

École Doctorale des Sciences Chimiques
Institut Charles Sadron, CNRS

Thèse présentée par :

Guillaume FIERS

soutenue le : **19 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Chimie des Polymères

**Synthèse orthogonale de poly(triazole amide)s
contenant des séquences codées synthétiques
ou naturelles**

THÈSE dirigée par :

M. Jean-François LUTZ

Directeur de recherche au CNRS, ICS, Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Eric DROCKENMULLER

Professeur, IMP, Lyon

M. Patrice WOISEL

Professeur, UMET, Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Delphine CHAN-SENG

Chargée de recherche au CNRS, ICS, Strasbourg

M. Loïc JIERRY

Professeur, ICS, Strasbourg

M. Jan C. BEHREND

Professeur, Institut de Physiologie, Freiburg

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Jean-François Lutz, qui m'a donné la possibilité de travailler sur cette thématique passionnante, et m'a encadré pendant les trois années passées dans son équipe.

Mes pensées vont également aux autres membres de cette équipe, qui m'ont formé, aidé, soutenu, et notamment à Laurence Oswald, sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas aussi efficacement, et qui a su me guider également au quotidien par ses nombreux conseils, et Delphine Chan-Seng, qui m'a aidé à me lancer et à obtenir mes premiers résultats. Je remercie également mes collègues non-permanents pour la bonne ambiance et l'entraide qui ont régné dans le groupe pendant mon séjour : Aziz bien entendu, le grand-frère, Gianni et Niklas, les inséparables, avec qui j'ai partagé des moments forts qui nous ont soudé, notamment dans les derniers mois de nos thèses respectives, Denise, Roza, Clothilde, Tito, avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau, Benoît, que j'ai aimé entendre râler jour après jour et tous les autres bien évidemment, Evgeniia, Sofia, Ufuk, Jeroen, Stejn, Emmanuelle, Héloïse, Matthieu, Elliot, Cécile, Clément, Alireza, Vincent, Swann, etc. grâce à qui j'ai passé des moments inoubliables. De ces rencontres ont découlé de très belles amitiés, je remercie donc tout particulièrement Julien et Romain, qui sauront très certainement pourquoi ils sortent un peu du lot, et je leur dis « à très bientôt » ! Je ne pourrais oublier Eline et Chloé, qui se sont relayées pour m'accompagner au quotidien pendant ces trois ans, au laboratoire comme en dehors, et avec qui j'ai eu plaisir à nouer des liens particuliers. Je les remercie également grandement pour leur aide dans l'élaboration de cette journée particulière qu'a été ma soutenance.

Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai été amené à collaborer pendant cette thèse : Dalila Chouikhi qui a initié le projet des acides nucléiques et m'a beaucoup transmis, Mélanie et Catherine pour les SEC, Pr. Laurence Charles et son équipe pour les mesures de spectrométrie de masse, Pr. Jan Behrends et ses étudiantes, Monasadat Talarimoghari et Mordjane Boukhet pour toute l'étude préliminaire avec les nanopores de protéines, Martine Heinrich et Noémie Bourgeois pour l'aide apportée pour les mesure de dichroïsme circulaire, Matthias Pauly et Laure Biniak pour la formation aux mesures en spectroscopie UV-visible. Je pense également à tous les collègues chercheurs et les personnels administratifs que j'ai côtoyé pendant ces trois années et qui m'ont rendu les moments à l'institut plus agréables. J'ai aussi pu compter sur le support de l'IRTG, dont je remercie les organisateurs et coordinateurs, Pr. Jorg Baschnagel, Birgitta Zovko et Jana Husse, mais aussi toutes les étudiantes et tous les étudiants que j'ai pu croiser sur les différents rendez-vous du programme.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury qui ont su apporter leur regard sur mon travail au cours d'une discussion très intéressante : les rapporteurs, Pr. Eric Drockenmuller et Pr. Patrice Woisel, les examinateurs, Dr. Delphine Chan-Seng et Pr. Jan Behrends, encore une fois, et enfin, le président du jury, Pr. Loïc Jierry, qui, en plus de m'avoir conseillé tout au long de ma thèse dans des discussions toujours sympathiques dans son bureau, dans les couloirs de l'institut, ou dans les gradins

d'une salle de basket, a su à la fois mener le débat d'une main de maître pendant la soutenance, mais également m'attribuer, avec brio, le grade de « docteur de l'Université Louis Pasteur ».

Trois années de doctorat ne seraient les mêmes sans les amis qui nous entourent, donc merci à eux d'avoir été présents pendant cette épreuve, que ce soient les amis rencontrés pendant ma thèse ou ceux de plus longues dates. Je pense notamment aux amis de l'école, aux supers voisins et leur petit bout de chou, que nous serons particulièrement tristes d'abandonner, ou encore à la famille alsacienne, qui a également pris une place importante. Vous êtes tous géniaux, ne changez rien. Merci aussi à ceux qui ont pu faire le déplacement pour venir assister à ma soutenance et m'ont permis de vivre une journée forte en émotions. Ma famille est également pour beaucoup dans les différents succès que j'ai pu vivre jusqu'à maintenant, je ne saurais les oublier : Maman, Papa, Benoît, Thomas, un grand merci ! Enfin, rien n'aurait été pareil sans la présence de celle qui croit en moi et me supporte au quotidien et qui illumine mes journées : Maëva, tu es parfaite.

Il me reste à remercier les lecteurs de prendre le temps de découvrir mes travaux dans lesquels, même s'ils ne sont sans doute pas parfaits, j'ai mis beaucoup de cœur. Bonne lecture !

Guillaume

Table des matières

Liste des abréviations	1
Introduction générale.....	5
Chapitre I : Les polymères à séquences contrôlées	13
1. Introduction.....	15
2. L'exemple des polymères naturels.....	16
2.1. Les acides nucléiques	16
2.1.1. L'acide désoxyribonucléique	16
2.1.1.1. Structure et fonction	16
2.1.1.2. La biosynthèse de l'ADN.....	17
2.1.1.3. La dénaturation de l'ADN	18
2.1.2. L'acide ribonucléique	19
2.1.2.1. Structure et fonctions.....	19
2.1.2.2. La biosynthèse de l'ARN	19
2.1.3. Les synthèses d'acides nucléiques	20
2.1.3.1. La synthèse chimique	20
2.1.3.2. La répllication artificielle	21
2.1.3.3. La synthèse d'analogues.....	21
2.2. Les protéines	22
2.2.1. Structure et fonctions.....	22
2.2.2. La biosynthèse des protéines	23
2.2.3. La synthèse chimique de peptides	24
2.2.3.1. L'approche en phase solide	25
2.2.3.2. L'utilisation de supports solubles	28
2.2.3.3. La chimie de protection.....	29
2.2.4. Les bioconjugués	29
2.3. Les glucides.....	31
3. Contrôle des séquences dans les polymères synthétiques	32
3.1. Les polymérisations par étapes	34
3.2. Les polymérisations en chaîne	35
3.3. Les synthèses multi-étapes	39
3.3.1. La synthèse itérative.....	39

3.3.2. La synthèse de dendrimères.....	40
3.3.3. La croissance itérative exponentielle	41
3.3.4. L'approche traditionnelle « AB+AB »	41
4. Synthèses itératives de polymères à séquences contrôlées sans groupements protecteurs	42
4.1. L'utilisation de monomères bi-fonctionnels en excès (« AA+BB »).....	44
4.2. L'utilisation d'une troisième fonction (« AA+BC »)	45
4.3. L'approche chimiosélective (« AB+CD »).....	46
5. Les chimies « click » pour la synthèse de polymères à séquences contrôlées	49
5.1. La cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre	50
5.2. Les chimies basées sur les thiols et thiolactones	52
5.3. L'utilisation de réactions de Diels-Alder.....	53
6. Séquençage et applications des polymères à séquences définies	54
6.1. Les techniques de séquençage des polymères à séquences définies	54
6.1.1. Les techniques historiques pour le séquençage basées sur les biopolymères	54
6.1.2. Des nouvelles techniques de séquençage adaptées aux polymères synthétiques.....	55
6.2. Les applications pour les polymères à séquences définies	57
7. Conclusions.....	58
Chapitre II : Optimisation de la synthèse d'oligo(triazole amide)s à séquences définies	61
1. Introduction.....	63
2. Synthèse itérative optimisée d'oligo(triazoles amide)s en phase solide	65
2.1. Stratégie générale	65
2.2. Optimisations pour la synthèse des oligomères	67
2.2.1. Premiers essais : nécessité d'apporter des améliorations	67
2.2.2. Influence du chauffage par micro-ondes sur l'étape de couplage acide-amine	68
2.2.3. Réduction des temps de réactions	71
2.2.4. Synthèse d'une chaîne plus longue	72
3. Amélioration de la solubilité des composés synthétisés grâce à un nouvel espaceur	73
3.1. Stratégie générale	73
3.2. Synthèses d'oligomères.....	74
3.2.1. Nouvelles preuves de la nécessité de l'utilisation des micro-ondes.....	74
3.2.2. Optimisation des bouts de chaînes dans le but d'améliorer la solubilité	76
3.2.2.1. Une phénylalanine en début de chaîne.....	77
3.2.2.2. Utilisation de la glycine et les problèmes en découlant.....	78
3.2.2.3. Un bout de chaîne sans linker : le choix de la simplicité	78

4. Analyses de chaînes uniques par les nanopores	80
4.1. Introduction aux analyses par les nanopores.....	80
4.2. Analyses des oligo(triazole amide)s par les nanopores.....	83
4.2.1. Analyse des poly(triazole amide)s porteurs d'une phénylalanine	84
4.2.2. Analyse des poly(triazole amide)s sans acide aminé terminal	86
5. Conclusions.....	87
Chapitre III : Développement d'une nouvelle voie de synthèse sans cuivre.....	89
1. Introduction.....	91
2. Synthèse itérative d'un oligo(triazole amide) sans cuivre	92
2.1. Stratégie générale	92
2.2. Synthèse du monomère contenant la cyclooctyne	94
2.3. Synthèse itérative d'un oligomère sans cuivre.....	96
3. Conclusions.....	101
Chapitre IV : Application à la synthèse d'acides xénonucléiques	103
1. Introduction.....	105
2. Synthèse itérative de PTzNAs	107
2.1. Stratégie générale	107
2.2. Synthèse des monomères	108
2.2.1. Synthèses des blocs AB.....	109
2.2.2. Synthèses des blocs CD	110
2.3. Synthèse des oligomères.....	112
2.3.1. Des premières tentatives prometteuses	112
2.3.2. Une nouvelle résine : un changement clé	113
2.3.3. Des problèmes avec certaines bases nucléiques : optimisation pour chaque situation	115
2.3.4. Conclusions des synthèses	120
3. Etude des propriétés d'hybridation des PTzNAs	121
3.1. Analyses en spectroscopie UV-visible en fonction de la température.....	121
3.2. Étude de la conformation spatiale par mesure du dichroïsme circulaire	124
4. Conclusions.....	126
Conclusion générale	129

Partie expérimentale	135
1. Techniques d'analyse et matériel utilisé	137
1.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	137
1.2. Chromatographies.....	137
1.3. Spectrométrie de masse.....	137
1.4. Spectroscopie UV-visible	138
1.5. Dichroïsme circulaire.....	138
1.6. Analyses par les nanopores.....	139
1.7. Micro-onde.....	139
1.8. Synthèses itératives.....	139
2. Réactifs et solvants.....	139
3. Synthèses.....	141
3.1. Synthèses du Chapitre II.....	141
3.1.1. Synthèse de l'espaceur E ₁ contenant une chaîne alkyle (II-1).....	141
3.1.2. Préparation de la résine fonctionnalisée avec une phénylalanine	142
3.1.3. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Phe-Wang à température ambiante..	143
3.1.4. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Phe-Wang ou Gly-Wang au micro-onde	144
3.1.5. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Wang au micro-onde	145
3.2. Synthèses du Chapitre III.....	145
3.2.1. Synthèse du monomère avec la cyclooctyne (III-1) – 1 ^{er} essai.....	145
3.2.2. Synthèse du monomère avec la cyclooctyne (III-1) – 2 ^{ème} essai	147
3.2.3. Synthèse itérative d'un oligo(triazole amide) à séquence définie sans cuivre sur une résine Wang.....	148
3.3. Synthèses du Chapitre IV.....	149
3.3.1. Synthèse du synthon AB-T (IV-1).....	149
3.3.2. Synthèse du synthon CD-T (IV-2).....	152
3.3.3. Synthèse des oligomères de PTzNAs.....	153
3.3.3.1. Préparation de la résine	153
3.3.3.2. Synthèse itérative.....	154
Références bibliographiques	157
Liste des publications	171

Liste des figures

Figure 0.1. Plan général des études menées.	9
Figure I.1. Guide (non exhaustif) des trois aspects principaux de l'architecture macromoléculaire : la composition, la topologie et la fonctionnalité.	15
Figure I.2. Les quatre bases nucléique de l'ADN.	17
Figure I.3. Principe de la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN.	17
Figure I.4. Réplication semi-conservative de l'ADN.	18
Figure I.5. Variation de l'absorbance de l'ADN à 260 nm lors de la dénaturation.	19
Figure I.6. Cycle des réactions itératives pour la méthode phosphoramidite.	21
Figure I.7. Comparaison des structures de l'ADN et du PNA.	22
Figure I.8. Exemple de structure d'un pentapeptide.	23
Figure I.9. Structures des protéines.	23
Figure I.10. Protocole général pour la synthèse itérative sur support solide.	26
Figure I.11. Description de la grande variété de propriétés apportées par les deux blocs des bioconjugués.	30
Figure I.12. Représentation schématique de différentes méthodes de préparation de bioconjugués peptide ou protéine-polymère en solution.	31
Figure I.13. Représentation de différents degrés de polymères à séquences contrôlées.	33
Figure I.14. Classification des approches principales pour la synthèse de polymères.	33
Figure I.15. Comparaison des polymérisations en chaîne libres et des polymérisations vivantes/contrôlées.	36
Figure I.16. Principaux mécanismes de polymérisations radicalaires vivantes/contrôlées.	37
Figure I.17. Principe général de l'insertion contrôlée cinétiquement d'unités maléimides N-substituées fonctionnalisées le long d'une chaîne polystyrène.	38
Figure I.18. Principe de la synthèse itérative.	39
Figure I.19. Approches pour la synthèse itérative de dendrimères.	40
Figure I.20. Stratégie générale pour l'approche itérative exponentielle.	41
Figure I.21. Stratégie générale pour l'approche « AB+AB ».	42
Figure I.22. Synthèse d'oligocarbamates.	43
Figure I.23. Stratégie générale pour l'approche « AA+BB ».	44
Figure I.24. Synthèse de TZPs.	44
Figure I.25. Stratégie générale pour l'approche « AA+BC ».	45
Figure I.26. Synthèse d'oligoTEAs.	45
Figure I.27. Protocole général pour l'étape de purification lors d'une synthèse itérative sur support fluoré.	46
Figure I.28. Stratégie générale pour l'approche « AB+CD ».	46
Figure I.29. Synthèse de peptoïdes.	47
Figure I.30. Synthèses d'oligomères à séquences contrôlées basées sur la chimie des thiolactones.	48
Figure I.31. Synthèses d'oligomères à séquences contrôlées basées sur les liaisons alcoxyamines.	49
Figure I.32. Synthèses d'oligo(triazole amide)s.	51

Figure I.33. Stratégie pour la synthèse de décamères alternés par des réactions de Diels-Alder photo-induites.	53
Figure I.34. Séquençage d'un brin d'ADN grâce à un nanopore.	55
Figure I.35. Représentation schématique des éléments principaux d'un spectromètre de masse pour analyse en tandem.	57
Figure II.1. Schéma général de la synthèse de triades de poly(triazole amide)s à séquences définies encodés moléculairement à partir d'une résine Wang.	63
Figure II.2. Schéma général de la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies encodés moléculairement par ajouts successifs de monomères ou par ligation de dyades.	64
Figure II.3. Concept général de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques.	65
Figure II.4. Schéma de la fonctionnalisation de la résine Wang par une phénylalanine protégée par un groupement Fmoc.	66
Figure II.5. Schéma de la déprotection de l'amine terminale de la résine Wang fonctionnalisée par une phénylalanine.	66
Figure II.6. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à partir d'une résine Phe-Wang.	67
Figure II.7. Spectres ESI-HRMS des premiers essais pour la synthèse de poly(triazole amide)s (amidification avec COMU).	68
Figure II.8. Spectres ESI-HRMS des essais avec chauffage au micro-onde pour la synthèse de poly(triazole amide)s.	69
Figure II.9. Spectres de masse en tandem des ions de m/z 566,4 Da et 872,6 Da observés dans les échantillons II-4, II-5 et II-6.	70
Figure II.10. Principe du chauffage par micro-ondes.	71
Figure II.11. Spectres ESI-HRMS des essais à temps réduits pour la synthèse de poly(triazole amide)s.	72
Figure II.12. Spectrométrie de masse pour la chaîne plus longue (II-9) de poly(triazole amide).	73
Figure II.13. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à espaceurs PEG à partir d'une résine Phe-Wang.	74
Figure II.14. Spectrométrie de masse pour les chaînes contenant les espaceurs PEG.	75
Figure II.15. Concept général pour le contrôle des bouts de chaînes des poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques.	76
Figure II.16. Spectres ESI-HRMS des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale.	77
Figure II.17. Analyses SEC des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12).	78
Figure II.18. Spectres ESI-HRMS des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal.	79
Figure II.19. Analyses SEC des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14).	80
Figure II.20. Représentation de la structure tridimensionnelle de l' α -hémolysine et de l'aérolysine, nanopores de protéines transmembranaires utilisés pour la caractérisation des poly(triazole amide)s contenant des séquences définies synthétiques.	82

Figure II.21. Discrimination des pelotes de polymères de tailles et/ou structures différentes par les nanopores.....	83
Figure II.22. Corrélation entre les analyses ESI-HRMS, SEC et avec l'α-hémolysine de l'échantillon contenant le composé II-12-7.	84
Figure II.23. Analyses par l'α-hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12) en mode négatif.	85
Figure II.24. Analyses par l'α-hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14) en mode négatif.	86
Figure II.25. Analyses par l'α-hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14) en mode positif.	87
Figure III.1. Comparaison entre la CuAAC et la SpAAC pour la formation d'un triazole par cycloaddition alcyne-azoture.....	92
Figure III.2. Schéma général pour la synthèse itérative de poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques grâce à une réaction de SpAAC à partir d'une résine Wang.	93
Figure III.3. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s avec des étapes de SpAAC à partir d'une résine Wang.....	93
Figure III.4. Synthèse du monomère AB contenant la cyclooctyne codant pour le bit 1 (III-1).....	95
Figure III.5. RMN ¹ H (CDCl ₃) du monomère AB contenant la cyclooctyne codant pour le bit 1 (III-1).	95
Figure III.6. Structure de l'oligo(triazole amide)s synthétisé par la nouvelle voie de synthèse sans cuivre (III-2).	96
Figure III.7. Analyse SEC de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2).	97
Figure III.8. Spectres ESI-HRMS de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2) en mode positif et en mode négatif.	98
Figure III.9. Guide (non exhaustif) des réarrangements et réactions subis par le monomère codant pour le bit 1 contenant la cyclooctyne (III-2).....	99
Figure III.10. Approches « AB+CD » possibles pour la voie de synthèse sans cuivre des poly(triazole amide)s.....	100
Figure IV.1. Schéma général de la synthèse des PNAs à partir d'une résine MBHA.....	106
Figure IV.2. Concept général de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des PTzNAs.	107
Figure IV.3. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des PTzNAs.	108
Figure IV.4. Structures chimiques des huit monomères utilisés pour la synthèse de PTzNAs.	109
Figure IV.5. Synthèse des blocs AB.	110
Figure IV.6. Synthèse des blocs CD.	111
Figure IV.7. Synthèse du bloc CD-T.	111
Figure IV.8. Spectre MALDI-TOF de la première séquence de PTzNA [Gly-TTTTTTTT] (IV-3).	112
Figure IV.9. Superposition des spectres MALDI-TOF après les 3 ^{ème} , 4 ^{ème} , 5 ^{ème} , 6 ^{ème} , 7 ^{ème} et 8 ^{ème} étapes de synthèse de la séquence de PTzNA [Gly-TTTTTTTT] (IV-4) avec des conditions optimisées.....	113
Figure IV.10. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTTTTTTT] (IV-5) et [Phe-TTTTTT] (IV-6-6) de PTzNAs.....	114
Figure IV.11. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTTTTTC] (IV-7) et [Phe-CTTTTC] (IV-8) de PTzNAs.	115

Figure IV.12. Spectre ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTTTG] (IV-9) (CuAAC avec CuBr/dNbipy).....	115
Figure IV.13. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTCTGT] (IV-10) et [Phe-TCTGTT] (IV-11) (CuAAC avec CuBr/dNbipy) de PTzNAs.....	116
Figure IV.14. Spectre ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-GTTTTG] (IV-12) (CuAAC avec CuBr/dNbipy).....	116
Figure IV.15. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTGTT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc CD-G.	117
Figure IV.16. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTATT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc CD-A.	118
Figure IV.17. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTTAT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc AB-A.....	119
Figure IV.18. Spectres UV-visible de l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires de séquences [TTTTTTTT] et [AAAAAAAA].....	122
Figure IV.19. Spectres UV-visible de l'hybridation de deux brins de PTzNA et d'ADN complémentaires de séquences [Phe-TTTTTTTT] (PTzNA, IV-5) et [AAAAAAAA] (ADN).....	123
Figure IV.20. Spectre UV-visible de l'analyse d'un brin de PTzNA de séquence [Phe-TTTTTTTT] (IV-5).	124
Figure IV.21. Analyse de l'hybridation de deux brins de PTzNA et d'ADN complémentaires de séquences [Phe-TTTTTTTT] (PTzNA, IV-5) et [AAAAAAAA] (ADN).....	125
Figure IV.22. Mesures du dichroïsme circulaire sur un brin d'ADN (séquence[AAAAAAAA]) et sur un brin de PTzNA (séquence [Phe-TTTTTTTT], IV-5) à différentes températures.	126
Figure E.1. RMN ¹ H (CDCl ₃) du composé II-1.....	142
Figure E.2. RMN ¹ H (CDCl ₃) du composé III-1.....	148
Figure E.3. RMN ¹ H (DMSO-d ₆) du composé IV-1.....	151
Figure E.4. RMN ¹ H (DMSO-d ₆) du composé IV-2.....	153

Liste des tableaux

Tableau I.1. Code génétique associé aux acides aminés (seuls 20 acides aminés sont reliés à des codons).....	24
Tableau I.2. Quelques exemples de linkers de supports insolubles.	28
Tableau II.1. Masses mesurées pour les oligomères II-4 (amidification à température ambiante) et II-6 (amidification à 40°C au micro-onde).	69
Tableau II.2. Masses mesurées pour les oligomères II-7 (amidification pendant 1h) et II-8 (CuAAC pendant 1h).	71
Tableau II.3. Masse mesurée pour la synthèse d'une chaîne plus longue (II-9).....	72
Tableau II.4. Masse mesurée pour la synthèse d'une chaîne contenant des espaceurs PEG avec les amidifications effectuées au micro-onde (II-11).	75
Tableau II.5. Masses mesurées et dispersité des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12).	78
Tableau II.6. Masses mesurées et dispersité des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14).....	80
Tableau III.1. Données extraites de l'analyse SEC de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2).	97
Tableau III.2. Liste (non exhaustive) des nouvelles générations de cyclooctynes pour une utilisation dans des réactions de cycloadditions.....	101
Tableau IV.1. Valeurs expérimentales des m/z mesurés par ESI-HRMS pour les PTzNAs protonés synthétisés par chimie itérative « AB+CD » en phase solide.	120


Liste des abréviations

ACN	acétonitrile
AcOH	acide acétique
ADMET	acyclic diene metathesis
ADN	acide désoxyribonucléique
amino-TEMPO	4-amino-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl
ARGET	activator regenerated by electron transfer
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ASCII	american standard code for information interchange
ATP	adénosine triphosphate
ATRP	atom transfer radical polymerization
BAL	backbone amide linker
BARAC	biarylazacyclooctyne
BCN	bicyclononyne
BHA	benzhydramine
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Cbz	carboxybenzyle
CCM	chromatographie sur couche mince
cHex	cyclohexane
CID	collision-induced dissociation
COMU	hexafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium
CPG	controlled-pore glass
cPNA	clickable peptide nucleic acid
CuAAC	copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition
Đ	dispersité
DBTDL	dilaurate de dibutylétain
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DHB	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DIBAC	dibenzoazacyclooctyne
DIBO	dibenzocyclooctyne
DIC	N,N'-diisopropylcarbodiimide
DIFO	difluorocyclooctyne
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMPA	2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone
DMSO	diméthylsulfoxyde

DMT	diméthoxytrityl
dNbipy	4,4'-dinonyl-2,2'-dipyridyl
DPhPC	diphytanoyl-phosphocholine
DSC	N,N'-disuccinimidyle
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ESI	electrospray ionization
Et ₂ O	éther diéthylique
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
Fmoc	fluorénylméthoxycarbone
Gly	glycine
HATU	hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium
HBTU	hexafluorophosphate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium
HMPA	acide 4-(hydroxyméthyl)phénoxyacétique
HMPB	acide 4-(4-hydroxyméthyl-3-méthoxyphénoxy)butyrique
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
ICAR	initiators for continuous activator regeneration
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MBHA	4-méthylbenzhydramine
Me ₂ PhP	diméthylphénylphosphine
Me ₆ TREN	tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine
MeOH	méthanol
MeONa	méthylate de sodium
MOFO	monofluorocyclooctyne
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
Mtt	méthyltrityle
NMP	nitroxide-mediated polymerization ou N-méthyl-2-pyrrolidone
NPPOC	2-(2-nitrophényl)propoxycarbone
OCT	cyclooctyne
oligoTEA	oligothioléthéramide
P-3C	Passerini three-component reaction
PBS	phosphate buffer saline
PEG	poly(éthylène glycol)
Phe	phénylalanine
PMDETA	N,N,N',N'',N''-pentaméthyl-diéthylènetriamine
PNA	peptide nucleic acid
PTzNA	peptide triazole nucleic acid
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium
RACP	radical addition-coupling polymerization

RAFT	polymerization by reversible addition/fragmentation chain transfer
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROP	ring-opening polymerization
SARA	supplemental activator and reducing agent
SASRIN	super acid-sensitive resin
SEC	steric exclusion chromatography
SpAAC	strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
SPPS	solid phase peptide synthesis
SPE	solide phase extraction
TBTA	tris-(benzyltriazolyméthyl)amine
t-Bu	<i>tert</i> -butyle
t-BuOK	<i>tert</i> -butylate de potassium
TFA	acide trifluoroacétique
TFMSA	acide trifluorométhylsulfonique
THF	tétrahydrofurane
THPTA	tris-(hydroxypropyltriazolyméthyl)amine
TIPS	triisopropylsilyle
TIS	triisopropylsilane
T _m	melting temperature
TOF	time of flight
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
TzNA	triazole analogue of peptide nucleic acid
TZP	triazine-based polymers
U-4C	Ugi four-component reaction
UV	ultraviolets
XNA	xeno nucleic acid

Introduction générale



Avec un développement croissant, les polymères deviennent, depuis environ un siècle, des outils indispensables à notre quotidien. Ils forment les objets qui nous accompagnent tous les jours, utilisés principalement en tant que matériaux grâce à leurs propriétés macroscopiques, mécaniques mais parfois aussi esthétiques. L'Âge du plastique, débuté avec les premiers matériaux polymères dans les premières années du 20^{ème} siècle, a connu son apogée quelques cinquante ans plus tard, avec des plastiques moulés, injectés ou colorés omniprésents. Aujourd'hui encore, beaucoup de matériaux de commodité sont basés sur les polymères sous des formes diverses, que ce soit des objets complets, des pièces de plus grands ensembles, ou simplement des revêtements sous forme de films minces comme des peintures ou des vernis. Des domaines sont particulièrement gourmands en matériaux plastiques tels que l'automobile, l'aéronautique, l'agroalimentaire, la construction, l'électronique ou le médical.^[1]

Pour ce dernier notamment, des progrès dans les dernières décennies ont permis de grandes avancées. S'inspirant de l'exemple de certaines biomacromolécules telles que les acides nucléiques ou les protéines, de nombreux outils ont ainsi été développés pour atteindre des degrés de contrôle dans les séquences des unités monomères toujours plus importants.^[2] Le contrôle toujours plus fin des microstructures des chaînes polymères^[3] donne accès à des propriétés nouvelles qui permettent, associées à des caractéristiques de biocompatibilité, d'atteindre donc par exemple des applications dans le domaine biomédical, comme pour de la vectorisation de principes actifs.^[4] Ces objectifs ont été atteints en partie grâce au développement de méthodes de synthèse donnant accès à des architectures précises utiles dans des situations particulières.

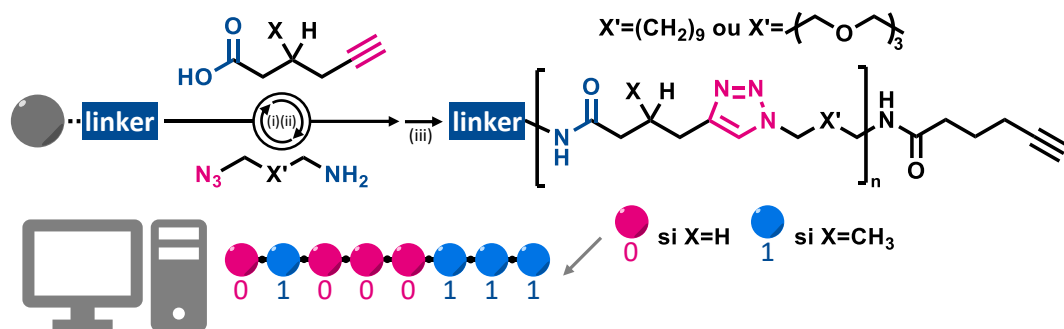
Il est désormais possible d'aller encore plus loin dans la régulation des unités monomères dans une chaîne polymère, amenant à la formation de polymères à séquences définies. Grâce à une méthode apparue dans les années 1960, la synthèse itérative supportée,^[5] puis toutes les améliorations qui en ont découlé jusqu'à aujourd'hui, la synthèse de tels composés est devenue très efficace. Si dans un premier temps, les efforts se concentraient sur l'obtention de composés naturels aux structures identiques aux acides nucléiques ou aux protéines, tout est, de nos jours, poussé plus loin avec des structures purement synthétiques présentant parfois des propriétés remarquables. Dans ce domaine à la fois pluridisciplinaire et interdisciplinaire, à l'interface entre chimie, biochimie, biologie ou encore ingénierie, les limites fixées par la nature sont repoussées pour synthétiser des polymères à séquences définies dont les applications sont diverses.^[2, 6, 7] Parfois basées sur les propriétés macroscopiques ou nanoscopiques découlant du contrôle de la microstructure, celles-ci peuvent être utiles au développement de nouveaux matériaux par exemple. Mais la régulation parfaite de l'enchaînement des unités monomères dans un polymère peut présenter une toute autre utilité : l'encodage d'information le long de la chaîne.^[8] Sur l'exemple de l'ADN, un grand nombre de groupes de recherche se sont focalisés sur le stockage d'information numérique au niveau moléculaire, avec comme objectifs des gains en facilité de synthèse, en densité de stockage, et en durabilité. Si l'ADN a été assez logiquement le premier choix, d'autres systèmes polymères non naturels ont depuis été développés pour du stockage de données ponctuel, sur le long terme, ou encore pour des applications différentes. Ceux-ci font généralement appel à un encodage de type binaire reposant sur l'utilisation de deux monomères codants (un pour le bit 0 et un autre pour le bit 1). D'autres problématiques émergent, faisant suite aux progrès dans la synthèse de ces polymères à séquences définies, notamment dans la caractérisation de ces composés. Ainsi, des méthodes de lecture des séquences de monomères sont par exemple étudiées.^[9]

C'est dans ce contexte que cette thèse s'inscrit puisqu'elle concerne la synthèse supportée itérative et orthogonale de différentes structures de poly(triazole amide)s à séquences définies, mais aborde également quelques aspects de techniques de caractérisation particulières, à savoir la spectrométrie de masse en tandem et l'analyse des séquences par les nanopores.

