



HAL
open science

Utilisation d'acides boroniques pour l'assemblage et le contrôle d'acides nucléiques fonctionnels

Mégane Debiais

► **To cite this version:**

Mégane Debiais. Utilisation d'acides boroniques pour l'assemblage et le contrôle d'acides nucléiques fonctionnels. Chimie organique. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONT090 . tel-04416289

HAL Id: tel-04416289

<https://theses.hal.science/tel-04416289v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard (ED459)

Unité de recherche IBMM UMR 5247 CNRS-UM-ENSCM

Utilisation d'acides boroniques pour l'assemblage et le contrôle d'acides nucléiques fonctionnels

Présentée par **Mégane DEBIAIS-CORBIERE**

Le 17 décembre 2020

Sous la direction de **Michael SMIETANA**

Devant le jury composé de

M. Jean-Jacques VASSEUR, Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier

Mme. Dominique GUIANVARC'H, Professeur, Université Paris Sud

M. Marcel HOLLENSTEIN, Chargé de recherche, Institut Pasteur

M. Mathieu PUCHEAULT, Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux

M. Michael SMIETANA, Professeur, Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Avant-propos

Cette thèse est l'aboutissement de trois années de recherches effectuées à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron au sein de l'équipe ChemBioNAC, à l'Université de Montpellier. Ces travaux ont pu être réalisés grâce au soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Jean-Jacques Vasseur pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir permis d'effectuer ces trois années dans les meilleures conditions possibles grâce à sa disponibilité et sa bonne humeur. Ce sera toujours un plaisir de discuter avec vous, que ce soit lors d'un congrès ou d'une séance à Orthosport.

J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur Dominique Guianvarc'h de l'Université Paris Sud ainsi qu'au Docteur Marcel Hollenstein de l'Institut Pasteur pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'associe à ces remerciements le Docteur Mathieu Pucheault de l'Université de Bordeaux et le Docteur Jean-Jacques Vasseur de l'Université de Montpellier pour leur présence au sein du jury en tant qu'examineurs.

Je souhaiterais ensuite remercier mon directeur de thèse, le Professeur Michael Smietana, pour la confiance qu'il a eu en moi. Cela n'a pas toujours été facile, il y a eu des moments difficiles mais vous avez toujours cru en moi, vous m'avez toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et le travail a fini par payer. Merci pour vos précieux conseils et votre disponibilité, cela a été un réel plaisir pour moi de travailler avec vous. Ces trois années à vos côtés m'ont beaucoup appris dans tous les domaines et j'en sors nettement grandie.

Je souhaite également remercier le Professeur Sabine Müller de l'Institut de Biochimie de l'Université de Greifswald, en Allemagne, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant un mois dans le cadre d'une collaboration. Merci pour votre accueil, je garde un excellent souvenir de ce mois passé avec vous. Je tiens à remercier l'ensemble des membres de son équipe pour m'avoir intégrée dès le premier jour et en particulier Amandine pour son implication dans ce projet et pour m'avoir fait découvrir Berlin et les alentours de Greifswald.

Je remercie également le Docteur Carine Baraguey pour le temps qu'elle a consacré à mon étude RMN. Merci d'avoir pris le temps nécessaire pour tout m'expliquer et pour ton implication dans la correction de ce manuscrit. Je tiens aussi à remercier le Docteur Ivan Barvik de l'Institut de Physique de Prague, en République Tchèque, pour sa contribution à ce projet.

Merci à tous les membres de l'équipe ChemBioNAC, Françoise, Guillaume, Albert, François, Martine, pour leur accueil, leurs conseils et leur bonne humeur quotidienne. Petite pensée particulière à Christelle et Sonia qui nous ont fait l'honneur de manger avec nous tous les midis et avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie également tous mes collègues de laboratoire en commençant par Justine, ma voisine de bureau et de paillasse pendant ces trois ans qui a dû supporter mon fort caractère et ma musique à la paillasse, Mathieu qui m'a formé à l'HPLC et au synthé (tu crois qu'un jour j'aurai le droit au macaron que tu me promets depuis des mois ?), Florian l'expert en ARN qui m'a initiée aux gels d'électrophorèse, Mimouna qui nous a régalié avec ses pâtisseries orientales, Kévan qui m'a sauvé la mise plus d'une fois avec mon ordinateur, Mary Anne qui a veillé à ma glycémie durant cette dernière année, Rostom le pro des fléchettes, Théo le maestro de la coinche et le dernier arrivé Joris, sans oublier Marie notre petite stagiaire grenobloise avec qui j'ai pu partager quelques mois. Je tiens ensuite à remercier les membres de l'équipe NuEP qui m'ont adopté dès le premier jour notamment Lucie grâce à qui j'ai appris que je pouvais courir un semi-marathon même s'il m'a fallu (très) longtemps pour m'en remettre, Natacha l'éternelle enfant toujours là quand il faut, Thomas mon partenaire de musique au sublime déhanché, Rayane la commère, Manon la championne de poney, Vincent le maniaque et mon partenaire de pause Félix, bon courage c'est toi le prochain.

Enfin, je remercie tous mes amis proches pour leurs encouragements, leur soutien et grâce à qui j'ai pu décompresser et penser à autre chose que la thèse, en particulier les « vieilles » de mon équipe de hand de Jacou, Elorri, Canelle, Juliette, les Gigis, Elodie, Agathe, Alex, Hélène, Audrey. Une pensée particulière à ma meilleure amie Oceanne qui a toujours été là pour moi, même à distance. Je suis également obligée de remercier Julie, sans qui je ne serai pas en thèse aujourd'hui. Merci pour ton soutien infailible et tes précieux conseils. Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle vie californienne.

Je dédie ce travail à ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenue même s'ils n'ont jamais vraiment compris ce que je faisais mise à part de la chimie. Manon, merci pour avoir supporté mes sautes d'humeur, surtout ces derniers mois, et pour avoir su me redonner le sourire quand il le fallait. Maman, beau papa, merci pour tout.

Sommaire

Abréviations	7
Introduction générale	9
Chapitre 1 : État de l’art sur les split aptamères, split DNAzymes et split ribozymes	17
1.1 Introduction et contexte	19
1.2 Split aptamères à base d’ADN.....	24
1.2.1 Split aptamères de l’ α -thrombine humaine.....	24
1.2.2 Split aptamères de l’adénosine et de l’adénosine triphosphate (ATP)	29
1.2.3 Split aptamère de la cocaïne	33
1.3 Split aptamères à base d’ARN.....	39
1.3.1 Split aptamère Spinach	41
1.3.2 Split aptamère Broccoli	44
1.4 Split ribozymes	47
1.5 Split DNAzymes.....	50
1.6 Limites des systèmes divisés	54
1.7 Conclusion du chapitre 1	56
Chapitre 2 : Développement de nouveaux split DNAzymes modifiés par des acides boroniques	57
2.1 Introduction et contexte	59
2.2 Synthèse des phosphoramidites modifiés par des acides boroniques.....	68
2.2.1 Synthèse multi-étapes de T ^{Bn}	68
2.2.2 Synthèse multi-étapes de U ^{Bn}	73
2.2.2.1 Protection 2’-PivOM	73
2.2.2.2 Protection 2’-TBDMS	74
2.2.3 Synthèse des autres dérivés boroniques.....	77
2.3 Synthèse des séquences modifiées.....	77
2.3.1 Chimie classique des phosphoramidites	77
2.3.2 Chimie click.....	79
2.4 Étude de l’activité des split DNAzymes.....	82
2.4.1 Étude de l’activité du DNAzyme parent.....	82
2.4.1.1 Étude par HPLC.....	82

2.4.1.2	Étude par fluorescence.....	86
2.4.1.3	Étude par PAGE	91
2.4.2	Étude de l'activité des split DNAzymes modifiés par des acides boroniques	92
2.4.2.1	Étude par PAGE	92
2.4.2.1.1	DNAzyme parent.....	94
2.4.2.1.2	Split DNAzyme 1	95
2.4.2.1.3	Split DNAzyme 2	97
2.4.2.1.4	Split DNAzyme 3	100
2.4.2.1.5	Split DNAzyme 4	103
2.4.2.1.6	Split DNAzyme 5	106
2.4.2.1.7	Système dynamique et programmable en fonction du pH.....	110
2.4.2.2	Étude par fluorescence (FRET)	111
2.5	Étude de l'activité des split ribozymes	113
2.6	Conclusion et perspectives du Chapitre 2.....	116
Chapitre 3 : Borylation d'acides nucléiques		119
3.1	Introduction et contexte	121
3.2	Borylation par réaction de CuAAC	127
3.2.1	Incorporation d'une fonction acide boronique à l'extrémité 5'	128
3.2.2	Incorporation d'une fonction acide boronique en position 2'	134
3.3	Hydroboration d'alcènes et alcynes.....	139
3.3.1	Hydroboration d'alcènes.....	140
3.3.2	Hydroboration d'alcynes	148
3.3.2.1	Optimisation des conditions de réaction.....	148
3.3.2.2	Fonctionnalisation des oligonucléotides modifiés.....	153
3.4	Conclusion du Chapitre 3	155
Chapitre 4 : Auto-assemblages bioinspirés à base de borono-uridine.....		157
4.1	Introduction et contexte	159
4.2	Étude de l'auto-assemblage par RMN.....	164
4.2.1	Synthèse du monomère borono-uridine.....	164
4.2.2	Oligomérisation de la borono-uridine en solvant organique anhydre	165
4.2.3	Oligomérisation de la borono-uridine dans le DMF-d ₇ en présence d'eau ..	167
4.2.4	Caractérisation des structures par RMN DOSY ¹ H.....	169
4.2.4.1	Principe de la RMN DOSY ¹ H	169
4.2.4.2	Détermination de la structure par RMN DOSY ¹ H	170

4.2.4.3	Analyse des dimères et trimères de référence par RMN DOSY ^1H	173
4.2.4.3.1	Synthèse des oligonucléotides	173
4.2.4.3.2	Analyse des oligonucléotides synthétisés par RMN DOSY ^1H	175
4.2.5	Étude de la conformation du résidu ribose	176
4.3	Auto-assemblage de la borono-uridine en milieu aqueux	180
4.4	Conclusion du chapitre 4	182
Chapitre 5 : Formation de nouveaux liens internucléosidiques de type oxazaborolidines		185
5.1	Introduction et contexte	187
5.2	Synthèse des séquences modifiées.....	193
5.3	Analyse des systèmes modifiés par dénaturation thermique	194
5.3.1	Modification de l'extrémité 3' du second brin par une aminouridine	195
5.3.2	Modification de l'extrémité 3' du second brin par une aminoadénosine	197
5.4	Conclusion du chapitre 5	201
Conclusion générale		203
Partie expérimentale		211
Bibliographie.....		257
Annexes.....		303

Abréviations

A	Adénosine	C	Cytidine
ABSA	Azide p-acétamidobenzène sulfonyle	CPG	Bille de verre à porosité contrôlée
ABTS	2,2'-azidobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre (I)
ACN	Acétonitrile	DBU	1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-ène
ADN	Acide désoxyribonucléique	DCE	Dichloroéthane
ADP	Adénosine diphosphate	DCM	Dichlorométhane
APS	Persulfate d'ammonium	DIEA	Diisopropyléthylamine
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique	DFHBI	3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidène
ARN	Acide ribonucléique	DMABI	4-diméthylaminobenzylidène
ARS	Alizarine Red S	DMF	N,N-diméthylformamide
ATMND	2-amino-5,6,7-triméthyl-1,8-naphtyridine	DMHBI	3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzylidène
ATP	Adénosine triphosphate	DMP	2,2-diméthoxypropane
ATT	6-aza-2-thiothymine	DMSO	Diméthylsulfoxyde
AuNP	Nanoparticule d'or	DMTCI	Chlorure de diméthoxytrityle
BBA	<i>N,N</i> -Bis((2-dihydroxyborono)benzyl)-lysinyglycine	DNAzyme	Désoxyribozyme
9-BBN	9-borabicyclo[3.3.1]nonane	DOSY	Diffusion ordered spectroscopy
Bcat	Catécholborane	DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
BHQ-1	Inhibiteur de fluorescence Black-Hole 1	EDTA	Acide éthylènediamine-tétraacétique
BMT	5-(benzylmercapto)-1 <i>H</i> -tétrazole	ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
BOR	Réactif de Bestmann-Ohira	FAM	Carboxyfluorescéine
B₂pin₂	Bis(pinacolato)diborane	Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
Bpin	Pinacolborane	FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
bpy	Bipyridine		
B-TTP	Borono-thymidinetriphosphate		
BSA	Acide benzènesulfonique		

Abréviations

G	Guanosine	RMN	Résonance magnétique nucléaire
GFP	Protéine fluorescente verte	Ru-SNP	Nanoparticule de silice conjuguée au ruthénium
HBI	Hydroxybenzylidène	SELEX	Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel
HMF	5-hydroxyméthylfurfural	Si@UCNP	Nanoparticule contenant un revêtement de silice
HPLC	Chromatographie liquide haute performance	SPAAC	Cycloaddition azide-alcyne dirigée par la tension de cycle
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution	T	Thymidine
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence	TBDMSCI	Chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthyl silyle
IBX	Acide iodobenzoïque	T^{Bn}	Borono-thymidine
LOD	Limite de détection	TCA	Acide trichloroacétique
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice – spectromètre de masse à temps de vol	TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
MIDA	Acide <i>N</i> -méthylimino-diacétique	THF	Tétrahydrofurane
MNAzyme	Enzyme d'acide nucléique multi-composante	THPTA	Tris(benzyltriazolylméthyl)-amine
NAD⁺	Dinucléotide nicotinamide adénine	T_m	Température de demi-fusion
Napht^{Bn}	Acide naphthalèneboronique	TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-éthylènediamine
NMI	<i>N</i> -méthylimidazole	TMGA	Azoture de tétraméthyl-guanidinium
NPOM	6-nitropipéronyloxyméthyl	TrPh^{Bn}	Acide triazole-phényl boronique
ODN	Oligodésoxyribonucléotide	U	Uridine
ORN	Oligoribonucléotide	U^{Bn}	Borono-uridine
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	UV	Ultraviolet
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne		
pH	Potentiel hydrogène		
Ph^{Bn}	Acide phénylboronique		
PivOM	Pivaloyloxyméthyl		
RCA	Amplification par réplication circulaire		

Introduction générale

Les acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN) font partie des trois grandes familles de biopolymères essentiels et communs à toute forme de vie connue et sont présents dans l'ensemble des cellules eucaryotes et procaryotes. Ces macromolécules biologiques résultent de la répétition de différents nucléotides, les principaux étant l'adénosine, la thymidine (remplacée par l'uridine dans le cas de l'ARN), la guanosine et la cytosine, reliés entre eux aux positions 5' et 3' du ribose ou désoxyribose par des liens phosphodiester. L'enchaînement croissant de nucléotides forme la séquence d'ADN ou d'ARN contenant l'information génétique.^{1,2} Bien que les oligonucléotides puissent exister sous la forme de simple brin, ils peuvent également s'auto-assembler avec un second brin pour former une double hélice *via* des interactions faibles supramoléculaires stabilisantes telles que les liaisons hydrogène (Figure 1). En effet, celles-ci sont notamment à l'origine de l'appariement de Watson-Crick³ entre les paires de bases adénosine-thymidine (ou uridine) et guanosine-cytidine, permettant de ce fait la reconnaissance spécifique entre brins dits complémentaires. Le double brin est de plus fortement stabilisé par des interactions π - π résultant de l'empilement des nucléobases azotées aromatiques. D'autre part, les charges négatives issues des groupements phosphates ont un rôle stabilisant pour la solvataion dans l'eau de la double hélice et permettent l'organisation des acides nucléiques sous la forme d'une double hélice dont la périphérie est hydrophile et le cœur hydrophobe. L'ensemble de ces interactions non covalentes et réversibles conduit à la formation de structures dynamiques et programmables.

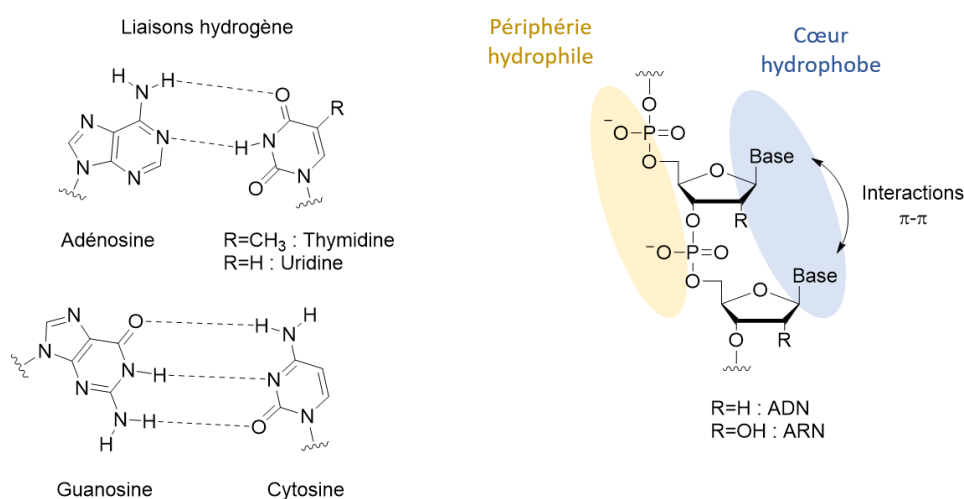


Figure 1: Interactions non covalentes mises en jeu au sein des acides nucléiques.

Les séquences d'acides nucléiques sont également connues pour adopter différentes structures bi- ou tridimensionnelles qui peuvent être utilisées dans le domaine des sciences bioanalytiques⁴

ou dans la conception de nanostructures.⁵ La structure tridimensionnelle la plus courante est un duplex composé de deux brins complémentaires mais il existe également des assemblages plus complexes tels que l'assemblage en épingle à cheveux, le triplex, le G-quadruplex, l'i-motif, l'enjambement ou encore la jonction à trois voies (Figure 2).⁶ Cette liste n'est toutefois pas exhaustive et d'autres types de structures peuvent être rencontrés. Ces assemblages spécifiques sont ainsi naturellement retrouvés dans le génome des organismes vivants, notamment dans les ARNs ribosomiques et de transfert, et semblent intervenir dans de nombreux processus cellulaires.

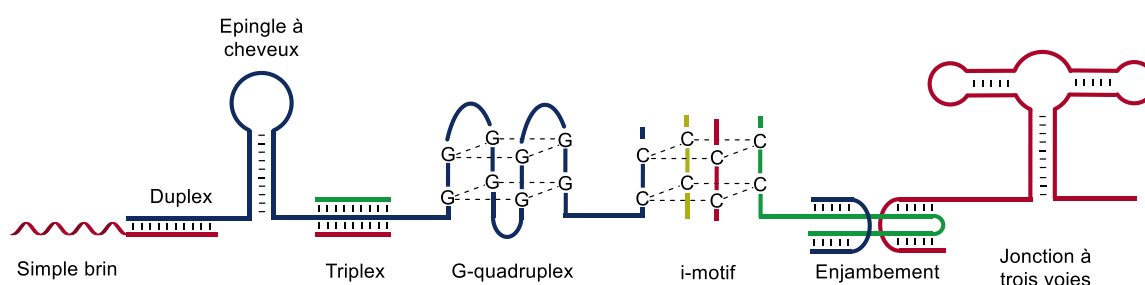


Figure 2: Différentes topologies des acides nucléiques.⁶

La connaissance des différentes interactions mises en jeu dans le repliement des simple brins ainsi que dans l'appariement des doubles brins permet d'adapter la nature de la séquence de l'oligonucléotide lors de la synthèse afin de limiter ou provoquer ces repliements. Ces systèmes peuvent par la suite être utilisés pour la détection de petites molécules et d'acides nucléiques complémentaires ainsi que pour permettre une interaction spécifique avec les processus biologiques naturels. Les oligonucléotides constituent ainsi un domaine très large avec de nombreuses applications thérapeutiques, de diagnostics ou dans le domaine des matériaux bioinspirés.⁷ Néanmoins, il peut être nécessaire de les modifier afin de répondre à certaines propriétés tant structurelles que fonctionnelles telles que la stabilité, la réversibilité ou encore l'efficacité de l'assemblage. Depuis plusieurs années, l'équipe ChemBioNAC (anciennement « Oligonucléotides modifiés ») a étudié la possibilité d'utiliser les esters boroniques en tant que mimes des phosphodiester naturels. En effet, les acides boroniques sont intéressants car ils possèdent une orbitale p vacante qui leur permet de réagir avec des centres donneurs d'électrons tels que les atomes d'oxygènes pour conduire à la formation d'esters boronates par déshydratation à travers la création de liaisons covalentes et réversibles (Figure 3).^{8,9} Ainsi, l'utilisation des acides boroniques a été récemment rapportée pour la ligation entre deux séquences d'acides nucléiques,¹⁰⁻¹⁵ la détection de molécules comportant des *cis*-diols et plus

particulièrement les glucides,^{16,17} ou encore pour la formation de nouveaux matériaux par auto-assemblage.¹⁸ De plus, la formation d'esters boronates ou de leurs dérivés est connue pour être sensible aux conditions environnantes et représente donc une stratégie intéressante pour développer des systèmes dynamiques et programmables. Dans ce contexte, l'équipe ChemBioNAC possède une expertise dans le domaine des oligonucléotides modifiés par du bore.^{10,11,14,15,19}

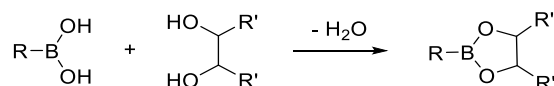


Figure 3: Formation d'esters boronates par déshydratation.

Ces travaux de thèse s'inscrivent ainsi dans la continuité de cette thématique de recherche et sont organisés en cinq chapitres comme suit (Figure 4):

Le Chapitre 1 est un état de l'art sur une classe particulière d'acides nucléiques que sont les aptamères et en particulier les split aptamères dont le brin parent est divisé en deux fragments non fonctionnels capables de se lier de façon spécifique à une molécule cible. Dans un premier temps, nous présenterons les différentes propriétés des split aptamères ainsi que leurs applications biologiques, notamment pour le développement de sondes sensibles permettant la détection de molécules variées. Nous nous intéresserons ensuite à un domaine très émergent concernant les split DNazymes et ribozymes qui sont de courts acides nucléiques possédant une activité catalytique permettant par exemple la coupure ou la ligation de substrats d'ARN. Les différentes structures ainsi que leurs principales applications en biologie moléculaire pour la détection d'acides nucléiques ou d'ions métalliques seront exposées.

Le Chapitre 2 a pour but d'étudier et de contrôler l'activité catalytique de différents split DNazymes dérivés du DNazyme **10-23** et modifiés par des acides boroniques. L'objectif principal porte ici sur le rétablissement de l'activité catalytique de tels systèmes grâce à la formation d'une jonction internucléosidique de type ester boronate entre un acide boronique et un partenaire *cis*-diol. Dans un premier temps, les conditions de réactions nécessaires à l'obtention d'une activité catalytique efficace du DNazyme parent ont été mises au point par HPLC puis le substrat d'ARN a été fonctionnalisé par un fluorophore à l'extrémité 3' afin de suivre la cinétique de réaction par fluorescence. Le DNazyme parent a ensuite été divisé à différentes positions et le premier fragment a été modifié à l'extrémité 5' par différents acides boroniques, à savoir la borono-thymidine et les acides phénylboronique, triazole-

phénylboronique et naphthalèneboronique. De plus, la désoxyribocytidine à l'extrémité 3' du second fragment a été remplacée par une ribocytidine constituant le partenaire *cis*-diol dans le but de former le nouveau lien internucléosidique boronate en présence du partenaire acide boronique. L'activité catalytique des différents systèmes divisés modifiés a ainsi été étudiée par gel d'électrophorèse et fluorescence et il s'avère que la formation de l'ester boronate entre les deux fragments permet de rétablir celle-ci de façon très efficace. Le système divisé modifié démontrant la meilleure activité catalytique par rapport au système sans acide boronique a alors été étudié à différents pH afin de développer un système programmable en fonction du pH. Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Sabine Müller à l'Universität Greifswald en Allemagne, ce concept a été étendu aux split ribozymes par Amandine Lelievre, doctorante de cette équipe.

Le Chapitre 3 expose le développement de différentes méthodologies pour introduire un acide boronique au sein de séquences d'acides nucléiques d'ADN et d'ARN permettant par la suite d'élaborer des bioconjugués dotés de nouvelles propriétés. Dans un premier temps, l'acide boronique protégé par un groupement pinacol ou acide *N*-méthyliminodiacétique (MIDA) a été inséré par la réaction de chimie click CuAAC (cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre(I)) à l'extrémité 5' de différentes séquences d'oligonucléotides modifiées par une fonction azoture. Cette même méthode a ensuite été appliquée à des séquences d'oligonucléotides dont un nucléotide 2'-propargyl-uridine a été incorporé à l'intérieur de la séquence. Dans un second temps, l'incorporation d'acides boroniques a été étudiée par hydroboration d'un alcène inséré à l'extrémité d'un oligonucléotide TTT. L'hydroboration d'alcyne a également été évaluée afin d'incorporer des acides boroniques vinyliques au sein de la séquence d'acide nucléique. Cette dernière méthode est particulièrement intéressante car l'oxydation de l'acide boronique incorporé permet l'obtention d'une fonction aldéhyde de manière rapide, simple et très efficace dans des conditions relativement douces, permettant par la suite le couplage de l'oligonucléotide modifié avec des alkoxyamines ou des hydrazines pour obtenir des conjugués oximes et hydrazones.

Le Chapitre 4 présente la formation covalente et réversible d'assemblages bioinspirés à partir d'un monomère borono-uridine, contenant à la fois un acide boronique en position 5' et un *cis*-diol en positions 2' et 3'. Les conditions nécessaires à l'auto-assemblage du monomère ont tout d'abord été mises au point dans le DMF- d_7 anhydre par un suivi RMN puis les deux espèces formées ont été analysées par RMN DOSY ^1H afin de déterminer leur structure précise. Par comparaison avec des dimères et trimères linéaires et cycliques de référence, nous avons pu

déterminer que les deux espèces formées par auto-assemblage correspondent à un dimère et un trimère cycliques. La conformation du résidu ribose dans le cas du dimère a ensuite été déterminée à partir des constantes de couplage. L'auto-assemblage de la borono-uridine a également été démontré dans le D₂O à pH basique. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Dr. Carine Baraguey, spécialiste RMN de l'équipe ChemBioNAC, et le Dr. Ivan Barvik de l'Institut de Physique de Prague.

Enfin, le Chapitre 5 décrit l'importance de la conformation du résidu ribose pour la formation d'un lien oxazaborolidine, dans lequel le partenaire *cis*-diol a été remplacé par un partenaire aminodiol. Pour cela, une séquence matrice a été synthétisée ainsi que deux brins complémentaires. Le premier contient une borono-thymidine à l'extrémité 5' et le second une riboadénosine ou une uridine dont l'hydroxyle en position 2' ou 3' est remplacé par une amine à l'extrémité 3'. La formation du lien internucléosidique modifié a été étudiée par dénaturation thermique et il s'avère que selon la position et la nature des substituants, le sucre peut adopter une conformation dite Nord ou Sud qui possède un rôle crucial sur la formation de ce type de liaisons internucléosidiques. Ainsi, seuls les nucléotides comportant la modification amine en position 3' possèdent une conformation Nord et sont capables de se lier à un acide boronique.

Pour finir, les principaux résultats obtenus, les perspectives ainsi que les potentielles applications de l'ensemble des systèmes développés seront résumés dans une conclusion générale.

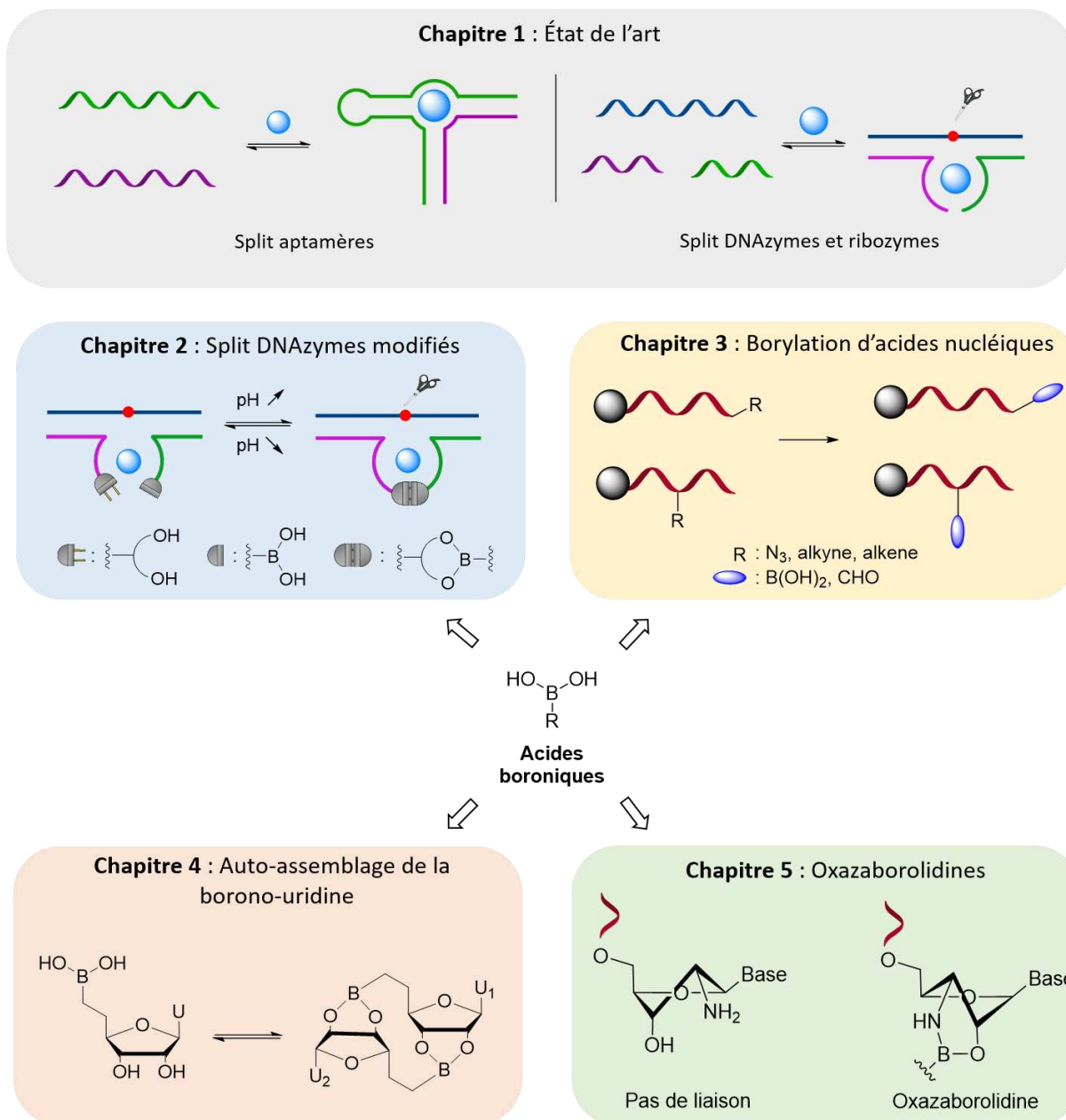


Figure 4: Schéma général des travaux réalisés au cours de cette thèse.

Chapitre 1 : État de l'art sur les split aptamères, split DNazymes et split ribozymes

1.1 Introduction et contexte

Outre le rôle bien connu de l'ADN et de l'ARN en tant que sources et transporteurs de l'information génétique, les séquences d'oligonucléotides sous la forme d'un simple brin sont capables de se lier à des molécules spécifiques avec une grande affinité et spécificité *via* des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogène.^{20,21} Ces acides nucléiques particuliers, appelés aptamères, ont ainsi suscité un grand intérêt pour la biologie et la médecine depuis leur découverte dans les années 1990s.^{22,23} Les aptamères sont obtenus par un processus de sélection *in vitro* appelé SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel), introduit pour la première fois par Tuerk et Gold en 1990 (Figure 5).²⁴⁻²⁶ Cette méthode consiste à sélectionner des séquences d'oligonucléotides à partir d'une librairie d'ADNs ou ARNs synthétiques dont les extrémités 5' et 3' sont connues et la séquence centrale aléatoire. Les séquences capables de se lier à un ligand donné avec une grande affinité sont ensuite isolées et amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le cycle de sélection est ensuite répété jusqu'à obtenir la meilleure affinité possible. Ainsi, les aptamères interagissent de façon spécifique avec une grande variété de cibles de nature différente telles que les petites molécules, les ions, les enzymes ou les protéines.

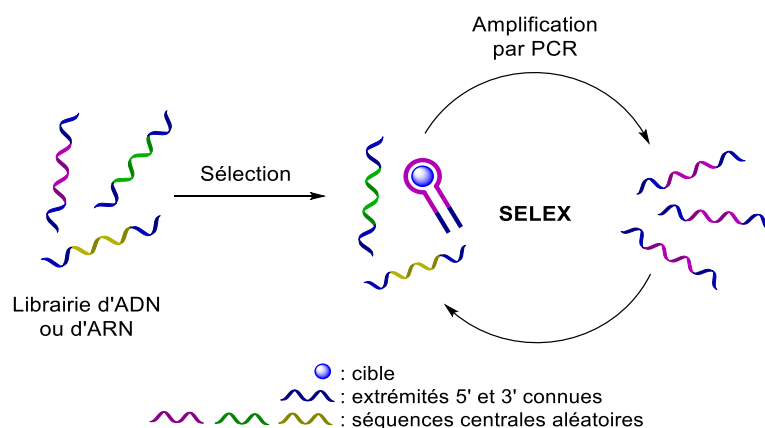


Figure 5 : Sélection *in vitro* des aptamères par SELEX.

Lors de la liaison avec la molécule cible, les aptamères subissent un changement de conformation conduisant ainsi à une structure tridimensionnelle bien définie responsable de la spécificité observée.^{27,28} L'architecture la plus commune est celle dite en épingle à cheveux, pour laquelle le site de liaison est situé à l'intérieur de la boucle (Figure 6). Il existe également d'autres architectures telles que la jonction à trois voies, comprenant le site de liaison à la

jonction entre les trois brins, ou encore l'épingle à cheveux avec une boucle interne, cette dernière constituant le site de liaison.

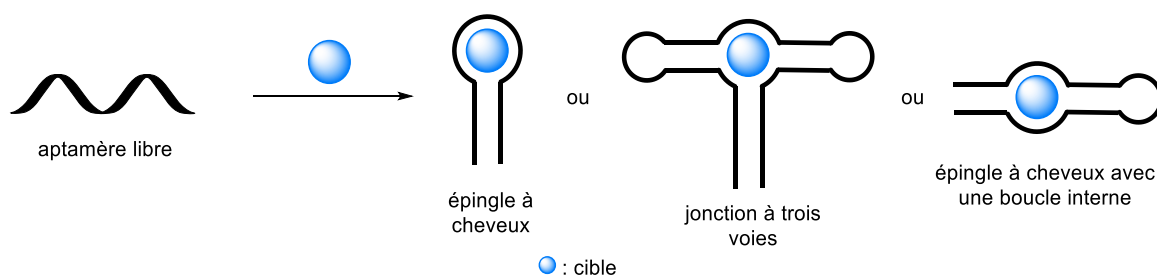


Figure 6 : Différentes architectures adoptées par les aptamères en présence de la cible.

De par leur facilité d'obtention, les aptamères sont des outils très attractifs pour la reconnaissance de cibles²⁹⁻³¹ dans le cadre d'applications thérapeutiques,^{22,29,32} de diagnostics³³ ou analytiques.³⁴ De plus, après l'étape de sélection SELEX, les aptamères sont facilement modifiables pour améliorer leur stabilité envers les nucléases³⁵ ou encore pour les conjuguer avec différents partenaires (fluorophores, sondes spécifiques, biomolécules lipophiles ou cationiques, etc...).^{29,36,37} Leur capacité à passer d'une conformation aléatoire à une structure organisée en présence d'une cible spécifique a ainsi été largement exploitée pour la formation de sondes fluorescentes.^{30,38,39} Cependant, l'utilisation des aptamères est limitée, majoritairement à cause de leur dégradation en milieu cellulaire par les nucléases.⁴⁰ Par ailleurs, le nombre de charges négatives, généralement compris entre 20 et 60, entrave la pénétration intracellulaire. Enfin, les longs aptamères peuvent former des structures secondaires défavorables, telles que les épingles à cheveux par exemple, entraînant des signaux faux-positifs ou non spécifiques.

Pour pallier ces limitations, des split aptamères, plus courts, ont récemment été développés. Ils présentent l'avantage d'être plus faciles à synthétiser, de générer moins de structures secondaires non souhaitées et contiennent moins de charges négatives.⁴¹ Pour cela, l'aptamère parent est découpé en plusieurs fragments indépendants et non fonctionnels pouvant s'assembler de façon sélective en présence d'une cible spécifique (Figure 7). L'assemblage des différents fragments est favorisé par l'établissement d'interactions non covalentes et réversibles de type liaisons hydrogène ou interactions électrostatiques entre la cible et le split aptamère permettant de modifier l'équilibre thermodynamique. De plus, la stabilité de la structure résultante peut être améliorée en fonctionnalisant l'extrémité des différents brins avec des fonctions chimiques réactives qui, après assemblage, peuvent les lier de façon covalente. En

effet, l'assemblage dirigé à travers une cible favorise le rapprochement des deux groupements fonctionnels et de fait la formation d'un lien internucléosidique modifié supplémentaire. À ce jour, parmi la centaine d'aptamères découverts, seules quelques études ont rapporté la conception de split aptamères pour lesquels l'aptamère parent a été découpé efficacement, c'est-à-dire sans affecter les interactions avec la cible étudiée.^{42,43} En effet, la difficulté de coupure est intimement liée à la nécessité de conserver la structure tridimensionnelle de l'aptamère parent, pouvant être perturbée si la division n'est pas effectuée à une position optimale. Celle-ci doit donc être préférentiellement réalisée au niveau d'une boucle afin de ne pas entraver l'établissement des interactions non covalentes entre les différents brins et donc la formation du duplex. Au sein des aptamères possédant une structure en épingle à cheveux, la boucle constitue le site de liaison avec la molécule cible et la coupure entraîne inévitablement une forte perturbation de la structure tridimensionnelle résultante. En revanche, les aptamères comprenant une structure de type jonction à trois voies ou épingle à cheveux avec une boucle interne peuvent être facilement coupés au niveau de la boucle externe sans affecter le système aptamère-cible.²⁷

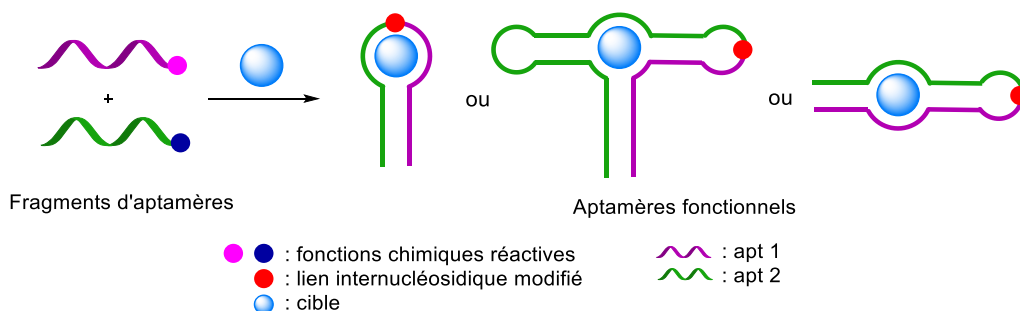


Figure 7 : Assemblage de split aptamères.

Enfin, il a été démontré que certaines séquences d'acides nucléiques sous la forme de simple brin expriment une activité catalytique grâce à leur repliement formant une cavité capable de se lier à un ligand à travers plusieurs interactions faibles de type liaisons hydrogène pour catalyser diverses réactions.⁴⁴⁻⁴⁶ Cette propriété a notamment été exploitée pour la détection de molécules ainsi que pour des applications nanobiotechnologiques.⁴⁷⁻⁵⁰ En effet, des séquences d'ARN, appelées ribozymes, catalysent un grand nombre de réactions grâce à leur structure tridimensionnelle stabilisée par des liaisons hydrogène, des interactions π - π ainsi que par une coordination métal-ion.⁵¹ Les ribozymes peuvent également reconnaître des substrats d'ARN spécifiques et catalyser la coupure d'une liaison phosphodiester par une réaction de transestérification en présence d'un ion métallique (Figure 8A) ou, *a contrario*, lier deux

fragments d'un substrat spécifique (Figure 8B). Parmi les ribozymes naturels, on retrouve les introns catalytiques de groupe I,⁵² les RNase P,⁵³ le ribozyme en tête de marteau^{54,55} et le ribozyme en épingle à cheveux.⁵⁶ Les mécanismes et structures des ARNs catalytiques ont été largement étudiés afin de créer des outils pertinents pour des applications en biologie moléculaire, médecine ou analyse.⁵⁷ Pour cela, des ribozymes synthétiques ont été obtenus par des méthodes de sélection *in vitro* de type SELEX, cependant le processus classique doit être amélioré afin de sélectionner l'affinité mais également l'activité enzymatique.

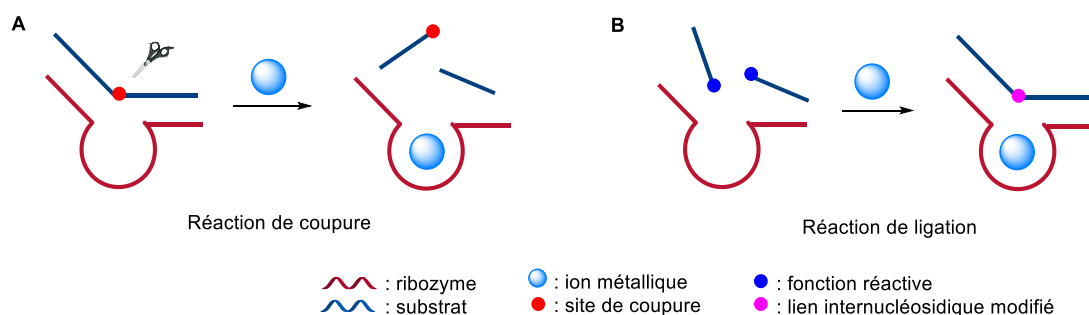


Figure 8 : Activités catalytiques des ribozymes : réactions de (A) coupure et (B) ligation.

Du fait des difficultés techniques rencontrées dans la synthèse chimique de longues séquences d'ARN, notamment en raison de leur grande sensibilité, les ribozymes ont été divisés en deux fragments capables de s'auto-assembler en présence d'un ion métallique donné. Ces split ribozymes ont alors permis le développement de systèmes plus sensibles et spécifiques pour la détection de séquences d'acides nucléiques ou d'ions métalliques.

De la même façon, les séquences d'ADN appelées DNAzymes catalysent des coupures ou des ligations de brins mais également une grande variété de réactions de modifications covalentes de substrats d'ARN et d'ADN.⁵⁸ Il existe différents types de DNAzymes mais les plus abondants sont les ribonucléases catalysant la coupure d'une liaison phosphodiester au niveau d'un ribonucléotide par une réaction de transestérification.⁵⁹ Cependant, ces structures n'existent pas dans la nature et sont donc obtenues de manière synthétique par le processus SELEX modifié. De manière générale, les DNAzymes sont composés d'un site catalytique, constituant le site de liaison de l'ion métallique, entouré de deux brins d'acides nucléiques responsables de la reconnaissance du substrat d'ARN à détecter. Les DNAzymes les plus étudiés sont le **8-17** et le **10-23** de par leur petite taille et leur activité catalytique satisfaisante en conditions physiologiques (Figure 9).⁶⁰ À l'inverse des réactions de coupure, les analogues de ligases permettent de lier différentes séquences d'oligonucléotides, mais ils restent moins

étudiés que les ribonucléases.⁶¹ L'utilisation des DNAzymes est en perpétuelle expansion et l'étendue des réactions catalysées par l'ADN ainsi que leurs applications en biochimie ont récemment fait l'objet de plusieurs revues par les principaux groupes de recherche de ce domaine.^{48,49,59,62-65,47}

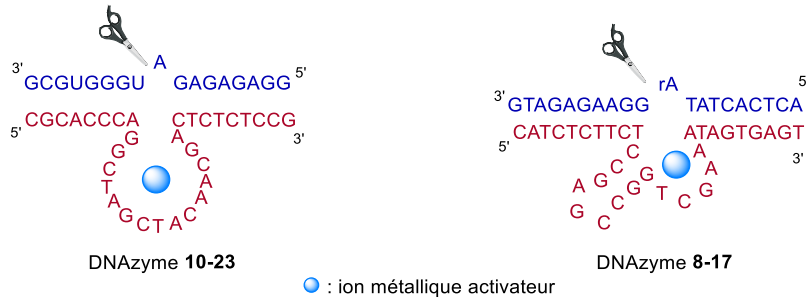


Figure 9: Structures des DNAzymes **10-23** et **8-17**.

Étant donné les avantages offerts par les split aptamères, les split DNAzymes ont naturellement émergé, notamment en tant que nouvelles sondes biologiques fonctionnelles. Ces architectures, initialement appelées MNAzymes (enzymes d'acides nucléiques multicomposantes), sont composées de plusieurs séquences d'oligonucléotides capables de s'assembler en un DNAzyme actif en présence d'un brin activateur (Figure 10A).⁶⁶ Les MNAzymes ont ensuite évolué en split DNAzymes, pour lesquels la structure active est formée en présence d'un ion métallique activateur de la même façon que les DNAzymes parents (Figure 10B). Ces nouveaux systèmes ont ainsi prouvé leur efficacité pour la détection de séquences d'acides nucléiques viraux et de mésappariements, c'est-à-dire la présence de deux bases non complémentaires au sein de la double hélice, responsables d'anomalies génétiques.⁶⁷⁻⁷¹

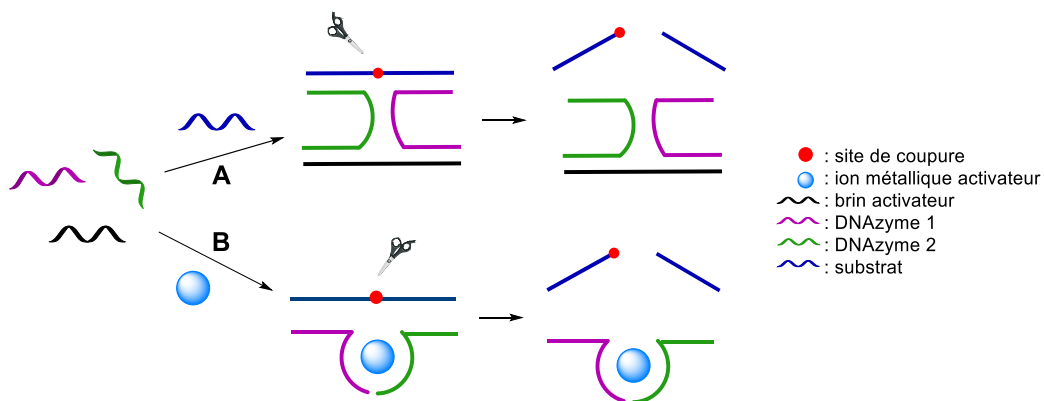


Figure 10 : Schéma général du fonctionnement des (A) MNAzymes et (B) split DNAzymes activés par un ion métallique.

Cependant, comparativement au grand nombre d'études relatant l'utilisation de split aptamères, seulement quelques-unes se sont intéressées à l'utilisation de split ribozymes ou split DNAzymes. Ainsi, ce chapitre exposera tout d'abord la conception de split aptamères pour le développement de sondes sensibles permettant la détection de molécules variées. Le sujet sera ensuite étendu aux premières études démontrant l'intérêt des split ribozymes et DNAzymes pour la détection d'acides nucléiques ou d'ions métalliques. Enfin, les limites de tels systèmes et les perspectives envisagées pour de futures améliorations seront décrites.

Par ailleurs, bien que la dénomination ne soit pas exacte dans la langue française, le terme « split aptamère », en référence à « split aptamer », sera préféré à « aptamère divisé » et sera utilisé tout au long de ce manuscrit de thèse.

1.2 Split aptamères à base d'ADN

Parmi la multitude de split aptamères à base d'ADN reportés dans la littérature, les systèmes permettant la détection de l' α -thrombine humaine, de l'adénosine et/ou adénosine triphosphate (ATP) et de la cocaïne sont les plus étudiés. Leur nature, propriétés, mécanismes d'actions ainsi que quelques applications sont présentés dans la suite de ce paragraphe.

1.2.1 Split aptamères de l' α -thrombine humaine

La thrombine, également appelée facteur de coagulation, est une sérine protéase de type trypsine qui joue un rôle essentiel au niveau du système sanguin, notamment comme régulateur de la circulation sanguine (hémostase) ou déclencheur de réactions de coagulation (thrombose).^{72,73} Elle existe sous plusieurs formes (α , β , γ) mais l' α -thrombine est celle qui possède l'activité la plus importante au niveau physiologique, notamment pour l'agrégation plaquettaire.⁷⁴ Cette dernière représente donc une cible majeure pour les traitements anticoagulants et maladies cardiovasculaires.

L'aptamère à base d'ADN inhibiteur de l' α -thrombine humaine a été isolé par Bock *et al.* en 1992 et obtenu par sélection *in vitro* (SELEX) après cinq cycles de sélections.²¹ Les 32 séquences d'oligonucléotides capables de se lier à l' α -thrombine cible sont chacune composées de 60 nucléotides enchaînés de façon aléatoire ainsi que d'une partie fixe, de 14 à 17 nucléotides, formant le site de liaison. Cette dernière est responsable de l'inhibition d'activité de la cible. Le site de liaison permettant la meilleure affinité envers la cible en présence d'ions potassium est composé de 15 nucléotides et constitue l'aptamère appelé **60-18[15]** (Figure

11).⁷⁵⁻⁷⁷ Des études par spectroscopie RMN et cristallographie aux rayons X ont révélé que cet aptamère forme une structure compacte composée d'une cavité G-quadruplex interne d'orientation antiparallèle ainsi qu'une conformation de type chaise.^{75,78} Cet aptamère a ensuite été modifié afin d'améliorer l'affinité avec la molécule cible. La nouvelle séquence obtenue, appelée **60-18[29]**, est composée d'une structure G-quadruplex antiparallèle dont les extrémités ont été allongées de 4 à 7 paires de bases complémentaires pour former un duplex (Figure 11).^{79,80} Des études ont montré que la nature et la sélectivité du site de liaison dépendent de l'orientation du site actif ainsi que du quatrième nucléotide du G-quadruplex représenté en rouge sur la Figure 11.⁸⁰⁻⁸²

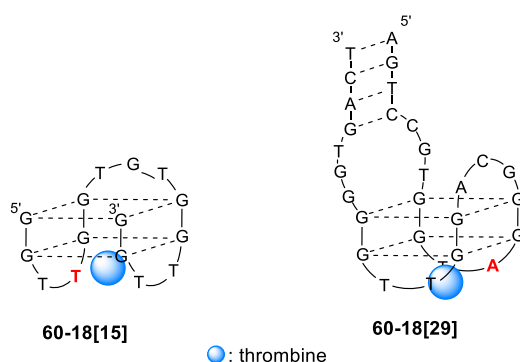


Figure 11 : Structure tridimensionnelle des deux principaux aptamères à base d'ADN avec les nucléotides déterminant le site de liaison en rouge.

Plusieurs aptamères fluorescents très sensibles et capables de détecter l' α -thrombine jusqu'à des concentrations de l'ordre du picomolaire ont par la suite été décrits.⁸³⁻⁸⁶ Mais dans le but de développer des sondes biologiques plus spécifiques et de s'affranchir des signaux faux-positifs, les aptamères ont été remplacés par des split aptamères conjugués avec différents types de molécules permettant d'amplifier le signal de détection. En effet, Liu *et al.* ont développé une nouvelle stratégie de détection d' α -thrombine par fluorescence en utilisant un polymère polycationique hydrosoluble capable d'émettre un signal fluorescent ainsi que l'aptamère **60-18[15]** divisé en deux fragments.⁸⁷ L'extrémité d'un des deux fragments est fonctionnalisée avec la fluorescéine afin de pouvoir visualiser la liaison avec la molécule cible par fluorescence. En l'absence d' α -thrombine, les deux fragments se lient au polymère *via* de fortes interactions électrostatiques provoquant un intense signal fluorescent (Figure 12). En revanche, la présence de la protéine cible entraîne la formation de structures de type G-quadruplex, atténuant l'interaction entre le polymère et le fluorophore et donc une diminution du signal observé. Comparé à l'aptamère parent correspondant, cette stratégie de split aptamère permet

d'augmenter la possibilité de former des structures G-quadruplex par ajout de thrombine. La sensibilité des systèmes est évaluée par la mesure de la limite de détection (LOD), c'est-à-dire la plus faible concentration de l'analyte, ici l' α -thrombine, à pouvoir être détectée par le système.⁸⁸ Dans cette étude, une concentration minimale de 2 nM en α -thrombine a pu être déterminée par le système split aptamère-polymère. Une approche similaire a par la suite été mise au point par les mêmes auteurs en utilisant un support d'oxyde de graphène sur lequel est adsorbé le même split aptamère.⁸⁹ Ce type de support offre l'avantage d'adsorber facilement les simple brins d'ADN et de présenter des propriétés d'inhibition de fluorescence associées à une conductivité électronique et thermique.^{90,91} En l'absence de la protéine cible, les deux fragments du split aptamère sont adsorbés sur le support *via* des interactions non-covalentes de type π - π , induisant ainsi une inhibition de la fluorescence. L'ajout d' α -thrombine entraîne la formation de structures G-quadruplex et la restauration de la fluorescence avec une sensibilité de l'ordre du nanomolaire (LOD = 1 nM), ce qui reste toutefois inférieur à la limite de détection obtenue avec l'aptamère parent (de l'ordre du picomolaire).^{84,85}

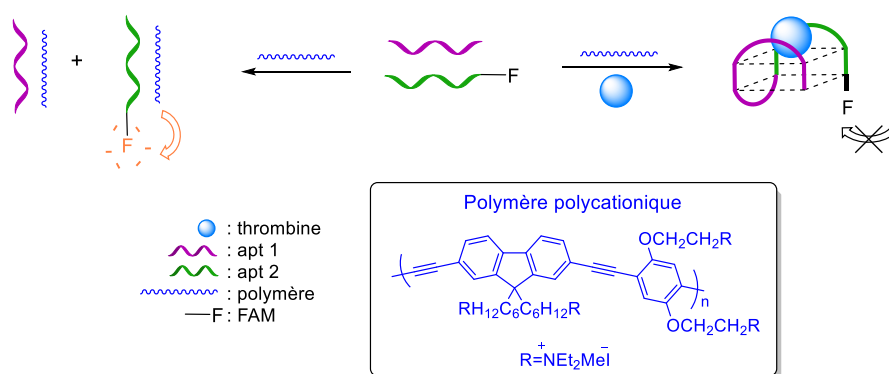


Figure 12 : Détection d' α -thrombine par conjugaison du split aptamère issu de **60-18[15]** avec un polymère cationique.

Ainsi, une méthode combinant fluorescence et colorimétrie plus sensible a été développée.⁹² Elle est basée sur l'utilisation de deux fragments issus de l'aptamère **60-18[15]** précédemment décrits. Ces derniers sont modifiés avec une extension polyadénosine à l'extrémité 5' ou 3' puis sont adsorbés sur des nanoparticules d'or (AuNPs) par des interactions faibles. Un des fragments est préalablement hybridé avec un brin complémentaire contenant une sonde fluorescente pour former un duplex. En l'absence d' α -thrombine, l'hybridation entre ces deux brins est maintenue et conduit à l'inhibition de la fluorescence par l'AuNP qui absorbe l'émission de fluorescence du fluorophore (Figure 13).⁹³ De plus, la forte répulsion électrostatique entre les brins d'acides nucléiques et les AuNPs empêche leur agrégation,

donnant une couleur rouge à la solution. L'ajout de l' α -thrombine provoque la formation de structures G-quadruplex par élimination de la sonde fluorescente, entraînant l'agrégation des AuNPs entre elles. La sensibilité de reconnaissance de l' α -thrombine par le split aptamère peut alors être mesurée par le changement de couleur de la solution qui passe de rouge à bleue (LOD = 0,45 nM) ainsi que par l'augmentation de la fluorescence (LOD = 0,16 nM). Cette stratégie basée sur une double détection permet ainsi de différencier l' α -thrombine de ses analogues, incapables de se lier à l'aptamère par manque d'affinité, dans les échantillons de sérum humain.

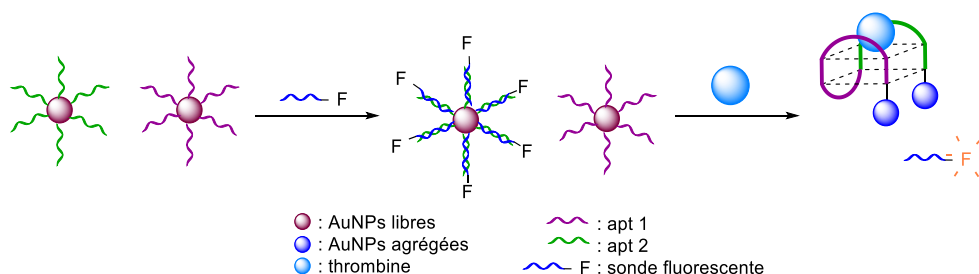


Figure 13 : Détection d' α -thrombine par fluorescence et colorimétrie.

La détection de l' α -thrombine par des split aptamères a également été étudiée par électrochimiluminescence, phénomène qui permet d'émettre de la lumière lorsque des espèces à la surface d'une électrode sont impliquées dans un transfert d'électrons. Cette technique suscite un grand intérêt pour l'analyse de biomolécules car elle est efficace, sensible et possède un large champ d'applications, notamment pour le diagnostic ou l'analyse. Lin *et al.* ont appliqué cette méthodologie à partir de l'aptamère parent **60-18**[15] et des nanoparticules de silices conjuguées avec le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (Ru-SNP), un luminophore.⁹⁴⁻⁹⁶ Ainsi, l'aptamère **60-18**[15] a été divisé en deux fragments différents pour lesquels le premier est fonctionnalisé avec un alcanethiol à l'extrémité 5' puis immobilisé sur une électrode d'or *via* des interactions faibles Au-S. Le second fragment est modifié par une fonction amide à l'extrémité 3' puis couplé à une Ru-SNP.⁹⁶ En l'absence de la protéine cible, les deux fragments sont dissociés et conduisent à un signal électrochimiluminescent relativement faible. En revanche, l'ajout d' α -thrombine permet la formation de structures G-quadruplex et entraîne l'interaction des Ru-SNPs avec la surface de l'électrode, résultant en une oxydation électrochimique du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ qui se traduit par l'augmentation du signal électrochimiluminescent (Figure 14). En plus d'être très sensible (LOD = 0,2 pM), cette méthode permet d'explorer de nouvelles stratégies de détection basées sur les split aptamères.

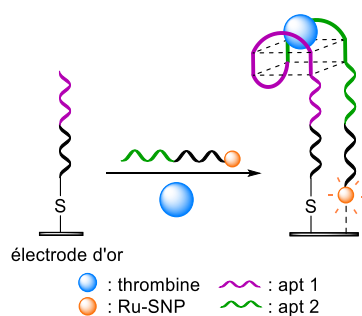


Figure 14 : Principe de la détection d' α -thrombine par électrochimiluminescence en utilisant des complexes Ru-SNP.

À l'inverse des méthodes précédemment décrites requérant la fonctionnalisation des split aptamères par des fluorophores, la détection électrochimique a été développée avec succès pour s'affranchir de cette contrainte. En effet, Fan *et al.* ont exposé une nouvelle technique basée sur la grande affinité des polyadénosines pour les AuNPs.^{93,97-99} Pour cela, les auteurs ont utilisé une séquence polyadénosine comme bloc d'ancrage afin d'immobiliser un des fragments du split aptamère **60-18[15]** à la surface d'une électrode d'or (Figure 15). L'addition d' α -thrombine ainsi que du second fragment, également prolongé par une courte séquence de polyadénosine, permet la formation de la structure G-quadruplex. L'extension polyadénosine de ce second brin est alors soumise à un phénomène d'amplification par réplication circulaire (RCA). Ce processus consiste à dupliquer l'ADN pour conduire à plusieurs copies d'ADN identiques et ainsi allonger la séquence. Dans ce cas, la RCA conduit à une longue séquence constituée d'une répétition d'adénosine. Les AuNPs sont ensuite ajoutées et adsorbées à la surface de la sonde aptamère *via* les interactions polyadénosine-AuNPs. Enfin, l'addition de peroxyde d'hydrogène entraîne un transfert d'électrons dû à la conductivité des AuNPs et permet la détection de l' α -thrombine par augmentation du signal électrochimique. Ce système possède ainsi une sensibilité remarquable avec une LOD de 35 fM. De plus, des analyses sur des échantillons réels ont démontré qu'il est aussi efficace et sélectif que des essais de type ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) commerciaux utilisés pour la détection de diverses molécules.

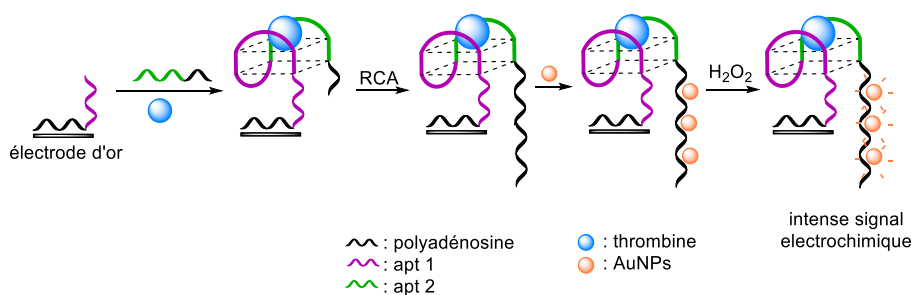


Figure 15 : Principe de détection électrochimique de l' α -thrombine basée sur la RCA.

La découverte de ces aptamères de l' α -thrombine a ainsi conduit à la conception de nouveaux systèmes plus sensibles et plus sélectifs grâce à la division de l'aptamère parent en deux fragments. Parallèlement, un aptamère capable de détecter l'adénosine ou l'ATP a été isolé puis divisé afin de développer des systèmes plus performants.^{100–106}

1.2.2 Split aptamères de l'adénosine et de l'adénosine triphosphate (ATP)

L'ATP, découverte en parallèle par Lohmann, Fiske et Subbarow en 1929,^{107,108} est impliquée dans de nombreux processus biologiques et de signalisation cellulaire. La dérégulation de l'ATP est notamment associée à de nombreux troubles tels qu'une diminution de l'apport sanguin artériel à un organe, une hypoglycémie ou encore l'apparition de la maladie de Parkinson ou de tumeurs malignes. Sa détection est donc particulièrement importante pour le traitement de ces maladies.

Le premier aptamère de l'ATP a été isolé par Sassanfar et Szostak en 1993 par sélection SELEX *in vitro*. Cet aptamère à base d'ARN est composé de 40 nucléotides dont l'architecture est en épingle à cheveux avec une boucle interne de 11 nucléotides (Figure 16A).¹⁰⁹ Quelques années plus tard, Szostak et Huizenga ont isolé un aptamère à base d'ADN de 25 nucléotides comprenant une structure G-quadruplex interne pour la reconnaissance d'adénosine et/ou d'ATP (Figure 16B).⁴¹ Sans le définir clairement en tant que split aptamère, les auteurs ont alors démontré qu'il est possible de diviser cet aptamère en deux fragments en supprimant la thymidine T13 qui ferme la tige 2 et en allongeant chaque fragment de quelques nucléotides afin de compenser la perte de stabilité (Figure 16C). Tels quels, les fragments sont incapables de lier l'adénosine ou l'ATP mais l'ajout de la molécule cible permet la formation de la structure active de type G-quadruplex. À notre connaissance, cet article est le premier à reporter l'utilisation de split aptamères même si aucune LOD n'a été déterminée.

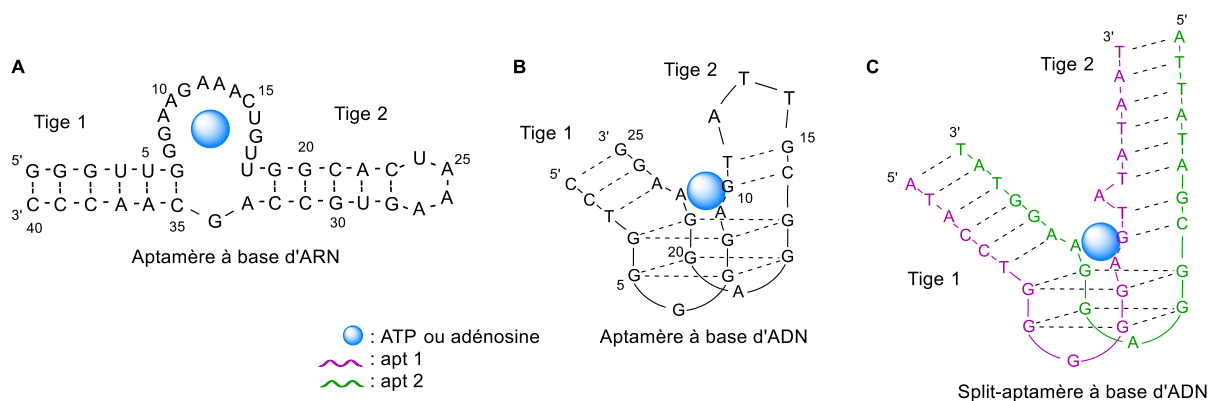


Figure 16: Différentes structures de l'aptamère à ATP ou adénosine : (A) aptamère à base d'ARN ou (B) d'ADN et (C) split aptamère à base d'ADN.

Ce split aptamère à base d'ADN a ensuite été utilisé afin de développer une méthode de détection pour l'adénosine n'impliquant aucun marqueur dans le but de limiter le signal de fond ainsi que le phénomène de blanchiment. Pour cela, une séquence polyadénosine est ajoutée à l'extrémité 5' du premier fragment pour servir de support à la polymérase du fragment Klenow (Figure 17).¹¹⁰ Ainsi, la polymérase est capable d'allonger l'extrémité du second fragment par une séquence de polythymidine, complémentaire du polyadénosine, lorsque les deux fragments sont assemblés pour former un duplex d'ADN stable. Cet assemblage est observé par l'ajout dans la solution du fluorophore SYBR Green I qui, par intercalation entre deux brins d'ADN émet une fluorescence. En l'absence d'adénosine, les deux fragments ne sont pas capables de former un complexe suffisamment stable pour initier la polymérisation par la polymérase du fragment de Klenow et sont rapidement digérés par celle-ci. Par conséquent, le SYBR Green I ne peut s'intercaler dans le duplex d'ADN et la fluorescence résultante est très faible. En revanche, l'ajout d'adénosine permet l'assemblage stabilisé des deux brins et amorce la réaction de polymérase d'ADN. Une importante augmentation de fluorescence est alors observée. Cette méthode présente l'avantage de ne nécessiter aucune fonctionnalisation des brins par un fluorophore pour la détection de la molécule cible. Cependant, sa sensibilité reste similaire à celle des sondes développées avec l'aptamère parent (LOD = 12 μ M) et faible comparativement aux systèmes développés pour la détection de l' α -thrombine (LOD = 35 fM).⁹⁹

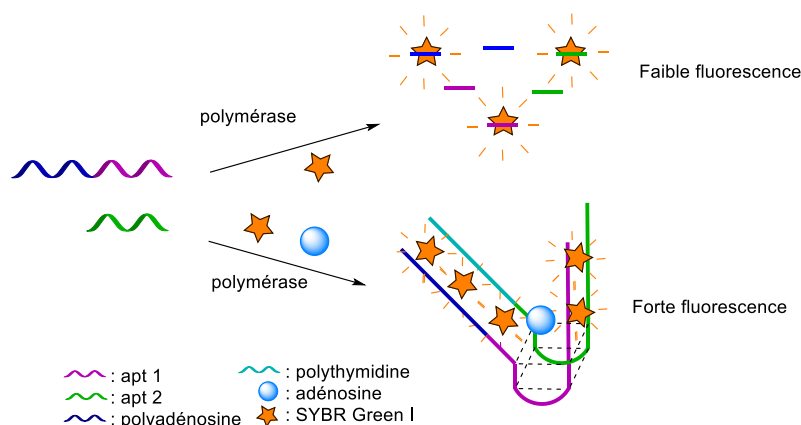


Figure 17 : Méthode sans marqueur utilisant un split aptamère, la polymérase du fragment Klenow et le SYBR Green I pour la détection d'adénosine.

Un système similaire au test ELISA dit en sandwich, qui consiste à piéger l'antigène d'intérêt entre deux anticorps spécifiques, a alors été développé afin d'augmenter la sensibilité ainsi que la sélectivité de l'aptamère envers l'ATP. Pour cela, He *et al.* ont utilisé le même split aptamère à base d'ADN (Figure 16C, page 30) et ont immobilisé l'extrémité 5' d'un des fragments sur des nanoparticules contenant un revêtement de silice (Si@UCNPs) par liaison covalente, ce dernier étant donneur d'énergie (Figure 18).¹¹¹ Le second fragment a été fonctionnalisé à l'extrémité 3' avec un inhibiteur de fluorescence, le BHQ-1. En l'absence d'ATP, les Si@UCNPs émettent une fluorescence verte et rouge tandis que l'addition d'ATP entraîne la formation d'un complexe de type sandwich par l'intermédiaire d'une structure G-quadruplex. Seule l'émission de fluorescence rouge est alors observée, l'émission de fluorescence verte étant sélectivement inhibée par le BHQ-1. Cette méthode est alors relativement sensible (LOD = 1,7 μ M) mais également très sélective car elle permet de distinguer l'ATP de ses analogues cytidine, uridine et guanosine triphosphate. De façon similaire, une méthode de détection de l'ATP très sensible basée sur une colocalisation de fluorescence bicolore du split aptamère a récemment été développée.¹¹² Ce système est notamment capable de détecter l'ATP avec une sensibilité très élevée (LOD = 100 fM) permettant d'éviter les signaux faux-positifs dus aux liaisons non spécifiques.

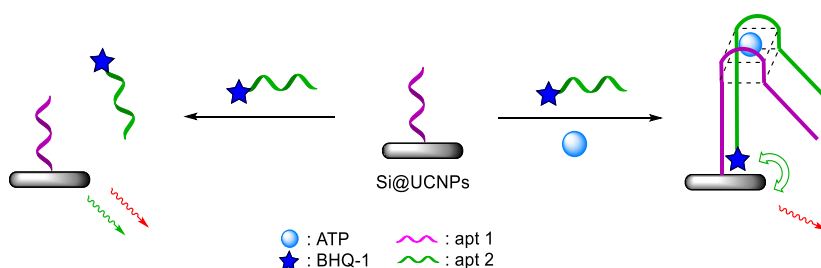


Figure 18 : Détection de l'ATP par un essai de type sandwich.

Dans le but de s'affranchir de la fonctionnalisation des fragments du split aptamère, des stratégies basées sur la spectroscopie de résonance de plasmon de surface ont été mises en place. Cette méthode a été très utilisée pour étudier l'interaction entre deux molécules ainsi que leur affinité car elle permet de détecter les variations de l'indice de réfraction à la surface de nanoparticules métalliques lorsqu'un ligand se lie à un récepteur adsorbé sur la surface d'une couche métallique.¹¹³⁻¹¹⁵ Cette variation est caractérisée par une bande d'absorption spécifique et variable en fonction de l'environnement diélectrique à la surface de la nanoparticule. Bien que cette technique sans marqueur et en temps réel soit très utilisée dans le cas de biomolécules, il est compliqué de l'appliquer à de petites molécules car le signal est proportionnel à la variation de la masse moléculaire. Elle a tout de même été appliquée à la détection d'adénosine. À partir du split aptamère précédemment décrit (Figure 16C, page 30), Wang *et al.* ont immobilisé le premier fragment au niveau de l'extrémité 5' sur un film d'or et le second fragment a été conjugué à une AuNP à l'extrémité 3' (Figure 19).¹¹⁶ En l'absence d'adénosine, les deux fragments sont incapables de s'assembler et aucune variation de la longueur d'onde de résonance n'est observée. En revanche, lorsque la molécule cible est ajoutée, les deux brins forment un complexe stable à la surface du film, induisant une variation de la longueur d'onde de résonance résultant du couplage électronique entre l'oscillation localisée des AuNPs et l'oscillation de surface du film d'or. La LOD de ce système, évaluée à 1,5 pM, couplée à l'absence de fluorophore en fait un système de choix pour la détection d'adénosine.¹¹⁷⁻¹¹⁹

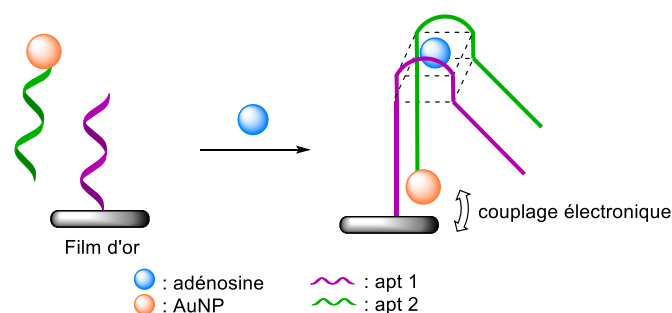


Figure 19 : Détection d'adénosine par spectroscopie de résonance de plasmon de surface.

Ces études ont démontré que la division d'un aptamère en deux fragments permet, en plus de faciliter la synthèse des oligonucléotides, d'améliorer la sensibilité du système envers une molécule cible donnée. Cependant, le coût entropique nécessaire à la formation du complexe split aptamère-cible est plus important que celui impliquant l'aptamère parent, résultant ainsi en règle générale à une plus faible stabilité de l'assemblage. Celle-ci peut toutefois être améliorée, notamment au niveau du duplex par l'allongement des fragments, comme évoqué précédemment. Une seconde alternative consiste à fonctionnaliser les extrémités des deux fragments par des fonctions chimiques capables de réagir entre elles pour former une liaison covalente. Cela a notamment été décrit dans le cas du split aptamère à cocaïne, également très étudié en tant que sonde biologique.^{43,120}

1.2.3 Split aptamère de la cocaïne

L'aptamère à cocaïne, découvert par Stojanovic *et al.* à la fin des années 1990s,¹²¹ possède une architecture de type jonction à trois voies avec trois tiges différentes (Figure 20). Les tiges 1 et 3 sont composées de six et quatre paires de base respectivement, dont deux non-canoniques entre bases non complémentaires. La tige 2 comporte cinq paires de base de type Watson-Crick. Cette dernière se trouve toujours sous la forme d'un duplex tandis que les tiges 1 et 3, en équilibre entre les conformations simple brin et double brin, ne forment un duplex stable qu'en présence de cocaïne.^{121,122} De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir la meilleure affinité entre la molécule cible et l'aptamère. Il apparaît ainsi qu'un pH de 7,4 est nécessaire afin que l'amine tertiaire de la cocaïne soit protonée et les groupements phosphates de l'ADN déprotonés. Cela permet en effet d'augmenter considérablement les interactions ioniques entre les deux entités. De plus, les paires de base G31/C6, G29/A21 et T19/A7 sont indispensables pour la liaison avec la cocaïne

car elles interagissent directement avec la cible et sont responsables de la formation de la structure secondaire aptamère-cible.

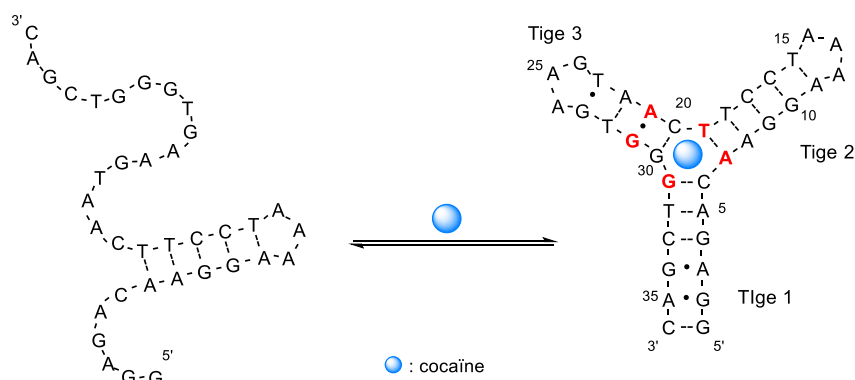


Figure 20 : Structure secondaire de l'aptamère à cocaïne. Les nucléotides essentiels à la liaison sont représentés en rouge.

La formation de l'assemblage en présence de cocaïne peut être détectée en fonctionnalisant l'aptamère par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence aux extrémités 5' et 3' respectivement. Lorsque l'aptamère est sous forme libre, les deux brins sont distants et émettent un signal fluorescent tandis que la présence de la molécule cible entraîne le rapprochement et l'hybridation des deux extrémités au niveau de la tige 1, inhibant de fait la fluorescence.^{121,123-129} Une méthode alternative consiste à diviser l'aptamère parent en deux fragments au niveau de la boucle de la tige 2 puis de les fonctionnaliser avec des fluorophores.¹²¹ Les stratégies précédemment évoquées dans le cas des aptamères de l' α -thrombine et de l'adénosine/ATP comme l'amplification,¹³⁰ la détection électrochimique de type sandwich¹³¹ ou encore l'utilisation de nanoparticules^{132,133} peuvent également être appliquées à la détection de la cocaïne.

Outre ces différentes méthodes, l'ADN peut être utilisé pour guider des réactions chimiques grâce aux interactions de type Watson-Crick entre les deux brins qui permettent de rapprocher les deux fonctions réactives et donc de faciliter la réaction en augmentant leur molarité effective.¹³⁴ Grâce à des conditions de réactions biocompatibles comme son efficacité en milieu aqueux, sa facilité de mise en œuvre et la formation de sous-produits inoffensifs,¹³⁵ la cycloaddition 1,3-dipolaire entre une fonction azoture et un alcyne terminal est largement appliquée aux acides nucléiques pour des applications biologiques, nanotechnologiques ou dans la conception de matériaux.¹³⁶ De manière générale, les réactions guidées par l'ADN sont dirigées par l'association de deux brins grâce aux interactions de type Watson-Crick¹³⁷ mais,

en 2011, Heemstra et Sharma ont démontré que l'assemblage pouvait être contrôlé à travers la formation d'un motif supplémentaire par cycloaddition azoture-alcyne dirigée par la tension de cycle (SPAAC).^{138,139} Cette réaction de chimie click est intéressante car l'alcyne contenu dans le cyclooctyne est déstabilisé par la tension de cycle. La réaction de cycloaddition est alors largement favorisée afin de diminuer la tension de cycle et ne nécessite pas l'utilisation de cuivre. Les auteurs ont fonctionnalisé le premier fragment du split aptamère de la cocaïne avec un cyclooctyne à l'extrémité 3' et le second avec une fonction azoture à l'extrémité 5'. Ainsi, en présence de cocaïne les deux brins peuvent s'assembler et, de par la proximité résultante des réactifs, la réaction de cycloaddition peut s'effectuer plus rapidement (Figure 22). Contrairement aux précédents systèmes décrits qui sont réversibles, la formation d'une liaison covalente implique une conformation figée. Cette nouvelle entité peut ensuite être visualisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (PAGE) grâce à la fonctionnalisation de l'extrémité 5' du premier fragment par un fluorophore.

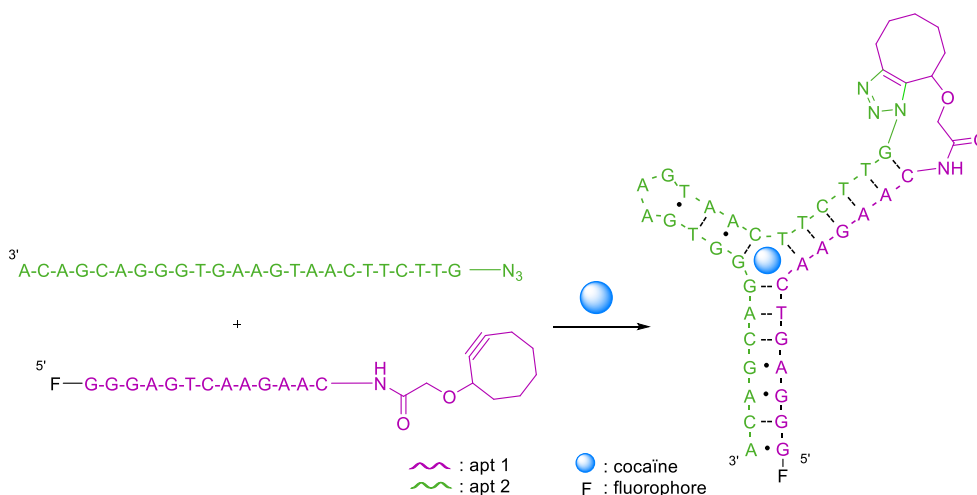


Figure 21 : Cycloaddition azoture-alcyne guidée par l'ADN grâce à la liaison avec la cocaïne.

La sélectivité de ce split aptamère a également été étudiée en remplaçant la cocaïne par des métabolites de structure similaire (Figure 22). Les résultats démontrent une diminution considérable du rendement de liaison excepté pour la norcocaïne qui possède une structure très proche de celle de la cocaïne. Ainsi, l'ester méthylique et le groupe benzoyle de la cocaïne sont essentiels pour la reconnaissance avec le split aptamère, à l'inverse du groupe méthyle du pont azoté. Cette observation vient confirmer de précédentes études réalisées sur l'aptamère parent.¹⁴⁰

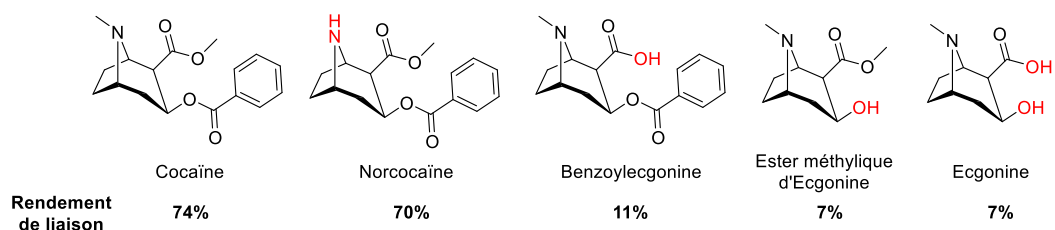


Figure 22 : Structures de la cocaïne et de ses métabolites (les modifications sont indiquées en rouge).

Cependant, les réactions de cycloaddition peuvent être réalisées indépendamment de la présence de la cocaïne et conduire à un bruit de fond non négligeable ainsi qu'à des signaux faux-positifs. L'équipe d'Heemstra a alors développé un nouveau système basé sur une réaction d'amination réductrice (Figure 23).¹⁴¹ La première étape consiste à faire réagir l'extrémité 5' du premier fragment, comportant une fonction amine, avec l'extrémité 3' du second fragment, possédant un aldéhyde, pour conduire à une imine. Cette liaison étant réversible, une étape de réduction est ensuite nécessaire pour obtenir l'amine primaire liant les deux fragments de façon irréversible. Ce système fortement stabilisé permet de détecter la cocaïne jusqu'à une concentration de 1 μ M, soit du même ordre de grandeur qu'avec l'aptamère parent. Cet assemblage covalent permet également de détecter de façon sélective des alcaloïdes naturels antipaludiques tels que la quinine et la quinidine jusqu'à 100 nM dans l'urine.

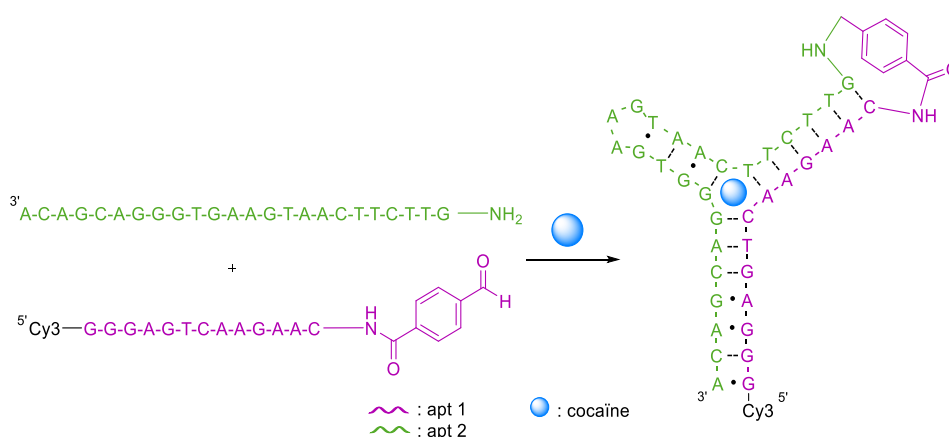


Figure 23 : Amination réductrice guidée par l'ADN grâce à la liaison avec la cocaïne.

Par la suite, Sharma *et al.* ont utilisé les réactions guidées par l'ADN et la présence de cocaïne pour former un système analogue à la méthode ELISA.¹⁴² Tout d'abord, le premier brin du split aptamère, modifié par une fonction azoture à l'extrémité 5' et une amine à l'extrémité 3', réagit avec une fonction *N*-hydroxysuccinimide liée à une microplaque pour former un lien amide (Figure 24). Le second brin, conjugué avec une biotine à l'extrémité 5' et un cyclooctyne à

l'extrémité 3', est ensuite ajouté en présence de cocaïne pour générer la liaison covalente entre les deux fragments du split aptamère par SPAAC. Enfin, l'ajout d'un conjugué streptavidine-péroxydase lie la biotine par l'intermédiaire de la streptavidine et réagit avec la tétraméthylbenzidine, un substrat chromogène qui devient bleu après action de la peroxydase. La détection de la cocaïne par fluorescence est simple à mettre en œuvre mais plus lente que pour les études précédentes.¹³⁹ Cette observation peut notamment s'expliquer par l'accrochage de l'azoture sur une microplaque *via* le fragment du split aptamère qui le rend moins accessible. L'ajout de groupements électroattracteurs tels que des fluors ou des benzènes sur le cyclooctyne augmente le caractère hydrophile de l'alcyne et peut ainsi engendrer une déstabilisation supplémentaire pour accélérer la réaction.¹⁴³ Le cyclooctyne a donc été remplacé par un dibenzoazacyclooctyne, cependant, cela entraîne une diminution de la spécificité car la liaison entre les deux fragments est également observée en l'absence de cocaïne. Il est donc nécessaire de remplacer la paire de base GC par une paire CC non appariée dans la tige 2 et la paire GT par une paire GC dans la tige 3 afin de légèrement déstabiliser la formation du duplex et de fait défavoriser la réaction de SPAAC. De plus, en ajoutant un lien entre la microplaque et le premier fragment, le signal peut être augmenté de façon considérable car l'accès au brin est facilité. Ce système modifié est ainsi capable de détecter la cocaïne à de très faibles concentrations (LOD = 100 nM dans un tampon et 1 μ M dans le sang humain). Tous ces atouts en font l'analogue split aptamère de la méthode ELISA le plus sensible et le plus rapide.

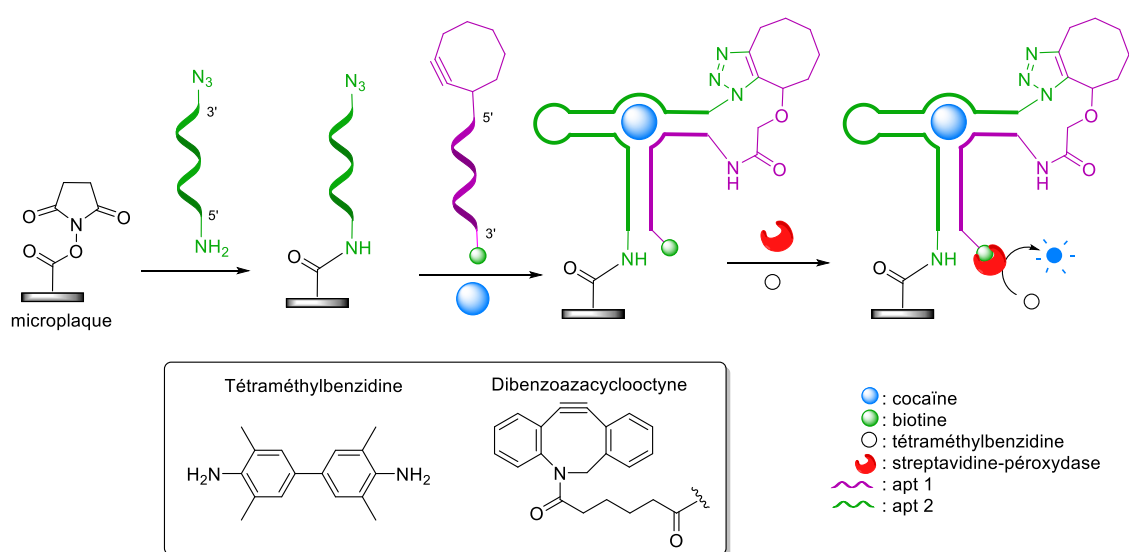


Figure 24 : Analogue de la méthode ELISA pour la détection de cocaïne.

Afin de s'affranchir de la fonctionnalisation des deux fragments par des fonctions réactives, un

système de liaison coopérative de split aptamère contenant deux sites de liaison a été développé.¹⁴⁴ La première liaison à une molécule de cocaïne stabilise la structure du split aptamère et facilite ainsi la liaison avec une seconde molécule au niveau du second site. Pour cela, deux paires différentes de fragments du split aptamère de la cocaïne tronqué au niveau des tiges 1 et 2 sont utilisées (Figure 25A).¹⁴⁵ Ce système est construit par combinaison des tiges 1 et 2 du premier et du second brin respectivement pour former un fragment long. Un fragment court issu de la liaison entre les tiges 2 (premier brin) et 1 (second brin) est également formé. Ces deux fragments sont ainsi capables de s'assembler en présence de cocaïne. Le fragment court est ensuite modifié en remplaçant l'adénosine A10 par l'espaceur C3 dans le but de former un site abasique pour suivre l'assemblage par complexation avec le fluorophore 2-amino-5,6,7-triméthyl-1,8-naphtyridine (ATMND). En effet, l'ATMND est fluorescent en solution mais lorsque les deux brins sont assemblés, la fluorescence est inhibée par l'espaceur C3 (Figure 25B). Ce système permet de détecter la cocaïne avec une sensibilité de l'ordre du nanomolaire (LOD = 50 nM) dans un tampon ou dans 10% volume de salive diluée. En 2018, un système similaire a été développé en utilisant des enzymes pour amplifier le signal et ainsi permettre la détection de cocaïne jusqu'à une concentration de 1 μ M dans 50% volume d'urine.¹⁴⁶

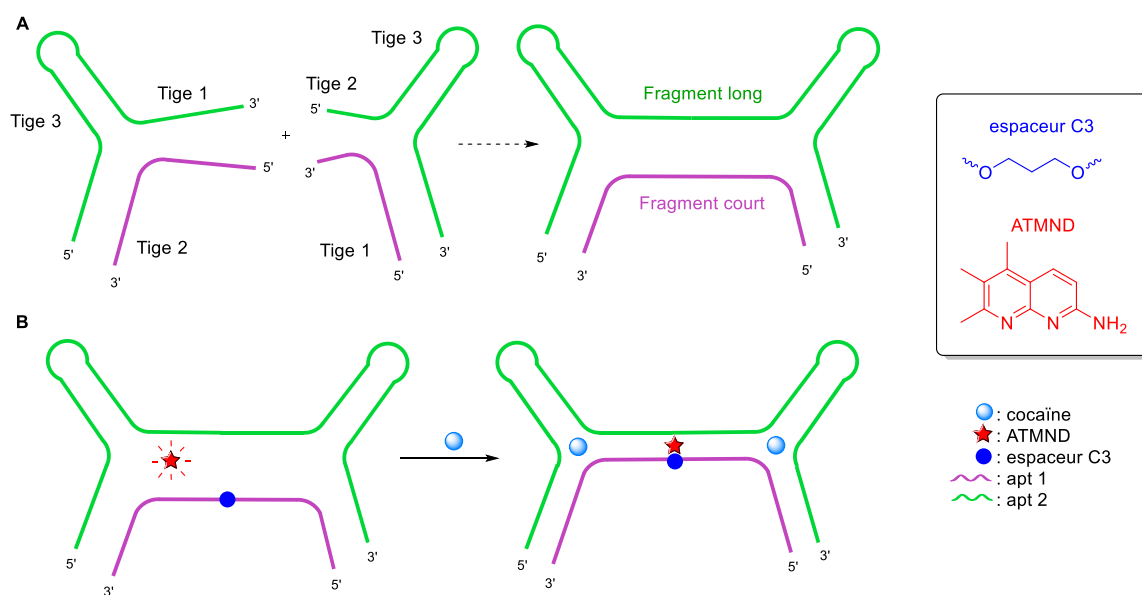


Figure 25 : (A) Structure du système de liaison coopérative. (B) Modification du système avec un espaceur C3 et formation du système fonctionnel en présence de cocaïne.

Comparés à la multitude d'aptamères à base d'ADN qui existent, seulement quelques-uns ont pu être convertis en split aptamères. Pour rappel, le découpage des aptamères possédant une structure de type épingle à cheveux ou jonction à trois voies doit être judicieusement choisi afin

de ne perturber ni la stabilité du système résultant ni son affinité envers la molécule cible.¹²³ Tandis que la plupart de ces systèmes sont basés sur un assemblage non-covalent en présence de la cible, les stratégies de ligation covalente représentent une alternative efficace pour la détection de petites molécules car elles évitent les difficultés rencontrées avec les systèmes non-covalents, à savoir l'assemblage non spécifique résultant en des signaux faux-positifs.^{139,147} Compte tenu de l'étendue des applications basées sur les split aptamères à base d'ADN, le domaine progresse très rapidement et le développement de nouvelles architectures de sondes biologiques augmente de façon exponentielle.¹⁴⁸ Ainsi, de récents exemples ont montré l'utilisation des split aptamères à base d'ADN pour la détection de cellules tumorales,¹⁴⁹⁻¹⁵¹ de virus,^{152,153} de substances actives,¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ d'antigènes,^{158,159} d'exosomes¹⁶⁰ ou encore de lysozymes dans des résidus d'empreintes digitales.¹⁶¹

Parallèlement, le concept de split aptamère a également été appliqué aux aptamères à base d'ARN mais les structures plus complexes de par leur grande taille et les nombreuses possibilités de repliement entraînent une méthode de visualisation plus complexe à mettre en œuvre.

1.3 Split aptamères à base d'ARN

Depuis ces dernières années, il a été montré que l'ARN joue un rôle crucial au niveau des cellules vivantes et peut également être utilisé pour des applications thérapeutiques et biotechnologiques, notamment dans le traitement de cancers. Afin d'élucider ses différentes fonctions et de créer de nouvelles substances actives ou modèles d'expression génétique, il est important de connaître sa localisation, sa dynamique ainsi que son fonctionnement de régulation. Par conséquent, de nombreux groupes ont développé différentes méthodes de détection des acides nucléiques dans les cellules vivantes en temps réel par imagerie de fluorescence.^{162,163} Toutefois, la fonctionnalisation d'ARN par une sonde fluorescente complique les applications au sein des cellules vivantes. L'utilisation d'aptamères luminescents à base d'ARN, comprenant un fluorophore au sein de leur structure, est alors pertinente car ils sont notamment capables de mimer les protéines vertes fluorescentes (GFPs). La première GFP a été découverte par Shimomura *et al.* à partir de la méduse *Aequorea Victoria*. La formation du fluorophore imidazolinone 4-hydroxybenzylidène (HBI) résulte d'une réaction intramoléculaire des trois acides aminés Ser65, Tyr66 et Gly67 (Figure 26). Les résidus sont placés au niveau du feuillet β de la GFP, permettant ainsi une cyclisation suivie d'une étape

d'oxydation.¹⁶⁴ Le fluorophore est ainsi situé au centre de la protéine et l'environnement protégé permet d'activer la fluorescence *via* des interactions non covalentes.

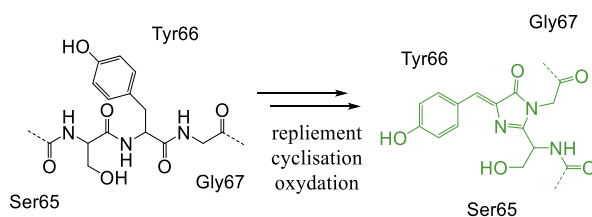


Figure 26 : Formation du fluorophore HBI par cyclisation et oxydation intramoléculaires.

Des aptamères dits lumineux à base d'ARN suivant ce mode de fonctionnement ont donc été développés à partir de méthodes de sélection SELEX *in vitro*.¹⁶⁵⁻¹⁷⁰ Ces derniers émettent un signal fluorescent uniquement lorsqu'ils sont liés à un ligand spécifique par intercalation ou par liaison non covalente au niveau de la séquence d'ARN (Figure 27). Ne possédant pas l'avantage des GFPs qui contiennent le fluorophore directement dans leur structure, ils sont considérés comme des mimes de GFPs et sont assimilables à des sondes fluorescentes non fonctionnalisées.

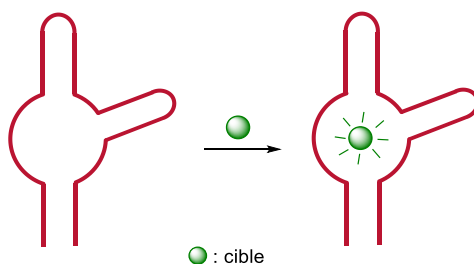


Figure 27: Principe de fonctionnement des aptamères lumineux mimes de GFPs.

Ces aptamères lumineux peuvent également être fusionnés avec des ARNs d'intérêt permettant leur visualisation par des méthodes optiques.^{166,169} Ils ont ensuite été développés en sondes d'aptamères afin de détecter des molécules d'intérêt.¹⁷¹ L'aptamère à malachite verte, un fluorophore de type triphénylméthane, a ainsi été le premier aptamère à base d'ARN mimant les GFPs à émettre un signal fluorescent après liaison avec la cible. Celui-ci a ensuite été divisé en deux fragments pour former un split aptamère capable de détecter les acides nucléiques par fluorescence.^{172,173} Cependant, la malachite verte ainsi que ses dérivés sont hautement toxiques, il est donc nécessaire de développer de nouveaux fluorophores et de nouvelles méthodes pour la détection d'acides nucléiques dans les cellules vivantes. Les split aptamères Spinach et Broccoli ont ainsi été développés pour répondre à cette problématique.

1.3.1 Split aptamère Spinach

Différents fluorophores non cytotoxiques mimant la GFP ont été synthétisés : les imidazolinones 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzylidène (DMHBI), 4-diméthylamino-benzylidène (DMABI), 2-hydroxybenzylidène (2-HBI) et 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidène (DFHBI) (Figure 28). Les aptamères correspondants ont ensuite été développés par méthode de sélection SELEX *in vitro*.¹⁷⁴ Le fluorophore possédant la fluorescence la plus importante est le DFHBI et, de par la couleur verte émise lorsque l'aptamère est lié à la molécule, il est appelé Spinach en référence aux épinards.

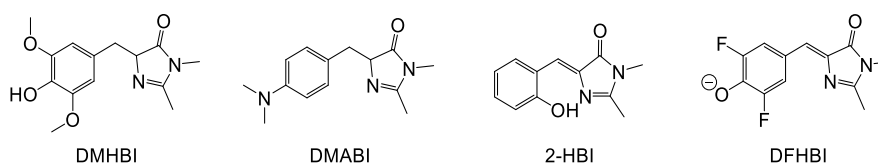


Figure 28 : Structures des différents fluorophores mimant la GFP.

La séquence de l'aptamère Spinach est formée de 98 nucléotides organisés en trois tige-boucles (Figure 29A) et forme une structure G-quadruplex stabilisée par deux ions K^+ (Figure 29B).¹⁷⁵ L'interaction avec le fluorophore DFHBI au sommet du motif G-quadruplex permet d'activer une fluorescence de couleur verte. Ces interactions mettent notamment en jeu (i) le résidu G30 se liant au carbonyle du DFHBI et interagissant avec le carbone du benzylidène par des interactions de Van Der Waals, (ii) l'hydroxyle en position 2' du résidu A64 se liant à l'atome d'azote N3 du DFHBI et (iii) l'hydroxyle en position 2' du résidu G26 se liant au phénolate du DFHBI. De plus, les ions K^+ coordonnent les G-quartets pour stabiliser la structure. La compréhension de la structure de l'aptamère et de son interaction avec le DFHBI a ainsi permis d'optimiser la structure pour générer l'aptamère « Baby Spinach », un analogue composé de 51 nucléotides avec des propriétés de fluorescence similaires.

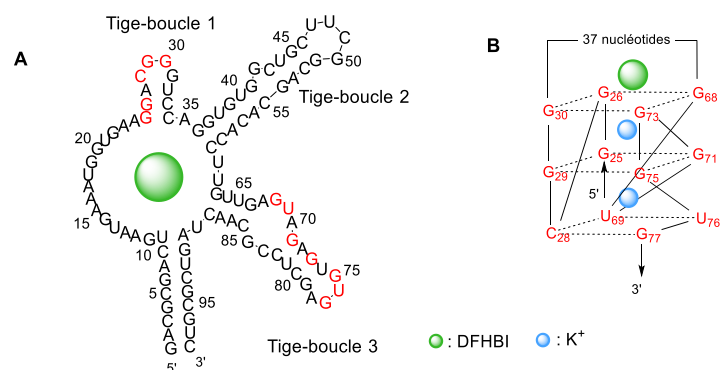


Figure 29 : (A) Structure secondaire de l'aptamère Spinach (nucléotides impliqués dans le G-quadruplex en rouge). (B) Représentation du G-quadruplex.

Comparativement aux GFPs, le système DFHBI-Spinach démontre un rendement de fluorescence supérieur lors des expériences *in vitro* (50% pour les GFPs contre 80% pour l'aptamère Spinach). Cependant, le repliement de l'aptamère n'est pas optimal à l'intérieur des cellules en raison d'une faible stabilité thermique, ce qui réduit son émission de fluorescence en présence de la molécule cible.^{174,176} Néanmoins, des mutations de la séquence ont permis de stabiliser la conformation de l'aptamère et d'augmenter sa fluorescence dans des systèmes *in vivo*. Ainsi, le « super aptamère » Spinach 2 a été développé et présente une fluorescence et une thermostabilité plus élevées ainsi qu'un meilleur repliement au sein des cellules.¹⁷⁶ Le Spinach 2 est alors capable d'imager des séquences d'ARNs contenant les motifs toxiques CCG avec une efficacité de fluorescence de 80% alors que l'aptamère parent n'émettait aucune fluorescence dans des conditions identiques. De tels systèmes ont été utilisés pour détecter des petites molécules¹⁷⁷ et des séquences spécifiques d'acides nucléiques,¹⁷⁸ ainsi que pour visualiser l'expression des protéines¹⁷⁹ et la transcription d'ARN.¹⁸⁰

À l'instar des aptamères à base d'ADN, les split aptamères à base d'ARN ont ensuite été développés pour faciliter leur synthèse et augmenter leur sensibilité. Afin de déterminer le site de coupure optimal de l'aptamère Spinach, des études de type structure-activité ont été réalisées.¹⁸¹ Les tiges-boucles 1 et 3 sont responsables de la formation des structures G-quadruplex et sont donc indispensables pour l'interaction avec le DFHBI. Par conséquent, la tige-boucle 2 constitue une région intéressante pour introduire des modifications et diviser l'aptamère.^{175,177,181} Une élongation de la séquence d'ARN des brins au niveau de la coupure est toutefois nécessaire afin d'augmenter la stabilité du complexe split aptamère-DFHBI. Les premières études liées à l'assemblage du split aptamère Spinach impliquent l'ajout de séquences d'ADN complémentaires capables de s'hybrider avec l'extrémité de chaque fragment,

également appelées « bloqueurs », et donc de contrôler l'assemblage (Figure 30).¹⁸¹ En l'absence de DFHBI, les deux fragments sont incapables de s'assembler. En revanche, l'ajout de DFHBI ainsi que de deux séquences d'ADN complémentaires aux « bloqueurs » libère les deux fragments, en raison de la meilleure affinité ADN-ADN que ADN-ARN, et conduit à la formation du split aptamère. L'assemblage des deux fragments est alors observé par une augmentation de fluorescence de DFHBI.

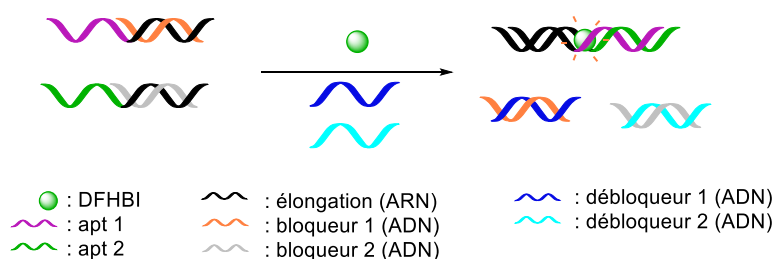


Figure 30 : Assemblage contrôlé du split aptamère Spinach.

Ces systèmes peuvent également être utilisés pour la détection d'acides nucléiques et la quantification de coupure d'ARN par combinaison des fragments du split aptamère Spinach et du ribozyme en tête de marteau qui catalyse la coupure d'un substrat d'ARN.¹⁸² En 2017, Kikushi *et al.* ont développé un split aptamère Spinach universel capable d'interagir avec des cibles à base d'ADN ou d'ARN, quelle que soit la nature de la séquence (Figure 31).¹⁸³ Cette stratégie impose l'utilisation de brins adaptateurs complémentaires des fragments du split aptamère et de la cible, faisant ainsi office de connexion entre l'aptamère et la cible. Pour cela, les deux fragments du split aptamère interagissent tout d'abord avec deux brins adaptateurs qui, après interaction de ces derniers avec la séquence cible, permettent de former le site de liaison au DFHBI. Étant donné que les deux fragments du split aptamère ne sont pas en contact direct avec la cible, ils peuvent être utilisés de façon universelle pour détecter des cibles à base d'ADN ou d'ARN avec une sensibilité pouvant atteindre 1,5 nM. Cependant, ce système ne permet pas la détection des séquences d'ARN messager en raison de l'instabilité thermique. Wang *et al.* ont amélioré cette stratégie et développé un nouveau système afin d'augmenter la fluorescence pour imager l'ARN sans utiliser d'adaptateur.¹⁸⁴ Pour cela, deux fragments de l'aptamère Baby Spinach sont fonctionnalisés à leur extrémités avec des séquences complémentaires de l'ARN messager. En présence de la cible, les deux fragments sont suffisamment proches pour reformer l'aptamère fonctionnel, permettant l'interaction avec le DFHBI et améliorant le signal de fluorescence.

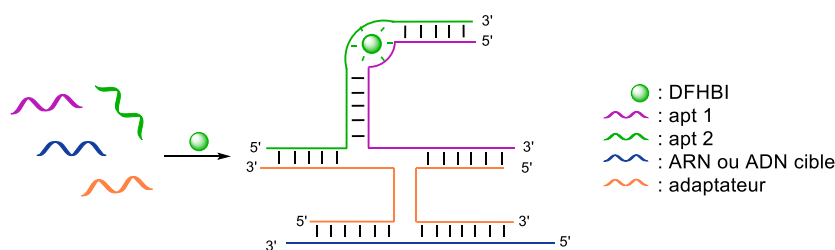


Figure 31 : Principe de détection de DFHBI par le split aptamère Spinach universel.

L'ensemble de ces études a permis de montrer la capacité du split aptamère Spinach à mimer le comportement de la GFP par interaction avec le DFHBI. Cependant, ce split aptamère est obtenu par méthode de sélection SELEX *in vitro*, une méthode basée sur l'affinité entre l'ARN cible et l'aptamère et non sur sa capacité à activer la fluorescence du DFHBI.¹⁷⁴ De plus, l'activité des aptamères est relativement faible à l'intérieur des cellules en raison des possibles dégradations de l'ARN ou du mauvais repliement intracellulaire dû à l'instabilité thermique ou à la trop faible concentration en ions métalliques qui permettent de stabiliser la structure.¹⁸⁵ Pour contrecarrer cette limitation de sélectivité, de nombreuses structures d'aptamères aux fonctionnalités similaires à celles du Spinach et avec des caractéristiques de détection *in vivo* améliorées ont été développées. Une nouvelle méthode de sélection a alors été mise au point, combinant la procédure SELEX classique avec une étape de tri cellulaire activé par fluorescence afin de sélectionner des aptamères capables d'activer la fluorescence du DFHBI en milieu cellulaire. Celle-ci a permis d'obtenir un nouvel aptamère appelé Broccoli.¹⁸⁵

1.3.2 Split aptamère Broccoli

La séquence de l'aptamère Broccoli est constituée de 49 nucléotides organisés en épingle à cheveux courbée avec une boucle interne (Figure 32A). Cet aptamère présente une fluorescence verte très intense après liaison avec le DFHBI ainsi qu'une meilleure efficacité de repliement en conditions physiologiques, grâce à sa taille plus réduite comparée à celle du Spinach. Ces propriétés plus performantes ont par la suite été étudiées dans le cas des split aptamères.^{186,187} Pour cela, deux aptamères en épingle à cheveux ont été combinés à une structure d'ARN de type jonction à trois voies afin d'augmenter le signal fluorescent résultant par l'insertion de deux DFHBI (Figure 32B). Cette structure particulière permet de connecter deux aptamères Broccoli tout en les gardant suffisamment éloignés l'un de l'autre pour éviter toute inhibition de fluorescence par interaction entre les deux fluorophores. L'aptamère formé a ensuite été divisé en deux fragments au niveau de la boucle terminale des deux aptamères Broccoli en

épingle à cheveux (Figure 32C).¹⁸⁸ Les deux fragments ont également été allongés à chaque extrémité afin de stabiliser le système sous la forme duplex et ainsi réduire les potentielles dégradations dues aux nucléases qui ciblent essentiellement les ARN non structurés. De plus, la structure jonction à trois voies utilisée possède une boucle fermée au niveau de la tige non fonctionnalisée, contrairement à la structure précédente dont la boucle avait été coupée afin de permettre l'assemblage de l'aptamère en une structure fonctionnelle.

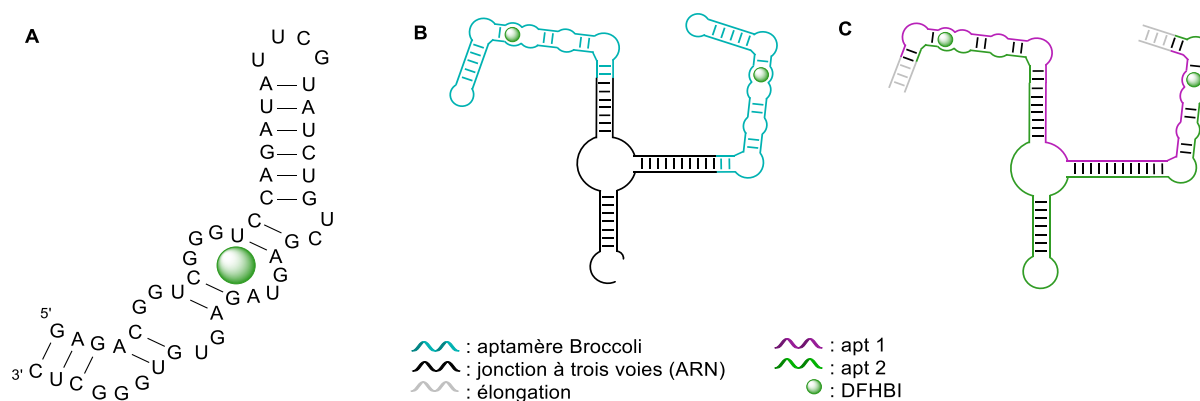


Figure 32 : Structures de l'aptamère Broccoli (A) en épingle à cheveux (B) et de type jonction à trois voies. (C) Structure du split aptamère Broccoli.

Le split aptamère Broccoli a été utilisé afin d'imager l'ARN *in cellulo*^{184,189} ainsi que pour suivre les phénomènes d'hybridation ARN-ARN *in vivo*.¹⁸⁸ Pour cela, le premier fragment a été fonctionnalisé par une séquence d'ARN « maintenir » à l'extrémité 3' et le second par une séquence d'ARN « déclencheur » à l'extrémité 5' (Figure 33). Celui-ci est de plus lié à une séquence permettant la traduction de l'ARN en une protéine rouge fluorescente, la mCherry, par l'action d'un ribosome. En l'absence de DFHBI, les séquences de l'ARN « maintenir » et de la traduction de la mCherry adoptent une structure en épingle à cheveux, bloquant l'accès au ribosome pour la traduction de l'ARN. En revanche, l'ajout de DFHBI permet aux deux fragments du split aptamère Broccoli de reformer la structure active du split aptamère, libérant ainsi la séquence d'ARN nécessaire à la traduction de la mCherry. L'assemblage des deux fragments est observé par une émission de fluorescence verte provenant du DFHBI mais également rouge issue de la traduction de l'ARN en protéine mCherry. Cette méthodologie met en lumière le contrôle explicite de l'expression de la protéine mCherry *in vivo* par la formation contrôlée de la structure active du split aptamère et représente, à notre connaissance, la première étude rapportant l'utilisation de split aptamères *in vivo*.

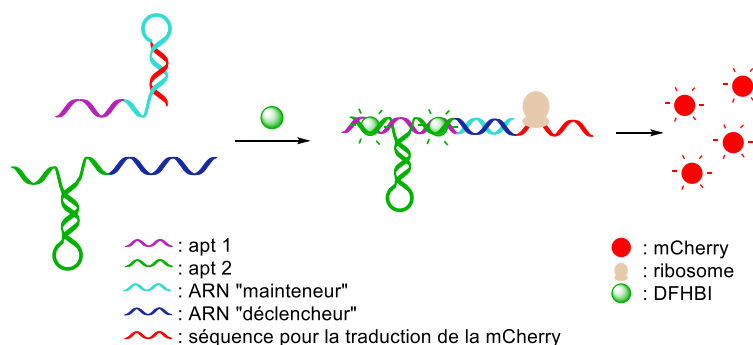


Figure 33: Visualisation de l'hybridation ARN-ARN *in vivo* grâce au split aptamère Broccoli.

Les aptamères lumineux sont également des outils pertinents pour la vérification du bon repliement des nanostructures d'ADN ou ARN. Dans ce contexte, un système basé sur le split aptamère Broccoli a récemment été utilisé pour contrôler la formation d'un origami d'ARN en conditions physiologiques.¹⁹⁰ Pour cela, l'aptamère est divisé au niveau de la boucle et les deux fragments obtenus sont allongés aux deux extrémités par une séquence complémentaire de la séquence d'ARN cible utilisée pour l'origami (Figure 34A). Cette dernière est obtenue à partir d'une séquence d'ARN composée de 212 nucléotides et conçue pour adopter une conformation fermée uniquement en présence du split aptamère Broccoli (Figure 34B). L'addition de courts brins « agraphe » spécifiques permet ensuite le repliement de la séquence cible en nanoruban par des interactions faibles, stabilisé par la formation du split aptamère actif en présence de DFHBI grâce aux interactions entre la séquence d'ARN et les extrémités des fragments. La formation du nanoruban est observée grâce à l'émission de fluorescence verte du DFHBI. Ce nouveau système d'origami d'ARN pourrait ainsi être utilisé comme structure capable de réguler l'expression des gènes dans les cellules *in vivo*.

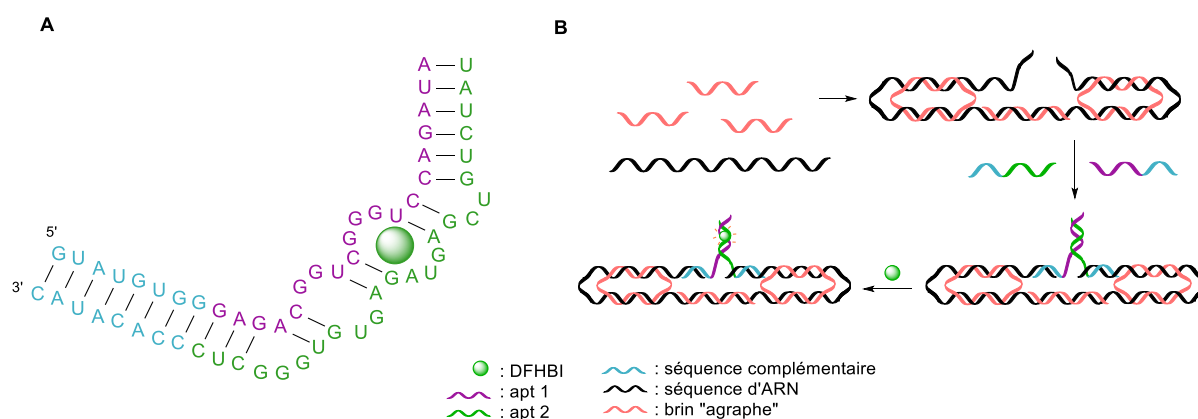


Figure 34 : (A) Split aptamère Broccoli. (B) Stabilisation d'un origami d'ARN grâce au split aptamère Broccoli.

Outre les aptamères luminescents, d'autres aptamères à base d'ARN ont été utilisés et divisés en split aptamères pour la détection de séquences d'ARN¹⁹¹ ou de molécules cibles spécifiques avec une grande sensibilité.¹⁹²⁻¹⁹⁴

Afin d'améliorer les méthodes de détection *in vitro* et *in vivo*, la stratégie de systèmes fragmentés a été utilisée pour les ribozymes, capables de catalyser de nombreuses réactions et cliver des substrats d'ARN spécifiques. Le développement des split ribozymes est très récent et seulement quelques exemples dans la littérature ont étudiés leurs propriétés.

1.4 Split ribozymes

La première grande famille de ribozymes à avoir été découverte correspond aux introns catalytiques de groupe I.⁵² L'ARN pré-messager est composé de différentes régions appelées introns et exons liées entre elles par des liens phosphodiester mais seuls les exons, c'est-à-dire les parties codantes, sont conservés dans la séquence de l'ARN messager pour la traduction en protéine. Des ribozymes naturels autocatalytiques appelés introns ont alors été développés par l'organisme afin d'éliminer les parties non codantes de la séquence par deux transestérifications successives en présence d'ions Mg^{2+} (Figure 35).¹⁹⁵ En effet, le repliement du ribozyme permet une première coupure à l'extrémité 5' de l'intron pour libérer l'exon. L'hydroxyle libre à l'extrémité 3' de l'exon est alors capable de cliver le second intron à l'extrémité 5' par une seconde réaction de transestérification. L'intron est alors éliminé et les exons forment une nouvelle séquence correspondant à l'ARN messager.

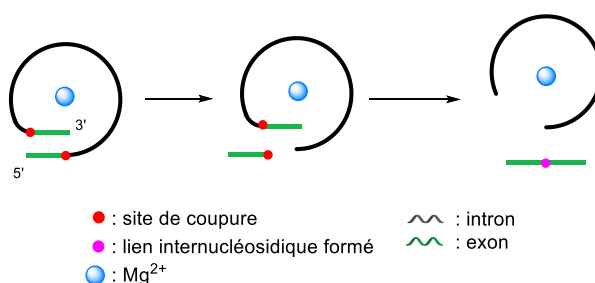


Figure 35 : Schéma général de l'activité catalytique des ribozymes d'introns de groupe I.

Parmi l'ensemble des ribozymes appartenant à cette famille, celui issu de l'espèce *Tetrahymena thermophila* a été étudié dans le cadre des split ribozymes pour mettre au point une méthode de détection de l'ARN messager dans les cellules de mammifères.^{196,197} Pour cela, les fragments du split ribozyme sont chacun connectés à une extrémité avec une séquence complémentaire de l'ARN messager cible tandis que l'autre extrémité est liée à une partie de la séquence codante

de la protéine TEM-1 β -lactamase, responsable de la résistance de certaines bactéries vis-à-vis d'antibiotiques β -lactamine (Figure 36). En présence de l'ARN messager cible et d'ions Mg^{2+} , les deux séquences complémentaires de la cible se lient à cette dernière, permettant l'assemblage des deux fragments en un split ribozyme actif. Les séquences codantes de la TEM-1 β -lactamase sont alors clivées par l'action catalytique du split ribozyme et s'assemblent pour former un ARN messager capable d'effectuer la traduction en protéine. Les protéines synthétisées sont ensuite détectées par un substrat fluorogène qui émet un signal fluorescent en leur présence.¹⁹⁸ La caractéristique clé de ce système est sa capacité intrinsèque d'amplification du signal car un seul brin d'ARN messager cible est capable de coder la production de plusieurs protéines. De plus, la possibilité de détecter différents ARN messager cibles en adaptant la nature des séquences complémentaires à la cible d'intérêt en fait un système universel.

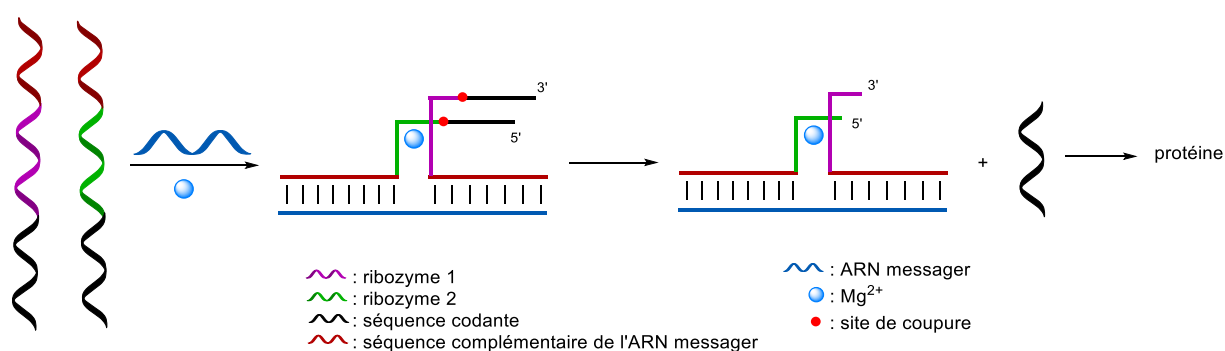


Figure 36 : Utilisation du split ribozyme d'introns de groupe I pour la détection d'ARN messager.

Le ribozyme en épingle à cheveux, présent dans l'ARN satellite de virus de plantes, a également été étudié car il intervient dans la réplication cellulaire du virus à travers des réactions de clivage et de jonction.¹⁹⁹ Celui-ci est composé de 50 nucléotides organisés en deux tige-boucles qui composent deux domaines différents, à savoir le site de reconnaissance du substrat et le site catalytique permettant le clivage de celui-ci (Figure 37).²⁰⁰ Lors de la reconnaissance du substrat, le ribozyme est inactif car le site de coupure est trop éloigné du site catalytique en raison de la répulsion électrostatique entre les deux domaines du ribozyme chargés négativement. En revanche, l'ajout d'ions Mg^{2+} permet de compenser cette répulsion électrostatique et de former une structure secondaire catalytiquement active appelée épingle à cheveux. Le substrat est alors situé entre les deux domaines, provoquant le clivage.¹⁷⁵

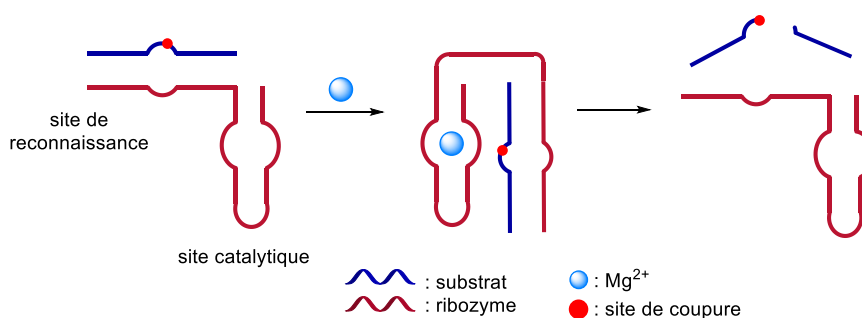


Figure 37 : Schéma général de l'activité catalytique des ribozymes en épingle à cheveux.

