

**ACADÉMIE DE BORDEAUX**  
**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II**

**THÈSE**

Présentée à l'Université de Bordeaux II

Pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

**SPÉCIALITÉ : INTERFACE CHIMIE BIOLOGIE**

École Doctorale « Sciences de la Vie et de la Santé »

Inserm U-869

**AMPHIPHILES BIOINSPIRÉS DÉRIVÉS D'ACIDES NUCLÉIQUES :**  
**SYNTHÈSES, CARACTÉRISATIONS ET ÉTUDES**

Par

**GUILHEM GODEAU**

Soutenue le 9 novembre 2009 devant le Jury composé de :

- P. BARTHÉLÉMY, Professeur à l'Université Victor Ségalen, Bordeaux (Directeur de thèse)
- I. HUC, Directeur de recherches CNRS, Bordeaux (Président du jury)
- P. MIDOUX, Directeur de recherches CNRS/Inserm, Orléans (Rapporteur)
- N. MIGNET, Chargée de recherches CNRS/Inserm, Paris (Rapporteur)
- V. BARRAGAN-MONTERO, Maître de conférences à l'école nationale supérieure de Chimie de Montpellier (Examineur)
- C. STAEDL, Chargée de recherches Inserm, Bordeaux (Examineur)

# REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué à l'université de Bordeaux II, sous la direction de Monsieur le professeur Philippe Barthélémy entre octobre 2006 et octobre 2009.

Pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour son enthousiasme et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues durant ces trois années, je tiens à formuler de sincères remerciements à Monsieur le professeur Philippe Barthélémy.

Je souhaite également adresser toute ma gratitude à Monsieur le docteur Jean-Jacques Toulmé pour m'avoir accueilli au sein de son unité pour toute la durée de ces travaux.

Je voudrais également adresser de profonds remerciements à Madame le docteur Cathy Staedel pour sa patience, son aide et pour tout ce qu'elle m'a appris au cours de ces trois années de recherches.

Ces travaux de thèse ont également profité de nombreux conseils. Pour cela, je voudrais adresser un grand merci à tous les membres de l'équipe de chimie, les docteurs Isabelle Bestel, Laurent Azéma, Arnaud Gissot et Bernard Rayner.

Je souhaite également remercier Nathalie Pierre dont la qualité du travail, notamment pour la synthèse des oligonucléotides, a joué un rôle clé pour le bon déroulement de ces travaux.

Ces études n'ont pas toutes pu être réalisées dans les locaux de l'université de Bordeaux II, c'est pour cela que je tiens à remercier Monsieur le docteur Patrick Midoux et Monsieur le professeur Mark Grinstaff pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires pour des expériences complémentaires.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne remerciais pas les personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont continué de faire vivre mes travaux de recherche alors que je rédigeais mon manuscrit. Pour cela je tiens à exprimer toute ma gratitude à Hélène Arnion et Christophe Brun.

Je remercie également tous les membres de l'unité U-869 pour leur aide durant ces trois années.

Il me faut maintenant remercier les courageux qui ont participé à la correction de ce manuscrit, particulièrement pour les premières relectures.

Je voudrais également adresser mes plus sincères remerciements à ma famille pour le soutien indéfectible qu'ils m'ont apporté au long de ces trois années.

Pour terminer, je voudrais remercier la région Aquitaine et l'Inserm pour le soutien financier indispensable à la réalisation de ces travaux de thèse.

# Préambule

Les travaux rapportés dans ce mémoire ont donné lieu aux communications suivantes :

## **PUBLICATIONS**

---

### **Amphiphilic Copolymer for Delivery of Xenobiotics: In Vivo Studies in a Freshwater Invertebrate, a Mesostominae Flatworm**

De Jong, L.; Moreau, X.; Thiéry, A.; Godeau, G.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 891–898

### **Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation**

Godeau, G.; Staedel, C.; Barthélémy, P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4374–4376

### **Glycosyl-Nucleoside Lipids as Low-Molecular-Weight Gelators**

Godeau, G.; Barthélémy, P. *Langmuir* **2009**, *25*, 8447-8450

### **Glycosyl-nucleoside-lipid based supramolecular assembly as a nanostructured material with Nucleic acid delivery capabilities**

Godeau, G.; Bernard, J.; Staedel, C.; Barthélémy, P. *Chem. Comm.* **2009**, 5127-5129

## **COMMUNICATIONS ORALES**

---

### **Amphiphilic oligonucleotid, a new toolbox for vectorisation**

Godeau, G.; Staedel, C.; Pierre, N.; Barthélémy, P. *23<sup>th</sup> Annual Meeting of the G.T.R.V.*

, Angers (France), 8-10 December **2008**

### **Application of the « click-chemistry » for amphiphilic oligonucleotides synthesis**

Godeau, G.; Barthélémy, P. *DOC'S 66 Meeting (IFR 66's Doctorants meeting)*, Pessac, 26 june **2007**

### **Nanostructured Gels with Nucleic Acid Delivery Capabilities**

Barthélémy, P.; Godeau, G. *Colloid and Surfactant Science Basic Research Workshop*, Napa, California (USA), 10-12 March **2009**

## **POSTERS**

---

### **Application of the « click-chemistry » for amphiphilic oligonucleotides synthesis**

Godeau, G.; Pierre, N.; Barthélémy, P. *8<sup>th</sup> scientific day of the doctoral school sciences of life and health*, Arcachon (France), 5 April **2007**

### **Synthesis and study of new amphiphilic compounds developed by « click-chemistry »**

Godeau, G.; Staedel, C.; Pierre, N.; Barthélémy, P. *Scientific day of the IFR 66*, Pessac (France), 4 December **2007**

### **Amphiphilic oligonucleotides: A new tool for vectorisation**

Godeau, G.; Staedel, C.; Pierre, N.; Barthélémy, P.

*Nanomaterials Club for sciences of Life of ENSCPB*, Pessac (France), 27 March **2008**

*9<sup>th</sup> scientific day of the doctoral school sciences of life and health*, Arcachon (France), 16 April **2008**

*IECB Young Researchers day (European Institute for Chemistry and Biology)*, Pessac (France), 22 May **2008**

*Scientific day of the IFR 66*, Talence (France), 2 December **2008**

### **Glycosyl-Nucleoside-Lipids as Low molecular weight Gelators**

Godeau, G.; Bernard, J.; Staedel, C.; Barthélémy, P. *10<sup>th</sup> scientific day of the doctoral school sciences of life and health*, Arcachon (France), 8 April **2009**

### **Lipid oligonucleotide conjugates for therapeutic applications**

Godeau, G.; Arnion, H.; Staedel, C.; Pierre, N.; Barthélémy, P.

*DOC'S 66 Meeting (IFR 66's Doctorants meeting)*, Pessac, 23 June **2009**

*RICT (International meeting of therapeutic chemistry)*, Orléans (France), 1-3 July **2009**

### **Mesostominae flatworms as new invertebrate model for *in vivo* intracellular delivery of oligonucleotides, drug and others molecules: promising approach for the development of medical and ecotoxicological tools**

De Jong, L.; Moreau, X.; Godeau, G.; Bestel, I.; Gissot, A.; Barthélémy, P.; Thiéry, A. *11th International Symposium on Flatworm Biology*, Diepenbeek (Belgium), 26-30 July **2009**

# Sommaire

<b>Liste des abbréviations</b>	p. 12
<b>I. Introduction</b>	p. 15
<b>II. Généralités sur les amphiphiles dérivés d'acides nucléiques</b>	p. 21
II.1 Introduction	p. 21
II.2 Nucléosides lipides (NLs)	p. 22
<u>II.2.1 Les NLs anioniques</u>	p. 24
<u>II.2.2 Les NLs cationiques</u>	p. 25
<u>II.2.3 Les NLs zwitterioniques</u>	p. 27
<u>II.2.4 Les NLs non chargés</u>	p. 28
<u>II.2.5 Organisations supramoléculaires</u>	P. 29
<u>II.2.6 Transfection</u>	p. 31
II.3 Oligonucléotides amphiphiles	p. 32
<u>II.3.1 Lipides conjugués</u>	P. 33
<u>II.3.2 Modification de l'oligonucléotide sur support</u>	p. 33
<u>II.3.3 Modification de l'oligonucléotide libre</u>	P. 34
<u>II.3.4 Organisations supramoléculaires</u>	P. 35
<u>II.3.5 Application (1) transfection</u>	P. 37

<u>II.3.6 Application (2) surfaces codées</u>	P. 38
<b>III. Projet de Recherche</b>	p. 42
III.1 Nucléolipides et dérivés	p. 42
III.2 Oligonucléotides amphiphiles	p. 43
III.3 Chimie clic (ou click-chemistry)	p. 43
<u>III.3.1 Réaction de Huisgen</u>	p. 44
<u>III.3.2 Application aux molécules du vivant</u>	p. 46
<b>IV. Nucléosides amphiphiles (NAs) et Glycosynucléosides amphiphiles (GNAs)</b>	p. 50
IV.1 Introduction	p. 50
IV.2 Nucléosides amphiphiles (NAs)	p. 50
<u>IV.2.1 5'-azido-5'-désoxynucléoside</u>	p. 50
<u>IV.2.2 Lipides alcynes vrais</u>	p. 51
<u>IV.2.3 Protocoles et synthèses</u>	P. 52
<u>IV.2.4 Études des nucléosides amphiphiles</u>	p. 55
<u>IV.2.5 Nucléosides amphiphiles hydrosolubles</u>	p. 55

IV.3 Glycosylnucléosides amphiphiles (GNAs)	p. 57
<u>IV.3.1 Rappel</u>	p. 57
<u>IV.3.2 Structures disponibles et synthèses</u>	p. 57
<u>IV.3.3 Propriété des GNAs</u>	p. 60
<u>IV.3.4 Interactions et stabilisations</u>	P. 61
<u>IV.3.5 Organisations supramoléculaires</u>	p. 65
<u>IV.3.6 Formation d'hydrogel</u>	p. 69
<u>IV.3.7 Formation d'organogel</u>	p. 71
IV.4 Application des GNAs	p. 73
<u>IV.4.1 Caractérisations complémentaires</u>	p. 74
<u>IV.4.2 Expériences de SAXS</u>	p. 75
<u>IV.4.3 Complexation des acides nucléotides</u>	p. 76
<u>IV.4.4 Cytotoxicité</u>	p. 78
<u>IV.4.5 Transfection</u>	p. 80
IV.5 Conclusion (1)	p. 81
IV.6 Perspectives (1)	p. 82
<b>V. Oligonucléotides amphiphiles (ONAs)</b>	p. 84
V.1 Synthèse d'oligonucléotides	p. 84
V.2 Synthèse d'oligonucléotides amphiphiles	p. 86

V.3 Synthèse	p. 89
<u>V.3.1 Couplage <i>ante</i>-synthèse</u>	p. 89
<u>V.3.2 Couplage <i>post</i>-synthèse</u>	p. 91
<u>V.3.3 Comparaison des deux méthodes de modification : <i>ante</i>- et <i>post</i>-synthèse</u>	p. 96
<u>V.3.4 Oligonucléotides amphiphiles et méthodes de purification</u>	p. 97
<u>V.3.5 Expériences de thermodénaturation</u>	p. 101
<u>V.3.6 Organisations supramoléculaires</u>	p. 102
V.4 ONAs et vectorisation d'oligonucléotides	p. 104
V.5 Application biologique	p. 118
<u>V.5.1 Généralité sur le VHC</u>	p. 118
<u>V.5.2 Test p-irf, principe</u>	p. 122
<u>V.5.3 Résultats obtenus <i>in-vitro</i></u>	p. 125
<u>V.5.3.1 Cytotoxicité</u>	p. 125
<u>V.5.3.2 Traduction dépendant de l'IRES du VHC</u>	p. 126
<u>V.5.3.3 Ajout d'un co-transfectant</u>	p. 127
<u>V.5.3.4 Changement de la chimie de l'oligonucléotide</u>	p. 128
V.6 Conclusion (2)	p. 129
V.7 Perspectives (2)	p. 130

<b>VI. Conclusion générale</b>	p. 132
<b>VII. Partie expérimentale</b>	p. 136
VII.1 Synthèse organique	p. 136
<u>VII.1.1 Matériel et méthodes</u>	p. 136
<u>VII.1.2 Protocoles</u>	p. 137
VII.2 Formation et fusion de gels	p. 206
<u>VII.2.1 Hydrogel</u>	p. 206
<u>VII.2.2 Organogel</u>	p. 206
<u>VII.2.3 Fusion des gels</u>	p. 207
VII.3 Études physicochimiques	p. 207
<u>VII.3.1 Epsilon</u>	p. 207
<u>VII.3.2 Tensiométrie</u>	p. 207
<u>VII.3.3 Dynamic light scattering (DLS)</u>	p. 207
<u>VII.3.4 Small angles X-ray scattering (SAXS)</u>	p. 208
<u>VII.3.5 Thermo-dénaturation</u>	p. 208

VII.4 Test sur cellules	p. 209
<u>VII.4.1 Culture cellulaire</u>	p. 209
<u>VII.4.2 Tests de cytotoxicité</u>	p. 209
<u>VII.4.3 Transfection (Test P-irf)</u>	p. 209
<u>VII.4.4 Cytométrie en flux</u>	p. 210
VII.5 Microscopie	p. 210
<u>VII.5.1 Microscopie optique, fluorescence et contraste de phase</u>	p. 210
<u>VII.5.2 Microscopie électronique à transmission (MET)</u>	p. 212
<b>VIII. Références</b>	p. 214

# Liste des abréviations

AcCN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATG : Analyse thermogravimétrique

CAC : Concentration d'agrégation critique

CCM : Chromatographie sur couche mince

DC : Dichroïsme circulaire

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DCU : Dicyclohexylurée

DIEA : Diisopropyléthylamine

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMF : N,N-diméthylformamide

DMRIE-C : Bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxy-éthyl ammonium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOPC : dioléylglycérophosphocholine

DSC : Differential scanning calorimetry

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HRMS : Spéctrométrie de masse haute résolution

IRES : Internal ribosomes entry site

LMWG : Low molecular weight gelator

MeOH : Méthanol

MET : Microscopie électronique à transmission

NA : Nucléoside amphiphile

NHC : N-hétérocarbène

NL : Nucléoside lipide

ODN : Oligodésoxyribonucléotide

ON : Oligonucléotide

ONA : Oligonucléotide amphiphile

PBS : Phosphate buffered saline

QELS : Quasi elastic light scattering

Rdt : Rendement

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAXS : Small angle X-ray scattering

TBTA : Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine

TEA : Triéthylamine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofuranne

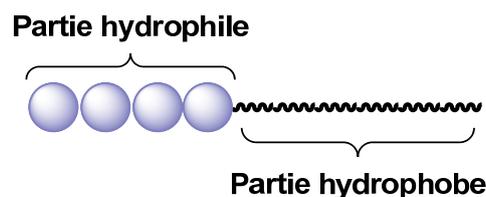
TMS : Tétraméthylsilane

VHC : Virus de l'hépatite C

# I. Introduction

# I. Introduction

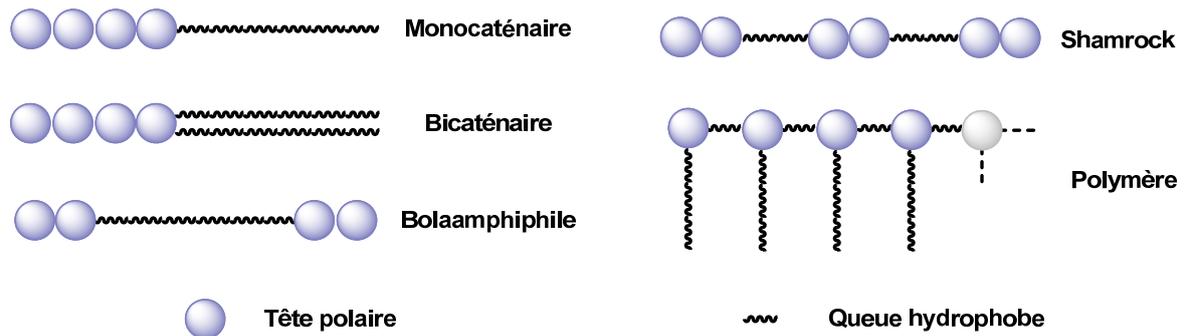
Étymologiquement parlant, le terme amphiphile provient de *amphi* qui signifie de part et d'autre, des deux cotés et de *phileo* qui signifie aimer. Une molécule amphiphile est donc une molécule qui présente une double affinité. (1) pour les solvants organiques et (2) pour l'eau. Structuralement parlant, ce comportement se matérialise par la cohabitation de structures ou groupes fonctionnels d'affinités opposées. Une tête hydrophile polaire schématisée par des structures sphériques dans la Figure 1 et une queue hydrophobe généralement constituée de chaînes lipidiques représentées par un serpentín dans la Figure 1. L'une des familles d'amphiphiles les plus simples, les plus connues et les plus employées est celle des carboxylates de sodium dérivés d'acides gras. Ces molécules sont généralement regroupées sous le nom de savons.



**Figure 1 :** Structure générale d'un amphiphile. Une partie hydrophile (structure polaire) liée à une partie hydrophobe (lipides par exemple).

Historiquement parlant, les amphiphiles sont parmi les molécules organiques « de synthèse » les plus anciennement utilisées par l'homme<sup>1</sup>. En effet l'étude de textes anciens montre que l'empire babylonien savait préparer et faisait usage de substances savonneuses dès 2200 avant J-C. D'autres documents, tels que le papyrus d'Ebers (1550 Av J-C) montrent que dans l'Égypte ancienne, des substances amphiphiles de type savon étaient également synthétisées et employées. De nos jours, l'emploi de composés amphiphiles est devenu quotidien. On les trouve en évidence dans chaque foyer au travers des savons et autres détergents mais également de manière plus discrète dans les cosmétiques par exemple.

Bien que ces substances soient d'usage courant, il est rare que le consommateur connaisse les structures et particularités qui donnent à ces molécules leurs propriétés si indispensables. En effet les structures et propriétés des amphiphiles peuvent être extrêmement variées. Nous pouvons citer ici quelques exemples de morphologies couramment décrites : mono ou bicaténaire, bolaamphiphile, shamrock ou encore des composés de plus grande taille de type polymère (Figure 2).



**Figure 2** : Exemples de structures d'amphiphiles décrites.

Quel que soit le type de structure étudié, l'un des points communs à tous les amphiphiles est cette double affinité (ou double phobie) qui leur confère leurs particularités. L'une des particularités les plus notables est leur propriété d'auto-organisation. En effet, les amphiphiles sont composés de deux parties aux affinités opposées. Chaque fragment de la molécule cherchant à retrouver un milieu plus favorable, ils s'organisent aux interfaces voire même, ils forment eux-mêmes des interfaces sous la forme de micelles ou autres organisations supramoléculaires. Ces assemblages supramoléculaires ont pour but de minimiser au maximum l'exposition des structures phobiques et d'exposer davantage les structures affines du milieu. Cela conduit à la formation d'organisations supramoléculaires variées pouvant aller de la micelle à la phase hexagonale inverse en passant par les bicouches.

Pour expliquer le lien existant entre la structure chimique des amphiphiles et l'organisation adoptée par ces derniers, un modèle a été décrit par Isrealachvilli<sup>2,3</sup> (Figure 3).

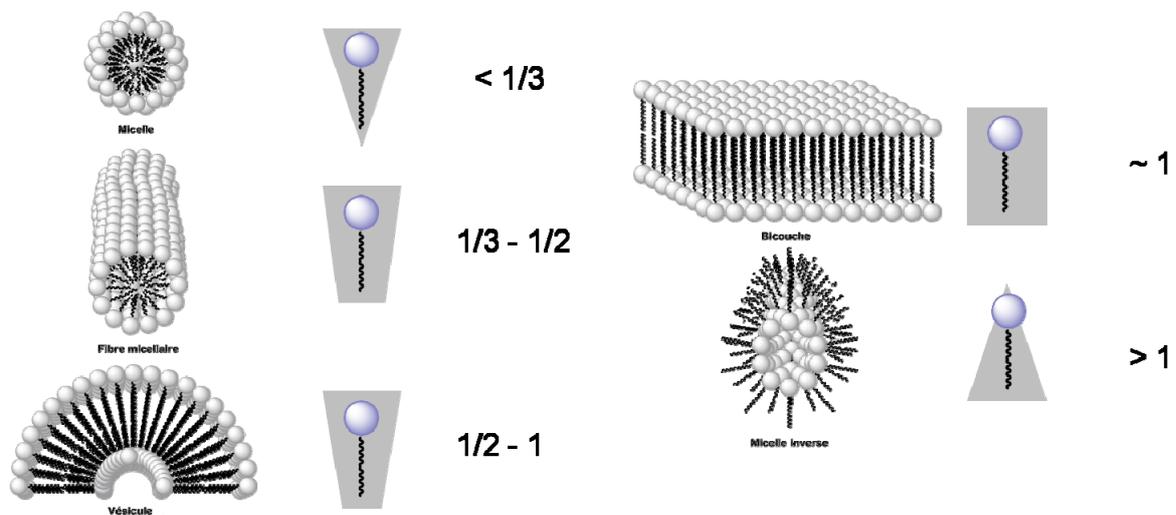


Figure 3 : Types d'organisations observés en fonction du rapport entre le volume de la tête polaire (sphère) et celui de la queue hydrophobe (serpentin noir).

Dans ce modèle simplifié, il est proposé que l'organisation supramoléculaire adoptée par l'amphiphile dépende du rapport entre le volume de sa tête polaire et celui de sa queue hydrophobe. Il ne dépendrait donc que de la balance hydrophobe/hydrophile. Ainsi selon Isrealachvilli, un rapport inférieur à  $1/3$  induit la formation de micelles, qui tendent à la formation de fibres micellaires lorsque le rapport augmente jusqu'à  $1/2$ . Pour des valeurs comprises entre  $1/2$  et  $1$ , l'organisation correspond davantage à des vésicules et des bicouches lorsque le rapport s'approche de  $1$ . Lorsque les proportions s'inversent et que le rapport dépasse  $1$  on observe la formation de micelles inverses capables de s'organiser en phases hexagonales inverses. Ce modèle a été confirmé de façon empirique pour les molécules de types phospholipides, mais s'est avéré peu pertinent pour des structures plus rigides comme les diphenylazométhines<sup>4</sup>. Cet écartement de certains amphiphiles au modèle proposé met bien en évidence l'impact d'interactions plus complexes pour l'auto-organisation des amphiphiles. Il existe une grande diversité d'amphiphiles dont l'organisation dépend de la structure.

Différentes grandes familles d'amphiphiles peuvent ainsi être décrites en tenant compte des similitudes dans leur structure chimique (nature de la tête, de la chaîne hydrophobe). Chacune de ces familles pouvant contenir plus d'une centaine d'exemples.

Au quotidien, les amphiphiles sont actuellement très utilisés, et ce dans de nombreux domaines : domestique (savons, détergents, cosmétiques...), recherche (catalyse de transfert de phase...).

Un autre domaine d'application faisant de plus en plus appel aux amphiphiles est la thérapeutique. En effet de nombreuses molécules sont étudiées et employées pour leur détergence, leur organisation ou pour leurs propriétés de transfection. Actuellement les agents de transfection les plus courants sont des molécules amphiphiles<sup>5</sup>, de nombreuses matrices pour la reconstruction tissulaire<sup>6</sup> sont également amphiphiles et de nouvelles molécules capables de s'auto-vectoriser (entrer spontanément dans les cellules) sont actuellement à l'étude pour le traitement de cancers<sup>7,8</sup>. C'est dans ce domaine que s'illustre essentiellement la catégorie particulière d'amphiphiles que nous avons étudiée dans le cadre de ce travail : les amphiphiles bio-inspirés et plus particulièrement ceux dérivant d'acides nucléiques. Outre les propriétés inhérentes aux amphiphiles, ces molécules ajoutent des possibilités de reconnaissance, d'immunogénicité et d'adressage propres aux molécules du vivant. Ceci offre de nombreuses possibilités d'application notamment dans le domaine de la thérapeutique. Ces molécules amphiphiles peuvent être très diverses, allant des peptides conjugués<sup>9,10</sup> aux copolymères<sup>11,12,13</sup> en passant par les dérivés glycolipides<sup>14,15,16</sup> (Figure 4)

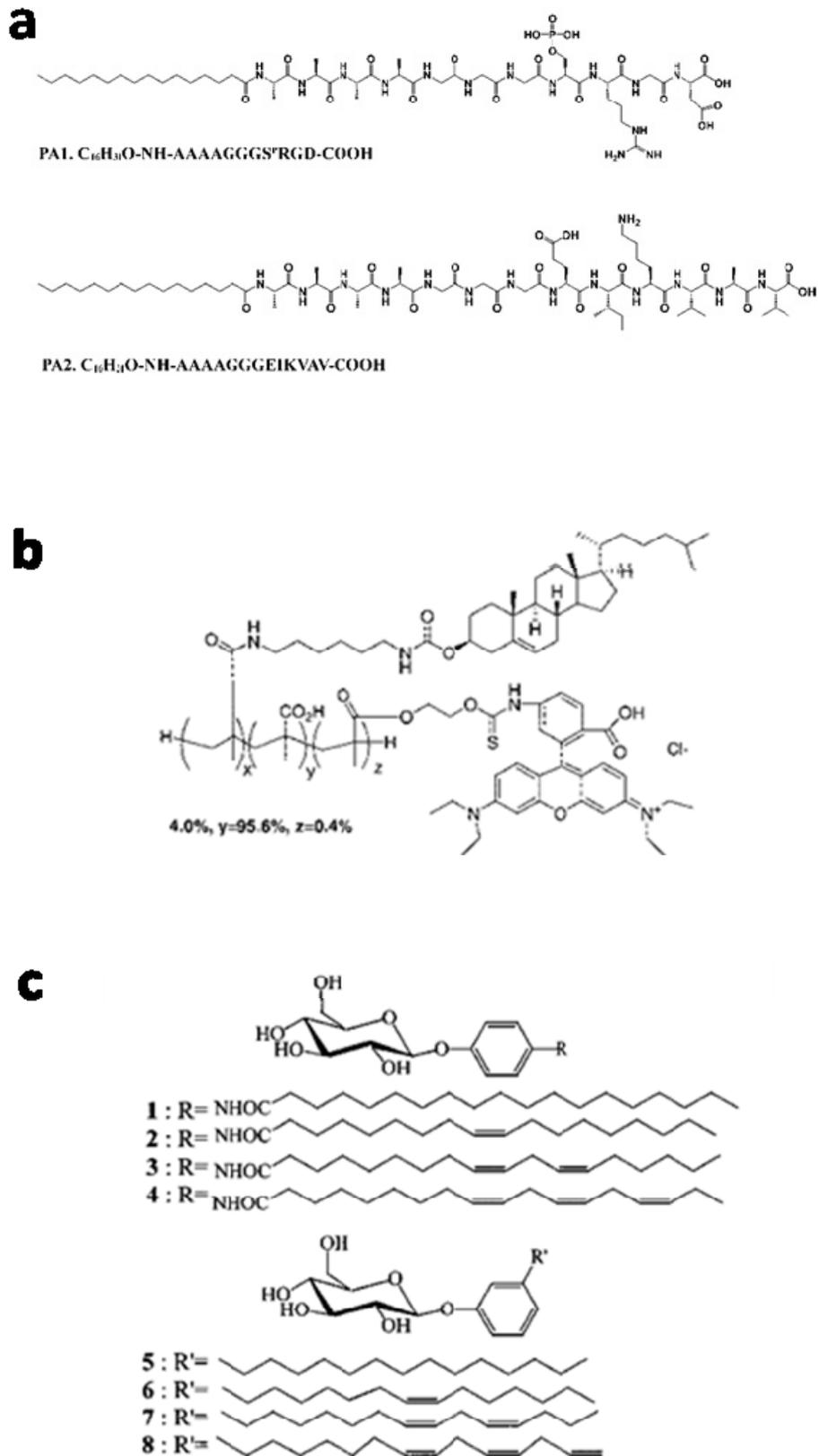


Figure 4 : Exemples d'amphiphiles : a) peptide<sup>9</sup>, b) polymère<sup>11</sup>, c) glycolipide<sup>13</sup>

## **II. Généralités sur les amphiphiles dérivés d'acides nucléiques**

# II. Généralités sur les amphiphiles dérivés d'acides nucléiques

## II.1 Introduction<sup>17</sup>

L'auto-organisation moléculaire est actuellement le centre d'intérêt de nombreux domaines. Elle joue un rôle fondamental en biologie, elle est à l'origine de la formation d'organisations supramoléculaires et permet le développement de nanotechnologies<sup>18,19,20,21,22,23</sup>. Si l'on prend l'exemple du monde du vivant, les nombreuses interactions non covalentes comme les liaisons hydrogène, les empilements par interactions  $\pi$  ( $\pi$ - $\pi$  stacking), les interactions hydrophobes ou encore les interactions électrostatiques, sont à l'origine d'organisations complexes de diverses dimensions pouvant aller du nanomètre au millimètre. Ces interactions et organisations sont notamment présentes dans l'assemblage des acides nucléiques et sont un maillon essentiel pour le stockage de l'information génétique. Un autre exemple de l'emploi de ces interactions par le vivant, est l'organisation formée par les bicouches lipidiques. Ces membranes lipidiques sont à l'origine du cloisonnement des cellules et par conséquent sont absolument indispensables au développement de la vie. Ces deux paramètres font des amphiphiles dérivés d'acides nucléiques un sujet d'étude incontournable. La conception de molécules hybrides acides nucléiques/lipides, ou plus généralement acides nucléiques/chaînes hydrophobes est le centre d'attention de nombreuses équipes<sup>24,25,26</sup>.

Le but de cette association est de réunir les propriétés de compartimentation associées aux structures hydrophobes et les propriétés d'organisation et de stockage d'information des acides nucléiques. Le principal objectif est le développement de nouveaux assemblages moléculaires pour la vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique. Deux approches peuvent être envisagées pour la formation de tels hybrides. (1) La formation de structures de faible masse moléculaire dérivant de nucléosides. Ces molécules ne renferment que peu d'information moléculaire (informations liées aux possibilités d'interactions) et présentent un haut potentiel d'organisation ou d'agrégation. (2) La formation d'hybrides de masse moléculaire élevée comme des oligonucléotides amphiphiles.

Ces molécules peuvent contenir une plus grande quantité d'information moléculaire et présentent un potentiel d'organisation variable (Figure 5).

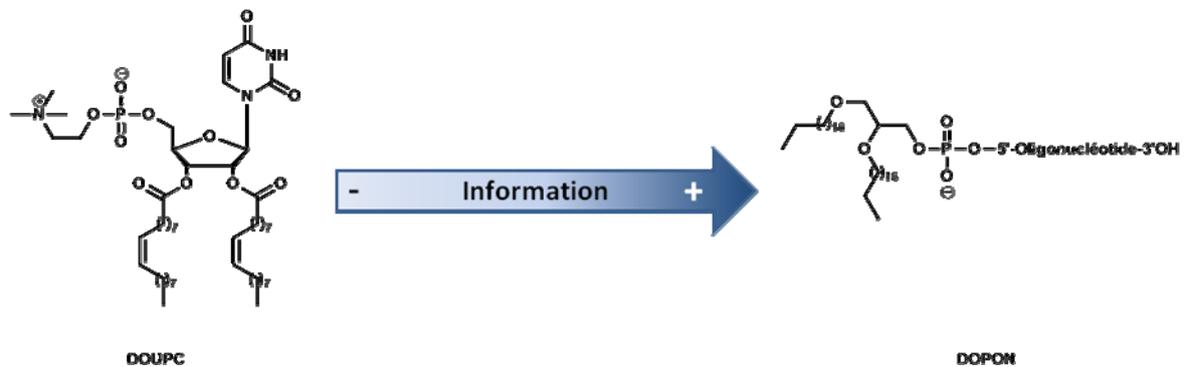


Figure 5 : Augmentation de l'information moléculaire entre la dioléyl-uridine-phosphocholine (DOUPC) et le dioctadécyl-glycéro-phosphooligonucléotide (DOPON).

## II.2 Nucléosides lipides (NLs)

Les nucléosides lipides (NLs) sont des molécules de petite taille ( $< 1000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) qui comme leur nom l'indique regroupent une partie lipidique et une structure nucléoside ou nucléotide. Il existe quelques exemples naturels de cette famille d'amphiphiles : le coenzyme diacylglycérocytidinediphosphate (Figure 6a) est présent dans les cellules des mammifères<sup>24</sup>. Ce NL joue un rôle clef dans le métabolisme des phosphoinosides et cardiolipides. Il est également présent sous une forme analogue 2'-désoxy (Figure 6b) chez des organismes procaryotes où il joue un rôle d'intermédiaire dans la synthèse des différents phospholipides.

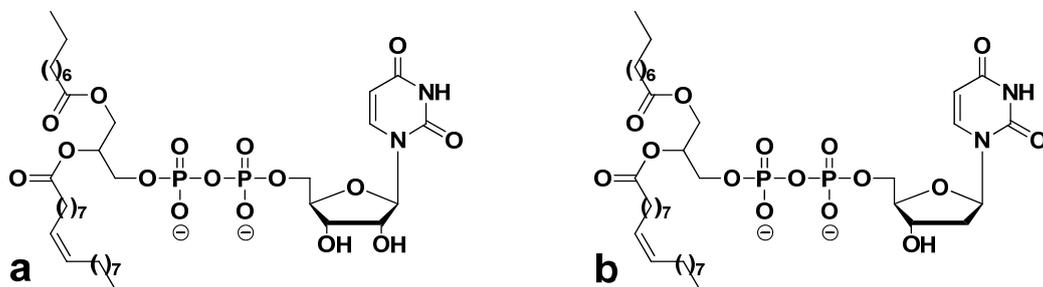


Figure 6 : Exemple de NLs naturels. Le coenzyme diacylglycérocytidinediphosphate (a) et son analogue 2' désoxy (b).

Quelques exemples de NLs naturels présentant des propriétés antibiotiques ont également été rapportés (Figure 7a). Les tunicamycines (A-D) découvertes chez *Streptomyces lysosuperficus* ont montré divers domaines d'activité, comme antimicrobien, antifongique, antiviral et antitumoral. Ces nombreuses activités s'expliquent par l'inhibition de la synthèse des oligosaccharides chez les eucaryotes. L'activité observée sur les procaryotes est quant à elle liée à l'inhibition de synthèse de peptidoglycanes. D'autres exemples de NLs naturels sont connus pour leur activité d'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes comme les liposidomycines isolées à partir de *Streptomyces griseosporus* (Figure 7b).

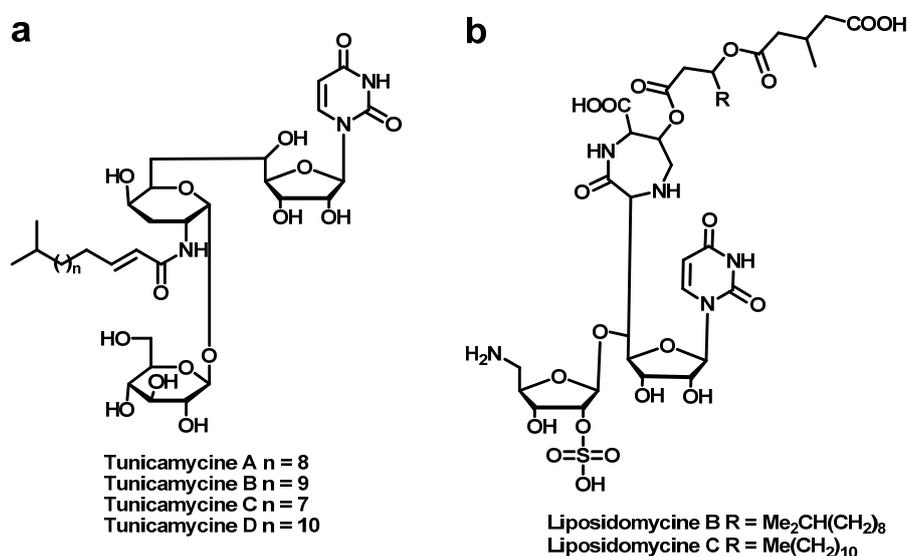


Figure 7 : Exemples de nucléolipides naturels. a) Tunicamycines isolées de *Streptomyces lysosuperficus*, b) Liposidomycines isolées de *Streptomyces griseosporus*.

Le rôle joué par les NLs naturels sur les processus métaboliques ainsi que les activités antimicrobienne, antifongique, antivirale et antitumeur observées, illustrent bien l'importance de cette classe d'amphiphiles, et l'intérêt de développer de nouvelles structures de synthèse. Plusieurs familles de ces NLs ont été rapportées dans la littérature. Ces familles peuvent être regroupées, selon leur charge, dans les grandes catégories suivantes : Les NLs anioniques, les cationiques, les zwitterioniques et les non chargés.

## II.2.1 Les NLs anioniques

Les NLs anioniques sont généralement des dérivés nucléotidiques, donc porteurs d'un groupement phosphate. De nombreuses variantes sont décrites dans la littérature : des structures mono- et bicaténares ou encore des dérivés bolaamphiphiles. Ces NLs présentent la particularité d'être simples d'accès en synthèse. Ils sont généralement préparés en une étape de couplage à partir de produits commerciaux<sup>27,28</sup> (Figure 8 a et b).

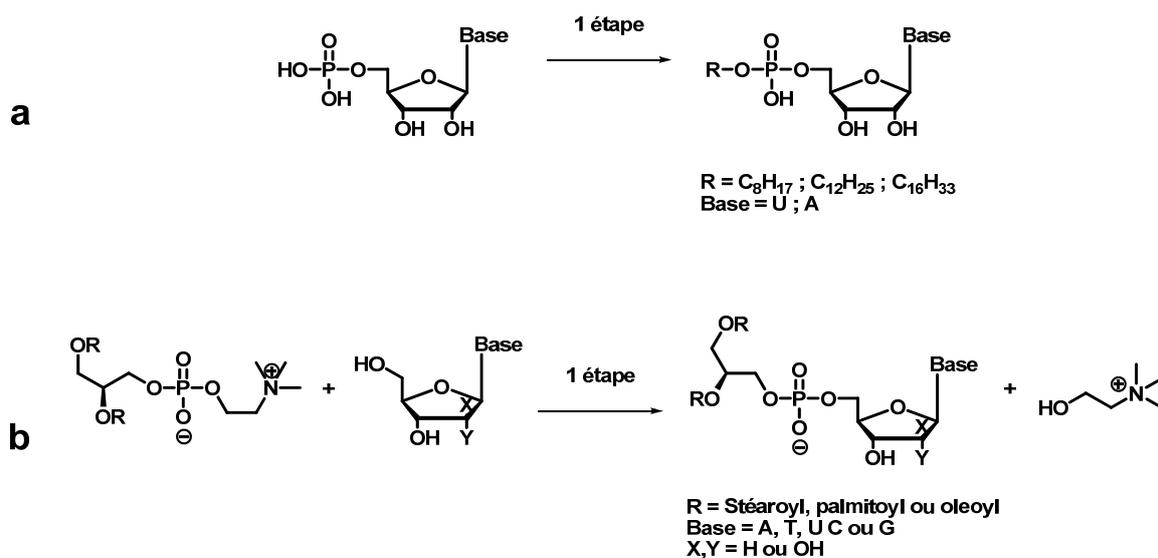


Figure 8 : Synthèse mono étape de NLs anioniques. a) Synthèse de NLs anioniques monocaténares proposée par Heiz *et al*<sup>24</sup>, b) Synthèse de NLs anioniques bicaténares proposée par Berti *et al*<sup>25</sup>.

D'autres synthèses utilisent des nucléosides phosphoramidites. Ces structures sont couplées à différents alcools commerciaux. L'emploi d'alcools gras ou de diacylglycérol permet la formation de nucléotides mono- ou bicaténares modifiés en position 3' (Figure 9a)<sup>29,30</sup>. L'emploi de dérivés diols donne des dérivés bolaamphiphiles (Figure 9b)<sup>31</sup>. Cette seconde voie de synthèse nécessite quelques étapes de protection, oxydation, déprotection. Elle fait cependant appel à des produits de départ commerciaux et reste donc simple à mettre en œuvre en laboratoire.

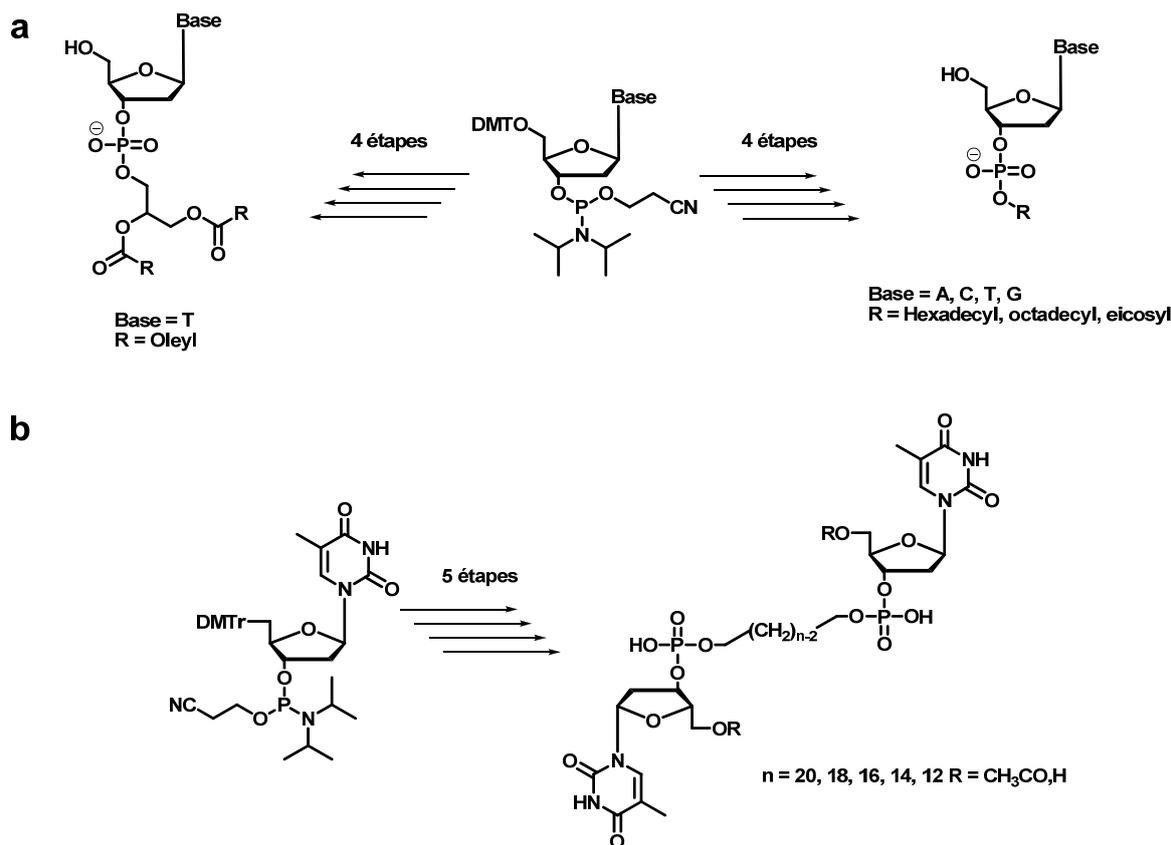


Figure 9 : Synthèses de NLs modifiés en 3'. a) Synthèses proposées par Campins *et al*<sup>29</sup> et Khiati *et al*<sup>30</sup>. b) Synthèse proposée par Iwaura *et al*<sup>31</sup>.

## II.2.2 Les NLs cationiques

Les NLs cationiques sont, comme leur nom l'indique, des molécules chargées positivement. Cette charge est généralement due à une structure ammonium. Quelques exemples de synthèse de ces molécules ont été décrits dans la littérature (Figure 10)<sup>32,33</sup>.

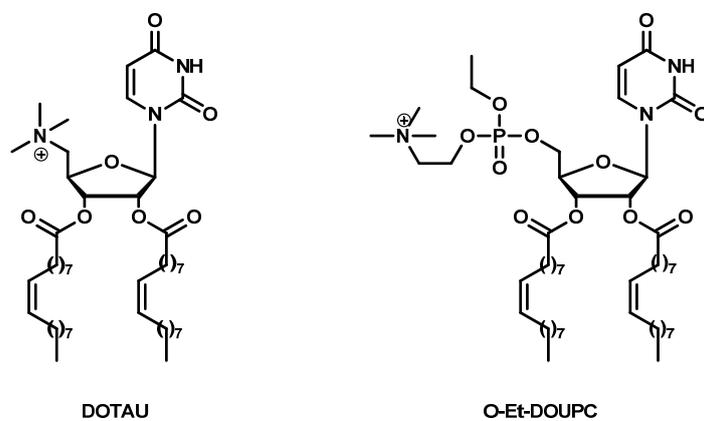


Figure 10 : Exemples de NLs cationiques. Dioléyl-tétraméthylammonium uridine (DOTAU)<sup>32</sup> et O-éthyl-dioléyluridinephosphocholine(O-Et-DOUPC)<sup>33</sup>.

La synthèse de ces NLs cationiques est également assez simple. Ils peuvent être obtenus purs après 4 étapes en partant de 2',3'-isopropylidène uridine (Figure 11 et Figure 12).

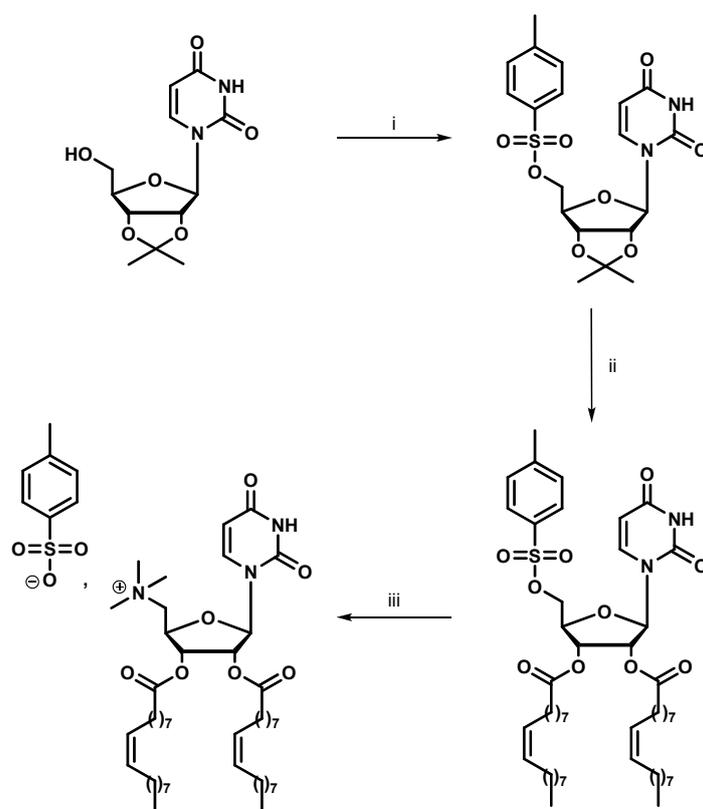


Figure 11 : Synthèse de la DOTAU<sup>32</sup>. i) Chlorure de tosylo, pyridine, température ambiante, 17 h. ii) TFA/H<sub>2</sub>O, 1 h, 0 °C puis acide oléique, DCC, DMAP, DCM, température ambiante, 14 h. iii) NMe<sub>3</sub>.HCl, THF, CH<sub>3</sub>CN, température ambiante, 48 h.

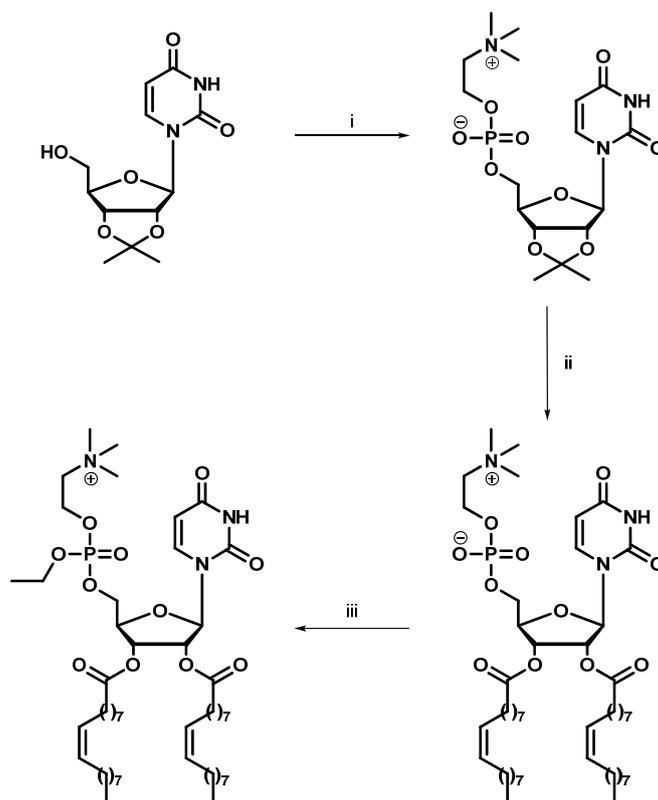


Figure 12 : Synthèse de la O-Et-DOUPC<sup>33</sup>. i) Chloro-oxodioxaphospholane, TEA, THF, 0 °C, 4 h puis triméthylamine, AcCN, THF, 60 °C, 24 h. ii) HCl dans acide acétique/H<sub>2</sub>O puis acide oléique, DCC, DMAP, DMF, température ambiante, 14 h. iii) Triflate d'éthyle, DCM, température ambiante, 12 h.

### II.2.3 Les NLs zwitterioniques

Les NLs zwitterioniques ou amphotères présentent la particularité d'être globalement neutres à pH physiologique. Cette molécule neutre devient cationique à pH acide (Figure 13). Cette capacité de pouvoir changer de nature rend les NLs zwitterioniques particulièrement intéressants. Différentes synthèses de NLs zwitterioniques sont rapportées dans la littérature. Moreau *et al.* ont proposé une méthode de synthèse efficace de ces composés (Figure 14)<sup>34</sup>. Cette voie de synthèse originale a permis de diversifier la famille des NLs zwitterioniques en développant les dérivés 2',3'-cétal<sup>35</sup>, ou leurs dérivés fluorocarbonés<sup>36</sup>.

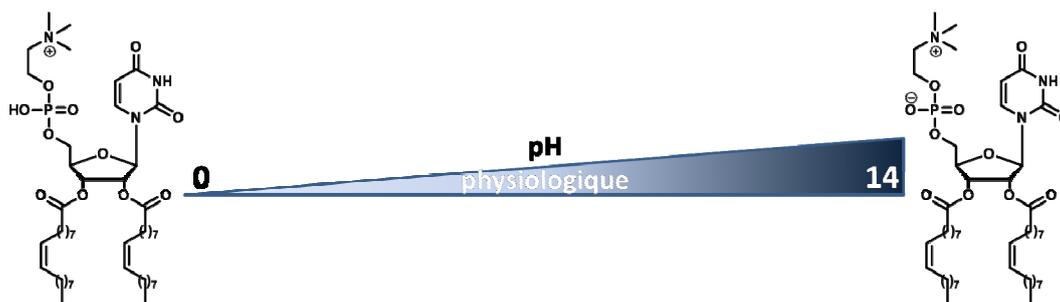


Figure 13 : Évolution d'une phosphocholine en fonction du pH.

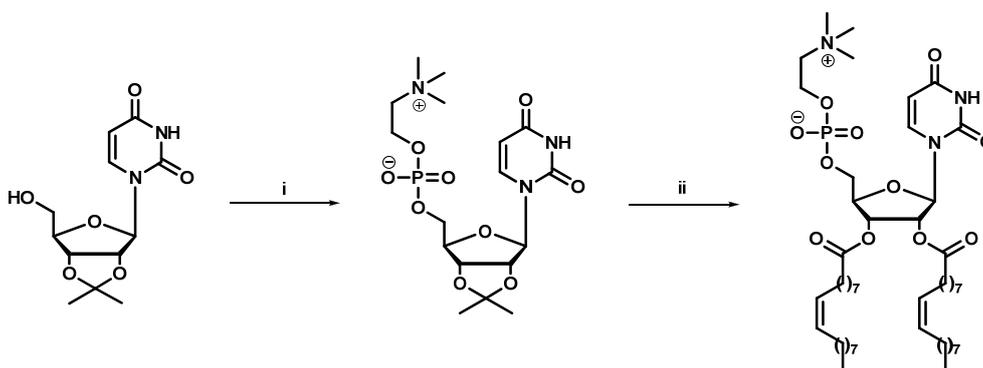


Figure 14 : Synthèse d'un NL zwitterionique. i) Chloro-oxo-dioxaphospholane, TEA, THF, 0 °C, 4 h puis triméthylamine, AcCN, THF, 60 °C, 24 h. ii) HCl dans acide acétique/H<sub>2</sub>O puis acide oléique, DCC, DMAP, DMF, température ambiante, 14 h.

## II.2.4 Les NLs non chargés

Les NLs non chargés sont globalement les moins représentés. Le noyau nucléoside + lipide étant très faiblement soluble dans l'eau, ils sont généralement associés à des structures polaires comme des polyéthylèneglycols<sup>37</sup> (Figure 15 a) ou des sucres<sup>38</sup> (Figure 15 b).

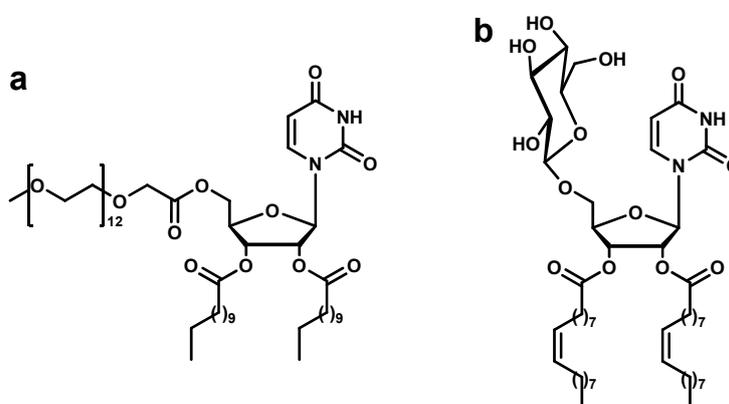


Figure 15 : Exemples de NLs non chargés<sup>37,38</sup>.

## II.2.5 Organisations supramoléculaires

Contrairement aux autres amphiphiles plus conventionnels, les NLs possèdent une tête polaire nucléoside ou nucléotide riche en possibilités d'interactions : interactions par  $\pi$ - $\pi$  stacking et liaisons hydrogène, ces deux types d'interactions pouvant conduire à des interactions entre bases nucléiques (A-T, C-G...). L'association de la possibilité de reconnaissance<sup>39,40</sup> et des propriétés d'organisation des lipides font des NLs des molécules parmi les plus intéressantes pour la conception de nouvelles organisations supramoléculaires. Ce concept de reconnaissance moléculaire par des NLs a tout d'abord été appliqué à des films à l'interface air-eau<sup>41,42,43</sup>. L'interaction base-base aux interfaces mésoscopiques, comme trouvés dans les systèmes micellaires et vésiculaires, ont fait l'objet d'études<sup>44,45,46,47,48,49,50,51</sup>. Les données réunies par différentes techniques (film de Langmuir, UV-vis, FTIR, *etc.*), permettent de mettre en évidence l'existence de liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires. Un exemple est la reconnaissance d'un oligonucléotide poly-adénosine par des NLs bolaformes pour former des nanofibres (Figure 16)<sup>52,53</sup>. En supplément de ces travaux, les interactions NL-NL ont été étudiées pour la formation de diverses organisations supramoléculaires : micelles<sup>54</sup>, vésicules<sup>32,55</sup> et monocouches<sup>56,57</sup>.

L'impact et l'importance de la partie nucléique de ces composés amphiphiles ont donc clairement été identifiés. Les propriétés d'organisations et de reconnaissance apportés par les dérivés d'acide nucléique sont un plus indéniable pour le développement et l'étude d'organisation supramoléculaire.

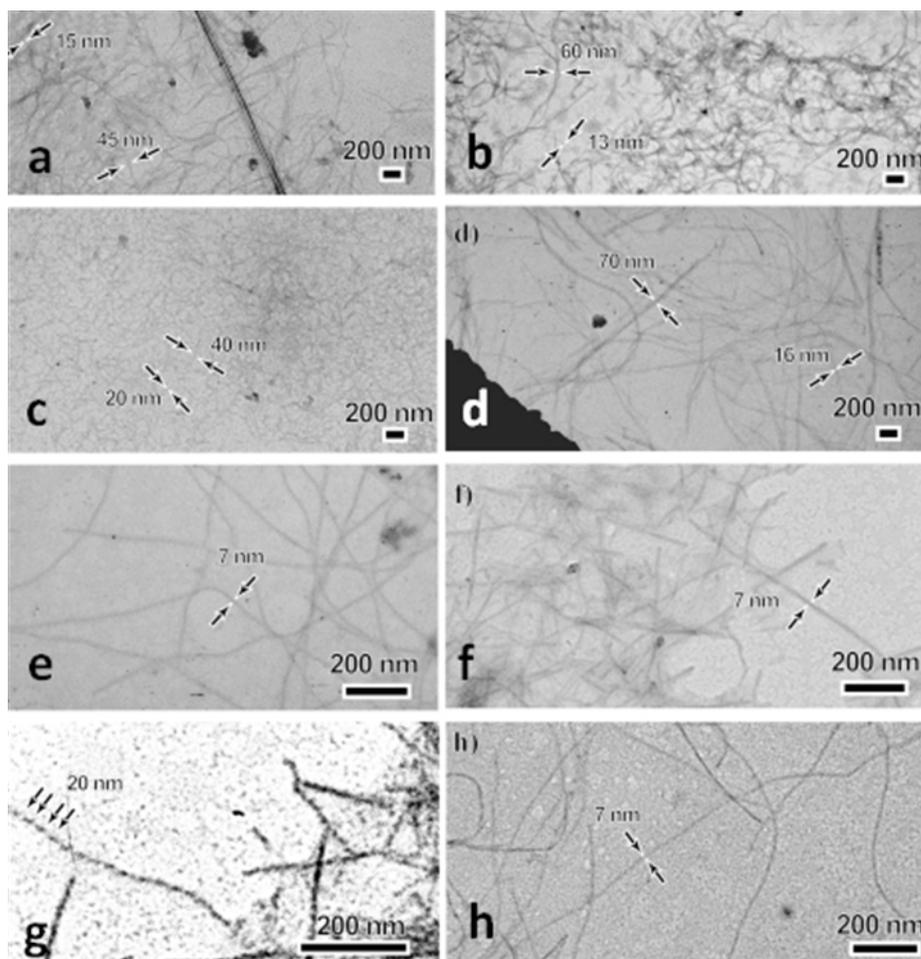


Figure 16 : Images MET de nanofibres formées par un NL bolaamphiphile (deux thymidines séparées par une chaîne eicosyl)<sup>52,53</sup> en présence : a) d'un dimère d'adénosine, b) d'un tétramère d'adénosine, c) d'un hexamère d'adénosine, d) d'un octamère d'adénosine et e) d'un decamère d'adénosine. Images MET de fibres formées par le NL bolaamphiphile en présence de poly A plus longs f) 20mère et h) 40mère. g) agrandissement des fibres observées en f). Les flèches indiquent le pas de l'hélice de 20 nm.

Depuis 2002, l'équipe de Monsieur le professeur P. Barthélémy s'est intéressée à la conception de nouveaux NLs et de nombreux exemples ont pu être préparés. Ces NLs présentent une grande diversité structurale. Ainsi les fixations de structures lipidiques sur les positions 5', 3' et 3',2' ont été envisagées. Différents exemples des synthèses de ces molécules sont présentés Figure 9a, 11, 12 et 14. Des exemples de chaque famille de NLs ont ainsi été synthétisés et ont permis de mettre en évidence la formation de diverses structures supramoléculaires comme par exemple des vésicules (Figure 17 a, b). Il a également été possible de mettre en évidence la capacité de ces NLs à reconnaître un acide nucléique

(Figure 17 c). Ces propriétés de complexation des acides nucléiques font de ces NLs des molécules d'intérêt pour la transfection.

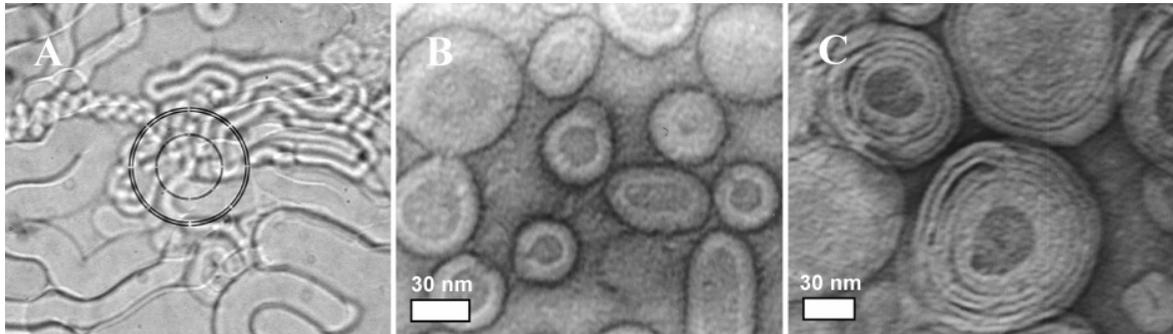


Figure 17 : (A) Image de microscopie optique de vésicules “worm-like” formées par la O-Et-DOUPC dans l'eau<sup>33</sup> (Cercle interne = 14  $\mu\text{m}$ ). (B) Images MET de vésicules obtenues après extrusion à 50 nm d'une solution de O-Et-DOUPC. (C) Image MET du complexe ADN/ O-Et-DOUPC.

### II.2.6 Transfection

La délivrance d'acides nucléiques dans des cellules requiert généralement l'emploi de vecteurs synthétiques capables de complexer les acides nucléiques, le complexe formé devant être capable de pénétrer la cellule. De nombreux vecteurs actuellement d'usage courant en laboratoire pour les transfections *in-vitro* sont des amphiphiles cationiques<sup>5</sup>. Il est donc logique de penser que les NLs et plus particulièrement les NLs cationiques sont susceptibles d'être de bons agents de transfection. Ces propriétés de transfection ont pu être mises en évidence sur des cellules CHO<sup>33</sup>. Les dérivés cationiques comme la O-Et-DOUPC se sont avérés de bons agents de transfection, ce résultat étant obtenu à partir d'un rapporteur  $\beta$ -gal (Figure 18). Par ailleurs ces composés NLs présentent une faible toxicité ce qui est également une qualité importante.

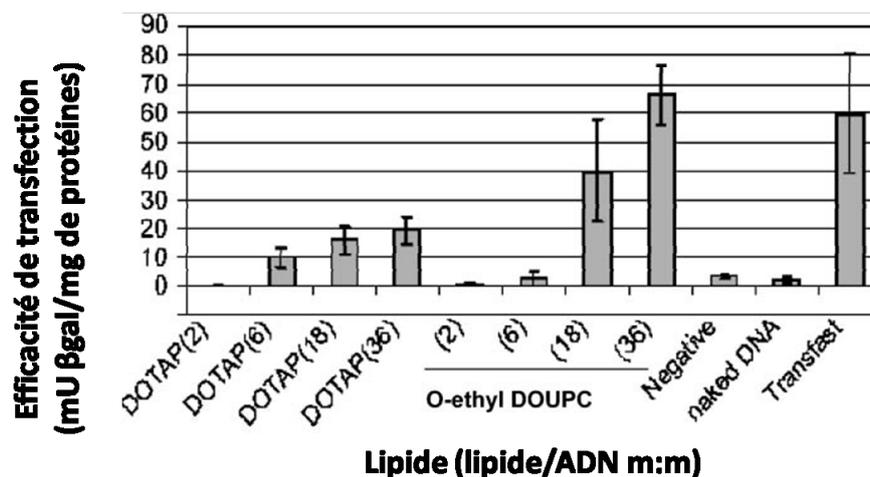


Figure 18 : Résultats de transfection obtenus pour O-Et-DOUPC comparés à ceux obtenus avec les agents de transfection DOTAP et Transfast<sup>33</sup>.