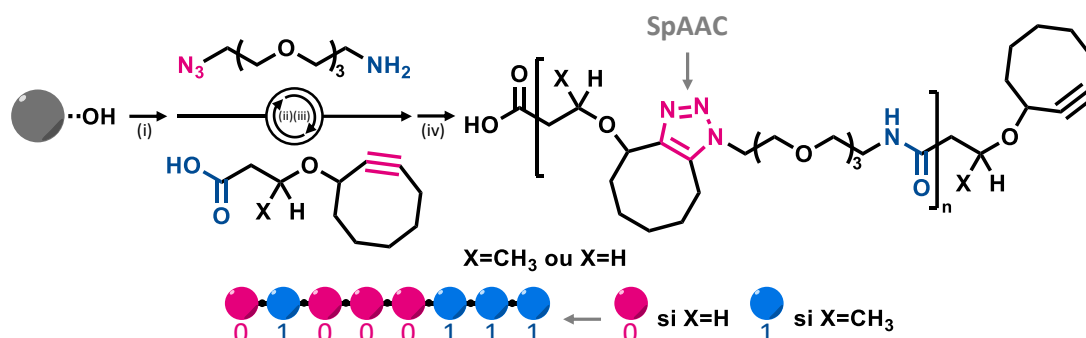
La synthèse itérative supportée des poly(triazole amide)s repose sur une approche orthogonale « AB+CD » faisant intervenir quatre fonctions A, B, C et D ne pouvant réagir que deux à deux. En l'occurrence, les deux réactions mises en jeu sont un couplage entre un acide carboxylique et une amine formant une liaison amide et une cycloaddition catalysée par le cuivre entre un azoture et un alcyne (CuAAC pour *copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*) menant à la formation d'un groupement triazole. L'utilisation de ces réactions orthogonales permet d'éviter des étapes de déprotection et de purification contraignantes qui étaient présentes dans les schémas traditionnels de synthèses itératives, notamment pour l'approche dite « AB+AB ».^[10] Un support solide est utilisé, aidant à contrôler parfaitement la séquence des monomères et facilitant du même coup les étapes de purification restantes. Le support est une bille de polymère insoluble et fonctionnalisée. Les fonctions présentes dans ce polymère réticulé constituent les points d'accroche des chaînes qui vont par la suite être synthétisées. Leur nombre est contrôlé, afin d'obtenir des quantités de produit suffisantes tout en évitant qu'un trop grand nombre de chaînes croissent autour de la résine, ce qui entraînerait des gênes stériques et donc une baisse du rendement. Cette notion de rendement est particulièrement primordiale dans la synthèse itérative des polymères à séquences définies puisque pour que les séquences des chaînes obtenues soient identiques et donc effectivement définies, il est nécessaire que chaque étape de la synthèse soit quantitative. Les réactions ont donc lieu dans un tube d'extraction en phase solide (SPE pour *solid-phase extraction*) muni d'un robinet et équipé d'un fritté permettant de filtrer les solutions de réactifs tout en conservant les chaînes en croissance covalamment attachées aux billes de résine insolubles.

Le **chapitre I** consiste en une large mise en contexte à travers une étude bibliographique des différents aspects dont il est question ensuite. L'étude historique et les méthodes de synthèse des biomacromolécules, dont s'inspirent la plupart des travaux sur la thématique des polymères à séquences contrôlées, sont abordées en premier lieu. Puis, les différents progrès réalisés au cours du siècle dernier et dans les années plus récentes sur les techniques qui permettent aujourd'hui de contrôler les architectures des chaînes polymères sont discutés, avec un intérêt particulier pour les synthèses multi-étapes qui sont au cœur des travaux de cette thèse. Enfin, les méthodes modernes de caractérisation et de séquençage des polymères à séquences contrôlées, ainsi que quelques applications à ceux-ci, sont brièvement décrites. Suivent alors trois chapitres expérimentaux qui contiennent l'ensemble des travaux qui ont été réalisés durant cette thèse (Figure 0.1).

a. Synthèse de poly(triazole amide)s contenant des séquences synthétiques définies



b. Développement d'une nouvelle voie de synthèse sans cuivre



c. Synthèse de poly(triazole amide)s contenant des séquences naturelles définies

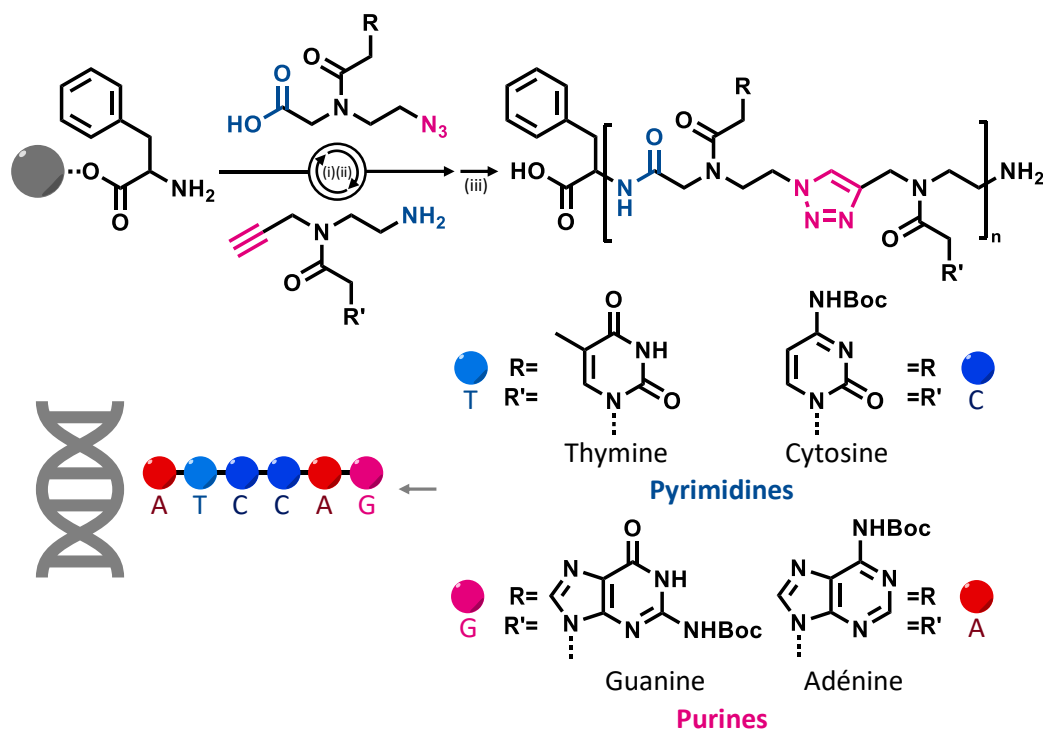



Figure 0.1. Plan général des études menées. a. **Chapitre II** - Synthèse itérative, orthogonale et supportée de poly(triazole amide)s contenant des séquences définies synthétiques de données numériques sous forme d'un code binaire. b. **Chapitre III** - Synthèse itérative, orthogonale et supportée de poly(triazole amide)s contenant des séquences définies synthétiques, faisant intervenir une étape de SpAAC ne nécessitant plus de catalyseur au cuivre. c. **Chapitre IV** - Synthèse itérative, orthogonale et supportée de poly(triazole amide)s de type acide xénonucléique (XNA) contenant des séquences définies naturelles.

Suivant l'exemple de poly(triazole amide)s à séquences définies synthétisés auparavant,^[11, 12] des structures sont imaginées dans le **chapitre II** pour encoder des informations sur les chaînes qui seraient solubles dans l'eau. La synthèse fait ainsi intervenir un premier monomère codant, porteur des fonctions acide carboxylique et alcyne, et d'une chaîne latérale déterminant s'il encode pour le bit 0 (un hydrogène) ou pour le bit 1 (un groupe méthyle). Dans les polymères synthétisés dans cette thèse, seul le monomère codant pour 0 est utilisé. Un deuxième monomère, portant les fonctions azoture et amine, est utilisé comme espaceur. Celui-ci se compose d'une longue chaîne alkyle ou d'une chaîne poly(éthylène glycol) (PEG). Grâce à ces différents monomères, plusieurs structures et longueurs de chaînes de poly(triazole amide)s sont synthétisées sur différents supports. La résine Wang utilisée est en effet modifiée avec différents linkers, permettant ainsi de contrôler le bout de chaîne du polymère obtenu. Les oligomères obtenus sont caractérisés en spectrométrie de masse et leur séquence (même si elle n'est composée que de 0) déchiffrée par spectrométrie de masse en tandem.

Des essais d'analyse des oligomères par les nanopores sont également menés. Cette technique d'analyse repose sur la mesure du courant électrique dans un nanopore que traverse les composés analysés, les analytes. Lorsqu'un analyte entre au cœur du nanopore, il va en partie bloquer le courant imposé à celui-ci et créer un événement. Les événements enregistrés diffèrent dans leur intensité et dans leur durée selon la structure ou la taille des polymères analysés. Cette technique, mise au point pour la lecture des séquences d'acides nucléiques est aujourd'hui en train d'être adaptée pour l'analyse de polymères synthétiques.^[13, 14] Elle donne très précisément accès à des distributions de tailles de molécules et permet de dissocier des objets dont les écarts de masses moléculaires sont relativement faibles. Dans des échantillons donnés, il est donc possible de détecter la présence des oligomères étudiés, ainsi que des impuretés qui peuvent subsister, donnant une caractérisation statistique et réaliste de l'isomolécularité et donc de la pureté des produits synthétisés.

Afin toujours d'améliorer les propriétés des oligomères obtenus, et notamment leur solubilité dans l'eau, une nouvelle voie de synthèse est envisagée dans le **chapitre III**, faisant intervenir non plus une CuAAC catalysée par le cuivre entre un azoture et un alcyne linéaire mais une SpAAC (pour *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) faisant intervenir un azoture et une cyclooctyne et formant un groupement triazole sans intervention de catalyseur.^[15, 16] Cette voie de synthèse a plusieurs avantages. Tout d'abord, l'absence de cuivre lors de l'étape de cycloaddition permet d'éviter d'éventuels arrangements et complexations entre le métal et les triazoles formés, ce qui pourrait être à l'origine de la faible solubilité dans la plupart des solvants usuels. En outre, la réaction étant affranchie de l'emploi du cuivre et prenant place dans un mélange comportant de l'eau, elle permet d'imaginer une chimie plus verte, très en vogue.

Enfin, sur l'exemple des PNAs (pour *peptide nucleic acids*) développés dans les années 1980,^[17, 18] reposant sur l'utilisation d'un squelette polymérique identique à celui des peptides sur lequel sont disposées les bases de l'ADN, un autre type d'acide xénonucléique (acide nucléique modifié) est considéré dans le **chapitre IV**. Il fait donc intervenir les bases nucléiques de l'ADN qui sont fixées sur un squelette poly(triazole amide) pour former des PTzNAs (pour *peptide triazole nucleic acids*). Le schéma de synthèse fait intervenir huit monomères différents (un monomère avec les fonctions acide carboxylique et azoture, un second avec les fonctions alcyne et amine, portant dans les deux cas les quatre bases nucléiques) dans une approche une nouvelle fois itérative, orthogonale et supportée. La résine utilisée dans ce cas est une résine Wang fonctionnalisée avec une phénylalanine. De



nombreuses conditions sont essayées pour l'ajout de chaque monomère aux séquences, résultant en l'obtention de différents oligomères faisant intervenir tous les synthons possibles. Les optimisations sont notamment nécessaires au niveau du choix des agents de couplage pour les étapes d'amidification et dans le choix des ligands du cuivre dans les étapes de cycloaddition. Des problèmes ont été particulièrement observés pour l'ajout des monomères portant des bases purines (guanine et adénine) qui amènent à des niveaux de pureté plus faibles pour certaines séquences.

Les PNAs, par leur squelette peptidique, présentaient des écarts entre bases identiques à ceux de l'ADN, ce qui a permis d'observer des interactions ADN-PNA et notamment la formation de duplexes et de triplexes. L'idée de remplacer une liaison amide sur deux par un groupement triazole présente les mêmes avantages. Des expériences sont donc conduites afin d'observer des interactions ADN-PTzNA en fonction de la température, comme c'est le cas pour la double hélice d'ADN ou pour les complexes ADN-PNA, à la fois en spectroscopie UV-visible et en dichroïsme circulaire.

Chapitre I

Les polymères à séquences contrôlées

1. Introduction

Avec une place prépondérante dans la recherche mondiale, fondamentale comme appliquée, depuis plus de cent ans, les polymères sont omniprésents et façonnent notre quotidien, notre vie, notre société moderne. Depuis les années 1950, la production de polymères a explosé et ne cesse d'augmenter, montrant l'importance croissante qui leur est attribuée. Mais ils façonnent notre vie par d'autres aspects également. En effet, les polymères font partie de nous en ce qu'ils nous composent en partie. La vie ne serait pas possible sans eux. Nous les mangeons, nous les transformons, nous les produisons, ils nous régissent finalement à travers tous les mécanismes biologiques qui nous permettent, de vivre, de respirer, de se déplacer, de penser.

Les polymères sont des macromolécules composées d'unités répétitives. Il est donc assez logique de retrouver cette définition directement dans le nom qui leur a été donné puisque le terme polymère provient du grec ancien et est construit à partir des mots πολύς (*polus*, beaucoup) et μέρος (*meros*, partie). Les unités qui composent ces macromolécules sont des monomères (du grec ancien μόνος, *monos*, seul) qui sont assemblés lors du processus de polymérisation. Leurs propriétés variées en font d'excellents candidats pour la production de matériaux, et c'est notamment dans ce domaine que les polymères ont été le plus largement utilisés depuis la fin du 19^{ème} siècle. Les objectifs principaux des chercheurs polyméristes ont longtemps porté sur des paramètres précis tels que le contrôle de la masse molaire ou de la dispersité des chaînes. Des recherches plus récentes ont permis le développement de compositions (copolymères statistiques, à blocs, gradients, périodiques) et de topologies (polymères cycliques, en étoile, branchés, réticulés, hyperbranchés) plus complexes, qui apportent une certaine modernité au domaine, en plus de fonctionnalités et propriétés inédites (Figure I.1). Des voies et des outils de synthèse ont ainsi vu le jour pour permettre de contrôler la structure des polymères en ce sens.

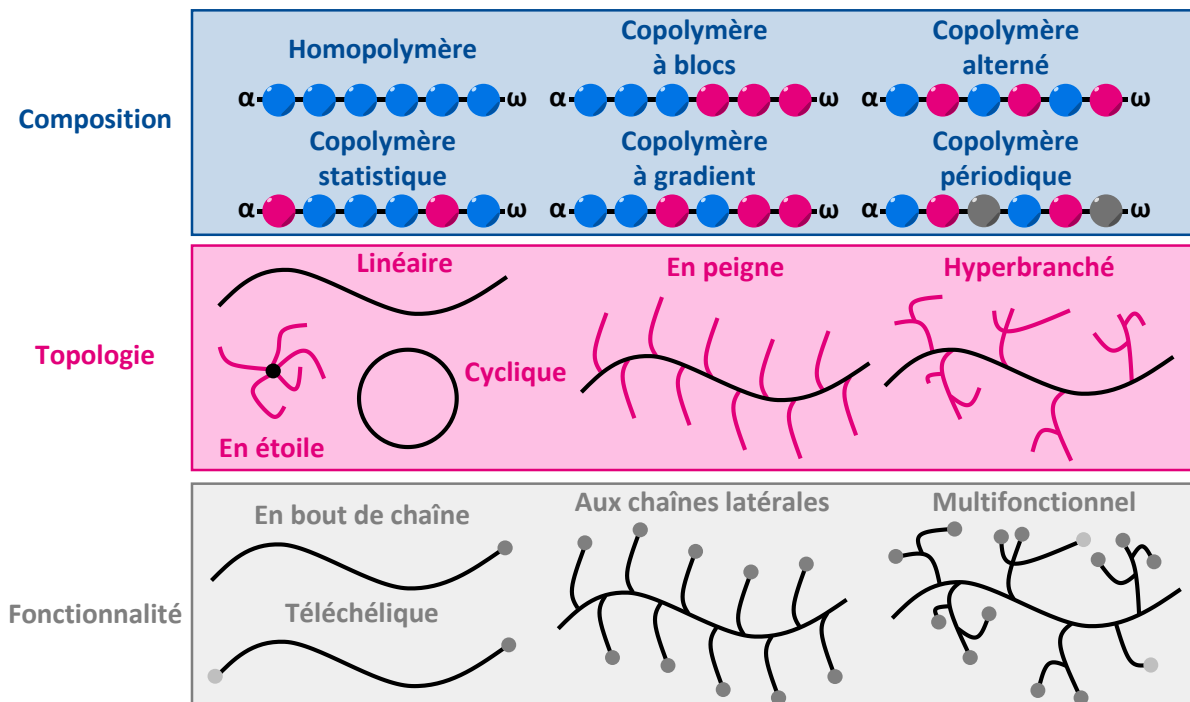


Figure I.1. Guide (non exhaustif) des trois aspects principaux de l'architecture macromoléculaire : la composition, la topologie et la fonctionnalité.^[3]

Les découvertes sur les structures des polymères naturels présents dans les organismes et le lien avec les propriétés et fonctions qu'ils dégagent ont cependant mis en évidence les manques à combler en termes de régulation de structure primaire des polymères synthétiques, c'est-à-dire du contrôle de la séquence. En effet, il est évident que pour accéder à une nouvelle génération de polymères, il n'est plus suffisant de se contenter de polymères à séquences contrôlées, mais il faut pousser plus loin le concept et parvenir à des polymères à séquences définies, dont la position de chaque unité monomère est parfaitement régulée. En procédant ainsi, sur le modèle des biomacromolécules, la définition de la structure primaire du polymère pourrait mener à l'obtention d'une structure secondaire (conformation dans l'espace), qui induirait potentiellement une structure tertiaire (interactions intramoléculaires) voire quaternaire (interactions intermoléculaires) donnant éventuellement des fonctionnalités et des propriétés encore plus avancées au matériau. La régulation de la séquence des monomères peut également donner lieu à l'implémentation d'un message dans la chaîne du polymère, ouvrant la perspective de polymères à séquences définies contenant de l'information.

C'est dans ce contexte que, depuis plusieurs décennies, des approches, des méthodes et des outils chimiques ont été développés ou importés de différentes disciplines comme la biologie, la biochimie ou l'ingénierie, dans le but d'accéder à des polymères à séquences définies synthétiques, en s'inspirant de la nature mais aussi pour repousser les limites de celle-ci. Ce chapitre vise à donner un aperçu de ces inspirations, de ces méthodes développées et de ces outils utilisés pour mener à des applications diverses.

2. L'exemple des polymères naturels

De nombreux exemples de polymères à séquences contrôlées sont présents dans la nature. L'intérêt est ici de pouvoir adapter les mécanismes propres à la biologie pour la synthèse de polymères à séquences contrôlées. Parmi ces biopolymères naturels, trois catégories sont particulièrement étudiées dans le domaine : les acides nucléiques, les protéines et les glucides.

2.1. Les acides nucléiques

2.1.1. L'acide désoxyribonucléique

2.1.1.1. Structure et fonction

Le stockage de l'information génétique des systèmes vivants se fait par l'acide désoxyribonucléique (ADN).^[19] Cette biomacromolécule est présente dans toutes les cellules du monde vivant. Le squelette de ce polymère, formé d'unités répétitives sucres (désoxyribose) et phosphates, porte quatre bases nucléiques distinctes, dont l'enchaînement défini forme le code génétique. Chaque unité est un nucléotide. Les bases sont la thymine (T) et la cytosine (C) (les pyrimidines), et la guanine (G) et l'adénine (A) (les purines) (Figure I.2). Avec son alphabet à quatre lettres codant le génome entier d'une cellule vivante, l'ADN est l'une des biomacromolécules à séquences définies contenant la plus grande densité d'information.^[20] L'ADN a été isolé pour la première fois en tant que vecteur de l'information génétique 1944 par Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod et Maclyn McCarty,^[21] mais ce n'est qu'en 1953 que le lien est fait entre sa structure primaire (l'enchaînement des bases azotées) et sa structure secondaire (l'organisation et l'assemblage des chaînes dans l'espace) par James D. Watson et Francis H. C. Crick,^[22] travaux qui, avec Maurice H. F. Wilkins,^[23] leur valurent le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1962.

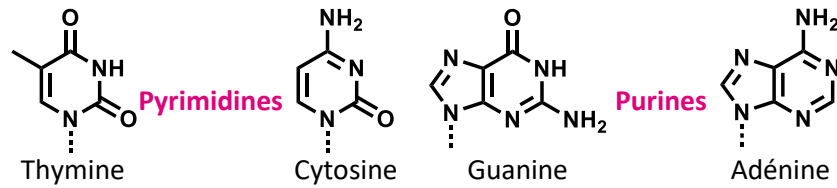


Figure I.2. Les quatre bases nucléique de l'ADN.

Dans les systèmes biologiques, l'ADN est donc trouvé sous la forme d'une double hélice bâtie par deux brins. Ces brins interagissent à travers des liaisons hydrogènes entre deux bases : l'adénine est appariée à la thymine par deux liaisons hydrogènes alors que la guanine est appariée à la cytosine par trois liaisons hydrogènes (Figure I.3). La double hélice est alors organisée de telle sorte que les groupements sucres et phosphates sont repoussés à l'extérieur et les bases se lient vers l'intérieur.^[19] La liaison hydrogène est plus faible qu'une liaison covalente, et présente dès lors l'intérêt majeur d'être réversible, propriété essentielle à beaucoup de mécanismes biologiques. Elle est cependant assez forte, surtout lorsqu'il s'en forme un grand nombre simultanément, pour maintenir la cohésion d'une structure comme la double hélice d'ADN. Il apparaît alors clair que pour que celle-ci soit le plus stable possible, il est nécessaire que toutes les bases des brins interagissent, et donc que les deux brins soient complémentaires.

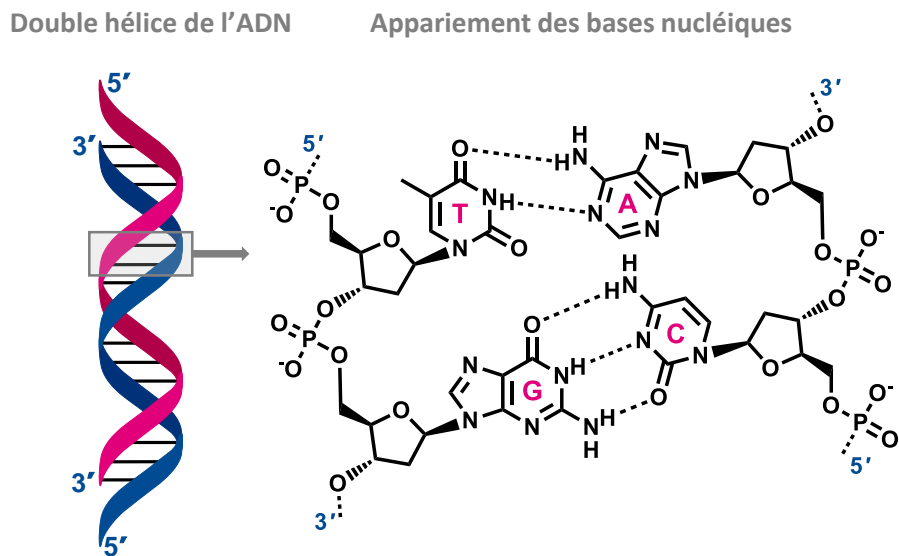


Figure I.3. Principe de la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN.

2.1.1.2. La biosynthèse de l'ADN

L'ADN est obtenu par réplication semi-conservative, ce qui signifie que chacun des brins de la double hélice, qui portent donc des séquences complémentaires, va mener à la formation d'un nouveau brin, dont la séquence lui sera également complémentaire, conduisant à l'obtention d'une deuxième double hélice, identique à celle du départ. Les deux double hélices formées sont donc constituées d'un brin parent (c'est-à-dire issu de la double hélice initiale) et d'un brin complémentaire nouveau.^[24] Des enzymes séparent les deux brins parents, conduisant à la formation d'une fourche de réplication, puis l'ADN polymérase, qui catalyse la formation de la liaison phosphodiester, aide à la polymérisation en incorporant les bases nucléiques (sous forme de monomères activés) par complémentarité avec le brin d'origine, qui lui sert donc de modèle. Cette polymérisation a toujours

lieu de l'extrémité 5' (phosphate relié au cinquième carbone de l'ose) vers le bout 3' (hydroxyle relié au troisième carbone de l'ose) de la chaîne. Cela signifie que l'une des deux chaînes nouvellement formées le sera de manière continue (brin direct) en suivant le déplacement de l'ADN polymérase, alors que la seconde, dans le mauvais sens, le sera de manière discontinue (brin indirect). Des blocs plus courts, appelés fragments d'Okazaki (Figure I.4), sont alors synthétisés puis assemblés par un autre complexe enzymatique (l'ADN ligase).^[25]

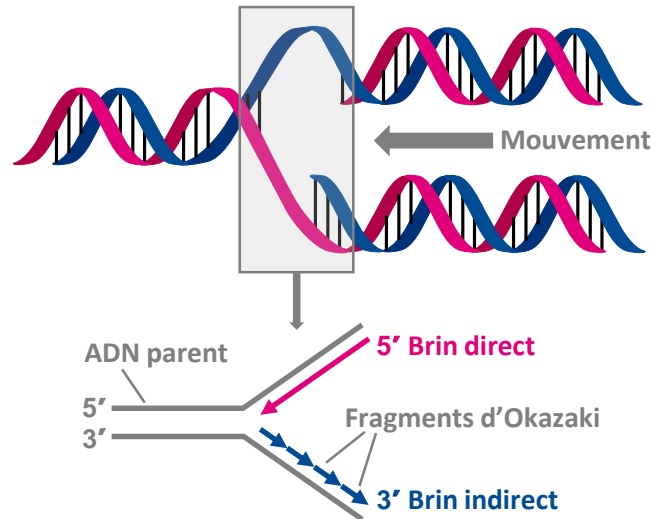


Figure I.4. Réplication semi-conservative de l'ADN.

2.1.1.3. La dénaturation de l'ADN

Une caractéristique très intéressante de la structure de l'ADN est la capacité des liaisons hydrogènes de la double hélice à se former ou se défaire. C'est le cas par exemple lors de la biosynthèse décrite précédemment. Il s'agit donc d'un système dynamique. Au repos, l'ADN est sous sa forme complexée. Lors d'un apport d'énergie suffisant, il est dénaturé,^[19] c'est-à-dire que les deux brins complémentaires sont séparés. La dénaturation, ou fusion (cette terminologie représente assez bien le caractère abrupt du phénomène), est effectuée dans les cellules par des protéines appelées hélicases, qui apportent au complexe de l'énergie chimique (par l'hydrolyse de molécules d'ATP par exemple). Au laboratoire, il suffit d'augmenter la température pour observer ce phénomène. On peut alors définir une température de fusion T_m (pour *melting temperature*) à laquelle la moitié des liaisons hydrogènes sont rompues, et donc la moitié de la structure hélicoïdale est perdue. Le processus inverse, à savoir la réassociation des bases azotées complémentaires deux à deux, est appelée renaturation, et a lieu lors de la baisse de l'énergie du système.

En pratique, cela peut s'observer en analysant l'absorption de la lumière à 260 nm, longueur d'onde d'absorbance maximale des bases nucléiques. En effet, lorsque ces bases sont libres (simple brin), elles absorbent plus la lumière que lorsqu'elles sont liées (double hélice). Il est donc possible de voir une nette augmentation de l'absorbance (environ 40%) du milieu lorsque le complexe d'ADN fond en simple brins (Figure I.5). Les bases G et C étant reliées l'une à l'autre par trois liaisons hydrogènes, il est plus difficile de les séparer. Plus il y aura de telles bases dans une séquence, plus il sera difficile de défaire le duplexe et plus la T_m de celui-ci sera élevée.^[26-28] La température de dénaturation d'une séquence d'ADN dépend donc directement du pourcentage de GC de cette séquence, c'est-à-dire de la proportion de bases G ou C de celle-ci. De la même manière, la taille de la séquence concernée par la dénaturation jouera sur la valeur de la température de dénaturation. Enfin, d'autres paramètres

entrent en jeu comme l'enchaînement des bases (les interactions entre deux bases de deux brins seront différentes selon les voisines directes de ces bases) par exemple.^[29-31] Finalement, il est possible, simplement en analysant la composition d'une séquence d'ADN, de prévoir sa température de dénaturation.

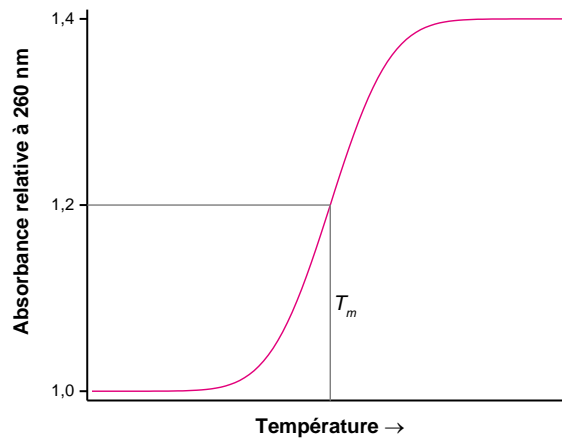


Figure I.5. Variation de l'absorbance de l'ADN à 260 nm lors de la dénaturation.

2.1.2. L'acide ribonucléique

2.1.2.1. Structure et fonctions

Alors que l'acide désoxyribonucléique (ADN) joue un rôle d'archivage du code génétique dans le noyau des cellules, l'acide ribonucléique (ARN) peut jouer plusieurs rôles, le plus souvent en exportant ce code à l'extérieur du noyau. En effet, les cellules utilisent en général l'ARN comme un vecteur intermédiaire temporaire du code génétique pour son expression dans de nombreux mécanismes chimiques et biologiques.^[32] La structure de l'ARN est très proche de celle de l'ADN mais diffère en certains points.^[19] Le squelette, tout d'abord, est toujours composé d'unités phosphates et sucres intercalées, seulement le groupement sucre, dans le cas de l'ARN, est le ribose. De plus, les bases azotées attachées à ce squelette sont les mêmes que pour l'ADN, à l'exception de la thymine, qui devient uracile (U). Les propriétés d'appariement de cette base avec l'adénine restent cependant identiques.

Les chaînes d'ARN, contrairement à l'ADN, ont tendance à ne pas former de complexes avec les séquences complémentaires, formant tout de même des structures tridimensionnelles bien définies mais monocaténaire (simple brin).^[19] La plupart du temps, les appariements entre bases se font à l'intérieur d'une même macromolécule, menant à des structures complexes. L'ARN est donc capable, du fait de cette structure secondaire particulière, d'aider à des tâches pour lesquelles la double hélice d'ADN ne serait d'aucune utilité.

2.1.2.2. La biosynthèse de l'ARN

La synthèse de l'ARN est très proche de celle de l'ADN. Cependant, celle-ci n'est pas appelée réplication. En effet, l'ARN étant la copie d'une partie du matériel génétique, le mot transcription est plus approprié. Une enzyme majeure est mise en jeu : l'ARN polymérase. Celle-ci, massive et complexe, prend en charge tout le processus synthétique. C'est donc cette enzyme qui parcourt la chaîne d'ADN à la recherche d'un site d'initiation, qui défait provisoirement une courte étendue de la double hélice afin d'accéder à un simple brin, qui apporte les monomères nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN et catalyse la formation des liaisons phosphodiester tout en se déplaçant le long de

la chaîne, puis termine cette synthèse lorsqu'elle atteint un signal de terminaison sur la séquence. La nouvelle séquence d'ARN est alors détachée de sa complémentaire ADN qui peut reformer sa double hélice.

2.1.3. Les synthèses d'acides nucléiques

2.1.3.1. La synthèse chimique

Dès les premières découvertes concernant les structures et les rôles variés des acides nucléiques, la synthèse de ceux-ci a été envisagée. C'est ainsi que dès 1955, après avoir passé quelques années à préparer des désoxyribonucléotides (les blocs formant l'ADN), Alexander R. Todd est parvenu à synthétiser le premier dinucléotide (didésoxythymidine)^[33] par la formation d'une liaison phosphodiester entre deux désoxythymidines protégées. Le dinucléotide obtenu présentant des caractéristiques communes au même dinucléotide isolé de produits naturels, la structure 3'-5' de la liaison phosphodiester a pu être confirmée. Par la suite, plusieurs méthodes d'activation et de protection des nucléotides ont été étudiées, notamment par H. Gobind Khorana,^[34-37] pour mener à la synthèse d'oligonucléotides d'ADN ou d'ARN avec des rendements toujours plus élevés, jusqu'à l'obtention de gènes complets dans les années 1970.^[38, 39] Cette approche, dite méthode phosphodiester, montre tout de même quelques limites. Par exemple, lors de la croissance de la chaîne, les groupements phosphates se multiplient le long du squelette du polymère, ouvrant la voie à des réactions avec les monomères ajoutés et menant à des polymères hyperbranchés aléatoirement qui ne correspondent donc plus au produit recherché et obligent à de longues étapes de purification.