Toujours dans le but de faciliter la synthèse et augmenter la sensibilité du système, le ribozyme a été divisé en deux fragments au niveau de la boucle terminale du site catalytique (Figure 38).²⁰¹ Le duplex a également été allongé de trois paires de bases supplémentaires de type Watson-Crick pour compenser la perte de stabilité. Le substrat à détecter a été fonctionnalisé à l'extrémité 5' par un fluorophore pour détecter le clivage par fluorescence sur gel d'électrophorèse. Le système est, comme précédemment, activé par l'ajout d'ions Mg^{2+} qui provoque l'assemblage des deux fragments ainsi que le changement de conformation nécessaire au maintien de l'activité catalytique. De plus, la spermine a également été ajoutée en tant que contre-ion par rapport à la charge négative du split ribozyme pour améliorer la stabilité et l'activité catalytique du système. Grâce à son abondance naturelle dans les cellules eucaryotes, elle permettrait de compenser la faible concentration des ions Mg^{2+} et ainsi maintenir l'activité catalytique pour de futures études *in vivo*.

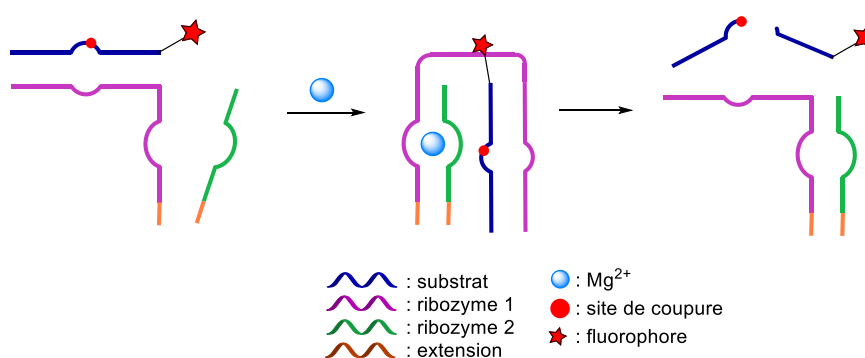


Figure 38 : Structure du split ribozyme en épingle à cheveux.

Bien que ces systèmes semblent très prometteurs pour des applications *in vivo*, les études restent limitées, notamment en raison de la difficulté de synthèse associée à la longueur importante de ces systèmes.

Dans le même temps, les DNAzymes, plus courts et de ce fait plus faciles à synthétiser, ont été développés.

1.5 Split DNAzymes

Les DNAzymes les plus étudiés sont les DNAzymes appelés **10-23** et **8-17**.⁶⁰ À l'instar des ribozymes, ils sont composés d'un site catalytique, la boucle, et de deux sites de reconnaissance, les tiges, et sont activés par des ions métalliques (Figure 39). Ils permettent de reconnaître des substrats d'ARN qui sont alors clivés entre une nucléobase purine et pyrimidine en présence d'ions Mg^{2+} dans le cas du DNAzyme **10-23** ou d'ions Pb^{2+} pour le DNAzyme **8-17**.

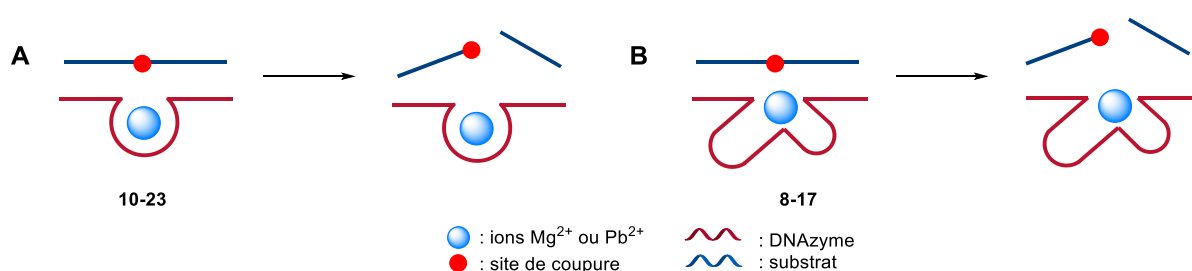


Figure 39 : Schéma général de l'activité catalytique des DNAzymes (A) **10-23** et (B) **8-17**.

De nombreuses techniques, principalement basées sur la colorimétrie ou la fluorescence, permettent de détecter ces différents ions métalliques divalents avec une forte sélectivité et une sensibilité modérée.²⁰² Les split DNAzymes ont récemment été conçus dans le but de développer des sondes biologiques fonctionnelles plus sensibles et sélectives.⁶⁶⁻⁷¹ En effet, Lu *et al.* ont mis au point une double stratégie en combinant un split DNAzyme et une sonde moléculaire catalytique, contenant un fluorophore à l'extrémité 5' et un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 3', pour la détection d'ATP et de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). Dans cette conformation, la sonde n'émet aucun signal fluorescent car les deux fonctionnalités sont trop proches l'une de l'autre (Figure 40).²⁰³ L'addition d'une séquence complémentaire aux deux fragments du DNAzyme joue alors le rôle de support pour permettre leur hybridation. Ils sont ensuite liés par la ligase d'ADN T4 pour l'ATP et *E. coli* pour le NAD^+ . L'addition d'un ADN invasif permet de libérer le DNAzyme **8-17**, qui s'hybride avec la sonde moléculaire possédant une structure en épingle à cheveux afin d'initier une réaction en cascade. Les fragments du split DNAzyme **8-17** sont toutefois inactifs envers la sonde moléculaire en l'absence de ligase d'ADN et du cofacteur Zn^{2+} . Ainsi, l'addition du cofacteur métallique approprié active le DNAzyme et coupe la sonde, provoquant une forte émission de fluorescence car l'inhibiteur de fluorescence est trop éloigné du fluorophore. Ce système est

hautement sélectif puisqu'il possède une LOD de 100 pM pour l'ATP et de 50 pM pour le NAD⁺.

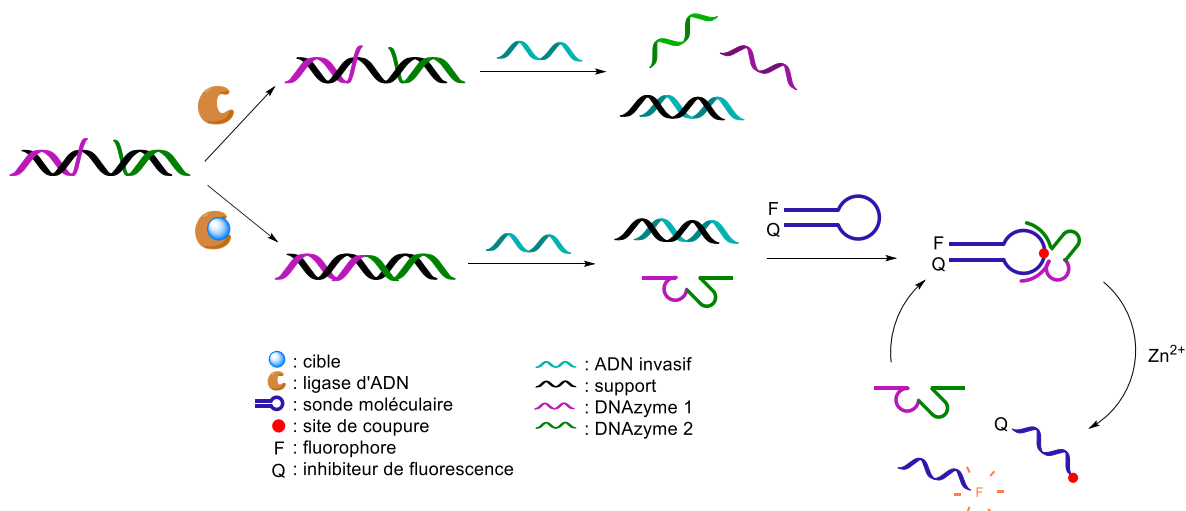


Figure 40 : Détection de l'ATP et du NAD⁺ en combinant le split DNAzyme 8-17 avec une sonde moléculaire.

Plus récemment, le split DNAzyme 8-17 a été utilisé pour développer un système multifonctionnel capable de détecter plusieurs cibles en même temps, à savoir le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) et un lipopolysaccharide (Figure 41).¹⁴⁷ Pour cela, le premier fragment du split DNAzyme est modifié à l'extrémité 3' par une fonction hydrazine et le second par un aldéhyde à l'extrémité 5'. À l'instar du système précédent, le substrat est une sonde moléculaire modifiée à chaque extrémité par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence. De plus, des billes magnétiques fonctionnalisées avec un aptamère capable de détecter le lipopolysaccharide hybridé à une sonde fluorescente sont utilisées. En présence d'ions Mg²⁺, l'assemblage des deux fragments entraîne la formation d'un lien hydrazone covalent qui permet de bloquer le système dans sa conformation active. La coupure du substrat est alors observée par l'augmentation de fluorescence, indiquant que la présence du lien hydrazone n'a aucune influence sur l'activité catalytique du DNAzyme (Figure 41A). En revanche, aucune émission de fluorescence n'est reportée en présence d'ions Mg²⁺ et de la cible HMF, à cause de la formation du lien hydrazone non pas entre les deux fragments du DNAzyme mais entre le fragment DNAzyme portant la fonction hydrazine et l'aldéhyde présent dans la structure de HMF (Figure 41B). La structure du DNAzyme actif est donc impossible, empêchant de fait la coupure de la sonde moléculaire et la fluorescence. Dans le cadre de la détection du lipopolysaccharide, la présence de la molécule cible et d'ions Mg²⁺ entraîne un changement de

conformation de l'aptamère et la libération de la sonde fluorescente (Figure 41C). Ainsi, un important signal fluorescent est émis à la fois par la sonde fluorescente et par la coupure de la sonde moléculaire par le DNAzyme actif. Enfin, lorsque les deux cibles sont présentes dans le milieu, l'émission de fluorescence est plus faible car bien que la sonde fluorescente soit libérée par le changement de conformation de l'aptamère du lipopolysaccharide, la coupure de la sonde moléculaire n'a pas lieu du fait de l'absence de formation du DNAzyme actif en présence de HMF (Figure 41D). La LOD de ce système a été évaluée à 0,04 μM pour le HMF et 0,08 ng/mL pour le lipopolysaccharide.

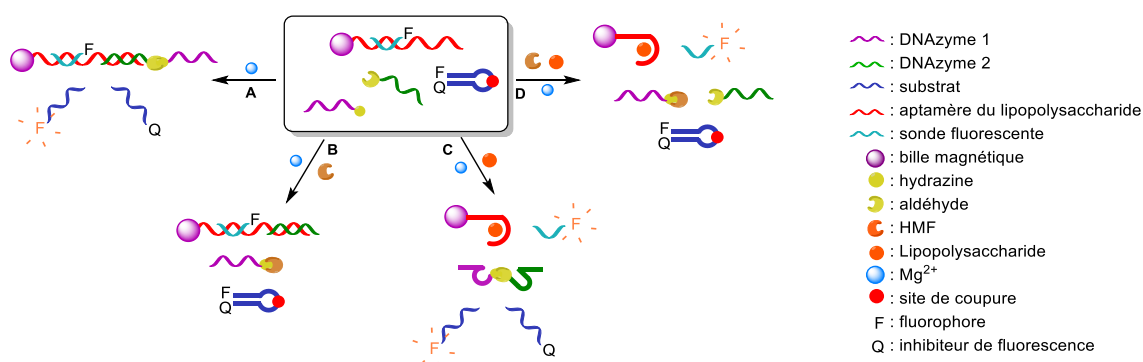


Figure 41 : Détection de deux cibles en combinant les DNAzymes et la chimie des hydrazones.

Les split DNAzymes ont également été utilisés pour la construction d'une sonde biologique ultrasensible pour la détection d'ions Hg²⁺.²⁰⁴ Cette sonde combine un split DNAzyme activé par des ions Mg²⁺, un brin d'ADN servant de support à l'hybridation des fragments du DNAzyme, un brin d'ADN en épingle à cheveux contenant un des fragments du split DNAzyme et un substrat cagé contenant à la fois une séquence d'ADN (A) pour la liaison avec les brins contenant les AuNPs et le substrat (B). Les ions Hg²⁺ ont alors pu être détectés grâce à une cascade d'évènements présentée en Figure 42. Tout d'abord, en présence d'ions Hg²⁺ les fragments du split DNAzyme s'hybrident avec un troisième brin d'ADN support, et le complexe est stabilisé par l'établissement d'interactions entre l'ion métallique et la thymine pour former des paires de bases T-Hg²⁺-T. L'ajout d'ions Mg²⁺ permet de former la structure active du DNAzyme qui est alors capable de couper le substrat cagé au niveau du segment B et de l'éliminer. Le segment A s'hybride ensuite à des AuNPs fonctionnalisées avec un brin complémentaire, formant des agrégats d'AuNPs. Ces derniers deviennent bleus, ce qui permet de détecter la présence d'ions Hg²⁺ qui sont à l'origine de cette cascade d'évènements. Le segment B peut quant-à-lui initier un nouveau processus d'amplification du signal en s'hybridant avec le brin d'ADN en épingle à cheveux. En effet, l'hybridation permet la

libération du premier fragment du split DNAzyme et, en présence du second fragment, du substrat cagés et d'ions Mg^{2+} présents dans la solution, un nouveau DNAzyme actif est formé. De la même façon que pour le premier cycle, le fragment B contenu dans le substrat cagé est coupé, entraînant de nouveau l'agrégation des AuNPs par hybridation avec le fragment A. Ce système est ainsi capable de détecter la cible avec une LOD de 10 pM.

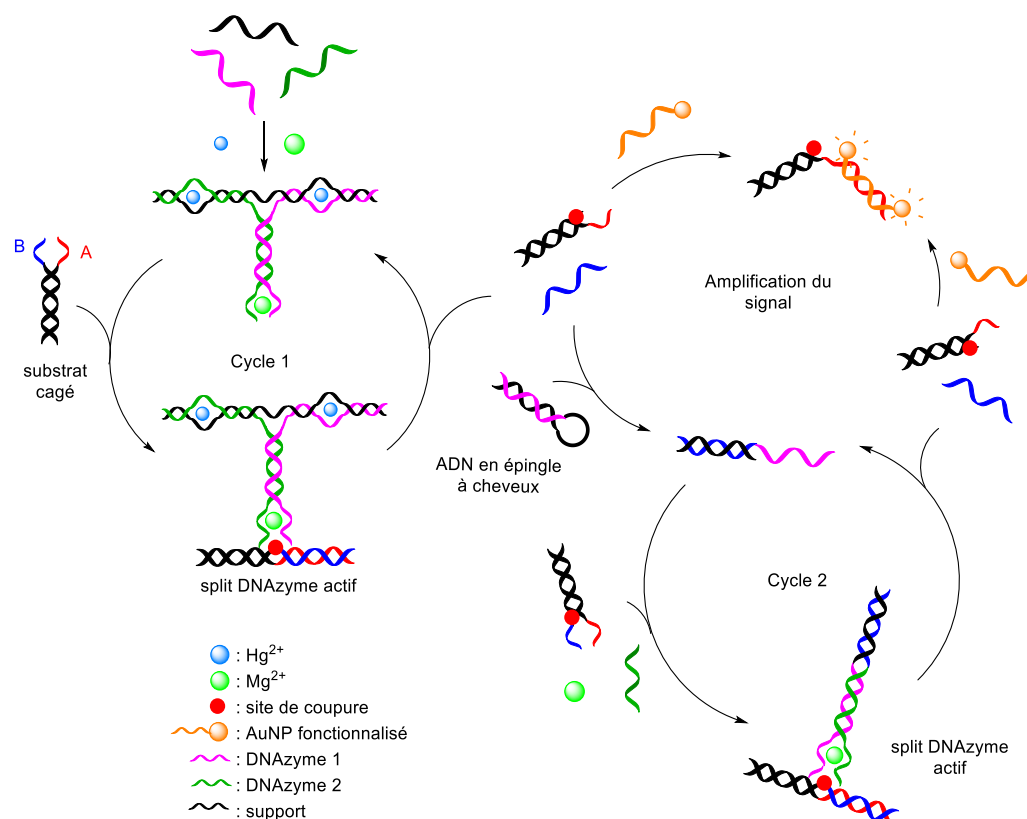


Figure 42 : Amplification du signal pour la détection des ions Hg^{2+} .

Un autre exemple de l'utilisation des split DNAzymes consiste à détecter les micro-ARN dans les cellules vivantes (Figure 43).²⁰⁵ Pour cela, le substrat d'ARN est conjugué avec une AuNP à l'extrémité 5' et un fluorophore à l'extrémité 3'. Celui-ci est ensuite capable de s'hybrider avec les deux fragments du DNAzyme **10-23** activé par les ions Mg^{2+} , l'un d'eux contenant un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 5'. En l'absence du micro-ARN cible, le split DNAzyme est inactif et la fluorescence est inhibée par la proximité entre le fluorophore et l'inhibiteur de fluorescence. En revanche, la présence du micro-ARN permet la formation d'un split DNAzyme actif qui coupe le substrat et libère le fluorophore. De façon simultanée, la libération de la cible entraîne l'activation d'un autre cycle, permettant l'amplification du signal. Une sensibilité de l'ordre du picomolaire (LOD = 10 pM) a notamment été mesurée dans les cellules vivantes.

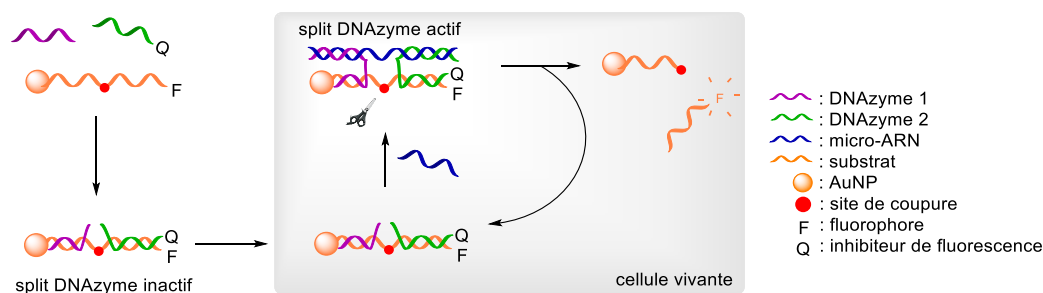


Figure 43 : Détection de micro-ARN dans les cellules vivantes par un système conjuguant split DNAzyme et AuNPs.

La forte sensibilité associée aux systèmes à base de split DNAzymes en fait des outils prometteurs pour la détection de substrats variés comme des séquences d'acides nucléiques,^{206,207} des mésappariements,²⁰⁸ des antigènes carcino-embryonnaires,²⁰⁹ des enzymes,^{210,211} des ions métalliques,^{212–214} des petites molécules^{215,216} ou encore de substances actives.^{217–219}

Compte tenu de l'intérêt porté aux split aptamères ainsi qu'aux split DNAzymes, ces deux systèmes ont été combinés pour donner des split aptazymes. L'activité catalytique du split DNAzyme est alors activée par la présence du ligand capable de se lier à l'aptamère. Ces nouveaux systèmes sensibles et sélectifs permettent de diminuer les liaisons non spécifiques conduisant à des signaux faux-positifs et d'amplifier le signal obtenu. Ils ont ainsi été utilisés pour la détection d'adénosine^{220–222} ou d'ATP.^{223–225}

1.6 Limites des systèmes divisés

Outre le potentiel des split aptamères, DNAzymes et ribozymes pour des applications de diagnostic et de thérapie, seulement quelques-uns ont été utilisés avec succès jusqu'à présent. Cela s'explique notamment par la difficulté à concevoir de tels systèmes tout en conservant au minimum une efficacité égale à celle de l'aptamère parent. En effet, trois points clés nécessitent une attention particulière : (i) le choix du site de coupure, (ii) la stabilité du complexe système-cible et (iii) la sensibilité du système.

(i) Choix du site de coupure

Lors de la conception du système, la structure tridimensionnelle de la séquence d'acide nucléique parent peut être considérablement perturbée si la coupure n'est pas effectuée à une position propice. Par conséquent, il faut tout d'abord étudier la position de la coupure et vérifier

par des études théoriques et expérimentales que la formation de la structure tridimensionnelle n'est pas entravée. Cela nécessite une connaissance précise du complexe système-cible, et notamment du rôle des groupements fonctionnels présents au niveau des nucléobases et des liens sucre-phosphate. De plus, afin de maintenir l'activité du système, la coupure est généralement effectuée au niveau de sites qui n'entrent pas en jeu lors de l'interaction avec la molécule cible. Bien qu'il existe plusieurs positions de ce type dans les structures de DNAzymes et ribozymes, elles sont en revanche plus rares dans le cas des aptamères. Pour autant, Wang *et al.* ont récemment étudié des split aptamères dont le site de liaison de la molécule cible a été modifié et ont montré de manière théorique puis confirmé expérimentalement que la reconnaissance et l'interaction avec la cible sont préservées.²²⁶ Ainsi, la prédiction des capacités d'interactions par simulation dynamique moléculaire pourrait permettre d'améliorer le développement de split aptamères en tant que sondes biologiques.

(ii) *Stabilité du complexe*

Par comparaison avec le système parent, les fragments du système divisé possèdent en règle générale une affinité plus faible envers la cible, se traduisant par une instabilité plus élevée du complexe système-cible résultant. De plus, le coût entropique de la formation d'un tel complexe est beaucoup plus important, dû à l'assemblage de plusieurs fragments pour former un système fonctionnel. Le complexe peut toutefois être stabilisé en modifiant la structure du système, c'est-à-dire en allongeant un des fragments de quelques nucléotides supplémentaires qui, par complémentarité de base, facilite l'assemblage. D'autres fonctionnalités peuvent également stabiliser le complexe comme l'ajout de pyrènes à l'extrémité des fragments d'un split aptamère.¹⁰⁵ Ainsi, la formation du dimère lors de l'assemblage des deux fragments en présence de la molécule cible permet non seulement sa détection mais également la stabilisation du complexe split aptamère-cible. D'autres études ont reporté la fonctionnalisation des fragments avec des groupements réactifs tels que des azotures et alcynes ou des aldéhydes et amines/hydrazines pour stabiliser le système dans sa conformation active par la création de liaisons covalentes lors de l'assemblage des fragments.

(iii) *Sensibilité du système*

Les limitations en termes d'affinité et de stabilité associées aux complexes sont également reflétées par une diminution de sensibilité. En effet, bien qu'une très bonne sensibilité ait été observée dans certains cas, il est nécessaire de diminuer la LOD jusqu'à une concentration de

l'ordre du picomolaire pour les stratégies d'amplification de signal, ce qui reste difficile pour les systèmes divisés. L'amplification du signal est obtenue en combinant le système divisé avec des enzymes protéiques, pour lequel le substrat est disponible pour l'enzyme uniquement lorsque le complexe split aptamère-cible est formé.¹³⁰ De façon similaire, les split aptazymes coupent ou lient des substrats spécifiques uniquement en présence d'un ligand spécifique qui se lie à la partie aptamère et stabilise le cœur catalytique dans la conformation optimale pour l'activité catalytique. D'autres méthodes telles que l'amplification par déplacement de brin d'une séquence, qui devient disponible exclusivement après formation du complexe, ou encore la détection de doubles brins d'ADN formés en temps réel par PCR¹²⁵ commencent à être intégrées dans le développement de ces systèmes.

1.7 Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons d'abord présenté le concept récent de split aptamères, DNAzymes et ribozymes étant encore au stade initial de leur développement. Nous avons également démontré leurs avantages comparés aux systèmes parents, notamment en termes de facilité d'obtention et d'absence de formation de structures secondaires non souhaitées. Les aptamères sont considérés comme des éléments clés pour détecter des petites molécules ou protéines tandis que les DNAzymes et ribozymes ont été principalement appliqués à la détection de séquences d'acides nucléiques spécifiques ou d'ions métalliques. La combinaison des deux pour former des split aptazymes est également un concept intéressant afin d'augmenter l'intensité des signaux émis par le renouvellement de l'enzyme.

Cependant, la conception de systèmes divisés pour des applications de biodétection reste difficile. Il est en effet crucial d'améliorer la stabilité et la sensibilité des complexes formés en présence de molécules cibles. De plus, des approches plus simples et rapides basées sur la détection par fluorescence, chimioluminescence, colorimétrie ou encore électrochimie doivent être mises en œuvre pour obtenir des méthodes plus efficaces. Néanmoins, les assemblages fonctionnels dérivés de split aptamères, DNAzymes et ribozymes rapportés récemment démontrent leur fort potentiel et ouvrent la voie à de nombreux développements dans ce domaine.

Chapitre 2 : Développement de nouveaux split DNazymes modifiés par des acides boroniques

2.1 Introduction et contexte

Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 1, qui a par ailleurs fait l'objet d'une revue,²²⁷ les split DNAzymes et split ribozymes sont en pleine émergence et permettent d'envisager le développement de nouvelles architectures plus sensibles, plus stables, plus spécifiques et surtout programmables. Cependant, la conception de tels systèmes reste difficile car leur division en plusieurs fragments peut entraîner une diminution voire une suppression de l'activité catalytique. Ainsi, le groupe d'Heemstra a démontré qu'il est possible de stabiliser et de figer un système dans sa conformation active par liaison covalente grâce à des réactions de chimie click^{139,142} ou d'amination réductrice.¹⁴¹ Pour cela, les extrémités 5' et 3' des fragments du split aptamère étudié sont fonctionnalisées de façon appropriée, cependant il s'agit ici de liaisons covalentes irréversibles. L'objectif du présent travail est d'introduire des liaisons covalentes réversibles dans des systèmes split DNAzymes et ribozymes afin de les stabiliser et de les programmer en fonction d'un stimulus externe tout en maintenant leur activité catalytique. Parmi l'ensemble des réactions permettant la création de liens covalents réversibles,²²⁸ nous nous sommes intéressés en particulier à la formation d'un ester boronate en présence d'un acide boronique et d'un partenaire *cis*-diol.

L'élément Bore, découvert en 1808,²²⁹ possède trois électrons de valence et se trouve le plus souvent sous la forme neutre trivalente pour laquelle l'atome de bore possède une géométrie planaire trigonale et un état d'hybridation sp^2 avec une orbitale p vide.²³⁰ Dans le cas d'une liaison bore-oxygène, relativement courte par rapport à une liaison carbone-carbone, les doublets de l'oxygène sont capables d'interagir avec l'orbitale p vacante. Cela lui procure un caractère de double liaison partielle et permet de stabiliser le composé résultant. Notons que le bore peut également former des composés tétravalents négativement chargés avec cette fois-ci une géométrie tétraédrique et un état d'hybridation sp^3 , l'orbitale p étant engagée dans la quatrième liaison par coordination. Ainsi, selon la nature des substituants, les composés organoborés peuvent être classés en différentes catégories (Figure 44), les acides boroniques et les esters boronates étant ceux qui nous intéressent ici.

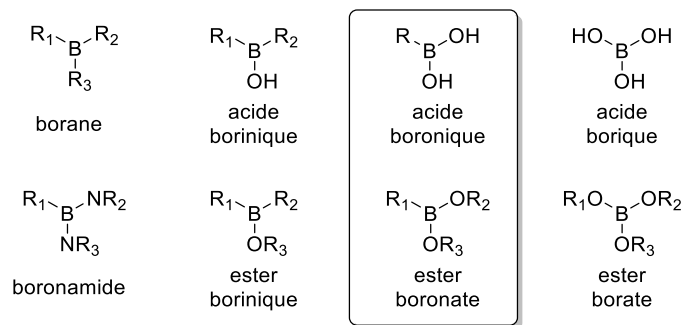


Figure 44 : Différentes catégories de composés organoborés.

Contrairement à leurs analogues carbonés que sont les acides carboxyliques, les acides boroniques et les esters boronates n'existent pas à l'état naturel et sont obtenus synthétiquement à partir des acides boriques. Leur préparation a été reportée pour la première fois par Frankland en 1860 qui a synthétisé l'acide éthylboronique à partir du triéthylborate.²³¹ Depuis, l'attention croissante portée aux acides boroniques leur a permis d'être utilisés pour de nombreuses applications en synthèse organique^{230,232} et plus particulièrement pour la formation de liaisons carbone-azote²³³ ou carbone-carbone.²³⁴ Cette dernière a par ailleurs valu un Prix Nobel de chimie en 2010 au Pr. Suzuki, partagé avec les Pr. Heck et Negishi pour leur travaux sur les réactions de couplage croisées.²³⁵ Ils sont également largement utilisés pour la synthèse asymétrique,²³⁶ la catalyse,²³⁷ la chimie médicinale,²³⁸⁻²⁴⁰ la reconnaissance moléculaire²⁴¹ ou encore dans le domaine des matériaux.²⁴²

Grâce à leur orbitale p vide, les acides boroniques sont capables de réagir avec des centres donneurs d'électrons tels que les atomes d'oxygènes ou d'azotes et plus particulièrement avec les *cis*-diols, pour former des liaisons covalentes et réversibles.^{8,243} La formation des esters boronates résultants peut être réalisée en milieu organique anhydre par déshydratation à l'aide d'un appareil de Dean-Stark ou en présence d'un agent desséchant. Les esters boronates peuvent également être formés en milieu aqueux dans lequel le pH est contrôlé. En effet, le pH doit être supérieur au pKa de l'acide boronique afin de passer d'une géométrie sp² trigonale à sp³ tétraédrique par complexation de l'anion hydroxyle dans l'orbitale p vacante du bore (Figure 45).²⁴⁴ Ainsi, la réduction de la tension de cycle observée favorise la formation d'un ester boronate stabilisé. Le pH est donc un paramètre clé afin de contrôler l'assemblage acide boronique-diol et, dans le cadre de ces travaux de thèse, de contrôler l'activité des split DNAzymes et ribozymes modifiés.

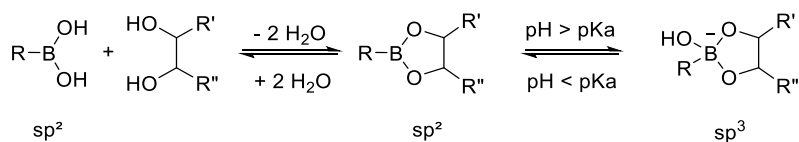


Figure 45 : Schéma général de la formation d'esters boronates.

Cette capacité à former des liaisons covalentes réversibles est pertinente car elle permet de contrôler la géométrie de l'assemblage et d'obtenir le composé le plus stable thermodynamiquement. Par conséquent, les esters boronates ont suscité un grand intérêt pour la construction de biomatériaux par auto-assemblage,²⁴⁵ le transport de drogues d'intérêt²⁴⁶ ou encore pour la détection de molécules,^{247,248} ce qui nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce chapitre.

La formation d'esters boronates peut également être utilisée dans l'objectif unique de protéger les acides boroniques envers de possibles dégradations telles que les réactions d'oxydations. Pour cela, de nombreux diols sont utilisés à cet effet, dont les plus courants sont les ligands divalents pinacol et catéchol ou le ligand trivalent acide *N*-méthyliminodiacétique (MIDA). Ce dernier, développé récemment par Burke, permet, de la même façon que les anions hydroxyles, de complexer l'atome d'azote dans l'orbitale p vacante du bore et de stabiliser l'ester boronate résultant (Figure 46).²⁴⁹

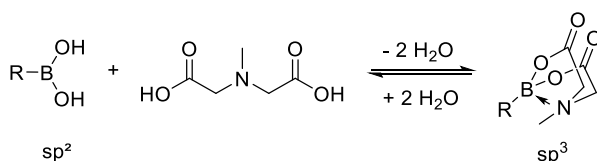


Figure 46 : Formation d'un ester MIDA-boronate par déshydratation.

Toutefois, l'utilisation de ligands divalents tels que le pinacol ou le catéchol entraîne une diminution de la réactivité par rapport aux acides boroniques correspondants. En effet, la conjugaison induite par les doublets non liants des deux atomes d'oxygènes qui complexent l'orbitale p vacante du bore entraîne une diminution de l'acidité de Lewis de l'orbitale p vacante (Figure 47).²⁴⁹ La diminution de réactivité induite est alors problématique pour des applications futures dans des réactions de couplage telles que le couplage de Suzuki-Miyaura. Le ligand trivalent MIDA apparaît alors comme une alternative prometteuse car il permet au bore d'adopter une hybridation sp^3 via la complexation de l'orbitale p vacante par l'atome d'azote, la rendant ainsi indisponible pour le phénomène non désiré de conjugaison. De plus, le groupement MIDA est baso-labile et nécessite des conditions relativement douces pour la

déprotection. Tous ces paramètres en font donc un groupement protecteur de choix qui sera principalement utilisé dans ces travaux de thèse.

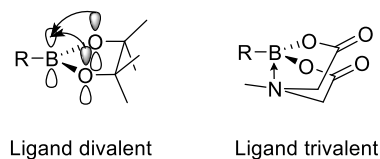


Figure 47 : Réactivité des esters boronates en fonction de la nature du ligand.

Depuis plusieurs années, l'équipe ChemBioNAC étudie la formation, dirigée par une matrice d'oligonucléotides, de liaisons internucléosidiques covalentes et réversibles de type ester boronate.^{10,14} Ainsi, en présence de la matrice, l'hybridation de deux fragments fonctionnalisés respectivement par un acide boronique à l'extrémité 5' et un diol à l'extrémité 3' permet d'augmenter la molarité effective des réactifs et de faciliter la réaction entre les deux entités (Figure 48). De plus, une augmentation du pH permet de stabiliser le complexe grâce à la formation d'un anion hydroxyboronate. La réaction de ligation est ensuite analysée par spectrophotométrie UV permettant de déterminer la température de demi-fusion (T_m) dont la valeur augmente lorsque le complexe est stabilisé.

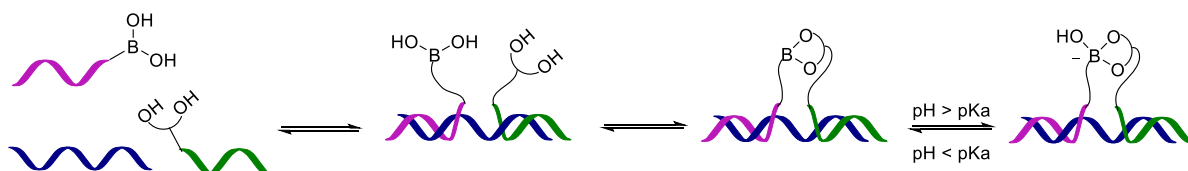


Figure 48 : Schéma général de la formation d'ester boronate dirigée par une matrice.

L'application de ce type de ligation aux split DNAzymes *via* l'introduction d'un acide boronique et d'un diol aux extrémités 5' et 3' des deux fragments pourrait ainsi permettre un assemblage réversible et contrôlable par un stimulus externe.

Parmi les DNAzymes connus, le **10-23** isolé par Santoro et Joyce⁶⁰ fait partie des systèmes les plus étudiés car il est relativement court et possède une très bonne activité catalytique en conditions physiologiques (Figure 49A).²⁵⁰ Cette séquence d'ADN, composée d'une boucle catalytique entourée de deux bras de reconnaissance, est capable de reconnaître un substrat d'ARN et de le couper entre un 5'-nucléoside purine, soit l'adénosine A9 non appariée, et un 3'-nucléoside pyrimidine, soit l'uridine U10, en présence d'un activateur, le magnésium. En l'absence d'ions Mg^{2+} , aucune activité catalytique n'est observée. Bien que ce système soit très étudié, le mécanisme d'action n'a pas encore été clairement élucidé et il semblerait que

plusieurs facteurs entrent en jeu. Tout d'abord, les nucléotides allant de G8 à G14 ainsi que C21 et G22 constituent le site catalytique, ils ont donc une importance primordiale pour le maintien de l'activité catalytique (Figure 49B). En effet, les fonctions amines exocycliques (4-amino) des nucléotides C11 et C21 ainsi que la fonction carbonyle (6-one) du nucléotide G14 semblent former un complexe actif tandis que les fonctions amine (2-amino) et carbonyle (6-one) du nucléotide G22 apparaissent comme essentielles pour la coupure du substrat. Ainsi, la coordination de l'ion Mg^{2+} par ces différents nucléotides permet de maintenir l'enzyme dans sa conformation active et ces derniers ne peuvent donc pas être modifiés sous peine d'affecter l'activité catalytique résultante.

Concernant le mécanisme de coupure en lui-même, il semblerait que l'ion Mg^{2+} agisse comme une base afin d'ioniser une molécule d'eau adjacente pour former un anion hydroxyle (Figure 49B). De plus, le magnésium est un acide de Lewis et peut donc coordiner l'hydroxyle en position 2' de l'adénosine non appariée. L'acidité du proton est alors augmentée, ce qui favorise sa déprotonation par l'anion hydroxyle et entraîne de fait la coupure de la liaison internucléosidique entre l'adénosine et l'uridine par transestérification. Cela se traduit alors par la formation de deux brins distincts, l'un comportant un cycle à cinq chaînons à l'extrémité 3' entre les deux hydroxyles 2' et 3' du sucre et le groupement phosphate, et l'autre comportant un hydroxyle libre à l'extrémité 5'.

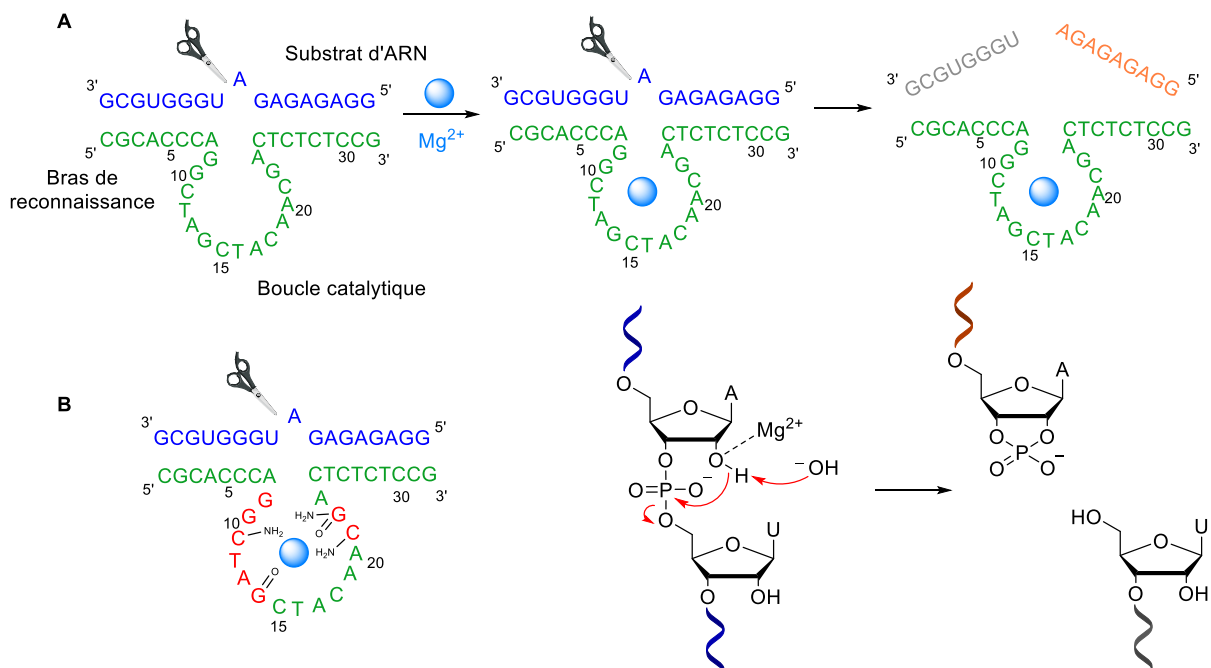


Figure 49 : (A) Structure du DNAzyme 10-23 et principe d'action. (B) Mécanisme d'action de coupure du substrat (les nucléotides formant le site catalytique sont en rouge).

Bien que l'activité de ce système soit dépendante de la séquence du cœur catalytique, la nature des nucléotides qui ne sont pas impliqués dans le mécanisme de coupure peut varier d'un système à l'autre. De plus, la séquence du bras de reconnaissance peut être de nature très variable étant donné qu'elle est complémentaire du substrat d'ARN à détecter. Ainsi, le groupe de Lusica a incorporé des thymidines photocagées, dont l'amine N3 de la nucléobase T16 est protégée par un groupement 6-nitropipéronyloxyméthyl (NPOM) sensible à la lumière, à différentes positions de la séquence.²⁵¹ L'impact de ces modifications sur l'activité catalytique a ensuite été étudié par gel d'électrophorèse. Il apparaît alors que l'ajout de la modification entraîne une inhibition totale de l'activité catalytique. En revanche, l'irradiation UV coupe le groupement NPOM photosensible et déprotège l'amine, entraînant ainsi le rétablissement de l'activité catalytique (Figure 50).

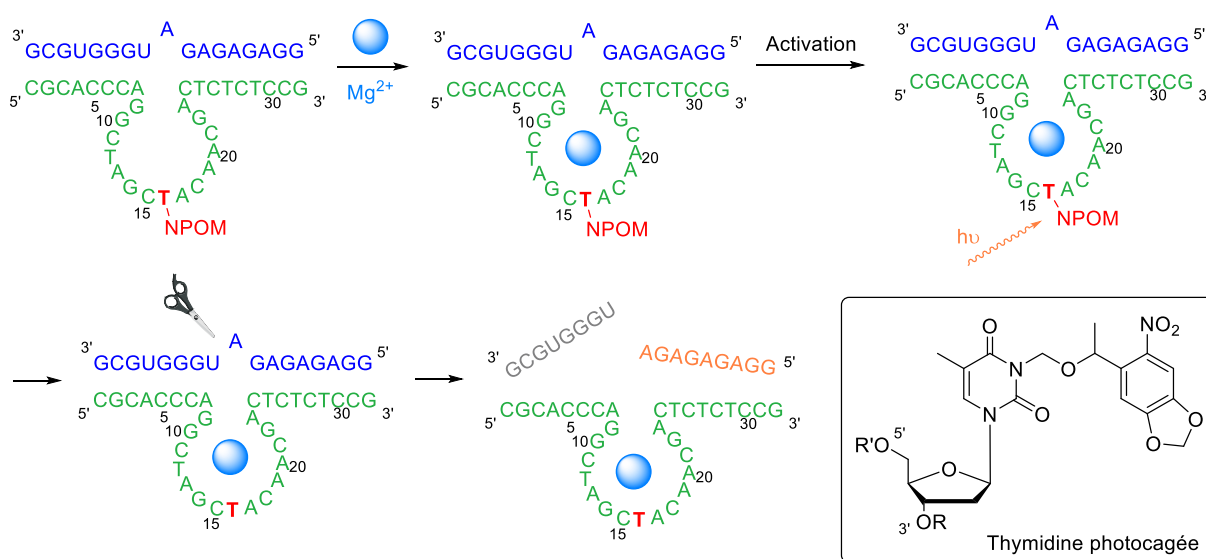


Figure 50 : Exemple d'activation du DNAzyme **10-23** photocagé par irradiation UV.²⁵¹

Basés sur ce système et les précédents travaux réalisés au sein de l'équipe, nous avons choisi d'introduire une jonction internucléosidique de type ester boronate au sein du DNAzyme **10-23** dont la formation dépend du pH. Toutefois, bien que plusieurs études relatent l'utilisation de ce système pour diverses applications,^{48,49,62,64} seulement quelques-unes rapportent l'utilisation de split DNAzymes. Même si les split DNAzymes étudiés ne sont pas explicitement nommés en tant que tels, la première étude à reporter ce type de système divisé a été réalisée par le groupe de Dmochowski avec le DNAzyme **10-23** capable de reconnaître le substrat **VEGFR2** (Figure 51A).²⁵² En effet, certains nucléotides du DNAzyme ont été remplacés par un espaceur photoclivable et l'activité catalytique du système a été étudiée avant et après irradiation UV (Figure 51B). L'application du stimulus entraîne la coupure de l'espaceur et la

formation d'un phosphate en position 5' et d'une cétone en position 3' (Figure 51C). Il apparaît ainsi que lorsque le DNAzyme est coupé au niveau du site catalytique, le maintien de l'activité catalytique dépend fortement de la position de l'espaceur, ce qui corrobore la présence clé de certains nucléotides pour la coupure du substrat comme précédemment évoqué. De plus, l'insertion de la modification au niveau du bras de reconnaissance diminue l'activité catalytique de moitié après irradiation UV. Enfin, les modifications simultanées de la boucle catalytique et du bras de reconnaissance divisent le DNAzyme en trois fragments après stimulus, inhibant de ce fait totalement l'activité catalytique. Cette étude met ainsi en lumière la capacité d'un split DNAzyme à couper un substrat d'ARN cible, bien que l'efficacité soit diminuée par rapport au DNAzyme parent.

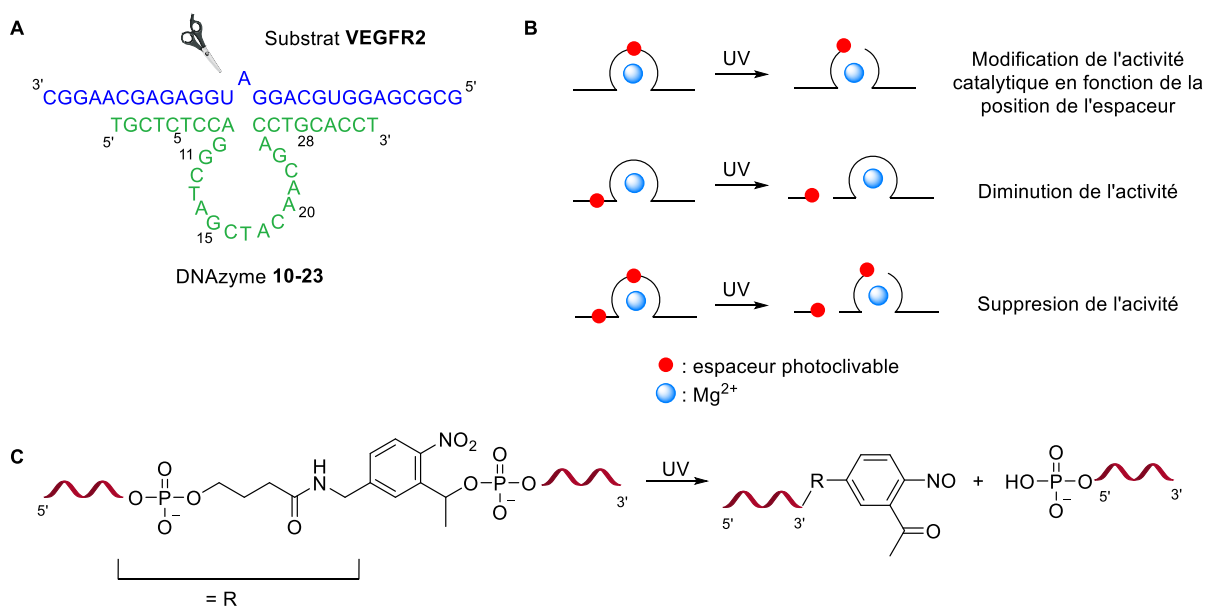


Figure 51 : (A) Structure du DNAzyme 10-23 utilisé et (B) des différents systèmes photostimulables. (C) Schéma de la réaction de clivage sous irradiation UV.²⁵²

Ce même groupe a ensuite étudié ces split DNAzymes de façon plus approfondie et a divisé le DNAzyme 10-23 entre différents résidus de la boucle catalytique pour générer quatorze split DNAzymes différents.⁶⁸ Ils observent alors que les split DNAzymes dont la coupure a été effectuée au centre de la boucle catalytique, entre C16 et T17 ou T17 et A18, ne sont quasiment pas affectés car l'activité catalytique obtenue est comparable au DNAzyme parent. Ces systèmes divisés au centre de la boucle ont ensuite été utilisés pour développer un système photomodulable en fonctionnalisant l'extrémité 5' du second fragment par un espaceur photoclivable lié à la biotine (Figure 52A). En présence de streptavidine, la biotine incorporée au fragment du split DNAzyme est fortement liée à la protéine, ce qui inhibe totalement

l'activité catalytique. L'irradiation UV permet alors de couper l'espaceur, libérant le complexe streptavidine-biotine et le fragment du split DNAzyme avec un phosphate supplémentaire à l'extrémité 5' (Figure 52B). L'activité du système est alors presque totalement restaurée.

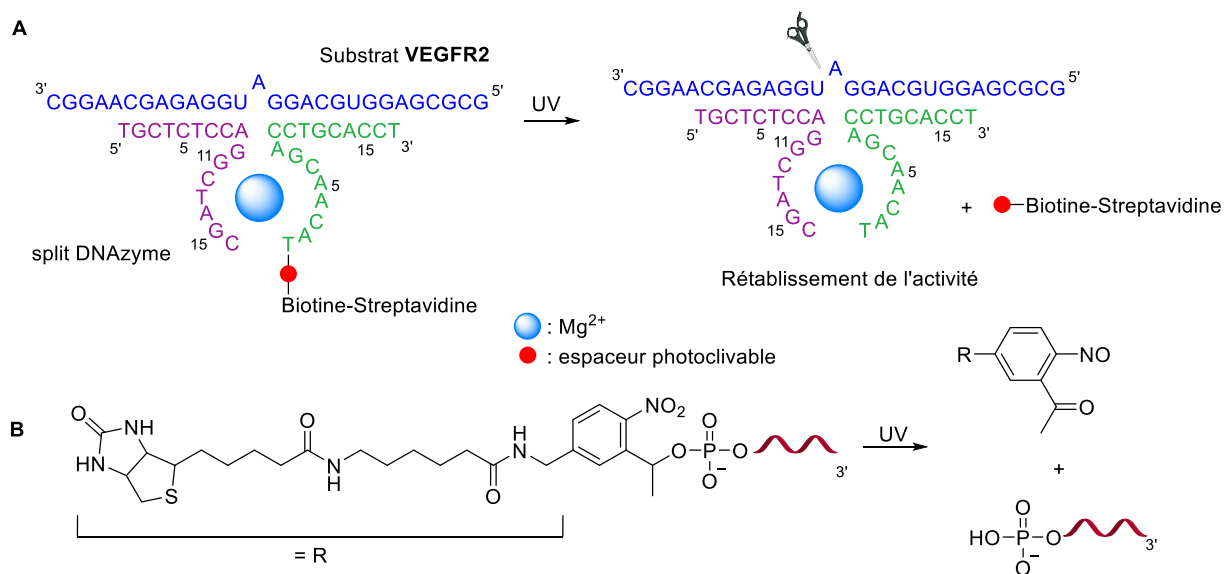


Figure 52 : (A) Exemple d'activation d'un split DNAzyme synthétisé et (B) structure de l'espaceur photoclivable utilisé pour introduire la biotine.⁶⁸

Pour notre part, nous avons décidé d'étudier différents systèmes comprenant plusieurs sites de coupures et types de modifications à partir de la séquence du DNAzyme **10-23** décrite par Lusic.²⁵¹ Pour cela, nous avons imaginé cinq split DNAzymes différents en découpant la séquence après les cinq thymidines, similairement à l'étude de Lusic (Figure 53A). D'autres split systèmes analogues, dans lesquels la dernière thymidine a été supprimée, ont également été étudiés. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, tels quels les deux fragments sont non-fonctionnels et sont peu susceptibles de s'assembler, ce qui se traduit par une très forte diminution voire une inhibition totale de l'activité catalytique. Le but est donc de la rétablir par la formation d'une jonction internucléosidique de type ester boronate. Pour cela, chaque split DNAzyme a été modifié comme suit : (i) remplacement de la désoxycytidine à l'extrémité 3' du premier fragment par une ribocytidine qui apporte la fonction *cis*-diol, (ii) introduction de différentes molécules comprenant un acide boronique à l'extrémité 5' du second fragment (Figure 53B), soit en les ajoutant après la dernière thymidine soit en remplaçant celle-ci (Figure 53A). Différents phosphoramidites modifiés ont été synthétisés afin d'étudier leur impact sur l'activité catalytique, à savoir : une borono-thymidine (**T^{Bn}**) analogue de la thymidine naturelle, un acide phénylboronique (**Ph^{Bn}**) et un acide naphthalèneboronique (**Napht^{Bn}**) (Figure 53C). Ces phosphoramidites ont ensuite été incorporés au sein des séquences par chimie classique des

phosphoramidites. L'acide phénylboronique a également été introduit par chimie click (CuAAC) pour étudier l'influence d'un lien triazole sur l'activité catalytique (**TrPh^{Bn}**). La comparaison entre tous ces systèmes nous permettra alors d'évaluer l'impact du site de coupure, de la longueur du brin et du type de modification sur la formation de l'ester boronate et par conséquent son effet sur le rétablissement de l'activité catalytique.

D'autre part, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Sabine Müller de l'Universität Greifswald en Allemagne, ce concept a également été appliqué au split ribozyme **HPWTL2**. Ce système a été étudié avec les mêmes phosphoramidites modifiés mais le split ribozyme étant une séquence d'ARN, la borono-uridine **U^{Bn}** a également été synthétisée. Les résultats obtenus par la doctorante Amandine Lelievre seront résumés dans la dernière partie de ce chapitre.

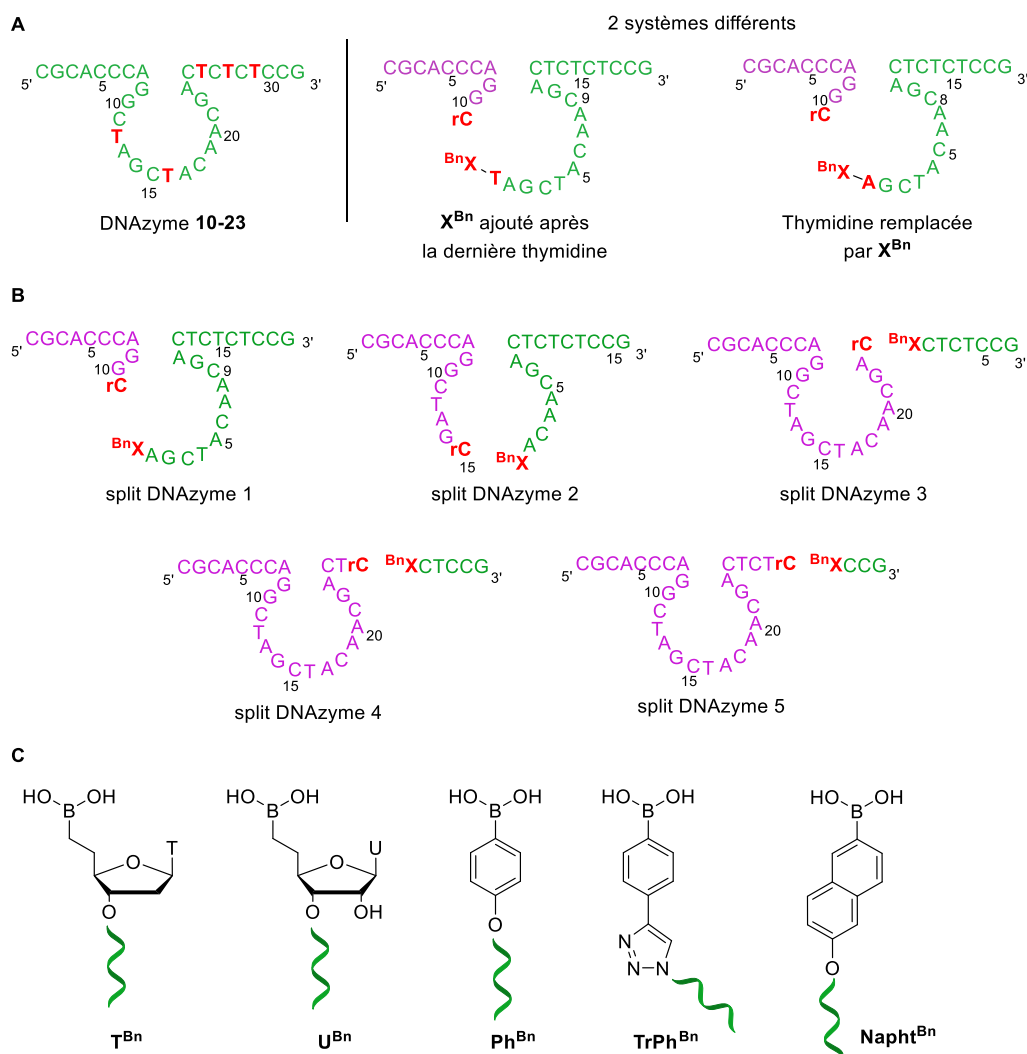


Figure 53 : (A) Conception des split DNAzymes étudiés. (B) Structure de chaque split DNAzyme et (C) de chaque acide boronique incorporé.

Tout d'abord, la synthèse des différents phosphoramidites modifiés par des acides boroniques ainsi que leur incorporation au sein des séquences sera présentée puis une première étude du DNAzyme parent par HPLC et fluorescence nous permettra d'optimiser les conditions de réactions. Les différents résultats obtenus par gel d'électrophorèse (PAGE) et fluorescence avec les split DNAzymes modifiés par des acides boroniques seront ensuite exposés. Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, la formation de l'ester boronate est très dépendante du pH du milieu. Le système obtenant les meilleurs résultats sera alors étudié pour développer une sonde pH-sensible. Enfin, l'étude des split ribozymes sera présentée ainsi que quelques perspectives sur d'éventuelles applications.

2.2 Synthèse des phosphoramidites modifiés par des acides boroniques

2.2.1 Synthèse multi-étapes de T^{Bn}

La synthèse du phosphoramidite T^{Bn} est réalisée en neuf étapes et est inspirée de précédents travaux menés dans l'équipe,^{18,253} bien que certaines étapes aient été optimisées (Figure 54).

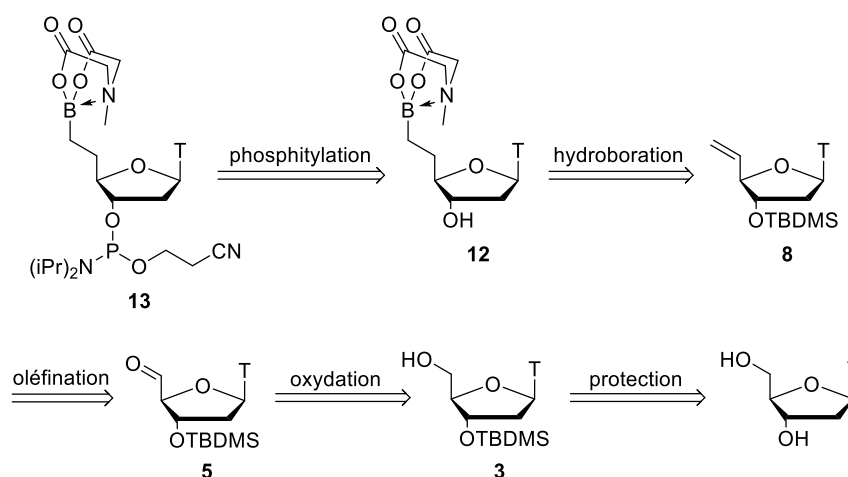


Figure 54 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse de la borono-thymidine 13.

Tout d'abord, l'hydroxyle en position 5' est protégé de façon sélective avec du chlorure de diméthoxytrityle (DMTCl) dans la pyridine anhydre pour conduire au produit 1 avec un rendement de 89 % (Figure 55).

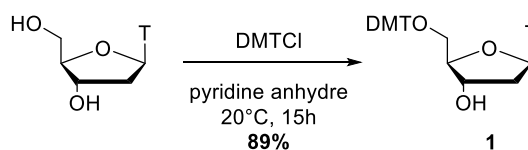


Figure 55 : Tritylation de la thymidine.

L'hydroxyle en position 2' est ensuite silylé en présence d'imidazole et de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMSCl) dans la pyridine anhydre (Figure 56). L'intermédiaire **2**, obtenu avec un rendement brut de 93 %, est directement engagé dans la réaction de détritulation sans aucune purification supplémentaire. Le traitement avec une solution d'acide benzène sulfonique (BSA) dans un mélange dichlorométhane/méthanol permet la déprotection sélective de la position 5' pour obtenir le produit **3** avec un rendement de 89 %.

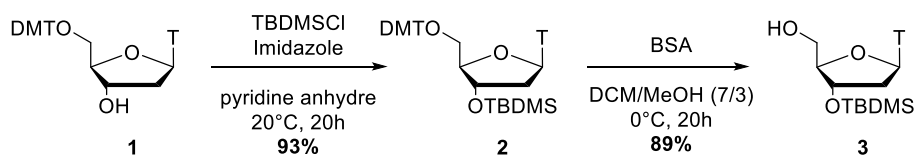


Figure 56 : Silylation de **1** et détritulation de **2**.

L'étape suivante d'oxydation de l'alcool en position 5' en aldéhyde nécessite la synthèse préalable de l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX) **4** à partir de l'acide iodobenzoïque en présence d'oxone monopersulfate (Figure 57). L'utilisation du protocole expérimental décrit par Frigerio (1,3 équivalents d'oxone)²⁵⁴ mène principalement à l'intermédiaire réactionnel acide 2-iodosobenzoïque. Nous avons également noté que la proportion de cet intermédiaire varie en fonction de la température du milieu réactionnel. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace pendant 30 minutes avec une agitation lente. La formation de l'IBX est visible à l'œil nu grâce à sa nature cristalline et brillante caractéristique, contrairement à l'intermédiaire non souhaité présent sous forme d'une poudre blanche. Toutefois, en récupérant l'intermédiaire par filtration et en relançant la réaction avec un excès d'oxone monopersulfate (3 équivalents), il est possible de compléter la réaction jusqu'à obtenir uniquement l'IBX. Le protocole expérimental a alors été modifié en augmentant le nombre d'équivalents d'oxone à 3 pour les synthèses suivantes. Grâce à cette modification, un rendement de 69 % est obtenu sans aucune trace de l'intermédiaire.²⁵⁵ L'alcool **3** est ensuite oxydé par l'IBX dans l'acétonitrile pour conduire à l'aldéhyde **5** de façon quantitative et sans purification nécessaire (Figure 57).

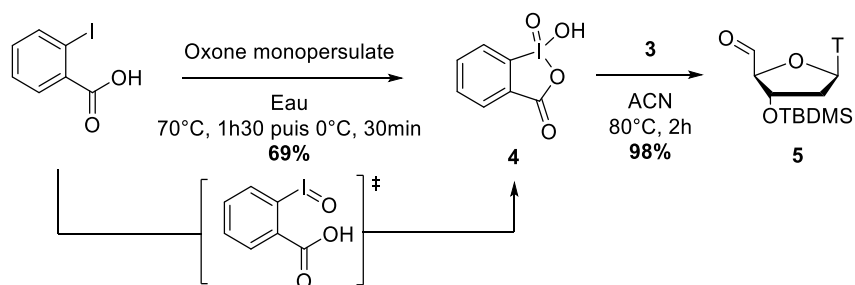


Figure 57 : Synthèse d'IBX **4** et oxydation de **3**.

L'homologation de l'aldéhyde en alcène a ensuite été étudiée *via* plusieurs voies de synthèse. La première stratégie est l'homologation de l'aldéhyde en alcyne par le réactif de Bestmann-Ohira (BOR) **6**,²⁵⁶ suivie d'une hydrogénation pour obtenir l'alcène **8** (Figure 58). Cependant, cette synthèse nécessite la formation du BOR **6** en présence d'hydrure de sodium et d'azide p-acétamidobenzènesulfonyl (ABSA) ainsi que de l'intermédiaire alcyne **7** avant d'obtenir l'alcène **8** par semi-hydrogénation. Bien que cette dernière étape soit quantitative, son manque de reproductibilité due à l'inhomogénéité du catalyseur de Lindlar est problématique, ce qui nous contraint à lancer les réactions uniquement sur grosse quantité pour avoir un maximum de catalyseur en solution. Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser une quantité importante de cyclohexène (alcène sacrificiel) afin de limiter la sur-réduction qui conduit à l'alcane.

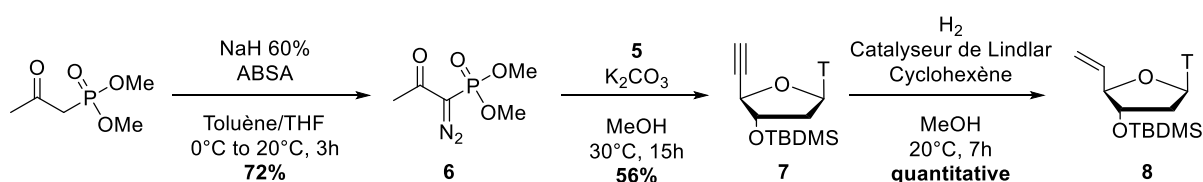


Figure 58 : Synthèse du réactif de Bestman-Ohira **6** permettant l'homologation de **5** suivi d'une réduction par hydrogénation.

Une seconde stratégie de synthèse a alors été envisagée : l'oléfination de l'aldéhyde pour conduire à l'alcène **8** en une seule étape grâce au réactif de Tebbe (Figure 59).²⁵⁷ Ce réactif est présent sous la forme d'un complexe titane-aluminium en équilibre avec la forme réactive de type carbène dans le tétrahydrofurane. Le titane étant connu pour sa tendance à se lier fortement à un atome d'oxygène, il favorise la formation d'un intermédiaire à quatre chaînons qui conduit ensuite à l'alcène **8** attendu en libérant de l'oxyde de titane. Bien que cette voie de synthèse ait déjà été utilisée au laboratoire, de faibles rendements (34 %) sont obtenus et le traitement de la réaction est compliqué du fait que le réactif ainsi que les sous-produits formés ne soient pas solubles dans l'eau.

Une nouvelle stratégie a alors été développée *via* le réactif de Nysted (Figure 59).²⁵⁸ Initialement utilisé en présence de tétrachlorure de titane pour ses propriétés d'acide de Lewis et son oxophilie,²⁵⁹ il a ensuite été utilisé en présence d'éthérate de trifluorure de bore afin d'obtenir une méthylation chimiosélective des aldéhydes tout en évitant le dégagement exothermique et corrosif de chlorure d'hydrogène en présence d'eau ou de tétrahydrofurane.²⁵⁸ Bien que le mécanisme n'ait pas été clairement élucidé, l'acide de Lewis semble être coordonné par l'atome d'oxygène de l'aldéhyde permettant ensuite une addition nucléophile du réactif de

Nysted. L'alcène est ainsi obtenu avec un rendement de 70 % et le réactif de Nysted est facilement éliminé en phase aqueuse.

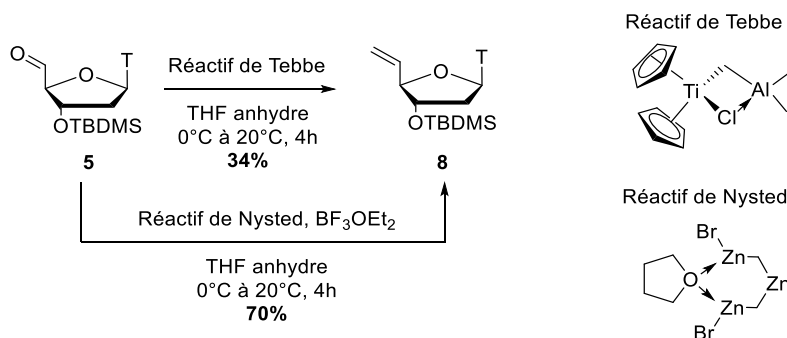


Figure 59 : Oléfination de **5** par les réactifs de Tebbe et de Nysted.

L'alcène **8** est ensuite engagé dans une réaction d'hydroboration en utilisant le diméthylsulfure de borane et le diisopinocampérylborane, également appelé α -pinène (Figure 60). L'espèce réactive est ainsi formée *in situ* et l'alcène **8** est ajouté après 4 heures de réaction à 35°C. Après une hydrolyse acide lors du traitement de la réaction, l'acide boronique **9** est obtenu avec un rendement de 75 %.

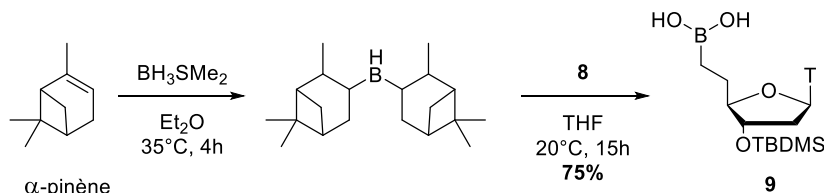


Figure 60 : Hydroboration de l'alcène **8**.

L'acide boronique doit ensuite être protégé et, comme précédemment évoqué, le MIDA a été utilisé car l'atome d'azote est capable de complexer l'orbitale p vacante de l'atome de bore et ainsi stabiliser l'ester boronate. Pour cela, l'acide boronique est dissous dans un mélange benzène/DMSO, ce dernier étant nécessaire pour solubiliser le produit. Après ajout du MIDA, la solution est chauffée à reflux pendant 20 heures avec un appareil Dean-Stark afin de pouvoir éliminer l'eau et déplacer l'équilibre vers la formation de l'ester boronate (Figure 61). L'ajout de tamis moléculaire permet de faciliter l'élimination d'eau et d'augmenter le rendement. Le composé **10** est ensuite désilylé en position 3' par une solution diluée d'acide chlorhydrique dans le méthanol. Toutefois, le rendement de cette étape est relativement faible et peut s'expliquer par la présence de méthanol et de lithine, utilisée pour neutraliser l'acide, entraînant la déprotection de l'ester boronate.

Afin d'éviter cette déprotection non désirée, l'ordre des réactions a été inversé (Figure 61). Ainsi, l'hydroxyle est d'abord désilylé avec un rendement de 68 %, la perte de produit pouvant ici s'expliquer par l'oxydation de l'acide boronique. Le composé **11** est ensuite protégé par le MIDA de la même façon que précédemment et le composé **12** est obtenu avec un rendement de 62 %.

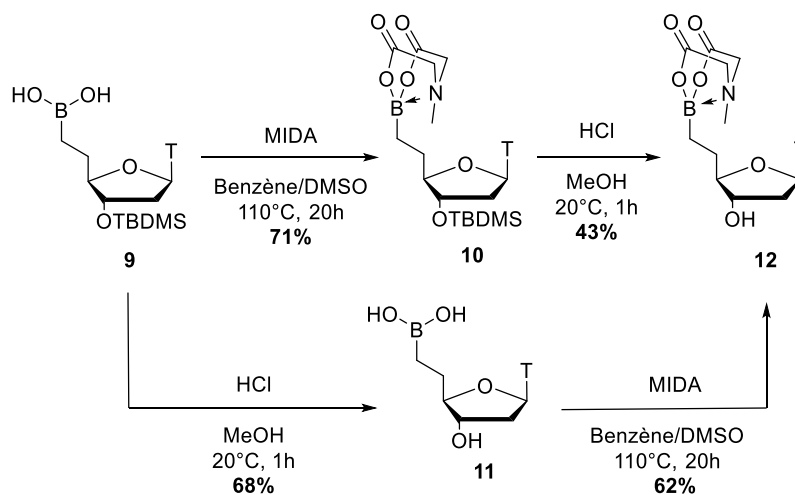


Figure 61 : Protection de l'acide boronique **9** et déprotection de l'hydroxyle en position 3'.

Le composé **12** est ensuite phosphitylé en présence de 2-cyanoéthyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite et de diisopropyléthylamine (DIEA) dans l'acétonitrile anhydre pour conduire au phosphoramidite modifié **T^{Bn}** avec un rendement de 37 % (Figure 62). Le faible rendement peut s'expliquer par la difficulté à séparer le composé **13** de l'excès de réactifs qui co-éluent lors de la purification sur colonne de silice. Cette limitation entraîne alors des étapes de purification successives à l'origine d'une perte significative de produit.

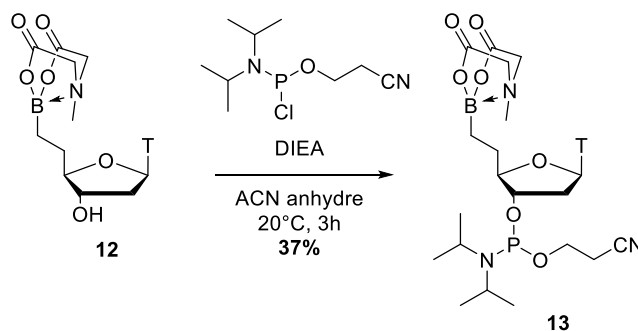


Figure 62 : Phosphitylation du composé **12**.

Le phosphoramidite **T^{Bn}** a ensuite été incorporé au sein des séquences d'acides nucléiques désirées selon la méthode classique des phosphoramidites qui sera décrite au paragraphe 2.3.1.

2.2.2 Synthèse multi-étapes de U^{Bn}

La synthèse du phosphoramidite modifié borono-uridine U^{Bn} a été entreprise *via* deux voies de synthèses, à savoir une protection PivOM en position 2', groupement protecteur développé par l'équipe ChemBioNAC,²⁶⁰ et une protection classique TBDMS. Dans les deux cas, la synthèse est inspirée de celle précédemment décrite pour le composé T^{Bn}. Le composé final, non phosphitylé pour éviter de possibles dégradations lors du transport, a ensuite été envoyé à l'Universität Greifswald afin d'être introduit dans les séquences d'acides nucléiques correspondant au split ribozyme étudié, le HPWTL2.

2.2.2.1 Protection 2'-PivOM

La synthèse d'ARN est connue pour être plus compliquée et plus sensible que la synthèse d'ADN. En effet, en milieu basique l'ARN peut être soumis à une attaque nucléophile de l'hydroxyle en position 2' sur l'atome de phosphore, entraînant une isomérisation 2'-3' ou une coupure de la liaison internucléosidique.²⁶¹ Les groupements protecteurs baso-labiles sont donc généralement écartés au profit de groupements tels que le TBDMS, déprotégés par des ions fluorures. Toutefois, un groupement protecteur baso-labile, le pivaloyloxyméthyle (PivOM), a été développé avec succès par l'équipe ChemBioNAC.²⁶⁰ En plus d'être compatible avec les protections classiques, c'est-à-dire les diméthoxytrityles en position 5', les 2-cyanoéthyles sur les groupements phosphates ou encore les groupements acyles sur les nucléobases, le PivOM a également l'avantage d'être coupé en conditions douces et donc compatibles avec l'ARN. En effet, la première étape consiste à déprotéger les groupements phosphates avec une base forte non nucléophile, la 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène (DBU) ou la pipéridine, puis à déprotéger les nucléobases et les hydroxyles en position 2' en même temps que l'oligonucléotide est coupé du support par un traitement ammoniacal à 37°C pendant 3 heures. Ces travaux ayant fait l'objet d'un brevet, l'uridine protégée en position 5' par un groupement DMT et en position 2' par un groupement PivOM est aujourd'hui commercial. Nous sommes donc partis de ce composé comme substrat de départ qui, à l'instar de T^{Bn}, a été silylé en position 2' et déprotégé en position 5' par un traitement acide pour conduire au produit **15** avec un rendement de 72% sur les deux étapes (Figure 63).

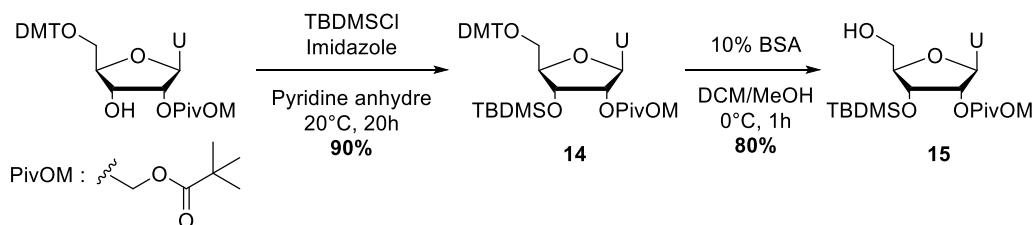


Figure 63 : Silylation et détritulation de l'uridine tritylée et protégée par le groupement PivOM en position 2'.

L'alcool primaire de l'intermédiaire **15** est ensuite oxydé en aldéhyde par l'IBX de façon quantitative (Figure 64). En revanche, l'homologation de l'aldéhyde ne peut ici pas être réalisée avec le réactif de Nysted car celui-ci met en jeu l'éthérate de trifluorure de bore qui peut déprotéger le groupement PivOM. L'utilisation du réactif de Bestmann-Ohira est également impossible car elle nécessite l'assistance d'une base, le K_2CO_3 , susceptible de déprotéger l'hydroxyle en position 2'. Pour cette étape, il est donc nécessaire d'utiliser le réactif de Tebbe malgré les faibles rendements obtenus de 22 % en moyenne pour obtenir le composé **17**.

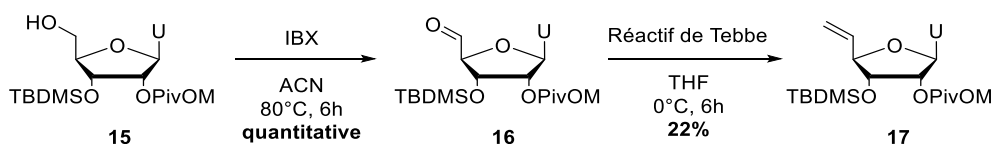


Figure 64 : Oxydation de **15** et homologation de **16**.

Afin d'améliorer ces rendements, nous avons opté pour une seconde voie de synthèse dans laquelle l'hydroxyle en position 2' est protégé par un groupement TBDMS. En raison de l'encombrement stérique généré, l'étape de couplage lors de la synthèse automatique des oligonucléotides est plus lente. Celle-ci peut toutefois être optimisée en remplaçant l'agent de couplage 1*H*-tétrazole par de meilleurs activateurs tels que le 5-éthylthio-1*H*-tétrazole²⁶² ou le 5-(benzylmercapto)-1*H*-tétrazole (BMT).²⁶²

2.2.2.2 Protection 2'-TBDMS

Une stratégie de synthèse en 7 étapes a ainsi été développée (Figure 65).

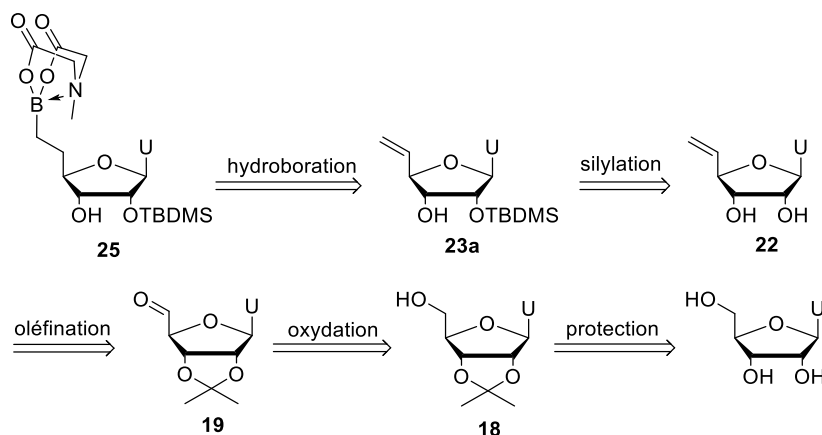


Figure 65 : Schéma rétrosynthétique de la borono-uridine **25**.

Tout d'abord, les hydroxyles en positions 2' et 3' de l'uridine ont été protégés de façon simultanée avec un groupement isopropylidène par l'ajout de 2,2-diméthoxypropane (DMP) et d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) (Figure 66). De la même façon que pour la synthèse de **T^{Bn}**, le composé **18** a ensuite été oxydé par l'IBX pour conduire à l'aldéhyde **19** de façon quantitative.

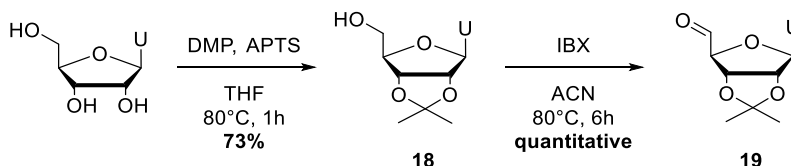


Figure 66 : Protection des hydroxyles 2' et 3' de l'uridine et oxydation du composé **18**.

La réaction d'homologation a été entreprise *via* l'utilisation du réactif de Nysted et de BOR (Figure 67). Au vu du rendement supérieur obtenu par le réactif de Nysted, cette voie de synthèse a été préférée et a permis, après déprotection de l'alcène **21** par l'acide trichloroacétique (TCA), de conduire au composé **22** avec un rendement de 69 %.

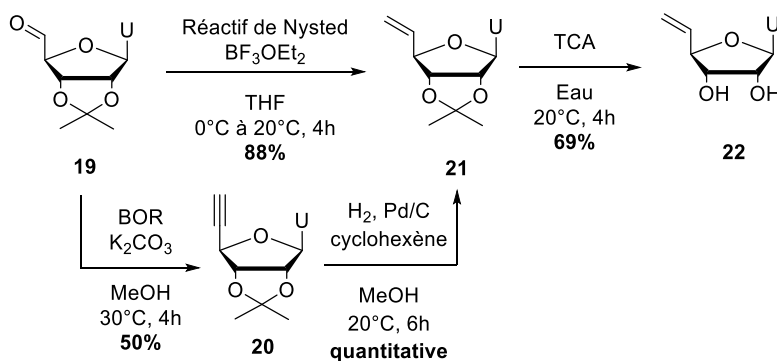


Figure 67 : Homologation de **19** par le réactif de Bestmann-Ohira ou de Nysted et déprotection.

Afin de silyler sélectivement l'hydroxyle en position 2', du TBDMSCI en présence de nitrate d'argent dans de la pyridine est utilisé pour conduire au composé **23a** avec un rendement de 54 % (Figure 68).²⁶³ Le rôle exact du nitrate d'argent n'a pas clairement été mis en évidence mais il semble être impliqué dans la coordination de l'hydroxyle en position 3', permettant ainsi la réaction de silylation quasiment exclusivement en position 2'. Une faible fraction du composé **23b**, présentant le groupement TBDMS en position 3', a été isolé et caractérisé. Cependant, la migration intramoléculaire 2'-3' du groupement silyle impliquant un atome de silicium pentavalent en présence de méthanol a déjà été rapportée dans la littérature.²⁶⁴ La poursuite de la synthèse doit ainsi exclure ce solvant pour ne pas risquer une migration non désirée du groupement protecteur.

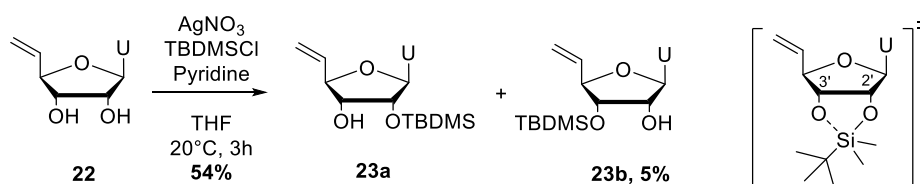


Figure 68 : Silylation sélective de l'alcène **22**.

L'alcène silylé en position 2' est ensuite borylé en présence de diméthylsulfure de borane et d' α -pinène dans un mélange d'éther diéthylique et de tétrahydrofurane conduisant au composé **24a** avec un rendement de 51 % (Figure 69). Cette réaction conduite sur un mélange de composés **23a** et **23b** nous a également permis de caractériser le composé borylé **24b**, avec le groupement TBDMS en position 3', sans toutefois avoir pu l'isoler. Enfin, la protection de l'acide boronique de l'intermédiaire **24a** par le MIDA conduit au composé final **25** avec un rendement de 63 %. Celui-ci a par la suite été envoyé au Professeur Sabine Müller de l'Universität Greifswald en Allemagne pour entreprendre l'étape de phosphorylation ainsi que l'introduction du produit obtenu au sein des séquences correspondant au split ribozyme étudié (**HPWTL2**).

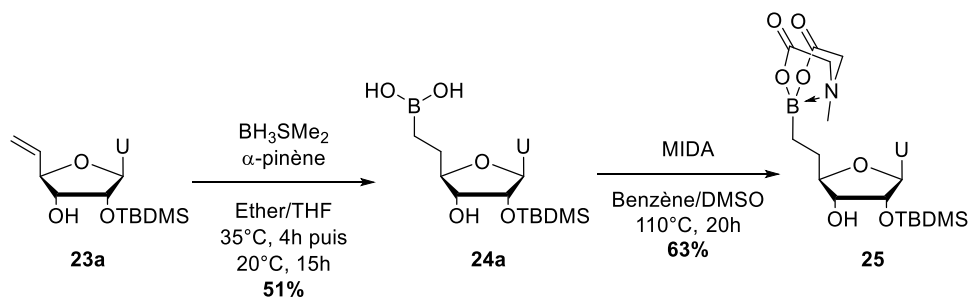


Figure 69 : Borylation de l'alcène silylé **23a** et protection de l'acide boronique **24a** par le MIDA.

2.2.3 Synthèse des autres dérivés boroniques

En plus des deux nucléosides modifiés T^{Bn} et U^{Bn} , d'autres synthons ont été synthétisés par des stratégies de synthèse similaires afin d'étudier l'influence du lien entre l'acide boronique et la séquence d'acide nucléique sur l'activité catalytique résultante (Figure 70). Tout d'abord, le composé **26** est obtenu par phosphitylation à partir du 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phénol commercial avec un rendement de 42 %. Afin d'augmenter l'aromaticité et la rigidité du composé, le composé **28** a été synthétisé à partir de l'acide naphthalèneboronique, protégé par le MIDA puis phosphitylé avec un rendement de 18 % sur les deux étapes. Malgré ces rendements modérés, une quantité suffisante de produits a été obtenue pour les futures synthèses d'oligonucléotides, ces réactions n'ont de ce fait pas été optimisées.

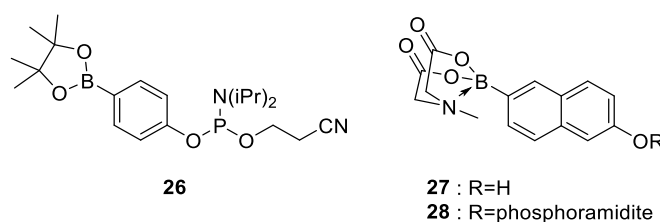


Figure 70 : Structure des autres synthons synthétisés.

L'ensemble des phosphoramidites contenant des acides boroniques ont ensuite été incorporés à l'extrémité 5' des séquences d'acides nucléiques nécessaires à l'étude du split DNAzyme **10-23**.

2.3 Synthèse des séquences modifiées

2.3.1 Chimie classique des phosphoramidites

Les oligonucléotides modifiés par les différents acides boroniques, dont les séquences ont été déterminées à partir du DNAzyme **10-23** de Lusic,²⁵¹ ont été synthétisés sur support solide par la méthode classique des phosphoramidites par un synthétiseur automatique.^{265,266} Le nucléoside à l'extrémité 3' est greffé sur un support solide de billes de verre à porosité contrôlée (CPG) *via* un lien succinyl et l'élongation de l'oligonucléotide s'effectue de l'extrémité 3' vers 5' selon le cycle de synthèse décrit ci-dessous (Figure 71). Tout d'abord, l'oligonucléotide en formation est détritylé à l'extrémité 5' par un traitement au TCA en solution dans le dichlorométhane afin d'obtenir un hydroxyle libre et permettre l'élongation de la séquence. L'efficacité de la déprotection est évaluée par une mesure conductimétrique de la quantité de

cations 4,4'-diméthoxytrityles libérés. Le phosphoramidite correspondant au nucléoside suivant est ensuite ajouté en présence de BMT en solution dans l'acétonitrile pour former une liaison phosphite triester. Cette réaction de couplage n'est jamais totale et nécessite une étape de coiffage afin de bloquer les hydroxyles n'ayant pas réagi et ainsi empêcher la poursuite de la synthèse sur les oligonucléotides tronqués. Cette étape est réalisée par l'addition d'une solution d'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole (NMI) pour les séquences d'ADN ou d'anhydride phénoxyacétique pour les séquences d'ARN. Enfin, un traitement avec une solution de diiode dans le tétrahydrofurane est effectué en présence d'eau afin d'oxyder le lien phosphite triester instable en phosphate triester plus stable. Le cycle est ensuite répété autant de fois que nécessaire afin d'introduire les nucléosides suivants. Les séquences d'ADN synthétisées sont ensuite traitées par une solution d'ammoniacale à 28 % pendant 5 heures à 55°C pour les libérer du support et déprotéger les nucléobases ainsi que les groupements phosphates internucléosidiques. Les groupements pinacol et MIDA baso-labiles sont également déprotégés lors de cette étape. Classiquement, les séquences d'ARN sont protégées par un groupement TBDMS en position 2' et sont déprotégées par des ions fluorures. Cependant, dans le cas où les séquences d'ARN sont protégées par un groupement PivOM, l'utilisation de DBU est nécessaire pour déprotéger les phosphates internucléosidiques. Un traitement ammoniacal à 37°C pendant 3 heures permet ensuite d'éliminer tous les autres groupements protecteurs.

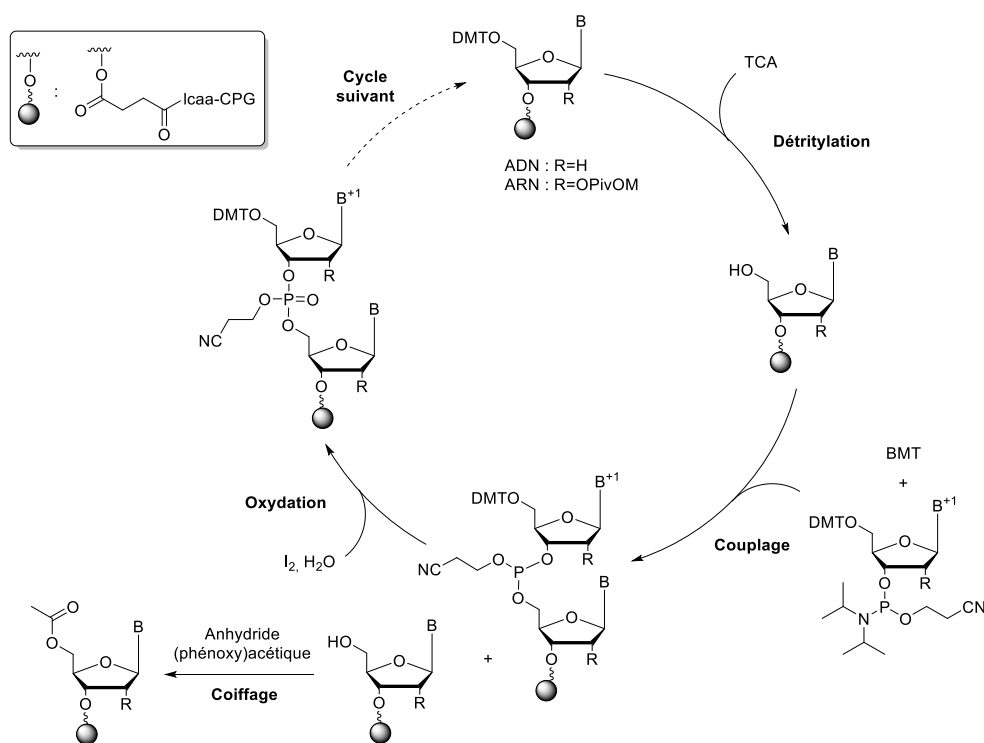


Figure 71 : Schéma général du cycle de synthèse d'oligonucléotides.

Pour les premières études par fluorescence des split DNAzymes non modifiés, le substrat a été fonctionnalisé par un fluorophore à son extrémité 3', le 6-FAM, et le DNAzyme ainsi que les split DNAzymes par un inhibiteur de fluorescence, le BHQ-1, à leur extrémité 5'. Pour cela, les supports solides et phosphoramidites correspondant ont été utilisés et la synthèse des oligonucléotides a été réalisée selon les conditions classiques (Tableau 1). Cependant, pour les phosphoramidites modifiés **T^{Bn}**, **Ph^{Bn}**, et **Napht^{Bn}**, une modification des conditions est nécessaire. Ainsi, les temps de couplage ont été augmentés jusqu'à 180 ou 1200 secondes selon le phosphoramidite incorporé et la dernière étape de détritylation n'a pas été effectuée.

Tableau 1 : Conditions utilisées pour la synthèse d'oligonucléotides.

Étape	Réaction	Réactifs	Temps (s)
1	Détritylation	3% TCA/DCM	65
2	Couplage	Non modifié : 0,1M amidite/ACN + 0,3M BMT/ACN	30
		Ph^{Bn} : 0,1M amidite/ACN + 0,3M BMT/ACN	180
		Napht^{Bn} : 0,05M amidite/ACN + 0,3M BMT/ACN	180
		T^{Bn} : 2x0,05M amidite/ACN + 0,3M BMT/ACN	1200
3	Coiffage	Ac ₂ O/THF/Pyridine + 10% NMI/THF	10
4	Oxydation	0,1M I ₂ /THF/H ₂ O/Pyridine	15

Les oligonucléotides obtenus sont ensuite purifiés par HPLC préparative en phase inverse puis analysés par HPLC analytique en phase inverse et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectre de masse est enregistré en mode négatif avec une matrice 6-aza-2-thiothymine (ATT) et du citrate d'ammonium en tant que co-matrice. Pour les séquences d'oligonucléotides modifiées par des acides boroniques, la masse attendue correspondant à $[M-H]^-$ n'est généralement pas observée. En revanche, la présence de signaux correspondant à des masses inférieures de 18, 36 ou 45 Da implique des fragmentations de type $[M-H_2O-H]^-$, $[M-2H_2O-H]^-$ et $[M-B(OH)_2-H]^-$ respectivement. Un signal avec une masse supérieure de 156 Da est également parfois observé et est attribué à un adduit de l'acide boronique avec le citrate d'ammonium présent dans la matrice. La présence de ces signaux d'intensité plus ou moins importante selon la puissance du laser a précédemment été reportée.²⁶⁷

2.3.2 Chimie click

L'influence du lien entre l'acide nucléique et l'acide boronique a été évaluée par l'introduction de l'ester 2-(4-éthynylphényl)pinacolborane commercial *via* un motif triazole par réaction de

CuAAC. Pour cela, les oligonucléotides ont été classiquement synthétisés mais n'ont pas été déprotégés ni coupés du support en fin de synthèse. En effet, il faut fonctionnaliser l'extrémité 5' avec une fonction azide pour pouvoir effectuer la réaction de CuAAC (Figure 72). Tout d'abord, la colonne contenant les billes de support CPG est connectée d'une part à une seringue vide et d'autre part à une seringue comportant une solution d'iodure de (méthyl)triphenylphosphonium dans le diméthylformamide. La solution est passée à travers la colonne d'une seringue à l'autre pendant 15 minutes à 20°C (percolation).²⁶⁸ Après plusieurs rinçages avec de l'acétonitrile et du dichlorométhane, la colonne est ensuite percolée avec une solution d'azoture de tétraméthylguanidinium (TMGA) dans l'acétonitrile pendant une heure et demie à 60°C.²⁶⁹ Les billes sont ensuite lavées avec de l'acétonitrile puis avec une solution de bisulfite de sodium afin d'éliminer l'excès de réactifs ainsi que toute trace d'iode résiduel. Enfin, toujours sur support, l'oligonucléotide est mis en présence de l'ester 2-(4-éthynylphényl)pinacolborane, de tris(benzyltriazolyméthyl)amine (THPTA) et d'une solution de sulfate de cuivre/ascorbate de sodium pendant une heure à 60°C. Après plusieurs lavages avec une solution d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pour éliminer tous les résidus de cuivre, l'oligonucléotide est déprotégé et purifié.

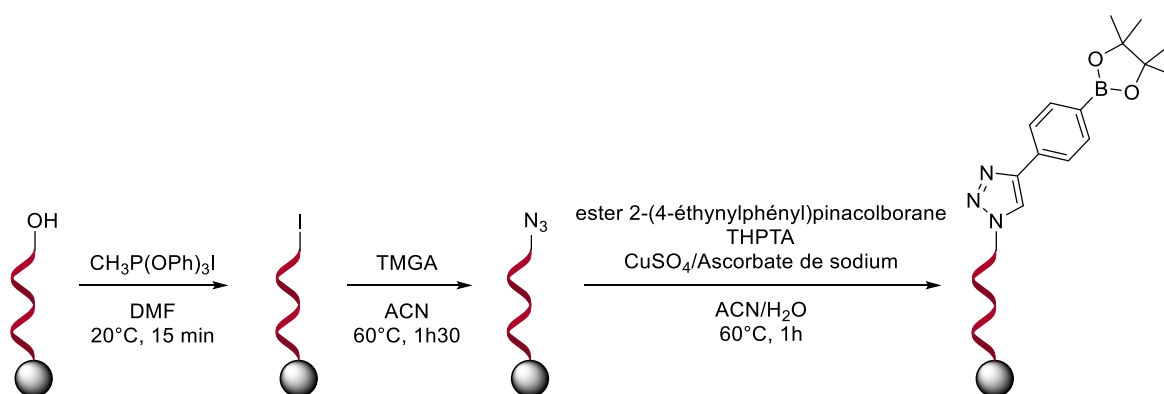


Figure 72 : Incorporation de l'acide boronique par chimie click.

Cette technique de borylation sur support par chimie click est, à notre connaissance, la première à avoir été reportée et fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le Chapitre 3 de ce manuscrit ainsi que d'une publication.²⁷⁰

Toutes les séquences d'oligonucléotides correspondant au DNAzyme **10-23** ainsi qu'aux systèmes divisés ayant été synthétisées (Tableau 2), nous avons ensuite étudié leur activité catalytique. Nous nous sommes d'abord intéressés au DNAzyme **10-23** puis aux systèmes divisés non modifiés par des acides boroniques afin de déterminer les conditions optimales. Ces

dernières ont ensuite été appliquées aux systèmes modifiés afin d'évaluer l'impact de la formation de l'ester boronate sur le rétablissement de l'activité catalytique.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des séquences utilisées pour l'étude du DNAzyme **10-23**.

Nom	Séquence (5' vers 3')	Utilisation
ORN1	r(GAGAGAGAUGGGUGCG)	DNAzyme 10-23 ²⁵¹
ORN2	r(UGGGUGCG)	
ORN3	r(GGAGAGAGA)	
ODN1	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACTCTCTCCG)	Split DNAzymes (sans acide boronique)
ODN2	d(CGCACCCAGGC)	
ODN3	d(TAGCTACAACGACTCTCTCCG)	
ODN4	d(CGCACCCAGGCTAGC)	
ODN5	d(TACAACGACTCTCTCCG)	
ODN6	d(CGCACCAGGCTAGCTACAACGAC)	
ODN7	d(TCTCTCCG)	
ODN8	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACTC)	
ODN9	d(TCTCCG)	
ODN10	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACTCTC)	
ODN11	d(TCCG)	
ORN4	r(GGAGAGAGAUGGGUGCG)-FAM	DNAzyme fonctionnalisé pour la détection par fluorescence
ORN5	r(UGGGUGCG)-FAM	
ODN12	BHQ-d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACTCTCTCCG)	
ODN13	d(GGAGAGAG(rArU)GGGTGCG)-FAM	
ODN14	rUd(GGGTGGC)-FAM	
ODN15	d(GGAGAGAG)rA	
ORN6	r(GGAGAGAGAUGGGUGCG)-ATTO ₆₈₀	
ORN7	r(GGAGAGAGA)	
ORN8	r(UGGGUGCG)-ATTO ₆₈₀	
ORN9	ATTO ₄₈₈ -r(GGAGAGAGAUGGGUGCG)-ATTO ₆₈₀	
ODN16	d(CGCACCCAGG)rC	Split DNAzyme 1
ODN17	T ^{Bn} -d(AGCTACAACGACTCTCTCCG)	
ODN18	d(CGCACCCAGGCTAG)rC	Split DNAzyme 2
ODN19	d(ACAACGACTCTCTCCG)	
ODN20	T ^{Bn} -d(ACAACGACTCTCTCCG)	
ODN21	Napht ^{Bn} -d(TACAACGACTCTCTCCG)	

ODN22	TrPh^{Bn}-d(TACAACGACTCTCTCCG)	Split DNAzyme 2	
ODN23	Napht^{Bn}-d(ACAACGACTCTCTCCG)		
ODN24	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGA)rC	Split DNAzyme 3	
ODN25	d(CTCTCCG)		
ODN26	T^{Bn}-d(CTCTCCG)		
ODN27	Napht^{Bn}-d(TCTCTCCG)		
ODN28	Ph^{Bn}-d(TCTCTCCG)		
ODN29	Napht^{Bn}-d(CTCTCCG)		
ODN30	Ph^{Bn}-d(CTCTCCG)		
ODN31	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACT)rC		Split DNAzyme 4
ODN32	d(CTCCG)		
ODN33	T^{Bn}-d(CTCCG)		
ODN34	Napht^{Bn}-d(TCTCCG)		
ODN35	Ph^{Bn}-d(TCTCCG)		
ODN36	TrPh^{Bn}-d(TCTCCG)		
ODN37	Napht^{Bn}-d(CTCCG)		
ODN38	Ph^{Bn}-d(CTCCG)		
ODN39	d(CGCACCCAGGCTAGCTACAACGACTCT)rC	Split DNAzyme 5	
ODN40	d(CCG)		
ODN41	T^{Bn}-d(CCG)		
ODN42	Napht^{Bn}-d(TCCG)		
ODN43	Ph^{Bn}-d(TCCG)		
ODN44	Napht^{Bn}-d(CCG)		
ODN45	Ph^{Bn}-d(CCG)		

2.4 Étude de l'activité des split DNAzymes

2.4.1 Étude de l'activité du DNAzyme parent

2.4.1.1 Étude par HPLC

L'activité catalytique du DNAzyme **10-23** a tout d'abord été étudiée par HPLC ionique, permettant une meilleure séparation des oligonucléotides qu'en phase inverse (Figure 73A). Pour cela, la première étape consiste à déterminer le gradient optimal pour l'observation des quatre brins de façon bien distincte (Figure 73B). L'analyse est effectuée à une température de 75°C pour s'assurer que tous les partenaires soient bien sous la forme simple brin, la

température de demi-fusion de l'ensemble étant située autour de 40°C. La largeur du pic correspondant au brin **ODN1** s'explique par une quantité ainsi qu'un temps de rétention plus élevés. L'étude portant d'abord sur le DNAzyme parent, elle doit donc permettre de déterminer la disparition du substrat d'ARN entier **ORN1**, et l'apparition des deux fragments d'ARN coupés **ORN2** et **ORN3**. Les premiers tests ont été réalisés selon les conditions décrites par Lusic, soit 100 mM de chlorure de magnésium, un tampon Tris à une concentration de 15 mM et un pH de 8,2, une température de 37°C et une quantité de DNAzyme dix fois supérieure à celle du substrat d'ARN, soit ici 20 µM de substrat et 200 µM de DNAzyme.²⁵¹ Avant l'ajout d'ions Mg²⁺, les brins **ODN1/ORN1** sont chauffés à 90°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les duplexes et supprimer toutes les structures secondaires, puis un retour lent à température ambiante (30 minutes) permet leur hybridation. Le magnésium est ensuite ajouté pour activer le système catalytique et, après 30 minutes de réaction seulement, les signaux correspondant aux substrats d'ARN coupés **ORN2** et **ORN3** sont observés (Figure 73B). Afin de pouvoir étudier la réaction à différents instants *t* et la suivre au cours du temps, la réaction est stoppée en ajoutant une solution aqueuse d'EDTA à 83 mM.²⁷¹ Ainsi, grâce à la complexation des ions Mg²⁺ par les quatre atomes d'oxygènes et les deux atomes d'azotes de l'EDTA, l'activité catalytique est inhibée car ceux-ci ne sont plus disponibles pour complexer l'hydroxyle en position 2' du substrat d'ARN **ORN1**, empêchant de fait l'activation du DNAzyme. L'ajout d'une solution d'EDTA avant celle de magnésium démontre l'absence des signaux attendus **ORN2** et **ORN3** après 30 minutes de réaction (Figure 73C).

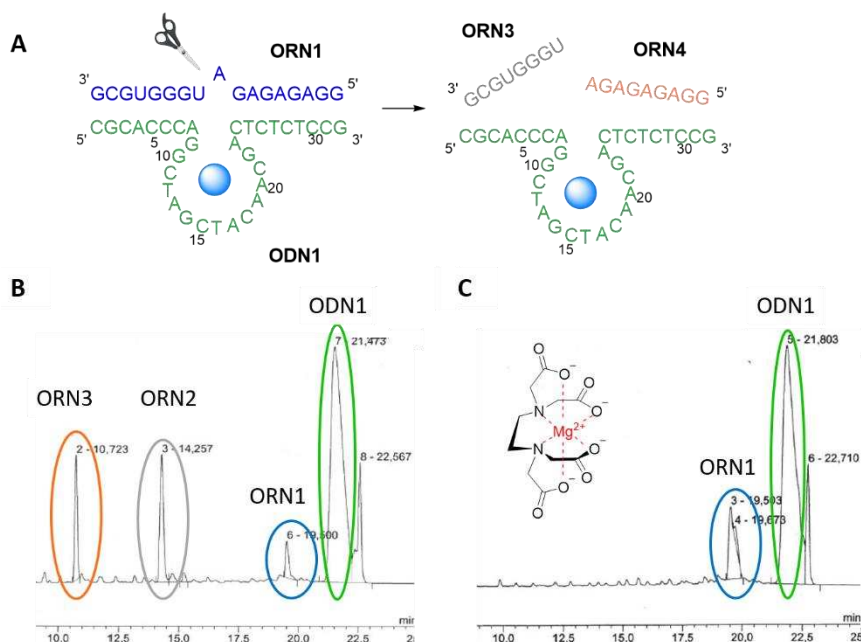


Figure 73 : (A) Coupure du substrat d'ARN par le DNAzyme **10-23** (ODN1) en présence de magnésium et spectres HPLC obtenus (B) sans et (C) avec addition d'EDTA à $t = 0$ min.

La concentration en ions Mg^{2+} a ensuite été optimisée. Pour cela, différentes réactions ont été effectuées pour des concentrations allant de 1 à 100 mM puis elles ont été stoppées par ajout d'EDTA après 30 minutes et analysées par HPLC ionique. La quantité de substrat d'ARN résiduel **ORN1** est calculée à partir du ratio entre l'aire du pic obtenu à la concentration voulue et celle obtenue sans magnésium, considérée comme étant le maximum. Il s'avère qu'avec seulement 1 mM de d'ions Mg^{2+} , la quantité de substrat d'ARN **ORN1** a déjà diminué de plus de 50 % mais à partir d'une concentration de 25 mM un plateau est observé, indiquant une saturation des sites de coordination (Figure 74A). Le but étant de suivre la réaction au cours du temps et d'évaluer les différences entre tous les systèmes, nous avons choisi une concentration de 1 mM afin que le substrat d'ARN ne soit pas entièrement coupé trop rapidement. Une cinétique de la réaction est donc réalisée avec 1 mM en ions Mg^{2+} et il s'avère que le temps de demi-réaction, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la moitié du substrat soit coupé, est de 20 minutes. De plus, un ralentissement de la cinétique de la réaction est observé. En effet, tandis que 60 % de substrat d'ARN **ORN1** sont coupés durant les 30 premières minutes, seulement 20 % de coupure supplémentaire sont visibles après 60 minutes (Figure 74B).

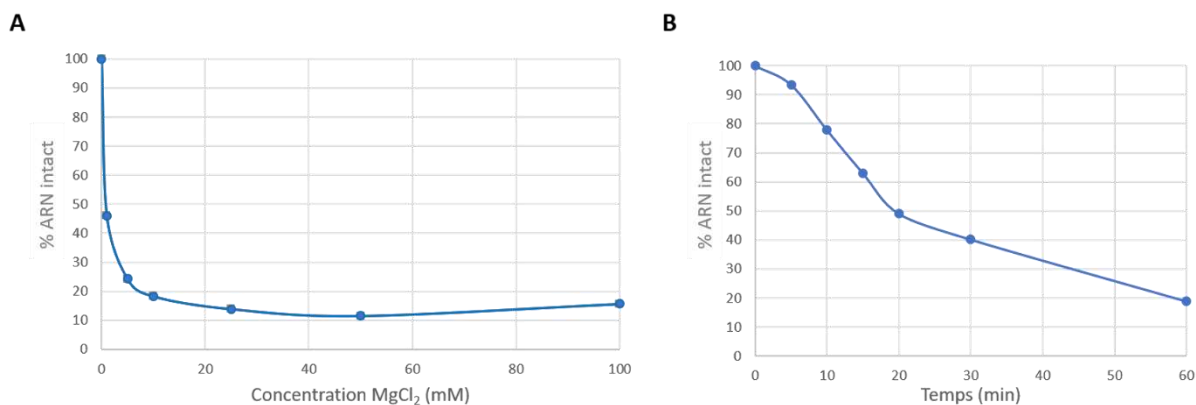


Figure 74 : Évolution de l'activité catalytique en fonction (A) de la concentration en ions Mg²⁺ et (B) du temps à une concentration en ions Mg²⁺ de 1 mM.

La réaction a ensuite été testée avec les systèmes divisés qui ne portent aucune modification chimique (Figure 75). Avec une concentration en ions Mg²⁺ de 1 mM, aucun split DNAzyme ne semble être actif. Même en augmentant la concentration à 50 mM, aucune coupure du substrat n'est observée par HPLC ionique pour les split DNAzymes 1 et 2, ce qui semble logique car le site de coupure est situé au niveau du cœur catalytique. Ce même résultat est également obtenu pour le split DNAzyme 3 dont le site de coupure se situe à la jonction entre le bras de reconnaissance et le site catalytique. En revanche, une faible quantité d'**ORN2** et **ORN3** est observée dans le cas des split DNAzymes 4 et 5 pour lesquels la coupure est effectuée au niveau du bras de reconnaissance, laissant ainsi le site catalytique intact (Tableau 3). La coupure du DNAzyme entraîne donc une diminution considérable voire une inhibition de l'activité catalytique. L'insertion d'un acide boronique en position 5' et d'un ribonucléotide en position 3' a pour but de rétablir la liaison entre les deux fragments et ainsi rétablir l'activité catalytique par formation d'un lien de type ester boronate.

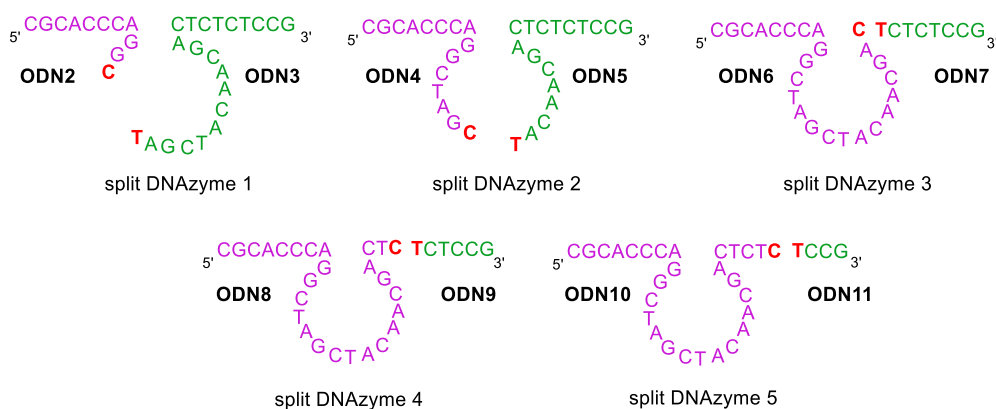


Figure 75 : Représentation des split DNAzymes 1 à 5 ne comportant aucune modification chimique.

Cette première étude par HPLC nous a permis de déterminer les conditions optimales pour obtenir la meilleure activité catalytique possible (Tableau 3). Cependant, les résultats obtenus étant uniquement basés sur l'aire des pics observés, cette technique manque de reproductibilité et de précision. De plus, il est nécessaire d'avoir une concentration en oligonucléotides élevée pour obtenir des signaux exploitables en HPLC, consommant une importante quantité de produit. Nous avons donc choisi de changer de technique d'analyse et d'utiliser la spectroscopie de fluorescence qui permet l'analyse en temps réel ainsi que l'utilisation de quantités plus restreintes.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de l'optimisation de la quantité de magnésium pour l'activité du DNAzyme et premiers résultats avec les split DNAzymes observés après 30 minutes de réaction.

Système	Concentration MgCl ₂ (mM)	% ORN1
DNAzyme parent	0	100
	1	46
	5	24
	10	18
	25	14
	50	12
	100	15
Split DNAzyme 1	50	100
Split DNAzyme 2	50	100
Split DNAzyme 3	50	100
Split DNAzyme 4	50	92
Split DNAzyme 5	50	98

2.4.1.2 Étude par fluorescence

Afin de pouvoir analyser l'activité catalytique du système par fluorescence, il est nécessaire de fonctionnaliser le substrat d'ARN **ORN4** à l'extrémité 3' par un fluorophore et le DNAzyme **ODN12** à l'extrémité 5' par un inhibiteur de fluorescence. Notre premier choix s'est porté sur la 6-carboxyfluorescéine (6-FAM), dont l'émission de fluorescence est relativement intense, et sur le Black Hole 1 (BHQ-1), un inhibiteur non fluorescent. Ils ont alors été introduits par la méthode classique des phosphoramidites en utilisant les supports et phosphoramidites correspondants.^{265,266} Ainsi, lorsque les deux brins sont hybridés le 6-FAM et le BHQ-1 sont à proximité, résultant en une inhibition de l'émission de fluorescence (Figure 76). En revanche,

en présence d'ions Mg^{2+} l'activité catalytique est rétablie et le substrat est coupé en deux fragments. Le fragment **ORN5** contenant le fluorophore est alors libéré et déshybridé, ce qui se traduit par une augmentation de fluorescence.

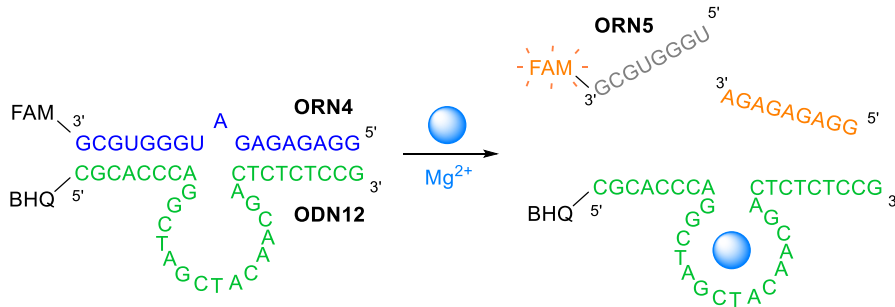


Figure 76 : Principe de détection de l'activité catalytique par spectroscopie de fluorescence avec un système ARN/ADN.

L'étude de ce système par fluorescence n'ayant, à notre connaissance, jamais été réalisé auparavant, il a été nécessaire d'optimiser les paramètres afin d'obtenir une émission et une inhibition de fluorescence suffisantes pour pouvoir être détectées. Ainsi, la fluorescence du substrat d'ARN **ORN4** seul a d'abord été étudiée afin de déterminer la concentration minimale nécessaire pour obtenir un signal fluorescent (Figure 77A). Nous pouvons noter qu'un signal intense est obtenu à partir de 500 nM, soit à une concentration 40 fois inférieure à celle utilisée lors des études précédentes d'HPLC. La fluorescence du substrat d'ARN coupé **ORN5** a également été étudiée et un signal satisfaisant est obtenu à partir de 200 nM (Figure 77B).

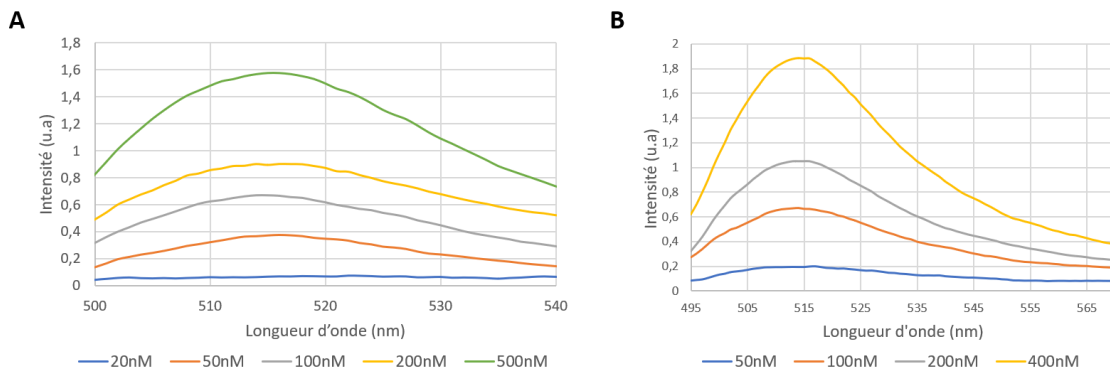


Figure 77 : Fluorescence de (A) **ORN4** et (B) **ORN5** en fonction de la concentration.

L'inhibition de fluorescence en présence des deux brins **ODN12** et **ORN4** a ensuite été étudiée en fonction de la température afin de déterminer la température optimale pour qu'ils restent hybridés lors de la réaction (Figure 78A). La même étude a également été réalisée avec le

fragment d'ARN coupé **ORN5** et le DNAzyme **ODN12** afin de déterminer la température à laquelle le substrat coupé se déshybride après coupure, permettant l'augmentation de fluorescence (Figure 78B). Concernant le substrat entier **ODN12/ORN4**, nous pouvons observer une augmentation de fluorescence relativement faible jusqu'à 37°C, indiquant que les brins sont majoritairement sous la forme de duplex. En revanche, à partir de 50°C la fluorescence augmente car le duplex commence à se déshybrider. Il faut donc se placer à une température inférieure à celle-ci afin de favoriser l'hybridation des deux brins et ainsi l'activité catalytique. De plus, cela permettra de limiter les signaux faux positifs, c'est-à-dire l'augmentation de fluorescence due à une déshybridation et non à la coupure du substrat. Nous pouvons noter que même en étant hybridés, un signal fluorescent résiduel est observé et la déshybridation des brins entraîne une augmentation de fluorescence d'un facteur 1,2, ce qui est assez faible. Le système **ODN12/ORN5** après coupure est capable de se déshybrider et d'émettre un signal fluorescent intense quelle que soit la température, ce qui s'explique par une faible longueur du duplex bien que des paires CG, connues pour stabiliser les duplex, soient présentes.

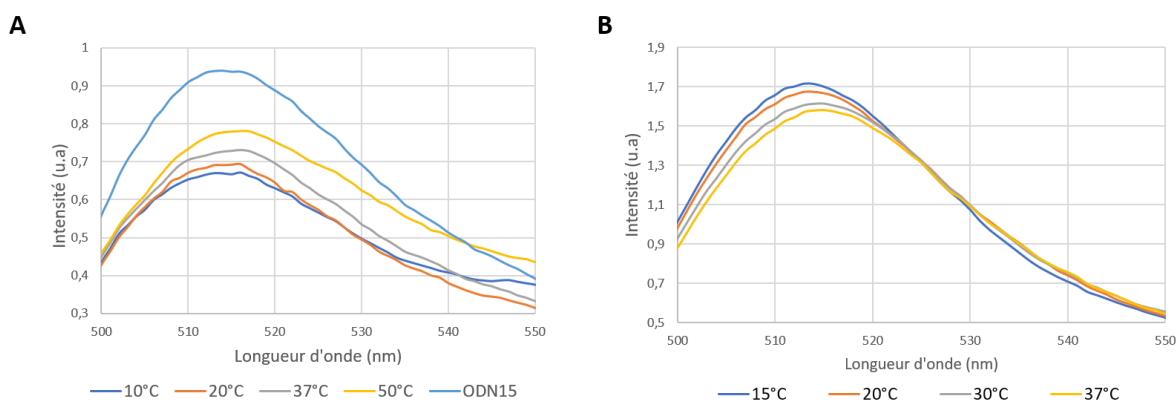


Figure 78 : Émission de fluorescence en fonction de la température pour les systèmes (A) **ODN12/ORN4** ou (B) **ODN12/ORN5**.

Après optimisation des conditions de réaction, l'activité catalytique du système **ODN12/ORN4** a été étudiée à 37°C en présence d'ions Mg^{2+} à une concentration de 100 mM. Le substrat d'ARN **ORN4** (200 nM) et le DNAzyme **ODN12** (2 μ M) ont été au préalable déshybridés par chauffage puis à nouveau hybridés par un retour lent à température ambiante. La fluorescence est ensuite mesurée toutes les 10 minutes après l'ajout d'ions Mg^{2+} (Figure 79A). Cependant, aucune augmentation significative de fluorescence n'est observée, même après une heure de réaction. La première hypothèse évoquée est la présence d'un trop large excès de DNAzyme

ODN12 qui inhiberait la fluorescence du substrat d'ARN coupé (**ORN5**) par proximité spatiale. La réaction a donc été testée avec 500 nM de chaque oligonucléotide et 200 mM de $MgCl_2$ mais le même résultat est observé (Figure 79B). La réaction a également été étudiée à des températures plus faibles afin de favoriser l'hybridation des brins sous forme de duplex, mais sans succès.

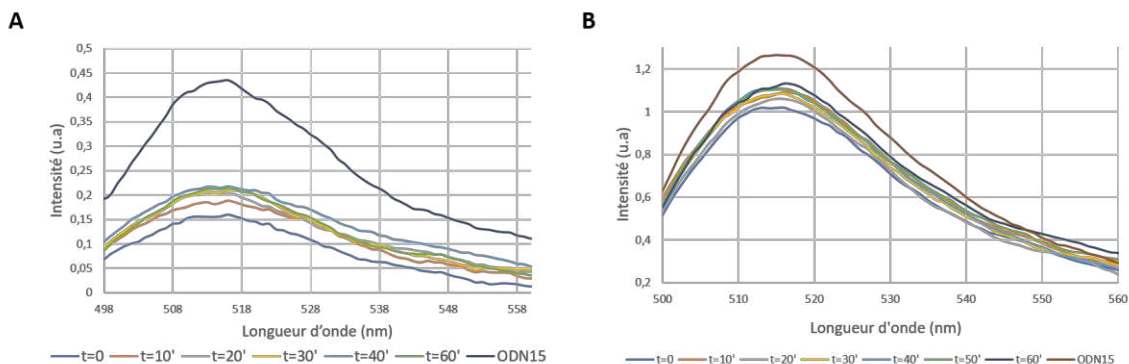


Figure 79 : Cinétiques de la réaction à 37°C avec (A) **ORN4** (200 nM), **ODN12** (2 µM) et 100 mM d'ions Mg^{2+} , puis (B) **ORN4** (500 nM), **ODN12** (500 nM) et 200 mM d'ions Mg^{2+} .

D'après la littérature, les duplexes ADN/ADN ont démontré une meilleure affinité et stabilité que les duplexes ARN/ADN.²⁷²⁻²⁷⁴ Un nouveau système uniquement à base d'ADN a donc été développé afin de favoriser l'hybridation des deux brins et d'augmenter l'activité catalytique (Figure 80). Il est toutefois important de garder la riboadénosine et l'uridine au centre de la séquence du substrat d'ADN **ODN13** car la coupure ne peut être réalisée qu'en présence de bases ARN grâce à la présence de l'hydroxyle en position 2'. Bien qu'une augmentation de fluorescence ait été notée après 10 minutes de réaction, celle-ci reste stable par la suite et ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants. Le problème ne semble donc pas venir de l'hybridation ni de la concentration en oligonucléotides.

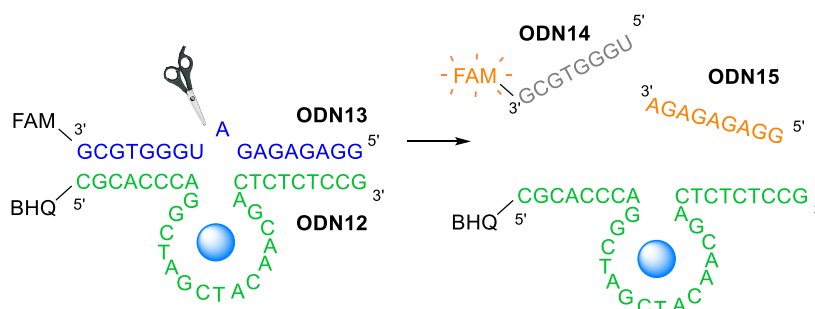


Figure 80 : Principe de détection de l'activité catalytique par spectroscopie de fluorescence avec un système ADN/ADN.

Nous avons observé que la quantité de magnésium avait une influence sur la fluorescence initiale. En effet, plus la concentration est importante plus la fluorescence est faible. Nous avons étudié plus précisément ce phénomène en plaçant **ORN4** et **ODN13** en présence de différentes concentrations en ions Mg^{2+} (Figure 81). À notre grande surprise, nous avons observé que plus la concentration est importante, plus la fluorescence est inhibée. Nous observons toutefois qu'à faible concentration, la fluorescence de **ODN13** reste supérieure à celle du substrat d'ARN **ORN4**, indiquant une sensibilité plus faible à la présence de magnésium dans le milieu.

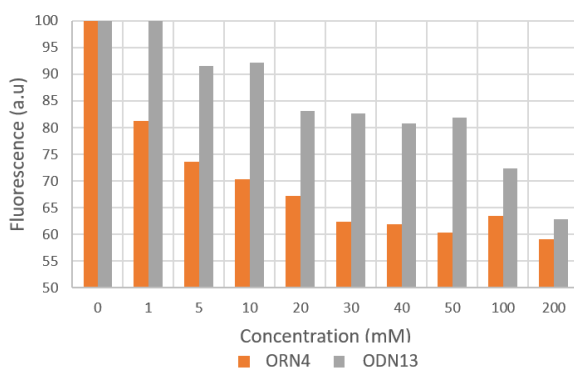


Figure 81 : Inhibition de la fluorescence de **ORN4** et **ODN13** selon la concentration en ions Mg^{2+} .