Si les NLs les plus employés pour leurs propriétés de transfection et leur capacité à complexer les acides nucléiques sont les NLs cationiques, il ne faut pas pour autant négliger les autres grandes familles de NLs. Ainsi la complexation d'ADN par des NLs neutres a également été observée. La capacité de complexation des glycosylnucléosides lipides a notamment été étudiée par Arigon *et al.*<sup>35</sup>. Cette complexation a pu être observée par différentes techniques (UV-vis, Quasi elastic light scattering (QELS), MET, gel d'électrophorèse, RMN <sup>31</sup>P, IR et Dichroïsme Circulaire (DC)). Les résultats ainsi obtenus indiquent une complexation des acides nucléiques par les glycosylnucléosides lipides. Cette complexation est liée non plus à des interactions électrostatiques entre un polyanion (oligonucléotide) et un NLs cationique, mais uniquement au caractère amphiphile et aux interactions entre le sucre des glycosylnucléosides lipides et les phosphates des acides nucléiques.

### II.3 Oligonucléotides amphiphiles (ONAs)

Le développement d'oligonucléotides amphiphiles (ONAs) remonte à la fin des années 80, début des années 90. Cet intérêt est étroitement lié à celui des stratégies antisens pour la thérapie génique<sup>58a,b,c</sup>. Le postulat de départ derrière la synthèse des ONAs était que la présence d'une structure hydrophobe comme un lipide, pouvait permettre la fixation de l'oligonucléotide dans les membranes<sup>59,60</sup> et faciliter l'internalisation<sup>61,62</sup>. Cette hypothèse s'est avérée exacte, et depuis, différents ONAs ont pu montrer leur capacité de

transfection sur différentes lignées cellulaires<sup>63</sup>. Différentes natures de structures hydrophobes peuvent être envisagées comme des oligonucléotides peptides conjugués<sup>64,65</sup>, des oligonucléotides polymères conjugués<sup>66,67,68</sup> ou encore des oligonucléotides lipides conjugués. Ces travaux de thèse ont porté pour l'essentiel sur les ONAs lipides conjugués.

### **II.3.1 Lipides conjugués**

La fixation d'une structure lipidique sur un oligonucléotide est une opération délicate qui nécessite une réelle réflexion sur la chimie employée. Actuellement la méthode de modification la plus simple est l'emploi d'un phosphoramidite modifié. Différentes structures sont disponibles dans le commerce. Ces phosphoramidites permettent la modification de n'importe quelle position de l'oligonucléotide (en position terminale ou intercalée entre deux nucléotides). Les ONAs de structure conventionnelle (généralement des dérivés cholestérol) sont actuellement disponibles commercialement. Il est à noter toutefois que la modification des nucléotides au cœur de la séquence est nettement plus complexe. Des exemples de ces modifications sont proposés dans la littérature. Ces modifications peuvent être apportées sur le sucre<sup>69,70</sup>, sur le phosphate<sup>71</sup> et/ou sur la base<sup>72</sup>. D'une manière générale les chaînes hydrophobes peuvent être incorporées de deux façons : (1) soit pendant la synthèse de l'oligonucléotide *via* l'utilisation de phosphoramidites modifiées, (2) soit être greffées sur l'oligonucléotide après sa synthèse.

### **II.3.2 Modification de l'oligonucléotide sur support**

Ce type de modification est le plus employé, les exemples types sont les modifications par les phosphoramidites commerciales. Le sens usuel de synthèse d'un oligonucléotide étant de 3' vers 5', les modifications les plus accessibles se font donc en position 5' terminale. Les fonctionnalisations intra-nucléotides induisent de fortes diminutions de rendement, elles sont peu employées. La modification de la position 3' terminale est possible, mais nécessite des voies de synthèse plus complexes<sup>73</sup>. La fonctionnalisation des oligonucléotides par le biais de liens conventionnels comme les esters est particulièrement délicate, car ces derniers ne sont pas compatibles avec l'étape de déprotection et de clivage du support qui se déroule en milieu ammoniacal.

### II.3.3 Modification de l'oligonucléotide libre

La modification d'un oligonucléotide libéré de son support et déprotégé est un problème chimique délicat. Kabanov et *al* proposent toutefois une méthode pour réaliser la modification de la position 5' phosphate d'un oligonucléotide emprisonné dans une micelle inverse (Figure 19)<sup>74</sup>. La colocalisation de l'alcool lipophile, de l'acide nucléique hydrophobe et du carbodiimide à l'interface lipide/eau apporté par le système micellaire, assure l'efficacité de la réaction. Cette méthode est théoriquement applicable à tout acide nucléique portant un phosphate en 5'.

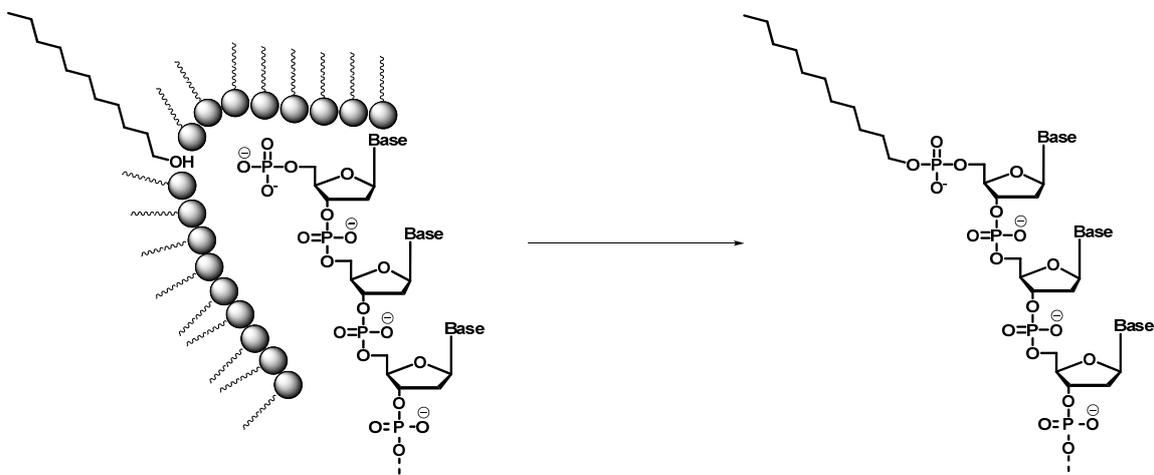


Figure 19 : Stratégie de modification d'oligonucléotides libres assistée par micelle inverse<sup>74</sup>.

Une méthode alternative a été proposée par Abell et *al*, cette méthode met en œuvre des acides gras (Figure 20a) ou thiols gras activés (Figure 20b) et permet la formation d'ONAs modifiés sur n'importe quelle position<sup>75</sup>.

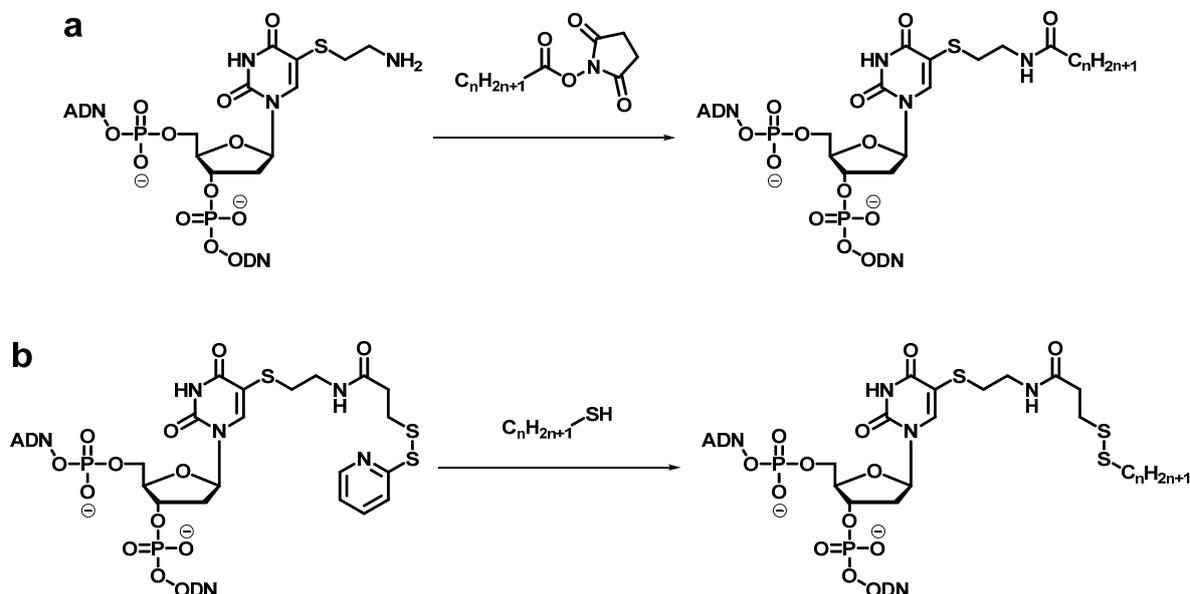


Figure 20 : Modification d'oligonucléotides libres par formation d'amide (a) ou de pont disulfure (b).<sup>75</sup>

### II.3.4 Organisations supramoléculaires

L'organisation des ONAs est actuellement peu connue. Deux aspects de cette organisation ont été envisagés.

Le premier, et le plus étudié, est l'organisation liée à la présence de la séquence d'acide nucléique. En effet, un ONA est avant tout un oligonucléotide, il est donc théoriquement capable de former un duplex avec son brin complémentaire. Ces organisations ont largement été étudiées, puisque pour pouvoir utiliser les ONAs dans le cadre de stratégies antisens, la présence de la chaîne hydrophobe ne doit pas interférer avec la formation du duplex. Les études réalisées sur l'impact de la chaîne lipidique, sur la reconnaissance du brin complémentaire et la formation du duplex, sont contradictoires. Certaines décrivent une déstabilisation<sup>71,76,77</sup>, d'autres une stabilisation<sup>78</sup> et les dernières décrivent une absence d'impact<sup>71,73,79,80</sup>. Ces études ont permis de mettre en évidence que l'activité de stabilisation ou de déstabilisation dépendait surtout de la position modifiée par

rapport à la séquence ciblée. D'une manière intéressante, le duplex formé par un ONA présentant un lipide en cœur de chaîne ne sera pas nécessairement plus déstabilisé que le même duplex où le ONA est modifié en position terminale. Cela dépend d'avantage de la position du lipide par rapport au duplex formé (petit ou grand sillon) : selon l'importance de la reconnaissance de ce fragment de séquence, l'impact sera stabilisant ou non<sup>81</sup>. Les stabilisations ou déstabilisations généralement observées restent relativement faibles et correspondent le plus souvent à des évolutions de  $\pm 5$  °C du  $T_m$ . Il est toutefois à noter que de plus importantes stabilisations des duplex ont été décrites par Letsinger *et al*<sup>80</sup> entre 2 ONAs complémentaires. Ces stabilisations peuvent aller jusqu'à déplacer le  $T_m$  de plus de 20 °C.

Le second aspect est la formation de structures supramoléculaires liées à l'amphiphilie des ONAs. Différents exemples d'organisations ont pu être rapportés dans la littérature, notamment à propos des ONAs peptides conjugués formant des nanofibres (Figure 21a)<sup>59</sup> et des ONAs polymères conjugués formant des vésicules (Figure 21b)<sup>82</sup>.

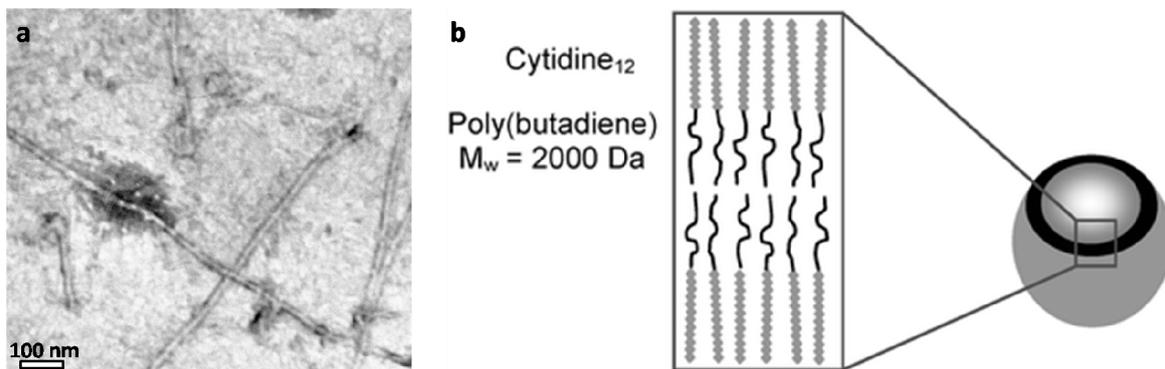


Figure 21 : Exemple d'organisations observées. a) Nanofibres formées par un ONA peptide conjugué<sup>59</sup>. b) Représentation de l'organisation en vésicules d'un ONA polymère conjugué<sup>82</sup>.

Les exemples d'organisations observés sur les ONAs lipides conjugués sont toutefois plus rares. Quelques exemples d'organisations peuvent néanmoins être observés. Des organisations de type micelles (Figure 22a)<sup>83</sup> ou vésicules (Figure 22b)<sup>84</sup> ont été rapportées dans la littérature.

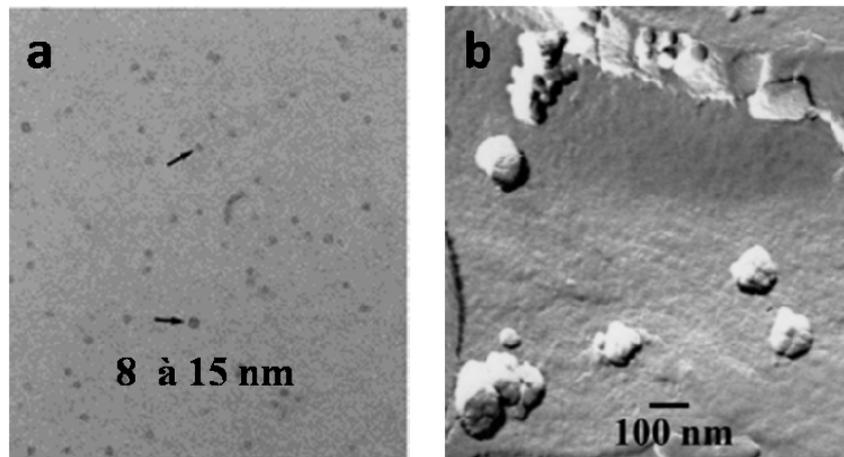


Figure 22 : Organisations observées pour des ONAs lipides conjugués. a) micelles<sup>83</sup>, b) vésicules<sup>84</sup>.

### **II.3.5 Applications (1) transfection**

Les ONAs ont originellement été conçus en parallèle de l'évolution des stratégies antisens, donc pour l'application à la transfection. Les molécules d'acides nucléiques antisens ont été expérimentées avec succès pour bloquer l'expression d'ARNm. Le développement de thérapies basées sur des antisens *in-vivo* est limité par la faible internalisation des structures polyanioniques de grande taille que sont les oligonucléotides. Les ONAs représentent un outil très intéressant pour le développement de thérapies antisens. L'internalisation des ONAs a pu être montrée comme étant largement augmentée par rapport à l'internalisation de leurs analogues non lipidiques<sup>59,85,86,87</sup>. Il a de plus été démontré que l'ajout d'une structure lipidique augmente la résistance des acides nucléiques aux nucléases<sup>69,75,85</sup>, et cette résistance semble liée à la dimension de la structure lipidique<sup>88</sup>. Cette stratégie a également été développée avec succès pour le transfert de petits ARNs interférents<sup>89,90</sup>. Généralement, la partie lipidique sert à ficher le ONA dans la membrane lipidique ce qui favorise l'endocytose<sup>73</sup>.

L'un des exemples, et des succès, le plus couramment cité est l'utilisation de ONAs cholestérol pour l'inhibition spécifique de miARN. Ces ONAs baptisés antagomirs ont montré une nette activité d'inhibition *in-vivo* dans un modèle murin<sup>91</sup>. Les miARNs sont des acides nucléiques abondants, non codants, de courte séquence (20 nucléotides en moyenne). Ils jouent un rôle très important dans la régulation des gènes<sup>92</sup>. Ces résultats soulignent bien le potentiel représenté par les ONAs comme antisens ou agents thérapeutiques.

### **II.3.6 Applications (2) surfaces codées**

Les propriétés uniques de reconnaissance et de codage de la tête oligonucléotide associées à l'amphiphilie font des ONAs des « building-blocks » de premier plan pour la fonctionnalisation de surfaces. Différents auteurs ont travaillé sur la fonctionnalisation et le codage de surfaces lipidiques par des ONAs. Boxer et al<sup>93</sup> ont proposé l'encodage de puces lipidiques par des ONAs (Figure 23). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la reconnaissance spécifique d'une surface codée (par un ONA) par un liposome également codé (par un ONA complémentaire). Pour mettre en évidence ce comportement, des puces lipidiques compartimentées ont été préparées. Deux séquences A et B ont été choisies pour coder la puce et réparties chacune de son côté. Des liposomes fonctionnalisés par les ONAs complémentaires (A' et B') et portant une sonde chacun d'une couleur différente (rouge et verte) sont ajoutés. La séparation des marqueurs rouges et verts indique bien la répartition des ONAs de manière spécifique à leur séquence.

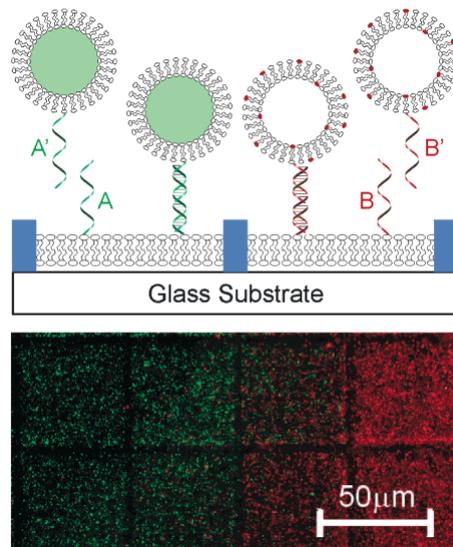


Figure 23 : Micro-puces lipidiques codées par ONAs et reconnues par des liposomes complémentaires<sup>93</sup>.

Plus récemment, les travaux réalisés au laboratoire et publiés par Gissot *et al.*<sup>94</sup> ont également pu mettre en évidence cette reconnaissance spécifique, mais cette fois sur des structures de type liposome. Des liposomes de DOPC (dioléylglycérophosphocholine) sont préparés par extrusion puis fonctionnalisés par ajout d'un ONA. Un oligonucléotide complémentaire marqué est ensuite ajouté. Les liposomes sont alors observables en microscopie de fluorescence, ce qui permet de mettre en évidence la reconnaissance des vésicules par l'oligonucléotide marqué (Figure 24). Les liposomes sont par la suite chauffés. Au dessus de la température de dénaturation, les oligonucléotides se désassocient et les liposomes ne sont plus observables en fluorescence. En dessous de cette température, les brins se réassocient et les liposomes réapparaissent. Cela indique bien que cette reconnaissance est liée à la séquence, mais cela indique également que cette reconnaissance est un système on/off parfaitement réversible et dépendant de la séquence.

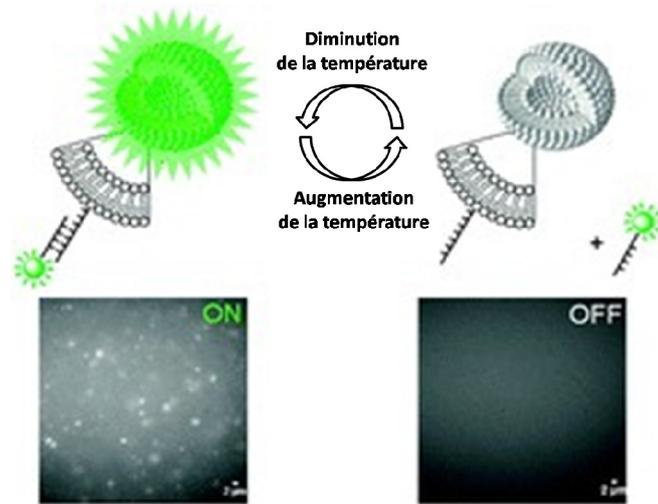


Figure 24 : Travaux développés par Gissot *et al.*<sup>94</sup>

Les amphiphiles dérivés d'acides nucléiques sont des molécules dérivées du vivant. Leurs propriétés particulières en font un outil de choix pour l'élaboration de nouvelles technologies aussi bien pour les matériaux codés que pour la thérapeutique.

# **III. Projet de recherche**

## III. Projet de recherche

L'objectif de ce travail est de développer une nouvelle classe de composés amphiphiles dérivés d'acides nucléiques. Pour cela, il est nécessaire de mettre en place une méthode de modification chimique simple et efficace, permettant la synthèse d'une grande variété de molécules amphiphiles de masses moléculaires faibles (nucléosides) et élevées (oligonucléotides). Selon le type de molécules, les approches de synthèse, d'études et les applications seront différentes. Il faut donc différencier deux grands axes de travail : les nucléosides amphiphiles et dérivés (faibles masses moléculaires) et les oligonucléotides amphiphiles (masses moléculaires élevées).

### III.1 Nucléosides amphiphiles et dérivés

L'objectif de cette partie sera le développement de nouveaux nucléosides amphiphiles (NAs). Ce travail consistera en l'élaboration d'une nouvelle méthode de synthèse permettant l'élaboration d'amphiphiles originaux. Une fois obtenues, ces molécules feront l'objet de caractérisations complètes (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HRMS). Les propriétés d'organisation de ces nouveaux NAs seront étudiées par tensiométrie, et observées en microscopie optique ainsi qu'en microscopie électronique à transmission (MET). Le développement de ces molécules permettra de mettre en évidence leur capacité à former des gels et de les définir comme une nouvelle classe de gélateurs de faible masse moléculaire (Low molecular weight gelator : LMWG). Les interactions à l'origine de la formation de ces organisations supramoléculaires feront l'objet de caractérisations complémentaires. Les propriétés des gels seront étudiées dans le cadre de tests de fusion. Les interactions de ces gels avec les acides nucléiques seront également observées en microscopie de fluorescence et en MET. L'application de ces nouvelles molécules pour la transfection sera également étudiée.

## III.2 Oligonucléotides amphiphiles

Du fait de leur fragilité et de leur caractère polyfonctionnel, la modification des oligonucléotides pour en faire des molécules amphiphiles est particulièrement délicate. Cela nécessite le développement d'une chimie de modification compatible avec les caractéristiques des oligonucléotides. Une fois la modification réalisée, ces macromolécules seront étudiées afin de mieux connaître l'impact de la structure hydrophobe sur le comportement de ces oligonucléotides. L'organisation de ces composés sera envisagée et rapidement définie par des études de diffusion de la lumière et des observations en microscopie de fluorescence. L'impact de la présence d'une chaîne lipidique sur la reconnaissance entre la molécule et son brin complémentaire sera évalué par mesure de la température de thermo-dénaturation des duplex. La capacité de ces nouveaux amphiphiles à franchir la barrière cytoplasmique et à pénétrer les cellules sera évaluée par cytométrie en flux et observée en microscopie de fluorescence conventionnelle et confocale. Une fois l'internalisation des amphiphiles confirmée, ils seront appliqués à une cible d'intérêt thérapeutique, le virus de l'hépatite C.

L'une des étapes clés de ce travail sera donc le choix de la modification chimique employée pour obtenir ces amphiphiles. La chimie mise en oeuvre devra être compatible avec la nature même des acides nucléiques. Ces modifications devront être douces pour ne pas dégrader le nucléoside ou l'oligonucléotide. Elles devront pouvoir se faire dans l'eau et être sélectives. Une chimie est particulièrement bien adaptée à ce cahier des charges, il s'agit de la chimie clic ou « Click-chemistry ».

## III.3 Chimie clic (ou click-chemistry)

La chimie clic est un concept introduit par Sharpless au début des années 2000<sup>95,96</sup>. Il s'agit du regroupement sous une même appellation de réactions chimiques présentant des caractéristiques communes. Les principales caractéristiques que doit présenter une réaction pour être considérée comme de la chimie clic sont les suivantes :

- simple à mettre en oeuvre
- stéréo sélective

- de rendement élevé (de l'ordre de 70 %),
- sans purification,
- non sensible à l'eau ou à l'oxygène
- produits de départ facilement disponibles ou commerciaux

Ces caractéristiques ont rapidement fait de la chimie clic un outil de choix pour le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Il existe de nombreuses réactions chimiques susceptibles d'être considérées comme « clic ». La réaction la plus fréquemment citée est la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, plus précisément la réaction de cycloaddition [3+2] décrite par Huisgen<sup>97</sup>. Cette réaction conduit à la formation de composés de type 1,2,3-triazole en faisant réagir un alcyne terminal et un azoture (Figure 25). Cette réaction, actuellement très employée, a notamment montré un grand potentiel pour la modification de molécules biologiques.

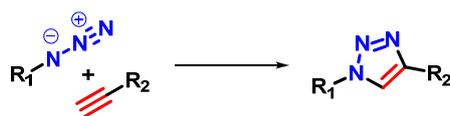


Figure 25 : Schéma général de la réaction de Huisgen.

### III.3.1 Réaction de Huisgen

Cette réaction a initialement été décrite au début du XXème siècle par Dimroth, mais ce n'est que dans les années 1960 que le mécanisme de la réaction a été élucidé par Huisgen<sup>98</sup>. Initialement cette réaction conduisait à la formation d'un mélange des deux triazoles isomères 1,4- et 1,5- disubstitués (Figure 26 a). De nombreuses tentatives visant à ne produire qu'un unique isomère ont échoué. Ce n'est que dans les années 2000 avec l'utilisation des catalyseurs au cuivre que ces tentatives ont été fructueuses. Suite à la découverte par Sharpless en 2001 de l'utilisation de la catalyse au cuivre, cette réaction a connu un renouveau qui la place actuellement au premier plan de la chimie clic. Cette réaction est maintenant bien connue et de nombreux protocoles sont proposés faisant appel à différentes sources de cuivre (Cu (0), Cu(I) ou Cu(II)) dans une gamme variée de solvants seuls ou en mélanges incluant généralement une forte proportion d'eau.

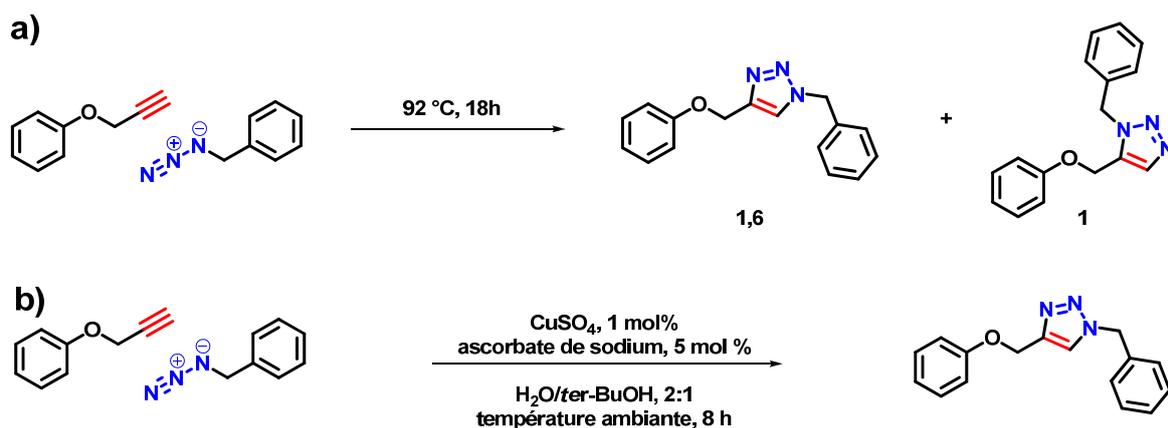


Figure 26 : Réaction initiale de Huisgen (a) et réaction catalysée par le cuivre (b).

D'une manière générale les conditions les plus régulièrement décrites emploient le sulfate de cuivre (II) et l'ascorbate de sodium en solution dans un mélange *ter*-butanol/eau à température ambiante durant une dizaine d'heures. Ce temps de réaction peut être réduit à quelques minutes grâce à l'activation par micro-ondes. Un autre facteur qui a participé à la promotion de cette réaction est son orthogonalité vis-à-vis des autres structures et groupes fonctionnels tels que les esters, les acides carboxyliques, les alcènes, les alcools et les amines.

Le mécanisme de cette réaction a été proposé par Sharpless (Figure 27)<sup>95</sup>. Ce mécanisme débute par la formation d'un complexe d'acétylide de cuivre (I). Les calculs de densité fonctionnelle montrent que ce mécanisme serait d'avantage une réaction étape par étape (1 => 2 => 3 => 4) plutôt qu'une cycloaddition concertée (1 => 4). Ce résultat conduit à la proposition d'un mécanisme passant par un métallocycle (3) à 6 chaînons. Le mécanisme de réaction met en évidence l'importance du cuivre et son rôle dans la stéréosélectivité<sup>95</sup>.

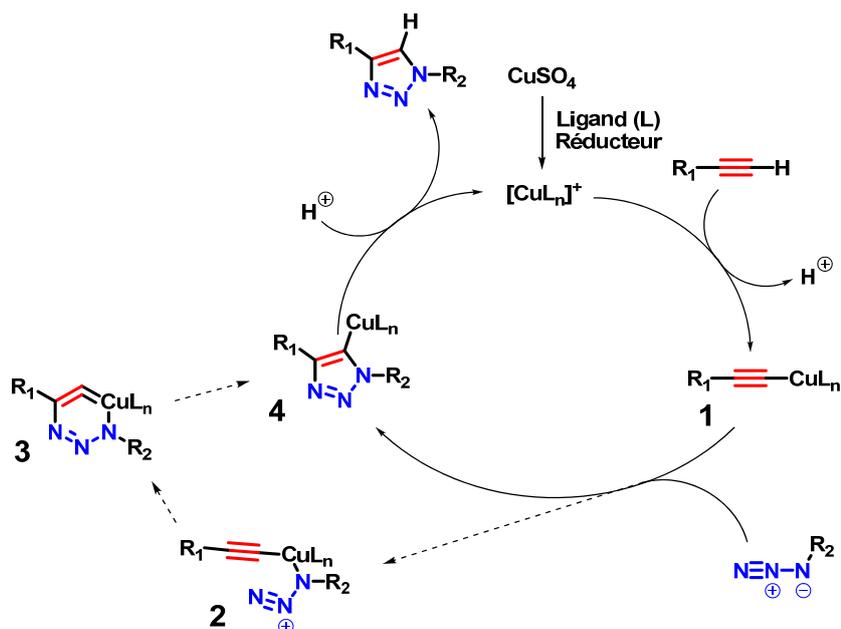


Figure 27 : Mécanisme proposé par la Sharpless pour la cycloaddition catalysée par le cuivre.

### III.3.2 Application aux molécules du vivant

Du fait de ses nombreuses qualités, la réaction de cycloaddition initialement décrite par Huisgen est devenue la réaction la plus représentative de la chimie clic. Ses caractéristiques, son stéréo-contrôle, la non nécessité de purification et son absence de réaction orthogonale en font un outil de choix pour le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique<sup>99</sup>. Cette réaction est un outil adapté aux bio-molécules qui présentent généralement de nombreux centres asymétriques et de nombreux groupes fonctionnels. La cyclo-addition 1,3-dipolaire offre en effet de nombreuses opportunités de modifications.

Cette réaction a rapidement été exploitée pour son potentiel de modification et de fonctionnalisation des dérivés de nucléosides, nucléotides et d'oligonucléotides<sup>100</sup>. Ces molécules peuvent être développées pour des applications thérapeutiques<sup>101,102,103</sup> comme les dérivés de la ribavirine<sup>104,105,106</sup>. D'autres molécules peuvent avoir des applications pour les matériaux comme les hydrogélateurs<sup>107</sup>. La chimie clic a également été exploitée pour la formation de polymères de nucléosides. Elle peut aussi bien conduire à la formation de dimères nucléosidiques<sup>108</sup> que d'oligonucléotides<sup>109,110</sup>. Son emploi a rapidement été étendu aux oligonucléotides<sup>111</sup>, elle est à présent décrite pour un large choix de modifications telles

que la circularisation<sup>112</sup>, le marquage<sup>113,114</sup> (terminal ou non) ou encore la formation d'hybrides (peptides, carbohydrates)<sup>115,116,117,118</sup> (Figure 28). Actuellement elle apparaît comme un outil de choix pour le développement de nouveaux amphiphiles dérivés d'acides nucléiques.

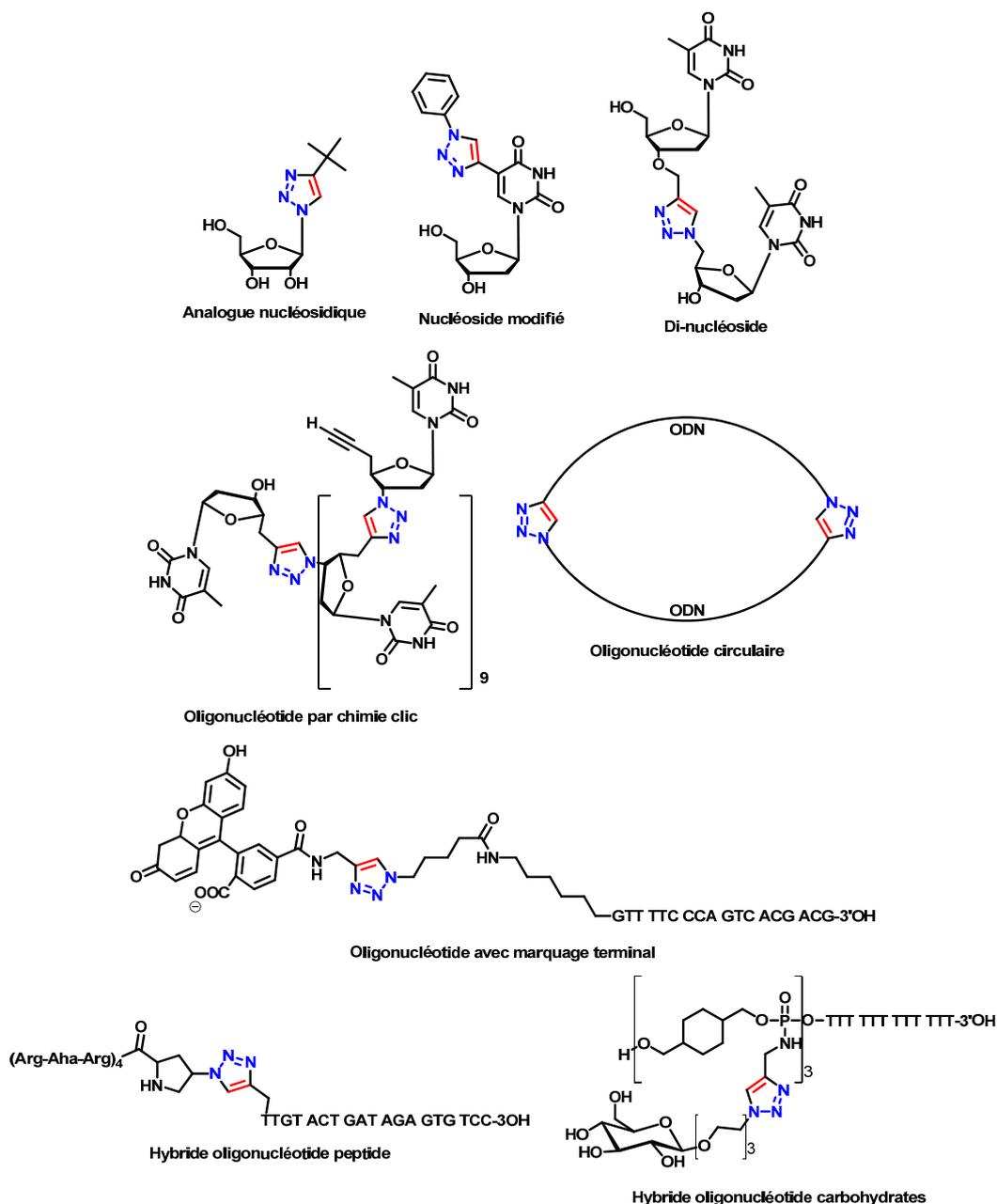


Figure 28 : Exemples d'application de la chimie clic aux dérivés d'acides nucléiques<sup>104, 107, 108, 109, 112, 114, 115, 117</sup>.

Dans ce travail de nouvelles classes de composés amphiphiles dérivés d'acides nucléiques ont été développées. L'approche chimique choisie (chimie clic) permet de

développer une large gamme de composés amphiphiles modulables. La modularité apportée par cette nouvelle voie de synthèse permet l'étude du rapport entre la structure chimique des composés amphiphiles et l'organisation supramoléculaire formée par ce composé. Cette méthode de synthèse tournée vers la diversité est également un moyen de définir la différence d'activité des composés amphiphiles en fonction de la partie hydrophobe associée. Les travaux de recherche présentés permettent d'envisager de nouvelles familles d'amphiphiles adaptables à leurs applications qu'il s'agisse d'applications aux nanotechnologies ou aux biotechnologies.

# **IV. Nucléosides amphiphiles (NAs) et Glycosylnucléosides amphiphiles (GNAs)**

# IV. Nucléosides amphiphiles (NAs) et Glycosylnucléosides amphiphiles (GNAs)

## IV.1 Introduction

La synthèse de structures amphiphiles dérivées d'acides nucléiques peut être résumée à l'association de deux entités, l'une présentant une affinité pour l'eau, et une seconde qui sera plus affine des solvants organiques. Cette association peut être de différentes natures, il peut s'agir de couplages covalents entre les deux entités comme celles précédemment citées ou dans certains cas, il peut s'agir d'association par interaction ionique<sup>119,120</sup>. Dans tous les cas, il s'agit de l'association d'une molécule hydrophile (nucléosides, nucléotides ou oligonucléotides) à une seconde hydrophobe (lipides et dérivés). Dans le cadre de ces travaux de thèse, la chimie choisie pour le couplage des deux parties est la chimie clic. Cette chimie a été sélectionnée pour des raisons de synthèse. La réactivité du couplage alcyne-azoture est orthogonale aux réactivités des structures fonctionnelles présentes sur les dérivés d'acides nucléiques. En outre, le lien formé lors de cette réaction présente des propriétés particulières de résistance, de mime du vivant (isostère d'une liaison peptidique) et de possibilité d'interactions par stacking (organisation)<sup>121</sup>. Cette méthode permet d'éviter la mise en place d'une stratégie de protection et déprotection.

## IV.2 Nucléosides amphiphiles (NAs)

Les amphiphiles les plus simples à réaliser sont les nucléosides lipides. Il s'agit de molécules issues du couplage d'un nucléoside et d'un lipide.

### IV.2.1 5'-azido-5'-désoxynucléoside

Pour réaliser ce couplage par chimie clic, il est nécessaire de modifier les deux molécules à coupler pour permettre une réaction de clic. La modification de la position 5' d'un nucléoside est une réaction bien décrite dans la littérature (Figure 29). Deux protocoles sont ici rapportés et permettent l'obtention des dérivés 5'-azido-5'-désoxy de l'adénosine (**2**) et de la thymidine (**1**). Ces deux protocoles correspondent à la modification de l'hydroxyle en

5' du nucléoside pour favoriser sa substitution par un azoture. Les dérivés azotures sont obtenus avec des rendements supérieurs à 60 % sans aucun besoin de purification autre que des extractions et qu'une reprecipitation.

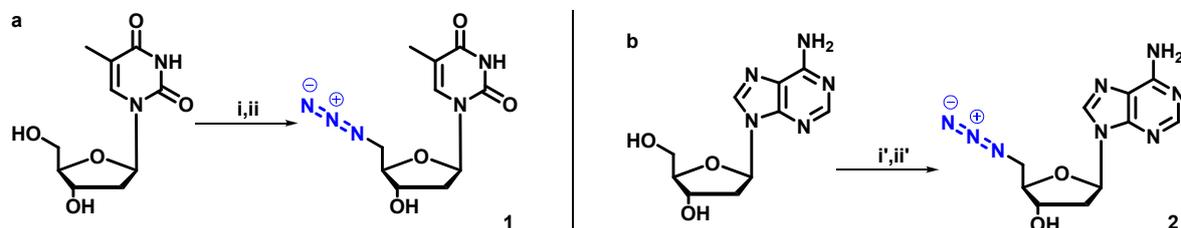


Figure 29 : a : Synthèse de la 5'-azido-5'-désoxythymidine. i) chlorure de méthanesulfonyle (1,1 éq), pyridine, température ambiante, 4 heures. ii)  $\text{NaN}_3$  (5 éq), DMF, 80 °C, 4 heures. b : Synthèse de la 5'-azido-2',5'-didésoxyadénosine i') chlorure de méthanesulfonyle (2,5 éq), pyridine, température ambiante, 4 heures. ii')  $\text{NaN}_3$  (5 éq), DMF, 85 °C, une nuit.

#### **IV.2.2 Lipides alcynes vrais**

Les lipides ainsi que leurs dérivés porteurs d'un alcyne vrai sont soit d'origine commerciale, soit préparés au laboratoire par des couplages simples de type couplage peptidique ou réaction de Williamson. La banque constituée dans le cadre de ces travaux est présentée sur la Figure 30. Une grande diversité de structures hydrophobes a été envisagée. Ces chaînes représentant les principales familles de structures lipidiques (alcools et acides gras, terpénoïdes, stéroïdes, glycérolipides modifiés...), des chaînes courtes d'origine commerciale ou encore des structures plus originales comme les dérivés hydrofluorés d'acides gras.

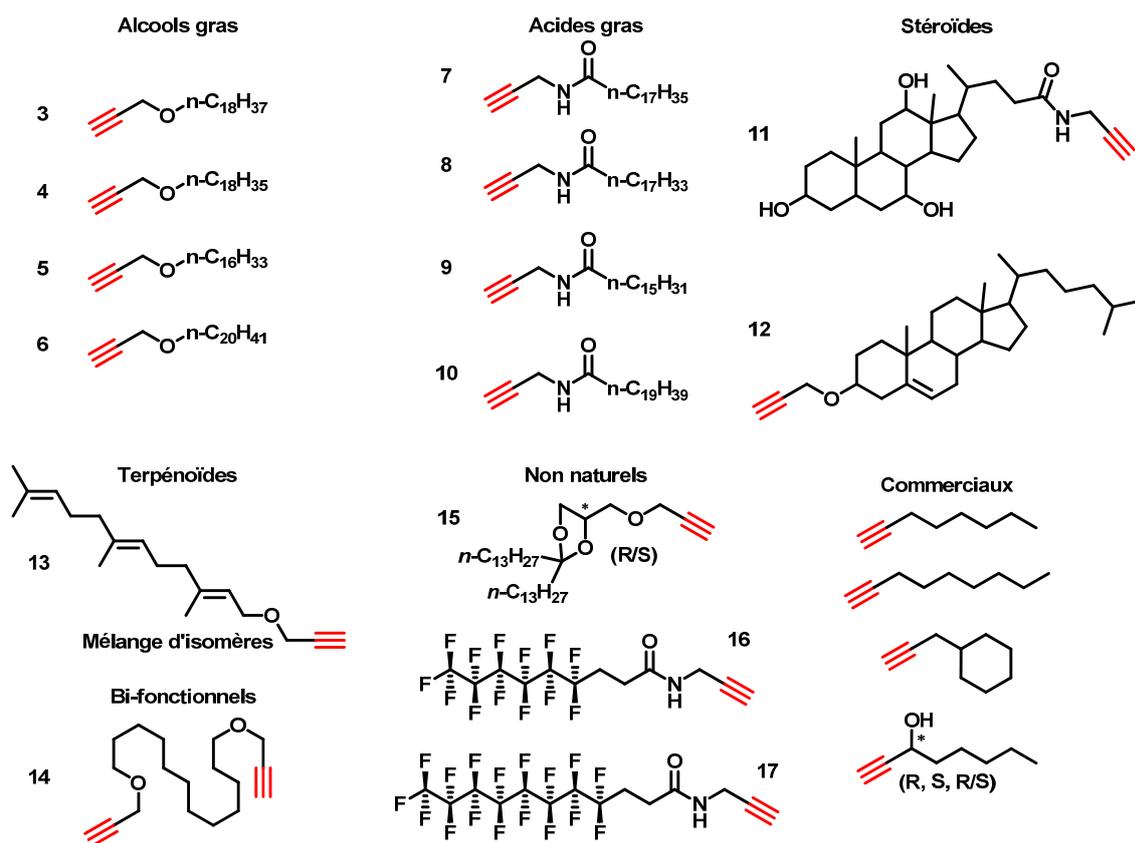
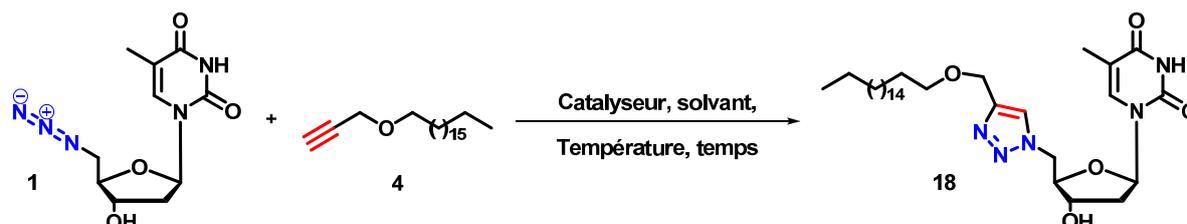


Figure 30 : Banque de structures lipidiques et dérivés fluorocarbures d'acides gras

### IV.2.3 Protocoles et synthèses

Les conditions réactionnelles issues de la littérature peuvent être extrêmement variées, le seul paramètre constant étant l'emploi de l'eau comme cosolvant. Le second cosolvant est généralement un solvant organique miscible à l'eau. Le cosolvant organique le plus régulièrement utilisé dans la littérature est le *ter*-butanol, mais certains protocoles utilisent le DMSO, l'éthanol, le DMF, le THF et même le toluène. Le catalyseur de cette réaction est le cuivre sous sa forme Cu (I). Il peut être mis en œuvre sous forme Cu(0), Cu (I) ou encore Cu (II). Il est généralement associé à un agent de réduction pour générer et régénérer le Cu (I). Le catalyseur le plus couramment utilisé est le sulfate de cuivre (II) associé à l'ascorbate de sodium mais de nouveaux catalyseurs plus actifs tels que les N-hétérocarbènes développés par Nolan ont été récemment proposés<sup>122,123</sup>. La réaction est décrite comme pouvant être réalisée à température ambiante ou assistée par des micro-ondes. Les temps de réaction peuvent varier de 5 minutes à 48 heures selon le protocole et les réactifs utilisés. Afin de déterminer les conditions les plus adaptées, différents tests ont

été réalisés sur un couplage lipide/nucléoside choisis comme référence. L'évolution de la réaction peut être facilement suivie par RMN  $^1\text{H}$  par la disparition des signaux des protons des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}$  du propargyle et l'apparition d'un singulet entre 7 et 8,5 ppm correspondant au proton du triazole. Les résultats obtenus sont indiqués sur la Figure 31 et nous ont permis de définir le protocole 5 comme étant le plus adapté pour l'obtention des molécules souhaitées.



Conditions	Azoture/alcyne	Catalyseur	Solvant	Température	Temps	Rendement brut
1	1	10 % CuI 1 éq DIEA	Toluène	Température ambiante	10 heures	Traces
2	1	10 % NHC CuBr	<i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O	Température ambiante	10 heures	40 %
3	1	10 % CuSO <sub>4</sub> 20 % ascorbate de sodium	<i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O	Température ambiante	10 heures	30 %
4	1	20 % CuSO <sub>4</sub> 40 % ascorbate de sodium	<i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O	Température ambiante	36 heures	64 %
5	1	10 % CuSO <sub>4</sub> 20 % ascorbate de sodium	THF/H <sub>2</sub> O	65 °C	5 heures	82 %

Figure 31 : Exemples de protocoles de chimie clic employés pour la formation des NLs.

L'utilisation de ces conditions expérimentales pour le greffage de structures lipidiques a permis l'élaboration d'une première banque de NAs. La banque de structures hydrophobes étant variée, ces premiers couplages permettent la formation de structures diverses (Figure 32) présentant des chaînes lipidiques ou dérivées plus ou moins longues, linéaires, cycliques, encombrées ou non, permettant de confirmer et généraliser le protocole proposé pour la synthèse des NAs en général.

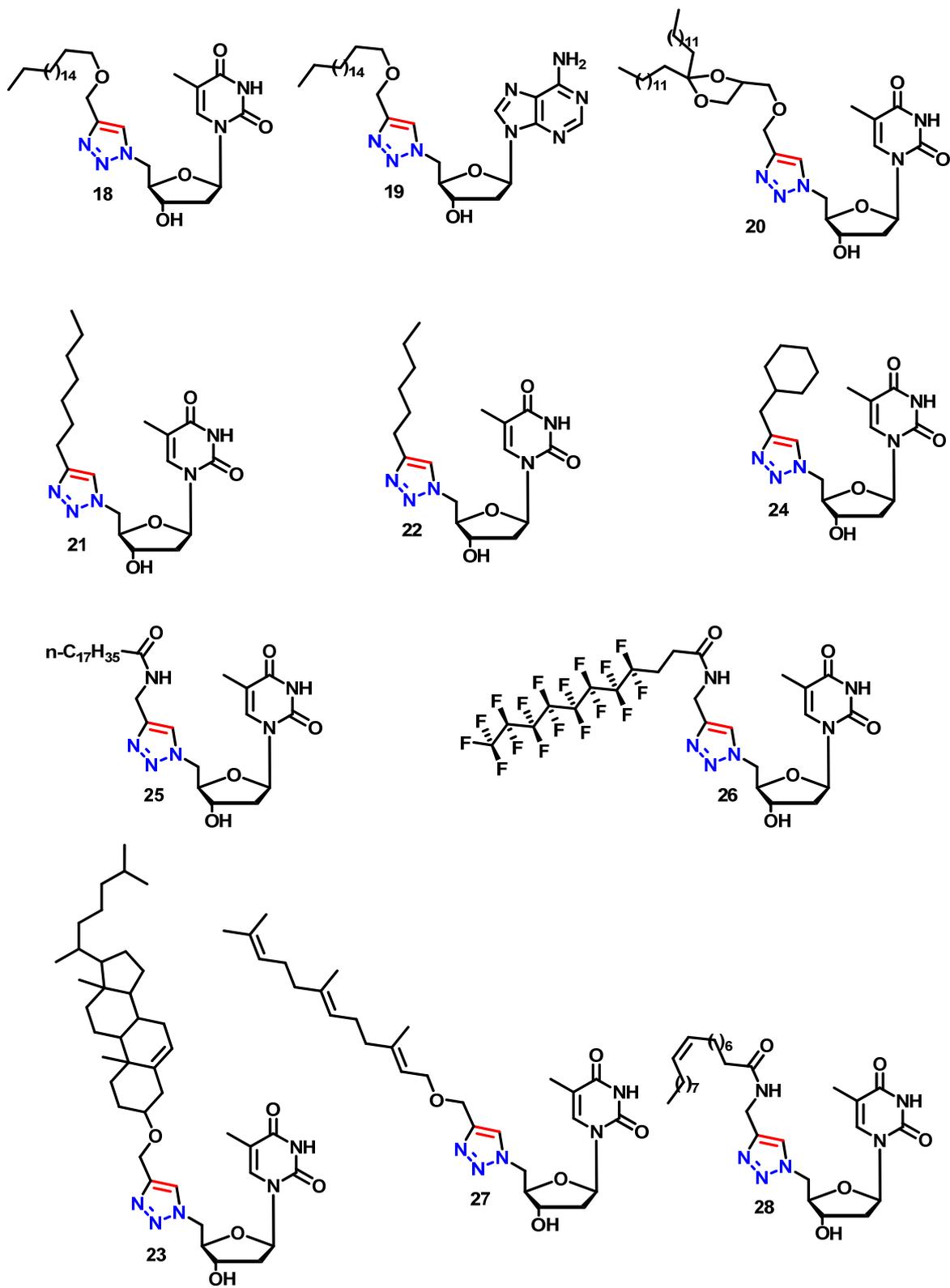


Figure 32 : Exemples de NAs synthésisés dans le cadre de ces travaux de thèse.

#### IV.2.4 Étude des propriétés des nucléosides amphiphiles

L'étude de cette première génération de NAs a permis de mettre en évidence leurs propriétés d'auto organisation, particulièrement dans les solvants organiques, leur solubilité dans l'eau étant trop faible. Les dérivés présentant des structures lipidiques cholestéryle (**23**) et octadécyle (**18**) ont été les plus étudiés. Les observations réalisées en microscopie électronique à transmission (MET) ont permis de mettre en évidence la formation de structures de type fibres hélicoïdales et nanotubes pour les dérivés cholestéryle dans le toluène (Figure 33) et membrane pour les dérivés octadécyle dans le *n*-butanol. Pour des concentrations plus élevées (8 % masse/masse), il est à noter que ces composés forment des organogels dans les solvants précités.

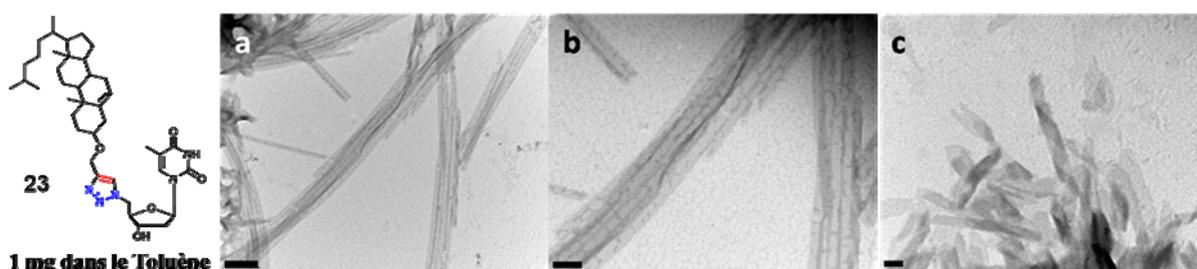


Figure 33 : Organisations supramoléculaires observées pour le dérivé cholestéryle dans le toluène (1 mg/mL). Formation de nanotubes, images a (échelle 500 nm) et b (échelle 200 nm). Formation de fibres hélicoïdales, image c (100 nm).

Au regard des structures développées les interactions possibles qui expliqueraient ces organisations sont majoritairement de type hydrophobe (lipide), liaisons hydrogène et  $\pi$ - $\pi$  stacking (nucléoside).

#### IV.2.5 Nucléosides amphiphiles hydrosolubles

Afin d'étendre les propriétés de gélification des NAs synthétisés à d'autres solvants et plus particulièrement à l'eau, ces NAs ont été modifiés. Plusieurs stratégies peuvent être proposées. Pour augmenter l'hydrosolubilité, la modification la plus employée est la formation de structures chargées : ammonium, phosphate et phosphocholine. Souhaitant développer avant tout des NAs non-ioniques, cette hypothèse a rapidement été éliminée. Une seconde solution était d'utiliser des lipides plus courts, porteurs de fonctions polaires ou des lipides amphipathiques comme des cholates favorisant la solubilité (Figure 34). Le gain de solubilité observé a permis l'observation en MET de structures supramoléculaires

dans l'eau, mais la solubilité n'était pas encore suffisante pour permettre la formation d'un hydrogel. Ces solutions ont donc été écartées.

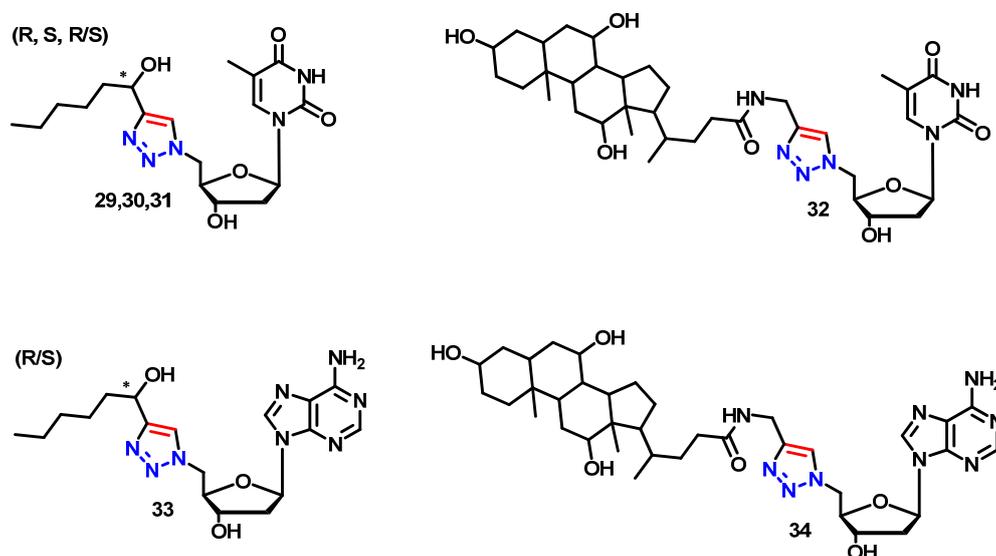


Figure 34 : Nouveaux NAs synthésisés pour améliorer l'hydrosolubilité.

La dernière possibilité étudiée a été d'ajouter des structures polaires supplémentaires telles qu'un second nucléoside pour former un bolaamphiphile. Ces structures peuvent être facilement préparées en une étape à partir d'un lipide difonctionnalisé (Figure 35).

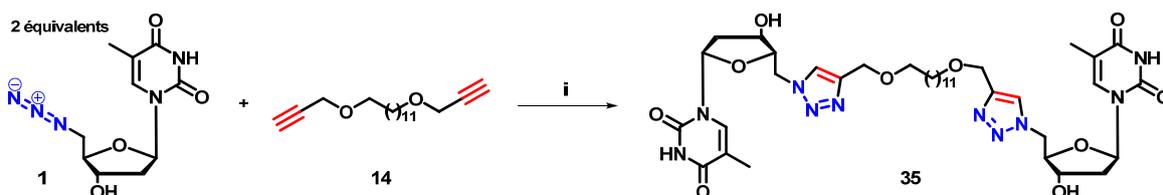


Figure 35 : Synthèse d'un bolaNA. i) 10 % mol  $\text{CuSO}_4$ , 20 % ascorbate de sodium, THF/Eau (50/50), 65 °C, 6 heures.

L'addition d'une nouvelle partie nucléosidique permet à nouveau une augmentation de la solubilité, mais là encore si le composé **35** peut former des structures supramoléculaires comme des vésicules, il n'est pas suffisamment hydrosoluble pour former un hydrogel. Une alternative à cette modification peut être proposée en ajoutant un dérivé carbohydrate plutôt qu'un nucléoside.

## IV.3 Glycosylnucléosides amphiphiles (GNAs)

### IV.3.1 Rappel

L'addition d'une partie sucre sur les NAs (Figure 36) pour les rendre plus solubles dans l'eau a été proposée en 2005 par Arigon *et al*<sup>38</sup>. Ces molécules présentent une bonne hydrosolubilité et sont capables de s'organiser pour former des fibres dans l'eau. Ces fibres peuvent former des vésicules après extrusion.

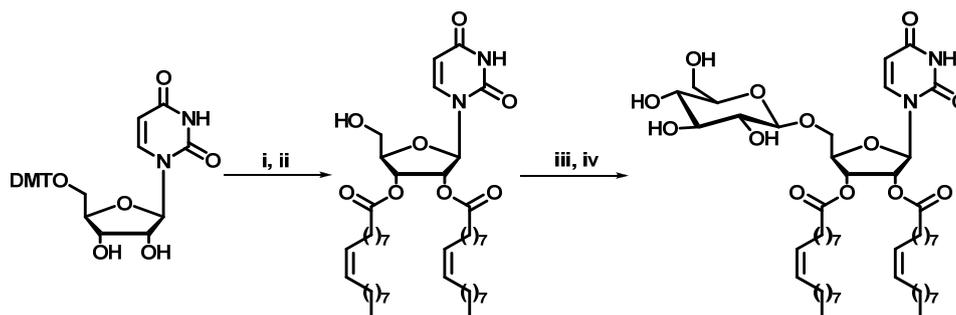


Figure 36 : Premier GNA décrit. i) acide oléique, DCC, DMAP, DMF, température ambiante, 12 h. ii) acide trichloroacétique, DCM. iii) trichloroacétimide de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyle, BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O dans le DCM. iv) MeONa, MeOH.

L'ajout d'une structure carbohydrate permet une augmentation significative de la solubilité, le maintien du potentiel d'interactions hydrophobes et ajoute des possibilités d'interactions par liaisons hydrogène.

### IV.3.2 Structures disponibles et synthèses

Afin de préparer ces dérivés glycosylnucléosides amphiphiles (GNAs) en partant des NAs synthétisés, il faut envisager une méthode de couplage. Différents exemples de sucres présentant un azoture sont commerciaux (Figure 37), la chimie clic leur a été appliquée.

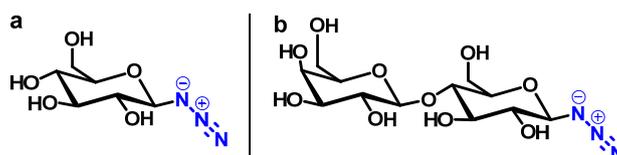


Figure 37 : Sucres porteurs d'azoture disponibles commercialement a) 1-azido- $\beta$ -(D)-glucopyranoside et b) 1-azido- $\beta$ -(D)-lactopyranoside.

Pour permettre la réaction de chimie clic sur le NA, il faut que ce dernier présente une structure alcyne vraie. Pour réaliser cette fonctionnalisation, la méthode proposée par Nakane et *al* en 2008<sup>124</sup> a été utilisée. Cette méthode permet en une étape la fixation d'un motif propargyle sur la position N3 de la thymidine. Cette réaction douce a lieu à température ambiante, dans le DMF en présence de  $K_2CO_3$ . (Figure 38).

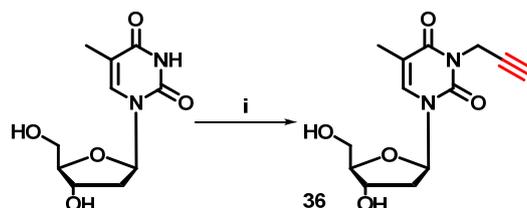


Figure 38 : Propargylation de la position N3 de la thymidine<sup>124</sup>. i) Bromure de propargyle (1,5 éq),  $K_2CO_3$  (2 éq), DMF, température ambiante, 10 heures.

L'application de cette réaction aux NAs a permis d'utiliser la chimie clic pour proposer une voie de synthèse des GNAs par couplage avec des sucres porteurs d'un azoture (Figure 39).

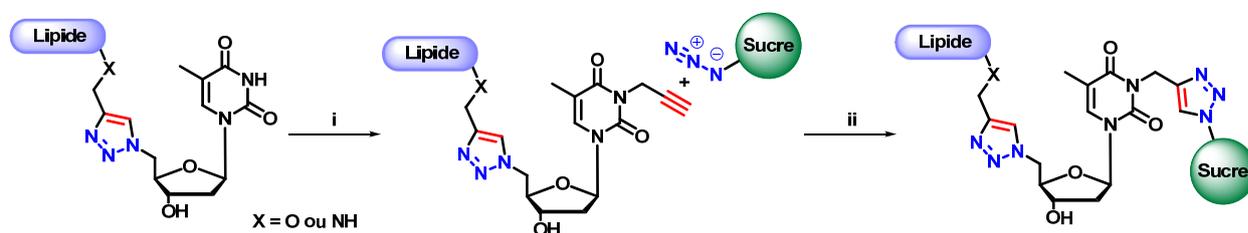


Figure 39 : Synthèse générale d'un GNA. i) Bromure de propargyle (1,5 éq),  $K_2CO_3$  (2 éq), DMF, température ambiante, 10 heures. ii) 10 % mol  $CuSO_4$ , 20 % ascorbate de sodium, THF/Eau (50/50), 65 °C, 6 heures.