Une amélioration majeure est alors apportée par Robert L. Letsinger. Déçu d'avoir été devancé par R. Bruce Merrifield sur ses projets de synthèse supportées de peptides (voir 1.2.2.3),^[40] il se lance au début des années 1960 dans la synthèse sur support solide d'oligonucléotides. La méthode développée, dite méthode phosphotriester,^[41] est un perfectionnement de celle décrite précédemment puisqu'elle empêche les hyperbranchements. En effet, la formation de phosphotriesters à la place des phosphodiesters réduit considérablement la réactivité du squelette du polymère en croissance, limitant les réactions parasites. En outre, l'utilisation du support solide sur lequel la séquence croît simplifie grandement les étapes de purification. Au final, la synthèse itérative des oligonucléotides est bien plus rapide et facile.^[42] Mais Letsinger ne s'arrête pas là et développe dans les années 1970 une autre méthode toujours plus rapide et efficace,^[43, 44] optimisée encore un peu plus par son ancien étudiant Marvin H. Caruthers.^[45] La méthode phosphite triester fait intervenir un intermédiaire portant un groupement phosphite triester facilement oxydé en quelques secondes seulement en phosphotriester. Le design des monomères et des supports utilisés pour cette voie de synthèse permet une fois de plus un gain de temps considérable, auquel il est possible d'ajouter un début d'automatisation de la procédure. Cependant, l'instabilité des réactifs et les conditions un peu dures de cette approche ne permettent pas réellement un succès à plus large échelle.

Finalement, la méthode la plus répandue pour la synthèse d'ADN est largement inspirée de la méthode phosphite triester. Au début des années 1980, Caruthers, décrit la synthèse de nucléosides phosphoramidite qu'il utilise comme monomères pour la synthèse d'ADN par une approche phosphite triester.^[46] C'est la méthode phosphoramidite (Figure I.6).^[47] Ces nouveaux intermédiaires sont beaucoup plus stable et sont activés dans des conditions assez douces pour que, après quelques optimisations, la méthode soit commercialisée au travers de synthétiseurs automatiques. Le protocole est ainsi rendu accessible à tous et la synthèse de polynucléotides au laboratoire simple et rapide.^[48]

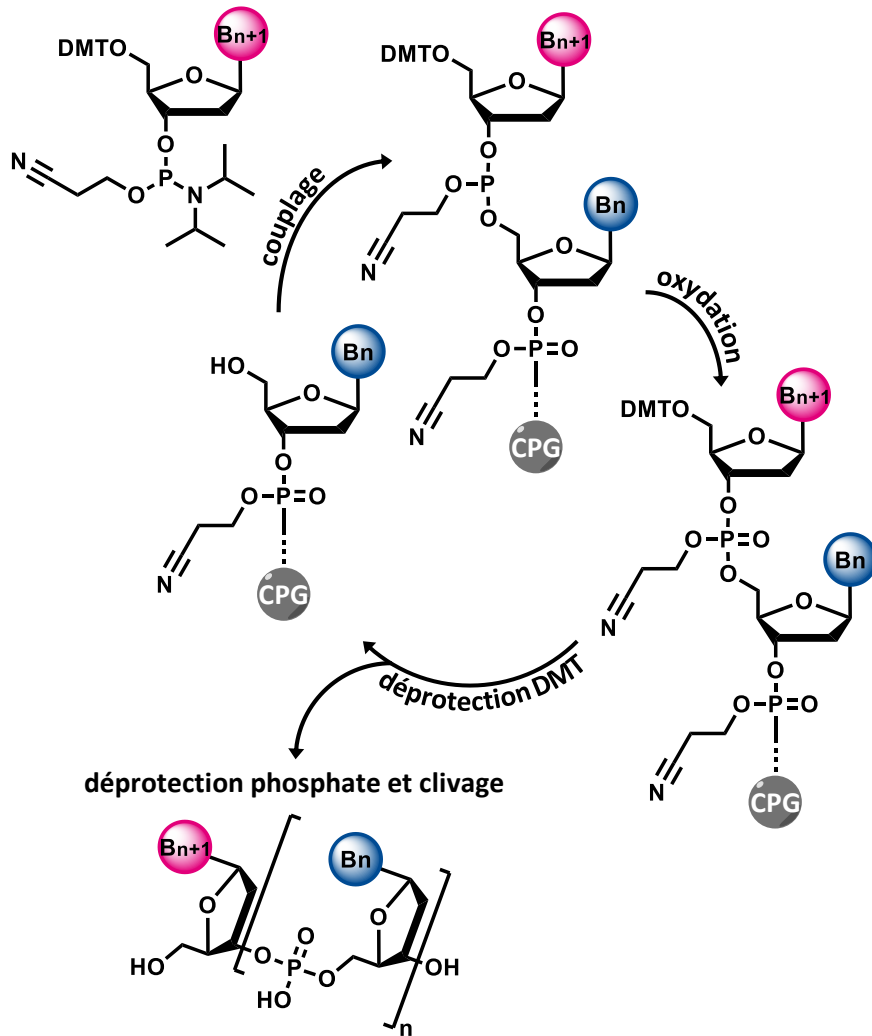


Figure 1.6. Cycle des réactions itératives pour la méthode phosphoramidite.

2.1.3.2. La réplique artificielle

Bien que la méthode phosphoramidite soit la plus répandue, il est également possible d'obtenir des acides nucléiques synthétiques à l'aide de modèles macromoléculaires.^[49, 50] Un brin d'ADN parent est utilisé pour former un nouveau brin par complémentarité. Cette voie de synthèse peut faire penser à la réplique de l'ADN ou à sa transcription en ARN. Il se trouve d'ailleurs que des enzymes de type polymérase, comme dans la synthèse naturelle, peuvent être utilisées pour catalyser les réactions. D'autres études ont montré la possibilité de réaliser de telles synthèses sans enzyme de catalyse, mais dans la majeure partie des cas, beaucoup d'erreurs étaient présentes dans le brin nouvellement formé, notamment à cause de la plus faible interaction entre les bases A et T. De telles approches permettent cependant aisément de faire varier les structures des polymères obtenus (bases non naturelles, squelette) tout en conservant des propriétés d'hybridation avec le brin parent.

2.1.3.3. La synthèse d'analogues

Les dernières décennies ont également vu le développement de nouvelles classes de polymères analogues des polynucléotides : les acides xénonucléiques (XNAs pour *xeno nucleic acids*).^[7] Ils diffèrent de l'ADN et de l'ARN dans leur structure par un squelette non naturel mais portent tout de même les bases nucléiques de ces derniers, permettant de stocker de l'information génétique dans une séquence définie aperiodique.^[51] La classe la plus étudiée de ces XNAs est décrite au début des

années 1990 par Peter E. Nielsen.^[17] Les acides nucléiques peptidiques (PNAs pour *peptide nucleic acids*) sont des analogues de l'ADN contenant un squelette peptidique dont les unités 2-aminoéthylglycine répétitives sont fonctionnalisées avec des bases nucléiques (Figure I.7). Ce squelette a été imaginé afin de conserver une distance entre les bases de même valeur que pour l'ADN ou l'ARN.^[18, 52] La synthèse des PNAs se fait en suivant une approche itérative « AB+AB » (voir I.3.3.4) avec des monomères portant à la fois un acide carboxylique et une amine protégée (la protection par le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) laisse petit à petit sa place au groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) (voir I.2.2.3.3), les amines présentes sur les bases étant elles aussi protégées, par des groupements carboxybenzyles (Cbz).^[53] Un protocole de synthèse polypeptidique classique sur support solide, sur la base des travaux de Merrifield (voir I.2.2.3) est suivi, et peut donc également être automatisé afin d'obtenir les oligomères plus rapidement. En outre, plusieurs synthèses de PNAs avec l'aide de templates ADN ou ARN, faisant appel à des enzymes ou non, sont décrites.^[54-56] La propriété majeure de ces composés, qui permet en partie de pouvoir réaliser ces synthèses assistées par des templates, est leur capacité à former des complexes avec les polynucléotides naturels. L'appariement des bases entre ADN ou ARN et PNA selon le schéma de Watson et Crick mène ainsi à des duplexes et des triplexes très stables.^[17, 18, 52-54, 57-61] Cette caractéristique donne accès à de nombreuses applications, notamment dans le domaine des biotechnologies.^[53, 62]

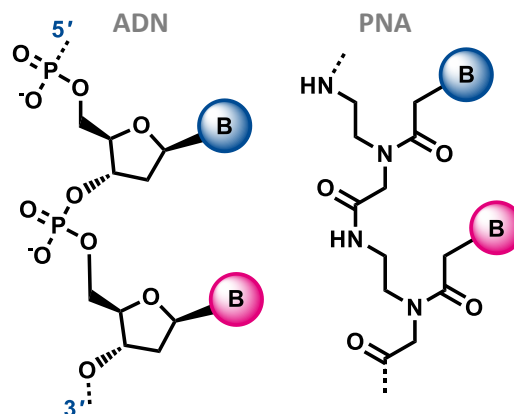


Figure I.7. Comparaison des structures de l'ADN et du PNA.^[17] Le premier a un squelette phosphate-ose alors que le second présente des liaisons peptidiques.

2.2. Les protéines

2.2.1. Structure et fonctions

Les protéines sont aussi des polymères à séquences contrôlées essentiels au fonctionnement des cellules vivantes. Il s'agit de chaînes polypeptidiques, composées d'une suite d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides (Figure I.8), aussi appelées liaisons peptidiques.^[63] Parce qu'elle possède des bouts de chaîne différents, un chaîne polypeptidique a une direction : par convention, le groupe aminé est considéré comme le début de la chaîne tandis que le groupe carboxyle en est la fin. Les acides aminés qui forment la chaîne polypeptidique sont au nombre de 22 (21 pour les eucaryotes), ce qui en fait la macromolécule des systèmes vivants présentant la plus grande diversité. L'enchaînement de ces unités dans un certain ordre (structure primaire) (Figure I.9.a), défini par des gènes spécifiques, induit une conformation dans l'espace des chaînes polypeptidiques (structure secondaire) (Figure I.9.b), par exemple en hélice alpha ou feuillet beta, qui sont ensuite capable

d'interagir de manière intramoléculaire par des liaisons hydrogènes entre acides aminés (structure tertiaire) (Figure I.9.c). Certaines protéines sont composées d'un ensemble de chaînes polypeptidiques distinctes liées entre elles par des liaisons de ce type (structure quaternaire) (Figure I.9.d), ce qui leur procure une fonctionnalité différente des mêmes polypeptides isolés.

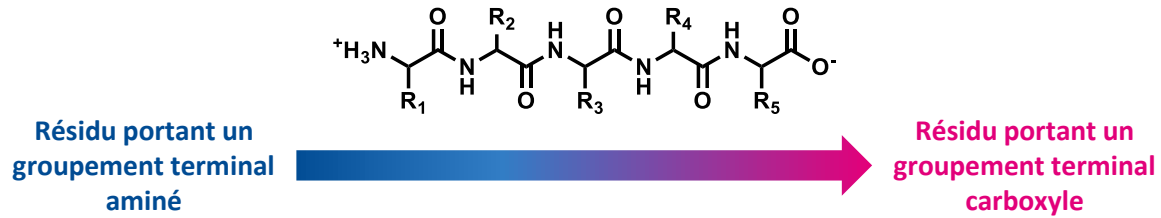


Figure I.8. Exemple de structure d'un pentapeptide.

Les protéines sont au cœur de la plupart des processus biologiques.^[19] Les niveaux de structuration définissent les propriétés des macromolécules (sites fonctionnels, rigidité, etc.) qui procurent à chaque protéine une fonction bien spécifique. On retrouve par exemple des protéines qui composent le cytosquelette des cellules, d'autres qui catalysent des réactions chimiques dans l'organisme (enzymes), ou encore certaines qui forment des machines macromoléculaires capables, entre autres, de répliquer l'ADN ou d'induire la contraction d'un muscle. La très grande diversité des acides aminés et par conséquent des séquences et conformations des protéines implique et permet donc de remplir une immense variété de fonctions dans les systèmes vivants. De plus, comme expliqué précédemment, les protéines peuvent interagir avec d'autres éléments de l'organisme (les glucides par exemple), pour former d'autres complexes avec des fonctions nouvelles, élargissant encore les possibilités.

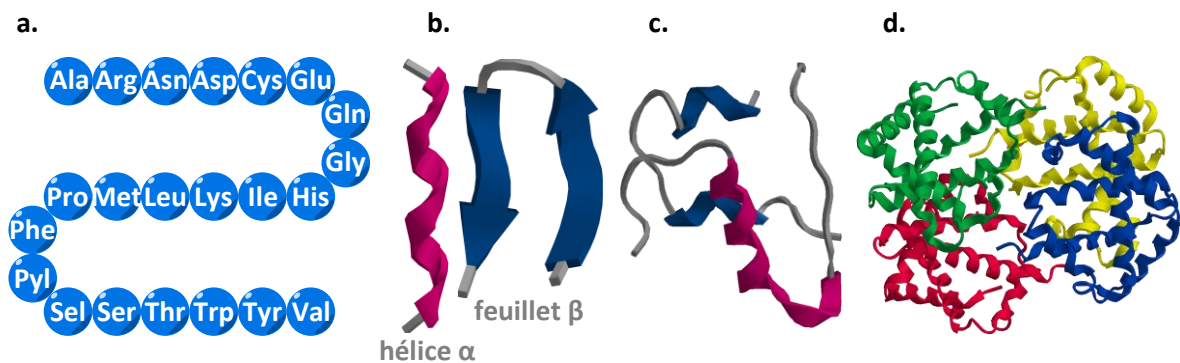


Figure I.9. Structures des protéines. a. Structure primaire : acides aminés disponibles. b. Structure secondaire : conformation spatiale des polypeptides. c. Structure tertiaire : exemple de la conformation dans l'espace de la protéine d'insuline. d. Structure quaternaire : exemple des interactions entre les sous-unités protéiques composant l'hémoglobine A humaine.

2.2.2. La biosynthèse des protéines

La synthèse des protéines par les organismes biologiques fait intervenir un très grand nombre d'acteurs.^[19] L'information concernant l'ordre des acides aminés dans la séquence se trouve par exemple dans les gènes de l'ADN. Ceux-ci sont exprimés par la production d'ARN messager (ARNm),^[64] dont l'enchaînement des bases nucléiques est une copie du code de l'ADN (on parle de transcription). C'est l'ARNm qui va servir de base à la synthèse de la protéine dans les ribosomes.^[32] En effet, chaque acide aminé de la protéine synthétisée est déterminé par un enchaînement de trois bases nucléiques de l'ARNm, appelé codon (Tableau I.1). Ces codons sont lus linéairement par le ribosome, traduisant

donc l'ordre de la séquence des acides aminés contenu dans le code génétique. C'est alors un autre ARN qui intervient : l'ARN de transfert (ARNt). Il s'agit d'un ARN qui transporte les acides aminés sous leur forme activée pour la synthèse de la protéine. Il existe un ARNt pour chacun des acides aminés disponibles, porteur d'un codon spécifique pour la reconnaissance par le ribosome. Ainsi, lorsque la traduction de l'ARNm arrive sur un codon correspondant à un certain acide aminé, l'ARNt homologue est reconnu et apporte le monomère nécessaire. L'ARNm contient également des codons stop, une combinaison de trois bases azotées signalant la fin de la traduction, et donc de la synthèse de la chaîne peptidique.

		Deuxième lettre								
		U		C		A		G		
Première lettre	U	UUU	Phénylalanine	UCU	Sérine	UAU	Tyrosine	UGU	Cystéine	U
		UUC		UCC		UAC		UGC		C
		UUA	Leucine	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
		UUG		UCG		UAG		UGG		Tryptophane
	C	CUU	Leucine	CCU	Proline	CAU	Histidine	CGU	Arginine	U
		CUC		CCC		CAC		CGC		C
		CUA		CCA		CAA	Glutamine	CGA		A
		CUG		CCG		CAG		CGG		G
	A	AUU	Isoleucine	ACU	Thréonine	AAU	Asparagine	AGU	Sérine	U
		AUC		ACC		AAC		AGC		C
		AUA		ACA		AAA	Lysine	AGA	Arginine	A
		AUG		Méthionine		ACG		AAG		AGG
	G	GUU	Valine	GCU	Alanine	GAU	Acide aspartique	GGU	Glycine	U
		GUC		GCC		GAC		GGC		C
		GUA		GCA		GAA	Acide glutamique	GGA		A
		GUG		GCG		GAG		GGG		G

Tableau I.1. Code génétique associé aux acides aminés (seuls 20 acides aminés sont reliés à des codons).

2.2.3. La synthèse chimique de peptides

L'intérêt croissant porté aux protéines du fait de leur variété et leurs fonctions a évidemment poussé les chercheurs à trouver des voies de synthèse en laboratoire.^[65] Ces recherches sont notamment essentielles dans certains domaines comme l'immunologie, et elles présentent une utilité dans le domaine de la chimie des polymères évidemment.^[66, 67] La première synthèse rapportée a été celle d'un tripeptide Gly-Gly-Gly par Emil Fischer en 1903,^[68] puis les techniques, en solution, se sont perfectionnées jusque dans les années 1960, menant à l'obtention de chaînes plus longues. L'exemple le plus marquant est peut-être celui de Vincent du Vigneaud, récompensé par le prix Nobel de Chimie en 1955 pour ces travaux sur la synthèse d'une hormone peptidique de huit acides aminés.^[69] Cependant, malgré l'introduction de groupements protecteurs et de stratégies d'activation, ces synthèses restaient fastidieuses et chronophages.^[5]

Une nouvelle approche, rapportée en 1963 par R. Bruce Merrifield,^[70, 71] est venue révolutionner le domaine : la synthèse peptidique sur support solide (SPPS, pour *solid phase peptide synthesis*). Elle consiste en l'utilisation d'un support insoluble sur lequel la chaîne en croissance est attachée. Les mêmes stratégies itératives avec groupements protecteurs sont utilisées, mais les étapes de purification sont largement facilitées. En effet, il n'est alors plus nécessaire d'en passer par des

étapes de recristallisation, un simple lavage suffit pour éliminer les sous-produits des réactions. La chaîne restant attachée au support insoluble, un filtre ou un fritté permet de conserver celui-ci alors que les produits secondaires solubilisés le traversent.

Très vite, cette approche est automatisée,^[72] entraînant un nouveau gain de temps considérable pour le manipulateur. Cependant, l'introduction d'un support solide fonctionnalisé apporte dans un premier temps des nouveaux problèmes, telle l'accessibilité restreinte des sites réactionnels due au choix des solvants utilisés et à l'encombrement autour de la particule insoluble utilisée. Cela empêche les rendements quantitatifs et crée donc des erreurs dans les séquences synthétisées, qui ne peuvent encore que trop difficilement être séparées. Ces difficultés poussent dans un premier temps certains chercheurs à continuer le développement des approches en phase liquide,^[73] mais l'obtention en 1984 par Merrifield du prix Nobel de Chimie^[5] pour ses travaux sur la SPPS montre l'importance donnée à cette méthode. Aujourd'hui, des améliorations ont été faites sur les instruments utilisés,^[74-76] les types de résines,^[74-77] le choix des solvants^[74-78] ou encore les réactifs disponibles,^[74-77, 79-81] permettant de limiter les problèmes dus à ces facteurs. Au final, les méthodes actuelles donnent de très bons résultats.

2.2.3.1. L'approche en phase solide

Merrifield réalise donc, en 1963, la synthèse d'un polypeptide à l'aide d'un support insoluble.^[70] C'est une révolution dans le domaine qui est suivie, quelques mois plus tard, par une publication similaire de Letsinger.^[82] Voyant l'exclusivité de la méthode lui échapper, celui-ci s'oriente dès 1965 vers l'utilisation de ces mêmes supports pour la synthèse d'acides nucléiques (voir. I.2.1.3.1).^[41] Au-delà de la bataille que ces deux chercheurs se livrent pour le développement de ces supports, c'est une nouvelle méthodologie qui apparaît et évolue à une grande vitesse, grâce aux perspectives qu'elle apporte. En effet, la technique facilite grandement la synthèse itérative des polymères à séquences contrôlées, qu'il s'agisse d'oligonucléotides,^[41, 42, 45-47] de polypeptides,^[66, 67, 70, 75-77, 83] de bioconjugués,^[84, 85] de polymères synthétiques^[86, 87] ou de bien d'autres encore.

Des billes de polymère réticulé et donc insoluble sont fonctionnalisées par des linkers portant des sites réactionnels dans une certaine mesure (taux de fonctionnalisation).^[88] La croissance des chaînes de polymères souhaitées s'initie sur ces sites réactionnels. La chaîne en croissance est donc toujours liée à la résine insoluble. À la fin de la synthèse, la chaîne formée est détachée de la résine lors d'une étape appelée clivage. C'est la liaison covalente entre le polymère constituant le support et le polymère synthétisé qui est brisée. L'avantage majeur de cette polymérisation itérative en milieu hétérogène par rapport à une synthèse classique en solution est la réalisation des étapes de purification. En effet, la résine est placée sur un filtre ou un fritté et il suffit de la nettoyer avec les solvants adéquats (solvants des sous-produits ou des réactifs en excès par exemple) pour se libérer des produits non attachés au support. Ceux-ci, une fois solubilisés par les solvants de lavage, passent simplement au travers du filtre. La chaîne en croissance, elle, est toujours covalamment attachée à la résine insoluble et prête à recevoir un monomère supplémentaire lors de l'étape de couplage suivante (Figure I.10). L'objectif à ne pas perdre de vue pour les synthèses itératives supportées est l'obtention de polymères isomoléculaires. Pour cela, le rendement de chaque étape doit nécessairement être quantitatif afin de prévenir la formation de chaînes plus courtes ayant manqué des couplages. Même si la cinétique de réaction est plus lente avec l'utilisation d'un support, l'utilisation d'un large excès de réactifs permet à la fois de l'accélérer et de pousser la réaction à la complétude.

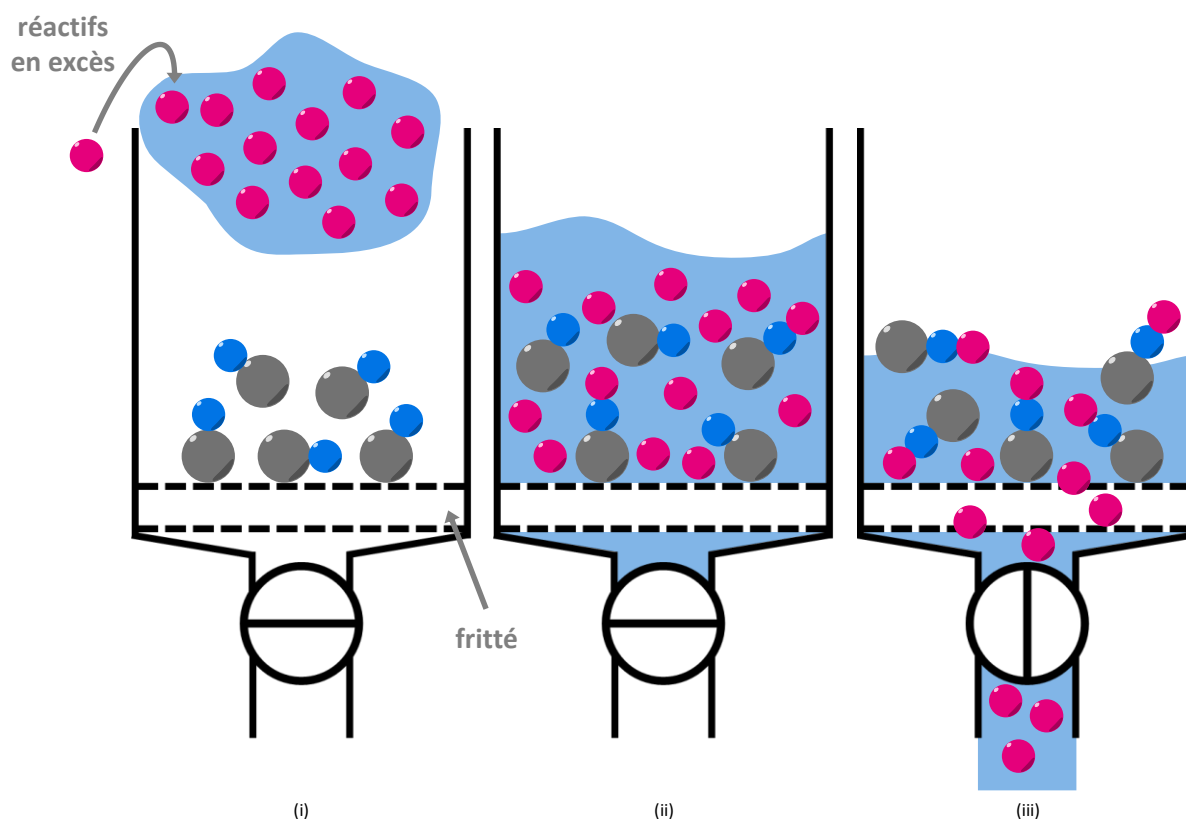
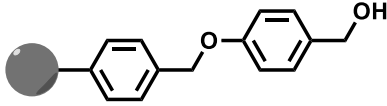
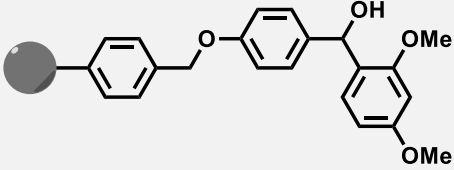
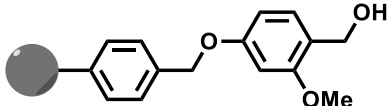
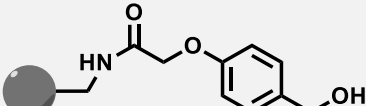
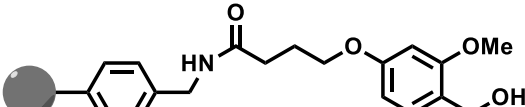
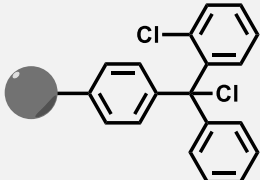
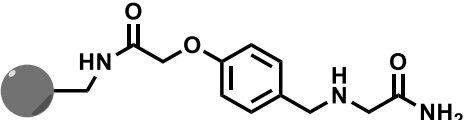
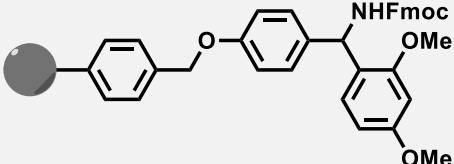


Figure 1.10. Protocole général pour la synthèse itérative sur support solide. (i) Ajout des réactifs en solution en excès. (ii) Couplage. (iii) Purge et lavage par filtration avec les solvants adéquats. Les différentes étapes peuvent alors être répétées.

Le choix du support utilisé se fait en fonction du produit souhaité. En dehors du choix du composant principal du support – polystyrène réticulé avec du divinylbenzène, poly(éthylène glycol), silice, verre poreux (CPG pour *controlled-pore glass*), pour ne citer qu'eux – d'autres points ont une très grande importance. Une résine fortement réticulée aura des sites réactionnels moins accessibles du fait de la tension du réseau et de l'encombrement. Elle sera privilégiée pour la synthèse de petites molécules. En revanche, une résine avec un taux de réticulation moins élevé pourra, dans certains solvants, gonfler (on parle de résine-gel), rendant les fonctions plus accessibles pour la synthèse de molécules plus grosses, tels les oligomères et les polymères. Il faut cependant rester vigilant sur l'encombrement qui peut être engendré par un taux de fonctionnalisation trop élevé, qui entraînerait l'effet inverse, même si un taux de fonctionnalisation élevé résulterait évidemment en une quantité plus importante de chaînes formées. Un autre critère important pour le choix du support est la nature du point d'ancrage, à savoir la fonction réactive portée par la résine à partir de laquelle la chaîne synthétisée va croître. Ce site d'attache doit remplir plusieurs conditions : pouvoir réagir avec le premier monomère, résister aux conditions de synthèse et permettre le clivage du produit en fin de synthèse uniquement, sans altérer la structure de celui-ci. Le point d'ancrage peut également dans certains cas servir d'espaceur qui éloignerait la fonction terminale de la bille de résine afin de diminuer l'encombrement autour de celle-ci. C'est ainsi que pour chaque application, des types de résines différents ont été imaginés pour répondre au mieux aux besoins de chaque chimie (Tableau 1.2).^[83, 89-91] Trois groupements terminaux sortent du lot (chlorure, hydroxyle et amine), qui sont placés au bout d'un linker clivable relié au cœur de la résine. Les résines peuvent également être catégorisées par les conditions nécessaires au clivage du produit final, qui dépend du linker utilisé. Encore une fois, plusieurs familles principales se distinguent selon la sensibilité des produits synthétisés à certains

composés ou certaines conditions : les résines clivables en conditions acides, basiques, en présence d'héxafluoroisopropanol, grâce à des réactions d'oxydation ou de réduction ou bien photoclivables.

Structure de la résine	Conditions de clivage	Groupe terminal du produit
 <p>Wang</p>	TFA	Acide
 <p>Rink acide</p>	TFA ou AcOH	Acide
 <p>SASRIN</p>	TFA	Acide
 <p>HMPA</p>	TFA	Acide
 <p>HMPB</p>	TFA	Acide
	TFA	Acide
 <p>BAL</p>	TFA-TFMSA	Acide
 <p>Rink amide</p>	TFA	Amide

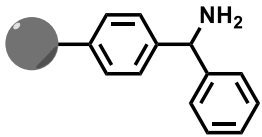
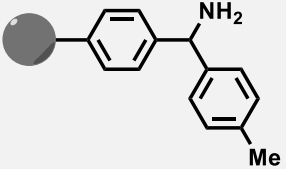
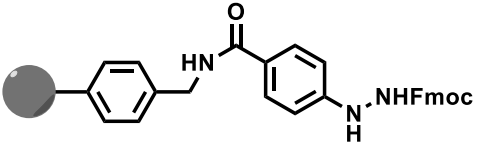
Structure de la résine	Conditions de clivage	Groupe terminal du produit
 BHA	HF	Amide
 MBHA	HF	Amide
 Hydrazine	Pyridine, acide acétique ou nucléophile	Acide, ester ou amide

Tableau I.2. Quelques exemples de linkers de supports insolubles.

2.2.3.2. L'utilisation de supports solubles

Afin de contrer les quelques problèmes demeurant avec la synthèse en phase solide – tels que l'encombrement au niveau de la résine empêchant l'isomolécularité pour la synthèse de chaînes longues, la trop faible quantité de matière obtenue par cette méthode due aux restrictions en termes de taux de fonctionnalisation du support en partie à cause, encore une fois, du manque d'accessibilité aux fonctions réactives, ou bien l'impossibilité de suivre la réaction par des techniques d'analyse avant le clivage final – une autre solution a été imaginée : l'utilisation d'un support soluble.^[92] Cette méthode permet la synthèse de grandes quantités de polymères à séquences contrôlées avec des masses moléculaires élevées en un temps assez faible dû à la cinétique plus rapide des réactions en solution. Cette fois-ci, le polymère constituant le support, généralement du poly(éthylène glycol) ou des dérivés de polystyrène, est linéaire, ce qui lui permet d'être soluble dans certains solvants. Il présente toujours un point d'ancrage sur lequel croît la chaîne synthétisée. Après chaque étape de couplage, la purification est un peu plus compliquée que pour la synthèse en phase solide puisqu'elle implique une précipitation sélective dans un non solvant du support. Ainsi, le support précipite avec la chaîne en croissance attachée coalement alors que les sous-produits et monomères en excès, de masses moléculaires beaucoup plus faibles, ont tendance à rester en solution. Il suffit donc de filtrer le produit de précipitation pour pouvoir poursuivre la synthèse. Cependant, ces étapes de précipitation sont souvent assez longues et ne donnent que très rarement des rendements élevés, une grosse partie du support (et donc du produit) restant parfois en solution. La synthèse se termine une nouvelle fois par une étape de clivage qui vise à récupérer le produit de synthèse séparé du support. De la même manière qu'avec les supports insolubles, cette méthode permet d'accéder à des polymères à séquences contrôlées naturels^[92, 93] comme des polypeptides,^[73, 94] des oligonucléotides,^[95, 96] ou encore des polysaccharides^[97], des bioconjugués,^[98] mais également un grand nombre de polymères à séquences contrôlées synthétiques.^[99-104]

2.2.3.3. La chimie de protection

Pour la synthèse peptidique sur support solide (SPPS), les monomères portent une fonction acide carboxylique et une fonction amine primaire. C'est cette dernière qui est protégée. A l'origine, Merrifield choisit le groupement carboxybenzyle (Cbz) pour protéger ces amines. Cependant, les conditions de déprotection du Cbz sont tellement fortes (bromure d'hydrogène) qu'il observe un clivage partiel des chaînes en croissance de son support, et donc une perte de produit considérable à chaque étape.^[70] C'est pourquoi il se met à utiliser un groupement protecteur qui était déjà développé pour d'autres applications^[80], le *tert*-butoxycarbone (Boc).^[72] Les conditions de déprotection de l'amine (acide) sont favorables à un rendement final plus élevé, puisqu'elles ne permettent pas le clivage du produit de la résine. En outre, cette stratégie permet de réaliser la synthèse avec les amines réactives protégées par le groupement Boc, tout en maintenant la protection des amines latérales et autres fonctions potentiellement réactives indésirables, protégées elles par des groupements benzyles (Bn). Dans le premier cas, l'utilisation d'un acide relativement faible comme le TFA est possible alors que pour les groupements Bn, un acide plus fort est nécessaire, comme l'acide fluorhydrique.^[105] Cependant, les conditions restent encore assez fortes et la déprotection sélective de la fonction réactive principale fait intervenir les mêmes conditions que pour les fonctions secondaires, ce qui est loin d'être idéal. L'apparition d'une nouvelle stratégie au début des années 1970 grâce à Louis A. Carpino est donc bienvenue. En effet, il suggère l'utilisation du groupement fluorénylméthoxycarbone (Fmoc),^[81] qui est altéré dans des conditions basiques assez douces cette fois-ci. Cela favorise grandement les déprotections sélectives voulues auparavant, puisqu'il est maintenant possible d'associer le groupement Fmoc, déprotégé en conditions basiques, à n'importe quel groupement déprotégé en conditions acides tels le groupement Boc ou le groupement *tert*-butyle (t-Bu).^[105] Ce groupement protecteur est donc logiquement largement introduit dans de nombreuses synthèses de polypeptides.^[106-111] De plus, une résine clivable en conditions acides également peut maintenant être utilisée, ce qui aide énormément à la dernière étape de la synthèse : le clivage.