Les ions Mg^{2+} semblent donc être responsables de l'inhibition de fluorescence non désirée malgré l'impact minime reporté dans la littérature.²⁷⁵ Bien que le magnésium soit le métal divalent le plus efficace pour activer ce DNAzyme,²⁷⁶ nous avons étudié l'inhibition de fluorescence du DNAzyme **ODN13** en présence d'autres métaux divalents (Figure 82A). Ainsi, les métaux alcalino-terreux inhibent la fluorescence d'environ 50 % tandis que les métaux de transition l'inhibent à hauteur de 100 %. Ces derniers sont en effet connus pour leur rôle d'inhibiteur de fluorescence par la présence d'électrons non appariés au sein de leur couche électronique d qui inhibent la fluorescence par un mécanisme de transfert de charge, même à faible concentration.²⁷⁵ De plus, les ions métalliques sont capables de se coordonner avec les nucléobases des oligonucléotides, et plus particulièrement avec l'atome N7 des résidus guanosines. Or, dans notre cas, plusieurs guanosines sont situées à côté du fluorophore, ce qui peut entraîner une préconcentration des ions métalliques dans la sphère d'inhibition du fluorophore (Figure 82B). D'autre part, la présence du duplex à proximité du fluorophore ainsi que d'un grand nombre de groupements phosphates internucléosidiques chargés négativement permet aux ions métalliques de se lier aux brins par interactions électrostatiques. Celles-ci entraînent des liaisons non spécifiques et l'effet de préconcentration peut provoquer une inhibition de la fluorescence ainsi qu'une diminution de l'activité catalytique. Enfin, le 6-FAM

est sous une forme dianionique à pH basique pouvant ainsi engendrer la formation de sels de magnésium qui pourraient être à l'origine de l'inhibition de fluorescence, même si cela n'a pas été confirmé.²⁷⁷

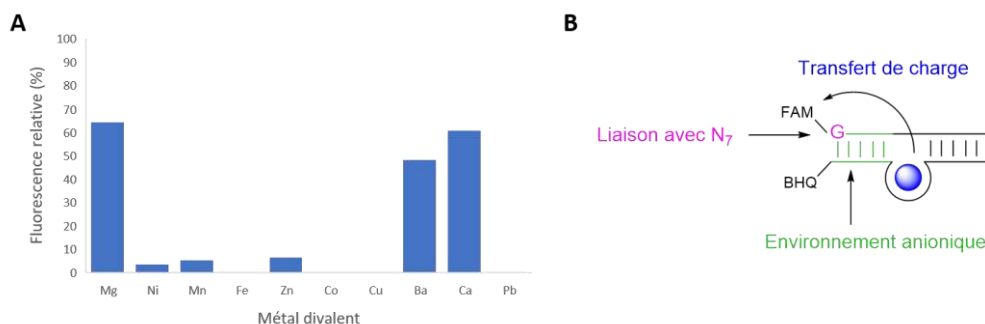


Figure 82 : (A) Inhibition de la fluorescence de **ODN13** en fonction du métal divalent utilisé. (B) Mécanisme de l'inhibition du fluorophore.

Par conséquent, ce système modifié avec ce type de fluorophore ne peut être étudié par spectroscopie de fluorescence dans ces conditions. Toutefois, le substrat **ODN13** comportant le fluorophore 6-FAM peut être étudié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) tout en s'affranchissant des problèmes d'inhibition.

2.4.1.3 Étude par PAGE

Cette technique est très utilisée pour l'analyse d'acides nucléiques grâce à la séparation des séquences en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. Dans notre cas, un gel dénaturant est utilisé afin d'observer les séquences sous la forme simple brin. Les agents dénaturants les plus classiques sont le formamide ou l'urée, qui sont des compétiteurs de liaisons hydrogène, ainsi que le formaldéhyde, dont la fonction carbonyle agit comme base de Schiff avec les fonctions imino ou amino des nucléobases empêchant l'appariement des nucléobases. Cependant, ce dernier étant hautement toxique, nous lui avons préféré l'urée et le formamide. La formation du gel de polyacrylamide est réalisée en présence de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et de persulfate d'ammonium (APS) qui, par réaction avec la lumière, sont des anions extrêmement réactifs et permettent d'activer la polymérisation du mélange acrylamide-bisacrylamide avec un taux de réticulation de 20 % dans un tampon Tris, Borate, EDTA (TBE). Pour chaque puit, 50 pmoles des brins correspondants aux substrats d'ADN entier **ODN13** ou coupé **ODN14** sont dilués dans de l'eau et du formamide puis la solution est déposée au sommet du gel. Après migration des échantillons, le gel est révélé par une lampe UV. La présence du fluorophore 6-FAM permet d'éviter une révélation chimique

via le bromure d'éthidium ou le GelRed, plus sensible certes mais toxique et peu efficace pour de courtes séquences d'acides nucléiques. Les deux brins fonctionnalisés sont donc déposés séparément afin d'obtenir une référence pour chaque substrat puis une solution contenant le substrat **ODN13** et le DNAzyme **ODN12** préalablement hybridés est déposée sur le gel afin de vérifier que les conditions utilisées permettent bien de dénaturer les brins. La réaction est ensuite effectuée dans les conditions décrites au paragraphe précédent et un certain volume est prélevé au temps t afin de pouvoir suivre la réaction au cours du temps. Cependant, les quantités obtenues du substrat ADN coupé **ODN14** fonctionnalisé par le 6-FAM ne nous permettent pas d'observer clairement la coupure ni de la quantifier. Le manque de sensibilité du détecteur UV dans ces conditions impliquerait de lancer la réaction sur des quantités trop importantes.

L'étude de l'activité catalytique de tous les systèmes modifiés par des acides boroniques a donc été réalisée lors d'un séjour à l'Universität Greifswald en Allemagne (équipe du Pr. Sabine Müller) *via* l'appareil LI-COR 4300 DNA Analyzer permettant d'analyser les gels d'électrophorèse avec une sensibilité et une précision beaucoup plus importantes.

2.4.2 Étude de l'activité des split DNAzymes modifiés par des acides boroniques

2.4.2.1 Étude par PAGE

Contrairement aux systèmes classiques d'électrophorèse, le gel formé entre les deux plaques n'est pas plongé dans un bain contenant le tampon conducteur (Figure 83A). Au contraire, les plaques sont accrochées contre une paroi puis deux réserves de tampon sont présentes en haut et en bas afin de connecter respectivement les électrodes positives et négatives. Ainsi, la quantité de tampon utilisée est inférieure à celle utilisée classiquement. Les échantillons sont ensuite déposés dans chaque puit au sommet du gel et migrent du haut vers le bas grâce au courant électrique entre les deux électrodes. La détection réalisée par un laser à une longueur d'onde de 700 nm qui balaie le bas du gel en permanence est visible en temps réel sur ordinateur et avec une grande sensibilité car seulement 0,02 pmol par brin sont déposées dans chaque puit, soit 2500 fois moins qu'un gel classique. Ainsi, l'utilisation de colorants chimiques n'est pas nécessaire et les échantillons sont facilement éliminés dans la réserve de tampon lors de leur arrivée en bas du gel. D'autres échantillons peuvent alors être déposés au sommet du gel sans qu'il n'y ait de risques de contamination. La possibilité de réutilisation du gel permet donc un gain de temps et une économie de réactifs. Cependant, pour cette méthode, il est nécessaire de fonctionnaliser le substrat par un fluorophore qui absorbe à 700 nm. Nous avons ainsi choisi d'incorporer le fluorophore ATTO₆₈₀ à l'extrémité 3' du substrat (**ORN6**), fluorophore

classiquement utilisé au laboratoire du Pr. Sabine Müller.²⁷⁸ Pour cela, la séquence d'ARN a d'abord été synthétisée par chimie classique des phosphoramidites en utilisant un support solide de type 2'-(*O*-propargyl)guanosine-CPG. Après coupure du support, déprotection et purification, le substrat a été fonctionnalisé en position 3' par le fluorophore ATTO₆₈₀-azide par une réaction de CuAAC (Figure 83B).²⁷⁸

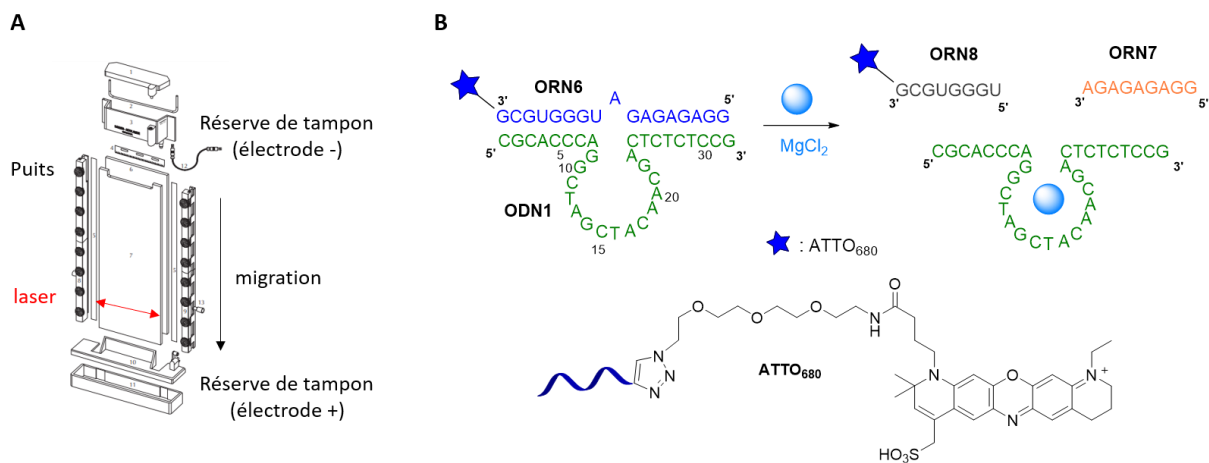


Figure 83 : (A) Principe de détection par l'appareil LI-COR et (B) structure du substrat modifié.

L'ORN6 a ensuite été purifié par HPLC en phase inverse au cours de laquelle les composés fonctionnalisés ou non sont facilement repérables grâce aux longueurs d'ondes d'absorption. En effet, la fraction d'intérêt absorbe à 260 nm (ARN) et 680 nm (ATTO₆₈₀). Cependant, il est important d'ajuster l'absorption mesurée grâce au facteur de correction propre au fluorophore étant donné que ce dernier absorbe :

$$A = A_{\alpha} \times V - (A_{680} \times C_{UV} \times C_{F680})$$

Où A_{α} : absorbance de l'ARN mesurée à 260 nm ; V : facteur de dilution ; A_{680} : absorbance de l'ATTO₆₈₀ mesurée à 680 nm ; C_{UV} : facteur de correction UV-Visible de l'appareil utilisé (Nanodrop : $C_{UV} = 10$) ; C_{F680} : facteur de correction du fluorophore ($C_{F680} = 0,30$).

Les conditions de réaction nécessaires pour l'étude du DNAzyme parent et des split DNAzymes ont préalablement été mises au point par Amandine Lelievre, doctorante à l'Université Greifswald. La solution réactionnelle est composée de 0,6 pmol de substrat ORN6 (20 nM) et 60 pmol de DNAzyme ODN1 ou de chaque fragment du split DNAzyme (2 μ M) dans un tampon Tris HCl (50 mM) à un pH de 8,6 qui est optimal pour la formation de l'ester boronate. De façon similaire à l'étude par fluorescence, les brins sont tout d'abord déshybridés à 90°C puis la température est lentement diminuée jusqu'à 25°C. Après une incubation à 25°C pendant

15 minutes, l'activation du système catalytique est réalisée par l'ajout d'une solution de $MgCl_2$ à 20 mM. 1 μL de la solution est ensuite prélevé au temps voulu et dilué dans une solution de « Stop-Mix » composée d'urée et d'EDTA permettant de stopper la réaction par complexation des ions Mg^{2+} et de dénaturer les brins. Les échantillons sont ensuite déposés au sommet du gel.

2.4.2.1.1 DNAzyme parent

Le DNAzyme **ODN1** a d'abord été étudié et nous observons qu'après seulement 10 minutes de réaction la quasi-totalité du substrat d'ARN **ORN6** a été coupé en deux fragments (Figure 84, courbe noire). L'analyse des gels obtenus permet ainsi de déterminer le ratio de chaque tâche qui est rapporté dans un tableau sur le logiciel Origin8. Les valeurs sont ensuite représentées dans un graphique sous la forme de nuage de points et un ajustement de type exponentiel est réalisé afin de tracer une courbe dont l'équation est la suivante ^{.252,279,280}.

$$y = A(1 - e^{-kx})$$

où A correspond à la quantité de substrat coupé à un temps infini, soit la quantité maximale, et k à la pente de la tangente à courbe, soit la constante de vitesse apparente de premier ordre.

La courbe obtenue permet alors de calculer la vitesse de réaction ainsi que la quantité de substrats coupés après 2 heures de réaction. Dans le cas du DNAzyme parent **ODN1**, elle s'avère très rapide et en accord avec les données de la littérature ($k_{ODN1} = 0,364 \pm 0.073 \text{ min}^{-1}$).²⁵¹ De plus, la réaction est très efficace car, d'après l'équation de la courbe, 73 % de substrats d'ARN **ORN6** sont coupés après 2 heures de réaction, ce qui prouve la grande efficacité de ce DNAzyme. Une réaction de contrôle sans ions Mg^{2+} permet également de démontrer l'importance de ce dernier dans l'activation du DNAzyme car aucune activité n'est observée dans ces conditions (Figure 84, courbe rouge).

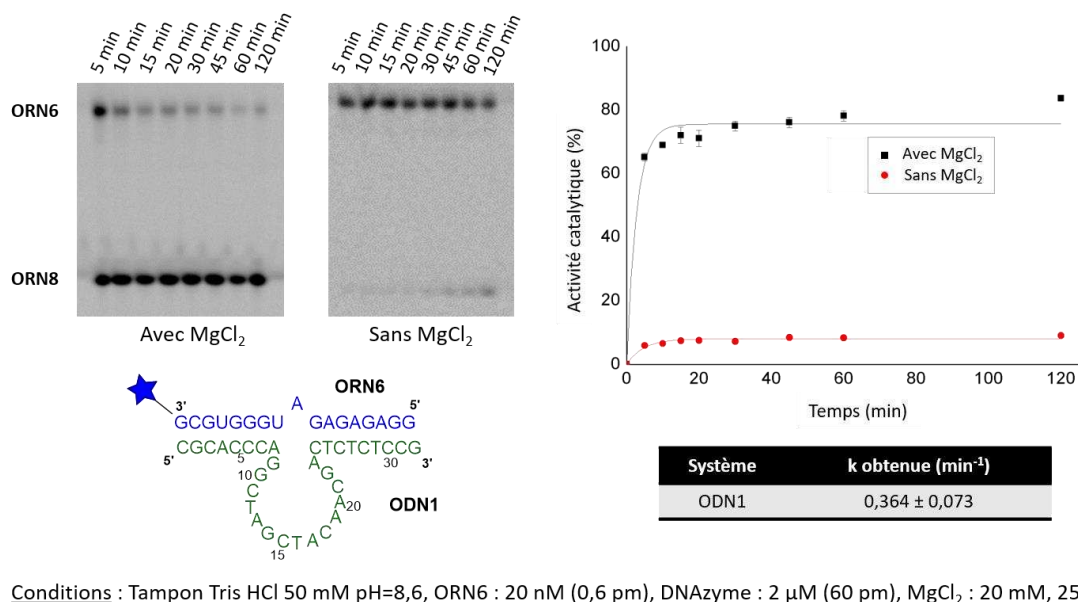


Figure 84 : Résultats obtenus pour le DNAzyme **10-23** par LI-COR.

L'activité catalytique de l'ensemble des split DNAzymes a ensuite été étudiée. Comme précédemment évoqué, ces systèmes peuvent présenter une diminution de l'activité catalytique causée par l'absence de ligation des deux fragments selon la position de la coupure. La formation du lien ester boronate à travers l'ajout d'une fonction acide boronique dans la séquence pourrait par conséquent rétablir cette activité. Pour investiguer cette hypothèse, les systèmes non modifiés et modifiés chimiquement par l'ajout des phosphoramidites **T^{Bn}**, **Napht^{Bn}**, **Ph^{Bn}** et **TrPh^{Bn}** comportant la fonction acide boronique, ont été évalués. Pour rappel, les 5 systèmes divisés présentent une coupure entre une thymidine et une cytidine à différentes positions de la séquence (Figure 75, page 85). Plusieurs stratégies de modification chimique au niveau de la thymidine à l'extrémité 5' impliquée dans la coupure ont alors été testées comme suit : (i) remplacement de la dernière thymidine par le **T^{Bn}**, (ii) ajout du **Napht^{Bn}**, **Ph^{Bn}** ou **TrPh^{Bn}** après la dernière thymidine et (iii) remplacement de la dernière thymidine par le **Napht^{Bn}** ou le **Ph^{Bn}**. Notons que la désoxycytidine a été modifiée en ribocytidine pour apporter la fonction *cis*-diol nécessaire à la formation du lien ester boronate. De plus, afin de comparer l'activité catalytique des différents split DNAzymes entre eux mais également envers le DNAzyme **ODN1**, le même substrat d'ARN **ORN6** a été utilisé.

2.4.2.1.2 Split DNAzyme 1

Le split DNAzyme 1, coupé au niveau de la boucle catalytique entre la cytidine C11 et la thymidine T12, a d'abord été étudié. Comme attendu, aucune activité catalytique n'est observée

car les deux fragments ne sont pas capables de se lier pour reformer la boucle (Figure 85A).

(i) Remplacement de la thymidine T12 par le T^{Bn}

La cytidine C11 du premier fragment est alors remplacée par une ribocytidine à l'extrémité 3' (**ODN16**) et la thymidine T12 du second fragment modifiée remplacée par le phosphoramidite modifié T^{Bn} à l'extrémité 5' (**ODN17**). Le système **ODN16-17** ne conduit à aucune activité catalytique à l'instar du split DNAzyme 1 non modifié. La cause de cette absence d'activité catalytique peut être expliquée à travers l'étude structurale du cœur catalytique dans lequel les nucléosides et groupements phosphates internucléosidiques essentiels au maintien de l'activité catalytique ont été mis en évidence (Figure 85B).^{272,281} Ainsi, il a été démontré que l'oxygène présent au niveau du phosphate internucléosidique entre les bases C11 et T12 est impliqué dans la stabilisation de la conformation active du DNAzyme et dans la coordination des ions Mg²⁺. Or, c'est précisément ce phosphate qui a ici été supprimé et remplacé par une liaison internucléosidique de type ester boronate. De plus, une étude de la structure tridimensionnelle du DNAzyme **10-23** démontre que le cœur catalytique adopte en réalité une conformation similaire à un duplex stabilisé par des interactions π - π permettant de maintenir une proximité du brin avec le site de coupure du substrat (Figure 85C).²⁸² Étant donné que la division du système est située au niveau de ce pseudo-duplex, il ne peut adopter la conformation active nécessaire à l'activité catalytique.

Au vu de ce résultat, les étapes (ii) et (iii) impliquant d'autres modifications n'ont pas été conduites sur ce split DNAzyme 1.

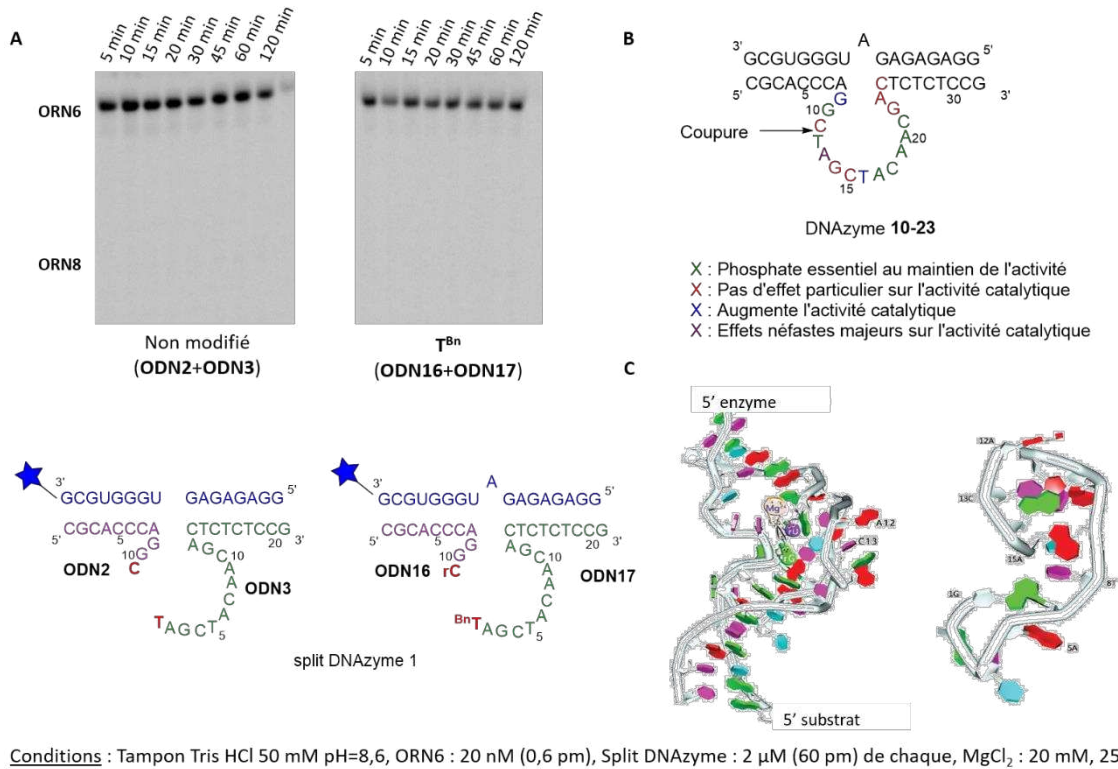


Figure 85 : (A) Résultats obtenus pour le split DNAzyme 1 par LI-COR. (B) Étude structurale des phosphates essentiels pour l'activité catalytique. (C) Structure tridimensionnelle de la conformation active du DNAzyme 10-23.²⁸²

2.4.2.1.3 Split DNAzyme 2

Le split DNAzyme 2 est également coupé au niveau de la boucle catalytique, entre la cytidine C15 et la thymidine T16, mais le groupement phosphate supprimé n'est pas essentiel au maintien de l'activité catalytique (Figure 86). De plus, la coupure est réalisée au milieu de la boucle, ce qui n'empêche pas la formation des pseudo-duplexes permettant le maintien de la conformation active.

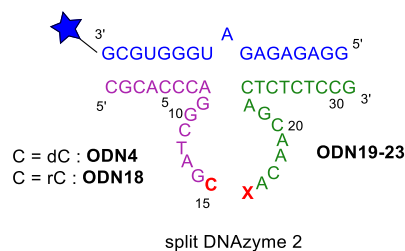


Figure 86: Structure du split DNAzyme 2.

L'activité catalytique du système non modifié ODN4-5 est très importante car 80 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction (Figure 87A, courbe noire). Cependant, la vitesse

de réaction est bien inférieure à celle obtenue précédemment avec le DNAzyme **ODN1**, probablement à cause d'une plus faible stabilité du pseudo-duplex ($k_{\text{ODN4-5}} = 0,039 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$). Un seul exemple de la littérature étudie le DNAzyme **10-23** divisé à cet endroit du cœur catalytique mais les conditions différentes ne nous permettent pas de comparer l'activité catalytique obtenue dans notre cas.⁶⁸ Les auteurs observent toutefois une diminution de l'activité lorsque le système est divisé mais la vitesse de réaction n'a pas été déterminée. Nous avons ensuite supprimé la thymidine T16 (**ODN19**) et la vitesse mesurée est deux fois plus rapide que le système divisé contenant la base T16 malgré une quantité de substrat coupé légèrement plus faible ($k_{\text{ODN4-19}} = 0,086 \pm 0,011 \text{ min}^{-1}$; Figure 87A, courbe rouge). La flexibilité du système au niveau de la boucle catalytique permet donc le maintien de l'activité catalytique malgré le fait qu'il soit plus court.

(i) Remplacement de la thymidine T16 par le **T^{Bn}**

L'impact de la formation de l'ester boronate a ensuite été étudié sur le système modifié **ODN18-20** pour lequel la cytidine C15 à l'extrémité 3' du premier fragment et la thymidine T16 à l'extrémité 5' du second fragment ont été respectivement remplacées par une ribocytidine (**ODN18**) et l'analogue boronique **T^{Bn}** (**ODN20**). La vitesse de réaction est ainsi largement améliorée ($k_{\text{ODN18-20}} = 0,127 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$; Figure 87A, courbe bleue) tandis que la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction est assez similaire comparativement au système non modifié (83 %). La formation de la jonction internucléosidique de type ester boronate a donc un impact important sur le rétablissement de l'activité catalytique et la similarité structurale entre la thymidine naturelle et le **T^{Bn}** limite la déstabilisation du système. Une réaction de contrôle comprenant la séquence modifiée **ODN20** et le brin complémentaire **ODN4** contenant une désoxycytidine à la place de la ribocytidine démontre que la formation de l'ester boronate est responsable de la liaison entre les deux brins et donc de l'augmentation de la vitesse. En effet, en l'absence du *cis*-diol l'activité catalytique est assez similaire au système coupé **ODN4-5** non modifié ($k_{\text{ODN4-20}} = 0,048 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$; Figure 87A, courbe verte).

(ii) Ajout du **Napht^{Bn}**, **Ph^{Bn}** ou **TrPh^{Bn}** après la thymidine T16

Un phosphoramidite modifié par un acide boronique aromatique **Napht^{Bn}** a ensuite été ajouté sur le premier fragment après la thymidine T16 à l'extrémité 5' (**ODN21**) tout en conservant le second fragment **ODN18** modifié par la ribocytidine. Le système **ODN18-21** résultant conduit à une augmentation de la vitesse de réaction d'un facteur 2 et à une quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction similaire comparativement au système non modifié **ODN4-5**

($k_{\text{ODN18-21}} = 0,068 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$; Figure 87B, courbe rouge). L'augmentation de la vitesse s'explique alors par la conformation particulière du site actif du DNAzyme qui permet d'approcher les deux brins à proximité et de favoriser la réaction entre les deux entités. De plus, le remplacement du **Napht^{Bn}** par le **TrPh^{Bn}** obtenu par chimie click (**ODN22**) mène à une vitesse de réaction initialement similaire au split DNAzyme non modifié **ODN4-5** ($k_{\text{ODN18-22}} = 0,037 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$; Figure 87B, courbe bleue). Toutefois, après 30 minutes de réaction celle-ci atteint un palier et n'augmente plus. Ainsi, l'activité maximum est considérablement diminuée car seulement 32 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction. Ceci pourrait être expliqué par une complexation des ions Mg^{2+} par les atomes d'azote du triazole qui, de la même façon que l'EDTA, arrêtent la réaction. Le système pour lequel le **Ph^{Bn}** a été ajouté après la thymidine T16 n'a pas pu être étudié pour ce système par manque de temps mais l'impact de ce phosphoramidite modifié sur le rétablissement de l'activité catalytique devra être évalué.

(iii) Remplacement de la thymidine T16 par le **Napht^{Bn}** ou le **Ph^{Bn}**

L'activité catalytique du split DNAzyme 2 a enfin été évaluée en remplaçant la thymidine T16 par le **Napht^{Bn}** (**ODN23**) tout en conservant le second fragment **ODN18** comprenant la ribocytidine à l'extrémité 3'. Comparativement au système **ODN4-19** sans acide boronique et pour lequel la thymidine T16 a été supprimée, la vitesse de réaction est inférieure bien que la quantité de substrats d'ARN coupés soit supérieure après 2 heures de réaction ($k_{\text{ODN18-23}} = 0,050 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ et 87 % de substrats coupés ; Figure 87C, courbe rouge). De plus, nous pouvons observer que la vitesse de réaction est inférieure à celle du système **ODN18-21** pour lequel le phosphoramidite modifié **Napht^{Bn}** avait été ajouté après la thymidine à l'extrémité 5' du second fragment (Figure 87B, courbe rouge). Cela peut s'expliquer par la rigidité apportée par les cycles aromatiques du naphthalène qui rend l'accès au second brin plus difficile. Le système pour lequel la thymidine T16 a été remplacée par le **Ph^{Bn}** devra également être étudié.

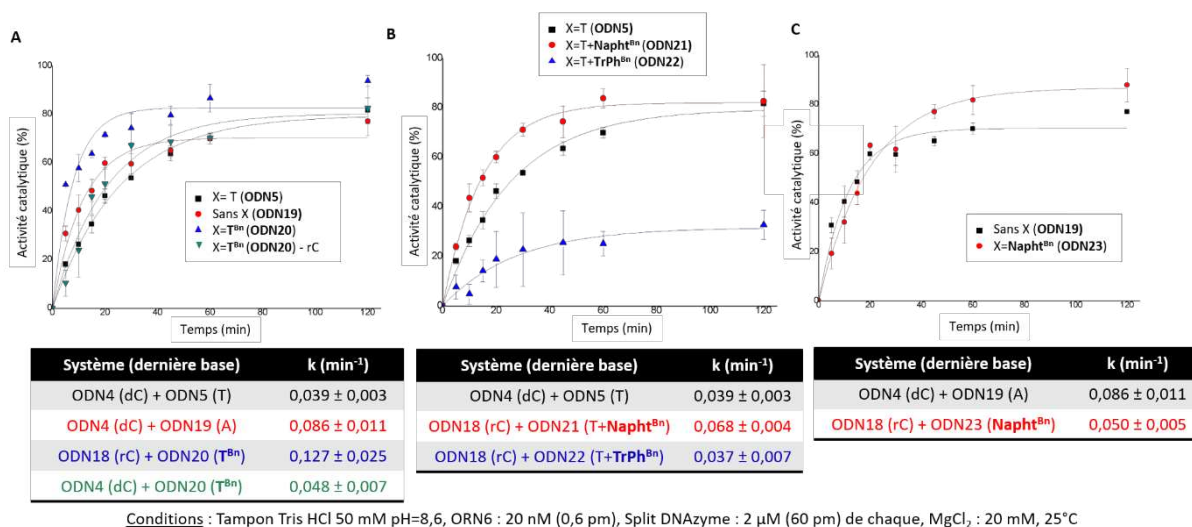


Figure 87 : Résultats obtenus pour le split DNAzyme 2 par LI-COR (A) en remplaçant la thymidine T16 par l’analogue borono-thymidine puis (B) en ajoutant un phosphoramidite modifié après la thymidine T16 ou (C) en remplaçant la thymidine T16 par un phosphoramidite modifié.

L’étude de ces deux premiers split DNAzymes démontre alors l’importance d’étudier le système en amont en termes de structure tridimensionnelle et de nucléotides responsables de l’activité catalytique. En effet, les DNAzymes sont très dépendants de la structure et de la séquence des brins, impliquant ainsi un choix judicieux de la position des modifications à introduire. De plus, nous pouvons noter que, malgré la formation du nouveau lien internucléosidique de type ester boronate, l’introduction d’un phosphoramidite modifié de type aromatique tel que le **Napht^{Bn}** déstabilise plus fortement le système que l’analogue de la thymidine naturelle **T^{Bn}**.

2.4.2.1.4 Split DNAzyme 3

Le split DNAzyme 3 a, lui, été coupé au niveau de la jonction entre la boucle catalytique et le bras de reconnaissance, soit entre la cytidine C24 et la thymidine T25 (Figure 88).

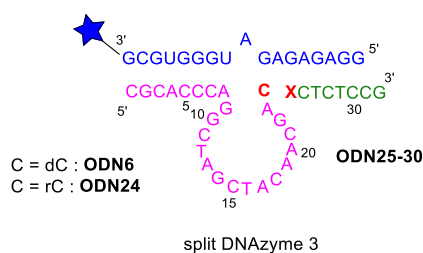


Figure 88 : Structure du split DNAzyme 3.

Le split DNAzyme non modifié **ODN6-7** entraîne une importante chute de l’activité catalytique

par rapport aux systèmes précédents (Figure 89A, courbe noire). En effet, une faible vitesse de réaction est obtenue ($k_{\text{ODN6-7}} = 0,013 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$) et seulement 47 % de substrats d'ARN ont été coupés après 2 heures de réaction. Ceci peut s'expliquer par le fait que la liaison avec le bras de reconnaissance ait été coupée bien que le site catalytique soit intact. Le premier fragment **ODN6** ne possède alors qu'une base capable de s'hybrider avec le substrat d'ARN pour se reconnecter au second fragment **ODN7**. Or, la stabilité de cette paire de base est beaucoup trop faible, laissant le site catalytique dans une conformation aléatoire. Par conséquent, le pseudo-duplex nécessaire au maintien de l'activité catalytique ne peut se former et celle-ci est très fortement diminuée. De plus, la suppression de la thymidine T25 (**ODN25**) entraîne, à l'instar du split DNAzyme 2, la déstabilisation du système et une diminution de l'activité catalytique (Figure 89A, courbe rouge). En effet, seulement 15 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction mais la vitesse est *a contrario* relativement élevée par rapport à l'efficacité du système ($k_{\text{ODN6-25}} = 0,025 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$). Ce résultat peut être expliqué par la faible quantité de substrats d'ARN coupés qui est de fait atteinte très rapidement.

(i) Remplacement de la thymidine T25 par le **T^{Bn}**

La cytidine C24 et la thymidine T25 ont ensuite été remplacées par la ribocytidine (**ODN24**) ainsi que l'analogue **T^{Bn}** (**ODN26**) aux extrémités 3' et 5' respectivement. L'activité catalytique est alors fortement rétablie puisque la vitesse de réaction est 4 fois plus élevée et environ 62 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction ($k_{\text{ODN24-26}} = 0,094 \pm 0,017 \text{ min}^{-1}$; Figure 89A, courbe bleue). L'importante différence d'activité catalytique entre les systèmes non modifié **ODN6-7** et modifié **ODN24-26** nous a conduit à sélectionner ce dernier système modifié par le **T^{Bn}** en vue d'élaborer un système dynamique et programmable en fonction du pH. Cette étude est présentée dans le paragraphe 2.4.2.1.7, page 110.

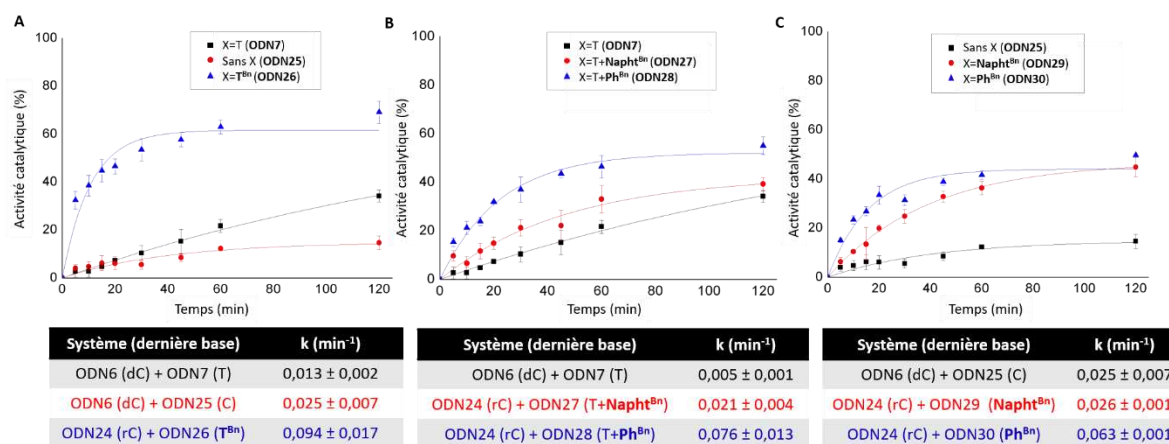
(ii) Ajout du **Napht^{Bn}** ou **Ph^{Bn}** après la thymidine T25

Différents phosphoramidites modifiés ont ensuite été ajoutés après la thymidine T25 à l'extrémité 5' du second fragment tout en conservant le premier fragment **ODN24** modifié par une ribocytidine. Cette modification permet d'évaluer si l'insertion d'acides boroniques aromatiques peut compenser la perte de stabilité du split DNAzyme non modifié et ainsi rétablir l'activité catalytique. Tout d'abord, l'introduction du **Napht^{Bn}** (**ODN27**) conduit à une faible vitesse de réaction et seulement 47 % de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction, soit la quantité obtenue pour le système split non modifié ($k_{\text{ODN24-27}} = 0,021 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$; Figure 89B, courbe rouge). De plus, ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec le système

ODN24-26 comprenant le **T^{Bn}**, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse que la rigidité apportée par le cycle aromatique est trop importante. À l'inverse, l'ajout du **Ph^{Bn}** (**ODN28**) permet d'augmenter la vitesse de réaction mais la quantité de substrats coupés reste la même ($k_{\text{ODN24-28}} = 0,045 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ et 47 % de substrats coupés ; Figure 89B, courbe bleue). La plus grande flexibilité apportée par le groupement phényle permet ainsi une adaptation du système plus rapide. Le système pour lequel le **TrPh^{Bn}** a été ajouté après la thymidine T25 n'a pas été étudié car le site de coupure est très proche du site catalytique, or nous avons remarqué avec le split DNAzyme 2 qu'une telle position entraîne l'inhibition de l'activité catalytique par complexation des ions Mg^{2+} .

(iii) Remplacement de la thymidine T25 par le **Napht^{Bn}** ou le **Ph^{Bn}**

La thymidine T25 à l'extrémité 5' du second fragment a ensuite été remplacée par le **Napht^{Bn}** (**ODN29**), tout en conservant le premier fragment **ODN24**, mais l'activité catalytique est similaire au système non modifié ($k_{\text{ODN24-29}} = 0,026 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ et 47 % de substrats d'ARN coupés ; Figure 89C, courbe rouge). Cela est probablement dû à la rigidité apportée par le naphtalène, limitant la mobilité des brins et donc la formation de la nouvelle liaison internucléosidique. La thymidine T25 a ensuite été remplacée par le **Ph^{Bn}** (**ODN30**), ce qui entraîne une augmentation de la vitesse de réaction bien que la quantité de substrats coupés reste du même ordre de grandeur ($k_{\text{ODN24-30}} = 0,063 \pm 0,011 \text{ min}^{-1}$ et 44 % de substrats coupés ; Figure 89C, courbe bleue).



Conditions : Tampon Tris HCl 50 mM pH=8,6, ORN6 : 20 nM (0,6 pm), Split DNAzyme : 2 μM (60 pm) de chaque, MgCl_2 : 20 mM, 25°C

Figure 89 : Résultats obtenus pour le split DNAzyme 3 par LI-COR (A) en remplaçant la thymidine T25 par l'analogue borono-thymidine puis (B) en ajoutant un phosphoramidite modifié après la thymidine T25 ou (C) en remplaçant la thymidine T25 par un phosphoramidite modifié.

Le split DNAzyme 3 a ainsi permis de démontrer l'importance de la formation d'une nouvelle liaison internucléosique de type ester boronate pour le rétablissement de l'activité catalytique. En effet, la différence d'activité catalytique obtenue avec ou sans modification est relativement importante car le nouveau lien formé permet de rétablir la conformation active. De plus, le rétablissement de l'activité catalytique est dépendant de la nature du phosphoramidite modifié introduit. En effet, le degré de flexibilité de la molécule ainsi que la nature des interactions mises en jeu lors de l'appariement avec les nucléobases voisines influencent la stabilisation du système.

2.4.2.1.5 Split DNAzyme 4

Contrairement aux split DNAzymes 1 à 3 coupés au sein de la boucle catalytique, le split DNAzyme 4 présente le site de coupure au niveau du bras de reconnaissance entre le cytidine C26 et la thymidine T27 (Figure 90).

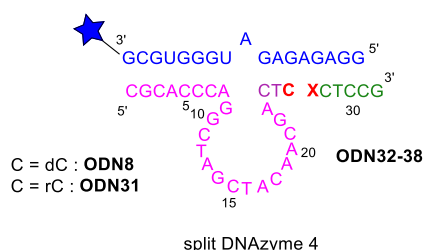


Figure 90 : Structure du split DNAzyme 4.

Le système non modifié **ODN8-9** conduit à une activité catalytique supérieure au split DNAzyme 3 non modifié **ODN6-7** car 58 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction (Figure 91A, courbe noire). Cependant, la stabilisation des duplexes au niveau du bras de reconnaissance par des interactions π - π et des liaisons hydrogène permet de doubler la vitesse de réaction ($k_{\text{ODN8-9}} = 0,087 \pm 0,012 \text{ min}^{-1}$). La suppression de la thymidine T27 du second fragment (**ODN32**) entraîne dans ce cas une chute significative de l'activité catalytique tant au niveau de la vitesse de réaction que de la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction ($k_{\text{ODN8-32}} = 0,004 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$ et 35 % de substrats coupés ; Figure 91A, courbe rouge).

(i) Remplacement de la thymidine T27 par le T^{Bn}

Nous avons ensuite inséré la ribocytidine à l'extrémité 3' du premier fragment (**ODN31**) et remplacé la thymidine T27 par le T^{Bn} (**ODN33**) à l'extrémité 5' du second fragment. Le système **ODN31-33** résultant présente une vitesse de réaction ainsi qu'une efficacité de coupure après 2 heures de réaction plus élevées que le système non modifié ($k_{\text{ODN31-33}} = 0,120 \pm 0,024 \text{ min}^{-1}$

et 64 % de substrats d'ARN coupés ; Figure 91A, courbe bleue).

(ii) Ajout du **Napht^{Bn}**, **Ph^{Bn}** ou **TrPh^{Bn}** après la thymidine T27

Différents phosphoramidites modifiés ont ensuite été ajoutés après la thymidine T27 du premier fragment tout en conservant le premier fragment **ODN31** comportant la ribocytidine. Tout d'abord, l'introduction du **Napht^{Bn}** (**ODN34**) conduit à une diminution de la vitesse de réaction et de l'efficacité de coupure après 2 heures de réaction comparativement au système non modifié ($k_{\text{ODN31-34}} = 0,033 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ et 53 % de substrats d'ARN coupés ; Figure 91B, courbe rouge). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la coupure soit effectuée cette fois-ci au niveau du duplex et non de la boucle catalytique. La flexibilité du système est donc grandement diminuée et une rigidité supplémentaire est apportée par l'ajout du naphthalène. De plus, celui-ci est ajouté après la thymidine T27, ajoutant ainsi une base supplémentaire par rapport à la séquence initiale. La rigidité induite par le naphthalène ne conduit donc pas à une flexibilité suffisante pour former la jonction ester boronate. Le **Napht^{Bn}** a ensuite été remplacé par le **Ph^{Bn}** (**ODN35**) et, dans ce cas, la vitesse est très largement augmentée ($k_{\text{ODN31-35}} = 0,204 \pm 0,058 \text{ min}^{-1}$; Figure 91B, courbe bleue). Cependant, seulement 59 % de substrats sont coupés après 2 heures de réaction. Afin d'augmenter la flexibilité du split DNAzyme 4, le second fragment a été fonctionnalisé avec le **TrPh^{Bn}** obtenu par chimie click (**ODN36**). La vitesse de réaction du système **ODN31-36** résultant reste inférieure à celle du système **ODN31-35** comprenant le groupement phényle issu d'une chimie classique des phosphoramidites, bien que la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction reste similaire ($k_{\text{ODN31-36}} = 0,029 \pm 0,006 \text{ min}^{-1}$; Figure 91B, courbe verte). Comme nous l'avons vu dans le cas du split DNAzyme 2, cela pourrait s'expliquer par la capacité du triazole à complexer les ions Mg^{2+} nécessaires au maintien de l'activité catalytique. Malgré cette limitation, l'activité catalytique de ce système reste plus élevée que celui du DNAzyme 2 car le **TrPh^{Bn}** est inséré au niveau du duplex et non du site catalytique, il est donc plus éloigné des ions Mg^{2+} et de fait moins susceptible de les complexer.

(iii) Remplacement de la thymidine T27 par le **Napht^{Bn}** ou le **Ph^{Bn}**

Le split DNAzyme 4 a ensuite été étudié en remplaçant la thymidine T27 par un phosphoramidite modifié sur le second fragment à l'extrémité 5' tout en conservant le premier fragment **ODN31** comprenant la ribocytidine. Ainsi, l'ajout du **Napht^{Bn}** (**ODN37**) permet d'augmenter la vitesse de réaction ainsi que l'efficacité de coupure après 2 heures de réaction ($k_{\text{ODN31-37}} = 0,016 \pm 0,006 \text{ min}^{-1}$ et 58 % de substrats d'ARN coupés ; Figure 91C, courbe rouge)

par rapport au système **ODN8-32** sans acide boronique pour lequel la thymidine T27 a été supprimée. Bien que la thymidine T27 ait été supprimée, libérant ainsi plus d'espace pour le naphthalène, l'amélioration apportée par la formation de l'ester boronate reste relativement faible. Le **Napht^{Bn}** a donc été remplacé par le groupement **Ph^{Bn}** plus flexible (**ODN38**) mais la vitesse de réaction est similaire et la quantité de substrats d'ARN coupés est inférieure ($k_{\text{ODN31-38}} = 0,019 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$ et 48 % de substrats coupés ; Figure 91C, courbe bleue). Cependant, les résultats obtenus avec ces deux systèmes sont très en dessous de celui obtenu avec **ODN31-33** comprenant le phosphoramidite modifié **T^{Bn}** malgré la stabilisation apportée par des interactions $\pi-\pi$ entre les nucléobases et le naphthalène ou le phényle.

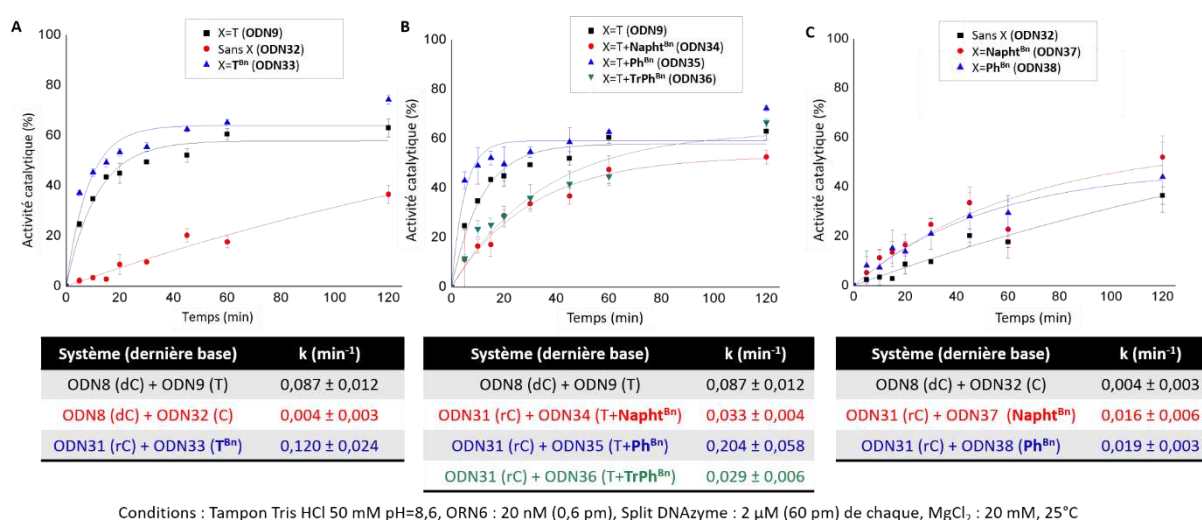


Figure 91: Résultats obtenus pour le split DNAzyme 4 par LI-COR (A) en remplaçant la thymidine T27 par l'analogue borono-thymidine puis (B) en ajoutant un phosphoramidite modifié après la thymidine T27 ou (C) en remplaçant la thymidine T27 par un phosphoramidite modifié.

Ainsi, à l'instar du split DNAzyme 3 pour lequel la coupure empêche la liaison entre la boucle catalytique et le bras de reconnaissance, la coupure au niveau du bras de reconnaissance implique une importante diminution de l'activité catalytique. Cependant, il est difficile de déterminer si celle-ci provient de la difficulté à reformer la conformation active du DNAzyme ou d'un problème de reconnaissance du substrat. En effet, sans modification, les trois nucléobases du premier fragment ne peuvent pas s'hybrider et le second fragment, constitué de seulement six bases, n'a que peu de probabilité de se maintenir sous la forme de duplex. Lors des études par fluorescence, nous avons en effet observé que le substrat coupé, composé de huit bases, se déshybridait du DNAzyme peu importe la température. Ainsi, le substrat n'est reconnu que par une extrémité et la conformation active du système est beaucoup plus complexe à obtenir, entraînant une diminution de l'activité catalytique. La formation d'une liaison de type

internucléosidique permet ainsi de rétablir l'hybridation des deux brins sous la forme de duplex et par conséquent de rétablir l'activité catalytique.

2.4.2.1.6 Split DNAzyme 5

Le split DNAzyme 5 comprend, comme le DNAzyme 4, le site de coupure au niveau du bras de reconnaissance mais il est cette fois-ci plus éloigné de la boucle catalytique à savoir entre la cytidine C28 et la thymidine T29 (Figure 92).

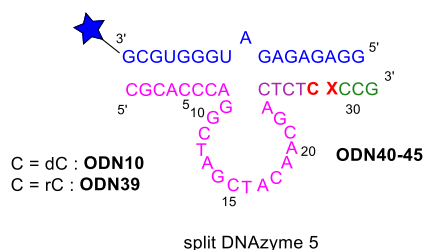


Figure 92 : Structure du split DNAzyme 5.

L'activité catalytique du split DNAzyme non modifié **ODN10-11** est inférieure à celle obtenue pour le split DNAzyme 4 (**ODN8-9**) car seulement 45 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction et la vitesse de réaction est plus lente ($k_{\text{ODN10-11}} = 0,059 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$; Figure 93A, courbe noire). Cette diminution est probablement due à la difficulté de former de courts duplexes comme précédemment évoqué. Cette hypothèse est confirmée en étudiant l'activité catalytique du split DNAzyme pour lequel la thymidine T29 est supprimée (**ODN40**) car l'activité observée est similaire (Figure 93A, courbe rouge). En effet, seulement 48 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction et la vitesse de réaction est du même ordre de grandeur comparé au système **ODN10-11** ($k_{\text{ODN10-40}} = 0,065 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$). Cela renforce donc l'idée que, sans modification par un acide boronique, cette partie du split DNAzyme ne joue aucun rôle dans l'activité catalytique car sa longueur n'est pas suffisante pour s'hybrider au substrat.

(i) Remplacement de la thymidine T27 par le T^{Bn}

Nous avons donc par la suite introduit une ribocytidine à l'extrémité 3' du premier fragment (**ODN39**) et le T^{Bn} à l'extrémité 5' du second fragment (**ODN41**) afin de stabiliser ce duplex par la formation du lien ester boronate. Ainsi, la vitesse de réaction ainsi que la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction sont largement supérieures comparativement au système initial **ODN10-11** ($k_{\text{ODN39-41}} = 0,211 \pm 0,037 \text{ min}^{-1}$ et 64 % de substrats d'ARN coupés ; Figure 93A, courbe bleue).

*(ii) Ajout du **Napht^{Bn}** ou **Ph^{Bn}** après la thymidine T29*

Différents phosphoramidites modifiés ont ensuite été ajoutés après la thymidine T29 à l'extrémité 5' du second fragment tout en conservant le premier fragment **ODN39** comprenant la ribocytidine à l'extrémité 3'. Tout d'abord, l'introduction du **Napht^{Bn}** (**ODN42**) permet d'améliorer la stabilité du duplex grâce à des interactions de type π - π . De ce fait, nous observons qu'environ 71 % de substrats d'ARN sont coupés après 2 heures de réaction malgré une vitesse de réaction similaire à **ODN10-11** ($k_{\text{ODN39-42}} = 0,059 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$; Figure 93B, courbe rouge). De plus, le remplacement du **Napht^{Bn}** par le **Ph^{Bn}** (**ODN43**) conduit à une efficacité de coupure similaire car 67 % de substrats d'ARN coupés sont obtenus après 2 heures de réaction (Figure 93B, courbe bleue). En revanche, la vitesse de réaction est plus élevée, probablement grâce à la plus grande flexibilité du phényle par rapport au naphthalène qui permet de stabiliser le duplex plus rapidement malgré une plus faible aromaticité ($k_{\text{ODN39-43}} = 0,085 \pm 0,013 \text{ min}^{-1}$). Le système pour lequel le **TrPh^{Bn}** a été ajouté après la thymidine T25 n'a pas été étudié car les résultats obtenus avec le split DNAzyme 4 ont démontré que le rétablissement de l'activité catalytique est très faible avec cette modification.

*(iii) Remplacement de la thymidine T29 par le **Napht^{Bn}** ou le **Ph^{Bn}***

La thymidine T29 a alors été supprimée du second fragment et remplacée tout d'abord par le **Napht^{Bn}** tout en conservant le premier fragment **ODN39** comprenant la ribocytidine. L'introduction de **Napht^{Bn}** (**ODN44**) permet d'améliorer l'efficacité de coupure car 60 % de substrats d'ARN sont coupés mais la vitesse de réaction est légèrement inférieure au split DNAzyme non modifié **ODN10-40** sans acide boronique pour lequel la thymidine T29 a été supprimée en raison de la rigidité du système ($k_{\text{ODN39-44}} = 0,052 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$; Figure 93C, courbe rouge). De plus, bien que l'absence de la thymidine T29 laisse plus d'espace pour incorporer le naphthalène, l'activité catalytique est nettement inférieure à celle du système **ODN39-42** pour lequel le **Napht^{Bn}** est ajouté après la thymidine (Figure 93B, courbe rouge). La stabilisation apportée dans le système **ODN39-44** est donc moins importante dans le cas de fragments très courts mais l'activité catalytique reste toutefois meilleure comparativement à celle obtenue avec **ODN10-40** sans acide boronique. Enfin, l'ajout du **Ph^{Bn}** (**ODN45**) conduit à une efficacité de coupure similaire à celle observée pour le système **ODN39-44** comprenant le **Napht^{Bn}**, bien que la vitesse de réaction soit légèrement plus lente ($k_{\text{ODN39-45}} = 0,045 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$, 62 % de substrats coupés ; Figure 93C, courbe bleue). Dans ce cas, la limitation de la formation du duplex n'est pas liée à la rigidité ou à la flexibilité du système mais bien à la courte

taille du brin.

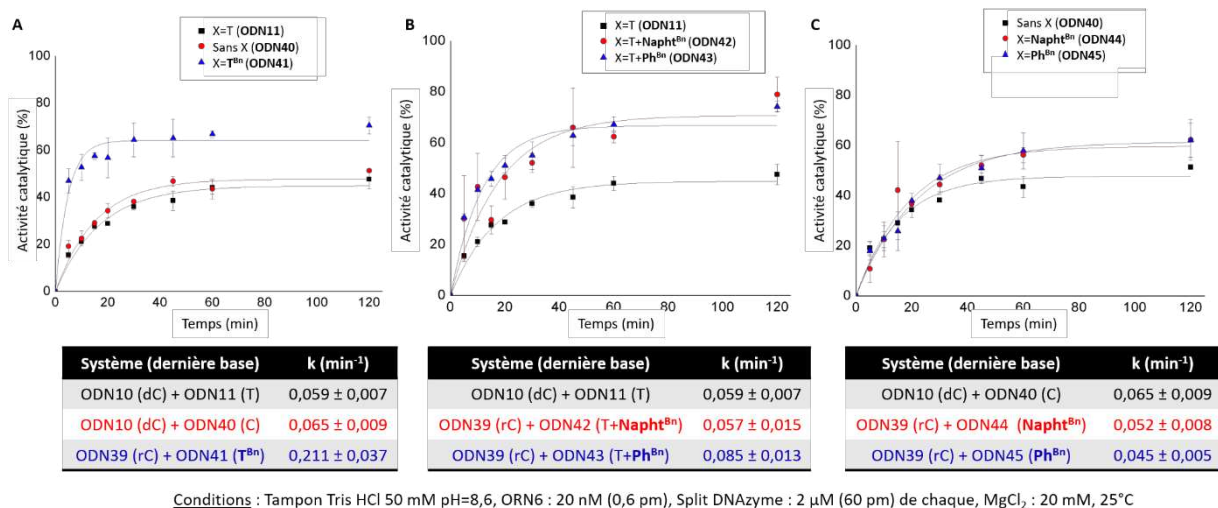


Figure 93 : Résultats obtenus pour le split DNAzyme 5 par LI-COR (A) en remplaçant la thymidine T29 par l’analogue borono-thymidine puis (B) en ajoutant un phosphoramidite modifié après la thymidine T29 ou (C) en remplaçant la thymidine T29 par un phosphoramidite modifié.

Ce dernier système a ainsi démontré que le bras de reconnaissance joue également un rôle sur la formation de la conformation active du DNAzyme. De plus, plus la coupure est éloignée de la boucle, moins l’activité catalytique du système est impactée.

Dans le but de démontrer que l’activité catalytique de ces systèmes modifiés est contrôlée par la formation d’un lien internucléosidique modifié de type ester boronate entre les deux fragments, la réaction a été réalisée en présence de catéchol. L’activité du DNAzyme parent est alors faiblement impactée car la quantité de substrats clivés diminue seulement de 73 % à 66 % (Figure 94A). En revanche, dans le cas du split DNAzyme 3, coupé à la jonction entre la boucle et le bras de reconnaissance et modifié par le T^{Bn}, l’activité chute de 62 % à 20 % car l’acide boronique est complexé par le catéchol et ne peut plus réagir avec le partenaire *cis*-diol (Figure 94B). Ainsi, ces résultats démontrent clairement le rôle joué par l’acide boronique et le partenaire *cis*-diol dans le rétablissement de l’activité catalytique.

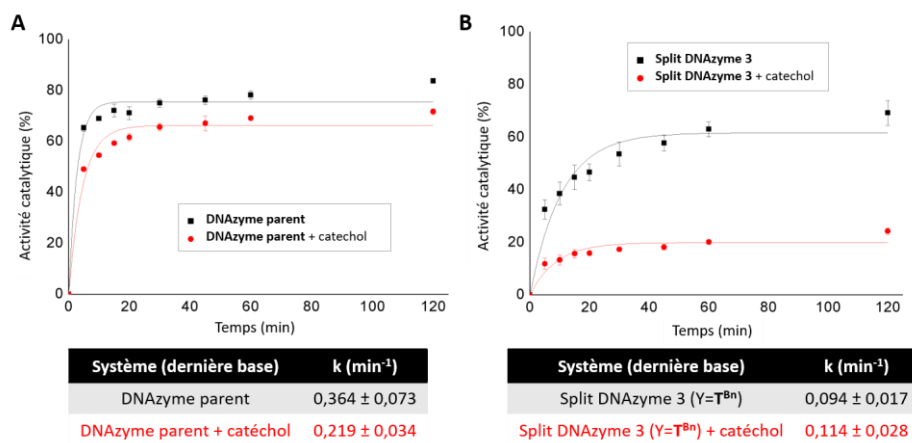


Figure 94: Résultats obtenus avec et sans catéchol pour (A) le DNAzyme parent et (B) le split DNAzyme 3.

Classiquement, l'activité catalytique du DNAzyme **10-23** est décrite par l'équation de Michaelis-Menten pour laquelle une équation du premier ordre est obtenue. Cependant, comme cela a déjà été observé dans le cas de ribozymes, les DNAzymes peuvent suivre une cinétique biphasique où le complexe substrat-DNAzyme est en échange lent entre la forme active et inactive. Dans ce cas, une vitesse initiale rapide est observée puis, après un certain pourcentage de substrats clivés, la vitesse diminue. Certaines des courbes présentées dans ce chapitre semblent en effet correspondre à cette cinétique plus compliquée qu'une cinétique de premier ordre, notamment dans le cas du split DNAzyme 3 où les vitesses de réaction sont relativement élevées par rapport à la quantité de substrats coupés (Figure 89, page 102). Par conséquent, nous avons préféré comparer en premier lieu la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction pour pouvoir comparer les différents systèmes entre eux. Ainsi, l'étude de ces différents split DNAzymes a permis de démontrer que la formation d'une liaison internucléosidique de type ester boronate en présence d'un partenaire *cis*-diol à l'extrémité 3' et d'un acide boronique à l'extrémité 5' permet de rétablir l'activité catalytique du système résultant. Cependant, celle-ci est très variable en fonction de la position de la coupure ainsi que de la nature de l'acide boronique incorporé. En effet, la meilleure activité est généralement observée avec le phosphoramidite **T^{Bn}** dû à sa similitude avec la thymidine naturelle impliquant une plus faible déstabilisation du système. L'activité catalytique de ces split DNAzymes modifiés par les phosphoramidites modifiés **Ph^{Bn}** et **Napht^{Bn}** a également été évaluée car les acides boroniques aromatiques, et de fait les esters boronates correspondants, sont connus pour être plus stables. De plus, en les ajoutant après la dernière thymidine du fragment ou en la remplaçant, l'influence de la flexibilité et des interactions π - π a pu être évaluée. Cependant, ces paramètres ne semblent avoir une influence majeure que dans le cas du split DNAzyme 5 où le

duplex est stabilisé par des interactions π - π , résultant en une amélioration de l'activité catalytique. Il pourrait donc être intéressant de fonctionnaliser ce phosphoramidite avec des groupements accepteurs et donateurs de liaisons hydrogène tels que des hydroxyles ou des amines afin de mimer des structures de type purines dans le but d'améliorer la stabilité et par conséquent l'activité catalytique.

Au début de ce chapitre, nous avons exposé qu'un pH basique favorise la formation de l'ester boronate par stabilisation d'un anion hydroxyboronate tandis qu'un pH acide la défavorise (paragraphe 2.1, page 59). Par ailleurs, de précédentes études menées par l'équipe ChemBioNAC ont démontré l'impact de la basicité du milieu sur la ligation de brins en présence d'une matrice.¹⁰ Parmi l'ensemble des systèmes divisés précédemment étudiés par PAGE, le split DNAzyme 3 démontre la plus grande différence d'activité catalytique entre le système divisé non modifié et celui pour lequel la thymidine T25 a été remplacée par le **T^{Bn}** (**ODN26**). Le système **ODN24-26** a donc été utilisé pour évaluer l'influence du pH sur la formation de l'ester boronate.

2.4.2.1.7 Système dynamique et programmable en fonction du pH

L'influence du pH a tout d'abord été étudiée en présence du DNAzyme parent par LI-COR. L'augmentation du pH à une valeur de 9,6 n'entraîne qu'une faible augmentation de la quantité d'ARN coupés tout au long de la réaction (Figure 95A). En revanche, aucune activité n'est observée à pH 5 car seulement 7 % de substrats coupés sont observés après 2 heures de réaction. L'activité du split DNAzyme 3 comportant le phosphoramidite modifié **T^{Bn}** à l'extrémité 5' du second fragment a ensuite été étudiée en fonction du pH dans le but de développer un système programmable. De la même façon que pour le DNAzyme parent, aucune activité catalytique n'est observée à pH 5 (Figure 95B). En revanche, à pH 9,6, la quantité de substrats d'ARN coupés après 2 heures de réaction est augmentée de 62 % à 82 % tandis que le système non modifié par un acide boronique n'augmente que de 47 % à 58 % (Figure 95C). La vitesse de réaction du split DNAzyme 3 modifié par le **T^{Bn}** est toutefois similaire aux deux valeurs de pH ($k_{\text{ODN24-26 pH=8,6}} = 0,094 \pm 0,017 \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{ODN24-26 pH=9,6}} = 0,096 \pm 0,018 \text{ min}^{-1}$).

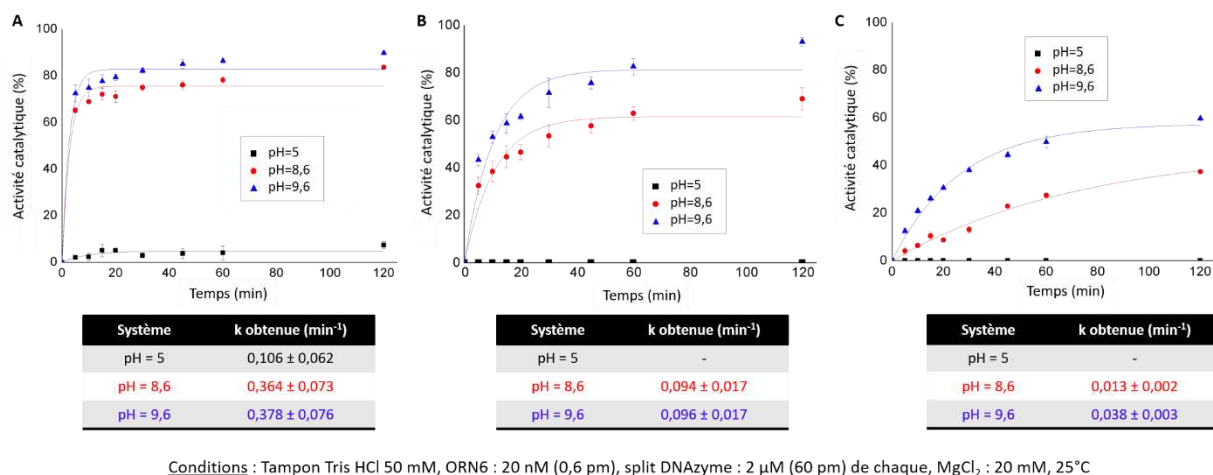


Figure 95 : Étude à différents pH (A) du DNAzyme parent, (B) du split DNAzyme 3 modifié par T^{Bn} et (C) du split DNAzyme 3 non modifié.

Cette différence d'activité catalytique en fonction du pH a alors été par la suite mesurée en appliquant successivement au système des variations de pH basique à acide ou inversement. Tout d'abord, la solution placée à un pH de 8,6 pendant deux minutes permet d'activer la coupure du substrat. La diminution du pH à une valeur de 5 par l'ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique entraîne cette fois-ci une absence totale de coupure supplémentaire après 15 minutes de réaction. En revanche, lorsque le pH est de nouveau augmenté aux alentours de 8 par l'ajout d'une solution aqueuse de soude, aucune activité catalytique n'est retrouvée. Les ions Na⁺, apportés par la solution de soude, pourraient être coordonnés par le système au détriment des ions Mg²⁺ et ainsi empêcher la formation de la conformation active à l'origine de l'activité catalytique. Une étude plus poussée est alors nécessaire afin d'étudier plus précisément le système en fonction du pH.

2.4.2.2 Étude par fluorescence (FRET)

L'activité des split DNAzymes a ensuite été étudiée par fluorescence et plus précisément par transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Pour cela, le substrat d'ARN **ORN9** a été doublement fonctionnalisé par les fluorophores ATTO₄₈₈ et ATTO₆₈₀ dont la fluorescence n'est pas affectée par les ions Mg²⁺. Ces deux fluorophores ont été choisis car la bande d'émission de fluorescence de l'ATTO₄₈₈ correspond à la bande d'absorption de l'ATTO₆₈₀, le premier est donc donneur d'énergie et le second accepteur (Figure 96A). Ainsi, lorsque l'ATTO₄₈₈ est excité, l'émission de fluorescence est absorbée par l'ATTO₆₈₀ qui réémet sa propre fluorescence, la seule à pouvoir être détectée. Cependant, en présence d'ions Mg²⁺ le substrat d'ARN **ORN9** est coupé en deux fragments, trop éloignés pour maintenir le phénomène

de FRET (Figure 96B). Le suivi de la réaction est donc possible en mesurant la diminution d'intensité de ce phénomène par fluorescence.

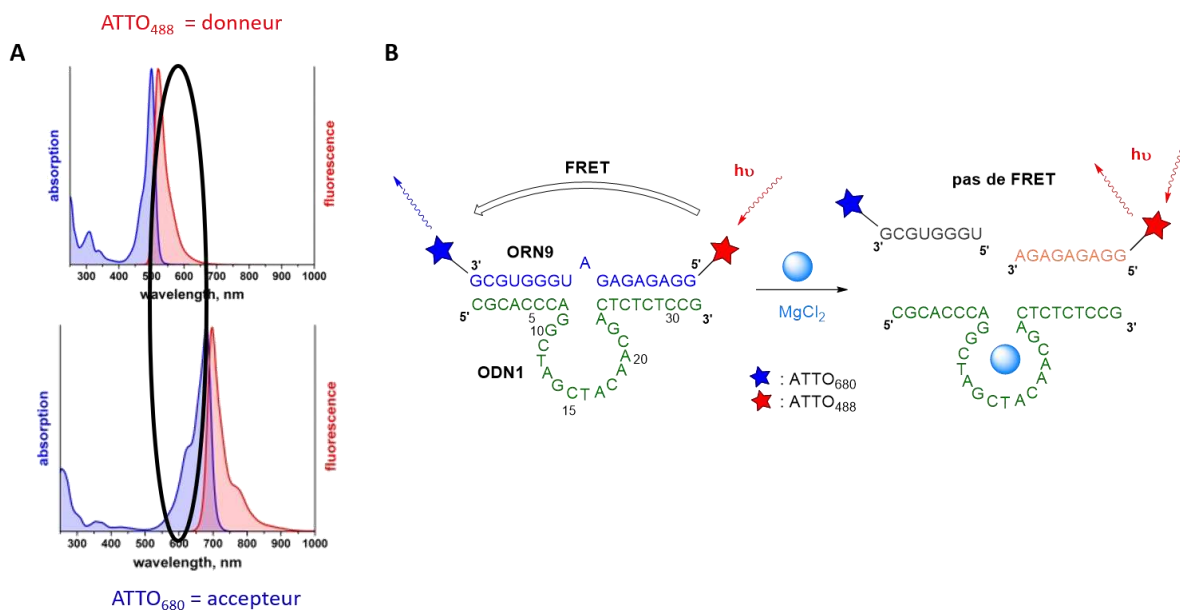
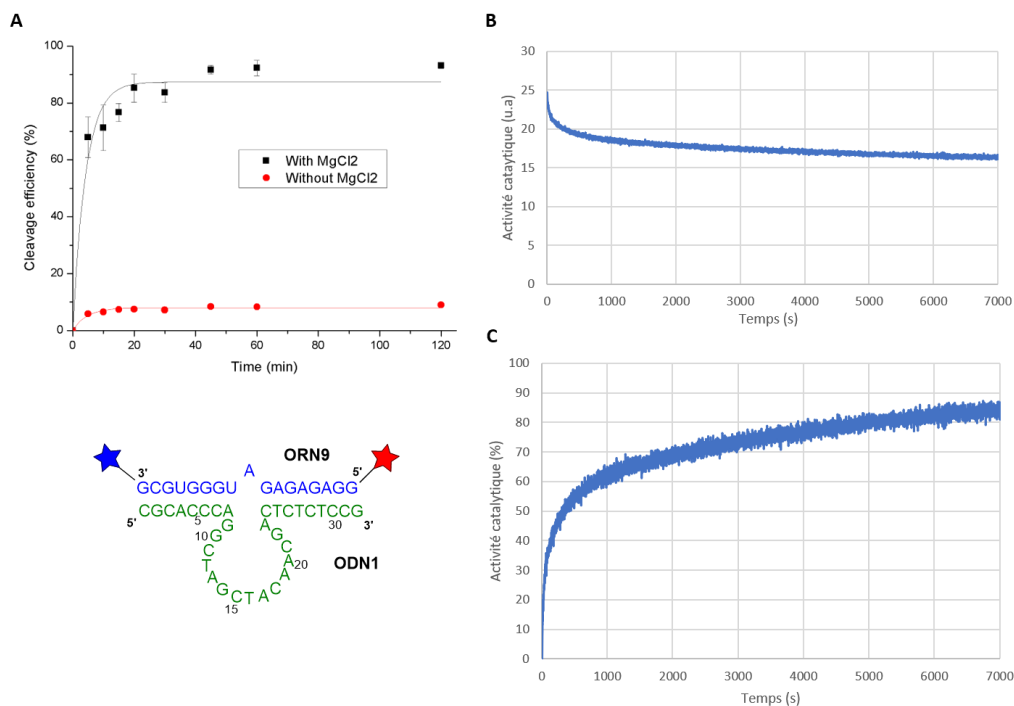


Figure 96 : (A) Courbes d'absorbance des fluorophores et (B) principe de détection par FRET.

Concernant la synthèse du substrat doublement fonctionnalisé, un phosphoramidite correspondant au lien C6-amine, dont l'amine est protégée par un groupement TFA, a été introduit à l'extrémité 5'. Après coupure du support, déprotection et purification, le substrat **ORN9** a été fonctionnalisé avec les deux fluorophores.²⁷⁸ Tout d'abord, une acylation a permis d'incorporer l'ATTO₄₈₈-NHS ester à l'extrémité 5' en 4 heures à 25°C dans le diméthylformamide puis une réaction de chimie click a été réalisée en « one-pot », soit dans le même flacon et sans aucun traitement, pour incorporer l'ATTO₆₈₀-azide en position 3' de la même façon que pour l'**ORN6**.

Le DNAzyme parent a ainsi pu être étudié par fluorescence et plus particulièrement en observant l'évolution du phénomène de FRET au cours du temps afin de comparer les résultats avec ceux obtenus précédemment par PAGE (paragraphe 2.4.2.1, page 94). La réaction a donc été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment et des résultats du même ordre de grandeur sont observés (Figure 97A). En effet, le signal FRET diminue au cours du temps (Figure 97B), ce qui signifie que la quantité de substrats d'ARN coupés augmente jusqu'à atteindre 85 % après 2 heures de réaction (Figure 97C). Une légère diminution de l'efficacité de coupure est toutefois observée par rapport aux analyses précédemment réalisées par PAGE, ce qui peut s'expliquer par un phénomène de photoblanchiment au cours du temps car les fluorophores ont été excités en continu pendant 2 heures, bien qu'ils soient connus pour être

robustes envers cette dégradation. De plus, ce type d'analyse est moins précis et moins sensible que le LI-COR.



Conditions : Tampon Tris HCl 50 mM pH=8,6, ORN9 : 20 nM (0,6 pm), DNAzyme : 2 μ M (60 pm), MgCl₂ : 20 mM, 25°C

Figure 97 : Étude du DNAzyme **10-23** par (A) PAGE puis par FRET à partir de la (B) diminution de fluorescence émise par le fluorophore ATTO₆₈₀, (C) résultant en une augmentation de la quantité de substrats coupés.

L'objectif est donc de suivre en temps réel le signal FRET du split DNAzyme 3 modifié tout en faisant varier le pH afin de déterminer les valeurs de pH optimales pour le développement d'un système on/off. Cependant, les résultats n'ont pu être obtenus à ce jour et ne seront, par conséquent, pas présentés dans ce manuscrit.

Nous avons ainsi pu réaliser une étude complète de ces systèmes à base d'ADN et, grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Sabine Müller à l'Universität Greifswald en Allemagne, nous avons également pu appliquer ce concept aux ribozymes. L'ensemble des résultats présentés au paragraphe suivant sont issus des travaux réalisés par la doctorante Amandine Lelievre dans le cadre de sa thèse. Par conséquent, seuls quelques résultats préliminaires seront mentionnés.

2.5 Étude de l'activité des split ribozymes

Le ribozyme en épingle à cheveux appelé **HPWTL2**, dérivé de l'ARN satellite du virus des taches en anneaux du tabac (TRSV) et capable de détecter le substrat **HPAS3**, a été étudié dans

ce contexte.^{201,283,284} Le complexe formé par le ribozyme et le substrat **HPAS3** comprend deux domaines composés de deux hélices séparées par une boucle interne (Figure 98). Le domaine A constitue le site de reconnaissance et contient une partie du substrat tandis que le domaine B forme le site catalytique. Cependant, dans cette configuration le ribozyme est inactif car le site de coupure du substrat est trop éloigné du site catalytique. L'ajout de cations tels que les ions Mg^{2+} permet de compenser la répulsion électrostatique des squelettes négativement chargés du ribozyme entraînant la formation d'une structure secondaire catalytiquement active qualifiée d'épingle à cheveux ou de trombone dans laquelle le substrat est situé entre les deux domaines.²⁸⁵

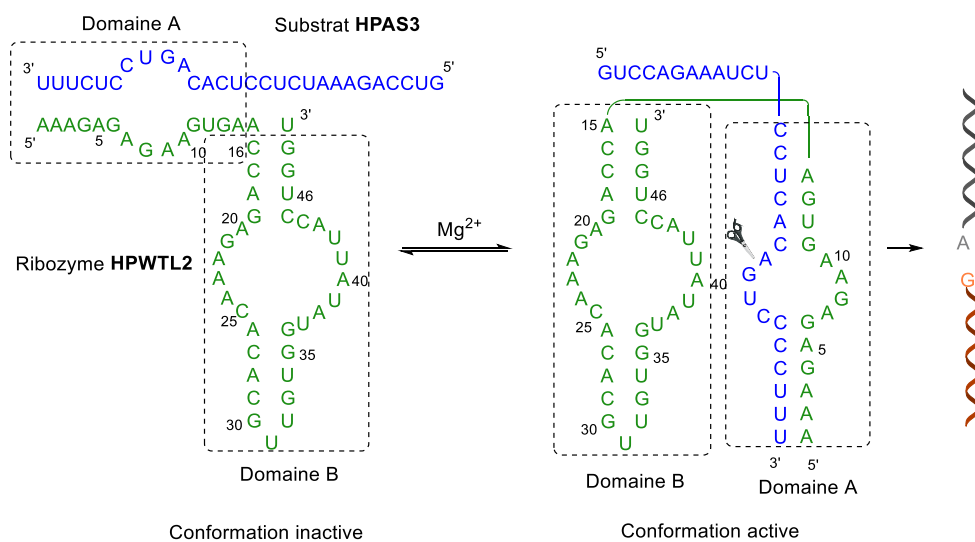


Figure 98 : Structure et conformations du ribozyme **HPWTL2**.

Le mécanisme de coupure du substrat est globalement le même que celui précédemment décrit pour les DNAzymes où l'ion Mg^{2+} coordine l'hydroxyle en position 2', provoquant la coupure de la liaison phosphate-oxygène. En revanche, dans le cas des ribozymes, la coupure est assistée par des liaisons hydrogène entre les oxygènes du groupement phosphate internucléosidique et les fonctions amines des bases A38 et G8 du ribozyme qui sont relativement proches dans l'espace lorsque le ribozyme adopte sa conformation active (Figure 99).

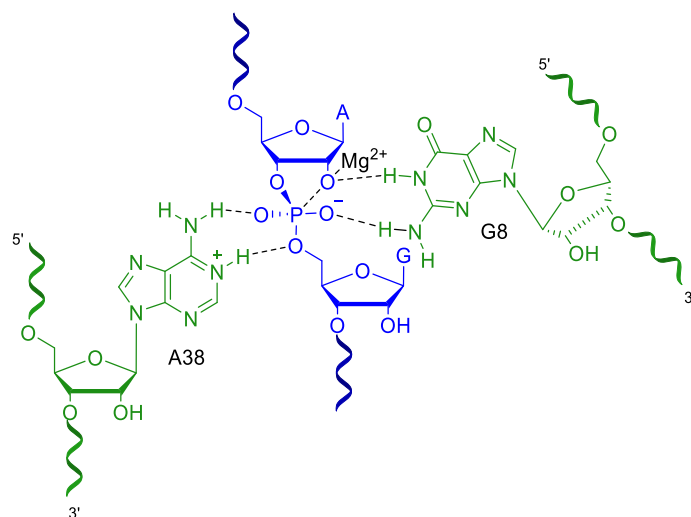


Figure 99 : Mécanisme de coupure du ribozyme **HPWTL2**.

L'activité catalytique du ribozyme parent a dans un premier temps été étudiée par PAGE en fonctionnalisant le substrat d'ARN à l'extrémité 5' par le fluorophore ATTO₆₈₀. De la même façon que précédemment, l'analyse des gels obtenus permet d'obtenir l'efficacité de coupure maximale ainsi que la vitesse de réaction par un ajustement non linéaire de type exponentiel. Le ribozyme **HPWTL2** a ensuite été divisé à différentes positions afin d'étudier l'impact de la position de la coupure sur le rétablissement de l'activité catalytique (Figure 100). Le ribozyme a tout d'abord été divisé au niveau de la deuxième hélice du domaine B puis à deux positions différentes au niveau de la boucle catalytique. Dans le cas du split ribozyme 1, la coupure est située à une position connue pour ne pas inhiber totalement l'activité catalytique, en revanche pour les deux autres split ribozymes la coupure se situe au niveau du site catalytique, il est donc très probable que l'activité catalytique soit fortement affectée.

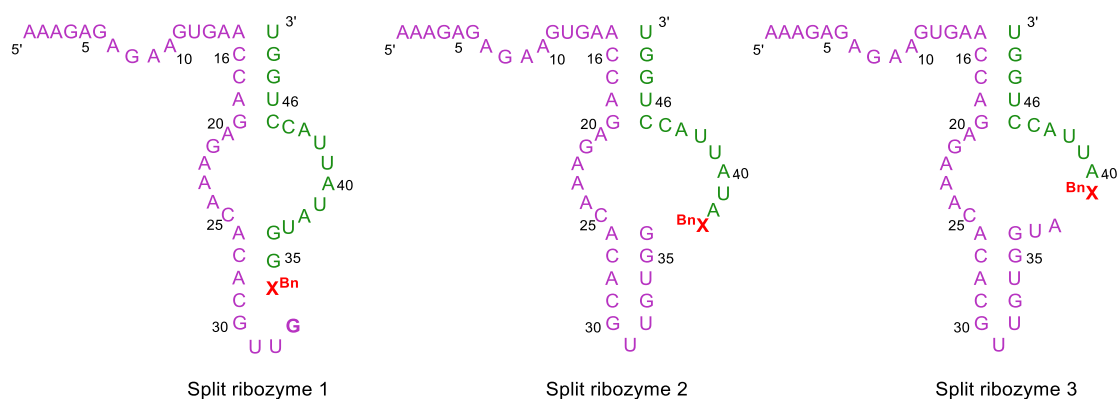


Figure 100 : Structures des différents split ribozymes.

Comme attendu, la coupure des split ribozymes entraîne une forte déstabilisation du système et

de fait une importante diminution de l'activité catalytique par rapport au ribozyme parent, voire une inhibition totale dans le cas des split ribozymes 2 et 3. Ces systèmes non modifiés par un acide boronique ne permettent donc pas un assemblage efficace des deux brins en une conformation active. Dans le but d'étudier si l'activité catalytique peut être rétablie grâce à la formation d'un lien internucléosidique de type ester boronate, l'extrémité 5' a été remplacée par un phosphoramidite modifié contenant un acide boronique, à savoir la borono-thymidine T^{Bn} , la borono-uridine U^{Bn} , l'acide phénylboronique Ph^{Bn} et l'acide naphthalèneboronique $Napht^{Bn}$. Notons que dans le cas des ribozymes il s'agit de séquences d'ARN, le partenaire *cis*-diol nécessaire à la formation de l'ester boronate est de fait déjà présent au sein de la séquence et ne nécessite donc pas de modifications supplémentaires. L'étude du split ribozyme 1 démontre alors que celui-ci est beaucoup plus sensible aux mutations par rapport aux split DNAzymes précédemment étudiés. En effet, plusieurs interactions sont impliquées dans le repliement du split ribozyme dans une conformation active indispensable à la coupure du substrat et seuls les analogues de nucléobases naturelles T^{Bn} et U^{Bn} sont capables de rétablir l'activité catalytique du système de façon efficace.

2.6 Conclusion et perspectives du Chapitre 2

Ces études sur le split DNAzyme **10-23** et le split ribozyme **HPWTL2** nous ont permis de démontrer la capacité des liaisons internucléosidiques de type ester boronate à rétablir l'activité catalytique du système. Pour cela, les phosphoramidites modifiés par des acides boroniques ont d'abord été synthétisés au laboratoire et introduits dans des oligonucléotides. Les conditions de réactions optimales ont alors été mises au point avec les systèmes entiers par HPLC, fluorescence et PAGE. Les systèmes divisés ont ensuite été étudiés par PAGE et fluorescence (FRET) afin d'étudier l'impact de la coupure sur l'activité catalytique ainsi que l'influence de la formation de l'ester boronate. Ainsi, il s'avère que la coupure du DNAzyme entraîne une importante diminution voire une inhibition complète de l'activité mais l'incorporation d'une ribocytidine à l'extrémité 3' du premier fragment et d'un phosphoramidite modifié par un acide boronique à l'extrémité 5' du second fragment permet de rétablir l'activité catalytique. Cependant, il a été démontré que la position de la coupure ainsi que la nature de l'acide boronique incorporé ont une influence non négligeable sur la conformation du système et par conséquent sur sa capacité à former un ester boronate. En effet, les split DNAzymes ou ribozymes modifiés les plus efficaces sont ceux comportant le phosphoramidite modifié T^{Bn} ou U^{Bn} , respectivement, grâce à leur très grande similitude avec les nucléosides originaux

entraînant une plus faible déstabilisation qu'avec les autres acides boroniques incorporés. L'incorporation du **Napht^{Bn}** au niveau du bras de reconnaissance permet toutefois une stabilisation grâce à la présence des deux cycles aromatiques et à sa capacité à former des interactions π - π . Celle-ci est cependant entravée par la rigidité de la molécule qui rend la formation de l'ester boronate plus difficile. Il pourrait donc être intéressant de fonctionnaliser le naphthalène avec des groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène afin d'augmenter sa capacité à interagir avec les nucléobases et ainsi améliorer la stabilisation. Il serait également intéressant de diviser le système en trois fragments afin d'étudier sa capacité à reformer la conformation active à travers la formation de deux liens internucléosidiques de type ester boronate. L'influence du pH a également été étudiée dans le but de former un système programmable et réversible. En effet, un pH élevé favorise la formation de l'ester boronate par stabilisation de l'anion hydroxyboronate tandis qu'un pH plus faible favorise la dissociation des deux entités conduisant à une inhibition de l'activité. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin d'optimiser les conditions permettant l'obtention d'un système on/off. Cette étude a ensuite pu être étendue aux split ribozymes bien que ces systèmes soient plus sensibles que les split DNAzymes car seuls les analogues de nucléosides naturels sont capables de rétablir l'activité catalytique.

Enfin, comme nous l'avons évoqué dans le Chapitre 1, le développement de systèmes divisés est très intéressant car, les séquences d'acides nucléiques étant plus courtes et moins enclines à former des structures secondaires, les systèmes développés sont plus sensibles et spécifiques. Cependant, seulement quelques systèmes ont pu être divisés de par la difficulté à préserver l'activité catalytique. Ainsi, l'incorporation d'acides boroniques et de *cis*-diols à chaque extrémité pourrait permettre le développement de nouveaux systèmes divisés sans affecter son activité catalytique, celle-ci étant rétablie par formation d'une liaison covalente et réversible de type ester boronate. De plus, le caractère réversible de la liaison permet de contrôler l'activité du système en fonction du pH. Ces travaux ont ainsi fait l'objet d'une publication récemment acceptée dans le journal *Chemistry – A European Journal*. Ce concept pourrait alors être appliqué à d'autres DNAzymes tel que le DNAzyme **8-17** qui est également très étudié.²⁸⁶

Chapitre 3 : Borylation d'acides nucléiques

3.1 Introduction et contexte

Comme présenté dans le Chapitre 2, les acides boroniques suscitent un fort intérêt en raison de leur capacité à former des liens covalents et réversibles en présence de dérivés *cis*-diols, conduisant notamment à des systèmes dynamiques et programmables par un stimulus externe tel que le pH.²⁸⁷⁻²⁹⁰ Par conséquent, l'introduction d'acides boroniques au sein de biomolécules fait l'objet de nombreuses études pour élaborer des bioconjugués dotés de nouvelles propriétés. Cette stratégie a notamment permis la modification sélective de différents sites de peptides et protéines permettant le développement de sondes capables de détecter les carbohydrates et glycoprotéines grâce à la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.²⁹¹ Cela a également permis la conception d'aptamères possédant une meilleure affinité envers une molécule cible grâce à la formation de liaisons covalentes et réversibles.^{16,17} La fonctionnalisation d'oligonucléotides est communément réalisée par la réaction de CuAAC grâce à sa simplicité de mise en œuvre, sa rapidité, son orthogonalité et son efficacité. Cependant, elle s'avère peu adaptée en présence d'acides boroniques car ceux-ci sont rapidement dégradés par une réaction d'oxydation en présence de sels de cuivre.²⁹² En effet, le Cu(I) est connu pour sa capacité à s'insérer entre la liaison carbone-bore.^{293,294} Par conséquent, plusieurs groupes de recherches ont considéré que la fonctionnalisation sélective des oligonucléotides par un acide boronique était incompatible avec la CuAAC comme le démontre leurs publications à travers les citations suivantes :

*« Because of the undesired reactivity of boronic acids by the presence of copper salts, the CuAAC at the 2'-position of the cU moiety had to be performed with dye azides before the covalent attachment of the boronic acid to the zA component. »*²⁹⁵

*« Nucleobase modification for the epinephrine selection was performed using SPAAC because Cu(I) is incompatible with the boronic acid modification that was used in the selection, whereas the Con A selection was performed with CuAAC. »*²⁹⁶

Une solution alternative largement utilisée pour l'incorporation d'acides boroniques au sein des séquences d'oligonucléotides est la synthèse automatisée en utilisant les phosphoramidites correspondants.^{297,298} Cette approche a largement été étudiée au sein de l'équipe ChemBioNAC et a permis de développer des systèmes de ligation d'ADN et d'ARN en présence d'une matrice.^{10,14} Les analogues de la thymidine, désoxyadénosine, désoxycytidine, désoxyguanosine et uridine contenant un acide boronique protégé par un groupement pinacol ou MIDA en position 5' ont été synthétisés *via* la voie de synthèse décrite dans le paragraphe 2.2 du Chapitre 2 (Figure 101). Ils ont ensuite introduits dans une séquence d'ADN ou d'ARN

par chimie classique des phosphoramidites.^{15,18,253} L'incorporation d'acides boroniques au sein de séquences d'ADN a également permis d'améliorer leur stabilité vis-à-vis des nucléases, dont la RNase H.^{267,299,300} Cependant, bien que cette stratégie de synthèse soit couramment utilisée au sein du laboratoire, la synthèse des phosphoramidites modifiés peut parfois s'avérer complexe car elle nécessite plusieurs étapes de protection et déprotection de la nucléobase et certaines étapes conduisent à de faibles rendements.

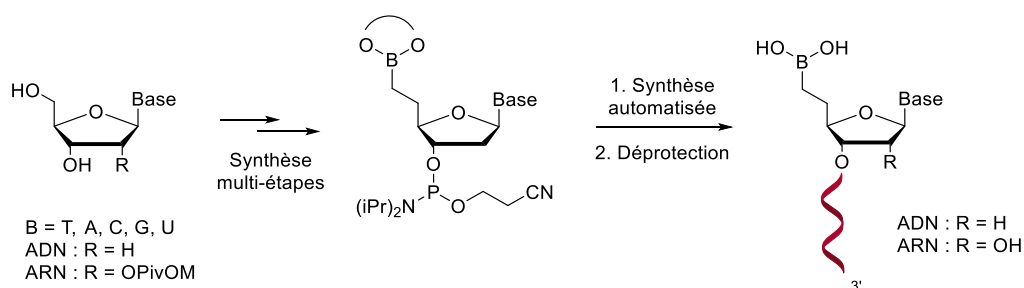


Figure 101 : Structure des nucléosides modifiés en base ADN ou ARN.

Ainsi, une approche enzymatique peut être utilisée pour s'affranchir des risques de dégradation lors de la synthèse automatisée en utilisant les nucléosides triphosphates correspondants.³⁰¹ Lin *et al.* ont synthétisé la borono-thymidine triphosphate (**B-TTP**) à partir de la 5-iodo-2'-désoxyuridine et l'ont introduit dans une séquence d'ADN par polymérisation enzymatique (Figure 102).³⁰² Pour cela, les auteurs ont tout d'abord phosphorylé la position 5' de la thymidine puis introduit par réaction de CuAAC un synthon aromatique contenant un acide boronique (Figure 102A). L'ordre des réactions est crucial car la phosphorylation ne peut pas être effectuée si l'acide boronique est présent sur la molécule à cause de la présence des deux hydroxyles et du caractère hygroscopique apporté par celui-ci. La **B-TTP** obtenue est ensuite incorporée au sein de la séquence d'ADN en présence d'une matrice et d'une amorce par une ADN polymérase (Figure 102B). L'amplification des séquences modifiées par PCR a ainsi permis le développement *via* sélection *in vitro* de mimes de lectines à base d'ADN pour la détection spécifique de glucides. Dans le même but, Yang *et al.* ont conçu des sondes fluorescentes dont l'émission de fluorescence augmente après liaison avec le glucide.³⁰³ Cependant, cette méthode nécessite la synthèse de la **B-TTP** et les rendements sont relativement faibles, notamment pour la dernière étape de CuAAC (20 %). Cela est probablement dû à la faible compatibilité des acides boroniques avec les sels de cuivre.

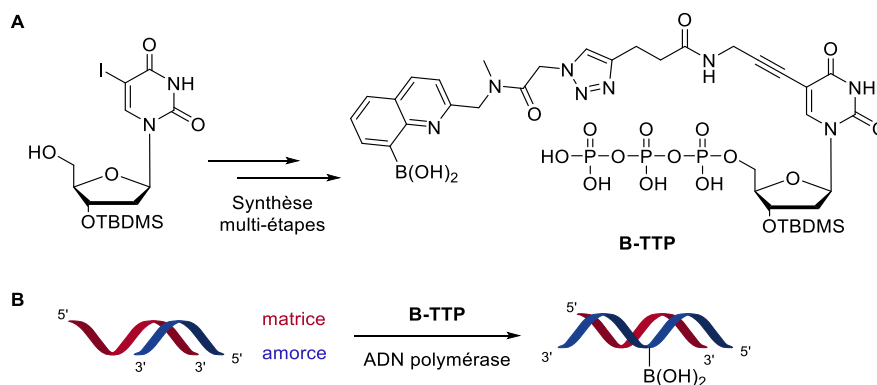


Figure 102: (A) Synthèse de la borono-thymidine triphosphate (**B-TTP**) et (B) incorporation dans la séquence par polymérisation enzymatique.

Une alternative intéressante consiste à introduire un acide boronique après la synthèse de la séquence d'oligonucléotides, tout en s'affranchissant dans certains cas de longues étapes de synthèse de nucléosides modifiés et des risques de dégradation.^{304,305} Cette stratégie est modulable, facile à mettre en œuvre et permet généralement d'accéder à de meilleurs rendements.³⁰⁶ Steinmeyer et Wagenknecht ont ainsi développé une méthode permettant d'introduire un acide boronique à travers un lien amide à l'extrémité 5' (Figure 103A) ou à l'intérieur d'une séquence d'oligonucléotides (Figure 103B).²⁹⁵ La présence d'un acide boronique à l'extrémité 5' est rendue possible par l'introduction d'un phosphoramidite fonctionnalisé par une chaîne hexylamine lors de la synthèse automatisée. Après déprotection, la formation d'un lien amide entre ce dernier et l'intermédiaire acide 4-carboxyphénylboronique permet d'obtenir la séquence modifiée correspondante. L'introduction d'un acide boronique est également possible à l'intérieur d'une séquence d'oligonucléotide, cependant la présence d'un acide boronique à l'intérieur de la séquence nécessite au préalable la synthèse de la 7-déaza(propyltrifluoroacétamide)-2'-désoxyadénosine en dix étapes. De plus, il est nécessaire d'insérer un phosphoramidite 2'-O-propargyluridine à la position souhaitée par synthèse automatisée. Après déprotection, la séquence d'oligonucléotides est d'abord fonctionnalisée avec un fluorophore par réaction de CuAAC, permettant la détection du brin lors de futures applications. L'acide boronique est ensuite introduit par formation du lien amide en présence d'acide 4-carboxyphénylboronique au niveau de l'amine de la nucléobase déprotégée. Dans cet exemple aussi, l'ordre des réactions est important afin de préserver l'acide boronique envers les potentielles réactions d'oxydations. Cette méthode est intéressante car elle permet la détection de glucides par fluorescence grâce à la formation de liaisons covalentes et réversibles entre l'oligonucléotide modifié par un acide

boronique et le glucide. Cependant, les nombreuses étapes de synthèse de l'adénosine modifiée, nécessaires pour introduire un acide boronique à l'intérieur de la séquence d'oligonucléotides, peuvent limiter l'application de ce système.

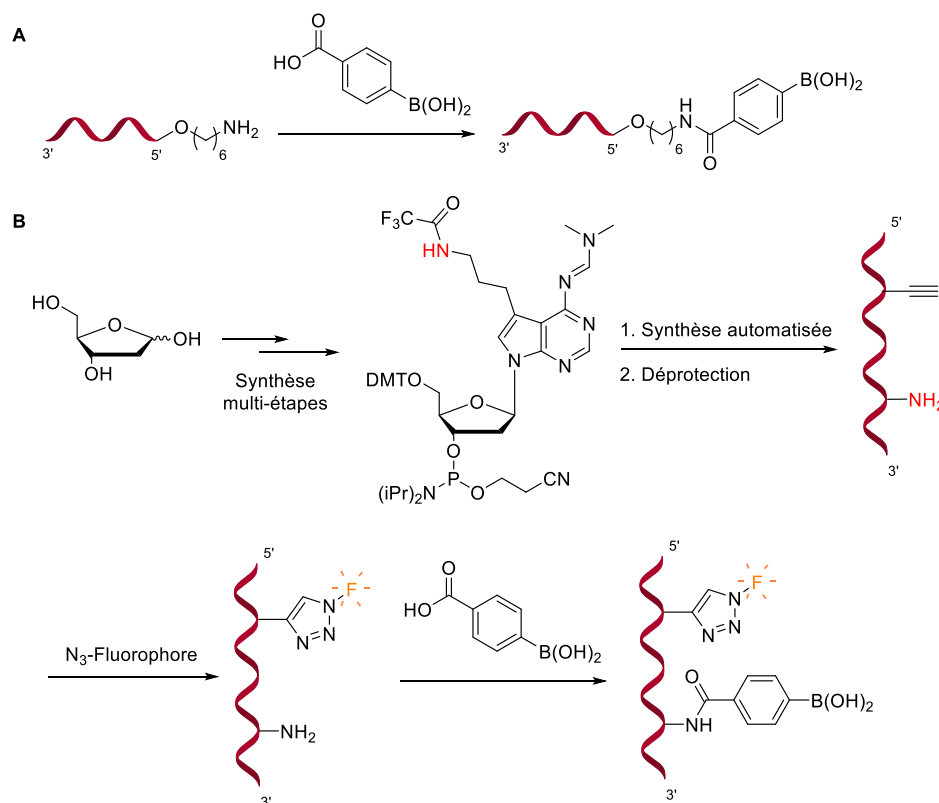


Figure 103 : Incorporation d'un acide boronique de façon post-synthétique (A) à l'extrémité 5' ou (B) au milieu de la séquence.

Grâce à cette même méthode, un duplex d'ADN contenant jusqu'à quatre acides boroniques a également été développé (Figure 104).³⁰⁷ Pour cela, une chaîne hexylamine a été introduite aux extrémités 5' et 3' du premier et second brin respectivement. Les fonctions acides boroniques sont ensuite introduites par la formation d'un lien amide entre l'extrémité des brins et le composé *N,N*-bis((2-dihydroxyborono)benzyl)-lysino glycine (BBA), porteur de deux fonctions acides boroniques. Il a ainsi été démontré que ce système permet de reconnaître différents glucides de façon beaucoup plus spécifique qu'avec un seul acide boronique car il possède quatre sites de liaisons. Ce système pourrait ensuite être appliqué à diverses macromolécules possédant plusieurs sites d'interactions. Ce duplex modifié présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de ne nécessiter que peu d'étapes de synthèse des brins d'oligonucléotides et de l'intermédiaire BBA. Cependant, l'introduction de ce dernier et donc des fonctions acides boroniques ne peut être réalisée qu'à l'extrémité de la séquence.

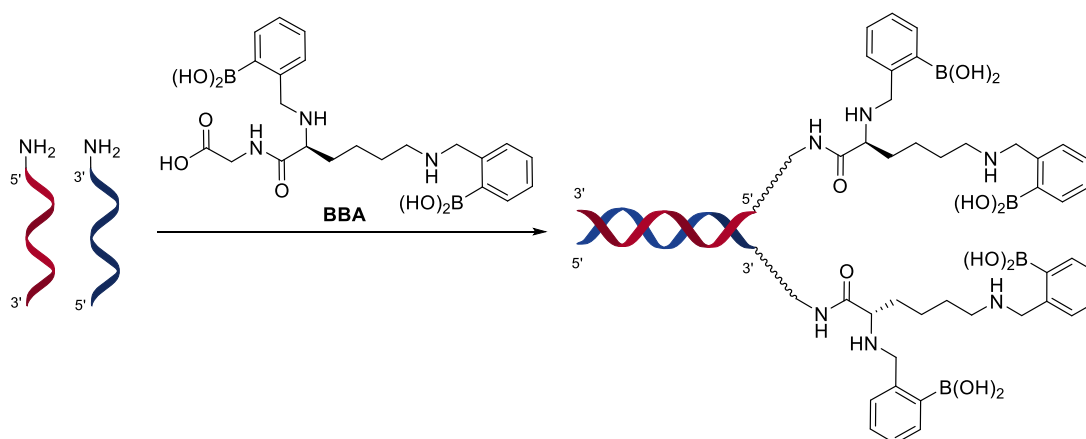


Figure 104 : Fonctionnalisation du duplex d'ADN avec quatre acides boroniques par formation de liaisons amides.

Dans une autre étude, Dai *et al.* ont introduit un acide boronique au sein de séquences d'ADN par une réaction de SPAAC (Figure 105).¹³⁸ Un phosphoramidite modifié comportant un groupement difluorocyclooctyne en C5 de la thymine a été synthétisé puis incorporé à différentes positions de la séquence d'ADN. Après déprotection, l'oligonucléotide a été mis en présence de différents substrats comportant une fonction azoture et acide boronique. La formation d'un lien triazole a alors été observée avec une conversion supérieure à 95 %. Cette stratégie de synthèse a ainsi permis d'identifier un nouvel aptamère capable de détecter l'épinéphrine, une molécule appartenant à la famille des catécholamines.²⁹⁶ L'introduction d'un acide boronique dans la séquence de l'aptamère permet la formation d'un ester boronate et la stabilisation du complexe aptamère-cible. La synthèse du phosphoramidite modifié, réalisée en seulement quatre étapes avec de bons rendements, couplée à la réaction de SPAAC constitue une méthodologie intéressante pour l'obtention d'oligonucléotides modifiés de manière efficace.

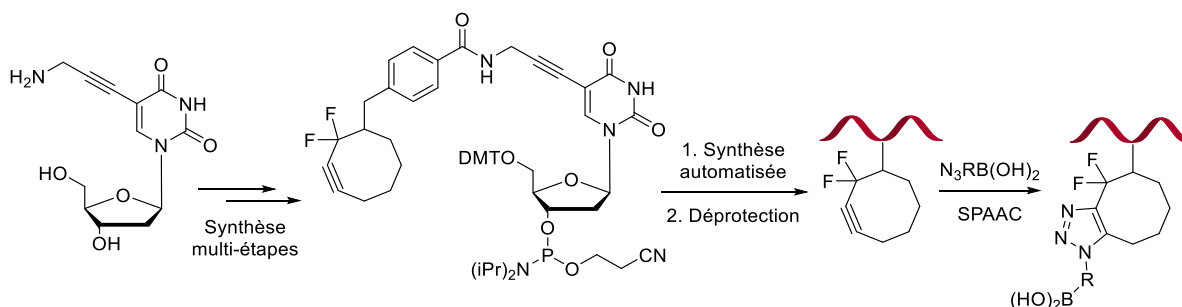


Figure 105 : Incorporation d'un acide boronique au sein d'un oligonucléotide par la réaction SPAAC.

L'ensemble des méthodes développées pour incorporer un acide boronique au sein d'une

séquence d'acide nucléique nécessite en règle générale la synthèse multi-étapes de nucléosides modifiés pouvant, dans certains cas, être difficile à mettre en œuvre. Nous avons alors développé une nouvelle méthode simple, rapide, efficace et modulable permettant d'insérer un acide boronique post-synthèse, soit après l'élongation des oligonucléotides sur support solide et avant l'étape de déprotection.

Bien que de nombreuses études aient mis en évidence l'incompatibilité de la réaction de CuAAC avec les acides boroniques sous peine de dégradation par les sels de cuivre, plusieurs exemples ont démontré que des acides boroniques protégés sous la forme d'esters boronates pouvaient être engagés dans de telles réactions pour la synthèse de petites molécules.^{292,308-312} De plus, les précédents travaux de l'équipe ChemBioNAC ont montré avec succès l'absence de toute dégradation non désirée dans ces conditions.³⁰⁸ En effet, une fonction aldéhyde présente sur un dérivé d'acide boronique protégé par un groupement pinacol peut être transformée en alcyne par une homologation de Seyferth-Gilbert puis couplée avec une molécule d'intérêt par réaction de CuAAC avec un rendement de 30 à 60 % (Figure 106).

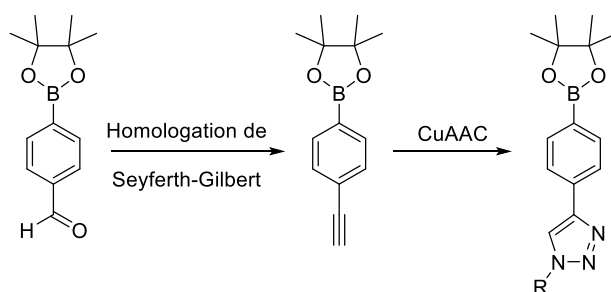


Figure 106 : Homologation de Seyferth-Gilbert suivie d'une réaction de CuAAC permettant de coupler un acide boronique avec de petites molécules.

Ainsi, deux méthodes permettant d'intégrer des acides boroniques protégés à l'extrémité 5' ou à l'intérieur d'une séquence d'oligonucléotide donnée par réaction de CuAAC sur support solide ont été développées sans avoir recourt à l'utilisation de nucléosides modifiés. Les résultats obtenus, seront présentés dans la première partie de ce chapitre. Les résultats du Chapitre 2 (paragraphe 2.3.2) sont issus des travaux présentés dans cette partie. L'introduction d'un acide boronique au sein d'une séquence d'oligonucléotide a également été étudiée par hydroboration sur support solide à partir d'alcènes ou d'alcynes. Cette réaction permet de transformer un alcène en alcool ou un alcyne en aldéhyde grâce à l'utilisation d'un borane. Les conditions réactionnelles ont ainsi été optimisées afin d'isoler l'intermédiaire comportant un borane ou un ester boronate pour ensuite obtenir l'acide boronique par hydrolyse. L'oxydation

de l'acide boronique vinylique obtenu par hydroboration d'alcyne a par la suite été étudiée dans le but d'incorporer un aldéhyde, fonction relativement difficile à incorporer au sein d'acides nucléiques de façon classique en raison de sa grande sensibilité, afin de développer une méthode de couplage entre l'oligonucléotide comportant l'aldéhyde et des biomolécules comportant des fonctions amines, hydrazines ou hydroxylamines.

3.2 Borylation par réaction de CuAAC

La réaction de CuAAC entre une fonction azoture et un alcyne terminal permet la formation régiospécifique d'un motif triazole 1,4 sous catalyse au cuivre (I) et est réalisée selon le cycle catalytique présenté en Figure 107.³¹³ La coordination de type π de l'alcyne sur l'atome de cuivre entraîne la déprotonation de l'alcyne terminal pour former l'intermédiaire clé acétylure de cuivre (I). L'atome de cuivre est ensuite coordonné par l'azoture, permettant l'attaque nucléophile de l'atome d'azote terminal sur la triple liaison pour former un intermédiaire cyclique métallacycle à six chaînons. La contraction du cycle suivie de l'élimination réductrice du cuivre et d'une protonolyse en milieu aqueux permet ainsi d'obtenir de manière régiospécifique le triazole 1,4 ainsi que la régénération du catalyseur. Parmi l'ensemble des sources de cuivre de degré d'oxydation 0, I et II capables de générer l'espèce active cuivre (I), le système cuivre (II) couplé à un agent réducteur dans des mélanges eau/alcool ou eau/acétonitrile constitue l'une des approches les plus utilisées. Elle présente notamment l'avantage de générer l'espèce active *in situ* grâce à la réduction du cuivre (II), généralement sous la forme de sulfate de cuivre CuSO_4 , par un agent réducteur, l'ascorbate de sodium, et ainsi d'être peu sensible à la présence d'oxygène dans le milieu.

La CuAAC répond pleinement au « cahier des charges » des réactions de chimie click décrit par Kolb et Sharpless car elle permet d'obtenir régiosélectivement un motif triazole disubstitué en position 1,4 très stable chimiquement, dans des conditions de réactions douces (température ambiante, solvant aqueux) et avec de très bons rendements.³¹⁴ Il s'agit d'une réaction modulable pour laquelle les fonctions alcyne et azoture sont chimiquement stables et faciles à introduire sur des partenaires possédant des structures chimiques très diverses. Dès lors, de nombreuses améliorations ont été apportées aux systèmes existants à travers l'utilisation par exemple de ligands externes pour améliorer et stabiliser le système catalytique en protégeant l'espèce active cuivre (I) vis-à-vis de potentielles réactions d'oxydation. Les dérivés polytriazoles, comme le ligand hydrosoluble THPTA, présentent de manière générale trois bras faiblement donneurs et un azote central fortement donneur (Figure 107). L'atome de cuivre est alors coordonné à la fois

par l'atome d'azote central et par ceux contenus au sein des triazoles. L'utilisation de ce type de ligand a ainsi permis d'insérer avec succès différentes fonctionnalités *in vivo* par réaction de CuAAC sans que l'intégrité de la biomolécule ne soit affectée.³¹⁵ Malgré la toxicité qui peut être apportée par le cuivre, la CuAAC présente une cinétique ainsi qu'une efficacité supérieure en comparaison à la réaction de SPAAC. Elle constitue donc une réaction de choix pour la fonctionnalisation de biomolécules.

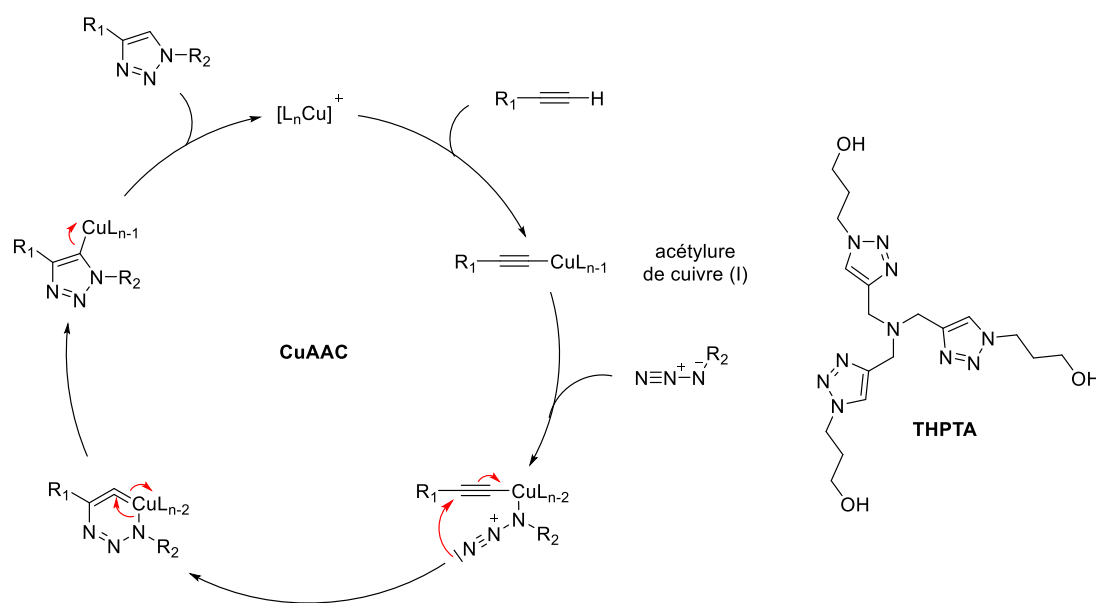


Figure 107 : Cycle catalytique de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (I) et structure du ligand THPTA.

Ainsi, nous avons utilisé cette réaction de CuAAC pour incorporer un acide boronique au sein d'acides nucléiques d'abord en incorporant une fonction azoture à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide puis en introduisant une fonction alcyne à l'intérieur de la séquence.

3.2.1 Incorporation d'une fonction acide boronique à l'extrémité 5'

La première méthode consiste à incorporer l'acide boronique à l'extrémité 5' d'une séquence donnée par réaction de CuAAC, comme nous l'avons précédemment décrit dans le Chapitre 2 pour les **ODN22** et **ODN36** (paragraphe 2.3.2, page 79). Les oligonucléotides ont été synthétisés par chimie classique des phosphoramidites et l'hydroxyle à l'extrémité 5' a été déprotégé en ajoutant une étape de détritylation supplémentaire à la fin du cycle de synthèse (Figure 108). La fonctionnalisation de l'extrémité 5' avec une fonction azoture a été inspirée de la méthode développée par Kool et Miller, consistant à remplacer l'hydroxyle à l'extrémité 5' par un atome d'iode, soit un très bon groupe partant, pour réaliser par la suite une substitution

nucléophile de type 2 en présence de TMGA.²⁶⁸ Cette méthode permet l'incorporation de nombreux groupes fonctionnels tels qu'un atome d'iode ou des groupements amine, azoture, thiol ou encore thioester permettant ainsi d'obtenir une plus grande librairie d'oligonucléotides modifiés utilisables pour diverses applications.²⁶⁹ La colonne contenant l'oligonucléotide est connectée d'un côté avec une seringue vide et de l'autre avec une seringue contenant une solution d'iodure de (méthyl)triphenylphosphonium en excès dans le DMF anhydre. La solution est ensuite transférée d'une seringue à l'autre en passant par la colonne (percolation) pendant 15 minutes à 20°C. Les billes sont ensuite lavées avec de l'acétonitrile et du dichlorométhane afin d'éliminer l'excès de réactif. L'atome d'iode est ensuite remplacé par une fonction azoture par une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire en percolant la colonne avec une solution de TMGA en excès dans l'acétonitrile anhydre pendant 1 heure 30 minutes à 60°C.²⁶⁹ Des lavages successifs avec de l'acétonitrile, une solution de bisulfite de sodium et du dichlorométhane sont ensuite effectués afin d'éliminer toutes traces résiduelles d'iode ainsi que d'excès de réactif. Cette méthode de fonctionnalisation d'oligonucléotides possède de nombreux avantages. Premièrement, elle est modulable car la modification chimique peut être effectuée sur n'importe quel nucléoside et permet de s'affranchir de la synthèse d'un nucléoside modifié. Deuxièmement, elle est peu onéreuse car bien qu'un large excès de réactif soit utilisé, la réaction est réalisée sur 1 μmol de substrat, impliquant ainsi l'utilisation de faibles quantités. Troisièmement, il s'agit d'une réaction simple, ne nécessitant qu'un lavage pour éliminer l'excès de réactif, et rapide puisqu'elle varie de quelques minutes à une heure et demie. De plus, les réactions peuvent être automatisées en ajoutant les étapes correspondantes dans le cycle de synthèse. Quatrièmement, la purification des oligonucléotides synthétisés par HPLC en phase inverse est relativement simple à mettre en œuvre.

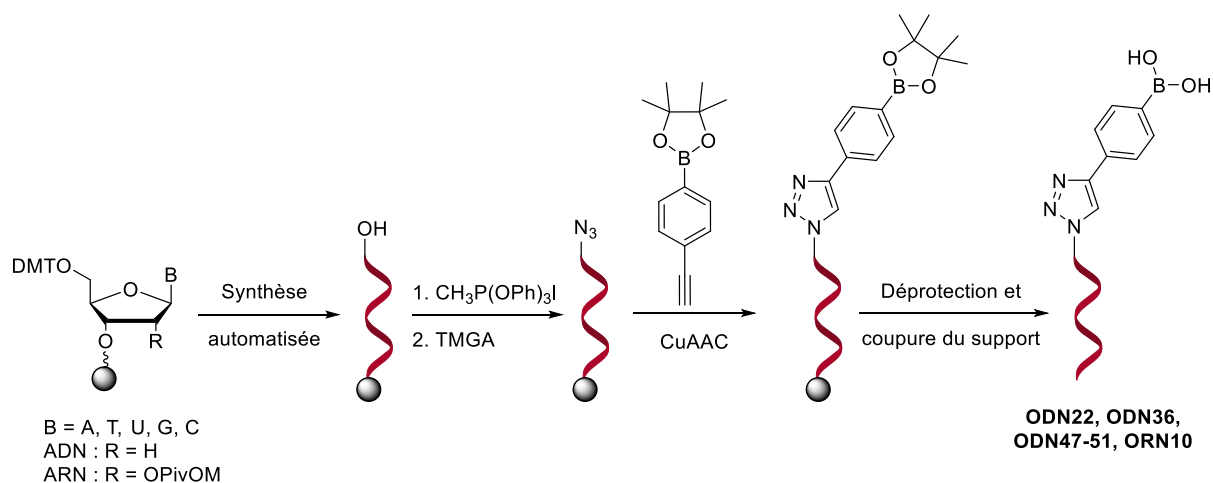


Figure 108 : Schéma de synthèse pour fonctionnaliser l'extrémité 5' par CuAAC.

Après fonctionnalisation de l'extrémité 5' de la séquence d'oligonucléotides modifiée par une fonction azoture, la réaction de CuAAC a dans un premier temps été réalisée avec l'acide 2-(4-éthynylphényl)boronique non protégé en présence du ligand THAP, de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et d'ascorbate de sodium dans un mélange eau/acétonitrile. Les solutions contenant les différents réactifs sont toutes préalablement dégazées avec un ballon d'argon pendant 5 minutes afin d'éliminer toutes traces d'air ou d'oxygène pouvant oxyder le cuivre (I) en cuivre (II). Les solutions aqueuses contenant le cuivre (II) et l'ascorbate de sodium sont mélangées au dernier moment afin de générer le plus tardivement possible l'espèce active Cu(I). Les différentes solutions contenant le réactif, le ligand et le système catalytique sont introduites les unes après les autres dans la colonne contenant l'oligonucléotide puis celle-ci est bouchée de chaque côté et placée sur un agitateur dans une étuve à 60°C pendant une 1 heure 30 minutes. La colonne est ensuite rincée avec une solution aqueuse d'EDTA afin d'éliminer toutes traces de cuivre résiduelle puis avec de l'acétonitrile. Les billes sont traitées avec une solution d'ammoniaque concentré pendant 5 heures à 50°C afin de déprotéger tous les groupements et de couper l'oligonucléotide du support. L'**ODN46** résultant a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le pic obtenu à $m/z = 1291,82$ Da ne correspond pas au dérivé comportant l'acide boronique attendu mais au produit issu de la réaction d'oxydation (m/z calculée = $1291,94$ Da ; Figure 109A). Cela confirme ainsi l'hypothèse que les acides boroniques sont facilement dégradés en présence de sels de cuivre. La même réaction a par la suite été réalisée en remplaçant l'acide 2-(4-éthynylphényl)boronique par l'ester 2-(4-éthynylphényl)-pinacolborane et cette fois-ci deux pics à $m/z = 1318,91$ et $1475,12$ Da sont obtenus (**ODN47**, Figure 109B). Ces masses correspondent respectivement à la masse attendue pour le dérivé comportant l'acide boronique (m/z calculée pour $[\text{M}-\text{H}]^- = 1318,75$ Da) et à l'adduit avec le citrate d'ammonium utilisé en tant que co-matrice (m/z calculée pour $[\text{M}+\text{citrate}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^- = 1475,85$ Da). Ce type d'adduit est classiquement observé dans le cas des séquences d'oligonucléotides modifiés par des acides boroniques.^{10,138,295} L'**ODN47** fonctionnalisé par un acide boronique à l'extrémité 5' a ainsi été synthétisé avec une conversion de 93 % d'après le spectre HPLC, ce qui est comparable aux résultats reportés dans la littérature avec la réaction de SPAAC.¹³⁸ Après purification par HPLC préparative en phase inverse, l'**ODN47** a été obtenu avec un rendement isolé de 35 % (Tableau 4).

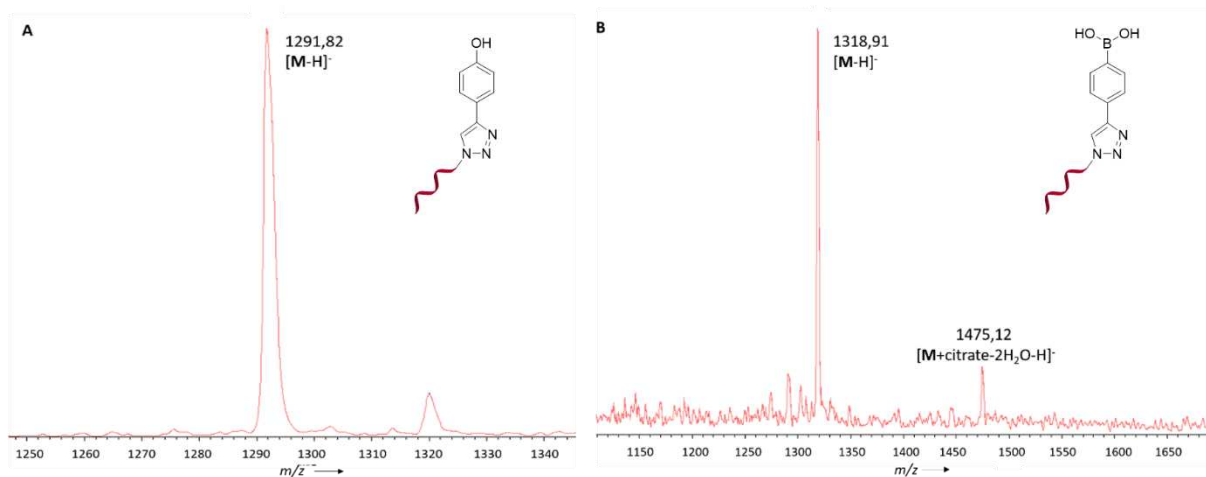


Figure 109 : Spectres MALDI-TOF obtenus pour (A) ODN46 et (B) ODN47.

Encouragés par ces résultats prometteurs, l'efficacité de cette méthode a été évaluée sur différentes séquences d'ADN dont (i) la longueur, (ii) la nature du résidu à l'extrémité 5' des séquences et (iii) la nature de l'oligonucléotide (série ADN ou ARN) ont été successivement modifiées (Tableau 4). Les séquences ont été choisies à partir des séquences utilisées pour la synthèse de split DNazymes dans le Chapitre 2 et la réaction de CuAAC a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

Tableau 4 : Incorporation d'acides boroniques par CuAAC au sein de séquences d'ADN et d'ARN.

Entrée	Nom	Séquence (5' vers 3')	Conversion (%)	Rendement isolé (nmol, %)
1	ODN47	TrPh^{Bn}-d(TCCG)	93	348,6 (35)
2	ODN36	TrPh^{Bn}-d(TCTCCG)	95	145,8 (15)
3	ODN48	TrPh^{Bn}-d(TCTCTCCG)	93	148,7 (15)
4	ODN22	TrPh^{Bn}-d(TACAACGACTCTCTCCG)	55	77,1 (8)
5	ODN49	TrPh^{Bn}-d(CCG)	95	98,9 (10)
6	ODN50	TrPh^{Bn}-d(CTCCG)	95	141,5 (14)
7	ODN51	TrPh^{Bn}-d(CTCTCCG)	97	61,5 (6)
8	ORN10	TrPh^{Bn}-r(UCUCCA)	90	200,7 (20)

(i) *Impact de la longueur de l'oligonucléotide*

La réaction de CuAAC a été effectuée en présence de séquences d'oligonucléotides modifiées par une fonction azoture à l'extrémité 5' de différentes longueurs (Tableau 4, entrées 1 à 4). Dans le cas d'une courte séquence, à savoir composée de seulement quatre bases (**ODN47**), la

réaction est très efficace car une conversion de 93% et un rendement isolé de 35 % sont observés. Lorsque deux (**ODN36**) ou quatre nucléotides (**ODN48**) sont ajoutés à la séquence, des conversions similaires sont obtenues (95 et 93% respectivement), mais le rendement isolé chute à 15 %. Enfin, la réaction de CuAAC effectuée sur une séquence plus longue (17 nucléotides, **ODN22**) résulte en une diminution significative de la conversion (55 %) ainsi que du rendement isolé (8 %). Cette diminution d'efficacité lorsque la longueur de la séquence d'oligonucléotides augmente est probablement due à des repliements du brin qui rendent l'accès à la fonction azoture plus difficile.