Les NAs de départ sont modifiés en une étape pour former les dérivés N3 propargyle correspondants. Ces nouveaux dérivés (Figure 40) sont alors engagés dans le cadre de réactions de chimie clic selon le même protocole que pour la formation des NLs. Les produits finaux obtenus après purification sont des GNAs.

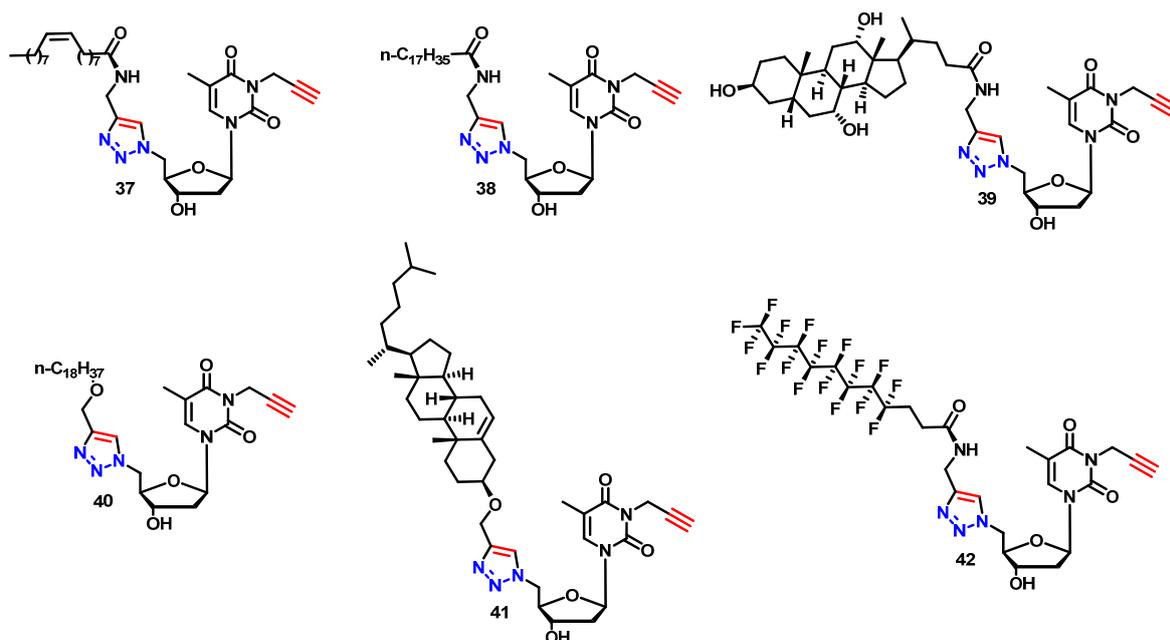


Figure 40 : Nucléosides amphiphiles N3 propargyle.

Cette voie de synthèse a par la suite pu être généralisée et une banque de GNAs présentant différentes natures de sucres (mono- et di-saccharides) et de lipides (alcools gras, acides gras saturés ou insaturés, stéroïdes) a été constituée (Figure 41). Le développement d'une gamme de structures hydrophobes variées a permis d'effectuer des corrélations structures/propriétés. Afin de pouvoir confirmer les déductions, un glycosyl lipide (GL) est également synthétisé en une étape par chimie clic (composé **50**, Figure 41).

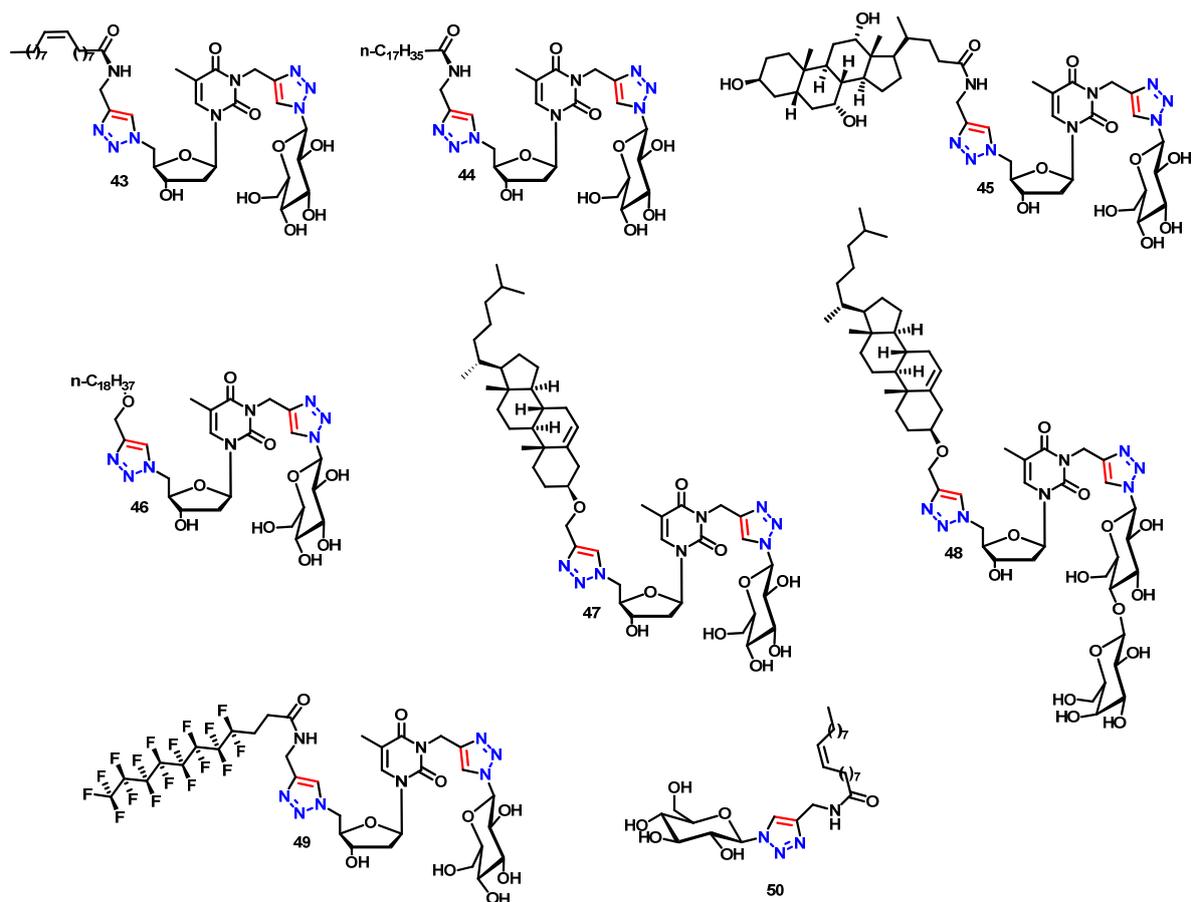


Figure 41 : Exemples de GNAs et de GL.

### IV.3.3 Propriété des GNAs

La structure même des GNAs a été envisagée pour permettre et favoriser l'hydro-solubilité et la formation d'organisations supramoléculaires. La solubilité des GNAs dans l'eau a pu être confirmée expérimentalement. En dehors des composés **47** et **48** qui restent très faiblement solubles dans l'eau, les dérivés GNAs sont beaucoup plus solubles que leurs homologues NAs. Les organisations formées par les GNAs et plus particulièrement par les composés **43**, **44**, **45**, **46** et **49** ont dans un premier temps été observées en microscopie optique (Figure 42). Cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence que l'organisation adoptée par le GNA dépend de sa structure chimique. Les dérivés de type amide, saturé ou non, conduisent à la formation d'un réseau dense de fibres (Figure 42a). En revanche, le dérivé de type éther conduit à la formation de fibres courtes et grossières (Figure 42b).

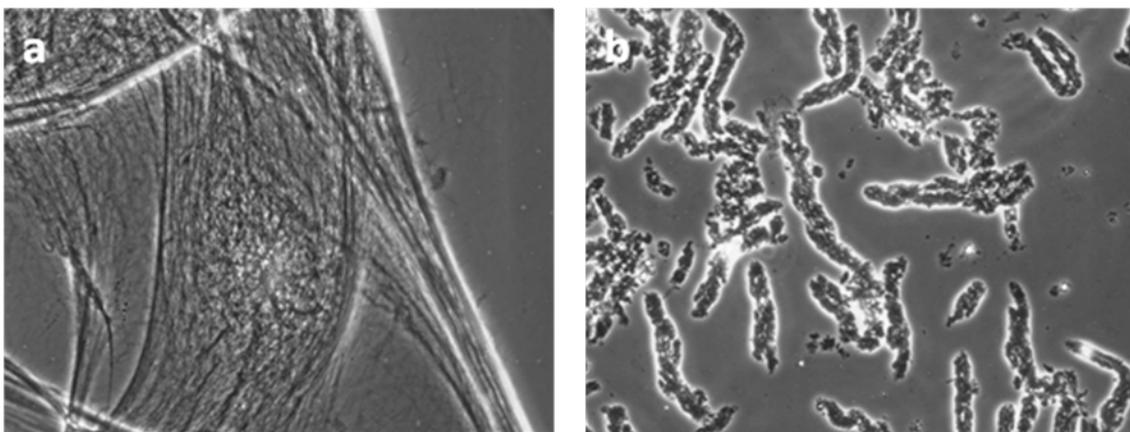


Figure 42 : Image de microscopie optique des organisations formées par les GNAs dans l'eau. a) Composé **43** en solution dans l'eau (1 mg/mL). b) Composé **46** en solution dans l'eau (1 mg/mL).

#### **IV.3.4 Interactions et stabilisations**

Les observations réalisées en microscopie optique indiquent que de simples modifications de la structure chimique des GNAs (remplacement d'un lien amide par un éther) impliquent d'importantes modifications de l'organisation supramoléculaire adoptée dans l'eau. Chacun des éléments fonctionnels constituant un GNA est nécessaire et la perte de l'un d'entre eux (comme dans les cas des GAs ou des NAs) conduit à une diminution importante de la solubilité. Seule l'association des trois structures confère aux GNAs les propriétés d'organisation et de solubilité décrites dans ce travail. Chacun des éléments structuraux du GNA est à l'origine d'interactions et favorise l'organisation des GNAs (Figure 43).

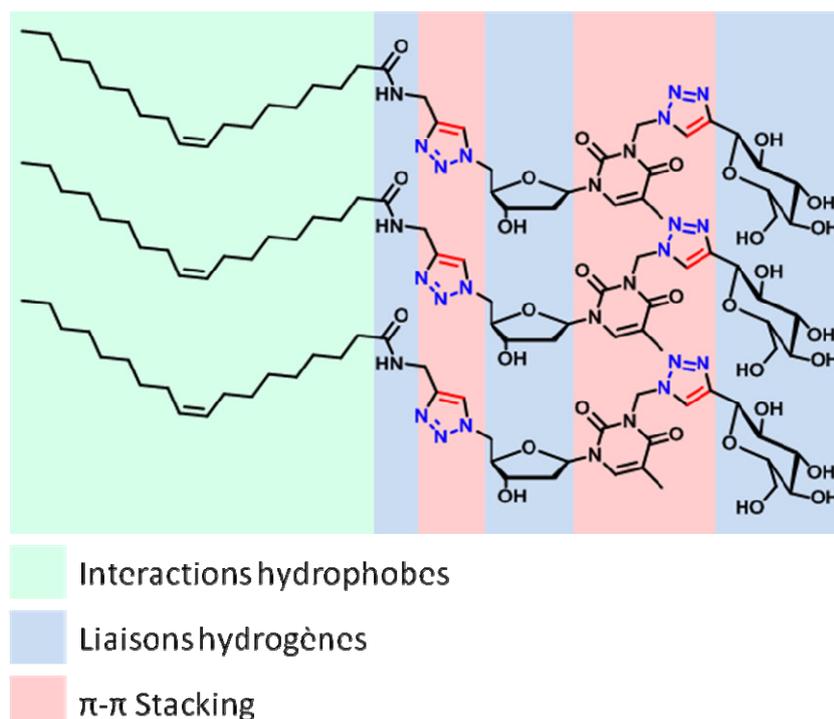


Figure 43: Possibilités d'interactions existantes chez le composé **43**.

Le lipide interagit par interactions hydrophobes. Les liens amides et les sucres par liaisons hydrogène. Les triazoles et la base nucléique peuvent pour leur part être à l'origine d'interaction de type  $\pi$ - $\pi$  stacking. Les interactions hydrophobes et la formation de domaines hydrophobes ont pu être mises en évidence par microscopie de fluorescence, en laissant incubé 24 heures le composé **43** (Figure 44) et le composé **49** (Figure 45) en solution dans l'eau (1 mg/mL) en présence de pyrène. Le pyrène est piégé dans les zones hydrophobes et peut être observé en microscopie de fluorescence.

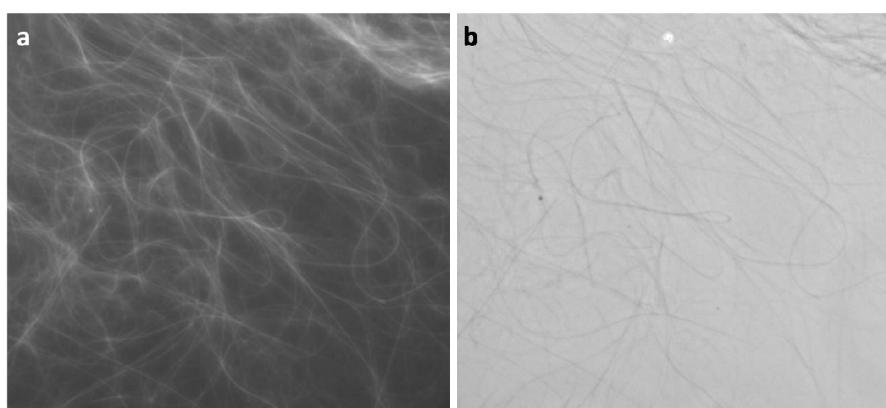


Figure 44 : Fibres du composé **43** emprisonnant le pyrène. a) Image de fluorescence, b) contraste de phase.

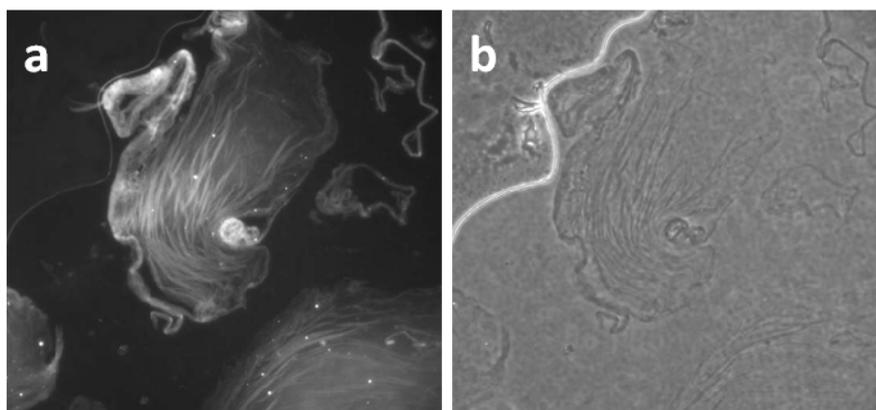


Figure 45: Fibres du composé **49** emprisonnant le pyrène. a) Image de fluorescence, b) contraste de phase.

Les liaisons hydrogène impliquant les liens amides ont pu être confirmées par analyse des spectres IR (Figure 46) des composés GNA (**43**, **44**, **46** et **47**). En effet, les valeurs de  $\delta_{\text{N-H}}$  observées pour les composés **43** et **44** sont respectivement de 1555 et 1549  $\text{cm}^{-1}$ . Ces valeurs correspondent aux valeurs de  $\delta_{\text{N-H}}$  observées pour un N-H engagé dans une liaison hydrogène. L'étude détaillée des spectres IR peut également apporter des informations concernant la conformation des chaînes lipidiques. Il est connu que les fréquences de vibrations d'élongations antisymétriques et symétriques de groupements méthylènes dépendent étroitement de la conformation des chaînes lipidiques. Ainsi, une chaîne alkyle tout-anti présente une fréquence de vibration d'élongation symétrique de l'ordre de 2846-2849  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>125</sup> Une augmentation de la proportion de conformère gauche induira un déplacement de cette valeur vers 2853  $\text{cm}^{-1}$ . Les valeurs observées pour les différents GNAs étudiés (**43**, **44**, **46**) sont respectivement de 2925 et 2853,5  $\text{cm}^{-1}$ , 2918,5 et 2850,5  $\text{cm}^{-1}$ , 2922,5 et 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Ces valeurs nous indiquent une proportion croissante de conformation trans : amides insaturés (**43**) < dérivés éthers (**46**) < amides saturés (**44**). Cette observation est cohérente avec la croissance des interactions H-H du dérivé amide saturé en passant par l'éther pour finalement arriver à l'amide saturé.

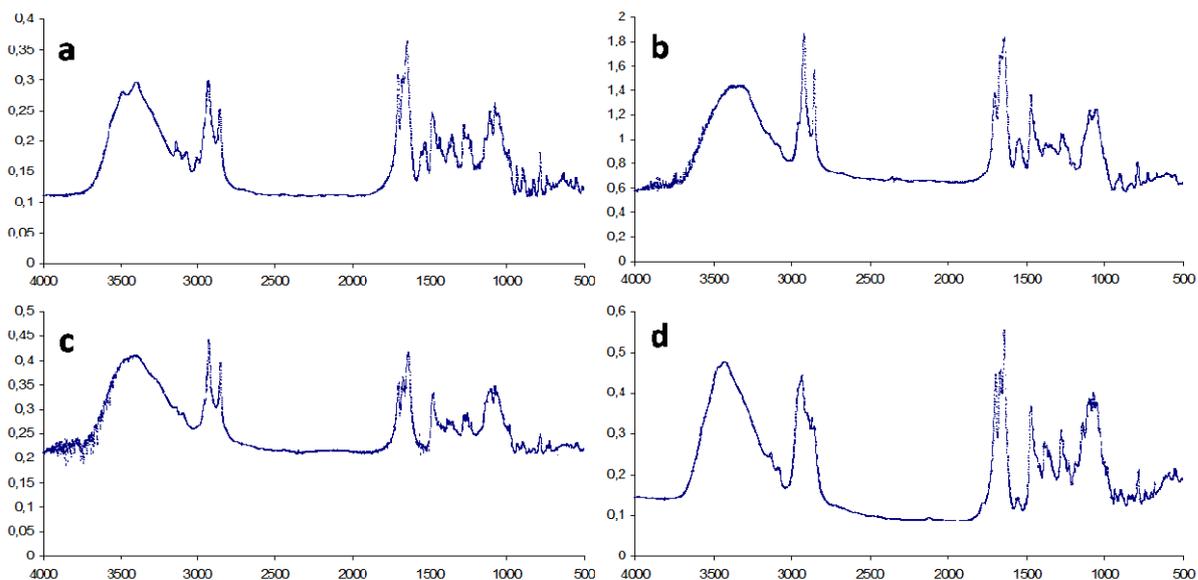


Figure 46 : Spectre IR des GNAs. a) Composé **43**, b) Composé **44**, c) Composé **46** et d) Composé **47**.

Les interactions par  $\pi$ - $\pi$  stacking ont été mises en évidence par des mesures de DO et la détermination des coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) des GNAs (Figure 47). Les  $\epsilon$  des GNAs ont été mesurés entre 6500 et 7000. Les valeurs décrites dans la littérature pour la thymidine et la N3-propargylthymidine sont respectivement de 7900 et 8090. Cet écart indique la différence d'environnement de la nucléobase entre la base libre et la base associée dans une interaction de type stacking.

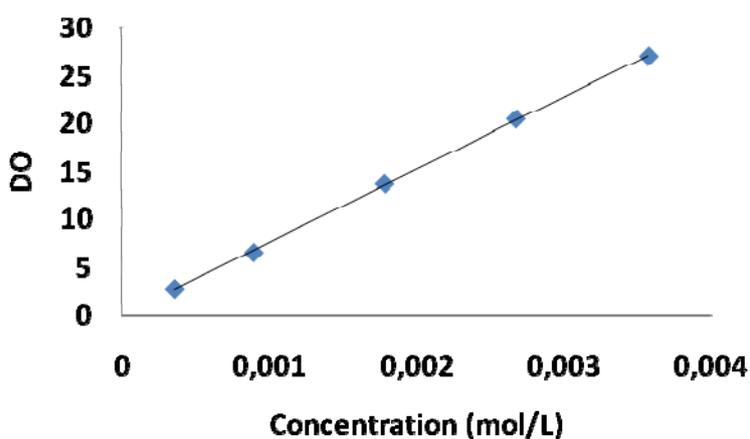


Figure 47 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenu au Nanodrop® pour la détermination de l' $\epsilon$  du composé **43**.

### IV.3.5 Organisation supramoléculaire

Les GNAs sont capables de s'organiser pour former des structures supramoléculaires. La concentration minimale à partir de laquelle les GNAs se structurent et s'agrègent (concentration d'agrégation critique : CAC) constitue une caractéristique importante. Cette concentration a été déterminée par mesure de tensiométrie (Figure 48).

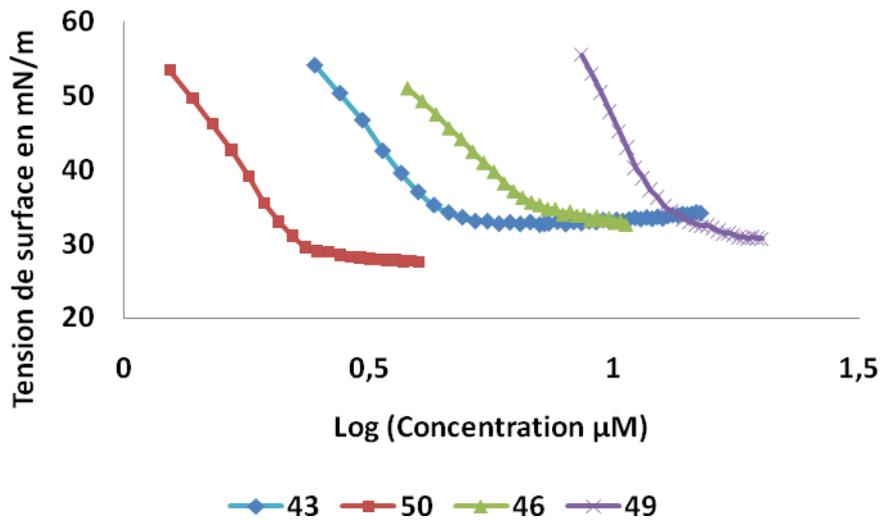


Figure 48 : Mesure de la CAC des GNAs. Graphique représentant l'évolution de la tension de surface en fonction du Log de la concentration (µM).

La CAC est déterminée à la cassure nette observée sur les graphiques d'  $\gamma = f(\log(C))$ . La pente définie par l'évolution de  $\gamma$  aux concentrations inférieures à la CAC permet, en utilisant l'équation de l'isotherme de Gibbs (Figure 49) de déterminer la valeur de  $a_s$  qui est la valeur moyenne de l'aire occupée par une molécule de GNA à l'interface. Les valeurs obtenues pour la CAC, le  $\gamma_{cac}$  et l' $a_s$  sont indiquées dans le Tableau 1.

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \times \frac{d\gamma}{d \ln c}$$

Figure 49 : Équation de l'isotherme de Gibbs.

Tableau 1 : Mesures des CACs des GNAs.

Composé	<b>43</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>50</b>
CAC ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$3,91 \pm 0,61$	$7,43 \pm 0,74$	$12,8 \pm 1,4$	$2,62 \pm 0,44$
$a_s$ ( $\text{nm}^2$ )	$0,105 \pm 0,01$	$0,175 \pm 0,035$	$0,09 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
$\gamma_{\text{cac}}$ (mN/m)	$33,8 \pm 1,2$	$30,6 \pm 0,53$	$34,6 \pm 0,5$	$36,5 \pm 0,45$

L'aire moyenne occupée par une molécule dans une monocouche à une concentration inférieure à la CAC  $a_s$  est calculée en utilisant l'équation de Gibbs.  $\gamma_{\text{cac}}$  est la valeur de la tension de surface à la CAC.

Les valeurs des CACs des composés cholestérol et amide saturé n'ont pas pu être mesurées. Le premier ayant une solubilité trop basse et le second ayant une CAC trop basse.

Il est intéressant de noter que les valeurs de CAC et de  $\gamma_{\text{cac}}$  mesurées pour les dérivés lipidiques sont globalement comparables avec les CACs décrites dans la littérature<sup>126,127</sup> pour des structures de types GAs présentant la même nature de lipide.

La structure des organisations formées par les GNAs dans l'eau a été observée en microscopie électronique à transmission. Les résultats obtenus confirment les observations faites en microscopie optique : les organisations formées dépendent de la nature des GNAs et en l'occurrence de la structure hydrophobe et du lien qui l'unit au glycosynucléoside. D'une manière générale, les dérivés de type amide (composés **43**, **44** et **49**) forment des organisations en réseau de fibres alors que le dérivé éther **46** forme des structures vésiculaires. Le composé **43** forme un réseau de fibres dense (Figure 50).

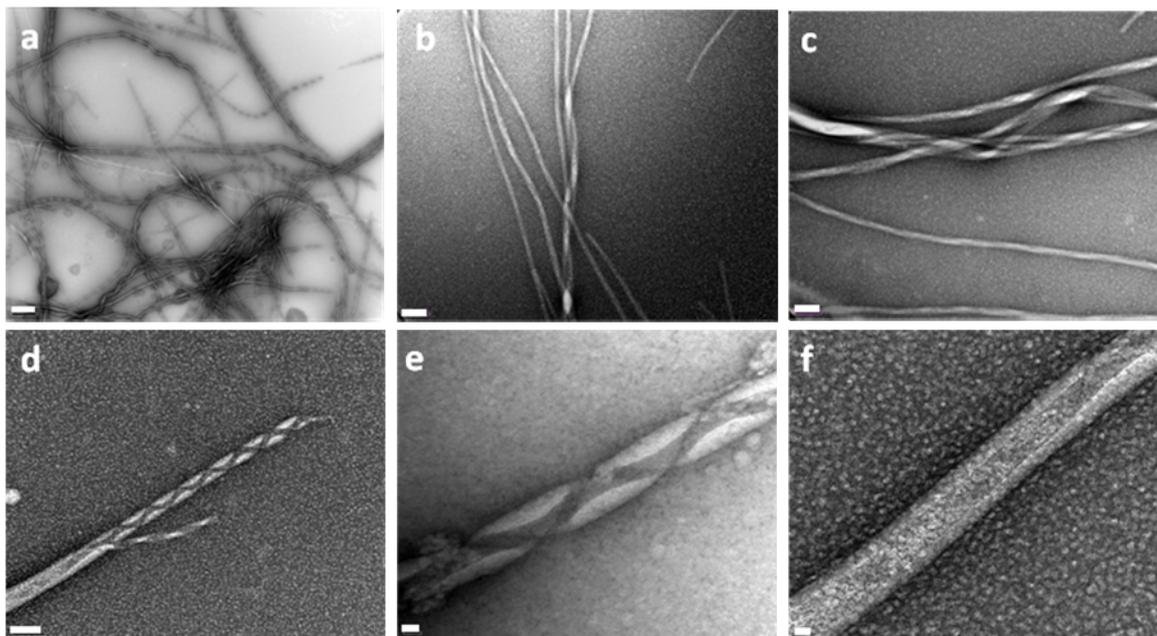


Figure 50 : Organisations supramoléculaires observées en MET pour le composé **43**. Échelle : a) 1  $\mu\text{m}$ , b) 100 nm, c) 100 nm, d) 100 nm, e) 20 nm et f) 20 nm.

La structure de base est une fibre hélicoïdale, qui peut être libre (Figure 50e), ou étirée pour former des fibres tubulaires de faible diamètre (15-25 nm). Ces fibres hélicoïdales peuvent également s'associer pour former des nanotubes de diamètre plus élevé (> 60nm) (Figure 50d et f). Les fibres et nanotubes formés peuvent également s'organiser, se tresser (Figure 50c) pour créer des structures secondaires de plus grandes dimensions comme les réseaux visibles en microscopie optique.

Le composé **44** forme des réseaux de fibres (Figure 51), mais il n'a pas été observé de fibres hélicoïdales. Les fibres formées par le composé **44** sont de diamètre faible (environ 20 nm). Comme pour le composé **43**, les fibres formées par le composé **44** sont capables de s'organiser pour former des structures circulaires compactes où le diamètre des fibres diminue considérablement (Figure 51 b,c,d,e,f). Ces structures qui ne sont pas sans rappeler les célèbres réglisses (Rotella®) de la marque Haribo sont assez abondantes et ont pu être observées à chaque expérience.

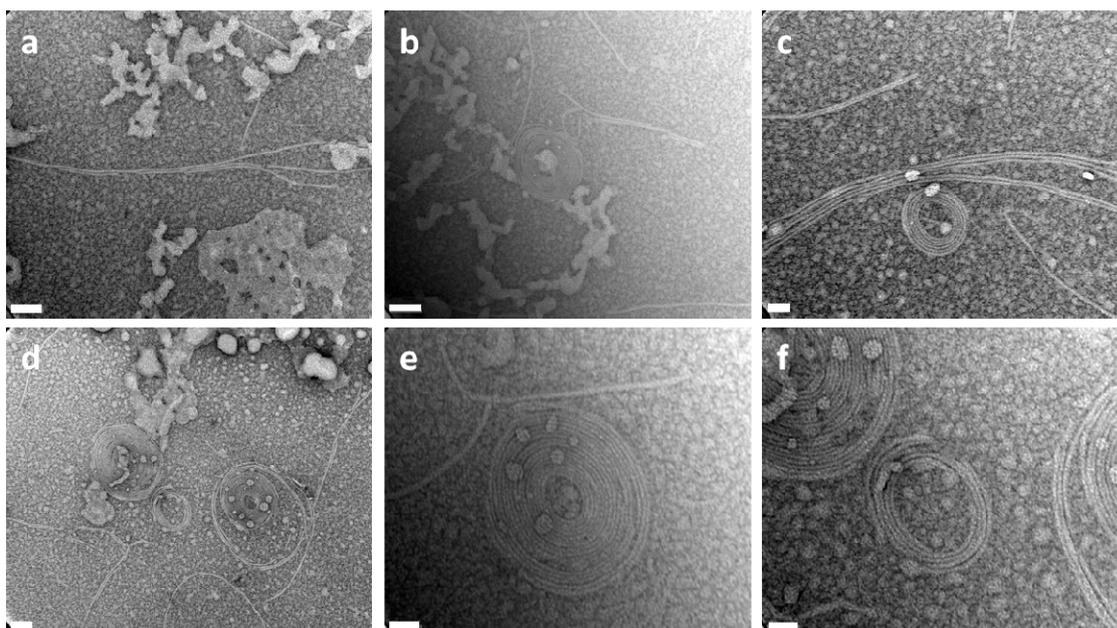


Figure 51 : Organisations supramoléculaires observées en MET pour le composé **44**. Échelle : a) 100 nm, b) 100 nm, c) 50 nm, d) 100 nm, e) 50 nm, f) 50 nm.

Tout comme les dérivés **43** et **44**, le composé **49** forme des fibres (Figure 52). Il est à noter que les structures formées par le composé **49** sont des fibres hélicoïdales capables de s'auto associer pour former des fibres qui elles mêmes forment un réseau comme dans le cas du composé **43**.

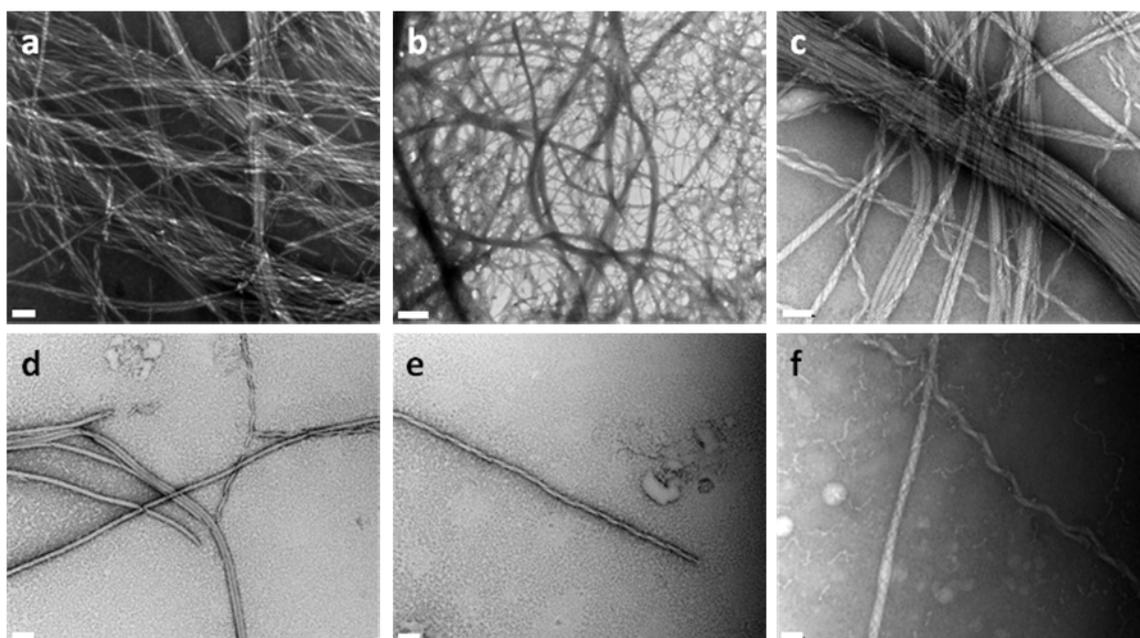


Figure 52 : Organisations supramoléculaires observées en MET pour le composé **49**. Échelle : a) 100 nm, b) 0,5  $\mu\text{m}$ , c) 100 nm, d) 100 nm, e) 100 nm, f) 50 nm.

Contrairement aux dérivés amides, le dérivé éther (composé **46**) ne forme pas de fibre. Il forme des structures membraneuses, *quasi* circulaires (Figure 53). Ces structures s'empilent pour former les organisations hémitubulaires qui ont été qualifiées de fibres grossières en microscopie optique.

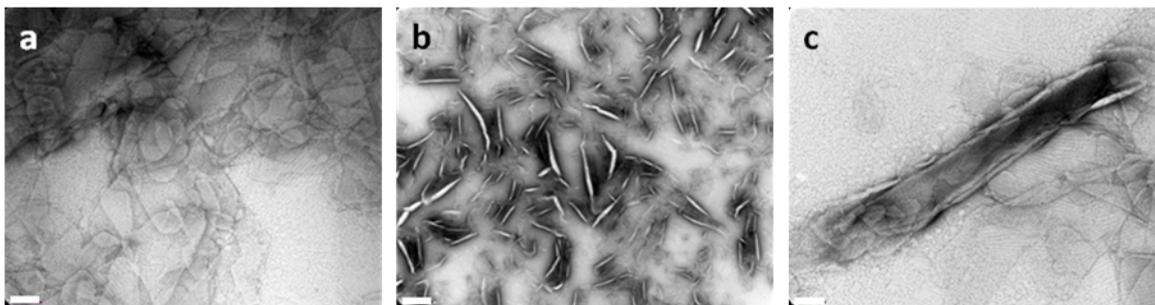


Figure 53: Organisations supramoléculaires observées en MET pour le composé **46**. Échelle : a) 100 nm, b) 0,5 μm, c) 100 nm.

#### **IV.3.6 Formation d'hydrogel**

Les composés GNAs forment des hydrogels (Figure 54) à de faibles concentrations de 0,1 % à 3 % masse/masse pour les gélateurs les plus efficaces (Tableau 2, page 72). Là encore, on note une grande importance de la nature de la chaîne hydrophobe. Ainsi les dérivés amides, dont la liaison amide peut former des liaisons hydrogène, sont de meilleurs gélateurs (concentration de gélation plus basse) que les éthers. Parmi les amides, les dérivés saturés, donc favorables aux interactions H-H ou F-F, sont de meilleurs gélateurs que les dérivés insaturés dont la fluidité perturbe les interactions hydrophobes.

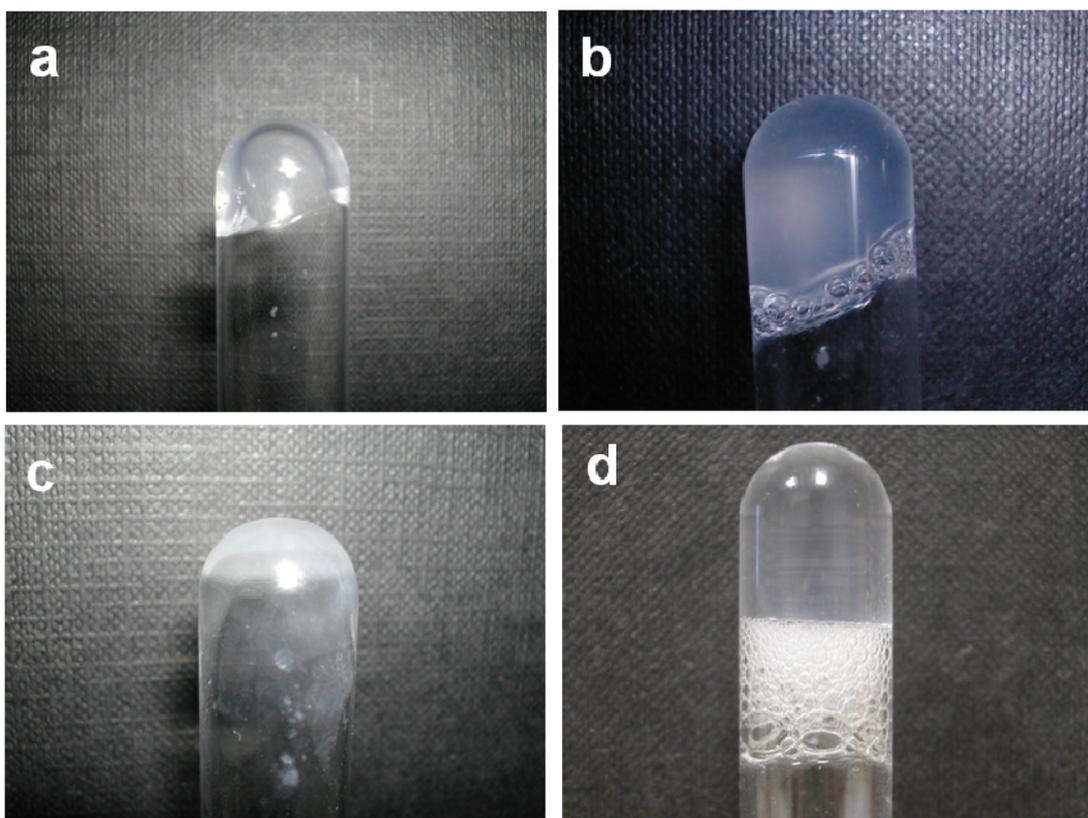


Figure 54 : Hydrogels formés par les GNAs. a) Composé **43**, 2,5 % m/m. b) Composé **44** 0,1 % m/m. c) Composé **46** 3 % m/m. d) Composé **49** 0,1 % m/m.

Les hydrogels formés peuvent soutenir leur propre poids, même une fois démoulés (Figure 55). Les hydrogels obtenus à des concentrations supérieures à 3 % m/m sont stables plusieurs semaines. Les hydrogels formés à partir des composés **43** et **49** de concentrations inférieures à 0,5 % sont également stables, environ quinze jours pour le **43** et plusieurs semaines pour le **49**.

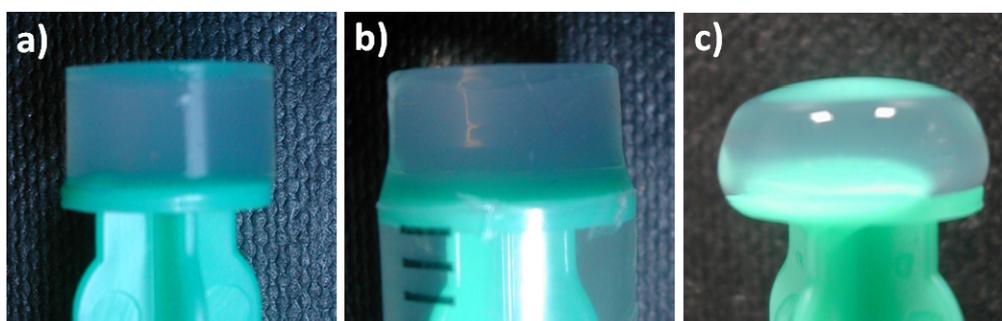


Figure 55 : Tenue du gel en fonction de la concentration. Composé **44** a) 1 % m/m, b) 0,5 % m/m, c) 0,2 % m/m.

Les GNAs sont dissous à chaud (80 °C) dans l'eau, le gel se forme spontanément lors du retour à température ambiante. Le temps de gélification peut être variable, de 5 min pour le composé **43** à 5 % m/m à 12 heures pour le composé **49** à 0,1 % m/m. La température à laquelle le gel n'est plus capable de supporter son propre poids est définie ici comme la température de fusion du gel. Cette température a été étudiée en fonction de la chaîne hydrophobe et de la concentration en GNA (Figure 56).

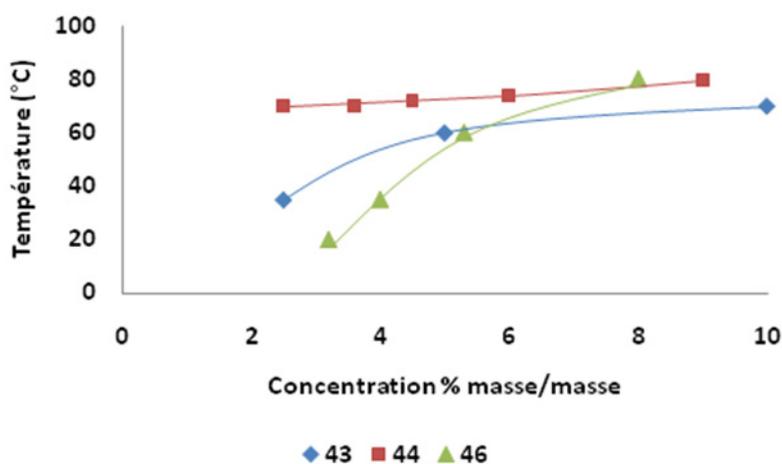


Figure 56 : Diagramme de phase des hydrogels formés par les composés **43**, **44** et **46**.

Les résultats obtenus confirment l'importance du lien amide et des liaisons hydrogène que ce lien implique. De même, il est confirmé que la fluidité apportée par la double liaison du bras oléyle déstabilise les structures formées et diminue la température de fusion du gel. Ce test n'a pas été réalisé sur le composé **49** car ce dernier est trop faiblement soluble pour former des hydrogels à des concentrations supérieures à 1 %.

#### **IV.3.7 Formation d'organogel**

De même que pour l'eau, les propriétés de gélification des GNAs ont été étudiées dans les solvants organiques (Tableau 2). Les quantités de matière nécessaires à la gélification sont plus importantes que dans le cas de l'eau, toutefois différents organogels ont pu être obtenus (Figure 57).

Tableau 2 : Gélation des GNAs dans différents solvants. Les concentrations de gélation sont indiquées en % m/m. G : gel, Gt : gel trouble, Go : gel opaque, P : partiellement soluble, Sol : soluble.

Composé	43	44	46	47	49	50
Eau	G (0,5 %)	Gt (0,1 %)	Go (3 %)	P	G (0,1 %)	P
Chloroforme	G (2,5 %)	Gt (8 %)	Sol	Go (5 %)	P	P
Toluène	P	P	G (6 %)	G (9 %)	P	nc
<i>n</i> -Hexane	P	P	P	P	P	nc
DMSO	Sol	Sol	Sol	Sol	Sol	nc
<i>n</i> -Butanol	Sol	Sol	Sol	Go (9 %)	P	nc

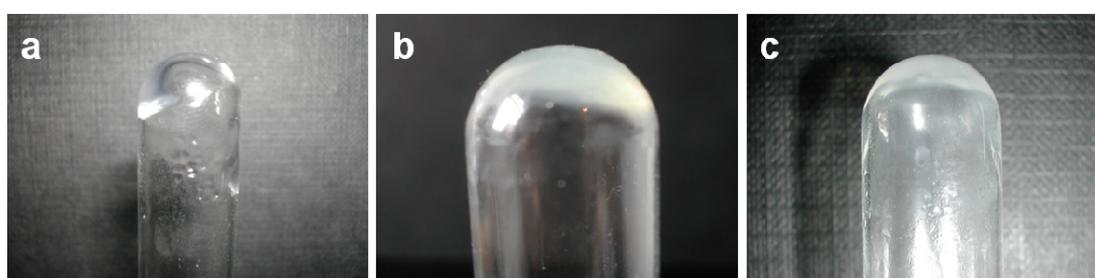


Figure 57 : Organogels formés par les GNAs dans  $\text{CHCl}_3$ . a) Composé **43**, 2,5 % m/m. b) Composé **44** 8 % m/m. c) Composé **47** 5% m/m.

Les organisations supramoléculaires formées par les GNAs ont pu être observées en microscopie électronique à transmission (Figure 58). Les structures formées sont très différentes des structures observées dans l'eau. Le dérivé **43** qui forme un gel dans le chloroforme à 2,5 % m/m s'organise en structures vésiculaires (Figure 58a). Le composé **44** forme des structures de type fibres (Figure 58b). Les composés **46** et **49** qui ne gélifient pas le chloroforme forment respectivement des vésicules hétérogènes (Figure 58c) et des particules homogènes (Figure 59). Le dérivé cholestéryle, quant à lui, forme un réseau dense de vésicules hétérogènes (Figure 58d).

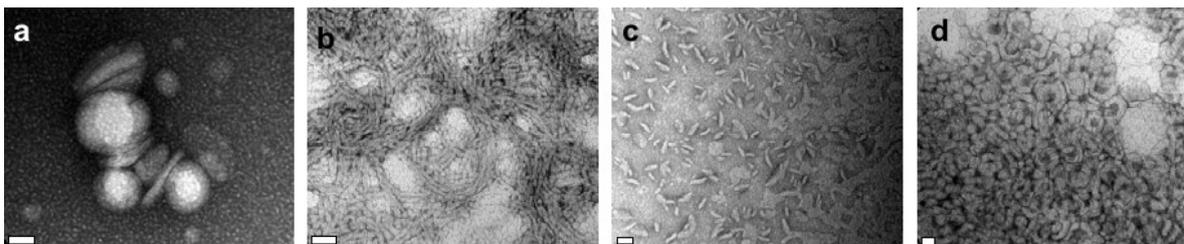


Figure 58 : Organisations observées sur les GNAs dans le chloroforme. a) Composé **43** échelle 50 nm. b) Composé **44** échelle 50 nm. c) Composé **46** échelle 50 nm. d) Composé **47** échelle 20 nm.

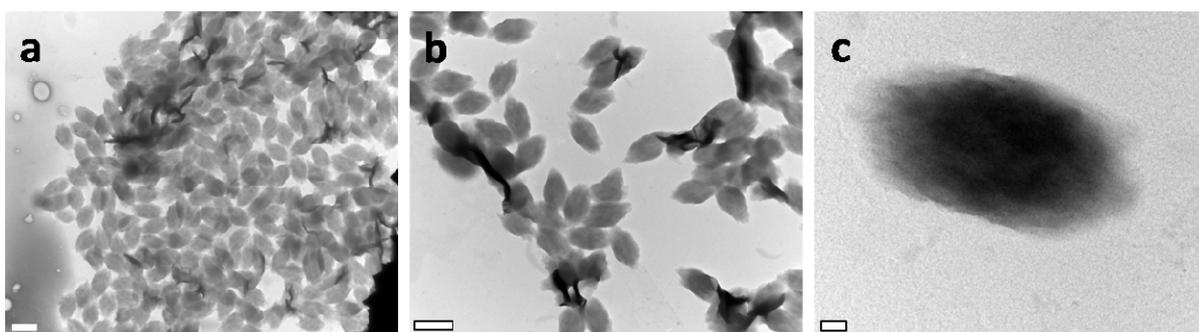


Figure 59 : Organisations formées par le composé **49** dans le chloroforme. Échelle : a) 1 µm, b) 1 µm, c) 100 nm.

## IV.4 Application des GNAs

Il est décrit dans la littérature qu'il est possible de faire interagir et même de complexer des sucres et des acides nucléiques. Ces complexes se forment *via* des interactions de types liaisons hydrogène entre les hydroxyles des sucres et les phosphates des acides nucléiques. Sakurai et *al.*<sup>128</sup> mettent en évidence ces interactions dans leurs travaux sur le schizophyllane (polysaccharide naturel) capable de reconnaître un oligonucléotide. Plus récemment, Arigon et *al.*<sup>38</sup> ont décrit la possibilité de complexer un oligonucléotide par un GNA. Ces travaux ont pu mettre en évidence la complexation d'un duplex d'acide nucléique par des expériences de gels retards et par observation MET. L'engagement des phosphates dans ces interactions a, quant à lui, été mis en évidence par des expériences de RMN du <sup>31</sup>P. Ces travaux ont également pu démontrer la stabilisation du duplex par le biais des interactions hydrophobes apportées par le GNA.

Dans le cadre du présent travail, une hypothèse de transfection assistée par les GNAs a été explorée (Figure 60).

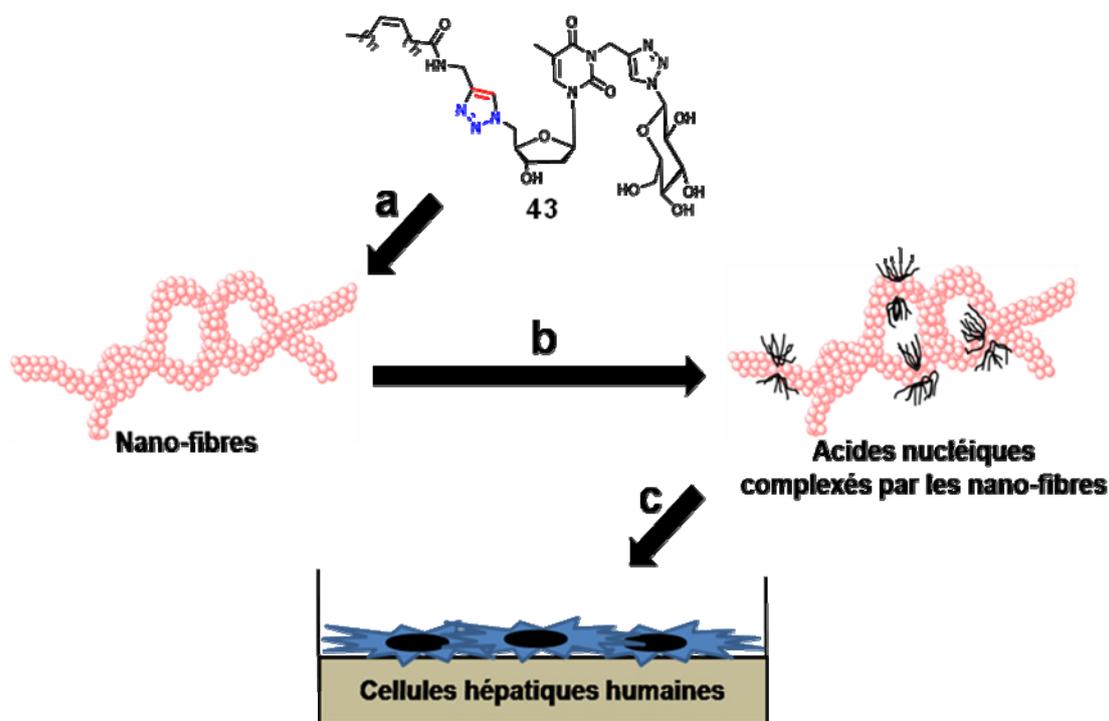


Figure 60 : Application d'un GNA à la transfection. a) Formation de nano-fibres. b) Complexation des acides nucléiques par les nano-fibres. c) Internalisation du complexe dans des cellules hépatiques humaines (Huh-7).

#### IV.4.1 Caractérisations complémentaires

En préalable à leur utilisation pour la transfection, il a été vérifié que les propriétés démontrées par Arigon *et al.*<sup>38</sup> s'appliquent aux molécules synthétisées dans le cadre des présents travaux. Pour cela des expériences complémentaires de caractérisation et de complexation ont été entreprises. Ces expériences ont toutes été réalisées sur le composé **43**. Ce composé a été choisi pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est capable de former des hydrogels à de faibles concentrations et les gels formés sont parmi les plus stables dans le temps. Par ailleurs, les chaînes oléyle devraient apporter une fluidité utile pour les interactions avec les membranes lipidiques et pour la transfection.

#### IV.4.2 Expériences de SAXS

Des expériences de diffraction des rayons X aux petits angles ont permis de mettre en évidence des dimensions de l'ordre de 6,3 nm (Figure 61). Le pic obtenu lors de ces expériences est large, ce qui semble cohérent avec une structure fluide capable de se dilater ou de se contracter.

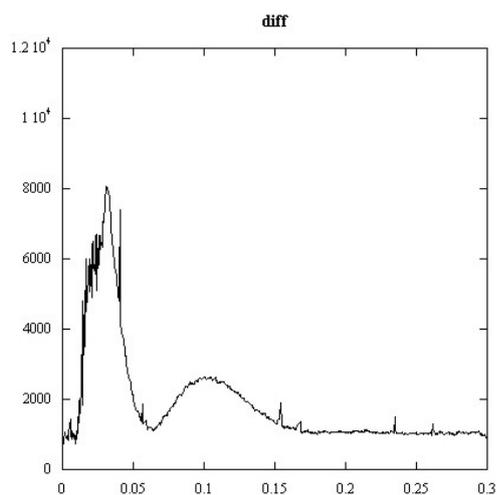


Figure 61 : Spectre de SAXS.

La valeur obtenue de 6,3 nm est inférieure à deux fois la longueur de la molécule. La longueur de la molécule étant estimée à environ 4 nm selon un modèle CPK, ceci nous indique une probable interdigitation des chaînes lipidiques. Ces expériences nous permettent de proposer un modèle d'organisation en deux dimensions (Figure 62a). En répétant  $n$  fois ce modèle, il est possible de proposer une organisation tridimensionnelle pour les fibres formées par le composé **43** (Figure 62b). Le modèle ainsi obtenu semble particulièrement correspondre aux images de fibres tubulaires monobrins observées en MET.

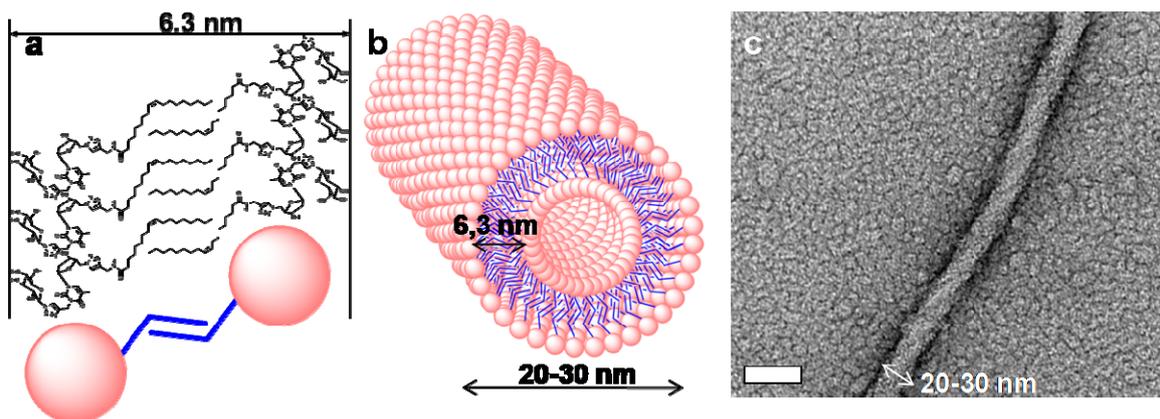


Figure 62 : Proposition d'organisation pour le composé **43**. a) Organisation en 2 dimensions. b) Organisation en trois dimensions. c) Corrélation MET (échelle 50 nm).

Une fois l'organisation du composé **43** mieux définie, il est possible de l'employer pour la complexation d'acides nucléiques.

#### IV.4.3 Complexation des acides nucléiques

Cette complexation a pu être observée et confirmée en microscopie de fluorescence. Un oligonucléotide présentant une fluorescéine à son extrémité 3' est incubé dans une solution de composé **43** en très large excès (160 éq). Après quelques heures d'incubation, le mélange est prélevé, déposé sur lame et examiné. Le réseau de fibres précédemment décrit est observé en microscopie optique (contraste de phase) (Figure 63a). En microscopie de fluorescence (Figure 63b), de nombreux agrégats sont présents. Ces agrégats ont des dimensions variables pouvant aller de moins de 1 à plusieurs  $\mu\text{m}$ . La même expérience conduite en l'absence d'oligonucléotide n'induit pas la formation d'agrégats visibles en fluorescence. Bien que ces résultats soient cohérents avec les précédentes observations sur la complexation d'oligonucléotides, une confirmation par une seconde méthode est nécessaire car le caractère hydrophobe de la fluorescéine pourrait favoriser la complexation et donc fausser le résultat.

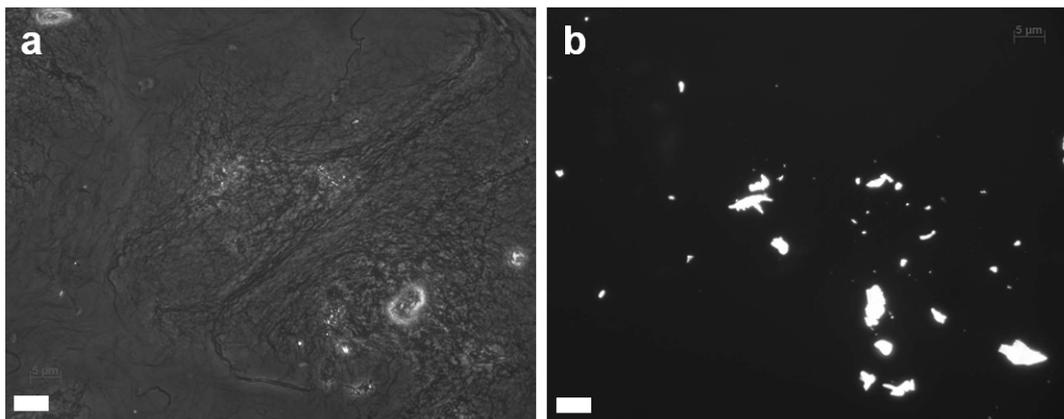


Figure 63 : Complexation d'un oligonucléotide 3'fluorescéine par le composé 43. a) Contraste de phase. b) Microscopie de fluorescence. Échelle : 5 µm.

Afin de confirmer ce résultat, la même expérience a été réalisée sur un oligonucléotide non marqué. Cette fois l'expérience a été suivie par MET (Figure 64). La formation d'agrégats de dimensions hétérogènes est observée à la surface des fibres. La taille de ces agrégats peut varier d'une centaine de nm le long des fibres à quelques µm aux intersections de fibres. Les agrégats les plus représentés ont une dimension de quelques centaines de nm.

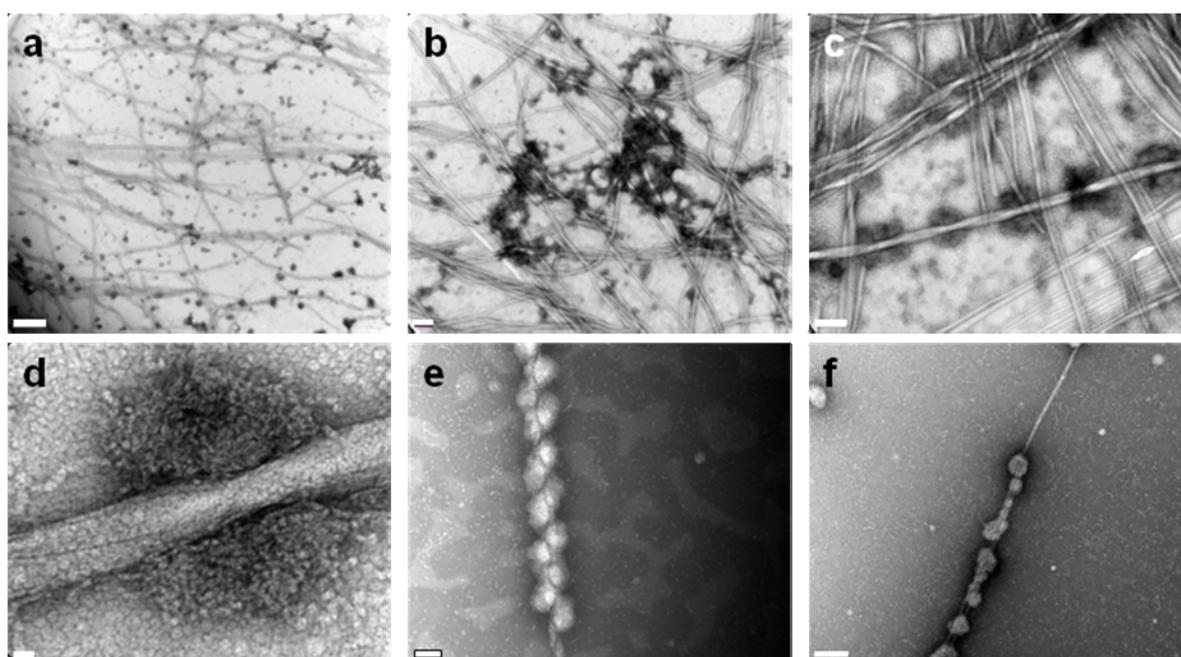


Figure 64 : Complexation d'un oligonucléotide par le composé **43** observée en MET. a) Échelle : 0,5 µm b) Échelle : 200 nm, c) Échelle : 200 nm, d) Échelle : 20 nm, e) Échelle : 100 nm, f) Échelle : 200 nm.

Les agrégats formés sont attribués à la complexation d'oligonucléotides par les molécules de GNA. La dimension des agrégats étant très importante par rapport à la dimension de l'oligonucléotide, il est probable que ces structures soient composées d'un mélange amorphe de GNA et d'oligonucléotide. Un schéma représentant ces agrégats est proposé Figure 65. Les sphères roses représentent les GNAs et les fibres noires représentent l'association ADN/GNA.

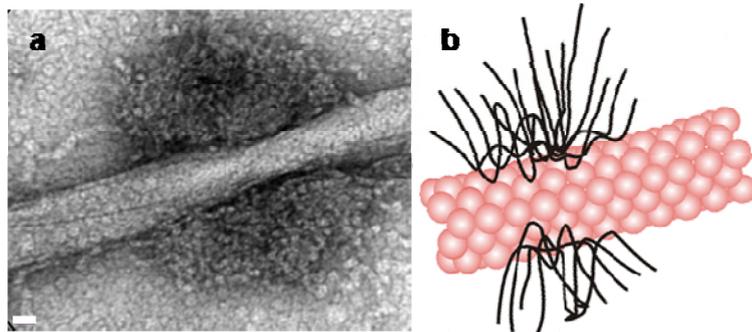


Figure 65 : Complexation d'un oligonucléotide par le composé **43**. a) Image MET échelle 20 nm. b) Représentation schématique.