2.2.4. Les bioconjugués

Parmi les dernières avancées de la recherche sur les protéines et les polypeptides, figurent le design et la synthèse de bioconjugués peptide-polymère et protéine-polymère.^[84, 112] Consistant à relier des chaînes polypeptidiques à des chaînes de polymères purement synthétiques, ces conjugués permettent d'apporter des propriétés nouvelles aux biomacromolécules concernées ou bien, à l'inverse, des propriétés biologiques aux systèmes synthétiques (Figure I.11).^[113] D'un côté, la chaîne polypeptidique amène évidemment une fonctionnalité, mais elle permet également de travailler sur des aspects de structure et d'auto-assemblage, de reconnaissance moléculaire ou encore d'adhésion spécifique.^[114] Le cœur du problème reste tout de même la sélection d'une séquence fonctionnelle pour viser des propriétés permettant une application particulière.^[85, 115] D'un autre côté, le segment polymère apporte des propriétés de solubilité, de stabilité, de résistance (biologique ou mécanique) ou de processabilité par exemple.^[114] En particulier, certaines interactions avec des anticorps ou la digestion de protéines peuvent être réduites par attachement à une chaîne de polymère. Grâce à sa bonne solubilité dans l'eau et sa biocompatibilité, le poly(éthylène glycol) (ou PEG) est beaucoup utilisé pour la formation de bioconjugués peptide ou protéine-polymère. On parle alors de PEGylation. Ces bioconjugués agissent donc à l'interface entre les matériaux synthétiques et la biologie, et les applications sont nombreuses, allant de la science des matériaux à la pharmacologie, en passant par les biotechnologies. Si ces systèmes ont d'abord été étudiés pour leurs propriétés biologiques (dans le

domaine médical),^[113] plus récemment, ils ont été beaucoup utilisés pour le design de matériaux hybrides fonctionnels (traitements de surfaces, adhésifs, etc.).^[115]

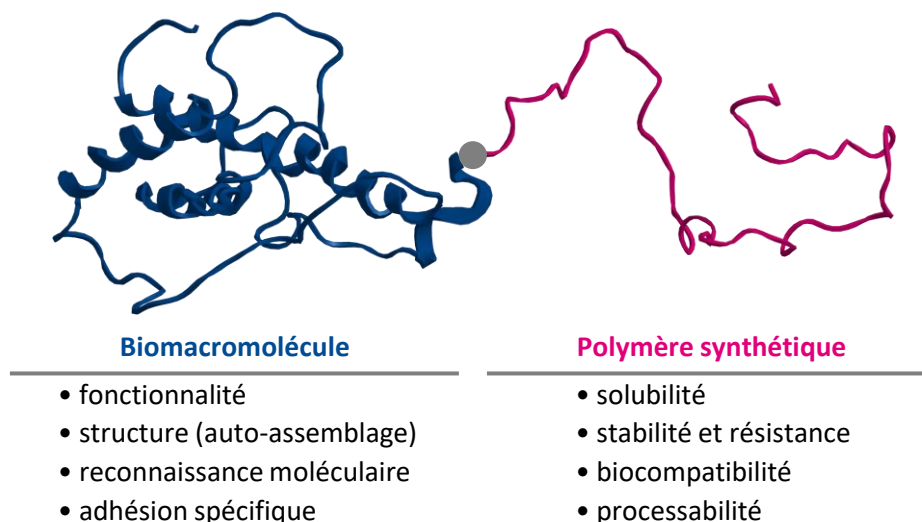


Figure I.11. Description de la grande variété de propriétés apportées par les deux blocs des bioconjugués.

Les premiers exemples de telles structures remontent en fait aux années 1950^[116] mais la plupart des évolutions de ce domaine sont beaucoup plus récentes, puisqu'elles viennent des deux dernières décennies. En particulier, plusieurs méthodes pour la synthèse de tels systèmes ont été développées.^[113] Parmi celles-ci, on trouve des approches en solution comme la synthèse convergente (*grafting to*) et la synthèse divergente (*grafting from*). Dans les deux cas, l'objectif est la ligation des blocs polymère et peptide ou protéine. Dans la première approche, le polymère, qui porte une fonction réactive, est attaché à la biomacromolécule (Figure I.12). Les réactions impliquées dans cette ligation convergente peuvent varier mais les plus utilisées restent celle de la chimie « click », et plus particulièrement la cycloaddition entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre (voir I.5.1).^[113] Dans la seconde approche, la chaîne peptidique contient une fonction d'amorçage pouvant initier une polymérisation en chaîne en présence des monomères amenés à former la chaîne synthétique (Figure I.12). Il est alors possible, par différentes techniques, de contrôler la polymérisation. Une troisième approche également divergente, dite *grafting through*, consiste à attacher à la chaîne peptidique des groupes polymérisables. Celle-ci sert alors de macromonomère dans une copolymérisation. Ces procédés permettent d'aboutir à différentes topologies et architectures allant des chaînes linéaires aux chaînes réticulées, mais aussi de blocs, des polymères greffés ou branchés par exemple.^[114] D'autres approches, sur support solide notamment, existent, permettant de faciliter les étapes de purification.

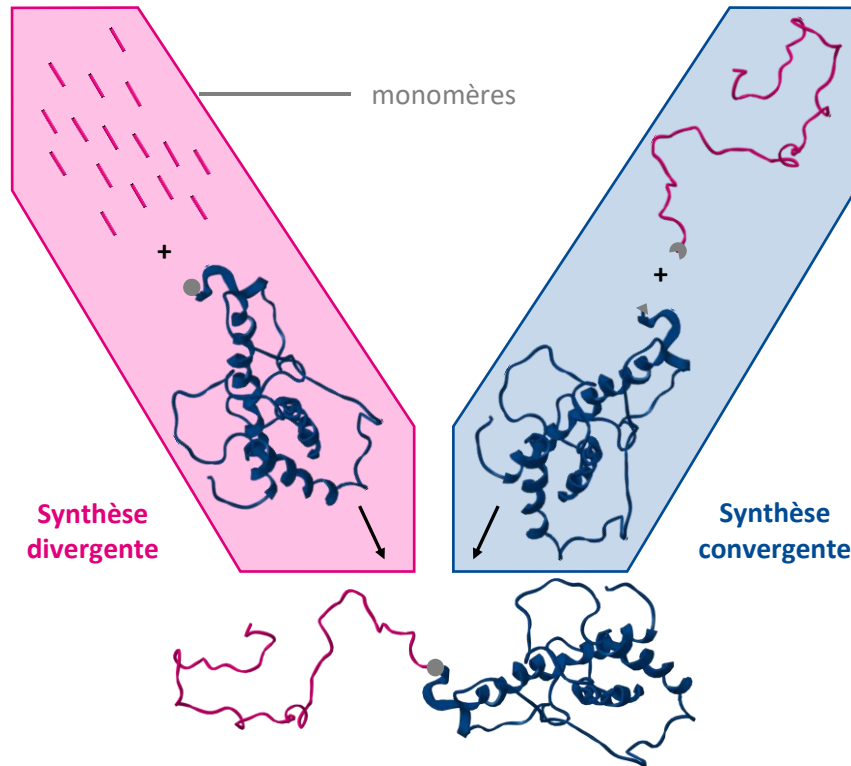


Figure 1.12. Représentation schématique de différentes méthodes de préparation de bioconjugués peptide ou protéine-polymère en solution. Synthèse divergente (grafting from) et synthèse convergente (grafting to).

2.3. Les glucides

Les glucides sont également des molécules complexes essentielles au bon fonctionnement des cellules de l'organisme, et à leurs interactions les uns avec les autres. L'intérêt croissant qui leur est porté réside non seulement dans leurs manières d'interagir en synergie avec d'autres molécules de l'organisme, mais aussi dans l'incroyable diversité de leurs structures.^[19] En effet, les glucides sont composés de motifs issus de monosaccharides (des chaînes carbonées présentant des groupes hydroxyle latéraux et un aldéhyde ou une cétone) dont la longueur de la chaîne peut varier de 3 à 9 carbones et dont les configurations stéréochimiques peuvent être très différentes d'un monomère à un autre. Ces monosaccharides peuvent être liés entre eux pour former des oligosaccharides voire des polysaccharides dont la variété des structures est par conséquent encore plus vaste. La structure primaire des glucides est ainsi définie et permet, ou non, des interactions spécifiques avec les molécules qui les entourent, en faisant un exemple parfait de polymères à séquences contrôlées.

Les études récentes portent donc sur la détermination des structures des glucides, mais aussi les mécanismes de leur formation, ou encore sur la nature de leurs interactions avec leur environnement, et donc leur utilité dans le fonctionnement des organismes vivants. Des enzymes spécifiques sont responsables de l'assemblage des monosaccharides les uns avec les autres. Appelées glycosyltransférases, elles catalysent la formation des liaisons osidiques entre les monosaccharides. Elles sont donc à l'origine de la structure contrôlée des glucides. Ce sont d'autres enzymes qui sont utilisées pour la détermination des séquences des glucides. En effet, par des clivages spécifiques de certaines liaisons par des enzymes particulières, combinés à des analyses par spectrométrie de masse, il est possible de déterminer la structure primaire de ces polymères à séquences définies. Cette technique permet également d'évaluer les sites d'interactions avec d'autres molécules.

La plupart du temps, ces interactions ont lieu entre des glucides et une protéine, formant un complexe appelé glycoprotéine. Les glucides sont liés de manière covalente aux protéines par des réactions de glycosylation. L'attachement de glucides à une protéine modifie évidemment les propriétés de celle-ci, comme c'est le cas par exemple dans le sang (des glycoprotéines spécifiques portant les oligosaccharides nommés A, B ou O sont présentes en surface des globules rouges d'un individu, déterminant la nature de son groupe sanguin). Certaines pathologies seraient également dues à des erreurs de glycosylations, les glucides n'assurant plus la stabilité de certaines protéines. Les protéines concernées sont généralement sécrétées par les cellules ou bien composent leurs membranes externes, ayant principalement un rôle dans les contacts avec d'autres cellules ou tissus.

Ces découvertes ont incité les chercheurs à développer des macromolécules bio-inspirées portant des caractéristiques communes aux glucides : les glycopolymères.^[117-119] Il s'agit de chaîne polymères portant des sucres sur les chaînes latérales. Les glycopolymères ont de nombreux avantages, de par leur propension à avoir une spécificité et des interactions proches des glucides et des glycoprotéines, mais aussi grâce aux nombreuses voies de synthèse imaginées, menant à des architectures des plus simples (chaîne linéaire dont il est possible de contrôler le degré de polymérisation ainsi que le nombre de chaînes latérales par molécule) aux plus complexes (copolymères à blocs, voire glycooligomères à séquences définies, portant différents types de sucres, polymères en étoile ou structures micellaires par exemple). Cette grande variété de structures des glycopolymères synthétiques permet de comparer les comportements et d'en apprendre plus sur le fonctionnement et le rôle des glucides et glycoprotéines naturels.

3. Contrôle des séquences dans les polymères synthétiques

Les biomacromolécules à séquences définies sont de très bons exemples en termes de stockage d'information au niveau moléculaire, de structuration fonctionnelle ou encore de transmission héréditaire. Comme décrit précédemment, des techniques pour leur synthèse au laboratoire ont été développées depuis de nombreuses années et sont, pour la plupart, parfaitement au point avec des protocoles rapides et faciles, grâce en particulier à l'automatisation des techniques. En comparaison, le développement de polymères non naturels avec des séquences contrôlées de monomères est un domaine de recherche beaucoup plus récent.^[2] Les premiers balbutiements remontent en réalité assez loin, avec la découverte de compositions de copolymères alternées, statistiques, périodiques ou même à blocs, mais la plupart des avancées amenant à des degrés de régulation des séquences plus complexes proviennent de la dernière décennie. Aujourd'hui, la précision de certaines structures est telle que le terme de polymères à séquences définies, qu'il est possible d'inclure dans la classe des polymères à séquences contrôlées (Figure I.13), est également utilisé pour des polymères synthétiques. Dans ce cas, c'est l'expérimentateur qui fait varier la structure des monomères mis en jeu afin de répondre au mieux aux propriétés recherchées.

Le degré de contrôle de la séquence évoqué ici est visible dans la dispersité \mathcal{D} du polymère. Cette grandeur donne une idée de la distribution des masses molaires ou des longueurs de chaînes d'un polymère. Dans le cas particulier des polymères à séquences définies, il est nécessaire que toutes les chaînes synthétisées soient identiques. Le polymère est donc uniforme ou isomoléculaire et la dispersité en théorie égale à 1.^[120]

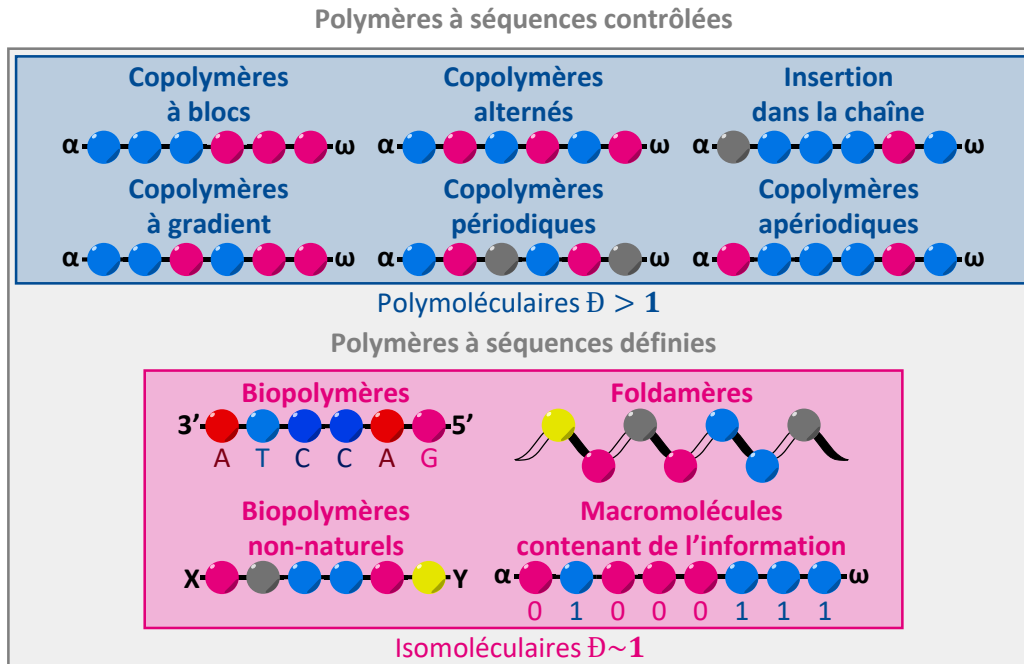


Figure I.13. Représentation de différents degrés de polymères à séquences contrôlées^[2] (tous les polymères dont la séquence est contrôlée dans une certaine mesure). Les polymères à séquences définies (uniformes, dont la séquence est parfaitement définie) sont inclus dans cet ensemble.

Les méthodes traditionnelles pour la synthèse de polymères sont la polymérisation par étapes et la polymérisation en chaîne. Cependant, depuis quelques décennies, de nouvelles méthodes, appelées synthèses multi-étapes, sont apparues, répondant en particulier aux besoins pour les synthèses de polymères à séquences contrôlées.^[6] Ces trois catégories de polymérisations permettent d'obtenir des polymères avec des polymolécularités plus ou moins contrôlées, et donc des séquences plus ou moins bien régulées (Figure I.14).

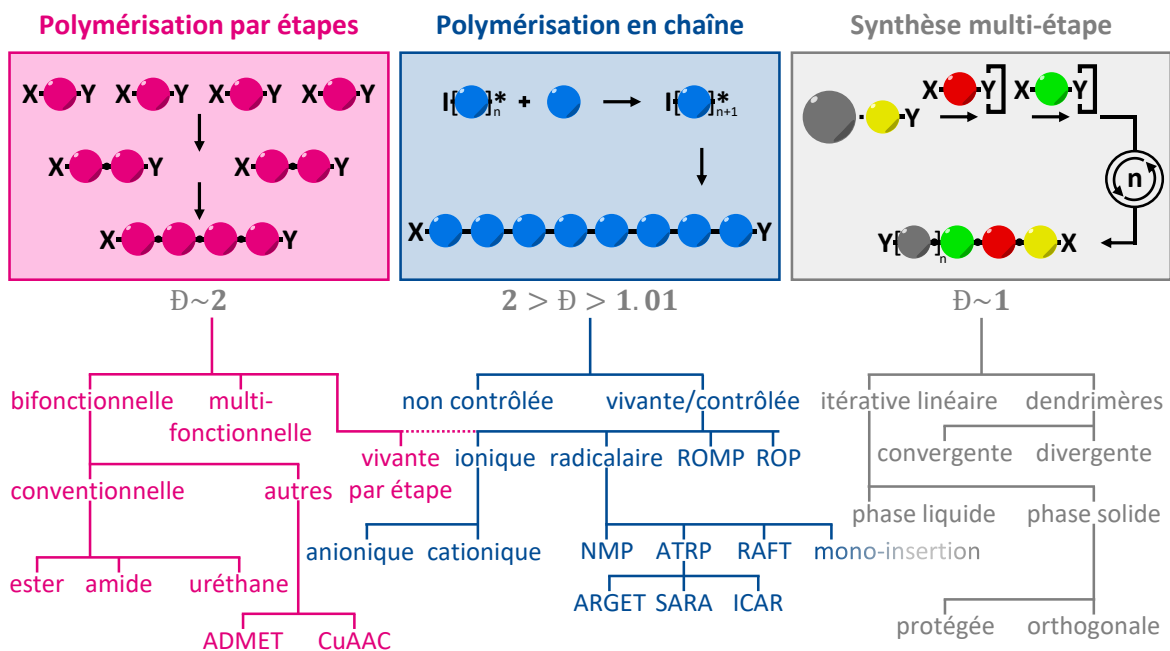


Figure I.14. Classification des approches principales pour la synthèse de polymères.^[2, 6]

3.1. Les polymérisations par étapes

Pendant des siècles, des matériaux polymères naturels ont été utilisés sans le savoir. Dans les années 1870, alors qu'il mène des recherches sur le phénol et le formaldéhyde, Adolf von Baeyer observe la formation d'un solide au fond de sa verrerie, qu'il considère comme un sous-produit de réaction inintéressant. Après avoir fait fortune à la toute fin du 20^{ème} siècle grâce à un papier photographique, le *Velox*[®] vendu à prix d'or à Georges Eastman, fondateur de la société Kodak, Leo H. Baekeland monte son laboratoire de chimie.^[121] Intrigué par ce produit insoluble de von Baeyer, il se lance dans une étude plus détaillée et finit par produire une résine soluble appelée *Novolak*. Il essaie alors d'autres conditions de réaction en contrôlant notamment un peu plus la température et la pression, conduisant à la formation d'un matériau plastique dur et insoluble, qu'il commercialisera à partir de 1909 sous le nom de Bakélite.^[122, 123] Il s'agit d'une résine insoluble issue de la polycondensation du phénol et du formaldéhyde à hautes pression et température, rejetant de l'eau. C'est le premier matériau polymère synthétique de l'Histoire, qui marque le début d'un Âge du plastique.

La méthode utilisée pour la synthèse d'un tel matériau est la polymérisation par étapes.^[124] Elle consiste en une succession de réactions de condensations ou d'additions entre des monomères bifonctionnels (XY) (Figure I.14) conduisant à la formation de dimères portant les mêmes groupes réactifs en bouts de chaînes que les monomères initiaux. Les petits fragments issus des réactions entre monomères réagissent ensuite entre eux ou avec d'autres monomères, menant à de plus longues chaînes. Ce type de polymérisation est également observé avec des monomères XX et YY donnant des copolymères. Il est enfin possible d'obtenir des polymères branchés ou réticulés par cette voie, à partir de monomères multifonctionnels. Ces polymérisations ont été largement étudiées depuis la découverte de la Bakélite, en particulier dans les années 1920 et 1930 par Wallace H. Carothers^[125] puis dans les années 1940 par Paul J. Flory^[126]. Même si de très nombreuses applications ont été trouvées dans l'industrie^[127] notamment pour les polyesters,^[128] les polyamides^[129, 130] ou encore les polyuréthanes,^[131, 132] l'intérêt porté à ces méthodologies reste limité dans le domaine des polymères à séquences contrôlées. En effet, ces synthèses mènent à des polymères avec des dispersités plutôt élevées, aux alentours de $\overline{D} \sim 2$,^[133] et de ce fait, le contrôle de la structure est relativement faible.

Les dernières années ont cependant vu le développement de nouvelles méthodes pour l'obtention de polymères dont la structure primaire est contrôlée par polymérisation par étapes.^[134] Des dispersités plus réduites ainsi que des structures périodiques sont maintenant obtenues par polymérisation de diènes acycliques (ADMET),^[135-139] chimie « click » (voir I.5),^[140] couplage radicalaire par transfert d'atomes,^[141] condensation hydroxyle-acide carboxylique,^[142] polymérisation par addition et couplage radicalaire (RACP),^[143, 144] addition séquentielle de monomère,^[145] ou encore par polymérisation radicalaire par étapes catalysée par un métal.^[146-148] Enfin, très récemment, une nouvelle technique un peu particulière a été décrite. En effet, l'un des postulats de départ des polymérisations par étapes est que les groupements fonctionnels des chaînes en croissance et des monomères ont la même réactivité. Il a cependant été montré qu'il était possible d'augmenter la réactivité des bouts de chaînes de polymères afin de favoriser l'élongation de celles-ci, transformant la polymérisation par étapes en une sorte de polymérisation vivante.^[149] Une différenciation entre la réactivité des groupements de fin de chaînes et les monomères peut être réalisée de plusieurs manières, comme un design particulier des monomères ou l'activation des chaînes en croissance par un catalyseur spécifique. Dans le dernier cas, la méthode se rapproche étrangement des biosynthèses

des biomacromolécules comme les acides nucléiques ou les protéines (voir I.2.1.1.2, I.2.1.2.2 et I.2.2.2) par l'action d'un catalyseur (des enzymes) qui active les bouts de chaînes et la copie d'un *template*. En tout cas, ces polymérisations vivantes par étapes se rapprochent très certainement d'autres méthodes de synthèse des polymères, à savoir les polymérisations en chaîne.

3.2. Les polymérisations en chaîne

Il faut également remonter dans le temps pour trouver trace d'une polymérisation en chaîne, même si à l'époque, elle a été réalisée inconsciemment. En 1839, Eduard Simon, un apothicaire de Berlin, parvient à extraire du *storax*, une résine provenant de l'arbre *Liquidambar*, un produit huileux qu'il appelle *styrol*. Quelques jours plus tard, il réalise que cette huile s'est solidifiée. Pensant que ce phénomène a eu lieu au contact de l'air, de la lumière et de la chaleur, il imagine une oxydation et nomme ce produit *styroloxyd*.^[150] Il vient en fait, sans le savoir, d'observer la formation de polystyrène par un mécanisme de polymérisation en chaîne. En 1866, Marcelin Berthelot est le premier à utiliser le terme de polymérisation pour le processus de transformation du *styrol* en *styroloxyd* par la chaleur : « On sait que le *styrolène chauffé en vase scellé à 200°C, pendant quelques heures, se change en un polymère résineux (métastyrol)* ». ^[151] Avant une industrialisation à partir d'extraits pétroliers, la définition même du concept de polymère n'est finalisée que plusieurs décennies plus tard avec les travaux de Hermann Staudinger,^[152] considéré comme le « père de la science des polymères ». Enfin, la distinction entre les différentes catégories de polymérisations est faite en 1953 par Paul J. Flory^[153] : la polymérisation en chaîne est définie. Entre temps, d'autres polymères issus de mécanismes de polymérisations en chaîne avaient été découverts, ouvrant la voie à un âge d'or de ces nouveaux matériaux polymères.

La polymérisation en chaîne met la plupart du temps en jeu des molécules insaturées – pour la polymérisation par ouverture de cycle (ROP pour *ring-opening polymerization*) par exemple, ce n'est pas le cas, les monomères sont tout simplement cycliques – qui sont activées et s'ajoutent à une chaîne en croissance dont le bout de chaîne est lui aussi un centre actif (Figure I.14).^[121] Un tel procédé fait intervenir principalement trois étapes :

- l'amorçage, durant lequel le premier monomère constituant ce qui deviendra la chaîne de polymère est activé,
- la propagation, durant laquelle les monomères s'ajoutent un à un à la chaîne en croissance,
- la terminaison, qui consiste en la désactivation des centres actifs, résultant en l'arrêt de la croissance de la chaîne.

Plusieurs sous-catégories de polymérisations en chaîne existent, et elles sont définies par la manière dont la réaction est amorcée. En effet, l'amorçage est obtenu par l'attaque du monomère par un radical libre (substance réactive porteuse d'un électron non apparié), un cation, un anion, ou autres, et résulte donc en une polymérisation dite radicalaire, cationique, anionique ou par ouverture de cycle par exemple. Cette étape d'amorçage est cinétiquement beaucoup plus lente que la propagation. Cela signifie qu'une fois amorcée, une chaîne va grandir très rapidement. La terminaison joue également un rôle important par rapport au degré de polymérisation obtenu, c'est-à-dire la longueur des chaînes produites. En effet, plusieurs réactions peuvent intervenir. La terminaison par dismutation, tout d'abord, consiste en un transfert d'hydrogène entre deux chaînes en croissance qui résulte en une désactivation des deux chaînes. La terminaison par recombinaison, ensuite, est une réaction entre deux chaînes activées qui forment une liaison covalente entre elles et donc une seule grande chaîne inactive. Ces terminaisons pouvant avoir lieu à n'importe quel instant, il n'est a priori pas évident de

contrôler la taille des chaînes obtenues. Elles peuvent différer à la fois selon leur état au moment de la terminaison (plus ou moins longues), le type de terminaison mis en jeu ou même la concentration de monomères restant dans le milieu au moment de l'amorçage. Une étape supplémentaire, dite transfert de chaîne, peut également intervenir et perturber la croissance des chaînes. De plus, lors de la copolymérisation de deux monomères différents, la structure primaire du polymère formé dépend des différences de réactivité entre les deux monomères et de leurs cinétiques d'amorçage et d'incorporation. Il est courant que cela donne lieu à des copolymères statistiques avec des structures irrégulières.^[2] Des techniques ont cependant été développées très récemment afin d'obtenir un contrôle de ces facteurs.

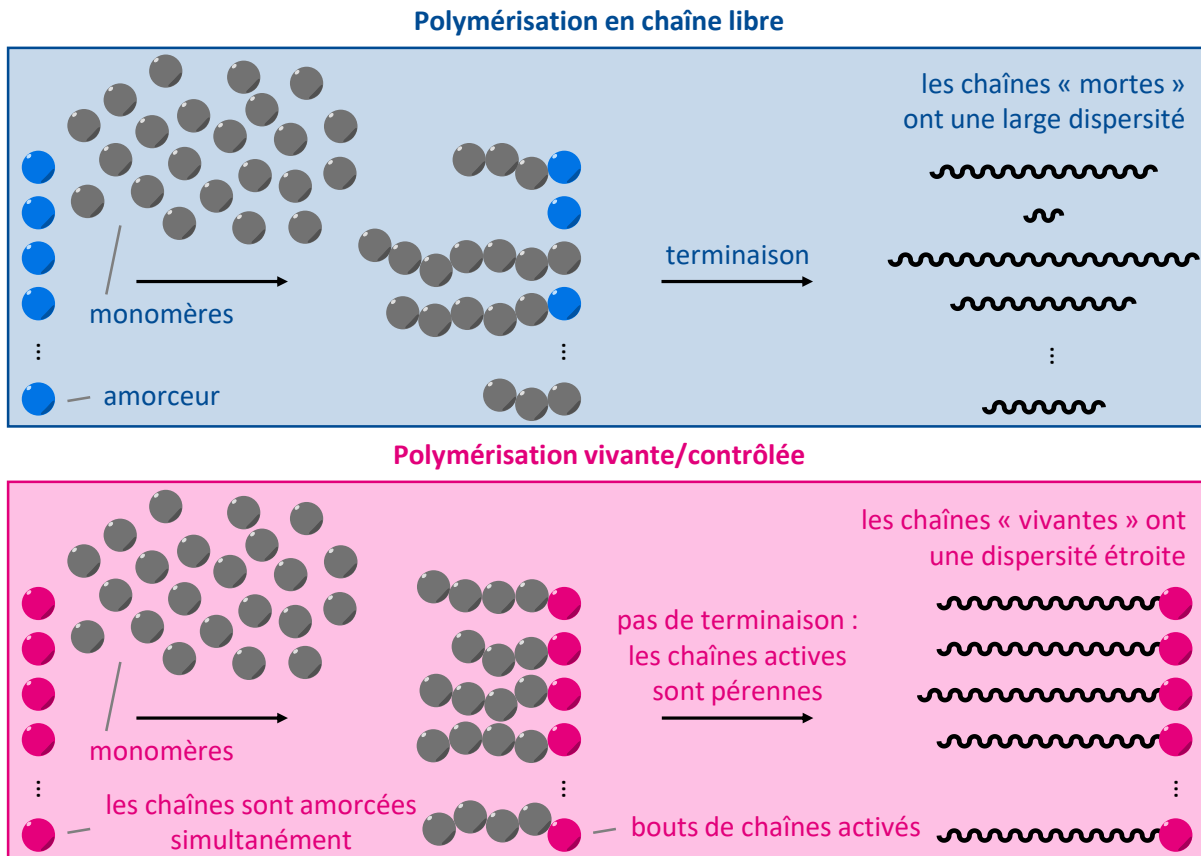


Figure I.15. Comparaison des polymérisations en chaîne libres et des polymérisations vivantes/contrôlées.

Afin d'empêcher une forte dispersité des chaînes formées, il a été imaginé des méthodes dites de polymérisations vivantes ou contrôlées, concept introduit dans les années 1950 par Michael Szwarc.^[154] L'idée est de s'affranchir des étapes de transfert de chaîne et de terminaison, permettant aux chaînes de croître indéfiniment. De plus, la cinétique d'amorçage est plus rapide que celle d'élongation des chaînes, autorisant un départ simultané de toutes les croissances et un nombre de chaînes en propagation constant. Les chaînes polymères croissent donc au même rythme sans être perturbées par les terminaisons ou transferts de chaîne, résultant en un degré de polymérisation identique pour toutes et une dispersité en théorie proche de 1 (Figure I.15). Il est même possible de prédire la masse molaire obtenue en fonction de la quantité de matière de monomère mise en jeu. De plus, les chaînes n'étant pas désactivées, il est possible, une fois la réserve de monomères épuisée, d'en ajouter un différent au système. La propagation reprend donc avec cette nouvelle molécule,

produisant finalement des copolymères à blocs. La structure primaire des macromolécules formées atteint donc un niveau de contrôle supérieur aux polymérisations en chaîne traditionnelles.