(ii) *Impact de la nature des résidus à l'extrémité 5'*

Le résidu thymidine à l'extrémité 5' de plusieurs séquences d'oligonucléotides de différentes longueurs a été remplacé par une cytidine (Tableau 4, entrées 5 à 7). L'introduction de la fonction azoture en position 5' de la cytidine présente à l'extrémité 5' selon la méthode développée par Kool et Miller²⁶⁹ a permis d'obtenir les séquences d'oligonucléotides modifiées avec des conversions supérieures à 95 %. Un rendement isolé de 14 % est observé pour la séquence de 5 nucléotides (**ODN50**), ce qui est proche de celui précédemment obtenu avec la séquence de 6 nucléotides **ODN36** comprenant une thymidine à l'extrémité 5'. Les séquences **ODN49** et **ODN51** de 3 et 7 nucléotides respectivement présentent un rendement isolé inférieur comparé à celui obtenu pour les séquences similaires **ODN47** et **ODN48** possédant une 5'-thymidine. Les raisons d'une telle différence n'ont pour l'instant pas été élucidées et une répétition de ces expériences devra être menée pour confirmer ou infirmer ces résultats.

(iii) *Impact de la nature de l'oligonucléotide*

La méthode a été étendue à une séquence d'ARN dont les hydroxyles en position 2' sont protégés par des groupements PivOM. L'utilisation de ce groupement protecteur permet de s'affranchir des réactions de dégradations observées avec les groupements silylés de type TBDMS et facilite grandement les purifications des oligonucléotides.³¹⁶ La séquence d'ARN modifiée par un acide boronique **ORN10** a ainsi été obtenue avec une conversion de 90 % et un rendement isolé de 20 % (Tableau 4, entrée 8). Ce résultat est du même ordre de grandeur que la séquence d'ADN similaire **ODN36** précédemment synthétisée. La nature de l'oligonucléotide n'a donc aucun impact sur l'efficacité de la réaction. Warminski *et al.* ont également appliqué cette méthode aux acides ribonucléiques afin de les fonctionnaliser avec différents partenaires alcynes tels que la fluorescéine (FAM) et une riboguanosine coiffée ($G_{\text{coiffé}}$, Figure 110).³¹⁶ Pour cela, les auteurs ont fonctionnalisé l'extrémité 5' par une fonction

azoture et, après déprotection et purification, l'oligonucléotide est couplé avec le partenaire alcyne par réaction de CuAAC. En comparant leurs résultats avec ceux obtenus pour l'ORN10, les conversions issues des spectres HPLC sont similaires. Les rendements isolés sont également cohérents car, de la même façon que les différentes séquences d'oligonucléotides modifiées à base d'ADN, les auteurs observent une diminution du rendement lorsque la taille de la séquence augmente. En effet, un rendement isolé de 20 % est obtenu pour l'ORN10, comportant 6 nucléotides, tandis qu'il diminue à 11 % et à 2 % dans le cas de séquences de 9 et 21 nucléotides respectivement.

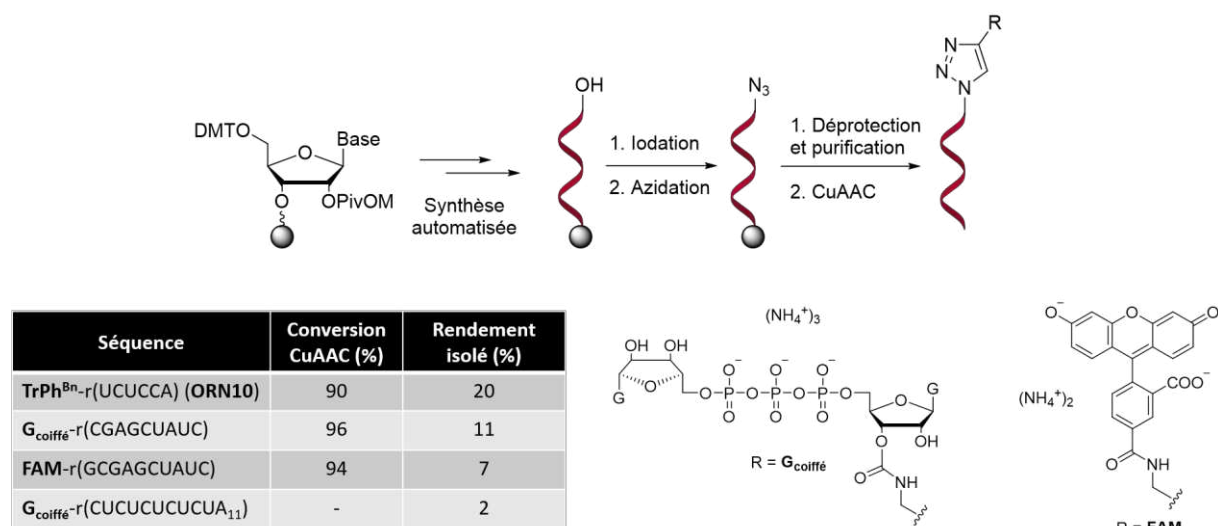


Figure 110 : Fonctionnalisation de l'extrémité 5' par un azoture puis conjugaison avec un partenaire alcyne.³¹⁶

Ces différentes études ont donc démontré la possibilité d'incorporer un acide boronique à l'extrémité 5' d'un brin d'ADN ou d'ARN par réaction de CuAAC peu importe la longueur de la séquence ou la nature des nucléotides qui la composent. Les rendements isolés obtenus avec cette méthode pour les séquences d'ADN et d'ARN testées sont toutefois inférieurs à ceux obtenus lors de synthèses classiques d'oligonucléotides non modifiés, généralement compris autour de 40-50 %. Cette diminution peut s'expliquer par le fait qu'ils aient été calculés à partir de 1 μmol après la synthèse automatisée de la séquence, les trois étapes de réaction, la déprotection et la purification par HPLC préparative en phase inverse. De plus, les rendements isolés obtenus restent très largement supérieurs au rendement minimum fourni par les principaux fournisseurs d'oligonucléotides. En effet, pour une synthèse à une échelle de 1 μmol d'une séquence d'oligonucléotides modifiée d'une longueur de 10 à 19 bases, les fournisseurs garantissent généralement moins de 50 nmol après purification par HPLC en phase inverse or

cette méthode permet d'obtenir en moyenne 158 nmol.³¹⁷ Ainsi, cette méthode développée pour introduire un acide boronique à l'extrémité d'acides nucléiques est donc simple à mettre en œuvre, efficace et modulable.

3.2.2 Incorporation d'une fonction acide boronique en position 2'

Pour augmenter le champ d'applications de ces oligonucléotides modifiés, une seconde méthode permettant d'introduire un acide boronique à l'intérieur d'une séquence donnée a été développée. Pour cela, les séquences d'oligonucléotides sont synthétisées en incorporant le phosphoramidite commercial 2'-O-propargyluridine à différents endroits de séquences d'ADN ou d'ARN par synthèse automatisée (Figure 111).

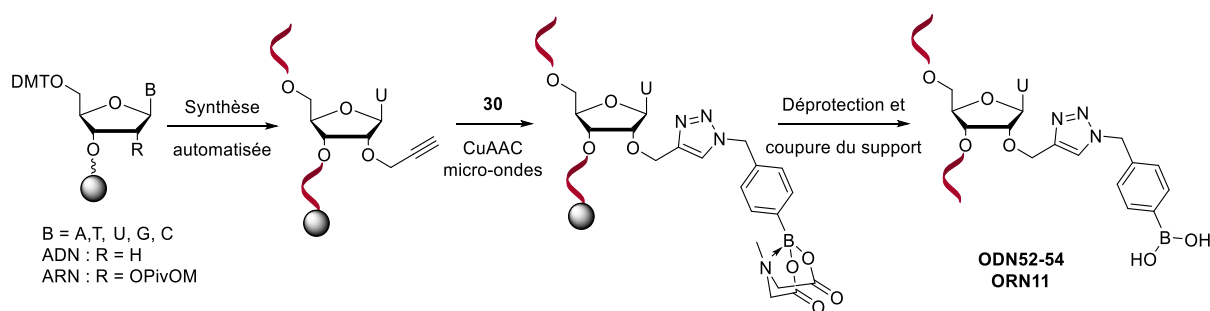


Figure 111 : Schéma de synthèse pour fonctionnaliser les oligonucléotides en position 2' par CuAAC.

Cette méthode nécessite la synthèse en deux étapes du partenaire azoture **30** contenant l'acide boronique (Figure 112). L'acide 4-(hydroxyméthyl)phénylboronique commercial est d'abord protégé par un groupement MIDA pour conduire au composé **29** avec un rendement de 98 %. Le groupement MIDA a été préféré au groupement pinacol afin d'améliorer la stabilité de l'ester boronate grâce à la complexation du doublet non liant de l'atome d'azote dans l'orbitale p vacante du bore. La fonctionnalisation par une fonction azoture est ensuite réalisée en utilisant l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) et la DBU dans le DMF.³¹⁸ La base permet de déprotoner l'hydroxyle qui peut ensuite réagir avec le DPPA pour former un intermédiaire phosphate. L'azoture est ensuite introduit par substitution nucléophile bimoléculaire pour conduire au composé **30** avec un rendement de 89 %. L'utilisation d'une base en présence de DPPA permet de s'affranchir des réactions secondaires de type substitution nucléophile monomoléculaire ou β -élimination classiquement observées lors des réactions de Mitsunobu conduisant à un mélange des deux énantiomères ou à la formation d'oléfine.^{318,319}

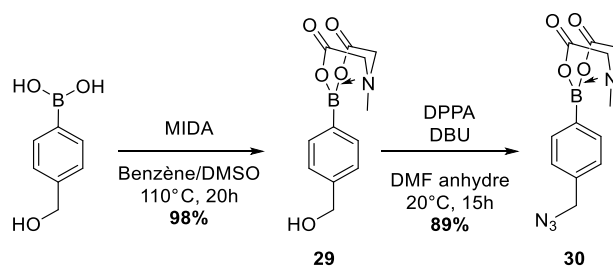


Figure 112 : Synthèse du partenaire azoture **30**.

La réaction de CuAAC a ensuite été réalisée en présence du ligand THAP et du système catalytique $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /ascorbate de sodium dans un mélange eau/acétonitrile pendant 1 heure 30 minutes à 60°C entre le partenaire azoture **30** et l'ODN52, pour lequel le phosphoramidite 2'-*O*-propargyluridine a été incorporé à l'extrémité 5' de la séquence d'ADN (Tableau 5, entrée 1). Cependant, aucun motif triazole n'est formé, même en augmentant le temps de réaction. La présence de l'alcyne en position 2' pourrait compliquer l'accès et de fait limiter la réaction. Une irradiation aux micro-ondes a été par la suite réalisée et, après 1 heure 30 minutes à 60°C en présence de 8 équivalents du partenaire azoture **30**, le spectre MALDI-TOF démontre la présence d'un pic correspondant à l'oligonucléotide comportant l'acide boronique. Cependant, la conversion déterminée à partir de l'analyse du spectre MALDI-TOF est faible car seulement 40 % de modification de la séquence sont observés. Basé sur l'expertise du laboratoire,³⁰⁶ l'acétonitrile a été remplacé par du dioxane, tout en conservant une faible quantité d'acétonitrile pour des raisons de solubilité. La conversion obtenue après 1 heure 30 minutes augmente alors jusqu'à 70 % (Tableau 5, entrée 3). La différence de conversion peut s'expliquer par la polarité des solvants utilisés. En effet, les solvants polaires tels que l'acétonitrile interagissent avec les micro-ondes et l'énergie n'est transférée aux réactifs que dans un second temps tandis que les solvants apolaires tels que le dioxane sont inactifs face aux ondes électromagnétiques. Les réactifs absorbent ainsi directement l'énergie, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction. Afin d'améliorer l'efficacité de la réaction, le temps de réaction ainsi que la quantité du réactif azoture ont été respectivement augmentés à 2 heures et 15 équivalents. La conversion obtenue d'après le chromatogramme HPLC brut est alors de 96 % (Tableau 5, entrée 4). Par conséquent, ces conditions sont retenues pour les réactions suivantes.

Tableau 5 : Conditions testées pour la réaction de CuAAC avec **ODN52**.

Entrée	Méthode	T (°C)	Temps (h)	Équivalents d'azoture	Solvant	Conversion (%)
1	Classique	60	1,5	8	ACN/eau	0
2	Micro-ondes	60	1,5	8	ACN/eau	40
3	Micro-ondes	60	1,5	8	ACN/Dioxane/eau	70
4	Micro-ondes	60	2	15	ACN/Dioxane/eau	96

Différentes séquences ont par la suite été synthétisées afin d'évaluer l'impact de (i) la position de l'alcyne dans la séquence, (ii) la nature de l'oligonucléotide (série ADN ou ARN) et (iii) la longueur de la séquence (Tableau 6). Le choix des séquences est basé sur une séquence couramment utilisée au laboratoire pour la fonctionnalisation d'oligonucléotides par réaction de CuAAC.³⁰⁶ De plus, l'interaction forte entre les acides boroniques et les glucides a été exploitée à travers la séquence de l'aptamère à tobramycine **ODN54**, un antibiotique aminoglycoside.^{320–323}

Tableau 6 : Incorporation d'acides boroniques par CuAAC au sein de séquences d'ADN et d'ARN.

Entrée	Nom	Séquence (5' vers 3')	Conversion (%)	Rendement isolé (nmol, %)
1	ODN52	U ^{PhBn} d(CCAGCTGACCG)	95	236,6 (24)
2	ODN53	d(GCCAGCU ^{PhBn} GACCG)	66	111,6 (11)
3	ORN11	r(U ^{PhBn} CCAGCUGACCA)	69	86,0 (9)
4	ODN54	d(ACTTGGTTU ^{PhBn} AGGTAATGAGT)	48	70,5 (7)

(i) *Impact de la position de l'alcyne dans la séquence*

Dans un premier temps, l'efficacité de la réaction de CuAAC a été évaluée sur deux séquences d'oligonucléotides comportant une fonction alcyne à l'extrémité 5' et à l'intérieur de la séquence (Tableau 6, entrées 1 et 2). L'introduction de l'acide boronique par réaction de CuAAC au milieu de la séquence (**ODN53**) est moins efficace qu'à l'extrémité 5' (**ODN52**). En effet, **ODN53** est obtenu avec une conversion de seulement 66 % après analyse du chromatogramme HPLC et avec un rendement isolé de 11 % après purification, contre 95 % et 24 % respectivement pour **ODN52**. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique généré autour de la fonction alcyne en milieu de séquence, rendant l'approche du partenaire azoture

plus difficile. Toutefois, le rendement isolé reste supérieur à celui garanti par les principaux fournisseurs d'oligonucléotides.

(ii) *Impact de la nature de l'oligonucléotide*

La réaction de CuAAC a par la suite été étudiée en présence de l'ARN **ORN11** dont les hydroxyles en position 2' sont protégés par des groupements PivOM et comportant une fonction alcyne à l'extrémité 5' (Tableau 6, entrée 3). L'incorporation de l'acide boronique est obtenue avec une conversion de seulement 69 %, soit de façon nettement moins efficace par rapport à la séquence d'ADN précédemment synthétisée (**ODN52**). De plus, un rendement isolé faible de 9 % est observé après purification. La différence de rendements pourrait provenir d'une approche plus difficile du partenaire azoture **30** dans le cas des séquences d'ARN. De plus, l'ARN est plus sensible aux dégradations, notamment à la coupure et à la migration des liens internucléosidiques.

(iii) *Impact de la longueur de l'oligonucléotide*

Cette méthode a été appliquée à une séquence de 20 nucléotides correspondant à l'aptamère à tobramycine (**ODN54**, Tableau 6, entrée 4).^{320,321} L'introduction d'un acide boronique au sein de la séquence d'oligonucléotide **ODN54** pourrait améliorer son affinité vis-à-vis de la tobramycine grâce à la formation d'une liaison covalente entre cette dernière et l'acide boronique, couplée aux différentes liaisons hydrogène d'ores et déjà présentes entre la cible et les nucléobases (Figure 113). Cette amélioration de l'affinité a par ailleurs été démontrée dans le cas de l'aptamère à épinéphrine.²⁹⁶ Ainsi, malgré la longueur de la séquence et la position du site de fonctionnalisation, le partenaire azoture **30** a pu être introduit avec une conversion de 48 % et un rendement isolé de 7 %. Une augmentation du temps de réaction à 3 heures ainsi qu'un large excès de **30** ont toutefois été nécessaires. Cette observation est cohérente avec les résultats reportés dans le cas de la première méthode, pour laquelle l'efficacité de la réaction diminue lorsque la longueur de la séquence d'oligonucléotides augmente. La méthode de borylation par CuAAC a permis de synthétiser un nouvel aptamère modifié de la tobramycine. Des études plus approfondies, notamment en termes d'affinité envers la cible devront être menées pour démontrer l'effet synergique apporté par l'acide boronique dans la détection de la molécule cible.

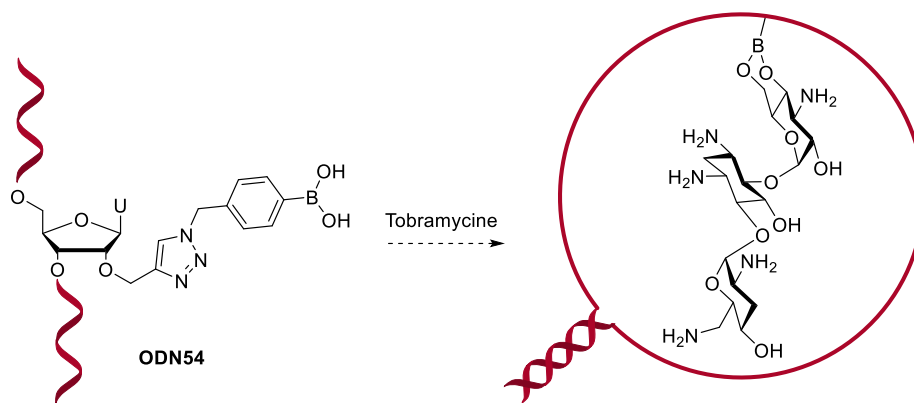


Figure 113 : Liaison entre l'aptamère à tobramycine modifié par un acide boronique et la molécule cible.

Bien que la présence de l'acide boronique au sein des différentes séquences a été démontrée par spectrométrie de masse MALDI-TOF, une méthode de détection par colorimétrie, développée par Springsteen et Wang et basée sur la formation d'une liaison ester boronate, a également été utilisée pour confirmer les résultats obtenus (Figure 114).³²⁴ Pour cela, un dérivé *cis*-diol coloré, l'Alizarine Red S (ARS), est d'abord dilué dans un mélange tampon phosphate salin (pH 7,7)/DMSO (60/40), ce qui donne une coloration violette à la solution. Comme précédemment explicité au cours de ce manuscrit, un pH autour de 8 favorise la formation de l'anion hydroxyboronate et de fait l'ester boronate. À l'inverse, un pH trop acide entraîne la dissociation de cette liaison. Un oligonucléotide supposément modifié par un acide boronique est ensuite ajouté. Le changement de couleur de la solution en jaune est caractéristique d'une modification des propriétés de l'ARS due à la suppression des deux hydroxyles et de fait la formation de l'ester boronate. Un très large excès de fructose permet de dissocier le système ODN-ARS au profit de ODN-fructose grâce à la meilleure affinité de l'acide boronique vis-à-vis des glucides et la couleur de la solution redevient violette. Ce changement de couleur très rapide, de l'ordre de la minute, visible à l'œil nu permet ainsi de démontrer très rapidement la présence de l'acide boronique au sein de la séquence.

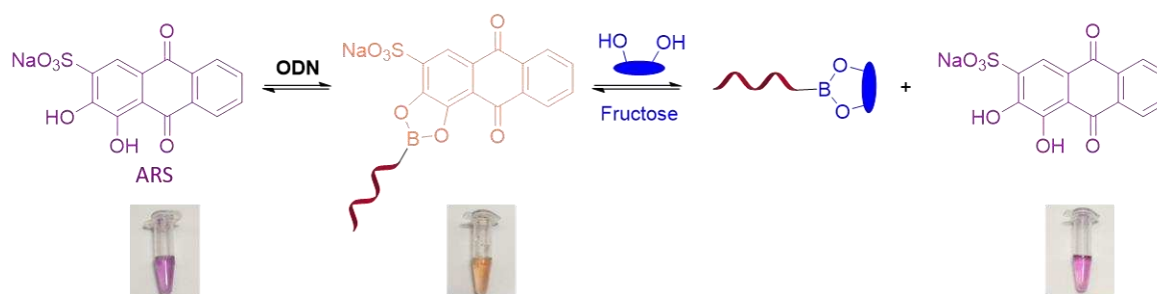


Figure 114 : Principe de détection d'acide boronique à l'œil nu.

Ces différentes études mettent en lumière le développement de deux méthodes simples et efficaces pour introduire un acide boronique à l'extrémité 5' ou au sein de séquences d'ADN et d'ARN par réaction de CuAAC. Ces travaux ont par ailleurs fait l'objet d'une publication.²⁷⁰ Dans le but d'étendre le champ d'applications, deux nouvelles méthodes permettant d'incorporer un acide boronique par hydroboration d'alcènes ou d'alcynes ont ensuite été étudiées.

3.3 Hydroboration d'alcènes et alcynes

Découverte par le Pr. Brown en 1957,³²⁵ récompensé pour ses travaux par le Prix Nobel de chimie en 1979 partagé par ailleurs avec le Pr. Wittig, la réaction d'hydroboration a été largement étudiée car elle permet de transformer un alcène en alcool grâce à l'utilisation d'un borane (Figure 115A). Cette addition *syn* dirigée par des effets stériques implique la liaison du bore sur le carbone le moins substitué. L'atome de bore subit par la suite une attaque nucléophile par un anion hydroperoxyde, provoquant la migration du groupement alkyle R' vers l'atome d'oxygène pour former un ester borinique. Cette réaction est répétée trois fois, soit pour chaque groupement alkyle R ou R', puis l'alcool est obtenu par hydrolyse. De la même façon, l'hydroboration peut être réalisée à partir d'un alcyne et, après oxydation et hydrolyse, conduit à la formation d'une cétone ou d'un aldéhyde dans le cas d'un alcyne vrai par tautomérisation (Figure 115B).³²⁶

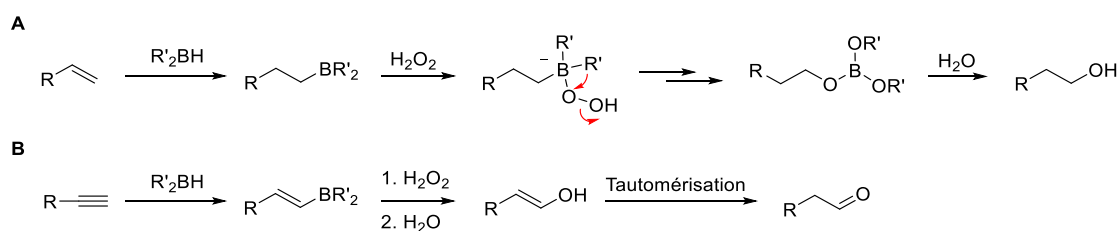


Figure 115 : Schéma réactionnel général de l'hydroboration (**A**) d'alcène ou (**B**) d'alcyne.

Sur la base de cette réactivité nous avons étudié l'introduction d'un borane sur des séquences d'acides nucléiques supportées (CPG) et modifiées en leur extrémité 5' par une fonction alcène. L'optimisation de la réaction a été réalisée à partir d'une séquence composée de 3 thymidines TTT auquel nous avons ajouté un phosphoramidite butène à l'extrémité 5'. La réaction d'hydroboration a également été appliquée aux acides nucléiques contenant un alcyne vrai pour introduire un acide boronique vinylique puis un aldéhyde après oxydation au sein des séquences d'acides nucléiques. L'introduction d'aldéhydes au sein d'acides nucléiques est très intéressante car cela permet d'effectuer par la suite des réactions de conjugaison notamment à

travers la formation d'une fonction oxime ou hydrazone.

3.3.1 Hydroboration d'alcènes

L'optimisation de la réaction d'hydroboration d'alcènes a été réalisée à travers l'introduction d'un phosphoramidite synthétisé à partir du 3-butèn-1-ol en présence de 2-cyanoéthyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite et de DIEA dans le dichlorométhane anhydre (Figure 116). Le phosphoramidite modifié comportant une fonction alcène **31** a été obtenu avec un rendement de 79 % et a ensuite été introduit à l'extrémité 5' de la séquence TTT par synthèse automatisée en utilisant la chimie classique des phosphoramidites (Figure 71, page 78) pour conduire à l'oligonucléotide modifié **ODN55**.

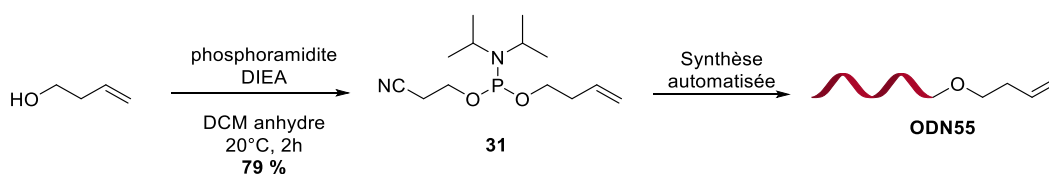


Figure 116 : Phosphitylation du 3-buten-1-ol et synthèse de l'oligonucléotide modifié **ODN55**.

L'acide boronique étant sensible aux réactions d'oxydation (page 59), l'oligonucléotide contrôle **ODN56** correspondant au produit oxydé a également été synthétisé afin de comparer par spectrométrie de masse MALDI-TOF et HPLC les séquences obtenues. Pour cela, le 1,4-butanediol est monotritylé par l'utilisation de DMTCI en défaut pour conduire au composé **32** avec un rendement de 57 % (Figure 117). Le rendement est faible car une partie du 1,4-butanediol a été tritylée aux deux extrémités étant donné la réactivité identique des deux hydroxyles. Le composé **32** a ensuite été phosphitylé en présence de 2-cyanoéthyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite et de DIEA dans le dichlorométhane anhydre pour conduire au phosphoramidite **33** avec un rendement de 45 %.

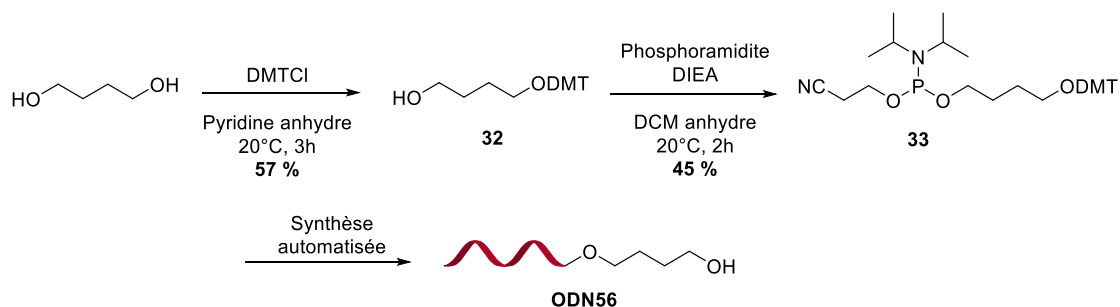


Figure 117 : Synthèse du phosphoramidite **33** et synthèse de l'oligonucléotide **ODN56**.

Les conditions réactionnelles d'hydroboration de **ODN55** ont ensuite été évaluées (Figure 118).

Pour cela, différents paramètres ont été testés, à savoir : (i) le réactif borane, (ii) le solvant de réaction, (iii) la température, la quantité des réactifs et le temps de réaction, (iv) les conditions de déprotection de la séquence d'oligonucléotides et enfin (v) les conditions utilisées lors de la synthèse automatisée.

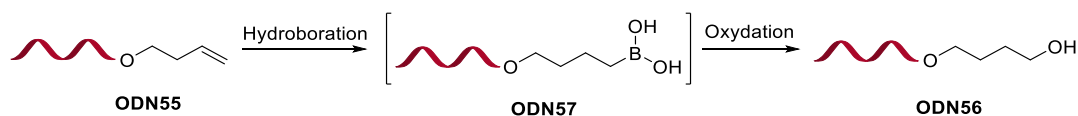


Figure 118 : Schéma réactionnel de l'hydroboration d'ODN55.

(i) Modification du réactif borane

Dans un premier temps, la réactivité des boranes présentés en Figure 119 a été évaluée à partir de conditions classiquement utilisées en solution. Le bis(pinacolato)diborane (B_2pin_2) a été choisi pour sa bonne stabilité en présence d'air ou d'eau³²⁷ puis le pinacolborane (Bpin)³²⁸ et le catécholborane (Bcat)³²⁹ pour leur excellente régio- et stéréosélectivité. Le diméthylsulfure de borane ($BH_3 \cdot SMe_2$) et le complexe borane-tétrahydrofurane ($BH_3 \cdot THF$) ont ensuite été sélectionnés pour leur bonne réactivité.³³⁰ Enfin, le complexe diisopinocampérylborane-*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine ($(IpcBH_2)_2 \cdot TMEDA$) a été choisi pour sa chiralité et sa bonne réactivité^{331,332} et le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) pour sa plus grande stabilité envers les réactions d'oxydations.³³³

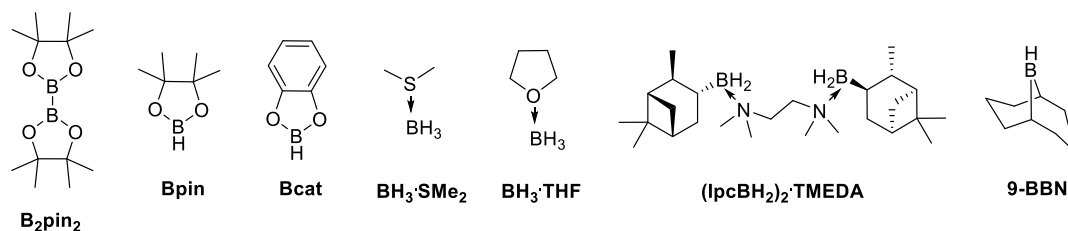


Figure 119 : Structure des différents boranes utilisés pour l'hydroboration d'alcène.

Les réactions ont été effectuées dans des conditions identiques en présence de chaque borane, majoritairement dans le THF car il s'agit du solvant couramment utilisé pour ce type de réaction, afin de déterminer parmi ces différentes structures laquelle présente la meilleure réactivité. Pour cela, 0,5 μ moles de l'ODN55 sont placées dans un Eppendorf suivies du solvant et d'un large excès de borane (500 équivalents). La solution est ensuite agitée dans un thermoshaker entre 20 et 36 heures à 50°C, puis les billes sont filtrées et l'oligonucléotide est déprotégé par une solution d'ammoniaque concentré. Enfin, l'oligonucléotide est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Tableau 7). La réaction a tout d'abord été effectuée avec

le B₂pin₂ en présence d'un catalyseur, le tetrakis(triphénylphosphine)palladium (Pd(PPh₃)₄), dans le DMF, solvant généralement utilisé pour ce type de borane (Tableau 7, entrée 1).³²⁷ Dans ce cas, la présence du catalyseur est nécessaire pour activer la double liaison et favoriser l'addition du borane de façon régiosélective.³³⁴ Cependant, après 36 heures à 60°C, seul le pic à $m/z = 982,69$ Da correspondant au produit de départ est observé (m/z calculée pour [M-H]⁻ = 982,67 Da). La réaction a ensuite été testée avec le pinacolborane dans le dichloroéthane (DCE) pendant 20 heures à 50°C mais sans succès (Tableau 7, entrée 2).³²⁸ Le même résultat est obtenu avec l'utilisation des complexes BH₃•SMe₂ et BH₃•THF en solution dans le THF après 20 heures de réaction à 50°C (Tableau 7, entrées 3 et 4). En revanche, le 9-BBN en solution dans le THF ou le complexe (IpcBH₂)₂•TMEDA dans les mêmes conditions conduisent à l'apparition d'un nouveau pic à $m/z = 1000,32$ Da qui ne correspond ni au réactif initial ni au produit attendu **ODN57** porteur de l'acide boronique (m/z calculée pour [M-H]⁻ = 1028,50 Da ; Tableau 7, entrées 5 et 6). En comparant les chromatogrammes HPLC et spectres MALDI-TOF avec ceux du produit d'oxydation **ODN56** (m/z calculée pour [M-H]⁻ = 1000,69 Da), nous observons que les données sont similaires. Ces conditions de réaction conduisent donc directement à l'alcool et non à l'acide boronique. De plus, les conversions du produit d'oxydation sont seulement de 40 % et de 55 % dans le cas du 9-BBN et du complexe (IpcBH₂)₂•TMEDA, respectivement. Une réaction de contrôle a été réalisée en plaçant **ODN55** dans les mêmes conditions de réaction sans réactif borane afin de démontrer qu'il ne s'agit d'une réaction d'hydratation de l'alcène (Tableau 7, entrée 7). Les conditions utilisées pour ces réactions sont donc responsables de l'oxydation de l'acide boronique. La réaction a ensuite été effectuée en présence de catécholborane en solution dans le THF (1 M) et le spectre MALDI-TOF démontre que la quasi-totalité de l'**ODN55** a été dégradé en produit d'oxydation car 97 % de conversion sont observés sur le chromatogramme HPLC (Tableau 7, entrée 8). L'utilisation du réactif borane commercial en solution, renfermant possiblement des oxydants, pourrait être responsable de l'oxydation non désirée de l'acide boronique. La réaction a donc été réalisée avec le catécholborane non dilué mais le signal observé sur le spectre MALDI-TOF correspond également au produit oxydé (Tableau 7, entrée 9). Toutefois, ce réactif semble être le plus efficace en regard de la conversion totale observée sur le spectre MALDI-TOF. Le catécholborane non dilué a donc été préféré et conservé comme réactif borane pour la suite de l'optimisation de la réaction d'hydroboration.

Tableau 7 : Différents réactifs testés pour l'hydroboration de l'ODN55.

Entrée	Borane	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Conversion en alcool (%)
1	B ₂ pin ₂ – Pd(PPh ₃) ₄	DMF	60	36	0
2	Bpin	DCE	50	20	0
3	BH ₃ •SMe ₂	THF	50	20	0
4	BH ₃ •THF	THF	50	20	0
5	9-BBN (solution)	THF	50	20	40
6	Ipc ₂ (BH ₂) ₂ •TMEDA	THF	50	20	55
7	-	THF	50	20	0
8	Bcat (1 M)	THF	50	20	97
9	Bcat non dilué	THF	50	20	100

(ii) Modification du solvant de réaction

Bien que le THF soit le solvant le plus couramment utilisé, la réaction d'hydroboration en présence de catécholborane non dilué a été effectuée dans différents solvants afin d'évaluer leur influence (Tableau 8). La réaction a d'abord été réalisée dans des solvants plus polaires que le THF et aprotiques tels que le dichlorométhane et l'acétonitrile anhydre mais les produits obtenus correspondent en majorité au produit d'oxydation (Tableau 8, entrées 2 et 3). De plus, les réactions ne sont pas totales car seulement 40 à 45 % de conversion en alcool sont observés. Le THF anhydre a ensuite été distillé afin de s'affranchir des traces de peroxydes et oxydants éventuellement présents dans les solvants anhydres commerciaux mais sans succès (Tableau 8, entrée 4). Le solvant anhydre a ensuite été dégazé par un flux d'argon pendant 5 minutes afin d'éliminer toutes traces d'air et d'oxygène mais n'a malheureusement pas permis de favoriser la formation de l'acide boronique par rapport à l'alcool (Tableau 8, entrée 5). Enfin, la réaction a été testée sans solvant mais encore une fois le produit majoritaire correspond à l'alcool avec une conversion de 70 % (Tableau 8, entrée 6). Le solvant n'est donc pas responsable de la réaction d'oxydation de l'acide boronique. Le THF anhydre dégazé a toutefois été conservé pour la suite de l'optimisation afin de s'affranchir de toute trace d'oxygène présente en solution.

Tableau 8 : Différents solvants testés pour l'hydroboration de l'**ODN55** avec le catécholborane.

Entrée	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Conversion en alcool (%)
1	THF commercial	50	20	100
2	DCM	50	20	40
3	ACN	50	20	45
4	THF distillé	50	20	100
5	THF dégazé	50	20	100
6	-	50	20	70

(iii) Modification de la température, de la quantité de catécholborane et du temps de réaction

La température élevée pouvant accélérer la cinétique de la réaction d'oxydation, celle-ci a ensuite été diminuée à 20°C (Tableau 9, entrée 1). Toutefois, elle ne semble pas avoir d'effet car le spectre MALDI-TOF du produit obtenu correspond à l'alcool. L'excès de catécholborane a ensuite été diminué de 500 équivalents à 300 et 100 mais seule une diminution de la conversion en produit d'oxydation et donc de l'efficacité de la réaction est observée (Tableau 9, entrées 2 et 3). En effet, 300 équivalents de réactif borane conduisent à une conversion acceptable de 95 %, mais seulement 60 % d'alcènes sont convertis en alcool en présence de 100 équivalents. Le temps de réaction, initialement de 20 heures, a été par la suite diminué progressivement jusqu'à 30 minutes pour étudier la cinétique de réaction et évaluer le temps à partir duquel l'acide boronique est oxydé (Tableau 9, entrées 4 à 8). Cependant, de la même façon que pour le nombre d'équivalents de réactif borane, cette diminution se traduit uniquement par une baisse de la conversion et donc de l'efficacité de la réaction. Une diminution du temps d'un facteur 4 provoque une légère diminution de la conversion puisque 95 % d'alcool sont obtenus. En revanche, 1 heure de réaction entraîne une diminution de la conversion d'un facteur 2 qui se poursuit également pour un temps de réaction de 30 minutes (40 % de conversion). Le but étant dans un premier temps de déterminer les conditions nécessaires à l'obtention de l'acide boronique et bien que la conversion ne soit pas optimale, les réactions réalisées pour la suite de l'optimisation ont été effectuées en 1 heure à 20°C avec 500 équivalents de catécholborane.

Tableau 9 : Différentes conditions testées pour l'hydroboration d'**ODN55** avec le catécholborane.

Entrée	Équivalents de borane	Température (°C)	Temps (h)	Conversion en alcool (%)
1	500	20	20	100
2	300	20	20	95
3	100	20	20	60
4	500	20	5	95
5	500	20	3	90
6	500	20	2	70
7	500	20	1	50
8	500	20	0,5	40

(iv) Modification des conditions de déprotection

La modification des conditions de réaction ne permet pas de conserver l'intermédiaire acide boronique sans l'oxyder. Il a alors été envisagé de modifier les conditions utilisées pour la déprotection de la séquence d'oligonucléotides en vue d'obtenir de meilleurs résultats (Tableau 10). La déprotection et la coupure de la séquence du support solide sont classiquement réalisées par une solution d'ammoniaque concentré à 50°C pendant 5 heures (Tableau 10, entrée 1). Cette méthode pourrait dans ce cas entraîner la dégradation de l'acide boronique, bien que cela n'ait pas été observé lors des synthèses des oligonucléotides modifiés utilisés dans le cadre des DNAzymes (Chapitre 2). Le temps de déprotection ainsi que la température ont été diminués à 30 minutes et 35°C respectivement, sans succès (Tableau 10, entrées 2 et 3). La déprotection de la séquence a ensuite été effectuée dans des conditions plus douces par une solution de méthanol ammoniacal pendant 20 heures à 25°C puis pendant 1 heure à 35°C mais aucune trace du produit attendu n'est observée sur le spectre MALDI-TOF (Tableau 10, entrées 4 et 5). Les conditions de déprotection ne sont donc pas responsables de l'oxydation de l'acide boronique. Les séquences d'oligonucléotides ont donc été déprotégées par une solution d'ammoniaque concentré à 50 °C pendant 30 minutes pour la suite de l'optimisation. Notons toutefois que ces conditions sont valables uniquement pour une séquence courte et composée de thymidine. Dans le cas de séquences plus longues et comportant différents nucléotides, le temps de réaction doit être augmenté à 5 heures afin de pouvoir déprotéger correctement l'ensemble des bases.

Tableau 10 : Différentes conditions testées pour la déprotection de l'oligonucléotide **ODN55**.

Entrée	Solution	Température (°C)	Temps (h)	Conversion en alcool (%)
1	NH ₄ OH	50	5	100
2	NH₄OH	50	0,5	100
3	NH ₄ OH	35	0,5	100
4	NH ₃ MeOH	25	20	100
5	NH ₃ MeOH	35	1	100

(v) Modification des conditions utilisées pour la synthèse automatisée

Malgré toutes les modifications des conditions de réaction et de déprotection, l'oxydation non désirée lors de la réaction d'hydroboration n'a pu être évitée et est même prédominante comparée à la formation de l'acide boronique. Nous nous sommes donc finalement intéressés aux conditions de synthèse de la séquence d'oligonucléotide (Tableau 11). Lors de la synthèse automatisée des oligonucléotides, une solution de diiode à 0,1 M est classiquement utilisée pour oxyder le lien phosphite triester instable en phosphate triester plus stable (Tableau 11, entrée 1). Dans ces conditions, seul le produit correspondant à l'alcool est obtenu. Cette étape serait donc susceptible de favoriser l'oxydation de l'acide boronique en alcool. La concentration de la solution de diiode a alors été diminuée à 0,02 M, conduisant à l'apparition d'un nouveau pic à $m/z = 992,51$ Da sur le spectre MALDI-TOF (Tableau 11, entrée 2). Celui-ci correspond à la séquence d'oligonucléotides **ODN57** comportant l'acide boronique (m/z calculée pour $[M-2H_2O-H]^+ = 994,48$ Da), bien qu'il soit très minoritaire par rapport au produit issu de l'oxydation (conversion estimée à 5 % d'après le spectre MALDI-TOF). Par conséquent, une concentration trop importante d'oxydant semble être responsable de la réaction d'oxydation de l'acide boronique lors de la réaction d'hydroboration bien que cette réaction n'ait jamais été observée sur le phosphoramidite modifié **T^{Bn}**.

Ainsi, les réactions suivantes ont été effectuées avec une solution de diiode à 0,02 M et les billes ont été lavées avec différentes solutions afin d'éliminer toutes traces résiduelles de l'oxydant. Tout d'abord, une solution aqueuse d'hydrosulfite de sodium à 0,5 M (Na₂S₂O₄), un agent réducteur connu pour sa capacité à éliminer l'excès d'oxydes dans les teintures industrielles, a été utilisée (Tableau 11, entrée 3). Cependant, le spectre MALDI-TOF obtenu après hydroboration démontre la formation de l'alcool uniquement. Une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 0,1 M (NaHSO₃), également utilisé en industrie comme agent réducteur, a ensuite

été testée et une quantité plus importante d'acide boronique (conversion de 15 %) est alors observée sur le spectre MALDI-TOF (Tableau 11, entrée 4). Un lavage par une solution aqueuse d'ascorbate de sodium à 0,5 M, un antioxydant utilisé notamment dans le cas des réactions de CuAAC pour éviter l'oxydation du cuivre (I) en cuivre (II), a également été effectué mais seulement des traces d'acides boroniques sont observées (conversion de 5 % ; Tableau 11, entrée 5). Enfin, les billes ont été lavées avec de l'acétonitrile anhydre, classiquement utilisé lors de la synthèse automatisée pour éliminer les traces de diiode (Tableau 11, entrée 6). Ces conditions permettent alors d'obtenir une quantité plus importante d'acide boronique car une conversion de 40 % est observée. Bien que l'acétonitrile ne présente aucun caractère réducteur ou antioxydant, la solubilité du diiode permet de l'éliminer de la colonne plus facilement. La séquence d'oligonucléotides modifiée par un acide boronique **ODN57** a ainsi pu être isolée et purifiée par HPLC semi-préparative avec un rendement isolé de 9 %.

Tableau 11 : Différentes conditions de synthèse et de lavage des billes.

Entrée	Conditions oxydation	Lavage des billes	Conversion en acide boronique (%)
1	Diiode 0,1 M	-	0
2	Diiode 0,02 M	-	5
3	Diiode 0,02 M	Na ₂ S ₂ O ₄ 0,5 M	0
4	Diiode 0,02 M	NaHSO ₃ 0,1 M	15
5	Diiode 0,02 M	Ascorbate de sodium 0,5 M	5
6	Diiode 0,02 M	ACN anhydre	40

Cette étude d'optimisation a ainsi permis de déterminer les conditions réactionnelles optimales pour l'incorporation d'un acide boronique à l'extrémité 5' d'une séquence d'acide nucléique. Pour cela, l'étape d'oxydation des phosphites triesters lors de la synthèse automatisée d'oligonucléotides est réalisée par une solution aqueuse de diiode à 0,02 M. Après un lavage des billes avec de l'acétonitrile anhydre, l'hydroboration est réalisée dans le THF anhydre dégazé avec 500 équivalents de catécholborane non dilué pendant 20 heures à 20°C pour conduire au produit **ODN57** souhaité. Cependant, seulement 40 % de conversion en acide boronique sont obtenus, les 60 % restant correspondant au produit d'oxydation. La faible stabilité de l'acide boronique est possiblement due au choix du substrat butène. La réaction a donc été appliquée à un substrat différent, à savoir un oligonucléotide TTT comportant le phosphoramidite modifié **35** à l'extrémité 5' qui est une thymidine modifiée par un alcène en position 5' (**ODN58**, Figure 120). L'hydroboration de ce composé directement sur support

solide CPG permettrait ainsi de faciliter la synthèse du phosphoramidite modifié T^{Bn} utilisé précédemment dans le cadre des split DNAzymes. Cependant, le produit d'hydroboration n'a pu être isolé.

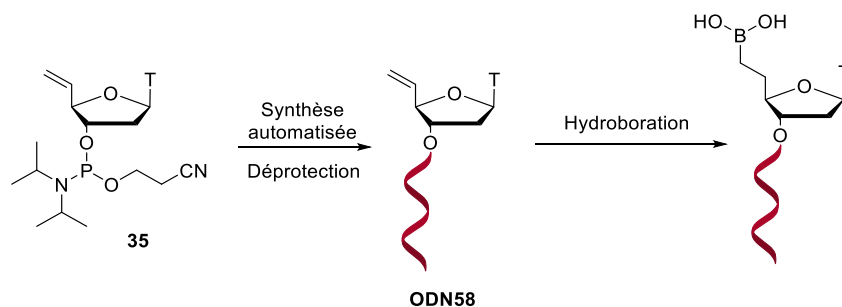


Figure 120 : Schéma de synthèse de l'oligonucléotide modifié **ODN58** et hydroboration.

La réaction d'oxydation de l'acide boronique ne pouvant être évitée et la réaction d'hydroboration n'étant pas reproductible, la réaction a été appliquée aux dérivés alcynes.

3.3.2 Hydroboration d'alcynes

3.3.2.1 Optimisation des conditions de réaction

L'hydroboration d'alcynes est particulièrement intéressante car elle permet d'introduire un acide boronique vinylique pouvant conduire à un aldéhyde par oxydation de l'acide boronique et tautomérisation de l'énol (Figure 121). L'incorporation d'une telle fonction au sein d'acides nucléiques permet par la suite de coupler la séquence d'oligonucléotides modifiée à une molécule d'intérêt de façon simple et efficace, notamment par amination réductrice.³³⁵⁻³³⁷

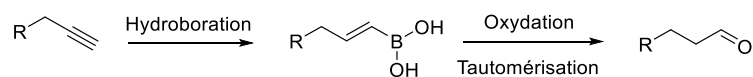


Figure 121 : Schéma de réaction de l'hydroboration d'alcyne.

Toutefois, la présence d'un aldéhyde au sein d'acides nucléiques reste aujourd'hui difficile à mettre en œuvre car ce type de fonction est très sensible aux dégradations. En effet, lors de la synthèse automatisée ils peuvent subir des attaques nucléophiles, s'hydrater ou être oxydés en acide carboxylique. De plus, la déprotection de la séquence d'oligonucléotides est réalisée en présence d'une base forte qui peut dégrader l'aldéhyde par réaction de Cannizzaro pour former un alcool et un acide carboxylique. Afin de contourner ces limitations, deux méthodes sont classiquement utilisées. La première consiste à insérer un groupement diol sur un nucléotide qui est ensuite incorporé dans la séquence par synthèse automatisée. Le diol est alors oxydé en

aldéhyde en présence de périodate de sodium après déprotection de l'oligonucléotide (Figure 122A).^{335,336,338-342} La seconde méthode implique l'insertion d'un atome d'iode au niveau de la nucléobase qui, après déprotection de la séquence, est remplacé par un groupement contenant un aldéhyde grâce au couplage de Suzuki (Figure 122B).³³⁷ Notre nouvelle méthode d'hydroboration d'alcyne sur support permettrait ainsi de s'affranchir de ces étapes de synthèse et d'obtenir un aldéhyde de façon simple et efficace.

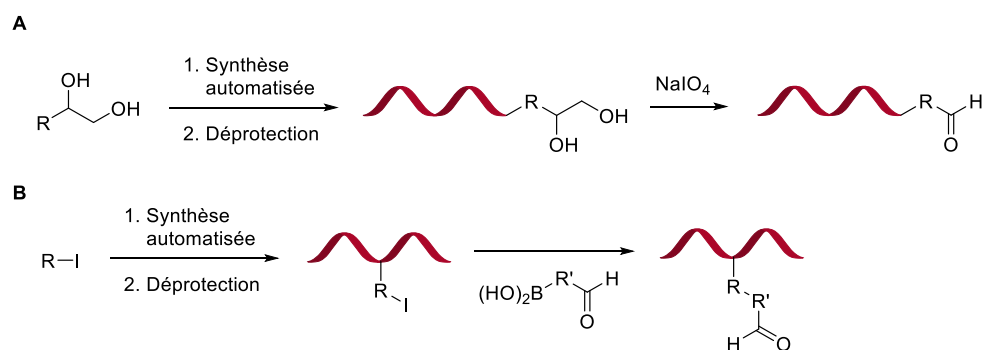


Figure 122 : Incorporation d'un aldéhyde au sein d'un oligonucléotide par (A) oxydation ou (B) couplage de Suzuki.

Les conditions de réactions ont tout d'abord été optimisées à partir d'un oligonucléotide TTT modifié à l'extrémité 5' par un phosphoramidite pentyne (**ODN59**). Pour cela, le phosphoramidite a été synthétisé à partir du 4-pentyn-1-ol en présence de 2-cyanoéthyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite et de DIEA dans le dichlorométhane anhydre (Figure 123). Le phosphoramidite modifié **36** comportant une fonction alcène a été obtenu avec un rendement de 74 % puis a été inséré à l'extrémité 5' de la séquence par synthèse automatisée en utilisant la chimie classique des phosphoramidites (Figure 71, page 78).

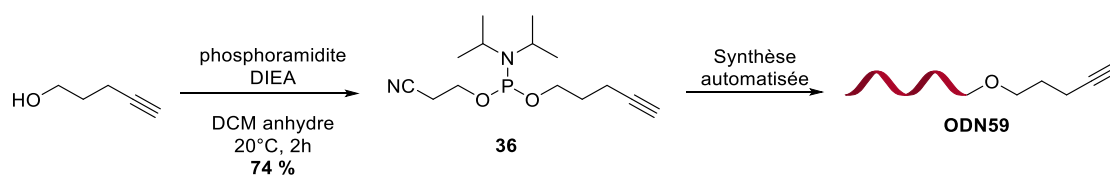


Figure 123 : Phosphitylation du 4-pentyn-1-ol et synthèse de l'oligonucléotide modifié **ODN59**.

L'étude précédente concernant la réaction d'hydroboration d'alcène a démontré que seuls le 9-BBN, le complexe $(\text{IpcBH}_2)_2 \cdot \text{TMEDA}$ et le catécholborane sont capables de réagir avec l'alcène. Par conséquent, l'hydroboration d'alcène a dans un premier temps été réalisée avec du 9-BBN (Tableau 12). Pour cela, les billes comportant l'oligonucléotide **ODN59** sont placées dans un Eppendorf suivies du THF anhydre et d'un large excès de borane (500 équivalents). La

solution est ensuite agitée dans un thermoshaker pendant 1 heure à 20°C puis les billes sont filtrées et l'oligonucléotide est déprotégé par une solution d'ammoniaque concentré. Enfin, l'oligonucléotide est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Après 1 heure de réaction à 20°C il reste encore 23 % d'**ODN59** et seulement 15 % d'**ODN60** comportant l'acide boronique sont observés, les 62 % restant correspondant à **ODN61** comportant l'aldéhyde issu de la réaction d'oxydation (Tableau 12, entrée 1 ; Figure 124).

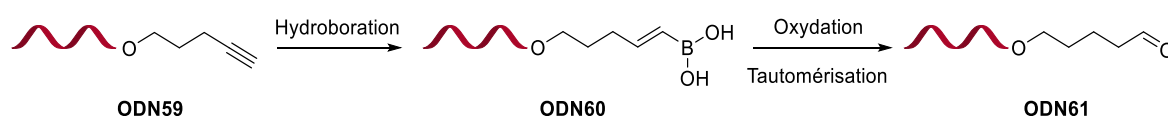


Figure 124 : Schéma réactionnel de l'hydroboration d'**ODN59**.

Le temps de réaction a alors été augmenté à 2 heures mais la conversion totale n'augmente pas, seule la proportion d'**ODN61** par rapport à **ODN60** augmente de 62 % à 69 % (Tableau 12, entrée 2). La quantité de 9-BBN a ensuite été diminuée à 100 équivalents mais la conversion diminue drastiquement car seulement 28 % de conversion totale sont observés dont 2 % d'**ODN60** (Tableau 12, entrée 3). La température a donc été augmentée à 50°C afin d'accélérer la réaction et la conversion est quasi-totale après 3 heures de réaction avec 500 équivalents de 9-BBN (Tableau 12, entrée 4). Cependant, les chromatogrammes HPLC des oligonucléotides modifiés brut sont assez complexes car il semble y avoir des dégradations. La réaction d'hydroboration d'alcynes a alors été évaluée en présence de catécholborane, réactif ayant conduit à la meilleure conversion dans le cas de l'hydroboration d'alcènes.

Tableau 12 : Différentes conditions testées pour l'hydroboration de l'**ODN59** par le 9-BBN dans le THF anhydre.

Entrée	Équivalents	Température (°C)	Temps (h)	Conversion aldéhyde/acide boronique (%)
1	500	20	1	62 / 15
2	500	20	2	69 / 9
3	100	20	3	26 / 2
4	500	50	3	67 / 29

En présence de 500 équivalents de catécholborane dans le THF anhydre, une conversion de 75 % est obtenue après 3 heures à 20°C, dont 45 % d'**ODN60** (Tableau 13, entrée 1). Le chromatogramme HPLC est toutefois moins complexe que celui obtenu précédemment en présence de 9-BBN. La température a alors été augmentée à 40 °C mais une conversion

similaire est obtenue (Tableau 13, entrée 2). En revanche, la proportion d'**ODN60** et d'**ODN61** a été inversée car seulement 19 % d'**ODN60** comportant l'acide boronique à l'extrémité 5' sont observés sur le chromatogramme HPLC. Le temps de réaction a donc été augmenté à 5 heures et cette fois-ci la réaction est totale (Tableau 13, entrée 3). Dans le but de diminuer le temps de réaction, la température a été augmentée à 50°C et nous pouvons observer sur le chromatogramme HPLC que la conversion est totale après 3 heures de réaction (Tableau 13, entrée 4). C'est donc ces conditions qui seront retenues pour la suite de l'optimisation.

Tableau 13 : Différentes conditions testées pour l'hydroboration de l'**ODN59** par le catécholborane (500 équivalents) dans le THF anhydre.

Entrée	Température (°C)	Temps (h)	Conversion aldéhyde / acide boronique (%)
1	20	3	39 / 45
2	40	3	51 / 19
3	40	5	81 / 19
4	50	3	87 / 13

Les premiers résultats obtenus démontrent que la formation d'acide boronique est minoritaire au profit de l'aldéhyde issu de la réaction d'oxydation. Cependant, l'insertion d'une fonction aldéhyde est intéressante car elle peut par la suite permettre d'effectuer des réactions de conjugaison avec différentes fonctions. D'autre part, l'optimisation de la réaction d'hydroboration d'alcène a démontré toute la complexité à isoler l'oligonucléotide comportant l'acide boronique. Nous avons donc décidé de ne pas isoler celui-ci. Au contraire, les conditions de réaction ont été optimisées dans le but d'obtenir uniquement l'aldéhyde. Pour cela, la réaction d'hydroboration a été réalisée dans les conditions précédemment optimisées (500 équivalents, 3 heures à 50°C) puis les billes sont filtrées et rincées avec de l'acétonitrile pour éliminer l'excès de catécholborane. Les billes sont ensuite placées dans une colonne connectée d'un côté avec une seringue vide et de l'autre avec une seringue contenant une solution de diiode 0,1 M. La solution est ensuite transférée d'une seringue à l'autre en passant par la colonne pendant 5 minutes à 20°C. Après un lavage des billes avec de l'acétonitrile pour éliminer l'excès de diiode, les billes sont déprotégées par une solution d'ammoniaque concentré. Le chromatogramme HPLC de l'oligonucléotide brut indique cependant qu'il reste 10 % d'**ODN60** comportant l'acide boronique (Tableau 14, entrée 1). L'oxydation a alors été réalisée en présence d'oxone, réactif couramment utilisé lors de réactions d'oxydation. Pour cela, après la réaction d'hydroboration les billes sont filtrées et lavées avec de l'acétonitrile puis

une solution d'oxone dans le THF/eau (1/2) est ajoutée (20 équivalents). La solution est ensuite agitée dans un thermoshaker pendant 30 minutes à 20°C puis les billes sont déprotégées par un traitement ammoniacal. Cependant, la proportion d'**ODN60** et **ODN61** ne varie pas (Tableau 14, entrée 2). La quantité d'oxone a alors été augmentée à 100 équivalents et après 3 heures à 50°C la quantité d'**ODN60** n'est plus que de 2 % (Tableau 14, entrée 3). Enfin, une augmentation du nombre d'équivalents d'oxone à 200 entraîne l'oxydation totale de l'acide boronique (Tableau 14, entrée 4).

Tableau 14 : Différentes conditions testées pour l'oxydation de l'acide boronique.

Entrée	Oxydant	Équivalents	Température (°C)	Temps (h)	Conversion en aldéhyde (%)
1	Diode	-	20	0,1	90
2	Oxone	20	20	0,5	88
3	Oxone	100	50	3	98
4	Oxone	200	50	3	100

Cette étude a ainsi permis de déterminer les conditions réactionnelles optimales pour l'insertion de fonctions aldéhydes à l'extrémité 5' d'une courte séquence d'acide nucléique. La réaction a ensuite été appliquée à une séquence plus longue (T_6) dont l'extrémité 5' a été modifiée par un pentyne (**ODN62**) et la formation de l'aldéhyde est bien observée sur le spectre MALDI-TOF. Cependant, la réaction n'est pas encore totale à ce jour et des études d'optimisation sont actuellement en cours. La réaction sera ensuite appliquée à des hétéro-oligonucléotides en série ADN et ARN de différentes longueurs.

Comme cela avait été fait dans la première partie de ce chapitre dans le cadre de la chimie click (paragraphe 3.2.2, page 134), la réaction a été appliquée à un oligonucléotide TTT modifié à l'extrémité 5' par un phosphoramidite commercial 2'-*O*-propargyluridine (**ODN63**). La fonction aldéhyde pourrait ainsi être insérée en position 2' à l'extrémité ou à l'intérieur d'une séquence d'acide nucléique et de fait augmenter le champ d'applications de ces oligonucléotides modifiés. Cependant, aucune réaction n'est observée dans ces conditions. Les précédentes études ont démontré qu'il est nécessaire d'effectuer la réaction sous irradiation aux micro-ondes pour ce type de modification pour compenser l'accès difficile à la position 2'. Toutefois, les signaux observés sur le spectre MALDI-TOF après 3 heures à 40°C ne correspondent ni au produit attendu ni au produit de départ et de nombreux signaux apparaissent

sur le chromatogramme HPLC, probablement à cause d'une dégradation. Un travail d'optimisation sera nécessaire afin de mettre au point cette nouvelle méthode.

Ces oligonucléotides modifiés par une fonction aldéhyde peuvent ainsi être fonctionnalisés avec des (bio)molécules d'intérêt à travers la formation d'une oxime, d'une hydrazone ou d'une imine.

3.3.2.2 Fonctionnalisation des oligonucléotides modifiés

La formation d'oximes et d'hydrazones est largement utilisée pour la bioconjugaison d'aldéhydes en raison de leur caractère réversible et de leur bonne stabilité envers les réactions d'hydrolyse (Figure 125).³⁴³ En effet, l'effet inductif négatif apporté par la présence de l'atome d'oxygène ou d'azote en α de l'amine permet de stabiliser le conjugué.³⁴⁴ La formation de ce type de liaison est ainsi largement utilisée pour la fonctionnalisation de peptides et protéines,³⁴⁵ la synthèse de sondes moléculaires³⁴⁶ ou encore pour la décoration de nanoparticules.³⁴⁷

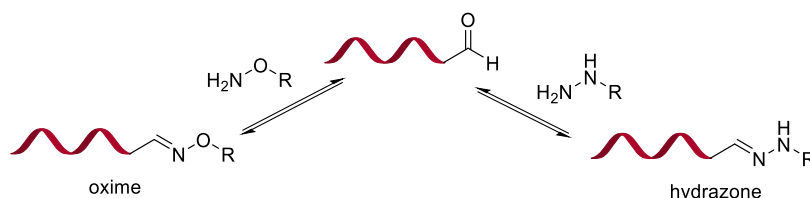


Figure 125 : Bioconjugaison d'aldéhydes par la formation d'une oxime ou d'une hydrazone.

Par conséquent, nous avons dans un premier temps étudié la fonctionnalisation des oligonucléotides modifiés précédemment synthétisés par la formation d'une oxime. Pour cela, après la réaction d'hydroboration et d'oxydation, l'oligonucléotide TTT-pentanal (**ODN61**) est déprotégé et coupé du support par un traitement ammoniacal. Il est ensuite mis en présence de benzylhydroxylamine (2 équivalents) dans un tampon acétate ammonium à pH 5 pendant 3 heures à 20°C (Figure 126A) et le spectre MALDI-TOF indique la formation d'un nouveau produit dont la masse correspond à la valeur attendue (m/z obtenue = 1119,41 et m/z calculée = 1117,83 ; Figure 126B). La réaction est également réalisée avec l'**ODN56** comportant un butanol à l'extrémité 5' mais aucun nouveau signal n'apparaît sur le spectre MALDI (Figure 126C). Ces premiers résultats confirment ainsi la présence de l'aldéhyde à l'extrémité 5' de l'**ODN61**.

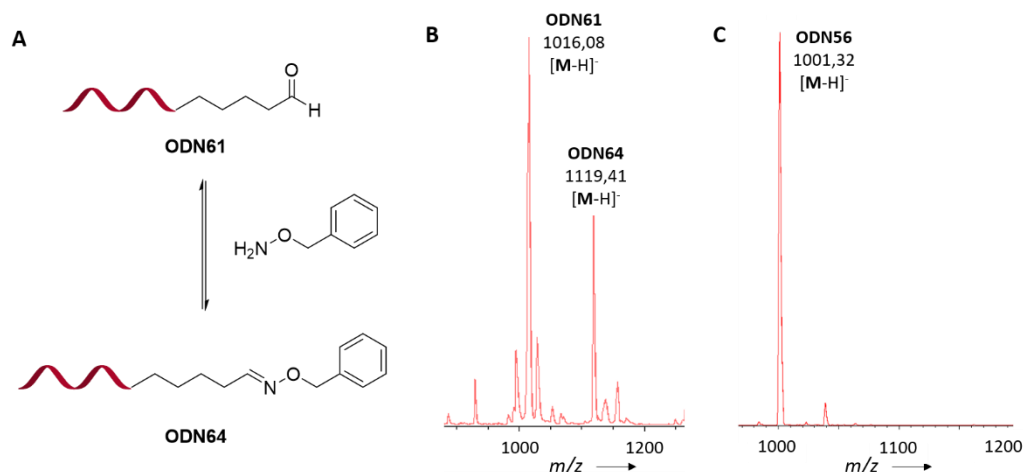


Figure 126 : (A) Réaction de couplage de l'ODN61 avec la benzylhydroxylamine et (B) spectre MALDI-TOF correspondant. (C) Spectre MALDI-TOF de la réaction de contrôle.

La réaction a ensuite été réalisée directement sur support CPG en présence d'un large excès de benzylhydroxylamine (300 équivalents) dans un tampon acétate ammonium à pH 5 pendant 3 heures à 40°C et une conversion de 70 % est observée (Figure 127).

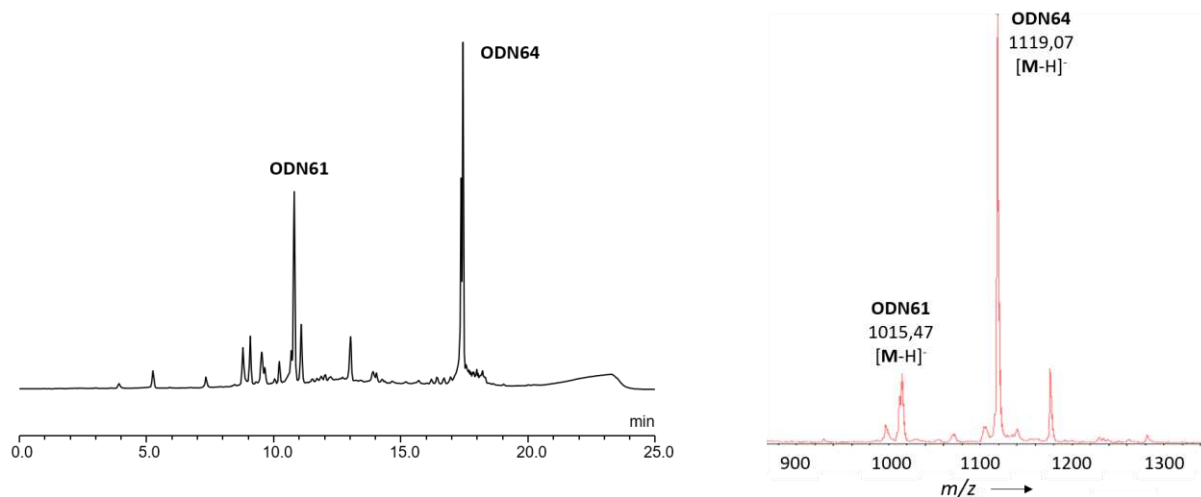


Figure 127 : Chromatogramme HPLC et spectre MALDI-TOF de la réaction de couplage de l'ODN61 avec la benzylhydroxylamine sur support.

L'ODN64 attendu a bien été formé, cependant la conversion n'est pas totale. Une optimisation des conditions de réaction est donc actuellement en cours. La fonctionnalisation d'oligonucléotides modifiés à travers la formation d'hydrazone ou d'imine par amination réductrice sera ensuite étudiée.

3.4 Conclusion du Chapitre 3

Cette étude a ainsi permis de développer quatre méthodes différentes permettant la borylation d'acides nucléiques post-synthèse tout en s'affranchissant des longues synthèses généralement nécessaires pour ce type de modification. Tout d'abord, bien que les acides boroniques semblent incompatibles avec les réactions de CuAAC, il est toutefois possible de l'introduire sur support solide CPG lorsque celui-ci est protégé par un groupement pinacol ou MIDA. Les différentes séquences d'oligonucléotides modifiées par un acide boronique ont en effet été obtenues avec des conversions et rendements satisfaisants, que ce soit en série ADN ou ARN. Deux méthodes ont été mises au point pour incorporer l'acide boronique à l'extrémité 5' en remplaçant l'hydroxyle en position 5' du nucléotide par une fonction azoture ou à l'intérieur de la séquence en insérant un phosphoramidite 2'-*O*-propargyluridine à la position souhaitée. Cette dernière méthode a également été appliquée à l'aptamère à tobramycine, ce qui permettrait alors d'améliorer l'affinité de l'aptamère modifié vis-à-vis de la molécule cible grâce à la formation d'un ester boronate. Ces nouvelles méthodes simples, rapides, efficaces et modulables permettent ainsi d'enrichir considérablement le répertoire d'oligonucléotides disponibles pour des réactions de conjugaison. Ces nouveaux oligonucléotides modifiés pourraient alors être utilisés pour de nombreuses applications et plus particulièrement pour la détection de glucides ou de molécules contenant des *cis*-diols par formation de liaisons réversibles et covalentes de type ester boronate.

Deux méthodes d'hydroboration sur support solide CPG ont également été développées. La première méthode consiste à effectuer une hydroboration à partir d'un alcène et l'optimisation des conditions de réaction sur une séquence composée de trois thymidines fonctionnalisée à l'extrémité 5' par un butène a permis d'introduire un acide boronique en présence de catécholborane dans le THF. Cependant, la réaction d'oxydation de l'acide boronique en alcool ne peut être évitée. Ces conditions de réaction ont alors été adaptées à l'hydroboration d'alcynes permettant l'obtention d'un acide boronique vinylique à l'extrémité 5' de la séquence. Cette méthode est particulièrement intéressante car l'oxydation de l'acide boronique permet ensuite d'obtenir un aldéhyde de manière simple et efficace, nécessitant habituellement la mise en place de synthèses de composés intermédiaires relativement longues. L'oligonucléotide modifié obtenu peut alors être couplé avec différentes biomolécules d'intérêt à travers la formation d'une oxime, comme les premiers résultats l'ont démontré. D'autres réactions de conjugaison telles que l'amination réductrice ou la réaction de Wittig peuvent également être envisagées afin d'élargir la gamme d'oligonucléotides modifiés disponibles et de fait le domaine

d'applications de ces derniers.

Chapitre 4 : Auto-assemblages bioinspirés à base de borono-uridine

4.1 Introduction et contexte

Les précédents chapitres ont démontré l'intérêt des acides boroniques dans le domaine des acides nucléiques pour des applications de reconnaissance moléculaire mais ceux-ci ont également été utilisés pour la formation de matériaux.²⁴² En effet, outre leur capacité à s'associer avec des partenaires *cis*-diols, les acides boroniques peuvent former des assemblages supramoléculaires linéaires ou multidimensionnels à travers l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires (Figure 128).^{348,349} Des interactions de coordination ou π - π peuvent également être mises en jeu pour stabiliser l'assemblage par délocalisation des électrons π dans l'orbitale p vacante de l'atome de bore ou par complexation de celle-ci par un atome possédant un doublet non liant.

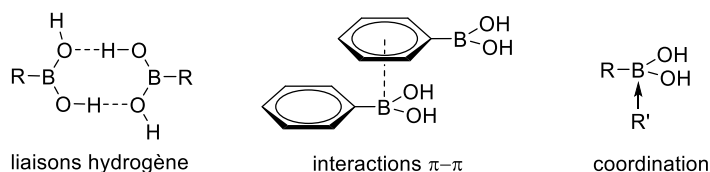


Figure 128 : Représentation des différentes interactions pouvant être mises en jeu pour la formation d'assemblages supramoléculaires à base d'acides boroniques.

Des études de cristallographie aux rayons X ont ainsi permis de mettre en évidence la formation de structures cristallines bidimensionnelles par auto-assemblage.^{242,245} En effet, Rodriguez-Cuamatzi *et al.* ont démontré que l'acide 1,4-phényldiboronique est capable de s'auto-assembler grâce à la formation de liaisons hydrogène entre les différents hydroxyles liés aux atomes de bore pour former des chaînes linéaires (Figure 129A).³⁵⁰ Celles-ci peuvent ensuite s'empiler pour former des réseaux bidimensionnels stabilisés par des interactions π - π issues de l'empilement des cycles aromatiques. Des ligands donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène tels que l'eau, le dioxane, la bipyridine ou le *trans*-1,2-bis(4-pyridyl)éthène peuvent également être additionnés dans le milieu pour établir un lien entre les différents acides boroniques et modifier la structure cristalline de l'assemblage supramoléculaire.^{351,352} La modification du monomère acide boronique permet également de varier la structure de l'auto-assemblage et de fait ses propriétés. Par exemple, l'utilisation d'acides tétraphénylméthaneboronique ou tétraphénylsilaneboronique tétraédriques entraîne la formation d'un réseau tridimensionnel hautement structuré par l'établissement de seize liaisons hydrogène avec les molécules adjacentes (Figure 129B).³⁵³ La structure relativement compacte et périodique présente ainsi d'importants volumes libres à l'intérieur, permettant l'encapsulation de

molécules cibles. De plus, l'assemblage tridimensionnel étant régi uniquement par des liaisons hydrogène, celui-ci est capable de se déformer pour s'adapter au mieux à la molécule cible, ce qui est impossible avec des assemblages basés sur la formation de liaisons covalentes. Ces structures ont été utilisées pour diverses applications, notamment pour la catalyse acide hétérogène ou pour la séparation de molécules selon leur taille ou leur forme.³⁵⁴

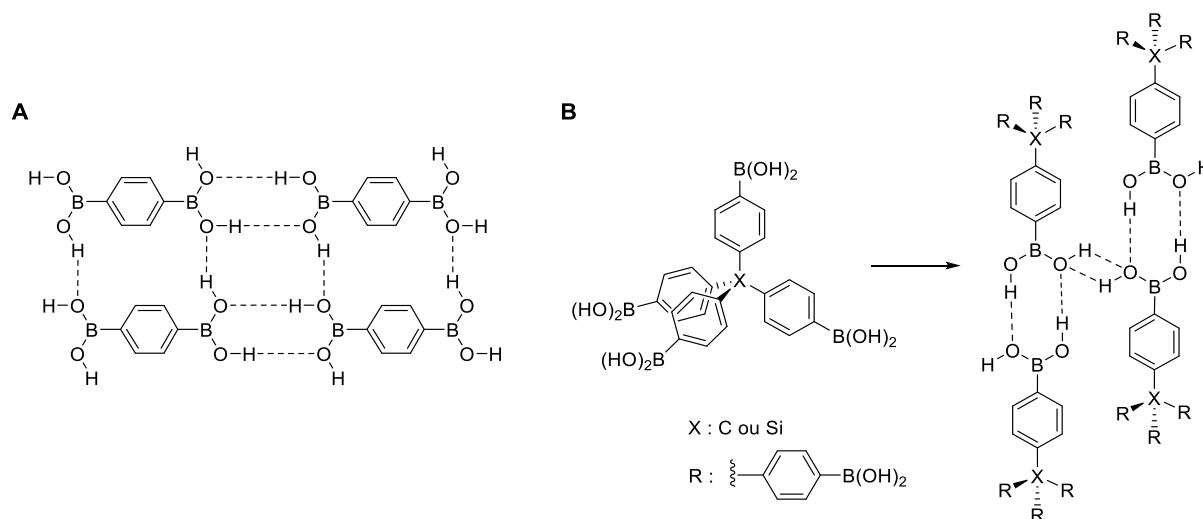


Figure 129 : Assemblages supramoléculaires (A) bi- et (B) tridimensionnels par liaisons hydrogène intermoléculaires.

La formation de boroxines par déshydratation de trois acides boroniques liés à des groupements alkyles, alkoxy ou aryles permet également l'obtention d'assemblages moléculaires ordonnés à travers la formation de liaisons covalentes et réversibles (Figure 130A). Ces cycles plans à six chaînons, exclusivement composés d'atomes de bore et d'oxygène, possèdent un caractère partiellement aromatique composé d'un système π issu des orbitales p vacantes des atomes de bore et des doublets non liants des atomes d'oxygène.⁹ L'utilisation d'acides boroniques liés à des groupements aromatiques permet ainsi de stabiliser l'assemblage par recouvrement orbitalaire des électrons π , des orbitales p vacantes des atomes de bore et des doublets non liants des atomes d'oxygènes. La stabilité de ces assemblages a été évaluée par RMN en utilisant des acides phénylboroniques substitués en position *para* et il s'avère que la constante d'équilibre de la formation de la triarylborexine résultante dépend en partie de l'effet inductif du substituant (Figure 130B).³⁵⁵ En effet, la présence de substituants électroattracteurs augmente le caractère électrophile de l'atome de bore et de fait favorise la réaction d'hydrolyse. La constante d'équilibre de la formation de la triarylborexine est donc diminuée. *A contrario*, la substitution du cycle benzène par un groupement électrodonneur augmente le caractère nucléophile de l'atome de bore. Par conséquent, la réaction d'hydrolyse est défavorisée et la constante

d'équilibre est plus élevée. La substitution du cycle benzène en position *ortho* par un groupement méthyle a également été évaluée. Cependant, une diminution de la constante d'équilibre est observée en raison des effets stériques et électroniques. En effet, la présence du groupement méthyle entraîne une torsion des trois cycles benzéniques par rapport au cycle boroxine et de fait la stabilité électronique est diminuée. La stabilité de la triarylboroxine est donc dépendante de l'environnement électronique des cycles aromatiques.

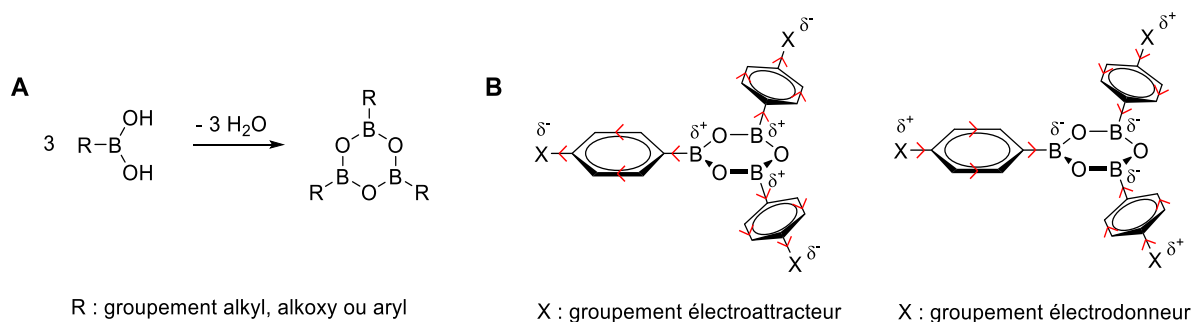


Figure 130 : (A) Formation de boroxine par déshydratation et (B) effets inductifs mis en jeu pour la formation de triarylboroxines.

Ainsi, ces différentes propriétés d'assemblages supramoléculaires des acides boroniques ont été utilisées pour la conception d'assemblages organiques covalents qui sont des matériaux poreux et cristallins très ordonnés. La formation de matériaux bidimensionnels a d'abord été démontrée par déshydratation à partir de plusieurs molécules d'acide 1,4-benzènediboronique (Figure 131A)³⁵⁶ puis des assemblages tridimensionnels ont été développés à partir d'acides polyboroniques (Figure 131B).³⁵⁷ Ces structures très ordonnées sont classiquement formées dans des solvants dans lesquels le monomère est peu soluble tandis que les structures assemblées le sont, afin de déplacer l'équilibre vers la formation de celles-ci. De plus, les assemblages peuvent être stabilisés par la formation de liaisons hydrogène ou d'interactions π - π permettant de renforcer la stabilité de la structure. Différentes tailles et formes de macrocycles de faible densité à porosité élevée et variable peuvent ainsi être obtenues en fonction des monomères utilisés.^{9,358} Leur capacité à former des cages capables d'accueillir une molécule cible, leur grande surface spécifique théorique ainsi que leur grande stabilité chimique ont permis leur développement pour le stockage d'hydrogène,^{359,360} le transport de petites molécules,³⁶¹ la catalyse hétérogène³⁶² ou encore en tant qu'additifs retardateurs de flammes.³⁶³

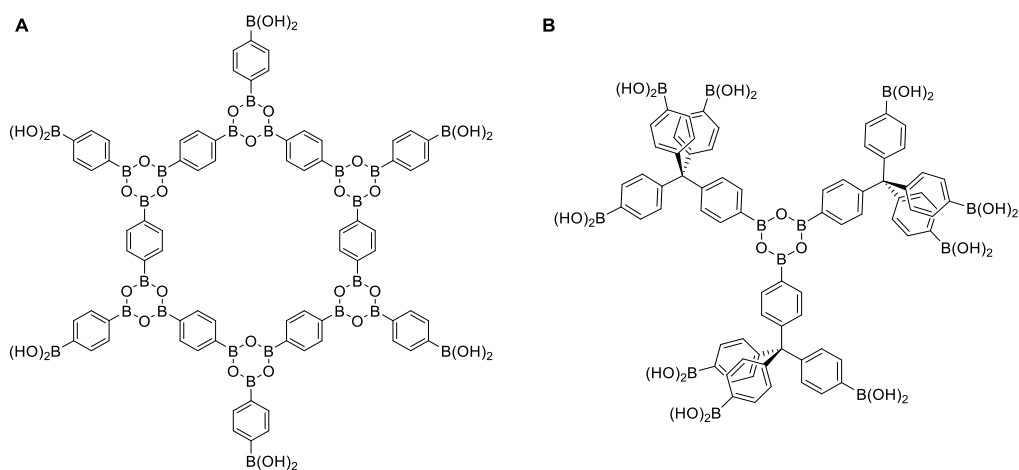


Figure 131 : Assemblages organiques covalents par la formation de boroxines (A) bi-³⁵⁶ et (B) tridimensionnels.³⁵⁷

Par ailleurs, les acides boroniques sont largement utilisés pour leur capacité à former des liaisons covalentes et réversibles avec des fonctions *cis*-diols, notamment pour la détection de glucides.^{364,365} Cette capacité à former de telles liaisons peut également être utilisée pour la formation de matériaux possédant des structures ordonnées²⁴² pour diverses applications telles que le stockage de gaz et d'énergie,^{359,366–369} la catalyse,³⁷⁰ l'optoélectronique^{371–373} et la délivrance de drogues.³⁶¹ En effet, de nombreux assemblages organiques covalents de formes hexagonales ou tétraogonales peuvent être engendrés par la formation d'esters boronates en présence d'acides bis-boroniques et de bis ou tris diols, leur structure pouvant varier en fonction des monomères utilisés (Figure 132).^{245,374–377}

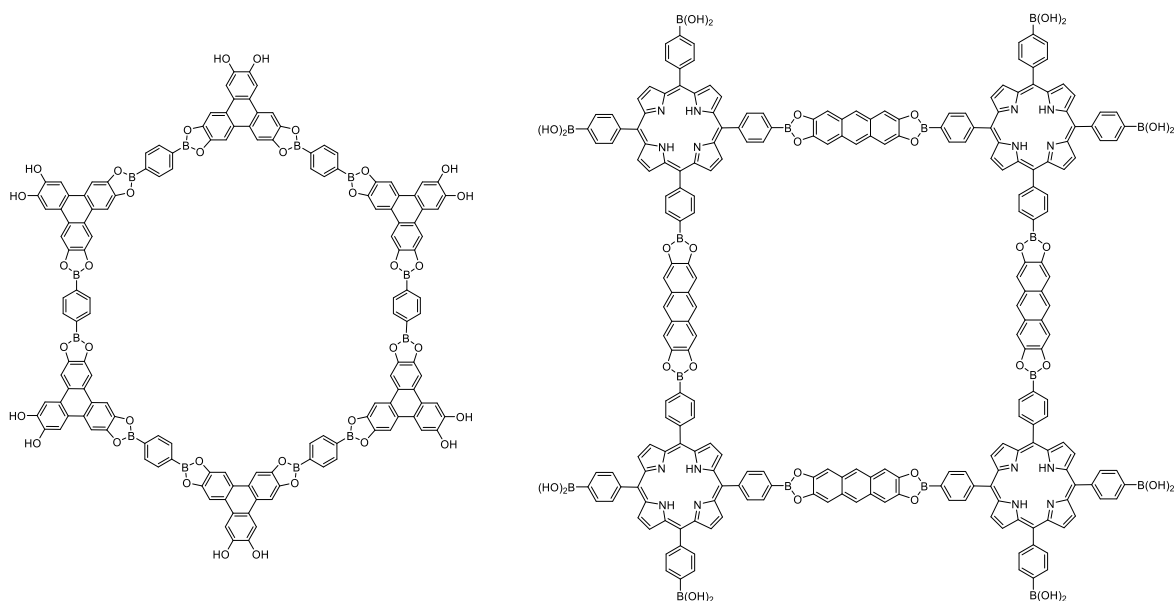


Figure 132 : Assemblages organiques covalents par la formation d'esters boronates.^{356,374}

Des polymères dont la chaîne latérale est fonctionnalisée par plusieurs fonctions acides boroniques ont également été étudiés pour générer des matériaux macromoléculaires. Kobayashi *et al.* ont ainsi inséré des acides boroniques le long d'une poly(L-lysine) capable de former à pH basique des esters hydroxyboronates avec les fonctions hydroxyles en positions 2' et 3' des résidus adénosines (Figure 133).³⁷⁸ L'hélice α générée est alors capable d'interagir avec une poly(uridine) grâce à la formation de liaisons hydrogène de type Watson-Crick. La double hélice engendrée peut ainsi être assimilée à celle d'un ARN. Ce système pourrait ensuite être utilisé pour le transport d'ARN ou la suppression temporaire du processus de transcription. Ces matériaux polymériques ont par ailleurs été utilisés pour la détection de carbohydrates^{364,365,379} ou la séparation de nucléosides³⁸⁰ et nucléotides.^{381,382} Des polymères fonctionnalisés par des acides boroniques peuvent également former des hydrogels, c'est-à-dire des réseaux tridimensionnels à l'intérieur desquels une grande quantité de solvant aqueux est emprisonnée.³⁸³ Ces systèmes résultant de l'établissement de liens intermoléculaires chimiques de nature covalente et réversible sont biocompatibles et particulièrement intéressants pour des applications biomédicales et pharmaceutiques, notamment pour la détection de *cis*-diols.³⁸⁴⁻³⁸⁸

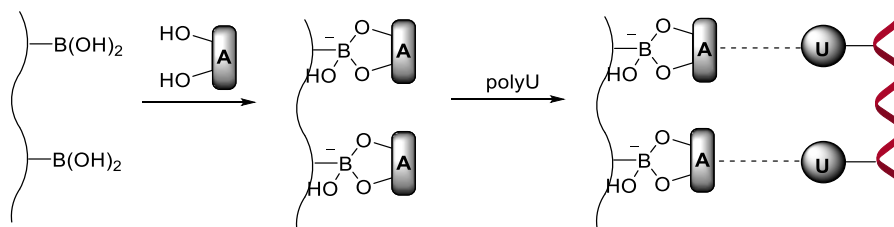


Figure 133 : Synthèse de mimes d'ARN par formation d'esters hydroxyboronates.³⁷⁸

Plus récemment, de nouvelles structures ont été développées dans le but de former des architectures bio-inspirées visant à mimer des processus naturels. Au laboratoire, le travail de thèse du Dr. Delphine Luvino a consisté à remplacer le lien phosphodiester d'un dinucléotide par une jonction internucléosidique de type ester boronate (Figure 134).¹⁸ L'utilisation de ce type de lien permet ainsi de conserver la charge négative par la formation d'un anion hydroxyboronate à pH basique. L'étude de l'association entre l'uridine et un analogue de la thymidine portant une fonction acide boronique en position 5' a été effectuée par RMN ^1H dans le DMSO. L'ajout de borono-thymidine a conduit à l'apparition d'une nouvelle espèce chimique ainsi qu'à une diminution de la largeur des pics des protons échangeables, caractéristique d'un ralentissement de la vitesse d'échange de ces derniers. La disparition des signaux correspondant aux hydroxyles en positions 2' et 3' de l'uridine observée en présence d'un excès de la borono-thymidine ainsi que les variations de constantes de couplage des

protons H₁ et H₂, caractéristiques du changement de conformation du sucre de l'uridine, ont permis de mettre en évidence l'existence de la formation d'un ester boronate entre les deux nucléosides.

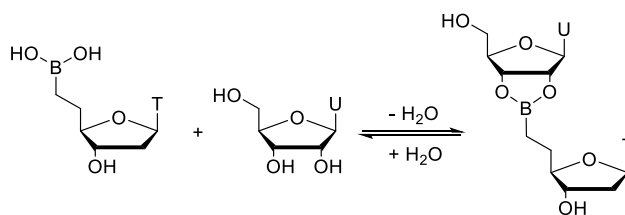


Figure 134 : Formation d'un dinucléotide par formation d'un lien ester boronate.

Ainsi, dans la continuité de ce travail, nous avons synthétisé la borono-uridine **37** dont la position 5' a été modifiée par un acide boronique. Les hydroxyles en positions 2' et 3' formant un *cis*-diol, le composé bifonctionnel est capable de s'auto-assembler de façon covalente et réversible par la formation d'un ester boronate. En collaboration avec le Dr. Carine Baragney, spécialiste RMN au sein de l'équipe ChemBioNAC, les structures assemblées ont d'abord été étudiées par RMN dans le DMF-d₇ anhydre et dans le DMF-d₇ en présence d'eau afin de caractériser les espèces formées par auto-assemblage. Ces dernières ont ensuite été analysées par RMN DOSY ¹H (Diffusion Ordered SpectroscopY) afin d'étudier leurs coefficients de diffusion et déterminer leur structure exacte. Enfin, l'aptitude de la borono-uridine à s'auto-assembler en milieu aqueux a été étudiée par RMN dans le D₂O.

4.2 Étude de l'auto-assemblage par RMN

4.2.1 Synthèse du monomère borono-uridine

La synthèse du monomère borono-uridine suit le même schéma de synthèse que celui décrit pour la synthèse du composé **22** (Chapitre 2, paragraphe 2.2.2.2, Figure 65). Une protection des hydroxyles en positions 2' et 3' par un groupement isopropylidène est d'abord effectuée, suivie de l'oxydation de l'alcool en position 5'. Une homologation de l'aldéhyde en alcène est ensuite réalisée pour conduire au composé **22** après déprotection des deux hydroxyles (Figure 135). L'hydroboration de l'alcène est ensuite effectuée en présence d' α -pinène et de diméthylsulfure de borane pour obtenir le composé **37** avec un rendement de 70 %.

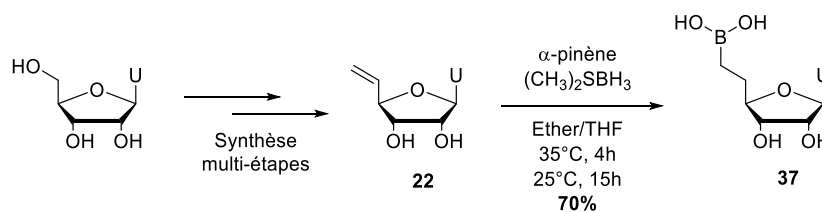


Figure 135 : Synthèse du monomère borono-uridine 37.

4.2.2 Oligomérisation de la borono-uridine en solvant organique anhydre

Dans l'étude de Luvino *et al.*,¹⁸ le solvant organique utilisé pour promouvoir l'assemblage des deux nucléosides est le DMSO anhydre mais dans notre cas l'utilisation de ce solvant conduit à de larges signaux caractéristiques d'un régime d'échange ni suffisamment rapide ni suffisamment lent pour permettre une analyse fine. En revanche, le spectre RMN ^1H du monomère 37 dissous dans le DMF- d_7 anhydre à température ambiante montre l'apparition de deux séries de signaux fins (ratio de 2:1) qui ont pu être entièrement caractérisés et attribués. La comparaison des déplacements chimiques des deux espèces indique que les structures sont relativement proches (Figure 136, spectre à 37 mM). En effet, sur le spectre RMN ^1H la plus grande variation entre les deux formes est de seulement 0,15 ppm et est observée pour le proton situé autour de 4 ppm. Le comportement de ces deux espèces liées a alors été étudié dans le DMF- d_7 anhydre avec différentes concentrations de borono-uridine. Une diminution de la concentration du monomère 37 de 37 à 1,4 mM entraîne la disparition progressive de l'espèce minoritaire qui n'est quasiment plus détectée sur le spectre RMN ^1H à 0,14 mM. Le fait que les déplacements chimiques soient indépendants de la concentration et de la température (une augmentation de 25 à 55 degrés est sans effet sur le spectre RMN ^1H) montre l'absence d'interactions π - π entre les deux espèces formées. De plus, des expériences d'irradiations sélectives ont démontré l'existence d'un échange lent entre les deux espèces puisque la saturation sélective du signal d'un noyau appartenant à l'espèce majoritaire affecte le signal du même noyau de l'espèce minoritaire.

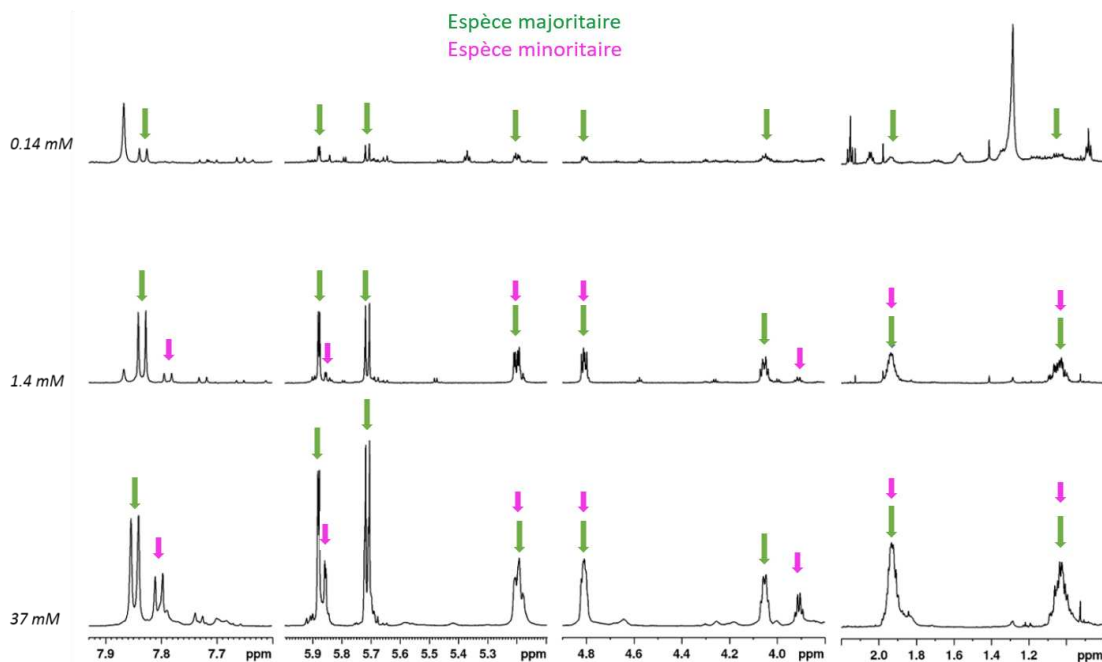


Figure 136 : Spectre RMN ^1H de la borono-uridine dans le DMF- d_7 anhydre à différentes concentrations.

L'étude des spectres RMN ^1H et ^{13}C obtenus a ensuite permis d'attribuer les signaux de chacune des deux espèces formées (Figure 137A-B). La comparaison des déplacements chimiques avec ceux de l'uridine native, incapable de former des esters boronates, montre des variations de l'environnement atomique qui sont bien au-delà de celles attendues suite à la modification chimique de la position 5' (Figure 137C). D'une part, les protons $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{3'}$, initialement présents à 4,20 et 3,92 ppm respectivement dans le cas de l'uridine native sont décalés vers les champs faibles à 5,19 et 4,81 ppm dans le DMF- d_7 anhydre, ce qui indique un changement d'environnement autour de ces protons. D'autre part, le signal du proton $\text{H}_{6'}$, aux alentours de 0,80 ppm présente une multiplicité plus complexe que le triplet résultant de la libre rotation de l'acide boronique autour du CH_2 en position 6'. La disparition immédiate des signaux correspondants aux hydroxyles libres présents sur le monomère bifonctionnel laisse supposer la formation de deux espèces liées cycliques. Une variation de déplacement chimique est également observée sur le spectre RMN ^{13}C sur lequel les signaux correspondant aux carbones $\text{C}_{2'}$ et $\text{C}_{3'}$, classiquement présents autour de 73 ppm dans le cas de l'uridine native sont cette fois-ci observés autour de 84 ppm dans le DMF- d_7 anhydre (Figure 137B-C). Ces variations de déplacements chimiques vers les champs faibles sont caractéristiques de la formation d'un ester boronate. En effet, des études portant sur la complexation d'un acide boronique avec du glucose ont démontré que les déplacements chimiques des carbones portant les atomes d'oxygène

impliqués dans la liaison subissent une variation d'environ 10 ppm.³⁸⁹ Plus récemment, la formation d'un ester boronate en présence d'uridine et d'acide *para*-trifluorométhylphénylboronique dans l'acétonitrile a été décrite et des variations de déplacements chimiques similaires ont été observées.³⁹⁰

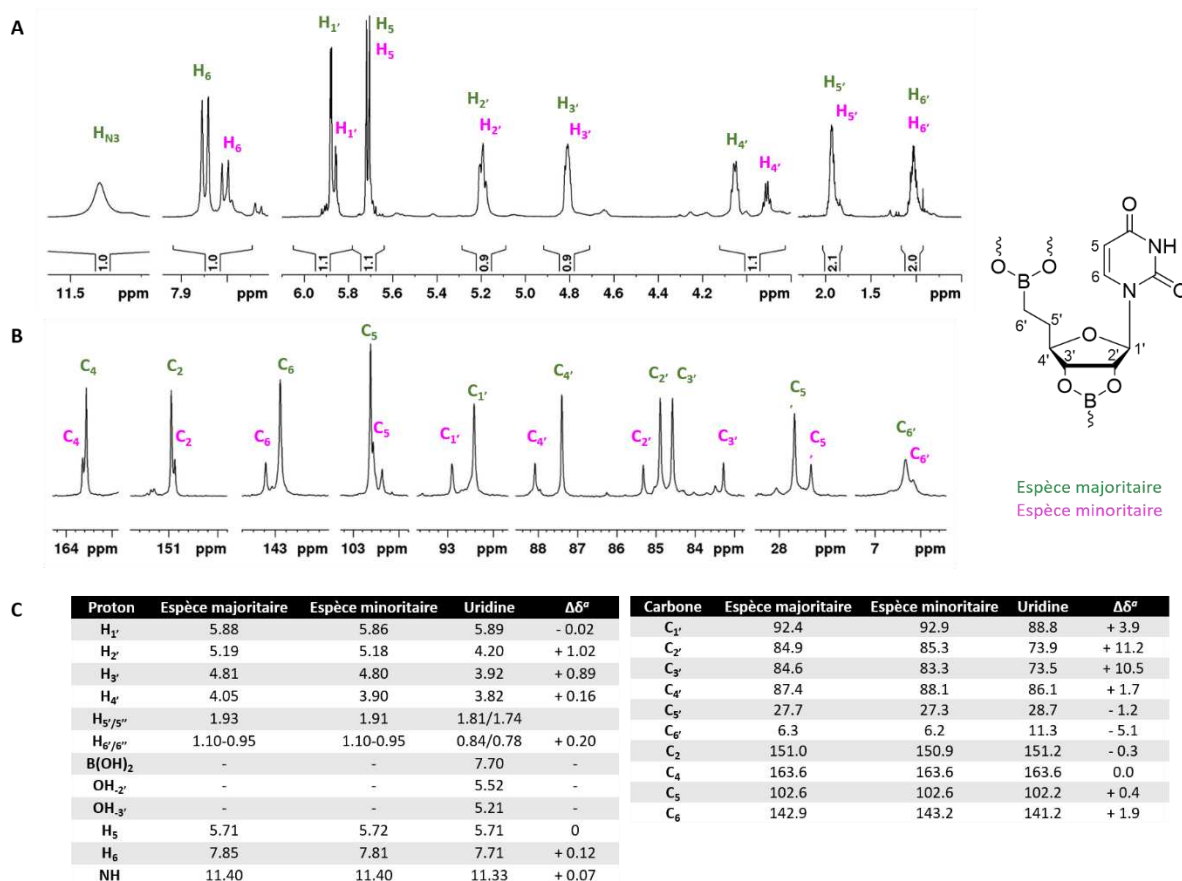


Figure 137 : Spectres RMN (A) ¹H et (B) ¹³C dans le DMF-d₇ anhydre. (C) Comparaison des déplacements chimiques obtenus avec ceux de l'uridine native. ^a écart entre les déplacements chimiques moyens obtenus pour les espèces liées et le déplacement chimique de l'uridine native.

Ainsi, ces premières observations, en accord avec les données de la littérature, démontrent la liaison entre les atomes d'oxygènes en positions 2' et 3' et l'atome de bore pour les deux structures coexistantes dans le DMF-d₇ anhydre.

4.2.3 Oligomérisation de la borono-uridine dans le DMF-d₇ en présence d'eau

La formation d'esters boronates étant défavorisée en milieu aqueux, des ajouts successifs de 5 μ L d'eau ont ensuite été effectués dans le but de provoquer la dissociation des deux espèces liées (Figure 138). Comme attendu, la première addition de 5 μ L d'eau provoque la disparition des deux signaux à 5,19 et 4,81 ppm correspondants respectivement aux protons H_{2'} et H_{3'} de

l'espèce liée. Ceux-ci sont remplacés par deux signaux décalés vers les champs forts (4,20 et 3,92 ppm) qui sont associés à ces mêmes protons de la forme libre. Les trois signaux caractéristiques des protons échangeables des hydroxyles du monomère apparaissent également à 7,70, 5,52 et 5,21 ppm. Après addition de 20 μL d'eau, la totalité des signaux correspondants à l'espèce liée a disparu au profit du monomère libre. La présence d'eau permet ainsi de dissocier les espèces liées, démontrant la réversibilité des liaisons covalentes formées.

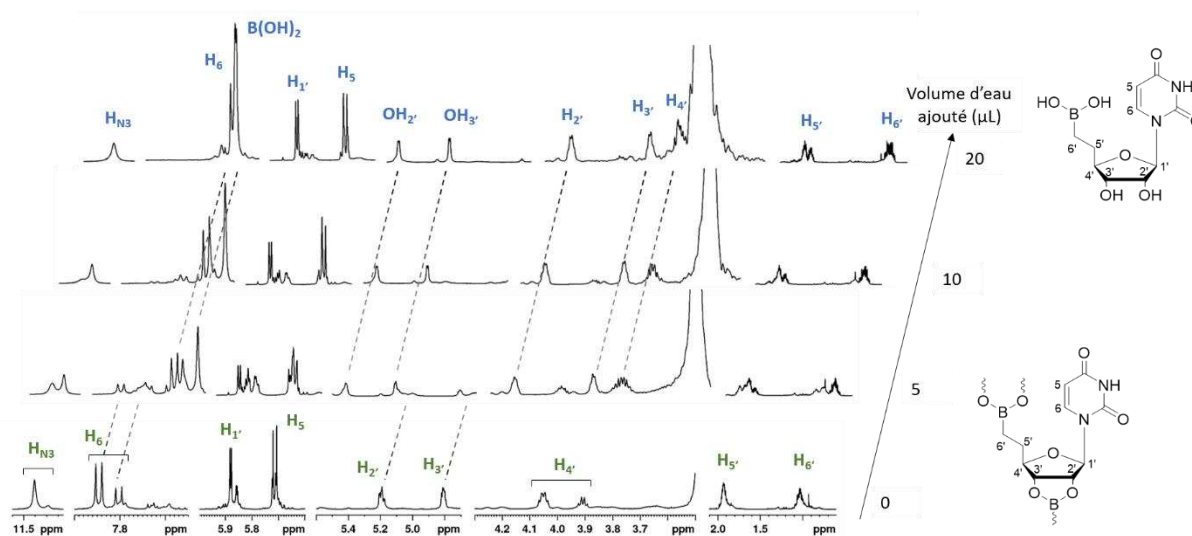


Figure 138 : Spectres RMN ^1H obtenus dans le DMF-d_7 anhydre avant et après ajout d'eau.

Le spectre RMN ^{11}B a également été enregistré dans le DMF-d_7 avant et après addition de l'eau dans le tube RMN en utilisant strictement les mêmes paramètres d'acquisition. Dans le DMF-d_7 anhydre, un large signal allant de 20 à 50 ppm est obtenu (Figure 139A) tandis qu'un signal fin caractéristique des acides boroniques est observé à 31,9 ppm après l'ajout d'eau (Figure 139B). L'atome de bore est un noyau quadripolaire ($I > 1/2$). La largeur du signal RMN est ainsi particulièrement sensible à la distribution des charges électriques dans le noyau,³⁹¹ c'est-à-dire due à son environnement mais aussi à la coordination et à la symétrie moléculaire autour du noyau. L'aplanissement du signal observé en milieu anhydre témoigne de la perte de symétrie autour du bore consécutive à la formation du cycle à cinq chaînons par liaison du bore avec les oxygènes en positions 2' et 3' du sucre. Ce phénomène est probablement accentué, bien que dans une moindre mesure, par le ralentissement des mouvements moléculaires de l'ester boronate par rapport au monomère.

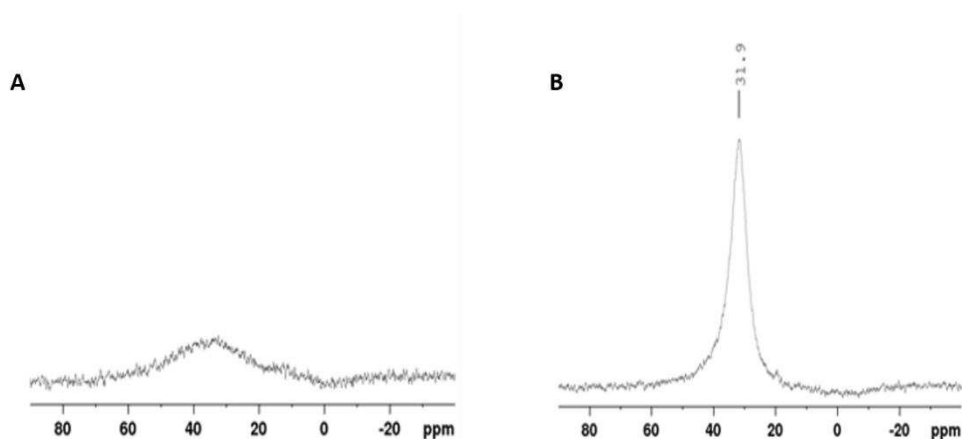


Figure 139 : Spectres RMN ^{11}B (A) dans le DMF-d_7 anhydre et (B) dans le DMF-d_7 en présence d'eau.

L'étude RMN a ainsi permis de démontrer la formation de deux espèces liées cycliques par la formation d'un ester boronate entre l'acide boronique en position 5' et les deux hydroxyles en positions 2' et 3'. Cependant, la structure exacte de ces deux espèces, et notamment la taille des cycles, n'a pu être déterminée de façon précise. Pour ce faire, les espèces liées ont été analysées par RMN DOSY ^1H .

4.2.4 Caractérisation des structures par RMN DOSY ^1H

4.2.4.1 Principe de la RMN DOSY ^1H

La RMN est aujourd'hui un outil indispensable pour la détermination structurale de composés. Ainsi, de nombreuses techniques ont été mises au point et, dans le cadre de ce projet, une des techniques relativement récentes appelée DOSY ^1H nous intéresse particulièrement car elle permet l'analyse précise d'un mélange de composés sans séparation préalable. En effet, cette expérience permet d'étudier le phénomène de diffusion, c'est-à-dire le mouvement translationnel aléatoire des particules soumises à de nombreuses collisions avec les molécules présentes dans le fluide environnant.³⁹² L'expérience consiste à collecter une série de spectres 1D dans lesquels les impulsions de gradient varient. Dans le cas où la diffusion est nulle, le gradient de champ n'a aucun effet sur l'aimantation. En revanche, si les molécules en solution subissent des mouvements aléatoires, l'intensité des signaux s'en trouve atténuée selon une décroissance exponentielle proportionnelle à l'intensité du gradient et du coefficient de diffusion. Le coefficient de diffusion étant inversement proportionnel au rayon hydrodynamique de la molécule, une petite molécule aura un coefficient de diffusion plus élevé qu'une grosse molécule. Les spectres pseudo-2D obtenus doivent ensuite être traités

informatiquement afin d'en extraire le coefficient de diffusion.³⁹³ Pour cela, deux méthodes différentes sont possibles. La première conduit à une carte DOSY pour laquelle les déplacements chimiques (δ) se trouvent en abscisse et les coefficients de diffusion (D) en ordonnée (Figure 140). Toutes les tâches correspondant à une même molécule sont alignées sur une même ligne, ce qui amène à comparer cette méthode à de la chromatographie. Ce traitement permet d'obtenir les résultats sous forme graphique mais la mesure du coefficient de diffusion est cependant peu précise.

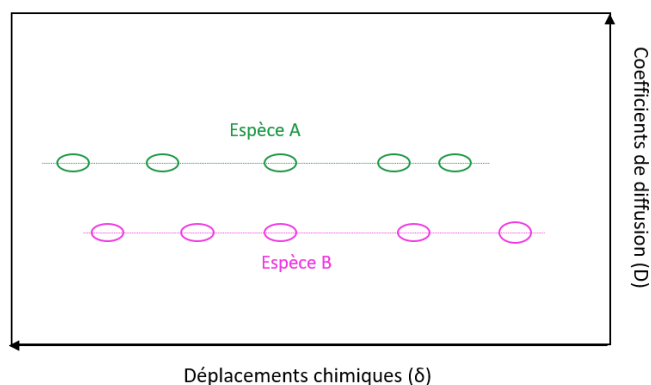


Figure 140 : Carte DOSY obtenue après traitement.

La seconde méthode consiste, pour chaque spectre 1D, à ajuster les paramètres de la fonction exponentielle décroissante (équation de Stejskal-Tanner) sur les données expérimentales.³⁹³ Une moyenne des différents coefficients de diffusion obtenus pour plusieurs pics permet ainsi de déterminer celui de la molécule considérée avec précision.

La technique de RMN DOSY ^1H constitue une méthode de choix pour l'analyse de mélanges complexes. En effet, elle permet d'obtenir les déplacements chimiques mais également des informations structurales et physico-chimiques telles que la taille de la molécule ou encore la formation d'agrégats ou de polymères. Celle-ci a ainsi été utilisée pour de nombreuses applications, notamment pour la caractérisation de nanomatériaux³⁹⁴ ou l'analyse de mélanges complexes³⁹⁵⁻³⁹⁷ et de médicaments.³⁹⁸ Dans ce projet, la DOSY ^1H permet de comparer les coefficients de diffusion des espèces formées dans le DMF- d_7 anhydre par auto-assemblage afin d'en déterminer la structure exacte.

4.2.4.2 Détermination de la structure par RMN DOSY ^1H

Les espèces liées ainsi que le monomère borono-uridine **37** ont ensuite été analysés par RMN DOSY ^1H . L'ensemble des analyses a été réalisé dans le DMF- d_7 anhydre excepté pour l'analyse du monomère où l'ajout d'un faible volume d'eau (4 %) a été nécessaire pour dissocier

les espèces.

L'expérience DOSY ^1H du monomère borono-uridine **37** dans le DMF- d_7 anhydre a tout d'abord été réalisée afin d'analyser le coefficient de diffusion des espèces liées formées par auto-assemblage. La carte DOSY confirme la présence de deux espèces différentes puisque les tâches sont réparties selon deux lignes distinctes et montre que les deux espèces possèdent des coefficients de diffusion relativement proches (Figure 141). Les coefficients de diffusion de chaque espèce ont ensuite été calculés par ajustement linéaire par rapport à la décroissance des signaux correspondant aux protons H_6 , H_1 et H_4 . La moyenne des différents coefficients de diffusion obtenus conduit à une valeur de $3,26 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ dans le cas de l'espèce majoritaire et de $2,81 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ pour l'espèce minoritaire. Ces derniers étant relativement élevés, cela indique que les deux espèces liées sont de petite taille.

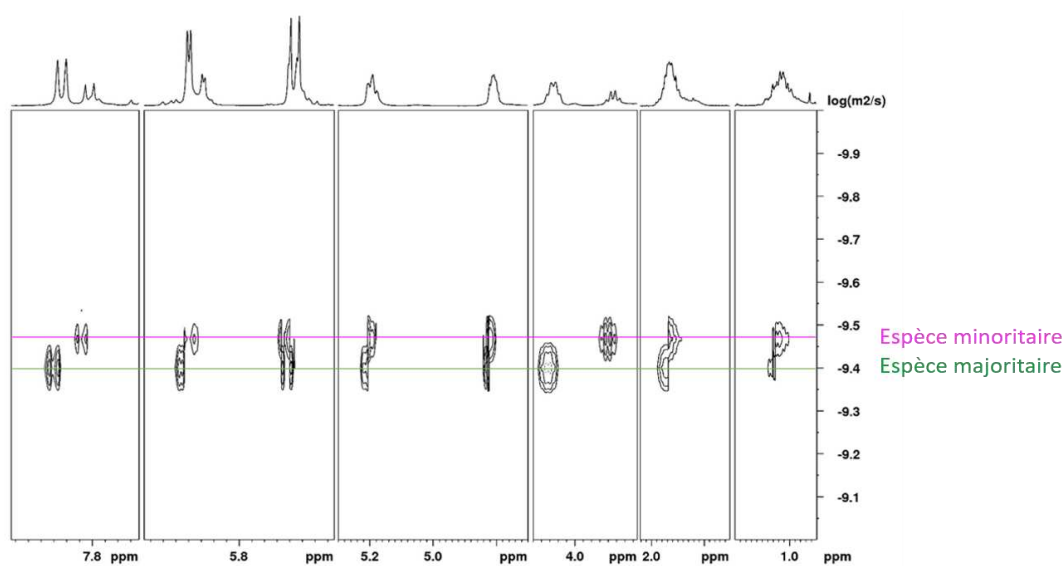


Figure 141 : Carte DOSY des espèces liées dans le DMF- d_7 anhydre.

Le coefficient de diffusion du monomère borono-uridine **37** a ensuite été déterminé en ajoutant un faible volume d'eau (4%) dans le tube RMN afin de dissocier les espèces liées au profit du monomère **37**. Nous admettons que la faible quantité d'eau ajoutée a peu d'impact sur la viscosité de la solution et de fait n'affecte pas les coefficients de diffusion de manière significative. Un coefficient de diffusion d'une valeur de $3,84 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ a été obtenu à partir de la moyenne des ajustements linéaires de la décroissance des signaux correspondant aux protons H_6 , H_1 et H_5 . Celui-ci étant plus élevé que ceux obtenus pour les espèces liées, cela indique que la molécule est plus petite que les espèces liées précédemment obtenues et confirme la dissociation des espèces liées en présence d'eau. Ainsi, ces résultats laissent penser à la

formation d'un dimère et d'un trimère cycliques ($c(U^{Bn}U^{Bn})$ et $c(U^{Bn}U^{Bn}U^{Bn})$; Figure 142).

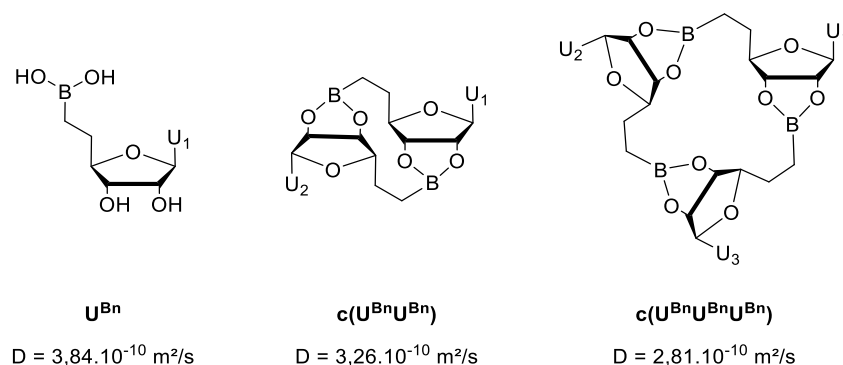


Figure 142 : Structure du monomère et des espèces liées formées dans le DMF- d_7 anhydre ainsi que leurs coefficients de diffusion respectifs.

Afin de valider ces résultats, les masses molaires approximatives des espèces liées ont été calculées. En effet, le coefficient de diffusion D dépend de la masse molaire, des propriétés hydrodynamiques (taille, forme, charges) et de l'environnement (solvant, température, état d'agrégation). Il permet ainsi de déterminer le rayon hydrodynamique de la molécule considérée, à condition que celles-ci soient sphériques, grâce à l'équation de Stokes-Einstein^{399,400} :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

D = coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ; k = constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) ; T = température (K) ; η = viscosité dynamique (Pa.s) ; R_H = rayon hydrodynamique (m).

Cependant, le rayon hydrodynamique correspond au rayon d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion et pour cela des molécules de solvant situées autour de la molécule considérée sont prises en compte. Celui-ci est donc supérieur au rayon exact de la molécule considérée. Il est toutefois possible de relier le rayon hydrodynamique à la masse molaire du soluté grâce à l'expression suivante⁴⁰¹ :

$$R_H = \sqrt[3]{\frac{3M}{4\pi\rho N_A}}$$

M = masse molaire ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) ; ρ = densité du soluté ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$) ; N_A = nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Ainsi, en considérant la nature polymérique des différents assemblages, il est possible d'estimer

la masse molaire à partir du ratio des coefficients de diffusion du monomère et de l'espèce considérée : ⁴⁰¹

$$\frac{M_i}{M_{\text{monomère}}} = \left(\frac{D_{\text{monomère}}}{D_i}\right)^3$$

Une masse de 467,6 g/mol est alors obtenue pour l'espèce majoritaire tandis que, dans le cas de l'espèce minoritaire, elle est de 730,1 g/mol. Cela confirme alors la formation des structures précédemment évoquées car les masses molaires exactes de ces structures cycliques sont de 500,2 et 750,0 g/mol respectivement (Tableau 15).

Tableau 15 : Comparaison des masses molaires des espèces.

	U ^{Bn}	c(U ^{Bn} U ^{Bn})		c(U ^{Bn} U ^{Bn} U ^{Bn})	
		Exacte	Calculée	Exacte	Calculée
M (g/mol)	286,1	467,6	500,2	730,1	750,0

Dans le but de confirmer les résultats précédemment obtenus, des dimères et trimères linéaires et cycliques ont été synthétisés puis analysés par RMN DOSY ¹H.

4.2.4.3 Analyse des dimères et trimères de référence par RMN DOSY ¹H

4.2.4.3.1 Synthèse des oligonucléotides

Les oligonucléotides linéaires ont été synthétisés par synthèse automatisée en utilisant la chimie classique des phosphoramidites tandis que pour les oligonucléotides cycliques la synthèse a été adaptée selon la méthode de Smietana et Kool.⁴⁰² Pour cette synthèse, un support CPG 3'-phosphate est utilisé afin de générer un phosphorothioate à l'extrémité 3' lors de la déprotection de l'oligonucléotide. La première étape consiste à coupler le support CPG 3'-phosphate avec le premier nucléotide par chimie classique des phosphoramidites puis une sulfuration par le 3*H*-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide (réactif de Beaucage) est réalisée pour conduire au thiophosphotriester (Figure 143).

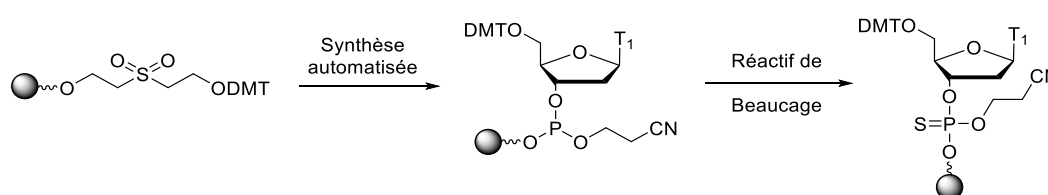


Figure 143 : Incorporation du premier nucléotide puis oxydation du lien par le réactif de Beaucage.

Le nucléotide suivant est incorporé par chimie classique des phosphoramidites en ajoutant une étape de détritylation à la fin du cycle de synthèse afin de déprotéger l'hydroxyle à l'extrémité 5' (Figure 144). Celui-ci subit ensuite une réaction d'iodation sur support par percolation avec de l'iodure de méthyltriphénoxyphosphonium à température ambiante pendant 15 minutes.²⁶⁸

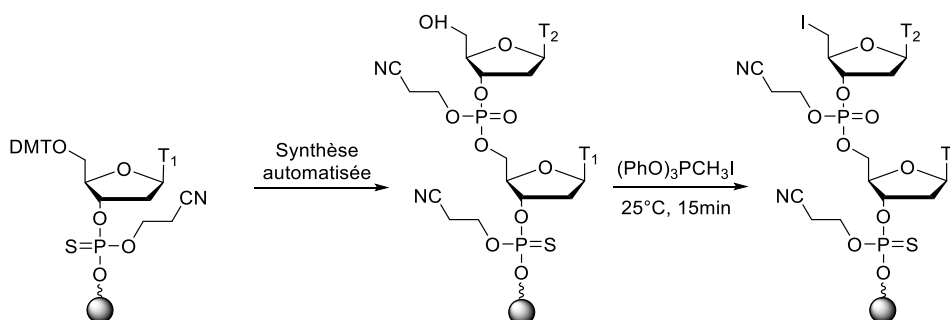


Figure 144 : Incorporation du second nucléotide puis iodation de l'extrémité 5'.

La déprotection de l'oligonucléotide par un traitement ammoniacal pendant 24 heures à température ambiante permet ensuite de déprotéger les groupements phosphates et couper l'oligonucléotide du support par une réaction de β -élimination (Figure 145). Enfin, une réaction de substitution nucléophile entre le soufre, plus nucléophile que l'oxygène, à l'extrémité 3' et l'iode inséré à l'extrémité 5' entraîne la cyclisation instantanée du dimère pour conduire au dimère cyclique **ODN65**. Le même protocole a été appliqué pour la synthèse du trimère cyclique **ODN66**.

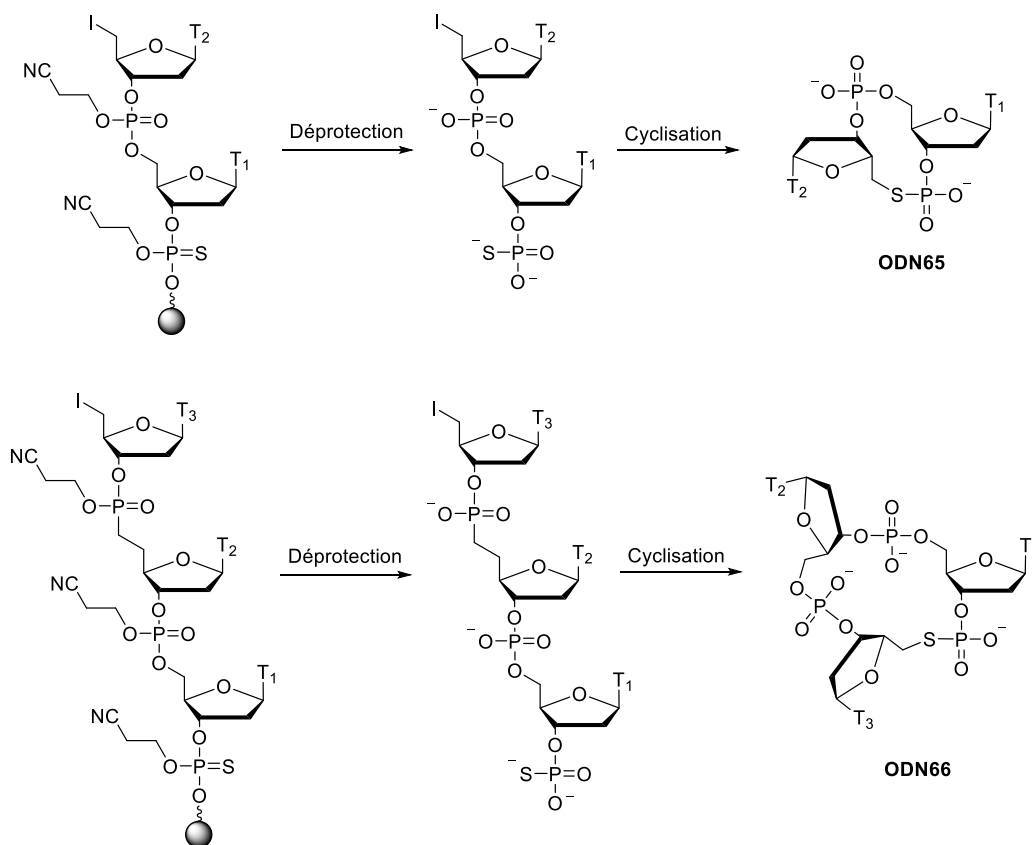


Figure 145 : Déprotection puis cyclisation des oligonucléotides **ODN65** et **ODN66**.