#### **IV.4.4 Cytotoxicité**

Pour pouvoir être utilisés comme agent de transfection, les GNAs ne doivent pas présenter de trop forte toxicité vis-à-vis des cellules transfectées. La cytotoxicité du composé **43** a donc été évaluée par des tests de mortalité cellulaire sur des cellules de carcinome hépatique humain Huh-7. Ce test fait appel à un bromure de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Ce réactif est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette réduction induit un changement de couleur du jaune vers le bleu violacé. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Les résultats de viabilité cellulaire sont présentés dans la Figure 66 (page suivante).

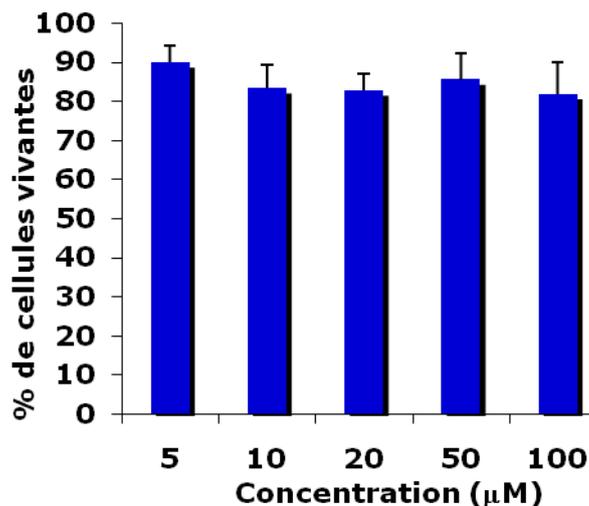


Figure 66 : Test de cytotoxicité sur le composé **43**.

Les résultats obtenus indiquent que le composé **43** ne présente pas de toxicité significative pour des concentrations inférieures ou égales à 100 µM. Pour des concentrations plus élevées, la toxicité devient rapidement importante et 100 % des cellules sont tuées à une concentration de 200 µM. Cette toxicité semble liée à la détergence du composé **43**. Afin de la limiter, des composés fluorocarbonés ont été synthétisés (composé **49**). Le caractère hydrophobe et lipophile de la chaîne fluorocarbone devrait limiter la miscibilité du GNA dans les membranes lipidiques<sup>129,130,131,132</sup>, donc limiter sa détergence et par conséquent sa toxicité. La toxicité du composé **49** a été évaluée de la même manière que pour le composé **43** sur des cellules de carcinome hépatique. Les résultats obtenus sont indiqués dans la Figure 67 (Page suivante).

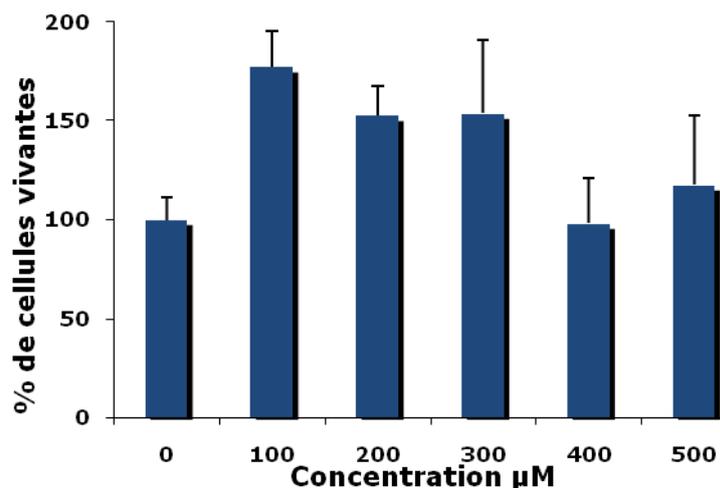


Figure 67 : Test de cytotoxicité sur le composé **49**.

Les résultats indiquent clairement une diminution de la toxicité, le composé **49** n'étant pas toxique pour des concentrations équivalentes à 500 µM.

#### **IV.4.5 Transfection**

Le composé **43**, non toxique jusqu'à 100 µM, a pu être utilisé pour des expériences de transfection. Un oligonucléotide marqué en 3' par de la fluorescéine a été complexé par le composé **43**. Ce complexe a été incubé en présence de cellules de type Huh-7. Après 24 h les cellules sont lavées plusieurs fois et fixées par du formol. L'observation en microscopie de fluorescence indique que le complexe GNA oligonucléotide est bien associé à la cellule. Les cellules présentent un faible marquage cytoplasmique (Figure 68b). Dans les mêmes conditions, mais en absence de GNA, l'oligonucléotide marqué n'est pas internalisé (Figure 68a).

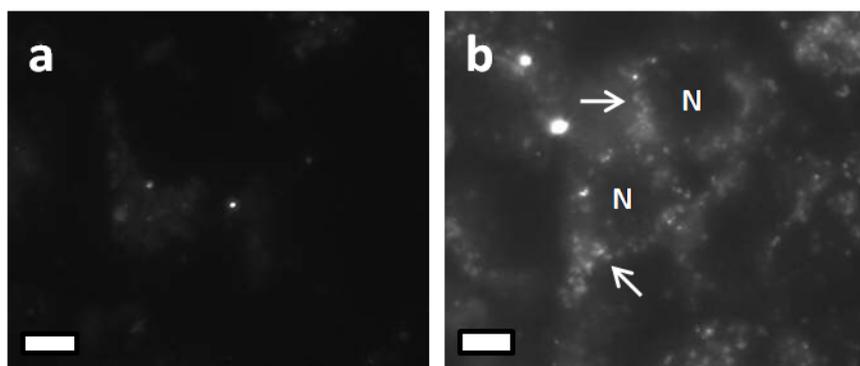


Figure 68 : Internalisation d'oligonucléotides assistés par le composé **43** sur des cellules Huh-7 échelle 10  $\mu\text{m}$ . a) Oligonucléotide 3'fluorescéine seul incubé 24 heures. b) Oligonucléotide 3'fluorescéine complexé par le composé **43** incubé 24 heures.

L'augmentation significative du pourcentage de cellules marquées par suite de la transfection par le composé **43** a pu être confirmée par cytométrie de flux. Cependant le faible taux de cellules transfectées ne permet que difficilement l'application du composé **43** à la transfection d'acides nucléiques.

## IV.5 Conclusion (1)

La nouvelle famille d'amphiphiles développée dans ce travail présente de nombreux intérêts aussi bien dans le domaine des matériaux que pour des applications thérapeutiques. La méthode de synthèse choisie pour le développement de ces molécules permet une variabilité et une grande adaptabilité de ces molécules. Ces travaux ont mis en évidence les propriétés d'organisation des GNAs, ainsi que le lien structure chimique/organisation. La capacité de ces composés à former des gels dans différents solvants (eau et solvants organiques) a également pu être mise en évidence. Les premiers résultats *in vitro* ont révélé l'absence de toxicité pour des concentrations équivalentes à 100 et 500  $\mu\text{M}$  pour les composés **43** et **49**. L'application des GNAs pour la transfection a également été envisagée et observée. Ces résultats indiquent bien le rôle potentiel de ces amphiphiles pour la biotechnologie.

## IV.6 Perspectives (1)

Les perspectives à ce travail sont nombreuses, dans le domaine de la chimie, en faisant varier la nature de chaque partie, non pas seulement du lipide, mais aussi du sucre (mono, di ou tri saccharide) ou du nucléoside (A, C, G, U et analogues). Une autre approche pourrait être de faire varier la configuration du GNA : modifier la structure linéaire (Figure 69a) pour former des GNAs bola (Figure 69b), ajouter un espaceur tridenté pour former un GNA éclaté (Figure 69c). Ces modifications pourraient apporter des changements importants sur le comportement des GNAs. Ce nouveau type de fixation pourrait libérer la base du nucléoside qui serait par la suite engagée dans une reconnaissance base-base.

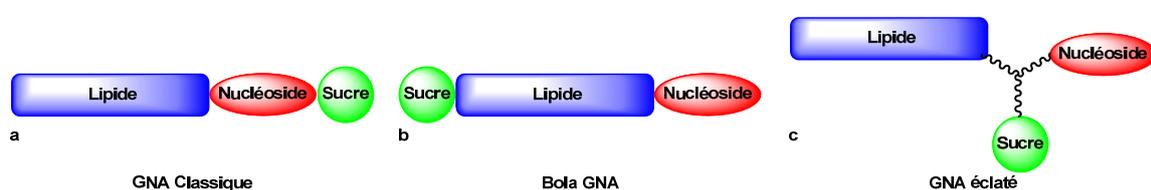


Figure 69 : Nouvelles configurations possibles pour les GNAs. a) Forme classique, b) forme bola, c) forme éclatée.

L'étude physicochimique complète, incluant des études d'ATG, de DSC ou encore de rhéologie sur ces GNAs pourra également apporter de précieuses informations sur le comportement et les propriétés de cette nouvelle famille d'amphiphiles. D'autres perspectives peuvent être envisagées, par exemple l'amélioration des résultats de transfection par la modification de la nature du GNA utilisé. Une autre application actuellement de plus en plus étudiée pour les hydrogels bioinspirés est l'emploi de ces hydrogels comme support pour la reconstruction tissulaire<sup>133</sup> ou comme support injectable. Le caractère non polymérique et par conséquent facile à éliminer des GNAs en fait des molécules prometteuses pour cette application. La faible toxicité du composé **49** lui confère les propriétés idéales pour cette application. Les résultats préliminaires obtenus dans cette optique ont permis de mettre en évidence que le composé **49** était capable de former des gels dans le milieu de culture et que des cellules pouvaient être cultivées en sa présence.

# **V. Oligonucléotides amphiphiles (ONAs)**

## V. Oligonucléotides amphiphiles (ONAs)

Les oligonucléotides amphiphiles forment une famille d'amphiphiles proche des NAs mais de masses moléculaires plus élevées. La liaison covalente entre la structure hydrophile et la partie hydrophobe représente une alternative aux interactions par liaisons hydrogène employées par les GNAs. Comme cité dans la partie concernant les généralités sur les amphiphiles (Partie I), des exemples de synthèses et d'applications de ces oligonucléotides amphiphiles ont été rapportés dans la littérature<sup>76,134,135</sup>. Les premières structures décrites étaient des dérivés de glycérolipides conjugués à un oligonucléotide en position 5'<sup>76</sup>. Ces molécules ont été développées pour des applications antivirales. L'étude réalisée dans le cadre de cette publication a permis de mettre en évidence la transfection et l'activité séquence spécifique liées à ces amphiphiles. Toutefois l'activité de ces composés nécessite une très forte concentration en molécule active (100  $\mu$ M).

Plus récemment les oligonucléotides amphiphiles ont fait l'objet des travaux de Manoharan<sup>135</sup>. Les molécules développées sont des oligonucléotides anti-sens ciblant des micros ARNs (Antimir). Afin de permettre l'internalisation de ces oligonucléotides, des structures cholestérol ont été liées de façon covalente en position 3' à des oligonucléotides. Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que ces oligonucléotides étaient capables d'interagir avec leur cible miARN dans un modèle animal (souris)<sup>135</sup>.

Avant de pouvoir tester l'activité de nouvelles molécules amphiphiles, il faut coupler de manière covalente l'oligonucléotide à une chaîne hydrophobe.

### V.1 Synthèse d'oligonucléotides

Les synthèses sont réalisées au laboratoire de 3' vers 5' sur support solide et totalement automatisées. La synthèse d'un oligonucléotide consiste en la répétition n fois d'un cycle de synthèse aboutissant au greffage d'un nucléotide (Figure 70). Pour la synthèse d'un oligonucléotide non modifié, les synthons de départ sont généralement tous d'origine commerciale. La première étape consiste en une déprotection de la fonction 5'OH du nucléotide fixé sur support. Cette réaction dite de détritulation (Figure 70a) est réalisée en milieu acide. La seconde étape est le couplage du nucléotide suivant (Figure 70b). Cette

réaction est réalisée entre un synthon phosphoramidite et la position 5'OH précédemment déprotégée. Elle est fréquemment décrite comme catalysée par le tétrazole ou par le thiobenzyltétrazole selon le mécanisme décrit Figure 71. Une fois le couplage terminé, on fait agir de l'anhydride acétique en présence de méthylimidazole afin d'acétyler les molécules n'ayant pas été couplées. Cette étape porte le nom de capping ou terminaison (Figure 70c). La dernière étape de ce cycle est une réaction d'oxydation par l'iode pour faire passer le phosphore de son degré d'oxydation III au V (Figure 70d).

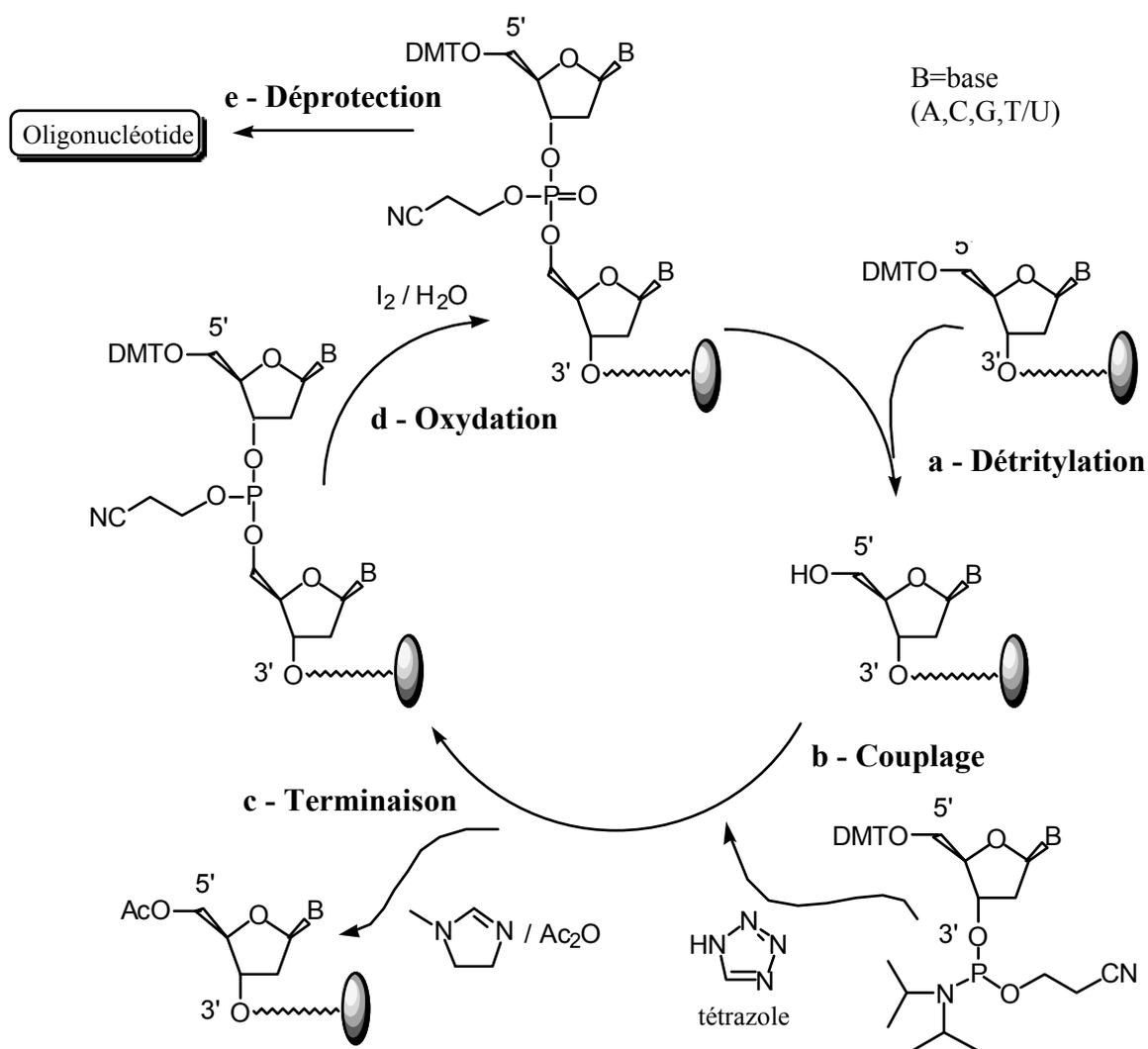


Figure 70 : Synthèse d'un oligonucléotide.

Ce cycle est répété autant de fois que nécessaire pour la formation de l'oligonucléotide souhaité. Une fois la synthèse terminée, l'oligonucléotide est déprotégé et libéré de son support par un traitement par l'ammoniaque (Figure 70e).

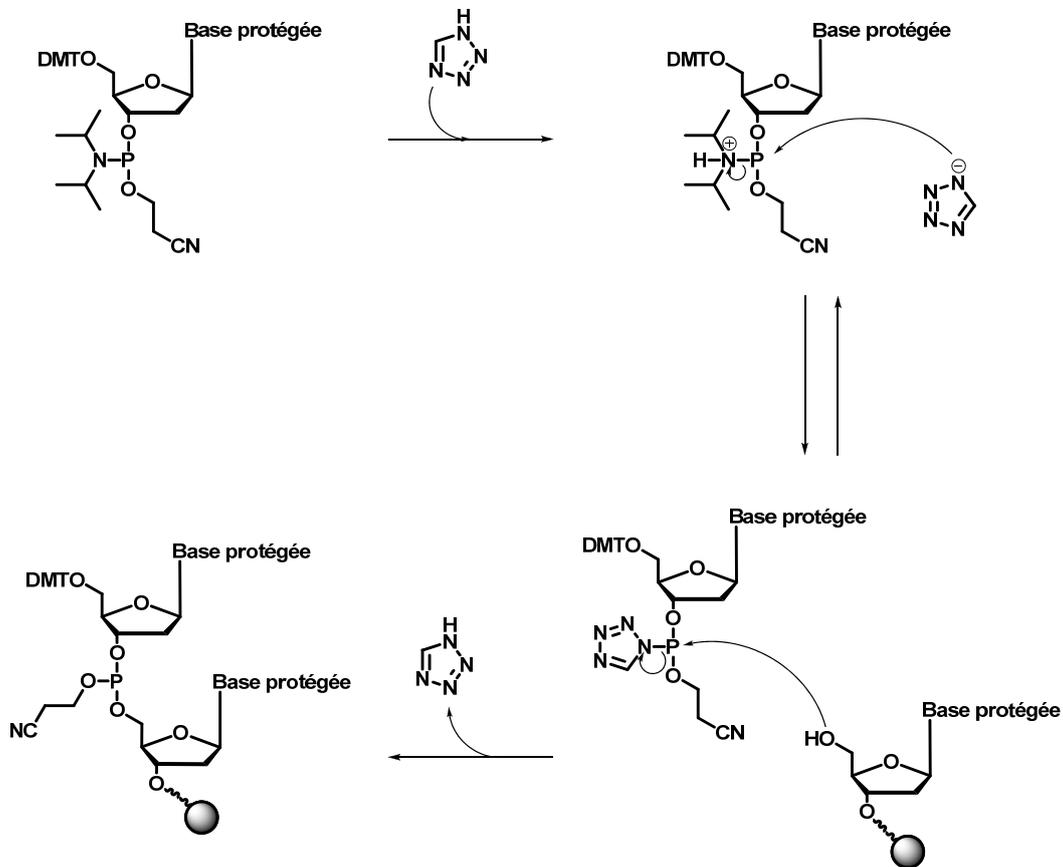


Figure 71 : Couplage d'un phosphoramidite activé par le tétrazole.

## V.2 Synthèse d'oligonucléotides amphiphiles

Pour rendre un oligonucléotide amphiphile, il faut lui greffer une structure hydrophobe. Différentes positions sont fonctionnalisables sur un oligonucléotide (Figure 72). Les positions les plus accessibles durant la synthèse sont les positions terminales 5'OH et 3'OH. La position 5'OH restant libre à la fin de la synthèse de l'oligonucléotide, elle peut être engagée dans une réaction de couplage avec un phosphoramidite hydrophobe de synthèse ou commercial (Figure 72a). La position 3' peut être fonctionnalisée en utilisant un support de synthèse portant une structure hydrophobe. Différents exemples de ces supports modifiés sont disponibles dans le commerce (Figure 72b). En dehors des hydroxyles

terminaux, il existe différentes solutions pour fixer une structure hydrophobe au cœur de la séquence de l'oligonucléotide. Bien que plus délicate à obtenir, cette localisation de modification offre la possibilité de fonctionnalisation multiple de l'oligonucléotide. Différents exemples sont décrits dans la littérature (Figure 72c)<sup>70,71,72,81</sup>.

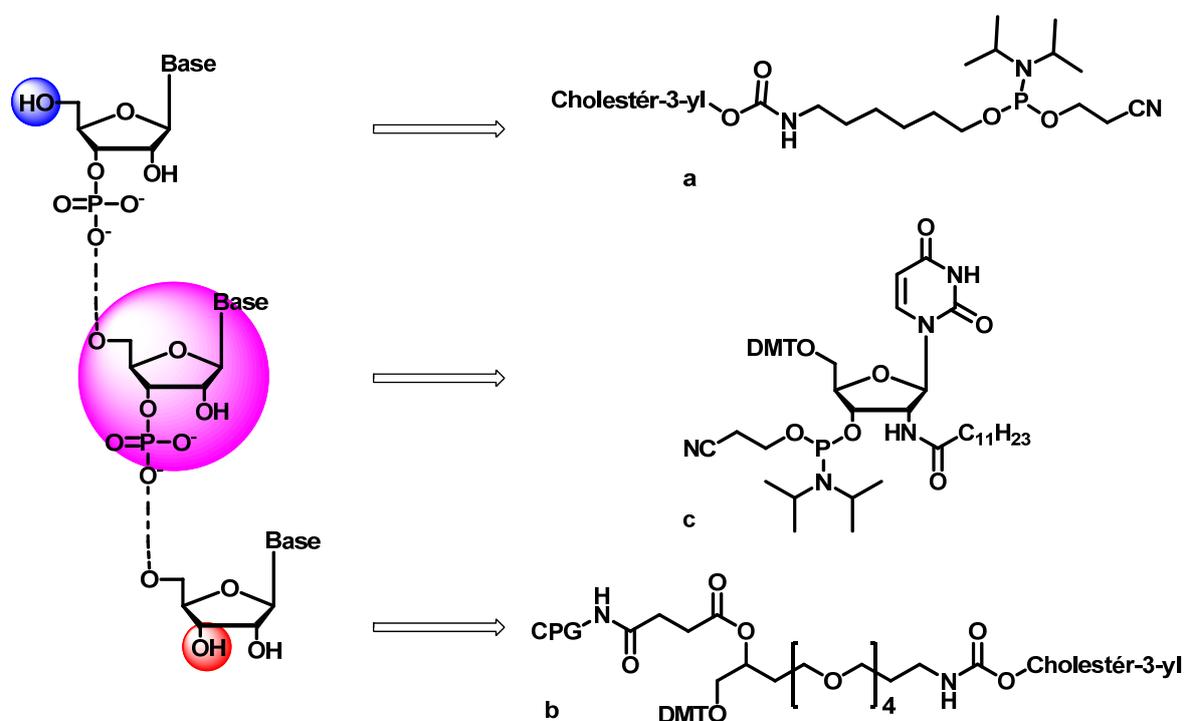


Figure 72 : Exemples de modifications actuellement décrites pour la formation d'oligonucléotides amphiphiles. a) Modification en position 5' OH. b) Modification en position 3' OH. c) Modification en cœur de chaîne<sup>81</sup>.

Bien qu'il existe différentes méthodes de modification des oligonucléotides pour en faire des amphiphiles, actuellement les méthodes de modification chimique ne permettent pas de diversifier les structures hydrophobes fixées. Les études réalisées n'exploitent généralement qu'une seule nature de lipide. Les plus fréquemment employés sont des dérivés d'acide gras ou de cholestérol. À notre connaissance, il n'existe pas d'outil qui permette l'étude de l'impact de la structure lipidique sur le comportement ou les propriétés biologiques des oligonucléotides amphiphiles.

Cette seconde partie présente une méthode de modification chimique simple destinée à pouvoir fonctionnaliser les hydroxyles terminaux d'un oligonucléotide par une

grande variété de structures lipidiques ou plus généralement hydrophobes. Là encore la méthode chimique développée fait appel à la chimie clic. Différents exemples de travaux décrits dans la littérature montrent que la chimie clic peut être associée à la chimie des oligonucléotides avec succès<sup>100,111</sup>. Cette chimie a été développée pour de nombreuses structures d'intérêt comme pour le marquage, les carbohydrates ou encore les peptides. Mais elle n'a à notre connaissance jamais été utilisée pour la fixation de structures lipidiques et la préparation d'oligonucléotides amphiphiles.

Pour réaliser cette fonctionnalisation, différentes approches sont envisageables. Il est possible de développer des stratégies *ante* ou *post*-synthèse c'est-à-dire que la réaction de chimie clic peut être située en amont (Figure 73a) ou en aval (Figure 73b) de la synthèse de l'oligonucléotide.

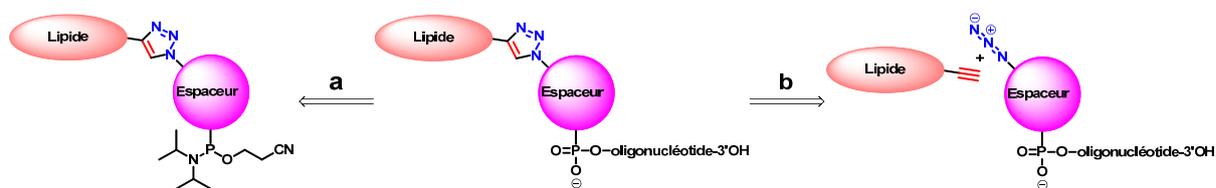


Figure 73 : Modification *ante* (a) et *post* (b) synthèse.

Si la stratégie adoptée est une stratégie *post*-synthèse, il est également possible de différencier deux sous voies de synthèse, en envisageant la synthèse soit d'un oligonucléotide alcyne vrai couplé à un lipide azoture, soit d'un oligonucléotide porteur d'un azoture couplé à un lipide porteur d'un alcyne vrai (Figure 74).

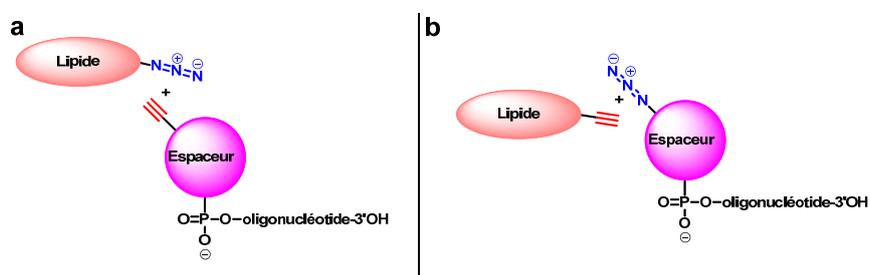


Figure 74 : Sous voies possibles pour les modifications *post*-synthèse.  
a) Oligonucléotide alcyne vrai. b) Oligonucléotide azoture.

L'ensemble de ces stratégies sera envisagé et elles seront comparées dans cette étude. Le comportement des molécules ainsi formées sera ensuite étudié. Enfin, ces oligonucléotides amphiphiles seront appliqués à une cible d'intérêt thérapeutique : le virus de l'hépatite C.

## V.3 Synthèses

### V.3.1 Couplage *ante*-synthèse

Pour réaliser une modification *ante*-synthèse d'oligonucléotide, il faut développer une structure amphiphile de plus petite taille, donc plus simple à manipuler. Cette molécule de dimension réduite qui sera préparée par chimie clic doit par la suite pouvoir être greffée sur l'oligonucléotide dans le cadre de la synthèse sur support décrite précédemment dans la partie III (partie : Nucléosides amphiphiles). Les NAs ayant précédemment été synthétisés et caractérisés, nous avons souhaité les utiliser comme composés de départ pour la synthèse des ONAs. En effet, ces molécules amphiphiles ayant pour base un nucléoside, il est aisé d'envisager une voie de modification pour les coupler à un oligonucléotide. La modification *post*-synthèse ainsi développée est présentée sur la Figure 75.

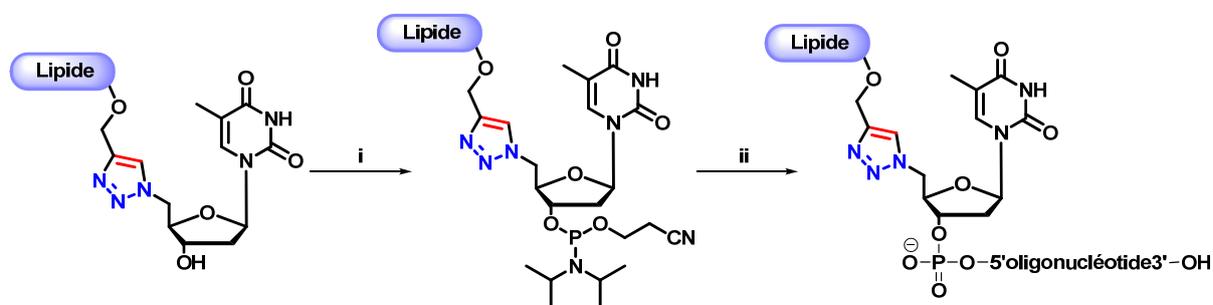


Figure 75 : Synthèse d'oligonucléotides amphiphiles par voie *post*-synthèse. i) Chlorophosphite (1,5 éq), DIEA (2 éq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, température ambiante, 4h. ii) Couplage sur support automatisé et activé par du benzylthiotétrazole.

En partant d'un dérivé NA anhydre, il est possible d'obtenir le dérivé phosphoramidite correspondant en une étape par action de chlorophosphite dans le DCM en présence de DIEA pour éliminer l'acide chlorhydrique formé. Le phosphoramidite ainsi obtenu est purifié sur colonne neutralisée. Les phosphoramidites synthétisés dans le cadre

de ce travail et pouvant être utilisés pour la modification d'oligonucléotides sont indiqués sur la Figure 76.

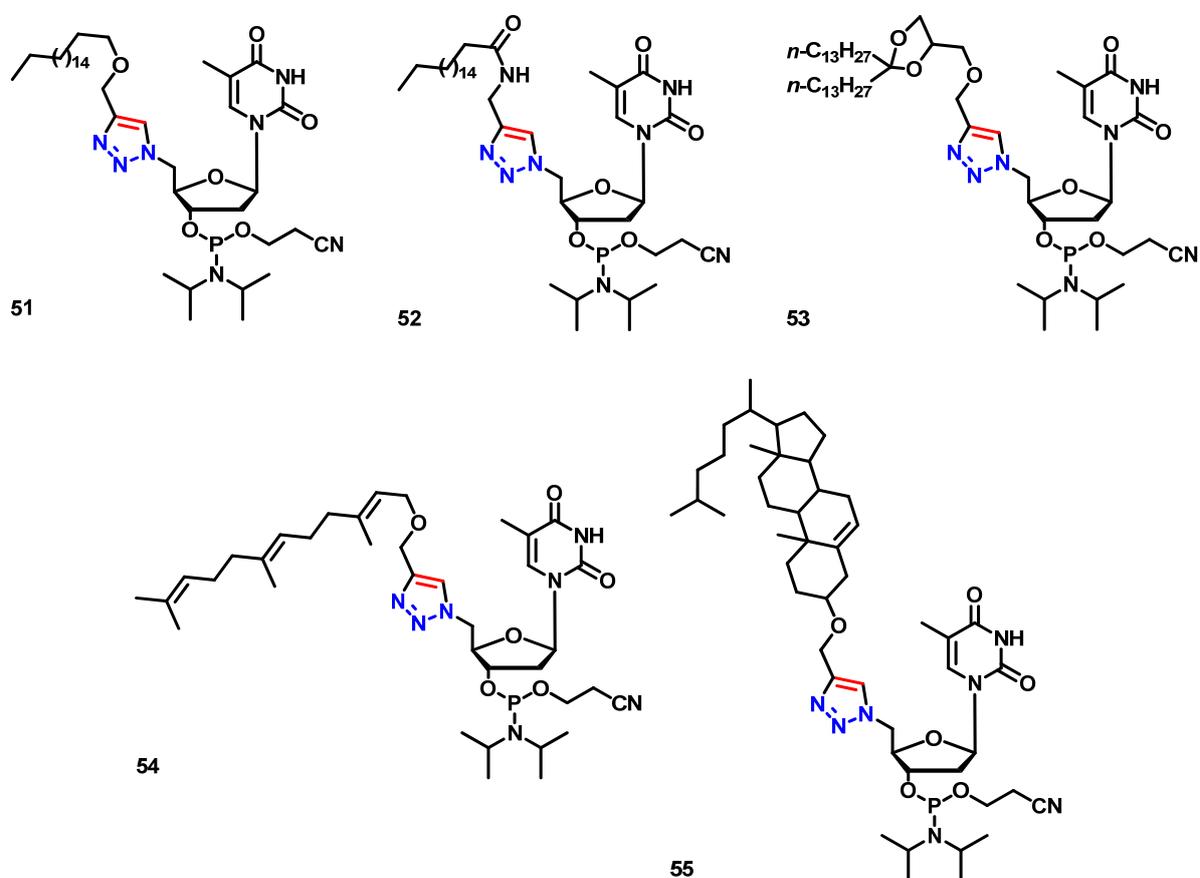


Figure 76 : Phosphoramidites amphiphiles synthésés pour les modifications *ante*-synthèse.

Le phosphoramidite est couplé par la suite lors de la dernière étape d'une synthèse d'oligonucléotide sur support solide. Cette méthode de modification faisant appel à des phosphoramidites modifiés, elle ne nécessite pas de modification supplémentaire de l'oligonucléotide. Par ailleurs elle emploie la même voie de couplage que celle suivie pour la synthèse des oligonucléotides. Elle est donc compatible avec toutes les chimies d'oligonucléotides pouvant être utilisées sur synthétiseur et permet d'obtenir les oligonucléotides amphiphiles après purification par HPLC avec des rendements de l'ordre de 20 à 40 %. Un autre attrait de cette méthode de modification est que l'étape de couplage catalysé par le cuivre ayant lieu bien avant la synthèse de l'oligonucléotide, le cuivre est éliminé avant l'étape de synthèse de l'oligonucléotide. L'inconvénient de cette méthode est que la formation du phosphoramidite n'est possible que sur les molécules ne présentant pas

d'hydrogène mobile. Le cas échéant, il est indispensable de mettre en place une stratégie de protection.

### V.3.2 Couplage *post-synthèse*

Les conditions réactionnelles décrites précédemment pour le couplage d'un nucléoside et d'un lipide par chimie clic ne fonctionnent pas pour les structures plus complexes. De nouvelles conditions réactionnelles ont été envisagées. Différents protocoles décrits dans la littérature ont été testés. Les conditions les plus favorables déterminées après expérience sont 72 heures à température ambiante dans un mélange DMSO/eau (50/50). Cette réaction est catalysée par le cuivre sous forme I généré *in-situ* par action de l'ascorbate de sodium sur du sulfate de cuivre (Figure 77a). Cette réaction nécessite également l'emploi d'un adjuvant de catalyse le TBTA (Figure 77b) dont le rôle est de maintenir le cuivre sous sa forme active (Cu I) en le chélatant. Une alternative à ce protocole peut être l'emploi de micro-ondes pour activer la réaction. La réaction peut alors être réalisée en 35 min, 65 °C, 100 W, en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium le tout dans un solvant DMSO/eau (50/50) (Figure 77c).

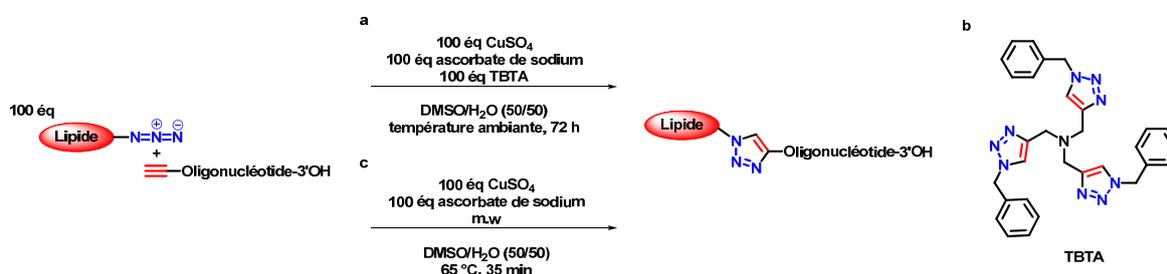


Figure 77 : Modification d'oligonucléotide par chimie clic. a) Modification *post-synthèse* à température ambiante, b) adjuvant de catalyse TBTA, c) modification assistée par micro-ondes.

- Couplage *post-synthèse* d'un oligonucléotide alcyne vrai (*post* de première génération)

Les premiers essais de modification par chimie clic ont été réalisés sur des dérivés de type oligonucléotides présentant une structure alcyne vrai en position 5'. Ces oligonucléotides peuvent être rapidement obtenus par couplage d'un dérivé hexynyle

phosphoramidite commercial. Une fois l'oligonucléotide alcyne obtenu, il est couplé dans les conditions préalablement décrites (Figure 78).

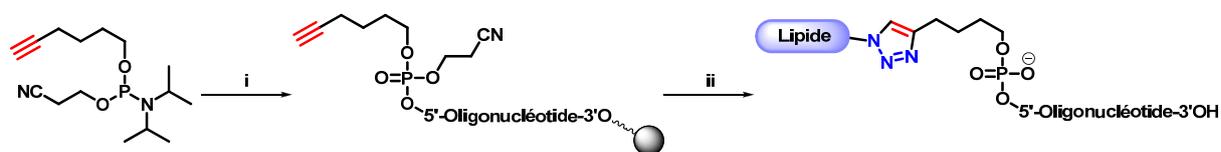


Figure 78 : synthèse d'oligonucléotides amphiphiles par voie *post-synthèse*, première génération. i) Couplage sur support automatisé et activé par du benzylthiotétrazole. ii)  $\text{CuSO}_4$  (100 éq), ascorbate de sodium (100 éq), TBTA (100 éq), DMSO/Eau (50/50), température ambiante, 72 h.

L'oligonucléotide nouvellement amphiphile, toujours fixé sur support et protégé, est alors lavé trois fois par une solution saturée d'EDTA pour éliminer les sels de cuivre. Il est ensuite déprotégé et purifié par HPLC.

Cette méthode permet l'emploi de lipides présentant des hydrogènes mobiles sans faire appel à des groupements protecteurs. Toutefois, les rendements observés sont aléatoires et restent conditionnés par le couplage de la structure hexynyle. Il est à noter que cette méthode nécessite le développement d'une nouvelle banque de lipides présentant un azoture (Figure 79).

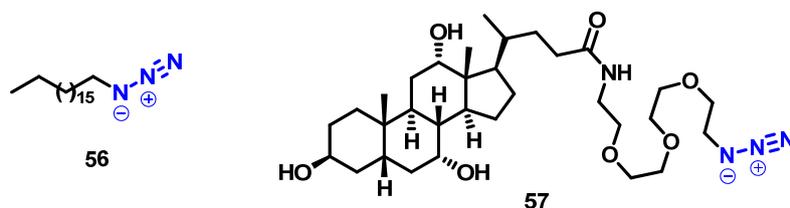


Figure 79 : Lipides porteurs d'azoture synthétisés au laboratoire.

Ces composés sont préparés par substitution d'un halogène ou par un couplage peptidique sur des synthons commerciaux. Les azotures sont délicats à manipuler voire instables, il ne semble donc pas idéal de développer une vaste banque de lipides ainsi modifiés. Par ailleurs, la structure hexynyle utilisée pour assurer le lien entre le lipide et l'oligonucléotide diffère du lien développé pour la méthode de modification *ante-synthèse* (Figure 80).

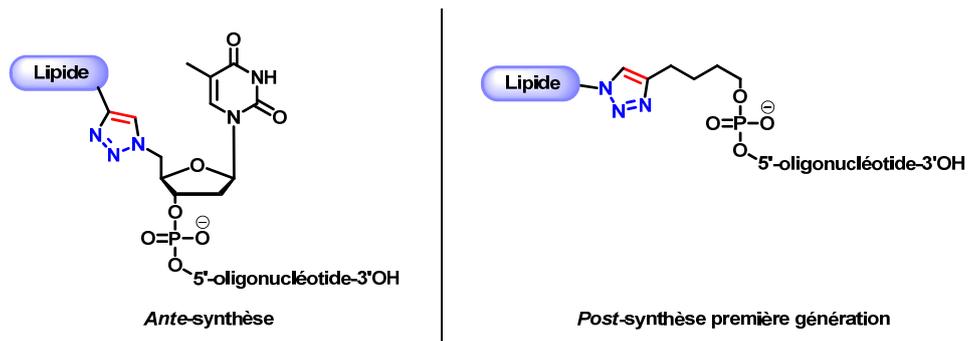


Figure 80 : Comparaison des deux types d'amphiphiles obtenus par modification *post-synthèse*.

La méthode *ante* et la méthode *post* de première génération sont donc deux méthodes qui conduisent à l'obtention de deux banques de molécules différentes. Il serait préférable de développer une seconde génération de modification *post* dont les produits seraient identiques à ceux obtenus par la modification *ante synthèse*.

- Couplage *post-synthèse* d'un oligonucléotide azoture (*post* de deuxième génération).

Afin de faire converger les voies *ante-* et *post-synthèse*, il faut envisager une nouvelle méthode de modification. Pour cela une rétro synthèse a été proposée (Figure 81).

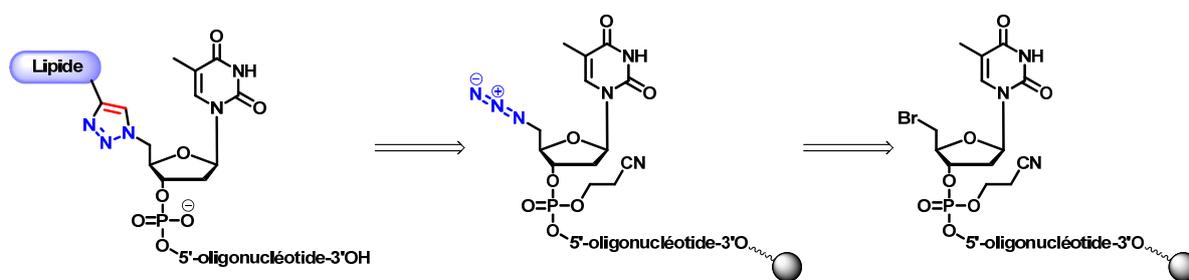


Figure 81 : Rétrosynthèse proposée pour les modifications *post-synthèse* de deuxième génération.

Pour arriver à un oligonucléotide amphiphile par une méthode *post*, la réaction de chimie clic intervient lors de la dernière étape de synthèse. Pour pouvoir accepter le couplage par chimie clic l'oligonucléotide doit présenter un groupement azoture, dans ce cas en position 5'. La solution la plus évidente serait de développer un linker portant un azoture et capable d'être fixé à un oligonucléotide. La synthèse de la 5'-azido-5'désoxythymidine a déjà été rapportée dans ce travail et ce composé peut être obtenu en quantité importante

(plusieurs grammes). Toutefois pour pouvoir être fixé sur un oligonucléotide, il faut préparer le dérivé phosphoramidite correspondant ce qui n'est pas possible. Les dérivés azoture étant très réactifs avec les différentes formes de P(III) mises en jeu dans cette réaction, la voie directe n'est pas envisageable. Une alternative simple peut être de préparer un synthon phosphoramidite porteur d'un groupement facilement substituable comme un halogène mais qui ne réagirait pas sur les différents phosphites. Le nucléoside 5' halogéné peut-être préparé au laboratoire selon le même protocole que le dérivé azoture (Figure 82).

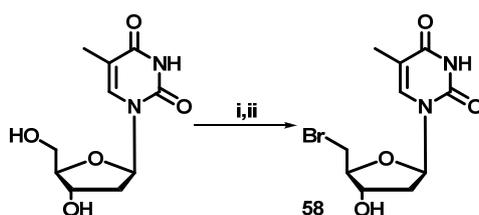


Figure 82 : Synthèse de 5'-bromo-5'-désoxythymidine. i) chlorure de méthanesulfonyle (1,1 éq), pyridine température ambiante, 4 heures. ii) KBr (5 éq), DMF, 80 °C, 4 heures.

Le dérivé phosphoramidite **59** est obtenu par action du chlorophosphite dans le DCM. Le phosphoramidite est finalement couplé à un oligonucléotide lors de la synthèse sur support de ce dernier (Figure 83).

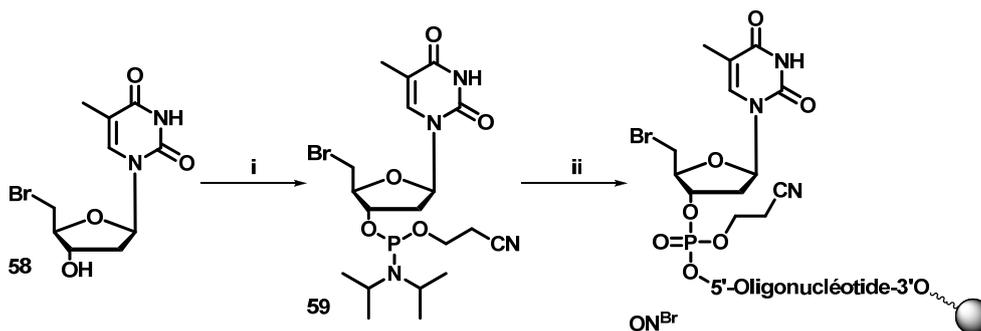


Figure 83 : synthèse de 5'-bromo-5'-désoxyoligonucléotides. i) Chlorophosphite (1,5 éq), DIEA (2 éq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, température ambiante, 4h. ii) Couplage sur support automatisé et activé par du benzylthiotétrazole.

L'oligonucléotide 5'-bromo-5'-désoxy synthétisé est maintenu protégé et fixé à son support. La substitution du groupement bromo par un azoture (Figure 84) est obtenue par action de l'azoture de sodium dans le DMF selon un protocole décrit par Miller et Kool en 2004<sup>136</sup>. Cette réaction est activée par l'ajout d'iodure de sodium et conduit au dérivé azoture. À ce stade de la synthèse, une petite fraction de l'oligonucléotide est déprotégée et libérée de son support. Après injection en HPLC phase inverse C18, les différentes fractions collectées sont caractérisées par spectrométrie de masse. Par cette méthode, le rendement du couplage de la phosphoramidite 5'-bromo peut être estimé à 50 % et la substitution du brome par l'azoture peut être considérée comme quantitative. L'oligonucléotide 5'-azido-5'-désoxy obtenu peut alors être engagé dans une réaction de couplage de chimie clic selon les protocoles précédemment décrits en partie IV (modifications *post*-synthèse). De la même manière que pour les oligonucléotides amphiphiles issus de la première génération de *post*, ces oligonucléotides sont maintenus protégés et sur support pour être lavés abondamment par une solution d'EDTA saturé. L'oligonucléotide est libéré de son support et déprotégé pour finalement être purifié en HPLC RP-C4. Globalement, les rendements sont compris entre 10 et 15 %.

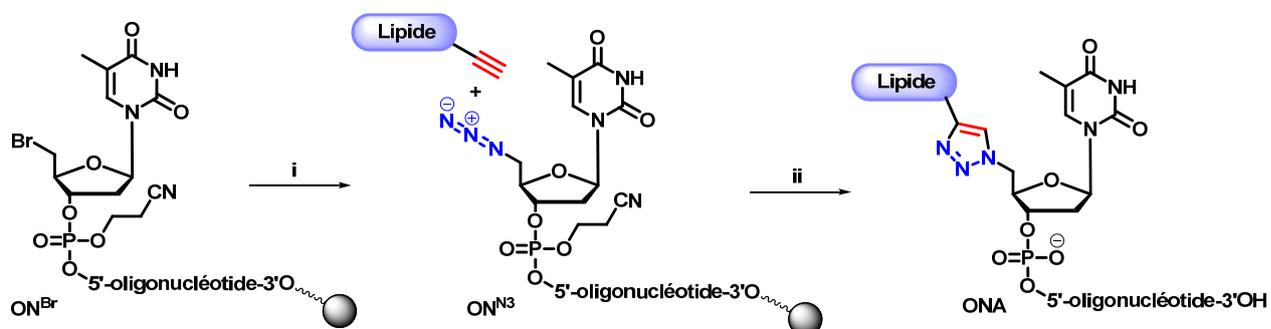


Figure 84 : Modifications *post*-synthèse de deuxième génération. i) NaI (50 éq), NaN<sub>3</sub> (50 éq), DMF, 65 °C, 75 minutes. ii) CuSO<sub>4</sub> (100 éq), ascorbate de sodium (100 éq), TBTA (100 éq), DMSO/Eau (50/50), température ambiante, 72 h.

Les caractéristiques de rendement et de réactivité des voies *post*-synthèse de première et deuxième générations sont très similaires. Toutefois cette seconde voie de synthèse permet l'obtention d'oligonucléotides identiques à ceux obtenus par la méthode *ante*, ce qui permettra de réunir et comparer les caractérisations et expérimentations ultérieures.

### V.3.3 Comparaison des deux méthodes de modification : *ante-* et *post-synthèse*

Les différentes méthodes de modifications décrites ici présentent chacune des avantages et des inconvénients.

*Ante* :

Avantages : Cette méthode permet l'obtention d'oligonucléotides amphiphiles avec des rendements de 20 à 40 %. L'emploi d'une modification par la chimie des phosphoramidites limite l'exposition de l'oligonucléotide à des réactions parasites qui pourraient le dégrader (oxydation par l'oxygène dissous associé au cuivre). Par ailleurs cette chimie est compatible avec toutes les natures d'acides nucléiques. Un autre facteur non négligeable est l'élimination des sels de cuivre avant la synthèse de l'oligonucléotide.

Inconvénients : L'inconvénient majeur de cette voie de synthèse est la réactivité des phosphoramidites qui limite le choix des structures lipidiques aux chaînes non réactives et exemptes d'hydrogène mobile. Cet aspect réduit les possibilités de variation des chaînes lipidiques et diminue l'intérêt apporté par la chimie clic.

*Post* :

Avantages : Ces méthodes permettent l'obtention d'une grande variété d'oligonucléotides modifiés. Toute structure hydrophobe susceptible d'être propargylée peut en effet être fixée. Cette méthode permet la préparation d'un stock d'oligonucléotides bromés ou présentant un azoture. Ce stock peut être fractionné et modifié à façon afin de cribler ultérieurement des banques de lipides.

Inconvénients : Ces méthodes ont principalement deux inconvénients. Le premier est le faible rendement (10-15 %). Le second est la complexation du cuivre par les groupements phosphate des oligonucléotides. Bien que lavé à plusieurs reprises par une solution d'EDTA et purifié sur HPLC, les oligonucléotides préparés par cette méthode sont susceptibles de contenir des traces de cuivre.

Bilan : Les voies de synthèse *ante* et *post* mises en place au laboratoire sont différentes. Les modifications *ante* permettent la modification de tout type d'oligonucléotide, avec de bons rendements et en l'absence de cuivre en fin de synthèse. Il s'agit donc d'une méthode de

production qui permet l'obtention de grandes quantités d'oligonucléotides *a priori* sans trace de cuivre. La méthode *post* permet quant à elle le développement d'une grande variété d'amphiphiles. Il s'agit donc d'une méthode davantage tournée vers l'investigation (pour déterminer la structure la plus adaptée, dans notre cas à la transfection). Ces deux méthodes sont donc parfaitement complémentaires. Une grande variété d'amphiphiles synthétisés par la voie *post* peut être testée, les plus prometteurs peuvent par la suite être produits en grande quantité par la méthode *ante*.

#### **V.3.4 Oligonucléotides amphiphiles et méthodes de purification**

L'ensemble des différentes voies de synthèse décrites dans la partie précédente a permis la constitution d'une banque variée d'oligonucléotides amphiphiles (Figure 85). Ces différentes structures ont été greffées sur des oligonucléotides de chimie diverse (ADN, LNA, 2'OMe) et de séquences variées. Dans un premier temps, pour tester la faisabilité de la méthode, des oligonucléotides polyuridine de différentes longueurs ont été modifiés par couplage en *post*-synthèse. Les oligonucléotides polyuridine utilisés possèdent différentes longueurs (8U et 17U).

Puis, afin de pouvoir appliquer les ONAs à une cible d'intérêt thérapeutique des oligonucléotides présentant une séquence anti VHC et leur équivalent mismatch (contrôle négatif) sont également modifiés. Ces modifications sont réalisées par voie *ante* et *post* synthèse. La séquence anti VHC choisie a été décrite par Tallet *et al*<sup>137</sup> et cible une zone très conservée de l'ARN viral du VHC. Ces cibles et séquences seront détaillées ultérieurement dans la partie spécifique au VHC.

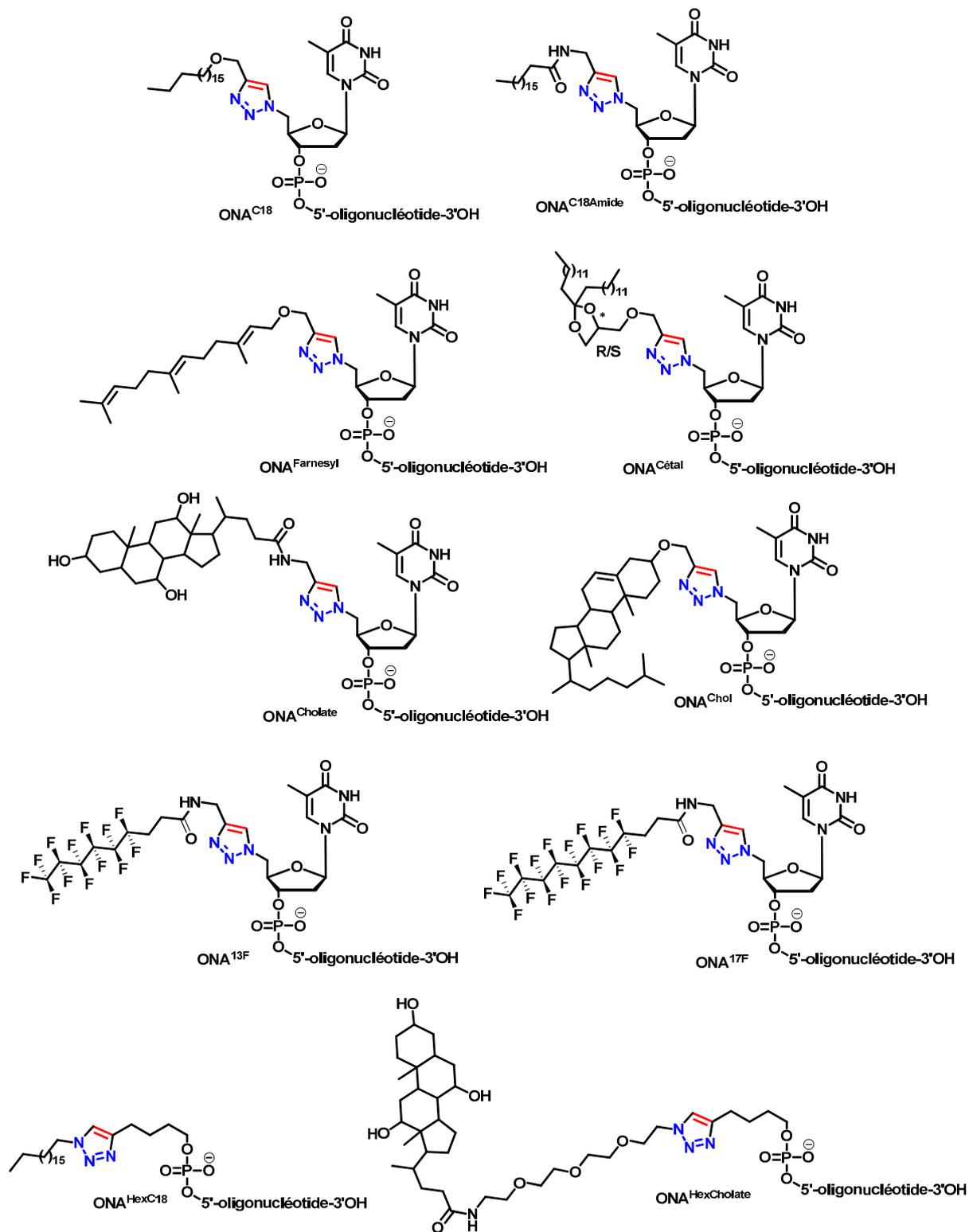


Figure 85 : Oligonucléotides amphiphiles préparés par les différentes voies de synthèse développées au laboratoire.

Ces oligonucléotides ont été baptisés ONAs (oligonucléotides amphiphiles). Ils sont obtenus purs après purification par HPLC phase inverse. (Figure 86)

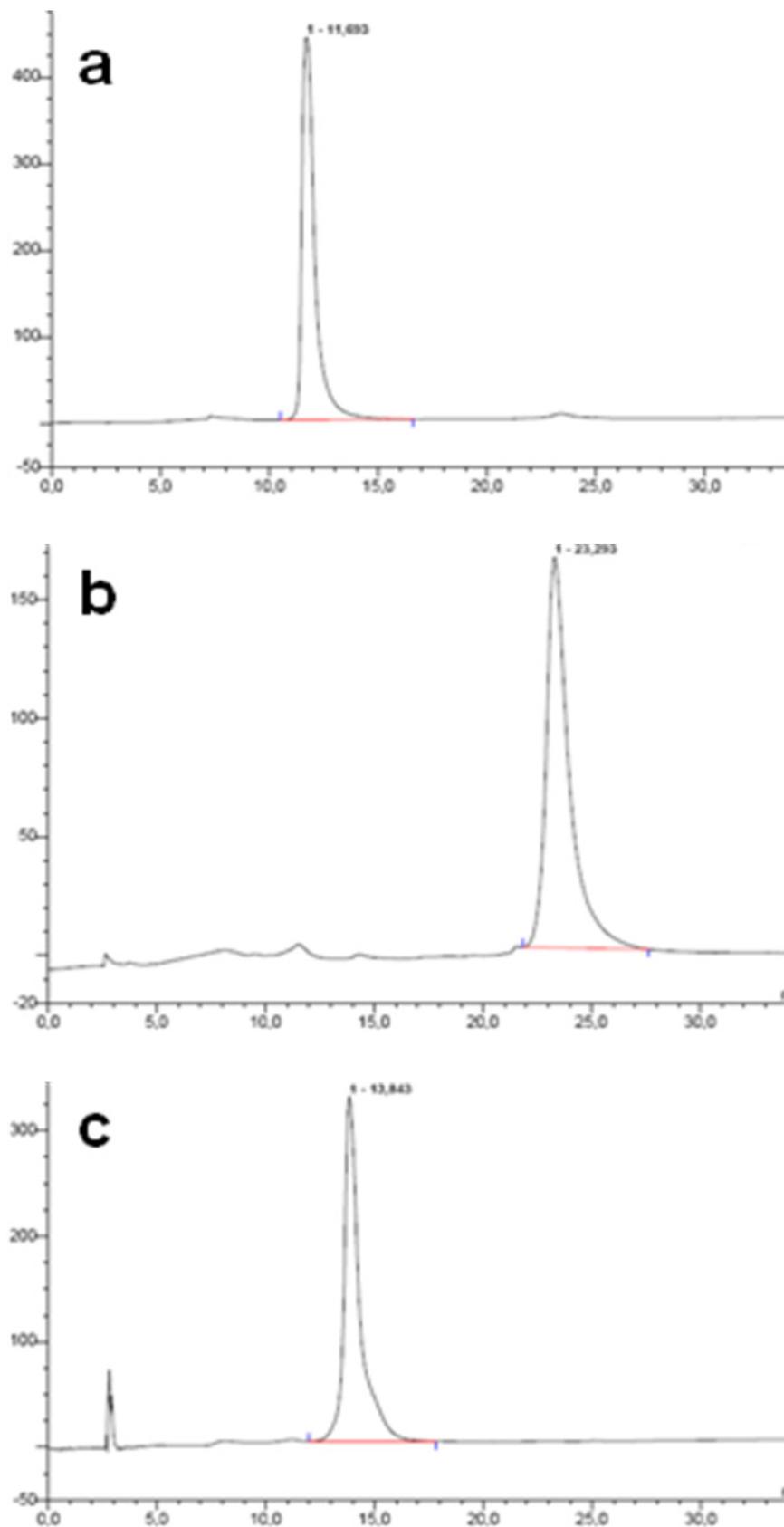


Figure 86 : Exemples de profils HPLC d'ONAs anti VHC. a) Composé  $ON^{N3}$ , b) Composé  $ON^{Chol}$ , c) Composé  $ON^{Cholate}$ .

Les solvants utilisés pour cette purification sont désignés sous les appellations A et B. L'éluant A étant un tampon TEA/acide acétique 0,1 M (pH 7) additionné de 5 % d'acétonitrile. L'éluant B est un mélange de 20 % d'éluant A et 80 % d'acétonitrile. La purification s'effectue en utilisant une élution rapide généralement de 0 à 80 % de B en 30 minutes (sauf pour le cas du composé **ONA<sup>Cétal</sup>** pour lequel le gradient est de 0 à 100 % de B en 30 minutes). La purification de ces ONAs est grandement facilitée par la présence de la chaîne hydrophobe. Les structures hydrophobes fixées étant d'une manière générale peu polaires, elles induisent un temps de rétention nettement supérieur à celui observé pour les oligonucléotides non amphiphiles (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des temps de rétention observés en RP-HPLC, pour des ONAs de même séquence : CGGCUCAUCAACCCAT<sup>modifié</sup>.

ONA	Conditions de départ	Conditions d'arrivée	Durée d'élution	Temps de rétention
<b>ON<sup>N3</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	11,7 min
<b>ONA<sup>C18</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	21,6 min
<b>ONA<sup>Chol</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	23,3 min
<b>ONA<sup>Cholate</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	13,8 min
<b>ONA<sup>C18Amide</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	19,6 min
<b>ONA<sup>13F</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	16 min
<b>ONA<sup>17F</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	19,1 min
<b>ONA<sup>Cétal</sup></b>	100 % A, 0 % B	0 % A, 100 % B	30 min	21,9 min
<b>ONA<sup>Farnésyl</sup></b>	100 % A, 0 % B	20 % A, 80 % B	30 min	18,5 min

Un exemple clair de cette différence de temps de rétention est donné par les dérivés **ONA<sup>13F</sup>** et **ONA<sup>17F</sup>**. La différence de deux CF<sub>2</sub> sur la chaîne implique une différence de plus de trois minutes du temps de rétention. Les dérivés bicaténaires de type **ONA<sup>Cétal</sup>** nécessitent un gradient plus important car leur rétention est telle qu'ils ne sont pas entraînés dans les mêmes conditions que les monocaténaires.

### V.3.5 Expériences de thermodénaturation

Afin de vérifier que la présence de la chaîne hydrophobe n'altère pas la reconnaissance de l'oligonucléotide par son brin complémentaire, des expériences de thermodénaturation ont été réalisées.

Principe :

La thermodénaturation d'un oligonucléotide est la dissociation des duplex par augmentation de la température. Cette thermodénaturation peut être suivie par UV du fait d'un phénomène appelé hyperchromicité. Ce phénomène est lié au fait que les brins d'acides nucléiques non appariés absorbent d'avantage en UV que les duplex. On peut donc observer la proportion d'oligonucléotides dissociés en fonction de la température. Le profil type d'une courbe de dénaturation est représenté Figure 87 (courbe rouge). La température de thermodénaturation est définie comme le premier maximum décrit par la dérivée première de la courbe de dénaturation (Figure 87, courbe noire). Concrètement, cette température est la température à laquelle 50 % des brins sont dissociés.