Même si les systèmes vivants développés jusque dans les années 1990^[155] concernaient principalement des polymérisations anioniques,^[156] cationiques,^[157-159] par ouverture de cycle^[160] ou par coordination,^[161, 162] la combinaison entre la polymérisation vivante et la polymérisation radicalaire restait l'objectif principal des chimistes polyméristes, par la diversité des structures et propriétés imaginées. Il fallait cependant passer outre la forte instabilité des radicaux mis en jeu dans ces techniques. C'est ainsi que les années 1990 ont vu l'émergence de nombreuses méthodes de polymérisations radicalaires vivantes/contrôlées.^[163]

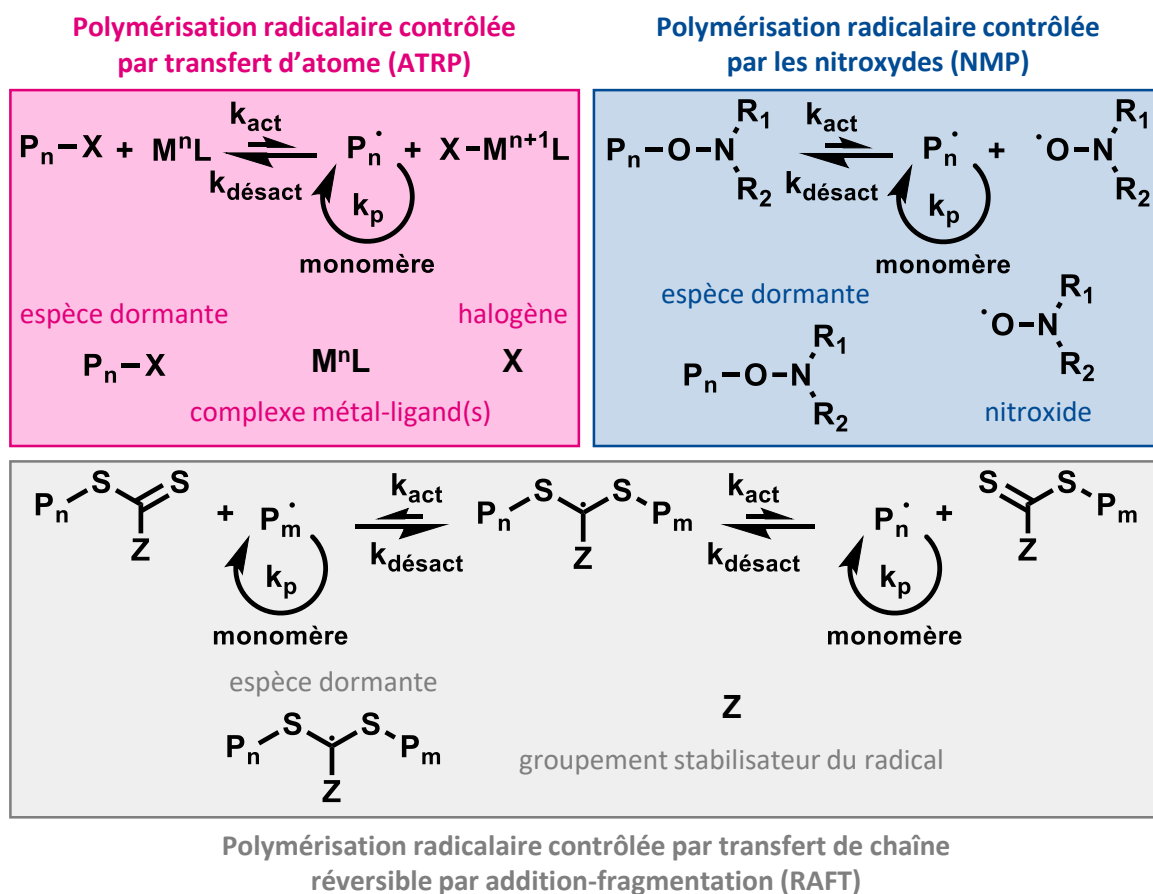


Figure I.16. Principaux mécanismes de polymérisations radicalaires vivantes/contrôlées.

Elles reposent sur un équilibre entre des espèces actives et des espèces dormantes par un systèmes d'activation/désactivation des radicaux en croissance. Cela permet de réduire le nombre et donc la concentration de radicaux dans le milieu, minimisant leurs terminaisons irréversibles. Une grande variété de polymérisations radicalaires contrôlées a été développée, mais trois mécanismes principaux sont à mettre en avant : la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP pour *nitroxide-mediated polymerization*),^[164-166] la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP pour *atom transfer radical polymerization*)^[167-169] et la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT pour *polymerization by reversible addition/fragmentation chain transfer*)^[170, 171] (Figure I.16). Ces progrès ont permis de développer un peu plus le domaine de l'ingénierie macromoléculaire, permettant d'atteindre des structures, des topologies et des fonctionnalités nouvelles.^[172-184]

Les principales techniques de polymérisations radicalaires contrôlées sont considérées comme « vivantes » par le fait qu'elles sont toujours actives même après consommation du monomère, grâce toujours à cet équilibre qui existe entre espèces dormantes et espèces actives.^[185] Cela permet dans un sens de contrôler la structure des polymères en y insérant des blocs, en ajoutant un nouveau monomère après consommation du précédent, ou des gradients par exemple, en changeant la composition en comonomères du milieu réactif au cours de la polymérisation.^[186, 187] Ce postulat est à la base d'une méthodologie exploitée par exemple par Hawker en 2000.^[188] En réalisant la synthèse d'un copolymère de styrène et d'anhydride maléique en NMP avec un ratio de 9:1, il obtient un premier bloc copolymère styrène-r-anhydride maléique dû à l'incorporation préférentielle de l'anhydride maléique, puis un bloc homopolymère styrénique lorsque tout l'anhydride maléique a été consommé. En 2007, Jean-François Lutz décrit l'insertion contrôlée cinétiquement de plusieurs structures de maléimides N-substitués dans une chaîne polystyrène synthétisée par ATRP (Figure I.17), par les mêmes effets de réactivité.^[189] En effet, l'ajout dans le milieu réactionnel d'une faible concentration de monomère accepteur (ici, les maléimides), entraîne dans une région étroite la copolymérisation (privilégiée par rapport à l'homopolymérisation) du styrène, donneur en excès, et de cet accepteur, consommé rapidement après son addition. L'accumulation de cette copolymérisation croisée très localisée et de la technique ATRP qui permet d'obtenir des chaînes de même structure permet de contrôler assez précisément la microstructure des polymère produits. La bibliothèque des unités maléimides insérées a été rapidement augmentée jusqu'à une vingtaine d'éléments.^[190] Cette étude a ouvert la voie à la synthèse de polymères aux structures, architectures et fonctionnalités encore plus complexes.^[191-201] En plus des aspects intéressants du design de tels polymères pour la science des matériaux, ce système a aussi été imaginé pour introduire de l'information dans les chaînes^[202] et a également été automatisé.^[203]

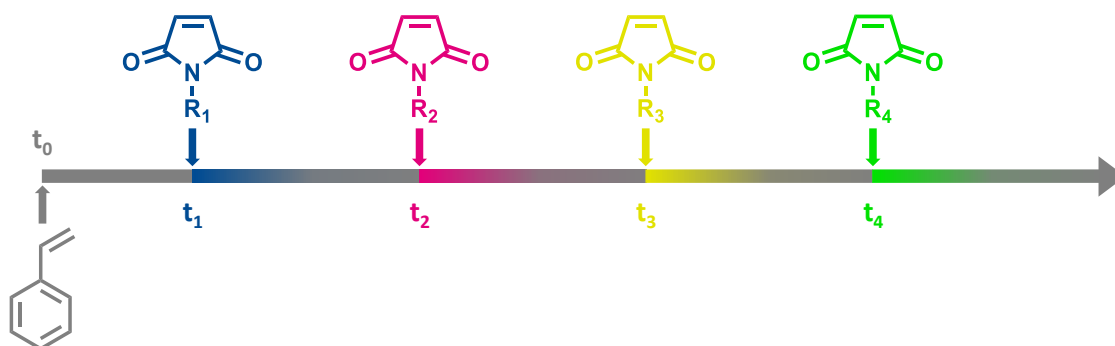


Figure I.17. Principe général de l'insertion contrôlée cinétiquement d'unités maléimides N-substituées fonctionnalisées le long d'une chaîne polystyrène.^[189]

Enfin, ces polymérisations en chaîne permettent d'atteindre des structures primaires sous forme de multiblocs, dont les séquences de blocs sont contrôlées.^[183] Par exemple, Haddleton décrit en 2014 la synthèse de telles structures grâce à une polymérisation radicalaire d'acrylates dont les phénomènes d'activation/désactivation sont gérés par un stimulus lumineux.^[204] La photoactivation se fait sous UV et permet d'atteindre une séquence de 12 blocs avec une polymolécularité de l'ordre de 1,15. Perrier utilise quant à lui la polymérisation RAFT pour la synthèse de polymères multiblocs. En 2013, il décrit l'obtention par cette technique de polymères dont les compositions varient en fonction du nombre de blocs (jusqu'à 20) formés et de la taille de chacun d'eux (de 3 à 25 unités).^[205] Cette synthèse *one-pot* est réalisée par ajouts successifs des réactifs dans le milieu et ne requiert pas de purification entre chaque ajout puisque chaque monomère est entièrement consommé avant

l'addition suivante. Cependant, au fur et à mesure que les chaînes croissent, la polymolécularité augmente, pour un résultat de 1,36 pour le polymère à 20 blocs de 3 unités, et de 1,57 pour celui de 12 blocs de 10 unités. Des optimisations du procédé permettent de baisser cette dispersité et d'améliorer les temps des réactions pour une synthèse globalement plus efficace.^[206, 207] Finalement, l'utilisation d'un système continu en boucle permet d'obtenir une polymolécularité encore meilleure qu'en réacteur, comme le montre une étude menée sur un polymère composé de 6 blocs de 10 unités pour lequel un indice de polymolécularité de 1,11 est obtenu.^[208]

3.3. Les synthèses multi-étapes

Même si des progrès récents ont permis d'approcher un certain contrôle de la structure et de la dispersité des polymères par des méthodes de polymérisations par étapes (voir I.3.1) ou polymérisations en chaîne (voir I.3.2), celles-ci ne permettent toujours pas, à ce jour, d'obtenir ni une parfaite isomolécularité, ni un contrôle absolu de la séquence de monomères. Or, ces conditions sont essentielles pour l'encodage d'information sur les chaînes de polymère par exemple. C'est pourquoi, suivant les travaux de Vincent du Vigneaud sur la synthèse itérative d'hormones peptidiques par exemple (voir I.2.2.3), des voies de synthèses multi-étapes ont été développées, rendant possible l'accès à des polymères à séquences contrôlées, voire à séquences définies (Figure I.14).

3.3.1. La synthèse itérative

La synthèse itérative consiste en la construction d'une molécule par ajouts successifs des synthons qui la constituent. Dans l'approche traditionnelle, une réaction entre deux fonctions A et B est mise en jeu. Des monomères portant des fonctions A (protégée) et B réagissent avec la fonction A de la chaîne en croissance. Celle-ci est donc terminée par une fonction A reliée à un groupement protecteur qui est déprotégée dans un second temps, afin de pouvoir accueillir le monomère suivant selon le même schéma. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention de la séquence désirée (Figure I.18).^[7]

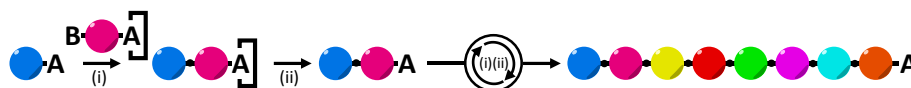


Figure I.18. Principe de la synthèse itérative. (i) Réaction entre A et B pour l'ajout d'un monomère. (ii) Déprotection de A.

Cependant, en solution, il est nécessaire de procéder à chaque étape, que ce soit un ajout de monomère ou une déprotection, à une purification du produit demandeuse en temps. Cette approche résulte en théorie en un polymère présentant une dispersité égale à 1.^[2]

Les travaux de du Vigneaud sur la synthèse d'hormones polypeptidiques et d'analogues de celles-ci^[69, 209-212] sont donc des précurseurs à cette approche, qui a depuis été étendue à la synthèse de composés macromoléculaires de différentes architectures. Parmi les plus synthétisées, on retrouve évidemment les polymères linéaires tels que des polypeptides,^[86] ou encore des polymères périodiques.^[101, 102] Une autre classe de macromolécules est également issue d'une synthèse itérative : les dendrimères.^[213-215]

3.3.2. La synthèse de dendrimères

À la suite des travaux de Fritz Vögtle^[216] en 1978 sur une méthode de synthèse en cascade de molécules hyperbranchées, Donald A. Tomalia et son équipe de *Dow Chemical* publient en 1985 la synthèse d'une macromolécule dont la structure leur fait penser à un arbre, qu'ils appellent dendrimère.^[217] L'optimisation des voies de synthèses ainsi que des propriétés et fonctionnalités obtenues dans le domaine des dendrimères^[218, 219] se fait alors très rapidement sous l'impulsion de plusieurs chercheurs comme Tomalia^[220, 221] toujours, Newkome,^[222] Mülhaupt^[223] ou encore le duo Fréchet et Hawker.^[224-228] En une quinzaine d'années seulement, ce sous-domaine des polymères à structures contrôlées s'est développé de manière incroyable. Ces macromolécules s'articulent autour d'un cœur, duquel partent des branches, appelées dendrons. Deux approches se font face pour la synthèse des dendrimères : la synthèse divergente, du cœur vers les extrémités, et la synthèse convergente, des bouts de chaînes au noyau (Figure I.19). Quelle que soit la méthode utilisée, il est nécessaire de recourir à des étapes de couplage et d'activation à chaque itération. La synthèse divergente présente le désavantage d'un nombre croissant de réactions au fur et à mesure que la structure se construit ainsi que d'un encombrement de plus en plus important, résultant en la présence de bien plus de défauts de structures que lors d'une synthèse convergente.^[218] Cependant, la production peut se faire à bien plus grande échelle par synthèse divergente, du fait que la masse de macromolécules formée est sensiblement augmentée à chaque étape.^[215]

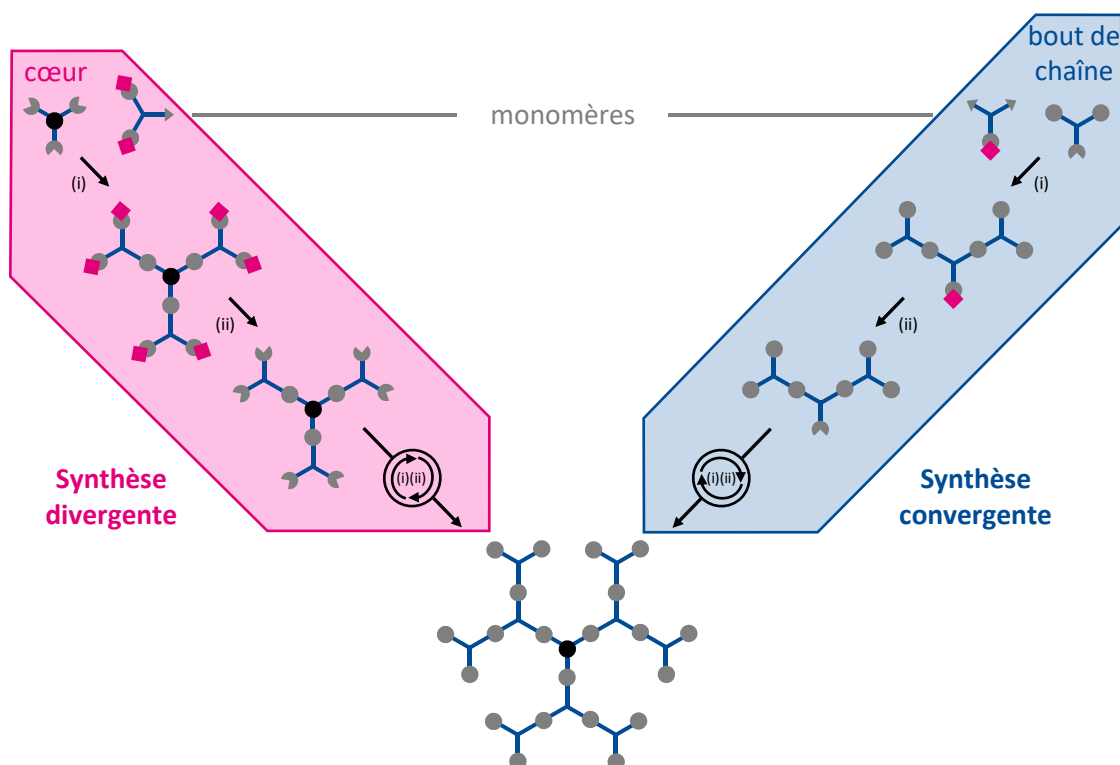


Figure I.19. Approches pour la synthèse itérative de dendrimères.^[215, 218] (i) Étape de couplage. (ii) Étape d'activation.

La plupart des dendrimères ont une structure sphérique assez symétrique qui leur donne des propriétés physiques assez éloignées des polymères linéaires.^[214] Un intérêt majeur de ce type de macromolécules, en plus de leur structure souvent parfaitement définie, est la variété des fonctionnalités qu'il est possible d'attacher en bouts de chaînes. Il est facilement imaginable qu'un même dendrimère puisse présenter en surface différentes fonctions qui lui procureront des propriétés

multiples.^[215] La concentration de sites actifs en surface peut notamment amener des propriétés très intéressantes dans le domaine médicale.^[214] Le groupe de René Roy par exemple a développé un grand nombre de glycodendrimères^[229-231] qui se sont avérés très efficaces pour des interactions avec des protéines sur le modèle des glycoprotéines (voir I.2.3). Des peptides dendritiques ont également eu un certain succès dans des utilisations comme antigènes avec une forte réponse en anticorps pour la défense de l'organisme contre des systèmes pathogènes.^[232, 233] D'autres applications en médecine et en biologie sont imaginées, par exemple dans la délivrance de médicaments, l'imagerie médicale ou dans la lutte contre le cancer.^[214, 219]

3.3.3. La croissance itérative exponentielle

Une méthode itérative en solution permet d'obtenir des polymères linéaires de structures et de tailles contrôlées avec une croissance rapide : c'est la synthèse itérative exponentielle. Grâce à un système de déprotection sélective de monomères diprotégés – l'un des groupements protecteurs est éliminé, l'autre demeure, menant à la formation de deux intermédiaires monoprotégés différents –, il est possible de former des dimères également diprotégés par les mêmes groupements protecteurs (Figure I.20). En réitérant cette opération sur les dimères, des tétramères sont obtenus, portant également les mêmes fonctions protégées en bouts de chaînes. En répétant ainsi ces étapes de déprotection sélective et de couplage, il est possible d'obtenir très rapidement des tailles de chaînes assez importantes – puisqu'à chaque itération, la taille de la chaîne est doublée – et dont la structure est contrôlée par le choix des monomères de la première étape, et par le nombre d'itérations réalisées. Cette méthode est par exemple utilisée en 2008 par Hawker dans le cadre de la synthèse de poly(caprolactone)s^[234] et de poly(lactide)s^[235] définis. Il parvient par cette méthode à produire des oligomères dont les tailles vont de 2 unités à 64 unités en un nombre limité d'étapes. Cette méthode est également appliquée à des chimies « click » pour la synthèse par exemple de polytriazoles de structures variées (voir I.5.1).

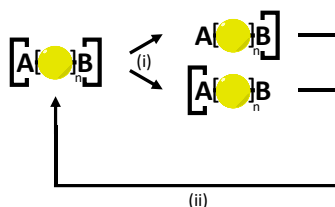


Figure I.20. Stratégie générale pour l'approche itérative exponentielle.^[101] (i) Étape de déprotection sélective. (ii) Étape de couplage.

3.3.4. L'approche traditionnelle « AB+AB »

Avec l'apparition des synthèses itératives supportées (voir I.2.2.3), que ce soit à l'aide d'une résine insoluble ou d'un support soluble, plusieurs stratégies ont été développées quant à la chimie et à la protection des groupements réactifs afin de faciliter les itérations. La première d'entre elles, utilisée initialement pour la synthèse de polypeptides (voir I.2.2.3), fait intervenir des groupements protecteurs et donc nécessairement des étapes d'activation : c'est l'approche « AB+AB ». Basée sur le même principe que la synthèse itérative non supportée décrite précédemment (voir I.3.3.1), elle fait intervenir des synthons portant deux fonctions A et B dont l'une est donc protégée (pour l'exemple, il s'agit de la fonction A). La chaîne en croissance sur le support présente une fonction A libre qui va réagir avec la fonction B du synthon. Après purification, la nouvelle fonction A de bout de chaîne,

protégée, subie une déprotection puis, après un nouveau lavage, l'étape de couplage suivante peut intervenir sur le même schéma (Figure I.21).

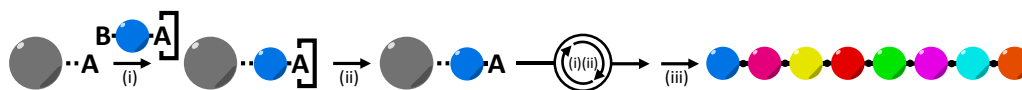


Figure I.21. Stratégie générale pour l'approche « AB+AB ». ^[10] (i) Étape de couplage. (ii) Étape de déprotection. (iii) Étape de clivage.

Comme décrit précédemment, après la synthèse de polypeptides (voir I.2.2.3), ce sont les oligonucléotides qui ont attiré l'attention (voir I.2.1.3.1).^[236] Initiées par Letsinger en 1965,^[41] les techniques se sont améliorées au fil des années^[47] jusqu'à permettre, aujourd'hui, des synthèses d'oligonucléotides de plus de 200 unités sur support solide dans des temps très rapides.^[86] Une autre tendance a fait son apparition ensuite : la synthèse de bioconjugués,^[84, 85, 112, 116] peptide-polymère (voir I.2.2.4) mais aussi oligonucléotide-polymère. Ainsi, s'inspirant de la chimie phosphoramidite et de la synthèse de bioconjugués, Sleiman développe une voie de synthèse itérative automatisée de bioconjugués oligonucléotide-polymère.^[237] Après obtention du simple brin d'ADN grâce à un protocole classique de chimie phosphoramidite automatisé, l'hybride est obtenu par ajouts itératifs, sur le même système automatique, de monomères synthétiques (en l'occurrence, contenant des chaînes alkyle ou PEG) protégés en position 5' par un groupement diméthoxytrityl (DMT). Ces segments confèrent au polymère des propriétés d'hydrophobie, d'auto-assemblage et d'encapsulation.

Cette approche « AB+AB » s'adapte également très bien à la synthèse de polymères à séquences contrôlées non naturels comme des oligocarbamates,^[238-240] oligoamides,^[241-246] oligoamines,^[247-249] oligourées,^[250-256] oligoesters,^[257-259] oligoarylènes^[104, 260-265] et bien d'autres,^[88] mais aussi des poly(phosphodiester)s, encore une fois par la même chimie phosphoramidite. En effet, Jean-François Lutz développe depuis quelques années des monomères compatibles avec cette chimie correspondant à un 0 ou un 1 en langage binaire selon le groupement latéral (0 si c'est un simple proton, 1 si c'est un groupement méthyle) qu'ils portent.^[266] Il a ainsi pu synthétiser des séquences de 0 et de 1 dont chaque série de huit motifs (un octet) correspond à une lettre au format ASCII. Ce concept a mené à la synthèse de plusieurs mots codés sur ces chaînes de polymères – avec un degré de polymérisation allant jusqu'à plus de 100 – comme « PMC » (3 octets), « Maurice » (7 octets) ou « Macromolécule » (13 octets).^[267] De manière identique, le même groupe génère des séquences de poly(phosphodiester)s dont certaines unités sont porteuses d'un alcyne latéral déprotégé quand les autres portent des alcynes protégés par un groupement triisopropylsilyle (TIPS), permettant une post-polymérisation sélective des chaînes latérales par cycloaddition avec un azoture, menant à des polymères contenant de l'information codée de manière différente.^[268] Reposant toujours sur la même chimie, des oligo(phosphodiester)s ont été produits en remplaçant la protection par du DMT par un groupement protecteur photoclivable : le 2-(2-nitrophényl)propoxycarbonyle (NPPOC).^[269]

4. Synthèses itératives de polymères à séquences contrôlées sans groupements protecteurs

Bien que l'approche « AB+AB » ait été largement étudiée durant les dernières décennies, elle présente l'inconvénient de nécessiter, entre chaque étape de couplage, une étape de déprotection qui

est gourmande à la fois en réactifs et en temps. C'est pourquoi, récemment, des approches ne faisant plus intervenir de groupements protecteurs ont été développées.^[10]

Par exemple, l'utilisation de groupes réactifs dormants peut être une solution pour supprimer ces étapes. Elle permet d'obtenir différents types d'oligomères comme des oligothiophènes,^[270] des oligoéthers^[271] ou des oligo(1,3-triazole)s.^[272] Dans cette stratégie, l'une des deux fonctions réactives est présente sous une forme dormante sur le monomère lors de l'ajout de celui-ci, mais peut, une fois sur la chaîne en croissance, être activée par une réaction chimique, afin de pouvoir accueillir le monomère suivant. Cependant, cette technique ne fait que remplacer les étapes de déprotection par des étapes d'activation de la fonction réactive, qui sont en général plus longues encore.

En 2016, Lutz décrit une synthèse sur support solide impliquant un monomère portant une amine et un groupe hydroxy et le carbonate de N,N'-disuccinimidyle (DSC).^[273] Dans une première étape, le DSC réagit avec le groupe hydroxy de la chaîne en croissance, conduisant à la formation d'un carbonate asymétrique activé. Une deuxième réaction de l'amine du monomère hétérofonctionnel sur le carbonate en bout de chaîne (étape pouvant se dérouler en présence de l'alcool déprotégé, preuve de l'orthogonalité du système) mène à l'obtention d'un motif uréthane. La répétition itérative de ce cycle de deux réactions permet donc l'obtention d'un oligocarbamate à séquence définie isomoléculaire (Figure I.22).

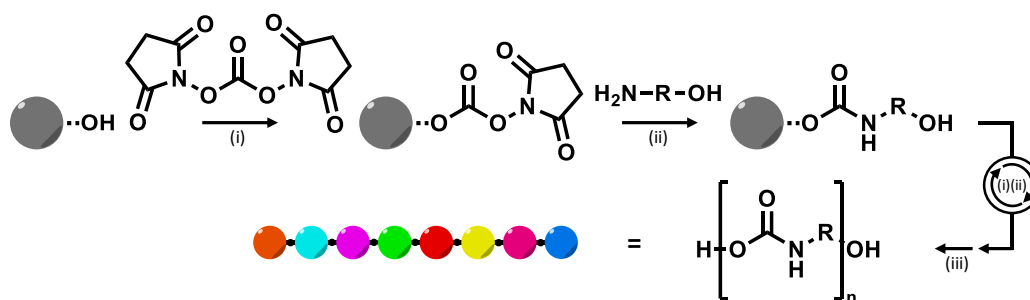


Figure I.22. Synthèse d'oligocarbamates.^[273] (i) DSC, triéthylamine, micro-ondes à 60°C, ACN. (ii) Alcool aminé, triéthylamine, DMF. (iii) Étape de clivage.

Une autre stratégie consiste en la mise en place de réactions multicomposants, qui font intervenir plusieurs petites molécules, des sous-synthons en quelque sorte, qui réagissent en une seule étape pour s'ajouter à la chaîne en croissance. Ces réactions ont été utilisées depuis bien longtemps en synthèse organique et sont désormais aussi employés dans le domaine des polymères^[274], et des polymères à séquences contrôlées. On peut retenir notamment l'utilisation de la réaction de Passerini avec trois composants (P-3C), à savoir un isonitrile, un aldéhyde (ou une cétone) et un acide carboxylique, menant à la formation d'un α -acyloxy-carboxamide. Couplée à une addition thiol-ène pour l'ajout intermédiaire d'un espaceur, elle permet de synthétiser des chaînes porteuses de groupements latéraux variés.^[275, 276] Plus récemment, l'association de cette réaction de Passerini à d'autres chimies permet d'améliorer les conditions de synthèse et la pureté des oligomères obtenus.^[277, 278] La réaction d'Ugi avec quatre composants (U-4C), à savoir un isonitrile, un aldéhyde (ou une cétone), un acide carboxylique et, cette fois-ci, une amine, menant à la formation d'un α -amidocarboxamide est également insérée dans des processus de la même espèce, toujours couplée à une addition thiol-ène.^[279] La répétition de cette réaction d'Ugi à quatre composants a également permis la formation de peptoïdes cycliques dont la structure primaire est contrôlée.^[280] En revanche, malgré la suppression de l'étape de déprotection de l'approche « AB+AB » et l'absence de l'étape

d'activation de la stratégie des groupes réactifs dormants, l'utilisation de réactions multicomposants ne permet pas d'obtenir une grande diversité de structures de polymères à séquences contrôlées, en particulier du point de vue du squelette principal. C'est pourquoi des approches orthogonales lui seront souvent préférées.

4.1. L'utilisation de monomères bi-fonctionnels en excès (« AA+BB »)

L'approche « AA+BB » fait intervenir deux comonomères homobifonctionnels AA et BB. A ne réagit qu'avec B, ce qui permet de limiter la croissance de la chaîne pendant une étape de couplage à un seul ajout de monomère (Figure I.23). Cependant, afin d'éviter la création de ponts interchaînes (un monomère dont les deux fonctions réagiraient avec des chaînes différentes sur le support), les réactifs sont utilisés en très large excès. Ces conditions favorisent donc les réactions intermoléculaires plutôt qu'intramoléculaire (en l'occurrence, du support au support).



Figure I.23. Stratégie générale pour l'approche « AA+BB ». ^[10] (i) et (ii) Étapes de couplage. (iii) Étape de clivage.

Les premières synthèses de polymères à séquences contrôlées par une approche « AA+BB » sont menées par Rose et Vizzanova dans les années 1990 grâce à des diamines composées de segments PEG et l'anhydride succinique. ^[281] La répétition itérative des étapes de couplage de ces comonomères permet l'obtention d'oligoamides à séquences définies isomoléculaires. Sur le même principe, Börner, en remplaçant les diamines à segments PEG par la spermine et la 3,3'-diamino-N-méthyl-dipropylamine par exemple, réalise également la synthèse d'oligoamides à séquences définies qui, liés à des polypeptides ou à des poly(éthylène glycol)s, forment des bioconjugués montrant une activité peptidomimétique et donc des propriétés intéressantes en tant que vecteurs d'ADN. ^[282-285] Plus récemment, la synthèse par une approche « AA+BB » d'une nouvelle classe de polymères à séquences définies a été décrite : celle de polymères à base de triazines (TZPs pour *triazine-based polymers*). ^[286] Ces TZPs sont obtenus à partir de diamines et de différents dérivés de chlorure cyanurique (Figure I.24). En plus de porter une variété de groupements et chaînes latéraux, ils présentent des interactions squelette-squelette qui leur confèrent des structures secondaires ou tertiaires pouvant une nouvelle fois s'approcher de fonctionnalités biologiques.

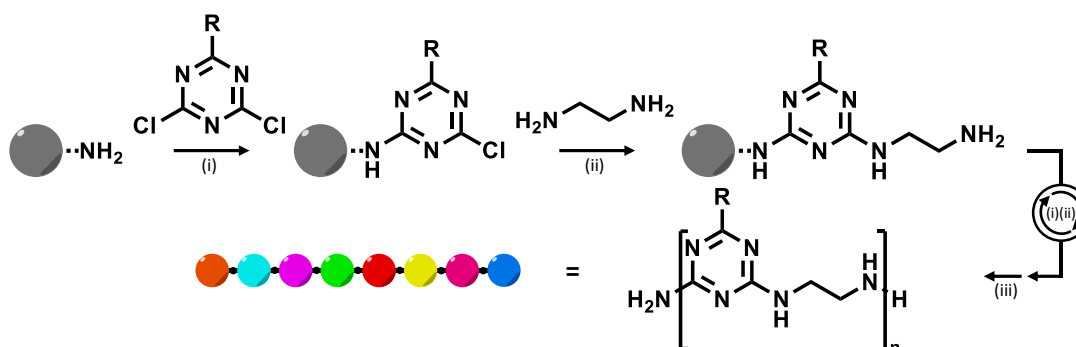


Figure I.24. Synthèse de TZPs. ^[286] (i) Chlorure cyanurique, DIPEA, THF. (ii) Diamine, DIPEA, 80°C, NMP. (iii) Étape de clivage.

4.2. L'utilisation d'une troisième fonction (« AA+BC »)

L'approche « AA+BC » fait intervenir une troisième fonction réactive (Figure I.25). L'ajout du monomère BC est basé sur sa chimiosélectivité alors que comme pour la stratégie « AA+BB », l'ajout du monomère AA doit se faire dans des conditions de très large excès pour éviter les connexions interchaînes.