4.2.4.3.2 Analyse des oligonucléotides synthétisés par RMN DOSY ^1H

Les dimères et trimères linéaires ont d'abord été analysés par DOSY ^1H dans le DMF- d_7 anhydre afin de pouvoir comparer leurs coefficients de diffusions avec ceux obtenus dans le cas des espèces liées. L'expérience RMN DOSY ^1H réalisée sur le dinucléotide UU (**ORN12**) à partir de la décroissance des signaux attribués aux protons H_{6a} , $\text{H}_{1'a}$ et H_{5a} conduit à une valeur moyenne de D de $3,18 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Concernant le trinucléotide UUU (**ORN13**), elle a été effectuée à partir des signaux correspondants aux protons H_{6a} , $\text{H}_{1'a}$ et H_{4a} et une valeur moyenne de D de $2,96 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ est obtenue. Les coefficients de diffusion calculés pour les deux oligonucléotides linéaires sont relativement proches respectivement de ceux obtenus pour les espèces liées, ce qui suggère que ces dernières sont bien formées par l'assemblage de deux et trois unités respectivement.

Les coefficients de diffusion des oligonucléotides cycliques ont ensuite été déterminés. Une valeur moyenne de D de $3,29 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ est obtenue dans le cas du dimère cyclique **ODN65** à partir de la décroissance des signaux correspondants aux protons H_{6a} , $\text{H}_{1'a}$ et $\text{H}_{1'b}$. Concernant le trimère cyclique **ODN66**, une valeur moyenne de D de $2,86 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ est obtenue à partir

des signaux attribués aux protons H_{6a}, H_{6b} et H_{1'a}. Les coefficients de diffusion obtenus pour les dimères et trimères cycliques sont bien plus proches de ceux calculés pour les espèces liées que ceux des oligonucléotides de référence linéaires (Tableau 16). Ces résultats confirment donc la formation de dimères et trimères cycliques ($c(U^{Bn}U^{Bn})$ et $c(U^{Bn}U^{Bn}U^{Bn})$).

Tableau 16 : Comparaison des coefficients de diffusion D moyens obtenus par RMN DOSY ¹H.

	U^{bn} (37)	c(U^{bn}U^{bn})	c(U^{bn}U^{bn}U^{bn})	ORN12 (UU)	ORN13 (UUU)	ODN65 c(TT)	ODN66 c(TTT)
D (m ² /s)	3,84.10 ⁻¹⁰	3,26.10⁻¹⁰	2,81.10⁻¹⁰	3,19.10 ⁻¹⁰	2,96.10 ⁻¹⁰	3,29.10⁻¹⁰	2,86.10⁻¹⁰

Grâce à l'ensemble de ces résultats, les deux espèces formées par auto-assemblage dans le DMF-d₇ anhydre à partir du monomère borono-uridine **37** ont pu être caractérisées. Une étude des constantes de couplage a ensuite été réalisée afin de déterminer la conformation du résidu ribose des nucléosides impliqués.

4.2.5 Étude de la conformation du résidu ribose

Le résidu ribose des ribonucléosides présente une structure plissée qui peut subir des déformations en fonction de l'encombrement stérique, des effets stéréoélectroniques, des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires ou encore des interactions π - π . La forme privilégiée des nucléosides est celle pour laquelle les atomes de carbone C_{1'} et C_{4'} ainsi que l'atome d'oxygène sont coplanaires tandis que les atomes de carbone C_{2'} et C_{3'} sont hors du plan. Ainsi, il existe deux conformations majoritaires en équilibre : la C_{2'}-endo, pour laquelle le carbone C_{2'} est au-dessus du plan, et la C_{3'}-endo, pour laquelle le carbone C_{3'} est au-dessus du plan (Figure 146A). Les différentes conformations du nucléoside sont ainsi définies par les angles de torsion endocycliques (Φ) dont l'amplitude maximum (Φ_m) traduit la sortie du plan des atomes (Figure 146B).⁴⁰³ La connaissance de ces angles de torsion permet ensuite de déterminer l'angle de phase de pseudorotation (P) selon l'équation suivante :

$$\tan P = \frac{(\Phi_2 + \Phi_4) - (\Phi_1 + \Phi_3)}{3,077\Phi_0}$$

Ainsi, à chaque valeur de P est associée une conformation donnée, ce qui peut être traduit à travers un cercle trigonométrique de pseudorotation (Figure 146C). La conformation C_{2'}-endo dont le paramètre P est de 162° est alors qualifiée de conformation Sud tandis que la conformation C_{3'}-endo, pour laquelle le paramètre P est de 18°, est appelée conformation Nord.

Dans le cas des oligonucléotides, l'angle de phase pseudorotation P ainsi que l'amplitude maximum Φ_m peuvent être reliés aux constantes de couplages entre les protons du cycle ribose, à savoir ${}^3J_{1'-2'}$, ${}^3J_{2'-3'}$ et ${}^3J_{3'-4'}$ (Figure 146A). En effet, pour une conformation $C_{2'-endo}$, les valeurs typiques sont autour de 8-10 Hz pour ${}^3J_{1'-2'}$ et 1-2 Hz pour ${}^3J_{3'-4'}$ tandis que ces valeurs sont inversées dans le cas d'une conformation $C_{3'-endo}$.⁴⁰⁴ La conformation du résidu ribose n'a cependant que peu d'effet sur la constante de couplage ${}^3J_{2'-3'}$, dont la valeur est d'environ 5 Hz dans le cas d'une conformation $C_{2'-endo}$ ou $C_{3'-endo}$. En revanche, l'augmentation de la constante ${}^3J_{2'-3'}$ indique une diminution de Φ_m due soit à un aplatissement du ribose soit à une conformation autre que celles évoquées précédemment.

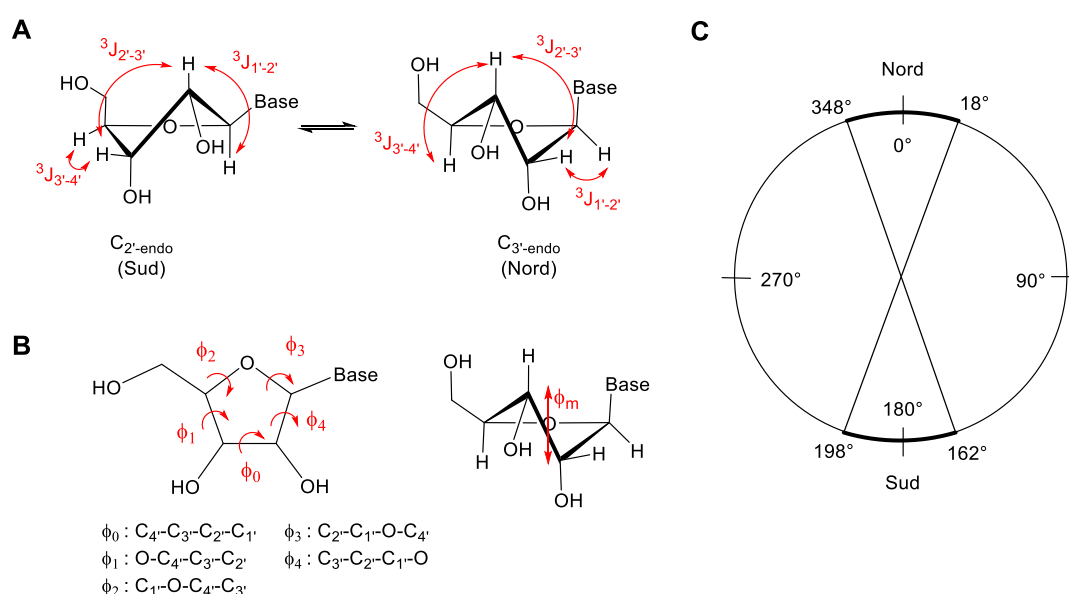


Figure 146 : Représentation (A) des conformations $C_{2'-endo}$ et $C_{3'-endo}$, (B) des angles de torsions endocycliques et (C) du cercle trigonométrique de pseudorotation.

Les valeurs de ces constantes de couplage ont tout d'abord été déterminées expérimentalement pour le monomère borono-uridine **37** dans le D_2O et sont comparables à celles reportées pour l'uridine libre⁴⁰⁵ qui est en équilibre entre les conformations $C_{2'-endo}$ et $C_{3'-endo}$ (Tableau 17, entrée 1). Des valeurs du même ordre de grandeur sont obtenues lorsque le monomère est placé dans le $DMF-d_7$ contenant 4% d'eau. D'autre part, la présence de l'acide boronique libre en position 5' n'affecte pas de manière significative la conformation du résidu ribose dans le monomère, comme en attestent les faibles variations de constantes de couplage (Tableau 17, entrée 2). En revanche, dans le $DMF-d_7$ anhydre le monomère s'auto-assemble pour former le dimère $c(U^{Bn}U^{Bn})$ et le trimère $c(U^{Bn}U^{Bn}U^{Bn})$ et les constantes de couplage se trouvent alors fortement impactées (Tableau 17, entrées 3 et 4). En effet, bien que la constante de couplage

$^3J_{3',4'}$ varie peu (5,1 Hz au lieu de 5,4 Hz dans le cas du monomère), nous pouvons remarquer une diminution conséquente de la constante de couplage $^3J_{1',2'}$ (3,2 Hz pour le dimère $c(U^{Bn}U^{Bn})$ et 2,5 Hz pour le trimère $c(U^{Bn}U^{Bn}U^{Bn})$). A l'inverse, la constante de couplage $^3J_{2',3'}$, classiquement autour de 5 Hz dans le cas d'une conformation $C_{2'-endo}$ ou $C_{3'-endo}$, est nettement augmentée (7,8 Hz pour le dimère), indiquant une conformation atypique ou un aplanissement du résidu ribose. Ces variations de constantes de couplage pour les espèces liées témoignent du changement de conformation des sucres induit par la formation de la liaison entre l'acide boronique et les hydroxyles en positions 2' et 3'.

Tableau 17 : Constantes de couplages mesurées à partir du spectre RMN 1H .

Entrée	U^{Bn}	Solvant	$^3J_{1',2'}$ (Hz)	$^3J_{2',3'}$ (Hz)	$^3J_{3',4'}$ (Hz)
1	Monomère (37)	D ₂ O	4,7 (4,4 ^a)	5,0 (5,3 ^a)	5,4 (5,5 ^a)
2	Monomère (37)	DMF-d ₇ + 4 % d'eau	5,3	5,3	-
3	Dimère	DMF-d ₇ anhydre	3,2	7,8	5,1
4	Trimère	DMF-d ₇ anhydre	2,5	-	-

^a Valeurs des constantes de couplage pour l'uridine native d'après Blackburn et al.⁴⁰⁵

Les constantes de couplage observées sur le spectre RMN 1H correspondent à une moyenne des mouvements du cycle car en milieu liquide le ribose est généralement en équilibre permanent entre différentes conformations. Il est donc difficile de remonter aux angles de torsion de façon fiable et précise. Les constantes de couplage peuvent cependant être calculées en combinant l'équation de Karplus avec les relations empiriques qui relient les angles de torsion aux paramètres P et Φ et qui ont été établies par Haasnoot et Altona⁴⁰³ (Tableau 18). Les calculs ont d'abord été réalisés en faisant l'hypothèse d'une conformation exclusivement $C_{3'-endo}$ ($P_N = 18^\circ$ et $\Phi_N = 37^\circ$) ou $C_{2'-endo}$ ($P_S = 162^\circ$ et $\Phi_S = 37^\circ$). Dans les deux cas, la déviation entre les constantes de couplages expérimentales et calculées est importante (2,87 Hz et 3,80 Hz respectivement ; Tableau 18, entrées 1 et 2). Les paramètres P et Φ ont ensuite été optimisés de sorte à atteindre la déviation la plus faible possible, en se basant également sur le modèle d'une unique conformation. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des valeurs de $P_N = 52^\circ$ et $\Phi_N = 9^\circ$ (déviation de 0.21 Hz ; Tableau 18, entrée 3), ce qui correspond à une conformation $C_{4'-exo}$ pour laquelle l'atome d'oxygène et les atomes de carbone $C_{1'}$, $C_{2'}$ et $C_{3'}$ sont dans le même plan tandis que l'atome de carbone $C_{4'}$ est en-dessous du plan. Pour finir, les calculs ont été réalisés sur la base d'un modèle à deux conformations symétriques $C_{2'-endo}$ et $C_{3'-endo}$, la population de chaque espèce étant définie par la fraction molaire X_N du conformère Nord. La valeur de l'amplitude maximale Φ_m a tout d'abord été fixée à 37° avec $P_N = 18^\circ$ et $P_S = 162^\circ$.

Les constantes de couplage calculées étant trop éloignées des valeurs expérimentales (déviations de 1,62 Hz ; Tableau 18, entrée 4), la valeur de l'amplitude maximale Φ_m a alors été optimisée et une déviation de seulement 0,14 Hz a été obtenue pour une valeur de Φ_m égale à 15° (Tableau 18, entrée 5).

Tableau 18 : Constantes de couplage calculées pour le dimère.

Entrée	P_N (°)	Φ_N (°)	P_S (°)	Φ_S (°)	X_N	${}^3J_{1'-2'}$ (Hz)	${}^3J_{2'-3'}$ (Hz)	${}^3J_{3'-4'}$ (Hz)	Déviations ^a (Hz)
1	18	37	-	-	-	1,20	5,14	8,79	2,87
2	-	-	162	37	-	7,85	5,20	1,24	3,80
3	52	9	-	-	-	3,13	8,15	5,12	0,21
4	18	37	162	37	0,6	3,86	5,16	5,77	1,62
5	18	15	162	15	0,7	3,06	7,66	4,97	0,14

$$^a \text{Déviation} = \sqrt{((\Delta^3 J_{1'-2'})^2 + (\Delta^3 J_{2'-3'})^2 + (\Delta^3 J_{3'-4'})^2)}/3$$

L'ensemble des résultats, issus de calculs mathématiques à partir d'optimisation des paramètres Φ et P sur la base de seulement trois constantes de couplage, ne permettent pas d'être catégorique quant à l'existence d'une unique conformation $C_{4'-exo}$ figée ou d'un système plus flexible en équilibre entre deux formes Nord et Sud. Ils permettent cependant de souligner que la formation du dimère conduit à une déformation du résidu ribose qui ne correspond plus à la conformation typique observée dans les acides nucléiques et s'accompagne d'une forte diminution de l'amplitude du plissement du résidu ribose. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature. En effet, des nucléosides liés au niveau des positions 2' et 3' ont été rapportés dans la littérature et il a été démontré que la structure à l'état liquide était différente de celle observée à l'état cristallin.⁴⁰⁶ Ainsi, à l'état solide le nucléoside possède une conformation $C_{2'-endo}$ ($\Phi_m = 23^\circ$) tandis qu'en solution un équilibre entre les conformations $C_{2'-endo}$ et $C_{3'-endo}$ est observé. Des résultats similaires ont également été démontrés dans le cas de nucléosides comportant un phosphate cyclique en positions 2' et 3'.^{407,408} La formation d'un cycle à cinq chaînons au niveau des positions 2' et 3' entraîne une déformation du ribose et l'amplitude maximale est alors considérablement réduite ($\Phi_m = 17-32^\circ$) par rapport aux nucléosides et nucléotides non modifiés ($\Phi_m = 39^\circ$).⁴⁰⁹ Mais la formation d'un cycle à 5 atomes accolé en 2'-3' ne fige pas pour autant le système dans une unique conformation. Cependant, dans le cas des espèces liées obtenues lors de notre étude dans le DMF-d₇ anhydre, une contrainte supplémentaire est imposée par la formation d'un cycle à 12 chaînons formé par l'assemblage des deux unités monomériques qui pourrait limiter la liberté de mouvement entre

les deux conformations.

Afin de valider l'ensemble des résultats obtenus par étude RMN, une étude de modélisation moléculaire est actuellement en cours, en collaboration avec le Dr. Ivan Barvik de l'Institut de Physique de l'université de Prague en République Tchèque.

Les deux espèces formées ont ainsi pu être caractérisées en solvant organique mais l'ester boronate est également capable de se former en milieu aqueux. En effet, une augmentation du pH de la solution permet de déplacer l'équilibre vers la formation de l'ester boronate par complexation d'un anion hydroxyle dans l'orbitale p vacante de l'atome de bore. Ainsi, le monomère borono-uridine **37** a dans un premier temps été caractérisé dans le D₂O sans modification du pH acide puis celui-ci a été augmenté progressivement afin de tenter d'observer la formation des ester boronates.

4.3 Auto-assemblage de la borono-uridine en milieu aqueux

Le spectre RMN ¹H du monomère borono-uridine **37** en solution dans le D₂O à un pD de 6,5 (pD = pH_{tu} + 0,4) pour défavoriser le phénomène d'auto-assemblage démontre une seule série de signaux (Figure 147, pD 6,5). La formation d'ester boronate en milieux aqueux étant connue pour être favorisée en conditions basiques, le monomère borono-uridine **37** a ensuite été soumis à des variations de pD afin d'évaluer sa capacité d'auto-assemblage. Pour cela, de faibles volumes d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium deutéré ont été ajoutés successivement dans le milieu. Ainsi, l'augmentation du pD de la solution entraîne un élargissement de l'ensemble des signaux observés sur le spectre RMN ¹H. À partir d'une valeur de pD de 7,5, de nouveaux signaux apparaissent et notamment un autour de 0,30 ppm attribuable au proton H_{6'} dont le blindage est caractéristique du changement d'hybridation de l'atome de bore. De plus, le signal vers 4,5 ppm pourrait correspondre au proton H_{2'} ou H_{3'} déblindé par le lien boronate.

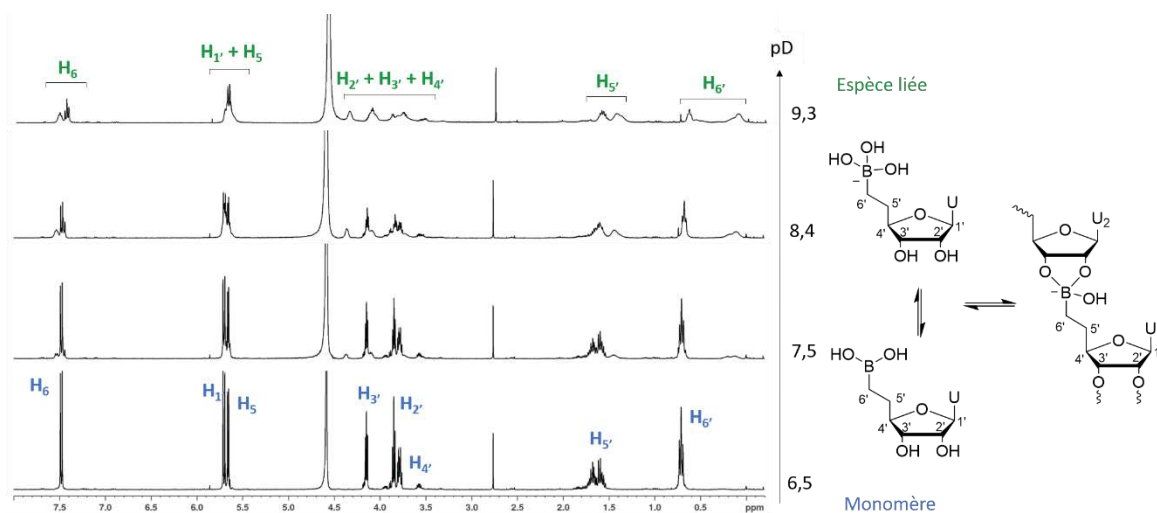


Figure 147 : Spectres RMN ^1H dans la borono-uridine dans le D_2O en fonction du pD.

Le spectre RMN ^1H ne permet pas une analyse fine comme dans le DMF-d_7 anhydre, la largeur des raies témoignant d'une vitesse d'échange entre les espèces plus rapide que dans le solvant organique. En revanche, puisque les carbones C_2' et C_3' sont également fortement impactés par la formation de l'ester boronate, une expérience de type HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) a été réalisée afin de confirmer l'hypothèse d'un auto-assemblage en conditions basiques (Figure 148). La carte 2D montre clairement un dédoublement des pics dans la région correspondant aux carbones C_2' et C_3' (70-80 ppm) car une différence de 10 ppm est observée sur l'axe vertical correspondant aux déplacements chimiques des carbones. De plus, les signaux à 4,27 et 4,54 ppm ont été clairement identifiés comme étant ceux des protons H_2' et H_3' des espèces liées dont l'oxygène est impliqué dans la liaison avec l'atome de bore. Le retour du pD à la valeur de 6,5 entraîne l'obtention d'un spectre RMN ^1H identique à celui d'origine, ce qui exclut toute possibilité de dégradation du monomère lors du passage en milieu basique.

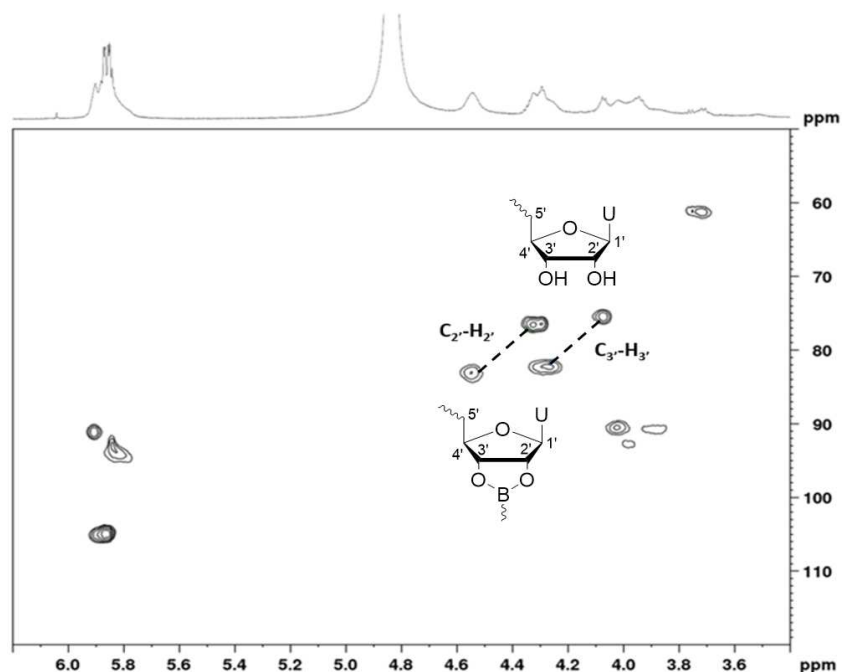


Figure 148: Spectre RMN ^1H - ^{13}C hétéronucléaire du monomère borono-uridine dans le D_2O à pD 9,3.

Cette étude a ainsi permis de confirmer l'auto-assemblage du monomère borono-uridine **37** en milieu aqueux basique à travers la formation de liaisons de type ester boronate ainsi que la nature réversible de ces nouvelles jonctions.

4.4 Conclusion du chapitre 4

Cette étude par RMN nous a ainsi permis de mettre en évidence la capacité d'auto-assemblage du monomère borono-uridine **37**. Une première étude dans le DMF-d_7 anhydre a tout d'abord démontré l'absence des signaux caractéristiques du monomère, tels que les protons échangeables, ainsi que l'apparition de deux séries de signaux. L'écart entre les déplacements chimiques de ces nouvelles structures et ceux du monomère a ainsi mis en évidence la liaison de l'atome de bore avec les hydroxyles situés en positions 2' et 3'. La réversibilité de ce système a ensuite été démontrée par l'ajout de faibles quantités d'eau permettant la dissociation des deux entités au profit du monomère. Cette réversibilité a été confirmée par l'analyse du spectre RMN ^{11}B dans le DMF-d_7 anhydre ainsi qu'en présence d'eau. Le monomère borono-uridine ainsi que les deux espèces liées ont ensuite été analysées par RMN DOSY ^1H afin de déterminer leur coefficient de diffusion. Les deux espèces liées ont ainsi été identifiées comme étant un dimère et trimère cycliques. Une étude des constantes de couplage nous a permis de déterminer la conformation du ribose. Il apparaît ainsi deux possibilités. La première conformation serait en équilibre entre une conformation Nord et Sud et la seconde serait une conformation unique C_4 .

exo. Des études de modélisation sont actuellement en cours pour valider ou non ces résultats. L'aptitude du monomère borono-uridine à s'auto-assembler en milieu aqueux par formation d'un ester boronate a également pu être mise en évidence en milieu basique par la stabilisation de l'anion hydroxyboronate.

La formation de structures cycliques est intéressante car, de la même façon que pour les assemblages organiques covalents, cela pourrait être utilisé pour capter une molécule par coordination ou par des interactions faibles de types liaisons hydrogène. De nouveaux systèmes de détection ou de transport de petites molécules pourraient ainsi être développés. De plus, les deux structures formées possèdent deux tailles de cavités différentes et pourraient être différenciées de par leur capacité à encapsuler une molécule de taille donnée. Pour cela, des études supplémentaires de modélisation moléculaire seraient nécessaires. Ce type de structure pourrait également être utilisé pour des applications de catalyse asymétrique, comme cela a récemment été démontré avec des dinucléotides cycliques.⁴¹⁰

D'autre part, il serait intéressant d'utiliser une matrice polyadénosine afin de favoriser l'auto-assemblage grâce à la complémentarité des nucléobases. En effet, l'hybridation entre deux brins est régit par des interactions faibles non covalentes de type liaison hydrogène ou interaction π - π tandis que l'auto-assemblage du monomère borono-uridine met en jeu des interactions covalentes relativement stables. Une simple augmentation de la température pourrait ainsi permettre la dénaturation du double brin sans affecter la structure formée par auto-assemblage. Par conséquent, des structures plus longues et linéaires pourraient être obtenues. De plus, la diversification des monomères (borono-adénosine, -cytidine et -guanosine) permettrait la formation de nouveaux biomatériaux semblables à ceux formés naturellement par les séquences d'ARN.

Enfin, l'ajout d'un ion métallique tel que l'ion Hg^{2+} pourrait favoriser l'auto-assemblage du monomère. En effet, de nombreuses études ont démontré la formation de paires de bases T-Hg-T stabilisées thermodynamiquement par interaction de coordination entre l'ion métallique et l'amine N3 des nucléobases.^{411,412}

**Chapitre 5 : Formation de nouveaux
liens internucléosidiques de type
oxazaborolidines**

5.1 Introduction et contexte

Le transfert de l'information génétique repose sur des processus de sélection, d'amplification et de correction résultant de l'auto-organisation des acides nucléiques. De nombreux groupes de recherche ont ainsi étudié ces systèmes dans le but de développer des méthodes de ligation d'oligonucléotides ayant pour objet de mimer le mode d'action des enzymes, notamment des ligases et polymérases. Pour cela, contrairement aux processus naturels où les extrémités 3' et 5' comportent respectivement un hydroxyle et un phosphate, celles-ci doivent généralement être modifiées chimiquement (Figure 149A). Les deux brins sont ainsi capables de réagir ensemble pour former un unique brin, comportant un nouveau lien internucléosidique naturel ou modifié comme cela a été démontré dans le cas des liens internucléosidiques modifiés de type phosphorothioester pour la synthèse d'oligonucléotides linéaires.^{137,413-415} Dans ce cas, l'hydroxyle à l'extrémité 5' du premier brin est remplacé par un groupement partant tel qu'un atome d'iode ou un groupement tosyle puis un phosphorothioate est inséré à l'extrémité 3' du second brin. Lorsque les deux brins sont en présence, les deux extrémités modifiées réagissent instantanément par substitution nucléophile. Cette méthode a également permis de synthétiser des oligonucléotides cycliques comme cela a été démontré dans le Chapitre 4 (paragraphe 4.2.4.3.1, p177).⁴⁰² Ces réactions de ligations dirigées par une matrice d'ADN ou d'ARN ont pu être réalisées au travers de réactions de transestérification,¹⁹⁵ amination réductrice⁴¹⁶ ou encore par la formation d'un hydrazone.¹⁴⁷ L'insertion d'un lien internucléosidique modifié a également été utilisée dans le cas de brins complémentaires pour former des structures en épingle à cheveux.⁴¹⁷ Lors de l'étape de reconnaissance, l'hybridation des deux brins complémentaires augmente la molarité effective des fonctions chimiques réactives situées aux extrémités et de fait facilite la ligation covalente entre les deux brins. Cette méthode a notamment été utilisée pour la synthèse stéréosélective d'acides nucléiques⁴¹⁸ ou dans le cas des split aptamères pour bloquer les deux fragments en une conformation active à travers une réaction d'amination réductrice ou de CuAAC comme cela a été décrit dans le cadre du Chapitre 1 (paragraphe 1.2.3, pages 36-36).^{139,141} Toutefois, la méthode qui semble la plus efficace repose sur la ligation assistée par une matrice (Figure 149B).^{419,420} L'hybridation de deux courts oligonucléotides avec un brin matrice complémentaire permet de faciliter le rapprochement des brins portant les fonctions chimiques réactives à leur extrémité. Ces méthodes permettent ainsi de générer de nouveaux liens internucléosidiques naturels⁴²¹⁻⁴²⁴ ou modifiés.^{425,426,137} Un des liens modifiés très largement utilisé est le triazole. En effet, la réaction de CuAAC est simple à mettre en œuvre, très efficace et nécessite des conditions relativement douces. El-Sagheer *et al.*

ont démontré que celui-ci peut être utilisé pour des applications nanotechnologiques et biologiques, notamment dans le cadre des ribozymes où l'activité catalytique est maintenue en présence du lien internucléosidique modifié.⁴²⁷ Le lien triazole a également été utilisé pour des réactions de cyclisation d'ADN⁴²⁸ ainsi que pour le développement de sondes fluorescentes.⁴²⁹ Des liens internucléosidiques réversibles ont également été développés par photoligation à travers une réaction de cycloaddition [2+2] pour la détection d'acides nucléiques.⁴³⁰⁻⁴³⁴ Les deux brins sont alors modifiés par une fonction alcène aux extrémités 3' et 5' respectivement et, après hybridation avec l'oligonucléotide à détecter et irradiation UV, les deux brins sont capables de réagir entre eux pour former un unique brin. D'autres exemples de ligation chimique non enzymatique ont également été décrits par cycloaddition de Diels-Alder,⁴³⁵ aldolisation,⁴³⁶ thioesterification⁴³⁷ ou encore par la formation d'une imine⁴³⁸ ou d'une amide.^{439,440}

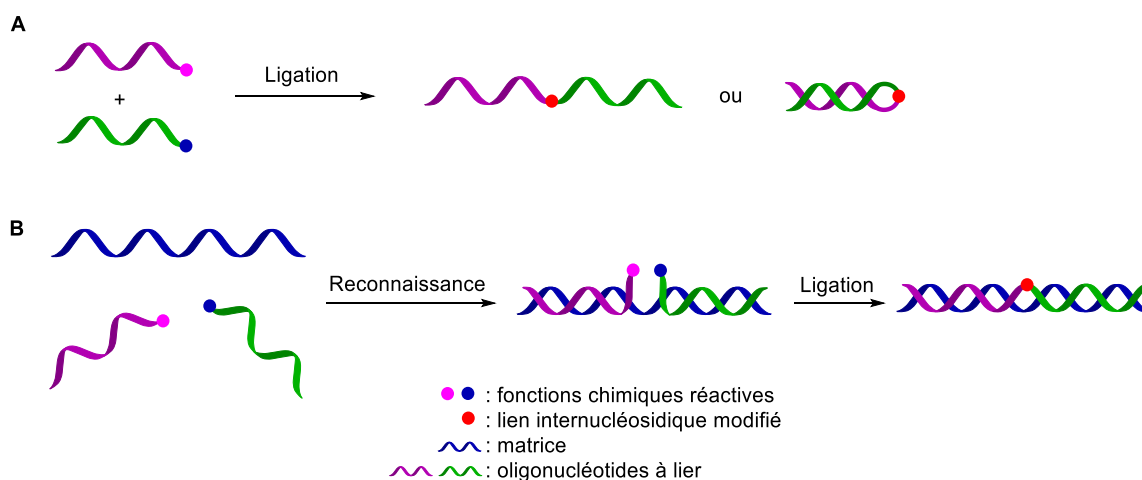


Figure 149 : Ligation chimique d'oligonucléotides non-enzymatique (A) en l'absence ou (B) en présence d'une matrice.

Parmi l'ensemble des liens internucléosidiques modifiés existants, le laboratoire s'est intéressé à l'insertion d'un lien de type ester boronate permettant de former une jonction covalente et réversible sous l'action d'un stimulus externe tel que le pH. Un système dynamique et programmable basé sur ce type de jonction a ainsi été développé par Martin *et al.* en fonctionnalisant l'extrémité 5' par une borono-thymidine T^{Bn} et l'extrémité 3' par un ribonucléotide (Figure 150A).¹⁰ Classiquement, les systèmes utilisant des acides nucléiques sont analysés par gel d'électrophorèse or dans ce cas le lien de type ester boronate n'est pas suffisamment stable en conditions dénaturantes pour pouvoir être visualisé. Il a donc été choisi d'utiliser une autre technique d'analyse qui est la dénaturation thermique suivie par

spectrophotométrie UV. Cette technique spectrophotométrique permet de comparer la stabilité des duplexes d'ADN ou d'ARN à partir de leur température de demi-fusion (T_m), c'est-à-dire la température pour laquelle la moitié des brins est sous forme de simples brins tandis que l'autre moitié est sous forme de double brins. Pour cela, la température est diminuée de 90 à 0°C pour hybrider les brins puis augmentée de 0 à 90°C, induisant la dénaturation du duplex par suppression des liaisons hydrogène de Watson-Crick entre les deux brins et déstacking des nucléobases. L'augmentation ou la diminution de l'empilement aromatique entre les nucléobases provoque une variation de l'absorbance du système. Le tracé de l'absorbance en fonction de la température conduit à l'obtention d'une courbe sigmoïdale dont la dérivée première permet de déterminer la température de demi-fusion du duplex. Dans le cas des systèmes étudiés dans ce chapitre, deux températures de transitions sont observées, T_{m1} étant la température de transition la plus basse et T_{m2} la plus élevée (Figure 150B). Les deux demi-brins ont alors été conçus afin que les deux températures de transition soient suffisamment différentes pour pouvoir observer l'influence de l'introduction d'une fonction acide boronique. La réaction de ligation entre les deux demi-brins modifiés est ainsi observée par une augmentation de la température de demi-fusion la plus basse, la seconde valeur n'étant pas affectée par la formation de l'ester boronate.

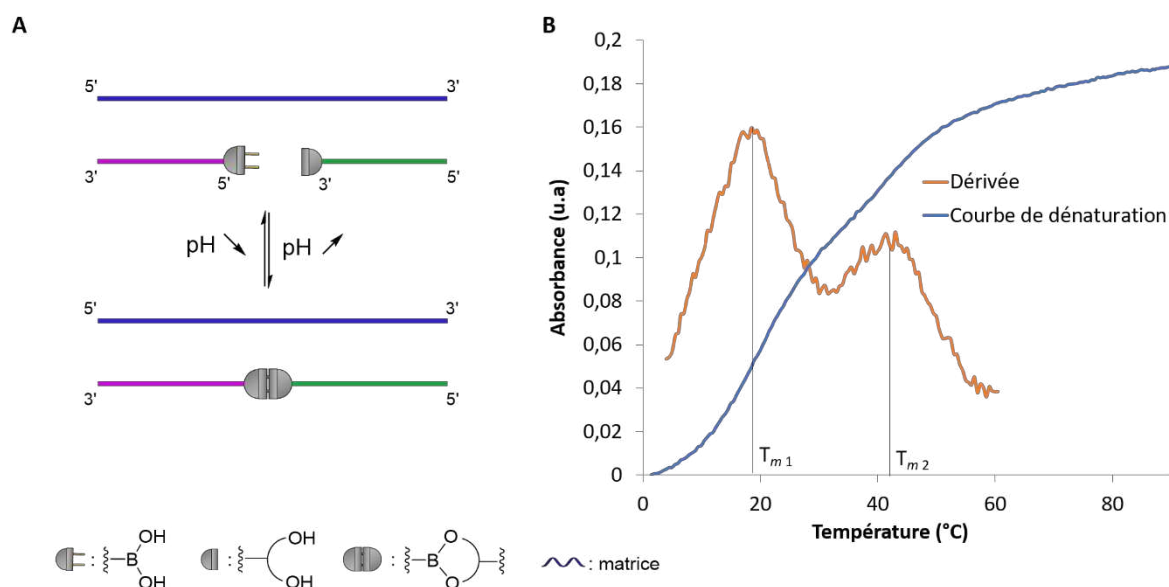


Figure 150 : (A) Système dynamique et programmable pH dépendant et (B) courbe de dénaturation thermique et dérivée première types obtenues pour ce système modifié.

En l'absence du partenaire diol à l'extrémité 3' du second brin, Martin *et al.* observent une température de demi-fusion de 12,8°C à pH 7,5 tandis que celle-ci est de 19,1 °C lorsque le

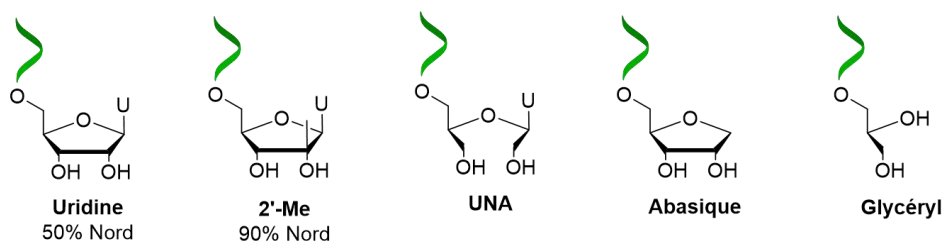
second brin est modifié par une ribocytidine à l'extrémité 3'. Ceci indique la formation d'une liaison de type ester boronate entre les deux brins. Notons également que deux transitions sont observées même lorsque les deux demi-brins sont liés, ce qui s'explique par la réversibilité de la liaison formée. La réaction de ligation a ensuite été étudiée en fonction du pH et la stabilisation du système est d'autant plus importante lorsque le pH augmente (+ 11°C à pH 8,5 et + 14,8°C à pH 9,5) car la formation d'un anion hydroxyboronate stabilisé en milieu basique favorise la liaison entre les deux brins. Cependant, bien que le duplex soit stabilisé par la formation d'une nouvelle jonction, celui-ci est déstabilisé par rapport au duplex naturel dont la température de transition était d'environ 63°C. Ceci s'explique par la distorsion induite par le plissement du sucre en présence d'un lien ester boronate comme cela a été démontré dans le Chapitre 4 (paragraphe 4.2.5) ainsi que par de précédents travaux de l'équipe ChemBioNAC.²⁵³

Dans le but d'augmenter la diversité des jonctions internucléosidiques disponibles et moduler leur stabilité ainsi que leurs propriétés, Barbeyron *et al.* ont synthétisé de nouveaux partenaires *cis*-diols puis ont évalué l'influence des paramètres stériques et électroniques sur la formation de l'ester boronate (Figure 151).¹² Les précédentes études réalisées au laboratoire ont démontré que ce type de jonction induit un changement de conformation du résidu ribose vers une conformation Nord.^{18,253} Les différents partenaires *cis*-diols ont donc été choisis pour adopter une conformation majoritairement Nord à partir d'une étude d'Altona *et al.* permettant de déterminer la conformation du résidu ribose en fonction de la constante de couplage $J_{1'-2'}$ selon l'équation suivante :⁴⁴¹

$$\%N = 100 - 10 \times J_{1'-2'}$$

La proportion obtenue correspond au nucléoside libre et peut varier lorsqu'il est incorporé dans une séquence d'oligonucléotide mais cela permet de donner une idée générale à propos de la conformation du résidu ribose étudié. Des systèmes en équilibre entre les conformations Nord et Sud tels que l'uridine^{253,441} peuvent toutefois former des liaisons ester boronate car, en présence d'acide boronique, l'équilibre est déplacé vers une conformation majoritairement Nord. Ceci est confirmé par l'augmentation de la température de demi-fusion lorsque le pH augmente, induite par la formation d'un anion hydroxyboronate stabilisé à pH élevé. Un partenaire uridine plus rigide comprenant un méthyl supplémentaire en position 2' a alors été étudié. La présence du méthyl entraînant un effet inductif positif et favorisant une conformation Nord,⁴⁴² la formation de l'ester boronate devrait être fortement stabilisée à pH élevé. Or la stabilisation observée est plus faible que dans le cas de l'uridine naturelle (+ 5,5°C au lieu de

+ 9,9°C) en raison de l'interaction entre le méthyle et le ribose adjacent (Figure 151, entrée 2). Le facteur stérique est donc un paramètre non négligeable pour la stabilisation de l'ester boronate. Un motif uridine UNA (Unlocked Nucleic Acid), plus flexible, a ensuite été introduit à l'extrémité 3'. Ce motif déstabilise le duplex d'ADN mais n'affecte pas la structure de la double hélice ni l'appariement des bases. Il est ainsi utilisé pour moduler la stabilité des duplexes dans le cadre d'applications thérapeutiques.⁴⁴³ Cependant, une température de demi-fusion d'environ 13,5°C est obtenue aux trois valeurs de pH étudiées (Figure 151, entrée 3), soit une valeur beaucoup plus faible que pour le système comportant une uridine naturelle à l'extrémité 3'. Ceci s'explique par la trop grande flexibilité et l'importante quantité d'énergie requise pour générer un ester cyclique à huit chaînons. L'importance de l'appariement et de l'empilement aromatique des nucléobases a également été évaluée à travers l'utilisation d'un ribose abasique. Il s'avère que la suppression de la dernière base déstabilise fortement la formation du duplex entre le brin modifié et la matrice, ne permettant pas l'observation d'une température de transition. Enfin, l'uridine à l'extrémité 3' a été remplacée par un glycéryl permettant une grande flexibilité mais le duplex est fortement déstabilisé et la température de demi-fusion est alors grandement diminuée. Par conséquent, la conformation du résidu ribose ainsi que les effets stériques et électroniques ont une importance primordiale pour la formation et la stabilisation du lien internucléosidique de type ester boronate.



Entrée	Système	T_{m1} (°C)		
		pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5
1	TTTTTT ^{Bn} + rUGTGCC	20,9	27,9	30,8
2	TTTTTT ^{Bn} + 2'-Me-GCTGCC	11,0	12,1	16,1
3	TTTTTT ^{Bn} + UNA-GCTGCC	13,7	13,6	13,4
4	TTTTTT ^{Bn} + Abasique-GCTGCC	-	-	-
5	TTTTTT ^{Bn} + Glycéryl-GCTGCC	13,0	12,9	10,9

Figure 151 : Structure des partenaires cis-diols modifiés et température de demi-fusion obtenues.¹²

Bien que les esters boronates soient les complexes les plus étudiés et utilisés, des analogues appelés oxazaborolidines peuvent également être formés à partir d'un partenaire aminodiol

(Figure 152). En effet, l'azote possédant un doublet non liant, il peut complexer l'orbitale p vacante du bore et stabiliser la structure formée de la même façon que pour les esters boronates.

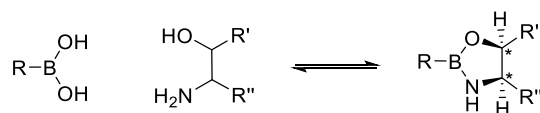


Figure 152 : Formation d'une oxazaborolidine à partir d'un acide boronique et d'un aminodiol.

Ces structures ont été utilisées pour la première fois en tant que catalyseur chiral pour la réduction énantiosélective de cétones en présence de borane (Figure 153).⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁷ En effet, la coordination de l'atome de bore du borane par l'atome d'azote de l'oxazaborolidine permet d'activer le borane donneur d'hydrogène et d'augmenter l'acidité de Lewis de l'atome de bore de l'oxazaborolidine. Ce dernier peut ainsi coordiner l'atome d'oxygène du carbonyle pour former le composé anti, plus stable. L'alcool est alors obtenu de façon énantiosélective par transfert d'hydrogène entre le borane et le carbonyle. Ces structures sont encore aujourd'hui largement utilisées pour la catalyse asymétrique de réactions de Diels-Alder,^{448,449} de Mukaiyama-Michael⁴⁵⁰ et de réduction énantiosélective de carbonyles ou de dérivés d'imines.⁴⁵¹⁻⁴⁵⁵ D'autre part, les composés comportant des liaisons bore-azote étant connus pour posséder une activité biologique, les oxazaborolidines ont ensuite été utilisées en tant qu'agents antibactériens^{456,457} ou inhibiteurs de la libération de calcium induite par la thrombine.⁴⁵⁸

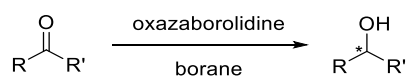


Figure 153 : Réduction énantiosélective de cétone en présence d'oxazaborolidine.

Dans le but de compléter l'étude de Barbeyron *et al.* et de développer de nouvelles jonctions internucléosidiques, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'influence d'un partenaire aminodiol sur la formation d'une jonction internucléosidique de type oxazaborolidine. L'influence de l'introduction d'un motif uridine LNA (Locked Nucleic Acid) à l'extrémité 3' a déjà été étudiée dans le cadre des travaux réalisés par Barbeyron *et al.* (Figure 154A). Cependant, la liaison entre l'atome d'azote en position 2' et le carbone C_{4'} bloque le sucre dans une conformation unique et cela entraîne une trop grande rigidité, ne permettant pas aux partenaires de s'adapter l'un à l'autre. De fait, aucune ligation n'est observée. L'utilisation de partenaires 2'- ou 3'-aminouridine ou adénosine permet ainsi de supprimer la liaison 2'-4', apportant plus de flexibilité. De plus, la réactivité d'une amine secondaire est plus importante que celle d'une

amine primaire, ce qui permettrait de favoriser la réaction de ligation. Concernant la conformation des résidus riboses modifiés par une amine, les nucléosides comportant une amine secondaire en position 3' sont, d'après les calculs d'Altona *et al.*,⁴⁴¹ plus à même d'adopter une conformation Nord que lorsque l'amine secondaire est située en position 2'.⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹ Leur capacité à se lier à un acide boronique en présence d'une matrice d'ADN a alors été évaluée par dénaturation thermique afin de déterminer l'importance de la conformation du résidu ribose dans le cas de jonctions internucléosidiques de type oxazaborolidines.

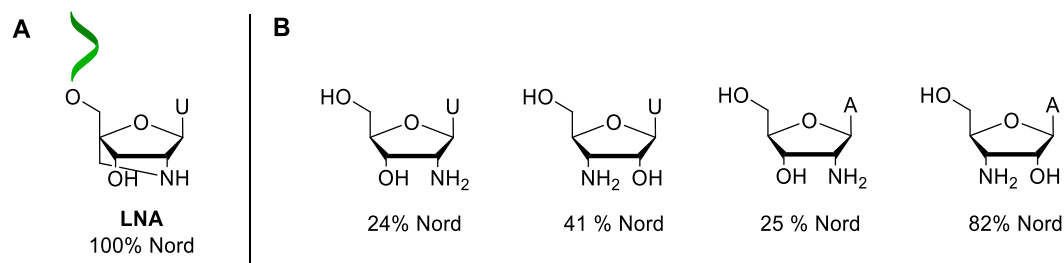


Figure 154 : Structure des partenaires aminodiols et conformation préférentielle des nucléosides seuls utilisés (A) dans l'étude de Barbeyron *et al.*¹² et (B) dans ce chapitre.⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹

5.2 Synthèse des séquences modifiées

Les oligonucléotides non modifiés correspondant aux matrices (**ODN67-68**) et aux brins complémentaires utilisés lors des réactions de contrôles (**ODN69**, **ODN71-72** et **ODN75-76**) ont été synthétisés par synthèse automatisée en utilisant la chimie classique des phosphoramidites (Figure 71, page 78). Le brin complémentaire T₇ a ensuite été modifié en remplaçant la thymidine à l'extrémité 5' par le phosphoramidite **T^{Bn}** précédemment synthétisé (**ODN70** ; Chapitre 2, paragraphe 2.2.1, page 70). Le partenaire modifié à l'extrémité 3' par une 2'-désoxy-2'-aminouridine (**ODN73**) a également été synthétisé par synthèse automatisée en utilisant un support commercial 2'-aminouridine-CPG. Dans le cas du partenaire modifié à l'extrémité 3' par une 3'-amino-3'-désoxyuridine (**ODN74**), celui-ci a été obtenu à partir d'un support 3'-azidouridine synthétisé par l'équipe du Pr. Sabine Müller de l'Universität Greifswald en Allemagne dans le cadre d'une collaboration. Après déprotection de l'oligonucléotide et coupure du support par un traitement ammoniacal, la réduction de l'azoture est effectuée par une solution de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) dans le Tris HCl (2,5 mM, pH 8) pour obtenir l'oligonucléotide **ODN74** comportant une amine libre en position 3' (Figure 155). Le même protocole est appliqué pour la synthèse des oligonucléotides **ODN77** et **ODN78** comportant respectivement une 2'-désoxy-2'-aminoadénosine et une 3'-amino-3'-

désoxyadénosine à l'extrémité 3' à partir des supports 2'-azidoadénosine et 3'-azidoadénosine synthétisés par l'équipe du Pr. Sabine Müller.

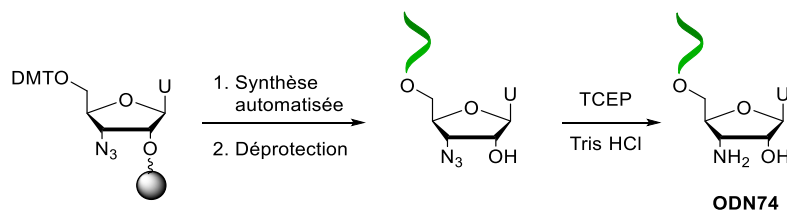


Figure 155 : Synthèse de l'oligonucléotide modifié **ODN74**.

L'ensemble des séquences d'oligonucléotides nécessaires à l'étude ayant été synthétisé (Tableau 19), la ligation des différents systèmes a ensuite été étudiée par dénaturation thermique.

Tableau 19 : Liste des oligonucléotides synthétisés.

Nom	Séquence (5' vers 3')
ODN67	d(AAAAAAAAAACGACGG)
ODN68	d(AAAAAAATCGACGG)
ODN69	d(TTTTTTTT)
ODN70	T ^{Bn} -d(TTTTTT)
ODN71	d(CCGTCGT)
ODN72	d(CCGTCG)rU
ODN73	d(CCGTCG)-U _{2'} NH ₂
ODN74	d(CCGTCG)-U _{3'} NH ₂
ODN75	d(CCGTCGA)
ODN76	d(CCGTCG)rA
ODN77	d(CCGTCG)-A _{2'} NH ₂
ODN78	d(CCGTCG)-A _{3'} NH ₂

5.3 Analyse des systèmes modifiés par dénaturation thermique

La ligation des demi-brins a été étudiée en milieu tamponné (10 mM cacodylate de sodium, 1 M NaCl) à pH 7,5, 8,5 et 9,5 par dénaturation thermique. Pour cela, sont mis en présence la matrice (**ODN67** pour l'aminouridine et **ODN68** pour l'aminoadénosine), le premier demi-brin complémentaire comportant ou non l'acide boronique T^{Bn} à l'extrémité 5' et le second demi-brin complémentaire comprenant le partenaire *cis*-diol ou aminodiol à l'extrémité 3'. Les deux études ont été effectuées de la façon suivante : (i) réactions de contrôle en présence des

partenaires 3'-désoxy (dT ou dA) et 3'-ribo (U ou rA) puis (ii) étude de la réaction de ligation en présence des partenaires 3'-aminodiols. La différence entre les valeurs de température de demi-fusion T_{m1} obtenues avec ou sans acide boronique à l'extrémité 5' du premier demi-brin (ΔT_{m1}) permet ainsi de déterminer l'impact de la modification sur la formation de la nouvelle jonction internucléosidique. Une diminution de la valeur de température de demi-fusion T_{m1} correspond à une déstabilisation du système et de fait aucune ligation. À l'inverse, une augmentation de celle-ci relate une stabilisation issue de la liaison covalente entre les deux demi-brins.

5.3.1 Modification de l'extrémité 3' du second brin par une aminouridine

La première étude par dénaturation thermique a été effectuée en présence du brin matrice **ODN67**, du demi-brin T_7 (**ODN69**) ou $T^{Bn}T_6$ (**ODN70**) et des partenaires naturels ou modifiés **ODN71-74** (Figure 156).

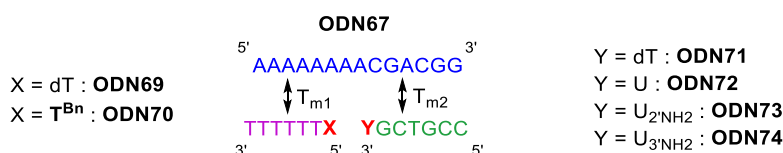


Figure 156 : Système utilisé pour l'étude par dénaturation thermique pour la série uridine.

(i) Réactions de contrôle avec $Y=dT$ ou U à l'extrémité 3'

La dénaturation thermique a dans un premier temps été étudiée avec le demi-brin comportant une désoxythymidine à l'extrémité 5' du premier brin (**ODN69**) ainsi qu'à l'extrémité 3' du second (**ODN71**) et une température de demi-fusion de 20,7°C est obtenue à pH 7,5 (Tableau 20, entrée 1). Nous pouvons toutefois remarquer qu'une augmentation du pH déstabilise le système (- 1,1°C à pH 8,5 et - 4°C à pH 9,5). La thymidine à l'extrémité 5' du premier brin a ensuite été remplacée par le phosphoramidite modifié T^{Bn} (**ODN70**) et il s'avère qu'une légère diminution de la température de demi-fusion est observée à pH 7,5 (- 2,7 °C) et 8,5 (- 1,5 °C) en présence de l'acide boronique par rapport au duplex naturel (Tableau 20, entrée 2). L'incorporation de ce dernier est donc légèrement déstabilisante. En revanche, à pH 9,5 la température de demi-fusion est relativement proche pour les deux systèmes, la perte de stabilité étant compensée par la complexation d'un anion hydroxyle dans l'orbitale p vacante de l'atome de bore. La thymidine à l'extrémité 3' du second brin a ensuite été remplacée par l'uridine (**ODN72**). En l'absence d'acide boronique, une température de demi-fusion d'environ 19°C est

obtenue et ne varie pas selon le pH car aucune liaison ne peut être effectuée entre les deux demi-brins (Tableau 20, entrée 3). En revanche, avec le demi-brin **ODN70** contenant le phosphoramidite modifié **T^{Bn}** à l'extrémité 5', l'augmentation de la température de demi-fusion de + 2,5°C observée à pH 7,5 indique la stabilisation du système par la formation d'un ester boronate (Tableau 20, entrée 4). De plus, cette augmentation de la température de demi-fusion est d'autant plus importante que le pH augmente (+ 5,9°C à pH 8,5 et + 12°C à pH 9,5) en raison de la formation d'un anion hydroxyboronate stabilisé en milieu basique. Dans ce cas précis, la température de demi-fusion la plus élevée n'a pu être déterminée en raison de la forte augmentation de la première température de demi-fusion. Graphiquement, la dérivée première de la seconde transition est en partie recouverte par celle de la première, ne permettant pas de déterminer sa valeur au sommet.

Tableau 20 : Étude de l'influence des partenaires thymidine et uridine par dénaturation thermique.

Entrée	ODNs	Système	T _{m1} (°C)			T _{m2} (°C)
			pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5	
1	69/71	TTTTTTT + dTGCTGCC	20,7	19,6	16,7	41,1
2	70/71	TTTTTTT ^{Bn} + dTGCTGCC	18,0	18,1	17,1	41,2
3	69/72	TTTTTTT + rUGCTGCC	18,5	19,6	18,4	39,6
4	70/72	TTTTTTT ^{Bn} + rUGCTGCC	20,9	25,5	30,4	-

(ii) Réaction de ligation avec Y=U₂'NH₂ ou U₃'NH₂

Les réactions de contrôle ayant confirmé la formation d'un ester boronate en présence d'un acide boronique à l'extrémité 5' et d'un ribonucléotide à l'extrémité 3', la réaction de ligation a été étudiée en présence d'un partenaire aminodiol. L'extrémité 3' du second brin a tout d'abord été modifiée par la 2'-désoxy-2'-aminouridine (**ODN73**). En l'absence d'acide boronique (**ODN69**), une température d'environ 18°C est obtenue pour les trois valeurs de pH (Tableau 21, entrée 1) mais une déstabilisation de - 0,9°C à - 1,9 °C est observée en présence du brin **ODN70** comportant le phosphoramidite **T^{Bn}** (Tableau 21, entrée 2). Par conséquent, ce partenaire ne permet pas la formation d'un lien oxazaborolidine. Dans le cas de la 3'-désoxy-3'-aminouridine (**ODN74**), la température de demi-fusion est située autour de 19°C pour les trois valeurs de pH en présence du demi brin **ODN69** ne comportant pas d'acide boronique (Tableau 21, entrée 3). En présence du demi-brin **ODN70** modifié par **T^{Bn}** à l'extrémité 5', une légère stabilisation de + 0,8 à + 2,1°C est observée par rapport au système contrôle (Tableau 21, entrée 4). L'augmentation de la température de demi-fusion observée reste toutefois

inférieure à celle observée avec le système comportant l'uridine naturelle à l'extrémité 3' (ODN70/72 ; Tableau 20, entrée 4). La formation d'un lien de type oxazaborolidine est donc moins stabilisante qu'un ester boronate et peu affectée par le pH.

Tableau 21 : Étude de l'influence des partenaires aminouridine par dénaturation thermique.

Entrée	ODNs	Système	T_{m1} (°C)			T_{m2} (°C)
			pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5	
1	69/73	TTTTTTT + U _{2'} NH ₂ -GCTGCC	17,4	18,2	17,8	40,3
2	70/73	TTTTTTT ^{Bn} + U _{2'} NH ₂ -GCTGCC	16,2	17,3	15,9	40,2
3	69/74	TTTTTTT + U _{3'} NH ₂ -GCTGCC	18,7	19,0	19,2	39,8
4	70/74	TTTTTTT ^{Bn} + U _{3'} NH ₂ -GCTGCC	19,5	21,0	21,3	39,8

Cette première série de partenaires semble démontrer la formation d'une nouvelle jonction de type oxazaborolidine entre les deux demi-brins en présence du partenaire 3'-désoxy-3'-aminouridine mais l'augmentation de la température de transition est relativement faible (Figure 157). Cependant, la modification de l'extrémité 3' en position 2' n'entraîne aucune réaction de ligation.

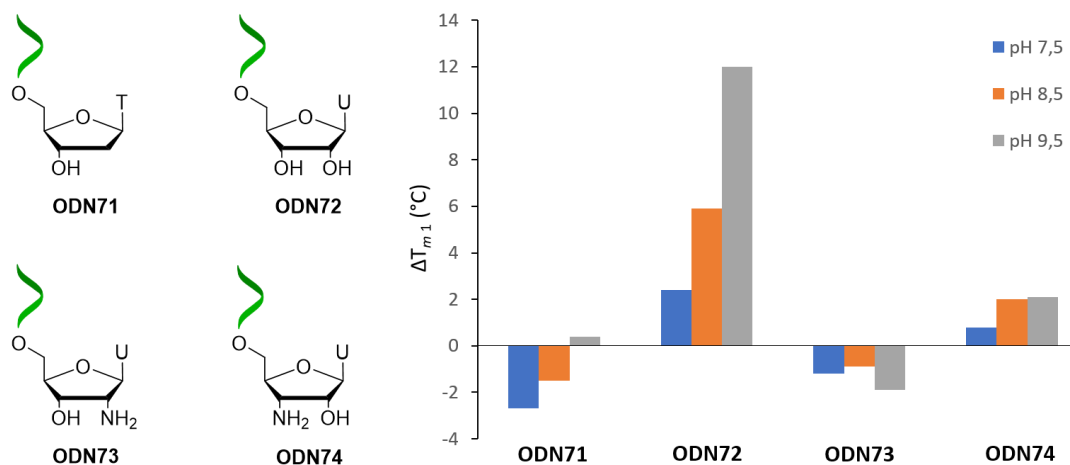


Figure 157 : Étude de l'influence des partenaires aminouridine par dénaturation thermique.

5.3.2 Modification de l'extrémité 3' du second brin par une aminoadénosine

La seconde étude par dénaturation thermique a été effectuée en présence du brin matrice ODN68, du demi-brin T₇ (ODN69) ou T^{Bn}T₆ (ODN70) et des partenaires naturels ou modifiés ODN75-78 (Figure 158).

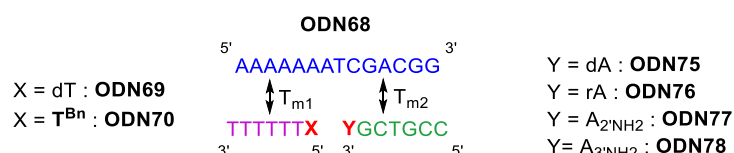


Figure 158 : Système utilisé pour l'étude par dénaturation thermique pour la série adénosine.

(i) Réactions de contrôle avec Y=dA ou rA à l'extrémité 3'

De la même façon que pour l'étude précédente, l'étude a dans un premier temps été réalisée en présence d'une désoxythymidine à l'extrémité 5' du premier demi-brin (**ODN69**) et une désoxyadénosine à l'extrémité 3' du second demi-brin (**ODN75** ; Tableau 22, entrée 1). Une température de demi-fusion de 27,6°C est obtenue à pH 7,5 et une légère déstabilisation est observée lorsque le pH augmente (- 1,8°C à pH 9,5). Lorsque l'extrémité 5' du premier demi-brin est modifiée par le phosphoramidite modifié T^{Bn} contenant un acide boronique (**ODN70**), une déstabilisation d'environ - 4°C est observée pour les trois valeurs de pH par rapport au duplex naturel (Tableau 22, entrée 2). La désoxyadénosine à l'extrémité 3' du second demi-brin a ensuite été remplacée par une riboadénosine (**ODN76**) pour former un lien ester boronate. En l'absence d'acide boronique, une température de transition d'environ 23°C est observée pour les trois valeurs de pH (Tableau 22, entrée 3) tandis qu'en présence de l'acide boronique, celle-ci est augmentée de + 12°C à pH 7,5, indiquant une liaison entre les deux brins (Tableau 22, entrée 4). La stabilisation est d'autant plus importante lorsque le pH augmente (+ 14,3°C à pH 8,5 et + 16,6°C à pH 9,5) en raison de la stabilisation de l'ester sous la forme d'anion hydroxyboronate. De la même façon pour le système **ODN70/72**, les températures de demi-fusion des systèmes **ODN69/75** et **ODN70/76** n'ont pu être déterminées graphiquement car la dérivée première de la seconde transition est en partie recouverte par celle de la première, ne permettant pas de déterminer sa valeur au sommet.

Tableau 22 : Étude de l'influence des partenaires désoxy- et riboadénosine par dénaturation thermique.

Entrée	ODNs	Système	T _{m1} (°C)			T _{m2} (°C)
			pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5	
1	69/75	TTTTTTT + dA-GCTGCC	27,6	27,5	25,8	-
2	70/75	TTTTTTT ^{Bn} + dA-GCTGCC	23,3	24,0	21,9	38,4
3	69/76	TTTTTTT + rA-GCTGCC	22,8	23,2	22,4	39,6
4	70/76	TTTTTTT ^{Bn} + rA-GCTGCC	34,8	37,5	39,0	-

(ii) Réaction de ligation avec $Y=A_2'NH_2$ ou $A_3'NH_2$

La réaction a ensuite été étudiée en présence d'une 2'-désoxy-2'-aminoadénosine à l'extrémité 3' du second brin (**ODN77**). Notons tout d'abord que le remplacement d'un groupement hydroxyle par une fonction amine entraîne une diminution de la température de demi-fusion d'environ - 7°C par rapport au nucléoside naturel, même en l'absence d'acide boronique (Tableau 23, entrée 1). L'extrémité 5' du premier demi-brin a ensuite été modifiée par le phosphoramidite modifié **T^{Bn}** (Tableau 23, entrée 2). À pH 7,5 une déstabilisation de - 2,3°C est observée par rapport au système ne comportant pas d'acide boronique. Toutefois, celle-ci est compensée par la complexation de l'anion hydroxyle dans l'orbitale p vacante de l'atome de bore à pH basique, résultant en une plus faible diminution de la température de demi-fusion (- 1,1 °C à pH 8,5 et - 1,2°C à pH 9,5). La déstabilisation observée pour les trois valeurs de pH indique que la formation de l'oxazaborolidine est impossible dans ces conditions. L'extrémité 3' du second demi brin a ensuite été remplacée par une 3'-désoxy-3'-aminoadénosine (**ODN78**). En l'absence d'acide boronique, une température de transition d'environ 23°C est observée pour les trois valeurs de pH (Tableau 23, entrée 3). En revanche, en présence du brin modifié par **T^{Bn}** (**ODN70**), une stabilisation d'environ + 10°C est observée pour les trois valeurs de pH par rapport au système ne comportant pas d'acide boronique (Tableau 23, entrée 4). Ceci indique donc la formation d'une liaison de type oxazaborolidine entre les deux demi-brins.

Tableau 23 : Étude de l'influence des partenaires aminoadénosine par dénaturation thermique.

Entrée	ODNs	Système	T_{m1} (°C)			T_{m2} (°C)
			pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5	
1	69/77	TTTTTTT + A_{2'}NH₂-GCTGCC	15,5	15,4	14,5	39,4
2	70/77	TTTTTTT^{Bn} + A_{2'}NH₂-GCTGCC	13,2	14,3	13,2	39,5
3	69/78	TTTTTTT + A_{3'}NH₂-GCTGCC	23,1	22,5	22,4	40,0
4	70/78	TTTTTTT^{Bn} + A_{3'}NH₂-GCTGCC	33,6	34,0	33,5	-

Cette seconde étude a également démontré la formation d'une jonction internucléosidique stabilisée de type oxazaborolidine en présence d'une 3'-désoxy-3'-aminoadénosine (Figure 159). En revanche, de la même façon que lors de la première étude, aucune liaison n'est possible en présence du nucléoside modifié en position 2'.

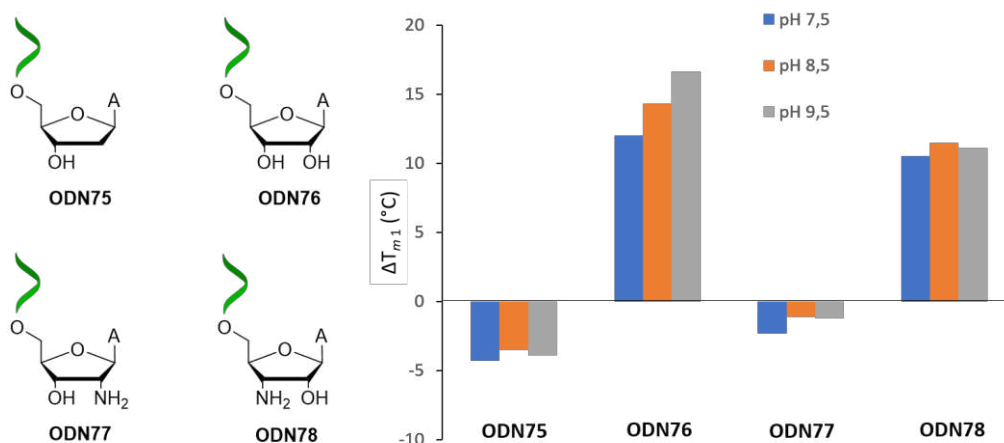


Figure 159 : Étude de l'influence des partenaires aminoadénosine par dénaturation thermique.

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de démontrer l'influence du partenaire à l'extrémité 3' du second demi-brin sur la ligation assistée par une matrice avec le premier demi-brin fonctionnalisé par une borono-thymidine à l'extrémité 5'. En effet, seuls les ribonucléotides fonctionnalisés par une amine en position 3' sont capables de former une nouvelle jonction internucléosidique de type oxazaborolidine en présence d'un acide boronique. Toutefois, la stabilisation du système comportant une 3'-désoxy-3'-aminouridine à l'extrémité 3' n'est que de + 2-3°C tandis que pour celui comportant une 3'-désoxy-3'-aminoadénosine une stabilisation de + 10°C est observée. Ces résultats peuvent alors s'expliquer à partir de l'étude de la conformation du résidu ribose modifié (Figure 160). La riboadénosine modifiée en position 2' adopte une conformation majoritairement Sud (25 % Nord) tandis que lorsqu'elle est modifiée en position 3', la conformation du résidu ribose est majoritairement Nord (82 %). De la même façon que pour les esters boronates, la conformation Nord semble donc indispensable pour la formation de l'oxazaborolidine. Dans le cas du partenaire aminouridine, le résidu ribose modifié adopte une conformation majoritairement Sud dans les deux cas, bien que la proportion de la conformation Nord soit plus importante dans le cas du ribose modifié en position 3' (25 % et 41 % Nord pour les résidus riboses modifiés en position 2' et 3' respectivement). Cela pourrait ainsi expliquer pourquoi la stabilisation est aussi faible dans ce dernier cas. Ces résultats démontrent donc, comme pour les esters boronates, l'importance de la conformation du ribose pour l'établissement d'une jonction internucléosidique de type oxazaborolidine.

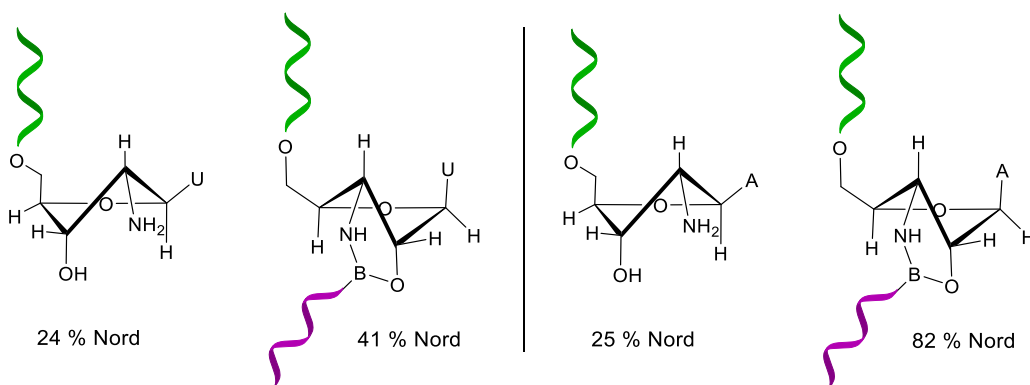


Figure 160 : Schéma des deux conformations majoritaires des aminonucléotides à l'extrémité 3' du second demi-brin.

Cette étude a ainsi permis de démontrer pour la première fois la ligation entre deux brins à travers la formation d'une oxazaborolidine. Toutefois, la dépendance au pH est peu marquée comparativement aux systèmes comportant des esters boronates. Cela pourrait s'expliquer par la stabilité beaucoup plus importante des liaisons bore-oxygène par rapport aux liaisons bore-azote. Ainsi, en milieu basique, la création de liaisons bore-oxygène avec les anions hydroxyles pourrait être favorisée au détriment de la formation de l'oxazaborolidine. Une étude est actuellement en cours afin d'améliorer la stabilisation du système, notamment en ajoutant du cyanure de sodium afin de limiter la création de liaisons bore-oxygène au profit de la formation de l'oxazaborolidine.

5.4 Conclusion du chapitre 5

Ce chapitre a mis en évidence l'influence des partenaires aminodiols pour la formation de jonctions internucléosidiques de type oxazaborolidines. Pour cela, différents partenaires ont été synthétisés, comportant une ribouridine ou une riboadénosine à l'extrémité 3' dont l'hydroxyle en position 2' ou 3' a été remplacé par une fonction amine. Une étude par dénaturation thermique a démontré l'influence non négligeable de la position de la modification sur la réaction de ligation. En effet, les ribonucléotides modifiés en position 2' adoptent une conformation majoritairement Sud défavorable à la formation de l'oxazaborolidine tandis que ceux modifiés en position 3' adoptent une conformation majoritairement Nord, plus propice à la réaction de ligation. De plus, la stabilisation est d'autant plus importante en milieu légèrement basique grâce à la complexation de l'orbitale p vacante de l'atome de bore par un anion hydroxyle. Cependant, contrairement aux esters boronates dont la stabilité augmente avec le pH, la stabilisation de l'oxazaborolidine est plus faible à pH 9,5 en raison de la formation de liaisons bore-oxygène avec les anions hydroxyles plus stables que les liaisons bore-azote.

Ajouté aux précédents travaux réalisés par Renaud Barbeyron concernant l'étude de différents partenaires *cis*-diols, ce chapitre a permis d'identifier de nouveaux partenaires capables de promouvoir la ligation réversible entre deux oligonucléotides et ainsi étendre les possibilités de jonctions internucléosidiques disponibles dont la stabilité est modulable en fonction du pH. De nombreux systèmes dynamiques biologiques pourraient ainsi être développés pour des applications en chimie médicinale ou pour la préparation de matériaux biocompatibles.

Conclusion générale

Les acides boroniques sont connus pour réagir avec des partenaires *cis*-diols pour former des esters boronates en milieu aqueux à travers la formation de liaisons covalentes et réversibles. L'objectif de cette thèse était d'utiliser ces esters boronates et leurs dérivés dans le but de développer des acides nucléiques fonctionnels programmables ou pour la formation d'architectures bioinspirées par auto-assemblage.

Parmi ces acides nucléiques fonctionnels, les DNAzymes sont capables de reconnaître des séquences d'ARN spécifiques et de catalyser la coupure d'une liaison phosphodiester par une réaction de transestérification en présence d'un ion métallique. Récemment, les split DNAzymes, composés de deux fragments et capables de s'assembler en une structure active uniquement en présence du substrat et de l'ion métallique activateur, sont apparus comme une alternative intéressante pour la détection de substrats variés grâce à leur plus grande sensibilité et sélectivité (M. Debiais *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **2020**, *48*, 3400-3422). La première partie de ce travail a donc consisté à étudier et contrôler l'activité catalytique de différents split DNAzymes modifiés par des acides boroniques. En vue d'exploiter la formation réversible et programmable des esters boronates, le DNAzyme **10-23**, activé par du magnésium et capable de détecter un substrat d'ARN composé de 17 bases, a été sélectionné car il est relativement court et possède une très bonne activité catalytique en milieu physiologique. Il fait ainsi partie des systèmes les plus étudiés. Les conditions de réactions nécessaires à l'obtention d'une activité catalytique optimale du DNAzyme parent ont tout d'abord été mises au point par HPLC. Cinq split DNAzymes composés de deux fragments ont ensuite été développés en divisant le DNAzyme parent à différentes positions, résultant en une diminution drastique de l'activité catalytique. Le but de ce chapitre était donc d'utiliser la capacité des acides boroniques à réagir avec des partenaires *cis*-diols afin de rétablir l'activité à travers la formation d'une jonction internucléosidique de type ester boronate. L'extrémité 5' du premier fragment a alors été modifiée par divers acides boroniques et l'extrémité 3' du second fragment par une ribocytidine. Une étude par PAGE a démontré que la position de la coupure avait un effet déterminant sur la conformation du système et de fait sur le rétablissement de l'activité catalytique. En effet, une division au niveau d'un site indispensable à l'activité catalytique entraîne une inhibition totale de celle-ci et la ligation entre les deux fragments est impossible. En revanche, une coupure au niveau du bras de reconnaissance ou d'un site non essentiel au sein du site catalytique provoque une forte diminution de l'activité qui peut toutefois être rétablie en présence des fragments modifiés par un acide boronique et un partenaire *cis*-diol. Il a également été démontré que la nature de l'acide boronique incorporé est importante pour la stabilisation du système en raison

des interactions mises en jeu ainsi que du degré de flexibilité de la molécule. Ainsi, la meilleure activité catalytique est obtenue avec les systèmes dont l'extrémité 5' est modifiée par une borono-thymidine, un analogue de la thymidine naturelle (M. Debiais *et al.*, *ChemEurJ*, acceptée en octobre 2020). Ces résultats permettent d'envisager l'application de ce concept à différents systèmes divisés tels que les split aptamères ou d'autres split DNAzymes et split ribozymes afin de développer des systèmes dynamiques et programmables en fonction du pH. L'utilisation de tels systèmes pourrait ainsi permettre l'obtention de sondes biologiques plus sensibles et plus sélectives pour la détection de petites molécules ou d'acides nucléiques, notamment pour des applications thérapeutiques, de diagnostic ou de théranostique. Les premières études réalisées sur le ribozyme **HPWTL2** par Amandine Lelievre, doctorante de l'équipe du Pr. Sabine Müller, indiquent que la formation d'une jonction ester boronate permet de rétablir l'activité du split ribozyme de manière efficace.

Au-delà des applications mentionnées dans la première partie, l'introduction d'acides boroniques dans des oligonucléotides est très attractive, notamment pour la formation d'aptamères modifiés. La seconde partie de ce travail a alors été consacrée à l'introduction de fonctions acides boroniques au sein d'oligonucléotides en série ADN et ARN de manière simple, rapide et efficace. Dans un premier temps, l'acide boronique a été incorporé par une réaction de chimie click de type CuAAC réalisée directement sur support CPG, bien que celle-ci ait été reportée comme étant incompatible avec les acides boroniques. En effet, plusieurs études rapportent la dégradation des acides boroniques en présence de sels de cuivre, or nous avons pu montrer que lorsque ces derniers sont protégés par un groupement pinacol ou MIDA, la réaction de cycloaddition était réalisable et ce avec de très bons rendements. Ainsi, un acide boronique a été incorporé à l'extrémité 5' ainsi qu'en position 2' à l'intérieur de séquences d'ADN et d'ARN de différentes longueurs avec de bons rendements (M. Debiais *et al.*, *Synthesis*, **2020**, 52, 2962-2969). Ces oligonucléotides modifiés peuvent ainsi être utilisés pour la détection de molécules comportant des fonctions *cis*-diols (par exemple les saccharides), notamment dans le cas des aptamères. La seconde partie de l'étude relate l'incorporation d'acides boroniques par hydroboration. Pour cela un trinuéclotide a été fonctionnalisé à l'extrémité 5' par un phosphoramidite modifié de type butène. Cependant, malgré un important travail d'optimisation seule une faible quantité d'acide boronique a été obtenue, celui-ci étant très rapidement oxydé. L'hydroboration d'alcyne a alors été envisagée pour former un acide boronique vinylique. Cette réaction est particulièrement intéressante car l'oxydation de l'acide boronique conduit à la formation d'un aldéhyde par tautomérisation de l'énol. Un trinuéclotide

a alors été fonctionnalisé à l'extrémité 5' par un phosphoramidite modifié de type pentyne. Cependant, de la même façon que pour l'hydroboration d'alcène, la réaction d'oxydation est majoritaire. Les conditions de réactions ont alors été optimisées de façon à n'obtenir que l'aldéhyde à l'extrémité 5' puis ont été appliquées à différents oligonucléotides afin de démontrer la modularité de cette méthode. Contrairement aux méthodes développées pour incorporer un aldéhyde mettant en jeu des étapes de protection et déprotection, cette méthode est rapide, efficace et s'effectue en conditions relativement douces. L'incorporation d'une telle fonction permet ainsi de coupler la séquence d'oligonucléotide modifiée à une (bio)molécule d'intérêt, notamment par amination réductrice ou par la formation d'une oxime, permettant par la suite d'élaborer des bioconjugués dotés de nouvelles propriétés (M. Debiais *et al.*, en préparation).

Le monomère borono-uridine synthétisé dans le cadre de l'étude de split ribozymes comporte à la fois un acide boronique en position 5' et un *cis*-diol en positions 2' et 3'. Ses propriétés d'auto-assemblage ont alors été étudiées par RMN en solvant organique anhydre puis en milieu aqueux, en collaboration avec le Dr. Carine Baraguey, dans le but de former des architectures bioinspirées. Les analyses RMN réalisées dans le DMF- d_7 anhydre ont démontré la formation de deux nouvelles espèces cycliques structuralement proches capables de se dissocier en présence d'eau. De plus, l'aplanissement du signal observé sur la RMN ^{11}B réalisée en solvant organique anhydre révèle une perte de symétrie autour de l'atome de bore due à la liaison de ce dernier avec les oxygènes en positions 2' et 3' du sucre. Les deux espèces ont ensuite pu être caractérisées par RMN DOSY ^1H et il s'avère que les deux structures formées par auto-assemblage correspondent à un dimère et un trimère cycliques. L'analyse des constantes de couplage a ensuite permis de déterminer la conformation du résidu ribose dans le cas du dimère cyclique. Classiquement, la conformation privilégiée des riboses est en équilibre entre les conformations $\text{C}_{2'}\text{-endo}$ et $\text{C}_{3'}\text{-endo}$ or, dans notre cas, la formation du dimère entraîne une déformation du résidu ribose. En effet, celui-ci semble être soit en équilibre entre deux conformations Nord et Sud soit dans une conformation unique $\text{C}_{4'}\text{-exo}$. Des études de modélisation moléculaire sont actuellement en cours afin de confirmer ou non ces résultats. Enfin, une étude par RMN ^1H réalisée dans le D_2O a démontré que le monomère borono-uridine est capable de s'auto-assembler de façon réversible en milieu basique (M. Debiais *et al.*, en préparation). Bien que des études complémentaires soient nécessaires, ces nouvelles structures pourraient être utilisées pour capter de petites molécules par coordination ou par de faibles interactions pour des applications de détection ou de catalyse asymétrique, comme cela a déjà

été démontré dans le cas de dimères cycliques. Il serait également intéressant d'étudier le comportement du monomère en présence d'une matrice polyadénosine afin de former des espèces cycliques ou linéaires plus grandes. L'ajout d'ions Hg^{2+} pourrait également favoriser l'auto-assemblage à travers la formation de paires de bases U- Hg^{2+} -U. Enfin, la synthèse des monomères borono-adénosine, -cytidine et -guanosine permettrait de diversifier la nature des structures formées.

Les acides boroniques sont connus pour leur capacité à se lier avec des partenaires *cis*-diols mais ils peuvent également se lier à des partenaires aminodiols pour former des oxazaborolidines. Ainsi, dans une dernière partie, de nouvelles jonctions internucléosidiques ont été étudiées dans le but de développer de nouvelles méthodes de ligation d'oligonucléotides mimant le mode d'action des enzymes naturelles. Pour cela, deux fragments d'oligonucléotides, le premier comportant une borono-thymidine à l'extrémité 5' et le second une 2'- ou 3'-aminouridine ou une 2'- ou 3' aminoadénosine à l'extrémité 3', ainsi qu'une matrice complémentaire ont été synthétisés. La formation d'un lien internucléosidique de type oxazaborolidine, jamais décrite à ce jour dans la littérature, a ensuite été évaluée par dénaturation thermique. La stabilisation du système se traduit par une augmentation de la température de demi-fusion et n'est observée qu'en présence des nucléosides modifiés en position 3', ce qui peut s'expliquer par la conformation du résidu ribose modifié. En effet, ces derniers adoptent une conformation majoritairement Nord qui, de la même façon que pour les esters boronates, semble indispensable pour la formation de l'oxazaborolidine. Cependant, contrairement aux esters boronates qui sont fortement stabilisés à pH 9,5 par complexation des anions hydroxyles dans l'orbitale p vacante de l'atome de bore, un milieu trop basique ne stabilise que très légèrement ce système. Cela s'explique par la formation de liaisons entre le bore et les oxygènes des anions hydroxyles, plus stables que les liaisons bore-azote. Il serait donc nécessaire de stabiliser le système, notamment par l'ajout d'ions cyanures. Cette étude a ainsi permis d'identifier de nouveaux partenaires pour la ligation non-enzymatique d'oligonucléotides à travers la formation d'un lien internucléosidique de type oxazaborolidine covalent et réversible (M. Debiais *et al.*, en préparation). Cela pourrait ensuite permettre de développer différents systèmes dynamiques dont la stabilité est modulable en fonction du pH pour des applications en chimie médicinale ou pour la préparation de matériaux biocompatibles. L'ensemble de ces travaux a pour le moment donné lieu à 3 publications présentées en annexes et 3 publications supplémentaires sont actuellement en cours d'écriture.

Ces travaux ont ainsi permis de démontrer l'intérêt des acides boroniques couplés à des acides nucléiques pour de futures applications de détection, de bioconjugaison, de catalyse asymétrique ou pour le développement d'assemblages fonctionnels bioinspirés. Les deux premiers chapitres de ce manuscrit ont également démontré l'intérêt des systèmes divisés en deux fragments en termes de sensibilité et de sélectivité. La modification des deux fragments par une borono-thymidine et une ribocytidine aux extrémités 5' et 3' respectivement permet alors de stabiliser le système à travers la formation d'une liaison internucléosidique de type ester boronate pour le développement de systèmes dynamiques et programmables. À plus long terme, il serait intéressant d'appliquer ce concept aux aptamères, capables de se lier à de petites molécules de façon très sélective. L'idée est de diviser l'aptamère en de plus nombreux fragments, chacun modifiés à l'extrémité 5' par une borono-thymidine et à l'extrémité 3' par une ribocytidine, et voir s'ils sont capables de s'auto-assembler en présence d'une molécule cible (Figure 161). Il faudrait ensuite étudier si l'assemblage spécifique est possible en ajoutant des fragments ne correspondant pas à la séquence de l'aptamère voulu. Cela pourrait ainsi permettre d'élaborer une bibliothèque variée de petits fragments modifiés dans le but de découvrir de nouveaux aptamères.

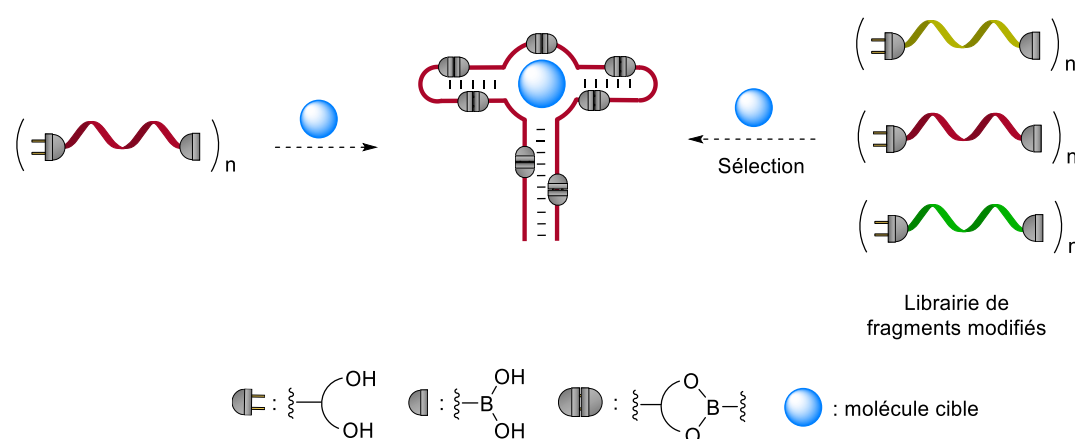


Figure 161 : Assemblage spécifique de fragments modifiés en présence d'une molécule cible.

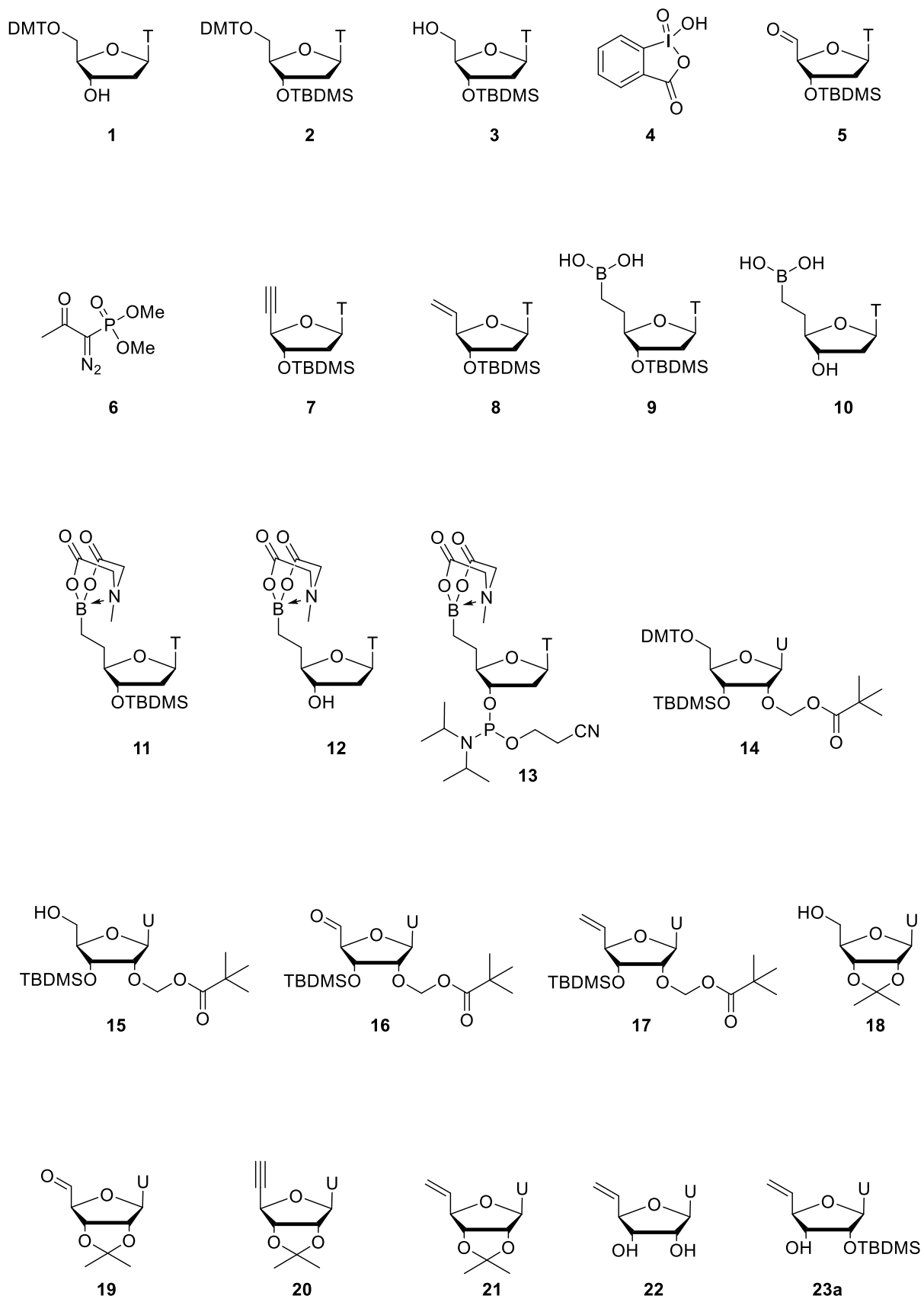
Partie expérimentale

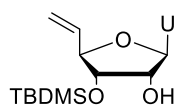
All experimental conditions are described in this part.

Experimental procedures for organic synthesis

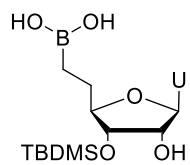
Except pyridine and DIEA that are distilled on calcium hydride and THF that is distilled on calcium with benzophenone, all the anhydrous solvent and reagents are commercial and used like this. Thin-layer chromatography (TLC) are made on silica plate 60 F₂₅₄ Merck and revealed with a laser at 254 nm. Purifications on silica gel column chromatography are made with silica 40-63 μm Merck-Millipore. NMR analysis are realised on a Bruker spectrometer 400 MHz at 20°C and chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) referenced to residual protonated solvent peak (CDCl₃ δ = 7.26, DMSO-d₆ δ = 2.50, CD₃OD δ = 3.31, CD₃CN δ = 1.94, D₂O δ = 4.79). ¹H NMR spectra data are reported as follows : chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, ddd = doublet of doublet of doublets, m = multiplet, bs = broad singlet), coupling constant (*J*) in Hertz, integration and attribution. ¹³C NMR spectra chemical shifts were referenced to carbon resonances in the NMR solvent (CDCl₃ δ = 77.16, DMSO-d₆ δ = 39.52, CD₃OD δ = 49.00, CD₃CN δ = 1.32). Diffusion Ordered Spectroscopy experiments (DOSY) are run with a sequence including longitudinal Eddy current delay with bipolar gradients and a double stimulated echo for convection compensation (sequence “dtebpgp3s” from the Bruker library). The magnetic field gradients are calibrated so that measuring the diffusion coefficient of water in D₂O at 25 °C yields a value of $1.902 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.⁴⁶² The T₁ relaxation times are measured for the sample in DMF before to run the DOSY to properly set the relaxation delay (3 s). The DOSY spectra are acquired with optimized gradient lengths of 2.6 and 2.8 ms (δ), a diffusion delay of 50 ms (Δ) and with gradient values linearly ranging from 2 to 95 % of the maximal gradient (69.2 G/cm) in 32 steps. Translational diffusion coefficients (D) are extracted by non-linear curve fitting of the intensity decay with increasing gradient strength using the T₁/T₂ processing tool of the Topspin software. HRMS analysis were realised on Micromass Q-TOF spectrometer with an electrospray ionisation (ESI).

Partie expérimentale

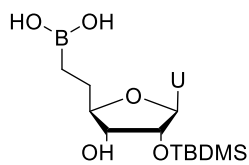




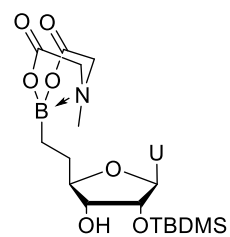
23b



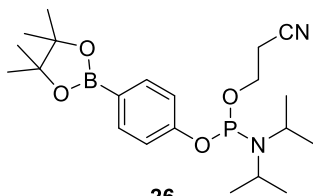
24a



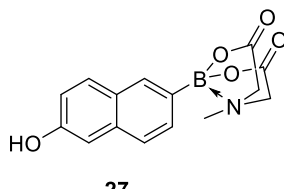
24b



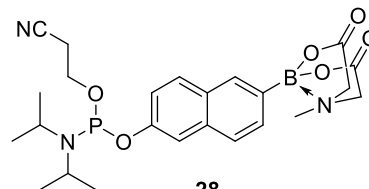
25



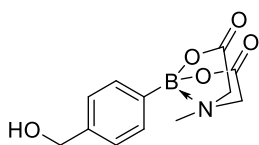
26



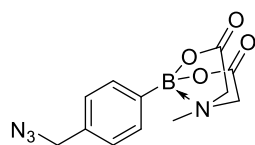
27



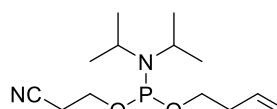
28



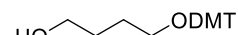
29



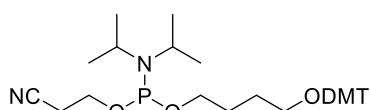
30



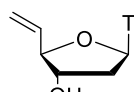
31



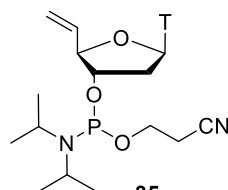
32



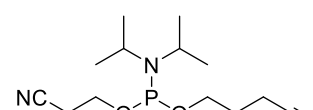
33



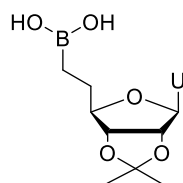
34



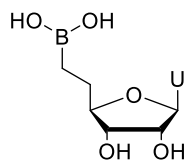
35



36



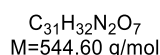
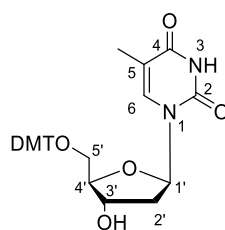
37



38

Compounds **1** (5'-dimethoxytrityl thymidine), **3** (3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine), **5** (5'-aldehyde-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine), **7** (5'-deoxy-5'-ethynyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine), **8** (5'-deoxy-5'-vinyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine), **9** (1-(5'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidin-5-yl)methylboronic acid) and **10** (1-(5'-deoxy thymidin-5'-yl)methylboronic acid) have been previously described by Luvino *et al.*¹⁸ Compounds **14** (5'-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine), **15** (3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine), **16** (5'-aldehyde-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine) and **17** (5'-deoxy-5'-vinyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine) have been previously described by Gimenez Molina *et al.*¹⁵

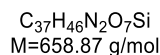
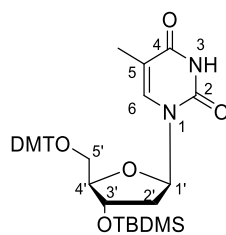
5'-dimethoxytrityl thymidine **1** [40615-39-2]



Thymidine (20.0 g, 826 mmol) is dissolved in 100 mL of anhydrous pyridine and dimethoxytrityl chloride (33.6 g, 99.2 mmol) dissolved in anhydrous pyridine is added step by step to the solution that becomes orange. The mixture is stirring at 20°C for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Ethyl acetate is added to the solution and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is then purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 90/10) to lead to a solid that corresponding to the compound **1** (40.2 g, 89 %).

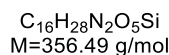
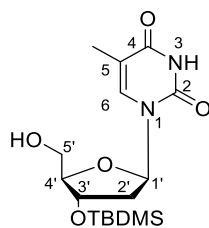
Rf : 0.30 (DCM/MeOH : 90/10)

¹H NMR (300 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 1.48 (s, 3H, H₅), 2.21-2.27 (m, 2H, H₂), 3.28 (s, 2H, H_{5'}), 3.77 (s, 6H, CH₃ DMT), 3.90-3.94 (m, 1H, H_{4'}), 4.42-4.49 (m, 1H, H_{3'}), 6.23 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{1'}), 6.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, H_{ar} DMT), 7.22-7.37 (m, 7H, H_{ar} DMT), 7.43-7.46 (m, 3H, H_{ar} DMT + H₆)

5'-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine 2

Imidazole (20.1 g, 295.2 mmol) is added to the compound 1 (40.2 g, 73.8 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (22.2 g, 147.6 mmol) dissolved in 200 mL of anhydrous pyridine is slowly added to the solution. The reaction is exothermic. The mixture is stirring at 20°C for 20 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Water and ethyl acetate are then added to the solution and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure to lead to the compound 2 (45.0 g, 93 %) which is not isolated.

Rf : 0.65 (DCM/MeOH : 95/5)

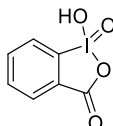
3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine 3

100 mL of a solution of DCM/MeOH (70/30) are added to the compound 2 (45.0 g, 68.4 mmol) and the balloon is placed in an ice bath. A solution containing 10 % of BSA in a solution of DCM/MeOH (70/30) is then added drop by drop until the mixture becomes orange. The mixture is stirring at 0°C for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane : 60/40) to lead to a white powder corresponding to the compound 3 (21.7 g, 89 %).

Rf : 0.35 (EA/Cyclohexane : 60/40)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.08 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.89 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.92 (s, 3H, H₅), 2.16-2.26 (m, 1H, H_{2'a}), 2.33-2.39 (m, 1H, H_{2'b}), 3.73-3.78 (m, 1H, H_{4'}), 3.89-3.97 (m, 2H, H_{5'}), 4.47-4.52 (m, 1H, H_{3'}), 6.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{1'}), 7.36 (s, 1H, H₆), 8.09 (bs, 1H, NH)

2-iodoxybenzoic acid (IBX) 4 [61717-82-6]²⁵⁴

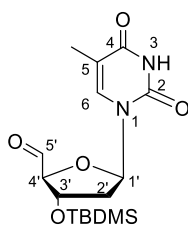


C₇H₅IO₄
M=280,02 g/mol

Oxone monopersulphate (37.2 g, 60.5 mmol) is dissolved in 200 mL of milli-Q water and then iodobenzoic acid (5.0 g, 20.2 mmol) is added (insoluble). The mixture is stirring at 70°C for one hour and a half and then at 0°C for 30 minutes with a low agitation. The solution is filtered under reduced pressure and the precipitate is washed with water and acetone. The white crystalline powder obtained corresponding to the compound **4** (3.9 g, 69 %) doesn't require purification.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 3.37 (bs, 1H, OH), 7.84 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.98-8.04 (m, 2H, H_{ar}), 8.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{ar})

5'-aldehyde-3'-O-tert-butyl dimethylsilyl thymidine 5



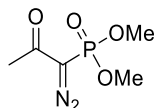
C₁₆H₂₆N₂O₅Si
M=354.48 g/mol

The compound **3** (2.0 g, 5.6 mmol) is dissolved in 90 mL of acetonitrile and IBX (3.25 g, 8.42 mmol) is added (insoluble). The mixture is stirring at 80°C for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the solution is filtered and evaporated under reduced pressure. The white solid corresponding to the compound **5** (1.98 g, quantitative) doesn't require purification.

Rf : 0.20 (EA/Cyclohexane : 60/40)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.13 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.91 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-TBDMS), 1.96 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.02-2.10 (m, 1H, H_{2'}a), 2.32 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.0 Hz, 2.4 Hz, 1H, H_{2'}b), 4.46-4.49 (m, 1H, H_{4'}), 4.6-4.70 (m, 1H, H_{3'}), 6.30 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{1'}), 7.57 (s, 1H, H₆), 9.16 (bs, 1H, NH), 9.75 (s, 1H, CHO)

Dimethyl-(1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate (Bestmann-Ohira reagent) 6 [90965-06-3]

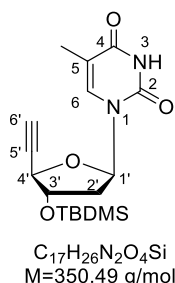


To NaH 60% in mineral oil (630.0 mg, 26.0 mmol) in solution in 10 mL of toluene and 50 mL of THF, is added drop by drop dimethyl(2-oxopropyl)phosphonate (1.0 g, 6.0 mmol) dissolved in 5 mL of THF. The mixture is stirring at 0°C for 1 hour. ABSA (3.8 g, 16.0 mmol) dissolved in THF is then added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. When there's no more phosphonate, the balloon is placed in an ice bath without and the filtrate is evaporated under reduced pressure to lead to a yellow oil corresponding to the compound 6 (907.0 mg, 72 %) which doesn't require purification.

Rf : 0.45 (DCM/Acetone : 90/10)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.21 (s, 3H, CH₃), 3.79 (d, *J* = 11.6 Hz, 6H, OCH₃)

5'-deoxy-5'-ethynyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl thymidine 7



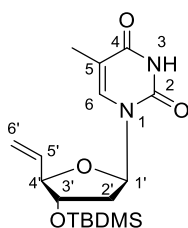
The compound 5 (1.0 g, 2.8 mmol) is dissolved in 10 mL of methanol. Bestmann-Ohira reagent (1.2 g, 5.6 mmol) dissolved in 2 mL of methanol and K₂CO₃ (974.0 mg, 7.1 mmol) are then added. After 30 minutes the solution becomes green. The mixture is stirring at 30°C for 15 hours. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with ammonium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is

purified silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane: 40/60) to lead to a solid corresponding to the compound **7** (550.0 mg, 56 %).

Rf : 0.45 (DCM/EA : 70/30)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.10 (s, 6H, , CH₃ Me-TBDMS), 0.88 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.92 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.10-2.19 (m, 1H, H_{2'a}), 2.40 (dd, $J = 13.6$ Hz, 6.4 Hz, 1H, H_{2'b}), 2.74 (s, 1H, H_{6'}), 4.49 (bs, 1H, H_{4'}), 4.56 (m, 1H, H_{3'}), 6.39 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.49 (s, 1H, H₆), 9.40 (bs, 1H, NH)

5'-deoxy-5'-vinyl-3'-O-tert-butyldimethylsilyl thymidine **8**



C₁₇H₂₈N₂O₅Si
M=352.51 g/mol

The compound **7** (350.0 mg, 1.0 mmol) is dissolved in 10 mL of methanol and the Lindlar catalyst (46.0 mg, 0.1 mmol) is added. Cyclohexene (10.13 mL, 100 mmol) is then added to avoid overhydrogenation. The mixture is hydrogenated at room temperature for 7 hours. The progress of the reaction is followed by NMR ¹H. The solution is filtered on celite and the filtrate is evaporated under reduced pressure to lead to a white solid corresponding to the compound **8** (350.0 mg, 100 %) which doesn't require purification.

The compound **8** can also be prepared by solubilisation of the compound **5** (3.0 g, 8.41 mmol) in 25 mL of anhydrous THF. The balloon is placed in an ice bath and the Tebbe reagent (33.9 mL, 16.8 mmol) is added drop by drop. The mixture is stirring at 0°C for 4 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Sodium bicarbonate is added drop by drop. The reaction is exothermic. DCM is then added and the organic layer is washed with sodium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **8** (1.0 g, 34 %).

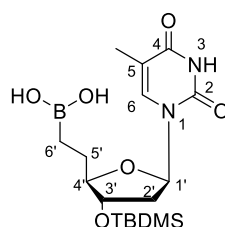
Finally, the compound **8** can be obtained by using the Nysted reagent. This last one (10.9 mL, 4.8 mmol) is dissolved in 6mL of anhydrous THF and BF₃OEt₂ (1.18 mL, 9.59 mmol) is added

drop by drop at 0°C. The mixture is stirring at 0°C for 15 minutes and then the compound **5** (1.7 g, 4.8 mmol) dissolved in 5 mL of anhydrous THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 4 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Sodium bicarbonate is added drop by drop. The reaction is exothermic. Butanol is then added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **8** (1.2 g, 70 %).

Rf : 0.45 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.05 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.86 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.91 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.09 (ddd, $J = 20.0$ Hz, 13.2 Hz, 6.8 Hz, 1H, H_{2'a}), 2.30 (ddd, $J = 18.0$ Hz, 13.2 Hz, 6.4 Hz, 1H, H_{2'b}), 4.12-4.19 (m, 1H, H_{4'}), 4.23-4.28 (m, 1H, H_{3'}), 5.27 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.37 (dt, $J = 17.2$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.78 (ddd, $J = 17.2$ Hz, 10.4 Hz, 6.8 Hz, 1H, H_{5'}), 6.21 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.18 (s, 1H, H₆), 9.63 (bs, 1H, NH)

1-(5'-deoxy-3'-O-tert-butylidimethylsilyl thymidin-5'-yl)methylboronic acid **9**



C₁₇H₃₁BN₂O₄Si
M=398.34 g/mol

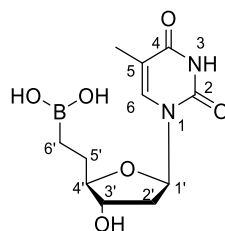
To 4 mL of anhydrous diethyl ether are added borane dimethylsulfide (1.32 mL, 13.6 mmol) and α -pinene (4.3 mL, 27.2 mmol) drop by drop. The mixture is stirring at 35°C for 4 hours. After return to room temperature, the compound **8** (600.0 mg, 1.6 mmol) dissolved in anhydrous THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. 0.5 mL of hydrochloric acid 0.1 M are then added drop by drop. The reaction is exothermic. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to yellow oil corresponding to the compound **9** (450.0 mg, 75 %).

Rf : 0.25 (DCM/MeOH : 95/5)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 0.01 (s, 6H, CH_3 Me-TBDMS), 0.80 (s, 9H, CH_3 *t*Bu-TBDMS), 1.66-1.85 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 1.78 (s, 3H, CH_3 Thymine), 2.03-2.16 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$), 3.58 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{5'}$), 3.81 (q, $J = 4.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.16-4.23 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.31 (s, 1H, H_6)

^{11}B NMR (128 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 31.7

1-(5'-deoxy thymidin-5'-yl)methylboronic acid 10



$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{BN}_2\text{O}_6$
M=284.07 g/mol

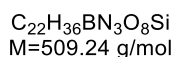
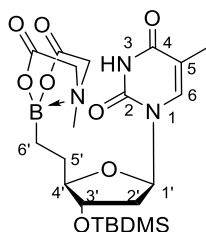
The compound **9** (600.0 g, 2.0 mmol) is dissolved in 20 mL of hydrochloric acid 1.25 M in solution of MeOH. The mixture is stirring at room temperature for 1 hour. The progress of the reaction is followed by TLC. A solution of lithium hydroxide 1.25 M is added until obtain a pH value of 7. The solution is then evaporated under reduced pressure and lyophilized. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 90/10) to lead to a colorless oil corresponding to the compound **10** (290.0 mg, 68 %).

Rf : 0.48 (DCM/MeOH : 90/10)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 0.85-0.98 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 1.64-1.81 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$), 1.90 (s, 3H, CH_3 Thymine), 2.17-2.25 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$), 3.72-3.80 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.11-4.15 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 6.21 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.41 (s, 1H, H_6)

^{11}B NMR (128 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 31.6

1-(5'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-5'-methylthymidin-6'-yl)-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione 11



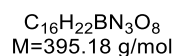
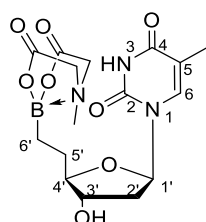
The compound **9** (215.0 mg, 0.5 mmol) is dissolved in 6 mL of a solution of benzene/DMSO (90/10) and MIDA (79.0 mg, 0.5 mmol) is added. A Dean-Stark system containing benzene is added. The mixture is stirring at 110°C for 20 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the product is evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/MeOH : 95/5) to lead to the compound **11** (275.0 mg, 71 %).

Rf : 0.42 (EA/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 0.13 (s, 6H, , CH₃ Me-TBDMS), 0.65-0.88 (m, 2H, H_{6'}), 0.92 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-TBDMS), 1.60-1.82 (m, 2H, H_{5'}), 1.90 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.15-2.24 (m, 2H, H_{2'}), 2.95 (s, 3H, CH₃ MIDA), 3.78-3.85 (m, 1H, H_{4'}), 4.01 (dd, $J = 17.2$ Hz, 6.0 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.18 (dd, $J = 17.2$ Hz, 2.0 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.26-4.32 (m, 1H, H_{3'}), 6.24 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.42 (s, 1H, H₆)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 13.1

1-(5'-deoxy-5'-methylthymidin-6'-yl)-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione 12



The compound **11** (150.0 mg, 0.3 mmol) is dissolved in 2 mL of methanol and 3 mL of hydrochloric acid 1 M is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 1

hour. The progress of the reaction is followed by TLC. A solution of lithium hydroxide 1 M is added until obtain a pH value of 7. The mixture is then evaporated under reduced pressure and lyophilized. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to an colourless oil corresponding to the compound **12** (50.0 mg, 43 %).

The compound **12** can also be obtained by solubilisation of the compound **10** (315.0 mg, 1.11 mmol) in 4 mL of a solution of benzene/DMSO (90/10) to which is added MIDA (232.0 mg, 2.22 mmol). A Dean-Stark system containing benzene is added. The mixture is stirring at 110°C for 20 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the solvent is evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone : 95/5) to lead to the compound **12** (270.0 mg, 62 %).

Rf : 0.10 (EA/Acetone : 95/5)

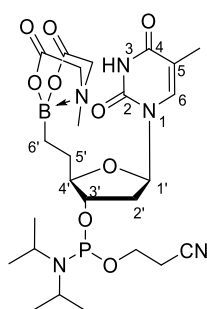
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.61-0.85 (m, 2H, H_{6'}), 1.57-1.76 (m, 2H, H_{5'}), 1.87 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.09-2.22 (m, 2H, H_{2'}), 2.89 (s, 3H, CH₃ MIDA), 3.72-3.78 (m, 1H, H_{4'}), 3.83 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H CH₂ MIDA), 3.97 (d, $J = 16.8$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.12-4.20 (m, 1H, H_{3'}), 6.18 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.29 (s, 1H, H₆), 9.20 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 12.6 (CH₃ Thymine), 29.1 (C_{5'}), 40.0 (C_{2'}), 46.7 (CH₃ MIDA), 62.8 (CH₂ MIDA), 74.5 (C_{3'}), 84.9 (C_{1'}), 89.5 (C_{4'}), 111.4 (C₅), 136.7 (C₆), 151.7 (C₂), 164.9 (C₄), 169.3 (CO MIDA)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 13.2

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₆H₂₂BN₃O₈ [M+H]⁺ : 396.1578, found : 396.1581

O*-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-*O*-[1-(5'-deoxy-5'-methylthymidin-6'-yl)-1,3,6,2-dioxaborocane-4,8-dione] phosphoramidite **13*



C₂₅H₃₉BN₅O₉P
M=595.40 g/mol

The compound **12** (270.0 mg, 0.68 mmol) is dissolved in 5 mL of anhydrous acetonitrile passed through alumina and DIEA (267 μ L, 1.57 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (305 μ L, 1.37 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 3 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone/Et₃N : 60/30/10) to lead to a solid corresponding to the compound **13** (150.0 mg, 37 %).

Rf : 0.30 (EA/Acetone/Et₃N : 60/30/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.53-0.76 (m, 2H, H_{6'a} + H_{6'b}), 1.14 (s, 6H, CH₃ iPr), 1.55-1.75 (m, 2H, H_{5'}), 1.81 (s, 3H, CH₃ Thymine), 2.13-2.37 (m, 2H, H_{2'}), 2.64 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂CN_{CNE}), 2.83 (s, 3H, CH₃ MIDA), 3.54-3.63 (m, 2H, CH iPr), 3.67-3.76 (m, 2H, OCH₂ CNE), 3.79 (dd, *J* = 16.8 Hz, 4.0 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 3.84-3.89 (m, 1H, H_{4'}), 3.95 (dd, *J* = 17.2 Hz, 2.8 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.26-4.34 (m, 1H, H_{3'}), 6.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H_{1'}), 7.25 (s, 1H, H₆)

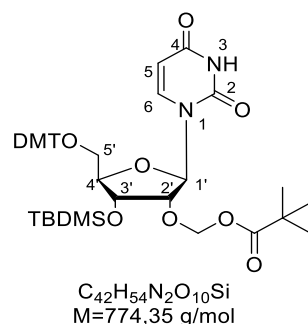
¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 12.6 (CH₃ Thymine), 20.9 (CH₂CN_{CNE}), 24.8 (CH₃ iPr), 24.9 (CH₃ iPr), 29.0 (C_{5'}), 39.0 (C_{2'}), 44.0 (CH iPr), 46.6 (CH₃ MIDA), 59.3 (OCH₂ CNE), 62.8 (CH₂ MIDA), 76.6 (C_{3'}), 85.0 (C_{1'}), 88.3 (C_{4'}), 111.5 (C₅), 119.6 (CN), 136.8 (C₆), 151.6 (C₂), 162.1 (C₄), 169.4 (CO_{MIDA})

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 13.6

³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 147.56

HRMS (ESI) : *m/z* calculated for C₂₅H₃₈BN₅O₉P [M-H]⁻ : 594.2500 found : 594.2499.

5'-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine **14**



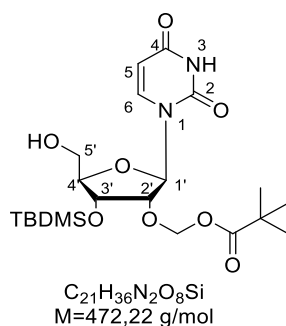
Imidazole (2.89 g, 42.0 mmol) is added to 5'-DMT-2'-PivOM uridine (7.0 g, 11.0 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (3.2 g, 22.0 mmol) dissolved in 150 mL of anhydrous pyridine is slowly added. The reaction is exothermic. The mixture is stirring at room temperature for 20

hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Water and ethyl acetate are added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH/Et₃N : 95/4/1) to lead to a white powder corresponding to the compound **14** (7.7 g, 90 %).

Rf : 0.45 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 0.05 (d, J = 4.4 Hz, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.79 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-PivOM), 1.15 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-TBDMS), 3.32 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.64 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H_{5'b}), 3.72 (s, 6H, CH₃ DMT), 3.99-4.07 (m, 1H, H_{4'}), 4.38 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 5.27 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₅), 5.31 (d, J = 6.4 Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.43 (d, J = 6.4 Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.96 (s, 1H, H_{1'}), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H_{ar} DMT), 7.22-7.31 (m, 7H, H_{ar} DMT), 7.37 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H_{ar} DMT), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₆)

3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine **15**



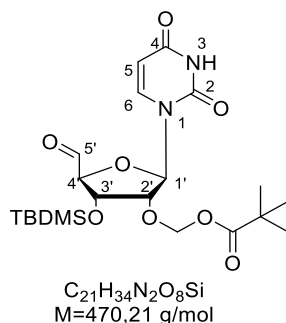
The compound **14** (7.2 g, 9.29 mmol) is dissolved in 125 mL of a solution of DCM/MeOH (70/30) and a solution of DCM/MeOH (70/30) containing 10 % BSA (4.0 g, 17.0 mmol) is added drop by drop at 0°C until the mixture becomes orange. The mixture is stirring at 0°C for 30 minutes and then at room temperature for 20 minutes. The progress of the reaction is followed by TLC. The organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **15** (3.5 g, 80 %).

Rf : 0.35 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.15 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.94 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-PivOM), 1.18 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-TBDMS), 3.69 (dd, J = 12.0 Hz, 2.8 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.83 (dd, J = 12.0 Hz, 2.8

Hz, 1H, H_{5'}b), 3.99-4.02 (m, 1H, H_{4'}), 4.38 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H_{3'}), 4.52 (t, $J = 4.8$ Hz, H_{2'}), 5.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.41 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 6.00 (s, 1H, H_{1'}), 8.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₆), 9.35 (bs, 1H, NH)

5'-aldehyde-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine **16**

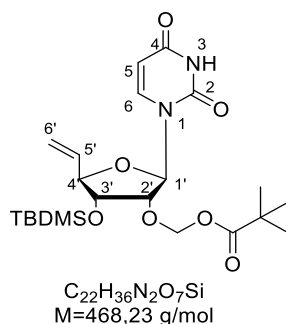


The compound **15** (1.0 g, 2.12 mmol) is dissolved in 50 mL of acetonitrile and IBX (1.18 g, 3.18 mmol) is added (insoluble). The mixture is stirring at 80°C for 6 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the mixture is filtered on celite and the filtrate is evaporated under reduced pressure to lead to a white solid corresponding to the compound **16** (990.0 mg, 99 %) which doesn't require purification.

Rf : 0.30 (EA/Cyclohexane : 80/20)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.17 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.96 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-PivOM), 1.16 (s, 9H, CH₃ *t*Bu-TBDMS), 4.34 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, H_{4'}), 4.44 (bs, 1H, H_{3'}), 4.54-4.56 (m, 1H, H_{2'}), 5.25 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.33 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH₂ PivOM), 5.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 6.21 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H_{1'}), 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₆), 9.61 (s, 1H, CHO)

5'-deoxy-5'-vinyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-*O*-pivaloyloxymethyl uridine **17**



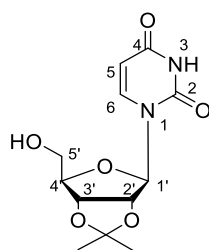
The compound **16** (1.8 g, 3.8 mmol) is dissolved in 20 mL of anhydrous THF and the Tebbe reagent (9.0 mL, 5.7 mmol) is added drop by drop at 0°C. The mixture is stirring at 0°C for 6

hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Sodium bicarbonate is added drop by drop. The reaction is exothermic. DCM is added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane : 70/30) to lead to a solid corresponding to the compound **17** (400.0 mg, 22 %).

Rf : 0.50 (EA/Cyclohexane : 70/30)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.06 (s, 3H, CH₃ Me-TBDMS), 0.09 (s, 3H, CH₃ Me-TBDMS), 0.89 (s, 9H, CH₃ tBu-PivM), 1.17 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 4.01 (dd, $J = 7.2$ Hz, 5.2 Hz, 1H, H_{4'}), 4.32-4.38 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 5.30 (d, 6.4Hz, 2H, CH₂ PivOM), 5.32 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.41 (dt, $J = 17.2$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.46 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂ PivOM), 5.73 (s, 1H, H₅), 5.75 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_{1'}), 5.86 (ddd, $J = 17.2$ Hz, 10.4 Hz, 6.8 Hz, 1H, H_{5'}), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₆), 9.64 (bs, 1H, NH)

2',3'-isopropylidene uridine **18** [362-43-6]



C₁₂H₁₆N₂O₆
M=284,26 g/mol

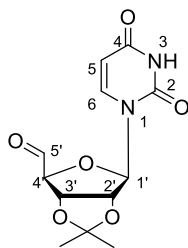
Uridine (10.0 g, 41.0 mmol) is dissolved in 80 mL of THF and 80 mL of 2,2-dimethoxypropane are added. The solution becomes white. *Para*-toluene sulfonic acid (100.0 mg, 1 % mass) is then added. The mixture is stirring at 80°C for one hour. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white powder corresponding to the compound **18** (8.5 g, 73 %).

Rf : 0.60 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1.36 (s, 3H, CH₃ IP), 1.58 (s, 3H, CH₃ IP), 3.81 (dd, $J = 12.0$ Hz, 2.4 Hz, 1H, H_{5'}), 3.93 (dd, $J = 12.0$ Hz, 2.4 Hz, 1H, H_{5'}), 4.27-4.31 (m, 1H, H_{4'}), 4.96 (dd, $J = 6.8$ Hz, 3.6 Hz, 1H, H_{2'}), 5.04 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H_{3'}), 5.57 (s, 1H, H_{1'}), 5.73 (d, $J =$

8.0 Hz, 1H, H₅), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₆), 8.55 (bs, 1H, NH)

5'-aldehyde-2',3'-isopropylidene uridine 19



C₁₂H₁₄N₂O₆
M=282,25 g/mol

The compound **18** (2.0 g, 7.0 mmol) is dissolved in 100 mL of acetonitrile and IBX (2.9 g, 10.0 mmol) is added (insoluble). The mixture is stirring at 80°C for 5 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the solution is filtered on celite and evaporated under reduced pressure to lead to a white solid corresponding to the compound **19** (1.98 g, quantitative) which doesn't require purification.

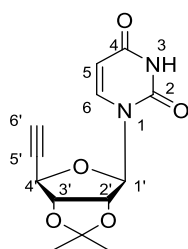
Rf : 0.55 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1.35 (s, 3H, CH₃ IP), 1.52 (s, 3H, CH₃ IP), 4.55 (bs, 1H, H_{4'}), 5.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H_{2'}), 5.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.51 (s, 1H, H_{1'}), 5.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₅), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₆), 9.42 (s, 1H, CHO), 9.74 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 24.9 (CH₃ IP), 26.5 (CH₃ IP), 83.8 (C_{2'}), 84.9 (C_{3'}), 94.2 (C_{4'}), 100.2 (C₅), 102.9 (C_{1'}), 113.7 (C_{IV} IP), 144.5 (C₆), 150.7 (C₂), 163.8 (C₄), 199.6 (CHO)

HRMS (ESI⁺) : *m/z* calculated for C₁₂H₁₄N₂O₆ [M+H]⁺ : 283.0930, found : 283.0931

5'-deoxy-5'-ethynyl-2',3'-isopropylidene uridine 20



C₁₃H₁₄N₂O₅
M=278,09 g/mol

The compound **19** (200.0 mg, 0.71 mmol) is dissolved in 3 mL of methanol. Then, the Bestmann-Ohira reagent (269.5 mg, 1.42 mmol) dissolved in 1 mL of methanol and K₂CO₃

(245.0 mg, 1.77 mmol) are added. The mixture is stirring at 30°C for 4 hours and after 30 minutes the solution becomes green. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is then evaporated under reduced pressure, ethyl acetate is added and the organic layer is washed with ammonium chloride, dried on sodium sulphate and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane : 90/10) to lead to a white solid corresponding to the compound **20** (100.0 mg, 50 %).

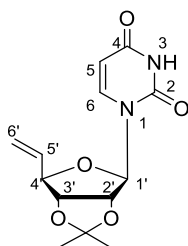
Rf : 0.60 (EA/Cyclohexane : 90/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1.36 (s, 3H, CH₃ IP), 1.52 (s, 3H, CH₃ IP), 3.21 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H_{6'}), 4.89 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H_{4'}), 5.02 (dd, J = 6.0 Hz, 2.4 Hz, 1H, H_{2'}), 5.16 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₅), 5.85 (s, 1H, H_{1'}), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₆)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 25.3 (CH₃ IP), 27.1 (CH₃ IP), 78.1 (C_{4'}), 78.9 (C_{5'}), 80.9 (C_{6'}), 83.3 (C_{2'}), 86.9 (C_{3'}), 95.5 (C_{1'}), 102.2 (C₅), 115.1 (C_{IV} IP), 143.9 (C₆), 152.1 (C₂), 166.2 (C₄)

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₃H₁₅N₂O₅ [M+H]⁺ : 279.0981, found : 279.0981

5'-deoxy-5'-vinyl-2',3'-isopropylidene uridine **21**



C₁₃H₁₆N₂O₅
M=280,27 g/mol

The compound **20** (300.0 mg, 1.1 mmol) is dissolved in 10 mL of methanol and the Lindlar catalyst (39.0 mg, 0.1 mmol) is added. Cyclohexene (10.2 mL, 110.0 mmol) is then added to avoid overhydrogenation. The mixture is hydrogenated at room temperature for 6 hours. The progress of the reaction is followed by NMR ¹H. The mixture is then filtered on celite and the filtrate is evaporated under reduced pressure to lead to a white solid corresponding to the compound **21** (298.0 mg, quantitative) which doesn't require purification.