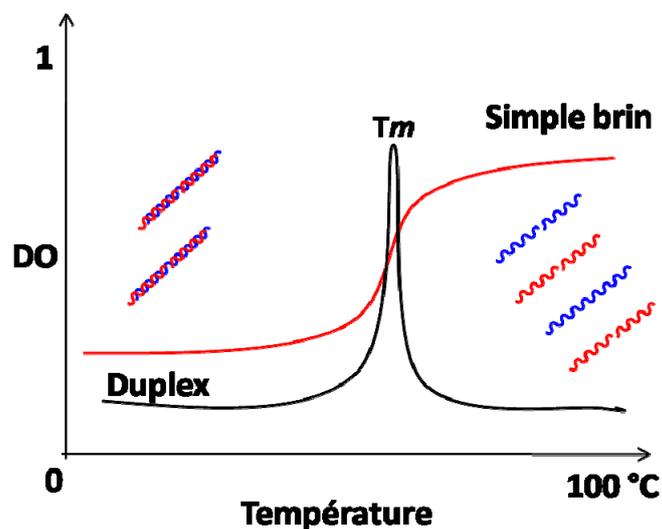


Figure 87 : Principe général de la thermo dénaturation. Courbe de dénaturation en rouge, dérivée première de la courbe de dénaturation en noir.

Les expériences réalisées en thermodénaturation nous ont globalement donné des résultats similaires pour les différents composés (Tableau 4). La température de thermodénaturation observée pour les ONAs est de l'ordre 70 °C (Figure 88).

Tableau 4: Récapitulatif de valeur de  $T_m \pm 1$  °C.

Duplex		$T_m$
ON <sup>17M</sup> :	3'-CGGCUCAUCACAACCCA-5'	70 °C
ODN complémentaire :	5'-GCCGAGTAGTGTGGGT-3'	
ON <sup>N3</sup> :	3'-CGGCUCAUCACAACCCAT <sup>azido</sup> -5'	70 °C
ODN complémentaire :	5'-GCCGTGUTGTGTGGGT-3'	
ONA <sup>Chol</sup> :	3'-CGGCUCAUCACAACCCAT <sup>Chol</sup> -5'	70 °C
ODN complémentaire :	5'-GCCGTGUTGTGTGGGT-3'	
ONA <sup>Cholate</sup> :	3'-CGGCUCAUCACAACCCAT <sup>Cholate</sup> -5'	70 °C
ODN complémentaire :	5'-GCCGTGUTGTGTGGGT-3'	
ONA <sup>C18</sup> :	3'-CGGCUCAUCACAACCCAT <sup>Cholate</sup> -5'	70 °C
ODN complémentaire :	5'-GCCGTGUTGTGTGGGT-3'	

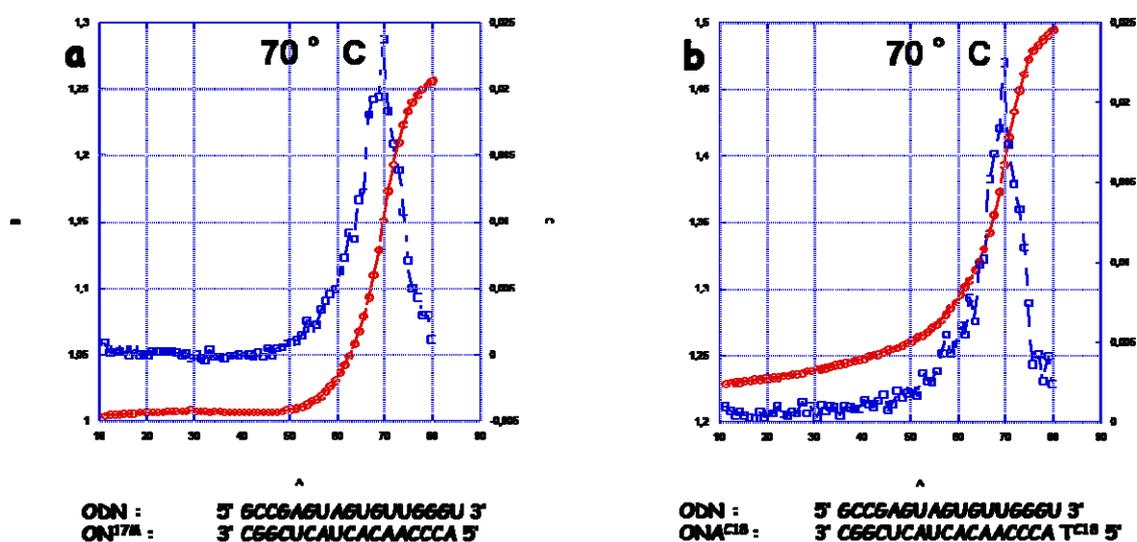


Figure 88 : Exemples de comparaison de  $T_m$ . a) Duplex oligonucléotide non amphiphile/ODN complémentaire. b) Duplex ONA<sup>C18</sup>/ODN complémentaire.

### V.3.6 Organisations supramoléculaires

Des expériences de MET ont été réalisées sur des solutions concentrées en ONAs (> 100  $\mu$ M). Ces expériences avaient pour objectif de déterminer si les ONAs induisent la formation d'organisations supramoléculaires. Des structures sphériques de 50 à 200 nm ont été observées. Ces agrégats ont été visualisés à différentes reprises sur des ONAs de concentrations allant de 100 à 200  $\mu$ M portant différentes séquences (polyuridine ou séquence anti-VHC) et exhibant différentes natures de chaînes hydrophobes (C<sub>18</sub> et Chol) (Figure 89). Aucune structure de ce type n'a été visualisée après la même étude faite sur un oligonucléotide anti-VHC non amphiphile de concentration 100  $\mu$ M.

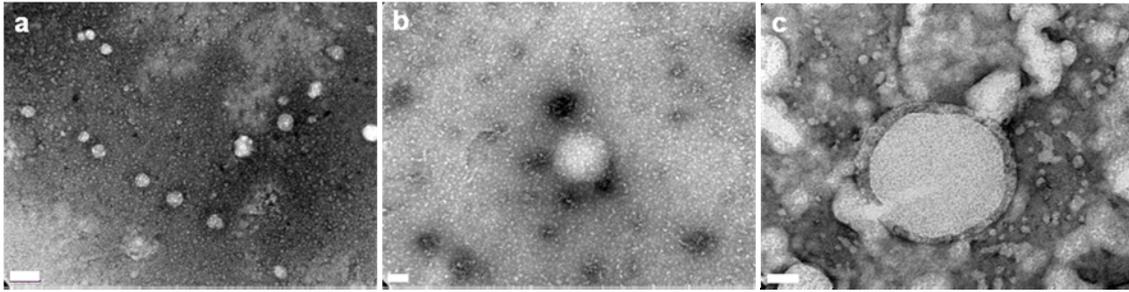


Figure 89 : Structure observée en MET, a) ONA<sup>C18</sup> polyuridine (17U) échelle : 100 nm, b) ONA<sup>C18</sup> polyuridine (8U) échelle : 100 nm, c) agrégats de ONA<sup>C18</sup> polyuridine (17U) interagissant avec une vésicule de DOPC échelle : 50 nm.

Ce comportement original souligne le potentiel supramoléculaire de ces molécules amphiphiles. Afin de confirmer les observations de MET, des expériences de diffusion de la lumière (DLS : diffusion light scattering) ont également été réalisées au moyen d'un zetasizer (Malvern) sur des échantillons aqueux contenant des ONAs à différentes concentrations (40-100  $\mu\text{M}$ ). Ces expériences réalisées sur des ONAs présentant des chaînes ONA<sup>C18</sup> et ONA<sup>Chol</sup>, ont confirmé l'existence de populations de particules de dimensions voisines de 125 nm pour le ONA<sup>C18</sup> et 140 nm pour le dérivé ONA<sup>Chol</sup>. Ces populations présentent un indice de polydispersité de 0,4 et sont mono-disperses.

Dans la littérature, les valeurs de CAC rapportées par Letsinger pour des oligonucléotides amphiphiles sont généralement élevées (supérieures à 150  $\mu\text{M}$ ). Les mesures de DLS réalisées au cours de ces travaux de thèse laissent apparaître des objets à des concentrations de 40  $\mu\text{M}$ . Afin de déterminer la concentration d'agrégation critique des ONAs, des expériences de tensiométrie (pour des concentrations allant de 0 à 30  $\mu\text{M}$ ) et de fluorescence (pour des concentrations allant de 0 à 200  $\mu\text{M}$ ) ont été réalisées. Les expériences de tensiométrie et de fluorescence n'ont pas permis de mettre en évidence de CAC dans une gamme de concentrations de 0 à 200  $\mu\text{M}$ , ce qui est cohérent avec la littérature.

D'autres expériences de MET ont été réalisées sur des ONA<sup>C18</sup> afin de mettre en évidence les interactions entre ONAs et surfaces lipidiques. Les ONAs ont été incubés à température ambiante en présence de liposomes de DOPC extrudés à 200 nm. Les images obtenues permettent de voir des structures agrégées de moins de 100 nm de diamètre venant se fixer à la surface de liposomes de DOPC de 200 nm de diamètre (Figure 89c).

## V.4 ONAs et vectorisation d'oligonucléotides

Pour mettre en évidence l'internalisation de nos amphiphiles, des ONAs marqués par une fluorescéine en position 3' ont été synthétisés (Figure 90).

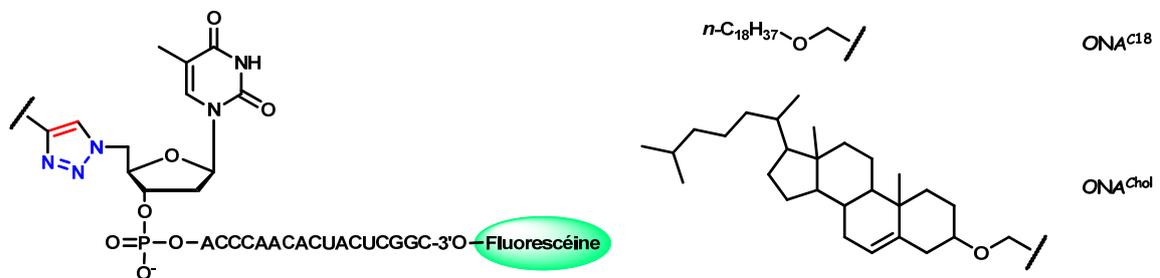


Figure 90 : ONAs marqués en 3' par la fluorescéine.

Les premières expériences réalisées ont été effectuées sur des cellules de carcinome hépatocellulaire humain (Huh-7). Les oligonucléotides amphiphiles marqués ont été incubés en présence de sérum. Les observations réalisées par microscopie à fluorescence ont permis de mettre en évidence l'internalisation des dérivés  $\text{ONA}^{\text{C18}}$  (Figure 91) et  $\text{ONA}^{\text{Chol}}$  (Figure 92). Les ONAs apparaissent sous forme de grains fluorescents dans le cytoplasme, et s'accumulent au cours du temps dans la région périnucléaire, le noyau n'est pas marqué. Les images de contraste de phase ne montrent pas de signes apparents de cytotoxicité de ces dérivés.

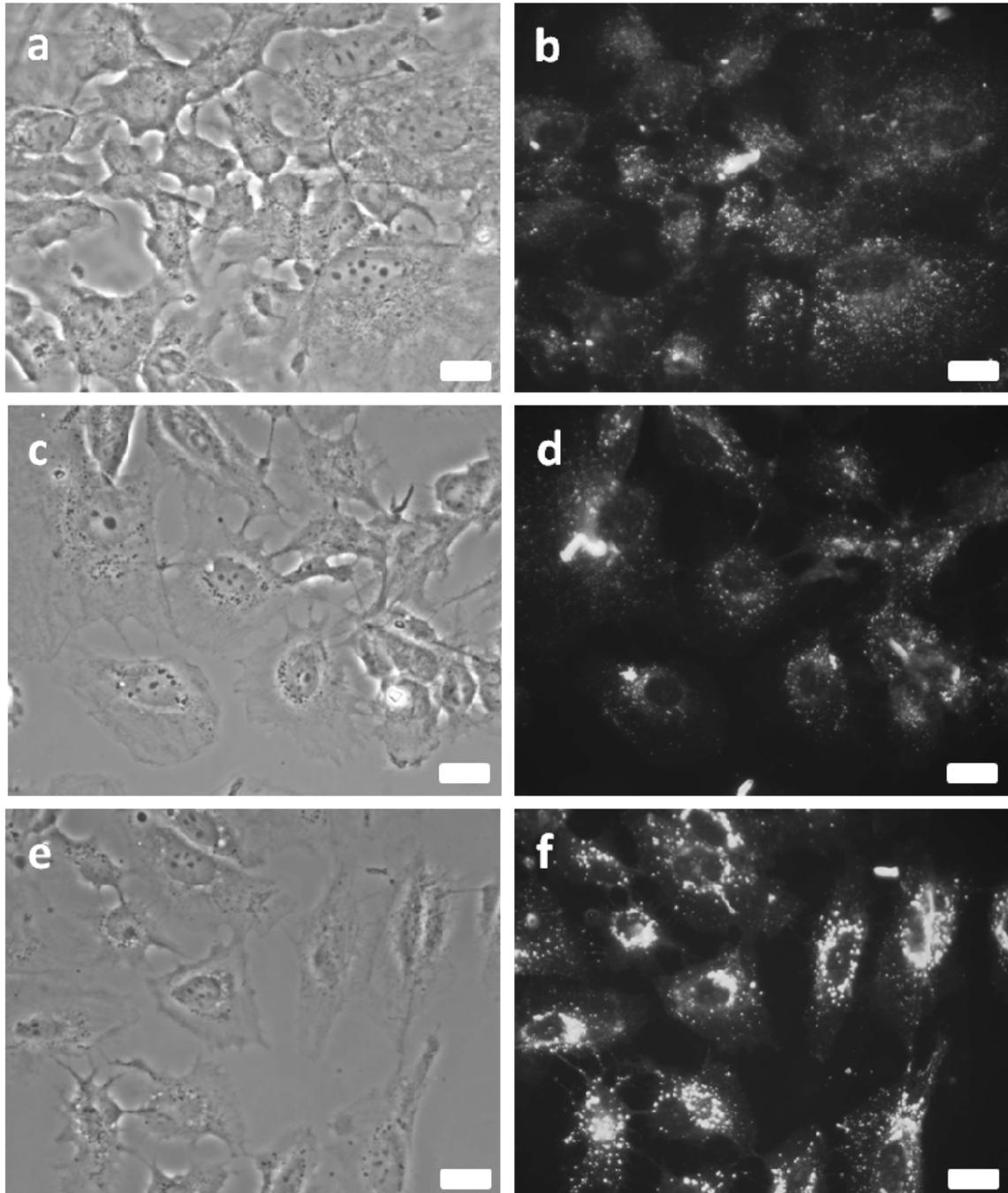


Figure 91 : Cinétique d'internalisation du ONA<sup>C18</sup> 3'-fluorescéine à 0,5 μM sur Huh-7 en microscopie optique et de fluorescence échelles : 10 μm. a,b) 1 h contraste de phase et fluorescence. c,d) 2 h contraste de phase et fluorescence. e,f) 4 h contraste de phase et fluorescence.

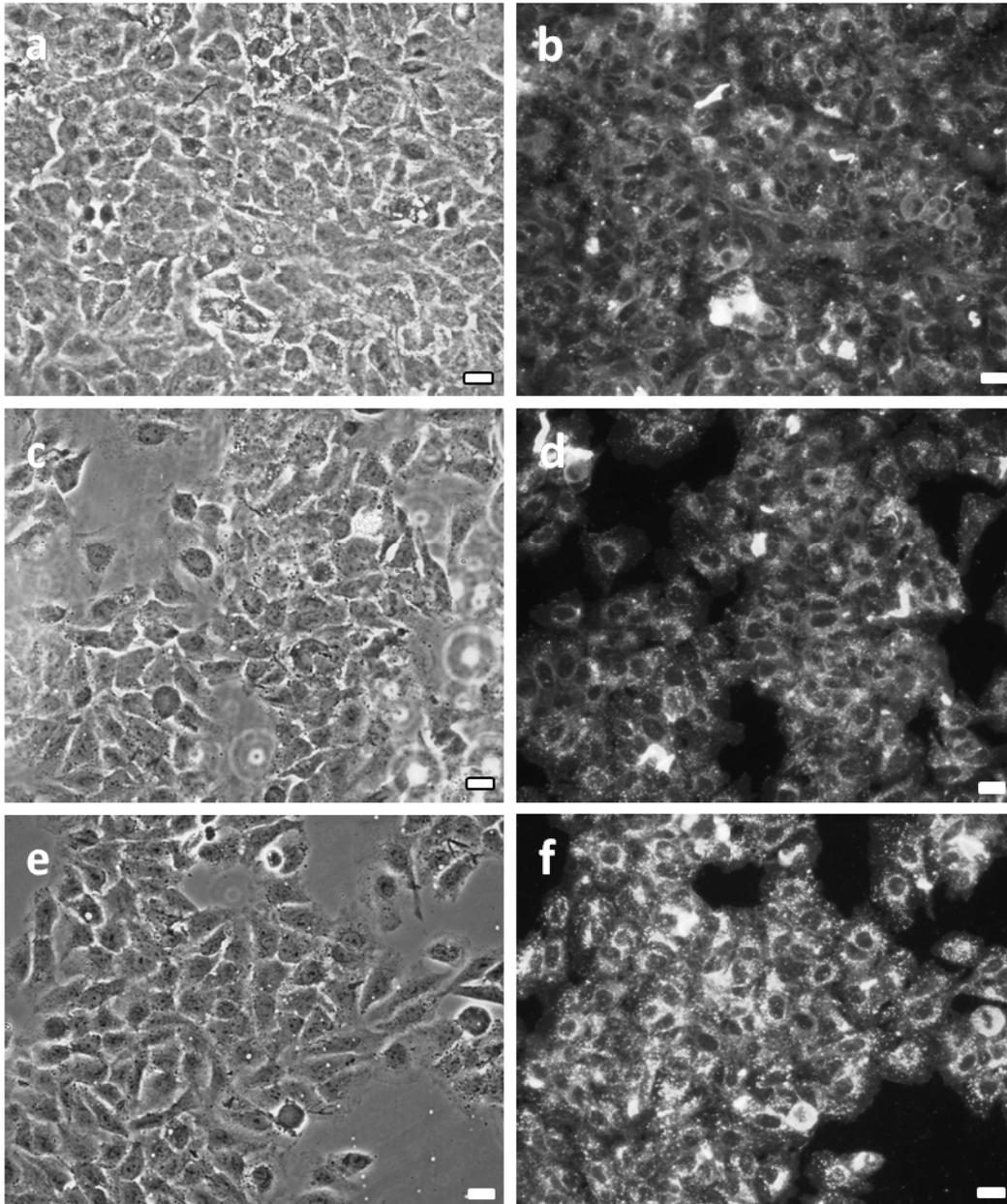


Figure 92 : Cinétique d'internalisation sur Huh-7 du HON<sup>Chol</sup> 3'-fluorescéine à 0,5 μM en microscopie optique et de fluorescence échelles : 10 μm. a,b) 1 h contraste de phase et fluorescence. c,d) 2 h contraste de phase et fluorescence. e,f) 4 h contraste de phase et fluorescence.

Un contrôle, réalisé avec un oligonucléotide non amphiphile marqué par la fluorescéine en 3' incubé pendant 24 heures sur des cellules Huh-7, atteste que la présence de la chaîne lipidique est nécessaire pour permettre l'internalisation (Figure 93).

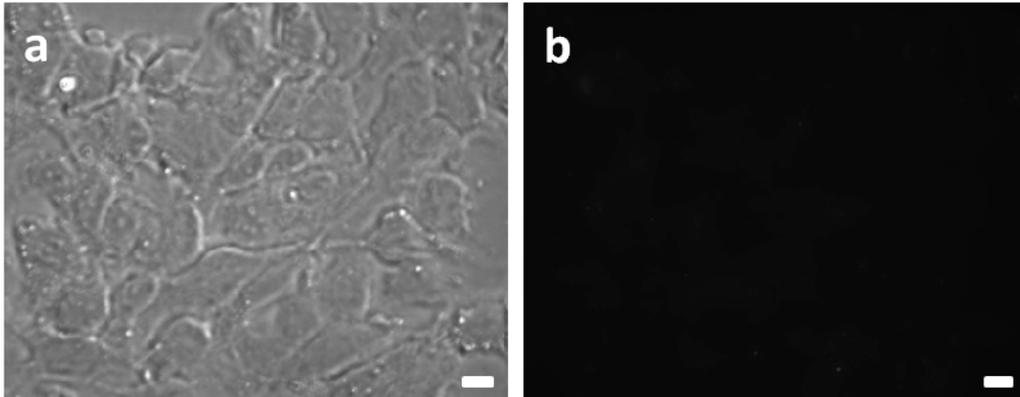


Figure 93 : Internalisation sur Huh-7 de l'oligonucléotide (ON) 3'-fluorescéine à 0,5  $\mu\text{M}$  en microscopie optique. 24 h contraste de phase échelle : 10  $\mu\text{m}$  (a) et fluorescence échelle : 10  $\mu\text{m}$ (b).

Nous avons voulu confirmer les observations faites en microscopie de fluorescence par cytométrie en flux sur des cellules Huh-7 mises en suspension après incubation en présence des ONAs et non fixées. Les données collectées en cytométrie de flux montrent une augmentation de la proportion de cellules marquées par le dérivé ONA<sup>C18</sup> au cours du temps. Le dérivé ONA<sup>chol</sup> marque 100 % des cellules après 1 heure seulement (Figure 94).

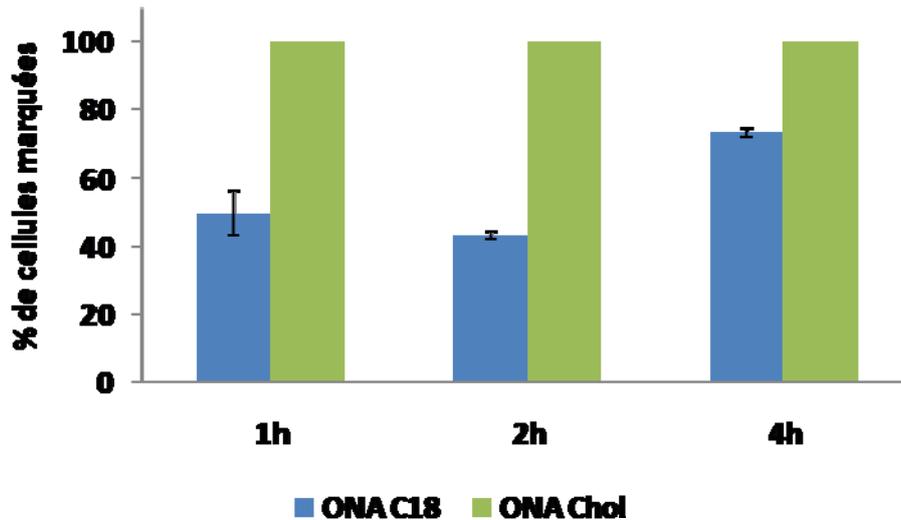


Figure 94 : Cinétique d'internalisation suivie par cytométrie en flux sur les composés ONA<sup>C18</sup> et ONA<sup>Chol</sup> à 37 °C (Concentration 0,5 µM).

Ces résultats de cytométrie en flux confirment la différence de cinétique d'internalisation précédemment observée en microscopie de fluorescence. Cette cinétique est dépendante de la nature du lipide fixé sur l'oligonucléotide. Une chaîne cholestérol permet l'internalisation de l'oligonucléotide dans 100 % des cellules en une heure alors que son équivalent octadécyléther nécessite 4 heures pour permettre une internalisation de l'oligonucléotide dans 75 % des cellules.

Le mécanisme d'internalisation des ONAs restant à définir, nous avons voulu savoir si cette internalisation était active ou passive. Pour cela des cinétiques d'internalisation des ONAs ont été réalisées à 4 °C, conditions dans lesquelles, seules les voies d'internalisation qui ne dépendent pas de l'énergie apportée par la cellule (comme la diffusion passive) sont possibles. Les résultats obtenus par cytométrie de flux sont présentés sur la Figure 95.

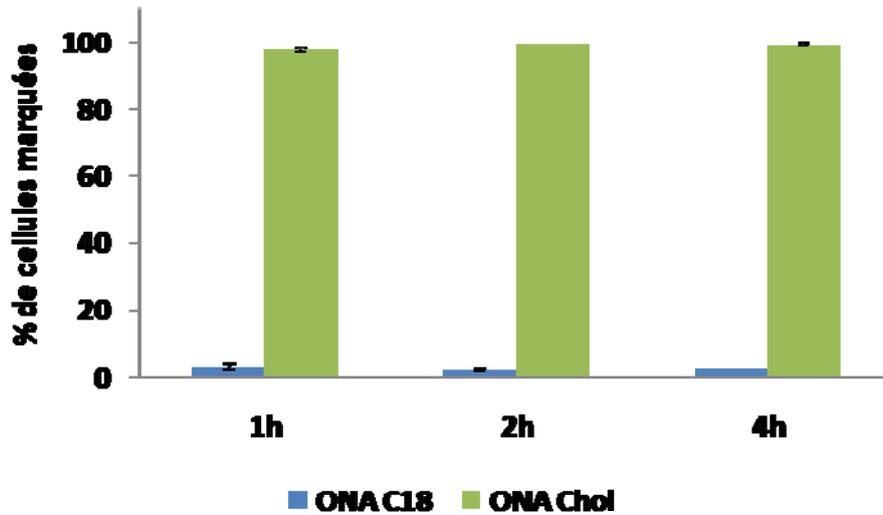


Figure 95: Cinétique d'internalisation suivie par cytométrie en flux sur les composés ONA<sup>C18</sup> et ONA<sup>Chol</sup> à 4 °C (Concentration 0,5 µM).

Le composé ONA<sup>C18</sup> ne marque pas les cellules à 4 °C même après une incubation de 4 heures. Par contre le composé ONA<sup>Chol</sup> marque 100 % des cellules après seulement une heure d'incubation à 4 °C de manière similaire à la cinétique obtenue à 37 °C. Ce résultat est surprenant et nous avons voulu savoir si l'oligonucléotide était bien internalisé. L'observation en microscopie de fluorescence de cellules (Huh-7) incubées à 4 °C en présence de ONA<sup>Chol</sup> (Figure 96) montrent un marquage membranaire : le ONA<sup>Chol</sup> est associé aux cellules mais il n'est pas internalisé en l'absence d'apport d'énergie.

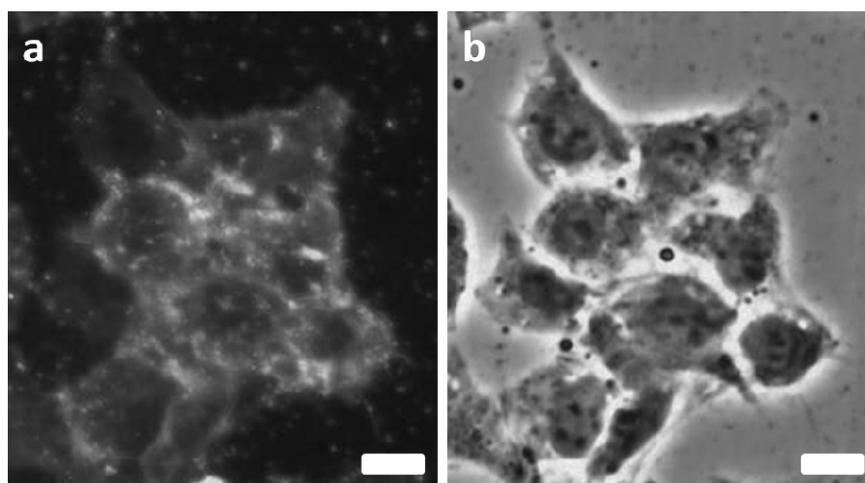


Figure 96 : Marquage de cellules Huh-7 après 4 heures d'incubation à 4 °C en présence d'ONA<sup>Chol</sup> 3' Fluorescéine à 0,5 µM. Contraste de phase échelle : 10 µm (a) et fluorescence échelle : 10 µm (b).

Cette observation met à nouveau en évidence la différence de comportement des ONAs sur cellules en fonction de leur structure lipidique. Les dérivés ONA<sup>C18</sup> ne sont que faiblement fixés dans la membrane alors que les dérivés ONA<sup>Chol</sup> constituent de véritables ancres lipidiques qui peuvent supporter plusieurs lavages sans être éliminées.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'internalisation mis en place pour l'entrée des ONAs dans les cellules, des études de co-marquage ont été initiées en collaboration avec l'équipe de Monsieur le docteur P. Midoux au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans.

Deux voies d'endocytose ont particulièrement été étudiées. (1) les internalisations par la voie des clathrines, (2) l'internalisation par la voie des radeaux lipidiques (Raft). Afin de différencier les deux types d'internalisation, le marquage d'organites intra cellulaires est nécessaire (cavéoles, endosomes précoces ou tardifs).

Les cavéoles sont des vésicules d'environ 50 nm de diamètre. Ces vésicules sont revêtues de protéines transmembranaires appelées cavéolines. Ces vésicules sont généralement riches en lipides (cholestérol). L'association lipide/cavéolines constitue les radeaux lipidiques (Raft). Le marquage des cavéolines permet la localisation des ONAs par rapport à cet organite.

Les endosomes sont des compartiments intra cellulaires provenant du processus d'endocytose. Les vésicules d'endocytose fusionnent pour former un compartiment de forme irrégulière appelé endosome précoce. Cet endosome précoce se transforme par la suite pour former un endosome tardif caractérisé par de nombreuses invaginations et vésicules internes. Par la suite les endosomes tardifs continuent d'évoluer pour former des lysosomes. Les endosomes présentent à leur surface différentes protéines, notamment les protéines de fusion EGFP Rab5 (endosomes précoces) et EGFP Rab7 (endosomes tardifs). Le marquage de ces protéines permet la localisation des ONAs par rapport à l'un ou l'autre de ces endosomes.

Le marquage de ces organites peut être soit issu d'une modification constitutive soit de l'expression d'un plasmide transfecté avant l'addition des ONAs. La présence d'une colocalisation avec les endosomes tardifs et précoces indiquerait une internalisation par la

voie des clathrines , tandis qu'une colocalisation avec les cavéoles serait révélatrice d'une internalisation par la voie des radeaux lipidiques.

- Internalisation de ONAs sur des cellules épithéliales (Hela) marquant les endosomes tardifs de manière constitutive (GTPase Rab7).

Les endosomes tardifs étant marqués en vert (EGFP, protéine fluorescente verte de la méduse), des ONAs portant une rhodamine en 3' ont été synthétisés au laboratoire (Figure 97).

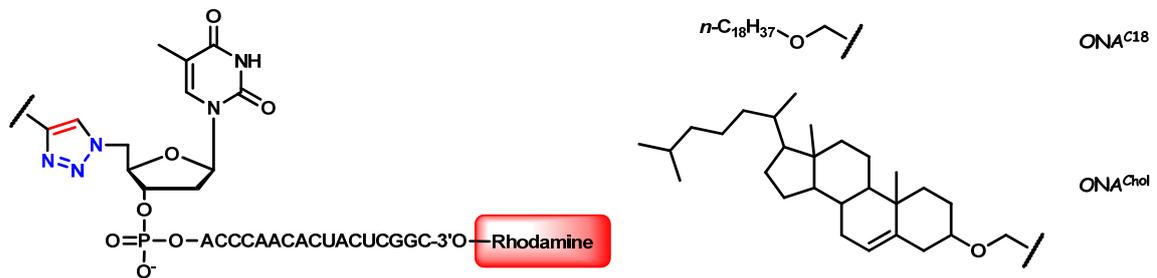


Figure 97: ONAs marqués en 3' par la rhodamine.

Les cellules sont incubées pendant 4 heures ou 24 heures en présence des ONAs et observées en microscopie confocale sans être fixées. Après 4 heures d'incubation, aucune colocalisation des ONAs (rouge) avec les endosomes tardifs (vert) n'est observée (Figure 98a). Après 24 heures, quelques zones de colocalisation peuvent être observées (Figure 98c). Toutefois, après 24 heures d'incubation, il y a des risques de confusion entre voies d'internalisation et d'élimination, cette colocalisation ne permet pas de tirer de conclusion sur la voie d'internalisation.

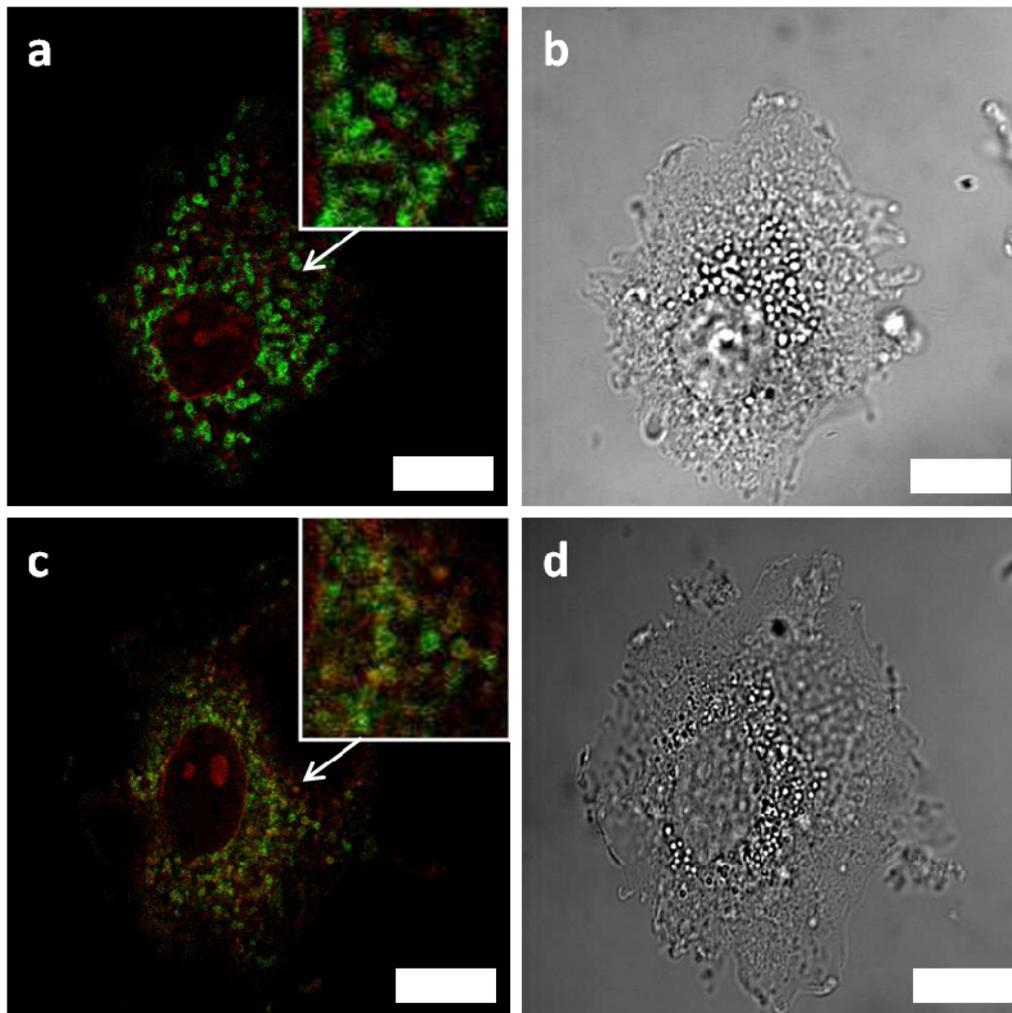


Figure 98 : Recherche de colocalisation de ONA<sup>chol</sup> 3'-rhodamine dans les endosomes tardifs sur cellules Hela échelles : 5  $\mu\text{m}$ . a,b) Fluorescence et contraste de phase après 4 heures d'incubation. c,d) Fluorescence et contraste de phase après 24 heures d'incubation. ONA<sup>chol</sup> (Rouge), endosomes tardifs (Vert), co-marquage (Jaune).

- Internalisation des ONAs sur des cellules Hela transfectées pour marquer les cavéoles (cavéoline).

Ces expériences ont été effectuées avec des ONAs 3'-fluoresceine sur des cellules Hela préalablement transfectées de manière transitoire par un plasmide rapporteur. Ce plasmide induit le marquage des cavéoles en rouge (RFP, protéine fluorescente rouge de la méduse). Le plasmide est transfecté au moyen d'un agent de transfection de type polymère cationique développé par l'équipe de Monsieur le docteur P. Midoux. L'observation en microscopie confocale n'a pas permis de mettre en évidence une colocalisation des ONAs

avec les cavéoles quel que soit le temps d'incubation. En effet les cellules étaient marquées soit par les ONAs soit par le rapporteur, mais jamais par les deux (Figure 99).

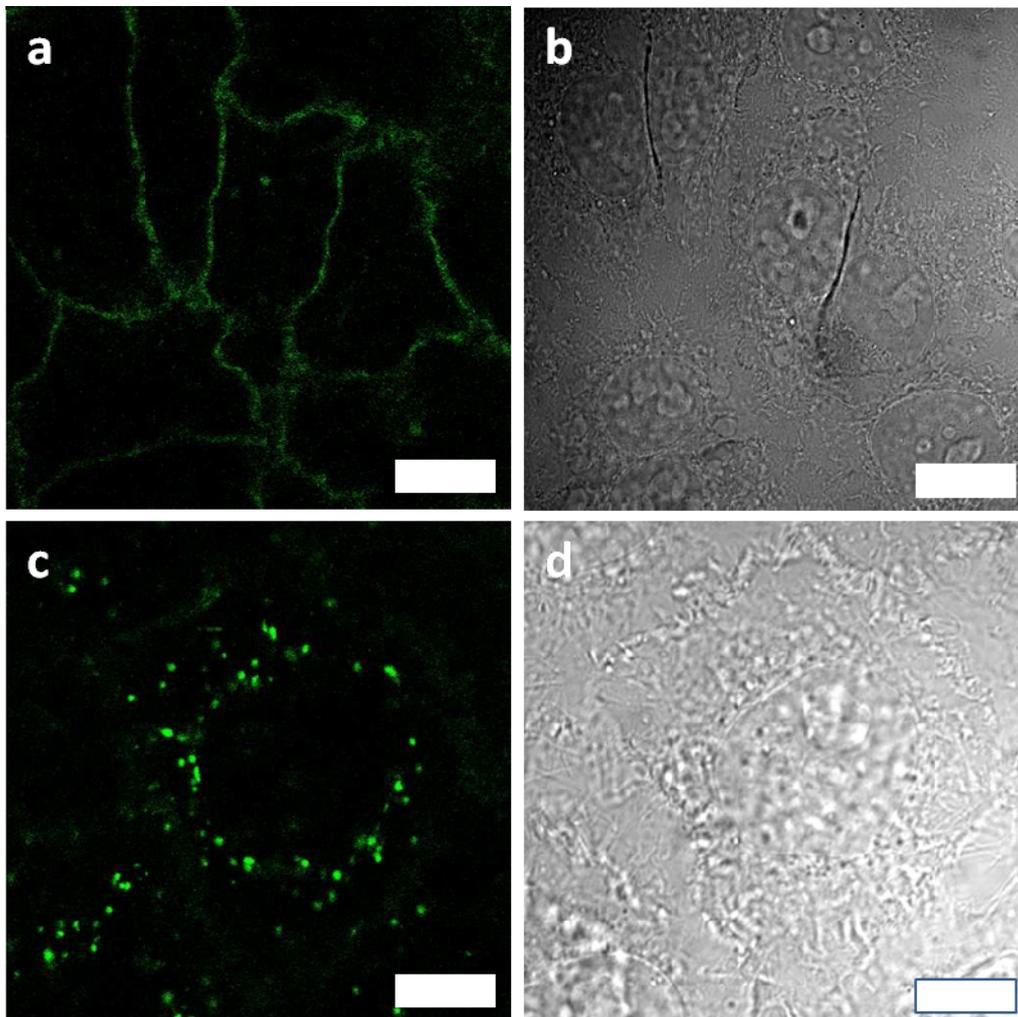


Figure 99 : Marquage observé pour ONA<sup>Chol</sup> 3'-fluorescéine sur des cellules Hela, échelles 5  $\mu$ m, a,b) après 4 heures, c,d) après 24 heures d'incubation.

Après 4 heures d'incubation seules les membranes plasmiques des cellules étaient marquées par les ONA<sup>Chol</sup>. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'internalisation.

La première serait une incompatibilité des ONAs polyanioniques avec l'agent de transfection polycationique. Pour vérifier cette hypothèse, des tests d'internalisation ont été réalisés avec les ONAs sur des cellules Hela non marquées (blanches). Les images de microscopie collectées montrent une accumulation des ONAs sur la membrane extérieure

des cellules, mais une faible internalisation (Figure 100). La faible transfection ne serait donc pas liée à une incompatibilité avec le polymère cationique.

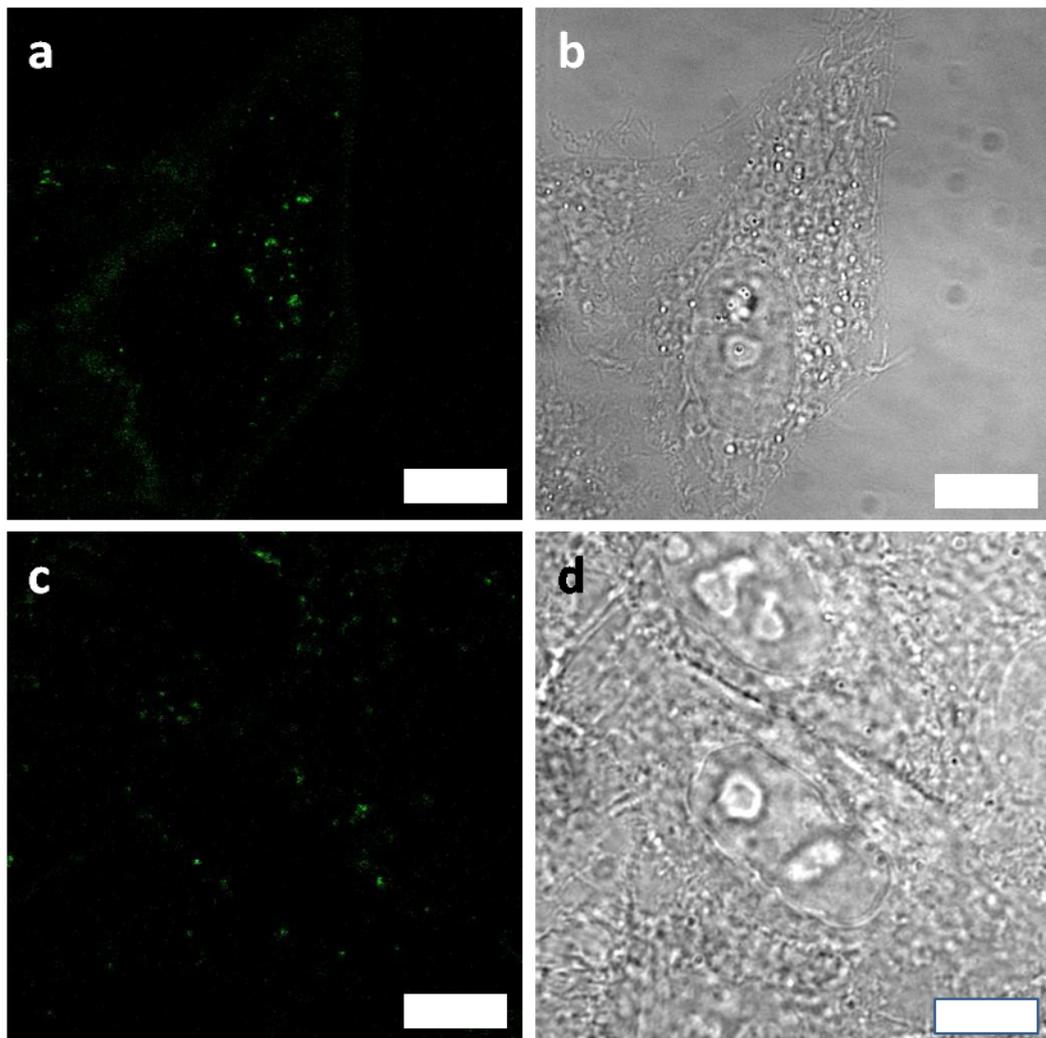


Figure 100 : Images de microscopie confocale sur cellules Hela après 4 heures d'incubation échelles 5  $\mu\text{m}$ . a,b)  $\text{ONA}^{\text{Chol}}$  3'-fluorescéine. c,d)  $\text{ONA}^{\text{C18}}$  3'-fluorescéine.

La seconde hypothèse serait que les ONAs se fixent dans la membrane plasmique et ne seraient internalisés que lors de la fixation des cellules. L'internalisation, observée précédemment sur Huh-7, ne serait donc pas liée au lipide mais seulement à la perméabilisation de la cellule lors de la fixation. L'absence de marquage des cellules Huh-7, par le  $\text{ONA}^{\text{C18}}$ , observé par cytométrie en flux après incubation à 4 °C contredit cette hypothèse. Il semble que le lavage des cellules permet d'éliminer les  $\text{ONA}^{\text{C18}}$  fixés à la surface des cellules. A l'opposé la cytométrie effectuée sur le  $\text{ONA}^{\text{Chol}}$  semble cohérente avec cette hypothèse. Pour vérifier que l'internalisation observée précédemment n'est pas un

simple artéfact lié à l'entrée des ONAs lors de la fixation, une nouvelle famille de ONAs a été synthétisée (Figure 101).

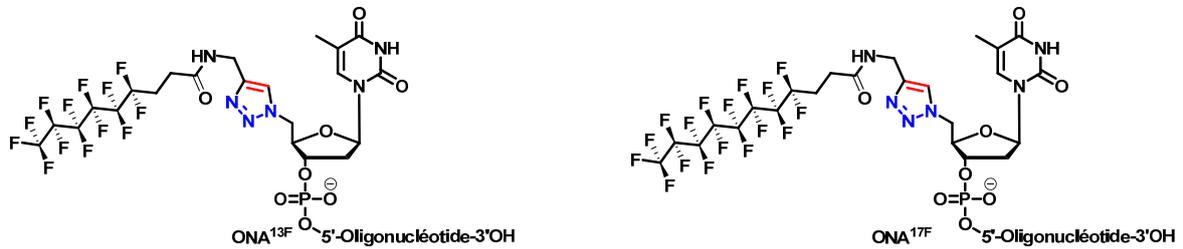


Figure 101 :  $\text{ONA}^{13\text{F}}$  et  $\text{ONA}^{17\text{F}}$ .

Ces ONAs présentent une chaîne fluorocarbure. Cette chaîne présente la particularité d'être hydrophobe et lipophobe. Cette lipophobie ne permet pas au  $\text{ONA}^{13\text{F}}$  et  $\text{ONA}^{17\text{F}}$  de se ficher dans une membrane lipidique. Ils seront éliminés lors des lavages par le PBS et ne pourront être présents lors de la fixation que si ils ont déjà été internalisés. Cette internalisation a été observée en microscopie de fluorescence conventionnelle (Figure 102) et confocale.

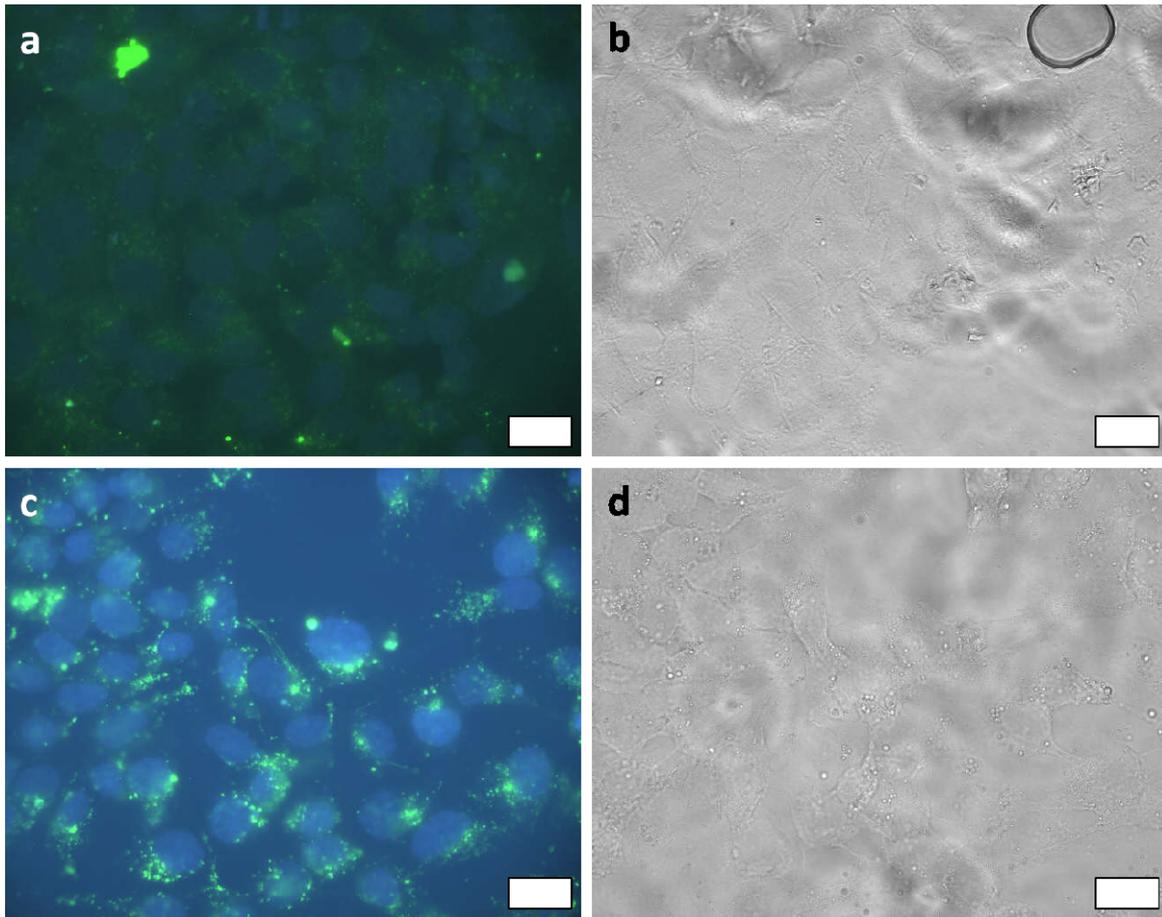


Figure 102 : Internalisation de ONA<sup>17F</sup> 3'-fluorescéine dans des cellules Huh-7 échelles : 10  $\mu$ m, ONA en vert et Dapi en bleu. Incubation 2 h à 0,5  $\mu$ M a) fluorescence, b) contraste de phase. Incubation 24 h c) fluorescence, d) contraste de phase.

Ce marquage a également pu être quantifié par cytométrie en flux. Les composés ONA<sup>13F</sup> et ONA<sup>17F</sup> sont internalisés plus lentement que les ONA<sup>C18</sup> et ONA<sup>Chol</sup>. Le plus efficace à être internalisé, ONA<sup>17F</sup>, marque 40 % de cellules après 4 heures d'incubation et 90 % à 24 heures (Figure 103).

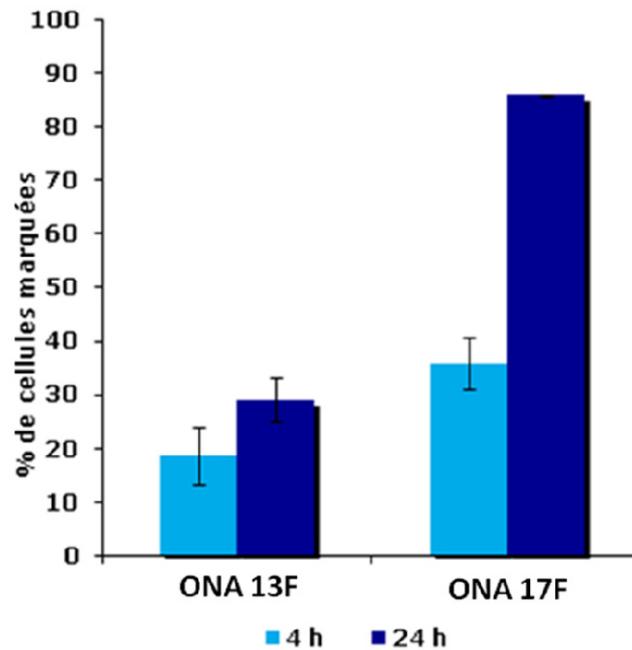


Figure 103 : Marquages des cellules Huh-7 par les composés ONA<sup>13F</sup> et ONA<sup>17F</sup> observés par cytométrie en flux.

Le comportement des ONA<sup>13F</sup> et ONA<sup>17F</sup> pourrait être expliqué par des échanges internalisation/élimination rapides. Une autre hypothèse serait que les ONAs ne sont que faiblement capables de rentrer dans les cellules Hela. Des études ont été réalisées pour étendre l'internalisation des ONAs à différents types cellulaires (Figure 104) : cellules de carcinome hépatocellulaire humain (Huh-7), cellules immunitaires non adhérentes (lymphocytes Jurkat), cellules gastriques (AGS, NCI), cellules épithéliales (Hela T4). L'observation de l'internalisation a été réalisée par microscopie de fluorescence conventionnelle et confocale. L'estimation de la fraction de cellules marquées a été réalisée par cytométrie en flux et a révélé qu'après 24 heures d'incubation près de 100 % de cellules sont marquées quel que soit l'ONA étudié et pour tous les types cellulaires testés.

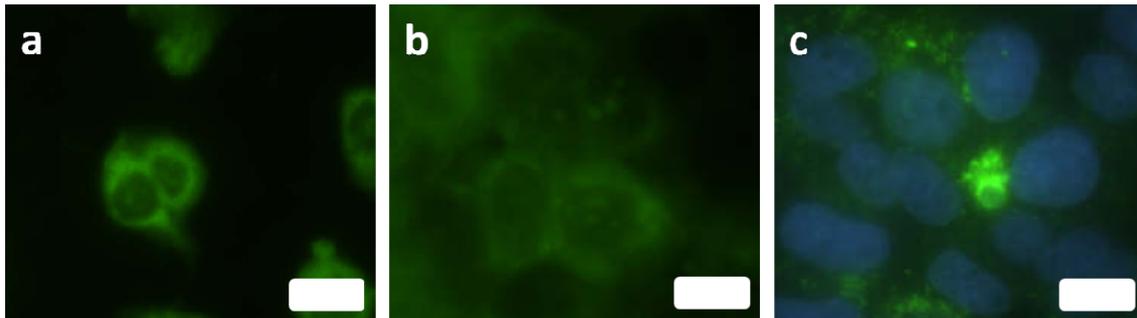


Figure 104 : Marquage par ONA<sup>C18</sup> 3'-fluorescéine (vert) de différents types cellulaires après 24 heures d'incubation à 0,5  $\mu$ M, échelles : 10  $\mu$ m. a) sur des cellules AGS, b) sur des cellules NCI, c) ONA<sup>Chol</sup> sur des cellules Huh-7, le noyau est coloré au Dapi (bleu).

## V.5 Application biologique

L'internalisation des ONAs ayant été mise en évidence sur des cellules hépatiques, nous avons voulu tester leur capacité à réguler une cible d'intérêt thérapeutique, telle que l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC).

### V.5.1 Généralité sur le VHC<sup>138</sup>

Le virus de l'hépatite C a été découvert au milieu des années 1970 par l'équipe de Feinstone<sup>139</sup>. Il avait originellement été décrit comme le virus d'une hépatite non A et non B (HNANB). Ce n'est qu'en 1989 que l'équipe de Houghton parvient à conclure que l'agent étiologique des HNANB était un virus contenant un génome ARN simple brin de polarité positive qu'il rebaptise virus de l'hépatite C (VHC)<sup>140</sup>.

#### - Épidémiologie

On estime qu'environ 3 % de la population mondiale, soit plus de 170 millions d'individus, sont infectés par le VHC<sup>141</sup>. Les prévalences des infections par le VHC sont très variables suivant les régions du monde. Les pays ayant les taux de prévalence les plus élevés (près de 10 %) se trouvent en Afrique et en Asie. Les nations industrialisées d'Amérique du nord, d'Europe du nord et de l'ouest et l'Australie ont les prévalences les plus faibles, proche de 1 %. Le pays le plus touché est selon toute vraisemblance l'Égypte où le taux de prévalence avoisine les 22 %<sup>142,143</sup>.

En Europe, il existe un gradient nord-sud de la prévalence du virus, allant de 0,5 % dans les pays du nord, à près de 2 % dans les pays bordant la Méditerranée. Certains pays d'Europe de l'est sont particulièrement touchés, avec jusqu'à 3 à 4 % de prévalence en Roumanie. En France, la prévalence se situe à un taux intermédiaire, évaluée à 1,1 % chez les adultes. Il a été admis en 2002 que 500 000 à 650 000 adultes exprimaient des anticorps anti-VHC. 80 % de ces sujets étant virémiques, il a été estimé que 400 000 à 500 000 personnes étaient chroniquement infectées par le VHC en France. Mais seulement 40 % à 50 % des sujets chroniquement infectés sont avertis de leur infection<sup>144</sup>.

Les principales voies de transmission sont par voie sanguine, soit de manière directe (transfusion), soit indirecte (matériel médical, seringue...). La contamination par transfusion de sang ou de produits dérivés du sang a été le mode majeur de transmission jusqu'en 1990. Mais cette source de contamination a presque totalement disparu en 1991 avec le dépistage des donneurs de sang, associé à l'inactivation virale des produits dérivés du sang<sup>142</sup>. Actuellement la plus grande source de contamination sanguine est la toxicomanie.

Il est à noter que si ces modes de transmission sont les plus courants, de nombreux modes de contamination (dont la transmission par voie vénérienne) ont été mis en évidence et environ 20 % des causes des contaminations restent actuellement d'origine inconnue.

- Évolution et complications de l'hépatite C.

L'évolution de l'hépatite C au carcinome hépatique est résumée Figure 105. Les étapes de la maladie ont été bien définies, depuis l'hépatite aiguë au carcinome hépatocellulaire, mais elles restent actuellement mal comprises. Cette évolution dure de 10 à 30 ans et peut être influencée par différents facteurs aggravant la maladie<sup>145</sup>.

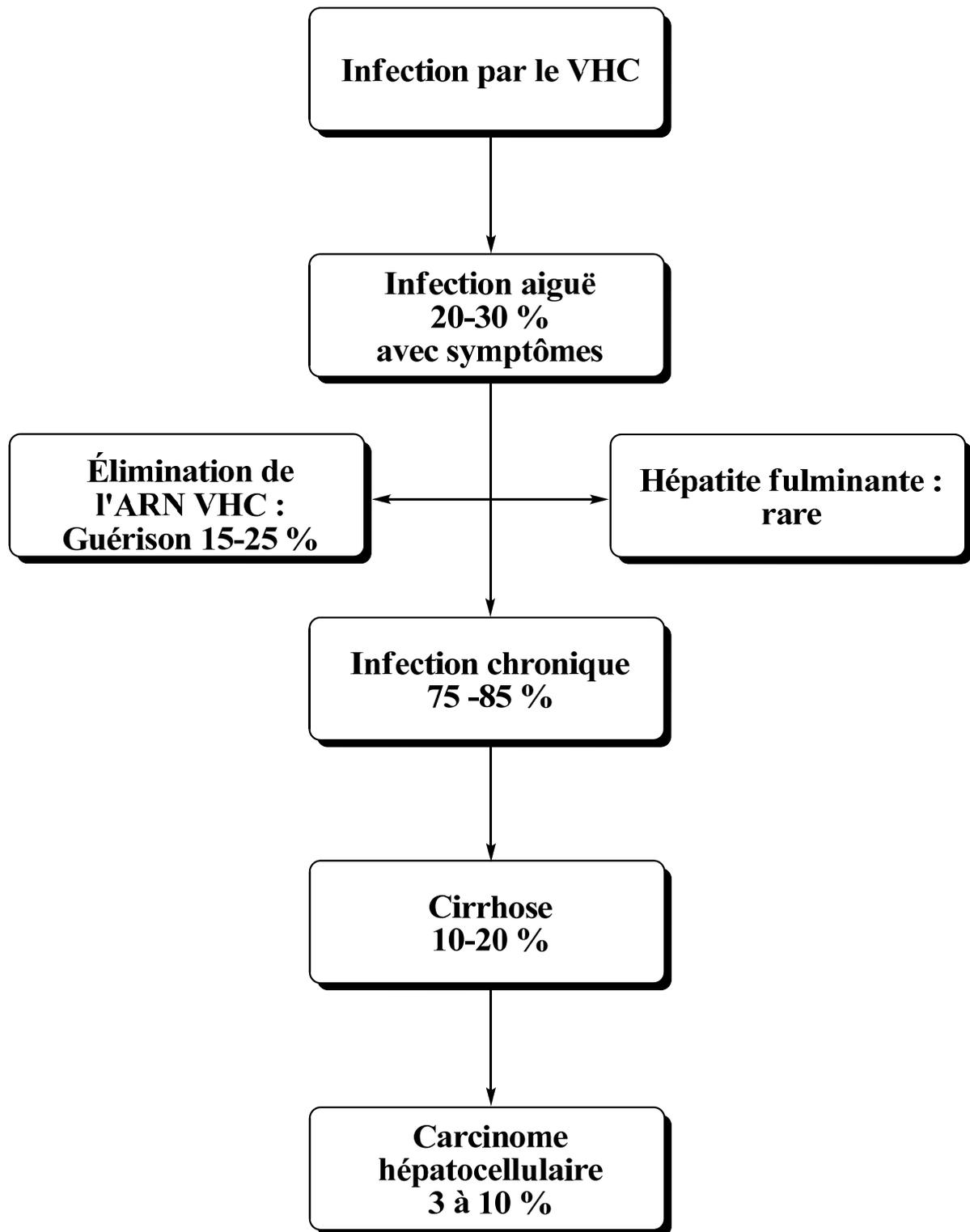


Figure 105 : Évolution de l'infection par le virus de l'hépatite C.

Après contamination et avant de provoquer une infection aiguë, la période d'incubation du VHC est de 2 à 12 semaines. Lors de l'infection aiguë, les symptômes les plus courants sont la fatigue, la perte d'appétit, la fièvre, des nausées, un état grippal et un

ictère, mais dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique. Des cas d'hépatite C fulminante, mortelle, caractérisée par une détérioration rapide des fonctions du foie due à une nécrose hépatique massive, ont été décrits. Ils restent très rares<sup>146,147</sup>. Après une infection aiguë, 75-80 % des malades développent une infection chronique, caractérisée par la persistance de l'ARN du VHC dans le sang, 6 mois après le début de l'infection aiguë. L'évolution de cette infection chronique est généralement plus rapide chez les malades âgés, chez les hommes et chez les personnes immunodéprimées.

10-20 % des hépatites C chroniques évoluent en cirrhose par une hypertension portale ou une insuffisance hépatique. Chaque année, chez 3 à 10 % des patients la cirrhose évolue en carcinome hépatocellulaire. La cirrhose, l'hypertension portale, l'insuffisance hépatique ou le carcinome hépatocellulaire aboutissent au décès des patients dans 2 à 5 % des cas.

- Structure du génome viral et choix de la cible.

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire linéaire, de polarité positive, d'environ 9,6 kb. Il est vraisemblablement très structuré dans le cytoplasme des cellules infectées, ainsi que dans les particules virales. Il comprend trois régions distinctes, de 5' en 3' : la région 5' non codante, le cadre ouvert de lecture et la région 3' non codante (Figure 106).

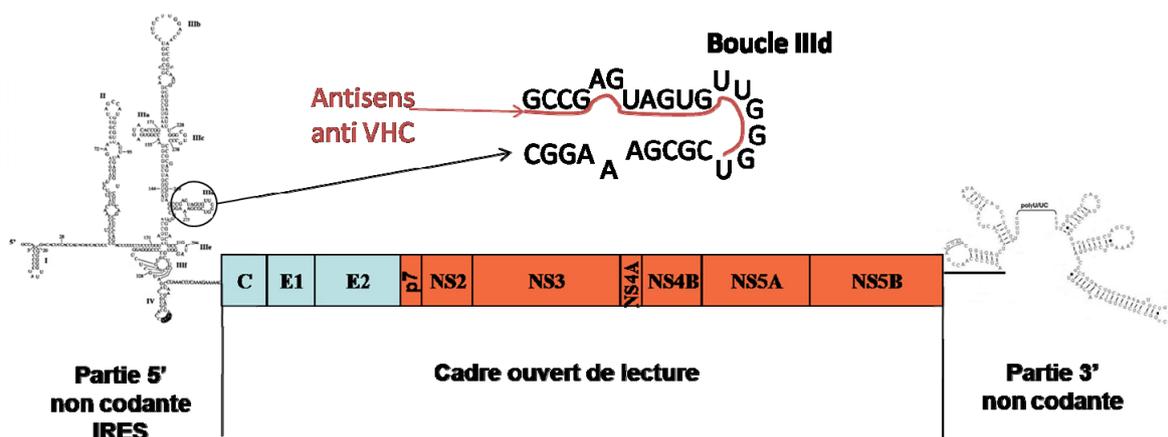


Figure 106 : Organisation génomique du VHC et séquence ciblée.