Figure I.25. Stratégie générale pour l'approche « AA+BC ». ^[10] (i) et (ii) Étapes de couplage. (iii) Étape de clivage.

Cette approche a notamment été utilisée récemment par Alabi pour la synthèse d'oligothiolétheramides (oligoTEAs) à séquences définies isomoléculaires.^[287, 288] La synthèse implique une addition thiol-ène entre un dithiol en excès (AA) et la double liaison de la chaîne en croissance (C) et une addition de Michael entre le thiol maintenant présent en bout de chaîne (A) et l'acrylamide du monomère hétérobifonctionnel (B) (Figure I.26). Cette synthèse est réalisée en phase liquide, permettant de diminuer les temps des réactions et d'obtenir de meilleurs rendements, sur un support fluoré. Se reposant sur la même méthode, le groupe d'Alabi toujours réalise la synthèse de macrocycles à séquences définies.^[289] Après la synthèse de la macromolécule linéaire sur support fluoré, une réaction en cascade permet en une seule étape le clivage du produit de son support et sa macrocyclisation.

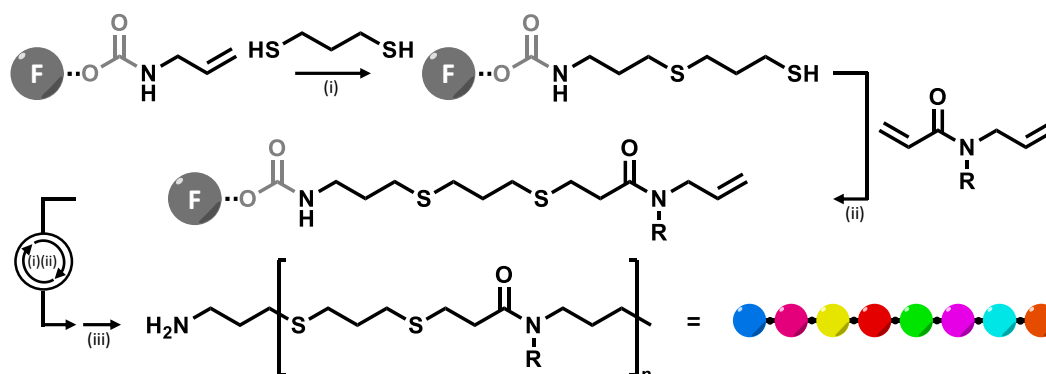


Figure I.26. Synthèse d'oligoTEAs.^[287] (i) Addition thiol-ène : dithiol, DMPA, hv, MeOH. (ii) Addition de Michael : acrylamide allylique, Me₂PhP, MeOH. (iii) Étape de clivage.

Constitué d'une chaîne perfluorée portant une unité clivable en fin de synthèse, le support fluoré permet des réactions en solution dans les solvants classiques tout en facilitant les étapes de purification.^[290, 291] Celles-ci se déroulent sur une colonne de silice perfluorée en deux étapes (Figure I.27). Un premier lavage est effectué avec un solvant fluorophobe, éliminant avec lui les impuretés et les réactifs en excès. Dans un second temps, un lavage avec un solvant fluorophile est réalisé, qui emmène avec lui la chaîne fluorée porteuse de l'oligomère synthétisé. La mise en œuvre est donc relativement facile et présente de nombreux avantages, à la fois de la synthèse en phase liquide et des purifications simplifiées.

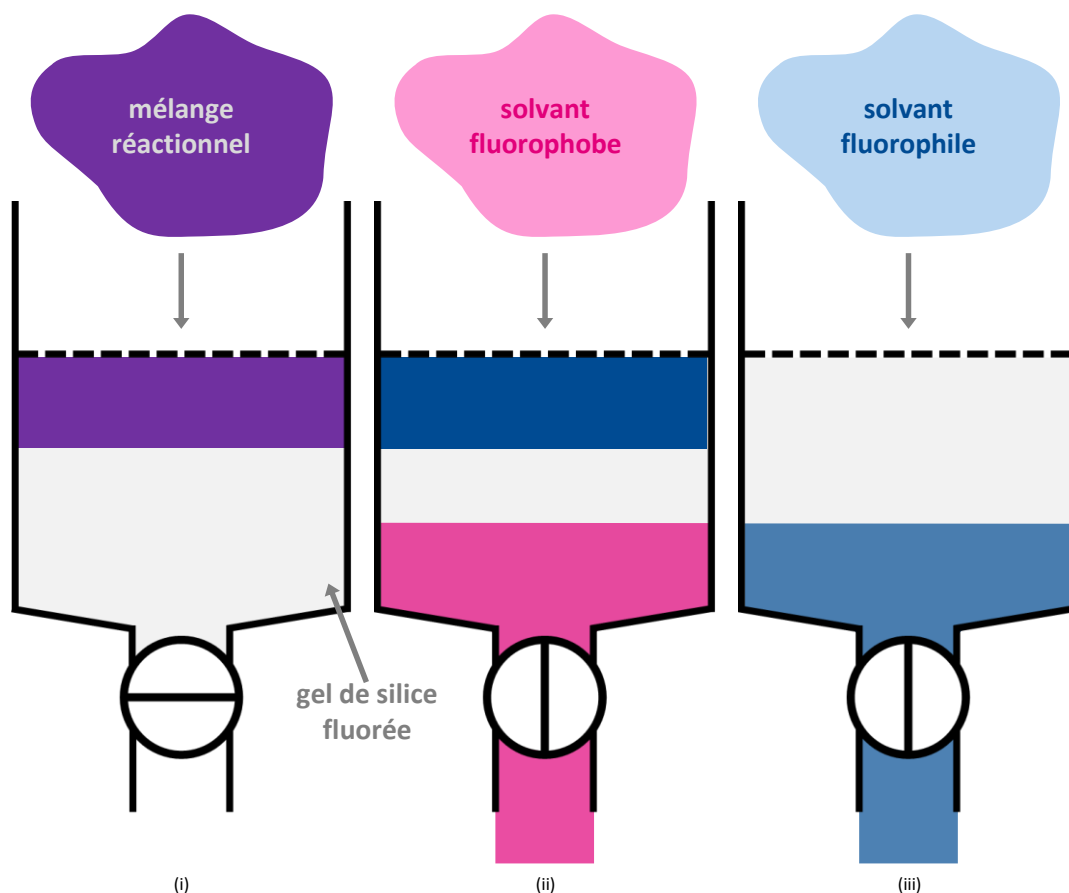


Figure I.27. Protocole général pour l'étape de purification lors d'une synthèse itérative sur support fluoré.^[88] (i) Introduction du mélange réactionnel sur la silice fluorée. (ii) Éluion de la fraction organique par un solvant fluorophobe. Les impuretés et réactifs en excès sont éliminés. (iii) Éluion de la fraction fluorée par un solvant fluorophile. Les chaînes en croissance sur le support sont récupérées.

4.3. L'approche chimiosélective (« AB+CD »)

Les approches décrites précédemment présentent toujours un inconvénient majeur : elles sont peu économes en produit puisqu'elles nécessitent au moins une étape dans des conditions de large excès. C'est pourquoi l'utilisation de deux réactions chimiosélectives est maintenant très souvent privilégiée. C'est l'approche « AB+CD », qui repose sur deux comonomères hétérobifonctionnels. Ainsi, la fonction C d'un monomère ne réagit qu'avec la fonction A du second et de la même manière, la fonction B de celui-ci ne réagit qu'avec la fonction D du premier (Figure I.28). Ce concept même de chimiosélectivité a été formalisé par Barry M. Trost dans les années 80 dans un souci d'efficacité et d'économie des atomes dans les réactions chimiques.^[292, 293] Adapté au domaine des polymères,^[294] il permet aujourd'hui de réaliser chaque étape d'une synthèse itérative dans des conditions raisonnables en termes de quantités de matière tout en se préservant des étapes de déprotection ou d'activation d'autres stratégies.



Figure I.28. Stratégie générale pour l'approche « AB+CD ». ^[10] (i) et (ii) Étapes de couplage. (iii) Étape de clivage.

La synthèse de peptoides à séquences contrôlées en 1992 par Zuckermann représente la première utilisation de ce principe en synthèse itérative en phase solide.^[295] Alors qu'ils étaient à

l'origine synthétisés grâce à la méthode de synthèse peptidique en phase solide classique,^[296] ces polymères peuvent également être issus de deux réactions chimiosélectives (pour Zuckermann, il s'agit d'une approche par submonomères) : dans un premier temps, un couplage a lieu entre une amine secondaire et l'acide bromoacétique, puis, l' α -bromoacétamide généré peut réagir avec une amine primaire par un déplacement nucléophile, résultant en la formation de l'amine secondaire utile à la première étape (Figure I.29). Les peptoïdes sont façonnables à volonté de par l'infinie variété des groupements latéraux qu'il est possible d'insérer dans la chaîne, pouvant leur donner de très intéressantes propriétés chimiques, physiques ou biologiques.^[297-299] Notamment, des interactions intra- et interchaînes donnent à ces polymères des structures secondaires et tertiaires^[297, 300] et une activité biologique résultante très prometteuses pour des applications pharmaceutiques.^[301, 302]

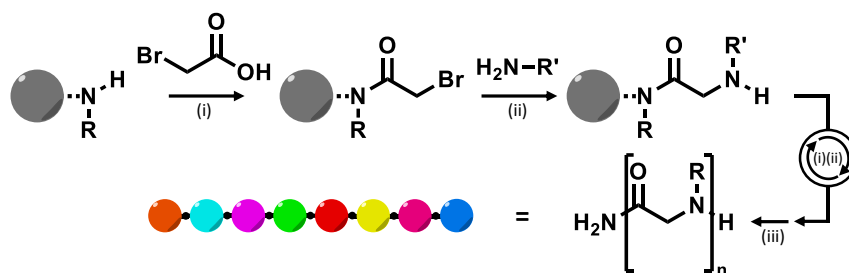


Figure I.29. Synthèse de peptoïdes.^[295] (i) Amidification : acide bromoacétique, DIC, DMF. (ii) Déplacement nucléophile : amine, DMF. (iii) Étape de clivage.

En 2009, Lutz utilise également une approche « AB+CD » sur support soluble pour la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies.^[99] Cette synthèse fait intervenir quatre fonctions réactives impliquées dans deux réactions chimiosélectives, un couplage peptidique entre un acide carboxylique et une amine primaire et une cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre entre un alcyne et un azoture. Cette voie de synthèse est, dans les années qui suivent, étudiée plus en détails (voir I.5.1).

La stratégie des submonomères a été récemment adaptée par Du Prez pour la synthèse d'oligo(mères à séquences contrôlées basée sur la chimie des thiolactones.^[303] Les oligo(thioéther amide)s sont issus d'une aminolyse entre la thiolactone fixée à la résine et une amine primaire formant une liaison amide, puis d'une extension de chaîne entre le thiol résultant de l'ouverture de la thiolactone à l'étape précédente et une fonction vinyle ou bromure d'un monomère portant également une thiolactone, menant à l'obtention d'une liaison thioéther et à la restauration de la thiolactone terminale (Figure I.30.a). Cependant, la première étape donnant lieu à la formation de ponts disulfures, le protocole a dû être amélioré (Figure I.30.b).^[304] L'amine primaire de la première étape est donc remplacée par un alcool aminé et un acrylate ou un acrylamide qui réagit immédiatement avec le thiol formé afin d'attacher le groupe pendant. L'étape d'extension de chaîne se fait par réaction entre la fonction hydroxy du bout de chaîne et un monomère de type α -isocyanato- γ -thiolactone permettant la formation d'une liaison carbamate et la réinstallation de la thiolactone finale. Ce nouveau protocole mène donc à des oligo(carbamate amide)s à séquences contrôlées donc la synthèse peut même être automatisée.^[305]

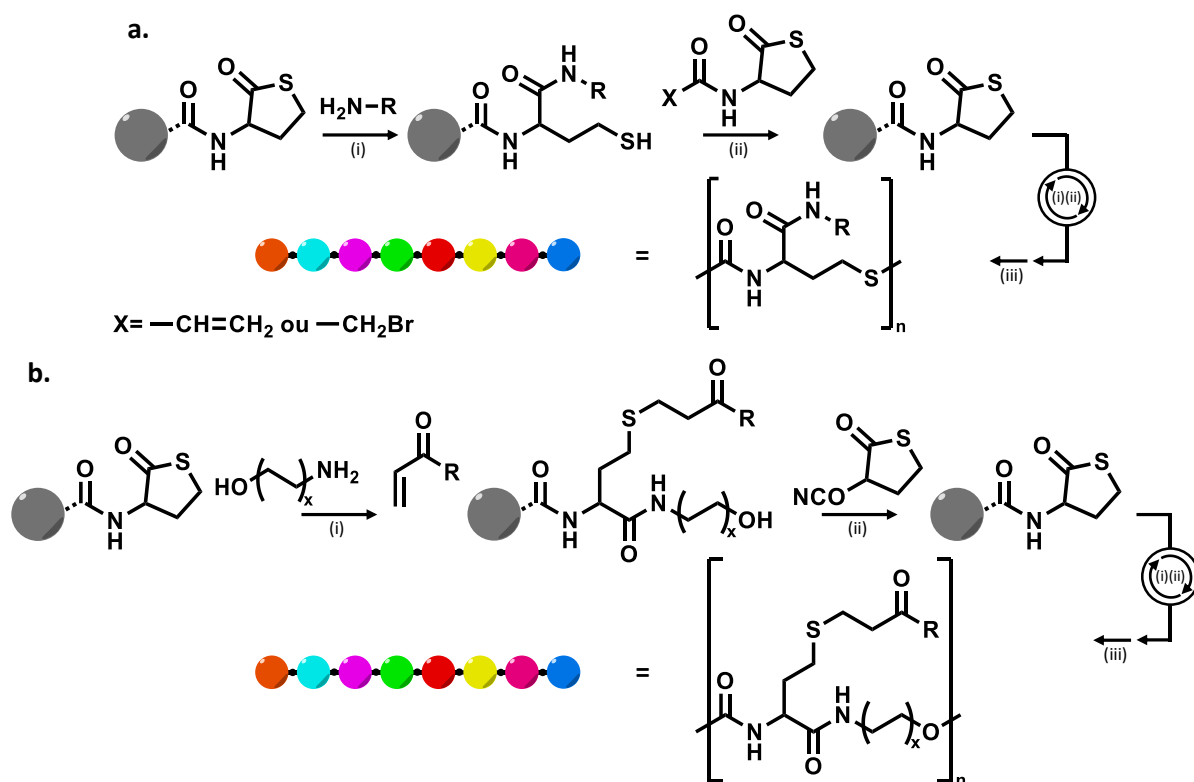


Figure I.30. Synthèses d'oligomères à séquences contrôlées basées sur la chimie des thiolactones. *a.*^[303] (i) Aminolyse : amine, DCM. (ii) Extension de chaîne : α -vinyle- γ -thiolactone ou α -bromo- γ -thiolactone, Me₂PhP, H₂O, DMF. (iii) Étape de clivage. *b.*^[305] (i) Aminolyse et fonctionnalisation : alcool aminé, acrylate ou acrylamide, CHCl₃. (ii) Extension de chaîne : α -isocyanato- γ -thiolactone, DBTDL, CHCl₃. (iii) Étape de clivage.

L'équipe de Jean-François Lutz diversifie également les stratégies chimiosélectives pour la synthèse de différentes structures d'oligomères à séquences définies. Par exemple, il décrit en 2015 la synthèse de poly(alcoxyamine amide)s grâce à deux synthons : un anhydride d'acide symétrique portant des fonctions bromures et un monomère portant une amine primaire et un radical nitroxy.^[306] Les deux réactions orthogonales impliquées sont donc une amidification entre l'amine et l'anhydride et un couplage radicalaire entre le nitroxy et le carbone bromé (Figure I.31.a). Un code binaire peut être inscrit sur ces polymères grâce à l'utilisation de deux différents anhydrides. Un 0 est inscrit lorsque que les carbones en alpha des bromes portent un groupement méthyle et un proton alors que lorsque qu'il s'agit de deux groupements méthyles, ce sera un 1. Cette classe de polymères constitue une référence dans les polymères contenant de l'information étant donnée la facilité avec laquelle il est possible d'inscrire ce code le long de la chaîne rapidement, puis de le lire par une simple analyse en spectrométrie de masse en tandem (voir I.6.1.2).^[306] Des essais sur différents types de supports (solides comme solubles) mènent à la synthèse en six étapes d'une librairie de 8 pentamères contenant 3 bits (trois 0 ou 1) d'information ainsi que de chaînes un peu plus longues codant pour un octet (8 bits). Par la suite, l'optimisation par différentes méthodes permet d'augmenter encore la quantité d'information codée : jusqu'à 10 bits par une méthode convergente,^[307] et même 24 et 32 bits (les mots « CMP » et « CNRS » en langage ASCII) grâce à une polymolécularité induite par un mélange de chaînes de différentes longueurs.^[308]

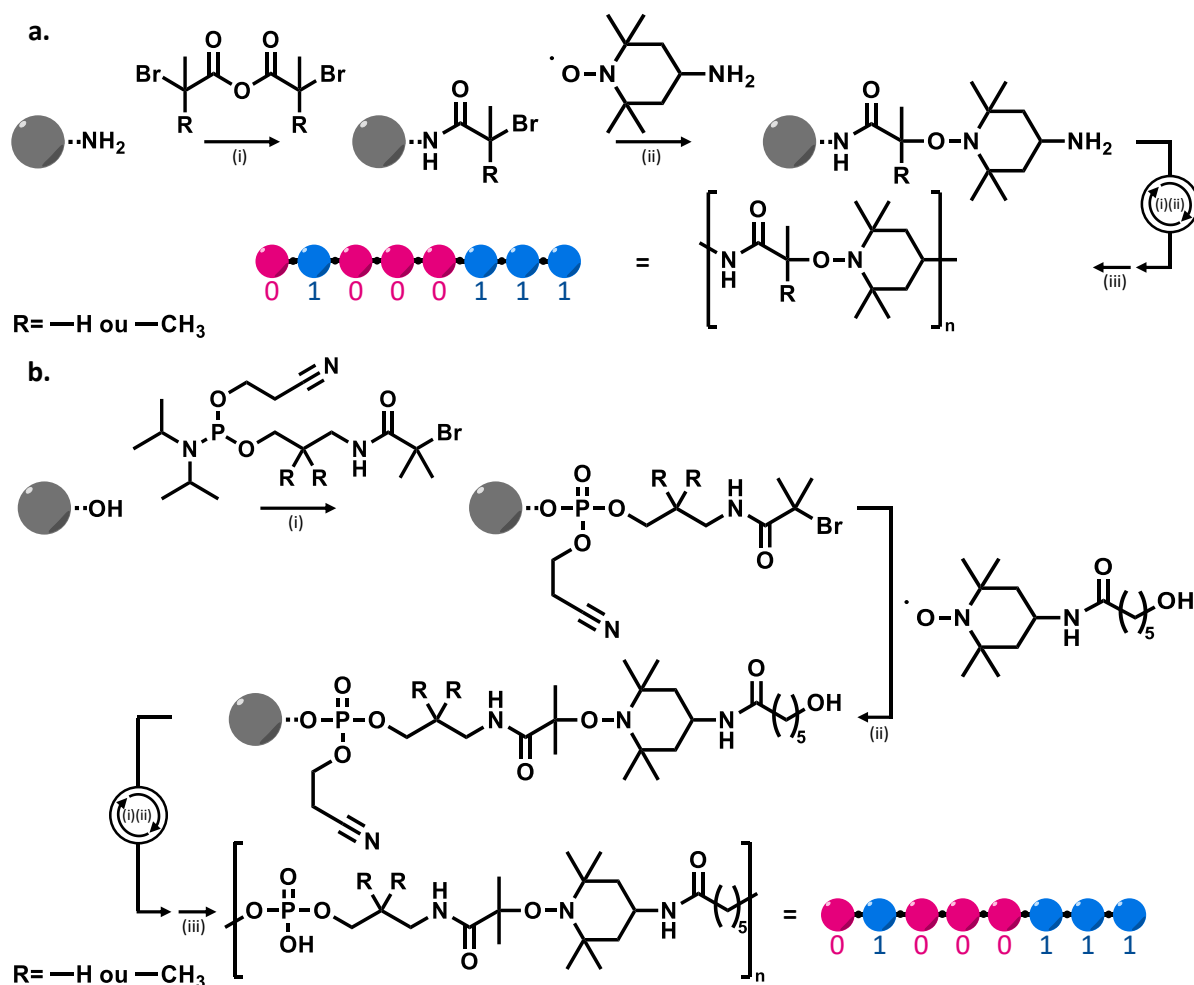


Figure I.31. Synthèses d'oligomères à séquences contrôlées basées sur les liaisons alcoxyamines. a.^[306] (i) Amidification : anhydride d'acide bromé, DIPEA, HBTU, THF. (ii) Couplage radicalaire : amino-TEMPO, CuBr, Me₆TREN, micro-ondes à 40°C, DMSO. (iii) Étape de clivage. b.^[309] (i) Couplage phosphoramidite et oxydation : monomère, tétrazole, ACN ; I₂, 2,6-lutidine, THF/H₂O. (ii) Couplage radicalaire : monomère nitroxyle, CuBr, Me₆TREN, DMSO. (iii) Étapes de clivage et de déprotection.

En 2016, la même équipe présente la synthèse de poly(alcoxyamine phosphodiester)s encodés sur le même principe. Cette fois-ci, le radical nitroxyle est associé à un groupement hydroxyle alors que le second monomère contenant l'information à encoder porte d'un côté le même bromure d'alkyle que précédemment, et de l'autre côté une phosphoramidite. Les deux réactions mises en jeu (Figure I.31.b) sont donc à nouveau un couplage radicalaire entre le nitroxyle et le carbone bromé et un couplage phosphoramidite (voir I.2.1.3.1).^[309]

De manière évidente, le développement de méthodes reposant sur l'approche « AB+CD » facilite la synthèse de polymères à séquences définies rapide et représente donc une avancée majeure dans ce domaine, notamment en considérant les polymères dits « numériques », contenant de l'information le long de leur chaîne.

5. Les chimies « click » pour la synthèse de polymères à séquences contrôlées

Afin que ces différentes stratégies de synthèse soient mises en place, il est nécessaire de définir quelle chimie sera utilisée dans chaque cas, ce qui donne également une idée de la structure finale du polymère obtenu. Parmi les outils à disposition, un type de chimie émerge depuis le début

des années 2000, en particulier dans le domaine des polymères à séquences définies : il s'agit des chimies dites « click ».

Introduit en 2001 par K. Barry Sharpless,^[310, 311] le concept de chimie « click » repose sur plusieurs principes.^[312, 313] Les réactions doivent être stéréospécifiques, être modulables, former des sous-produits inoffensifs qui peuvent être facilement éliminés, permettre de grands rendements à grande échelle et être économes en atome. Il est également souhaitable que les réactifs de départ soient disponibles au préalable, que les conditions de réactions soient le plus simple possible, et qu'elles ne nécessitent que très peu de solvant, voire aucun solvant, et enfin, que les produits finaux soient facilement isolés. Certaines réactions ne remplissent pas tous ces critères mais peuvent tout de même être assimilées à la chimie « click » si elles n'en occultent qu'un par exemple. Cette chimie a depuis pris de l'importance et s'est implantée dans de nombreux domaines,^[314-321] liés notamment aux polymères,^[322] dont certains ont déjà été discutés, comme la synthèse d'oligopeptides et d'oligonucléotides,^[323, 324] de dendrimères^[325, 326] ou encore de bioconjugués.^[84, 112, 327] L'utilisation est telle que le développement de la chimie « click » est vu par certains comme un nouvel idéal.^[319, 328] Parmi les réactions éligibles à l'appellation « click » ou proches, trois familles principalement sont retrouvées dans le domaine des polymères à séquences définies.^[312]

5.1. La cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre

La première et sans doute la plus utilisée et étudiée de ces réactions est la cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (CuAAC pour *copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*), inspirée de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen,^[329] et améliorée simultanément par K. Barry Sharpless^[310, 311] et Morten Meldal^[330, 331] au début des années 2000. Comme l'indique son nom, elle implique des fonctions azoture et alcyne et est catalysée par le cuivre (I), qui assure un meilleur rendement et une plus grande réactivité pour former un triazole.^[332] Cette réaction a très vite été utilisée pour la synthèse de polymères,^[333-335] son efficacité étant un avantage majeur, menant à la synthèse de structures complexes et parfaitement définies.^[336] La CuAAC est donc bien évidemment utilisée dans des stratégies itératives en solution ou supportées, avec des groupements protecteurs ou bien combinée avec d'autres réactions dans des approches orthogonales.

Un exemple de cette utilisation est la synthèse de polymères à séquences contrôlées par une méthode itérative divergente/convergente faisant intervenir des groupements protecteurs.^[101] Comme décrit précédemment (voir I.3.3.3), un monomère dont les deux fonctions réactives sont protégées et sélectivement déprotégées aux deux extrémités, donnant deux intermédiaires différents monoprotégés pouvant alors se coupler pour former un dimère diprotégé avec les mêmes groupements que le monomère d'origine. Il peut alors subir les mêmes étapes de déprotection sélective et couplage à répétition jusqu'à former la structure désirée avec la taille de chaîne souhaitée. Cette méthode permet principalement d'obtenir des structures périodiques mais avec une croissance rapide puisque chaque étape double la taille de la chaîne. Par cette technique, des synthèses d'oligotriazoles ont été effectuées à partir d'une grande variété de segments comme des oligoéthers,^[337, 338] des sucres,^[339, 340] des époxydes,^[102, 341] des nucléotides,^[342] des polymères^[343] ou des hydrocarbures.^[272, 344] La méthode a même été automatisée,^[345] menant à une échelle aux alentours du gramme.

Un autre exemple de l'utilisation de la CuAAC dans le domaine des polymères à séquences contrôlées est la synthèse de polymères à séquences définies via une approche « AB+CD » ne faisant

donc plus appel à des groupements protecteurs. Le groupe de Lutz a ainsi combiné la CuAAC à un couplage peptidique pour former des oligo(triazole amide)s contenant de l'information numérique sous la forme d'un code binaire.^[99] Les deux réactions mettent donc en jeu des monomères porteurs de fonctions alcyne (A) et acide carboxylique (B) pour l'un, et amine (C) et azoture (D) pour l'autre. Le monomère AB est alors codant (0 ou 1) alors que le monomère CD n'est qu'un simple espaceur (Figure I.32.a). De cette manière, une bibliothèque de pentamères (codant pour 3 bits) est obtenue^[11] puis, par une chimie combinatoire à partir de trimères (codant pour 2 bits), des chaînes plus longues (1 octet) sont synthétisées.^[346] En se basant sur ce principe également, Delphine Chan-Seng, dans la même équipe, introduit des unités naturelles dans la chaîne grâce à une étape supplémentaire impliquant des acides aminés (Figure I.32.b).^[347-349] Un oligomère contenant à la fois des unités purement synthétiques et des unités naturelles est donc obtenu, montrant la versatilité de cette synthèse quant au choix des synthons.

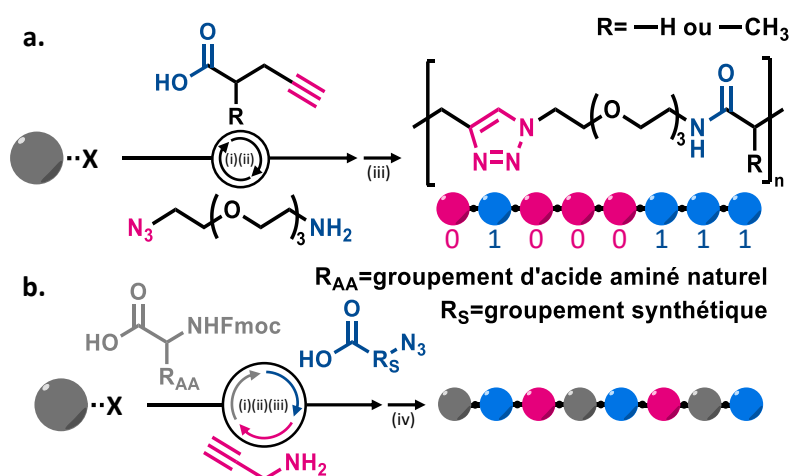


Figure I.32. Synthèses d'oligo(triazole amide)s. a.^[11] (i) Amidification : monomère, PyBOP, DIPEA, DCM. (ii) CuAAC : monomère, CuBr, dNbipy, THF. (iii) Étape de clivage. b.^[347] (i) et (ii) Amidifications : monomère, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF. (iii) CuAAC : CuBr, PMDETA, DCM. (iv) Étape de clivage.

Des polymères à séquences contrôlées peuvent également être obtenus par addition d'oligopeptides ou d'oligomères hétérotélchéliques avec des fonctions terminales alcynes et azotures. La CuAAC permet une ligation entre des segments qui jouent le rôle de macromonomères. En particulier, il est courant de combiner cette réaction à une synthèse par ATRP, menant à des chaînes longues de tailles et structures primaires contrôlées.^[198, 327, 350, 351] Le triazole formé peut également induire une conformation dans l'espace, donnant des structures secondaires et tertiaires qui imitent des composés naturels.^[352-355]

Une autre utilisation courante de la CuAAC consiste en la post-modification après polymérisation. Il suffit pour cela d'incorporer l'un des deux groupements nécessaires à la réaction dans la chaîne pendant la polymérisation afin de pouvoir par la suite venir y attacher des chaînes latérales par exemple.^[356] Il est possible, par ce procédé, d'introduire des sucres, formant des glycopolymères,^[192, 357-363] des désoxyribonucléosides,^[364] des oligopeptoides,^[315, 364] ou des chaînes PEG^[195, 266, 268] ou polystyrène,^[365] entre autres. Cette technique est aussi utilisée pour contrôler la cyclisation^[338, 366-368] ou le repliement de chaînes polymères par la création de liaisons covalentes à différents niveaux, permettant l'obtention de formes complexes.^[199, 369]

Cependant, malgré les nombreux avantages que présente la CuAAC, certains inconvénients demeurent, comme la possible explosivité des composés portant le groupement azoture en cas de masse moléculaire basse^[370] ou encore la difficulté à éliminer le cuivre qui catalyse la réaction mais qui peut ensuite former un complexe avec les triazoles obtenus.^[371] C'est pourquoi d'autres réactions correspondant au mieux aux critères de la chimie « click » mais ne présentant pas ces problèmes (absence de métal, pas de composés explosifs) sont également développées.

5.2. Les chimies basées sur les thiols et thiolactones

Les réactions de couplage faisant intervenir une fonction thiol par exemple sont un bon compromis. Même si elles ne respectent pas tous les critères de la chimie « click », elles en sont très proches et sont par conséquent parmi les plus utilisées. Par exemple, l'addition thiol-ène, connue depuis le début du 20^{ème} siècle,^[372] qui met en jeu un thiol et un alcène, est un très bon candidat à la synthèse de polymères à séquences définies. Malgré la possibilité des réactions secondaires (la formation d'un pont disulfure par exemple), cette réaction est rapide, insensible à l'eau ou aux acides, efficace et versatile.^[312] Ainsi, plusieurs applications dans le domaine des polymères à séquences contrôlées font appel à cette réaction. L'utilisation de l'addition thiol-ène dans une synthèse multicomposants^[275, 279] (voir I.4) ou la synthèse d'oligothiolétheramides par Alabi^[287-289] grâce à une approche « AA+BC » (voir I.4.2) en sont des exemples déjà présentés précédemment. Bowman rapporte en 2015 la synthèse d'oligomères portant des bases nucléiques se reposant également sur cette réaction avec une approche « AB+AB ».^[373]

De manière similaire, l'addition thiol-yne, qui fait intervenir cette fois-ci un thiol et un alcène, permet la synthèse de polymères portant des fonctions latérales définies localisées précisément,^[374] mais aussi de polymères à séquences contrôlées fonctionnels avec différentes topologies.^[375, 376] Il est notamment possible d'obtenir grâce à cette technique des polymères portant une nouvelle fois des bases nucléiques. Même si son étude est encore assez jeune dans le domaine, cette réaction présente les avantages d'être rapide et libre de toute stratégie de protection ouvrant la voie à la synthèse de polymères à séquences contrôlées à une grande échelle.^[134]

En outre, puisqu'il est question de fonctionnalisation, il est notable que ces réactions faisant intervenir des thiols, et particulièrement l'addition thiol-ène, sont également utilisées pour des aspects de post-modification ou de cyclisation.^[101, 341, 356, 377-381] À la manière de la CuAAC, l'une des deux fonctions réactives est incorporée au squelette d'un polymère pour pouvoir par la suite réagir avec la fonction complémentaire afin de fixer une chaîne latérale ou de créer une liaison covalente intramoléculaire. Cette technique permet notamment d'intégrer une nouvelle fois des unités sucres pour former des glycopolymères,^[363, 382-386] entre autres.