The compound **21** can also be obtained by using the Nysted reagent. This last one (16.2 mL, 7.08 mmol) is dissolved in 20 mL of anhydrous THF and BF₃OEt₂ (1.75 mL, 14.0 mmol) is added drop by drop at 0°C. The mixture is stirring at 0°C for 15 minutes and the compound **19**

(2.0 g, 7.08 mmol) dissolved in 5 mL of anhydrous THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 4 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Sodium bicarbonate is added drop by drop. The reaction is exothermic. Butanol is then added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **21** (1.8 g, 88 %).

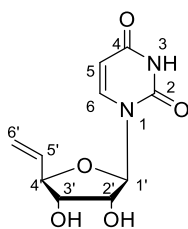
Rf : 0.60 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1.35 (s, 3H, CH₃ IP), 1.55 (s, 3H, CH₃ IP), 4.44-4.48 (m, 1H, H_{4'}), 4.74 (dd, $J = 6.4$ Hz, 4.4 Hz, 1H, H_{2'}), 5.04 (dd, $J = 6.4$ Hz, 2.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.22 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.33 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 5.78 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_{1'}), 6.0 (ddd, $J = 17.2$ Hz, 10.4 Hz, 7.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, H₆)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 25.6 (CH₃ IP), 27.5 (CH₃ IP), 85.5 (C_{2'}), 85.8 (C_{3'}), 89.7 (C_{1'}), 94.5 (C_{4'}), 102.8 (C₅), 115.5 (C_{IV} IP), 118.4 (C_{6'}), 136.9 (C_{5'}), 144.6 (C₆), 151.9 (C₂), 166.2 (C₄)

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₃H₁₆N₂O₅ [M+H]⁺ : 281.1137, found : 281.1142

5'-deoxy-5'-vinyl uridine **22**



C₁₀H₁₂N₂O₅
M=240,07 g/mol

The compound **21** (5.0 g, 18.0 mmol) is dissolved in 200 mL of milli-Q water and TCA (14.6 g, 89.0 mmol) is then added. The mixture is stirring at room temperature for 4 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Water is evaporated under reduced pressure and the crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 90/10) to lead to a white solid corresponding to the compound **22** (3.0 g, 69 %).

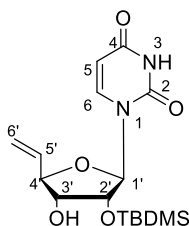
Rf : 0.30 (DCM/MeOH : 90/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 3.49 (d, J = 3.2 Hz, 1H, OH), 3.96 (t, J = 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), 4.20 (q, J = 5.2 Hz, 3.6 Hz, 1H, H_{2'}), 4.34 (td, J = 6.4 Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{4'}), 5.28 (dt, J = 10.4 Hz, 1.6 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.40 (dt, J = 10.4 Hz, 1.6 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₅), 5.83 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H_{1'}), 6.03 (ddd, J = 17.2 Hz, 10.4 Hz, 6.4 Hz, 1H, H_{5'}), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₆)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 75.0 (C_{3'} + C_{2'}), 85.6 (C_{4'}), 91.9 (C_{1'}), 102.9 (C₅), 118.4 (C_{6'}), 136.7 (C_{5'}), 142.4 (C₆), 152.2 (C₂), 166.1 (C₄)

HRMS (ESI⁻) : m/z calculated for C₁₀H₁₂N₂O₅ [M-H]⁻ : 239.0668 found : 239.0669

5'-deoxy-5'-vinyl-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl uridine 23a²⁶³



C₁₆H₂₆N₂O₅Si
M=354,16 g/mol

The compound 22 (2.8 g, 12.0 mmol) is dissolved in 25 mL of anhydrous THF. Pyridine (4.0 mL, 50.4 mmol) and silver nitrate (2.8 g, 14.0 mmol) are then added. The mixture is stirring at room temperature for 15 minutes and the *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.76 g, 12.0 mmol) is added. The mixture is stirring at room temperature for 4 hours. A precipitate is formed. The progress of the reaction is followed by TLC. The solution is filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by fine silica gel column chromatography (DCM/Acetone : 90/10) to lead to a white powder corresponding to the compound 23a (2.3 g, 54 %).

Rf : 0.35 (DCM/Acetone : 90/10)

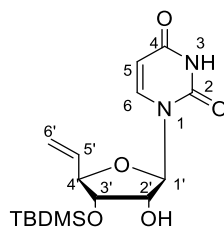
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.10 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.91 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 3.07 (d, J = 7.2 Hz, 1H, OH), 3.85 (q, J = 5.2 Hz, 1H, H_{3'}), 4.23 (dd, J = 4.0 Hz, 3.2 Hz, 1H, H_{2'}), 4.30 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H_{4'}), 5.29 (dt, J = 8.0 Hz, 0.8 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.40 (dt, J = 13.6 Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.64 (dd, J = 6.4 Hz, 1.6 Hz, 1H, H₅), 5.74 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H_{1'}), 5.99 (ddd, J = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 5.6 Hz, 1H, H_{5'}), 7.39 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H₆), 9.08 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : -4.7 (CH₃ Me-TBDMS), 18.7 (C_{IV} tBu-TBDMS), 2.9 (CH₃ tBu-

TBDMS), 74.7 (C_{3'}), 76.2 (C_{2'}), 85.2 (C_{4'}), 90.9 (C_{1'}), 103.0 (C₅), 118.9 (C_{6'}), 136.4 (C_{5'}), 141.3 (C₆), 151.4 (C₂), 164.0 (C₄)

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₆H₂₆N₂O₅Si [M+H]⁺ 355.1684, found : 355.1693

5'-deoxy-5'-vinyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl uridine 23b²⁶³



C₁₆H₂₆N₂O₅Si
M=354,16 g/mol

The secondary product **23b** with the *tert*-butyldimethylsilyl group in 3' position is also obtained in low quantity (30.0 mg, 5 %) by silylation of the compound **22**.

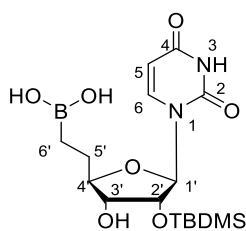
Rf : 0.25 (DCM/Acetone : 90/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.00 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.81 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 3.35 (bs, 1H, OH), 3.96-4.01 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 4.15 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{4'}), 5.30 (dt, $J = 11.2$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'a}), 5.39 (dt, $J = 17.2$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{6'b}), 5.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₅), 5.63 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H_{1'}), 5.95 (ddd, $J = 17.2$ Hz, 10.4 Hz, 7.6 Hz, 1H, H_{5'}), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₆), 9.11 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : -4.4 (CH₃ Me-TBDMS), 18.7 (C_{IV} tBu-TBDMS), 2.1 (CH₃ tBu-TBDMS), 74.8 (C_{2'}), 75.8 (C_{3'}), 85.7 (C_{4'}), 91.4 (C_{1'}), 102.9 (C₅), 119.6 (C_{6'}), 136.2 (C_{5'}), 141.8 (C₆), 151.6 (C₂), 164.2 (C₄)

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₆H₂₆N₂O₅Si [M+H]⁺ 355.16837, found : 355.16907

1-(5'-deoxy-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl uridin-5'-yl)methylboronic acid 24a



C₁₆H₃₁BN₂O₈Si
M=400,18 g/mol

To 3 mL of anhydrous diethyl ether are added borane dimethylsulfide (1.16 mL, 12.0 mmol) and α -pinene (2.15 mL, 24.0 mmol) drop by drop. The mixture is stirring at 35°C for 4 hours. After return to room temperature, the compound **23a** (540.0 mg, 1.52 mmol) dissolved in anhydrous THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. 1 mL of hydrochloric acid 0.1 M is added drop by drop. The reaction is exothermic. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone : 90/10) to lead to a white solid corresponding to the compound **24a** (200.0 mg, 51 %).

Rf : 0.35 (EA/Acetone : 90/10)

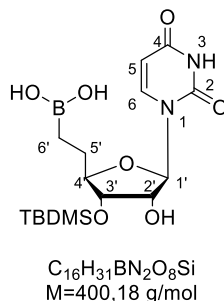
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.09 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.9 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.82-1.92 (m, 2H, H_{6'}), 3.12 (d, J = 6.0 Hz, 1H, OH), 3.58-3.71 (m, 2H, H_{5'}), 3.80 (q, J = 5.6 Hz, 1H, H_{3'}), 3.97 (q, J = 6.0 Hz, 1H, H_{4'}), 4.23 (q, J = 5.2 Hz, 4.0 Hz, 1H, H_{2'}), 5.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₅), 5.71 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H_{1'}), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₆), 8.96 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : -4.7 (CH₃ Me-TBDMS), 18.8 (C_{IV} TBDMS), 26.1 (CH₃ tBu-TBDMS), 36.9 (C_{6'}), 59.4 (C_{5'}), 74.7 (C_{3'}), 76.2 (C_{2'}), 82.3 (C_{4'}), 90.7 (C_{1'}), 103.0 (C₅), 141.4 (C₆), 151.9 (C₂), 163.7 (C₄)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 31.1

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₆H₃₁BN₂O₈Si [M-OH]⁺ : 383.1807, found : 383.1810

1-(5'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl uridin-5'-yl)methylboronic acid **24b**



The secondary product **24b** can't be isolated but could be characterized from a mixture of **24a** and **24b**.

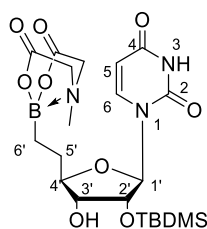
Rf : 0.30 (EA/Acetone : 9/1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.13 (s, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.93 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.73-1.82 (m, 2H, H_{6'}), 3.22 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, OH), 3.57-3.73 (m, 2H, H_{5'}), 3.81 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, H_{3'}), 4.03-4.09 (m, 1H, H_{2'}), 5.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 5.72 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₆), 9.14 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : -4.5 (CH₃ Me-TBDMS), 14.5 (C_{IV} TBDMS), 26.2 (CH₃ tBu-TBDMS), 36.7 (C_{6'}), 59.3 (C_{5'}), 74.7 (C_{3'}), 75.7 (C_{2'}), 82.0 (C_{4'}), 91.0 (C_{1'}), 102.9 (C₅), 141.7 (C₆), 151.5 (C₂), 164.0 (C₄)

1-(5'-deoxy-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl uridin-5'-yl)-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione

25



C₂₁H₃₄BN₃O₉Si
M=511,22 g/mol

The compound **26a** (250.0 mg, 0.63 mmol) is dissolved in 5 mL of a solution of benzene/DMSO (90/10) and MIDA (184.0 mg, 1.25 mmol) is added. A Dean-Stark system containing benzene is added. The mixture is stirring at 110°C for 20 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the solvent is evaporated under reduced pressure and lyophilized. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone : 80/20) to lead to a white solid corresponding to the compound **27** (200.0 mg, 63 %).

Rf : 0.20 (EA/Acetone : 80/20)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 0.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 6H, CH₃ Me-TBDMS), 0.60-0.82 (m, 2H, H_{6'}), 0.89 (s, 9H, CH₃ tBu-TBDMS), 1.60-1.80 (m, 2H, H_{5'}), 2.86 (s, 3H, CH₃ MIDA), 2.99 (bs, 1H, OH), 3.76-3.85 (m, 2H, H_{3'} + H_{4'}), 3.80 (d, $J = 18.0$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 3.94 (d, $J = 16.8$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.21 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H_{2'}), 5.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 5.77 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₆), 9.03 (bs, 1H, NH)

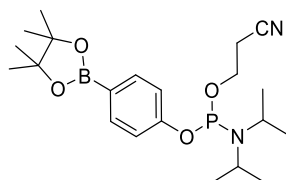
¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : -4.7 (CH₃ Me-TBDMS), 18.7 (C_{IV} tBu-TBDMS), 26.1 (CH₃ tBu-TBDMS), 28.9 (C_{5'}), 46.7 (CH₃ MIDA), 62.8 (CH₂ MIDA), 74.3 (C_{3'}), 76.2 (C_{2'}), 87.0 (C_{4'}), 90.0

(C_{1'}), 103.2 (C₅), 141.4 (C₆), 151.5 (C₂), 163.7 (C₄), 169.2 (CO_{MIDA})

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 13.2

HRMS (ESI⁺) : *m/z* calculated for C₂₁H₃₄BN₃O₉Si [M+H]⁺ : 512.2234 , found : 512.2234

2-cyanoethyl (4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)) diisopropylphosphoramidite 26



C₂₁H₃₄BN₂O₄P
M=420,30 g/mol

4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (150.0 mg, 0.68 mmol) is dissolved in 2 mL of anhydrous DCM passed through alumina and DIEA (267.0 μL, 1.57 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (304.0 μL, 1.36 mmol) are then added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 3 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/EA/Et₃N : 80/10/10) to lead to a white solid corresponding to the compound 26 (120.0 mg, 42 %).

Rf : 0.55 (Cyclohexane/EA : 90/10)

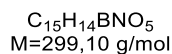
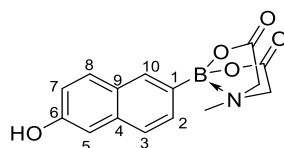
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH₃_{iPr}), 1.19 (d, *J*=6.8Hz, 6H, CH₃_{iPr}), 1.29 (s, 12H, CH₃_{pinacol}), 2.61 (td, *J* = 6.4 Hz, 2.0 Hz, 2H, CH₂_{CNE}), 3.64-3.73 (m, 2H, CH_{iPr}), 3.86-3.92 (m, 2H, CH₂_{CNE}), 7.00 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 2H, H_{ar}), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{ar})

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20.4 (CH₂_{CNE}), 24.4 (CH₃_{iPr}), 24.9 (CH₃_{pinacol}), 43.7 (CH_{iPr}), 58.9 (CH₂_{CNE}), 83.7 (C_{IV}_{pinacol}), 117.5 (C_{IV}_{Ph-B}), 119.2 (C_{ar}), 136.5 (C_{ar}), 157.1 (C_{IV}_{Ph-O})

¹¹B NMR (128 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 30.8

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 146.19

HRMS (ESI⁻) : *m/z* calculated for C₂₁H₃₄BN₂O₄P [M-H]⁻ : 420.2456, found : 420.2458

2-(6-hydroxynaphtalen-2-yl)-6-methyl-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione 27

(6-hydroxynaphtalen-2-yl)boronic acid (150.0 mg, 0.80 mmol) is dissolved in 10 mL of a solution of benzene/DMSO (9/1) and MIDA (120.0 mg, 0.80 mmol) is added. A Dean-Stark system containing benzene is added. The mixture is stirring at 110°C for 20 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, the solvent is evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 90/10) to lead to a white solid corresponding to the compound 27 (190.0 mg, 80 %).

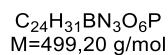
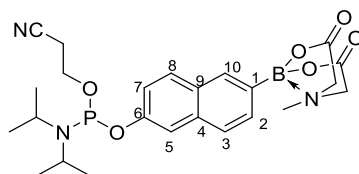
Rf : 0.35 (DCM/MeOH : 90/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 2.50 (s, 3H, CH₃ MIDA), 2.91 (s, 1H, OH), 3.92 (d, J = 16.8 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.09 (d, J = 16.8 Hz, 2H, CH₂ MIDA), 7.10 (dd, J = 9.2 Hz, 2.8 Hz, 1H, H₇), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H₅), 7.49 (dd, J = 8.4 Hz, 1.2 Hz, 1H, H₂), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₈), 7.93 (s, 1H, H₁₀)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 48.5 (CH₃ MIDA), 63.0 (CH₂ MIDA), 109.7 (C₅), 119.1 (C₇), 126.6 (C₃), 129.2 (C₁), 130.6 (C₂), 131.1 (C₈), 133.8 (C₁₀), 136.5 (C₄ + C₉), 156.4 (C₆), 169.7 (CO MIDA)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 11.9

HMRS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₅H₁₄BNO₅ [M+H]⁺ : 300.1043, found : 300.1044

2-cyanoethyl (6-(6-methyl-4,8-dioxo-1,3,6,2-dioxazaborocan-2-yl)naphtalen-2-yl) diisopropylphosphoramidite 28

The compound **27** (190.0 mg, 0.64 mmol) is dissolved in 4 mL of anhydrous acetonitrile passed through alumina and DIEA (248.0 μ L, 1.46 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (283.0 μ L, 1.27 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 3 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone/Et₃N : 70/20/10) to lead to a white solid corresponding to the compound **28** (70.0 mg, 22 %).

Rf : 0.5 (DCM/Acetone/Et₃N : 70/20/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 1.21 (d, J = 6.8 Hz, 6H, CH₃ _{iPr}), 1.26 (d, J = 6.8 Hz, 6H, CH₃ _{iPr}), 2.54 (s, 3H, CH₃ _{MIDA}), 2.75 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂ _{CNE}), 2.84 (s, 1H, OH), 3.75-2.85 (m, 2H, CH _{iPr}), 3.89-4.01 (m, 2H, CH₂ _{CNE}), 3.97 (d, J = 17.2 Hz, 2H, CH₂ _{MIDA}), 4.14 (d, J = 17.2 Hz, 2H, CH₂ _{MIDA}), 7.27 (dd, J = 8.8 Hz, 2.4Hz, 1H, H₇), 7.53 (bs, 1H, H₅), 7.57 (dd, J = 8.4 Hz, 1.2 Hz, 1H, H₂), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.88 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₈), 8.02 (s, 1H, H₁₀)

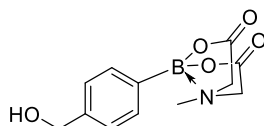
¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 21.0 (CH₂ _{CNE}), 24.8 (CH₃ _{iPr}), 44.5 (CH _{iPr}), 48.5 (CH₃ _{MIDA}), 60.0 (CH₂ _{CNE}), 62.9 (CH₂ _{MIDA}), 115.5 (C₅), 119.6 (CN), 122.3 (C₇), 127.2 (C₃), 130.4 (C₁), 130.8 (C₂), 131.0 (C₈), 133.8 (C₁₀), 135.9 (C₄ + C₉), 153.7 (C₆), 169.8 (CO _{MIDA})

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 12.0

³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 146.18

HMRS (ESI⁺) : m/z calculated for C₂₄H₃₁BN₃O₆P [M+H]⁺ : 500.2122, found : 500.2127

2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)-6-methyl-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione **29**



C₁₂H₁₄BN₂O₅
M=263.10 g/mol

The 4-(hydroxymethyl)phenylboronic acid (200 mg, 1.32 mmol) was dissolved in 3 mL of a solution of benzene/DMSO (9/1) to which was added MIDA (387 mg, 2.63 mmol). A Dean-Stark system containing benzene was added and the mixture was stirring at 110°C for 20 hours. The progress of the reaction was followed by TLC. After return to room temperature, the

solvent was evaporated under reduced pressure and the crude material was purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone : 80/20) to lead to the compound **29** (340 mg, 98 %).

Rf : 0.35 (EA/Acetone : 80/20)

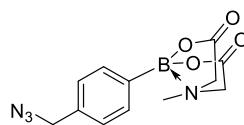
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 2.49 (s, 3H, CH₃ MIDA), 3.91 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.11 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.57 (s, 2H, CH₂), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{ar})

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 41.4 (CH₃ MIDA), 62.8 (CH₂ MIDA), 64.6 (CH₂), 127.2 (C_{ar}), 133.5 (C_{ar}), 144.2 (C_{IV}), 169.6 (CO MIDA)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 11.6

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₂H₁₄BN₂O₅ [M+H]⁺ : 264.1043, found : 264.1039

2-(4-(azidomethyl)phenyl)-6-methyl-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione 30³¹⁸



C₁₂H₁₃BN₄O₄
M=288,10 g/mol

The compound **29** (200.0 mg, 0.76 mmol) is dissolved in 4 mL of anhydrous DMF and are added drop by drop at 0°C DPPA (212 μ L, 0.91 mmol) and DBU (136 μ L, 0.91 mmol). The mixture is stirring at room temperature for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with water, dried on sodium sulphate and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Acetone : 80/20) to lead to a white solid corresponding to the compound **30** (195.0 mg, 80.9%).

Rf : 0.50 (EA/Acetone : 80/20)

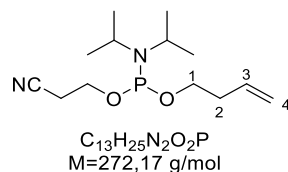
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 2.50 (s, 3H, CH₃ MIDA), 3.90 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.08 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H, CH₂ MIDA), 4.41 (s, 2H, CH₂), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{ar})

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 48.5 (CH₃ MIDA), 55.1 (CH₂), 62.9 (CH₂ MIDA), 128.9 (C_{ar}), 133.9 (C_{ar}), 138.9 (C_{IV}), 169.6 (CO MIDA)

^{11}B NMR (128 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 11.4

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BN}_4\text{O}_4$ [$\text{M}-\text{N}_2+\text{H}$]⁺ : 261.1043 , found : 261.41071

But-3-en-1-yl (2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite 31



3-buten-1-ol (178.0 μL , 2.08 mmol) is dissolved in 2 mL of anhydrous DCM passed through alumina and DIEA (814.0 μL , 4.78 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (928.0 μL , 4.16 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 80/15/5) to lead to a yellow oil corresponding to the compound **31** (450.0 mg, 79 %).

Rf : 0.40 (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 80/15/5)

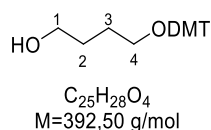
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 1.18 (d, $J = 4.8$ Hz, 6H, CH_3_{iPr}), 1.20 (d, $J = 4.4$ Hz, 6H, CH_3_{iPr}), 2.36 (q, $J = 13.6$ Hz, 6.8 Hz, 2H, H_2), 2.70 (td, $J = 6.4$ Hz, 2.0 Hz, 2H, CH_2_{CNE}), 3.59-3.69 (m, 2H, CH_2_{CNE}), 3.70-3.77 (m, 2H, H_1), 3.78-3.85 (m, 2H, CH_2_{CNE}), 5.01-5.14 (m, 2H, H_4), 5.81-5.93 (m, 1H, H_3)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 20.9 (CH_2_{CNE}), 25.0 (CH_3_{iPr}), 36.8 (C_2), 44.2 (CH_{iPr}), 59.7 (CH_2_{CNE}), 64.1 (C_1), 117.0 (C_4), 119.4 (CN), 136.3 (C_3)

^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 147.18

HMRS (ESI⁺) : m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺ : 273.1732 , found : 273.1731

4-dimethoxytritylbutan-1-ol 32



1,4-butanediol (196.0 μL , 2.22 mmol) is dissolved in 2 mL of anhydrous pyridine and dimethoxytrityl chloride (150.0 mg, 0.44 mmol) dissolved in anhydrous pyridine is slowly

added. The mixture is stirring at room temperature for 3 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane : 40/60) to lead to a white solid corresponding to the compound **32** (100.0 mg, 57 %).

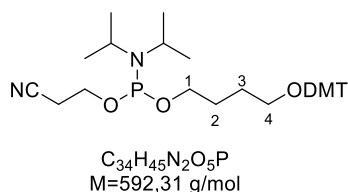
Rf : 0.25 (EA/Cyclohexane : 40/60)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1.56-1.68 (m, 4H, H₂ + H₃), 3.06 (t, J = 5.6 Hz, 2H, H₄), 3.52 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H₁), 3.71 (s, 6H, OCH₃), 4.85 (s, 1H, OH), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 4H, H_{ar DMT}), 7.15 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H_{ar DMT}), 7.22 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H_{ar DMT}), 7.28 (d, J = 9.2 Hz, 4H, H_{ar DMT}), 7.41 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H_{ar DMT})

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 27.5 (C₃), 30.6 (C₂), 55.7 (CH_{3 DMT}), 62.8 (C₁), 64.2 (C₄), 87.1 (C_{IV DMT}), 113.9 (C₆), 127.6 (C_{ar DMT}), 128.6 (C_{ar DMT}), 129.3 (C_{ar DMT}), 131.2 (C_{ar DMT}), 137.8 (C_{ar DMT}), 146.8 (C_{ar DMT}), 159.9 (C_{ar DMT})

HMRS (ESI⁺) : m/z calculated for C₂₅H₂₈O₄ [M+H+Na]⁺ : 415.1885, found : 415.1885

2-cyanoethyl (4-dimethoxytritylbutyl) diisopropylphosphoramidite **33** [CLP-9775]



The compound **32** (170.0 mg, 0.43 mmol) is dissolved in 2 mL of anhydrous DCM passed through alumina and DIEA (170.0 μ L, 0.99 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (193.0 μ L, 0.97 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane/Et₃N : 10/80/10) to lead to a yellow oil corresponding to the compound **33** (122.5 mg, 45 %).

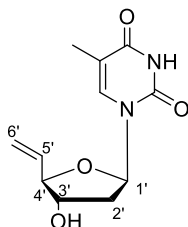
Rf : 0.45 (EA/Cyclohexane/Et₃N : 10/80/10)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ (ppm) : 1.09-1.24 (m, 12H, CH_{3 iPr}), 1.62-1.69 (m, 4H, H₂ + H₃), 2.60 (t, J = 6Hz, 2H, CH_{2 CNE}), 3.01-3.06 (m, H₄), 3.53-3.64 (m, 4H, CH_{iPr} + H₁), 3.69-3.82 (m, 2H, CH_{2 CNE}), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 6.84 (d, J = 9.2Hz, 4H, H_{ar DMT}), 7.21 (d, J = 7.6

Hz, 1H, $H_{ar\ DMT}$), 7.26-7.31 (m, 6H, $H_{ar\ DMT}$), 7.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $H_{ar\ DMT}$)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 20.99 ($\text{CH}_2\ \text{CNE}$), 24.9 ($\text{CH}_3\ \text{iPr}$), 27.2 (C_3), 29.0 (C_2), 43.7 ($\text{CH}\ \text{iPr}$), 55.9 ($\text{CH}_3\ \text{DMT}$), 59.2 ($\text{CH}_2\ \text{CNE}$), 63.8 (C_4), 61.1 (C_1), 86.6 ($\text{C}_{IV\ \text{DMT}}$), 113.9 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 119.6 (CN), 127.6 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 128.7 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 129.0 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 130.9 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 137.5 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 146.6 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$), 159.5 ($\text{C}_{ar\ \text{DMT}}$)

5'-deoxy-5'-vinyl thymidine **34**



$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$
M=238,10 g/mol

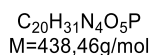
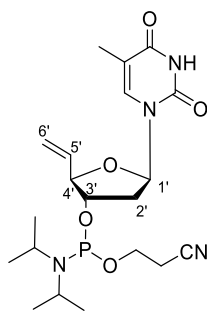
The compound **8** (720.0 mg, 2.0 mmol) is dissolved in 3 mL of hydrochloric acid 1.25 M in solution of methanol. The mixture is stirring at room temperature for 1 hour. The progress of the reaction is followed by TLC. A solution of lithium hydroxide 1.25 M is added until obtain a pH value of 7. The solution is then evaporated under reduced pressure and lyophilized. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **34** (306.0 mg, 63 %).

Rf : 0.25 (DCM/MeOH : 95/5)

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 1.84 (s, 3H, $\text{CH}_3\ \text{Thymine}$), 2.17 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 2.19 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.42-3.46 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.15-4.22 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 5.25 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{6'}$), 5.36 (dt, $J = 17.2$ Hz, 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{6'}$), 5.98 (ddd, $J = 17.2$ Hz, 10.4 Hz, 6.4 Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6.20 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.24 (s, 1H, H_6), 8.92 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 12.5 ($\text{CH}_3\ \text{Thymine}$), 39.6 ($\text{C}_{2'}$), 75.0 ($\text{C}_{3'}$), 85.0 ($\text{C}_{1'}$), 87.9 ($\text{C}_{4'}$), 111.4 (C_5), 118.1 ($\text{C}_{6'}$), 136.7 (C_6), 137.1 ($\text{C}_{5'}$), 151.4 (C_2), 164.5 (C_4)

HMRS (ESI⁺) : m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 239.1026, found : 239.1031

O*-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-*O*-(5'-deoxy-5'-vinyl thymidine) phosphoramidite **35*

The compound **34** (306.0 mg, 1.29 mmol) is dissolved in 8 mL of anhydrous ACN passed through alumina and DIEA (512.0 μL , 2.98 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (574.0 μL , 2.6 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. The solvent is evaporated under reduced pressure and the crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 60/35/5) to lead to a yellow oil corresponding to the compound **35** (280.0 mg, 50 %).

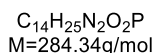
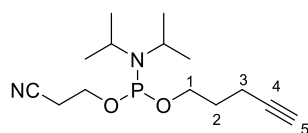
Rf : 0.35 (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 60/35/5)

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 1.16 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 12H, CH_3 $i\text{Pr}$), 1.84 (s, 3H, CH_3 Thymine), 2.23-2.42 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$), 2.66 (t, $J = 6.0\text{ Hz}$, 2H, CH_2 CNE), 3.56-3.66 (m, 2H, CH $i\text{Pr}$), 3.70-3.85 (m, 2H, CH_2 CNE), 4.30-4.43 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$ + $\text{H}_{4'}$), 5.24-5.28 (dt, $J = 10.4\text{ Hz}$, 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 5.34-5.41 (dt, $J = 16.4\text{ Hz}$, 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 5.94-6.04 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6.21 (t, $J = 6.8\text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{1'}$), 7.28 (s, 1H, H_6)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 12.5 (CH_3 Thymine), 21.0 (CH_2 CNE), 24.8 (CH_3 $i\text{Pr}$), 38.8 ($\text{C}_{2'}$), 44.0 (CH $i\text{Pr}$), 59.4 (CH_2 CNE), 77.1 ($\text{C}_{3'}$), 85.4 ($\text{C}_{1'}$), 87.1 ($\text{C}_{4'}$), 111.5 (C_5), 118.7 ($\text{C}_{6'}$), 119.5 (CN), 136.4 ($\text{C}_{5'}$), 137.0 (C_6), 151.6 (C_2), 165.2 (C_4)

^{31}P NMR (162 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 148.1

HMRS (ESI $^+$) : m/z calculated for $[\text{M}+\text{NH}_3+\text{H}]^+$: 457.2210 , found : 457.2195

Pent-4-yne-1-yl (2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite 36

4-pentyn-1-ol (222.0 μL , 2.38 mmol) is dissolved in 3 mL of anhydrous DCM passed through alumina and DIEA (947.0 μL , 5.47 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (1.06 mL, 4.76 mmol) are added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. Ethyl acetate, washed before with sodium bicarbonate, is added. The organic layer is washed with sodium bicarbonate, dried and evaporated under reduced pressure. The crude material is immediately purified by silica gel column chromatography (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 70/25/5) to lead to a colorless oil corresponding to the compound 36 (498.0 mg, 74 %).

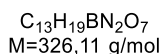
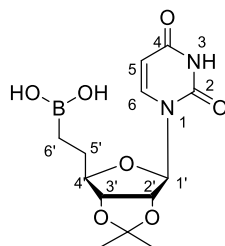
Rf : 0.50 (EA/Cyclohexane/ Et_3N : 70/25/5)

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 1.34 (dd, $J = 6.8$ Hz, 1.2 Hz, 9H, CH_3_{iPr}), 1.77 (m, 2H, H_2), 2.14 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, H_5), 2.27 (td, $J = 7.2$ Hz, 2.8 Hz, 2H, H_3), 2.80 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2_{CNE}), 3.73-4.01 (m, 5H, CH_{iPr} , CH_2_{CNE} , H_1)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 15.4 (C_3), 20.8 (CH_2_{CNE}), 24.8 (CH_3_{iPr}), 24.9 (CH_3_{iPr}), 30.7 (C_2), 43.6 (CH_{iPr}), 59.1 (CH_2_{CNE}), 62.5 (C_1), 69.8 (C_5), 84.5 (C_4), 119.2 (CN)

^{31}P NMR (162 MHz, CD_3CN) δ (ppm) : 147.16

HMRS (ESI $^+$) : m/z calculated for $[\text{M}+\text{H}]^+$: 285.1726, found : 285.1731

1-(5'-deoxy-2',3'-isopropylidene uridin-5'-yl)methylboronic acid 37

To 10 mL of anhydrous diethyl ether are added drop by drop borane dimethylsulfide (1.74

mL, 29.0 mmol) and α -pinene (9.07 mL, 57.0 mmol). The mixture is stirring at 35°C for 4 hours. After return to room temperature, the compound **21** (1.74 mL, 29.2 mmol) dissolved in THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. 1 mL of hydrochloric acid 0.1 M is added drop by drop. The reaction is exothermic. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a yellow oil corresponding to the product **37** (900.0 mg, 77 %).

Rf : 0.25 (DCM/MeOH : 95/5)

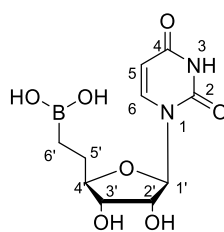
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 0.82-0.91 (m, 2H, H_{6'}), 1.34 (s, 3H, CH₃ IP), 1.53 (s, 3H, CH₃ IP), 1.67-1.80 (m, 2H, H_{5'}), 3.91-3.98 (m, 1H, H_{4'}), 4.58 (dd, $J = 6.8$ Hz, 4.8 Hz 1H, H_{3'}), 4.94 (dd, $J = 6.8$ Hz, 2.8 Hz, 1H, H_{2'}), 5.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₅), 5.77 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H_{1'}), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₆)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 10.4 (C_{6'}), 25.6 (CH₃ IP), 27.5 (CH₃ IP), 28.8 (C_{5'}), 84.9 (C_{3'}), 85.7 (C_{2'}), 89.3 (C_{4'}), 93.4 (C_{1'}), 102.9 (C₅), 115.6 (C_{IV} IP), 143.9 (C₆), 151.9 (C₂), 166.2 (C₄)

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 30.9

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₃H₁₉N₂O₇B [M+H-H₂O]⁺ : 309.0880, found : 309.0875

1-(5'-deoxyuridin-5'-yl)methylboronic acid **38**⁴⁶³



C₁₀H₁₅BN₂O₇
M=286,10 g/mol

The compound **37** (660.0 mg, 2.0 mmol) is dissolved in 12 mL of milli-Q water and 15 mL of hydrochloric acid 2 N are added drop by drop. The mixture is stirring at 80°C for 2 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. After return to room temperature, a solution of lithium hydroxide 1.5 M is added until obtain a pH value of 7. The water is evaporated under reduced pressure and lyophilized to lead to a white powder that corresponding to the compound

38 (400.0 mg, 70 %) which doesn't require purification.

The compound **38** can also be obtained from the compound **22**. To 5 mL of anhydrous diethyl ether are added borane dimethylsulfide (2.99 mL, 15.0 mmol) and α -pinene (4.76 mL, 30.0 mmol) drop by drop. The mixture is stirring at 35°C for 4 hours. After return to room temperature, the compound **22** (450.0 mg, 1.9 mmol) dissolved in anhydrous THF is added drop by drop. The mixture is stirring at room temperature for 15 hours. The progress of the reaction is followed by TLC. 1 mL of hydrochloric acid 0.1 M is added drop by drop. The reaction is exothermic. Ethyl acetate is added and the organic layer is washed with sodium chloride, dried on sodium sulphate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material is purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH : 95/5) to lead to a white solid corresponding to the compound **38** (170.0 mg, 32 %).

Rf : 0.25 (DCM/MeOH : 95/5)

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 0.85 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_{6'}), 1.67-1.87 (m, 2H, H_{5'}), 3.87-3.95 (m, 1H, H_{4'}), 3.96-4.03 (m, 1H, H_{3'}), 4.24-4.32 (m, 1H, H_{2'}), 5.78 (d, J = 4.4 Hz, 1H, H_{1'}), 5.83 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₅), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₆)

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 10.1 (C_{6'}), 27.4 (C_{5'}), 72.6 (C_{3'}), 73.5 (C_{2'}), 85.6 (C_{4'}), 89.5 (C_{1'}), 102.4 (C₅), 141.9 (C₆), 151.7 (C₂), 166.2 (C₄)

¹¹B NMR (128 MHz, D₂O) δ (ppm) : 32.4

HRMS (ESI⁺) : m/z calculated for C₁₀H₁₆sN₂O₇ [M+H]⁺ : 287.10469, found : 287.10509

Experimental procedures for oligonucleotide synthesis

All the classic oligonucleotides used are synthesized by using the automatic DNA synthesizer Applied Biosystems 394 or Mermade 6 by classical phosphoramidite chemistry with commercial or synthesized phosphoramidites and CPG solid support. Analytic and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) in ionic phase are made on a HPLC Dionex Ultimate 3000 with UV detection at 260 nm and DNA PAC200 4 x 250 mm (analytic) or 22 x 250 mm (semi-preparative) columns. Buffer used are : 5 % ACN in a solution of TEAAc 25 mM pH 8 (buffer A) and 5 % ACN in a solution of TEAAc 25 mM and NaClO₄ 400mM pH 8 (buffer B) with a flow of 1 mL/min (analytic) or 4 mL/min (semi-preparative). Analytic and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase are made on a HPLC Dionex Ultimate 3000 with UV detection at 260 nm and EC 75/4.6 Nucleodur 100-3 C18 (analytic) or VP 250/10 Nucleodur C18 HTec 5 μ m (semi-preparative) columns. Buffer used are : 1 % ACN in a solution of TEAAc 0.05 M (buffer A) and 80 % ACN in a solution of TEAAc 0.05 M (buffer B) with a flow of 1mL/min (analytic) or 5 mL/min (semi-preparative). The semi-preparative HPLC used in Greifswald is a Amersham Biosciences system with a UV detection at 260, 501 and 681 nm, a EC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 column and buffer are : 5 % ACN in a solution of TEAAc 0.1 M (buffer A) and 30 % ACN in a solution of TEAAc 0.1 M (buffer B) with a flow of 0.5 mL/min. MALDI-TOF used is a Axima assurance (Shimadzu Biotech) spectrometer with a N₂ laser (337 nm). The matrix use dis THAP or ATT in a solution of ACN/ammonium citrate 0.1 M (1/1). The sample is mixed with the matrix with a ratio of 1/5. Oligonucleotides dosage are made on a Varian Cary 300 Bio UV spectrometer with a UV detection at 260 nm. In Greifswald, dosage are made on a Nanodrop ND-1000 spectrometer with a UV detection at 260, 501 and 681 nm. The DNAzymes catalytic activity is studied by gel electrophoresis on a LI-COR 4300 DNA Analyzer. Fluorescence emission spectra are recorded using a Jasco J-815 spectropolarimeter in a 100 μ L quartz cell with a 1 cm light path. Thermal denaturation experiments are performed using a Cary 300 UV Spectrophotometer (Varian Inc.) in a 1 mL quartz cell with a 1 cm light path.

General procedure for oligonucleotides synthesis**Table 1** : Standards conditions for oligonucleotides synthesis.

Step	Reaction	Reagent	Time (s)
1	Detritylation	3 % TCA in DCM	65
2	Coupling	0.1 M amidite in ACN + 0.3 M BMT in ACN	30
3	Capping	Ac ₂ O/THF/Pyridine + 10 % NMI in THF	10
4	Oxidation	0.1 M I ₂ /THF/H ₂ O/Pyridine	15

For oligonucleotides synthesis with modified phosphoramidites, conditions have been optimised and the final step of detritylation is not realised (Table 2). For **26** and **28** the coupling time is increased to 180 s with concentration of 0.1 M and 0.05 M, respectively. For **12** a double coupling is made with a concentration of 0.05 M and a time coupling of 1200 s.

Table 2 : Modified phosphoramidite optimised conditions.

Step	Reaction	Reagent	Time (s)
1	Detritylation	3 % TCA in DCM	65
2	Coupling	12 : 2x0.05 M amidite in ACN + 0.3 M BMT in ACN	1200
		26 : 0.1 M amidite in ACN + 0.3 M BMT in ACN	180
		28 : 0.05 M amidite in ACN + 0.3 M BMT in ACN	180
3	Capping	Ac ₂ O/THF/Pyridine + 10 % NMI in THF	10
4	Oxidation	0.1 M I ₂ /THF/H ₂ O/Pyridine	15

General procedure for cyclic oligonucleotides synthesis⁴⁰²

All the cyclic oligonucleotides are synthesized by classical chemistry of phosphoramidites by using commercial or synthesized phosphoramidites and 3'-phosphate CPG solid supports. The first cycle requires a supplementary step of sulfurisation after the first phosphoramidite incorporation (Table 3). Next cycles are executed according to the classic conditions. The column is then percolated with 1 mL of a solution of (PhO)₃PCH₃I (0.5 M in anhydrous DMF) at room temperature for 15 minutes, washed with 15 mL of DCM, 10 mL of CAN, 10 mL of DCM and dried with argon. The deprotection and cyclisation are made at the same time by adding ammoniac solution at room temperature for 24 hours. Oligonucleotides are then purified by semi-preparative HPLC with a gradient of buffer B in buffer A (0-25-15) and analysed by

analytic HPLC et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Table 3 : Conditions for insertion of a phosphorothioate in the sequence.

Step	Reaction	Reagent	Time (s)
1	Detritylation	3 % TCA in DCM	35
2	Coupling	0.1 M amidite in ACN + 0.3 M BMT in ACN	20
3	Capping	Ac ₂ O/THF/Pyridine + 10 % NMI in THF	8
4	Sulfurisation	0.05 M Beaucage reagent in ACN	60

General procedure for oligonucleotides azidation at 5'-end ^{269,464}

The column containing oligonucleotide (1 μmol) is percolated with 1mL of a solution of (PhO)₃PCH₃I (0.5 M in anhydrous DMF) at room temperature for 15 minutes and washed with 10 mL of DCM, 10 mL of ACN, 10 mL of DCM and dried. The column is then percolated with 1mL of a solution of TMGA (0.3 M in anhydrous ACN) at 60°C for 1 hour. The column is then washed with 10 mL of ACN, 5 mL of DCM and dried.

General procedure for supported click reaction catalysed by Cu(I)

Incorporation of alkyne-boronic acid

All the solutions are degassed for 5 minutes before the reaction and CuSO₄ sodium ascorbate solutions are freshly prepared. Are added to the column containing oligonucleotide (1μmol) THPTA (30 μL, 0.1 M in water, 3 μmol) and 2-(4-ethynylphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (80 μL, 0.1 M in ACN, 8 μmol). A solution of copper sulphate (25 μL, 0.04 M in water, 1 μmol) and sodium ascorbate (50 μL, 0.1 M in water, 5 μmol) is then added. The mixture is stirring at 60°C for 1 hour. The column is then washed with 5 mL of aqueous EDTA disodium salt, 5 mL of ACN and dried with argon.

Incorporation of azide-boronic acid

All the solutions are degassed for 5 minutes before the reaction and CuSO₄ sodium ascorbate solutions were freshly prepared. Oligonucleotides balls (1 μmol) are transferred in a reaction flask for microwave (G10) and are added THPTA (30 μL, 0.1 M in water, 3 μmol) and 4-(azidomethyl)phenylboronic acid MIDA ester (200 μL, 0.1 M in dioxane/ACN (8/2), 20 μmol). A solution of copper sulphate (25 μL, 0.04 M in water, 1 μmol) and sodium ascorbate (50 μL, 0.1 M in water, 5 μmol) is then added. The mixture is then stirring at 60°C for 2 hours under

microwaves (power: 850 W, speed : 400 t/min). Balls are then washed with 5 mL of aqueous EDTA disodium salt, 5 mL of ACN and dried with argon.

General procedure for supported hydroboration

Alkene hydroboration

Oligonucleotide balls (1 μmol) are washed with 5 mL of ACN and transferred in an Eppendorf. Catecholborane (500 μL , 0.5 mmol) and 1 mL of anhydrous degassed THF are then added. The mixture is stirring at 20°C for 20 hours. Balls are then washed with 5 mL of ACN, 5 mL of DCM and dried with argon.

Alkyne hydroboration

Oligonucleotide balls (1 μmol) are washed with 5 mL of ACN and transferred in an Eppendorf. Catecholborane (500 μL , 0.5 mmol) and 1 mL of anhydrous degassed THF are then added. The mixture is stirring at 50°C for 3 hours. Balls are then washed with 5 mL of ACN, 5 mL of DCM and dried with argon. A solution of oxone 100 mM (1 mL, 100 μmol) is then added. The mixture is stirring at 20°C for 1 hour. Balls are then washed with 5 mL of ACN, 5 mL of DCM and dried with argon.

General procedure for deprotection, analysis and purification of oligonucleotides

DNA oligonucleotides are deprotected in a solution of ammoniac 28 % at 55°C for 5 hours. RNA oligonucleotides are percolated for 3 minutes in a solution of DBU 1 M in ACN, dried with argon and then deprotected in a solution of ammoniac 28 % at 37°C for 3 hours. Ammoniac is then evaporated in SpeedVac and oligonucleotides are analysed by analytic HPLC and MALDI-TOF with a ATT matrix and ammonium citrate as co-matrix in negative mode. If it's necessary, oligonucleotides are purified by semi-preparative HPLC.

General procedure for coupling reaction (oxime formation)

In solution

Deprotected oligonucleotide (1 μmol) is diluted in 495,4 μL of acetate buffer 500 mM pH 5 and benzylhydroxylamine (6 μL , 2 μmol) is added. The mixture is stirring at 20°C for 15 hours.

On solid support

Oligonucleotide balls (1 μmol) are transferred in an Eppendorf and 300 μL of a solution of

benzylhydroxylamine (0,5 μM in ammonium acetate buffer 400 mM, pH 5) are added. The mixture is stirring at 50°C for 3 hours. Balls are then washed with 5 mL of ACN and dried with argon.

General procedure for post-functionalisation of the RNA substrate by ATTO₄₈₈-NHS ester (5'-end) and ATTO₆₈₀ (3'-end)

The RNA substrate is synthesized by classical chemistry of phosphoramidites by using commercial phosphoramidites and a 2'-propargyl uridine-3'-CPG (1000 Å) allowing functionalisation of the fluorophore ATTO₆₈₀. After the last incorporation, the Fmoc-amino C-6 3'-phosphoramidite is incorporated allowing the functionalisation of the ATTO₄₈₈. The oligonucleotide deprotection is made by adding a solution of ammoniac (32 %)/methylamine (1/1) at 65°C for 40 minutes. The oligonucleotide is washed with a solution of EtOH/H₂O (1/1) and dried under vacuum. 200 μL of DMF and 600 μL of triethylaminetrifluoride are added and the mixture is stirring at 55°C for one hour and a half. After return to room temperature, 200 μL of water are added to stop the reaction and 20 mL of butanol are added. After one night at -20°C, the mixture is dried under reduced pressure. The oligonucleotide is then purified by gel electrophoresis (15 % PAA, 7 M Urea). After elution of the sample, the band corresponding to the substrate is cut into small pieces, diluted in NaOAc 3 M (pH 5.45) and stirring at 10°C for 1 hour. The supernatant is recovered and the elution is repeated three times. The solution is dried in the SpeedVac at 60°C. Ethanol and 10 % of NaOAc 3 M are added and after one night at -20°C and centrifugation the precipitate is washed with EtOH 70 %, dried under vacuum and analysed by Nanodrop.

The oligonucleotide (6.0 nmol) is then dissolved in 50 μL of sodium carbonate 0.2 M and ATTO₄₈₈-NHS ester (150.0 nmol) is dissolved in 30 μL of anhydrous DMF. The two solutions are mixed and the mixture is stirring at 25°C for 4 hours. In parallel two solutions are prepared. The first one contains THPTA (50 μL , 2.5 mM in phosphate buffer 0.1 M), CuSO₄ (10 μL , 0.5 mM in phosphate buffer 0.1 M) and 40 μL of phosphate buffer 0.1 M (pH 7). The second one contains sodium ascorbate (50 μL , 8.0 mM in phosphate buffer 0.1 M) and 12.5 μL of phosphate buffer 0.1 M (pH 7). All the solutions are degassed with argon for 5 minutes. ATTO₆₈₀-azide (50.0 nmol) is dissolved in the solution containing the substrate and are added successively the two solutions and 252 μL in order to obtain a final volume of 500 μL . The mixture is stirring at 37°C for 4 hours. 1.5 mL of ethanol and 50 μL of NaOAc 3 M (pH 6.5) are then added. After one night at -20°C and centrifugation, the supernatant is removed, the precipitate is washed

with ethanol 70 %, dried under vacuum, dissolved in 50 μ L of buffer A and purified by semi-preparative HPLC with a gradient 0-100-13 of buffer B in buffer A. The oligonucleotide is then dried under vacuum and analysed by Nanodrop.

General procedure for DNazymes analysis by LI-COR

Are added successively Tris HCl buffer (50.0 mM, pH 8.66), the RNA substrate (20.0 nM, 0.6 pmol), the DNzyme (20.0 nM, 0.6 pmol) or split-DNzyme fragments (2.0 μ M, 60.0 pmol by fragment) and water in order to obtain a final volume of 50 μ L. The mixture is heated at 90°C for 2 minutes and then incubated at 25°C for 15 minutes. MgCl₂ (20.0 mM) is added and the mixture is incubated at 25°C for 2 hours. 1 μ L is taken at the indicated time for kinetic studies and diluted in 19 μ L of a Stopmix solution (7 M Urea, 50 mM EDTA). Solutions are then heated at 90°C for 2 minutes, incubated at 37°C for 15 minutes and analysed by LI-COR (0.3 μ L of sample by pocket, gel : 15 % PAA, 0.6 X TBE, 7 M Urea).

General procedure for DNazymes analysis by FRET

Are added successively Tris HCl buffer (50.0 mM, pH 8.66), the RNA substrate (20.0 nM, 0.6 pmol), the DNzyme (20.0 nM, 0.6 pmol) or split-DNzyme fragments (2.0 μ M, 60.0 pmol by fragment) and water in order to obtain a final volume of 50 μ L. The mixture is heated at 90°C for 2 minutes and then incubated at 25°C for 15 minutes. MgCl₂ (20.0 mM) is added and the mixture is incubated at 25°C for 2 hours. The fluorescence is recorded in real time at 680 nm.

General procedure for thermal denaturation analysis

The samples are prepared by mixing oligonucleotide solutions with buffer (10 mM sodium cacodylate, 1 M NaCl) to give a 3 μ M final concentration in 1 mL. A heating-cooling-heating cycle in the 0-90°C temperature range with a 0.5°C/min gradient is applied. T_m values are determined from the maxima of the first derivative plots of the absorbance versus temperature.

Table 4 : Oligonucleotide analysis

Name	Yield (nmol)^a	<i>m/z</i> calculated^b	<i>m/z</i> found^b
ORN1	-	5623.42	5624.42
ORN2	-	2580.57	2583.24
ORN3	-	2979.88	2982.18
ODN1	118.6 (12 %)	9674.23	9676.84
ODN2	470.4 (47 %)	3286.16	3286.25
ODN3	42.0 (4 %)	6325.10	6325.70
ODN4	653.6 (65 %)	4521.94	4521.68
ODN5	102.8 (10 %)	5089.31	5089.01
ODN6	257.9 (26 %)	7275.72	7275.51
ODN7	720.2 (72 %)	2335.54	2335.75
ODN8	118.0 (12 %)	7869.09	7869.82
ODN9	461.8 (46 %)	1742.17	1742.83
ODN10	163.4 (16 %)	8462.47	8462.09
ODN11	720.0 (7 %)	1148.80	1148.70
ORN4	318.0 (32 %)	6192.87	6189.58
ORN5	80.0 (8 %)	3150.02	3148.10
ODN12	118.6 (12 %)	10211.71	10211.22
ODN13	180.6 (18 %)	5966.91	5966.78
ODN14	769.0 (77 %)	3052.05	3052.97
ODN15	-	-	-
ORN6	1.3 (22 %) ^c	6389.34	6380.20
ORN7	-	-	-
ORN8	-	-	-
ORN9	0.7 (12 %) ^c	7120,46	7112,75
ODN16	442.0 (44 %)	3302.15	3302.34
ODN17	101.4 (10 %)	6323.13 ^d	6326.05 ^d
ODN18	495.7 (50 %)	4537.94	4537.16
ODN19	120.6 (12 %)	4785.13	4785.14
ODN20	182.2 (18 %)	5098.15 ^d	5099.60 ^d
ODN21	134.3 (13 %)	5304.24 ^d , 5338.2, 5494.35 ^e	5303.83 ^d , 5338.22, 5494.43 ^e
ODN22	77.1 (8 %)	5226.26	5226.32
ODN23	217.8 (22 %)	5000.05 ^d , 5018.06 ^f , 5034.07 ^e	5000.04 ^d , 5018.80 ^f , 5034.40 ^e
ODN24	68.6 (7 %)	7291.72	7291.69

Partie expérimentale

ODN25	246.2 (25 %)	2031.36	2031.79
ODN26	280.3 (28 %)	2343.37 ^d , 2534.48 ^e	2343.40 ^d , 2534.58 ^e
ODN27	169.6 (17 %)	2552.49 ^d , 2569.49 ^f , 2587.51	2552.02 ^d , 2569.86 ^f , 2587.04
ODN28	235.1 (24 %)	2490.61 ^g , 2500.41 ^d , 2517.42 ^e , 2534.43	2490.81 ^g , 2500.22 ^d , 2517.96 ^e , 2534.94
ODN29	229.1 (23 %)	2245.20 ^d , 2280.29	2245.12 ^d , 2280.20
ODN30	242.7 (24 %)	2196.21 ^d , 2230.24	2195.75 ^d , 2230.64
ODN31	66.8 (7 %)	7885.09	7884.81
ODN32	117.9 (12 %)	1437.98	1437.98
ODN33	207.5 (21 %)	1749.99 ^d , 1942.12 ^e	1749.33 ^d , 1941.85 ^e
ODN34	132.1 (13 %)	1957.10 ^d , 1991.11	1956.55 ^d , 1991.69
ODN35	344.4 (34 %)	1907.04 ^d , 1941.05	1907.46 ^d , 1941.42
ODN36	145.8 (15 %)	1879.11 ^d , 1913.13, 2069.22 ^e	1879.75 ^d , 1913.98, 2070.09 ^e
ODN37	132.1 (13 %)	1643.10 ^g	1643.72 ^g
ODN38	382.1 (38 %)	1602.84 ^f , 1636.85, 1794.97 ^e	1603.47 ^f , 1638.25, 1794.79 ^e
ODN39	63.7 (6 %)	8478.47	8478.09
ODN40	281.3 (28 %)	844.61	844.52
ODN41	623.6 (62 %)	1155.61 ^d , 1174.64 ^f , 1191.64	1155.95 ^d , 1174.10 ^f , 1191.81
ODN42	120.0 (12 %)	1352.91 ^g , 1397.74	1353.49 ^g , 1397.08
ODN43	308.6 (31 %)	1302.85 ^g , 1346.67	1302.65 ^g , 1346.91
ODN44	106.5 (11 %)	1050.73 ^g , 1094.55	1050.91 ^g , 1094.89
ODN45	220.5 (22 %)	998.66 ^g , 1042.68	998.66 ^g , 1042.63
ODN46	-	1294.94	1291.82
ODN47	348.6 (34 %)	1318.75, 1475.85 ^e	1318.90, 1475.12 ^e
ODN48	148.7 (15 %)	2472.49 ^d , 2506.51, 2663.61 ^e	2472.4 ^d , 2506.80, 2663.28 ^e
ODN49	98.9 (10 %)	1015.57, 1171.65 ^e	1015.03, 1171.09 ^e
ODN50	141.5 (14 %)	1608.94, 1764.86 ^e	1608.78, 1764.59 ^e
ODN51	61.5 (6 %)	2168.30 ^d , 2202.32, 2358.40 ^e	2168.11 ^d , 2202.32, 2358.40 ^e
ORN10	200.7 (20 %)	1966.08, 2122.89 ^e	1966.21, 2121.89 ^e
ODN52	236.6 (24 %)	3791.35 ^d , 3934.52 ^h	3791.01 ^d , 3934.76 ^h
ODN53	111.6 (11 %)	3814.34 ^d , 3957.51 ^h	3814.95 ^d , 3957.23 ^h
ORN11	86.0 (9 %)	3932.28 ^d , 4075.45 ^h	3931.66 ^d , 4074.77 ^h
ODN54	70.47 (7 %)	6384.00 ^d , 6528.14 ^h	6384.97 ^d , 6527.31 ^h
ODN55	-	982.67	981.62
ODN56	-	1000.69	1001.27

Partie expérimentale

ODN57	-	992.47 ^d	993,76 ^d
ODN58	-	1148.80	1149.75
ODN59	-	994.68	993.36
ODN60	-	1022.50 ^f	1025.88 ^f
ODN61	-	1012.70	1014.88
ODN62	-	1907.26	1907.50
ODN63	-	1193.82	1193.44
ODN64	-	1117.83	1119.41
ORN12	2790.0 (35 %) ⁱ	549.36	549.24
ORN13	2460.0 (12 %) ^j	855.53	854.89
ODN65	2330.0 (29 %) ⁱ	623.45	623.45
ODN66	2760.0 (35 %) ⁱ	927.64	927.57
ODN67	225.7 (23 %)	4321.87	4322.03
ODN68	103.8 (10 %)	4312.86	4312.09
ODN69	469.5 (47 %)	2066.38	2066.72
ODN70	203.6 (20 %)	2074.21 ^d , 2266.33 ^e	2073.47 ^d , 2266.02 ^e
ODN71	102.2 (10 %)	2071.37	2071.94
ODN72	732.7 (73 %)	2073.35	2073.33
ODN73	247.6 (25 %)	2072.36	2072.95
ODN74	442.0 (44 %)	2072.36	2072.78
ODN75	594.5 (60 %)	2080.39	2080.86
ODN76	637.8 (64 %)	2096.39	2096.64
ODN77	141.4 (14 %)	2095.40	2095.17
ODN78	490,6 (49 %)	2095.40	2095.59

^a Isolated yields based on 1 μmol scale. ^b m/z calculated for $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^c Isolated yields based on 6 nmol scale. ^d m/z calculated for $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$. ^e m/z calculated for $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{citrate}-\text{H}]^-$. ^f m/z calculated for $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$. ^g m/z calculated for $[\text{M}-\text{B}(\text{OH})_2]^-$. ^h m/z calculated for $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{ATT}-\text{H}]^-$. ⁱ Isolated yields based on 8 μmol scale. ^j Isolated yields based on 12 μmol scale.

Bibliographie

Bibliographie

- (1) Li, T.; Dong, S.; Wang, E. G-Quadruplex Aptamers with Peroxidase-Like DNAzyme Functions: Which Is the Best and How Does It Work? *Chem. – Asian J.* **2009**, *4* (6), 918–922.
- (2) L. Neo, J.; Kamaladasan, K.; Uttamchandani, M. G-Quadruplex Based Probes for Visual Detection and Sensing. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (14), 2048–2057.
- (3) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- (4) Kosman, J.; Juskowiak, B. Peroxidase-Mimicking DNAzymes for Biosensing Applications: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707* (1–2), 7–17.
- (5) Chhabra, R.; Sharma, J.; Liu, Y.; Rinker, S.; Yan, H. DNA Self-Assembly for Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (6), 617–625.
- (6) Smietana, M.; Arseniyadis, S. Challenges and Opportunities in DNA-Based Asymmetric Catalysis. *Chim. Int. J. Chem.* **2018**, *72* (9), 630–634.
- (7) Benizri, S.; Gissot, A.; Martin, A.; Vialet, B.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (2), 366–383.
- (8) Hall, D. G. Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives: Overview of Their Reactions and Applications. In *Boronic Acids*; Hall, D. G., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011; pp 1–133.
- (9) Korich, A. L.; Iovine, P. M. Boroxine Chemistry and Applications: A Perspective. *Dalton Trans* **2010**, *39* (6), 1423–1431.
- (10) Martin, A. R.; Barvik, I.; Luvino, D.; Smietana, M.; Vasseur, J.-J. Dynamic and Programmable DNA-Templated Boronic Ester Formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (18), 4193–4196.
- (11) Smietana, M.; Martin, A. R.; Vasseur, J.-J. Dynamic Boronic Acid-Mediated Autoligation of DNA Strands. *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84* (7), 1659–1667.
- (12) Barbeyron, R.; Wengel, J.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. Boronic Acid-Based Autoligation of Nucleic Acids: Influence of the Nature of the 3'-End Ribonucleotidic Strand. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2013**, *144* (4), 495–500.

- (13) Martin, A. R.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. Boron and Nucleic Acid Chemistries: Merging the Best of Both Worlds. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (13), 5684–5713.
- (14) Barbeyron, R.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. PH-Controlled DNA- and RNA-Templated Assembly of Short Oligomers. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (1), 542–547.
- (15) Gimenez Molina, A.; Barvik, I.; Müller, S.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. RNA-Based Boronate Internucleosidic Linkages: An Entry into Reversible Templated Ligation and Loop Formation. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (45), 8824–8830.
- (16) Su, L.; Chen, T.; Xue, T.; Sheng, A.; Cheng, L.; Zhang, J. Fabrication of PH-Adjusted Boronic Acid-Aptamer Conjugate for Electrochemical Analysis of Conjugated N-Glycolylneuraminic Acid. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (6), 7650–7657.
- (17) Li, M.; Lin, N.; Huang, Z.; Du, L.; Altier, C.; Fang, H.; Wang, B. Selecting Aptamers for a Glycoprotein through the Incorporation of the Boronic Acid Moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (38), 12636–12638.
- (18) Luvino, D.; Baraguey, C.; Smietana, M.; Vasseur, J.-J. Boronucleotides: Synthesis, and Formation of a New Reversible Boronate Internucleosidic Linkage. *Chem. Commun.* **2008**, No. 20, 2352–2354.
- (19) Barbeyron, R.; Martin, A. R.; Jean-Jacques Vasseur, J.-J. V.; Michael Smietana, M. S. DNA-Templated Boronucleic Acid Self Assembly: A Study of Minimal Complexity. *RSC Adv.* **2015**, *5* (128), 105587–105591.
- (20) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- (21) Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J. Selection of Single-Stranded DNA Molecules That Bind and Inhibit Human Thrombin. *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- (22) Parashar, A. Aptamers in Therapeutics. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **2016**, *10* (6), BE01–BE06.
- (23) Klussmann, S. *The Aptamer Handbook : Functional Oligonucleotides and Their Applications*; 2006.

- (24) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (25) Gold, L.; Janjic, N.; Jarvis, T.; Schneider, D.; Walker, J. J.; Wilcox, S. K.; Zichi, D. Aptamers and the RNA World, Past and Present. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4* (3), a003582.
- (26) Sefah, K.; Shangguan, D.; Xiong, X.; O'Donoghue, M. B.; Tan, W. Development of DNA Aptamers Using Cell-SELEX. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (6), 1169–1185.
- (27) Kent, A. D.; Spiropoulos, N. G.; Heemstra, J. M. General Approach for Engineering Small-Molecule-Binding DNA Split Aptamers. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (20), 9916–9923.
- (28) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* **2000**, *287* (5454), 820–825.
- (29) Mayer, G. The Chemical Biology of Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (15), 2672–2689.
- (30) O'Sullivan, C. K. Aptasensors – the Future of Biosensing? *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372* (1), 44–48.
- (31) Xu, F.; Zhu, Y.-C.; Ma, Z.-Y.; Zhao, W.-W.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. An Ultrasensitive Energy-Transfer Based Photoelectrochemical Protein Biosensor. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (14), 3034–3037.
- (32) Rimmelé, M. Nucleic Acid Aptamers as Tools and Drugs: Recent Developments. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 963–971.
- (33) Brody, E. N.; Gold, L. Aptamers as Therapeutic and Diagnostic Agents. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74* (1), 5–13.
- (34) Kolpashchikov, D. M. Binary Probes for Nucleic Acid Analysis. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (8), 4709–4723.
- (35) Wilson, C.; Keefe, A. Building Oligonucleotide Therapeutics Using Non-Natural Chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (6), 607–614.
- (36) Röthlisberger, P.; Hollenstein, M. Aptamer Chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 3–21.
- (37) Dunn, M. R.; Jimenez, R. M.; Chaput, J. C. Analysis of Aptamer Discovery and Technology. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1* (10), 0076.

- (38) Pfeiffer, F.; Mayer, G. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Front. Chem.* **2016**, *4* (25), 1–21.
- (39) Munzar, J. D.; Ng, A.; Juncker, D. Duplexed Aptamers: History, Design, Theory, and Application to Biosensing. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 1390–1419.
- (40) Lakhin, A. V.; Tarantul, V. Z.; Gening, L. V. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae* **2013**, *5* (4), 34–43.
- (41) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665.
- (42) Tang, J.; Shi, H.; He, X.; Lei, Y.; Guo, Q.; Wang, K.; Yan, L.; He, D. Tumor Cell-Specific Split Aptamers: Target-Driven and Temperature-Controlled Self-Assembly on the Living Cell Surface. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (7), 1482–1485.
- (43) Chen, A.; Yan, M.; Yang, S. Split Aptamers and Their Applications in Sandwich Aptasensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 581–593.
- (44) Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **1983**, *35*, 849–857.
- (45) Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, *31* (1), 147–157.
- (46) Breaker, R. R.; Joyce, G. F. A DNA Enzyme That Cleaves RNA. *Chem. Biol.* **1994**, *1* (4), 223–229.
- (47) Willner, I.; Shlyahovsky, B.; Zayats, M.; Willner, B. DNAzymes for Sensing, Nanobiotechnology and Logic Gate Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (6), 1153–1165.
- (48) Zhou, W.; Ding, J.; Liu, J. Theranostic DNAzymes. *Theranostics* **2017**, *7* (4), 1010–1025.
- (49) Peng, H.; Newbigging, A. M.; Wang, Z.; Tao, J.; Deng, W.; Le, X. C.; Zhang, H. DNAzyme-Mediated Assays for Amplified Detection of Nucleic Acids and Proteins. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (1), 190–207.
- (50) Ma, L.; Liu, J. Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology. *iScience* **2020**, *23* (1), 100815–100832.

- (51) Müller, S.; Appel, B.; Balke, D.; Hieronymus, R.; Nübel, C. Thirty-Five Years of Research into Ribozymes and Nucleic Acid Catalysis: Where Do We Stand Today? *F1000Research* **2016**, *5*, 1511–1522.
- (52) Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, *31* (1), 147–157.
- (53) Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. The RNA Moiety of Ribonuclease P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme. *Cell* **1983**, *35*, 849–857.
- (54) Prody, G. A.; Bakos, J. T.; Buzayan, J. M.; Schneider, I. R.; Bruening, G. Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science* **1986**, *231* (4745), 1577–1580.
- (55) Scott, W. G.; Horan, L. H.; Martick, M. The Hammerhead Ribozyme. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *120*, 1–23.
- (56) Fedor, M. J. Structure and Function of the Hairpin Ribozyme. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297* (2), 269–291.
- (57) Weinberg, C. E.; Weinberg, Z.; Hammann, C. Novel Ribozymes: Discovery, Catalytic Mechanisms, and the Quest to Understand Biological Function. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (18), 9480–9494.
- (58) Silverman, S. K. Deoxyribozymes: DNA Catalysts for Bioorganic Chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (19), 2701–2706.
- (59) Silverman, S. K. In Vitro Selection, Characterization, and Application of Deoxyribozymes That Cleave RNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (19), 6151–6163.
- (60) Santoro, S. W.; Joyce, G. F. A General Purpose RNA-Cleaving DNA Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (9), 4262–4266.
- (61) Cuenoud, B.; Szostak, J. W. A DNA Metalloenzyme with DNA Ligase Activity. *Nature* **1995**, *375*, 611–614.
- (62) Silverman, S. K. Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (7), 595–609.

- (63) Baum, D. A.; Silverman, S. K. Deoxyribozymes: Useful DNA Catalysts in Vitro and in Vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (14), 2156–2174.
- (64) Gong, L.; Zhao, Z.; Lv, Y.-F.; Huan, S.-Y.; Fu, T.; Zhang, X.-B.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. DNAzyme-Based Biosensors and Nanodevices. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (6), 979–995.
- (65) Höbartner, C.; Silverman, S. K. Recent Advances in DNA Catalysis. *Biopolymers* **2007**, *87* (5–6), 279–292.
- (66) Mokany, E.; Bone, S. M.; Young, P. E.; Doan, T. B.; Todd, A. V. MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (3), 1051–1059.
- (67) Mokany, E.; Tan, Y. L.; Bone, S. M.; Fuery, C. J.; Todd, A. V. MNAzyme QPCR with Superior Multiplexing Capacity. *Clin. Chem.* **2013**, *59* (2), 419–426.
- (68) Ruble, B. K.; Richards, J. L.; Cheung-Lau, J. C.; Dmochowski, I. J. Mismatch Discrimination and Efficient Photomodulation with Split 10–23 DNAzymes. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *380*, 386–391.
- (69) Huang, P.-J. J.; Liu, J. Two Pb²⁺-Specific DNAzymes with Opposite Trends in Split-Site-Dependent Activity. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (34), 4442–4444.
- (70) Smith, A. L.; Kolpashchikov, D. M. Divide and Control: Comparison of Split and Switch Hybridization Sensors. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (19), 5427–5431.
- (71) Xie, Y.; Niu, F.; Yu, A.; Lai, G. Proximity Binding-Triggered Assembly of Two MNAzymes for Catalyzed Release of G-Quadruplex DNAzymes and an Ultrasensitive Homogeneous Bioassay of Platelet-Derived Growth Factor. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (1), 593–598.
- (72) Davie, E. W.; Kulman, J. D. An Overview of the Structure and the Function of Thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **2006**, *32*, 3–15.
- (73) Fenton, J. W.; Aronson, D. L.; Young, A. M.; Finlayson, J. S. Human Thrombins : Production, Evaluation and Properties of Alpha-Thrombin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (11), 3587–3598.

- (74) Mohammed, S. F.; Whitworth, C.; Chuang, H. Y.; Lundblad, R. L.; Mason, R. G. Multiple Active Forms of Thrombin: Binding to Platelets and Effects on Platelet Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73* (5), 1660–1663.
- (75) Macaya, R. F.; Schultze, P.; Smith, F. W.; Roe, J. A.; Feigon, J. Thrombin-Binding DNA Aptamer Forms a Unimolecular Quadruplex Structure in Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (8), 3745–3749.
- (76) Tsiang, M.; Gibbs, C. S.; Griffin, L. C.; Dunn, K. E.; Leung, L. K. Selection of a Suppressor Mutation That Restores Affinity of an Oligonucleotide Inhibitor for Thrombin Using in Vitro Genetics. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19370–19376.
- (77) Wang, K. Y.; Krawczyk, S. H.; Bischofberger, N.; Swaminathan, S.; Bolton, P. H. The Tertiary Structure of a DNA Aptamer Which Binds to and Inhibits Thrombin Determines Activity. *Biochemistry* **1993**, *32* (42), 11285–11292.
- (78) Russo Krauss, I.; Pica, A.; Merlino, A.; Mazzarella, L.; Sica, F. Duplex–Quadruplex Motifs in a Peculiar Structural Organization Cooperatively Contribute to Thrombin Binding of a DNA Aptamer. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (12), 2403–2411.
- (79) Macaya, R. F.; Waldron, J. A.; Beutel, B. A.; Gao, H.; Joesten, M. E.; Yang, M.; Patel, R.; Bertelsen, A. H.; Cook, A. F. Structural and Functional Characterization of Potent Antithrombotic Oligonucleotides Possessing Both Quadruplex and Duplex Motifs. *Biochemistry* **1995**, *34* (13), 4478–4492.
- (80) Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin That Bind Distinct Epitopes. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272* (5), 688–698.
- (81) Stubbs, M. T.; Bode, W. The Clot Thickens : Clues Provided by Thrombin Structure. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 23–28.
- (82) Kelly, J. A.; Feigon, J.; Yeates, T. O. Reconciliation of the X-Ray and NMR Structures of the Thrombin-Binding Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.* **1996**, *256* (3), 417–422.
- (83) Hamaguchi, N.; Ellington, A.; Stanton, M. Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins. *Anal. Biochem.* **2001**, *294* (2), 126–131.

-
- (84) Li, J. J.; Fang, X.; Tan, W. Molecular Aptamer Beacons for Real-Time Protein Recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292* (1), 31–40.
- (85) Deng, B.; Lin, Y.; Wang, C.; Li, F.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, X.-F.; Le, X. C. Aptamer Binding Assays for Proteins: The Thrombin Example—A Review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *837*, 1–15.
- (86) Riccardi, C.; Russo Krauss, I.; Musumeci, D.; Morvan, F.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Paduano, L.; Montesarchio, D. Fluorescent Thrombin Binding Aptamer-Tagged Nanoparticles for an Efficient and Reversible Control of Thrombin Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (41), 35574–35587.
- (87) Liu, X.; Shi, L.; Hua, X.; Huang, Y.; Su, S.; Fan, Q.; Wang, L.; Huang, W. Target-Induced Conjunction of Split Aptamer Fragments and Assembly with a Water-Soluble Conjugated Polymer for Improved Protein Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (5), 3406–3412.
- (88) Armbruster, D. A.; Pry, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* **2008**, *29*, S49–S52.
- (89) Liu, X.; Yang, Y.; Hua, X.; Feng, X.; Su, S.; Huang, Y.; Fan, Q.; Wang, L.; Huang, W. An Improved Turn-On Aptasensor for Thrombin Detection Using Split Aptamer Fragments and Graphene Oxide. *Chin. J. Chem.* **2015**, *33* (8), 981–986.
- (90) Liu, Y.; Dong, X.; Chen, P. Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2283–2307.
- (91) Chen, D.; Feng, H.; Li, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 6027–6053.
- (92) Duan, W.; Wang, X.; Wang, H.; Li, F. Fluorescent and Colorimetric Dual-Mode Aptasensor for Thrombin Detection Based on Target-Induced Conjunction of Split Aptamer Fragments. *Talanta* **2018**, *180*, 76–80.
- (93) Wang, H.; Wang, Y.; Jin, J.; Yang, R. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric and “Turn-On” Fluorescent Probe for Mercury(II) Ions in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 9021–9028.

-
- (94) Chen, J.; Zhang, J.; Li, J.; Yang, H.-H.; Fu, F.; Chen, G. An Ultrasensitive Signal-on Electrochemical Aptasensor via Target-Induced Conjunction of Split Aptamer Fragments. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (5), 996–1000.
- (95) Liu, Z.; Zhang, W.; Hu, L.; Li, H.; Zhu, S.; Xu, G. Label-Free and Signal-On Electrochemiluminescence Aptasensor for ATP Based on Target-Induced Linkage of Split Aptamer Fragments by Using [Ru(Phen)₃]²⁺ Intercalated into Double-Strand DNA as a Probe. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (45), 13356–13359.
- (96) Lin, Z.; Chen, L.; Zhu, X.; Qiu, B.; Chen, G. Signal-on Electrochemiluminescence Biosensor for Thrombin Based on Target-Induced Conjunction of Split Aptamer Fragments. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5563–5565.
- (97) Pei, H.; Li, F.; Wan, Y.; Wei, M.; Liu, H.; Su, Y.; Chen, N.; Huang, Q.; Fan, C. Designed Diblock Oligonucleotide for the Synthesis of Spatially Isolated and Highly Hybridizable Functionalization of DNA–Gold Nanoparticle Nanoconjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (29), 11876–11879.
- (98) Zhao, B.; Shen, J.; Chen, S.; Wang, D.; Li, F.; Mathur, S.; Song, S.; Fan, C. Gold Nanostructures Encoded by Non-Fluorescent Small Molecules in PolyA-Mediated Nanogaps as Universal SERS Nanotags for Recognizing Various Bioactive Molecules. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (11), 4460–4466.
- (99) Fan, T.; Du, Y.; Yao, Y.; Wu, J.; Meng, S.; Luo, J.; Zhang, X.; Yang, D.; Wang, C.; Qian, Y.; Gao, F. Rolling Circle Amplification Triggered Poly Adenine-Gold Nanoparticles Production for Label-Free Electrochemical Detection of Thrombin. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *266*, 9–18.
- (100) Melaine, F.; Coilhac, C.; Roupioz, Y.; Buhot, A. A Nanoparticle-Based Thermo-Dynamic Aptasensor for Small Molecule Detection. *Nanoscale* **2016**, *8* (38), 16947–16954.
- (101) Wang, J.; Wang, Y.; Liu, S.; Wang, H.; Zhang, X.; Song, X.; Huang, J. Duplex Featured Polymerase-Driven Concurrent Strategy for Detecting of ATP Based on Endonuclease-Fueled Feedback Amplification. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1060*, 79–87.
- (102) You, J.; You, Z.; Xu, X.; Ji, J.; Lu, T.; Xia, Y.; Wang, L.; Zhang, L.; Du, S. A Split Aptamer-Labeled Ratiometric Fluorescent Biosensor for Specific Detection of Adenosine in Human Urine. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (1), 43–50.
-

- (103) Ma, Y.; Geng, F.; Wang, Y.; Xu, M.; Shao, C.; Qu, P.; Zhang, Y.; Ye, B. Novel Strategy to Improve the Sensing Performances of Split ATP Aptamer Based Fluorescent Indicator Displacement Assay through Enhanced Molecular Recognition. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *134*, 36–41.
- (104) Zhou, C.; Yu, Z.; Yu, W.; Liu, H.; Zhang, H.; Guo, C. Split Aptamer-Based Detection of Adenosine Triphosphate Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Two Kinds of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (4), 251.
- (105) Jin, F.; Lian, Y.; Li, J.; Zheng, J.; Hu, Y.; Liu, J.; Huang, J.; Yang, R. Molecule-Binding Dependent Assembly of Split Aptamer and γ -Cyclodextrin: A Sensitive Excimer Signaling Approach for Aptamer Biosensors. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *799*, 44–50.
- (106) Wang, M.; Chen, J.; Su, D.; Wang, G.; Su, X. Split Aptamer Based Sensing Platform for Adenosine Deaminase Detection by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Talanta* **2019**, *198*, 1–7.
- (107) Lohmann, K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* **1929**, *17* (31), 624–625.
- (108) Fiske, C. H.; Subbarow, Y. Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. *Science* **1929**, *70* (1816), 381–382.
- (109) Sassanfar, M.; Szostak, J. W. An RNA Motif That Binds ATP. *Nature* **1993**, *364*, 550–553.
- (110) Liao, D.; Jiao, H.; Wang, B.; Lin, Q.; Yu, C. KF Polymerase-Based Fluorescence Aptasensor for the Label-Free Adenosine Detection. *Analyst* **2012**, *137* (4), 978–982.
- (111) He, X.; Li, Z.; Jia, X.; Wang, K.; Yin, J. A Highly Selective Sandwich-Type FRET Assay for ATP Detection Based on Silica Coated Photon Upconverting Nanoparticles and Split Aptamer. *Talanta* **2013**, *111*, 105–110.
- (112) Zhang, H.; Liu, Y.; Zhang, K.; Ji, J.; Liu, J.; Liu, B. Single Molecule Fluorescent Colocalization of Split Aptamers for Ultrasensitive Detection of Biomolecules. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (15), 9315–9321.
- (113) Zeng, S.; Baillargeat, D.; Ho, H.-P.; Yong, K.-T. Nanomaterials Enhanced Surface Plasmon Resonance for Biological and Chemical Sensing Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3426–3452.

- (114) Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface Plasmon Resonance Sensors: Review. *Sens. Actuators B Chem.* **1999**, *54* (1–2), 3–15.
- (115) Li, F.; Zhang, J.; Cao, X.; Wang, L.; Li, D.; Song, S.; Ye, B.; Fan, C. Adenosine Detection by Using Gold Nanoparticles and Designed Aptamer Sequences. *The Analyst* **2009**, *134* (7), 1355–1360.
- (116) Wang, Q.; Huang, J.; Yang, X.; Wang, K.; He, L.; Li, X.; Xue, C. Surface Plasmon Resonance Detection of Small Molecule Using Split Aptamer Fragments. *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *156* (2), 893–898.
- (117) Sergelen, K.; Liedberg, B.; Knoll, W.; Dostálek, J. A Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Reversible Split Aptamer Biosensor. *Analyst* **2017**, *142* (16), 2995–3001.
- (118) Lu, C.; Saint-Pierre, C.; Gasparutto, D.; Roupioz, Y.; Peyrin, E.; Buhot, A. Linear Chain Formation of Split-Aptamer Dimers on Surfaces Triggered by Adenosine. *Langmuir* **2017**, *33* (44), 12785–12792.
- (119) Park, J.-H.; Byun, J.-Y.; Shim, W.-B.; Kim, S. U.; Kim, M.-G. High-Sensitivity Detection of ATP Using a Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Sensor and Split Aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73*, 26–31.
- (120) Alkhamis, O.; Canoura, J.; Yu, H.; Liu, Y.; Xiao, Y. Innovative Engineering and Sensing Strategies for Aptamer-Based Small-Molecule Detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *121*, 115699–115710.
- (121) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (46), 11547–11548.
- (122) Cekan, P.; Jonsson, E. O.; Sigurdsson, S. Th. Folding of the Cocaine Aptamer Studied by EPR and Fluorescence Spectroscopies Using the Bifunctional Spectroscopic Probe C. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (12), 3990–3995.
- (123) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (21), 4928–4931.
- (124) Wu, C.; Yan, L.; Wang, C.; Lin, H.; Wang, C.; Chen, X.; Yang, C. J. A General Excimer Signaling Approach for Aptamer Sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (10), 2232–2237.

-
- (125) He, J.-L.; Wu, Z.-S.; Zhou, H.; Wang, H.-Q.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. Fluorescence Aptameric Sensor for Strand Displacement Amplification Detection of Cocaine. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (4), 1358–1364.
- (126) Tang, Y.; Long, F.; Gu, C.; Wang, C.; Han, S.; He, M. Reusable Split-Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Cocaine in Serum by Using an All-Fiber Evanescent Wave Optical Biosensing Platform. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *933*, 182–188.
- (127) Zhang, Y.; Sun, Z.; Tang, L.; Zhang, H.; Zhang, G.-J. Aptamer Based Fluorescent Cocaine Assay Based on the Use of Graphene Oxide and Exonuclease III-Assisted Signal Amplification. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (10), 2791–2797.
- (128) Neves, M. A. D.; Reinstein, O.; Johnson, P. E. Defining a Stem Length-Dependent Binding Mechanism for the Cocaine-Binding Aptamer. A Combined NMR and Calorimetry Study. *Biochemistry* **2010**, *49* (39), 8478–8487.
- (129) Morris, F. D.; Peterson, E. M.; Heemstra, J. M.; Harris, J. M. Single-Molecule Kinetic Investigation of Cocaine-Dependent Split-Aptamer Assembly. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (21), 12964–12970.
- (130) Li, Q.; Wang, Y.-D.; Shen, G.-L.; Tang, H.; Yu, R.-Q.; Jiang, J.-H. Split Aptamer Mediated Endonuclease Amplification for Small-Molecule Detection. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (20), 4196–4199.
- (131) Zuo, X.; Xiao, Y.; Plaxco, K. W. High Specificity, Electrochemical Sandwich Assays Based on Single Aptamer Sequences and Suitable for the Direct Detection of Small-Molecule Targets in Blood and Other Complex Matrices. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (20), 6944–6945.
- (132) Zhang, J.; Wang, L.; Pan, D.; Song, S.; Boey, F. Y. C.; Zhang, H.; Fan, C. Visual Cocaine Detection with Gold Nanoparticles and Rationally Engineered Aptamer Structures. *Small* **2008**, *4* (8), 1196–1200.
- (133) Abnous, K.; Danesh, N. M.; Ramezani, M.; Taghdisi, S. M.; Emrani, A. S. A Novel Amplified Double-Quenching Aptasensor for Cocaine Detection Based on Split Aptamer and Silica Nanoparticles. *Anal. Methods* **2018**, *10* (26), 3232–3236.
- (134) Li, X.; Liu, D. R. DNA-Templated Organic Synthesis: Nature's Strategy for Controlling Chemical Reactivity Applied to Synthetic Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (37), 4848–4870.
-

- (135) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (136) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Click Chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1388–1405.
- (137) Gorska, K.; Winssinger, N. Reactions Templated by Nucleic Acids: More Ways to Translate Oligonucleotide-Based Instructions into Emerging Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (27), 6820–6843.
- (138) Dai, C.; Wang, L.; Sheng, J.; Peng, H.; Draganov, A. B.; Huang, Z.; Wang, B. The First Chemical Synthesis of Boronic Acid-Modified DNA through a Copper-Free Click Reaction. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (12), 3598–3600.
- (139) Sharma, A. K.; Heemstra, J. M. Small-Molecule-Dependent Split Aptamer Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (32), 12426–12429.
- (140) Sachan, A.; Ilgu, M.; Kempema, A.; Kraus, G. A.; Nilsen-Hamilton, M. Specificity and Ligand Affinities of the Cocaine Aptamer: Impact of Structural Features and Physiological NaCl. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (15), 7715–7723.
- (141) Spiropulos, N. G.; Heemstra, J. M. Templating Effect in DNA Proximity Ligation Enables Use of Non-Bioorthogonal Chemistry in Biological Fluids. *Artif. DNA PNA XNA* **2012**, *3* (3), 123–128.
- (142) Sharma, A. K.; Kent, A. D.; Heemstra, J. M. Enzyme-Linked Small-Molecule Detection Using Split Aptamer Ligation. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 6104–6109.
- (143) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (144) Yu, H.; Canoura, J.; Guntupalli, B.; Lou, X.; Xiao, Y. A Cooperative-Binding Split Aptamer Assay for Rapid, Specific and Ultra-Sensitive Fluorescence Detection of Cocaine in Saliva. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 131–141.
- (145) Roncancio, D.; Yu, H.; Xu, X.; Wu, S.; Liu, R.; Debord, J.; Lou, X.; Xiao, Y. A Label-Free Aptamer-Fluorophore Assembly for Rapid and Specific Detection of Cocaine in Biofluids. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11100–11106.

-
- (146) Yu, H.; Canoura, J.; Guntupalli, B.; Alkhamis, O.; Xiao, Y. Sensitive Detection of Small-Molecule Targets Using Cooperative Binding Split Aptamers and Enzyme-Assisted Target Recycling. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (3), 1748–1758.
- (147) Sheng, A.; Su, L.; Jalalah, M.; Al-Assiri, M. S.; Harraz, F. A.; Zhang, J. Hydrazone Chemistry Assisted DNAzyme for the Analysis of Double Targets. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 695–698.
- (148) Xiao, X.; Zhu, L.; He, W.; Luo, Y.; Xu, W. Functional Nucleic Acids Tailoring and Its Application. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 138–157.
- (149) Sun, Y.; Yuan, B.; Deng, M.; Wang, Q.; Huang, J.; Guo, Q.; Liu, J.; Yang, X.; Wang, K. A Light-up Fluorescence Assay for Tumor Cell Detection Based on Bifunctional Split Aptamers. *The Analyst* **2018**, *143* (15), 3579–3585.
- (150) Yuan, B.; Zhou, Y.; Guo, Q.; Wang, K.; Yang, X.; Meng, X.; Wan, J.; Tan, Y.; Huang, Z.; Xie, Q.; Zhao, X. A Signal-on Split Aptasensor for Highly Sensitive and Specific Detection of Tumor Cells Based on FRET. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (8), 1590–1593.
- (151) Lei, Y.; Tang, J.; Shi, H.; Ye, X.; He, X.; Xu, F.; Yan, L.; Qiao, Z.; Wang, K. Nature-Inspired Smart DNA Nanodoctor for Activatable In Vivo Cancer Imaging and In Situ Drug Release Based on Recognition-Triggered Assembly of Split Aptamer. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (23), 11699–11706.
- (152) Kikuchi, N.; Reed, A.; Gerasimova, Y. V.; Kolpashchikov, D. M. Split Dapoxyl Aptamer for Sequence-Selective Analysis of Nucleic Acid Sequence Based Amplification Amplicons. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (4), 2667–2671.
- (153) Fatin, M. F.; Rahim Ruslinda, A.; Gopinath, S. C. B.; Arshad, M. K. Md. High-Performance Interactive Analysis of Split Aptamer and HIV-1 Tat on Multiwall Carbon Nanotube-Modified Field-Effect Transistor. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *125*, 414–422.
- (154) Pei, R.; Shen, A.; Olah, M. J.; Stefanovic, D.; Worgall, T.; Stojanovic, M. N. High-Resolution Cross-Reactive Array for Alkaloids. *Chem. Commun.* **2009**, *22*, 3193–3195.
- (155) Reinstein, O.; Yoo, M.; Han, C.; Palmo, T.; Beckham, S. A.; Wilce, M. C. J.; Johnson, P. E. Quinine Binding by the Cocaine-Binding Aptamer. Thermodynamic and Hydrodynamic Analysis of High-Affinity Binding of an Off-Target Ligand. *Biochemistry* **2013**, *52* (48), 8652–8662.
-

- (156) Belal, A. S. F.; Ismail, A.; Elnaggar, M. M.; Belal, T. S. Click Chemistry Inspired Copper Sulphide Nanoparticle-Based Fluorescence Assay of Kanamycin Using DNA Aptamer. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *205*, 48–54.
- (157) Neves, M. A. D.; Slavkovic, S.; Reinstein, O.; Shoara, A. A.; Johnson, P. E. A Proof of Concept Application of Aptachain: Ligand-Induced Self-Assembly of a DNA Aptamer. *RSC Adv.* **2019**, *9* (3), 1690–1695.
- (158) Li, X.-H.; Sun, W.-M.; Wu, J.; Gao, Y.; Chen, J.-H.; Chen, M.; Ou, Q.-S. An Ultrasensitive Fluorescence Aptasensor for Carcino-Embryonic Antigen Detection Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer from Upconversion Phosphors to Au Nanoparticles. *Anal. Methods* **2018**, *10* (13), 1552–1559.
- (159) Zhang, K.; Lv, S.; Lu, M.; Tang, D. Photoelectrochemical Biosensing of Disease Marker on P-Type Cu-Doped Zn_{0.3}Cd_{0.7}S Based on RCA and Exonuclease III Amplification. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 590–596.
- (160) Chen, X.; Lan, J.; Liu, Y.; Li, L.; Yan, L.; Xia, Y.; Wu, F.; Li, C.; Li, S.; Chen, J. A Paper-Supported Aptasensor Based on Upconversion Luminescence Resonance Energy Transfer for the Accessible Determination of Exosomes. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 582–588.
- (161) Liu, X.; Li, X.; Lu, Y.; Cao, J.; Li, F. A Split Aptamer-Based Imaging Solution for the Visualization of Latent Fingerprints. *Anal. Methods* **2018**, *10* (19), 2281–2286.
- (162) Li, J.; He, G.; Wang, B.; Shi, L.; Gao, T.; Li, G. Fabrication of Reusable Electrochemical Biosensor and Its Application for the Assay of α -Glucosidase Activity. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1026*, 140–146.
- (163) Liu, H.; Yang, J.; Li, Z.; Xiao, L.; Aryee, A. A.; Sun, Y.; Yang, R.; Meng, H.; Qu, L.; Lin, Y.; Zhang, X. Hydrogen-Bond-Induced Emission of Carbon Dots for Wash-Free Nucleus Imaging. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (14), 9259–9265.
- (164) Meech, S. R. Excited State Reactions in Fluorescent Proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (10), 2922–2934.
- (165) Grate, D.; Wilson, C. Laser-Mediated, Site-Specific Inactivation of RNA Transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (11), 6131–6136.

- (166) Kraus, G.; Jeon, I.; Nilsen-Hamilton, M.; Awad, A.; Banerjee, J.; Parvin, B. Fluorinated Analogs of Malachite Green: Synthesis and Toxicity. *Molecules* **2008**, *13* (4), 986–994.
- (167) Constantin, T. P.; Silva, G. L.; Robertson, K. L.; Hamilton, T. P.; Fague, K.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. Synthesis of New Fluorogenic Cyanine Dyes and Incorporation into RNA Fluoromodules. *Org. Lett.* **2008**, *10* (8), 1561–1564.
- (168) Sando, S.; Narita, A.; Aoyama, Y. Light-Up Hoechst–DNA Aptamer Pair: Generation of an Aptamer-Selective Fluorophore from a Conventional DNA-Staining Dye. *ChemBioChem* **2007**, *8* (15), 1795–1803.
- (169) Sando, S.; Narita, A.; Hayami, M.; Aoyama, Y. Transcription Monitoring Using Fused RNA with a Dye-Binding Light-up Aptamer as a Tag: A Blue Fluorescent RNA. *Chem. Commun.* **2008**, No. 33, 3858–3860.
- (170) Dolgosheina, E. V.; Jeng, S. C. Y.; Panchapakesan, S. S. S.; Cojocar, R.; Chen, P. S. K.; Wilson, P. D.; Hawkins, N.; Wiggins, P. A.; Unrau, P. J. RNA Mango Aptamer-Fluorophore: A Bright, High-Affinity Complex for RNA Labeling and Tracking. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (10), 2412–2420.
- (171) Sheng, L.; Lu, Y.; Deng, S.; Liao, X.; Zhang, K.; Ding, T.; Gao, H.; Liu, D.; Deng, R.; Li, J. A Transcription Aptasensor: Amplified, Label-Free and Culture-Independent Detection of Foodborne Pathogens via Light-up RNA Aptamers. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (68), 10096–10099.
- (172) Stojanovic, M. N.; Kolpashchikov, D. M. Modular Aptameric Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9266–9270.
- (173) Kolpashchikov, D. M. Binary Malachite Green Aptamer for Fluorescent Detection of Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (36), 12442–12443.
- (174) Paige, J. S.; Wu, K. Y.; Jaffrey, S. R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Science* **2011**, *333* (6042), 642–646.
- (175) Warner, K. D.; Chen, M. C.; Song, W.; Strack, R. L.; Thorn, A.; Jaffrey, S. R.; Ferré-D’Amaré, A. R. Structural Basis for Activity of Highly Efficient RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21* (8), 658–663.

- (176) Strack, R. L.; Disney, M. D.; Jaffrey, S. R. A Superfolding Spinach² Reveals the Dynamic Nature of Trinucleotide Repeat-Containing RNA. *Nat. Methods* **2013**, *10* (12), 1219–1224.
- (177) Paige, J. S.; Nguyen-Duc, T.; Song, W.; Jaffrey, S. R. Fluorescence Imaging of Cellular Metabolites with RNA. *Science* **2012**, *335* (6073), 1194–1194.
- (178) Bhadra, S.; Ellington, A. D. A Spinach Molecular Beacon Triggered by Strand Displacement. *RNA* **2014**, *20* (8), 1183–1194.
- (179) Song, W.; Strack, R. L.; Jaffrey, S. R. Imaging Bacterial Protein Expression Using Genetically Encoded RNA Sensors. *Nat. Methods* **2013**, *10* (9), 873–875.
- (180) Pothoulakis, G.; Ceroni, F.; Reeve, B.; Ellis, T. The Spinach RNA Aptamer as a Characterization Tool for Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3* (3), 182–187.
- (181) Rogers, T. A.; Andrews, G. E.; Jaeger, L.; Grabow, W. W. Fluorescent Monitoring of RNA Assembly and Processing Using the Split-Spinach Aptamer. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4* (2), 162–166.
- (182) Ausländer, S.; Fuchs, D.; Hürlemann, S.; Ausländer, D.; Fussenegger, M. Engineering a Ribozyme Cleavage-Induced Split Fluorescent Aptamer Complementation Assay. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (10), e94.
- (183) Kikuchi, N.; Kolpashchikov, D. M. A Universal Split Spinach Aptamer (USSA) for Nucleic Acid Analysis and DNA Computation. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (36), 4977–4980.
- (184) Wang, Z.; Luo, Y.; Xie, X.; Hu, X.; Song, H.; Zhao, Y.; Shi, J.; Wang, L.; Glinsky, G.; Chen, N.; Lal, R.; Fan, C. In Situ Spatial Complementation of Aptamer-Mediated Recognition Enables Live-Cell Imaging of Native RNA Transcripts in Real Time. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (4), 972–976.
- (185) Filonov, G. S.; Moon, J. D.; Svensen, N.; Jaffrey, S. R. Broccoli: Rapid Selection of an RNA Mimic of Green Fluorescent Protein by Fluorescence-Based Selection and Directed Evolution. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (46), 16299–16308.
- (186) Halman, J. R.; Satterwhite, E.; Roark, B.; Chandler, M.; Viard, M.; Ivanina, A.; Bindewald, E.; Kasprzak, W. K.; Panigaj, M.; Bui, M. N.; Lu, J. S.; Miller, J.; Khisamutdinov, E. F.; Shapiro, B. A.;

- Dobrovolskaia, M. A.; Afonin, K. A. Functionally-Interdependent Shape-Switching Nanoparticles with Controllable Properties. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (4), 2210–2220.
- (187) Chandler, M.; Lyalina, T.; Halman, J.; Rackley, L.; Lee, L.; Dang, D.; Ke, W.; Sajja, S.; Woods, S.; Acharya, S.; Baumgarten, E.; Christopher, J.; Elshalia, E.; Hrebien, G.; Kublank, K.; Saleh, S.; Stallings, B.; Tafere, M.; Striplin, C.; Afonin, K. Broccoli Fluorets: Split Aptamers as a User-Friendly Fluorescent Toolkit for Dynamic RNA Nanotechnology. *Molecules* **2018**, *23* (12), 3178.
- (188) Alam, K. K.; Tawiah, K. D.; Lichte, M. F.; Porciani, D.; Burke, D. H. A Fluorescent Split Aptamer for Visualizing RNA–RNA Assembly *In Vivo*. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (9), 1710–1721.
- (189) Karunanayake Mudiyansele, A. P. K. K.; Yu, Q.; Leon-Duque, M. A.; Zhao, B.; Wu, R.; You, M. Genetically Encoded Catalytic Hairpin Assembly for Sensitive RNA Imaging in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (28), 8739–8745.
- (190) Torelli, E.; Kozyra, J. W.; Gu, J.-Y.; Stimming, U.; Piantanida, L.; Voïtchovsky, K.; Krasnogor, N. Isothermal Folding of a Light-up Bio-Orthogonal RNA Origami Nanoribbon. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 6989.
- (191) Toran, P.; Smolina, I.; Driscoll, H.; Ding, F.; Sun, Y.; Cantor, C. R.; Broude, N. E. Labeling Native Bacterial RNA in Live Cells. *Cell Res.* **2014**, *24* (7), 894–897.
- (192) Ma, X.; Guo, Z.; Mao, Z.; Tang, Y.; Miao, P. Colorimetric Theophylline Aggregation Assay Using an RNA Aptamer and Non-Crosslinking Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (1), 33–40.
- (193) Wang, J.; Cheng, W.; Meng, F.; Yang, M.; Pan, Y.; Miao, P. Hand-in-Hand RNA Nanowire-Based Aptasensor for the Detection of Theophylline. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *101*, 153–158.
- (194) Jiang, H.; Ling, K.; Tao, X.; Zhang, Q. Theophylline Detection in Serum Using a Self-Assembling RNA Aptamer-Based Gold Nanoparticle Sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 299–303.
- (195) Cech, T. R. Self-Splicing of Group I Introns. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 543–568.
- (196) Sullenger, B. A.; Cech, T. R. Ribozyme-Mediated Repair of Defective mRNA by Targeted Trans-Splicing. *Nature* **1994**, *371* (6498), 619–622.

- (197) Hasegawa, S.; Gowrishankar, G.; Rao, J. Detection of mRNA in Mammalian Cells with a Split Ribozyme Reporter. *ChemBioChem* **2006**, *7* (6), 925–928.
- (198) Gao, W.; Xing, B.; Tsien, R. Y.; Rao, J. Novel Fluorogenic Substrates for Imaging β -Lactamase Gene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11146–11147.
- (199) Buzayan, J. M.; Gerlach, W. L.; Bruening, G. Non-Enzymatic Cleavage and Ligation of RNAs Complementary to a Plant Virus Satellite RNA. *Nature* **1986**, *323*, 349–353.
- (200) Hampel, A.; Tritz, R. RNA Catalytic Properties of the Minimum (-)STRSV Sequence. *Biochemistry* **1989**, *28* (12), 4929–4933.
- (201) Welz, R.; Schmidt, C.; Müller, S. Spermine Supports Catalysis of Hairpin Ribozyme Variants to Differing Extents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283* (3), 648–654.
- (202) Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent and Colorimetric Sensors for Detection of Lead, Cadmium, and Mercury Ions. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (8), 3210–3244.
- (203) Lu, L.-M.; Zhang, X.-B.; Kong, R.-M.; Yang, B.; Tan, W. A Ligation-Triggered DNAzyme Cascade for Amplified Fluorescence Detection of Biological Small Molecules with Zero-Background Signal. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (30), 11686–11691.
- (204) Chen, J.; Pan, J.; Chen, S. A Naked-Eye Colorimetric Sensor for Hg²⁺ Monitoring with Cascade Signal Amplification Based on Target-Induced Conjunction of Split DNAzyme Fragments. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (73), 10224–10227.
- (205) Wu, Y.; Huang, J.; Yang, X.; Yang, Y.; Quan, K.; Xie, N.; Li, J.; Ma, C.; Wang, K. Gold Nanoparticle Loaded Split-DNAzyme Probe for Amplified MiRNA Detection in Living Cells. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (16), 8377–8383.
- (206) Deng, M.; Zhang, D.; Zhou, Y.; Zhou, X. Highly Effective Colorimetric and Visual Detection of Nucleic Acids Using an Asymmetrically Split Peroxidase DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (39), 13095–13102.
- (207) Nakayama, S.; Sintim, H. O. Colorimetric Split G-Quadruplex Probes for Nucleic Acid Sensing: Improving Reconstituted DNAzyme's Catalytic Efficiency via Probe Remodeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (29), 10320–10333.

- (208) Deng, M.; Feng, S.; Luo, F.; Wang, S.; Sun, X.; Zhou, X.; Zhang, X.-L. Visual Detection of RpoB Mutations in Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains by Use of an Asymmetrically Split Peroxidase DNAzyme. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50* (11), 3443–3450.
- (209) Shahbazi, N.; Hosseinkhani, S.; Ranjbar, B. A Facile and Rapid Aptasensor Based on Split Peroxidase DNAzyme for Visual Detection of Carcinoembryonic Antigen in Saliva. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *253*, 794–803.
- (210) Zhu, D.; Luo, J.; Rao, X.; Zhang, J.; Cheng, G.; He, P.; Fang, Y. A Novel Optical Thrombin Aptasensor Based on Magnetic Nanoparticles and Split DNAzyme. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 91–96.
- (211) Zhang, X. F.; Li, N.; Ling, Y.; Tang, L.; Li, N. B.; Luo, H. Q. Linked Bridge Hybridizing-Induced Split G-Quadruplex DNA Machine and Its Application to Uracil-DNA Glycosylase Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *255*, 2589–2594.
- (212) Zhou, D.; Wu, W.; Li, Q.; Pan, J.; Chen, J. A Label-Free and Enzyme-Free Aptasensor for Visual Cd²⁺ Detection Based on Split DNAzyme Fragments. *Anal. Methods* **2019**, *11* (28), 3546–3551.
- (213) Zhou, W.; Ding, J.; Liu, J. Splitting a DNAzyme Enables a Na⁺-Dependent FRET Signal from the Embedded Aptamer. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (33), 6959–6966.
- (214) Zhou, X.-H.; Kong, D.-M.; Shen, H.-X. Ag⁺ and Cysteine Quantitation Based on G-Quadruplex–Hemin DNAzymes Disruption by Ag⁺. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (3), 789–793.
- (215) Xu, J.; Lee, E.-S.; Gye, M. C.; Kim, Y.-P. Rapid and Sensitive Determination of Bisphenol A Using Aptamer and Split DNAzyme. *Chemosphere* **2019**, *228*, 110–116.
- (216) Luo, Y.; Yu, H.; Alkhamis, O.; Liu, Y.; Lou, X.; Yu, B.; Xiao, Y. Label-Free, Visual Detection of Small Molecules Using Highly Target-Responsive Multimodule Split Aptamer Constructs. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 7199–7207.
- (217) Hou, T.; Li, C.; Wang, X.; Zhao, C.; Li, F. Label-Free Colorimetric Detection of Coralyne Utilizing Peroxidase-like Split G-Quadruplex DNAzyme. *Anal. Methods* **2013**, *5* (18), 4671–4674.
- (218) Cui, X.; Li, R.; Liu, X.; Wang, J.; Leng, X.; Song, X.; Pei, Q.; Wang, Y.; Liu, S.; Huang, J. Low-Background and Visual Detection of Antibiotic Based on Target-Activated Colorimetric Split

- Peroxidase DNAzyme Coupled with Dual Nicking Enzyme Signal Amplification. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *997*, 1–8.
- (219) Zhang, R.; Wang, Y.; Qu, X.; Li, S.; Zhao, Y.; Zhang, F.; Liu, S.; Huang, J.; Yu, J. A Label-Free Electrochemical Platform for Antibiotics Detection Based on Cascade Enzymatic Amplification Coupled with Split G-Quadruplex DNAzyme. *Analyst* **2019**, *144*, 4995–5002.
- (220) Sun, C.; Liu, X.; Feng, K.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R. An Aptazyme-Based Electrochemical Biosensor for the Detection of Adenosine. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *669* (1–2), 87–93.
- (221) Song, P.; Xiang, Y.; Xing, H.; Zhou, Z.; Tong, A.; Lu, Y. Label-Free Catalytic and Molecular Beacon Containing an Abasic Site for Sensitive Fluorescent Detection of Small Inorganic and Organic Molecules. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (6), 2916–2922.
- (222) Lu, N.; Shao, C.; Deng, Z. Rational Design of an Optical Adenosine Sensor by Conjugating a DNA Aptamer with Split DNAzyme Halves. *Chem. Commun.* **2008**, No. 46, 6161–6163.
- (223) Alila, K. O.; Baum, D. A. Modulation of an RNA-Branched Deoxyribozyme by a Small Molecule. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (11), 3227–3229.
- (224) Liu, J.; Lu, Y. Adenosine-Dependent Assembly of Aptazyme-Functionalized Gold Nanoparticles and Its Application as a Colorimetric Biosensor. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (6), 1627–1632.
- (225) Huang, J.; He, Y.; Yang, X.; Wang, K.; Quan, K.; Lin, X. Split Aptazyme-Based Catalytic Molecular Beacons for Amplified Detection of Adenosine. *The Analyst* **2014**, *139* (12), 2994–2997.
- (226) Wang, R.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Shi, H.; Nguyen, K. T.; Zhou, X. Unconventional Split Aptamers Cleaved at Functionally Essential Sites Preserve Biorecognition Capability. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 15811–15817.
- (227) Debais, M.; Lelievre, A.; Smietana, M.; Müller, S. Splitting Aptamers and Nucleic Acid Enzymes for the Development of Advanced Biosensors. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (7), 3400–3422.
- (228) Jin, Y.; Yu, C.; Denman, R. J.; Zhang, W. Recent Advances in Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6634–6655.
- (229) Davy, H. An Account of Some New Analytical Researches on the Nature of Certain Bodies, Particularly the Alkalies, Phosphorus, Sulphur, Carbonaceous Matter, and the Acids Hitherto

- Undecomposed : With Some General Observations on Chemical Theory. *Philos. Mag.* **1809**, *34* (135), 6–19.
- (230) DeFrancesco, H.; Dudley, J.; Coca, A. Boron Chemistry: An Overview. In *ACS Symposium Series*; Coca, A., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 2016; Vol. 1236, pp 1–25.
- (231) Frankland, E.; Duppa, B. On Boric Ethide. *Proc. R. Soc. Lond.* **1860**, *10*, 568–570.
- (232) Fyfe, J. W. B.; Watson, A. J. B. Recent Developments in Organoboron Chemistry: Old Dogs, New Tricks. *Chem* **2017**, *3* (1), 31–55.
- (233) Petasis, N. A.; Akritopouliou, I. The Boronic Acid Mannich Reaction : A New Method for the Synthesis of Geometrically Pure Allylamines. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (4), 583–586.
- (234) Miyaura, N.; Yamada, K. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, No. 36, 3437–3440.
- (235) Suzuki, A. Cross-Coupling Reactions Of Organoboranes: An Easy Way To Construct C–C Bonds (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (30), 6722–6737.
- (236) Kaur, P.; Khatik, G. L.; Nayak, S. K. A Review on Advances in Organoborane-Chemistry: Versatile Tool in Asymmetric Synthesis. *Curr. Org. Synth.* **2017**, *14* (5), 665–682.
- (237) Hall, D. G. Boronic Acid Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (13), 3475–3496.
- (238) Trippier, P. C.; McGuigan, C. Boronic Acids in Medicinal Chemistry: Anticancer, Antibacterial and Antiviral Applications. *MedChemComm* **2010**, *1* (3), 183–198.
- (239) António, J. P. M.; Russo, R.; Carvalho, C. P.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P. Boronic Acids as Building Blocks for the Construction of Therapeutically Useful Bioconjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (13), 3513–3536.
- (240) Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. Synthesis and Applications of Boronic Acid-Containing Polymers: From Materials to Medicine. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1375–1397.
- (241) Whyte, G. F.; Vilar, R.; Woscholski, R. Molecular Recognition with Boronic Acids—Applications in Chemical Biology. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6* (4), 161–174.

- (242) Liu, J.; Lavigne, J. J. Boronic Acids in Materials Chemistry. In *Boronic Acids*; Hall, D. G., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011; pp 621–676.
- (243) Lorand, J. P. Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion. **1959**, *24*, 769–774.
- (244) Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. The Relationship among PKa, PH, and Binding Constants in the Interactions between Boronic Acids and Diols—It Is Not as Simple as It Appears. *Tetrahedron* **2004**, *60* (49), 11205–11209.
- (245) Nishiyabu, R.; Kubo, Y.; James, T. D.; Fossey, J. S. Boronic Acid Building Blocks: Tools for Self Assembly. *Chem Commun* **2011**, *47* (4), 1124–1150.
- (246) Ryan, D. M.; Nilsson, B. L. Phenylboronic Acid-Based Glucose-Responsive Polymeric Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Polym Chem* **2014**, *5*, 1503–1518.
- (247) McClary, C. A.; Taylor, M. S. Applications of Organoboron Compounds in Carbohydrate Chemistry and Glycobiology: Analysis, Separation, Protection, and Activation. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 112–122.
- (248) Hansen, J. S.; Christensen, J. B.; Petersen, J. F.; Hoeg-Jensen, T.; Norrild, J. C. Arylboronic Acids: A Diabetic Eye on Glucose Sensing. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *161* (1), 45–79.
- (249) Gillis, E. P.; Burke, M. D. Iterative Cross-Coupling with MIDA Boronates: Towards a General Platform for Small Molecule Synthesis. *Aldrichimica Acta* **2009**, *42* (1), 17–27.
- (250) Hollenstein, M. DNA Catalysis: The Chemical Repertoire of DNAzymes. *Molecules* **2015**, *20* (12), 20777–20804.
- (251) Lusic, H.; Young, D. D.; Lively, M. O.; Deiters, A. Photochemical DNA Activation. *Org. Lett.* **2007**, *9* (10), 1903–1906.
- (252) Richards, J. L.; Seward, G. K.; Wang, Y.-H.; Dmochowski, I. J. Turning the 10-23 DNAzyme On and Off with Light. *ChemBioChem* **2010**, *11* (3), 320–324.
- (253) Martin, A. R.; Mohanan, K.; Luvino, D.; Floquet, N.; Baraguey, C.; Smietana, M.; Vasseur, J.-J. Expanding the Boronucleotide Family: Synthesis of Borono-Analogues of DCMP, DGMP and DAMP. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (21), 4369–4377.

- (254) Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX). *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (12), 4537–4538.
- (255) More, J. D.; Finney, N. S. A Simple and Advantageous Protocol for the Oxidation of Alcohols with *o*-Iodoxybenzoic Acid (IBX). *Org. Lett.* **2002**, *4* (17), 3001–3003.
- (256) Ohira, S. Methanolysis of Dimethyl (1-Diazo-2-Oxopropyl) Phosphonate: Generation of Dimethyl (Diazomethyl) Phosphonate and Reaction with Carbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **1989**, *19* (3–4), 561–564.
- (257) Tebbe, F. N.; Parshall, G. W.; Reddy, G. S. Olefin Homologation with Titanium Methylene Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (11), 3611–3613.
- (258) Matsubara, S.; Sugihara, M.; Utimoto, K. Methylenation of Carbonyl Compounds by Means of Nysted Reagent. *Synlett* **1998**, *1998* (3), 313–315.
- (259) Tochtermann, W.; Bruhn', S.; Meints', M.; Wolft, C.; Petersb, E.-M. Synthese Stereoisomer 4,7-epoxy-hydroazulen-5,6-dicarbonsäuredimethylester Mit Lactaran-Gerüst. *Tetrahedron* **1995**, *51* (6), 1623–1630.
- (260) Lavergne, T.; Bertrand, J.-R.; Vasseur, J.-J.; Debart, F. A Base-Labile Group for 2'-OH Protection of Ribonucleosides: A Major Challenge for RNA Synthesis. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (30), 9135–9138.
- (261) Reese, C. B. Oligo- and Poly-Nucleotides: 50 Years of Chemical Synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (21), 3851–3868.
- (262) Welz, R.; Müller, S. 5-(Benzylmercapto)-1 H -Tetrazole as Activator for 2'- O -TBDMS Phosphoramidite Building Blocks in RNA Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (5), 795–797.
- (263) Hakimelahi, G. H.; Proba, Z. A.; Ogilvie, K. K. New Catalysts and Procedures for the Dimethoxytritylation and Selective Silylation of Ribonucleosides. *Can. J. Chem.* **1982**, *60* (9), 1106–1113.
- (264) Jones, S. S.; Reese, C. B. Migration of T-Butyldimethylsilyl Protecting Groups. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1979**, 2762–2764.

-
- (265) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (20), 1859–1862.
- (266) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (11), 3185–3191.
- (267) Reverte, M.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. Nuclease Stability of Boron-Modified Nucleic Acids: Application to Label-Free Mismatch Detection. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (43), 10604–10608.
- (268) Kool, E. T.; Miller, G. P. 5'-Iodination of Solid-Phase-Linked Oligodeoxyribonucleotides. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2003**, *14* (1), 4.19.1-4.19.8.
- (269) Miller, G. P.; Kool, E. T. Versatile 5'-Functionalization of Oligonucleotides on Solid Support: Amines, Azides, Thiols, and Thioethers via Phosphorus Chemistry. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (7), 2404–2410.
- (270) Debiais, M.; Vasseur, J.-J.; Müller, S.; Smietana, M. Selective Chemical Modification of DNA with Boronic Acids by On-Column CuAAC Reactions. *Synthesis* **2020**, *52* (20), 2962–2969.
- (271) Schubert, S. RNA Cleaving “10-23” DNAzymes with Enhanced Stability and Activity. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (20), 5982–5992.
- (272) Nawrot, B.; Widera, K.; Wojcik, M.; Rebowska, B.; Nowak, G.; Stec, W. J. Mapping of the Functional Phosphate Groups in the Catalytic Core of Deoxyribozyme 10-23: Metal-Binding Site in Deoxyribozyme 10-23. *FEBS J.* **2007**, *274* (4), 1062–1072.
- (273) Gao, J.; Shimada, N.; Maruyama, A. Enhancement of Deoxyribozyme Activity by Cationic Copolymers. *Biomater. Sci.* **2015**, *3* (2), 308–316.
- (274) Jung, J.; Han, K. Y.; Koh, H. R.; Lee, J.; Choi, Y. M.; Kim, C.; Kim, S. K. Effect of Single-Base Mutation on Activity and Folding of 10-23 Deoxyribozyme Studied by Three-Color Single-Molecule ALEX FRET. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (9), 3007–3012.
- (275) Rupcich, N.; Chiuman, W.; Nutiu, R.; Mei, S.; Flora, K. K.; Li, Y.; Brennan, J. D. Quenching of Fluorophore-Labeled DNA Oligonucleotides by Divalent Metal Ions: Implications for Selection,

- Design, and Applications of Signaling Aptamers and Signaling Deoxyribozymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (3), 780–790.
- (276) Sugimoto, N.; Okumoto, Y.; Ohmichi, T. Effect of Metal Ions and Sequence of Deoxyribozymes on Their RNA Cleavage Activity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, No. 7, 1381–1386.
- (277) Panchompoo, J.; Aldous, L.; Baker, M.; Wallace, M. I.; Compton, R. G. One-Step Synthesis of Fluorescein Modified Nano-Carbon for Pd(II) Detection via Fluorescence Quenching. *The Analyst* **2012**, *137* (9), 2054.
- (278) Gao, M.; Gnutt, D.; Orban, A.; Appel, B.; Righetti, F.; Winter, R.; Narberhaus, F.; Müller, S.; Ebbinghaus, S. RNA Hairpin Folding in the Crowded Cell. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2016**, *55* (9), 3224–3228.
- (279) Cairns, M. J. Optimisation of the 10-23 DNAzyme-Substrate Pairing Interactions Enhanced RNA Cleavage Activity at Purine-Cytosine Target Sites. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (11), 2883–2889.
- (280) Balke, D.; Becker, A.; Müller, S. In Vitro Repair of a Defective EGFP Transcript and Translation into a Functional Protein. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (28), 6729–6737.
- (281) Zaborowska, Z.; Schubert, S.; Kurreck, J.; Erdmann, V. A. Deletion Analysis in the Catalytic Region of the 10-23 DNA Enzyme. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (2), 554–558.
- (282) Yang, X.; Xiao, Z.; Zhu, J.; Li, Z.; He, J.; Zhang, L.; Yang, Z. Spatial Conservation Studies of Nucleobases in 10–23 DNAzyme by 2'-Positioned Isonucleotides and Enantiomers for Increased Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (17), 4032–4038.
- (283) Haseloff, J.; Gerlach, W. L. Sequences Required for Self-Catalysed Cleavage of the Satellite RNA of Tobacco Ringspot Virus. *Gene* **1989**, *82* (1), 43–52.
- (284) Hieronymus, R.; Müller, S. Engineering of Hairpin Ribozyme Variants for RNA Recombination and Splicing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1447* (1), 135–143.
- (285) Esteban, J. A.; Walter, N. G.; Kotzorek, G.; Heckman, J. E.; Burke, J. M. Structural Basis for Heterogeneous Kinetics: Reengineering the Hairpin Ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (11), 6091–6096.

- (286) Li, J.; Lu, Y. A Highly Sensitive and Selective Catalytic DNA Biosensor for Lead Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (42), 10466–10467.
- (287) Zhai, W.; Sun, X.; James, T. D.; Fossey, J. S. Boronic Acid-Based Carbohydrate Sensing. *Chem. - Asian J.* **2015**, *10* (9), 1836–1848.
- (288) Stubelius, A.; Lee, S.; Almutairi, A. The Chemistry of Boronic Acids in Nanomaterials for Drug Delivery. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (11), 3108–3119.
- (289) Bull, S. D.; Davidson, M. G.; van den Elsen, J. M. H.; Fossey, J. S.; Jenkins, A. T. A.; Jiang, Y.-B.; Kubo, Y.; Marken, F.; Sakurai, K.; Zhao, J.; James, T. D. Exploiting the Reversible Covalent Bonding of Boronic Acids: Recognition, Sensing, and Assembly. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (2), 312–326.
- (290) Marco-Dufort, B.; Tibbitt, M. W. Design of Moldable Hydrogels for Biomedical Applications Using Dynamic Covalent Boronic Esters. *Mater. Today Chem.* **2019**, *12*, 16–33.
- (291) Akgun, B.; Hall, D. G. Boronic Acids as Bioorthogonal Probes for Site-Selective Labeling of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (40), 13028–13044.
- (292) Dai, C.; Cheng, Y.; Cui, J.; Wang, B. Click Reactions and Boronic Acids: Applications, Issues, and Potential Solutions. *Molecules* **2010**, *15* (8), 5768–5781.
- (293) Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M. T.; Combs, A. New Aryl/Heteroaryl C-N Bond Cross-Coupling Reactions via Arylboronic Acid/Cupric Acetate Arylation. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (19), 2941–2944.
- (294) Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Li, R.; Bonne, D.; Clark, C. G.; Lam, P. Y. S. Copper Promoted C-N and C-O Bond Cross-Coupling with Phenyl and Pyridylboronates. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (19), 3863–3865.
- (295) Steinmeyer, J.; Wagenknecht, H.-A. Synthesis of DNA Modified with Boronic Acid: Compatibility to Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (2), 431–436.
- (296) Gordon, C. K. L.; Wu, D.; Pusuluri, A.; Feagin, T. A.; Csordas, A. T.; Eisenstein, M. S.; Hawker, C. J.; Niu, J.; Soh, H. T. Click-Particle Display for Base-Modified Aptamer Discovery. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (12), 2652–2662.

- (297) 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.* **2008**, *47* (44), 8350–8358.
- (298) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Click Chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1388–1405.
- (299) Reverte, M.; Vaissiere, A.; Boisguerin, P.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. RNase H-Assisted Imaging of Peroxynitrite in Living Cells with 5'-Boronic Acid Modified DNA. *ACS Sens.* **2016**, *1* (8), 970–974.
- (300) Reverte, M.; Barvik, I.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. RNA-Directed off/on Switch of RNase H Activity Using Boronic Ester Formation. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8204–8210.
- (301) Burgess, K.; Cook, D. Syntheses of Nucleoside Triphosphates. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 2047–2060.
- (302) Lin, N.; Yan, J.; Huang, Z.; Altier, C.; Li, M.; Carrasco, N.; Suyemoto, M.; Johnston, L.; Wang, S.; Wang, Q.; Fang, H.; Caton-Williams, J.; Wang, B. Design and Synthesis of Boronic-Acid-Labeled Thymidine Triphosphate for Incorporation into DNA. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (4), 1222–1229.
- (303) Yang, X.; Dai, C.; Dayan Calderon Molina, A.; Wang, B. Boronic Acid-Modified DNA That Changes Fluorescent Properties upon Carbohydrate Binding. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (7), 1073–1075.
- (304) Ivancová, I.; Leone, D.-L.; Hocek, M. Reactive Modifications of DNA Nucleobases for Labelling, Bioconjugations, and Cross-Linking. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 136–144.
- (305) Weisbrod, S. H.; Marx, A. Novel Strategies for the Site-Specific Covalent Labelling of Nucleic Acids. *Chem. Commun.* **2008**, No. 44, 5675–5685.
- (306) Mansot, J.; Aubert, S.; Duchemin, N.; Vasseur, J.-J.; Arseniyadis, S.; Smietana, M. A Rational Quest for Selectivity through Precise Ligand-Positioning in Tandem DNA-Catalysed Friedel–Crafts Alkylation/Asymmetric Protonation. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (10), 2875–2881.

- (307) Hargrove, A. E.; Ellington, A. D.; Anslyn, E. V.; Sessler, J. L. Chemical Functionalization of Oligodeoxynucleotides with Multiple Boronic Acids for the Polyvalent Binding of Saccharides. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (3), 388–396.
- (308) Luvino, D.; Amalric, C.; Smietana, M.; Vasseur, J.-J. Sequential Seyferth-Gilbert/CuAAC Reactions: Application to the One-Pot Synthesis of Triazoles from Aldehydes. *Synlett* **2007**, *2007* (19), 3037–3041.
- (309) Scrafton, D. K.; Taylor, J. E.; Mahon, M. F.; Fossey, J. S.; James, T. D. “Click-Fluors”: Modular Fluorescent Saccharide Sensors Based on a 1,2,3-Triazole Ring. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (7), 2871–2874.
- (310) Mothana, S.; Grassot, J.-M.; Hall, D. G. Multistep Phase-Switch Synthesis by Using Liquid–Liquid Partitioning of Boronic Acids: Productive Tags with an Expanded Repertoire of Compatible Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (16), 2883–2887.
- (311) Caselli, E.; Romagnoli, C.; Vahabi, R.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A.; Prati, F. Click Chemistry in Lead Optimization of Boronic Acids as β -Lactamase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (14), 5445–5458.
- (312) Jin, S.; Choudhary, G.; Cheng, Y.; Dai, C.; Li, M.; Wang, B. Fluoride Protects Boronic Acids in the Copper(i)-Mediated Click Reaction. *Chem. Commun.* **2009**, No. 35, 5251–5253.
- (313) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.
- (314) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128–1137.
- (315) Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G. Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (10), 1912–1916.
- (316) Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Synthesis of RNA 5'-Azides from 2'-O - Pivaloyloxymethyl-Protected RNAs and Their Reactivity in Azide–Alkyne Cycloaddition Reactions. *Org. Lett.* **2017**, *19* (13), 3624–3627.