La partie 5' non codante du génome du VHC est très structurée et présente de multiples motifs tiges-boucles. Elle correspond à la partie la plus conservée du génome viral

parmi les différents génotypes (92 % d'homologie)<sup>148</sup>. La région 5' non codante ne comprend pas de coiffe en 5', mais est constituée de 4 domaines formés de 4 tiges-boucles très stables (domaine I, II, III et IV) et d'un pseudo-nœud. Les domaines II à IV et le pseudo-nœud associés aux 40 premiers nucléotides du cadre ouvert de lecture constituent un site interne d'entrée des ribosomes (IRES)<sup>149,150,151</sup>.

Le domaine I contient une petite tige-boucle, le II correspond une à tige-boucle imparfaite de plus grande dimension. Le domaine III forme la plus grande structure de la partie 5' non codante, avec 6 sous-domaines définis de a à f, chacun étant essentiel pour le bon fonctionnement de l'IRES et donc pour la traduction de l'ARN viral<sup>152</sup>. Leurs séquences sont extrêmement conservées parmi les différents génotypes, tel le triplet GGG localisé dans la boucle apicale IIIId et la tétraboucle dans le sous domaine IIIe<sup>153</sup>.

L'ARN du HCV est particulièrement localisé dans le cytoplasme, ce qui en fait une cible adaptée pour les ONAs développés dans cette étude. La structure IRES présente en 5' de cet ARN est particulièrement indiquée, car toute modification ou toute fixation d'un antagoniste bloquerait l'ensemble de la traduction de l'ARN viral.

La séquence choisie comme cible est la séquence de la boucle d du domaine III<sup>137</sup>. Cette séquence : CGGCUCAUCAACCCA, couvre le triplet de G décrit précédemment comme indispensable à la traduction. L'application thérapeutique de nos ONAs s'inscrit donc dans une stratégie antisens (Figure 106). Notre oligonucléotide amphiphile devra entrer spontanément dans la cellule et interagir avec la boucle IIIId empêchant ainsi la fixation du ribosome et la traduction de l'ARN viral.

### **V.5.2 Test p-irf, principe**

Afin de mettre en évidence l'activité antisens liée aux ONAs, un test sur cellule a été mis en place au laboratoire. Ce test fait appel à un ARN rapporteur de type p-irf (P\_lasmid, IRES, R\_enilla, F\_irefly) (Figure 107).

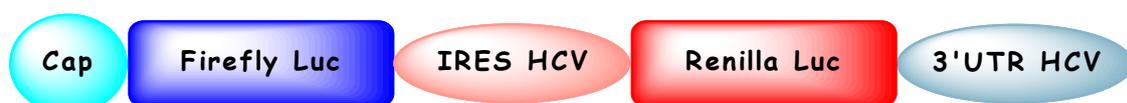


Figure 107 : Structure de l'ARN p-irf.

Il s'agit d'un ARN bicistronique qui présente le gène de la luciférase Firefly dont la traduction dépend d'une coiffe (ou « cap » structure permettant entre autre le recrutement des ribosomes) et le gène de la luciférase Renilla sous la dépendance de l'IRES du HCV. Après ajout de leurs substrats respectifs dans un lysat cellulaire, l'activité liée aux deux luciférases peut être évaluée par luminométrie. On peut évaluer l'évolution de l'activité de la renilla luciférase sous la dépendance de l'IRES régulée par l'ONA par rapport à celle de la luciférase Firefly (référence interne) (Figure 108).

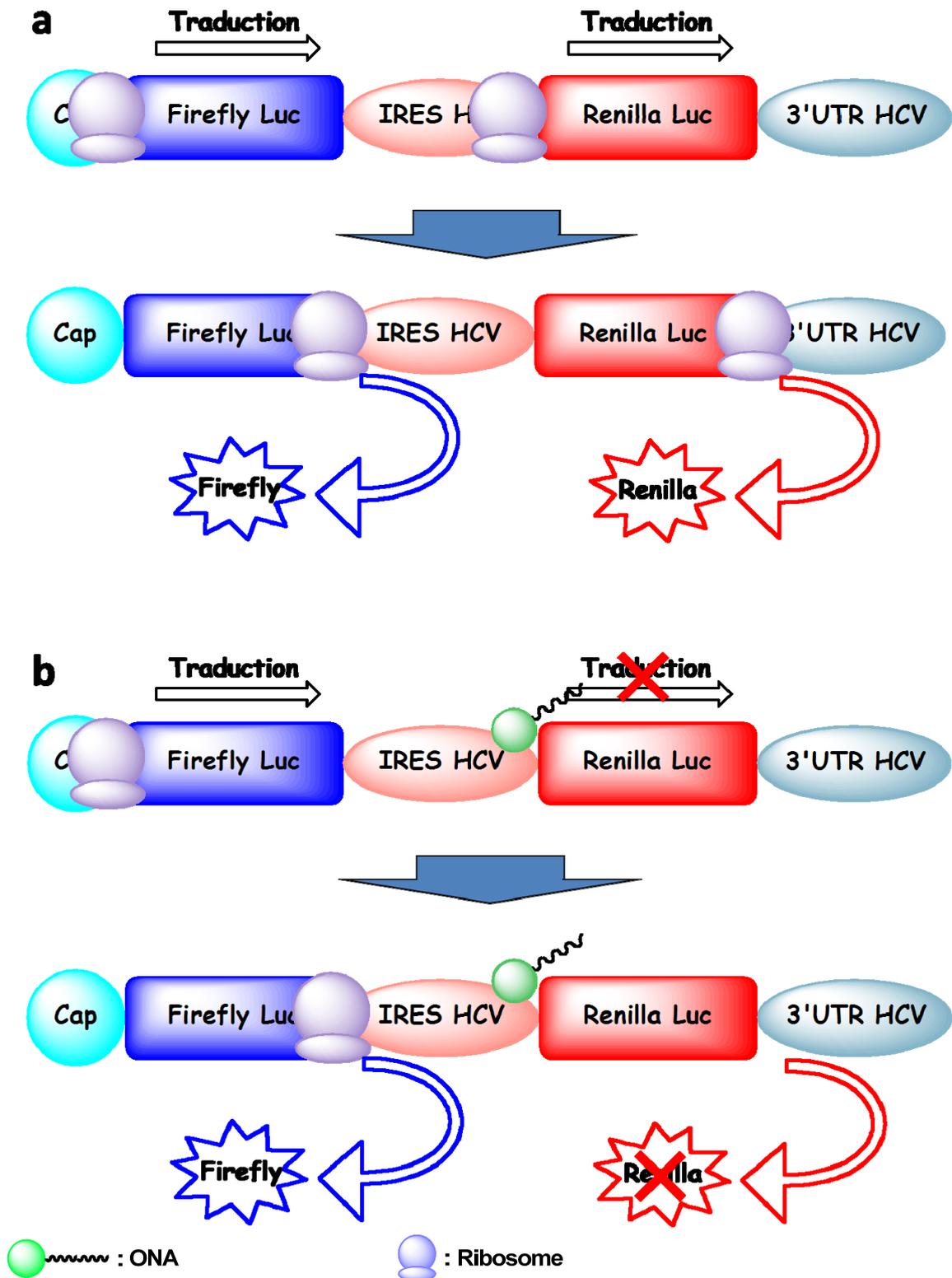


Figure 108 : Test p-Irf. a) En absence de ONA, les ribosomes se fixent au niveau de la coiffe (Cap) et de l'IRES. Les deux luciférases (Firefly et Renilla) sont produites. b) Le ONA s'est fixé sur la boucle IIIId de l'IRES. Seule la coiffe (Cap) a pu être reconnue par le ribosome. Seule la luciférase Firefly est produite.

### V.5.3 Résultats obtenus *in cellulo*

Pour réaliser ces expériences, les ONAs dérivés de la séquence anti VHC ont été synthétisés : 3'HO- CGGCUCAUCAACCCA-5'T<sup>modifié</sup> (5'T<sup>modifié</sup> : nucléotide modifié porteur de la structure lipidique). Afin de disposer d'un contrôle négatif une séquence présentant plusieurs mésappariements et ne pouvant pas reconnaître la cible est également synthétisée : cet oligonucléotide est appelé ONAmismatch (ONA<sup>mm</sup>) et présente une structure lipidique de type octadécyle. Afin d'augmenter la résistance des ONAs aux nucléases et d'augmenter leur affinité pour la cible, tous les ONAs sont synthétisés en chimie 2'OMe.

#### V.5.3.1 Cytotoxicité

Avant de pouvoir observer l'activité d'inhibition des ONAs, il importe de connaître leur toxicité. Pour cela les ONA<sup>C18</sup>, ONA<sup>Chol</sup> et ONA<sup>mm</sup> ont été incubés pendant 4 jours (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) en présence de cellules Huh-7 et à différentes concentrations. Ces études n'ont pas permis de mettre en évidence de toxicité significative dans la gamme des concentrations testées (Figure 109).

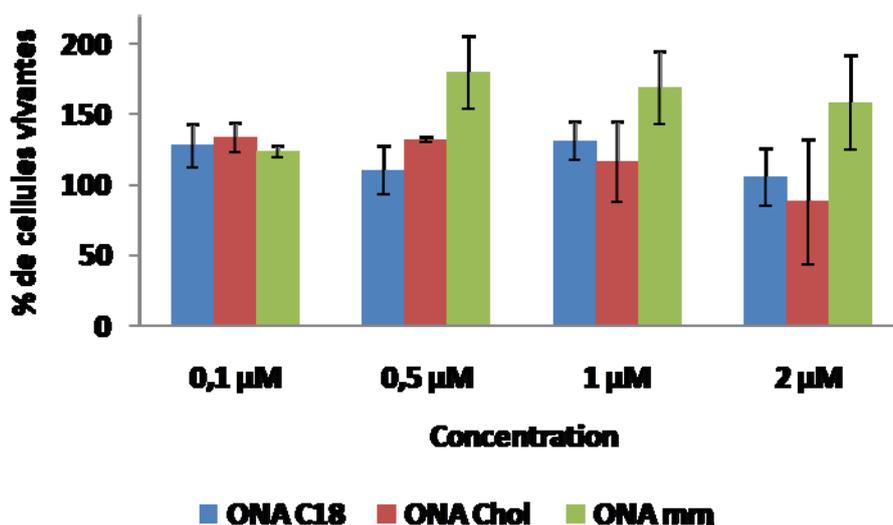


Figure 109 : Pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en ONA.

### V.5.3.2 Traduction dépendant de l'IRES du VHC

Après incubation des cellules avec les ONAs dans le milieu de culture complet et plusieurs lavages. L'ARN rapporteur est transfecté au moyen d'un agent de transfection commercial de type lipide cationique formulé en liposome comme le DMRIE-C (bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxy-éthyl ammonium). La transfection du rapporteur se fait en absence de sérum pendant 16 heures. Les cellules sont alors lavées par du PBS puis lysées. Les activités des luciférases sont successivement mesurées par luminométrie sur le même lysat cellulaire en présence de leurs substrats. (Figure 110).

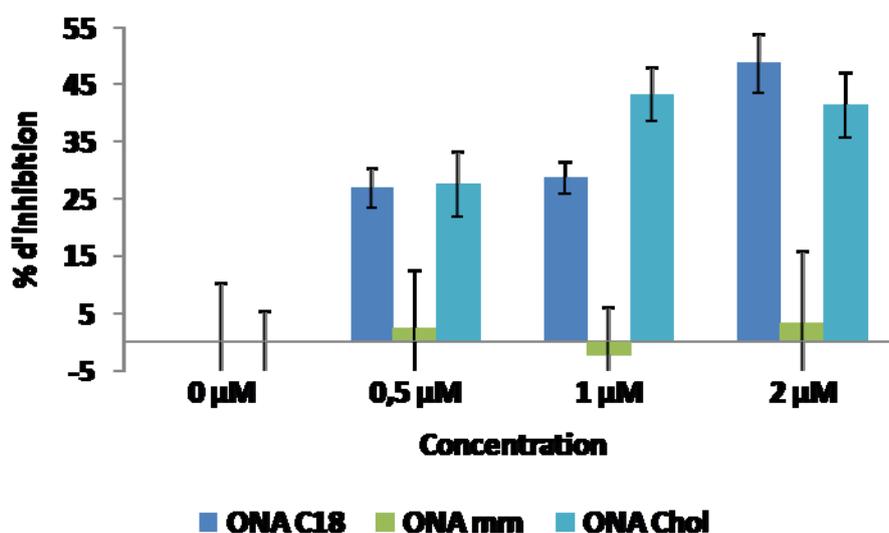


Figure 110 : Pourcentage d'inhibition de l'activité dépendant de l'IRES en fonction de la concentration en ONA (4 h).

Les résultats de l'activité relative de renilla luciférase en présence de quantité croissante d'ONA à 4 et 24 heures indiquent clairement une inhibition de l'activité dépendant de l'IRES. Cet effet est dépendant de la dose et spécifique à la séquence car le ONA<sup>mm</sup> n'induit pas d'inhibition de l'activité dépendant de l'IRES. Les ONA<sup>C18</sup> et ONA<sup>Chol</sup> induisent une inhibition de 40 à 50 % de l'activité IRES dépendante. La comparaison des inhibitions observées à différentes concentrations et pour les deux lipides ne permet pas de mettre en évidence de différences d'inhibition de l'activité IRES dépendante. Des études réalisées sur une gamme étendue de concentrations en ONAs à permis de mettre en évidence une inhibition maximale de 45 % pour une concentration de 2 μM. Le contrôle

réalisé en transfectant la séquence anti VHC au moyen d'un agent de transfection commercial (DMRIE-C) permet d'inhiber près de 60 % de l'activité dépendant de l'IRES.

Afin d'augmenter l'inhibition associée aux ONAs, différentes options ont été explorées. (1) L'ajout d'un lipide pouvant servir de co-transfectant. (2) L'utilisation d'une chimie d'oligonucléotide augmentant l'affinité des ONAs pour leur cible comme par exemple les LNAs (locked nucleic acids).

#### V.5.3.3 Ajout d'un co-transfectant

Les ONAs sont formulés avec des liposomes de DOPC. Les liposomes sont préparés par extrusion à 50 nm. Les conditions d'incubation et de lecture sont les mêmes que pour le test précédemment décrit. Les résultats observés ne permettent pas de conclure à une amélioration de l'activité. L'inhibition observée pour la co-formulation étant de l'ordre de 30 à 35 %, on peut même observer une diminution de l'activité des ONAs non formulés dont l'activité est de 45 % (Figure 111).

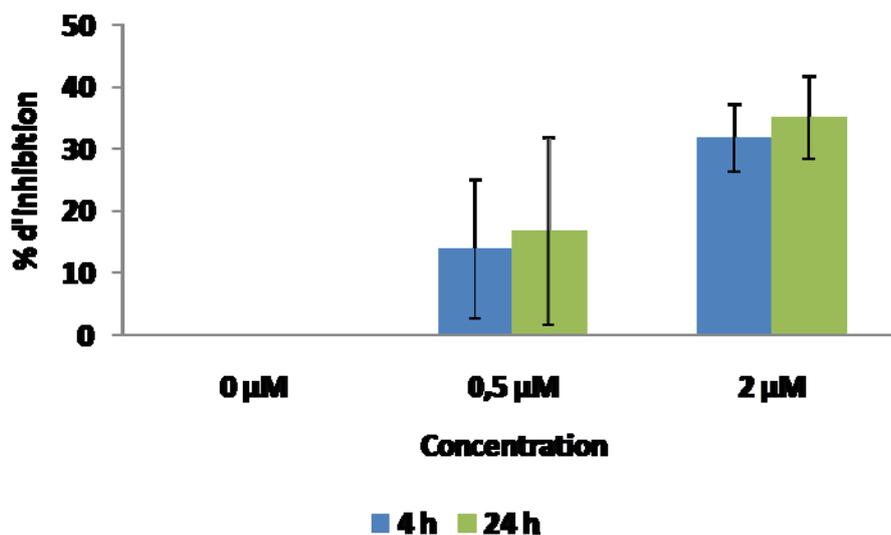


Figure 111 : Inhibition de l'activité IRES dépendante en fonction de la concentration de ONA<sup>C18</sup> formulé avec des liposomes de DOPC.

#### V.5.3.4 Changement de la chimie de l'oligonucléotide

Afin d'augmenter l'activité observée pour les ONAs, la chimie de la séquence a été modifiée. La chimie des Locked Nucleic Acids (LNA) étant connue comme induisant une augmentation significative de l'affinité<sup>154,155</sup>, cette dernière a été retenue. Un nouvel ONA présentant une séquence mixte LNA/2'OMe a été synthétisé. La séquence ne peut pas être totalement LNA car une trop forte augmentation de l'affinité induit une diminution de la spécificité (les nucléotides LNA apparaissent soulignés dans les séquences ci-après). Pour cette même raison, la séquence a été réduite à 14 nucléotides : 3'HO-TCACAACCCAGCGC-T<sup>Chol</sup>, une séquence mismatch a également été synthétisée : 3'HO-TCACAACCCCGCGCT<sup>Chol</sup>. Le test se déroule dans les mêmes conditions que pour les tests précédents et donne les résultats présentés dans le graphique Figure 112.

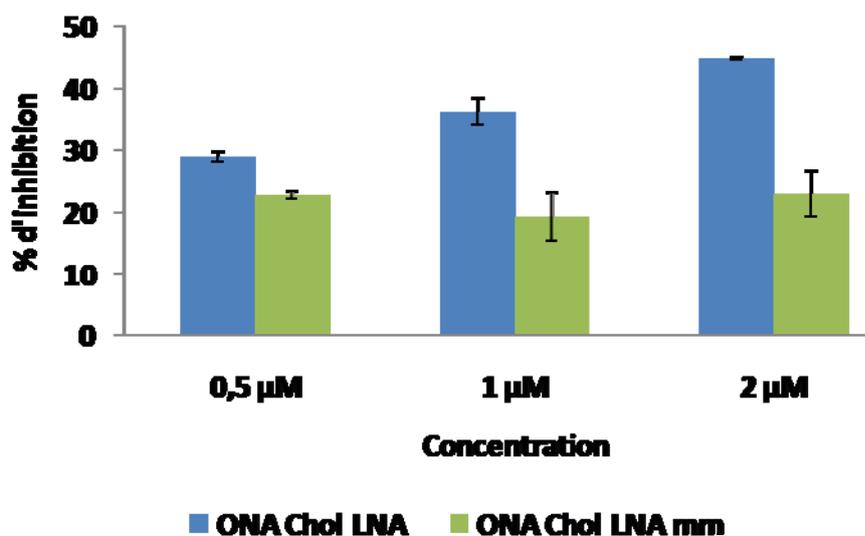


Figure 112 : Inhibition de l'activité IRES dépendante en fonction de la concentration en ONA.

La modification de la chimie de l'oligonucléotide n'améliore pas l'activité d'inhibition de la séquence spécifique. En revanche, on peut noter une nette augmentation de l'inhibition liée à la séquence mismatch. Cette inhibition non spécifique reste significativement plus faible que celle observée pour la séquence spécifique à 2 μM mais elle ne peut plus être négligée.

Ces deux études d'internalisation réunies expliqueraient en partie la limitation de l'activité des ONAs. L'inhibition limitée observée montre que toutes les molécules ONAs disponibles interagissent déjà avec leur cible. La diminution de l'inhibition de l'activité IRES dépendante observée en présence de DOPC semble indiquer qu'en présence de structures lipidiques capables de piéger les ONAs, l'activité liée à ces derniers est affectée. On peut émettre l'hypothèse que la limitation d'activité n'est liée, ni à la quantité d'agent transfecté, ni à l'affinité de la séquence. Cette activité serait dépendante de la disponibilité intracellulaire des ONAs.

## V.6 Conclusion (2)

Dans ce travail, deux nouvelles voies de synthèse complémentaires ont été décrites. La voie *ante* destinée à la production et la voie *post* destinée à l'investigation. Ces voies de synthèse nous ont permis de développer une nouvelle famille d'oligonucléotides amphiphiles, les ONAs. Cette famille présente une grande variété de structures hydrophobes comme par exemple des acides et alcools gras, des stéroïdes, des terpénoïdes ou encore des dérivés fluorocarbures. Les premières investigations menées sur les propriétés d'auto-organisation ont permis de mettre en évidence la formation de particules à des concentrations inférieures à 100  $\mu$ M. Les propriétés de transfection associées aux ONAs ont été observées sur une grande variété de types cellulaires : des cellules gastriques (AGS, NCI) aux cellules épithéliales (Hela T4) en passant par les cellules hépatiques (Huh-7) et des lymphocytes (Jurkat). Les premières expériences réalisées pour élucider l'internalisation des ONAs ont permis de mettre en évidence un mécanisme d'internalisation énergie dépendant. Les observations de colocalisations n'ont toutefois pas permis d'identifier de mécanisme préférentiel d'endocytose. L'activité d'inhibition liée à la séquence vectorisée par les ONAs a également pu être mise en évidence. Les premiers ONAs anti VHC ont pu être caractérisés et testés sur cellules. Toutes les expériences de transfection ont pu être réalisées dans un milieu complet (avec sérum) sans que les ONAs n'aient montré de toxicité pour les concentrations étudiées.

## V.7 Perspectives (2)

Différentes perspectives sont envisageables pour le travail concernant cette deuxième partie. La première est de poursuivre l'élaboration d'une vaste banque de chaînes hydrophobes couvrant toutes les grandes familles de lipides (acides gras, stéroïdes, terpénoïdes, diacylglycérols, phosphoglycérolipides, sphingolipides, céramides etc...) ainsi que leurs dérivés comme les chaînes fluorocarbonées. Ces lipides pourront ensuite être couplés à un oligonucléotide pour étudier l'impact de la chaîne lipidique sur le comportement. L'élaboration de ces nouveaux ONAs pourra permettre la caractérisation physicochimique de ces molécules et une étude approfondie des propriétés d'agrégation de ces composés. La disponibilité de nouvelles chaînes lipidiques pourrait également permettre d'identifier des lipides permettant de rendre les ONAs plus disponibles *in cellulo*. L'emploi de chaînes clivables *in cellulo*, et donc capables de libérer la séquence active, pourra également être envisagé.

Le mécanisme d'internalisation et la localisation des ONAs pourront également être étudiés. De nouvelles expériences de colocalisation pourront être réalisées en faisant varier les temps d'incubation, les concentrations en ONAs ou le type cellulaire étudié (Huh-7).

De nouvelles cibles pourront également être identifiées. Notamment la séquence 93del développée par de Soultrait *et al.*<sup>156</sup> dans l'UMR 5432 et dont les premiers analogues amphiphiles (3' et 5' Chol) ont été synthétisés et sont actuellement en cours d'évaluation pour leur activité anti VIH.

## **VI. Conclusion générale**

## VI. Conclusion générale

Le développement de molécules amphiphiles nécessite le couplage de deux structures d'affinités et de solubilités opposées. Le caractère tensioactif et la double affinité de ces molécules rendent délicate la manipulation des composés formés, notamment pour des techniques usuelles comme l'extraction liquide/liquide. Dans ce contexte, le développement d'une méthode de modification chimique ne nécessitant ni protection particulière, ni matériel particulier est pertinent. Pour réaliser ce ou ces couplages, la chimie clic représente un outil adapté.

La chimie clic développée dans ces travaux de thèse a permis la synthèse d'une large banque de molécules amphiphiles. L'obtention des molécules décrites dans le cadre de ces travaux de thèse ne nécessite généralement pas plus de 3 à 4 étapes. Ces molécules originales peuvent être classées en deux catégories : i) Les molécules de faibles masses moléculaires comme les NAs et GNAs et ii) les molécules de masses moléculaires élevées comme les ONAs.

i) Les NAs et GNAs sont capables de s'organiser pour former des structures supramoléculaires et des gels dans les solvants organiques à des concentrations minimum comprises entre 2,5 à 8 % en masse. Les organisations formées ont pu être observées en MET dans le toluène et le chloroforme. Les composés GNAs synthétisés dans le cadre de ces travaux de thèse ont également montré des propriétés d'organisation et de formation de gel dans l'eau. Les organisations supramoléculaires formées par les dérivés GNAs ont été observées par MET. Ces structures autoorganisées dépendent étroitement de la structure chimique des GNAs. Les GNAs sont capables de former des hydrogels à de faibles concentrations, de l'ordre de 0,1 % en masse pour les composés **44** et **49**. Les structures formées par les NAs et GNAs dans les solvants organiques ou dans l'eau dépendent étroitement de leur structure chimique et notamment de la nature de la structure lipidique fixée. La différence de comportement liée à la nature du lipide a pu être mise en évidence par tensiométrie, fusion des gels et MET. Des études complémentaires réalisées en SAXS ont permis de proposer un modèle d'organisation du composé **43** dans l'eau. Les GNAs ont également été utilisés pour complexer des acides nucléiques. Cette complexation a pu être

observée par différents types de microscopie (MET et fluorescence). Les complexes GNA/acides nucléiques ont été utilisés pour la transfection d'acides nucléiques dans des cellules de carcinome hépatique humain (Huh-7) en milieu complet. Les GNAs **43** et **49** n'ont pas montré de toxicité significative pour des concentrations équivalentes à 100 et 500  $\mu\text{M}$ .

Les composés GNAs hydrofluorés faiblement toxiques, comme le composé **49**, pourraient aboutir au développement de nouveaux biomatériaux pour des applications telles que la reconstruction tissulaire ou comme support injectable pour la culture de cellules.

Ces NAs et GNAs constituent deux nouvelles familles de tensioactifs capables de former spontanément des organisations supramoléculaires dans l'eau et dans les solvants organiques. La formation de ces structures conduit à l'obtention d'hydrogels et d'organogels. La voie de synthèse proposée pour la préparation de ces nouveaux amphiphiles apporte une grande modularité moléculaire. Chaque partie de l'amphiphile peut être modifiée, le lipide, le nucléoside ou le sucre. La modularité, la simplicité de production et les propriétés d'auto organisation des NAs et GNAs ouvrent de nombreuses possibilités d'application pour ces molécules. Ces amphiphiles pourraient être appliqués aux matériaux avec le développement d'hydrogels et d'organogels à de faibles concentrations. Du fait de leur faible toxicité, les GNAs peuvent également être employés en biologie, notamment pour leurs propriétés de transfection ou comme support injectable pour la délivrance topique de substances actives.

ii) Deux méthodes de modification des oligonucléotides ont également été développées dans le cadre de ces travaux. Ces deux méthodes de modification *post-* et *ante-synthèse* ont permis de développer une gamme d'ONAs présentant des structures lipidiques variées issues des grandes familles lipidiques. Les études menées en MET et DLS ont permis de mettre en évidence les propriétés d'agrégation des ONAs dans l'eau. Les propriétés de transfection des ONAs ont été observées en microscopie de fluorescence et suivies par cytométrie en flux. Une internalisation a été observée sur différents types cellulaires (Huh-7, AGS, NCI, Hela T4, lymphocyte Jurkat). L'activité liée à la séquence vectorisée par les ONAs a pu être évaluée par luminométrie au moyen d'un plasmide rapporteur de type p-irf. L'activité d'inhibition liée aux ONAs a été confirmée comme dose

dépendante et dépendante de la séquence. Tous les tests de transfection ont été réalisés, suivis et observés en présence de sérum et sans que les ONAs ne présentent de toxicité pour les cellules.

L'emploi de la chimie clic pour la formation d'ONAs permet de rapidement développer des banques d'ONAs. Les banques ainsi constituées pourraient être opposées à différentes cibles (VHC, VIH, miARN...) ce qui permettrait de rapidement sélectionner et développer les molécules amphiphiles capables de se vectoriser et les plus à même d'interagir avec la cible choisie. La stratégie utilisée dans le cadre de ces travaux peut être envisagée pour la formation de nouveaux conjugués tels que des aptamères-amphiphiles, foldamères-oligonucléotides, par exemple.

## **VII. Partie expérimentale**

# VII. Partie expérimentale

## VII.1 Synthèse organique

### VII.1.1 Matériel et méthodes

L'ensemble des produits de départ provient de fournisseurs de produits chimiques (Aldrich, Alfa Aesar et Avanti Polar Lipid). Ils sont utilisés sans purification ultérieure. Les solvants ont été utilisés sans distillation supplémentaire. Les composés synthétisés ont été caractérisés à l'aide de méthodes d'analyses spectroscopiques standards telles que la RMN ( $^1\text{H}$  à 300 MHz,  $^{13}\text{C}$  à 75 MHz et  $^{31}\text{P}$  à 121 MHz) et la spectroscopie de masse (Instrument JEOL SX 102, matrice NBA). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) en RMN sont exprimés en ppm et relativement au TMS. Les constantes de couplages  $J$  en RMN du  $^1\text{H}$  sont exprimées en Hz. Des plaques Merck RP-18 F254s ont été utilisées pour la chromatographie sur couche mince (CCM). De la silice silicagel 60 (40-60  $\mu\text{m}$ ) a été utilisée pour les purifications par chromatographie sur colonne.

## VII.1.2 Protocoles

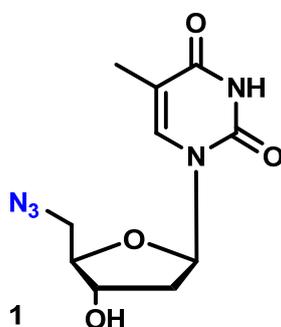
### 5'-azido-5'-désoxythymidine (1)

500 mg de thymidine (2,06 mmol, 1 équivalent) sont mis en solution dans 20 mL de pyridine anhydre. À 0 °C, 284 mg de chlorure de méthanesulfonyle (2,07 mmol, 1,05 équivalents) sont ajoutés goutte à goutte à la solution. Après retour à température ambiante, le mélange est agité pendant 4 heures, puis le solvant est éliminé sous pression réduite. La 5'-O-mésylthymidine obtenue est utilisée telle quelle pour l'étape suivante.

40 mL de DMF et 669 mg d'azoture de sodium (10,3 mmol, 5 équivalents) sont ajoutés à la 5'-O-mésylthymidine. Le milieu réactionnel est placé à 80 °C sous agitation pendant 4 heures. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL d'acétate d'éthyle puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 330 mg de produit sont obtenus après précipitation dans l'acétonitrile (Rdt : 60 %).

R<sub>f</sub> : 0,47 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1).

Les caractéristiques spectroscopiques sont conformes à la littérature : Hiebl, J. and al, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*,1426-1430.

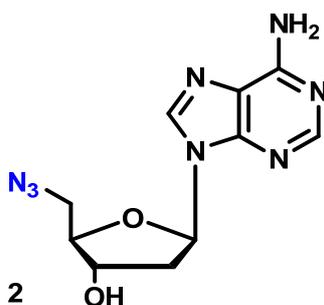


## 5'-azido-5',2'-didésoxyadénosine (2)

1 g de 2'-désoxyadénosine (3,98 mmol, 1 équivalent) est mis en solution dans 40 mL de pyridine anhydre. À 0 °C 1,14 g de chlorure de méthanesulfonyle (2,07 mmol, 2,5 équivalents) sont ajoutés goutte à goutte à la solution. Après retour à température ambiante, le mélange est agité pendant 4 heures, puis le solvant est éliminé sous pression réduite. La 5'-O-mésyl-2'-désoxyadénosine obtenue est utilisée telle quelle pour l'étape suivante.

80 mL de DMF et 1,3 g d'azoture de sodium (20 mmol, 10 équivalents) sont ajoutés à la 5'-O-mésyl-2'-désoxyadénosine. Le milieu réactionnel est placé à 85 °C sous agitation pendant une nuit. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 100 mL d'acétate d'éthyle puis successivement lavé par deux fois 10 mL d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et une fois par 10 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 780 mg de produit sont obtenus après précipitation dans l'acétonitrile (Rdt : 71 %).

R<sub>f</sub> : 0,37 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 2,68-2,75 (m, 1H) ; 2,93-2,97 (m, 1H) ; 3,57-3,63 (m, 1H) ; 3,80-3,85 (m, 1H) ; 4,28-4,31 (m, 1H) ; 4,66 (m, 1H) ; 6,31 (dd, 1H) ; 7,33 (s, 2H) ; 8,16 (s, 1H) ; 8,29 (s, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 37,2 ; 50,7 ; 61,4 ; 80,6 ; 82,9 ; 119,3 ; 139,3 ; 149,6 ; 153,1 ; 156,5.

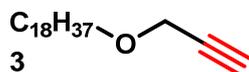
HRMS [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 277,1161 g.mol<sup>-1</sup> , masse mesurée : 277,1157 g.mol<sup>-1</sup>.

### Octadécylpropargyléther (3)

Sous atmosphère inerte, 25 mL de DMF anhydre sont ajoutés à 673 mg d'alcool propargylique (12 mmol, 2 équivalents). Le mélange est placé à 0 °C et 216 mg d'hydrure de sodium (216 mg, 9 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés par petites portions. 2 g de 1-bromo-octadécane (6 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés au mélange à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors agité 10 heures à 70 °C. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis est successivement lavé par 2 fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 1,2 g de produit sont isolés après chromatographie sur colonne (100 % hexane) (Rdt : 65 %).

R<sub>f</sub> : 0,82 (Hexane)

Les caractéristiques spectroscopiques sont conformes à la littérature : Rosensthal, A. F. and al *Recueil des travaux chimiques des Pays Bas* **1964**, 83, 1273-1287.

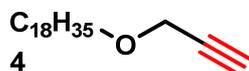


### Oléylpropargyléther (4)

Sous atmosphère inerte, 10 mL de DMF anhydre sont ajoutés à 425 mg d'alcool oléique (1,6 mmol, 1 équivalent). Le mélange est placé à 0 °C et 76 mg d'hydrure de sodium (3,2 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés par petites portions. 376,6 mg de bromure de propargyle (3,2 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés au mélange à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors agité 10 heures à 70 °C. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis est successivement lavé par 2 fois

20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. 158 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane, 100%) (Rdt : 32 %).

R<sub>f</sub>: 0,9 (hexane/acétate d'éthyle, 9/1).



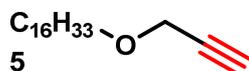
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,90 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,29 (s, 10H) ; 1,31 (s, 10) ; 1,59-1,63 (m, 2H) ; 2,02 (m, 4H) ; 2,43 (s, 1H) ; 3,53 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,15 (s, 2H), 5,37 (t, *J* = 6 Hz, 2H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,1 ; 22,7 ; 27,2 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,8 ; 31,9 ; 58,0 ; 70,3 ; 74,1 ; 77,2 ; 129,8 ; 130,0.

#### Palmitylpropargyléther (5)

Sous atmosphère inerte, 25 mL de THF anhydre sont ajoutés à 1,56 g d'alcool propargylique (13,1 mmol, 2 équivalents). Le mélange est placé à 0 °C et 314 mg d'hydrure de sodium (13,1 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés par petites portions. 2 g de 1-bromo-hexadécane (6,5 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés au mélange à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors agité 10 heures à 70 °C. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis est successivement lavé par 2 fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 1,7 g de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane, 100%) (Rdt : 90 %).

R<sub>f</sub>: 0,9 (hexane/acétate d'éthyle, 9/1).



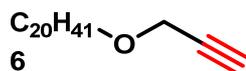
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,90 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,27 (s, 25H) ; 1,59-1,63 (m, 2H) ; 2,43 (s, 1H) ; 3,53 (t,  $J = 6$  Hz, 2H) ; 4,15 (s, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 14,2 ; 22,7 ; 26,1 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 58,0 ; 70,4 ; 74,0 ; 77,2 ; 80,1.

### Arachidylpropargyléther (6)

Sous atmosphère inerte, 25 mL de DMF anhydre sont ajoutés à 2 g d'eicosanol (6,7 mmol, 1 équivalent). Le mélange est placé à 0 °C et 321 mg d'hydrure de sodium (13,4 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés par petites portions. 1,59 g de bromure de propargyle (13,4 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés au mélange à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors agité 10 heures à 70 °C. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis est successivement lavé par 2 fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. 350 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane, acétate d'éthyl : de 100/0 à 80/20) (Rdt : 16 %).

$R_f$  : 0,38 (hexane 100 %).



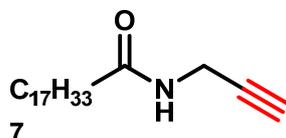
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,90 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,27 (s, 34H) ; 1,56-1,63 (m, 2H) ; 2,42 (s, 1H) ; 3,52 (t,  $J = 6$  Hz, 2H) ; 4,14 (s, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 14,1 ; 22,7 ; 26,1 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 58,0 ; 70,3 ; 74,0 ; 80,1.

## Amide N-propargyloleïque (7)

Sous atmosphère inerte, 10 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 1,08 g de chlorure d'oléoyle (3,6 mmol, 1,2 équivalents). 928 mg de DCC (4,5 mmol, 1,5 équivalents) et 550 mg de DMAP (4,5 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés au mélange. 165 mg de propargylamine (3 mmol, 1 équivalent) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est ensuite agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 850 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, 9/1) (Rdt : 76 %).

R<sub>f</sub>: 0,41 (hexane/acétate d'éthyle, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,85 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,24 (s, 10H) ; 1,28 (s, 10H) ; 1,57-1,63 (m, 2H) ; 1,97-2,03 (m, 4H) ; 2,17-2,21 (m, 3H) ; 4,00-4,02 (m, 2H) ; 5,28-5,32 (m, 2H) ; 6,46 (t, *J* = 6 Hz, 1H).

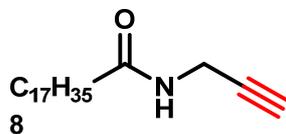
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,1 ; 22,7 ; 25,6 ; 27,2 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 31,9 ; 36,3 ; 71,2 ; 79,8 ; 129,7 ; 130,0 ; 173,1.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 320,2953 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 320,2962 g.mol<sup>-1</sup>.

### Amide N-propargylstéarique (8)

Sous atmosphère inerte, 30 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 1 g de chlorure de stéaroyle (3,3 mmol, 1,2 équivalents). 928 mg de DCC (4,5 mmol, 1,5 équivalents) et 550 mg de DMAP (4,5 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés au mélange. 165 mg de propargylamine (3 mmol, 1 équivalent) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est ensuite agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 300 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, 8/2) (Rdt : 30 %).

R<sub>f</sub>: 0,4 (hexane/acétate d'éthyle, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,90 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,27 (s, 30H) ; 1,63-1,65 (m, 2H) ; 2,21 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 2,24 (s, 1H) ; 4,08 (s, 2H) ; 5,62 (s, 1H).

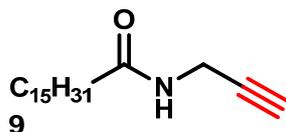
RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,1 ; 22,7 ; 25,6 ; 29,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 31,9 ; 36,5 ; 71,5 ; 79,7 ; 172,8.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 322,3110 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 322,3097 g.mol<sup>-1</sup>.

### Amide N-propargylpalmitique (9)

Sous atmosphère inerte, 25 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 2 g d'acide palmitique (7,8 mmol, 1 équivalent). 2,41 g de DCC (11,7 mmol, 1,5 équivalents) et 1,43 g de DMAP (11,7 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés au mélange. 644 mg de propargylamine (11,7 mmol, 1,5 équivalents) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est ensuite agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. 300 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, 8/2) (Rdt : 13 %).

R<sub>f</sub>: 0,45 (hexane/acétate d'éthyle, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,90 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,27 (s, 30H) ; 1,63-1,65 (m, 2H) ; 2,21 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 2,24 (s, 1H) ; 4,08 (s, 2H) ; 5,62 (s, 1H).

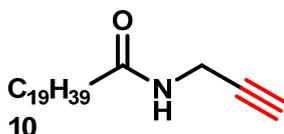
RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,1 ; 22,7 ; 25,6 ; 29,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 31,9 ; 36,5 ; 71,5 ; 79,7 ; 172,8.

TOF MS ES+ [M+H]<sup>+</sup> : 294,7 g.mol<sup>-1</sup>.

### Amide N-propargylarachidique (10)

Sous atmosphère inerte, 25 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 2 g d'acide eicosanoïque (6,4 mmol, 1 équivalent). 1,98 g de DCC (9,6 mmol, 1,5 équivalents) et 1,17 g de DMAP (9,6 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés au mélange. 529 mg d propargylamine (9,6 mmol, 1,5 équivalents) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est ensuite agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. 100 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, 8/2) (Rdt : 5 %).

R<sub>f</sub>: 0,45 (hexane/acétate d'éthyle, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,90 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 1,27 (s, 34H) ; 1,60-1,70 (m, 2H) ; 2,21 (t, J = 6 Hz, 2H) ; 2,24 (s, 1H) ; 4,08 (s, 2H) ; 5,63 (s, 1H).

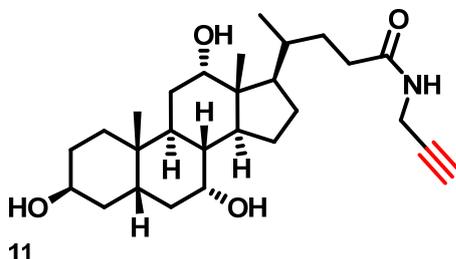
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,2 ; 22,7 ; 25,6 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 31,9 ; 34,0 ; 36,5 ; 49,1 ; 71,6 ; 77,2 ; 79,7 ; 172,7.

TOF MS ES+ [2M+Na]<sup>+</sup> : 721,3 g.mol<sup>-1</sup>.

## Amide N-propargylcholique (11)

Sous atmosphère inerte, 30 mL de DCM sont ajoutés à 1 g d'acide cholique (2,5 mmol, 1 équivalent). 763 mg de DCC (3,7 mmol, 1,5 équivalents) et 452 mg DMAP (3,7 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à la suspension. 165 mg de propargylamine sont ensuite ajoutés (3 mmol, 1,2 équivalents) à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite agité au reflux durant une nuit. Le milieu réactionnel est laissé refroidir à température ambiante puis filtré pour éliminer la DCU formée durant la réaction. 50 mL de DCM sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et une fois par une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 900 mg de produit sont isolés après chromatographie sur colonne de silice (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1) (Rdt : 81 %).

R<sub>f</sub> : 0,53 (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,57 (s, 3H) ; 0,79 (s, 3H) ; 0,92 (s, 3H) ; 1,23 – 2,22 (m, 28H) ; 3,17 (m, 1H) ; 3,60 (s, 1H) ; 3,77 (s, 1H) ; 3,81 (s, 2H) ; 4,04 (s, 1H) ; 4,13 (s, 1H) ; 4,39 (s, 1H) ; 8,25 (t, J = 6 Hz, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,8 ; 17,5 ; 23,1 ; 23,3 ; 26,7 ; 27,8 ; 28,1 ; 28,2 ; 29,0 ; 30,8 ; 32,0 ; 32,6 ; 33,8 ; 34,8 ; 35,3 ; 35,6 ; 35,8 ; 41,8 ; 42,0 ; 46,2 ; 46,6 ; 66,7 ; 70,9 ; 73,1 ; 81,8 ; 172,9.

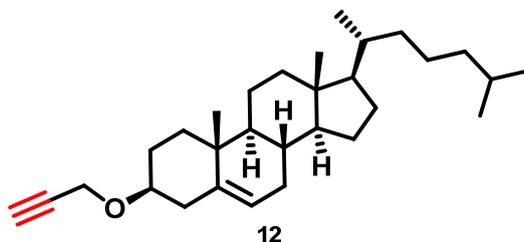
HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 446,3270 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 446,3251 g.mol<sup>-1</sup>.

## Cholestérylpropargyléther (12)

Sous atmosphère inerte, 5 g de cholestérol (12,4 mmol, 1, équivalent) sont dissous dans 50 mL de THF anhydre. La solution est refroidie à 0 °C et 446,4 mg d'hydrure de sodium (18,6 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés par petites quantités. 1,84 g de bromure de propargyle (15,5 mmol, 1,25 équivalents) sont ensuite ajoutés au mélange à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité 24 heures à 50 °C. La réaction est arrêtée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide obtenu est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 1,84 g de produit sont isolés après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle 8/2) (Rdt : 36 %).

R<sub>f</sub> : 0,79 (hexane/acétate d'éthyle, 8/2).

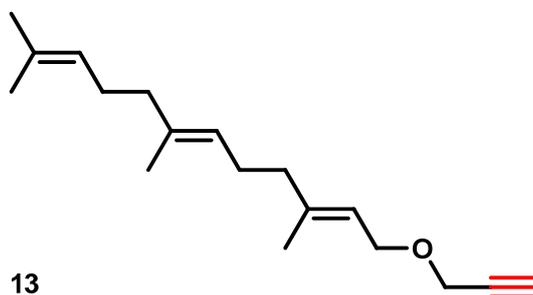
Les données spectroscopiques sont conformes aux données décrites dans la littérature : Ohkubo, M. and al *Org. Lett.* **2007**, *9*, 773-776.



### Farnésylpropargyléther (13)

Sous atmosphère inerte, 1 g de mélange d'isomères du farnésol (4,5 mmol, 1 équivalent) est dissous dans 20 mL de THF anhydre. La solution est refroidie à 0 °C et 216 mg d'hydrure de sodium (9 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés par petites quantités. 803 mg de bromure de propargyle (6,75 mmol, 1,5 équivalents) sont ensuite ajoutés au mélange qui est alors agité 24 h à température ambiante. La réaction est arrêtée par ajout de 10 mL de méthanol. Les solvants sont éliminés. Le solide obtenu est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 840 mg de produit sont isolés après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle 85/15) (Rdt : 72 %).

R<sub>f</sub> : 0,9 (hexane/acétate d'éthyle 8/2).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1,72 (s, 3H) ; 1,78 (s, 1H) ; 1,99-2,13 (m, 8H) ; 4,11 (d, J = 6 Hz, 2H) ; 4,14 (s, 2H) ; 5,13 (s, 2H) ; 5,36 (t, J = 6 Hz, 1H).

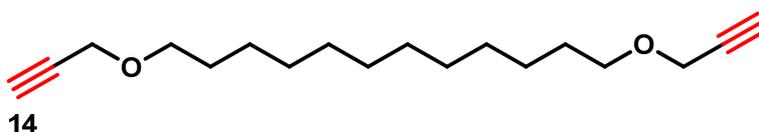
RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 16,0 ; 16,5 ; 17,6 ; 17,7 ; 23,4 ; 23,5 ; 25,7 ; 26,1 ; 26,3 ; 26,6 ; 26,7 ; 32,0 ; 32,2 ; 39,6 ; 39,7 ; 39,9 ; 46,3 ; 56,7 ; 56,8 ; 65,7 ; 66,0 ; 74,1 ; 80,1 ; 119,9 ; 120,9 ; 123,6 ; 123,8 ; 124,3 ; 124,6 ; 131,3 ; 135,4 ; 141,7.

### 1,12-dipropargyloxydodécane et 12-propargyloxydodécane-1-ol (14) et (14')

Sous atmosphère d'azote anhydre, 1 g de dodécane-1,12-diol (5 mmol, 1 équivalent) est dissous dans 10 mL de DMF. La solution est alors refroidie à 0 °C et 360 mg d'hydrure de sodium (3 équivalents, 15 mmol) sont additionnés par petites fractions. Après retour à la température ambiante, 1,49 g de bromure de propargyle (2,5 équivalents, 12,5 mmol) sont ajoutés. L'agitation est maintenue pendant 5 heures. La réaction est alors stoppée par ajout de 10 mL de méthanol, l'agitation est maintenue pendant 30 minutes. 50 mL de DCM sont ajoutés au mélange. Le tout est successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution saturée en chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre. Les solvants sont finalement éliminés sous pression réduite. Les produits obtenus sont alors séparés par chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, 9/1). Deux produits sont isolés, 370 mg d'une huile brune correspondant au 1,12-dipropargyloxydodécane (Rdt : 27 %) et 430 mg d'un solide brun correspondant au 12-propargyloxydodécane-1-ol (Rdt : 36).

#### 1,12-dipropargyloxydodécane (14)

R<sub>f</sub> : 0,53 (hexane/acétate d'éthyle, 9/1).



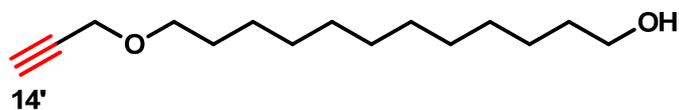
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1,31 (m, 16H) ; 1,61 (m, 4H) ; 2,43 (t, J = 3 Hz) ; 3,52 (t, J = 6 Hz, 4H) ; 4,15 (d, J = 3 Hz, 4H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 26,1 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 58,0 ; 70,3 ; 74,1 ; 80,1.

HRMS (ESI) : [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 301,2144 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 301,2136 g.mol<sup>-1</sup>.

### 12-propargyloxydodécan-1-ol (14')

R<sub>f</sub> : 0,10 (hexane/acétate d'éthyle, 9/1)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1,32 (m, 16H) ; 1,59 (m, 4H) ; 2,43 (t, *J* = 3 Hz, 2H) ; 3,52 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 3,65 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,15 (d, *J* = 3 Hz, 2H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 25,8 ; 26,0 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 32,7 ; 57,9 ; 62,7 ; 70,2 ; 74,2 ; 79,9.

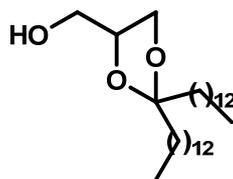
HRMS (ESI) : [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 263,1987 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 263,1996 g.mol<sup>-1</sup>.

### 2,2-bistridécyl-4-((prop-2-ynyloxy)méthyl)-1,3-dioxolane (15)

Sous atmosphère d'azote anhydre, 2 g de heptaéicosan-14-one (5,1 mmol, 1 équivalent) et 2,33 g de glycérol (25,5 mmol, 5 équivalents) sont dissous dans 50 mL de THF. La solution est alors refroidie à 0 °C et 3,75 g d'orthoformate de triéthyle (25,5 mmol 5 équivalents) et 964,3 mg d'acide para-toluènesulfonique (5,6 mmol 1,1 équivalents) sont ajoutés. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est agité au reflux du THF durant une nuit. Le mélange est refroidi à température ambiante puis la réaction est stoppée par ajout de 1 mL de TEA. Le milieu réactionnel est alors ajouté à un mélange de 50 mL d'eau et 50 g de glace contenant 5 % d'hydrogénocarbonate de sodium. Ce mélange est extrait par 3 fois 50 mL de DCM. Les phases organiques sont réunies puis lavées par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre. Les solvants sont finalement éliminés sous pression réduite. Le produit obtenu peut-être utilisé tel que pour l'étape suivante.

Rendement de l'étape 1 : 63 %

R<sub>f</sub> : 0,58 (hexane/acétate d'éthyle, 8/2)

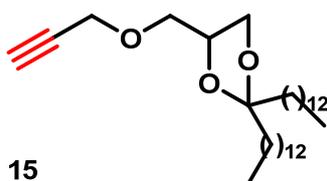


Sous atmosphère d'azote anhydre, 1,5 g de (2,2-ditridécyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthanol (3,2 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 40 mL de THF. La solution est alors refroidie à 0 °C et 312 mg d'hydruure de sodium (13 mmol, 4 équivalents) sont additionnés par petites fractions. Après retour à température ambiante, 761 mg de bromure de propargyle (6,4 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés. L'agitation est maintenue pendant 10 heures. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de méthanol et l'agitation est maintenue pendant 30 minutes. 50 mL de DCM sont ajoutés au mélange. Ce mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre. Les solvants sont finalement éliminés sous pression réduite. Le produit obtenu est alors purifié par chromatographie sur colonne neutralisée (100 % hexane). 1,072 g de composé sont ainsi obtenus.

R<sub>f</sub> : 0,62 (hexane/acétate d'éthyle, 9/1)

Rendement de l'étape 2 : 62 %

Rendement final : 40 %



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,90 (t,  $j = 6$  Hz, 6H) ; 1,27 (s, 44H) ; 1,6 (m, 4H) ; 2,46 (s, 1H) ; 3,58-3,71 (m, 3H) ; 4,09 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 4,23 (s, 2H) ; 4,3 (t,  $J = 6$  Hz, 1H).

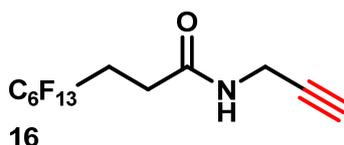
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 14,2 ; 22,7 ; 23,7 ; 24,0 ; 29,4 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,9 ; 30,0 ; 32,0 ; 37,1 ; 37,5 ; 58,7 ; 67,2 ; 70,9 ; 74,7 ; 74,8 ; 76,8 ; 79,3 ; 113,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 507,4777  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 507,4757  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### Amide N-propargyl-1H,1H,2H,2H-perfluorononanoïque (16)

Sous atmosphère inerte, 10 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 200 mg d'acide 1H,1H,2H,2H-perfluorononanoïque (0,5 mmol, 1 équivalent). 206 mg de DCC (1 mmol, 2 équivalents) et 122 mg de DMAP (1 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés au mélange. 55 mg de propargylamine (1 mmol, 2 équivalents) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est alors agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 200 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, de 80/20) (Rdt : 93 %).

$R_f$  : 0,2 (hexane/acétate d'éthyle, 80/20).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2,24 (s, 1H) ; 2,52 (s, 4H) ; 4,07 (s, 2H).

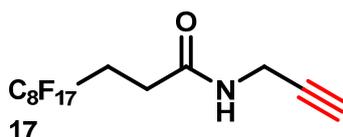
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 24,9 ; 29,3 ; 71,6 ; 79,2 ; 169,7.

HRMS (ESI)  $[M+Na]^+$  : masse calculée : 452,0296  $g.mol^{-1}$ , masse mesurée : 452,0277  $g.mol^{-1}$ .

### Amide N-propargyl-1H,1H,2H,2H-perfluoroundécanoïque (17)

Sous atmosphère inerte, 40 mL de DCM anhydre sont ajoutés à 1 g d'acide 1H,1H,2H,2H-perfluoroundécanoïque (2 mmol, 1 équivalent). 825 mg de DCC (4 mmol, 2 équivalents) et 489 mg de DMAP (4 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés au mélange. 220 mg de propargylamine (4 mmol, 2 équivalents) sont alors ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange est alors agité durant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer la DCU. 50 mL de DCM sont ajoutés et le mélange est successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 890 mg de produit sont obtenus après chromatographie sur colonne (hexane/acétate d'éthyle, de 90/10 à 80/20) (Rdt : 84 %).

$R_f$  : 0,33 (hexane/acétate d'éthyle, 80/20).



RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2,24 (s, 1H) ; 2,52 (s, 4H) ; 4,07 (s, 2H).

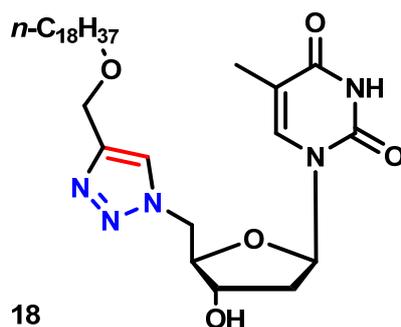
RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ) : 26,8 ; 29,5 ; 71,9 ; 79,0 ; 169,5.

TOF MS ES+  $[M+Na]^+$  : 552,00  $g.mol^{-1}$ .

### 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (18)

200 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (1) (0,75 mmol, 1 équivalent) et 231 mg de octadécylpropargyléther (3) (0,75 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 12 mg de sulfate de cuivre (0,075 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur après chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2). 180 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 42 %).

R<sub>f</sub>: 0,72 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,83 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,22 (m, 30H) ; 1,45 (m, 2H) ; 1,78 (s, 3H) ; 2,11 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 2,27 (s, 1H) ; 2,73 (s, 1H) ; 4,07 (s, 1H) ; 4,28 (s, 2H) ; 4,61 (m, 2H) ; 5,60 (s, 1H) ; 6,15 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,30 (s, 1H) ; 8,03 (s, 1H) ; 11,34 (s, 1H).

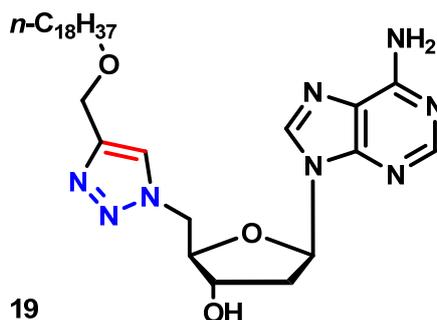
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, pyridine d<sub>5</sub>) : 11,2 ; 14,3 ; 15,5 ; 24,2 ; 27,8 ; 30,9 ; 31,1 ; 31,3 ; 33,4 ; 39,1 ; 51,2 ; 62,8 ; 72,2 ; 80,7 ; 112,7 ; 118,7 ; 127,0 ; 138,1 ; 147,0 ; 167,0.

HRMS [M+H]<sup>+</sup> masse calculée : 576,4125 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 576,4120 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2'-désoxyadénosine (19)

200 mg de 5'-azido-5',2'-didésoxyadénosine (**2**) (0,75 mmol, 1 équivalent) et 223 mg de octadécylpropargyléther (**3**) (0,75 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 12 mg de sulfate de cuivre (0,075 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur après chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2). 150 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 35 %).

R<sub>f</sub> : 0,68 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,89 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,26 (m, 30H) ; 1,55 (m, 2H) ; 2,54 (m, 1H) ; 3,06 (m, 1H) ; 3,45 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,50 (m, 4H) ; 4,89 (m, 1H) ; 5,88 (s, 2H) ; 6,40 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,42 (s, 1H) ; 7,81 (s, 1H) ; 8,35 (s, 1H).

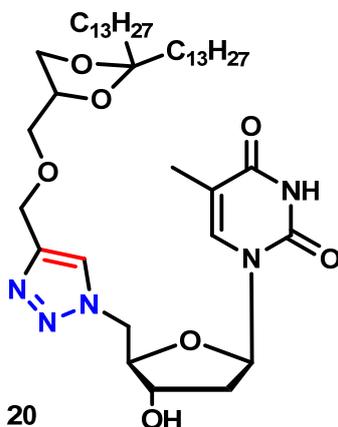
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,4 ; 22,6 ; 26,1 ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 31,8 ; 38,4 ; 51,9 ; 52,0 ; 63,6 ; 70,0 ; 71,7 ; 84,2 ; 85,4 ; 119,8 ; 124,8 ; 140,2 ; 144,2 ; 149,4 ; 153,0 ; 156,6.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 585,4241 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 585,4254 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-((2R,4S,5R)-5-(4-(((R)-2,2-ditridécyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthoxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (20)**

264 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (1 mmol, 1 équivalent) et 500 mg de 2,2-bistridécyl-4-((prop-2-ynyloxy)méthyl)-1,3-dioxolane (**15**) (1 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 15 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 39,5 mg d'ascorbate de sodium (0,2 mmol, 0,2 équivalent) et 16 mg de sulfate de cuivre (0,1 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1). 550 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 72 %).

R<sub>f</sub> : 0,7 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,90 (t, J = 6 Hz, 6H) ; 1,27 (m, 44H) ; 1,56-1,64 (m, 4H) ; 1,91 (s, 3H) ; 2,27-2,45 (m, 2H) ; 3,53-3,68 (m, 3H) ; 4,06 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 4,19-4,32 (m, 2H) ; 4,57-4,61 (m, 1H) ; 4,71 (s, 4H) ; 6,11 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 6,79 (s, 1H) ; 7,67 (s, 1H) ; 8,85 (s, 1H).

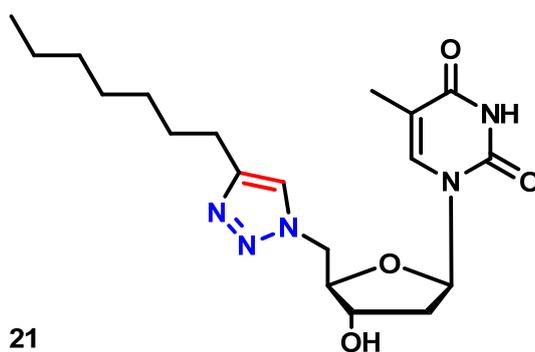
RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 12,4 ; 14,1 ; 22,7 ; 23,7 ; 24,0 ; 29,4 ; 29,7 ; 29,9 ; 31,9 ; 37,0 ; 37,5 ; 38,9 ; 51,0 ; 64,8 ; 67,2 ; 71,4 ; 71,9 ; 74,7 ; 77,2 ; 83,6 ; 86,4 ; 111,6 ; 113,2 ; 124,5 ; 136,4 ; 150,1 ; 163,5.

HRMS (ESI)  $[M+H]^+$  : masse calculée : 774,5745 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 774,5739 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-((Heptyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (21)

200 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,75 mmol, 1 équivalent) et 93 mg de non-1-yne (0,75 mmol, 1 équivalents) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 12 mg de sulfate de cuivre (0,075 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est refroidi à température ambiante. Les solvants sont alors éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15). 120 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 41 %).

R<sub>f</sub> : 0,6 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,83 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,25 (m, 8H) ; 1,55 (m, 2H) ; 1,79 (s, 3H) ; 2,10 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 2,61 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,06 (s, 1H) ; 4,27 (s, 1H) ; 4,59 (m, 2H) ; 5,5 (s, 1H) ; 6,16 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,29 (s, 1H) ; 7,82 (s, 1H) ; 11,31 (s, 1H).

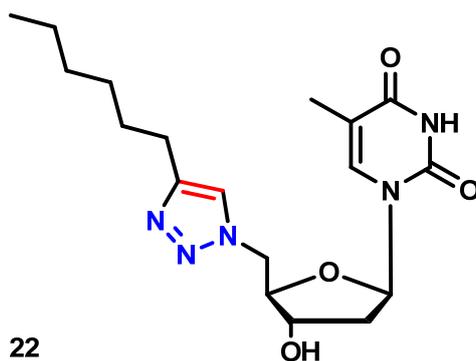
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,6 ; 14,4 ; 22,5 ; 25,4 ; 28,9 ; 29,0 ; 29,4 ; 31,7 ; 38,4 ; 51,5 ; 71,1 ; 84,4 ; 110 ; 123,1 ; 136,5 ; 147,4 ; 150,9 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[M+Na]^+$  : masse calculée 414,2117 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 414,2110 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-((Hexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (22)

200 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (1) (0,75 mmol, 1 équivalent) et 82,6 mg de oct-1-yne (0,75, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 12 mg de sulfate de cuivre (0,075 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2). 130 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 46 %).

R<sub>f</sub> : 0,62 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,83 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,26 (m, 6H) ; 1,56 (m, 2H) ; 1,79 (s, 3H) ; 2,10 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 2,59 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,06 (s, 1H) ; 4,27 (s, 1H) ; 4,60 (m, 2H) ; 5,5 (s, 1H) ; 6,16 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,31 (s, 1H) ; 7,82 (s, 1H) ; 11,32 (s, 1H).