Bien que les thiols présentent beaucoup d'avantages les rendant très utiles en synthèse organique ou de polymères, il existe beaucoup d'inconvénients, tels que leur instabilité face à la formation de ponts disulfures ou, tout simplement, leur odeur incommode, qui incitent à recourir à d'autres méthodes comme une stratégie de protection, et de déprotection *in situ*.^[387] La voie utilisée par le groupe de Du Prez, en passant par une thiolactone (voir I.4.3), est un très bon exemple de cette technique couplée à une approche « AB+CD » menant à des polymères à séquences définies.^[303-305, 379] La simple ouverture du thioester cyclique libère la fonction thiol qui peut alors subir la réaction d'addition. Preuve de sa démocratisation, d'autres groupes utilisent également l'aminolyse de la

thiolactone pour la synthèse de polymères à séquences-contrôlées,^[145] et notamment celui de Hong avec des motifs répétitifs.^[388-392]

5.3. L'utilisation de réactions de Diels-Alder

Bien qu'elle puisse être considérée comme une réaction « click » efficace et qu'elle ait déjà servi à l'obtention de structures macromoléculaires fonctionnelles, complexes et précises,^[393-401] ce n'est que récemment que la réaction de Diels-Alder a commencé à être utilisée comme outil pour la construction de séquences définies.^[312] Connue depuis la fin des années 1920, ce type de réactions, qui valut à ses inventeurs Otto Diels et Kurt Alder le prix Nobel de Chimie en 1950, est l'un des plus communément utilisés en chimie organique.^[393] La cycloaddition a lieu entre un diène riche en électrons et un diénophile qui est lui pauvre en électrons. L'une des particularités de cette réaction est sa réversibilité (retro-Diels-Alder) qui peut être contrôlée par la température. Celle-ci est utilisée pour la synthèse de polymères à séquences contrôlées, notamment pour la fonctionnalisation et la cyclisation d'oligopeptoides en couplage avec l'addition thiol-ène.^[378, 380, 381] Mais Barner-Kowolik est le premier à incorporer un protocole de Diels-Alder par photochimie,^[402, 403] ce qui ne nécessite pas forcément de hautes températures ou d'excès de réactifs et est donc moins coûteux, dans la synthèse de polymères à séquences définies, et ce, sans support ni template. Il décrit ainsi en 2015 la synthèse de décimères parfaitement isomoléculaires de manière itérative en partant d'un cœur bifonctionnel dimaléimide (Figure I.33).^[402] L'extension de la séquence a donc lieu dans deux directions. En alternant les additions photoinitiées de deux monomères hétérobifonctionnels portant des diènes et des diénophiles, une structure alternée est obtenue. Cependant, l'un des deux monomères présente une fonction maléimide qui nécessite d'être protégée, obligeant une étape supplémentaire de déprotection dans les itérations.

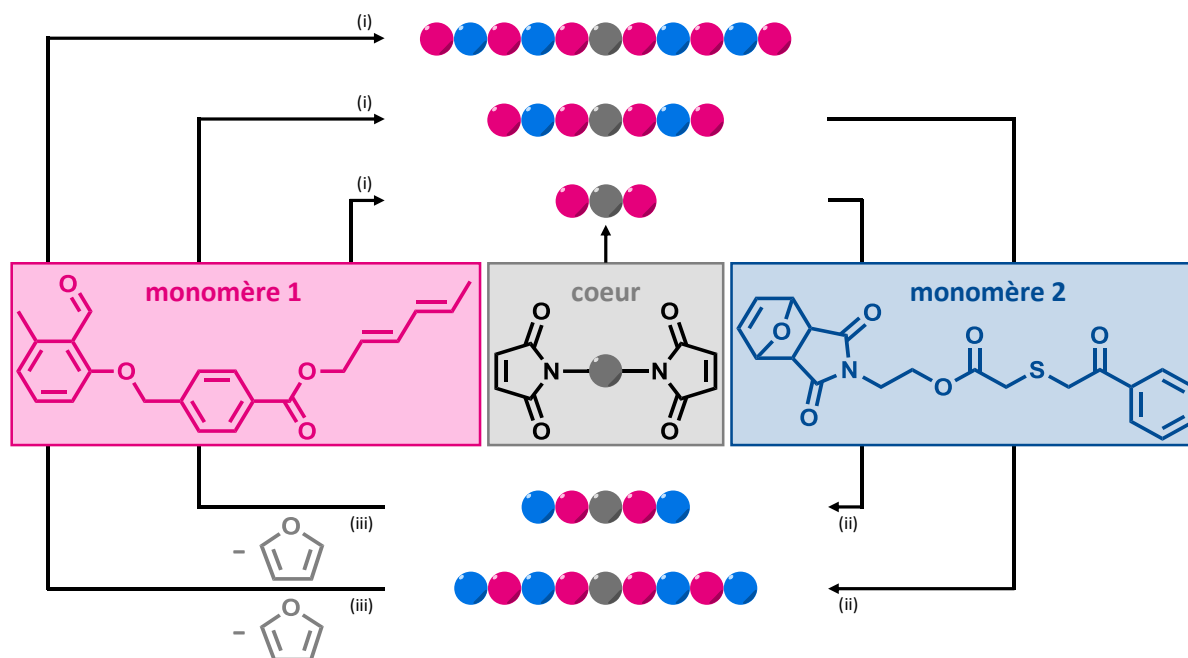


Figure I.33. Stratégie pour la synthèse de décimères alternés par des réactions de Diels-Alder photo-induites.^[402] (i) et (ii) Ajouts des monomères 1 et 2. (iii) Déprotection des maléimides terminaux.

Plus récemment, la synthèse de polymères à séquences contrôlées par la température a été rapportée en utilisant la réaction rétro-Diels-Alder.^[404] L'approche est élégante : une chaîne de

polystyrène est synthétisée par ATRP à 40°C en présence d'un second monomère dont une fonction maléimide est protégée par un furane. Lorsque la température est volontairement augmentée à 110°C, le maléimide est déprotégé en suivant un schéma de rétro-Diels-Alder et le second monomère s'intègre dans la chaîne pour former des segments hétérogènes. En contrôlant simplement les cycles de températures, l'insertion des maléimides et donc la structure de la chaîne sont contrôlées. Cette approche est similaire à celle utilisée pour la mono-insertion de maléimides N-substitués présentée précédemment (voir I.3.2), seulement le contrôle cinétique^[189, 190] fait place à un contrôle par la température.

6. Séquençage et applications des polymères à séquences définies

6.1. Les techniques de séquençage des polymères à séquences définies

Il est clair que d'énormes progrès ont été réalisés ces dernières décennies quant aux techniques de synthèse de polymères à séquence définies, fonctionnels ou contenant de l'information. C'est également le cas dans le domaine du séquençage de ceux-ci, c'est-à-dire la lecture de la séquence synthétisée.^[9] Annoncée en 2001, la réalisation de la cartographie complète du génome humain^[405, 406] est un tournant dans le domaine de la génomique, de même que le projet ENCODE,^[407] qui vise à lister tous les ingrédients nécessaires dans ce génome pour la construction de tous les types de cellules du corps humain. Ces études pourraient influencer et révolutionner la recherche et les technologies du 21^{ème} siècle.^[408] En fait, c'est depuis les premières découvertes sur les structures des biomacromolécules dans les années 1940 que persiste ce besoin de déchiffrer les séquences qu'elles contiennent. Et des techniques historiques qui ont été développées pour la lecture du code de l'ADN ou de la structure primaire des protéines sont nées des méthodes plus modernes qui permettent aujourd'hui ces révolutions dans la génomique, mais aussi le séquençage des nouvelles générations de polymères à séquences définies synthétiques, dont les structures sont parfois aussi complexes que les biopolymères, réduisant ainsi la frontière entre les disciplines.^[9]

6.1.1. Les techniques historiques pour le séquençage basées sur les biopolymères

Les premières études sur les structures primaires des polymères s'appliquant en très grande partie aux biomacromolécules, les premières techniques de séquençage apparues à la fin des années 1940 concernent logiquement celles-ci. Pehr Edman^[409] et Frederick Sanger^[410] (qui obtient le prix Nobel de Chimie pour ces travaux en 1958) présentent au début des années 1950 des méthodes pour séquencer des peptides. Dans les deux cas, le système repose sur des modifications des fins de chaînes qui sont ensuite soumises à un clivage acide. La terminaison aminée est modifiée avec un marqueur identifiable qui facilite le séquençage. Chez Sanger, le clivage mène à une fragmentation et l'analyse des fragments permet de reconstruire la séquence alors que chez Edman, seul le premier acide aminé (celui relié au marqueur) est détaché et analysé : le procédé est donc répété jusqu'à déchiffrer toute la séquence. Pour les deux méthodes, des progrès significatifs ont été fait surtout au niveau des techniques d'analyse à disposition pour les fragments, et notamment la spectrométrie de masse.^[411-415] Par la suite, Sanger s'oriente vers le séquençage de l'ADN en utilisant un complexe enzymatique présent dans la répllication de l'ADN, l'ADN polymérase^[416, 417] (il obtient pour ces travaux un second prix Nobel de Chimie en 1980 avec Walter Gilbert qui développe au même moment une autre méthode qui repose sur la dégradation chimique sélective du brin^[418]). L'ADN polymérase permet de créer des copies incomplètes de la séquence. Quatre synthèses ont lieu en parallèle pour lesquelles à chaque

fois l'un des nucléotides incorporés est marqué et donc reconnaissable lorsqu'il est inséré sur la chaîne selon le template. Chacune des quatre synthèses donne donc les positions de l'une des quatre bases, et en combinant le tout, la séquence est retrouvée. La *méthode de Sanger* domine le domaine du séquençage de l'ADN pendant de nombreuses années. Mais, peu fiable pour des chaînes longues, elle est renforcée par le développement d'inhibiteurs de fin de chaîne^[419] puis par leur marquage par fluorescence.^[420]

Ces dernières décennies, de nouvelles techniques sont investiguées pour rendre le séquençage des biopolymères possible.^[421] En particulier, l'intérêt est porté sur des méthodes non destructrices. Dans les années 1990, Kasianowicz montre expérimentalement qu'un brin d'ADN peut être conduit à travers un nanopore biologique (en l'occurrence, un nanopore de protéine, l' α -hemolysine) intégré à une bicouche de lipide. Celle-ci a un rôle de membrane qui sépare deux milieux. Un courant électrique induit un mouvement des espèces ioniques d'un milieu à un autre en passant par le seul chemin disponible : le nanopore. Lorsqu'il passe dans ce nanopore, le brin d'ADN analysé provoque un blocage du courant dans le conduit (Figure 1.34).^[422] Il est ensuite observé que des homopolymères et copolymères d'ADN ou d'ARN peuvent être différenciés par le nanopore en comparant par exemple l'amplitude du blocage du courant.^[423] Chaque base de la séquence interagit différemment avec le nanopore, ce qui induit un blocage caractéristique du courant. Elle peut ainsi être distinguée, et la séquence déchiffrée.^[424] Par la suite des nanopores synthétiques sont essayés pour remplacer les nanopores de protéines, avec un certain succès qui amène une potentielle versatilité dans les structures et de fonctionnalités de nanopores possibles pour ces études.^[13, 425-427]

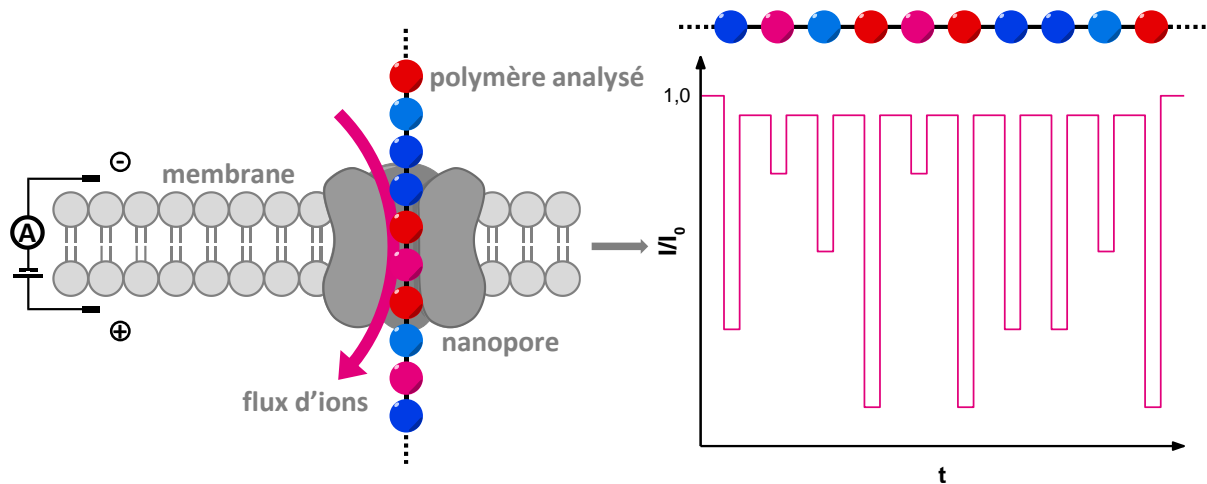


Figure 1.34. Séquençage d'un brin d'ADN grâce à un nanopore.^[9] Le courant est bloqué au passage de chaque base créant des événements caractéristiques qui permettent de remonter à la séquence du brin étudié.

6.1.2. Des nouvelles techniques de séquençage adaptées aux polymères synthétiques

Du côté des polymères synthétiques, certaines techniques d'analyse, comme la chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour *size-exclusion chromatography*), ne sont réellement utiles que pour déterminer la polymolécularité et la masse moléculaire moyenne des chaînes synthétisées. Le séquençage des polymères à séquences contrôlées synthétiques requiert donc le développement d'autres outils de caractérisation plus précis. Evidemment, des techniques basées sur la dégradation contrôlée des macromolécules comme c'est le cas dans les méthodes de Edman et de Gilbert pour les biopolymères peuvent être adaptées aux polymères synthétiques. Différentes méthodes comme les dégradations oxydatives, enzymatiques, hydrolytique ou thermiques ont été

examinées pour l'analyse de séquences.^[428-431] D'autres méthodes connaissent ensuite leur avènement.

Par exemple, la spectroscopie RMN donne des résultats satisfaisants pour des structures et des tacticités de copolymères.^[432, 433] Les analyses en RMN ^1H , ^{13}C et en deux dimensions, basées sur le principe que la résonance de chaque unité monomère est basée sur l'influence de ses unités voisines^[434, 435] permettent de recouvrer des structures relativement simples comme des copolymères statistiques, à blocs, gradients ou alternés, mais pas forcément des structures primaires plus complexes.^[9] Les analyses RMN permettent cependant de procéder à un suivi d'incorporation d'unités monomères au cours d'une polymérisation, comme cela est le cas pour les maléimides dans une chaîne polystyrène dans le groupe de Lutz.^[189-191, 198, 203] Par ailleurs, Colquhoun parvient, lui, à analyser des polyimides à l'aide de ce qu'il appelle des pinces moléculaires.^[436] Les interactions entre celles-ci et les unités de la séquence provoquent un déplacement du signal de l'imide qui peut donc être intégré et analysé. Ces techniques restent en revanche limitées à des microstructures localisées ou à des chaînes courtes.

Une analyse complémentaire peut cependant aider à retrouver la position sur une chaîne copolymère plus longue des microstructures étudiées grâce à l'effet Kerr.^[9] Consistant en une mesure en solution diluée de la biréfringence du polymère sous un champ électrique extérieur, cette technique mène, avec le coefficient de Kerr obtenu, qui dépend de la polarisabilité globale de la chaîne, à la microstructure totale de séquence. Cette méthode a permis à l'équipe de Tonelli de séquencer différents copolymères de styrènes d'abord,^[437] puis d'autres structures chimiques depuis.^[438]

La technique des nanopores est également adaptée à l'analyse de polymères synthétiques, ioniques ou non. Le groupe de Kasianowicz parvient à différencier des chaînes PEG de différentes tailles en 1996 par exemple, toujours en observant la différence d'amplitude et de durée des événements de blocage créés par les chaînes courtes ou longues.^[439-441] Depuis, l'équipe de Jan C. Behrends travaille à affiner ces analyses en haute résolution en étudiant des mélanges de PEG avec des distributions de tailles toujours plus resserrées,^[14, 442] en jouant sur les conditions d'analyses notamment. Leur intérêt est désormais porté sur les événements rencontrés dans les nanopores avec des polymères de précision et des polymères à séquences définies.^[443, 444]

Pour ceux-là, une autre méthode est déjà utilisée. Les progrès colossaux des années 1980 sur les techniques d'analyse par spectrométrie de masse ont permis d'accéder à une caractérisation rapide des protéines et cette voie est depuis étudiée pour les polymères synthétiques. L'électrospray ou la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI pour *matrix assisted laser desorption ionisation*) couplés à une analyse de temps de vol (TOF pour *time of flight*) permettent d'obtenir de bonne résolution pour l'analyse de copolymères.^[445] Ces techniques sont, de plus, assez douces pour permettre un séquençage de structures plus complexes par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).^[446] Plusieurs étapes d'analyse de masse sont utilisées dans cette technique. Après une première analyse en masse, l'ion d'intérêt pour l'étude, qui n'est pas encore fragmenté puisque les conditions d'ionisation sont douces, est isolé grâce à un analyseur quadripolaire puis fragmenté dans une cellule de collision par un gaz inerte, avant d'être à nouveau analysé par un spectromètre de masse à temps de vol (Figure I.35). Dans le cas où la structure du polymère présente des liaisons faibles, il est possible de prévoir le chemin de fragmentation de celui-ci. Il est alors aisé d'identifier les fragments observés sur le spectre de masse et de reconstruire la séquence du polymère. Cette méthode a par exemple été utilisée par Zuckerman pour identifier la structure primaire de ses peptoïdes,^[447] mais

aussi plus récemment par le groupe de Laurence Charles en collaboration avec Jean-François Lutz pour séquencer des polymères à séquences définies encodés numériquement de différentes structures, comme des polyphosphates,^[267] des poly(phosphodiester)s,^[269, 309, 448] des poly(alcoxyamine phosphodiester)s,^[449] des poly(alcoxyamine amide)s,^[306-308, 450] des poly(triazole amide)s^[12, 346, 449] ou de polyuréthanes.^[273, 451-453] Un logiciel informatique est même développé afin d'obtenir en quelques millisecondes seulement le code de la séquence d'un polymère à partir de ses spectres de masse en tandem.^[454]

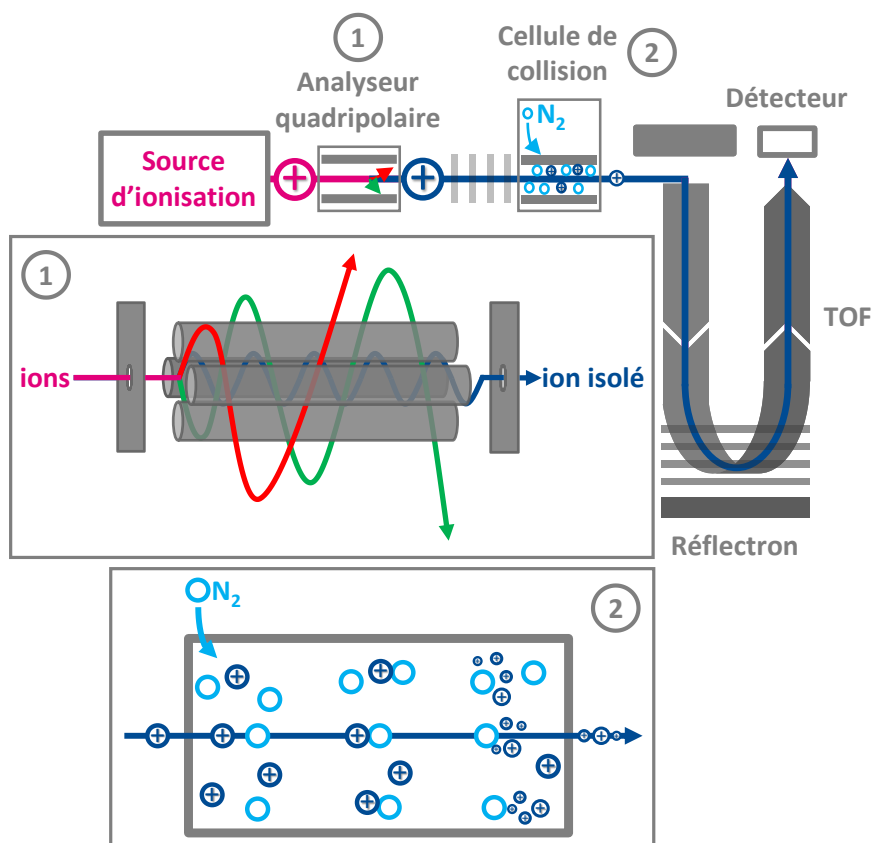


Figure I.35. Représentation schématique des éléments principaux d'un spectromètre de masse pour analyse en tandem.

6.2. Les applications pour les polymères à séquences définies

Alors que les approches et les outils pour la synthèse de polymères à séquences contrôlées ne cessent de s'améliorer et qu'il est de plus en plus facile de construire les structures et architectures souhaitées, les applications, souvent basées sur les propriétés macroscopiques obtenues grâce à ce contrôle de la microstructure, sont elles aussi en pleine croissance.^[455] La régulation de la séquence peut être utile pour apporter certaines propriétés macroscopiques à un matériau, que ce soit sur le plan mécanique, optique, de la gélification, de la conductivité ou de la dégradabilité par exemple.^[2, 6, 7]

Au niveau nanoscopique, les avancées sont également très intéressantes. Même si depuis longtemps, l'étude de l'auto-assemblage des polymères était limité aux copolymères à blocs,^[456] qui donnent néanmoins lieu à des nanostructures complexes très intéressantes, il est important de noter que ces morphologies obtenues avec les copolymères à blocs sont bien moins contrôlées que celles qui peuvent être atteintes par les biopolymères à séquences définies, tels que les protéines par exemple.^[457, 458] En effet, leur structure primaire influence leur repliement et leur assemblage dans des structures secondaires, tertiaires et quaternaires très précises (voir I.2.2.1). Il est possible de faire le

même constat avec les polynucléotides dont l'hybridation mène à la formation de double-hélices stables (voir I.2.1.1.1). Ces dernières années, ces principes d'auto-assemblage naturels ont été transmis au domaine de la science des matériaux à travers la création de bioconjugués notamment.^[85] L'association de chaînes polymères synthétiques à des segments polypeptidiques ou polynucléotidiques permet une organisation dans l'espace dans des morphologies utiles (voir I.2.2.4). Ces exemples ont ouvert la voie au développement de polymères à séquences définies entièrement non naturels présentant ces mêmes propriétés de repliement ou d'auto-assemblage,^[459-465] avec comme objectif bien souvent de réaliser des matériaux biocompatibles capables de servir de vecteurs dans l'organisme, voire bio-fonctionnels pour des applications dans le domaine médical par exemple.

Mais la définition parfaite de la structure primaire peut avoir une autre utilité : le stockage d'information. Après tout, c'est le rôle premier de l'ADN de contenir l'information génétique nécessaire à la vie sous la forme d'une séquence de nucléotides. Suivant cet exemple, un grand nombre de groupes se sont lancés dans le stockage d'information numérique au niveau moléculaire, avec pour objectifs principaux, le gain en densité de stockage et en durabilité.^[8] En premier lieu, c'est l'ADN qui est utilisé.^[466-471] En effet, en définissant que chaque base nucléique code pour un bit, à savoir soit un 0 (A et C, en général), soit un 1 (T et G, logiquement), voire pour deux bits (la densité d'information est alors doublée : A équivaut à 00, C à 01, T à 10 et G à 11 par exemple),^[472] il est possible d'écrire un message sur l'ADN en langage ASCII tout simplement en implémentant les monomères dans le bon ordre, à la bonne position. Une synthèse chimique est la plupart du temps utilisée, afin de pouvoir façonner les séquences comme désiré. Le groupe de George M. Church décrit notamment l'encodage sur des brins d'ADN d'un livre de 53 426 mots au format html, de 11 images au format JPG et d'un programme JavaScript,^[466] puis d'un film directement dans le génome d'une bactérie, qui se transmet ensuite par hérédité.^[473] Le code peut par la suite être facilement séquencé et donc lu grâce aux techniques présentées précédemment (voir I.6.1). L'ADN contenant l'information numérique présente l'avantage d'être stable à température ambiante mais il ne l'est pas forcément dans des conditions plus extrêmes, ou sur le plus long terme. C'est pourquoi le stockage d'information sur des polymères à séquences définies synthétiques est désormais largement étudié. Un grand nombre de structures ont déjà été décrites tout au long de ce chapitre.^[11, 266-269, 273, 306-309, 346] Les polymères contenant de l'information numérique sont étudiés pour plusieurs applications possibles, comme le stockage ponctuel de données (comme mémoire active),^[20, 474-476] le stockage de données sur le long terme (en tant que mémoire passive)^[468, 470, 477] ou encore une utilisation comme codes-barres moléculaires pour l'identification^[478] ou pour la lutte contre la contrefaçon.^[273, 308, 451, 452, 479]

7. Conclusions

En conclusion, ces dernières années, le domaine des polymères à séquences contrôlées est devenu un axe majeur de la science des polymères. De grands efforts de recherche ont été réalisés pour développer des méthodes et des outils permettant le contrôle de l'architecture de macromolécules et la régulation de la séquence des monomères de celles-ci, qu'elles soient naturelles ou synthétiques. Cet aspect montre d'ailleurs le lien étroit entre plusieurs disciplines dans ce domaine à travers les inspirations biologiques évidentes, mais aussi par les applications multiples et résolument ambitieuses que ce soit dans le domaine des biotechnologies encore un fois, des matériaux potentiellement, voire de l'informatique dans le cas des polymères à séquences définies contenant de l'information numérique. Une dimension est donc amplifiée par ce domaine d'étude au sein de la science des polymères : l'interdisciplinarité.

Les avancées ont été colossales et toutes les structures semblent maintenant accessibles. Quelques points restent néanmoins à améliorer, comme la longueur des chaînes atteinte (pour l'instant, des oligomères à séquences définies sont majoritairement obtenus, ce qui limite la quantité d'information qu'il est possible d'encoder), l'efficacité et la rapidité de certaines techniques, la stabilité de certains composés formés mais aussi des aspects plus dans l'air du temps tels que l'économie d'atomes et de solvants par exemple.

Le contrôle de la structure primaire des polymères synthétiques, qui a donc émergé assez récemment, permet d'atteindre une nouvelle génération de macromolécules et reste ainsi un sujet porteur de la science des polymères, très prometteur en termes de résultats et d'applications futures.

Chapitre II

Optimisation de la synthèse d'oligo(triazole amide)s à séquences définies

1. Introduction

Parmi les structures développées dans le domaine des polymères à séquences définies décrites dans le chapitre I, les poly(triazole amide)s sont des candidats prometteurs de par la connaissance maintenant assez poussée des différentes réactions mises en jeu pour leur synthèse. La liaison amide est en effet créée lors d'un couplage peptidique entre un acide carboxylique et une amine primaire tandis que le groupement triazole est le fruit d'une cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (CuAAC). Il est donc possible de réaliser leur synthèse avec une stratégie itérative supportée de type « AB+CD », ^[10] impliquant deux monomères porteurs de quatre fonctions orthogonales : un acide carboxylique, une amine primaire, un azoture et un alcyne. Cette méthode présente un avantage majeur par rapport à une approche de synthèse peptidique plus classique qui réside en la chimiosélectivité des réactions impliquées. En effet, cette dernière permet de se passer de tout un aspect de la chimie qui a longuement été développé pour la synthèse des polypeptides : la chimie de protection. Ainsi débarrassée d'étapes de protection et de déprotection, la synthèse des poly(triazole amide)s devient plus économe en termes de réactifs, mais aussi de temps.

Cette approche a donc fait l'objet ces dernières années d'une étude qui a mené au développement d'un protocole pour la synthèse d'oligomères encodés moléculairement. ^[8, 475] En effet, après une première série de synthèses d'oligomères en 2009 sur différents supports, solides ou solubles, ^[99] notre équipe montre, en 2014, la possibilité de synthétiser une bibliothèque de huit différentes « triades » (des oligomères contenant trois unités codant soit pour 0, soit pour 1, séparées par deux unités espaceurs) dont les séquences représentent tous les codes binaires possibles avec ce nombre d'unités codantes (Figure II.1). ^[11]

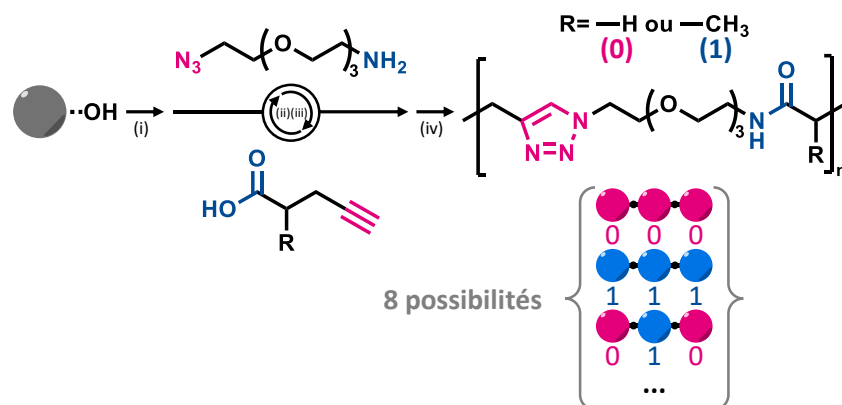


Figure II.1. Schéma général de la synthèse de triades de poly(triazole amide)s à séquences définies encodées moléculairement à partir d'une résine Wang. ^[11] (i) Estérification. (ii) CuAAC. (iii) Amidification. (iv) Étape de clivage.

L'équipe parvient ensuite, grâce à une stratégie différente, à synthétiser des chaînes plus longues, contenant un octet d'information, en préparant au préalable des oligomères porteurs de deux unités codantes. ^[346] Ainsi, grâce à une bibliothèque de quatre dyades, le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention d'une séquence plus longue est divisé par deux (Figure II.2).

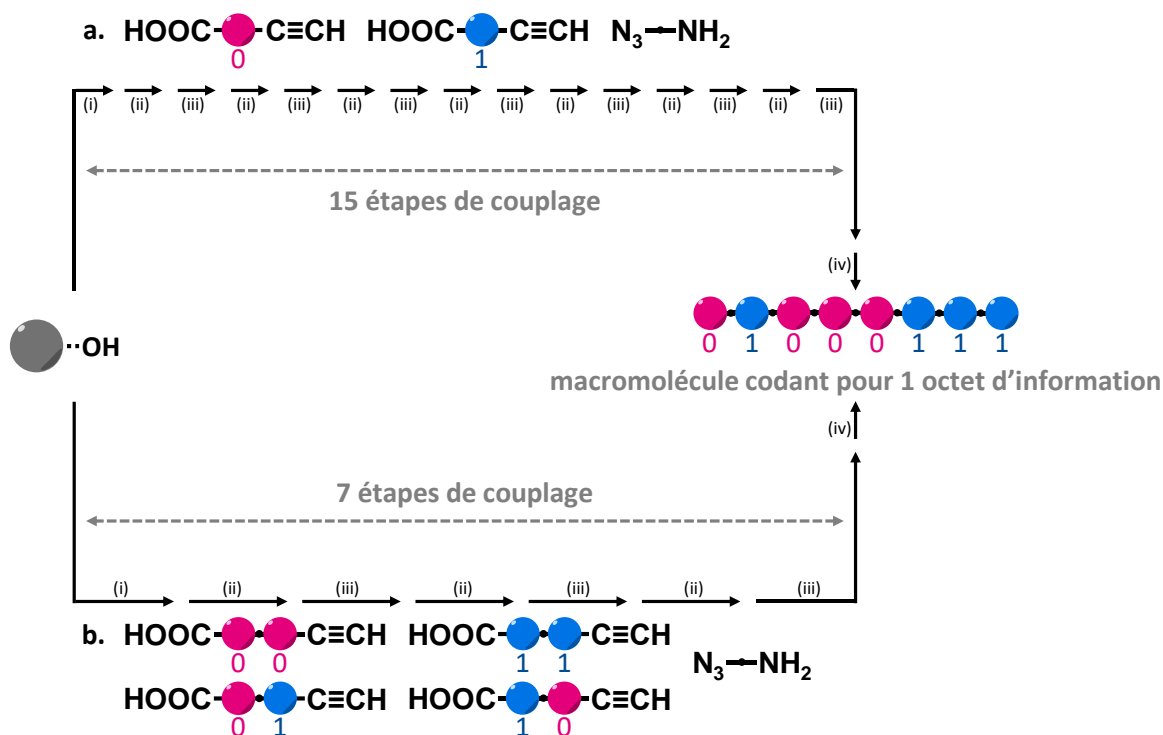


Figure II.2. Schéma général de la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies encodés moléculairement par ajouts successifs de monomères (a) ou par ligation de dyades (b).^[346] (i) Estérification. (ii) CuAAC. (iii) Amidification. (iv) Étape de clivage.