-
- (317) Eurogentec <https://secure.eurogentec.com/product/research-minimum-guaranteed-yields.html> (accessed Apr 21, 2020).
- (318) Thompson, A. S.; Humphrey, G. R.; DeMarco, A. M.; Mathre, D. J.; Grabowski, E. J. J. Direct Conversion of Activated Alcohols to Azides Using Diphenyl Phosphorazidate. A Practical Alternative to Mitsunobu Conditions. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (22), 5886–5888.
- (319) Lal, B.; Pramanik, N.; Manhas, M. S.; Bose, A. K. Diphenylphosphoryl Azid : A Novel Reagent for the Stereospecific Synthesis of Azides from Alcohols. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18* (23), 1977–1980.
- (320) Yan, S.; Lai, X.; Wang, Y.; Ye, N.; Xiang, Y. Label Free Aptasensor for Ultrasensitive Detection of Tobramycin Residue in Pasteurized Cow's Milk Based on Resonance Scattering Spectra and Nanogold Catalytic Amplification. *Food Chem.* **2019**, *295*, 36–41.
- (321) Wang, S.; Li, Z.; Duan, F.; Hu, B.; He, L.; Wang, M.; Zhou, N.; Jia, Q.; Zhang, Z. Bimetallic Cerium/Copper Organic Framework-Derived Cerium and Copper Oxides Embedded by Mesoporous Carbon: Label-Free Aptasensor for Ultrasensitive Tobramycin Detection. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1047*, 150–162.
- (322) Yoon, J.; Czarnik, A. W. Fluorescent Chemosensors of Carbohydrates. A Means of Chemically Communicating the Binding of Polyols in Water Based on Chelation-Enhanced Quenching. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (14), 5874–5875.
- (323) Wu, X.; Li, Z.; Chen, X.-X.; Fossey, J. S.; James, T. D.; Jiang, Y.-B. Selective Sensing of Saccharides Using Simple Boronic Acids and Their Aggregates. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (20), 8032.
- (324) Springsteen, G.; Wang, B. Alizarin Red S. as a General Optical Reporter for Studying the Binding of Boronic Acids with Carbohydrates. *Chem. Commun.* **2001**, No. 17, 1608–1609.
- (325) Brown, H. C.; Rao, B. C. Selective Conversion of Olefins into Organoboranes Through Competitive Hydroboration, Isomerization, and Displacement Reactions. *J. Org. Chem.* **1957**, *22* (9), 1137–1138.
- (326) Brown, H. C.; Gupta, S. K. Catecholborane (1,3,2-Benzodioxaborole) as a New, General Monohydroboration Reagent for Alkynes. Convenient Synthesis of Alkeneboronic Esters and Acids from Alkynes via Hydroboration. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4370–7371.

- (327) Ishiyama, T.; Yamamoto, M.; Miyaura, N. Diboration of Alkenes with Bis(Pinacolato)Diboron Catalysed by a Platinum(0) Complex. *Chem. Commun.* **1997**, No. 7, 689–690.
- (328) Tucker, C. E.; Davidson, J.; Knochel, P. Mild and Stereoselective Hydroborations of Functionalized Alkynes and Alkenes Using Pinacolborane. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (12), 3482–3485.
- (329) Brown, H. C.; Gupta, S. K. Hydroboration. XXXIX. 1,3,2-Benzodioxaborole (Catecholborane) as a New Hydroboration Reagent for Alkenes and Alkynes. General Synthesis of Alkane- and Alkeneboronic Acids and Esters via Hydroboration. Directive Effects in the Hydroboration of Alkenes and Alkynes with Catecholborane. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (18), 5249–5255.
- (330) Pasto, D. J.; Lepeska, B.; Balasubramaniyan, V. Measurement of the Relative Rate Ratios of the First and Second Steps of the Hydroboration Reaction and the Rates of Alkylborane Redistribution Reactions. Discussion of the Overall Mechanism of the Hydroboration Reaction". *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (17), 6090–6096.
- (331) Brown, H. C.; Yoon, N. M. Hydroboration. 44. Diisopinocampheylborane of High Optical Purity. Asymmetric Synthesis via Hydroboration with Essentially Complete Asymmetric Induction. *Isr. J. Chem.* **1976**, 15 (1–2), 12–16.
- (332) Mandal, A. K.; Jadhav, P. K.; Brown, H. C. Monoisopinocampheylborane: An Excellent Chiral Hydroborating Agent for Phenyl-Substituted Tertiary Olefins. Synthesis of Alcohols Approaching 100% Enantiomeric Excess. *J. Org. Chem.* **1980**, 45 (17), 3543–3544.
- (333) Brown, H. C.; Knights, E. F.; Scouten, C. G. Hydroboration. XXXVI. A Direct Route to 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane via the Cyclic Hydroboration of 1,5-Cyclooctadiene. 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane as a Uniquely Selective Reagent for the Hydroboration of Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96 (25), 7765–7770.
- (334) Huang, J.; Yan, W.; Tan, C.; Wu, W.; Jiang, H. Palladium-Catalyzed Regioselective Hydroboration of Aryl Alkenes with B_2Pin_2 . *Chem. Commun.* **2018**, 54 (14), 1770–1773.
- (335) Tilquin, J.-M.; Dechamps, M.; Sonveaux, E. Incorporation of an Aldehyde Function in Oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12 (3), 451–457.
- (336) Dohno, C.; Okamoto, A.; Saito, I. Stable, Specific, and Reversible Base Pairing via Schiff Base. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (47), 16681–16684.

- (337) Raindlová, V.; Pohl, R.; Hocek, M. Synthesis of Aldehyde-Linked Nucleotides and DNA and Their Bioconjugations with Lysine and Peptides through Reductive Amination. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (13), 4080–4087.
- (338) Sugiyama, H.; Matsuda, S.; Kino, K.; Zhang, Q.-M.; Yonei, S.; Saito, I. New Synthetic Method of 5-Formyluracil-Containing Oligonucleotides and Their Melting Behavior. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (50), 9067–9070.
- (339) Kittaka, A.; Kuze, T.; Asakura, T.; Ito, K.; Miyasaka, T.; Inoue, J. Oligonucleotides Bearing 5-Formyl-2'-O-Methyluridine: Preference in Binding Affinity to the NF- κ B (P50)² Homo- and P50/P65 Heterodimers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3207–3210.
- (340) Kittaka, A.; Takayama, H.; Kurihara, M.; Horii, C.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Inoue, J. DNA Sequence Recognition by NHKB P50 Homodimer: Strict and Obscure Recognition Sites in the Binding Sequence. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20* (4–7), 669–672.
- (341) Krömer, M.; Bártová, K.; Raindlová, V.; Hocek, M. Synthesis of Dihydroxyalkynyl and Dihydroxyalkyl Nucleotides as Building Blocks or Precursors for Introduction of Diol or Aldehyde Groups to DNA for Bioconjugations. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (46), 11890–11894.
- (342) Wirges, C. T.; Timper, J.; Fischler, M.; Sologubenko, A. S.; Mayer, J.; Simon, U.; Carell, T. Controlled Nucleation of DNA Metallization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (1), 219–223.
- (343) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376.
- (344) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47* (39), 7523–7526.
- (345) Li, X.-G.; Haaparanta, M.; Solin, O. Oxime Formation for Fluorine-18 Labeling of Peptides and Proteins for Positron Emission Tomography (PET) Imaging: A Review. *J. Fluor. Chem.* **2012**, *143*, 49–56.
- (346) Su, X.; Aprahamian, I. Hydrazone-Based Switches, Metallo-Assemblies and Sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1963.

- (347) Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (5), 825–858.
- (348) Rettig, S. J.; Trotter, J. Crystal and Molecular Structure of Phenylboronic Acid, C₆H₅B(OH)₂. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (17), 3071–3075.
- (349) Sopková-de Oliveira Santos, J.; Lancelot, J.-C.; Bouillon, A.; Rault, S. 2-(6-Bromopyridin-3-Yl)-4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-Dioxaborolane and (6-Bromopyridin-3-Yl)Boronic Acid, New Bifunctional Building Blocks for Combinatorial Chemistry. *Acta Crystallogr. C* **2003**, *59* (3), o111–o113.
- (350) Rodríguez-Cuamatzi, P.; Vargas-Díaz, G.; Maris, T.; Wuest, J. D.; Höpfl, H. 1,4-Phenylenediboronic Acid. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2004**, *60* (8), o1316–o1318.
- (351) Pedireddi, V. R.; SeethaLekshmi, N. Boronic Acids in the Design and Synthesis of Supramolecular Assemblies. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (9), 1903–1906.
- (352) Maly, K. E.; Maris, T.; Wuest, J. D. Two-Dimensional Hydrogen-Bonded Networks in Crystals of Diboronic Acids. *CrystEngComm* **2006**, *8*, 33–35.
- (353) Fournier, J.-H.; Maris, T.; Wuest, J. D.; Guo, W.; Galoppini, E. Molecular Tectonics. Use of the Hydrogen Bonding of Boronic Acids To Direct Supramolecular Construction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (4), 1002–1006.
- (354) Rose, M.; Notzon, A.; Heitbaum, M.; Nickerl, G.; Paasch, S.; Brunner, E.; Glorius, F.; Kaskel, S. N-Heterocyclic Carbene Containing Element Organic Frameworks as Heterogeneous Organocatalysts. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (16), 4814–4816.
- (355) Tokunaga, Y.; Ueno, H.; Shimomura, Y.; Seo, T. Formation of Boroxines : Its Stability and Thermodynamic Parameters in Solution. *Heterocycles* **2002**, *57* (5), 787–790.
- (356) Cote, A. P.; Benin, A. I.; Ockwig, N. W.; O’Keeffe, M.; Matzger, A. J.; Yaghi, O. M. Porous, Crystalline, Covalent Organic Frameworks. *Science* **2005**, *310*, 1166–1170.

-
- (357) El-Kaderi, H. M.; Hunt, J. R.; Mendoza-Cortes, J. L.; Cote, A. P.; Taylor, R. E.; O’Keeffe, M.; Yaghi, O. M. Designed Synthesis of 3D Covalent Organic Frameworks. *Science* **2007**, *316* (5822), 268–272.
- (358) Mastalerz, M. The Next Generation of Shape-Persistent Zeolite Analogues: Covalent Organic Frameworks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (3), 445–447.
- (359) Han, S. S.; Furukawa, H.; Yaghi, O. M.; Goddard, W. A. Covalent Organic Frameworks as Exceptional Hydrogen Storage Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (35), 11580–11581.
- (360) Cao, D.; Lan, J.; Wang, W.; Smit, B. Lithium-Doped 3D Covalent Organic Frameworks: High-Capacity Hydrogen Storage Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (26), 4730–4733.
- (361) Liu, C.; Zhang, W.; Zeng, Q.; Lei, S. A Photoresponsive Surface Covalent Organic Framework: Surface-Confined Synthesis, Isomerization, and Controlled Guest Capture and Release. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (20), 6768–6773.
- (362) Li, H.; Pan, Q.; Ma, Y.; Guan, X.; Xue, M.; Fang, Q.; Yan, Y.; Valtchev, V.; Qiu, S. Three-Dimensional Covalent Organic Frameworks with Dual Linkages for Bifunctional Cascade Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (44), 14783–14788.
- (363) Morgan, A. B.; Jurs, J. L.; Tour, J. M. Synthesis, Flame-Retardancy Testing, and Preliminary Mechanism Studies of Nonhalogenated Aromatic Boronic Acids: A New Class of Condensed-Phase Polymer Flame-Retardant Additives for Acrylonitrile-Butadiene-Styrene and Polycarbonate. *J. Polym. Appl. Sci.* **2000**, *76*, 1257–1268.
- (364) Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. Biomedical Applications of Boronic Acid Polymers. *Polymer* **2011**, *52* (21), 4631–4643.
- (365) Zhai, W.; Sun, X.; James, T. D.; Fossey, J. S. Boronic Acid-Based Carbohydrate Sensing. *Chem. - Asian J.* **2015**, *10* (9), 1836–1848.
- (366) Furukawa, H.; Yaghi, O. M. Storage of Hydrogen, Methane, and Carbon Dioxide in Highly Porous Covalent Organic Frameworks for Clean Energy Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (25), 8875–8883.
- (367) Doonan, C. J.; Tranchemontagne, D. J.; Glover, T. G.; Hunt, J. R.; Yaghi, O. M. Exceptional Ammonia Uptake by a Covalent Organic Framework. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (3), 235–238.
-

-
- (368) Yu, J.-T.; Chen, Z.; Sun, J.; Huang, Z.-T.; Zheng, Q.-Y. Cyclotricatechylene Based Porous Crystalline Material: Synthesis and Applications in Gas Storage. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (12), 5369–5373.
- (369) Zeng, Y.; Zou, R.; Zhao, Y. Covalent Organic Frameworks for CO₂ Capture. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (15), 2855–2873.
- (370) Ma, D.; Wang, Y.; Liu, A.; Li, S.; Lu, C.; Chen, C. Covalent Organic Frameworks: Promising Materials as Heterogeneous Catalysts for C-C Bond Formations. *Catalysts* **2018**, *8* (9), 404–439.
- (371) Wan, S.; Guo, J.; Kim, J.; Ihee, H.; Jiang, D. A Belt-Shaped, Blue Luminescent, and Semiconducting Covalent Organic Framework. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (46), 8958–8962.
- (372) Dogru, M.; Handloser, M.; Auras, F.; Kunz, T.; Medina, D.; Hartschuh, A.; Knochel, P.; Bein, T. A Photoconductive Thienothiophene-Based Covalent Organic Framework Showing Charge Transfer Towards Included Fullerene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (10), 2920–2924.
- (373) Ding, X.; Guo, J.; Feng, X.; Honsho, Y.; Guo, J.; Seki, S.; Maitarad, P.; Saeki, A.; Nagase, S.; Jiang, D. Synthesis of Metallophthalocyanine Covalent Organic Frameworks That Exhibit High Carrier Mobility and Photoconductivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (6), 1289–1293.
- (374) Feng, X.; Ding, X.; Jiang, D. Covalent Organic Frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 6010–6022.
- (375) Zhao, W.; Xia, L.; Liu, X. Covalent Organic Frameworks (COFs): Perspectives of Industrialization. *CrystEngComm* **2018**, *20* (12), 1613–1634.
- (376) Ding, S.-Y.; Wang, W. Covalent Organic Frameworks (COFs): From Design to Applications. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (2), 548–568.
- (377) Côté, A. P.; El-Kaderi, H. M.; Furukawa, H.; Hunt, J. R.; Yaghi, O. M. Reticular Synthesis of Microporous and Mesoporous 2D Covalent Organic Frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (43), 12914–12915.
- (378) Kobayashi, H.; Amaike, M.; Koumoto, K.; Shinkai, S. Organization of Nucleosides Supported by Boronic-Acid-Appended Poly(L-Lysine): Creation of a Novel RNA Mimic. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74* (7), 1311–1317.
-

- (379) Nishiyabu, R.; Kubo, Y.; James, T. D.; Fossey, J. S. Boronic Acid Building Blocks: Tools for Sensing and Separation. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (4), 1106–1123.
- (380) Okutucu, B.; Vurmaz, D.; Tuncal, A.; Türkcan, C.; Aktaş Uygun, D.; Akgöl, S. Boronate Affinity Nanoparticles for Nucleoside Separation. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, 44 (1), 322–327.
- (381) Elmas, B.; Onur, M. A.; Şenel, S.; Tuncel, A. Thermosensitive N-Isopropylacrylamide-Vinylphenyl Boronic Acid Copolymer Latex Particles for Nucleotide Isolation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, 232 (2–3), 253–259.
- (382) Çiçek, H. Nucleotide Isolation by Boronic Acid Functionalized Hydrogel Beads. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, 20 (3), 245–257.
- (383) Guan, Y.; Zhang, Y. Boronic Acid-Containing Hydrogels: Synthesis and Their Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (20), 8106–8121.
- (384) Marozas, I. A.; Anseth, K. S.; Cooper-White, J. J. Adaptable Boronate Ester Hydrogels with Tunable Viscoelastic Spectra to Probe Timescale Dependent Mechanotransduction. *Biomaterials* **2019**, 223, 119430–119442.
- (385) Tang, S.; Ma, H.; Tu, H.-C.; Wang, H.-R.; Lin, P.-C.; Anseth, K. S. Adaptable Fast Relaxing Boronate-Based Hydrogels for Probing Cell–Matrix Interactions. *Adv. Sci.* **2018**, 5 (9), 1800638–1800646.
- (386) Li, Y.; Zhang, Z.; Liu, B.; Liu, J. Adsorption of DNA Oligonucleotides by Boronic Acid-Functionalized Hydrogel Nanoparticles. *Langmuir* **2019**, 35 (42), 13727–13734.
- (387) Smithmyer, M. E.; Deng, C. C.; Cassel, S. E.; LeValley, P. J.; Sumerlin, B. S.; Kloxin, A. M. Self-Healing Boronic Acid-Based Hydrogels for 3D Co-Cultures SI. *ACS Macro Lett.* **2018**, 7 (9), 1105–1110.
- (388) Sarkar, K.; Dastidar, P. Supramolecular Hydrogel Derived from a C₃-Symmetric Boronic Acid Derivative for Stimuli-Responsive Release of Insulin and Doxorubicin. *Langmuir* **2018**, 34 (2), 685–692.

- (389) Norrild, J. C.; Eggert, H. Evidence for Mono- and Bidentate Boronate Complexes of Glucose in the Furanose Form. Application of $^1\text{J}_{\text{C-C}}$ Coupling Constants as a Structural Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (5), 1479–1484.
- (390) Someya, H.; Itoh, T.; Aoki, S. Synthesis of Disaccharide Nucleosides Utilizing the Temporary Protection of the 2',3'-Cis-Diol of Ribonucleosides by a Boronic Ester. *Molecules* **2017**, *22* (10), 1650–1671.
- (391) Nöth, H.; Wrackmeyer, B. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Boron Compounds*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1978.
- (392) Morris, K. F.; Johnson, C. S. Diffusion-Ordered Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (8), 3139–3141.
- (393) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (1), 288–292.
- (394) Agarwal, N.; Nair, M. S.; Mazumder, A.; Poluri, K. M. Characterization of Nanomaterials Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Characterization of Nanomaterials*; Elsevier, 2018; pp 61–102.
- (395) Johnson, C. S. Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34* (3–4), 203–256.
- (396) Cobas, J.; Groves, P.; Martin-Pastor, M.; Capua, A. New Applications, Processing Methods and Pulse Sequences Using Diffusion NMR. *Curr. Anal. Chem.* **2005**, *1* (3), 289–305.
- (397) Pagès, G.; Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M. Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance Measurements (PFG NMR) for Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) Mapping. *The Analyst* **2017**, *142* (20), 3771–3796.
- (398) Gilard, V.; Trefi, S.; Balayssac, S.; Delsuc, M.-A.; Gostan, T.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Prigent, Y.; Taulelle, F. DOSY NMR for Drug Analysis. In *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*; Elsevier, 2008; pp 269–289.
- (399) Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **1905**, *322* (8), 549–560.

- (400) Einstein, A. Elementare Theorie der Brownschen Bewegung. *Z. Für Elektrotechnik Elektrochem.* **1908**, *14* (17), 235–239.
- (401) Waldeck, A. R.; Kuchel, P. W.; Lennon, A. J.; Chapman, B. E. NMR Diffusion Measurements to Characterise Membrane Transport and Solute Binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30* (1–2), 39–68.
- (402) Smietana, M.; Kool, E. T. Efficient and Simple Solid-Phase Synthesis of Short Cyclic Oligodeoxynucleotides Bearing a Phosphorothioate Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (19), 3704–3707.
- (403) Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; de Leeuw, H. P. M.; Altona, C. The Relationship between Proton-Proton NMR Coupling Constants and Substituent Electronegativities. II—Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides in Solution Using a Generalized Karplus Equation. *Org. Magn. Reson.* **1981**, *15* (1), 43–52.
- (404) Marino, J. P.; Schwalbe, H.; Griesinger, C. *J* -Coupling Restraints in RNA Structure Determination. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32* (7), 614–623.
- (405) Blackburn, B. J.; Grey, A. A.; Smith, I. C. P.; Hruska, F. E. Determination of the Molecular Conformation of Uridine in Aqueous Solution by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. Comparison with β -Pseudouridine. *Can. J. Chem.* **1970**, *48* (18), 2866–2870.
- (406) de Kok, A. J.; Romers, C.; de Leeuw, H. P. M.; Altona, C.; van Boom, J. H. Crystal Structure and Molecular Conformation of 2',3'-O-Methoxymethylneuridine: X-Ray and Nuclear Magnetic Resonance Investigation. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1977**, No. 4, 487–493.
- (407) Geraldes, C. F. G. C.; Williams, R. J. P. Conformational Studies of Some 2':3'-Cyclic Mononucleotides in Solution by Different Nuclear-Magnetic-Resonance Methods. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85* (2), 471–478.
- (408) Davies, D. B.; Sadikot, H. Interdependence of Ring Conformations of 2',3'-Cyclic Mononucleotides by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1983**, No. 8, 1251–1258.
- (409) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer advanced texts in chemistry; Springer-Verlag: New York, 1984.

- (410) Wang, C.; Hao, M.; Qi, Q.; Dang, J.; Dong, X.; Lv, S.; Xiong, L.; Gao, H.; Jia, G.; Chen, Y.; Hartig, J. S.; Li, C. Highly Efficient Cyclic Dinucleotide Based Artificial Metalloribozymes for Enantioselective Friedel–Crafts Reactions in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (9), 3444–3449.
- (411) Ono, A.; Togashi, H. Highly Selective Oligonucleotide-Based Sensor for Mercury(II) in Aqueous Solutions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (33), 4300–4302.
- (412) Buncel, E.; Boone, C.; Joly, H.; Kumar, R.; Norris, A. R. Metal Ion-Biomolecule Interactions. XII. ¹H and ¹³C NMR Evidence for the Preferred Reaction of Thymidine Over Guanosine in Exchange and Competition Reactions with Mercury(II) and Methylmercury(II). *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *25*, 61–73.
- (413) Xu, Y.; Kool, E. T. High Sequence Fidelity in a Non-Enzymatic DNA Autoligation Reaction. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (3), 875–881.
- (414) Sando, S.; Kool, E. T. Nonenzymatic DNA Ligation in Escherichia Coli Cells. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2002**, *2* (1), 121–122.
- (415) Xu, Y.; Karalkar, N. B.; Kool, E. T. Nonenzymatic Autoligation in Direct Three-Color Detection of RNA and DNA Point Mutations. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (2), 148–152.
- (416) Engelhart, A. E.; Cafferty, B. J.; Okafor, C. D.; Chen, M. C.; Williams, L. D.; Lynn, D. G.; Hud, N. V. Nonenzymatic Ligation of DNA with a Reversible Step and a Final Linkage That Can Be Used in PCR. *ChemBioChem* **2012**, *13* (8), 1121–1124.
- (417) Gartner, Z. J.; Kanan, M. W.; Liu, D. R. Expanding the Reaction Scope of DNA-Templated Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (10), 1796–1800.
- (418) Li, X.; Liu, D. R. Stereoselectivity in DNA-Templated Organic Synthesis and Its Origins. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (34), 10188–10189.
- (419) O’Reilly, R. K.; Turberfield, A. J.; Wilks, T. R. The Evolution of DNA-Templated Synthesis as a Tool for Materials Discovery. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (10), 2496–2509.
- (420) Brudno, Y.; Liu, D. R. Recent Progress Toward the Templated Synthesis and Directed Evolution of Sequence-Defined Synthetic Polymers. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (3), 265–276.

- (421) Li, T.; Nicolaou, K. C. Chemical Self-Replication of Palindromic Duplex DNA. *Nature* **1994**, *369* (6477), 218–221.
- (422) Sosson, M.; Pfeffer, D.; Richert, C. Enzyme-Free Ligation of Dimers and Trimers to RNA Primers. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (8), 3836–3845.
- (423) Pino, S.; Ciciriello, F.; Costanzo, G.; Di Mauro, E. Nonenzymatic RNA Ligation in Water. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (52), 36494–36503.
- (424) Staroseletz, Y.; Nechaev, S.; Bichenkova, E.; Bryce, R. A.; Watson, C.; Vlassov, V.; Zenkova, M. Non-Enzymatic Recombination of RNA: Ligation in Loops. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2018**, *1862* (3), 705–725.
- (425) Li, X.; Liu, D. R. DNA-Templated Organic Synthesis: Nature's Strategy for Controlling Chemical Reactivity Applied to Synthetic Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (37), 4848–4870.
- (426) Berger, J.; Oberhuber, M. Chemistry on Nucleic Acid Templates. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7* (10), 2581–2615.
- (427) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Click Nucleic Acid Ligation: Applications in Biology and Nanotechnology. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1258–1267.
- (428) Kumar, R.; El-Sagheer, A.; Tumpene, J.; Lincoln, P.; Wilhelmsson, L. M.; Brown, T. Template-Directed Oligonucleotide Strand Ligation, Covalent Intramolecular DNA Circularization and Catenation Using Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (21), 6859–6864.
- (429) Jentzsch, E.; Mokhir, A. A Fluorogenic, Nucleic Acid Directed "Click" Reaction. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (20), 9593–9595.
- (430) Ogasawara, S.; Fujimoto, K. High Selectivity Detection of Point Mutation by DNA Photochemical Cross-Linking. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50* (1), 173–174.
- (431) Ogasawara, S.; Fujimoto, K. SNP Genotyping by Using Photochemical Ligation. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (27), 4624–4627.
- (432) Yoshimura, Y.; Noguchi, Y.; Sato, H.; Fujimoto, K. Template-Directed DNA Photoligation in Rapid and Selective Detection of RNA Point Mutations. *ChemBioChem* **2006**, *7* (4), 598–601.

- (433) Yoshimura, Y.; Okada, H.; Ohtake, T.; Tsukaguchi, T.; Fujimoto, K. A Selective and Sensitive Detection of SNP between Rice Cultivars by Using DNA Photoligation. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53* (1), 199–200.
- (434) Nakamura, S.; Ogasawara, S.; Matuda, S.; Saito, I.; Fujimoto, K. Template Directed Reversible Photochemical Ligation of Oligodeoxynucleotides. *Molecules* **2011**, *17* (1), 163–178.
- (435) El-Sagheer, A. H.; Cheong, V. V.; Brown, T. Rapid Chemical Ligation of Oligonucleotides by the Diels–Alder Reaction. *Org Biomol Chem* **2011**, *9* (1), 232–235.
- (436) Meguellati, K.; Koripelly, G.; Ladame, S. DNA-Templated Synthesis of Trimethine Cyanine Dyes: A Versatile Fluorogenic Reaction for Sensing G-Quadruplex Formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (15), 2738–2742.
- (437) Li, D.; Wang, X.; Shi, F.; Sha, R.; Seeman, N. C.; Canary, J. W. Templated DNA Ligation with Thiol Chemistry. *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (44), 8823–8827.
- (438) Goodwin, J. T.; Lynn, D. G. Template-Directed Synthesis: Use of a Reversible Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (23), 9197–9198.
- (439) Liu, Y.; Sha, R.; Wang, R.; Ding, L.; Canary, J. W.; Seeman, N. C. 2',2'-Ligation Demonstrates the Thermal Dependence of DNA-Directed Positional Control. *Tetrahedron* **2008**, *64* (36), 8417–8422.
- (440) Gartner, Z. J.; Kanan, M. W.; Liu, D. R. Multistep Small-Molecule Synthesis Programmed by DNA Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (35), 10304–10306.
- (441) Altona, C.; Sundaralingam, M. Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides. Improved Method for the Interpretation of Proton Magnetic Resonance Coupling Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (7), 2333–2344.
- (442) Guschlbauer, W.; Jankowski, K. Nucleoside Conformation Is Determined by the Electronegativity of the Sugar Constituent. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8* (6), 1421–1433.
- (443) Campbell, M. A.; Wengel, J. Locked vs. Unlocked Nucleic Acids (LNA vs. UNA): Contrasting Structures Work towards Common Therapeutic Goals. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (12), 5680–5689.

- (444) Hirao, A.; Itsuno, S.; Nakahama, S.; Yamazaki, N. Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones with Chiral Alkoxy-Amineborane Complexes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, No. 7, 315.
- (445) Itsuno, S.; Nakano, M.; Miyazaki, K.; Masuda, H.; Ito, K.; Hirao, A.; Nakahama, S. Asymmetric Synthesis Using Chirally Modified Borohydrides. Part 3. Enantioselective Reduction of Ketones and Oxime Ethers with Reagents Prepared from Borane and Chiral Amino Alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1985**, 2039.
- (446) Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibata, S. Highly Enantioselective Borane Reduction of Ketones Catalyzed by Chiral Oxazaborolidines. Mechanism and Synthetic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (18), 5551–5553.
- (447) Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibata, S.; Chen, C. P.; Singh, V. K. A Stable and Easily Prepared Catalyst for the Enantioselective Reduction of Ketones. Applications to Multistep Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (25), 7925–7926.
- (448) Corey, E. J. Catalytic Enantioselective Diels-Alder Reactions: Methods, Mechanistic Fundamentals, Pathways, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (10), 1650–1667.
- (449) Futatsugi, K.; Yamamoto, H. Oxazaborolidine-Derived Lewis Acid Assisted Lewis Acid as a Moisture-Tolerant Catalyst for Enantioselective Diels-Alder Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (10), 1484–1487.
- (450) Wang, X.; Adachi, S.; Iwai, H.; Takatsuki, H.; Fujita, K.; Kubo, M.; Oku, A.; Harada, T. Enantioselective Lewis Acid-Catalyzed Mukaiyama–Michael Reactions of Acyclic Enones. Catalysis by *α*-Llo-Threonine-Derived Oxazaborolidinones. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (26), 10046–10057.
- (451) Corey, E. J.; Helal, C. J. Reduction of Carbonyl Compounds with Chiral Oxazaborolidine Catalysts: A New Paradigm for Enantioselective Catalysis and a Powerful New Synthetic Method. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (15), 1986–2012.
- (452) Cho, B. T. Recent Advances in the Synthetic Applications of the Oxazaborolidine-Mediated Asymmetric Reduction. *Tetrahedron* **2006**, *62* (33), 7621–7643.
- (453) Corey, E. J. Enantioselective Catalysis Based on Cationic Oxazaborolidines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (12), 2100–2117.

- (454) Kawanami, Y.; Yanagita, R. C. Practical Enantioselective Reduction of Ketones Using Oxazaborolidine Catalysts Generated In Situ from Chiral Lactam Alcohols. *Molecules* **2018**, *23*, 2408–2422.
- (455) Nevalainen, V.; Uggla, R.; Sundberg, M. R. A New Class of Oxazaborolidine Derivatives Discovered. Ketones and Aldehydes as Bidentate Ligands. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6* (6), 1431–1440.
- (456) Jabbour, A.; Steinberg, D.; Dembitsky, V. M.; Moussaieff, A.; Zaks, B.; Srebnik, M. Synthesis and Evaluation of Oxazaborolidines for Antibacterial Activity against *Streptococcus Mutans*. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (10), 2409–2410.
- (457) Aharoni, R.; Bronstheyn, M.; Jabbour, A.; Zaks, B.; Srebnik, M.; Steinberg, D. Oxazaborolidine Derivatives Inducing Autoinducer-2 Signal Transduction in *Vibrio Harveyi*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (4), 1596–1604.
- (458) Dobrydneva, Y.; Abelt, C. J.; Dovel, B.; Thadigiri, C. M.; Williams, R. L.; Blackmore, P. F. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate as a Prototype Drug for a Group of Structurally Related Calcium Channel Blockers in Human Platelets. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69* (1), 247–256.
- (459) Guschlbauer, W.; Jankowski, K. Nucleoside Conformation Is Determined by the Electronegativity of the Sugar Substituent. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8* (6), 1421–1433.
- (460) Azhayev, A. V.; Ozols, A. M.; Bushnev, A. S.; Dyatkina, N. B.; Kochetkova, S. V.; Victorova, L. S.; Kukhanova, M. K.; Krayevsky, A. A.; Gottikh, B. P. Aminonucleosides and Their Derivatices. IV. Synthesis of the 3'-Amino-3'-Deoxynucleoside 5'-Phosphates. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6* (2), 625–643.
- (461) Plach, H.; Westhof, E.; Ludemann, H.-D.; Mengel, R. Solution Conformational Analysis of 2'-Amino-2'-Deoxyadenosine, 3'-Amino-3'-Deoxyadenosine and Puromycin by Pulsed Nuclear-Magnetic-Resonance Methods. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80* (1), 295–304.
- (462) Holz, M.; Weingartner, H. Calibration in Accurate Spin-Echo Self-Diffusion Measurements Using ¹H and Less-Common Nuclei. *J. Magn. Reson.* **1991**, *92* (1), 115–125.
- (463) Ohgi, T.; Kondo, T.; Goto, T. Total Synthesis of Nucleoside Q. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18* (46), 4051–4054.

Bibliographie

- (464) Miller, G. P.; Kool, E. T. A Simple Method for Electrophilic Functionalization of DNA. *Org. Lett.* **2002**, 4 (21), 3599–3601.

Annexes

SURVEY AND SUMMARY

Splitting aptamers and nucleic acid enzymes for the development of advanced biosensors

Mégane Debiais¹, Amandine Lelievre², Michael Smietana^{1,*} and Sabine Müller^{2,*}

¹Institut des Biomolécules Max Mousseron, University of Montpellier, CNRS, ENCSM, Montpellier, France and

²University Greifswald, Institute for Biochemistry, Greifswald, Germany

Received December 02, 2019; Revised February 12, 2020; Editorial Decision February 13, 2020; Accepted February 18, 2020

ABSTRACT

In analogy to split-protein systems, which rely on the appropriate fragmentation of protein domains, split aptamers made of two or more short nucleic acid strands have emerged as novel tools in biosensor set-ups. The concept relies on dissecting an aptamer into a series of two or more independent fragments, able to assemble in the presence of a specific target. The stability of the assembled structure can further be enhanced by functionalities that upon folding would lead to covalent end-joining of the fragments. To date, only a few aptamers have been split successfully, and application of split aptamers in biosensing approaches remains as promising as it is challenging. Further improving the stability of split aptamer target complexes and with that the sensitivity as well as efficient working modes are important tasks. Here we review functional nucleic acid assemblies that are derived from aptamers and ribozymes/DNAzymes. We focus on the thrombin, the adenosine/ATP and the cocaine split aptamers as the three most studied DNA split systems and on split DNAzyme assemblies. Furthermore, we extend the subject into split light up RNA aptamers used as mimics of the green fluorescent protein (GFP), and split ribozymes.

INTRODUCTION

Besides the well-known roles of DNA and RNA as sources and carriers of genetic information (1,2), nucleic acid sequences are known to adopt a large variety of topologies that can be employed in bioanalytical sciences (3). After the discovery of ribozymes by the Cech and Altman laboratories (4,5), Breaker and Joyce described for the first time in 1994 that also single-stranded DNA sequences can ex-

hibit enzymatic activity (6), an attribute that is currently extensively used for sensing and nanobiotechnological applications (7–10). Similarly, since their discovery in the early 1990s, aptamers being single-stranded RNA or DNA structures with the ability of binding molecules with high affinity and specificity, have stimulated tremendous interest in biology and medicine (11,12). Aptamers can be obtained by *in vitro* selection (Figure 1A), following the classical methodology of Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), first introduced by Tuerk and Gold in 1990 (13–15). For selection of deoxyribozymes (DNAzymes) and ribozymes, the classical SELEX process needs to be extended from selection of just binders to more complex functional screening, although iterative cycles of selection and amplification are retained. DNA- or RNA-based aptamers are able to interact specifically with a large variety of targets such as small molecules, ions, enzymes or proteins employing all kinds of non-covalent interactions. The first aptamers were revealed in 1990 by Ellington and Szostak (16) and composed exclusively of RNA sequences. In 1992, Bock *et al.* introduced also DNA single-stranded aptamers (17).

The most common architecture of aptamers is the hairpin or hairpin-like structure, in which the target binding site is situated in the loop region. There are also three-way junction topologies composed of three DNA stems with the target binding site located at the branch point, as well as bulged structures with the target binding site at an internal loop (Figure 1B). Upon binding of the target molecule, most aptamers undergo a conformational change, thus following the induced fit model. In all cases, the well-defined three-dimensional structure is responsible for the observed high specificity (18,19). Easy to synthesize, aptamers display very attractive features for target recognition (20–22) with therapeutic (11,20,23), diagnostic (24) and analytical applications (25). Moreover, once selected, aptamers are easy to modify in order to increase their stability against

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 3834 4204333; Fax: +49 3834 4204471; Email: smueller@uni-greifswald.de
Correspondence may also be addressed to Michael Smietana. Tel: +33 4 67143837; Email: michael.smietana@umontpellier.fr

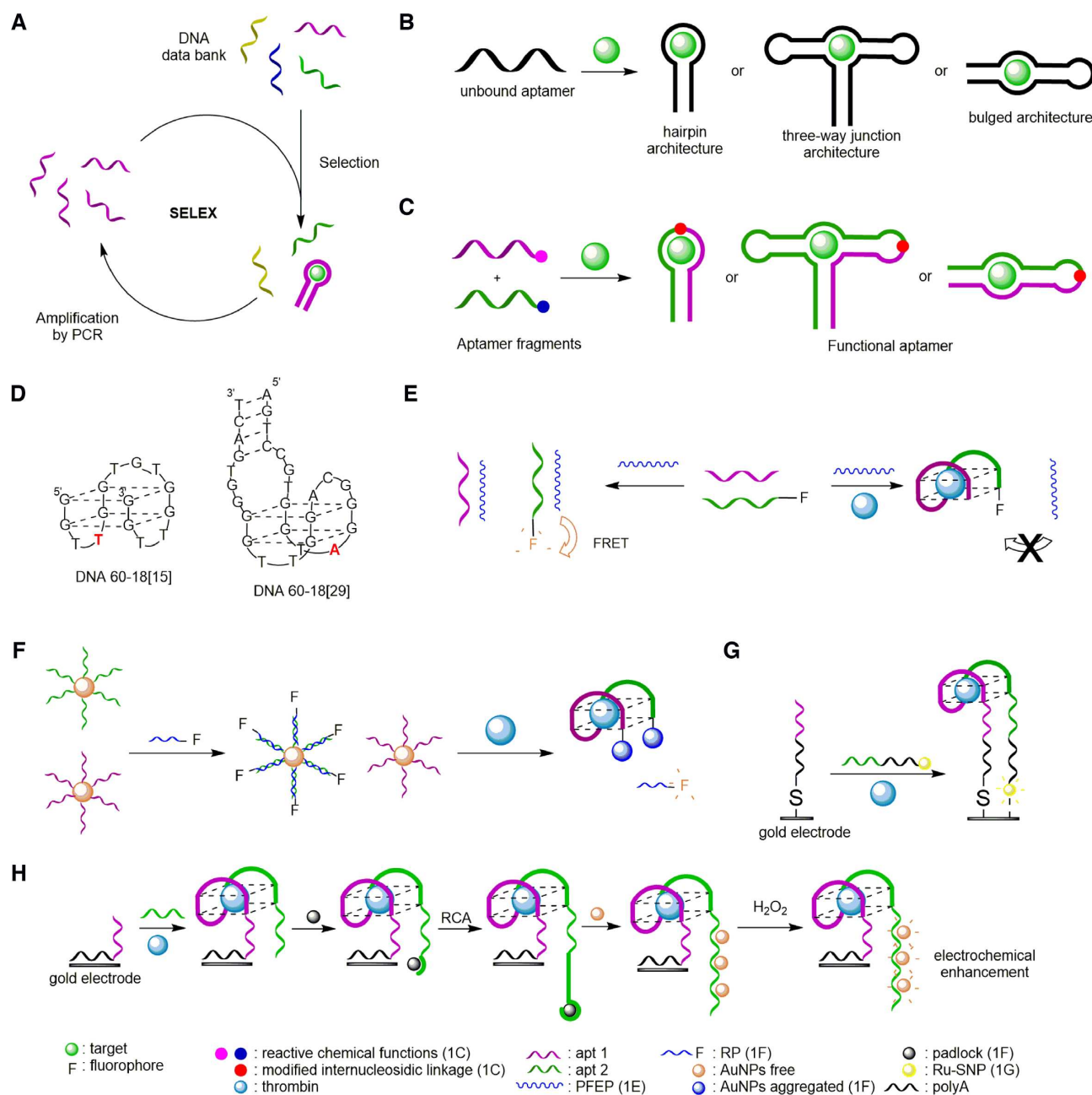


Figure 1. General concept and thrombin detection by aptamers and split aptamers. (A) *In vitro* selection of aptamers by SELEX (13–15). (B) Conformational change of aptamers in presence of the target (18). (C) General scheme of the split aptamer concept (18). (D) Three-dimensional structure of the two main DNA aptamers with the nucleotide that directs the aptamer to one of the binding sites marked in red (39, 44). (E) Thrombin detection by conjugation of two split aptamers with PFEP (50). (F) Thrombin detection by fluorimetry and colorimetry (51). (G) Thrombin detection by ECL using an Ru-SNP complex (58). (H) Thrombin detection by ECL based on RCA (59).

nucleases (26), or to conjugate with a large variety of partners (fluorescent tags, specific probes, lipophilic or cationic biomolecules, etc.) (20,27,28). Their ability to switch from a random coil to an organized conformation in the presence of a target has thus been exploited efficiently in fluorescent sensors (21,29,30). Although being very attractive, aptamers are not devoid of limitations (31). Degradation by nucleases can be limited by the incorporation of modified nucleotides, but the number of negative charges (generally from 20 to 60) hampers their intracellular delivery. In addition,

long aptamers can form unfavorable secondary structures that could interact with complex matrixes and may lead to false positive or nonspecific signals.

In analogy to split protein systems, which rely on the appropriate fragmentation of protein domains (32), split aptamers made of two or more short nucleic acid strands emerged recently to engineer systems easier to synthesize and with less negative charges per strand (33). In this concept, a defined aptamer is cut into a series of two or more independent and non-functional fragments, which are able

to assemble selectively in the presence of the target. The strong interactions between the ligand and the aptamer-based structure modify the thermodynamic equilibrium and promote the assembly of the fragments (Figure 1C). The stability of the assembled structure can be further enhanced by decorating individual strands with functionalities that upon folding would lead to covalent end-joining of the fragments. Assembly brings the two reactive functionalities in close proximity and thus allows, upon chemical activation, the formation of an additional natural or modified internucleosidic linkage. To date, within the >100 small-molecule-binding aptamers that have been discovered, only a few have been split successfully (34,35). The difficulty to design split aptamers arises from the necessary 3D structure of the parent aptamer, which can be highly perturbed if the division is made at the wrong site, like for example in a hairpin binding pocket. If the target molecule binds in the stem region, aptamers are easier to divide. As for three-way junction-based aptamers, the arms can be easily divided into short fragments, and yet preserving the interaction with the target (18).

In this review, we first focus on the three most studied DNA split aptamers obtained so far from a parent aptamer, namely the thrombin, the adenosine/ATP and the cocaine split aptamers. Then, we give some examples of split DNase-aptamer assemblies. Lastly, we extend the subject to RNA aptamers used as mimics of the green fluorescent protein (GFP), which are the split Spinach and the split Broccoli systems, and further on to split ribozymes.

HUMAN α -THROMBIN SPLIT APTAMER

Properties

Thrombin, also called coagulation factor, is a trypsin-like serine protease that plays an essential role in thrombosis and haemostasis (36,37). It exists in several forms, but only the α -thrombin seems to be physiologically important, whereas the β - and γ -thrombin are much less effective (37,38). Human α -thrombin is thus a major target for therapy of anticoagulation and cardiovascular diseases.

The first inhibitor to human thrombin, isolated by Bock *et al.* in 1992 by *in vitro* selection (17), was also the first DNA aptamer to be discovered. After five rounds of selection, 32 oligonucleotide sequences were obtained, capable of binding to thrombin. All of them were composed of 60 nucleotides of random sequence with a conserved region of 14–17 nucleotides (5'-GGNTGGN₂₋₅GGNTGG-3', N being a variable nucleotide), responsible of binding and inhibiting thrombin. The sequence 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', called **60-18[15]** (Figure 1D), was determined to have the highest thrombin affinity and inhibitory activity in the presence of potassium ions (39–41). NMR spectroscopy and X-ray crystallography studies revealed that the thrombin aptamer forms a highly compact structure, composed of an intramolecular G-quadruplex with an antiparallel orientation and a chair-like conformation (39,42).

In 1995, Macaya *et al.* reported a DNA oligonucleotide obtained by the same process with a quadruplex/duplex structure composed of the previous sequence and four to seven added base-pairs flanking the G-quadruplex motif,

which allows to considerably increase the affinity (K_d values of 10 to 25 nM versus 100 nM for **DNA60-18[15]**) (43). Then, in 1997, Tasset *et al.* reported a 29-mer DNA oligonucleotide, called **60-18[29]**, obtained by nitrocellulose filter partition, having a minimal sequence of 5'-NNNCCGTGGTAGGGNAGG^A/TGGGGGTGN^NN^N-3', where N and N' are complementary variable nucleotides, and a K_d value of 0.5 nM (44). This aptamer has also a quadruplex/duplex structure (Figure 1D) but is potassium-independent and, in contrast to previously reported aptamers that interact with the fibrinogen-recognition exosite (FRE), binds to the electropositive heparin-binding exosite. This change of binding site was attributed to the orientation of the G-quadruplex and its fourth nucleotide (red residue in Figure 1D), determining the selectivity of the binding site to the aptamer (44–46).

Fluorescent biosensor

Highly sensitive aptamer-based fluorescent sensors for thrombin have been widely described (47–49). In order to develop more specific biosensors, aptamers were replaced by split aptamer fragments, that are shorter, less secondary structured, and conjugated with different molecules to amplify the signal. Thus, in 2014, Liu *et al.* designed a new fluorescence-based strategy by using a water-soluble polycationic polymer, (poly{[9,9-bis(6'-(*N,N,N*-diethylmethylammonium)hexyl)-2,7-fluorenylene ethynylene]-alt-co-[2,5-bis(3'-(*N,N,N*-diethylmethylammonium)-1'-oxapropyl)-1,4-phenylene]} tetraiodide, PFEP), having a high fluorescence emission, and two fragments of the 15-mer thrombin binding DNA aptamer, one of them being labelled with fluorescein (Figure 1E) (50). In the absence of thrombin, the two fragments bind to the polymer *via* strong electrostatic interactions and lead to an intense Förster resonance energy transfer (FRET) phenomenon. However, the presence of thrombin triggers the formation of the G-quadruplex structure that decreases the interaction between the polymer and the fluorophore and results in a significant reduction of the FRET signal. Compared with the full-length aptamer, this split aptamer-based sensing strategy is isothermal and increases the possibility of forming the G-quadruplex upon thrombin addition, and thus the sensitivity (LOD = 2 nM). A similar approach using identical split aptamer fragments adsorbed on graphene oxide (GO) (51) took advantage of the ability of GO to adsorb single-stranded DNA and of GO fluorescence-quenching properties associated with high electronic and thermal conductivities (52,53). In the absence of thrombin the two fragments are adsorbed on GO *via* non-covalent π - π stacking interactions, resulting in quenching of the fluorescence. Addition of thrombin triggers the formation of the G-quadruplex structure and restores the fluorescence with a sensitivity in the nanomolar range (LOD = 1 nM) that could not be achieved with the intact aptamer.

More recently, a highly selective and sensitive method that combines fluorimetry and colorimetry has been developed (54). The strategy uses two fragments of the thrombin aptamer anchored on gold nanoparticles (AuNPs) by polyadenosine (polyA) DNA extensions (Figure 1F). One of the

fragments is caged in a duplex with a complementary strand containing a fluorescent reporter probe (RP). In the absence of thrombin, the hybridization of RP with its complementary split aptamer fragment leads to quenching of the fluorophore by the AuNPs (55). At the same time, owing to the high electrostatic repulsion, AuNPs cannot aggregate, mirrored in a wine red color of the solution. The presence of thrombin triggers the formation of the G-quadruplex structure and the aggregation of AuNPs, while simultaneously releasing the RP. This is monitored by a change of color of the solution from wine red to blue (LOD = 0.45 nM) and by a fluorescence increase of the RP (LOD = 0.16 nM). Interestingly, this dual mode detection strategy can discriminate thrombin from other analogues in human serum samples.

Electrochemiluminescent biosensor

Electrochemiluminescence (ECL) is a process that can emit light when species generated at the surface of electrodes undergo high-energy electron-transfer. ECL has received increasing attention in biomolecule analysis due to its efficiency, high sensitivity and wide linear range. Ru(bpy)₃²⁺ is the most used ECL reagent and has been employed in conjunction with silica nanoparticles to develop an aptamer-based ECL sensor for thrombin detection (Ru-SNPs) (56–58). An illustration is given by the work of Lin *et al.*, who split the 15-nucleotide thrombin aptamer into two different fragments: the first fragment was modified with an alkanethiol at its 5'-extremity and immobilized on a gold electrode, and the second one was coupled with Ru-SNPs at the 3'-extremity *via* an amide link (58). In the absence of thrombin the two fragments are dissociated resulting in a weak ECL signal whereas addition of thrombin triggers the formation of the G-quadruplex structure and provokes the attachment of Ru-SNPs onto the electrode surface, an event that can be monitored by ECL measurements (Figure 1G). Apart from being highly sensitive (LOD = 0.2 pM), the method explores new sensing strategies of split aptamer fragments.

Electrochemical detection

Electrochemical aptasensors based on split systems have also been described. Recently, the Fan laboratory developed a novel electrochemical label-free strategy for thrombin detection (59). The concept was based on the well-known affinity of polyA for gold nanoparticles (55,60,61). The authors exploited these polyA-Au interactions by designing a split system from the above-mentioned 15-mer DNA sequence (17). Using a polyA sequence as an anchoring block allowed the immobilization of the first fragment on a gold electrode surface *via* polyA-Au interactions (Figure 1H). The second fragment was also extended by a short sequence containing several adenosine residues. The addition of thrombin and the second split aptamer fragment promoted the formation of the G-quadruplex structure, and the extended part of the second fragment was then, upon addition of a padlock probe, subjected to rolling circle amplification (RCA), leading to long DNA sequences containing repeating A₆ sequences. AuNPs were then added and adsorbed on the surface of the aptasensor by polyA-

AuNPs interactions. Finally, upon addition of H₂O₂, electrocatalytic reduction of the AuNPs was monitored. This aptasensor showed high selectivity and remarkable sensitivity with a LOD of 35 fM in a linear detection range from 0.1 pM to 10 nM, and it was demonstrated to be as efficient as commercial ELISA assays on real sample analysis.

ADENOSINE AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE SPLIT APTAMER

Properties

Adenosine triphosphate (ATP), discovered in parallel by Lohmann, Fiske and Subbarow in 1929 (62,63), is implied in many biological and cell signalling processes. ATP dysregulations are associated with various disorders, which renders its detection particularly important. The first ATP-aptamer was isolated by Sassanfar and Szostak in 1993 by *in vitro* selection and consisted of a 40-mer RNA having a 11-nucleotides loop sequence and a *K_d* of 0.7–8 μM, depending on the specific salt and Mg²⁺ concentrations (Figure 2A) (64). A couple of years later, Szostak and Huizenga isolated and characterized a 25-nucleotides long DNA aptamer for adenosine and ATP composed of two stacked G-quartets, with a *K_d* of 6 μM (Figure 2A) (33). Although not defining it as a split system, the authors showed that the aptamer could be divided into two fragments by removing the loop that closes stem 2 and by extending each fragment with additional nucleotides to compensate the loss of stability. Neither of these fragments could bind ATP or adenosine alone, but when hybridized, target binding was reactivated (Figure 2A). To the best of our knowledge, this article reports the very first experiment in the field of split aptamers, although no LOD was reported at that time.

Fluorescent biosensor

The adenosine DNA aptamer was cut into two halves to develop a label-free method for selective detection of adenosine. A 21 nucleotides homo dA sequence was added to the first fragment to serve as a template for Klenow fragment polymerase (KF polymerase, Figure 2B) (65). Moreover, both fragments were slightly modified at their extremities to have complementary sequences, which however, are too short to be annealed at ambient temperature. SYBR Green I was selected for its ability to exhibit high fluorescence enhancement upon binding to dsDNA. When mixed together, both fragments do not form a sufficiently stable initiation complex for Klenow polymerization, and thus are rapidly digested by the exonuclease activity of KF polymerase. Hence, no dsDNA is available for SYBR Green binding and the fluorescence intensity response is very low. When adenosine is present, reassembly of the two ssDNA fragments is supported by adenosine binding, thus generating a primer-template complex for the DNA polymerase reaction that leads to the formation of a duplex DNA structure and a strong increase of the dye's emission intensity with a LOD of 12 μM. Although the detection limit is the same as found for the full-length aptamer-based adenosine sensors, the method presents the advantage of avoiding fragment labeling.

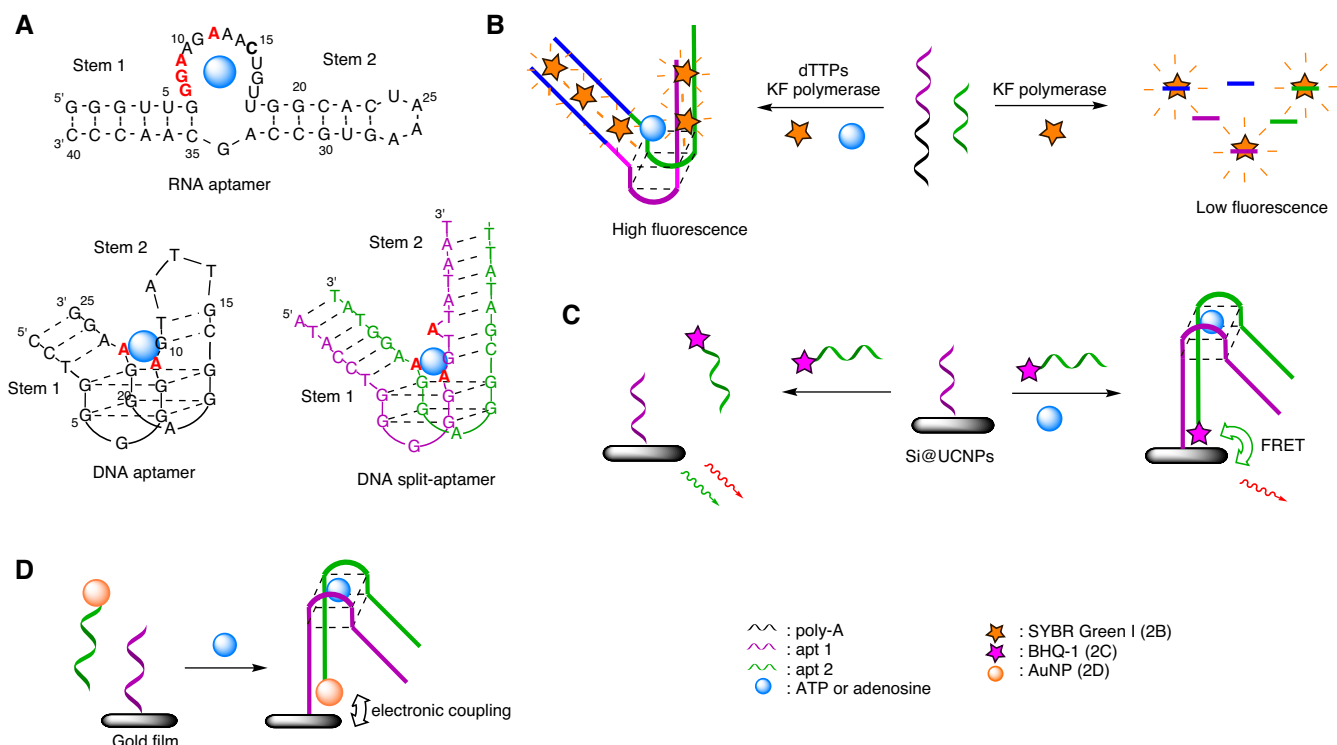


Figure 2. ATP and adenosine detection by aptamers and split aptamers. (A) RNA and DNA aptamers and DNA split aptamer (33,64). (B) Label-free method with KF polymerase and SYBR Green I for split aptamer based adenosine detection (65). (C) ATP detection by sandwich-FRET assay (66). (D) Adenosine detection by SPR with AuNPs (82).

He *et al.* used a sandwich-type FRET assay to increase the selectivity by conjugating one of the aptamer fragments to the dye BHQ-1, and the other to upconverting nanoparticles containing a silica coating (Si@UCNPs) that is used as an energy donor (Figure 2C) (66). In the absence of the target molecule, red and green fluorescence of the Si@UCNPs is observed, whereas addition of ATP triggers the formation of a sandwich complex allowing FRET between the Si@UCNPs and the BHQ-1, and therefore quenching of the green fluorescence. Moreover, this system allows to discriminate ATP from its CTP, UTP and GTP analogues with a LOD of 1.7 μM .

More recently, an ATP split aptamer platform was designed for the detection of adenosine deaminase activity *via* FRET from AuNPs and gold nanoclusters-linked aptamer fragments (67). The enzymatic activity was monitored by the transformation of ATP into inosine triphosphate (which has no affinity to the aptamer) with a LOD of 0.72 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, which compares favorably to other reported techniques (68).

The ATP aptamer was also split into two fragments labelled with pyrenes and evaluated in the presence of γ -cyclodextrin (γ -CD) that served as a space modulator (69). The system allows to detect ATP within a linear range from 5.0 to 50 μM and a LOD of 80 nM in buffer solution, and 0.5 μM in blood serum. More recently, Zhang *et al.* developed an ultrasensitive ATP detection method based on dual-color fluorescence co-localization of split aptamers (70). According to the previously reported design (69) the two fragments were labelled with Cy3 and Cy5, respectively.

The Cy3 labelled sequence was immobilized onto a surface through specific streptavidin/biotin interactions, whereas the Cy5 labelled fragment was free in solution. Upon addition of ATP the aptamer target complex is formed and the two strands become co-localized, which is mirrored in dual-color fluorescence. This assay can detect ATP in a linear range from 1 pM to 5 nM with a LOD of 100 fM. By distinguishing the kinetic signature of the fragments, the strategy avoids false positive detection and significantly increases the sensitivity as compared to previously reported methods. Given the interest of this type of systems, many recent studies report new designs of split aptamers able to detect ATP or adenosine by fluorescence (71–74).

Sandwich assays and surface plasmon resonance (SPR)

A method widely used for studying biomolecular interactions is SPR spectroscopy that allows to detect refractive index (RI) changes on the surface of metal nanoparticles when the ligand binds to the receptor (75–77). This phenomenon is characterized by a specific absorption band, which is shifted as a function of the dielectric environment on the nanoparticle surface. However, while this label-free and real-time technique is very useful, it is challenging to apply the method to small molecules, because the signal is proportional to a change of molecular weight. Still, the method has been applied for sensing adenosine and/or ATP. A thermodynamic aptasensor was developed, in which the two fragments are grafted on the surfaces of the SPR sensor and AuNPs, respectively. The hybridization of the two

sequences and the determination of their melting temperature was monitored by a home-made thermo-regulated SPR chamber. In the presence of adenosine, the aptamer/target complex is formed, leading to an increase of the melting-temperature, which was found to be dependent on adenosine concentration (78). Thanks to the signal amplification provided by the AuNP functionalization, this approach enabled to reach a LOD 200 times lower than with the native aptamer (LOD = 30 nM versus 6 μ M). Compared to fluorescence-based biosensors, SPR biosensors do not require fluorescent labels, which can limit the background signal and are prone to bleaching. These advantages are illustrated by many recent reports dealing with SPR-based split aptamer biosensors (79–81).

Combination of SPR and nanoparticles allowed the development of a high-sensitive aptasensor for adenosine based on split aptamer fragments. This approach is illustrated by the study of Wang *et al.*, in which one fragment is immobilized at its 5'-terminus on a gold film, whereas the second fragment is conjugated to AuNPs (Figure 2D) (82). In the absence of adenosine, the two fragments are not able to form a stable duplex, and no resonance wavelength shift could be monitored. However, in presence of the target, the two single-strands assemble to form the adenosine-aptamer complex on the Au film, thus leading to a shift of the resonance wavelength. The LOD of this SPR biosensor was determined as 1.5 pM.

COCAINE SPLIT APTAMER

Properties

The cocaine aptamer, discovered by Stojanovic *et al.* in the late 1990s (83), has been widely studied (35,84). This aptamer with a three-way junction architecture is composed of three helical parts. Stems 1 and 3 consist of six and four base pairs, respectively, including two noncanonical pairs, and stem 2 consists of five Watson–Crick base pairs (Figure 3A). Stem 2 is always double-stranded, while stems 1 and 3, which are in equilibrium between the single-stranded and double-stranded state, form a stable duplex only in the presence of cocaine at concentrations in the range of 10 μ M to 1 mM (83,85). Studies were carried out to determine the optimal conditions for maximizing the affinity between the aptamer and the target. It appears that a pH value of 7.4 is necessary to simultaneously have the tertiary amine of the cocaine protonated and the phosphate backbone of the DNA deprotonated, which allows to considerably increase electrostatic interactions between the two entities. Three base pairs, namely G31/C6, G29/A21 and T19/A7, are indispensable for cocaine binding, because they directly interact with the target and are important for formation of the required secondary structure.

A simple method to monitor aptamer folding in the presence of cocaine is to functionalize the aptamer with a fluorophore and a quencher at its 5'- and 3'- extremities, respectively. In the presence of the target, the 5'- and 3'-end of the aptamer are brought in close proximity, leading to quenching of the fluorescence (LOD = 1 μ M) (83,86–88). Other fluorescence-based systems have been described recently (89,90), and the different conformations have been

studied by NMR or ITC (86,91,92). Another method to analyze cocaine binding is to divide the aptamer into two strands and to functionalize the fragments with fluorescent tags (83). Amplification strategies (93), electrochemical sandwich assays (94) and nanoparticles (95,96) were also developed for the detection of cocaine at low concentration. Since cocaine binds at the junction of the three helices, the construction of a split aptamer architecture is feasible by dividing the aptamer in the loop region of stem 2, where interactions between the two resulting strands and the small molecule will be less influenced.

Click-chemistry

DNA can be used as a template to guide and promote chemical reactions owing to the Watson–Crick interaction of two strands that allows to bring the two reagents closer, increasing the effective molarity of the reactants and facilitate the reaction. Because of its biocompatible reaction conditions (efficient in aqueous media, rapid, high yielding and inoffensive by-products) (97) azide–alkyne cycloaddition (click chemistry) has been frequently applied to nucleic acid structures for applications in biology, nanotechnology or material sciences (98).

In most cases, the DNA-templated reaction is directed by the association between the two strands according to Watson–Crick affinity (99) but, in 2011, Heemstra and Sharma showed that the DNA-templated reaction can be controlled by small-molecule binding (100). To achieve this control, they split the cocaine aptamer at the loop region of stem 2 and modified one strand at its 3'-extremity with an azide, and the other at its 5'-extremity with a cycloalkyne. In the presence of cocaine, the two strands are brought together and the copper-free azide–alkyne cycloaddition can proceed, allowing to block the system in this conformation, in contrast to previous systems that are reversible (LOD = 1 μ M–1 mM) (Figure 3B). Successful click reaction has been visualized by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using the Cy3 fluorophore at the 5'-end of the clicked aptamer for detection. Selectivity of the split aptamer ligation was studied by replacing cocaine with similar metabolites. The results showed a decreased binding capacity of all tested metabolites, except norcocaine, which has the most similar structure to cocaine. This result confirms earlier studies with the complete aptamer (101), showing that the methyl ester and the benzoyl group of cocaine are essential for recognition and binding, whereas the methyl group of the bridging nitrogen seems to be less important. In general, background click ligation independent of the ligand was found to take place to a significant extent, and therefore reductive amination was explored as an alternative chemistry. Using a 5'-amino and a 3'-aldehyde substrate allowed to detect cocaine at concentrations as low as 1 μ M and quinine and quinidine down to 100 nM (Figure 3C) (102).

The DNA-templated reaction assisted by cocaine was used in a DNA-based analogue of the well-known sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), applicable to small-molecule detection (103). First, the capture strand modified by an azide at the 5'-end and an amine at the 3'-end

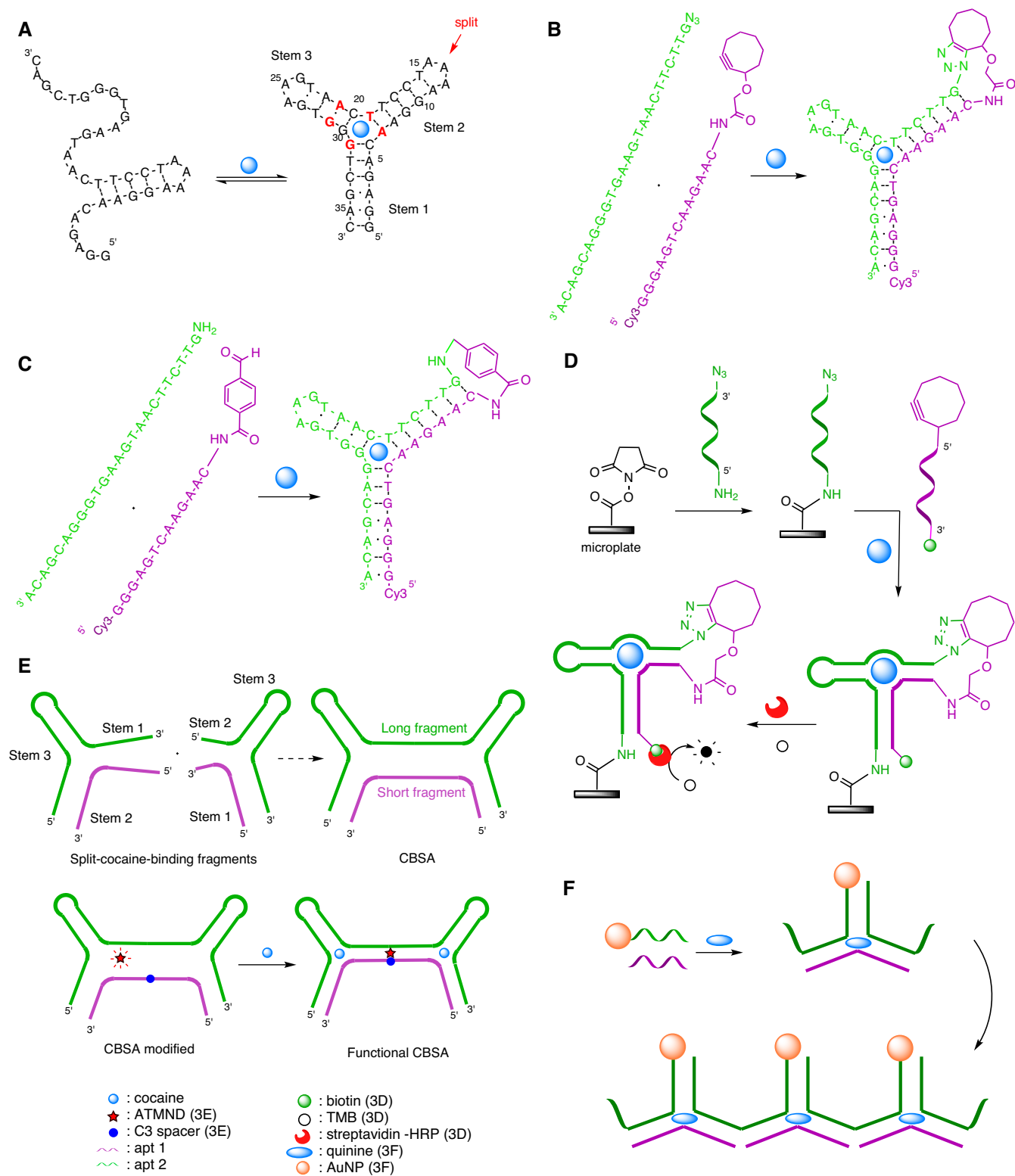


Figure 3. Cocaine detection by its aptamer and split aptamers. (A) Proposed secondary structure of the cocaine aptamer with nucleotides essential for cocaine binding marked in red, and the splitting position indicated by a red arrow (83). (B) DNA-templated click reaction controlled by cocaine binding (100). (C) DNA-templated reductive amination controlled by cocaine binding (102). (D) DNA-based analogue of ELISA for cocaine detection (103). (E) Design and modification of the CBSA by a C3 spacer to detect cocaine by formation of a functional CBSA (104). (F) Aptachain formation triggered by quinine (109).

reacts with a *N*-hydroxysuccinimide covered microplate to form an amide link (Figure 3D). Then, the detection strand modified at the 3'-end by a cyclooctyne and at the 5'-end by a biotin is added in the presence of cocaine to generate the split aptamer structure that will trigger ligation. Finally, a conjugate constituted of streptavidin and horse radish peroxidase (HRP) is added to bind to biotin and subsequently allows reaction with tetramethylbenzidine (TMB), resulting in a blue colored product. In this set-up, the detection of cocaine is sensitive (LOD = 1 μ M) and easy, but the response was fivefold slower than observed in previous studies, where a strong dose-dependent ligation was obtained after 4 h (100). This observation may be explained by the attachment of the azide containing strand to the microplate, which presumably makes the azide less accessible. By replacing the aryl-less cyclooctyne (ALO) with dibenzoazacyclooctyne (DIBAC), known to be 240-fold more reactive, the reaction becomes faster. As mentioned above, in the original version, ligation was observed also in the absence of the small-molecule target, thus it appeared necessary to replace a GC base pair in stem 2 with a CC mismatch, and a GT wobble pair in stem 3 with a GC base pair, to decrease the affinity between the two strands. Moreover, by adding a linker between the microplate and the capture strand, the signal could be considerably increased, probably by easier access of the detection strand to the azide. This modified system proved able to detect cocaine at very low concentrations, 100 nM in buffer and 1 μ M in human blood serum. All these parameters make it the so far most sensitive and fastest split aptamer analogue of sandwich ELISA.

Cooperative-binding split aptamer

The split aptamer concept is advantageous in terms of easier synthesis and delivery of the nucleic acid strands constituting the aptamer, but on the other side harbors the risk of a decrease of target affinity and low sensitivity. This problem was addressed with a recently developed cooperative-binding split aptamer (CBSA) having two binding sites (104). The first cocaine-binding event stabilizes the structure of the split aptamer and facilitates binding of the second cocaine molecule at the second binding site, thus in the aggregate allowing to achieve higher sensitivity and target affinity. The system uses two different pairs of cocaine split aptamer fragments truncated in stems 1 and 2 (105). The CBSA was constructed by combining stem 1 of the first split aptamer with stem 2 of the second to form one long and one short fragment that can assemble in the presence of the target (Figure 3E). Then, the short fragment sequence was modified by replacing an adenosine at position 10 with a C3 spacer in order to form an abasic site that serves to monitor the assembly by complexation with 2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine (ATMND). Indeed, ATMND is fluorescent in solution, but when the two strands are assembled, the fluorescence signal is quenched by the C3 spacer. The system was found to detect cocaine with a LOD of 50 nM in buffer or in 10% diluted saliva. In 2018, a similar system based on CBSA has been developed using enzyme-assisted target recycling to amplify signals, allowing to detect cocaine at 1 μ M in 50% urine (106).

Aptachain

The aptachain concept relies on splitting an aptamer into two overlapping strands able to assemble upon ligand binding. The nature of the cocaine aptamer makes it an ideal candidate for such an assembly. Interestingly, it has been shown that the cocaine aptamer binds quinine with an affinity that is 30- to 50-fold higher than cocaine (107,108). This property was used to design a model system able to trigger the assembly of the two fragments that will elongate to an aptachain (109). The concept was further implemented as a biosensor by immobilization of one fragment on AuNPs, which induced a shift of their plasmonic resonance and a visible color change upon quinine binding (LOD = 1.1 μ M, Figure 3F).

A similar approach was used recently for target induced construction of a hand-in-hand RNA nanowire. In the absence of theophylline as the specific ligand, RNA split aptamer fragments were designed to be stable hairpins. When theophylline was present, hairpin opening of the RNA probe and subsequent assembly of an RNA nanowire was triggered. The nanowire was captured on an electrode interface and sensed with silver nanoparticles as electrochemical species (LOD = 50 nM) (110).

SPLIT DNAZYMES

DNAzymes

DNAzymes are DNA single-strands having catalytic activities owing to their three-dimensional structure stabilized by hydrogen bonding, π -stacking and metal-ion coordination. Obtained by *in vitro* selection methods, many deoxyribozymes have been evolved to catalyze RNA cleavage, RNA and DNA ligation, and a variety of covalent modification reactions of nucleic acid substrates (Figure 4A) (111). There are different types of DNAzymes, but the most prominent are ribonucleases, which catalyze the cleavage of a ribonucleotide phosphodiester bond by a transesterification reaction triggered by a metal ion (112). The first DNAzyme has been discovered in 1994 by Breaker and Joyce, and is a Pb²⁺-dependent RNA cleaving DNAzyme (6,113). Most of these DNAzymes are composed of a catalytic site flanked by two binding arms able to recognize the nucleic acid substrate. This also applies to the two well studied DNAzymes that are the 8–17 and the 10–23 DNAzyme (114). Another category of DNAzymes are Ligases, which join molecules instead of fragmenting them. The first example was described by Cuenoud and Szostak in 1995, in which the Zn²⁺- or Cu²⁺-dependent metalloenzyme catalyses the condensation of a 5'-hydroxyl with a 3'-phosphorimidazolide to form a new phosphodiester bond (115). The use of DNAzymes is continually progressing and the reaction scope of catalysis by DNA as well as their numerous applications in biochemistry have been recently reviewed by key players in the field (8,9,112,116–120).

Split DNAzymes

Considering the advantages offered by split aptamers, split DNAzymes naturally have emerged as new functional biosensors. Composed of multiple oligonucleotides capable of assembling into the active DNAzyme core in the

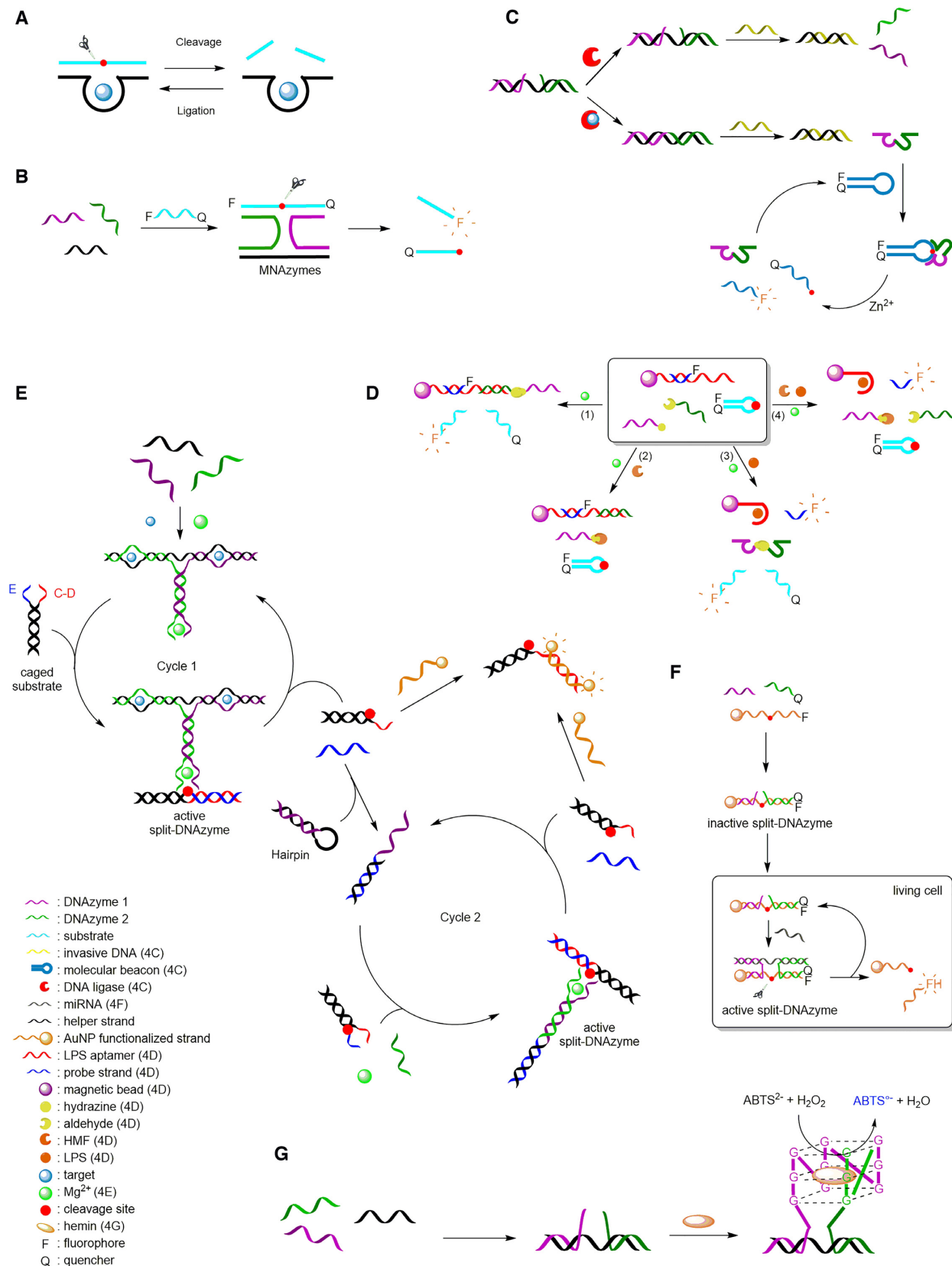


Figure 4. Target detection by split DNAzymes. (A) Catalytic activities of DNAzymes: cleavage and ligation reaction (111). (B) General scheme of a MNAzyme assay (121). (C) ATP and NAD⁺ detection by combining split 8–17 DNAzymes and CAMB (127). (D) HMF and LPS detection by hydrazone chemistry assisted DNAzyme (128). (E) Signal amplification for the detection of Hg²⁺ (129). (F) Detection of miRNA in living cells by a split DNAzyme and AuNPs (131). (G) Split peroxidase mimicking DNAzyme principle (133).

presence of a helper strand, these architectures were called MNazymes for Multicomponent Nucleic Acid enzymes, and proved their high efficiency for nucleic acid detection and mismatch discrimination (Figure 4B) (121–126).

With the purpose of detecting ATP or nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), Lu *et al.* developed a ligation-triggered DNAzyme cascade by combining a split DNAzyme with a catalytic and molecular beacon (CAMB) strategy (127). The 8–17-DNAzyme was split into two fragments, which are inactive toward the molecular beacon strand in the absence of DNA ligase and the cofactor Zn²⁺ (Figure 4C). The addition of a complementary strand triggers the hybridization of both fragments to become ligated by ATP-dependent T4 DNA Ligase (for ATP detection) or NAD⁺-dependent *E. coli* DNA ligase (for NAD⁺ detection). The amount of newly formed DNAzyme was found being directly related to the concentration of the cofactor ATP or NAD⁺. The addition of an invasive DNA frees the 8–17-DNAzyme, which subsequently is hybridized with a hairpin-structured molecular beacon substrate. Addition of the metal co-factor activates the DNAzyme and cleaves the molecular beacon substrate, thereby producing a significant increase of fluorescence. The LOD was found to be 100 pM for ATP and 50 pM for NAD⁺.

Very recently, the split 8–17 DNAzyme was also used for the detection of double targets, namely 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and lipopolysaccharide (LPS) (128). The design involves a hydrazine group at the extremity of the first fragment, while the second fragment carries an aldehyde group. Under standard conditions, the two fragments react to form the corresponding DNAzyme modified by a hydrazone linkage (Figure 4D). In the presence of Mg²⁺ ions and a molecular beacon substrate strand labelled with a fluorescent probe and a quencher, a strong fluorescence emission is observed, thus indicating that the hydrazone linkage does not significantly influence the catalytic activity of the DNAzyme (Figure 4D1). In the presence of HMF only, the aldehyde group present in the structure inhibits the formation of the DNAzyme, and hence the cleavage of the substrate, leading to no fluorescence emission (Figure 4D2). The presence of LPS is visualized by magnetic beads functionalized with an LPS aptamer and a fluorescent probe strand hybridized to the aptamer, such that fluorescence is quenched. A conformational change induced by the binding of LPS to its aptamer induces the release of the probe strand and thus fluorescence emission. Therefore, in the presence of LPS only, fluorescence of both the DNAzyme cleaved substrate and the probe strand released from the aptamer is observed (Figure 4D3). In the presence of both, HMF and LPS, formation of the DNAzyme and consequently cleavage of the molecular beacon substrate is inhibited, such that merely fluorescence of the probe strand is observed (Figure 4D4). The limits of detection have been evaluated to be 0.04 μM for HMF in a concentration range from 0.01 μM to 5 μM, and 0.08 ng/mL for LPS in a concentration range from 0.08 to 2000 ng/ml.

Split DNAzyme fragments have also been used to engineer an ultrasensitive biosensor for Hg²⁺ detection (129). Many techniques mainly based on colorimetry or fluorescence have been previously developed to detect this diva-

lent metal ion, achieving high selectivity, but only moderate sensitivity (130). The DNAzyme based biosensor combines a Mg²⁺-dependent split DNAzyme (two fragments), a binding DNA, a hairpin DNA and a caged substrate, and is also based on colorimetry (Figure 4E). The presence of Hg²⁺ is monitored through a cascade signal amplification. In the presence of Hg²⁺, the DNAzyme fragments bind a third DNA strand (helper strand) supported by the formation of T–Hg²⁺–T base pairs, thus resulting in the formation of an active DNAzyme able to cleave the caged substrate and release segments E and C–D. The C–D segment will then bind to AuNPs forming an aggregate network that becomes blue, allowing detection of Hg²⁺ by the naked eye. Segment E can initiate another signal amplification process by opening the hairpin containing one part of the split DNAzyme leading to signal amplification with a LOD value of 10 pM. Furthermore, split DNAzymes have been used to sense miRNA in living cells. The system relies on AuNPs functionalized with a 3'-FAM-labeled substrate strand hybridized to the two fragments derived from the Mg²⁺-dependent 10–23 DNAzyme, one of them carrying a quencher at its 5'-end (Figure 4F) (131). In the absence of the target miRNA, the split DNAzyme is inactive and the fluorophore is quenched by both the quencher and the AuNP. However, the presence of the target miRNA promotes the formation of an active split DNAzyme that cleaves the substrate and releases the fluorophore from the quencher. Simultaneously, the release of the target promotes another cycle of activation, thus allowing an amplification of the fluorescent signal and a LOD of the target miRNA in living cells of 10 pM.

Split peroxidase mimicking DNAzymes

The peroxidase mimicking DNAzyme, initially designed by Travascio *et al.* in 1998 (132) and then split for the first time by Deng *et al.* in 2008 (133), is actually a hemin-binding DNA aptamer, which exhibits peroxidase activity. The DNAzyme sequence possesses four GGG motifs and is thus able to self-assemble into a G-quadruplex structure, which can catalyze the H₂O₂-based oxidation of 2,2'-azido-bis(3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid) (ABTS²⁻). The first split DNAzyme was divided into two fragments in a 3:1 split mode (133) (Figure 4G), and many studies have been devoted to reveal the best architectural features and reaction conditions to achieve highly effective detection of nucleic acid sequences (134), mismatches (135), carcinoembryonic antigen (136), enzymes (137,138), metal ions (139–141), small molecules (142,143) or drugs (144–146).

Compared to the vast number of existing aptamers it is obvious that only a small number of them have been successfully translated into split systems. Splitting designs require a judicious choice of the fragments that do not disturb the stability and the affinity of the binding site. This is especially true with aptamers having hairpin and three-way junction architectures (86). While most systems are based on fragments that would reassemble non-covalently upon binding of the ligand, split aptamer covalent ligation strategies might overcome the difficulties encountered with non-covalent hairpin and three-way junction architectures and are currently emerging as an efficient alternative for the de-

tection of small molecules (100,128). However, given the versatile applications of DNA split aptamers, the engineering and characterization of new architectures as biosensors are rapidly expanding (147). Recent examples include the use of different split fragments for the detection of tumor cells (148–150), viruses (151,152), antibiotics (153), antigens (154,155), exosomes (156) or lysozyme in the residues of latent fingerprints (157).

SPLIT APTAZYMES

There are a few examples of combination of a DNAzyme/ribozyme with an aptamer in a split design, hence called split aptazyme or short, splitzyme, to be applied as biosensor. In general, activity of an aptazyme is dependent on the presence of a specific ligand that binds to the aptamer region.

As a prominent example, an RNA-branching deoxyribozyme was engineered as a splitzyme to respond positively to ATP, resulting in modulated control of its activity (158). For this purpose, an *in vitro* selected DNAzyme that supports reaction of the 5'-phosphate of one RNA strand with an internal 2'-OH group of another RNA strand, was reengineered to contain the ATP aptamer in its structure. To form the splitzyme, the stem-loop of the aptamer was replaced by three base pairs, and a break was introduced in the phosphodiester backbone, thereby requiring two oligonucleotides to form the complete deoxyribozyme. An optimized version of the splitzyme reached a high ligation yield (~75–80%) in the presence of millimolar concentrations of ATP, although only after 22 h. In another approach, a split version of an aptazyme was combined with molecular beacons that act as substrate and contain a ribonucleotide at the cleavage site (159). The aptazyme, composed of the 8–17 DNAzyme and the adenosine responsive aptamer, was split into two fragments. Similar to the set-up depicted in Figure 4C (127), a molecular beacon substrate labelled with a fluorescent dye and a quencher, was used to monitor split aptazyme activity. In the absence of adenosine, the split aptazyme is inactive, thus leaving the MS intact and resulting in low fluorescence. When adenosine was added to the medium, the two aptazyme fragments interact to form the catalytically competent structure and cleave the molecular beacon substrate, which results in significant increase of the fluorescence signal. The LOD for this system was found to be 1 μ M (159), and thus two orders of magnitude lower than observed with a previous split aptazyme-based adenosine sensor (160). Also an RNA enzyme, the hammerhead ribozyme (HHR) has been used in combination with an aptamer in a split aptazyme design (161) as will be described in more detail below (section Split Spinach).

GFP-MIMICKING LIGHT UP RNA APTAMERS

Over the past decades, it has been shown that RNA plays crucial roles in the living cell and moreover, can be engineered into a tool with numerous potential applications. To elucidate the many functions of RNA and to create new drugs or models of gene expression networks, knowledge of RNA localization, dynamics, and regulation is important. Therefore, many groups developed methods for fluo-

rescence imaging and detection of DNA and RNA in living cells in real-time (162,163). The main problem of RNA imaging is that RNA cannot be easily visualized, and thus has to be tagged with a fluorescent probe, which however is challenging in living cells. A solution to this problem are light-up RNA aptamers that mimic the green fluorescent proteins (GFPs). Since 1990, GFPs have been used to detect proteins in the cellular environment. The first GFP was discovered by Shimomura *et al.* from the jellyfish *Aequorea Victoria* (164). The 4-hydroxybenzylidene imidazolinone (HBI), which is formed from intramolecular reaction of the three amino acid residues Ser65–Tyr66–Gly67, is responsible for the fluorescence in GFP (Figure 5A). To form the chromophore, the residues are placed in the β -barrel of the protein to proceed through a cyclization and oxidation step (165). Therefore, the chromophore is localized in the center of the protein and is protected from the environment to activate the fluorescence. Thus, GFPs are advantageous as compared to other proteins that bind their chromophores *via* non-covalent interactions and thus are dependent on their environment.

Taking the working mode of GFPs as a lead, light-up aptamers have been developed by *in vitro* selection (166–171). Those aptamers create fluorescence upon binding their specific ligands *via* non-covalent interactions, and hence do not possess the advantage of GFPs that is harboring the chromophore as an integral part of their structure. Yet, light-up aptamers are seen as GFP mimics based on the fact, that fluorescence of, in the unbound state non-fluorescent, ligands is created by embedding those in a suitable environment. Thus, light-up aptamers are considered being label-free fluorescence probes. The ligand binds tightly to the nucleic acid, i.e. by intercalating or as minor groove binder. As a result, intramolecular movements are limited and, upon excitation, radiative relaxation can occur, resulting in an increase of fluorescence. Light-up aptamers can be fused to RNAs of interest allowing their visualization by optical methods (167,170). Furthermore, light-up aptamers have been engineered into aptasensors for detection of pathogens in food or water samples (172). The Malachite green aptamer (MGA) was the first RNA mimic of GFP to show a fluorescence response upon binding to malachite green (MG), a triphenylmethane dye with $K_D \leq 1 \mu$ M, and splitting MG aptamers allowed for fluorescence detection of nucleic acids (173,174). However, Malachite Green and its derivatives are highly cytotoxic, and therefore, other dyes were needed to develop methods for nucleic acid detection in living cells.

SPINACH RNA APTAMER

Properties

In an effort to develop non-toxic light-up aptamers, various GFP-like fluorophores like 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene imidazolinone (DMHBI), 4-dimethylamino-benzylidene imidazolinone (DMABI), 2-hydroxybenzylidene imidazolinone (2-HBI) and 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone (DFHBI) (Figure 5B) were synthesized and used for *in vitro* selection (175). The brightest fluorophore among those was DFHBI and, because of the green fluorescence of

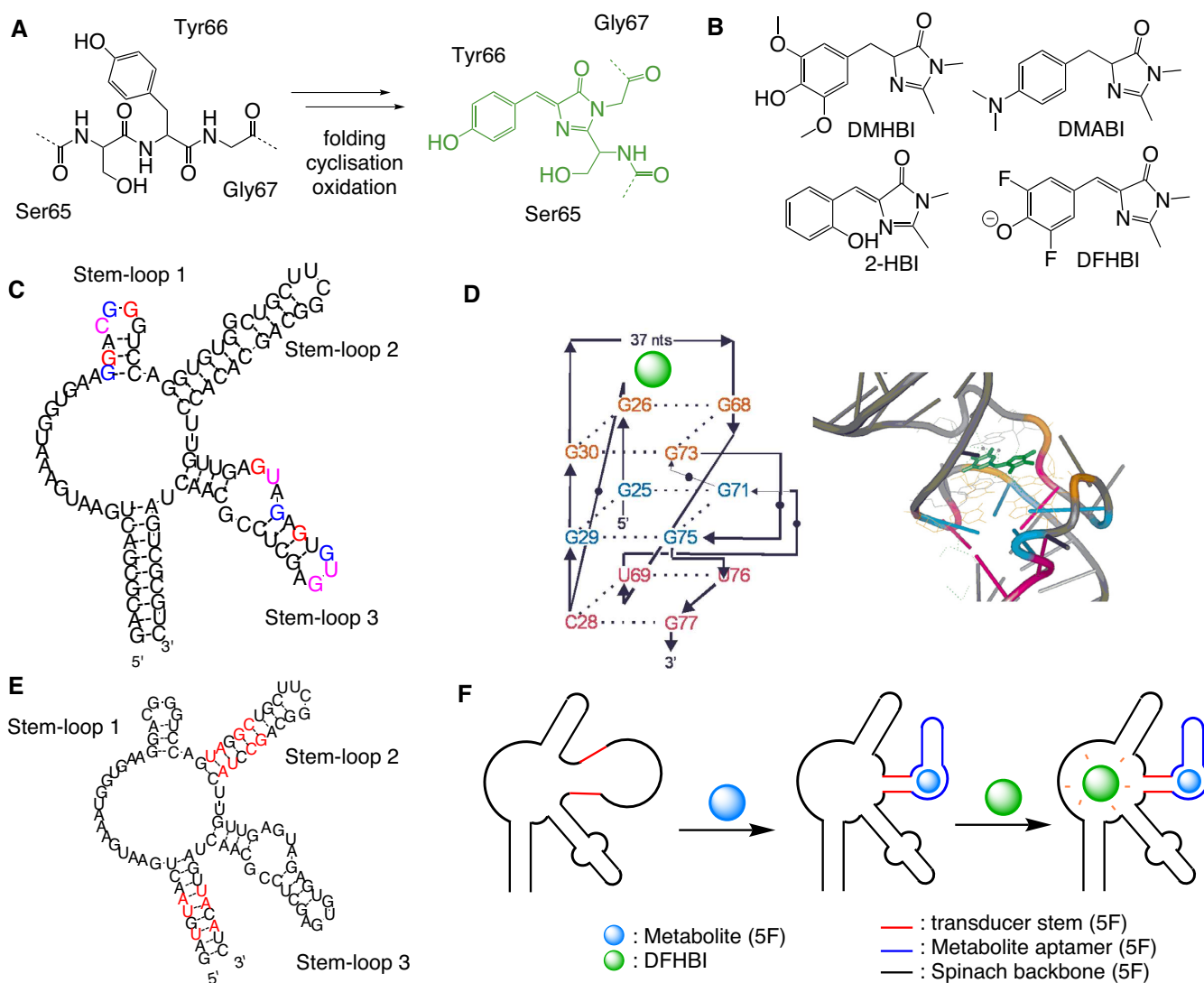


Figure 5. (A) The three amino acid residues Ser65-Tyr66-Gly67 in the center of GFP, forming the chromophore by intramolecular cyclization and oxidation (165). (B) GFP-like fluorophore structures (175). (C) Secondary structure of the Spinach aptamer (175). The colored bases refer to the colors used in the G-quadruplex shown in (D). (D) Cartoon presentation (left) and 3D structure (right) of the G-quadruplex interacting with DFHBI (PDB code: 4TS2) (176). (E) Secondary structure of the Spinach 2 'superfolder'. Red bases are the mutations as compared with the parent Spinach aptamer in (C) (177). (F) Structure of the Spinach sensor ligated to a metabolite aptamer via a transducer stem (178).

the aptamer bound dye, the system was named like the green vegetable Spinach. As compared to the other HBI derivatives, DFHBI exhibits specific fluorescence, also in the cellular environment, and does not induce cytotoxicity. The sequence is formed of 98 nucleotides, folded in three stem-loops (Figure 5C). In the three-dimensional fold, the three tetrad quadruplex is stabilized by two K^+ ions (176). DFHBI binds on the top of the G-quadruplex motif to activate the fluorescence (Figure 5D). Different interactions are involved. Residue G30 binds to the DFHBI carbonyl oxygen and interacts with the benzylidene carbon *via* Van der Waals interactions, N3 of DFHBI binds to the 2'-OH of A64, and the 2'-OH of G26 binds to the phenolate oxygen of DFHBI. One of the two K^+ ions coordinates two of the three G-quartets, and the other K^+ ion the third lower G-quartet. The understanding of the

Spinach structure allowed the minimization of the aptamer to generate a 'Baby Spinach' system, 51 nucleotides long, without changed fluorescence properties when binding to DFHBI (175).

The brightness of the Spinach-DFHBI system is only 53% of that of EGFP or 80% of the GFP brightness, respectively. In addition, Spinach turned out to misfold in cells (175,177). Thus, the fusion of Spinach with an RNA of interest remained challenging and showed rather low fluorescence. Performance of Spinach was improved by a number of sequence changes to stabilize the aptamer fold and to enhance the fluorescence in *in vivo* systems. Thus, Spinach 2, a 'superfolder' aptamer showing enhanced fluorescence upon fluorophore binding was developed (Figure 5E) (177). Compared to Spinach, Spinach 2 has almost the same photophysical properties, the excitation/emission spectra are

similar, but show higher brightness. Owing to the improved folding in living cells, the Spinach 2 aptamer allowed to image toxic CGG-repeat-containing RNAs and retained 80% of its fluorescence, while Spinach did not show any fluorescence in an identical set-up.

Spinach systems have been used for the detection of small molecules (178) and specific nucleic acid sequences (179), as well as for imaging protein expression (180) and RNA transcription (181). To acquire a broad range of applications and to image metabolites like for example ADP, a sensor has been developed composed of the Spinach aptamer and a second aptamer that binds to small molecules (178). Therein, stem-loop 2 (see Figure 5E) is essential for the stabilization and the activation of the Spinach fluorescence. This stem-loop has been replaced by a transducer stem connecting the Spinach backbone with the chosen metabolite aptamer. The transducer is stabilized only when the target molecule is bound to the aptamer, which in turn allows proper folding of the Spinach aptamer and fluorescence emission when bound to DFHBI (Figure 5F).

Split Spinach

The use of light up aptamers in split scenarios has potential in particular for the visualization of RNA assembly. To this end, Spinach was cut in two fragments that, upon appropriate interaction, would form the full length aptamer (182). In order to find a suitable split region, structure-function relationship studies have been carried out. Stem-loops 1 and 3 are responsible for the formation of the G-quadruplex structure, which is essential for binding of DFHBI (Figure 5C–E). Therefore, stem-loop 2 of the Spinach system provides an excellent region for sequence modifications and is a good candidate for the split region (176,178,182). First studies of the split Spinach assembly involved DNA blocker sequences to temporarily control the assembly of the functional aptamer. The split site is located within the stabilizing stem-loop 2, and the two fragments are elongated. Two DNA strands (DNA blockers 1 and 2 in Figure 6A) are designed to form duplexes with each of the two Spinach fragments to prevent folding into the functional aptamer. Association of the two pieces is permitted, when two complementary ‘unblocking’ DNA strands are added, allowing formation of the DFHBI binding pocket, mirrored in DFHBI fluorescence (Figure 6A) (182).

Split systems can also be utilized for RNA self-cleavage detection and quantification. Thus, the hammerhead ribozyme (HHR) has been combined with one of the Spinach aptamer fragments (Figure 6B). The Spinach aptamer used in this study has been minimized, and one fragment (apt 1 in Figure 6B) is used to form the 5'-part of the hammerhead substrate sequence. A short sequence complementary to this Spinach fragment is added to the 3'-end of the HHR, thus forming a short stem structure in the functional ribozyme. Upon self-cleavage, the elongated ribozyme strand is easily displaced from the Spinach fragment by addition of the second aptamer fragment (apt 2 in Figure 6B), thus allowing formation of the functional Spinach aptamer, mirrored in high fluorescence in the presence of DFHBI (Figure 6B) (161). This method is easily adaptable and can be used to analyze the performance of different ribozyme variants.

As seen with the HHR, application of the Spinach aptamer for detection of activity requires sequence adaptation, hence making necessary all the different steps of setting up such a system, like design, synthesis, purification, and optimization. In 2017, Kikuchi *et al.* developed a Universal Split Spinach Aptamer (USSA) probe able to bind DNA or RNA targets independent of their sequences (183). In the process, the Spinach fragments (apt 1 and apt 2; Figure 6C) have to interact with two adaptor strands, which only upon hybridization to the target would re-form the binding site for DFHBI. In this way, split aptamers are not in direct contact with the target and hence can be used in a universal manner for sensing different RNA or DNA targets (Figure 6C) with a LOD of 1.5 nM in the best case. However, the detection of mRNAs using the USSA still suffered from low-brightness, owing to thermal instability as well as K^+ and Mg^{2+} concentration-dependent folding, and thus remained challenging. Wang *et al.* improved the strategy and developed an aptamer-initiated fluorescence complementation protocol for RNA imaging, based on two fragments of Baby Spinach that are functionalized with complementary sequences to the mRNA target. When the mRNA target is present, both fragments become oriented sufficiently close to one another for formation of the functional aptamer, efficient DFHBI binding and high fluorescence (184).

Many of the processes in living systems take place due to the proximity of the components. Thus, split Spinach aptamers have been used not only with nucleic acids, but also for detection of a specific antibody *via* the corresponding antigens conjugated at the end of both Spinach fragments (Figure 6D). The functionality of the split strands is retained by an additional spacer, comprising 10 uracil units, between the split Spinach sequences and the antigen. In the presence of the specific antibody, the fragments are sufficiently close to properly fold and to bind the DFHBI fluorophore, thus resulting in a fluorescence increase (185).

BROCCOLI RNA APTAMER

Broccoli - a new green light up aptamer

The Spinach aptamer was obtained from *in vitro* selection by the SELEX method. This however, is based on the affinity of the aptamer for the target/fluorophore and not on its capability of activating the fluorescence of the fluorophore (175). Thus, as mentioned above, Spinach turned out being not optimal for *in vivo* experiments (186). To overcome this problem and to improve RNA imaging by light-up aptamers, research efforts were started to develop aptamers with similar features like Spinach, but improved characteristics for application in living cells. Filonov *et al.* invented a new selection method combining the classic SELEX procedure in *E. coli* with a fluorescence-activated cell sorting step, from which a new light-up aptamer, named Broccoli was obtained (187). With a sequence length of 49 nucleotides, Broccoli is shorter than Spinach, and exhibits better folding efficiency under physiological conditions, green fluorescence upon binding DFHBI, and lower magnesium ions dependence.

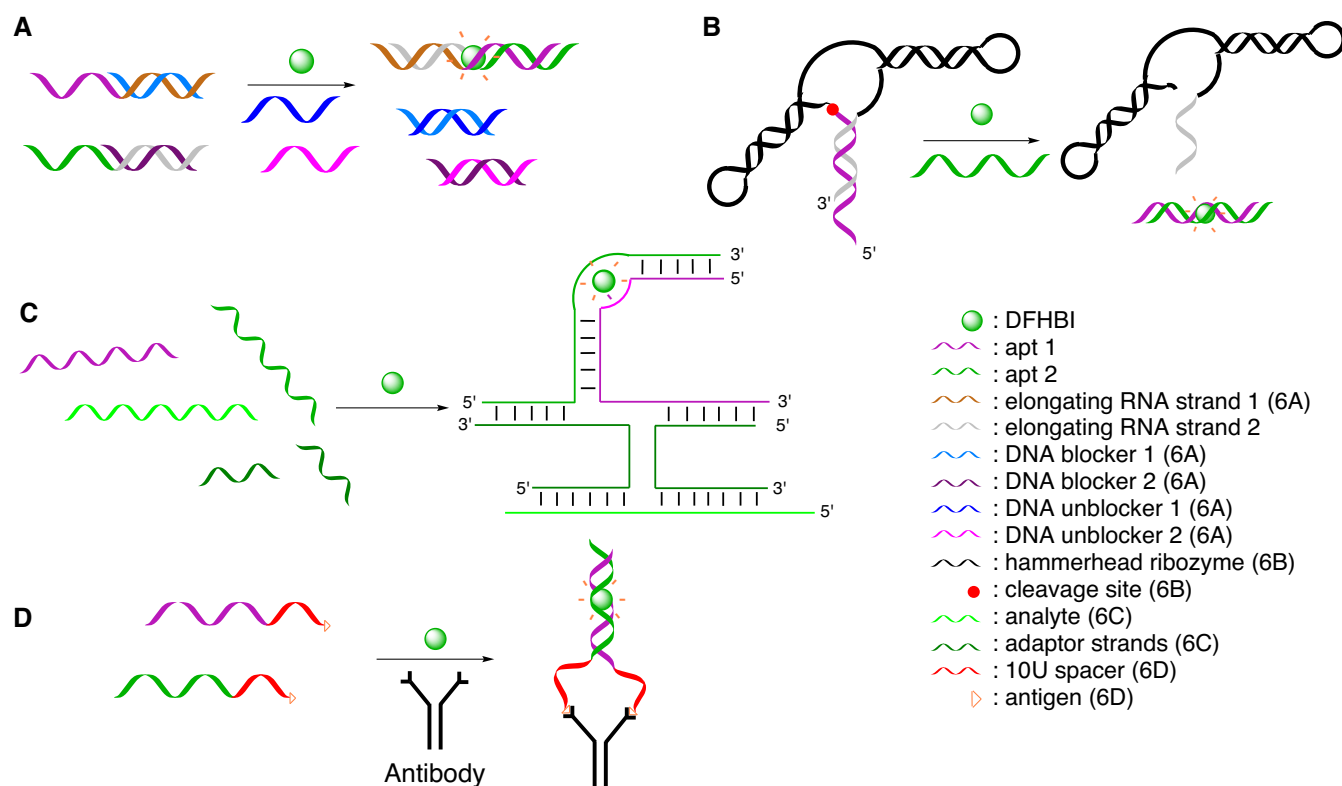


Figure 6. (A) Monitoring split Spinach assembly (182). (B) Hammerhead ribozyme cleavage assay using the split Spinach aptamer (161). (C) Universal Split Spinach aptamer assay (183). (D) Split Spinach aptamer assay for antibody detection (185).

Split Broccoli

Because of its favorable properties, the Broccoli aptamer has also been studied as split variants (188,189). For this purpose, two Broccoli aptamers were combined in a three-way junction structure (Figure 7A), and this structure was subsequently re-designed to consist of two separate RNA-strands with the split sites being located in the terminal loops of the two Broccoli hairpins (Figure 7B) (190).

Additional terminal strands were added to stabilize the system against nuclease degradation. This system was used to monitor RNA–RNA hybridization events *in vivo* (190), as well as for *in cell* mRNA imaging (184). For this, one three-way junction forming Broccoli fragment (Broccoli 1) was functionalized with an RNA ‘Trigger’ sequence, and another three-way junction forming Broccoli fragment (Broccoli 2) with an RNA ‘Toehold’ and the mCherry mRNA. The Trigger and the Toehold have complementary sequences allowing control of mCherry expression. The RNA Toehold forms a hairpin structure containing the 5'-UTR of mCherry. Upon hybridization, the two three-way junction forming Broccoli fragments self-assemble into the functional system, and allow for emission of green fluorescence in the presence of DFHBI. In addition, the sequence of the Toehold comprising the 5'-UTR is set free to favor ribosome binding and initiation of translation to express mCherry (Figure 7C). The green fluorescence of the split aptamer confirms the RNA–RNA hybridization event, and the red fluorescence of the mCherry protein indicates successful activation of translation.

Light-up aptamers are also valuable tools for verification of proper folding of DNA and RNA nanostructures. In this context a split Broccoli aptamer system has recently been used to monitor the folding of an RNA origami (Figure 7D) (191). An RNA origami ribbon was formed from the 212 nucleotides long De Bruijn sequence (DBS) scaffold, designed to adopt a closed conformation only in the presence of the split Broccoli scaffold, and folding was induced by addition of specific staple strands. The Broccoli aptamer is split at the terminal stem loop; the two resulting Broccoli fragments are extended via an eight nucleotides spacer with complementary sequences, allowing specific interaction with the DBS scaffold. Formation of the ribbon was followed by observing the fluorescence of the added DFHBI-1T dye.

Furthermore, based on a Toehold-mediated strand displacement mechanism, a novel Catalytic Hairpin Assembly RNA circuit sensor that is Genetically Encoded (named CHARGE) was designed to detect specific RNA molecules inside living cells with high sensitivity (192). The two ends of complementary hairpin RNA strands were functionalized with two non-fluorescent fragments of the Broccoli aptamer (Figure 7E). The target strand to be detected serves the role of invading one of the hairpin structures containing one Broccoli fragment, thus opening up the stem loop and inducing hybridization with the other hairpin structure containing the second Broccoli fragment. Thus, the functional Broccoli aptamer is formed as monitored by the emerging fluorescence upon addition of the cognate dye DFHBI-1T. Target concentrations as low as 0.5 nM could be detected.

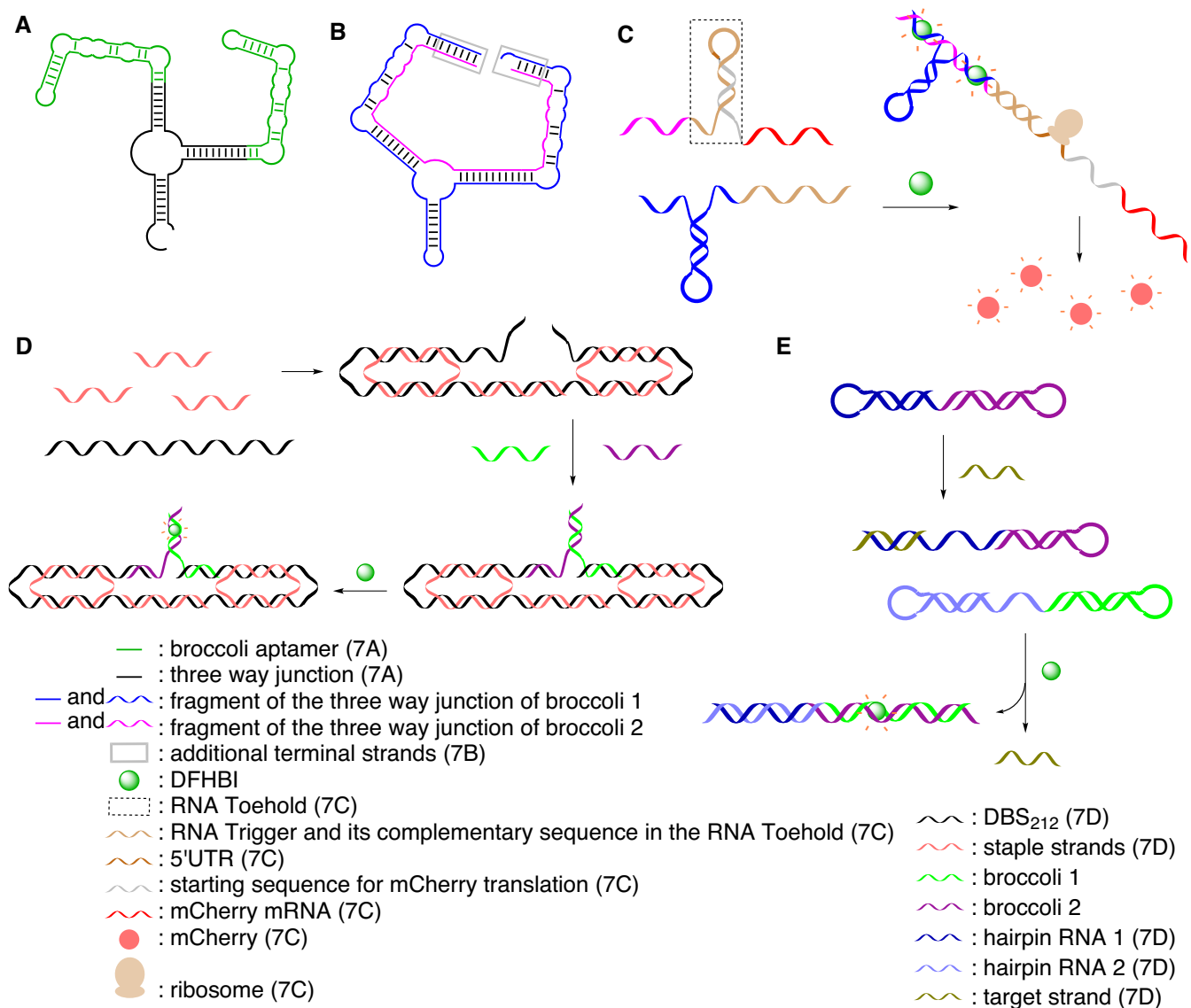


Figure 7. (A) The three-way junction of the monomeric Broccoli aptamer (190). (B) The dimeric three-way junction Broccoli aptamer (190). (C) Formation of the dimeric Broccoli aptamer for monitoring RNA–RNA hybridization events (190). (D) Monitoring the folding of an RNA origami (191). (E) CHARGE system for detection of specific nucleic acid targets (192).

Other split RNA aptamers

Apart from light-up aptamers, other RNA aptamers have been used in split designs for specific target detection. A split version of an aptamer specific for the RNA-binding protein eIF4A was used in combination with the protein complementation approach to detect and localize specific mRNAs in live *E. coli* cells (193). The assay relies on the sequence specific binding of two RNA probes complementary to two adjacent sites on the mRNA target. Each RNA probe is composed of a sequence complementary to the target and a fragment of the split aptamer, connected by a flexible linker. In the presence of the target mRNA, binding of the two RNA probes next to one another, brings the two aptamer fragments in close proximity and hence supports assembly. The assembled aptamer binds to a split version of its target protein eIF4A, and thereby triggers re-association.

eIF4A was used here as a fusion protein with EGFP, hence the emerging fluorescence upon aptamer and protein assembly was used as readout. Compared with assays where the full size EGFP and/or full length aptamer was used, the combination of the split aptamer approach with protein complementation lead to significant fluorescence background reduction and allowed to detect, in live cells, a signal from a specific mRNA with an average RNA concentration of ≤ 1 molecule per cell.

Another example of a non-light up split aptamer assay is detection of theophylline by aptamer triggered colorimetric aggregation of gold nanoparticles (AuNPs) (194). The theophylline RNA aptamer was cut into two fragments. The fragments interact with the AuNPs, enhancing the salt tolerance of the nanoparticles and preventing aggregation. Addition of theophylline triggered the assembly

of the RNA aptamer fragments, thus reducing the amount of RNA available to protect the AuNPs and allowing their salt-induced aggregation. Aggregation is associated with a color change from red to blue, that can be visually detected or measured by absorption spectroscopy. The relatively low LOD (67 nM of theophylline), the high selectivity and the facile visual detection make this assay a good tool for diagnostic applications and easily adaptable to other RNA aptamers.

SPLIT RIBOZYMES

As for split studies on RNA aptamers, the strategy of fragmented systems has been used with ribozymes in order to improve *in vivo* detection methods. Ribozymes are RNA molecules that can catalyze a wide range of reactions, although ribozymes occurring in nature are limited to catalysis of *trans*-esterification, hydrolytic or peptidyl transfer reactions (195). Nowadays, the mechanisms and structures of catalytic RNAs have been studied to an extent that has allowed to create tools for application in molecular biology, medicine or analytics.

Split hairpin ribozyme

Basically driven by the technical challenges of chemically synthesizing long RNA strands, ribozymes have been assembled from two or more fragments in mechanism and structure studies. For example, with the hairpin ribozyme, a small naturally occurring catalytic RNA derived from the (–)-strand of the *Tobacco Ringspot* virus satellite RNA (196), the terminal hairpin loop closing one of the helices has been removed, thus splitting the ribozyme strand into two parts. In order to compensate the stability loss, the helix was extended by three additional Watson–Crick base pairs. Both ribozyme versions have virtually the same cleavage characteristics, and thus both set-ups have been extensively used in numerous studies (197).

Split group I intron ribozyme

The group I intron of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* is an RNA catalyst that supports mRNA self-splicing (198). A split version of the *Tetrahymena* ribozyme was engineered to develop an mRNA detection method in mammalian cells (199). The ribozyme fragments were connected at one end to mRNA antisense strands *via* linker sequences. On the other end, the ribozyme fragments were attached each to one half of the coding sequence of nonsecreted TEM-1 β -lactamase. In the presence of the mRNA target, the antisense strands would bind to it, thus positioning the ribozyme fragments for functional assembly. Upon ribozyme mediated splicing, the complete coding sequence of the TEM-1 β -lactamase was regained for translation to occur. The synthesized proteins were then detected by a fluorogenic substrate, that is β -lactam linked to an umbelliferone called CC1. The produced β -lactamase catalyzed the hydrolysis of CC1, thus releasing umbelliferone and inducing a fluorescent signal (200). The key feature of this system is its inherent capability of signal amplification, since one molecule of target RNA induces the production of many

protein molecules from the spliced RNA. The assay is universal, since different mRNA targets can be detected by adapting the sequence of the antisense strands to the target of interest.

LIMITATIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

Despite the high potential of split aptamers for applications in diagnostic and therapy, only a rather small number of split structures have been successfully used so far. This is certainly a consequence of the fact that the design of a well-performing split system is still a challenging task. Basically there are three key issues that require careful consideration: (i) choice of the split site, (ii) stability of the split aptamer/nucleic acid enzyme target complex and (iii) sensitivity of the split system.

Choice of the split site

When designing split systems, it has to be taken into account that the three-dimensional structure of the parent nucleic acid strand can be considerably perturbed, if split at an unfavorable position. Therefore, careful design of the fragments and verification of the assembled structure by theoretical (computer aided) and experimental analysis is a very important task. This requires the understanding of the aptamer/nucleic acid enzyme target complex including the role of individual functional groups of nucleobases and of the sugar-phosphate backbone. In order to maintain the functionality of the system, splitting is usually restricted to functionally dispensable sites. Such sites are usually available in DNAzymes and ribozymes, in aptamers however, they are often missing. Recent work by Wang *et al.* has addressed this problem by studying split aptamers with broken initial small molecule binding pockets, and demonstrating, in wet lab experiments as well as *in silico*, that biorecognition and binding capabilities are preserved (201). Thus, the prediction of ligand binding potency of split aptamer designs by MD simulations can be expected to enhance the future development of split aptamers for biosensing purposes.

Stability of the split aptamer/nucleic acid enzyme–target complex

Compared to the parent full-length nucleic acid strand, the individual fragments of a split system often have lower affinity to the target, which results in reduced stability of the aptamer/nucleic acid enzyme target complex. Furthermore, there is a higher entropic cost of complex formation, due to the fact that two or more fragments need to assemble instead of only one nucleic acid strand that binds to the target. Stabilization of the split system can be achieved by structural manipulation, *i.e.* extension of the individual fragments by additional nucleotides that by complementary base pairing would assist assembly and increase stability of the split aptamer/nucleic acid enzyme target complex. Instead of additional nucleotides also other functionalities that support target-induced fusion of the fragments can be used. A prominent example is the work by Jin *et al.* (69) described above, who attached pyrene moieties at the ends of two split aptamer fragments, such that

Table 1. Summary of split-systems described in this review. LOD: limit of detection; FAM: 6-carboxy-fluorescein; FRET: Förster resonance energy transfer; ATP: Adenosine triphosphate; BHQ: black hole quencher; Cy3/Cy5: Cyanines 3 and 5; SPR: surface plasmon resonance; ALO: aryl-less cyclooctyne; DIBAC: dibenzoazacyclooctyne; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; CAMB: catalytic and molecular beacon; HMF: 5-hydroxymethylfurfural; LPS: lipopolysaccharide

Target	Fragment 1/Fragment 2 (5'-3')	Detection method	LOD	Ref
Thrombin	FAM-GGTTGGT/TGGTTGG	FRET	2 nM	(50)
	FAM-GGTTGGT/TGGTTGG	Fluorescence	1 nM	(51)
	AGGTTGGGGTACT/AGTCCGTGGTAGGGC	Fluorescence/Colorimetry	0.16 – 0.45 nM	(54)
	GGTTGGT/TGGTTGG	ECL	0.2 pM	(58)
	GGTTGGTGGTTGG/AGTCCGTGGTAGGGGCA	Electrochemical	35 fM	(59)
ATP	ACCTGGGGGAGTAT/TGCGGAGGAAGGT-BHQ1	Fluorescence	1.7 μM	(66)
	ACCTGGGGGAGTAT/TGCGGAGGAAGGT	FRET	0.72 U.L ⁻¹	(67)
	ATTATAGCGGAGGAAAGTATT-pyrene/pyrene-AGTACCTGGGGAGTATATACT	Fluorescence	80 nM – 0.5 μM	(69)
	ACCTGGGGGAGTAT-Cy3/TGCGGAGGAAGGT-Cy5	Dual color fluorescence	100 fM	(70)
Adenosine	ACCTGGGGGAGTAT/TGCGGAGGAAGGT	Fluorescence	12 μM	(65)
	AGAGAACCTGGGGGAGTAT/TGCGGAGGAAGGTTGAG	SPR	30 nM	(78)
	TACCTGGGGGAGTAT/TGCGGAGGAAGGT	SPR	1.5 pM	(82)
	CATCTCTTCCGAGCCGGTCGAAATATTGGAGGA	Fluorescence	1 μM	(159)
	AGCTC/GAGCTGGAGGAAAAAGTGACAA			
Cocaine	FAM-TTCGTTCTTCAATGAAGTGGGACGACA/	Fluorescence	1 μM	(83)
	GGGAGTCAAGAACGAA-Dabcyl			
	Cy3-GGGAGTCAAGAAC-cyclooctyne/N ₃ -	Fluorescence	1 μM – 1 mM	(100)
	GTTCTTCAATGAAGTGGGACGACA			
	Cy3-GGGAGTCAAGAAC-aldehyde/NH ₂ -	Fluorescence	1 μM	(102)
	GTTCTTCAATGAAGTGGGACGACA			
	Cy3-GGGAGTCAAGAAC-ALO/N ₃ -	Fluorescence	1 μM	(103)
	GTTCTTCAATGAAGTGGGACGACA			
	Cy3-GGGAGTCAAGAAC-DIBAC/N ₃ -	Fluorescence	100 nM – 1 μM	(103)
	GTCCTTCAACGAAGTGGGACGACA			
CTCCTTCAACGAAGTGGGTTCTTCAACGAAGTGG	Fluorescence	50 nM	(104)	
GTCTC/GAGACAAGGAACAAGGAG				
GTCCACTAACGAAGTTGTCTTCCACTAACGAAGTT	Fluorescence	1 μM	(106)	
GTCC/Cy5-GGACGTGGAGACGTGGAC-low Black				
Theo- phylline	CGGCUGGGGCGAUACCAGCCGAAA/	Electrochemical	50 nM	(110)
	CCAGCCGAAAGGCCUUGGCACGUCGGG-NH ₂			
	AAAGGCGAUACCAGCCGAAA/GGCC	Colorimetry	67 nM	(194)
Other targets	Quinine: TCGTGGGACGACATTCGTTCTTCAATGA/	Colorimetry	1.1 μM	(109)
	GGAGTCAAGAACGAA			
	Quinine/Quinidine: Cy3-GGGAGTCAAGAAC-	Fluorescence	100 nM	(102)
	aldehyde/NH ₂ -GTTCTTCAATGAAGTGGGACGACA			
	ATP/NAD ⁺ : CATCTCTTCTCCGAGCCGGTTCG/	Fluorescence	50 – 100 pM	(127)
	AAATAGTGGGTG			
	HMF/LPS: CATCTCTTCTCCGAGCCGGTTCG-	Fluorescence	0.08 – 2000	(128)
	hydrazine/aldehyde-AAATAGTGGTTCGCTGGG			
	GGGCTGACC	Colorimetry	10 pM	(129)
	Hg ²⁺ : ATCTGTGCGAGTGGTTACACCATGTTCCG			
	TCA/TCTTGCGAGCGATTAACAACACTGATGCTA	Fluorescence	10 pM	(131)
	miRNA: TCAACATCAGTCGGTCCGAAATAGT			
	GAGTCGCTC/BHQ-CATCTCTTCTCCGAGCCT	Colorimetry	100 nM	(133)
GATAAGCTA				
Hemin: ACAGGCGGCCTTAAGTGTAGTTGGG	Fluorescence	1.5 – 4.2 nM	(183)	
TAGGGCGGG/TGGGTCTGGTGAAATTGCTGCC				
miRNA: ACUGUUGAGUAGAGUGUGAGCUC	Fluorescence	0.5 nM	(192)	
CGcagtggccataccatgc/gtgggtgtg/TEG/UGGUGAAGG				
ACGGGUCCAGU	Fluorescence	0.5 nM	(192)	
RNA: Hairpin RNA 1- CAGAGAGACGGUCGGG				
UCCACAGUUUCC/GGAAACUGUGCAGUAGAGU	Fluorescence	0.5 nM	(192)	
GUGGGCUCUCUG- Hairpin RNA 2				

formation of the pyrene dimer upon split aptamer folding in the presence of the cognate ligand not only allowed for detection, but in addition assisted assembly and increased stability of the aptamer target complex. In another scenario, the fragments are functionalized with reactive groups, as for example azides and alkynes or aldehydes and amines/hydrazines, such that the individual strands, upon folding, would become covalently linked by an appropriate chemistry (100,102,103). In this way, upon target induced assembly of the split system, the effective molarity of the reactive groups attached to the ends of the split fragments would be significantly increased, thus promoting chemical reaction. This in turn would stabilize the split aptamer/nucleic acid enzyme target complex, and moreover can be used as readout of target-induced assembly and thus for detection, and potentially sensing, of the cognate ligand.

Sensitivity of the split system

The problem of limited affinity and stability of split aptamer/nucleic acid enzyme target complexes is also mirrored in reduced sensitivity. Although impressive sensitivity has been demonstrated in some cases (Table 1), there is a particular need for signal amplification strategies to improve the sensitivity down to LOD in the picomolar range. This is challenging with split systems and usually requires rather complex assays. In a quite straight-forward way signal amplification is achieved by combination of the split system with protein enzymes to turnover a specific substrate, which is available to the enzyme only if the split aptamer target complex has formed (202). In an analogous scenario, aptazymes cleave or ligate specific substrates only in the presence of a specific ligand that binds to the aptamer region of the aptazyme and stabilizes the functionally competent conformation of the catalytic core. Other methodologies like for example strand displacement amplification of a sequence that becomes available exclusively upon formation of the split aptamer target complex and detection/sensing of the formed dsDNA in a real time PCR assay (203) have started to be integrated in split aptamer and nucleic acid enzyme designs.

CONCLUSION

Split aptamers and ribozymes/DNAzymes are at the initial stage of design and application. The concept of split aptamers/nucleic acid enzymes involves dissecting the parent full length strand in a series of two or more independent and non-functional fragments, which in the presence of the specific target would assemble to form the functional entity. Thus, in comparison to full length functional nucleic acids, split systems are easier to synthesize, and due to their smaller size are less prone to form unwanted secondary structures, which might deliver false-positive or non-specific signals in the absence of the target. The ideal design would include that the fragments of the split system are brought in close contact and deliver a signal only when the target is present. Aptamers are the key elements for detecting small molecules or proteins, whereas nucleic acid enzymes have been applied mainly for detection of specific nucleic acid sequences or metal ions. The combination of both, aptamers

and nucleic acid enzymes, into aptazymes is an appealing concept of signal enhancement by the multiple turnover of the enzyme that amplifies the binding event of the target to the aptamer region into multiple reaction products used for readout.