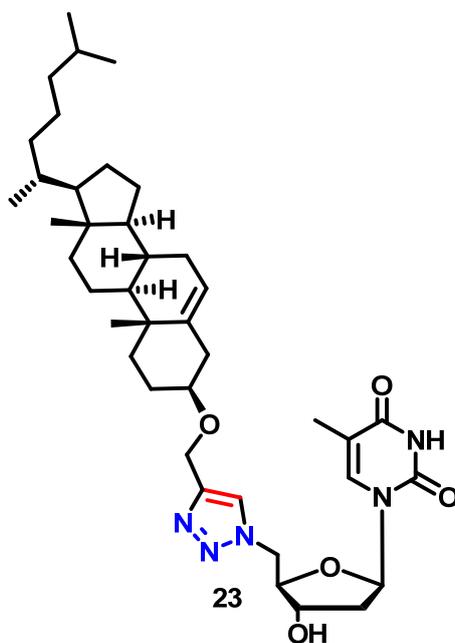
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 38,5 ; 38,9 ; 52,1 ; 71,6 ; 84,0 ; 85,9 ; 119,6 ; 140,3 ; 149,5 ; 153,1 ; 156,4.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 400,1961 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 400,1955 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (23)

170 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,63 mmol, 1 équivalent) et 270 mg de cholestérylpropargyléther (**12**) (0,63 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 20 mg de d'ascorbate de sodium (0,13 mmol, 0,2 équivalent) et 10 mg de sulfate de cuivre (0,063 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2). 260 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 59 %).

R<sub>f</sub> : 0,57 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,65 (s, 3H) ; 0,85-1,65 (m, 36H) ; 1,75-1,99 (m, 9H) ; 2,05-2,4 (m, 4H) ; 2,70-2,85 (m, 1H) ; 3,23 (m, 1H) ; 4,41 (s, 1H) ; 4,54-4,80 (s, 1H) ; 5,31 (s, 1H) ; 6,03 (s, 1H) ; 7,55 (s, 1H) ; 8,07 (s, 1H) ; 11,37 (s, 1H).

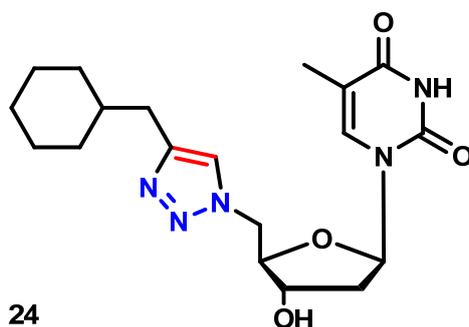
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d6) : 12,1 ; 12,9 ; 19,0 ; 19,5 ; 21,1 ; 22,9 ; 23,1 ; 23,7 ; 24,3 ; 27,9 ; 28,4 ; 31,9 ; 35,7 ; 36,1 ; 36,7 ; 42,3 ; 49,7 ; 50,1 ; 56,0 ; 56,6 ; 60,9 ; 61,4 ; 78,1 ; 80,4 ; 83,8 ; 110,0 ; 121,7 ; 124,9 ; 136,0 ; 140,9 ; 145,1 ; 150,8 ; 163,2.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 714,4570 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 714,4546 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(((cyclohexyl)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (24)

122 mg de prop-2-ynylcyclohexane (1,12 mmol, 1 équivalent), 47,5 mg d'ascorbate de sodium (0,24 mmol, 0,2 équivalent) et 19 mg de sulfate de cuivre (0,12 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 300 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (1,12 mmol, 1 équivalent) en solution dans 10 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 65 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le produit est obtenu pur après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1), 340 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 81 %).

R<sub>f</sub>: 0,4 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,87-1,61 (m, 11H) ; 1,80 (s, 3H) ; 2,10 (m, 2H) ; 4,06 (m, 1H) ; 4,27 (m, 1H) ; 4,50-4,70 (m, 2H) ; 5,51 (m, 1H) ; 6,16 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,33 (s, 1H) ; 7,81 (s, 1H) ; 11,33 (s, 1H).

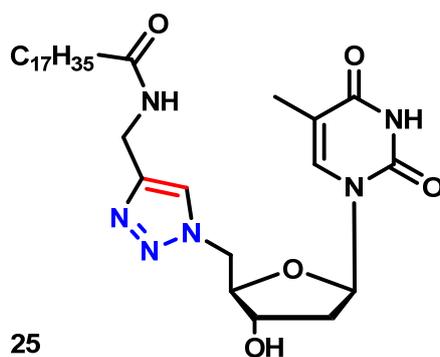
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 12,5 ; 14,2 ; 19,3 ; 26,1 ; 26,4 ; 32,9 ; 38,0 ; 51,4 ; 75,0 ; 84,5 ; 110,3 ; 123,6 ; 136,5 ; 145,8 ; 150,9 ; 164,1.

TOF MS ES+  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 390,4  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((stéaroylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (25)

280 mg d'amide N-propargylstéarique (**8**) (0,87 mmol, 1 équivalent), 36 mg d'ascorbate de sodium (0,18 mmol, 0,2 équivalent) et 14 mg de sulfate de cuivre (0,09 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 233 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,87 mmol, 1 équivalent) en solution dans 25 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60°C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 300 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (dichlorométhane/méthanol, 95/5) (Rdt : 60 %).

$R_f$  : 0,6 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) : 0,85 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,24 (m, 22H) ; 1,47 (m, 2H) ; 1,8 (s, 3H) ; 2,02 (m, 4H) ; 4,06 (m, 1H) ; 4,26 (d,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 4,63 (m, 2H) ; 5,32 (t,  $J = 6$  Hz, 2H) ; 5,51 (s, 1H) ; 6,17 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,38 (s, 1H) ; 7,87 (s, 1H) ; 8,27 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 11,33 (s, 1H).

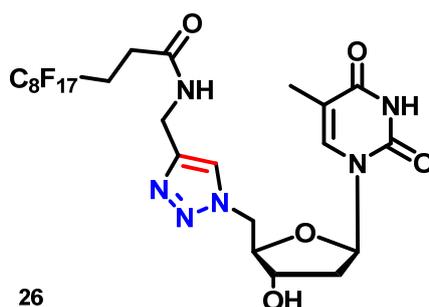
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,5 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,7 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 31,8 ; 34,5 ; 35,7 ; 38,4 ; 51,6 ; 71,2 ; 84,5 ; 110,3 ; 123,9 ; 136,5 ; 145,6 ; 150,9 ; 164,1 ; 172,6.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 611,3897  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 611,3873  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((1H,1H,2H,2H-perfluoroundécanyloyl)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (26)

297 mg d'amide N-propargyl-1H,1H,2H,2H-undécanoïque (**17**) (0,56 mmol, 1 équivalent), 24 mg d'ascorbate de sodium (0,12 mmol, 0,2 équivalent) et 9 mg de sulfate de cuivre (0,06 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 150 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,56 mmol, 1 équivalent) en solution dans 20 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Le THF est ensuite éliminé sous pression réduite et 10 mL d'eau sont ajoutés. Le composé attendu, insoluble, est obtenu après filtration. 370 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 95/5) (Rdt : 82 %).

R<sub>f</sub>: 0,56 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 1,8 (s, 3H) ; 2,11 (m, 2H) ; 2,44 (m, 2H) ; 4,05-4,07 (m, 1H) ; 4,32 (d,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 4,60-4,70 (m, 2H) ; 5,51 (s, 1H) ; 6,17 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,38 (s, 1H) ; 7,93 (s, 1H) ; 8,56 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 11,34 (s, 1H).

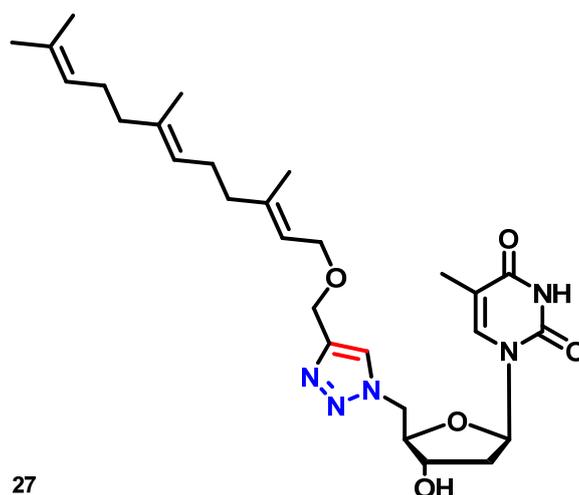
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,5 ; 26,1 ; 34,8 ; 38,3 ; 51,6 ; 71, 2 ; 84,5 ; 110,3 ; 124 ,0 ; 136,5 ; 150,9 ; 164,1 ; 169,7.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 819,1200 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 819,1190 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((farnésyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (27)

96 mg de farnésylpropargyléther (**13**) (0.37 mmol, 1 équivalent), 16 mg d'ascorbate de sodium (0,08 mmol, 0,2 équivalent) et 6 mg de sulfate de cuivre (0,04 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 100 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0.37 mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 140 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle /méthanol, 95/5) (Rdt : 70 %).

R<sub>f</sub> : 0,52 (acétate d'éthyle/méthanol, 95/5).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 1,55-1,63 (m, 10H) ; 1,70 (s, 1H) ; 1,79 (s, 3H) ; 1,90-2,12 (m, 8H) ; 3,17 (s, 6H) ; 3,97 (d, J = 6 Hz, 2H) ; 4,08-4,12 (s, 3H) ; 4,28 (d, 1H) ; 4,46 (s, 2H) ; 4,55- 4,75 (m, 2H) ; 5,07

(s, 2H) ; 5,27 (s, 1H) ; 5,52 (s, 1H) ; 5,76 (s, 1H) ; 6,17 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,33 (s, 1H) ; 8,05 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 11,33 (s, 1H).

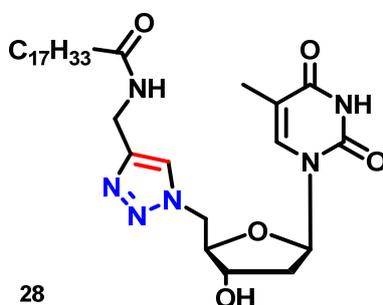
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ): 12,5 ; 16,3 ; 16,6 ; 16,7 ; 18,0 ; 23,5 ; 23,6 ; 23,7 ; 26,0 ; 26,2 ; 26,6 ; 38,3 ; 38,4 ; 38,5 ; 41,0 ; 49,1 ; 51,6 ; 55,4 ; 62,7 ; 62,9 ; 66,3 ; 71,2 ; 84,4 ; 110,3 ; 121,4 ; 122,4 ; 124,2 ; 124,6 ; 131,1 ; 131,4 ; 135,1 ; 136,5 ; 139,7 ; 139,8 ; 144,7 ; 150,9 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse : calculée 611,3897  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 611,3873  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((oléoylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (28)

118 mg d'amide N-propargyloleïque (**7**) (0,37 mmol, 1 équivalent), 16 mg d'ascorbate de sodium (0,08 mmol, 0,2 équivalent) et 6 mg de sulfate de cuivre (0,04 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 100 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,37 mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 150 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle /méthanol, 95/5) (Rdt : 69 %).

$R_f$ : 0,4 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,85 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 1,24 (s, 22H) ; 1,44-1,49 (m, 2H) ; 1,8 (s, 3H) ; 1,97-2,06 (m, 4H) ; 4,05-4,07 (m, 1H) ; 4,26 (d, J = 6 Hz, 3H) ; 4,59-4,67 (m, 2H) ; 5,32 (t, J = 6 Hz, 2H) ; 5,51 (s, 1H) ; 6,17 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,38 (s, 1H) ; 7,87 (s, 1H) ; 8,27 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 11,33 (s, 1H).

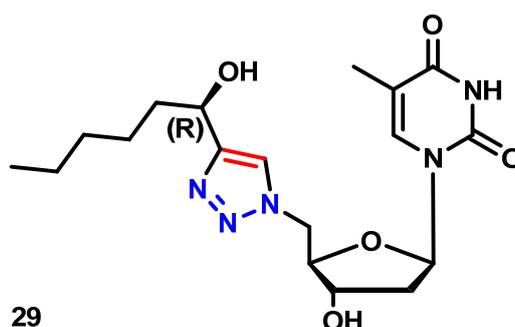
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,5 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,7 ; 27,0 ; 27,1 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,6 ; 31,2 ; 31,8 ; 34,5 ; 35,6 ; 38,3 ; 51,7 ; 71,2 ; 84,5 ; 110,3 ; 123,9 ; 130,1 ; 136,5 ; 145,6 ; 150,9 ; 164,1 ; 172,5.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 587,3921 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 587,3923 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(((R)-1-hydroxyhexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (29)

215 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (1) (0,8 mmol, 1 équivalent) et 101,5 mg de (R) oct-1-yn-3-ol (0,8 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans un mélange THF/eau (1/1). 31,5 mg d'ascorbate de sodium (0,16 mmol, 0,2 équivalent) et 13 mg de sulfate de cuivre (0,08 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1). 240 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 76 %).

R<sub>f</sub> : 0,48 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,84 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,24 (m, 6H) ; 1,68 (m, 2H) ; 1,81 (s, 3H) ; 2,11 (m, 2H) ; 4,08 (m, 1H) ; 4,27 (m, 1H) ; 4,61 (m, 3H) ; 5,21 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,51 (s, 1H) ; 6,17 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,40 (s, 1H) ; 7,88 (s, 1H) ; 11,34 (s, 1H).

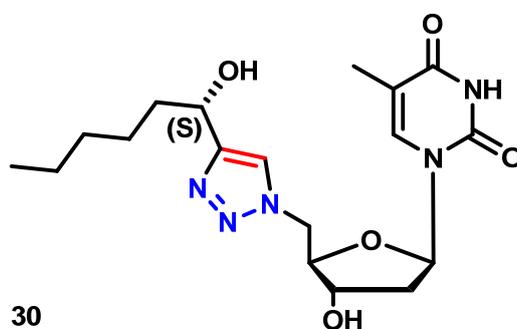
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,6 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,2 ; 31,7 ; 37,7 ; 38,4 ; 51,6 ; 66,0 ; 71,2 ; 84,4 ; 84,5 ; 110,3 ; 122,8 ; 136,5 ; 150,9 ; 152,4 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 576,4125  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 576,4120  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(((S)-1-hydroxyhexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (30)

215 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,8 mmol, 1 équivalent) et 101,5 mg de (S) oct-1-yn-3-ol (0,8 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 31,5 mg d'ascorbate de sodium (0,16 mmol, 0,2 équivalent) et 13 mg de sulfate de cuivre (0,08 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15). 255 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 78 %).

$R_f$  : 0,48 (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,83 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,24 (m, 6H) ; 1,68 (m, 2H) ; 1,81 (s, 3H) ; 2,09 (m, 2H) ; 4,09 (m, 1H) ; 4,27 (m, 1H) ; 4,63 (m, 3H) ; 5,2 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,51 (s, 1H) ; 6,17 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,37 (s, 1H) ; 7,89 (s, 1H) ; 11,33 (s, 1H).

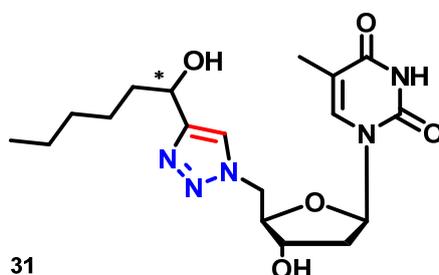
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,5 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,1 ; 31,7 ; 37 ; 38,4 ; 51,6 ; 66,0 ; 71,3 ; 84,4 ; 84,5 ; 110,3 ; 122,8 ; 136,4 ; 150,9 ; 152,4 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 576,4125  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 576,4120  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(((R/S)-1-hydroxyhexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (31)

215 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,8 mmol, 1 équivalent) et 101 mg du mélange racémique de oct-1-yn-3-ol (0,8 mmol, 1 équivalents) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 31,5 mg de d'ascorbate de sodium (0,16 mmol, 0,2 équivalent) et 13 mg de sulfate de cuivre (0,08 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15). 255 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 78 %).

$R_f$  : 0,48 (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,83 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 1,24 (m, 6H) ; 1,68 (m, 2H) ; 1,81 (s, 3H) ; 4,06 (m, 1H) ; 4,27 (m, 1H) ; 4,62 (m, 3H) ; 5,2 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,5 (s, 1H) ; 6,17 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,37 (s, 1H) ; 7,89 (s, 1H).

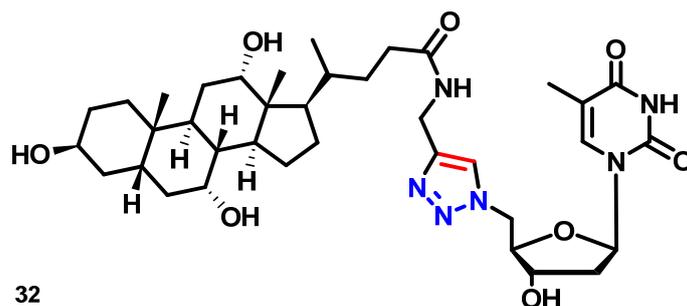
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,5 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,1 ; 31,7 ; 37 ; 38,4 ; 51,6 ; 66,0 ; 71,3 ; 84,4 ; 84,5 ; 110,3 ; 122,8 ; 136,4 ; 150,9 ; 152,4 ; 164,1.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 416,1910 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 416,1897 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (31)

200 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,75 mmol, 1 équivalent) et 334 mg d'amide N-propargylcholique (**11**) (0,75 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 20 mL THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 11 mg de sulfate de cuivre (0,07 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 65 °C pendant 10 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol de 90/10 à 80/20). 333 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 62 %).

R<sub>f</sub> : 0,4 (acétate d'éthyle/méthanol, 7/3)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,7 (s, 3H) ; 0,93 (s, 3H) ; 1-1,85 (m, 25H) ; 1,91 (s, 3H) ; 1,93-2,32 (m, 10H) ; 3,81 (m, 1H) ; 3,95 (m, 1H) ; 4,10-4,18 (m, 2H) ; 4,41 (s, 3H) ; 4,64-4,80 (m, 2H) ; 6,21 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,31 (s, 1H) ; 7,88 (s, 1H).

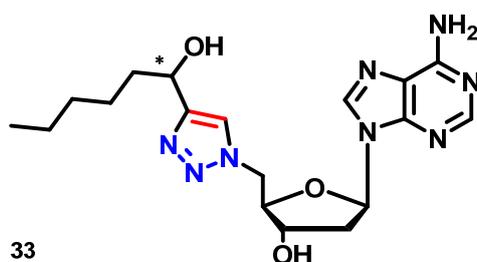
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 11,1 ; 11,6 ; 13,1 ; 16,3 ; 19,5 ; 21,8 ; 22,8 ; 26,5 ; 27,3 ; 28,2 ; 29,8 ; 31,8 ; 32,5 ; 34,2 ; 34,4 ; 34,5 ; 35,1 ; 35,5 ; 38,2 ; 39,1 ; 39,6 ; 41,6 ; 41,8 ; 46,1 ; 46,5 ; 51,3 ; 60,2 ; 67,7 ; 71,1 ; 71,5 ; 72,6 ; 84,2 ; 85,5 ; 110,6 ; 124,0 ; 136,8 ; 150,8 ; 164,9 ; 175,3.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 713,4238 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 713,4266 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(((R/S)-1-hydroxyhexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2'-désoxyadénosine (**33**)

200 mg de 5'-azido-5',2'-didésoxyadénosine (**2**) (0,72 mmol, 1 équivalent) et 95 mg du mélange racémique d'oct-1-yn-3-ol (0,72, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 30 mg d'ascorbate de sodium (0,15 mmol, 0,2 équivalent) et 12 mg de sulfate de cuivre (0,072 mmol 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 80/20). 240 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 80 %).

R<sub>f</sub> : 0,47 (acétate d'éthyle/méthanol, 80/20)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,84 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,25 (s, 6H) ; 1,67-1,74 (m, 2H) ; 2,45-2,53 (m, 1H) ; 2,84-2,99 (m, 1H) ; 4,30-4,37 (m, 1H) ; 4,66-4,74 (m, 2H) ; 4,82 (s, 2H) ; 6,38-6,48 (m, 1H) ; 7,72 (s, 1H) ; 8,16 (s, 1H) ; 8,21 (s, 1H).

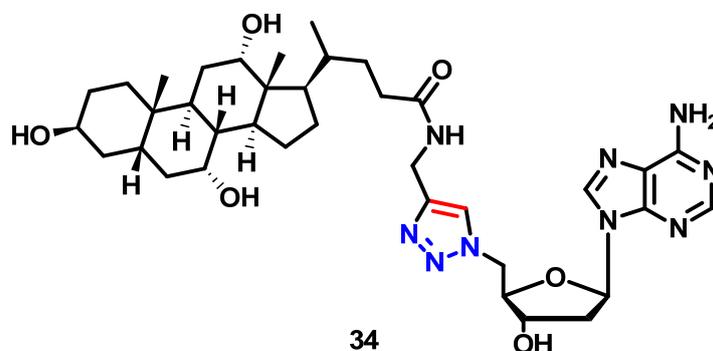
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 13,0 ; 22,2 ; 24,8 ; 31,4 ; 36,9 ; 38,3 ; 51,6 ; 66,1 ; 71,5 ; 84,7 ; 85,2 ; 119,3 ; 122,7 ; 140,1 ; 148,9 ; 151,5 ; 152,5 ; 155,9.

HRMS [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 425,2026 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 425,2041 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2'-désoxyadénosine (34)

100 mg de 5'-azido-5',2'-didésoxyadénosine (**2**) (0,36 mmol, 1 équivalent) et 161,3 mg d'amide N-propargylcholique (**11**) (0,36 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 16 mg de d'ascorbate de sodium (0,08 mmol, 0,2 équivalent) et 6 mg de sulfate de cuivre (0,04 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 65 °C pendant 10 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol de 90/10 à 70/30). 80 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt : 34 %).

R<sub>f</sub> : 0,54 (acétate d'éthyle/méthanol, 5/5)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,56 (s, 3H) ; 0,80 (s, 3H) ; 0,89-2,19 (m, 30H) ; 2,65-2,80 (m, 1H) ; 2,90-3,05 (m, 1H) ; 3,15-3,25 (m, 1H) ; 3,61 (m, 1H) ; 3,76 (m, 1H) ; 3,98-4,15 (m, 3H) ; 4,24-4,33 (m, 3H) ; 4,50-4,55 (m, 1H) ; 4,71-4,81 (m, 2H) ; 6,26 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 7,31 (s, 1H) ; 7,89 (s, 1H) ; 8,14 (s, 1H) ; 8,26 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 8,35 (s, 1H).

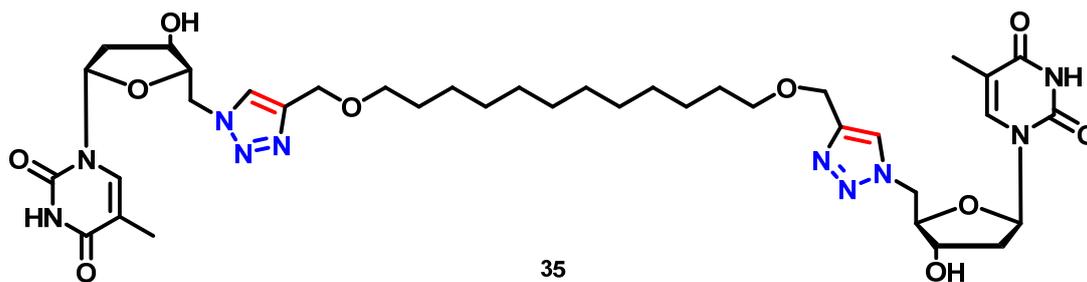
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,8 ; 14,6 ; 17,3 ; 17,6 ; 21,3 ; 23,1 ; 23,3 ; 26,6 ; 26,7 ; 27,7 ; 27,8 ; 29,1 ; 30,9 ; 32,0 ; 32,1 ; 32,8 ; 34,6 ; 34,9 ; 35,4 ; 35,6 ; 35,7 ; 35,8 ; 37,7 ; 37,8 ; 38,8 ; 41,8 ; 41,9 ; 42,0 ; 46,1 ; 46,2 ; 46,6 ; 50,0 ; 50,1 ; 60,3 ; 61,6 ; 66,7 ; 66,8 ; 70,8 ; 70,9 ; 71,6 ; 81,0 ; 83,1 ; 119,4 ; 124,0 ; 139,2 ; 145,6 ; 149,5 ; 153,1 ; 156,4 ; 173,0.

TOF MS ES+ [M+H]<sup>+</sup> : 722,7 g.mol<sup>-1</sup>.

**1,1'-(2R,2'R,4S,4'S,5R,5'R)-5,5'-(4,4'-(dodécane-1,12-diylbis(oxy)))bis(méthylène)bis(1H-1,2,3-triazole-4,1-diyl))bis(méthylène)bis(4-hydroxytétrahydrofuran-5,2-diyl)bis(5-méthylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione) (35)**

100 mg de 5'-azido-5'-désoxythymidine (**1**) (0,375 mmol, 1 équivalent) et 52 mg de 1,12-dipropargyloxydodécane (**14**) (0,1875 mmol, 0,5 équivalent) sont dissous dans 10 mL d'un mélange THF/eau (1/1). 15 mg de d'ascorbate de sodium (0,075 mmol, 0,2 équivalent) et 6 mg de sulfate de cuivre (0,0375 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. Le composé est obtenu pur par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2). 90 mg d'un solide blanc sont obtenus (Rdt 59 %).

R<sub>f</sub> : 0,54 (acétate d'éthyle/méthanol, 7/3).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD  $d_4$ ) : 1,28 (m, 16H) ; 0,83 (m, 4H) ; 1,89 (s, 6H) ; 2,17 (s, 2H) ; 2,25 (m, 4H) ; 3,51 (t,  $J = 6$  Hz, 4H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,42 (m, 2H) ; 4,58 (s, 4H) ; 4,76 (m,  $J = 6$  Hz, 4H) ; 6,21 (t,  $J = 6$  Hz, 2H) ; 7,23 (s, 2H) ; 7,99 (s, 2H).

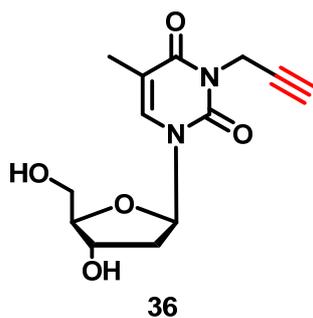
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,5 ; 26,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 38,4 ; 51,5 ; 63,7 ; 70,0 ; 71,2 ; 84,4 ; 110,3 ; 125,0 ; 136,5 ; 144,7 ; 150,9 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 835,4079  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 835,4074  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### N3-propargylthymidine (36)

1 g de thymidine (4,1 mmol, 1 équivalent) est dissous dans 50 mL de DMF anhydre. 849,9 mg de carbonate de potassium (6,15 mmol, 1,5 équivalents) et 491,2 mg de bromure de propargyle (4,1 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 100 mL de d'acétate d'éthyle puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 692 mg de produit sont obtenus après précipitation dans l'acétonitrile (Rdt : 60 %).

$R_f$ : 0,48 (acétate d'éthyle/méthanol, 80/10).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 1,85 (s, 3H) ; 2,10-2,18 (m, 2H) ; 3,10 (s, 1H) ; 3,59 (m, 2H) ; 3,79 (s, 1H) ; 4,25 (m, 1H) ; 4,53 (s, 2H) ; 5,04 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,27 (s, 1H) ; 6,21 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,82 (s, 1H).

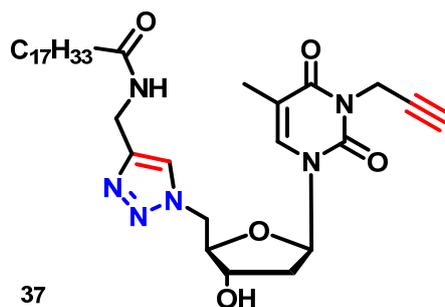
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 13,0 ; 30,3 ; 40,3 ; 62,0 ; 70,9 ; 71,1 ; 78,2 ; 86,0 ; 87,1 ; 116,9 ; 135,2 ; 150,2 ; 162,7.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 281,1137  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 281,1135  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

#### **5'-(4-((oléoylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (37)**

100 mg de 5'-(4-((oléoylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**28**) (0,17 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 25 mL de DMF anhydre. 36 mg de carbonate de potassium (0,26 mmol, 1,5 équivalent) et 20 mg de bromure de propargyle (0,17 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 80 mg de produit sont obtenus (Rdt : 65 %).

$R_f$ : 0.4 (hexane/acétate d'éthyle, 85/15).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,89 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,28 (s, 20H) ; 1,57-1,63 (m, 2H) ; 1,84 (s, 3H) ; 2,00-2,02 (m, 4H) ; 2,19 (t,  $J = 6$ Hz, 2H) ; 2,25 (s, 1H) ; 2,35-2,41 (m, 2H) ; 4,24-4,28 (m, 1H) ; 4,47-4,51 (m, 3H) ; 4,65-4,74 (m, 4H) ; 5,35 (t,  $J = 6$  Hz, 2H) ; 6,16 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 6,52 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,78 (s, 1H).

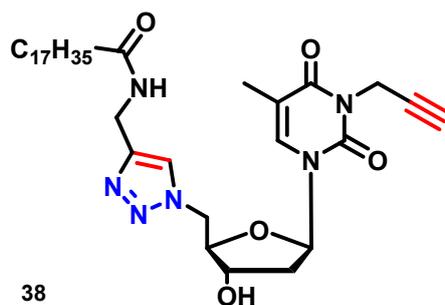
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 13,2 ; 14,2 ; 22,7 ; 25,6 ; 27,2 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 30,5 ; 31,9 ; 34,7 ; 36,5 ; 38,7 ; 51,4 ; 70,9 ; 71,4 ; 77,3 ; 78,1 ; 84,1 ; 87,3 ; 110,7 ; 124,3 ; 129,7 ; 130,0 ; 134,9 ; 144,9 ; 150,0 ; 162,3 ; 173,7.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 647,3897  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 647,3923  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((stéaroylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (38)

100 mg de 5'-(4-((stéaroylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**25**) (0,17 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL de DMF anhydre. 36 mg de carbonate de potassium (0,26 mmol, 1,5 équivalents) et 20 mg de bromure de propargyle (0,17 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 80 mg de produit sont obtenus (Rdt : 75 %).

$R_f$ : 0,6 (hexane/acétate d'éthyle, 90/10).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,89 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,27 (s, 20H) ; 1,55-1,65 (m, 2H) ; 1,74-1,79 (m, 3H) ; 1,97 (s, 3H) ; 2,03-2,09 (m, 4H) ; 2,19 (t,  $J = 6$ Hz, 2H) ; 2,21-2,26 (m, 4H) ; 2,37-2,41 (m, 2H) ; 4,48-4,52 (m, 4H) ; 4,64-4,76 (m, 4H) ; 6,18 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 6,39 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 6,89 (s, 1H) ; 7,73 (s, 1H).

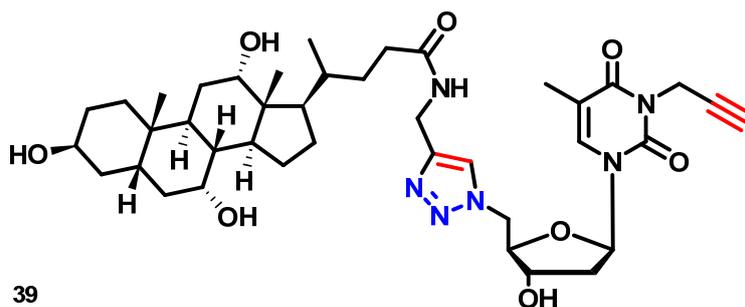
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 13,2 ; 14,2 ; 22,7 ; 25,6 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,7 ; 30,5 ; 32,0 ; 34,8 ; 36,5 ; 38,8 ; 51,2 ; 70,9 ; 71,5 ; 77,2 ; 78,1 ; 83,9 ; 87,1 ; 110,8 ; 124,2 ; 134,8 ; 150,0 ; 162,2 ; 173,6.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 627,4234  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 627,4230  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (39)

100 mg de 5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**32**) (0,14 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL de DMF anhydre. 39 mg de carbonate de potassium (0,28 mmol, 2 équivalents) et 25 mg de bromure de propargyle (0,17 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL d'acétate d'éthyle puis successivement lavé par deux fois 10 mL d'eau et une fois par 10 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 88 mg de produit sont obtenus (Rdt : 83 %).

$R_f$  : 0,3 (acétate d'éthyle/méthanol, 80/20).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,57 (s, 3H) ; 0,80 (s, 3H) ; 0,85-1,81 (m, 30H) ; 1,88 (s, 3H) ; 1,93-2,28 (m, 9H) ; 3,11 (s, 1H) ; 3,14-3,22 (m, 1H) ; 3,61 (s, 1H) ; 3,67 (s, 1H) ; 4,02-4,15 (m, 4H) ; 4,25-4,29 (m, 3H) ; 4,35 (d,  $J = 3$  Hz, 1H) ; 4,52 (s, 2H) ; 4,57-4,73 (m, 2H) ; 5,58 (d,  $J = 3$  Hz, 1H) ; 6,22 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,49 (s, 1H) ; 7,70 (m, 1H) ; 7,89 (s, 1H) ; 8,27 (t,  $J = 6$  Hz, 1H).

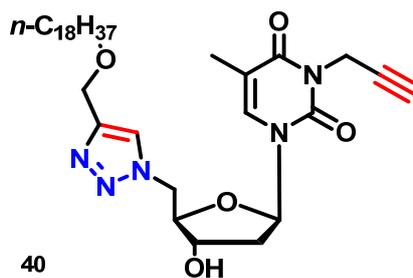
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ): 11,3 ; 12,8 ; 13,1 ; 14,4 ; 17,6 ; 22,9 ; 23,1 ; 23,3 ; 23,7 ; 26,7 ; 27,8 ; 28,8 ; 29,0 ; 30,3 ; 30,5 ; 30,9 ; 32,1 ; 32,7 ; 34,6 ; 34,8 ; 35,3 ; 35,6 ; 35,8 ; 38,4 ; 38,5 ; 41,8 ; 42,0 ; 46,2 ; 46,5 ; 51,5 ; 66,7 ; 67,9 ; 70,9 ; 71,2 ; 71,5 ; 73,5 ; 79,5 ; 84,7 ; 85,7 ; 109,5 ; 118,6 ; 123,9 ; 129,1 ; 132,1 ; 132,2 ; 135,7 ; 145,6 ; 150,2 ; 162,2 ; 167,5 ; 173,1.

TOF MS ES+  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : 773,8  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (40)

100 mg de 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**18**) (0,17 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL de DMF anhydre. 36 mg de carbonate de potassium (0,26 mmol, 1,5 équivalents) et 20 mg de bromure de propargyle (0,17 mmol, 1 équivalent) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 85 mg de produit sont obtenus (Rdt : 80 %).

R<sub>f</sub>: 0,3 (acétate d'éthyle, 100).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,89 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,27 (m, 24H) ; 1,59 (m, 2H) ; 1,75 (s, 4H) ; 1,94 (s, 3H) ; 2,21 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 2,31 (m, 2H) ; 3,50 (t, *J* = 6 Hz, 2H) ; 4,23 (s, 1H) ; 4,55 (m, 1H) ; 4,60 (m, 2H) ; 4,72 (s, 4H) ; 6,26 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 6,72 (s, 1H) ; 7,65 (s, 1H).

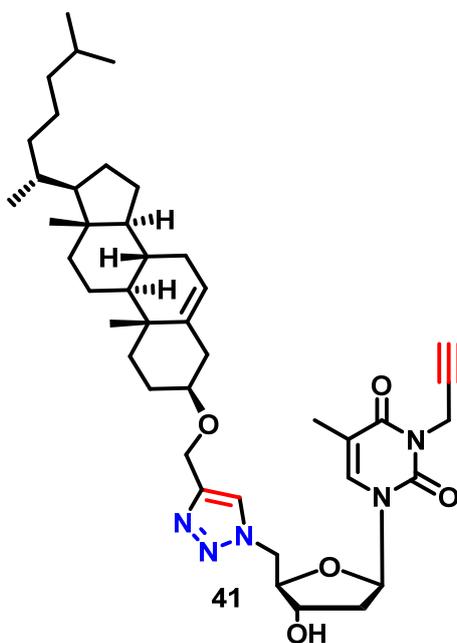
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 11,0 ; 13,2 ; 14,1 ; 14,2 ; 22,7 ; 23,0 ; 23,7 ; 26,1 ; 28,9 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 30,4 ; 30,5 ; 32,0 ; 38,7 ; 51,0 ; 64,1 ; 68,2 ; 70,9 ; 71,3 ; 77,3 ; 78,1 ; 83,8 ; 86,9 ; 110,9 ; 128,8 ; 131,0 ; 134,6 ; 150,1 ; 162,2.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 636,4101 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 636,4114 g.mol<sup>-1</sup>.

### 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (41)

70 mg de 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**23**) (0,1 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 10 mL de DMF anhydre. 27 mg de carbonate de potassium (0,2 mmol, 2 équivalents) et 14 mg de bromure de propargyle (0,12 mmol, 1,2 équivalents) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 85 mg de produit sont obtenus (Rdt : 95 %).

R<sub>f</sub>: 0,53 (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,67 (s, 3H) ; 0,85-1,65 (m, 36H) ; 1,75-1,99 (m, 9H) ; 2,05-2,4 (m, 5H) ; 3,30 (m, 1H) ; 4,41 (s, 1H) ; 4,52 (s, 1H) ; 4,69 (m, 4H) ; 5,32 (s, 1H) ; 6,22 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 6,79 (s, 1H) ; 7,67 (s, 1H).

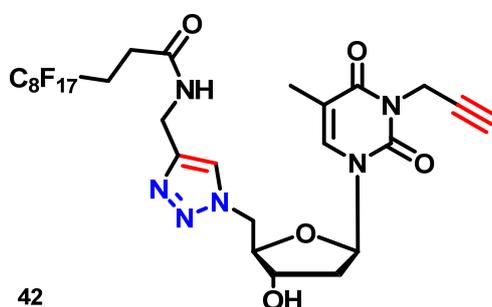
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 11,9 ; 13,2 ; 18,7 ; 19,4 ; 21,1 ; 22,6 ; 22,8 ; 23,8 ; 24,3 ; 28,0 ; 28,2 ; 29,7 ; 30,5 ; 31,9 ; 35,8 ; 36,2 ; 36,8 ; 37,1 ; 38,7 ; 39,0 ; 39,5 ; 39,7 ; 42,3 ; 50,1 ; 51,0 ; 56,1 ; 56,7 ; 60,4 ; 61,4 ; 70,8 ; 71,1 ; 78,1 ; 79,3 ; 83,8 ; 86,6 ; 110,8 ; 122,0 ; 124,9 ; 134,6 ; 140,5 ; 145,9 ; 150,1 ; 162,2.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 730,4907  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 730,4938  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**5'-(4-((1H,1H,2H,2H-perfluoroundécanylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (42)**

200 mg de 5'-(4-((1H,1H,2H,2H-perfluoroundécanylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**26**) (0,25 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 20 mL de DMF anhydre. 69 mg de carbonate de potassium (0,5 mmol, 2 équivalents) et 59,5 mg de bromure de propargyle (0,5 mmol, 2 équivalents) sont ajoutés. Le mélange est alors agité une nuit à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 203 mg de produit sont obtenus (Rdt : 96 %).

$R_f$  : 0,53 (acétate d'éthyle/méthanol, 90/10).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 1,87 (s, 3H) ; 2,09-2,19 (m, 2H) ; 2,43-2,47 (m, 2H) ; 3,1 (s, 1H) ; 4,05-4,15 (m, 1H) ; 4,31 (d, J = 6 Hz, 3H) ; 4,52 (s, 2H) ; 4,57-4,73 (m, 2H) ; 5,55 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 6,22 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,49 (s, 1H) ; 7,93 (s, 1H) ; 8,54 (t, J = 6 Hz, 1H).

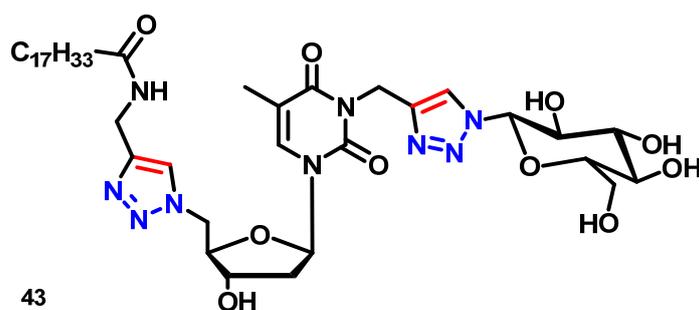
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 13,0 ; 26,1 ; 30,5 ; 34,8 ; 38,4 ; 51,6 ; 71,2 ; 73,5 ; 79,5 ; 84,7 ; 85,7 ; 109,5 ; 110,3 ; 124,0 ; 135,7 ; 145,1 ; 150,2 ; 162,2 ; 169,7.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 857,1356 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 857,1390 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((oléoylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (43)**

80 mg de 5'-(4-((oléamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)-thymidine (0,13 mmol, 1 équivalent), 6 mg d'ascorbate de sodium (0,03 mmol, 0,2 équivalent) et 2 mg de sulfate de cuivre (0,01 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 27 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,13 mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 100 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 95/5 à 80/20) (Rdt : 93 %).

R<sub>f</sub> : 0,5 (acétate d'éthyle/méthanol, 6/4).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,85 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 1,24 (s, 20H) ; 1,45-1,49 (m, 2H) ; 1,88 (s, 3H) ; 1,96-2,0 (m, 4H) ; 2,03-2,09 (m, 3H) ; 2,15-2,20 (m, 2H) ; 3,18-3,24 (m, 1H) ; 3,66-3,75 (m, 2H) ; 4,08-4,12 (m, 1H) ; 4,27 (d, J = 6 Hz, 3H) ; 4,64-4,67 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,18 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,32-5,36 (m, 4H) ; 5,48 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 5,57 (s, 1H) ; 6,23 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,50 (s, 1H) ; 7,90 (s, 1H) ; 8,11 (s, 1H) ; 8,29 (t, J = 6 Hz, 1H).

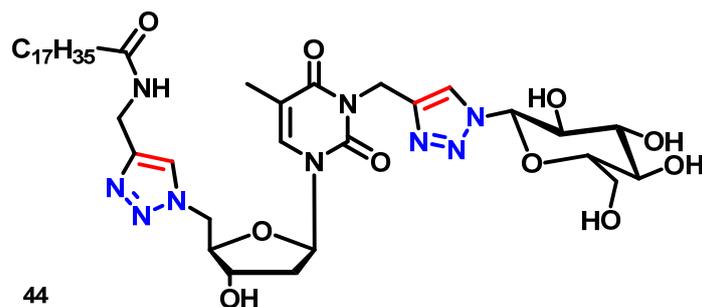
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 13,2 ; 14,4 ; 22,6 ; 25,7 ; 27,0 ; 27,1 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 31,8 ; 34,5 ; 35,6 ; 36,6 ; 38,5 ; 51,6 ; 61,1 ; 70,0 ; 71,2 ; 72,3 ; 77,4 ; 80,4 ; 84,7 ; 85,6 ; 87,9 ; 109,6 ; 122,9 ; 123,9 ; 130,1 ; 135,6 ; 143,1 ; 145,6 ; 150,7 ; 162,8 ; 172,6.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 852,4596 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 852,4604 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((stéaroylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (44)**

200 mg de 5'-(4-((stéaramide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)thymidine (**38**) (0,32 mmol, 1 équivalent), 12 mg d'ascorbate de sodium (0,06 mmol, 0,2 équivalent) et 5 mg de sulfate de cuivre (0,03 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 66 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,32 mmol, 1 équivalent) en solution dans 20 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 186 mg de produits sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 95/5 à 80/20) (Rdt : 70 %).

R<sub>f</sub> : 0,5 (acétate d'éthyle/méthanol, 6/4).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,85 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,23 (m, 30H) ; 1,47 (m, 2H) ; 1,88 (s, 3H) ; 2,06 (m, 2H) ; 2,18 (m, 2H) ; 3,22 (m, 1H) ; 3,71 (m, 3H) ; 4,09 (m, 1H) ; 4,27 (d,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 4,66 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,16 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,27 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,36 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 5,48 (d,  $J = 9$  Hz, 1H) ; 5,55 (d,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 6,23 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,50 (s, 1H) ; 7,89 (s, 1H) ; 8,11 (s, 1H) ; 8,28 (t,  $J = 6$  Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 13,2 ; 14,5 ; 22,6 ; 25,7 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 31,8 ; 34,5 ; 35,7 ; 36,6 ; 38,6 ; 51,6 ; 61,1 ; 70,0 ; 71,2 ; 72,3 ; 77,4 ; 80,4 ; 84,7 ; 85,6 ; 87,9 ; 109,6 ; 122,9 ; 123,9 ; 135,5 ; 143,0 ; 145,6 ; 150,7 ; 162,8 ; 172,6.

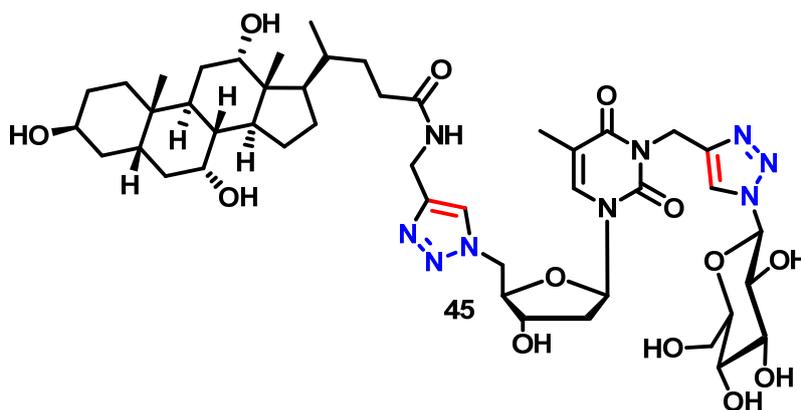
HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 854,4775  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 854,4752  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-(( $\beta$ -D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (45)**

105 mg de 5'-(4-((choloylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-propargylthymidine (**39**) (0,14 mmol, 1 équivalent), 6 mg d'ascorbate de sodium (0,03 mmol, 0,2 équivalent) et 3 mg de sulfate de cuivre (0,02 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 27 mg de 1-azido- $\beta$ -(D)-glucopyranoside (0,14 mmol, 1 équivalent) en solution dans 10 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est

adsorbé sur silice. 122 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 95/5 à 85/15) (Rdt : 92 %).

R<sub>f</sub> : 0,21 (acétate d'éthyle/méthanol, 6/4).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,57 (s, 3H) ; 0,81 (s, 3H) ; 0,90-1,80 (m, 24H) ; 1,88 (s, 3H) ; 1,96-2,24 (m, 6H) ; 3,20-3,78 (m, 11H) ; 4,03 (m, 1H) ; 4,10-4,27 (m, 2H), 4,57-4,73 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,47 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 6,23 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,48 (s, 1H) ; 7,90 (s, 1H) ; 8,11 (s, 1H) ; 8,30 (t, J = 6 Hz, 1H).

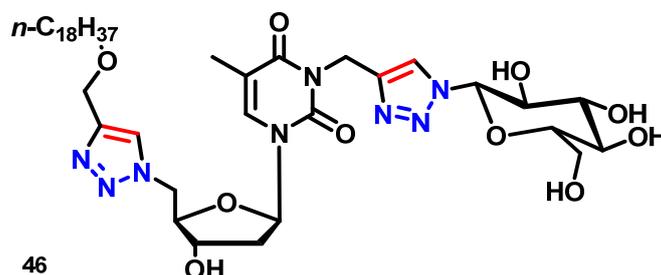
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 12,8 ; 13,2 ; 17,6 ; 23,1 ; 23,2 ; 25,6 ; 26,7 ; 27,7 ; 29,0 ; 30,8 ; 32,1 ; 32,8 ; 34,5 ; 34,8 ; 35,6 ; 41,8 ; 42,0 ; 46,2 ; 46,5 ; 51,5 ; 61,1 ; 66,7 ; 69,9 ; 71,13 ; 71,46 ; 72,4 ; 77,4 ; 80,5 ; 84,7 ; 85,6 ; 88,0 ; 109,5 ; 122,9 ; 123,9 ; 135,5 ; 143,03 ; 145,6 ; 150,7 ; 162,8 ; 173,1.

TOF MS ES+ [M+Na]<sup>+</sup> : 978,6 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (46)**

120 mg de 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)-thymidine (40) (0,19 mmol, 1 équivalent), 8 mg d'ascorbate de sodium (0,04 mmol, 0,2 équivalent) et 3 mg de sulfate de cuivre (0,02 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 39 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,19 mmol, 1 équivalent) en solution dans 10 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 110 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 98/2 à 80/20) (Rdt : 69 %).

R<sub>f</sub>: 0,75 (acétate d'éthyle/méthanol, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,85 (t, *J* = 6 Hz, 3H) ; 1,23 (m, 30H) ; 1,47 (m, 2H) ; 1,87 (s, 3H) ; 2,06 (m, 2H) ; 2,18 (m, 2H) ; 3,22 (m, 1H), 3,70 (m, 2H) ; 4,12 (s, 1H) ; 4,29 (s, 1H) ; 4,65 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,16 (d, *J* = 6 Hz, 1H) ; 5,27 (d, *J* = 6 Hz, 1H) ; 5,35 (d, *J* = 6 Hz, 1H) ; 5,48 (d, *J* = 9 Hz, 1H) ; 5,57 (d, *J* = 6 Hz, 1H) ; 6,24 (t, *J* = 6 Hz, 1H) ; 7,46 (s, 1H) ; 8,08 (s, 1H) ; 8,10 (s, 1H).

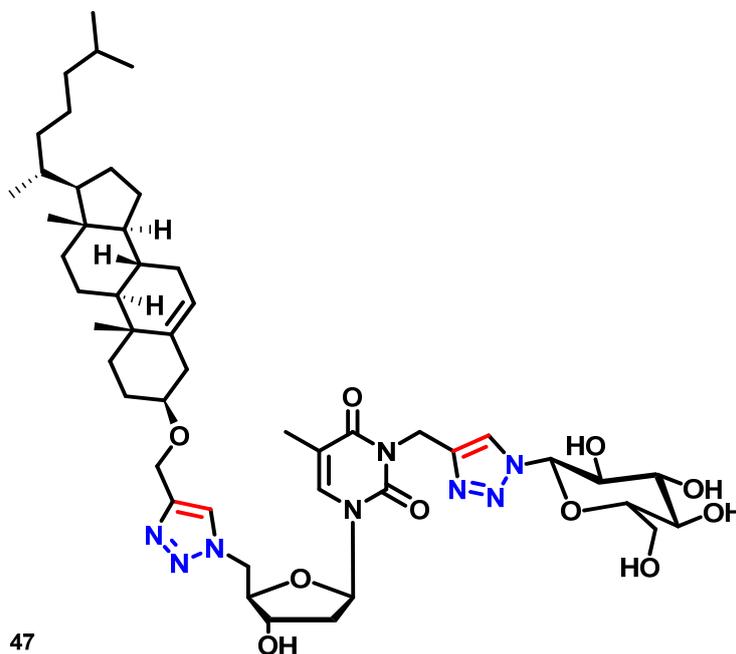
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 13,1 ; 14,4 ; 22,6 ; 26,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 31,8 ; 36,6 ; 38,6 ; 51,5 ; 61,1 ; 63,7 ; 70,0 ; 71,1 ; 72,4 ; 77,5 ; 80,4 ; 84,6 ; 85,7 ; 87,9 ; 109,5 ; 122,9 ; 125,1 ; 135,6 ; 143,1 ; 144,7 ; 150,7 ; 162,7.

HRMS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée : 841,4800 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 841,4828 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (47)**

65 mg de 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)-thymidine (41) (0,08 mmol, 1 équivalent), 4 mg d'ascorbate de sodium (0,02 mmol, 0,2 équivalent) et 2 mg de sulfate de cuivre (0,01 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 18 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,08 mmol, 1 équivalent) en solution dans 10 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 50 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 90/10 à 80/20) (Rdt : 60 %).

R<sub>f</sub>: 0,3 (acétate d'éthyle/méthanol, 7/3).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,65 (s, 3H) ; 0,85-1,65 (m, 36H) ; 1,75-1,99 (m, 9H) ; 2,05-2,4 (m, 5H) ; 3,22 (m, 2H) ; 3,69 (m, 3H) ; 4,12 (m, 1H) ; 4,29 (m, 1H) ; 4,53 (s, 1H) ; 4,68 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,18 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,27 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,37 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,48 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 5,59 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 6,22 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,46 (s, 1H) ; 8,07 (s, 1H) ; 8,11 (s, 1H).

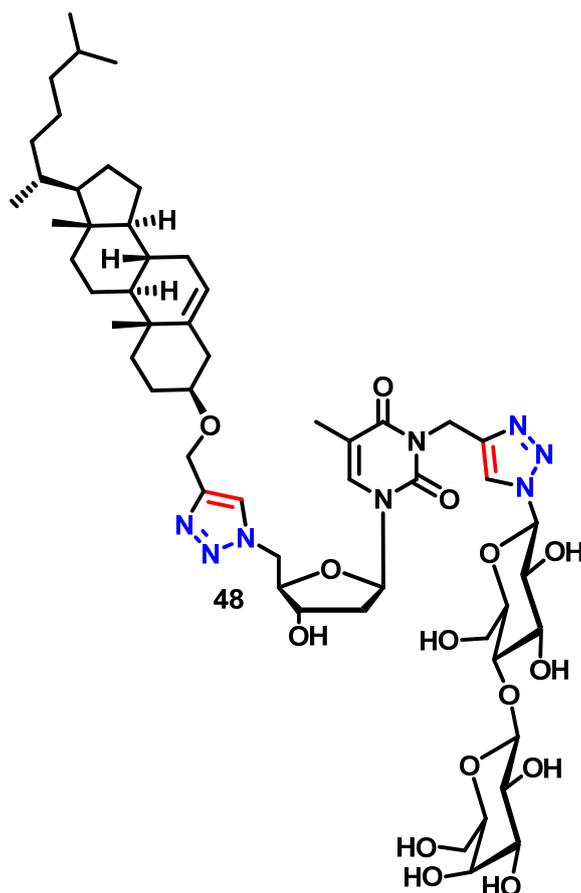
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 12,2 ; 13,2 ; 14,6 ; 19,0 ; 19,5 ; 21,2 ; 21,3 ; 22,9 ; 23,2 ; 23,7 ; 24,4 ; 27,9 ; 28,4 ; 28,5 ; 31,9 ; 35,7 ; 36,2 ; 36,6 ; 36,8 ; 37,2 ; 38,6 ; 42,4 ; 50,1 ; 51,5 ; 56,1 ; 56,7 ; 59,8 ; 60,3 ; 61,0 ; 61,2 ; 70,0 ; 71,2 ; 72,4 ; 77,5 ; 78,2 ; 80,5 ; 84,6 ; 85,7 ; 87,9 ; 109,6 ; 121,7 ; 123,0 ; 125,0 ; 135,6 ; 140,9 ; 143,1 ; 145,2 ; 150,7 ; 162,8.

HRMS [M+Na]<sup>+</sup> : masse calculée 957,5426 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 957,5427 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-lactopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (48)**

190 mg de 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)-thymidine (**41**) (0,26 mmol, 1 équivalent), 12 mg d'ascorbate de sodium (0,06 mmol, 0,2 équivalent) et 5 mg de sulfate de cuivre (0,03 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 95 mg de 1-azido-1-déoxy-β-(D)-lactopyranoside (0,26 mmol, 1 équivalent) en solution dans 15 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 110 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 80/20 à 60/40) (Rdt : 38 %).

R<sub>f</sub> : 0,3 (acétate d'éthyle/méthanol, 4/6).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,64-1,80 (m, 32H) ; 1,87 (s, 3H) ; 1,90-2,35 (m, 5H) ; 3,05-4,13 (m, 24H) ; 4,13 (m, 1H) ; 4,26 (m, 2H) ; 4,52-5,15 (m, 10H) ; 5,19 (m, 1H) ; 5,58 (d,  $J = 9$  Hz, 1H) ; 6,22 (t,  $J = 6$  Hz, 1H) ; 7,45 (s, 1H) ; 8,06 (s, 1H) ; 8,13 (s, 1H).

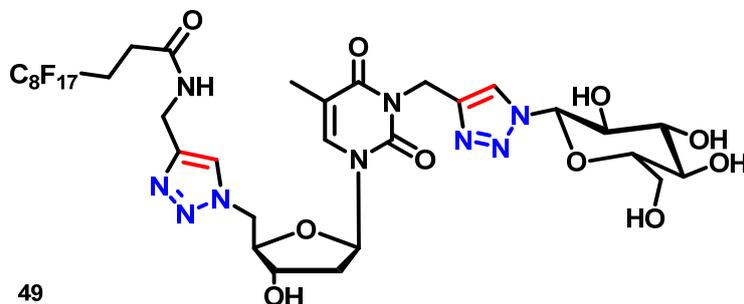
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 12,1 ; 13,2 ; 19,0 ; 19,5 ; 21,1 ; 22,9 ; 23,1 ; 23,8 ; 24,3 ; 27,9 ; 28,3 ; 31,2 ; 31,8 ; 35,8 ; 36,3 ; 36,7 ; 37,2 ; 38,6 ; 42,3 ; 50,1 ; 51,5 ; 56,1 ; 56,7 ; 60,8 ; 68,5 ; 71,0 ; 71,1 ; 72,1 ; 73,7 ; 75,6 ; 76,1 ; 78,3 ; 80,0 ; 84,6 ; 85,7 ; 87,4 ; 104,2 ; 109,5 ; 121,6 ; 122,9 ; 124,9 ; 135,5 ; 140,8 ; 143,1 ; 145,1 ; 150,7 ; 162,8.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 1119,5954  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 1119,5986  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**5'-(4-((1H,1H,2H,2H-perfluoroundécane)amide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(1-((β-D-glucopyranoside)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)thymidine (49)**

200 mg de 5'-(4-((1H,1H,2H,2H-perfluoroundécane)amide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N3-(propargyl)thymidine (**42**) (0,24 mmol, 1 équivalent), 10 mg d'ascorbate de sodium (0,05 mmol, 0,2 équivalent) et 4 mg de sulfate de cuivre (0,02 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 49 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,24 mmol, 1 équivalent) en solution dans 20 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est alors refroidi à température ambiante. Les solvants sont ensuite éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 186 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 90/10 à 80/20) (Rdt : 48 %).

R<sub>f</sub>: 0,4 (acétate d'éthyle/méthanol, 65/35).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 1,88 (s, 3H) ; 2,10-2,23 (m, 2H) ; 2,44 (m, 2H) ; 3,18-3,24 (m, 1H) ; 3,64-3,75 (m, 2H) ; 4,08-4,12 (m, 1H) ; 4,32 (d, J = 6 Hz, 3H) ; 4,60-4,72 (m, 3H) ; 5,05 (s, 2H) ; 5,17 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,28 (d, J = 3 Hz, 1H) ; 5,37 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 5,49 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 5,57 (s, 1H) ; 6,23 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 7,50 (s, 1H) ; 7,96 (s, 1H) ; 8,11 (s, 1H) ; 8,57 (t, J = 6 Hz, 1H).

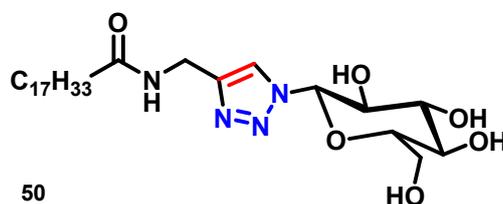
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 13,1 ; 26,1 ; 34,8 ; 36,6 ; 38,5 ; 51,6 ; 61,1 ; 70,0 ; 71,2 ; 72,3 ; 77,4 ; 80,4 ; 84,6 ; 85,6 ; 87,9 ; 109,6 ; 122,9 ; 124,0 ; 135,6 ; 143,1 ; 145,1 ; 150,7 ; 162,8 ; 169,8.

HRMS (ESI) :  $[M+Na]^+$  : masse calculée : 1062,2055 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 1062,2065 g.mol<sup>-1</sup>.

### 1-(4-((oléamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-β-D-glucopyranoside (50)

200 mg d'amide N-propargyloleïque (**7**) (0,63 mmol, 1 équivalent), 6 mg d'ascorbate de sodium (0,03 mmol, 0,2 équivalent) et 2 mg de sulfate de cuivre (0,01 mmol, 0,1 équivalent) sont ajoutés à 128 mg de 1-azido-β-(D)-glucopyranoside (0,63 mmol, 1 équivalent) en solution dans 30 mL d'un mélange eau/THF (1/1). Le milieu réactionnel est ensuite agité et chauffé à 60 °C pendant 5 heures. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante. Les solvants sont alors éliminés sous pression réduite et le mélange réactionnel est adsorbé sur silice. 141 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, 95/5) (Rdt : 43 %).

R<sub>f</sub> : 0,4 (acétate d'éthyle/méthanol, 85/15).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 0,85 (t, J = 6 Hz, 3H) ; 1,24 (s, 20H) ; 1,46-1,49 (m, 2H) ; 1,97 (q, J = 6 Hz, 4H) ; 2,09 (t, J = 6 Hz, 2H) ; 2,51 (s, 4H) ; 3,17-3,25 (m, 1H) ; 3,42-3,46 (m, 1H) ; 3,66-3,74 (m, 2H) ; 4,29 (d, J = 6 Hz, 2H) ; 4,66 (t, J = 6 Hz, 1H) ; 5,18 (d, J = 6 Hz, 1H) ; 5,33-5,39 (m, 4H) ; 5,49 (d, J = 9 Hz, 1H) ; 8,05 (s, 1H) ; 8,30 (t, J = 6 Hz, 1H).

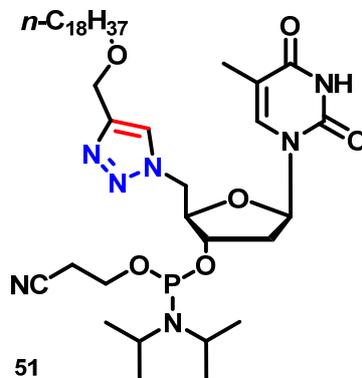
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) : 14,4 ; 22,6 ; 25,6 ; 27,0 ; 27,1 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,6 ; 31,8 ; 34,5 ; 35,7 ; 61,2 ; 72,5 ; 77,5 ; 80,4 ; 87,8 ; 122,3 ; 130,1 ; 145,5 ; 172,6.

HRMS (ESI)  $[M+Na]^+$  : masse calculée : 547,3472 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 547,3448 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-((octadécyloxyméthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (51)**

Sous atmosphère d'argon, 44 mg de DIEA (0,34 mmol, 2 équivalents), 60 mg de 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0,25 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à 100 mg de 5'-(4-((octadécyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**18**) (0,17mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 h à température ambiante. 5 mL de DCM anhydre sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 2 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 2 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 65 mg de composé sont isolés après purification par chromatographie sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 3/7) (Rdt : 49 %).

R<sub>f</sub> : 0,52 (hexane/acétate d'éthyle 3/7)



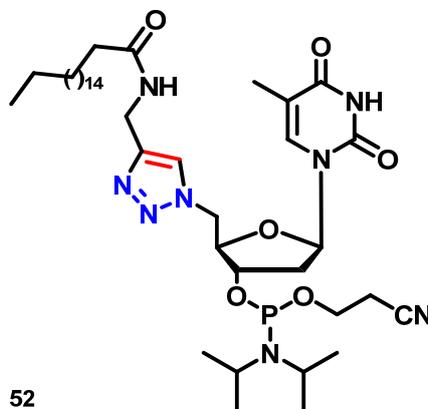
RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 152,1 ; 152,3.

HRMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> : masse calculée : 776,5203 g.mol<sup>-1</sup>, masse mesurée : 776,5184 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(((stéaroylamide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (52)**

Sous atmosphère d'argon, 44 mg de DIEA (0,34 mmol, 2 équivalents), 61 mg de 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0,26 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à 100 mg de 5'-(4-((stéaramide)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**25**) (0,15 mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 h à température ambiante. 5 mL de DCM anhydre sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 2 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 2 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 35 mg de composé sont isolés après purification par chromatographie sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 3/7) (Rdt : 29 %).