Overall, the design and application of split aptamers and nucleic acid enzymes in biosensing applications is still in its infancy and remains challenging. Further improving the stability of split nucleic acid target complexes and with that the sensitivity is an important task. In addition, fast and practical approaches based on fluorescence, chemiluminescence, colorimetric or electrochemical detection need to be further implemented in split aptamer/nucleic acid enzyme assays to achieve efficient working modes. Nevertheless, the so far reported functional assemblies derived from aptamers and ribozymes/DNAzymes, impressively demonstrate the proof of principle, and pave the way for deeper implementations and exciting new developments in this compelling and emerging field.

FUNDING

Agence Nationale de la Recherche; Deutsche Forschungsgemeinschaft [ANR PCRI ‘TEMPLAR’-16-CE92- 0010-01; DFG MU1396/11]. The open access publication charge for this paper has been waived by Oxford University Press – NAR Editorial Board members are entitled to one free paper per year in recognition of their work on behalf of the journal.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Li, T., Dong, S. and Wang, E. (2009) G-quadruplex aptamers with peroxidase-like DNAzyme functions: which is the best and how does it work? *Chem. – Asian J.*, **4**, 918–922.
- Neo, J.L., Kamaladasan, K. and Uttamchandani, M. (2012) G-Quadruplex based probes for visual detection and sensing. *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 2048–2057.
- Kosman, J. and Juskowiak, B. (2011) Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: a review. *Anal. Chim. Acta*, **707**, 7–17.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849–857.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, **31**, 147–157.
- Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.*, **1**, 223–229.
- Willner, I., Shlyahovskiy, B., Zayats, M. and Willner, B. (2008) DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1153–1165.
- Zhou, W., Ding, J. and Liu, J. (2017) Theranostic DNAzymes. *Theranostics*, **7**, 1010–1025.
- Peng, H., Newbigging, A.M., Wang, Z., Tao, J., Deng, W., Le, X.C. and Zhang, H. (2018) DNAzyme-mediated assays for amplified detection of nucleic acids and proteins. *Anal. Chem.*, **90**, 190–207.
- Ma, L. and Liu, J. (2020) Catalytic nucleic acids: biochemistry, chemical biology, biosensors, and nanotechnology. *iScience*, **23**, 100815.
- Parashar, A. (2016) Aptamers in Therapeutics. *J. Clin. Diagn. Res.*, **10**, BE01–BE06.
- Klussmann, S. (2006) The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications. In: Klussmann, S. (ed) *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, WILEY-VCH, Weinheim, Germany, p. 490.

13. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505–510.
14. Gold, L., Janjic, N., Jarvis, T., Schneider, D., Walker, J.J., Wilcox, S.K. and Zichi, D. (2012) Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a003582.
15. Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'Donoghue, M.B. and Tan, W. (2010) Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat. Protoc.*, **5**, 1169–1185.
16. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818–822.
17. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, **355**, 564–566.
18. Kent, A.D., Spiropulos, N.G. and Heemstra, J.M. (2013) General approach for engineering small-molecule-binding DNA split aptamers. *Anal. Chem.*, **85**, 9916–9923.
19. Hermann, T. and Patel, D.J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, **287**, 820–825.
20. Mayer, G. (2009) The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 2672–2689.
21. O'Sullivan, C.K. (2002) Aptasensors – the future of biosensing? *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 44–48.
22. Xu, F., Zhu, Y.-C., Ma, Z.-Y., Zhao, W.-W., Xu, J.-J. and Chen, H.-Y. (2016) An ultrasensitive energy-transfer based photoelectrochemical protein biosensor. *Chem. Commun.*, **52**, 3034–3037.
23. Rimmel, M. (2003) Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *ChemBioChem*, **4**, 963–971.
24. Brody, E.N. and Gold, L. (2000) Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Rev. Mol. Biotechnol.*, **74**, 5–13.
25. Kolpashchikov, D.M. (2010) Binary probes for nucleic acid analysis. *Chem. Rev.*, **110**, 4709–4723.
26. Wilson, C. and Keefe, A. (2006) Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 607–614.
27. Röthlisberger, P. and Hollenstein, M. (2018) Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **134**, 3–21.
28. Dunn, M.R., Jimenez, R.M. and Chaput, J.C. (2017) Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.*, **1**, 0076.
29. Pfeiffer, F. and Mayer, G. (2016) Selection and biosensor application of aptamers for small molecules. *Front. Chem.*, **4**, 1–21.
30. Munzar, J.D., Ng, A. and Juncker, D. (2019) Duplexed aptamers: history, design, theory, and application to biosensing. *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 1390–1419.
31. Lakhin, A.V., Tarantul, V.Z. and Gening, L.V. (2013) Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae*, **5**, 34–43.
32. Shekhawat, S.S. and Ghosh, I. (2011) Split-protein systems: beyond binary protein–protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 789–797.
33. Huizenga, D.E. and Szostak, J.W. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, **34**, 656–665.
34. Tang, J., Shi, H., He, X., Lei, Y., Guo, Q., Wang, K., Yan, L. and He, D. (2016) Tumor cell-specific split aptamers: target-driven and temperature-controlled self-assembly on the living cell surface. *Chem. Commun.*, **52**, 1482–1485.
35. Chen, A., Yan, M. and Yang, S. (2016) Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors. *Trends Anal. Chem.*, **80**, 581–593.
36. Davie, E.W. and Kulman, J.D. (2006) An overview of the structure and the function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.*, **32**, 3–15.
37. Fenton, J.W., Aronson, D.L., Young, A.M. and Finlayson, J.S. (1977) Human thrombins: production, evaluation and properties of alpha-thrombin. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3587–3598.
38. Mohammed, S.F., Whitworth, C., Chuang, H.Y., Lundblad, R.L. and Mason, R.G. (1976) Multiple active forms of thrombin: binding to platelets and effects on platelet function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1660–1663.
39. Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A. and Feigon, J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3745–3749.
40. Tsiang, M., Gibbs, C.S., Griffin, L.C., Dunn, K.E. and Leung, L.K. (1995) Selection of a suppressor mutation that restores affinity of an oligonucleotide inhibitor for thrombin using in vitro genetics. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19370–19376.
41. Wang, K.Y., Krawczyk, S.H., Bischofberger, N., Swaminathan, S. and Bolton, P.H. (1993) The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity. *Biochemistry*, **32**, 11285–11292.
42. Russo Krauss, I., Pica, A., Merlino, A., Mazzarella, L. and Sica, F. (2013) Duplex–quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer. *Acta Crystallogr.*, **69**, 2403–2411.
43. Macaya, R.F., Waldron, J.A., Beutel, B.A., Gao, H., Joesten, M.E., Yang, M., Patel, R., Bertelsen, A.H. and Cook, A.F. (1995) Structural and functional characterization of potent antithrombotic oligonucleotides possessing both quadruplex and duplex motifs. *Biochemistry*, **34**, 4478–4492.
44. Tasset, D.M., Kubik, M.F. and Steiner, W. (1997) Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.*, **272**, 688–698.
45. Stubbs, M.T. and Bode, W. (1995) The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 23–28.
46. Kelly, J.A., Feigon, J. and Yeates, T.O. (1996) Reconciliation of the X-ray and NMR structures of thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.*, **256**, 417–422.
47. Hamaguchi, N., Ellington, A. and Stanton, M. (2001) Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal. Biochem.*, **294**, 126–131.
48. Li, J.J., Fang, X. and Tan, W. (2002) Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 31–40.
49. Deng, B., Lin, Y., Wang, C., Li, F., Wang, Z., Zhang, H., Li, X.-F. and Le, X.C. (2014) Aptamer binding assays for proteins: thrombin example—a review. *Anal. Chim. Acta*, **837**, 1–15.
50. Liu, X., Shi, L., Hua, X., Huang, Y., Su, S., Fan, Q., Wang, L. and Huang, W. (2014) Target-Induced conjunction of split aptamer fragments and assembly with a Water-Soluble conjugated polymer for improved protein detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 3406–3412.
51. Liu, X., Yang, Y., Hua, X., Feng, X., Su, S., Huang, Y., Fan, Q., Wang, L. and Huang, W. (2015) An improved turn-on aptasensor for Thrombin detection using split aptamer fragments and graphene oxide. *Chin. J. Chem.*, **33**, 981–986.
52. Liu, Y., Dong, X. and Chen, P. (2012) Biological and chemical sensors based on graphene materials. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2283–2307.
53. Chen, D., Feng, H. and Li, J. (2012) Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem. Rev.*, **112**, 6027–6053.
54. Duan, W., Wang, X., Wang, H. and Li, F. (2018) Fluorescent and colorimetric dual-mode aptasensor for thrombin detection based on target-induced conjunction of split aptamer fragments. *Talanta*, **180**, 76–80.
55. Wang, H., Wang, Y., Jin, J. and Yang, R. (2008) Gold Nanoparticle-Based colorimetric and “Turn-On” fluorescent probe for Mercury(II) ions in aqueous solution. *Anal. Chem.*, **80**, 9021–9028.
56. Chen, J., Zhang, J., Li, J., Yang, H.-H., Fu, F. and Chen, G. (2010) An ultrasensitive signal-on electrochemical aptasensor via target-induced conjunction of split aptamer fragments. *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 996–1000.
57. Liu, Z., Zhang, W., Hu, L., Li, H., Zhu, S. and Xu, G. (2010) Label-Free and Signal-On electrochemiluminescence aptasensor for ATP based on Target-Induced linkage of split aptamer fragments by using [Ru(phen)₃]²⁺ intercalated into Double-Strand DNA as a probe. *Chem. – Eur. J.*, **16**, 13356–13359.
58. Lin, Z., Chen, L., Zhu, X., Qiu, B. and Chen, G. (2010) Signal-on electrochemiluminescence biosensor for thrombin based on target-induced conjunction of split aptamer fragments. *Chem. Commun.*, **46**, 5563–5565.
59. Fan, T., Du, Y., Yao, Y., Wu, J., Meng, S., Luo, J., Zhang, X., Yang, D., Wang, C., Qian, Y. *et al.* (2018) Rolling circle amplification triggered poly adenine-gold nanoparticles production for label-free electrochemical detection of thrombin. *Sens. Actuat. B Chem.*, **266**, 9–18.
60. Pei, H., Li, F., Wan, Y., Wei, M., Liu, H., Su, Y., Chen, N., Huang, Q. and Fan, C. (2012) Designed diblock oligonucleotide for the synthesis of spatially isolated and highly hybridizable

- functionalization of DNA–gold nanoparticle nanoconjugates. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11876–11879.
61. Zhao, B., Shen, J., Chen, S., Wang, D., Li, F., Mathur, S., Song, S. and Fan, C. (2014) Gold nanostructures encoded by non-fluorescent small molecules in polyA-mediated nanogaps as universal SERS nanotags for recognizing various bioactive molecules. *Chem. Sci.*, **5**, 4460–4466.
 62. Lohmann, K. (1929) Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften*, **17**, 624–625.
 63. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1929) Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science*, **70**, 381–382.
 64. Sassanfar, M. and Szostak, J.W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature*, **364**, 550–553.
 65. Liao, D., Jiao, H., Wang, B., Lin, Q. and Yu, C. (2012) KF polymerase-based fluorescence aptasensor for the label-free adenosine detection. *Analyst*, **137**, 978–982.
 66. He, X., Li, Z., Jia, X., Wang, K. and Yin, J. (2013) A highly selective sandwich-type FRET assay for ATP detection based on silica coated photon upconverting nanoparticles and split aptamer. *Talanta*, **111**, 105–110.
 67. Wang, M., Chen, J., Su, D., Wang, G. and Su, X. (2019) Split aptamer based sensing platform for adenosine deaminase detection by fluorescence resonance energy transfer. *Talanta*, **198**, 1–7.
 68. Tang, X., Wu, K., Zhao, H., Chen, M. and Ma, C. (2018) A label-free fluorescent assay for the rapid and sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibition. *Sensors*, **18**, 2441.
 69. Jin, F., Lian, Y., Li, J., Zheng, J., Hu, Y., Liu, J., Huang, J. and Yang, R. (2013) Molecule-binding dependent assembly of split aptamer and γ -cyclodextrin: a sensitive excimer signaling approach for aptamer biosensors. *Anal. Chim. Acta*, **799**, 44–50.
 70. Zhang, H., Liu, Y., Zhang, K., Ji, J., Liu, J. and Liu, B. (2018) Single molecule fluorescent colocalization of split aptamers for ultrasensitive detection of biomolecules. *Anal. Chem.*, **90**, 9315–9321.
 71. Wang, J., Wang, Y., Liu, S., Wang, H., Zhang, X., Song, X. and Huang, J. (2019) Duplex featured polymerase-driven concurrent strategy for detecting of ATP based on endonuclease-fueled feedback amplification. *Anal. Chim. Acta*, **1060**, 79–87.
 72. You, J., You, Z., Xu, X., Ji, J., Lu, T., Xia, Y., Wang, L., Zhang, L. and Du, S. (2019) A split aptamer-labeled ratiometric fluorescent biosensor for specific detection of adenosine in human urine. *Microchim. Acta*, **186**, 43–50.
 73. Ma, Y., Geng, F., Wang, Y., Xu, M., Shao, C., Qu, P., Zhang, Y. and Ye, B. (2019) Novel strategy to improve the sensing performances of split ATP aptamer based fluorescent indicator displacement assay through enhanced molecular recognition. *Biosens. Bioelectron.*, **134**, 36–41.
 74. Zhou, C., Yu, Z., Yu, W., Liu, H., Zhang, H. and Guo, C. (2019) Split aptamer-based detection of adenosine triphosphate using surface enhanced Raman spectroscopy and two kinds of gold nanoparticles. *Microchim. Acta*, **186**, 251.
 75. Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H.-P. and Yong, K.-T. (2014) Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 3426–3452.
 76. Homola, J., Yee, S.S. and Gauglitz, G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuat. B Chem.*, **54**, 3–15.
 77. Li, F., Zhang, J., Cao, X., Wang, L., Li, D., Song, S., Ye, B. and Fan, C. (2009) Adenosine detection by using gold nanoparticles and designed aptamer sequences. *Analyst*, **134**, 1355–1360.
 78. Melaine, F., Coilhac, C., Roupioz, Y. and Buhot, A. (2016) A nanoparticle-based thermo-dynamic aptasensor for small molecule detection. *Nanoscale*, **8**, 16947–16954.
 79. Sergelen, K., Liedberg, B., Knoll, W. and Dostálek, J. (2017) A surface plasmon field-enhanced fluorescence reversible split aptamer biosensor. *Analyst*, **142**, 2995–3001.
 80. Lu, C., Saint-Pierre, C., Gasparutto, D., Roupioz, Y., Peyrin, E. and Buhot, A. (2017) Linear chain formation of split-aptamer dimers on surfaces triggered by adenosine. *Langmuir*, **33**, 12785–12792.
 81. Park, J.-H., Byun, J.-Y., Shim, W.-B., Kim, S.U. and Kim, M.-G. (2015) High-sensitivity detection of ATP using a localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor and split aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, **73**, 26–31.
 82. Wang, Q., Huang, J., Yang, X., Wang, K., He, L., Li, X. and Xue, C. (2011) Surface plasmon resonance detection of small molecule using split aptamer fragments. *Sens. Actuat. B Chem.*, **156**, 893–898.
 83. Stojanovic, M.N., de Prada, P. and Landry, D.W. (2000) Fluorescent sensors based on aptamer self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11547–11548.
 84. Alkhamis, O., Canoura, J., Yu, H., Liu, Y. and Xiao, Y. (2019) Innovative engineering and sensing strategies for aptamer-based small-molecule detection. *Trends Anal. Chem.*, **121**, 115699.
 85. Cekan, P., Jonsson, E.O. and Sigurdsson, S.Th. (2009) Folding of the cocaine aptamer studied by EPR and fluorescence spectroscopies using the bifunctional spectroscopic probe C. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3990–3995.
 86. Stojanovic, M.N., De Prada, P. and Landry, D.W. (2001) Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4928–4931.
 87. Wu, C., Yan, L., Wang, C., Lin, H., Wang, C., Chen, X. and Yang, C.J. (2010) A general excimer signaling approach for aptamer sensors. *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2232–2237.
 88. He, J.-L., Wu, Z.-S., Zhou, H., Wang, H.-Q., Jiang, J.-H., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q. (2010) Fluorescence aptameric sensor for strand displacement amplification detection of Cocaine. *Anal. Chem.*, **82**, 1358–1364.
 89. Tang, Y., Long, F., Gu, C., Wang, C., Han, S. and He, M. (2016) Reusable split-aptamer-based biosensor for rapid detection of cocaine in serum by using an all-fiber evanescent wave optical biosensing platform. *Anal. Chim. Acta*, **933**, 182–188.
 90. Zhang, Y., Sun, Z., Tang, L., Zhang, H. and Zhang, G.-J. (2016) Aptamer based fluorescent cocaine assay based on the use of graphene oxide and exonuclease III-assisted signal amplification. *Microchim. Acta*, **183**, 2791–2797.
 91. Neves, M.A.D., Reinstein, O. and Johnson, P.E. (2010) Defining a stem length-dependent binding mechanism for the cocaine-binding aptamer. A combined NMR and calorimetry study. *Biochemistry*, **49**, 8478–8487.
 92. Morris, F.D., Peterson, E.M., Heemstra, J.M. and Harris, J.M. (2018) Single-molecule kinetic investigation of cocaine-dependent split-aptamer assembly. *Anal. Chem.*, **90**, 12964–12970.
 93. Li, Q., Wang, Y.-D., Shen, G.-L., Tang, H., Yu, R.-Q. and Jiang, J.-H. (2015) Split aptamer mediated endonuclease amplification for small-molecule detection. *Chem. Commun.*, **51**, 4196–4199.
 94. Zuo, X., Xiao, Y. and Plaxco, K.W. (2009) High specificity, electrochemical sandwich assays based on single aptamer sequences and suitable for the direct detection of small-molecule targets in blood and other complex matrices. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6944–6945.
 95. Zhang, J., Wang, L., Pan, D., Song, S., Boey, F.Y.C., Zhang, H. and Fan, C. (2008) Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures. *Small*, **4**, 1196–1200.
 96. Abnous, K., Danesh, N.M., Ramezani, M., Taghdisi, S.M. and Emrani, A.S. (2018) A novel amplified double-quenching aptasensor for cocaine detection based on split aptamer and silica nanoparticles. *Anal. Methods*, **10**, 3232–3236.
 97. Kolb, H.C., Finn, M.G. and Sharpless, K.B. (2001) Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004–2021.
 98. El-Sagheer, A.H. and Brown, T. (2010) Click chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1388–1405.
 99. Gorska, K. and Winsinger, N. (2013) Reactions templated by nucleic acids: more ways to translate oligonucleotide-based instructions into emerging function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6820–6843.
 100. Sharma, A.K. and Heemstra, J.M. (2011) Small-molecule-dependent split aptamer ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12426–12429.
 101. Sachan, A., Ilgu, M., Kempema, A., Kraus, G.A. and Nilsen-Hamilton, M. (2016) Specificity and ligand affinities of the cocaine aptamer: impact of structural features and physiological NaCl. *Anal. Chem.*, **88**, 7715–7723.
 102. Spiropoulos, N.G. and Heemstra, J.M. (2012) Templating effect in DNA proximity ligation enables use of non-bioorthogonal chemistry in biological fluids. *Artif. DNA PNA XNA*, **3**, 123–128.
 103. Sharma, A.K., Kent, A.D. and Heemstra, J.M. (2012) Enzyme-linked small-molecule detection using split aptamer ligation. *Anal. Chem.*, **84**, 6104–6109.

104. Yu, H., Canoura, J., Guntupalli, B., Lou, X. and Xiao, Y. (2017) A cooperative-binding split aptamer assay for rapid, specific and ultra-sensitive fluorescence detection of cocaine in saliva. *Chem. Sci.*, **8**, 131–141.
105. Roncancio, D., Yu, H., Xu, X., Wu, S., Liu, R., Debord, J., Lou, X. and Xiao, Y. (2014) A label-free aptamer-fluorophore assembly for rapid and specific detection of cocaine in Biofluids. *Anal. Chem.*, **86**, 11100–11106.
106. Yu, H., Canoura, J., Guntupalli, B., Alkhamis, O. and Xiao, Y. (2018) Sensitive detection of small-molecule targets using cooperative binding split aptamers and enzyme-assisted target recycling. *Anal. Chem.*, **90**, 1748–1758.
107. Reinstein, O., Yoo, M., Han, C., Palmo, T., Beckham, S.A., Wilce, M.C.J. and Johnson, P.E. (2013) Quinine binding by the cocaine-binding aptamer. Thermodynamic and hydrodynamic analysis of high-affinity binding of an off-target ligand. *Biochemistry*, **52**, 8652–8662.
108. Pei, R., Shen, A., Olah, M.J., Stefanovic, D., Worgall, T. and Stojanovic, M.N. (2009) High-resolution cross-reactive array for alkaloids. *Chem. Commun.*, **22**, 3193–3195.
109. Neves, M.A.D., Slavkovic, S., Reinstein, O., Shoara, A.A. and Johnson, P.E. (2019) A proof of concept application of aptachain: ligand-induced self-assembly of a DNA aptamer. *RSC Adv.*, **9**, 1690–1695.
110. Wang, J., Cheng, W., Meng, F., Yang, M., Pan, Y. and Miao, P. (2018) Hand-in-hand RNA nanowire-based aptasensor for the detection of theophylline. *Biosens. Bioelectron.*, **101**, 153–158.
111. Silverman, S.K. (2004) Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2701–2706.
112. Silverman, S.K. (2005) In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6151–6163.
113. Lan, T., Furuya, K. and Lu, Y. (2010) A highly selective lead sensor based on a classic lead DNAzyme. *Chem. Commun.*, **46**, 3896–3898.
114. Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 4262–4266.
115. Cuenoud, B. and Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, **375**, 611–614.
116. Silverman, S.K. (2016) Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 595–609.
117. Baum, D.A. and Silverman, S.K. (2008) Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2156–2174.
118. Gong, L., Zhao, Z., Lv, Y.-F., Huan, S.-Y., Fu, T., Zhang, X.-B., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q. (2015) DNAzyme-based biosensors and nanodevices. *Chem. Commun.*, **51**, 979–995.
119. Höbartner, C. and Silverman, S.K. (2007) Recent advances in DNA catalysis. *Biopolymers*, **87**, 279–292.
120. Willner, I., Shlyahovsky, B., Zayats, M. and Willner, B. (2008) DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1153–1165.
121. Mokany, E., Bone, S.M., Young, P.E., Doan, T.B. and Todd, A.V. (2010) MNzymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1051–1059.
122. Mokany, E., Tan, Y.L., Bone, S.M., Fuery, C.J. and Todd, A.V. (2013) MNzyme qPCR with superior multiplexing capacity. *Clin. Chem.*, **59**, 419–426.
123. Ruble, B.K., Richards, J.L., Cheung-Lau, J.C. and Dmochowski, I.J. (2012) Mismatch discrimination and efficient photomodulation with split 10–23 DNAzymes. *Inorganica Chim. Acta*, **380**, 386–391.
124. Huang, P.-J.J. and Liu, J. (2014) Two Pb²⁺-specific DNAzymes with opposite trends in split-site-dependent activity. *Chem. Commun.*, **50**, 4442–4444.
125. Smith, A.L. and Kolpashchikov, D.M. (2017) Divide and control: comparison of split and switch hybridization sensors. *ChemistrySelect*, **2**, 5427–5431.
126. Xie, Y., Niu, F., Yu, A. and Lai, G. (2020) Proximity binding-triggered assembly of two MNzymes for catalyzed release of G-Quadruplex DNAzymes and an ultrasensitive homogeneous bioassay of platelet-derived growth factor. *Anal. Chem.*, **92**, 593–598.
127. Lu, L.-M., Zhang, X.-B., Kong, R.-M., Yang, B. and Tan, W. (2011) A ligation-triggered DNAzyme cascade for amplified fluorescence detection of biological small molecules with zero-background signal. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11686–11691.
128. Sheng, A., Su, L., Jalalah, M., Al-Assiri, M.S., Harraz, F.A. and Zhang, J. (2020) Hydrazone chemistry assisted DNAzyme for the analysis of double targets. *Chem. Commun.*, **56**, 695–698.
129. Chen, J., Pan, J. and Chen, S. (2017) A naked-eye colorimetric sensor for Hg²⁺ monitoring with cascade signal amplification based on target-induced conjunction of split DNAzyme fragments. *Chem. Commun.*, **53**, 10224–10227.
130. Kim, H.N., Ren, W.X., Kim, J.S. and Yoon, J. (2012) Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 3210–3244.
131. Wu, Y., Huang, J., Yang, X., Yang, Y., Quan, K., Xie, N., Li, J., Ma, C. and Wang, K. (2017) Gold nanoparticle loaded split-DNAzyme probe for amplified miRNA detection in living cells. *Anal. Chem.*, **89**, 8377–8383.
132. Travascio, P., Li, Y. and Sen, D. (1998) DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.*, **5**, 505–517.
133. Deng, M., Zhang, D., Zhou, Y. and Zhou, X. (2008) Highly effective colorimetric and visual detection of nucleic acids using an asymmetrically split Peroxidase DNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13095–13102.
134. Nakayama, S. and Sintim, H.O. (2009) Colorimetric split G-Quadruplex probes for nucleic acid sensing: improving reconstituted DNAzyme's catalytic efficiency via probe remodeling. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10320–10333.
135. Deng, M., Feng, S., Luo, F., Wang, S., Sun, X., Zhou, X. and Zhang, X.-L. (2012) Visual detection of rpoB mutations in Rifampin-resistant mycobacterium tuberculosis strains by use of an asymmetrically split peroxidase DNAzyme. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 3443–3450.
136. Shahbazi, N., Hosseinkhani, S. and Ranjbar, B. (2017) A facile and rapid aptasensor based on split peroxidase DNAzyme for visual detection of carcinoembryonic antigen in saliva. *Sens. Actuat. B Chem.*, **253**, 794–803.
137. Zhu, D., Luo, J., Rao, X., Zhang, J., Cheng, G., He, P. and Fang, Y. (2012) A novel optical thrombin aptasensor based on magnetic nanoparticles and split DNAzyme. *Anal. Chim. Acta*, **711**, 91–96.
138. Zhang, X.F., Li, N., Ling, Y., Tang, L., Li, N.B. and Luo, H.Q. (2018) Linked bridge hybridizing-induced split G-quadruplex DNA machine and its application to uracil-DNA glycosylase detection. *Sens. Actuat. B Chem.*, **255**, 2589–2594.
139. Zhou, D., Wu, W., Li, Q., Pan, J. and Chen, J. (2019) A label-free and enzyme-free aptasensor for visual Cd²⁺ detection based on split DNAzyme fragments. *Anal. Methods*, **11**, 3546–3551.
140. Zhou, W., Ding, J. and Liu, J. (2017) Splitting a DNAzyme enables a Na⁺-dependent FRET signal from the embedded aptamer. *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 6959–6966.
141. Zhou, X.-H., Kong, D.-M. and Shen, H.-X. (2010) Ag⁺ and cysteine quantitation based on G-Quadruplex–Hemin DNAzymes disruption by Ag⁺. *Anal. Chem.*, **82**, 789–793.
142. Xu, J., Lee, E.-S., Gye, M.C. and Kim, Y.-P. (2019) Rapid and sensitive determination of bisphenol A using aptamer and split DNAzyme. *Chemosphere*, **228**, 110–116.
143. Luo, Y., Yu, H., Alkhamis, O., Liu, Y., Lou, X., Yu, B. and Xiao, Y. (2019) Label-free, visual detection of small molecules using highly target-responsive multimodule split aptamer constructs. *Anal. Chem.*, **91**, 7199–7207.
144. Hou, T., Li, C., Wang, X., Zhao, C. and Li, F. (2013) Label-free colorimetric detection of coralyne utilizing peroxidase-like split G-quadruplex DNAzyme. *Anal. Methods*, **5**, 4671–4674.
145. Cui, X., Li, R., Liu, X., Wang, J., Leng, X., Song, X., Pei, Q., Wang, Y., Liu, S. and Huang, J. (2018) Low-background and visual detection of antibiotic based on target-activated colorimetric split peroxidase DNAzyme coupled with dual nicking enzyme signal amplification. *Anal. Chim. Acta*, **997**, 1–8.
146. Zhang, R., Wang, Y., Qu, X., Li, S., Zhao, Y., Zhang, F., Liu, S., Huang, J. and Yu, J. (2019) A label-free electrochemical platform for antibiotics detection based on cascade enzymatic amplification coupled with split G-quadruplex DNAzyme. *Analyst*, **144**, 4995–5002.
147. Xiao, X., Zhu, L., He, W., Luo, Y. and Xu, W. (2019) Functional nucleic acids tailoring and its application. *Trends Anal. Chem.*, **118**, 138–157.

148. Sun, Y., Yuan, B., Deng, M., Wang, Q., Huang, J., Guo, Q., Liu, J., Yang, X. and Wang, K. (2018) A light-up fluorescence assay for tumor cell detection based on bifunctional split aptamers. *Analyst*, **143**, 3579–3585.
149. Yuan, B., Zhou, Y., Guo, Q., Wang, K., Yang, X., Meng, X., Wan, J., Tan, Y., Huang, Z., Xie, Q. *et al.* (2016) A signal-on split aptasensor for highly sensitive and specific detection of tumor cells based on FRET. *Chem. Commun.*, **52**, 1590–1593.
150. Lei, Y., Tang, J., Shi, H., Ye, X., He, X., Xu, F., Yan, L., Qiao, Z. and Wang, K. (2016) Nature-Inspired smart DNA Nanodoctor for activatable in vivo cancer imaging and in situ drug release based on recognition-triggered assembly of split aptamer. *Anal. Chem.*, **88**, 11699–11706.
151. Kikuchi, N., Reed, A., Gerasimova, Y.V. and Kolpashchikov, D.M. (2019) Split Dapoxyl aptamer for sequence-selective analysis of nucleic acid sequence based amplification amplicons. *Anal. Chem.*, **91**, 2667–2671.
152. Fatin, M.F., Rahim Ruslinda, A., Gopinath, S.C.B. and Arshad, M.K.Md. (2019) High-performance interactive analysis of split aptamer and HIV-1 Tat on multiwall carbon nanotube-modified field-effect transistor. *Int. J. Biol. Macromol.*, **125**, 414–422.
153. Belal, A.S.F., Ismail, A., Elnaggar, M.M. and Belal, T.S. (2018) Click chemistry inspired copper sulphide nanoparticle-based fluorescence assay of kanamycin using DNA aptamer. *Spectrochim. Acta A*, **205**, 48–54.
154. Li, X.-H., Sun, W.-M., Wu, J., Gao, Y., Chen, J.-H., Chen, M. and Ou, Q.-S. (2018) An ultrasensitive fluorescence aptasensor for carcino-embryonic antigen detection based on fluorescence resonance energy transfer from upconversion phosphors to Au nanoparticles. *Anal. Methods*, **10**, 1552–1559.
155. Zhang, K., Lv, S., Lu, M. and Tang, D. (2018) Photoelectrochemical biosensing of disease marker on p-type Cu-doped Zn_{0.3}Cd_{0.7}S based on RCA and exonuclease III amplification. *Biosens. Bioelectron.*, **117**, 590–596.
156. Chen, X., Lan, J., Liu, Y., Li, L., Yan, L., Xia, Y., Wu, F., Li, C., Li, S. and Chen, J. (2018) A paper-supported aptasensor based on upconversion luminescence resonance energy transfer for the accessible determination of exosomes. *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 582–588.
157. Liu, X., Li, X., Lu, Y., Cao, J. and Li, F. (2018) A split aptamer-based imaging solution for the visualization of latent fingerprints. *Anal. Methods*, **10**, 2281–2286.
158. Alila, K.O. and Baum, D.A. (2011) Modulation of an RNA-branching deoxyribozyme by a small molecule. *Chem. Commun.*, **47**, 3227–3229.
159. Huang, J., He, Y., Yang, X., Wang, K., Quan, K. and Lin, X. (2014) Split aptazyme-based catalytic molecular beacons for amplified detection of adenosine. *Analyst*, **139**, 2994–2997.
160. Liu, J. and Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Anal. Chem.*, **76**, 1627–1632.
161. Ausländer, S., Fuchs, D., Hürlemann, S., Ausländer, D. and Fussenegger, M. (2016) Engineering a ribozyme cleavage-induced split fluorescent aptamer complementation assay. *Nucleic Acids Res.*, **44**, e94.
162. Li, J., He, G., Wang, B., Shi, L., Gao, T. and Li, G. (2018) Fabrication of reusable electrochemical biosensor and its application for the assay of α -glucosidase activity. *Anal. Chim. Acta*, **1026**, 140–146.
163. Liu, H., Yang, J., Li, Z., Xiao, L., Aryee, A.A., Sun, Y., Yang, R., Meng, H., Qu, L., Lin, Y. *et al.* (2019) Hydrogen-bond-induced emission of carbon dots for wash-free nucleus imaging. *Anal. Chem.*, **91**, 9259–9265.
164. Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223–239.
165. Meech, S.R. (2009) Excited state reactions in fluorescent proteins. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2922–2934.
166. Grate, D. and Wilson, C. (1999) Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6131–6136.
167. Kraus, G., Jeon, I., Nilsen-Hamilton, M., Awad, A., Banerjee, J. and Parvin, B. (2008) Fluorinated analogs of malachite green: synthesis and toxicity. *Molecules*, **13**, 986–994.
168. Constantin, T.P., Silva, G.L., Robertson, K.L., Hamilton, T.P., Fague, K., Waggoner, A.S. and Armitage, B.A. (2008) Synthesis of new fluorogenic cyanine dyes and incorporation into RNA fluoromodules. *Org. Lett.*, **10**, 1561–1564.
169. Sando, S., Narita, A. and Aoyama, Y. (2007) Light-up Hoechst–DNA aptamer pair: generation of an aptamer-selective fluorophore from a conventional DNA-Staining dye. *ChemBioChem*, **8**, 1795–1803.
170. Sando, S., Narita, A., Hayami, M. and Aoyama, Y. (2008) Transcription monitoring using fused RNA with a dye-binding light-up aptamer as a tag: a blue fluorescent RNA. *Chem. Commun.*, 3858–3860, doi:10.1039/b808449a.
171. Dolgosheina, E.V., Jeng, S.C.Y., Panchapakesan, S.S.S., Cojocar, R., Chen, P.S.K., Wilson, P.D., Hawkins, N., Wiggins, P.A. and Unrau, P.J. (2014) RNA mango aptamer-fluorophore: a bright, high-affinity complex for RNA labeling and tracking. *ACS Chem. Biol.*, **9**, 2412–2420.
172. Sheng, L., Lu, Y., Deng, S., Liao, X., Zhang, K., Ding, T., Gao, H., Liu, D., Deng, R. and Li, J. (2019) A transcription aptasensor: amplified, label-free and culture-independent detection of foodborne pathogens via light-up RNA aptamers. *Chem. Commun.*, **55**, 10096–10099.
173. Stojanovic, M.N. and Kolpashchikov, D.M. (2004) Modular aptameric sensors. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 9266–9270.
174. Kolpashchikov, D.M. (2005) Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12442–12443.
175. Paige, J.S., Wu, K.Y. and Jaffrey, S.R. (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, **333**, 642–646.
176. Warner, K.D., Chen, M.C., Song, W., Strack, R.L., Thorn, A., Jaffrey, S.R. and Ferré-D’Amaré, A.R. (2014) Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 658–663.
177. Strack, R.L., Disney, M.D. and Jaffrey, S.R. (2013) A superfolder Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nat. Methods*, **10**, 1219–1224.
178. Paige, J.S., Nguyen-Duc, T., Song, W. and Jaffrey, S.R. (2012) Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science*, **335**, 1194–1194.
179. Bhadra, S. and Ellington, A.D. (2014) A Spinach molecular beacon triggered by strand displacement. *RNA*, **20**, 1183–1194.
180. Song, W., Strack, R.L. and Jaffrey, S.R. (2013) Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors. *Nat. Methods*, **10**, 873–875.
181. Pothoulakis, G., Ceroni, F., Reeve, B. and Ellis, T. (2014) The spinach RNA aptamer as a characterization tool for synthetic biology. *ACS Synth. Biol.*, **3**, 182–187.
182. Rogers, T.A., Andrews, G.E., Jaeger, L. and Grabow, W.W. (2015) Fluorescent monitoring of RNA assembly and processing using the split-spinach aptamer. *ACS Synth. Biol.*, **4**, 162–166.
183. Kikuchi, N. and Kolpashchikov, D.M. (2017) A universal split spinach aptamer (USSA) for nucleic acid analysis and DNA computation. *Chem. Commun.*, **53**, 4977–4980.
184. Wang, Z., Luo, Y., Xie, X., Hu, X., Song, H., Zhao, Y., Shi, J., Wang, L., Glinksky, G., Chen, N. *et al.* (2018) In situ spatial complementation of aptamer-mediated recognition enables live-cell imaging of native RNA transcripts in real time. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 972–976.
185. Bertucci, A., Porchetta, A. and Ricci, F. (2018) Antibody-templated assembly of an RNA mimic of green fluorescent protein. *Anal. Chem.*, **90**, 1049–1053.
186. Strack, R.L., Disney, M.D. and Jaffrey, S.R. (2013) A superfolder Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nat. Methods*, **10**, 1219–1224.
187. Filonov, G.S., Moon, J.D., Svensen, N. and Jaffrey, S.R. (2014) Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 16299–16308.
188. Halman, J.R., Satterwhite, E., Roark, B., Chandler, M., Viard, M., Ivanina, A., Bindewald, E., Kasprzak, W.K., Panigaj, M., Bui, M.N. *et al.* (2017) Functionally-interdependent shape-switching nanoparticles with controllable properties. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2210–2220.

189. Chandler, M., Lyalina, T., Halman, J., Rackley, L., Lee, L., Dang, D., Ke, W., Sajja, S., Woods, S., Acharya, S. *et al.* (2018) Broccoli fluorets: split aptamers as a user-friendly fluorescent toolkit for dynamic RNA Nanotechnology. *Molecules*, **23**, 3178.
190. Alam, K.K., Tawiah, K.D., Lichte, M.F., Porciani, D. and Burke, D.H. (2017) A fluorescent split aptamer for visualizing RNA–RNA assembly *in vivo*. *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1710–1721.
191. Torelli, E., Kozyra, J.W., Gu, J.-Y., Stimming, U., Piantanida, L., Voitchovsky, K. and Krasnogor, N. (2018) Isothermal folding of a light-up bio-orthogonal RNA origami nanoribbon. *Sci. Rep.*, **8**, 6989.
192. Karunanayake Mudiyansele, A.P.K.K., Yu, Q., Leon-Duque, M.A., Zhao, B., Wu, R. and You, M. (2018) Genetically encoded catalytic hairpin assembly for sensitive RNA imaging in live cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 8739–8745.
193. Toran, P., Smolina, I., Driscoll, H., Ding, F., Sun, Y., Cantor, C.R. and Broude, N.E. (2014) Labeling native bacterial RNA in live cells. *Cell Res.*, **24**, 894–897.
194. Ma, X., Guo, Z., Mao, Z., Tang, Y. and Miao, P. (2018) Colorimetric theophylline aggregation assay using an RNA aptamer and non-crosslinking gold nanoparticles. *Microchim. Acta*, **185**, 33.
195. Müller, S., Appel, B., Balke, D., Hieronymus, R. and Nübel, C. (2016) Thirty-five years of research into ribozymes and nucleic acid catalysis: where do we stand today? [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, **5**, 1511.
196. Hampel, A. and Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929–4933.
197. Welz, R., Schmidt, C. and Müller, S. (2001) Spermine supports catalysis of hairpin ribozyme variants to differing extents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 648–654.
198. Sullenger, B.A. and Cech, T.R. (1994) Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing. *Nature*, **371**, 619–622.
199. Hasegawa, S., Gowrishankar, G. and Rao, J. (2006) Detection of mRNA in mammalian cells with a split ribozyme reporter. *ChemBioChem*, **7**, 925–928.
200. Gao, W., Xing, B., Tsien, R.Y. and Rao, J. (2003) Novel Fluorogenic substrates for imaging β -lactamase gene expression. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11146–11147.
201. Wang, R., Zhang, Q., Zhang, Y., Shi, H., Nguyen, K.T. and Zhou, X. (2019) Unconventional split aptamers cleaved at functionally essential sites preserve biorecognition capability. *Anal. Chem.*, **91**, 15811–15817.
202. Li, Q., Wang, Y.-D., Shen, G.-L., Tang, H., Yu, R.-Q. and Jiang, J.-H. (2015) Split aptamer mediated endonuclease amplification for small-molecule detection. *Chem. Commun.*, **51**, 4196–4199.
203. He, J.-L., Wu, Z.-S., Zhou, H., Wang, H.-Q., Jiang, J.-H., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q. (2010) Fluorescence aptameric sensor for strand displacement amplification detection of cocaine. *Anal. Chem.*, **82**, 1358–1364.

Selective Chemical Modification of DNA with Boronic Acids by On-Column CuAAC Reactions

Mégane Debiais^a

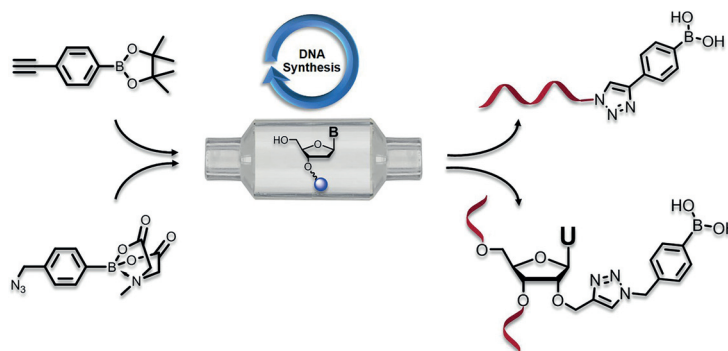
Jean-Jacques Vasseur^a

Sabine Müller^b

Michael Smietana^{*a}

^a Institut des Biomolécules Max Mousseron, University of Montpellier, CNRS, ENCSM, Montpellier, France
michael.smietana@umontpellier.fr

^b University Greifswald, Institute for Biochemistry, Greifswald, Germany



Received: 14.05.2020

Accepted after revision: 15.06.2020

Published online: 14.07.2020

DOI: 10.1055/s-0040-1707194; Art ID: ss-2020-z0261-fa

Abstract The use of the Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction for the preparation of oligonucleotide conjugates is by now familiar. However, the selective introduction of boronic acids into DNA and RNA sequences by CuAAC reactions has long been considered impossible due to the incompatibility of the boronic acid moiety with copper salts. Here we describe two new methods for the selective on-column functionalization of oligonucleotides with boronic acids via two different CuAAC reactions. The first one allows the introduction of a phenylboronic acid at the 5'-extremity of oligonucleotides, while the selective intrastrand positioning of the modification can be achieved with the second one. Both methods were applied to the DNA and RNA series (up to a 20-mer) with good isolated yields and excellent purities. These results illustrate the potential of the reported methods for selective incorporation of boronic acids into oligonucleotides.

Key words CuAAC, boronic acid, oligonucleotide, bioconjugation, DNA, RNA

The widespread properties of boronic acid containing organic compounds has resulted in their use in a large number of applications in various fields, including organic chemistry,¹ medicinal chemistry,² asymmetric synthesis,³ catalysis,⁴ and materials.⁵ Due to their trigonal planar sp^2 -hybridized boron atom bearing two hydroxyl groups and an empty p -orbital, boronic acids can form covalent and reversible complexes with electron-donating centers such as oxygen and nitrogen nucleophiles. In aqueous media, when the pH is higher than the pK_a , this Lewis acid–base reaction results in a rehybridization of the boron atom from sp^2 to sp^3 leading to an anionic tetravalent borate species.⁶ The reversible reaction with 1,2-*cis*-diols leading to cyclic boronate esters has notably been used to create self-organizing systems, sensors, and pH responsive materials.⁷ Given the versatile features of boronic acids, it is therefore not surprising that the incorporation of this moiety into biomole-

cules is currently attracting a lot of attention to develop new bioconjugates endowing new properties. While the site-selective modification of peptides and proteins with boronic acids has made huge strides in recent years,⁸ their incorporation into DNA remains challenging. One of the reasons is that the cornerstone Cu-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction is difficult to apply, given the lack of stability of boronic acids in the presence of copper salts.⁹

Modified oligonucleotides (ONs) are usually obtained either by automated chemical synthesis¹⁰ or by enzymatic chain assembly with appropriately modified phosphoramidite building blocks or modified nucleoside triphosphates, respectively.¹¹ Both approaches have the disadvantage of requiring a multistep synthesis of the modified monomers, which subsequently have to tolerate the reagents and conditions used for the elongation. An attractive alternative is the site-specific postsynthetic conjugation of a desired functionality to a defined reactive group incorporated into the ON.¹² This latter strategy is highly modular, easier to handle, and usually gives better yields.¹³

Considering the broad variety of applications that can be achieved with borono-based DNA in particular in the field of aptamers,¹⁴ the two strategies described above have been applied to introduce a boronic acid moiety into ONs. In the laboratory, we have extensively studied the phosphoramidite approach that led us to develop enzyme-free DNA- and RNA-templated ligation systems with 5'-boronic acid modified oligonucleotides.¹⁵ We have also demonstrated the ability of borono-based ONs to inhibit nucleases including RNase H.¹⁶ Enzymatic polymerization,¹⁷ amide bond formation,¹⁸ and strain-promoted alkyne–azide cycloaddition (SPAAC)¹⁹ have been evaluated as well by other research groups, all of them requiring the prior multistep synthesis of modified nucleosides or solid-phase synthesis of boronic acid reactive species. In this context, the

development of a rapid, efficient, and modular approach for postsynthetic introduction of boronic acid functions into DNA is highly desirable. Herein we report the on-column introduction of phenylboronic acid moieties either at the 5'-extremity or at an internal position of the ONs via two

different CuAAC reactions (Scheme 1): (a) Method 1 involves reaction of a 5'-azido-modified ON with 4-ethynyl-phenylboronic acid pinacol ester **1**, and (b) Method 2 implicates an incorporated 2'-O-propargyluridine and 4-(azidomethyl)phenylboronic acid MIDA ester **2**.

Biographical Sketches



Mégane Debiais obtained her Master degree in 2017 from the University of Bordeaux with a specialization in organic chemistry. She did her research placement at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) in Bordeaux

within the ChemBioPharm team under the guidance of Dr. Valérie Desvergnès. She then moved to Montpellier to carry out her Ph.D. under the supervision of Prof. Michael Smietana in the ChemBioNAC team at the Institute of Biomolecules Max

Mousseron (IBMM). Her research is focused on developing new programmable boronic acid based split DNAzymes for molecular recognition and on boronic acid based assembly.



Jean-Jacques Vasseur received his Ph.D. in 1988 from the University of Montpellier, France working on the reactivity of DNA apurinic sites under the guidance of Prof. Jean-Louis Imbach. From 1990 to 1992, he was a visiting scientist at IONIS Pharmaceuticals in Carlsbad, CA (USA) where he developed oligonucleotide analogues without a phosphorus backbone. In 1993, he returned to Montpelli-

er and was promoted Research Director at the CNRS in 1998. For the past 20 years, Dr J.-J. Vasseur was the team leader of the 'Modified Oligonucleotides' team, now known as ChemBioNAC at the University of Montpellier. He just recently handed over this role to Prof M. Smietana and is currently vice-director of the Max Mousseron Institute of Biomolecules (IBMM) in Montpellier (France). In 2020,

he was elected vice-president of the International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IS3NA). He co-authored more than 250 publications on various aspects of nucleic acid chemistry focusing notably on the design of chemically modified DNAs and RNAs and their conjugates for therapeutic and diagnostic applications.



Sabine Müller is Full Professor for Biochemistry/Bioorganic Chemistry at University Greifswald, Germany. Having obtained her academic degrees from Humboldt University Berlin, she spent one and a half year as a postdoc at the MRC in Cambridge, UK, and then took up a group leader position again at Humboldt University. After

finishing her Habilitation in 2003, she moved to the Ruhr University Bochum, Germany, where she was a Professor for Bioorganic Chemistry, before taking up her present appointment at University Greifswald in 2006. Prof. Müller has received scientific awards, including a Heisenbergstipendium of the Deutsche Forschungsgemein-

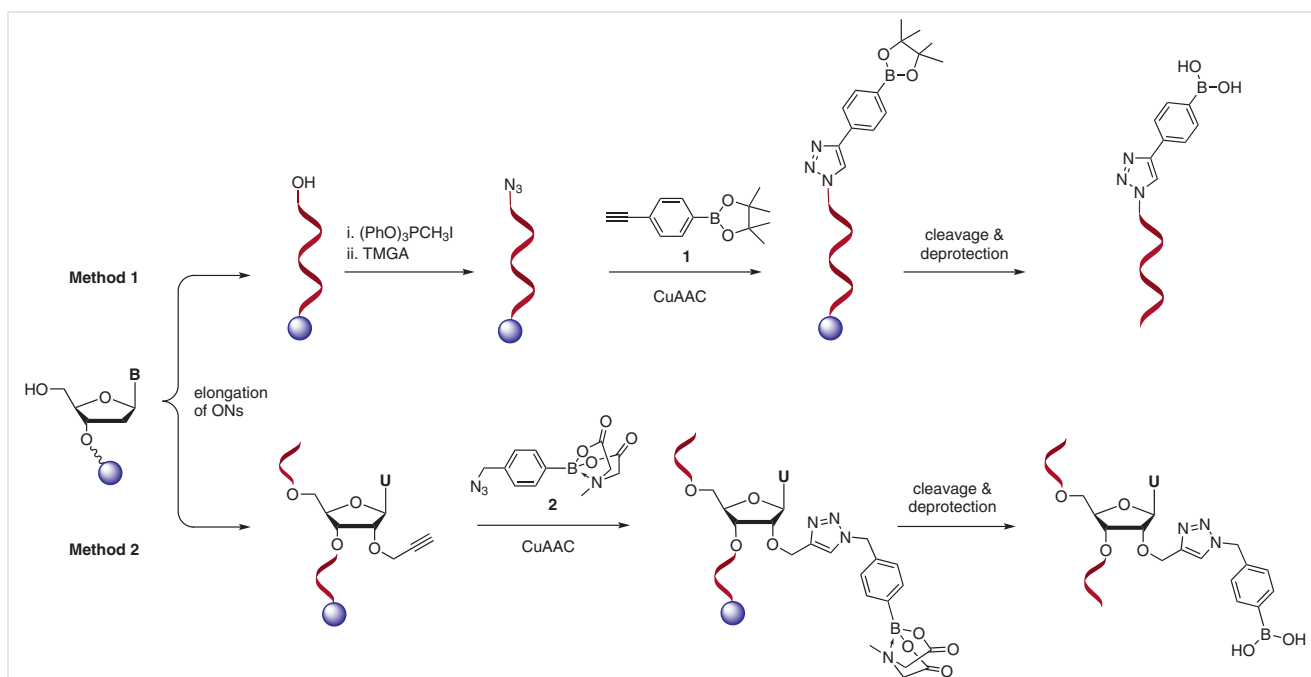
schaft (DFG). She is a member of the Leibniz-Societät der Wissenschaften zu Berlin and of AcademiaNet. Her research interests are centered around the chemistry and biochemistry of nucleic acids with a special focus on functional RNAs and the Origin of Life.



Prof. Michael Smietana was educated at the Ecole Normale Supérieure in Paris. He received his Ph.D. in 2001 from the University of Strasbourg under the guidance of the late Dr Charles Mioskowski. He then moved to Stanford University with a WHO Postdoctoral Fellowship to join Prof. Eric Kool's group. In 2004,

he moved to the University of Montpellier as an Assistant Professor working in the Nucleic Acids Department of the Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM). He was appointed Associate Professor in 2010 and Full Professor in 2012. In 2018 he received the Jean-Marie Lehn award from the

Organic Chemistry Division of the French Chemical Society. Since 2020 he leads the ChemBioNAC team at IBMM. His current research interests focus on molecular recognition, DNA-based asymmetric catalysis, and nucleic acid bioconjugates.



Scheme 1 Schematic illustration of on-column CuAAC conjugation of boronic acids. Blue spheres represent the CPG solid-support. *Reagents and conditions:* Method 1: (i) $(\text{PhO})_3\text{PCH}_2\text{I}$ (500 equiv), DMF, rt, 15 min; (ii) TMGA (300 equiv), MeCN, 60 °C, 1.5 h. CuAAC: **1** (8 equiv), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 equiv), sodium ascorbate (5 equiv), THPTA (3 equiv), MeCN/ H_2O (4:6), 60 °C, 1 h. Method 2: CuAAC: **2** (20 equiv), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 equiv), sodium ascorbate (5 equiv), THPTA (3 equiv), dioxane/MeCN/ H_2O (3:1:6), MW 60 °C, 2 h. Cleavage and deprotection: NH_4OH , 55 °C, 5 h (for DNA synthesis); 1 M DBU in MeCN, rt, 3 min, NH_4OH , 37 °C, 3 h (for RNA synthesis).

The insertion of Cu(I) between carbon–boron bonds is a well-documented side reaction that can hamper the efficacy of the CuAAC reaction.²⁰ This observation has led many research groups to consider that the selective labeling of DNA with boronic acid was incompatible with the CuAAC reaction,^{18b,19b} although various groups including ours have shown that appropriately protected boronic acids can be successfully used with CuAAC reactions in the context of small molecule synthesis.^{9,21}

Inspired by these results, we started our study by evaluating the possibility of performing the on-column attachment of commercially available 4-ethynylphenylboronic acid pinacol ester **1** at the 5'-extremity of DNA sequences (Scheme 1, Method 1). 5'-Azido-modified sequences were obtained following the two-step protocol developed by Kool and co-workers.²² All the oligonucleotides were prepared using standard phosphoramidite chemistry on a DNA synthesizer with removal of the terminal DMT group. The 5'-terminal hydroxyl groups were then converted into the corresponding 5'-iodide via the on-column reaction with $(\text{PhO})_3\text{PCH}_2\text{I}$ in DMF for 15 min at rt. The conversion of 5'-iodides into 5'-azides proceeded to completion by on-column reaction with a solution of tetramethylguanidinium azide (TMGA) in acetonitrile for 90 min at 60 °C. Excess of TMGA was removed by washing the column with a sodium bisulfite solution. In each step, a syringe with the reagent was fitted to one end of the DNA synthesis column containing

the CPG-bound ODN and an empty syringe was fitted to the other end; 1 mL of reagent was passed through the column from one syringe to the other for the appropriate time before putting the column on a shaker at the appropriate temperature.

The CuAAC reaction conditions were optimized for the tetranucleotide (5'- N_3dTCCG -3') until full conversion was observed by HPLC analysis with no noticeable formation of byproducts after cleavage from the support. A control experiment was run using 5'- N_3dTCCG -3' and 8 equiv of 4-ethynylphenylboronic acid, the deprotected analogue of **1**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 equiv), sodium ascorbate (5 equiv), and tris(benzyltriazolylmethyl)amine (THPTA, 3 equiv) for 60 min at 60 °C in a MeCN/ H_2O mixture. The resulting CPG support was then washed with a saturated solution of EDTA and **ODN1** was cleaved off the support by addition of a concentrated aqueous solution of ammonia. MALDI-TOF MS analysis confirmed that the boronic acid was fully oxidized to the corresponding phenol moiety under these conditions (Table 1, entry 1). While surprising at first, a literature survey revealed a similar observation made by Hu, Wang, and co-workers in their copper-catalyzed base-mediated oxidative hydroxylation of arylboronic acids under aqueous conditions.²³ In contrast, the use of 4-ethynylphenylboronic acid pinacol ester **1** under otherwise identical conditions led to the postsynthetic modification of **ODN2** by a phenyl-

boronic acid moiety with 93% conversion without noticeable degradation of the boronic acid moiety (Table 1, entry 2).

RP-HPLC spectra of the crude product after three steps and deprotection/cleavage from the solid support showed very little amount of the starting material, indicating complete conversion in all the reactions. This also confirmed the removal of the pinacol protecting group by concentrated aqueous ammonia.^{15c} Following RP-HPLC purification, the modified **ODN2** was isolated in 34% yield and an excellent purity as shown by RP-HPLC analysis. The RP-HPLC spectrum of **ODN1** and **ODN2** showed very close retention times (<1.0 min span). In MALDI-TOF analysis, a single peak at m/z 1291.82 Da (calcd m/z = 1291.94 Da) was observed for the oxidized sequence **ODN1**, whereas peaks at m/z = 1318.91 and 1475.12 Da corresponding to $[M - H]^-$ (calcd m/z = 1318.75 Da) and $[M + \text{citrate} - 2\text{H}_2\text{O} - H]^-$ (calcd m/z = 1475.85 Da), were observed for **ODN2** in accordance with fragmentations and adducts that typically appear with boronic acid modified oligonucleotides (Figure 1).^{15c,17b,18b}

Encouraged by these results, we evaluated the method on sequences varying in length and nature of the residue at the 5'-end. As the length of the sequences increased, we observed a decrease in the conversions and isolated yields as exemplified with the 17-mer **ODN5**, which was obtained with 55% conversion and 8% isolated yield after purification (Table 1, entry 5). The seemingly low isolated yields are actually not that low considering that they are calculated on 1 μmol scale after automated synthesis (16 cycles), four reaction steps, deprotection, and purification by RP-HPLC. In fact, the isolated yields are similar to previously reported syntheses using 5'-azido ONs²⁴ and far superior to the mini-

num guaranteed yields provided by major market suppliers for pure custom oligonucleotides (usually less than 50 nmol are guaranteed for modified ONs 10–19mer on a 1 μmol scale purified by RP-HPLC). Replacement of 5'-thymidine by 5'-cytidine resulted in similarly good conversions but slightly lower isolated yields (Table 1, entries 6–8). Finally, the method was successfully applied to a hexameric RNA sequence leading to the 5'-boronic acid modified **ORN1** with 90% conversion and 20% isolated yield (Table 1, entry 9).

The successful conjugation of boronic acids at the 5'-extremity of ONs prompted us to evaluate their incorporation inside oligonucleotide strands (Scheme 1, Method 2). Commercially available 2'-*O*-propargyluridine phosphoramidite was used to prepare CPG-bound oligonucleotides (DMT-off). The partner 4-(azidomethyl)phenylboronic acid MIDA ester **2**, was synthesized in two steps starting from commercially available 4-(hydroxymethyl)phenylboronic acid (**3**). The boronic acid moiety was first protected as a *N*-methyliminodiacetic acid (MIDA) boronate ester under Dean-Stark conditions affording the corresponding derivative **4** in 98% yield. MIDA was selected for its stability and facile

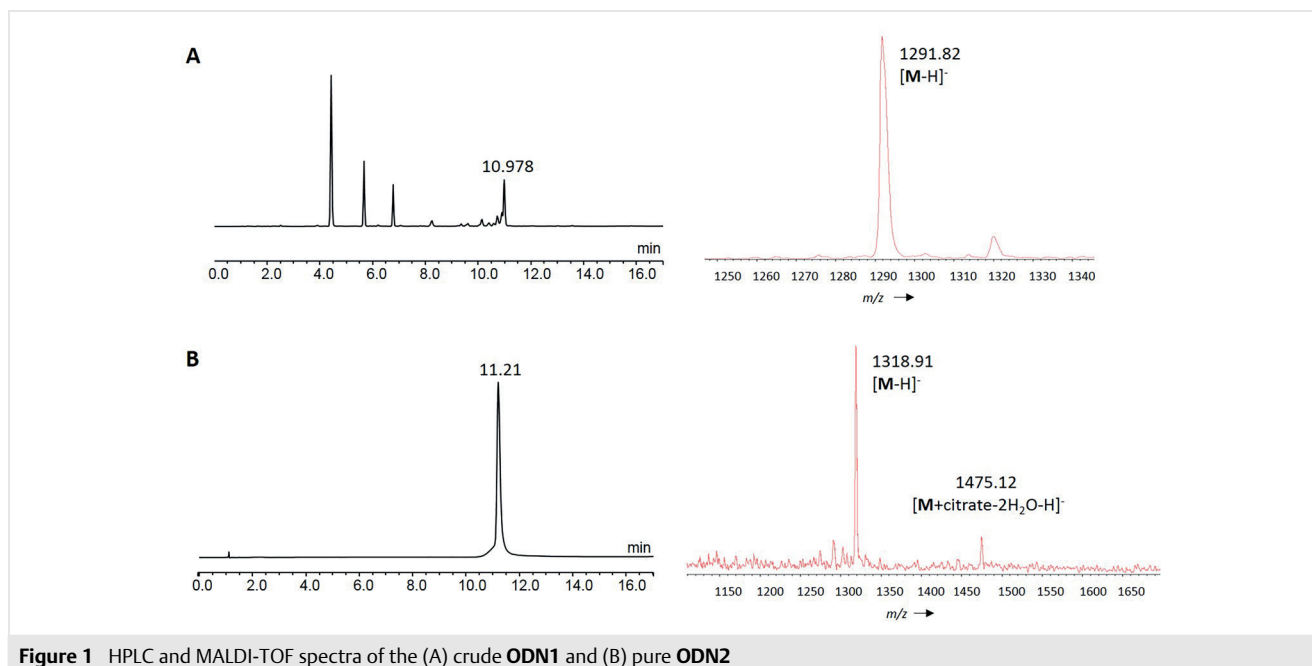
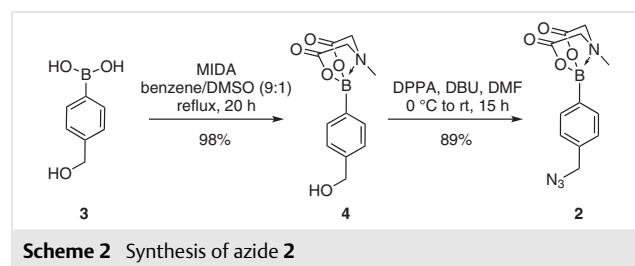


Table 1 On-column CuAAC Reaction with DNA and RNA Sequences

Entry	Name	Sequence 5' → 3' ^a	Conversion (%) ^b	Yield (nmol) (%) ^c
1	ODN1	Ph ^{OH} -d(TCCG)	–	–
2	ODN2	Ph ^{Bn} -d(TCCG)	93	348.6 (34%)
3	ODN3	Ph ^{Bn} -d(TCTCCG)	95	145.8 (15%)
4	ODN4	Ph ^{Bn} -d(TCTCTCCG)	93	148.7 (15%)
5	ODN5	Ph ^{Bn} -d(TACAACGACTCTCTCCG)	55	77.1 (8%)
6	ODN6	Ph ^{Bn} -d(CCG)	95	98.9 (10%)
7	ODN7	Ph ^{Bn} -d(CTCCG)	95	141.5 (14%)
8	ODN8	Ph ^{Bn} -d(CTCTCCG)	97	61.5 (6%)
9	ORN1	Ph ^{Bn} -r(UCUCCA) ^d	90	200.7 (20%)
10	ODN9	U ^{PhBn} d(CCAGCTGACCG)	95	236.6 (24%)
11	ODN10	d(GCCAGCU ^{PhBn} GACCG)	66	111.6 (11%)
12	ORN2	r(U ^{PhBn} CCAGCUGACCA) ^d	69	86.0 (9%)
13	ODN11	d(ACTTGGTTU ^{PhBn} AGGTAATGAGT)	48	70.47 (7%)

^a Ph^{OH} and Ph^{Bn} refer respectively to a phenol or a phenylboronic acid moiety linked to the 5'-extremity. U^{PhBn} refers to a phenylboronic acid moiety linked to the 2'-position of a uridine residue.

^b Determined by RP-HPLC.

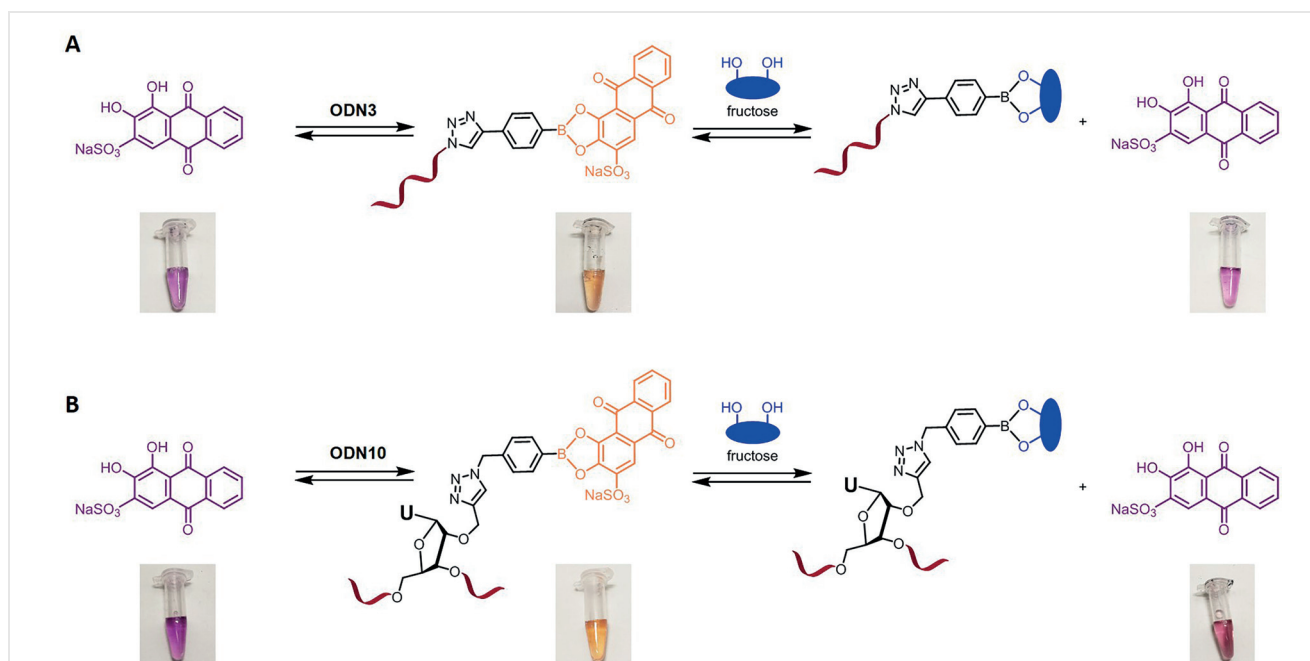
^c Isolated yields based on 1 μmol scale.

^d RNA synthesis performed with 2'-O-PivOM residues.^{24,28}

deprotection under basic conditions.²⁵ The azidation of **4** was obtained in one step using diphenyl phosphoryl azide (DPPA) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in DMF to afford the desired azide **2** in 89% yield (Scheme 2).

The Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction was then carried out on-column by mixing the repre-

sentative ONs with azide **2** (20 equiv) in MeCN/dioxane (2:8) mixture in the presence of a freshly prepared aqueous solution of CuSO₄·5H₂O (1 equiv), sodium ascorbate (5 equiv), and THPTA (3 equiv), and by heating the mixture for 120 min at 60 °C under microwave irradiation (Scheme 1, Method 2). The resulting CPG supports were then washed



Scheme 3 Naked-eye detection of the formation of DNA-ARS and DNA-fructose complexes formed in situ. (A) **ODN3**; (B) **ODN10**; (ARS, 0.1 mM; DNA, 0.6 mM, in 40% DMSO/PBS buffer (pH 7.7) at 25 °C).

with a saturated solution of EDTA, treated with aqueous ammonia and purified by preparative RP-HPLC, leading to the corresponding conjugated oligonucleotides. The boronic acid moiety could be positioned successfully either at the extremity of a sequence or inside the DNA strand although in the latter case we observed a decrease of the overall isolated yield, probably due to steric hindrance (Table 1, entries 10 and 11). The method is equally compatible with RNA sequences although the isolated yields are lower than in the DNA series (Table 1, entry 12). To further demonstrate the applicability of borono-modified sequences in the field of aptamers, the 20-mer **ODN11** containing the core sequence of the tobramycin aptamer, used notably for the detection of this aminoglycoside antibiotic in milk and human serum samples,²⁶ was obtained with 48% conversion and 7% isolated yield (Table 1, entry 13).

Finally, to further prove the presence of the boronic acid moiety in the modified sequences, we performed a colorimetric displacement assay with Alizarin red S (ARS). Indeed, the combination of this dye with boronic acids is well known for the detection of various analytes.²⁷ The binding of the boronic acid to ARS induces a significant color change from purple to yellow within a few seconds, which can be readily visualized by the naked eye (Scheme 3). The addition of 100 equiv of fructose results, in less than 1 min, in the displacement of the ARS dye and the formation of a DNA-fructose complex, which ultimately restores the purple color.

In conclusion, we have described the first successful use of CuAAC reactions as a convenient strategy for postsynthetic on-column conjugation of oligonucleotides with boronic acids. The phenylboronic acid moiety could be selectively positioned either at the 5'-extremity or at an internal position of ONs by the use of the appropriately protected 4-ethynyl- or 4-(azidomethyl)phenylboronic acid. The functionalized oligonucleotide products were obtained after preparative HPLC in good isolated yields and excellent purities in both the DNA and the RNA series. The demonstrated practicability of this new procedure for postsynthetic modification of oligonucleotides with boronic acids increases significantly the repertoire of possible DNA and RNA conjugation chemistries and will undoubtedly find use for the design of functional ONs.

Commercially available reagents were used as received. Pyridine was distilled on CaH₂. The reaction mixtures were monitored by TLC using silica gel plates (Merck) with fluorescent indicator ($\lambda = 254$ nm). The purification of the products was performed by flash column chromatography using silica gel 60 (43–63 μ m) from Merck-Millipore. NMR analyses were made on a Bruker spectrometer 400 MHz at 20 °C and are referenced to the residual solvent resonance as the internal standard (CD₃CN $\delta = 1.94$ for ¹H NMR and CD₃CN $\delta = 1.32$ and 118.26 for ¹³C NMR). HRMS were recorded on a Micromass Q-TOF spectrometer with an electrospray ionization (ESI) in negative or positive mode. All the oligonucleotide syntheses were conducted on an ABI 394

DNA/RNA synthesizer by classical phosphoramidite chemistry with commercial phosphoramidites and CPG (Control Pore Glass) solid support using standard conditions. Crude sequences were purified by semi-preparative HPLC Dionex 600 in reverse phase with a gradient of buffer B (triethylammonium acetate (TEAAc) 0.05 M + 80% MeCN) in buffer A (TEAAc 0.05 M + 1% MeCN) at 30 °C at a flow rate of 4 mL/min. Purified DNA samples were analyzed by analytic HPLC with a gradient of buffer B (TEAAc 0.05 M + 80% MeCN) in buffer A (TEAAc 0.05 M + 1% MeCN) at a flow of 1 mL/min. MALDI-TOF mass spectra were recorded on an Axima assurance spectrometer (Shimadzu Biotech) using 1 μ L of purified DNA sample mixed with 5 μ L of a 6-aza-2-thiothymine (ATT) saturated matrix and ammonium citrate (0.1 M) as co-matrix. Samples were then spotted on a stainless steel plate and air dried before analysis. Reactions under microwave irradiation were realized on a monowave 400 (Anton Paar) in G10 reaction flask with a power of 850 W and a speed of 400 t/min.

4-(Hydroxymethyl)phenylboronic Acid MIDA Ester 4

An oven-dried flask topped with a Dean–Stark apparatus and condenser was charged sequentially with 4-(hydroxymethyl)phenylboronic acid (**3**; 200 mg, 1.32 mmol), MIDA (387 mg, 2.63 mmol), anhyd benzene (2.7 mL), and DMSO (0.3 mL). The Dean–Stark trap was filled with benzene and the resulting mixture was heated at reflux for 20 h (reaction monitored by TLC). The solution was cooled to rt, concentrated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by flash column chromatography (silica gel, EtOAc/acetone 8:2) to provide compound **4** (340 mg, 98%); *R*_f = 0.35 (EtOAc/acetone 8:2)

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta = 2.49$ (s, 3 H), 3.91 (d, *J* = 17.2 Hz, 2 H), 4.11 (d, *J* = 17.2 Hz, 2 H), 4.57 (s, 2 H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): $\delta = 41.4, 62.8, 64.6, 127.2, 133.5, 144.2, 169.6$.

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN): $\delta = 11.59$.

HRMS (ESI+): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₄NO₃B: 264.1043; found: 264.1039.

4-(Azidomethyl)phenylboronic Acid MIDA Ester 2

Compound **4** (200.0 mg, 0.76 mmol) was dissolved in anhyd DMF (4 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C and treated by dropwise addition of DPPA (212 μ L, 0.91 mmol) and DBU (136 μ L, 0.91 mmol). The mixture was stirred at rt for 15 h (monitored by TLC). After addition of EtOAc, the organic layer was extracted with water (3 \times 5 mL), dried (anhyd Na₂SO₄), and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, EtOAc/acetone 8:2) to afford compound **2** (195.0 mg, 89%) as a white solid; *R*_f = 0.50 (EtOAc/acetone 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta = 2.50$ (s, 3 H), 3.90 (d, *J* = 17.2 Hz, 2 H), 4.08 (d, *J* = 17.2 Hz, 2 H), 4.41 (s, 2 H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): $\delta = 48.5, 55.1, 62.9, 128.9, 133.9, 138.9, 169.6$.

¹¹B NMR (128 MHz, CD₃CN): $\delta = 11.44$.

HRMS (ESI+): *m/z* [M – N₂ + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₃N₄O₄B: 261.1043; found: 261.1071.

On-Column Iodination

Upon completion of the syntheses of the desired sequences (DMT-off), the columns were removed from the synthesizer and 1 mL syringes were fitted to each end. A solution of (PhO)₃PCH₃I (1 mL; 0.5 M

in anhyd DMF; 500 μmol) was then passed through the column at rt for 15 min. The column was then washed with DCM (10 mL), MeCN (10 mL), and DCM (10 mL), and eventually dried under argon.

On-Column Azidation

The column containing the 5'-iodo oligodeoxyribonucleotide bound to a CPG resin was fitted in each end by 1 mL syringes. A solution of TMGA (1 mL; 0.3 M in anhyd MeCN; 300 μmol) was then passed through the column 10 to 15 times before placing the column in an oven at 60 °C for 90 min. The column was then washed with MeCN (10 mL), sodium bisulfite soln (5 mL), DCM (5 mL), and MeCN (5 mL), and dried under argon.

On-Column CuAAC Reactions

Incorporation of Alkyne-Boronic Acid 1

All solutions were freshly prepared and degassed with argon bubbling. The column containing the 5'-azido oligodeoxyribonucleotide bound to a CPG resin was fitted in each end by 1 mL syringes. 1 mL of a solution containing boronic acid **1** (80 μL ; 0.1 M in MeCN; 8 μmol), THPTA (30 μL ; 0.1 M in water; 3 μmol), CuSO_4 (25 μL ; 0.04 M in water; 1 μmol), and sodium ascorbate (50 μL ; 0.1 M in water; 5 μmol) was then passed through the column 10 to 15 times before putting the column in a shaker at 60 °C for 60 min. The column was then washed with aq EDTA disodium salt (5 mL) and MeCN (5 mL) and dried under argon.

Incorporation of Azide-Boronic Acid 2

All solutions were freshly prepared and degassed with argon bubbling. Protected oligodeoxyribonucleotide attached to CPG beads was placed into a 10-mL reaction flask (G10). THPTA (30 μL ; 0.1 M in water; 3 μmol) and boronic acid **2** (200 μL ; 0.1 M in dioxane/MeCN 8:2; 20 μmol), CuSO_4 (25 μL ; 0.04 M in water; 1 μmol), and sodium ascorbate (50 μL ; 0.1 M in water; 5 μmol) were added and the resulting mixture was then stirred for 120 min at 60 °C under microwave irradiation (power: 850 W, speed: 400 t/min).²⁹ The beads were then successively washed with aq EDTA disodium salt (5 mL) and MeCN (5 mL), and eventually dried under argon. **ODN11** was obtained using boronic acid **2** (100 μmol) after 180 min under microwave irradiation at 60 °C.

Deprotection, Analysis, and Purification of Oligonucleotides

Deprotection and cleavage of the DNA sequences from the solid support was achieved upon mixing with concd NH_4OH at 55 °C for 5 h.

Deprotection and cleavage of the RNA sequences from the solid support, on the other hand, was possible after passing 1 M DBU in MeCN soln through the column for 3 min before treating the beads with concd NH_4OH at 37 °C for 3 h.

Funding Information

The Agence Nationale de la Recherche and the Deutsche Forschungsgemeinschaft are gratefully acknowledged for financial support (ANR PCRI 'TEMPLAR'-16-CE92- 0010-01; DFG MU1396/11).

Supporting Information

Supporting information for this article is available online at <https://doi.org/10.1055/s-0040-1707194>.

References

- (a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457. (b) Fyfe, J. W. B.; Watson, A. J. B. *Chem* **2017**, *3*, 31.
- (a) Trippier, P. C.; McGuigan, C. *MedChemComm* **2010**, *1*, 183. (b) António, J. P. M.; Russo, R.; Carvalho, C. P.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3513. (c) Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1375.
- (3) Paranjee, K.; Gopal, L. K.; Surendra Kumar, N. *Curr. Org. Synth.* **2017**, *14*, 665.
- (4) Hall, D. G. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3475.
- (5) Fujita, N.; Shinkai, S.; James, T. D. *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1076.
- (6) Hall, D. G. *In Boronic Acids* 2011; pp. 1.
- (7) (a) Stubelius, A.; Lee, S.; Almutairi, A. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 3108. (b) Marco-Dufort, B.; Tibbitt, M. W. *Mater. Today* **2019**, *12*, 16. (c) Zhai, W.; Sun, X.; James, T. D.; Fossey, J. S. *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 1836. (d) Bull, S. D.; Davidson, M. G.; Van den Elsen, J. M. H.; Fossey, J. S.; Jenkins, A. T. A.; Jiang, Y. B.; Kubo, Y.; Marken, F.; Sakurai, K.; Zhao, J.; James, T. D. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 312.
- (8) Akgun, B.; Hall, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13028.
- (9) Dai, C. F.; Cheng, Y. F.; Cui, J. M.; Wang, B. H. *Molecules* **2010**, *15*, 5768.
- (10) (a) Gramlich, P. M. E.; Wirges, C. T.; Manetto, A.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350. (b) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388.
- (11) Burgess, K.; Cook, D. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047.
- (12) (a) Ivancová, I.; Leone, D.-L.; Hocek, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 136. (b) Weisbrod, S. H.; Marx, A. *Chem. Commun.* **2008**, 5675.
- (13) Mansot, J.; Aubert, S.; Duchemin, N.; Vasseur, J. J.; Arseniyadis, S.; Smietana, M. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2875.
- (14) (a) Li, M.; Lin, N.; Huang, Z.; Du, L.; Altier, C.; Fang, H.; Wang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12636. (b) Su, L.; Chen, T.; Xue, T.; Sheng, A.; Cheng, L.; Zhang, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 7650.
- (15) (a) Luvino, D.; Baraguey, C.; Smietana, M.; Vasseur, J. J. *Chem. Commun.* **2008**, 2352. (b) Martin, A. R.; Mohanan, K.; Luvino, D.; Floquet, N.; Baraguey, C.; Smietana, M.; Vasseur, J. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4369. (c) Martin, A. R.; Barvik, I.; Luvino, D.; Smietana, M.; Vasseur, J.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4193. (d) Barbeyron, R.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 542. (e) Gimenez Molina, A.; Barvik, I.; Müller, S.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8824.
- (16) (a) Reverte, M.; Barvik, I.; Vasseur, J. J.; Smietana, M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8204. (b) Reverte, M.; Vaissiere, A.; Boisguerin, P.; Vasseur, J. J.; Smietana, M. *ACS Sensors* **2016**, *1*, 970. (c) Reverte, M.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10604.
- (17) (a) Lin, N.; Yan, J.; Huang, Z.; Altier, C.; Li, M. Y.; Carrasco, N.; Suyemoto, M.; Johnston, L.; Wang, S. M.; Wang, Q.; Fang, H.; Caton-Williams, J.; Wang, B. H. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1222. (b) Yang, X.; Dai, C.; Molina, A. D. C.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1073.
- (18) (a) Hargrove, A. E.; Ellington, A. D.; Anslyn, E. V.; Sessler, J. L. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 388. (b) Steinmeyer, J.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 431.
- (19) (a) Dai, C.; Wang, L.; Sheng, J.; Peng, H.; Draganov, A. B.; Huang, Z.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3598. (b) Gordon, C. K. L.; Wu, D.; Pusuluri, A.; Feagin, T. A.; Csordas, A. T.; Eisenstein, M. S.; Hawker, C. J.; Niu, J.; Soh, H. T. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 2652.
- (20) (a) Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Li, R.; Bonne, D.; Clark, C. G.; Lam, P. Y. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3863. (b) Lam, P. Y. S.;

- Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M. T.; Combs, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2941.
- (21) (a) Luvino, D.; Amalric, C.; Smietana, M.; Vasseur, J. J. *Synlett* **2007**, *19*, 3037. (b) Scrafton, D. K.; Taylor, J. E.; Mahon, M. F.; Fossey, J. S.; James, T. D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2871. (c) Jin, S.; Choudhary, G.; Cheng, Y.; Dai, C.; Li, M.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2009**, 5251. (d) Mothana, S.; Grassot, J.-M.; Hall, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2883. (e) Caselli, E.; Romagnoli, C.; Vahabi, R.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A.; Prati, F. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5445.
- (22) (a) Miller, G. P.; Kool, E. T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3599. (b) Miller, G. P.; Kool, E. T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2404.
- (23) (a) Xu, J.; Wang, X.; Shao, C.; Su, D.; Cheng, G.; Hu, Y. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1964. (b) Inamoto, K.; Nozawa, K.; Yonemoto, M.; Kondo, Y. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11775.
- (24) Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 3624.
- (25) Knapp, D. M.; Gillis, E. P.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6961.
- (26) Yan, S.; Lai, X.; Wang, Y.; Ye, N.; Xiang, Y. *Food Chem.* **2019**, 295, 36.
- (27) (a) Sun, X.; Odyniec, M. L.; Sedgwick, A. C.; Lacina, K.; Xu, S.; Qiang, T.; Bull, S. D.; Marken, F.; James, T. D. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 1058. (b) Sun, X.; Lacina, K.; Ramsamy, E. C.; Flower, S. E.; Fossey, J. S.; Qian, X.; Anslyn, E. V.; Bull, S. D.; James, T. D. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2963.
- (28) Lavergne, T.; Bertrand, J. R.; Vasseur, J. J.; Debart, F. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9135.
- (29) Bouillon, C.; Meyer, A.; Vidal, S.; Jochum, A.; Chevolot, Y.; Cloarec, J. P.; Praly, J. P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700.

DNAzymes

Boronic Acid-Mediated Activity Control of Split 10–23 DNAzymes

Mégane Debiais,^[a] Amandine Lelievre,^[b] Jean-Jacques Vasseur,^[a] Sabine Müller,*^[b] and Michael Smietana*^[a]

Abstract: The 10–23 DNAzyme is an artificially developed Mg²⁺-dependent catalytic oligonucleotide that can cleave an RNA substrate in a sequence-specific fashion. In this study, new split 10–23 DNAzymes made of two nonfunctional fragments, one of which carries a boronic acid group at its 5' end, while the other has a ribonucleotide at its 3' end, were designed. Herein it is demonstrated that the addition

of Mg²⁺ ions leads to assembly of the fragments, which in turn induces the formation of a new boronate internucleoside linkage that restores the DNAzyme activity. A systematic evaluation identified the best-performing system. The results highlight key features for efficient control of DNAzyme activity through the formation of boronate linkages.

Introduction

The spontaneous and reversible reaction between boronic acids and *cis*-diols leading to the formation of cyclic boronate esters has been comprehensively investigated^[1] and has found widespread use for biomedical,^[2] sensing,^[3] materials,^[4] and supramolecular applications.^[5] This reaction is notably characterized by the ability of boronic acids to operate in aqueous media, and by the reactivity of the boron atom, which can be either sp²- or sp³-hybridized depending on the addition of a Lewis base.^[6]

In this context, we recently developed reversible DNA- and RNA-templated boronate-formation systems operating through the reaction of two oligonucleotide fragments, one of which has a boronic acid group at its 5' end, and the other a ribonucleotide at its 3' end (Figure 1 A).^[7] While boronate esters are known to be sensitive to water, the presence of the template increases significantly the effective molarity of the two oligonucleotide fragments and facilitates the reaction.^[8] The resulting strand therefore differs from natural DNA by having a boronate internucleoside linkage instead of a phosphodiester. Inspired by these results we decided to evaluate whether the

formation of boronate esters at key positions of engineered split DNAzymes could be triggered by an effector and subsequently be used to control their activity (Figure 1 B).

Like ribozymes, DNAzymes are capable of supporting a wide variety of reactions.^[9] Yet, the most prominent and best studied representatives of the DNAzyme family are RNA-cleaving DNAzymes.^[10] Composed of a catalytic core and substrate-recognizing domains, RNA-cleaving DNAzymes catalyze the phosphodiester bond cleavage of their RNA substrate with the aid of a divalent cation. Among them, the 10–23 DNAzyme, which was named after the round and clone numbers of its respective *in vitro* selection, has been the most widely studied RNA-cleaving DNAzyme.^[11] Its catalytic core is composed of a loop flanked by two complementary substrate-recognizing domains. On binding the substrate, which is a full oligoribonucleotide or an oligodeoxyribonucleotide with a single ribonucleotide at the cleavage site, the catalytically competent structure is formed in the presence of magnesium ions, followed by cleavage of a specific phosphodiester bond.^[12]

[a] M. Debiais, Dr. J.-J. Vasseur, Prof. Dr. M. Smietana
Institut des Biomolécules Max Mousseron
Université de Montpellier, CNRS, ENSCM
Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier (France)
E-mail: michael.smietana@umontpellier.fr

[b] A. Lelievre, Prof. Dr. S. Müller
University Greifswald, Institute for Biochemistry
Felix-Hausdorff-Strasse 4, 17487 Greifswald (Germany)
E-mail: sabine.mueller@uni-greifswald.de

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.202004227>.

© 2020 The Authors. Chemistry - A European Journal published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

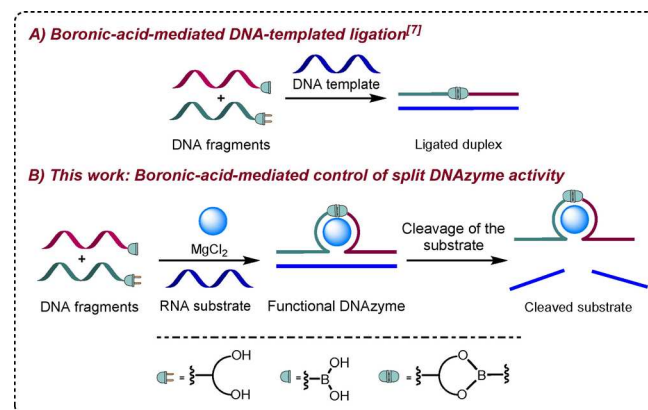


Figure 1. Schematic representation of boronic acid-mediated assembly of nucleic acids.

The 10–23 DNAzyme catalytic core has been well studied through base or phosphate substitutions and deletions. The G₉–G₁₄ and C₂₁–G₂₂ regions were demonstrated to be directly involved in forming the catalytic site.^[13]

Since DNAzymes are easy to synthesize and to modify, many studies have been devoted to improve their stability and catalytic properties.^[13d,14] In this context split systems, which rely on dividing a DNAzyme into a series of two or more independent fragments that are able to assemble in the presence of a specific target, are emerging as novel biosensing tools for the modulation of DNAzyme activity with high spatial and temporal resolution.^[15]

Although split systems are yet easier to synthesize and carry fewer negative charges per strand, the design of efficient split systems can be a challenging task. The choice of the split site and the resulting stability and efficiency of the split DNAzyme–substrate complex are key issues that need to be considered, in particular when application of the split system in diagnostics or therapy is planned. Most of the systems rely solely on the target-driven assembly of the fragments, which, however, often results in unstable and/or poorly active systems. This drawback can be counterbalanced by the use of fragments modified with chemical functionalities that upon addition of the target are brought into close proximity to allow covalent end joining of the fragments. Ideally, this reaction occurs without prior chemical activation. Therefore, fragment design and experimental verification of the activity of the assembled structure are required for the development of split DNAzymes.

Results

To achieve this control, the 10–23 DNAzyme was split into two fragments individually at all thymidine positions, located either in the catalytic loop or in one of the flanking arms. To monitor

the performance of the different systems, the RNA substrate 5'-GGAGAGAGAUGGGUGCG-3' was fluorescently labeled with ATTO680 at its 3' extremity and the cleavage rates *k* of DNAzymes **Dz1**–**Dz6** were determined by quantification of the amount of cleaved RNA at eight different time points, analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on a LICOR DNA sequencer (Figure 2A). Cleavage reactions were performed under single-turnover conditions; hence, binding of the substrate and release of the cleavage products did not need to be considered.

The first fragment of each DNAzyme was modified at its 3' extremity with a cytosine ribonucleotide, while the second fragment was modified at its 5' extremity with a boronic acid moiety. Three phosphoramidite derivatives of boronic acid, namely **T^{Bn}**, **Ph^{Bn}**, and **Napht^{Bn}**, were prepared and incorporated individually at all thymidine positions of the 10–23 DNAzyme (Figures 2B and C). The phosphoramidite of **T^{Bn}** was prepared according to our previously reported procedure.^[7d,16] Phosphitylation of commercially available 4-hydroxyphenylboronic acid pinacol ester delivered the phosphoramidite derivative of **Ph^{Bn}**, while the phosphoramidite of **Napht^{Bn}** was obtained from 6-hydroxynaphthalene-2-boronic acid after protection of the boronic acid as a MIDA ester and phosphitylation (Supporting Information). These derivatives were then incorporated at the 5' end of the oligonucleotide sequences on an automated DNA synthesizer by using conventional phosphoramidite chemistry.

To further understand the effect of **Ph^{Bn}** and **Napht^{Bn}** modifications, we evaluated also the performance of split DNAzymes in which these moieties were added after the T₁₂, T₁₆, T₂₅, T₂₇, and T₂₉ positions instead of replacing these final residues. In each case, the activity of the corresponding unmodified split DNAzymes was evaluated as control.

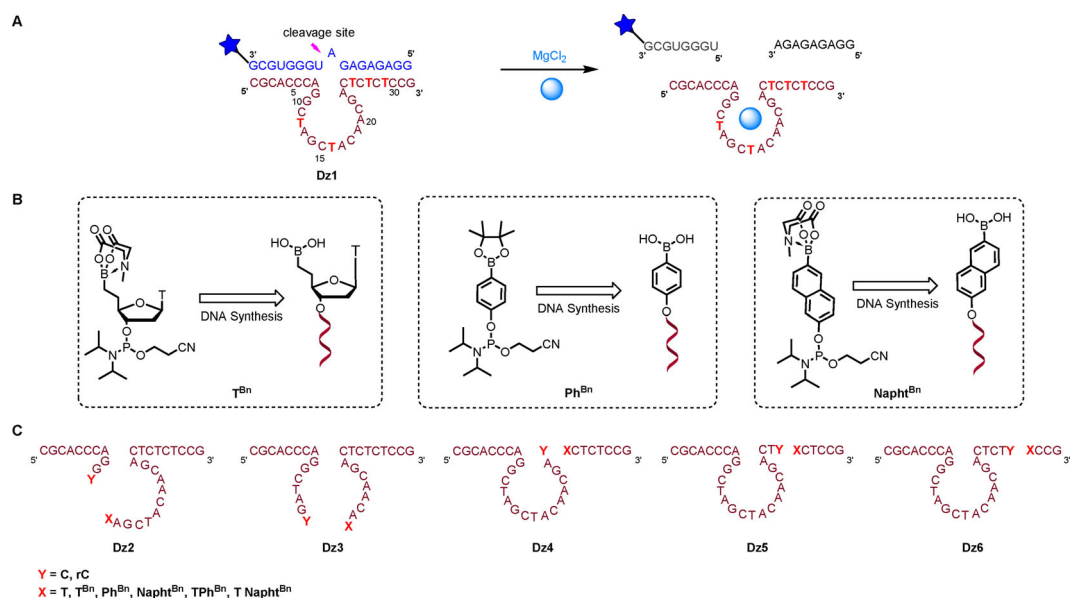


Figure 2. A) Secondary structure of wild-type 10–23 DNAzyme (**Dz1**). The pink arrowhead indicates the cleavage site and the blue star represents the fluorescent dye ATTO680. Thymidine residues that have been replaced with structures in B) in individual experiments are highlighted in red. B) Phosphoramidite derivatives of boronic acid incorporated at various thymidine positions. C) Sequences of the split DNAzymes (**Dz2**–**Dz6**) employed in this study.

The Mg^{2+} -dependent catalytic ability was first evaluated on the parent **Dz1**, which showed a cleavage rate of $k = 0.364 \pm 0.073 \text{ min}^{-1}$ and a percentage of RNA cleaved (*A*) of about 80%, in accordance with previously reported data,^[17] while no reaction could be observed in the absence of Mg^{2+} ions (Table 1, entry 1 and Figure S19 in the Supporting Information).

We started our study with the unmodified split DNAzyme **Dz2**, which showed no cleavage after 2 h of incubation. This result is coherent with previous studies, which demonstrated that nonbridging phosphate oxygen atoms located between C_{11} and T_{12} are involved in direct coordination of Mg^{2+} ions (Table 1, entry 2).^[13c] Consequently, it was not surprising that replacement of C_{11} by a ribocytosine and T_{12} by T^{Bn} did not restore the activity (Table 1, entry 3). Interestingly, if the DNAzyme was split between C_{15} and T_{16} (**Dz3**), it was still active ($A = 79.6\%$), although a sixfold reduction of the cleavage rate compared with **Dz1** was observed ($k = 0.039 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$, Table 1, entry 4). However, replacing C_{15} by a ribocytosine and T_{16} by T^{Bn} somewhat restored the activity ($k = 0.127 \pm 0.045 \text{ min}^{-1}$, $A = 82.7\%$), which suggests that the formation of

a boronate internucleoside linkage influences the activity of the split DNAzyme (Table 1, entry 5). Interestingly, joining of the fragments occurs in a region in which flexibility is important. A control experiment with the fragment carrying the terminal C_{15} and the T^{Bn} -modified fragment confirmed this effect (Table 1, entry 6). Concerning the other evaluated **Dz3**-based systems (Table 1, entries 7 and 8), very limited variations were observed compared with the unmodified split DNAzyme **Dz3**.

When the DNAzyme was split at the junction of the catalytic core and the flanking arm (**Dz4**), a remarkable decrease of product yield was observed ($A = 47.3\%$; Table 1, entry 9), most probably due to the incapacity of the DNAzyme to adopt its active structure. Interestingly, the replacement of C_{24} by an *rC* residue and T_{25} by T^{Bn} in **Dz4** restores the activity remarkably (Table 1, entry 10; $A = 61.6\%$). All other modifications increase the cleavage rate by varying degrees, but product yields were similar to those of the parent split **Dz4** (Table 1, entries 11–14).

When the cut is positioned in the flanking arm between C_{26} and T_{27} , the unmodified split DNAzyme **Dz5** (Table 1, entry 15) recovers some activity ($k = 0.087 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$, $A = 57.9\%$), although only three base pairs of the 5' fragment are complementary to the RNA substrate. Here again, the formation of a boronate internucleoside linkage restores activity when C_{26} and T_{27} are replaced by a ribocytosine and T^{Bn} , respectively (Table 1, entry 16; $k = 0.120 \pm 0.024 \text{ min}^{-1}$, $A = 64.0\%$). Surprisingly, in this specific configuration the highest cleavage rate is obtained when Ph^{Bn} is added after T_{27} . The activity of this split variant is nearly as high as that of the parent **Dz1** (Table 1, entry 19; $k = 0.204 \pm 0.058 \text{ min}^{-1}$), although the percentage of total RNA cleavage is somewhat lower ($A = 59.2\%$). The exact nature of the activity increase observed with $X = TPh^{Bn}$ in **Dz5** remains unclear. It is well known that the formation of boronate esters is favored for aromatic boronic acids compared with aliphatic ones.^[6] Hence, the rather high flexibility of the 3'-terminal nucleotides of the 5' fragment in **Dz5** might be counterbalanced by the rigidity of the aromatic boronate ester, formed when $X = TPh^{Bn}$. By contrast, when Ph^{Bn} replaces T_{27} ($X = Ph^{Bn}$), the activity is noticeably reduced, most likely because the structure of the resulting DNAzyme becomes strained due to the missing nucleotide T_{27} .

Lastly, split DNAzyme **Dz6** is characterized by a cut between C_{28} and T_{29} , such that five base pairs at the 3' terminus of the 5' fragment remain for binding to the substrate. Surprisingly, activity of this split variant is somewhat lower than that of unmodified split DNAzyme **Dz5**, despite the two additional base pairs in **Dz6** (Table 1, entry 21; $k = 0.059 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$, $A = 44.9\%$). However, when C_{28} and T_{29} are replaced with *rC* and T^{Bn} , respectively, a remarkable increase of the cleavage rate and product yield is observed (Table 1, entry 22, $k = 0.211 \pm 0.037 \text{ min}^{-1}$, $A = 64.2\%$). All other modifications also induced product yields higher than that of the unmodified split DNAzyme **Dz6**, albeit with lower cleavage rates (Table 1, entries 23–26).

Although the formation of boronate esters can be observed in neutral aqueous media, it is well known that the association between boronic acids and *cis*-diols is favored at higher pH. This effect is explained by the formation of an hydroxybro-

Table 1. Observed rate constants and percentage of total RNA cleaved for 10–23 DNAzymes **Dz1** and split DNAzymes **Dz2–Dz6**.

Entry	DNAzyme	Y	X	$k^{[a]}$ [min^{-1}]	<i>A</i> [%]
1	Dz1	–	–	$0.364(\pm 0.073)$	$75.6(\pm 1.7)$
2	Dz2	C	T	inactive	–
3		rC	T^{Bn}	inactive	–
4	Dz3	C	T	$0.039(\pm 0.003)$	$79.6(\pm 2.3)$
5		rC	T^{Bn}	$0.127(\pm 0.011)$	$82.7(\pm 3.9)$
6		C	T^{Bn}	$0.048(\pm 0.007)$	$80.3(\pm 4.2)$
7		rC	Napht ^{Bn}	$0.050(\pm 0.005)$	$86.8(\pm 3.2)$
8	rC	TNapht ^{Bn}	$0.068(\pm 0.004)$	$82.1(\pm 1.5)$	
9	Dz4	C	T	$0.013(\pm 0.002)$	$47.3(\pm 5.1)$
10		rC	T^{Bn}	$0.094(\pm 0.017)$	$61.6(\pm 3.1)$
11		rC	Ph^{Bn}	$0.063(\pm 0.011)$	$44.1(\pm 2.6)$
12		rC	Napht ^{Bn}	$0.026(\pm 0.001)$	$47.0(\pm 1.1)$
13		rC	TPh^{Bn}	$0.076(\pm 0.013)$	$46.5(\pm 2.5)$
14		rC	TNapht ^{Bn}	$0.021(\pm 0.004)$	$42.5(\pm 4.4)$
15	Dz5	C	T	$0.087(\pm 0.012)$	$57.9(\pm 2.2)$
16		rC	T^{Bn}	$0.120(\pm 0.024)$	$64.0(\pm 3.2)$
17		rC	Ph^{Bn}	$0.019(\pm 0.003)$	$47.7(\pm 4.2)$
18		rC	Napht ^{Bn}	$0.016(\pm 0.006)$	$57.7(\pm 12.7)$
19		rC	TPh^{Bn}	$0.204(\pm 0.058)$	$59.2(\pm 3.0)$
20		rC	TNapht ^{Bn}	$0.033(\pm 0.004)$	$53.0(\pm 2.9)$
21	Dz6	C	T	$0.059(\pm 0.007)$	$44.9(\pm 1.8)$
22		rC	T^{Bn}	$0.211(\pm 0.037)$	$64.2(\pm 2.0)$
23		rC	Ph^{Bn}	$0.045(\pm 0.005)$	$61.5(\pm 2.4)$
24		rC	Napht ^{Bn}	$0.052(\pm 0.008)$	$59.7(\pm 3.3)$
25		rC	TPh^{Bn}	$0.085(\pm 0.013)$	$66.8(\pm 3.1)$
26		rC	TNapht ^{Bn}	$0.057(\pm 0.015)$	$70.8(\pm 6.5)$

[a] Observed rate constants of DNAzymes under single-turnover conditions (2 h reaction at 25 °C, 50 mM Tris buffer (pH 8.6), 20 mM $MgCl_2$, 20 nM of substrate, and 2 μM of each **Dz** fragment). First-order rate constants *k* were obtained from curve fitting to $[S] = A(1 - e^{-kt})$, where *[S]* is the fraction of uncleaved substrate at time *t*, and *A* is the percentage of total RNA cleaved after 2 h of incubation.^[17]

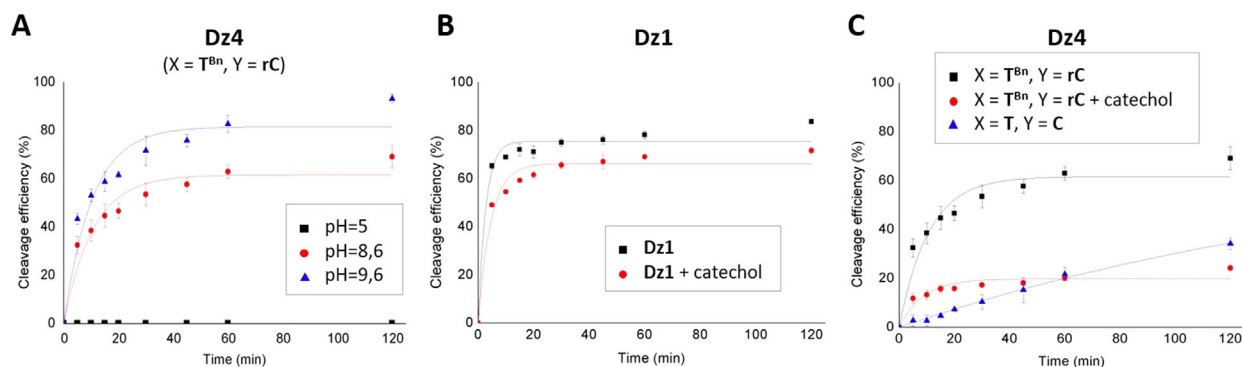


Figure 3. Time courses of cleavage reactions under single-turnover conditions analyzed by a LICOR DNA sequencer. A) pH dependence of modified **Dz4**. B) Parent DNAzyme **Dz1** and C) split DNAzymes **Dz4** in the absence or presence of 1000 equiv of catechol.

nate complex resulting from rehybridization of the boron atom from sp^2 to sp^3 and a substantial release of angle strain around the boron center.^[18]

Thus, we evaluated the cleavage activity of **Dz4** from pH 5.5 to pH 9.6. At pH 5.5 neither the parent **Dz1** nor its split **Dz4** analogues (X = T or T^{Bn}, Y = C or rC) were found to be active. In the case of **Dz1**, increasing the pH value to 9.6 resulted in no significant difference in terms of cleavage rate or product yield (A = 76 and 83% at pH 8.6 and 9.6 respectively; Figures S1, S44–S45 in the Supporting Information). Similarly, the percentage of cleaved substrate obtained with the unmodified **Dz4** (X = T, Y = C) decreased from 58 to 47% at pH 9.6 and 8.6 respectively (Figures S26, S46–S47 in the Supporting Information). However, in the presence of the T^{Bn} modified split **Dz4** we were pleased to observe a ~25% increase of the percentage of product yield, when the pH value was raised to 9.6 (from 61.6 to 81.5% at pH 8.6 and 9.6, respectively; Figure 3A) thus nearly reaching the wild-type activity after 2 h of incubation and this further demonstrates the ability of the noninvasive nature of borono-modified systems to control DNAzyme activity through pH variations.

Finally, to provide definitive proof that the boronic acid–diol interaction controls the split-DNAzyme activity, we performed a competition experiment in the presence of 1000 equiv of catechol. Catechol is known to form stable esters with boronic acid and thus would outcompete the 3'-terminal diol in **Dz4**.^[19] As expected, the addition of catechol induced only a slight decrease of the percentage of cleaved substrate with **Dz1**, most likely as a consequence of nonspecific interaction of catechol with the DNA strands (from 76 to 66%, Figure 3B), whereas a dramatic loss of activity from 62 to 20% was observed for **Dz4** (X = T^{Bn}, Y = rC; Figure 3C) matching that of the unmodified analogue (X = T, Y = C). These results demonstrate unambiguously the role played by the boronic acid and diol partners to either reactivate the DNAzyme or, if needed, suppress its activity.

Discussion

Split DNAzymes carrying a cytosine ribonucleotide at the 3' terminus, and a boronic acid derivative (T^{Bn}, Ph^{Bn} or Napht^{Bn}) at the 5' terminus at the split site were investigated. The objec-

tive of evaluating Ph^{Bn} and Napht^{Bn} in addition to T^{Bn} was two-fold. Firstly, we sought to take advantage of the greater stability of aromatic boronic acids and of the resulting boronate esters. Secondly, by positioning Ph^{Bn} and Napht^{Bn} in place of the last residue or after the T_{12r}, T_{16r}, T_{25r}, T_{27r}, and T₂₉ positions, we wanted to evaluate the influence of flexibility and stacking interactions. It is notable that these parameters seem to have had an influence only in the case of **Dz6**, in which stacking interactions most likely participate in stabilization of the system. We have already demonstrated in the past by semiempirical calculations^[16b] that the electrostatic potential, sugar puckering, and C4'-oxygen distance of T^{Bn} are almost identical to those of its natural counterpart. The present results confirm the importance of this bioisostere for efficient control of DNAzyme activity.

There is quite some evidence in the literature that catalysis by the 10–23 DNAzyme can be suitably described by the Michaelis–Menten model. However, most studies have not been carried out under saturating substrate concentration, but under single-turnover conditions with the DNAzyme in excess over substrate. Normally, a simple first-order reaction is obtained then. Nevertheless, as observed for other ribozymes, the DNAzyme cleavage reaction can follow biphasic kinetics. For an ideal DNAzyme under saturating conditions, every substrate molecule is expected to bind to a DNAzyme, and the observed rate of cleavage k should be equal to the sum of the forward and reverse rate constants. Biphasic kinetics may arise when an alternative conformation of the DNAzyme–substrate complex forms off the cleavage pathway and is in slow exchange with the active conformation. In this case, one would observe an initial fast rate that corresponds to the normal cleavage rate, followed by a slow rate after a certain percentage of the substrate is cleaved. Some of the curves shown in Figure 4 indeed imply that the kinetics may be more complicated than simple first-order reactions. It is possible that with the split DNAzymes, part of the RNA substrate is trapped in alternative cleavage-inactive conformations. If these transform into an active conformation, cleavage would be slower or follow biphasic kinetics, but the reaction eventually would reach completion. Therefore, we preferentially rely on the final percentage of cleavage for comparing the different systems. In some cases (Figure 4), we observed only a small fraction of cleaved

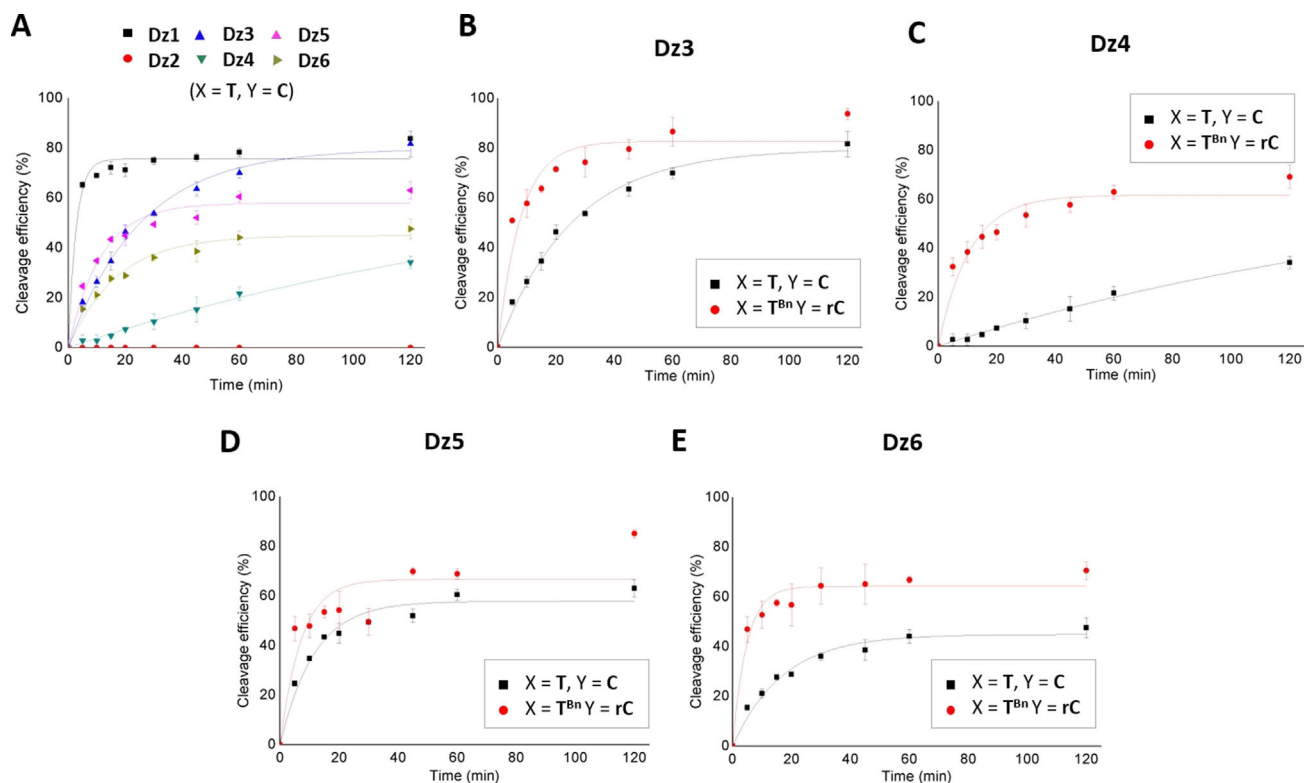


Figure 4. Time courses of cleavage reactions under single-turnover conditions analyzed by a LICOR DNA sequencer. A) Parent DNAzyme **Dz1** and unmodified split DNAzymes **Dz2–Dz6**. DNAzyme activities of unmodified and modified split DNAzymes B) **Dz3**, C) **Dz4**, D) **Dz5**, and E) **Dz6**.

substrate. This may indicate 1) chemically impure fragments constituting the split DNAzyme, 2) stable alternative conformations or aggregates of involved fragments, 3) stable inactive conformations of DNAzyme–substrate complex, or 4) an inactive conformation of the DNAzyme that stably binds the substrate. For DNAzymes investigated herein, it appears reasonable that, depending on the split site and the functionality at the 5' terminus of the 3'-DNAzyme fragment, part of the RNA substrate may bind to either the 5' or the 3' fragment of the DNAzyme without being cleaved, because the catalytically competent complex is not formed. Taken together, the reached percentage of cleavage appears to be a suitable measure for DNAzyme performance and functionality of the individual split DNAzymes.

Important insights have emerged from these results. The different unmodified split systems show various degrees of cleavage activity (Figure 4A). This was surprising, since one may expect that, if split into fragments, the catalytically competent conformation is difficult if not impossible to adopt. This would apply in particular to variants **Dz2**, **Dz3**, and **Dz4**, in which the split is located in the catalytic loop (Figure 2C). Yet, activity was observed for the unmodified split variants of **Dz3** and **Dz4** (Table 1, Figure 4). Only **Dz2** showed high sensitivity when split into fragments. In that case, no activity was observed, neither for the unmodified split variant, nor for the modified variants with potential for boronate formation (Table 1, Figure 4A). Taken together, we have demonstrated that activity of split DNAzymes can be significantly restored by boronate ester formation, which does not require any kind of additional chemical

or enzymatic activation. This is a clear advantage over other split systems that, in order to become functional, rely on chemical or enzymatic ligation of the assembled fragments.^[15] While the potential of **Ph^{Bn}** and **Napht^{Bn}** remains limited, **T^{Bn}** stands out as an efficient bioisosteric analogue of natural thymidine, even when located in non-Watson–Crick base-paired regions, as demonstrated with **Dz3** (Figure 4B–E). Thus, while many studies have been devoted to the analysis of functional sequence requirements in the catalytic core of the 10–23 DNAzyme,^[13] we here confirm and extend previous results for both 10–23^[17c,20] and 8–17 DNAzymes^[21] showing that, even if perturbed, unmodified split systems are able to maintain some level of functionality.

Even though the 10–23 DNAzyme is the most extensively studied representative of the DNAzyme family, structural data are rare, and the exact cleavage mechanism is still rather poorly understood. Nevertheless, a large number of biochemical studies have allowed conclusions to be drawn on the importance and functional role of nucleotides in the catalytic loop. According to the numbering used in our study and shown in Figure 2A, G₉ to G_{14r}, as well as C₂₁ and G₂₂ are absolutely essential, since modification at those positions greatly affects cleavage activity. Modification of C₁₅ to A₂₀ and A₂₃ was found to only slightly affect the cleavage rate,^[13b] whereby T₁₆ appears to be completely dispensable: it can be replaced with a C3 spacer or an abasic residue, or completely deleted without loss of activity.^[13b] Deletion of T₁₆ was even found to increase cleavage activity.^[13a,b,20b] Furthermore, it was shown previously that a certain degree of conformational flexibility is cru-

cial for the 10–23 DNAzyme activity. Substitution of T₁₆ by an LNA analogue resulted in strong reduction of activity.^[22] Thus, not surprisingly, splitting the DNAzyme between C₁₅ and T₁₆ (as in **Dz3**) did not significantly affect activity, and even the unmodified split system cleaved up to 82% of the substrate (Table 1).

On the contrary, T₁₂ has been described being absolutely essential for activity. Structural prearrangement of some of the loop nucleotides is important for correct function, and, in particular, proper positioning of the nucleobase of T₁₂ as well as of the exocyclic amino group of C₁₁ seems to be required.^[13b,20b] In addition, the nonbridging oxygen atoms of the phosphate group between T₁₂ and A₁₃ were suggested to be involved in metal-ion coordination.^[13b,c,20b] Substitution of loop nucleotides by a C3 spacer or an abasic site enhances flexibility of the DNAzyme loop, which has been shown to be tolerated at some positions, but not T₁₂.^[13b,c,20b] Therefore, splitting the DNAzyme between C₁₁ and T₁₂ (as in **Dz2**) heavily affects activity, very likely due to the more flexible structure and the therefore missing required local arrangement at this site. Activity could not even be restored by the borono-functionalized fragments, and this implies that the boronate linkage may not even have formed, as a consequence of the flexible structural environment.

The neighboring nucleotides of the scissile purine nucleotide in the RNA substrate play an important role in determining a flexible equilibrium of base pairing with the DNAzyme, thereby acting as a hinge between the catalytic loop and the RNA-DNA helical arms.^[14b,17b] In our DNAzyme variant, U+1 would be in equilibrium of base pairing with A₈ or G₉, and G-1 would be in equilibrium of base pairing with A₂₃ or C₂₄. These equilibria allow the catalytic loop to be properly positioned relative to the double-helical arms and adopt the catalytically competent conformation. The results obtained for **Dz4** with the split site between C₂₄ and T₂₅ (Figure 2) are in agreement with this important functional role of C₂₄. Activity of the unmodified split system is strongly abolished, and also formation of a boronate linkage can only partially restore it. Lastly, results obtained for **Dz5** and **Dz6**, both bearing the split site in the helical arms, mirror increased stability of the DNAzyme–substrate complex, due to formation of the boronate linkage as compared with the unmodified fragments, and as a consequence higher cleavage activity.

Conclusion

We have reported a new concept for the activity control of split DNAzymes, through the use of two fragments, one of which is modified with a boronic acid at the 5' end and the other with a *cis*-diol at the 3' end. In the presence of an RNA substrate, the assembly of the two nonfunctional fragments brings the two moieties into close proximity, and a boronate internucleoside linkage is formed spontaneously. This leads to stabilization of the DNAzyme structure and restores activity for cleavage of the RNA substrate. By varying the position of the boronate linkage we were able to characterize the key elements and the optimum split site for maintaining high levels

of activity. In the long term, the reversible formation of boronate esters and the tunable boronic ester–boronate equilibrium may be a promising concept to control functional nucleic acids for the development of valuable biosensing platforms.

Acknowledgements

The Agence Nationale de la Recherche and the Deutsche Forschungsgemeinschaft are gratefully acknowledged for financial support (ANR PCRI “TEMPLAR”-16-CE92-0010-01; DFG MU1396/11). Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: autoligation · boronic acids · DNA · oligonucleotides · RNA

- [1] X. Sun, B. M. Chapin, P. Metola, B. Collins, B. Wang, T. D. James, E. V. Anslyn, *Nat. Chem.* **2019**, *11*, 768.
- [2] a) H. Fu, H. Fang, J. Sun, H. Wang, A. Liu, J. Sun, Z. Wu, *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 3271; b) P. C. Trippier, C. McGuigan, *MedChemComm* **2010**, *1*, 183; c) J. P. M. António, R. Russo, C. P. Carvalho, P. M. S. D. Cal, P. M. P. Gois, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3513.
- [3] a) W. Zhai, X. Sun, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 1836; b) B. Akgun, D. G. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13028; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 13210; c) K. Lacin, P. Skládal, T. D. James, *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*, 1.
- [4] W. L. A. Brooks, B. S. Sumerlin, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1375.
- [5] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1124.
- [6] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291.
- [7] a) A. R. Martin, I. Barvik, D. Luvino, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4193; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4279; b) R. Barbeyron, A. R. Martin, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 105587; c) R. Barbeyron, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 542; d) A. Gimenez Molina, I. Barvik, S. Müller, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8824.
- [8] a) M. J. Catalano, N. E. Price, K. S. Gates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2627; b) K. Gorska, N. Winsinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6820; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6956.
- [9] S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1521.
- [10] T. Lan, Y. Lu, *Metal Ions Life Sci.* **2012**, *10*, 217.
- [11] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262.
- [12] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13330.
- [13] a) Z. Zaborowska, S. Schubert, J. Kurreck, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 554; b) Z. A. Zaborowska, J. P. Fürste, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40617; c) B. Nawrot, K. Widera, M. Wojcik, B. Rebowska, G. Nowak, W. J. Stec, *FEBS J.* **2007**, *274*, 1062; d) X. Yang, Z. Xiao, J. Zhu, Z. Li, J. He, L. Zhang, Z. Yang, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 4032.
- [14] a) A. A. Fokina, D. A. Stetsenko, J.-C. François, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 689; b) J. Zhu, Z. Li, Z. Yang, J. He, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 4256; c) Z. Li, J. Zhu, J. He, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9846; d) J. Zhu, Z. Li, Q. Wang, Y. Liu, J. He, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 446214; e) R. Dolot, M. Sobczak, B. Mikolajczyk, B. Nawrot, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2017**, *36*, 292; f) P. Li, S. Du, Y. Li, J. He, *Molecules* **2017**, *22*, 1011; g) Y. Kamiya, Y. Arimura, H. Ooi, K. Kato, X.-G. Liang, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1305; h) Y. Hong, D. Mao, R. Wu, Z. Gao, T. Meng, R. Wang, L. Liu, J. Miao, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 15196; i) Y. Lin, Z. Yang, R. J. Lake, C. Zheng, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 17061; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 17217; j) K. Ven, S. Safdar, A. Dillen, J. Lammertyn, D.

- Spasic, *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 205; k) S. Du, Y. Li, J. He, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 126961; l) J. Jiang, P. Zhang, Y.-M. Nie, K.-F. Peng, Y. Zhuo, Y.-Q. Chai, R. Yuan, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2193; m) M. Xiong, Z. Yang, R. J. Lake, J. Li, S. Hong, H. Fan, X.-B. Zhang, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 1891; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 1907; n) M. Chakravarthy, M. T. Aung-Htut, B. T. Le, R. N. Veedu, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1613.
- [15] M. Debiais, A. Lelievre, M. Smietana, S. Müller, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 3400.
- [16] a) D. Luvino, C. Baraguey, M. Smietana, J. J. Vasseur, *Chem. Commun.* **2008**, *44*, 2352; b) A. R. Martin, K. Mohanan, D. Luvino, N. Floquet, C. Baraguey, M. Smietana, J. J. Vasseur, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4369.
- [17] a) H. Lusic, D. D. Young, M. O. Lively, A. Deiters, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903; b) M. J. Cairns, A. King, L. Q. Sun, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2883; c) J. L. Richards, G. K. Seward, Y.-H. Wang, I. J. Dmochowski, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 320.
- [18] D. G. Hall, *Boronic Acids*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [19] F. Coumes, A. Malfait, M. Bria, J. Lyskawa, P. Woisel, D. Fournier, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 4682.
- [20] a) B. K. Ruble, J. L. Richards, J. C. Cheung-Lau, I. J. Dmochowski, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *380*, 386; b) B. Wang, L. Cao, W. Chiuman, Y. Li, Z. Xi, *Biochemistry* **2010**, *49*, 7553.
- [21] P.-J. J. Huang, J. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4442.
- [22] L. Robaldo, F. Izzo, M. Dellafiore, C. Proietti, P. V. Elizalde, J. M. Montserrat, A. M. Iribarren, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2581.

Manuscript received: September 16, 2020

Accepted manuscript online: October 15, 2020

Version of record online: ■ ■ ■ ■ 0000

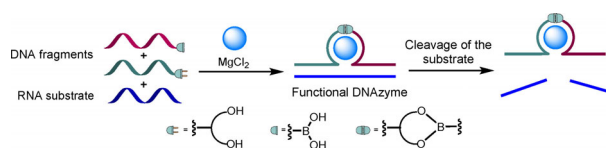
FULL PAPER

DNAzymes

M. Debiais, A. Lelievre, J.-J. Vasseur,
S. Müller,* M. Smietana*



Boronic Acid-Mediated Activity
Control of Split 10–23 DNAzymes



Split, join, activate: Split DNAzymes made of two or more short nucleic acid strands are emerging as novel tools for biosensing applications. Herein, it is reported that the activity of 10–23 DNA-

zyme that was split into two nonfunctional fragments can be restored by formation of a boronate internucleoside linkage.

Titre : Utilisation des acides boroniques pour l'assemblage et le contrôle d'acides nucléiques fonctionnels

Résumé : Connus pour être des biomolécules polyvalentes jouant un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes, la capacité d'association des acides nucléiques permet de programmer leur assemblage et ce faisant l'émergence de nouvelles fonctions. En effet, la possibilité d'utiliser leur spécificité d'association pour l'obtention d'arrangements spécifiques fonctionnels est très prometteuse notamment dans le domaine des nanotechnologies et de la bioanalyse.

Dans la première partie de ce travail, le DNAzyme 10-23 a été choisi comme modèle pour concevoir et étudier de nouveaux systèmes fonctionnels à base d'acides nucléiques modifiés par des acides boroniques capables de s'auto-assembler de manière réversible et de répondre à des stimuli externes. Au travers de cette étude, nous avons développé de nouvelles méthodes de conjugaison sur support permettant d'incorporer des fonctions acides boroniques ou aldéhydes au sein de séquences d'acides nucléiques. Des oligonucléotides cycliques liés par des jonctions esters boronates et formés par auto-assemblage ont également été décrites dans la troisième partie. Enfin, dans le but de diversifier la nature des liaisons internucléosidiques disponibles, la quatrième partie de ce travail a permis l'élaboration de nouveaux liens internucléosidiques de type oxazaborolidines.

Mots clés : acides nucléiques, DNAzymes, acides boroniques, esters boronates, oxazaborolidines, auto-assemblage

Title : Use of boronic acids for the assembly and control of functional nucleic acids

Summary : While nucleic acids are known to be versatile biomolecules that play a crucial role in regulating gene expression, the predictable nature of nucleic acid hybridization offers a simple and cutting-edge platform to program assemblies with emerging function. The burgeoning use of nucleic acids as a material to organize the precise arrangements of specific molecules marked an important milestone in the relatively recent history of nanotechnologies and bioanalysis.

In the first part of this work, the 10-23 DNAzyme has been choosed as a model to develop and study new boronic acids-containing nucleic acid-based functional systems able to reversibly self-assemble responding to an external stimuli. Through this study we have developed new supported conjugation methods allowing the incorporation of boronic acids or aldehydes functions into nucleic acids sequences. Cyclic oligonucleotides bound by boronate esters junctions and formed by self-assembly were also described in a third part. Finally, in order to diversify internucleosidic bounds available, the fourth part of this work allowed the elaboration of new internucleosidic junctions based on oxazaborolidines.

Keywords : nucleic acids, DNAzymes, boronic acids, boronate esters, oxazaborolidines, auto-assembly

Laboratoire : Institut des Biomolécules Max Mousseron, équipe ChemBioNAC, UMR 5247 CNRS-UM-ESNCM, Université de Montpellier, Campus Triolet, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France