R<sub>f</sub> : 0,7 (hexane/acétate d'éthyle 2/8)

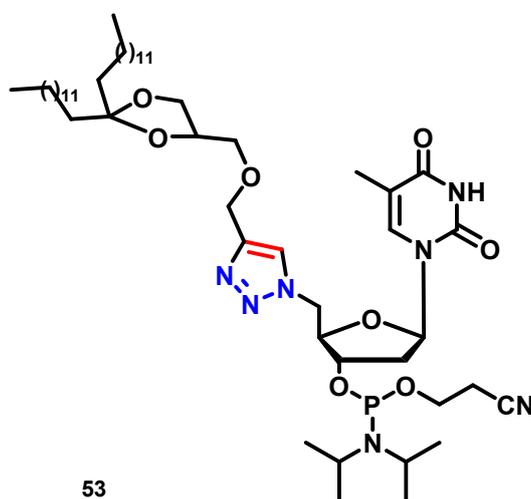


RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 152,2 ; 152,5.

**5'-((2R,4S,5R)-5-(4-(((R)-2,2-ditridécyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthoxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (53)**

Sous atmosphère d'argon, 34 mg DIEA (0,26 mmol, 2 équivalents), 45 mg de 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0,19 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à une solution de 100 mg de 5'-((2R,4S,5R)-5-(4-(((R)-2,2-ditridécyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthoxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**20**) (0,13 mmol, 1 équivalent) dans 5 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 h à température ambiante. 5 mL de DCM anhydre sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 2 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 2 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 70 mg de produit sont isolés après purification par chromatographie sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 1/9) (Rdt : 78 %).

R<sub>f</sub> : 0,6 (hexane/acétate d'éthyle 2/8).



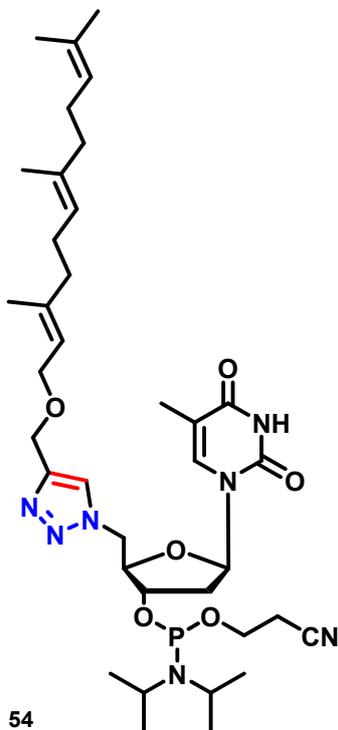
RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 152,2 ; 152,4.

TOF MS ES+ [M+Na]<sup>+</sup> : 996,9 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-((farnésyloxyméthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (54)**

Sous atmosphère d'argon, 49 mg de DIEA (0,38 mmol, 2 équivalents), 66 mg de 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0,28 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à 100 mg de 5'-(4-((farnésyloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**27**) (0.19 mmol, 1 équivalent) en solution dans 5 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 h à température ambiante. 5 mL de DCM anhydre sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 2 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 2 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 45 mg de composé sont isolés après purification par chromatographie sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 20/80) (Rdt : 49 %).

R<sub>f</sub> : 0,76 (hexane/acétate d'éthyle 3/7)



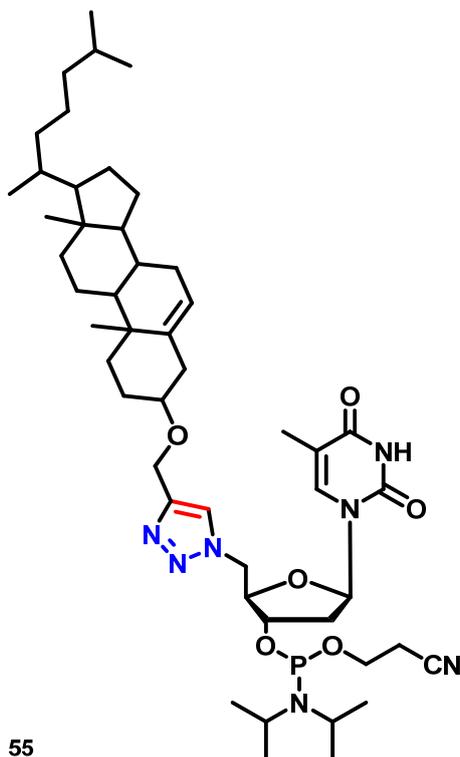
RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 152,2 ; 152,4.

TOF MS ES+ [M+Na]<sup>+</sup> : 750,7 g.mol<sup>-1</sup>.

**5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (55)**

Sous atmosphère d'argon, 26 mg DIEA (0,2 mmol, 2 équivalents), 35,5 mg 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0,15 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à une solution de 70 mg de 5'-(4-((cholestéryloxy)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-thymidine (**23**) (0,1 mmol, 1 équivalent) dans 5 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 h à température ambiante. 5 mL de DCM anhydre sont ajoutés puis le mélange est successivement lavé par deux fois 2 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 2 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 59 mg de produit sont isolés après purification sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 2/8) (Rdt : 65 %).

R<sub>f</sub> : 0,53 (hexane/acétate d'éthyle 2/8)



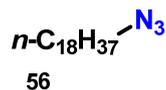
RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 152,3 ; 152,5.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 892,5829  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 892,5786  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 1-azido-octadécane (56)

2,5 g de 1-bromooctadécane (7,5 mmol, 1 équivalent) sont dissous dans 60 mL de DMF. 1,95 g d'azoture de sodium (30 mmol, 4 équivalents) sont ensuite ajoutés à la solution. Le mélange est alors agité 10 heures à 110 °C. Le milieu réactionnel est progressivement laissé refroidir à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 50 mL de DCM puis est successivement lavé par 2 fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 2,1 g de produit sont obtenus (Rdt : 95 %).

$R_f$  : 0,4 (hexane)



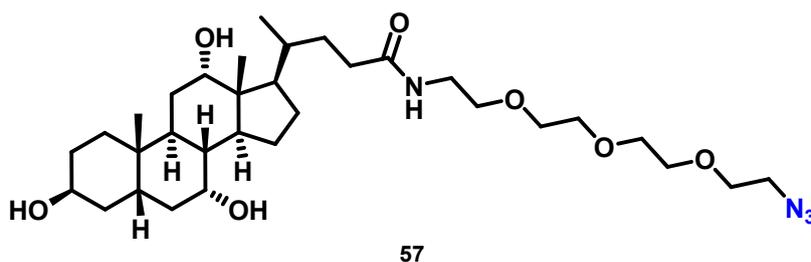
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,89 (t,  $J = 6$  Hz, 3H) ; 1,27 (s, 30H) ; 1,56-1,65 (m, 2H) ; 3,25 (t,  $J = 6$  Hz, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14,1 ; 22,7 ; 26,7 ; 28,9 ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 51,5.

**N-(2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)-4-(3,7,12-trihydroxy-10,13-diméthylhexadécahydro-1H-cyclopenta[a]phénanthrène-17-yl)pentanamide (57)**

1 g d'acide cholique (2,4 mmol, 1,2 équivalents) est suspendu dans 30 mL de DMF. 619 mg de DCC (3 mmol, 1,5 équivalents) et 366 mg de DMAP (3 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à la suspension. 447 mg de 11-azido-3,6,9-trioxo-undécane-1-amine (2 mmol, 1 équivalent) sont ensuite ajoutés. Le mélange est alors agité 24 heures à température ambiante. Le DMF est éliminé, puis le solide formé est repris dans 50 mL de DCM. La suspension est alors filtrée pour éliminer la DCU, puis successivement lavée par 2 fois 20 mL d'eau et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 750 mg de produit sont obtenus après purification par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle/méthanol, de 100/0 à 90/10) (Rdt : 60 %).

$R_f$  : 0,5 (acétate d'éthyle/méthanol, 8/2).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 0,57 (s, 3H) ; 0,80 (s, 3H) ; 0,88-2,26 (m, 43H) ; 3,18 (m, 1H) ; 3,36-3,60 (m, 7H) ; 3,76 (s, 1H) ; 3,93-4,11 (m, 2H) ; 4,33 (d,  $J = 3$  Hz, 1H) ; 8,25 (d,  $J = 3$  Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,8 ; 17,5 ; 23,1 ; 23,3 ; 24,9 ; 25,6 ; 25,9 ; 26,7 ; 27,7 ; 29,0 ; 30,8 ; 30,9 ; 31,6 ; 31,8 ; 32,2 ; 34,8 ; 35,3 ; 35,6 ; 35,8 ; 41,8 ; 42,0 ; 46,2 ; 46,5 ; 50,0 ; 50,4 ; 52,9 ; 60,7 ; 66,7 ; 70,3 ; 70,9 ; 71,4 ; 170,6.

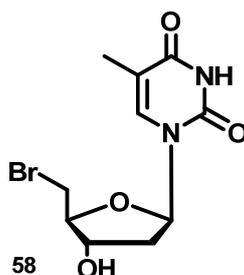
HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 609,4227  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 609,4216  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### **5'-bromo-5'-désoxythymidine (58)**

1 g de thymidine (4,1 mmol, 1 équivalent) est dissous dans 40 mL de pyridine anhydre. À 0 °C, 496,5 mg de chlorure de méthanesulfonyle (4,3 mmol, 1,05 équivalents) sont ajoutés goutte à goutte à la solution. Après retour à température ambiante, le mélange est agité pendant 4 heures. Puis le solvant est éliminé sous pression réduite. La 5'-O-mésylthymidine obtenue est utilisée telle quelle pour l'étape suivante.

80 mL de DMF et 2 g de bromure de potassium (16,4 mmol, 4 équivalents) sont ajoutés à la 5'-O-mésylthymidine. Le milieu réactionnel est placé à 80 °C sous agitation pendant 4 heures. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris dans 100 mL d'acétate d'éthyle puis successivement lavé par deux fois 20 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5% en masse et une fois par 20 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 820 mg de produit sont obtenus après précipitation dans l'acétonitrile (Rdt : 65 %).

$R_f$  : 0,58 (acétate d'éthyle/méthanol, 9/1).



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 1,79 (s, 3H) ; 2,10 (m, 1H) ; 2,11 (m, 1H) ; 2,25 (m, 1H) ; 3,75 (m, 2H) ; 3,92 (s, 1H) ; 4,23 (s, 1H) ; 5,50 (s, 1H) ; 6,23 (t,  $J = 3$  Hz, 1H) ; 7,52 (s, 1H) ; 11,36 (s, 1H).

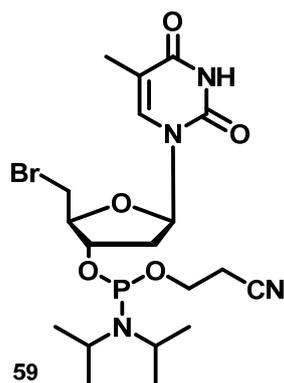
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) : 12,7 ; 34,2 ; 38,4 ; 45,2 ; 71,6 ; 72,4 ; 84,3 ; 85,6 ; 85,8 ; 110,3 ; 136,5 ; 150,9 ; 164,1.

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : masse calculée : 326,9956  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 326,9941  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

#### **5'-bromo-5'-désoxy-3'-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)thymidine (59)**

Sous atmosphère d'argon, 381 mg DIEA (2,94 mmol, 2 équivalents), 523 mg 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (2,2 mmol, 1,5 équivalents) sont ajoutés à une solution de 450 mg 5'-bromo-5'-désoxythymidine (**58**) (0,1 mmol, 1 équivalent) dans 30 mL de DCM anhydre. Le mélange est alors agité 6 heures à température ambiante. Le mélange est successivement lavé par deux fois 5 mL d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % en masse et une fois par 5 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. 524 mg de produit sont finalement isolés après purification par chromatographie sur colonne neutralisée (hexane/acétate d'éthyle 2/8), (Rdt : 70 %).

$R_f$  : 0,7 (hexane/acétate d'éthyle 30/70)



RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 152,3

HRMS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : masse calculée : 527,1035  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , masse mesurée : 527,1037  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

## Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides sont synthétisés sur support au moyen d'un appareil Expedite 8909 Synthesizer. Le couplage réalisé utilise des nucléotides phosphoramidites et est activé par le 1H-tétrazole. Les nucléotides phosphoramidites protégés, de type 1-(2-O-méthyl-3-O(2-cyanoéthoxy(diisopropylamino)-phosphino)-5-(4,4' diméthoxytrityl)- $\alpha$ -D-nucléoside, sont issus du commerce (Glen Research). Les oligonucléotides non modifiés proviennent du commerce (Eurogentec).

Oligonucléotide anti VHC

ON $^{17\text{M}}$

TOF MS ES (-)  $[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$  : 1390,57  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

## Oligonucléotides amphiphiles par la voie *ante-synthèse*.

Ces oligonucléotides amphiphiles sont obtenus par couplage manuel lors de la dernière étape de la synthèse de l'oligonucléotide. 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de concentration 100  $\mu\text{M}$  en phosphoramidite amphiphile (composés **51** à **55**) sont ajoutés par injection à l'oligonucléotide sur support. Après 8 minutes d'agitation, par aspirations et injections successives, l'oligonucléotide sur support peut être remplacé sur le synthétiseur pour subir la dernière étape d'oxydation. L'oligonucléotide est déprotégé et libéré de son support par traitement à l'ammoniaque à 55  $^{\circ}\text{C}$  pendant 6 heures. Le surnageant est alors évaporé puis repris dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau. L'oligonucléotide amphiphile est obtenu pur par purification en HPLC phase inverse (RP-C4).

### Oligonucléotides anti VHC

ONA<sup>C18</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6203,91 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Amide</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6217,38 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Chol</sup>

TOF MS ES (-) [M-4H]<sup>4-</sup> : 1578,9569 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Cétal</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6404,30 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Farnésyl</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6153,76 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Chol</sup> LNA

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 5363,61 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>mm</sup>

TOF MS ES (-) [M-8H]<sup>8-</sup> : 784,42 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Chol</sup> LNAmm

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 5342,73 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>C18</sup> 3'fluorescéine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6775,80 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Chol</sup> 3'fluorescéine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6890,27 g.mol<sup>-1</sup>.

Oligonucléotides anti VIH

93 del 5'Chol

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 5879,27 g.mol<sup>-1</sup>.

60 Delsc 5'Chol

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6404,87 g.mol<sup>-1</sup>.

### **5'-hexynyloligonucléotide**

Les oligonucléotides 5' hexynyl sont obtenus par synthèse automatisée sur support. La structure hexynyl est fixée lors de la dernière étape par couplage d'un hexynylphosphoramidite commercial. Les oligonucléotides formés ne sont pas isolés et sont utilisés en l'état pour les réactions suivantes.

### **5'-bromo-5'-désoxyoligonucléotide**

Cet oligonucléotide modifié est obtenu par couplage manuel lors de la dernière étape de la synthèse de l'oligonucléotide. 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de concentration 100  $\mu\text{M}$  en phosphoramidite **59** sont mis en contact avec l'oligonucléotide sur support. Après 8 minutes d'agitation l'oligonucléotide sur support peut être replacé sur le synthétiseur pour subir la dernière étape d'oxydation. L'oligonucléotide formé n'est pas isolé, il est utilisé en l'état pour les étapes suivantes.

### **5'-azido-5'-désoxyoligonucléotide**

1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{ON}^{\text{Br}}$  sur support est suspendu dans 1 mL de DMF. 15 mg d'iodure de sodium (100 équivalents, 100  $\mu\text{mol}$ ) et 6,5 mg d'azoture de sodium (100 équivalents, 100  $\mu\text{mol}$ ) sont ajoutés. Le mélange est agité 80 minutes à 70 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est lavé deux fois par 1 mL de DMF et deux fois par 1 mL d'eau. Pour évaluer le taux de conversion de la réaction, une fraction de l'oligonucléotide est déprotégée et libérée de son support par traitement à l'ammoniaque 6 heures à 55 °C. Après études par HPLC (RP-C18) et spectrométrie de masse le taux de conversion est estimé à 100%.

Oligonucléotide anti VHC

ON<sup>N3</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6896,68 g.mol<sup>-1</sup>.

### Oligonucléotides amphiphiles par la voie *post-synthèse*.

-Hexynyl

Dans un tube Eppendorff, 400 nmol de ON<sup>hexynyl</sup> protégé et fixé sur support sont suspendus dans 1 mL d'un mélange *ter*-butanol/eau (1/1). 6,4 mg de sulfate de cuivre (40 μmol, 100 équivalents), 8 mg d'ascorbate de sodium (40 μmol, 100 équivalents), 21 mg de TBTA (40 μmol, 100 équivalents) et le lipide azidé (40 μmol, 100 équivalents) sont ajoutés. La suspension est alors agitée 72 heures à température ambiante. L'oligonucléotide protégé et sur support est lavé une fois par du DCM, trois fois par une solution aqueuse saturée d'EDTA et deux fois par de l'eau. L'oligonucléotide est alors déprotégé et libéré de son support par traitement par l'ammoniaque 6 heures à 55 °C. L'ONA est ensuite purifié par HPLC (RP C4).

Oligonucléotides polyuridine (U<sub>8</sub>)

ONA<sup>hexC18</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 2957,87 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>hexCholate</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 3268,16 g.mol<sup>-1</sup>.

Oligonucléotides polyuridine (U<sub>17</sub>)

ONA<sup>hexC18</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 5875,2 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>hexCholate</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6133,49 g.mol<sup>-1</sup>.

-Azido assisté par micro-ondes

Dans un réacteur de 10 mL, 400 nmol de ON<sup>N3</sup> protégé et fixé sur support sont suspendus dans 1 mL d'un mélange *ter*-butanol/eau (1/1). 6,4 mg de sulfate de cuivre (40 µmol, 100 équivalents), 8 mg d'ascorbate de sodium (40 µmol, 100 équivalents) et le lipide propargylé (40 µmol, 100 équivalents) sont ajoutés. La suspension est alors irradiée par micro-ondes (CEM discover) 35 minutes, 100 Watts à 65 °C. Après refroidissement, l'oligonucléotide protégé et sur support est lavé une fois par du DCM, trois fois par une solution aqueuse saturée en EDTA et deux fois par de l'eau. L'oligonucléotide est alors déprotégé et libéré de son support par traitement par l'ammoniaque 6 heures à 55 °C. L'ONA est ensuite purifié par HPLC (RP C4).

-Azido sans micro-onde

Dans un tube Eppendorff, 400 nmol de ON<sup>N3</sup> protégé et fixé sur support sont suspendus dans 1 mL d'un mélange *ter*-butanol/eau (1/1). 6,4 mg de sulfate de cuivre (40 µmol, 100 équivalents), 8 mg d'ascorbate de sodium (40 µmol, 100 équivalents), 21 mg de TBTA (40 µmol, 100 équivalents) et le lipide propargylé (40 µmol, 100 équivalents) sont ajoutés. La suspension est alors agitée 72 heures à température ambiante. Après refroidissement, l'oligonucléotide protégé et sur support

est lavé une fois par du DCM, trois fois par une solution aqueuse saturée d'EDTA et deux fois par de l'eau. L'oligonucléotide est alors déprotégé et libéré de son support par traitement par l'ammoniaque 6 heures à 55 °C. L'ONA est ensuite purifié par HPLC (RP C4).

#### Oligonucléotides anti VHC

ONA<sup>Chol</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6321 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Cholate</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6343,94 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>13F</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6327,50 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>17F</sup>

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6425,51 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Cholate</sup> 3'fluorescéine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6914,53 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>13F</sup> 3'fluorescéine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6894,29 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>17F</sup> 3'fluorescéine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6994,46 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Cholate</sup> 3'rhodamine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6966,66 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>17</sup> 3'rhodamine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 7049,01 g.mol<sup>-1</sup>.

ONA<sup>Chol</sup> 3'rhodamine

Maldi (-) [M-H]<sup>-</sup> : 6946 g.mol<sup>-1</sup>.

## VII.2 Formation et fusion de gels

### VII.2.1 Hydrogel

Le composé est dissous à chaud (70-80 °C) dans l'eau miliQ. La solution est laissée refroidir à température ambiante. La gélification est confirmée en retournant le tube. Si le mélange supporte son propre poids, il est défini comme un gel.

### VII.2.2 Organogel

Le composé est dissous à l'ébullition du solvant. La solution est laissée refroidir à température ambiante. La gélification est confirmée en retournant le tube. Si le mélange supporte son propre poids, il est défini comme un gel.

### **VII.2.3 Fusion des gels**

Les gels sont progressivement chauffés au bain-marie, le tube est alors retourné. Si le gel ne supporte plus son propre poids, il est défini comme fondu.

## VII.3 Études physicochimiques

### **VII.3.1 Epsilon**

Les epsilons sont déterminés en mesurant la DO sur une gamme de solutions de GNAs à différentes concentrations. Les DO sont mesurées au moyen d'un spectrophotomètre Nanodrop®.

### **VII.3.2 Tensiométrie**

Les mesures de tensiométrie ont été réalisées au moyen d'un tensiomètre DCAT11 de chez Dataphysics. Une solution de GNA fraîchement préparée dans l'eau distillée est ajoutée goutte à goutte à de l'eau distillée. Toutes les mesures et additions sont réalisées de manière automatique à température ambiante.

### **VII.3.3 Dynamic light scattering (DLS)**

Les expériences de DLS sont effectuées sur un Zetasizer nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Les échantillons sont préparés par sonication 10 secondes, 14 heures avant la mesure. La dimension des particules est mesurée à partir des courbes d'autocorrélation (méthode des cumulants) des fluctuations de l'intensité de la diffusion de la lumière pendant 80 secondes à 20 °C (l'expérience est répétée 5 fois).

#### **VII.3.4 Small angle X-ray scattering (SAXS)**

Les mesures de diffusion des rayons X aux petits angles sont réalisées au moyen d'un Rigaku Nanoviewer (Microsource generator, Micromax 007, 800 W anode rotative couplée à un miroir Confocal Maxflux). L'hydrogel, de composé **43**, à 20 % en masse est scellé dans un capillaire de verre de 1,5 mm de diamètre (Glaskapillaren GLAS, Germany). L'intégration du spectre est réalisée au moyen d'un programme R-axis Display software.

#### **VII.3.5 Thermo-dénaturation**

Les expériences de thermo-dénaturation des duplex ont été réalisées au moyen d'un spectrophotomètre VARIAN Cary 1E équipé d'un passeur 6-positions et d'un accessoire de contrôle de température Peltier. Ces expériences ont été réalisées à une concentration finale de 3  $\mu\text{M}$  en ODN dans un tampon cacodylate 15 mM, pH 6,0, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM NaCl. La solution tamponnée de duplex est placée à température ambiante dans une cuvette de 200  $\mu\text{L}$ . Les cuvettes sont fermées de manière étanche au moyen d'un bouchon de Téflon, afin de prévenir l'évaporation à haute température. Une équilibration de 10 minutes à 10 °C est réalisée avant les montées en température. La température est ensuite progressivement augmentée de 10 à 90 °C (1 °C/min). La thermo-dénaturation est suivie à 260 nm. La température de thermo-dénaturation ( $T_m$ ) est définie comme le maximum de la dérivée première de la courbe de fusion UV.

## VII.4 Test sur cellules

### **VII.4.1 Culture cellulaire**

Les cellules Huh-7 (cellules de carcinome hépatique humain) sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine et 1% d'acides aminés non essentiels, à 37 °C sous atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 %). Tous les produits de cultures sont commerciaux (Invitrogen).

### **VII.4.2 Tests de cytotoxicité**

Dans une boîte 96 puits,  $2.10^3$  cellules Huh-7 sont déposées dans chaque puits et incubées les jours suivants en présence de concentrations croissantes de composé à tester, dans le milieu de culture (DMEM) complet. Après quatre jours en présence continue du composé testé, la quantité de cellules survivantes est quantifiée par colorimétrie au moyen d'un kit CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega).

### **VII.4.3 Transfection (Test P-irf)**

Dans une plaque 24 puits,  $8.10^4$  cellules sont déposées dans chaque puits. Le jour suivant les cellules sont incubées pendant 4 ou 24 heures en présence des ONA à des concentrations croissantes dans du milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite rincées deux fois par du milieu de culture sans sérum et transfectées par 150 femtomoles d'ARN pIRF cappé dans 200 µL de milieu sans sérum contenant 2 µL de DMRIE-C (2mg/ml ; Invitrogen). Les cellules sont alors incubées 18 heures à 37 °C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois par du PBS puis lysées par 100 µL de tampon de lyse

(Promega). Les activités des luciférases Firefly et Renilla sont déterminées sur 20  $\mu\text{L}$  de lysat des cellules en utilisant un kit Dual-Luciferase (Promega) et un luminomètre BERTHOLD.

**Insertion d'ONAs dans des liposomes de DOPC :** Une solution de DOPC (1 mg/mL) est extrudée à 50 nm, 100 équivalents de cette solution sont ensuite ajoutés aux ONAs. Le mélange est alors vortexé et repris dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu complet.

#### VII.4.4 Cytométrie en flux

Dans une plaque 24 puits,  $8 \cdot 10^4$  cellules sont déposées dans chaque puits. Après 24 h de culture les cellules sont incubées 1, 2 ou 4 heures en présence de ONA 3'fluorescéine ou de ON 3'fluorescéine à une concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  dans du milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite rincées trois fois par du PBS et détachées par 50  $\mu\text{L}$  d'une solution diluée de trypsine 0,05 % (*m/v*). Les cellules détachées sont mises en suspension dans 500  $\mu\text{L}$  de PBS glacé. Le pourcentage de cellules fluorescentes est analysé au moyen d'un cytomètre en flux COULTER EPICS® XL équipé d'un laser type 488.

## VII.5 Microscopie

Les observations sont réalisées au moyen d'un microscope inverse Axiovert 200 fluorescent avec un objectif 40x à immersion (Zeiss).

#### VII.5.1 Microscopie optique, fluorescence et lumière visible

Les expériences de microscopie sont obtenues sur une solution de composé **43** à une concentration de 1 mg/mL dans l'eau et 1mg/mL en présence d'ODN (10  $\mu\text{M}$ ). Avant observation, le

mélange est placé 24 heures à température ambiante. La solution est alors déposée entre lame et lamelle.

**Microscopie de fluorescence sur cellules transfectées par un GNs :**  $8.10^4$  cellules sont mises en culture dans chaque puits d'une plaque 24 puits. Chaque puits est au préalable équipé d'une lamelle de verre sur laquelle se fixent les cellules. Les jours suivants, les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37 °C et en présence de 0,5  $\mu$ M d'ON portant une fluorescéine et préalablement complexé 4 heures par différentes quantités de GNA (2 à 10 équivalents de GNAs par phosphate). Les cellules sont alors lavées 3 fois par du PBS et fixées 15 minutes à température ambiante par une solution de formaldéhyde à 3,7 % dans du PBS. Après 3 lavages par du PBS, les cellules sont ensuite montées sur lame au moyen d'un liquide de montage Vectashield (Vector Laboratories).

**Microscopie de fluorescence sur cellules transfectées par ONAs :**  $8.10^4$  cellules sont mises en culture dans chaque puits d'une plaque 24 puits. Chaque puits est au préalable équipé d'une lamelle de verre sur laquelle se fixent les cellules. Les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37 °C et en présence de 0,5  $\mu$ M d'ONAs portant une fluorescéine. Les cellules sont alors lavées 3 fois par du PBS et fixées 15 minutes à température ambiante par une solution de formaldéhyde à 3,7 % dans du PBS. Après 3 lavages par du PBS, les cellules sont ensuite montées sur lame au moyen d'un liquide de montage Vectashield (Vector Laboratories).

**Microscopie de fluorescence sur cellules marquées transfectées par ONAs :**  $8.10^4$  cellules marquées sont mises en culture dans 4 puits d'une plaque 8 puits pour observation par microscopie. Les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37 °C et en présence de 0,5  $\mu$ M d'ONAs portant une fluorescéine ou rhodamine. Les cellules sont alors lavées 3 fois par du PBS et observées sans fixation en microscopie confocale.

### **VII.5.2 Microscopie électronique à transmission (MET)**

Les observations de microscopie électronique sont réalisées au moyen d'un HITACHI H 7650. Les échantillons sont déposés sur grilles de nickel couvertes de carbone et colorés par de l'acétate d'uranyle.

**MET sur complexe ODN/GNAs :** Les expériences de microscopie sont obtenues sur une solution de composé **43** à une concentration de 1 mg/mL dans l'eau et 1mg/mL en présence de 10  $\mu$ M d'ODN. Ces solutions sont préparées soit dans l'eau pure soit dans une solution 15 mM de tampon cacodylate ; pH 6,0 ; 8 mM  $MgCl_2$  ; 3 mM NaCl. Avant observation, le mélange est placé 24 heures à température ambiante.

**MET sur ONAs :** Les observations sont réalisées sur des solutions de ONAs à 100  $\mu$ M dans l'eau et dans une solution 15 mM de tampon cacodylate ; pH 6,0 ; 8 mM  $MgCl_2$  ; 3 mM NaCl. Les solutions sont laissées incuber une nuit à température ambiante avant observation.

**MET sur GNAs :** Les observations sont réalisées sur des solutions de GNAs à 1 mg/mL dans l'eau ou dans le chloroforme. Les solutions sont laissées incuber une nuit à température ambiante avant observation.

## **VIII. Références**

## VIII. Références

- 
- <sup>1</sup> Reynhout, I. C.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. **Synthesis of Polymer-Biohybrids: From Small to Giant Surfactants**, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 681-692
- <sup>2</sup>a) Luzzati, V.; Gulik-Krzywicki, T.; Rivas, E.; Reiss-Husson, F.; Rand, R. P. **X-Ray Study of Model Systems: Structure of the Lipid-Water Phases in Correlation with the Chemical Composition of the Lipids**, *J. Gen. Physiol.* **1968**, *51*, 37-43; b) Israelachvili, J. N.; Marcelja, S.; Horn, R. G. **Physical principles of membrane organization**, *Q. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121-200
- <sup>3</sup> Israelachvili, J. *Intermolecular & Surface Forces 2<sup>nd</sup> ED.*, Academic near, London, 1992
- <sup>4</sup> Kunitake, T.; Okahata, Y. **Formation of the stable bilayer assemblies in dilute aqueous solution from ammonium amphiphiles with the diphenylazomethine segment**, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 549-553
- <sup>5</sup> Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. **Non viral Vector for Gene Delivery**, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302
- <sup>6</sup> Lee, K. Y.; Mooney, D. **Hydrogels for Tissue Engineering**, *J. Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869-1879
- <sup>7</sup> Reddy, L. H.; Renoir, J. -M.; Marsaud, V.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Desmaele, D.; Couvreur, P. **Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor**, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 1526-1535
- <sup>8</sup> Couvreur, P.; Stella, B.; Reddy, L. H.; Hillaireau, H.; Dubernet, C.; Desmaële, D.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Rocco, F.; Dereuddre-Bosquet, N.; Clayette, P.; Rosilio, V.; Marsaud, V.; Renoir, J. -M.; Cattel, L. **Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics**, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2544-2548
- <sup>9</sup> Hung, A. M.; Stupp, S. I. **Simultaneous Self-Assembly, Orientation, and Patterning of Peptide-Amphiphile Nanofibers by Soft Lithography**, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1165-1171
- <sup>10</sup> Sone, E. D.; Stupp, S. I. **Semiconductor-Encapsulated Peptide-Amphiphile Nanofibers**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12756-12757
- <sup>11</sup> De Jong, L.; Moreau, X.; Thiéry, A.; Godeau, G.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Amphiphilic Copolymer for Delivery of Xenobiotics: *In Vivo* Studies in a Freshwater Invertebrate, a Mesostominae Flatworm**, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 891-898

- 
- <sup>12</sup> Chirila, T. V.; Rakoczy, P. E.; Garret, K. L.; Xia, L.; Constable, I. J. **The use of synthetic polymers for delivery of therapeutic antisense oligodeoxynucleotides**, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 321-342
- <sup>13</sup> Breuzard, G.; Tertil, M.; Gonçalves, C.; Cheradame, H.; Géguan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. **Nuclear delivery of NFκB-assisted DNA:polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging**, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e71
- <sup>14</sup> Jung, J. H.; John, G.; Yoshida, K.; Shimizu, T. **Self-Assembling Structures of Long-Chain Phenyl Glucoside Influenced by the Introduction of Double Bonds**, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10674-10675
- <sup>15</sup> Richard, C.; Chaumet-Riffaud, P.; Belland, A.; Parat, A.; Contino-Pepin, C.; Bessodes, M.; Scherman, D.; Pucci, B.; Mignet, N. **Amphiphilic perfluoroalkyl carbohydrates as new tools for liver imaging**, *Int. J. Pharm.* **2009**, *379*, 301-308
- <sup>16</sup> Barragan-Montero, V.; Winum, J. -Y.; Molès, J. -P.; Juan, E.; Clavel, C.; Montero, J. -L. **Synthesis and properties of isocannabinoid and cholesterol derivatized rhamnosurfactants: application to liposomal targeting of keratinocytes and skin**, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1022-1029
- <sup>17</sup> Barthélémy, P. **Nucleosides-based lipids at work: From supramolecular assemblies to biological applications**, *C. R. Chimie* **2009**, *12*, 171-179
- <sup>18</sup> Watson, J. D.; Crick, F. H. C. **A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid**, *Nature* **1953**, *171*, 737-738
- <sup>19</sup> Sinden, R. R. *DNA Structure and Function*, first ed. Academic Press, San Diego, 1994
- <sup>20</sup> Petitjean, A.; Houry, R. G. K.; Kyritsakas, N.; Lehn, J.-M. **Dynamic Devices. Shape Switching and Substrate Binding in Ion-Controlled Nanomechanical Molecular Tweezers**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6637-6647
- <sup>21</sup> Lee, M.; Jang, C. -J.; Ryu, J. -H. **Supramolecular Reactor from Self-Assembly of Rod-Coil Molecule in Aqueous Environment**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8082-8083
- <sup>22</sup> Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Seto, C. T. **Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures**, *Science*, **1991**, *254*, 1312-1319
- <sup>23</sup> Bowden, N.; Terfort, A.; Carbeck, J.; Whiteside, G. M. **Self-Assembly of Mesoscale Objects into Ordered Two-Dimensional Arrays**, *Science*, **1997**, *276*, 233-235

- 
- <sup>24</sup> Rosemeyer, H. **Nucleolipids: natural occurrence, synthesis, molecular recognition, and supramolecular assemblies as potential precursors of life and bioorganic materials**, *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 977-1063
- <sup>25</sup> Gissot, A.; Camplo, M.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids**, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324-1333
- <sup>26</sup> Kaczmarek, O.; Brodersen, N.; Bunge, A.; Löser, L.; Huster, D.; Herrmann, A.; Arbuzova, A.; Liebscher, J. **Synthesis of nucleosides with 2'-fixed lipid anchors and their behavior in phospholipid membranes**, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1917-1928
- <sup>27</sup> Heiz, C.; Radler, U.; Luisi, P. L. **Spectroscopy and Recognition Chemistry of Micelles from Monoalkyl Phosphoryl Nucleosides** *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8686-8691
- <sup>28</sup> Berti, D.; Luisi, P. L.; Baglioni, P. **Molecular recognition in supramolecular structures formed by phosphatidyl nucleosides-based amphiphiles**, *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *167*, 95-103
- <sup>29</sup> Campins, N.; Dieudonné, P.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Nanostructured assemblies from nucleotide-based amphiphiles**, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1928-1934
- <sup>30</sup> Khiati, S.; Pierre, N.; Andriamanarivo, S.; Grinstaff, M. W.; Arazam, N.; Nallet, F.; Navailles, L.; Barthélémy, P. **Anionic Nucleotide-Lipids for In Vitro DNA Transfection**, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1765-1772
- <sup>31</sup> Iwaura, R.; Yoshida, K.; Masuda, M.; Yase, K.; Shimizu, T. **Spontaneous Fiber Formation and Hydrogelation of Nucleotide Bolaamphiphiles**, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3047-3053
- <sup>32</sup> Chabaud, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M. W. **Cationic Nucleoside Lipids for Gene Delivery**, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 466-472
- <sup>33</sup> Moreau, L.; Barthélémy, P.; Li, Y.; Luo, D.; Prata, C. A.; Grinstaff, M. W. **Nucleoside phosphocholine amphiphile for in vitro DNA transfection**, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 260-264
- <sup>34</sup> Moreaux, L.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, J. **Supramolecular Assemblies of Nucleoside Phosphocholine Amphiphiles**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7533-7539
- <sup>35</sup> Moreau, L.; Camplo, M.; Wathier, M.; Taib, N.; Laguerre, M.; Bestel, I.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Real Time Imaging of Supramolecular Assembly Formation via Programmed Nucleolipid Recognition**, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14454-14455

- 
- <sup>36</sup> Moreau, L.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Vesicle formation from a synthetic adenosine based lipid**, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1593-1596
- <sup>37</sup> Barthélémy, P.; Prata, C. A.; Filocamo, S. F.; Immoos, C. E.; Maynor, B. W.; Hashmi, S. A.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. **Supramolecular assemblies of DNA with neutral nucleoside amphiphiles**, *Chem. Comm.* **2005**, *10*, 1261-1263
- <sup>38</sup> Arigon, J.; Prata, C. A. H.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. **Nucleic Acid Complexing Glycosyl Nucleoside-Based Amphiphile**, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 864-872
- <sup>39</sup> Overberger, C. G.; Inaki, Y. *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.* **Graft copolymers containing nucleic acid bases and amino acids**, **1979**, *17*, 1739-1758
- <sup>40</sup> Overberger, C. G.; Morishima, Y. **Syntheses of polyethylenimine containing asymmetric nucleic acid base derivatives as grafted pendants**, *J. Polym. Sci. A1* **1980**, *18*, 1247-1265
- <sup>41</sup> Ahlers, M.; Ringsdorf, H.; Rosemeyer, H.; Seela, F. **Orientation, recognition, and photoreaction of nucleolipids in model membranes**, *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 132-142
- <sup>42</sup> Ariga, K.; Kunitake, T. **Molecular Recognition at Air-Water and Related Interfaces: Complementary Hydrogen Bonding and Multisite Interaction**, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 371-378
- <sup>43</sup> Paleos, C. M.; Tsiourvas, T. **Molecular Recognition of Organized Assemblies via hydrogen bonding in aqueous media**, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 695-710
- <sup>44</sup> Berti, D.; Franchi, L.; Baglioni, P.; Luisi, P. L. **Dynamics of wormlike micelles: the « bond-interchange » reaction scheme**, *Langmuir*, **1997**, *13*, 3438-3444
- <sup>45</sup> Huang, J.; Li, C.; Liang, Y. **FT-SERS Studies on Molecular Recognition Capabilities of Monolayers of Novel Nucleolipid Amphiphiles**, *Langmuir*, **2000**, *16*, 3937-3940
- <sup>46</sup> Berti, D.; Baglioni, P.; Bonaccio, S.; Barsacchi-Bo, G.; Luisi, P. L. **Base Complementarity and Nucleoside Recognition in Phosphatidyl nucleoside Vesicles**, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 303-308
- <sup>47</sup> Bonaccio, S.; Walde, P.; Luisi, P. L. **Liposomes Containing Purine and Pyrimidine Bases: Stable Unilamellar Liposomes from Phosphatidyl Nucleosides**, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6661-6663
- <sup>48</sup> Itojima, Y.; Ogawa, Y.; Tsuno, K.; Handa, N.; Yanagawa, H. **Spontaneous formation of helical structures from phospholipid-nucleoside conjugates**, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4757-4765

- 
- <sup>49</sup> Kawahara, T.; Kurihara, K.; Kunitake, T. **Cooperative Binding of Adenine via Complementary Hydrogen Bonding to an Imide Functionalized Monolayer at the Air-Water Interface**, *Chem. Lett.* **1992**, *21*, 1839-1842
- <sup>50</sup> Shimizu, T.; Iwaura, R.; Masuda, M.; Hanada, T.; Yase, K. **Internucleobase-Interaction-Directed Self-Assembly of Nanofibers from Homo- and Heteroditopic 1,  $\omega$ -Nucleobase Bolaamphiphiles**, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5947-5955
- <sup>51</sup> Yanagawa, H. Ogawa, Y.; Furuta, H. Tsuno, K. **Spontaneous formation of superhelical strands**, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4567-4570
- <sup>52</sup> R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, M. Ohnishi-Kameyama, M. Yoshida, T. Shimizu, **Oligonucleotide-Templated Self-Assembly of Nucleotide Bolaamphiphiles: DNA-Like Nanofibers Edged by a Double-Helical Arrangement of A-T Base Pairs**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1009-1012
- <sup>53</sup> Iwaura, R.; Kikkawa, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Shimizu, T. **Effects of oligoDNA template length and sequence on binary self-assembly of a nucleotide bolaamphiphile**, *Org. biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3450-3455
- <sup>54</sup> Nowick, J. S.; Cao, T.; Noronha, G. **Molecular Recognition between Uncharged Molecules in Aqueous Micelles**, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3285-3289
- <sup>55</sup> Onda, M.; Yoshihara, K.; Koyano, H.; Ariga, K.; Kunitake, T. **Molecular Recognition of Nucleotides by the Guanidinium Unit at the Surface of Aqueous Micelles and Bilayers. A Comparison of Microscopic and Macroscopic Interfaces**, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8524-8530
- <sup>56</sup> Li, C.; Huang, J.; Liang, Y. **Molecular Recognition Capabilities of a Nucleolipid Amphiphile (3',5'-Distearoyl)-2'-Deoxythymidine to Adenosine at the Air/Water Interface and Langmuir-Blodgett Films Studied by Molecular Spectroscopy**, *Langmuir*, **2000**, *16*, 7701-7707
- <sup>57</sup> Berndt, P.; Kurihara, K.; Kunitake, T. **Mesurement of Forces between Surfaces Composed of Two-Dimensionally Organized, Complementary and Noncomplementary Nucleobases**, *Langmuir*, **2000**, *11*, 3083-3091
- <sup>58</sup> a) Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B. **Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 648-652

- 
- b) Cazenave, C.; Stein, C. A.; Loreau, N.; Thuong, N. T.; Neckers, L. M.; Subasinghe, C.; Hélène, C.; Cohen, J. S.; Toulmé, J.-J. **Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides**, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 4255-4273
- c) Wilson, C.; Keefe, A. D. **Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 607-614
- <sup>59</sup> Pfeiffer, I.; Hook, F. **Bivalent Cholesterol-Based Coupling of Oligonucleotides to lipid Membrane Assemblies**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10224-10225
- <sup>60</sup> Pfeiffer, I.; Hook, F. **Quantification of Oligonucleotide Modifications of Small Unilamellar Lipid Vesicles**, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7493-7498
- <sup>61</sup> Boutorine, A. S.; Kostina, E. V. **Reversible covalent attachment of cholesterol to oligodeoxyribonucleotides for studies of the mechanisms of their penetration into eukaryotic cells**, *Biochimie* **1993**, *75*, 35-41
- <sup>62</sup> Kim, S. J.; Bang, E. K.; Kwon, H. J.; Shim, J. S.; Kim, B. H. **Modified Oligonucleotides Containing Lithocholic Acid in Their Backbones: Their Enhanced Cellular Uptake and Their Mimicking of Hairpin Structures**, *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 1517-1522
- <sup>63</sup> Boutorine, A. S.; Gus'kova, L. V.; Ivanova, E. M.; Kobetz, N. D.; Zarytova, V. F.; Ryte, A. S.; Yurchenko, L. V.; Vlassov, V. V. **Synthesis of alkylating oligonucleotide derivatives containing cholesterol or phenazinium residues at their 3'-terminus and their interaction with DNA within mammalian cells**, *FEBS Lett.* **1989**, *254*, 129-132
- <sup>64</sup> Tung, C. H.; Stein, S. **Preparation and Applications of Peptide-Oligonucleotide Conjugates**, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 605-618
- <sup>65</sup> Guler, M. O.; Pokorski, J. K.; Appella, D. H.; Stupp, S. I. **Enhanced Oligonucleotide Binding to Self-Assembled Nanofibers**, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 501-503
- <sup>66</sup> Schlapak, R.; Pammer, P.; Armitage, D.; Zhu, R.; Hinterdorfer, P.; Vaupel, M.; Frühwirth, T.; Howorka, S. **Glass Surfaces Grafted with High-Density Poly(ethylene glycol) as Substrates for DNA Oligonucleotide Microarrays**, *Langmuir*, **2006**, *22*, 277-285
- <sup>67</sup> Fong, R. B.; Ding, Z.; Long, C. J.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. **Thermoprecipitation of Streptavidin via Oligonucleotide-Mediated Self-Assembly with Poly (N-isopropylacrylamide)**, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 720-725

- 
- <sup>68</sup> Alemdaroglu, F. E.; Herrmann, A. **DNA meets synthetic polymers-highly versatile hybrid materials**, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1311-1320
- <sup>69</sup> Manoharan, M.; Johnson, L. K.; Tivel, K. L.; Springer, R. H.; Cook, P. D. **Introduction of a lipophilic tether in the minor groove of nucleic acids for antisense applications**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2765-2770.
- <sup>70</sup> Manoharan, M.; Tivel, K. L.; Cook, P. D. **Lipidic nucleic acids**, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3651-3654
- <sup>71</sup> Letsinger, R. L.; Zhang, G.; Sun, D. K.; Ikeuchi, T.; Sarin, P. S. **Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6553-6556
- <sup>72</sup> Tomkins, J. M.; Barnes, K. J.; Blacker, A. J.; Watkins, W. J.; Abell, C. **Lipophilic modification of oligonucleotides**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 691-694
- <sup>73</sup> Mackellar, C.; Graham, D.; Will, W.; Burgess, S.; Brown, T. **Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups**, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3411-3417
- <sup>74</sup> Kabarov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Ovcharenko, A. V.; Krivonos, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S. **A new class of antivirals: antisense oligonucleotides combined with a hydrophobic substituent effectively inhibit influenza virus reproduction and synthesis of virus-specific proteins in MDCK cells**, *FEBS Lett.* **1990**, *259*, 327-330
- <sup>75</sup> Gryaznov, S. M.; Lloyd, D. H. **Modulation of oligonucleotide duplex and triplex stability via hydrophobic interactions**, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5909-5915
- <sup>76</sup> Shea, R. G.; Marsters, J. C.; Bischofberger, N. **Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates**, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3777-3783
- <sup>77</sup> Seela, F.; Zulauf, M. **Oligonucleotides containing 7-Deazaadenines: The Influence of the 7-Substituent Chain Length and Charge on the Duplex Stability**, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1878-1898
- <sup>78</sup> Guzaev, A.; Lonnberg, H. **Solid support synthesis of ester linked hydrophobic conjugates of oligonucleotides**, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9101-9116
- <sup>79</sup> Ramzaeva, N.; Mittelbach, C.; Seela, F. **7-Deazaguanine DNA: Oligonucleotides with Hydrophobic or Cationic side Chains**, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1809-1822

- 
- <sup>80</sup> Letsinger, R. L.; Chaturvedi, S. K.; Farooqui, F.; Salunkhe, M. **Use of hydrophobic substituents in controlling self-assembly of oligonucleotides**, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7535-7536
- <sup>81</sup> Chapuis, H.; Bui, L.; Bestel, I.; Barthélémy, P. **2'-Lipid-modified oligonucleotides via a "Staudinger-Vilarrasa" reaction**, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6838-6840
- <sup>82</sup> Teixeira Jr, F.; Rigler, P.; Vebert-Nardin, C. **Nucleo-copolymers : oligonucleotide-based amphiphilic diblock copolymers**, *Chem. Comm.* **2007**, 1130-1132
- <sup>83</sup> Gosse, C.; Boutorine, A.; Aujard, I.; Chami, M.; Kononov, A.; Cogne-Laage, E.; Allemand, J. F.; Li, J.; Julien, L. **Micelles of Lipid-Oligonucleotide Conjugates: Implications for Membrane Anchoring and Base Pairing**, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6485-6497
- <sup>84</sup> Dentinger, P. M.; Simmons, B. A.; Cruz, E.; Spargue, M. **DNA-Mediated Delivery of Lipophilic Molecules via Hybridization to DNA-Based Vesicular Aggregates**, *Langmuir*, **2006**, *22*, 2935-2937
- <sup>85</sup> Manoharan, M.; Tivel, K. L.; Condon, T. P.; Andrade, L. K.; Barber-Peoch, I.; Inamati, G.; Shah, S.; Mohan, V.; Graham, M. J.; Franck-Bennett, C.; Crooke, S. T.; Dan Cook, P. **Conjugated Antisense Oligonucleotides**, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1129-1138
- <sup>86</sup> Krieg, A. M.; Tonkinson, J.; Matson, S.; Zhao, Q.; Saxon, M.; Zhang, L. M.; Bhanja, U.; Yakubov, L.; Stein, C. A. **Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1048-1052
- <sup>87</sup> Stein, C. A.; Pal, R.; DeVico, A. L.; Hoke, G.; Mumbauer, S.; Kinstler, O.; Sarngadharan, M. G.; Letsinger, L. G. **Mode of action of 5'-linked cholesteryl phosphorothioate oligodeoxynucleotides in inhibiting syncytia formation and infection by HIV-1 and HIV-2 in vitro**, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 2439-2444
- <sup>88</sup> Otvos, L.; Sagi, J.; Sagi, G.; Szemzo, A.; Toth, F. D.; Jeney, A. **Enzymatic Hydrolysis and Biological Activity of Oligonucleotides Containing 5-Substituted Pyrimidine Bases**, *Nucleosites Nucleotides* **1999**, *18*, 1665-1666
- <sup>89</sup> De Paula, D.; Vitoria, M.; Bentley, M. V.; Mahato, R. I. **Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting**, *RNA* **2007**, *13*, 431-456
- <sup>90</sup> Fattal, E.; Bochot, A. **State of the art and perspectives for the delivery of antisense oligonucleotides and siARN by polymeric nanocarriers**, *Int. J. Pharm.* **2008**, *364*, 237-248

- 
- <sup>91</sup> Krutzfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K. G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. **Silencing of microRNAs *in vivo* with ‘antagomirs’**, *Nature*, **2005**, *438*, 685-689
- <sup>92</sup> O’Driscoll, L. **The Emerging World of MicroRNAs**, *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4271-4278
- <sup>93</sup> Yoshina-Ishii, C.; Boxer, S. G. **Arrays of Mobile Tethered Vesicles on Supported Lipid Bilayers**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3696-3697
- <sup>94</sup> Gissot, A.; Di Primo, C.; Bestel, I.; Giannone, G.; Chapuis, H.; Barthélémy, P. **Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids**, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324-1333
- <sup>95</sup> 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*, 2004-2021
- <sup>96</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. **A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599
- <sup>97</sup> Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Wiley: New York, 1984; pp. 1-176
- <sup>98</sup> Huisgen, R. **1,3-Dipolar Cycloadditions**, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-369
- <sup>99</sup> Lutz, J. -F.; Zarafshani, Z. **Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne “click” chemistry**, *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, *60*, 958-970
- <sup>100</sup> Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. **Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry**, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207-4220
- <sup>101</sup> Perez-Castro, I.; Caamano, O.; Fernandez, F.; Garcia, M. D.; Lopez, C.; De Clercq, E. **Synthesis of 4-substituted-1,2,3-triazole carbanucleoside analogues of ribavirin *via* click chemistry**, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3805-3813
- <sup>102</sup> Cho, J. H.; Bernard, D. L.; Sidwell, R. W.; Kern, E. R.; Chu, C. K. **Synthesis of Cyclopentenyl Carbocyclic Nucleosides as Potential Antiviral Agents Against Orthopoxviruses and SARS**, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1140-1148
- <sup>103</sup> Goeminne, A.; McNaughton, M.; Bal, G.; Surpateanu, G.; Van der Veken, P.; De Prol, S.; Versees, W.; Steyaert, J.; Apers, S.; Haemers, A.; Augustyns, K. **1,2,3-Triazolylalkylribitol derivatives as nucleoside hydrolase inhibitors**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2523-2526

- 
- <sup>104</sup> Broggi, J.; Diez-Gonzalez, S.; Petersen, J. L.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A. **Study of copper(I) catalysts for the synthesis of carbanucleosides via azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition**, *Synthesis* **2008**, 141-148
- <sup>105</sup> Broggi, J.; Joubert, N.; Aucagne, V.; Zevaco, T.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A. **Mass spectrometry based methods for analysis of nucleosides as antiviral drugs and potential tumor biomarkers**, *Nucleosides Nucleotides* **2007**, *26*, 779-783
- <sup>106</sup> Pradere, U.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A. **Preparation of ribavirin analogues by copper- and ruthenium-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition**, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9044-9051
- <sup>107</sup> Park, S. M.; Lee, Y. S.; Kim, B. H. **Novel low-molecular-weight hydrogelators based on 2'-deoxyuridine**, *Chem. Comm.* **2003**, 2912-2913
- <sup>108</sup> Lucas, R.; Neto, V.; Hadj Bouazza, A.; Zerrouki, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. **Microwave-assisted synthesis of a triazole-linked 3'-5' dithymidine using click chemistry**, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1004-1007
- <sup>109</sup> Isobe, H.; Fujino, T.; Yamazaki, N.; Guillot-Nieckowsky, M.; Nakamura, E. **Triazole-Linked Analogue of Deoxyribonucleic Acid (<sup>T</sup>DNA): Design, Synthesis, and Double-Strand Formation with Natural DNA**, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3729-3732
- <sup>110</sup> Lucas, R.; Zerrouki, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. **A rapid efficient microwave-assisted synthesis of a 3',5'-pentathymidine by copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition**, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5467-5471
- <sup>111</sup> 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*, 8350-8358
- <sup>112</sup> Kumar, R.; El-Sagheer, A.; Tumpane, 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*, 6859-6864.
- <sup>113</sup> Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. **Click-Click-Click: Single to Triple Modification of DNA**, *Angew Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444
- <sup>114</sup> Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J. **Click Chemistry to Construct Fluorescent Oligonucleotides for DNA Sequencing**, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609-612

- 
- <sup>115</sup> Humenik, M.; Huang, Y.; Wang, Y.; Sprinzl, M. **C-Terminal Incorporation of Bio-Orthogonal Azide Groups into a Protein and Preparation of Protein-Oligodeoxynucleotide Conjugates by Cu<sup>I</sup>-Catalyzed Cycloaddition**, *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 1103-1106
- <sup>116</sup> Gogoi, K.; Mane, M. V.; Kunte, S. S.; Kumar, V. A. **A versatile method for the preparation of conjugates of peptides with DNA/PNA/analog by employing chemo-selective click reaction in water**, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e139
- <sup>117</sup> Bouillion, C.; Meyer, A.; Vidal, S.; Jochum, A.; Chevlot, Y.; Cloarec, J.-P.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. **Microwave Assisted "Click" Chemistry for the Synthesis of Multiple Labeled-Carbohydrate Oligonucleotides on Solid Support**, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700-4702
- <sup>118</sup> Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J. -J.; Morvan, F. **Synthesis of Mannose and Galactose Oligonucleotide Conjugates by Bi-click chemistry**, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1218-1222
- <sup>119</sup> Aimé, C.; Manet, S.; Satoh, T.; Ihara, H.; Park, K. -Y.; Godde, F.; Oda, R. **Self-Assembly of Nucleoamphiphiles: Investigating Nucleosides Effect and the Mechanism of Micrometric Helix Formation**, *Langmuir* **2007**, *23*, 12875-12885
- <sup>120</sup> Aimé, C.; Tamoto, R.; Satoh, T.; Grelard, A.; Dufourc, E. J.; Buffeteau, T.; Ihara, H.; Oda, R. **Nucleotide-Promoted Morphogenesis in Amphiphile Assemblies: Kinetic Control of Micrometric Helix Formation**, *Langmuir* **2009**, *25*, 8489-8496
- <sup>121</sup> Kočalka, P.; Andersen, N. K.; Jensen, F.; Nielsen, P. **Synthesis of 5-(1,2,3-Triazol-4-yl)-2'-deoxyuridines by a Click Chemistry Approach: Stacking of Triazoles in the Major Groove Gives Increased Nucleic Acid Duplex Stability**, *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 2106-2116
- <sup>122</sup> Diez-Gonzalez, S.; Correa, A.; Cavallo, L.; Nolan, S. P. **(NHC)Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition of Azides and Mono- or Disubstituted Alkynes**, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7558-7564
- <sup>123</sup> Diez-Gonzalez, S.; Nolan, S. P. **[(NHC)<sub>2</sub>Cu]X Complexes as Efficient Catalysts for Azide - Alkyne Click Chemistry at Low Catalyst Loadings**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8881-8884
- <sup>124</sup> Nakane, M.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. **Triazole-Linked Dumbbell Oligodeoxynucleotides with NF-κB Binding Ability as Potential Decoy Molecules**, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1842-1851
- <sup>125</sup> Garidel, P.; Blume, A.; Hubner, W. **A Fourier transform infrared spectroscopic study of the interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol**, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1466*, 245-259

- 
- <sup>126</sup> Milkereit, G.; Garamus, V. M.; Veermans, K.; Willumeit, R.; Vill, V. **Structures of micelles formed by synthetic alkyl glycosides with unsaturated alkyl chains**, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *284*, 704-713
- <sup>127</sup> Allen, D. K.; Tao, B. Y. **Synthesis and characterization of maltose fatty acid monoesters as biosurfactants**, *J. Surfact. Deterg.* **2002**, *5*, 245-255
- <sup>128</sup> Sakurai, K.; Shinkai, S. **Molecular Recognition of Adenine, Cytosine, and Uracil in a Single-Stranded RNA by a Natural Polysaccharide: Schizophyllan**, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4520-4521
- <sup>129</sup> Riess, J. G. **Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective**, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 4113-4131
- <sup>130</sup> Mukerjee, P.; Yang, A. Y. S. **Nonideality of mixing of micelles of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants and evidence of partial miscibility from differential conductance data**, *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 1388-1390
- <sup>131</sup> Elbert, R.; Folda, T.; Ringsdorf, H. **Saturated and polymerizable amphiphiles with fluorocarbon chains. Investigation in monolayers and liposomes**, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7687-7692
- <sup>132</sup> Kunitake, T. **Synthetic Bilayer Membranes: Molecular Design, Self-Organization, and Application**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 709-726
- <sup>133</sup> Lee, K. Y.; Mooney, D. J. **Hydrogels for Tissue Engineering**, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869-1879
- <sup>134</sup> Lönnberg, H. **Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates Useful for Delivery and Targeting of Potential Nucleic Acid Therapeutics**, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1065-1094
- <sup>135</sup> Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Rainer, C.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Kotliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.-P. **Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs**, *Nature* **2004**, *432*, 173-178
- <sup>136</sup> 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*, 2404-2410

- 
- <sup>137</sup> Tallet-Lopez, B.; Aldaz-Carroll, L.; Chabas, S.; Dausse, E.; Staedel, C.; Toulmé, J. J. **Antisense oligonucleotides targeted to the domain III<sub>d</sub> of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent *in vitro* translation**, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 734–742
- <sup>138</sup> Jaffrelo, L. Thèse de doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France, 2006
- <sup>139</sup> Feinstone, S. M.; Kapikian, A. Z.; Purcell, R. H.; Alter, H. J.; Holland, P. V. **Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B**, *N. Engl. J. Med.* **1975**, *292*, 767-770
- <sup>140</sup> Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome**, *Science* **1989**, *244*, 359-362
- <sup>141</sup> OMS. *J. Viral. Hepat.* **1999**, *6*, 35-47
- <sup>142</sup> Shepard, C. W.; Finelli, L.; Alter, M. J. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection**, *The Lancet Infectious Diseases* **2005**, *5*, 558-567
- <sup>143</sup> Memon, M. I.; Memon, M. A. **Hepatitis C: an epidemiological review**, *J. Viral. Hepat.* **2002**, *9*, 84-100
- <sup>144</sup> Jury de la Conference de Concensus. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2002**, *26*, B303-320
- <sup>145</sup> Chen, S. L.; Morgan, T. R. **The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection**, *Int. J. Med. Sci.* **2006**, *3*, 47-52
- <sup>146</sup> Kato, T.; Furusaka, A.; Miyamoto, M.; Date, T.; Yasui, K.; Hiramoto, J.; Nagayama, K.; Tanaka, T.; Wakita, T. **Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient**, *J. Med. Virol.* **2001**, *64*, 334-339
- <sup>147</sup> Farci, P.; Alter, H. J.; Shimoda, A.; Govindarajan, S.; Cheung, L. C.; Melpolder, J. C.; Sacher, R. A.; Shih, J. W.; Purcell, R. H. **HEPATITIS C VIRUS–ASSOCIATED FULMINANT HEPATIC FAILURE**, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 631-634
- <sup>148</sup> Brown, E. A.; Zhang, H.; Ping, L. H.; Lemon, S. M. **Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs**, *Nucleic, Acids Res.* **1992**, *20*, 5041-5045
- <sup>149</sup> Tsukiyama,-Kohara, K.; Lizuka, N.; Kohara, M.; Nomoto, A. **Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA**, *J. Virol.* **1992**, *66*, 1476-1483

- 
- <sup>150</sup> Fukushi, S.; Katayama, K.; Kurihara, C.; Ishiyama, N.; Hoshino, F. B.; Ando, T.; Oya, A. **Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 425-432
- <sup>151</sup> Hellen, C. U.; Pestova, T. V. **Translation of hepatitis C virus RNA**, *J. Viral Hepat.* **1999**, *6*, 79-87
- <sup>152</sup> Honda, M.; Ping, L. H.; Rijnbrand, R.C.; Amphlett, E.; Clarke, B.; Rowlands, D.; Lemon, S. M. **Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA**, *Virology*, **1996**, *222*, 31-42
- <sup>153</sup> Psaridi, L.; Georgopoulou, U.; Varaklioti, A.; Mavromara, P. **Mutational analysis of a conserved tetraloop in the 5' untranslated region of hepatitis C virus identifies a novel RNA element essential for the internal ribosome entry site function**, *FEBS. Lett.* **1999**, *453*, 49-53
- <sup>154</sup> Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. **LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition**, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630
- <sup>155</sup> Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. **LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition**, *Chem. Comm.* **1998**, 455-456
- <sup>156</sup> De Soultrait, V. R.; Lozach, P. -Y.; Altmeyer, R.; Tarrago-Litvak, L.; Litvak, S.; Andréola, M. L. **DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents**, *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 195-203

# Résumé

Dans le cadre de ce travail, nous avons synthétisé, isolé et caractérisé de nouvelles molécules amphiphiles dérivées d'acides nucléiques.

Les modifications de ces structures ont été réalisées par voie chimique au moyen d'une réaction de chimie clic, la réaction de Huisgen.

Les amphiphiles développés peuvent être classés dans deux catégories différentes :

- Les amphiphiles de faible masse moléculaire qui dérivent de nucléosides et de glycosylnucléosides.

Les propriétés d'auto organisation de ces composés ont été étudiées par différentes techniques, notamment de microscopie électronique et de diffraction des rayons X. La capacité de ces amphiphiles à former des gels a été évaluée dans différents solvants (eau et solvants organiques). Les propriétés de complexation des acides nucléiques de ces molécules ont également été mises en évidence. Les premiers résultats de transfection montrent que les glycosylnucléosides amphiphiles permettent l'internalisation des oligonucléotides à visée thérapeutique dans des cellules humaines de carcinome hépatocellulaire (Huh-7) en présence de sérum.

- Les amphiphiles de masse moléculaire élevée qui dérivent d'oligonucléotides.

La formation d'agrégats a été mise en évidence par différentes techniques telles que la microscopie électronique et la diffusion de la lumière. Les propriétés de reconnaissance associées à la séquence oligonucléotide ont été étudiées par des expériences de thermodénaturation. L'auto vectorisation de ces composés a pu être observée par microscopie d'épi-fluorescence et confocale. Cette auto vectorisation a également pu être quantifiée par cytométrie en flux sur une gamme variée de types cellulaires humains tels que les cellules épithéliales (Hela T4), les cellules gastriques (NCI) ou encore les cellules de carcinome hépatocellulaire (Huh-7). Ces travaux présentent également pour la première fois l'évaluation *in cellulo* d'oligonucléotides amphiphiles ciblant le virus de l'hépatite C.