Ces études montrent que les conditions de synthèse de ces séquences d'oligo(triazole amide)s sont maîtrisées, mais en comparaison avec d'autres structures de polymères à séquences définies synthétiques faisant appel à d'autres chimies, ces conditions ne sont pas optimales. En effet, nombreuses sont les réactions de couplage qui ne demandent que quelques heures, comme c'est le cas pour les synthèses de polycarbamates,^[273] poly(alcoxyamine amide)s^[306] ou poly(alcoxyamine phosphodiester)s^[309] décrites dans le chapitre I, et même parfois quelques minutes, voire secondes pour être complètes, telles que celles utilisées dans la méthode phosphoramidite.^[266, 267] Dans le cas présenté cependant, l'étape de couplage acide carboxylique-amine est réalisée en 4h tandis que l'étape de cycloaddition alcyne-azoture nécessite 20h. Un cycle permettant d'ajouter une unité codante et un espaceur à la chaîne en croissance demande donc une journée complète de synthèse, et l'accès à une séquence codant pour un octet plus d'une semaine. De plus, dans le cas de la synthèse par ajouts successifs de monomères,^[11] l'obtention de chaînes uniformes demande parfois la répétition de certaines étapes, et notamment des couplages peptidiques, allongeant encore un peu plus la durée totale de la synthèse.

Une étude plus poussée des conditions de la synthèse itérative supportée des oligo(triazole amide)s contenant des séquences synthétiques par l'approche « AB+CD » exposée ci-avant, avec insertion de différents espaceurs et d'une variété de bouts de chaînes a donc été conduite dans le but d'optimiser cette synthèse (Figure II.3). C'est l'objet de ce chapitre II.

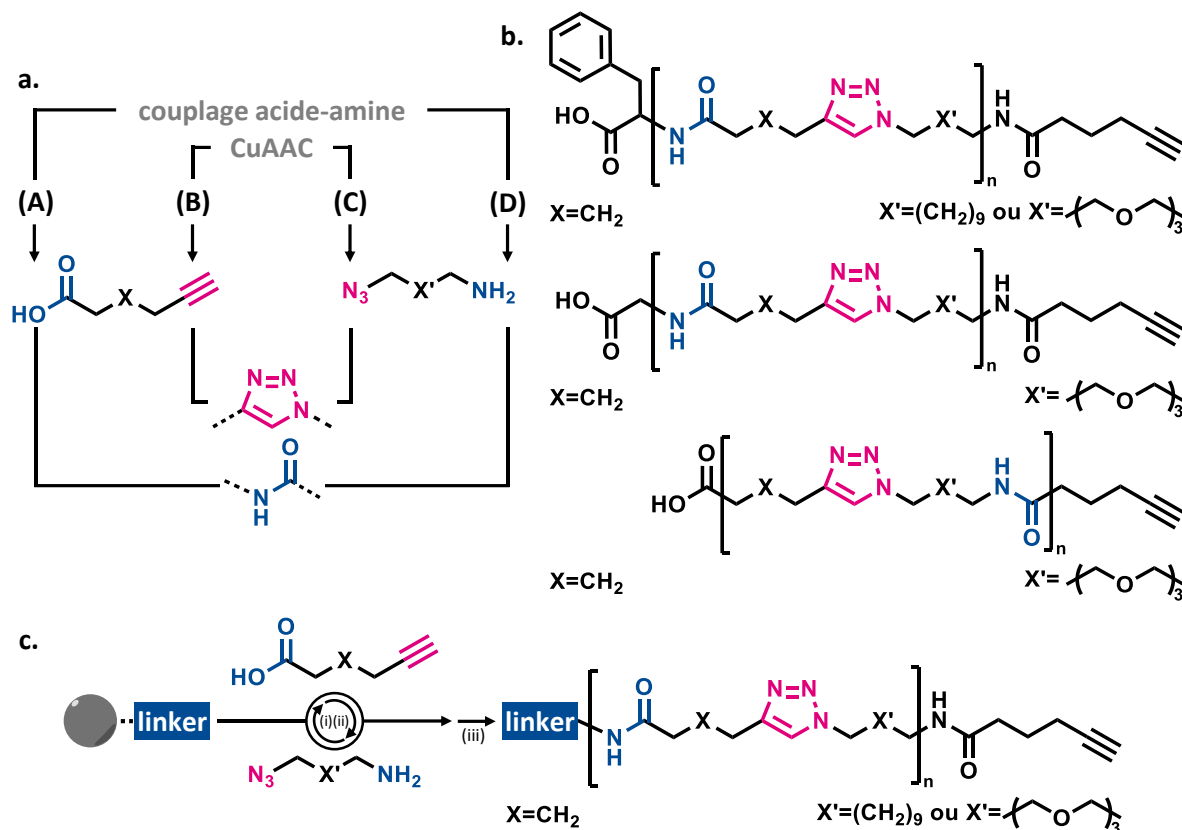


Figure II.3. Concept général de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques. a. Stratégie « AB+CD » étudiée pour la synthèse des poly(triazole amide)s. Cette approche nécessite l'emploi de deux monomères AB et CD contenant quatre fonctions orthogonales A, B, C et D. b. Structures des polymères synthétisés. c. Schéma général pour la synthèse itérative des polymères. (i) Amidification. (ii) CuAAC. (iii) Étape de clivage.

2. Synthèse itérative optimisée d'oligo(triazoles amide)s en phase solide

2.1. Stratégie générale

La synthèse d'oligo(triazole amide)s par voie itérative sur support solide telle que décrite précédemment fait donc intervenir deux monomères différents porteurs de quatre fonctions orthogonales. Dans les travaux présentés ici, le premier monomère AB, constituant l'unité dite « codante », porte les fonctions acide carboxylique (A) et alcyne (B) tandis que le second monomère CD, qui a un rôle d'espaceur, contient les fonctions azoture (C) et amine primaire (D). Ce dernier est utilisé comme unité intercalante entre les unités codantes et permet, par sa structure, d'aider à moduler les propriétés macroscopiques des oligomères obtenus. Dans un premier temps, c'est une structure des plus simples qui a été utilisée puisque le monomère sélectionné est le 11-azidoundecan-1-amine (E_1 , composé II-1), soit une chaîne alkyle relativement longue équipée des fonctions nécessaires. Cette structure a été pensée pour jouer un rôle réel de séparateur des unités codantes. Pour ce qui est du bloc AB, c'est l'acide 5-héxynoïque qui est utilisé pour l'unité 0, alors qu'il serait possible d'imaginer différentes structures dérivées de celui-ci pour l'unité 1.

Un élément majeur d'une synthèse supportée est bien évidemment le support choisi. Ici, il s'agit d'une résine Wang (voir Tableau I.2) fonctionnalisée au préalable par un acide aminé (en l'occurrence une phénylalanine) qui permet de présenter une fonction de bout de chaîne commode pour la suite de la synthèse : une amine primaire. La résine Wang utilisée a un taux de

fonctionnalisation relativement peu élevée afin d'empêcher au maximum les interactions entre les chaînes en croissance, au cours de celle-ci. En effet, une résine trop fonctionnalisée présenterait une densité très importante de chaînes en surface et il serait donc de plus en plus compliqué d'atteindre les sites réactifs à chaque couplage pour la synthèse de chaînes longues. L'ajout du linker phénylalanine se fait par une estérification entre l'acide carboxylique de celui-ci et le groupement hydroxyle final de la résine (Figure II.4). Afin de prévenir des possibles réactions secondaires, l'amine primaire de la phénylalanine est protégée par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc). L'estérification est réalisée dans des conditions classiques en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) et de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), et la réaction est répétée deux fois afin d'assurer un rendement, et donc un taux de fonctionnalisation, maximum. Cet acide aminé est préféré à d'autres pour lesquels la résine fonctionnalisée est disponible commercialement, comme la glycine, du fait de sa stabilité plus importante face aux acides. En effet, le faible encombrement de la glycine favorise une hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique (TFA) par exemple, utilisé au cours de la synthèse, qui mène à une fragmentation de l'oligomère et à une caractérisation moins facile de celui-ci (en spectrométrie de masse, des écarts de 57 Da peuvent être observés).^[480]

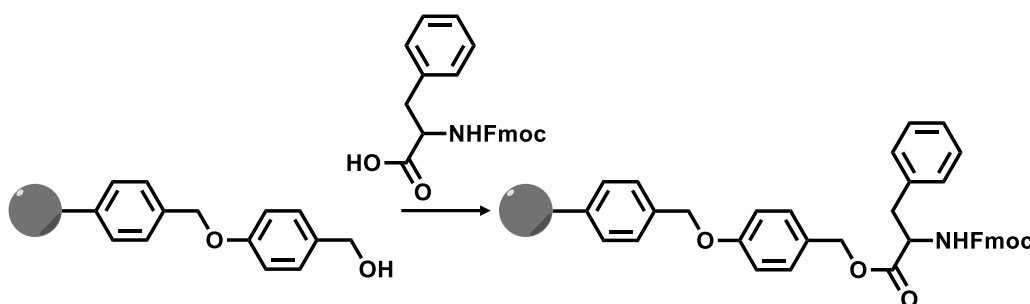


Figure II.4. Schéma de la fonctionnalisation de la résine Wang par une phénylalanine protégée par un groupement Fmoc.

La synthèse débute donc par une étape de déprotection de la résine, avec l'élimination du groupement Fmoc, qui libère l'amine primaire terminale à partir de laquelle la croissance des chaînes va être initiée (Figure II.5). Cette étape est réalisée en conditions basiques, à l'aide de pipéridine.

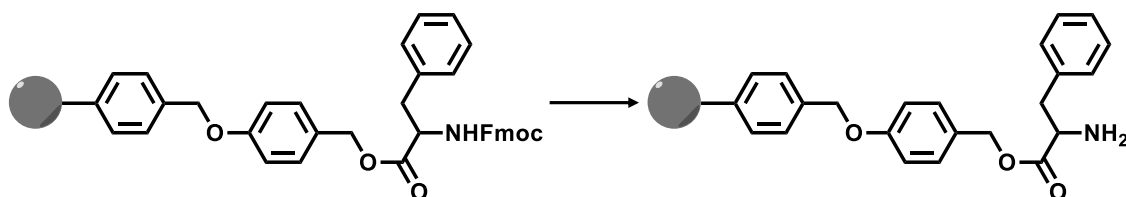


Figure II.5. Schéma de la déprotection de l'amine terminale de la résine Wang fonctionnalisée par une phénylalanine. Conditions : pipéridine dans le DMF (20%).

Le protocole itératif est alors entamé avec un premier ajout d'une unité AB. Le couplage entre l'amine primaire de la résine et l'acide carboxylique du monomère est effectué avec l'assistance d'agents de couplage, en présence d'une base, la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA). Les chaînes présentent alors des fonctions terminales alcynes, qui sont soumises à une cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (CuAAC) dans le but d'ajouter un bloc CD intercalant. Cette réaction est réalisée avec l'assistance de cuivre (I), amené dans ce cas par le bromure de cuivre (CuBr), associé à un ligand, ici, le 4,4'-dinonyl-2,2'-dipyridyl (dNbipy), sous atmosphère inerte, afin d'éviter que le cuivre (I) ne s'oxyde en cuivre (II) et perde ses propriétés de catalyseur. Ces deux étapes de couplage sont alors répétées à tour de rôle jusqu'à obtention du nombre d'unités et de la longueur de chaîne désirés

(Figure II.6). Les chaînes sont alors séparées de la résine lors d'une étape de clivage, en milieu acide (c'est le TFA qui est utilisé) qui consiste à casser une liaison covalente (en l'occurrence la liaison ester qui précède la phénylalanine). L'oligomère synthétisé est alors récupéré en solution et précipité.

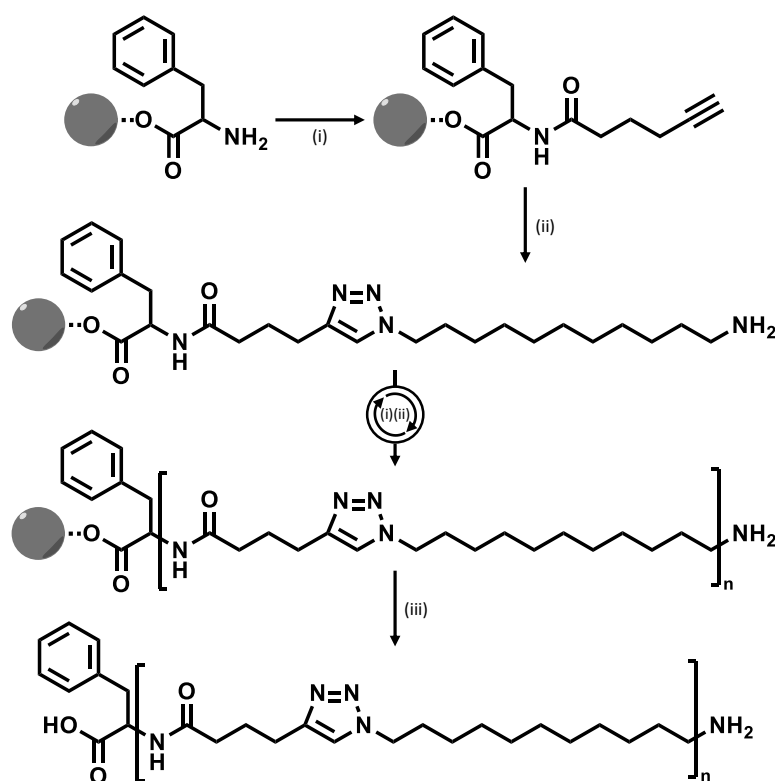


Figure II.6. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à partir d'une résine Phe-Wang. (i) Amidification : acide 5-héxynoïque (O), agents de couplage, DIPEA, DMF anhydre. (ii) CuAAC : 11-azidoundecan-1-amine (E₁), CuBr, dNbipy, DMF anhydre. (iii) Étape de clivage : TFA, DCM, 2h.

Cette stratégie, qui reprend les grandes lignes des synthèses présentées précédemment,^[11, 99] est destinée à l'amélioration des conditions de réactions, et notamment à la réduction des temps de chaque étape, d'où les quelques changements de réactifs.

2.2. Optimisations pour la synthèse des oligomères

2.2.1. Premiers essais : nécessité d'apporter des améliorations

Pour les premiers essais de synthèse, l'agent de couplage utilisé pour l'étape de formation de l'amide est l'héxafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium (COMU), réputé efficace dans la synthèse de polypeptides.^[83, 105] Chaque étape du cycle, couplage acide-amine comme cycloaddition alcyne-azoture, est alors laissée 1h à température ambiante. Les chaînes ciblées contiennent cinq unités* (trois unités codantes et deux unités intercalantes). Cependant, l'analyse en spectrométrie de masse montre de nombreuses impuretés (Figure II.7.a) malgré la présence en très faible abondance du produit désiré (composé II-2).

* Le terme « unité » utilisé dans cette thèse est à différencier des « unités répétitives » généralement discutées dans le domaine des polymères. Ici, chaque unité correspond à un monomère ajouté, que ce soit un monomère AB ou un monomère CD. En revanche, une unité répétitive est composée à la fois d'un monomère AB et d'un monomère CD. Ainsi, une chaîne de cinq unités est constituée de trois monomères AB et deux monomères CD, qui peuvent être assimilées à 2,5 unités répétitives comme la terminologie classique le suggère.

En particulier, des congénères de plus faibles masses (Figure II.7.c) ne contenant que deux (X_1), trois (X_2) ou quatre (X_3) unités au lieu de cinq sont majoritairement observés preuve que les conditions ne sont pas optimales pour obtenir des rendements complets à chaque étape. Le rendement global supérieur à 100% est également un indicateur de la présence de nombreuses impuretés.

Le doublement des temps de réactions (passage de 1h à 2h) ne donne pas de résultats significatifs et le spectre de masse correspondant (Figure II.7.b) a exactement la même allure pour le composé II-3.

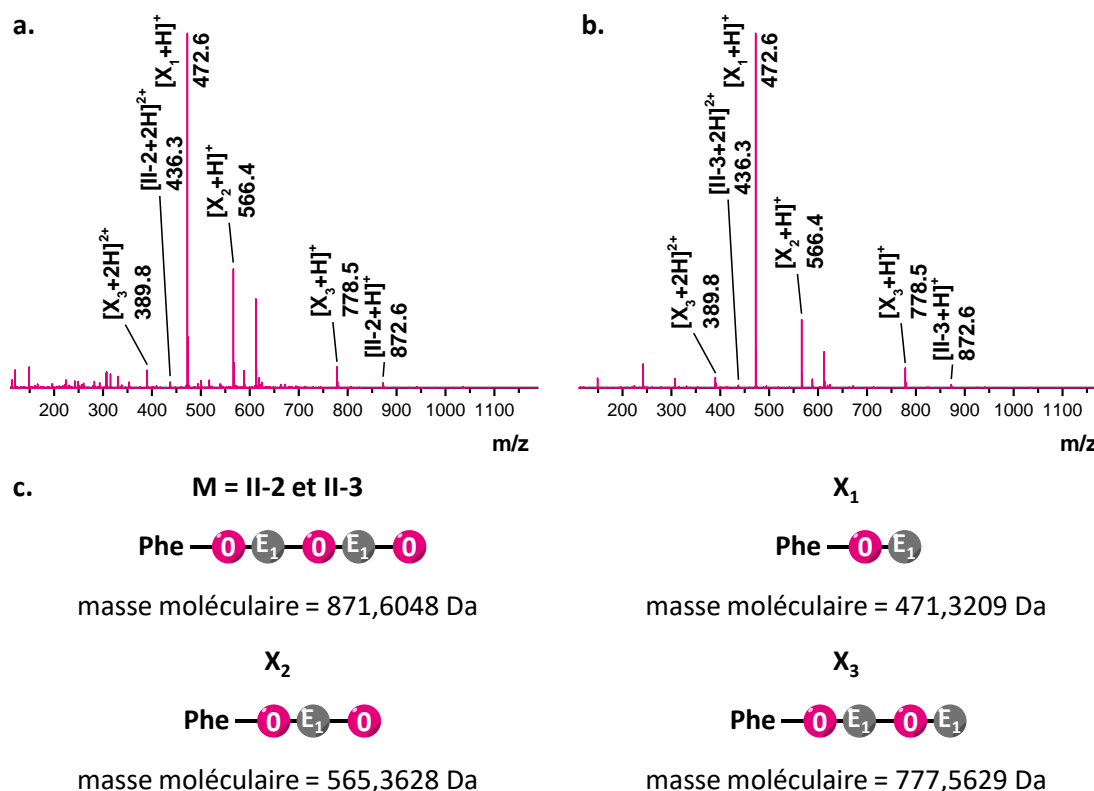


Figure II.7. Spectres ESI-HRMS des premiers essais pour la synthèse de poly(triazole amide)s (amidification avec COMU). a. Réactions laissées 1h à température ambiante (II-2). b. Réactions laissées 2h à température ambiante (II-3). c. Structures des différentes espèces observées.

Si ces premières synthèses présentent des points positifs, et notamment l'obtention, minoritairement, du produit désiré, plusieurs aspects restent à optimiser. En effet, les étapes de couplage acide carboxylique-amine, et dans une moindre mesure les cycloadditions alcyne-azoture, ne semblent pas toutes complètes. Des modifications des conditions de réactions, à commencer par les agents de couplage utilisés sont donc envisagées. De plus, quelques impuretés supplémentaires sont visibles, en témoignent les rendements globaux des synthèses, montrant la nécessité d'une étape finale de purification du produit.

2.2.2. Influence du chauffage par micro-ondes sur l'étape de couplage acide-amine

Les synthèses qui suivent font finalement intervenir un couple d'agents de couplage, à savoir un mélange de N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt).^[449] Même si les congénères de plus faibles masses sont en quantités moins importantes (un seul contre trois visibles précédemment), au moins l'une des étapes d'amidification n'a pas entièrement donné satisfaction (Figure II.8.a, composé II-4), comme le prouve le pic à 566,4 Da correspondant à une séquence

tronquée de deux étapes, soit une amidification puis une « click » (Figure II.8.d). En revanche, et assez étonnamment, les réactions « clicks » semblent cette fois-ci complètes, sans que les conditions n'aient été changées.

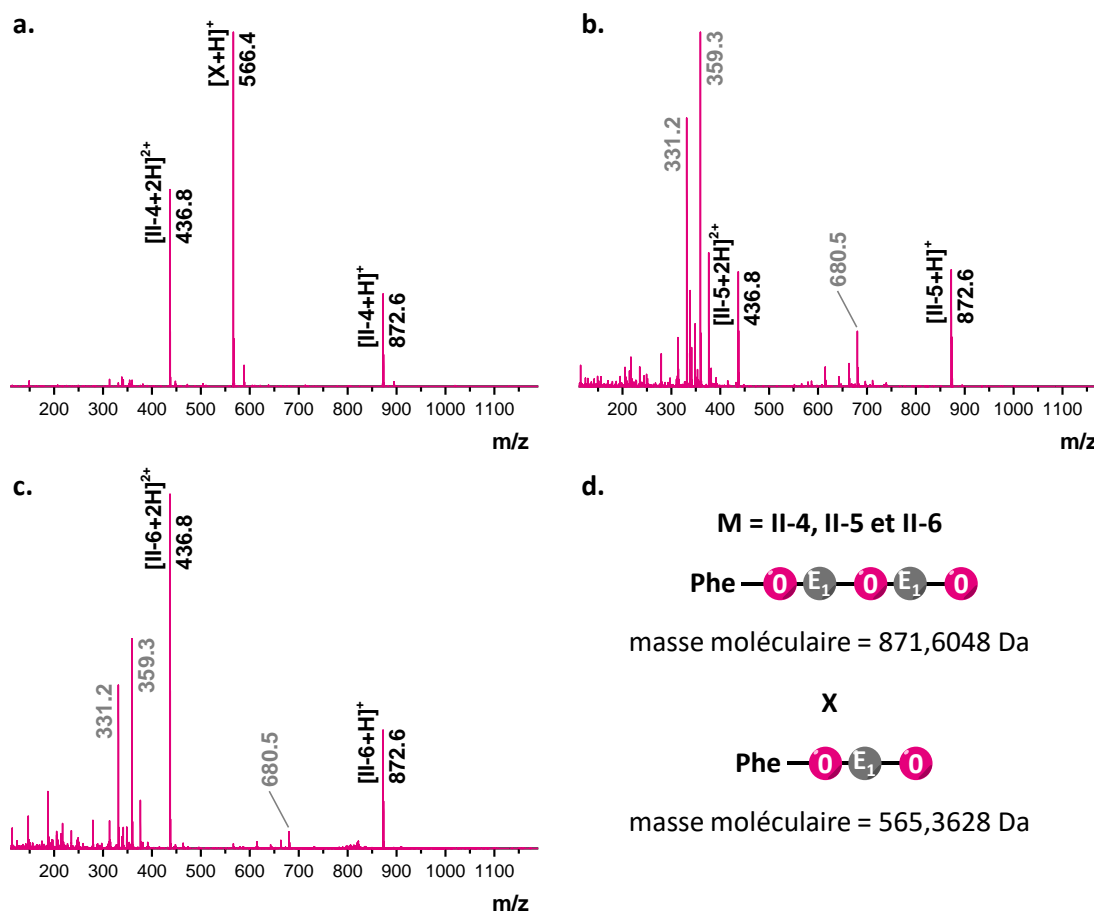


Figure II.8. Spectres ESI-HRMS des essais avec chauffage au micro-onde pour la synthèse de poly(triazole amide)s. Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. a. Amidification à température ambiante (II-4). b. Amidification à 60°C au micro-onde (II-5). c. Amidification à 40°C au micro-onde (II-6). d. Structures des différentes espèces observées.

Ces derniers problèmes observés sont résolus grâce à l'instauration d'un chauffage lors de l'étape de couplage concernées, à savoir l'amidification. En effet, grâce à une chauffe à hauteur de 60°C pendant les deux heures de réaction, le pic à 566,4 Da disparaît complètement ne laissant plus que l'oligomère visé II-5 seul (Tableau II.1), présent sous ses formes protonée et doublement protonée (Figure II.8.b). Un essai est même réalisé à 40°C (composé II-6), et le spectre de masse présente la même allure (Figure II.8.c), suggérant que cette température est suffisante pour compléter la réaction en deux heures.

Échantillon	Conditions de couplage	Masse [M+H] ⁺	
		m/z _{th}	m/z _{exp}
II-4	Température ambiante	872,6120	872,6116
II-6	40°C aux micro-ondes	872,6120	872,6099

Tableau II.1. Masses mesurées pour les oligomères II-4 (amidification à température ambiante) et II-6 (amidification à 40°C au micro-onde).

Les structures des différents produits sont confirmées par une analyse en spectrométrie de masse en tandem (Figure II.9). Les masses des fragments des ions analysés permettent en effet de

reconstruire les séquences des produits et sous-produits observés (voir I.6.1.2), à savoir O-E₁-O-E₁-O pour l'oligomère ciblé, O-E₁-O pour son congénère de masse inférieur (O correspondant à l'unité codant pour le bit 0 et E₁ dénotant l'unité intercalaire). Il est, en outre, possible de repérer un chemin de fragmentation préférentiel pour ces structures, puisque seules deux séries de fragments sont visibles sur ces spectres, correspondant à la rupture d'une seule et même liaison, la liaison amide.

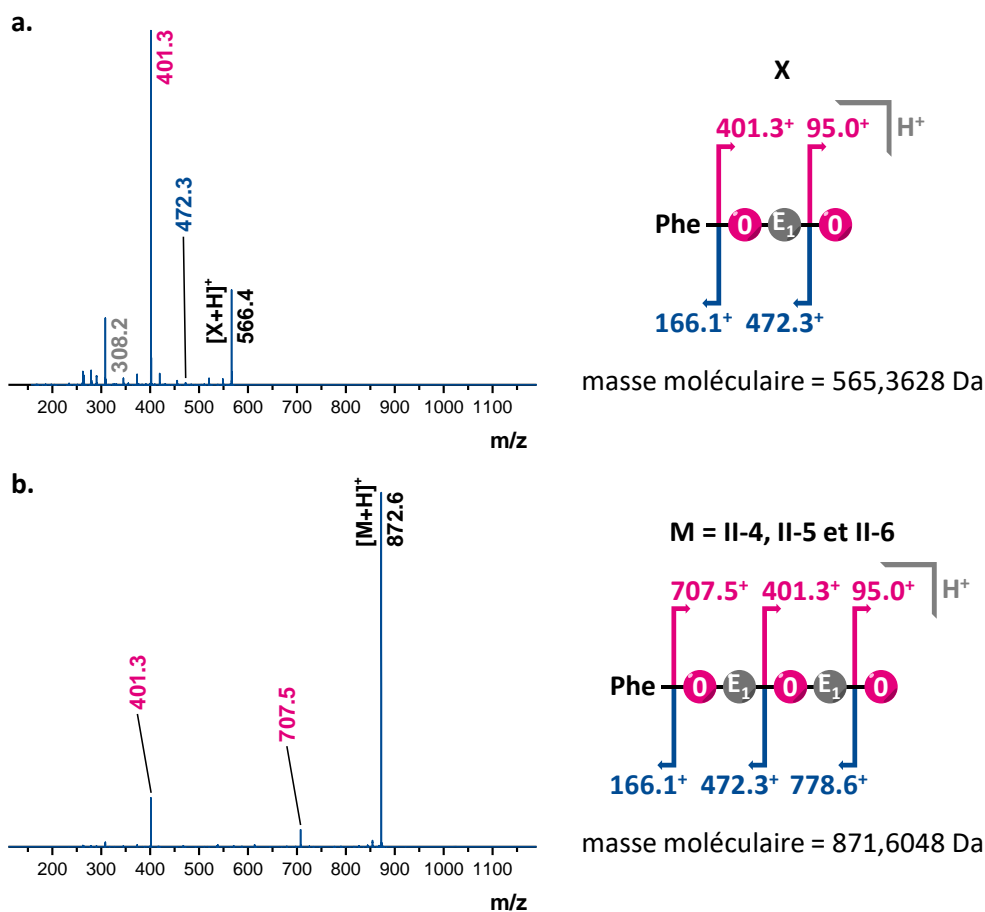


Figure II.9. Spectres de masse en tandem des ions de m/z 566,4 Da (a) et 872,6 Da (b) observés dans les échantillons II-4, II-5 et II-6. Les pics annotés en gris correspondent à des fragments internes.

L'utilisation des micro-ondes permet un chauffage homogène et efficace du milieu réactionnel, contrairement à un chauffage par des méthodes conventionnelles qui chauffe d'abord l'extérieur du réacteur avant d'atteindre le cœur de celui-ci (Figure II.10). Ces résultats permettent donc de valider l'emploi des micro-ondes à 40°C pour les étapes de couplage acide carboxylique-amine primaire.

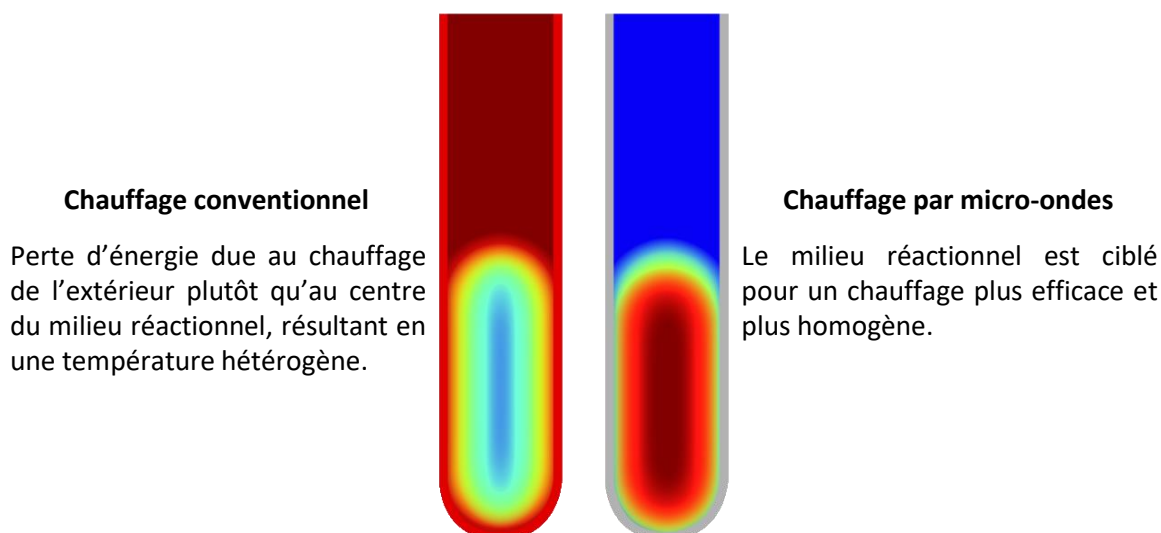


Figure II.10. Principe du chauffage par micro-ondes. Les teintes bleues réfèrent à des températures basses tandis que les teintes rouges dénotent des températures élevées.

2.2.3. Réduction des temps de réactions

La réussite de la synthèse grâce à l'apport du chauffage par micro-ondes pousse à essayer d'améliorer encore un peu plus les conditions des réactions en essayant de diminuer la durée de celles-ci.

Ainsi, un essai est réalisé au cours duquel les étapes d'amidification ne sont laissées à 40°C qu'une heure au lieu de deux. La spectrométrie de masse montre que ce temps réduit de réaction n'est pas suffisant pour que cette dernière soit complète, le composé X de masse 565,3 refaisant son apparition au travers d'un pic à 566,3 Da (Figure II.11.a). L'oligomère II-7 souhaité est tout de même toujours visible sous ses deux formes protonée et doublement protonée (Tableau II.2).

Échantillon	Conditions de synthèse	Masse [M+H] ⁺	
		m/z _{th}	m/z _{exp}
II-7	Amidification 1h	872,6120	872,6117
II-8	CuAAC 1h	872,6120	872,6136

Tableau II.2. Masses mesurées pour les oligomères II-7 (amidification pendant 1h) et II-8 (CuAAC pendant 1h).

De la même manière, une expérience a été conduite en réduisant le temps de réaction de la cycloaddition alcyne-azoture de moitié, la faisant donc durer une heure au lieu de deux. Comme pour le couplage acide-amine, une impureté à laquelle il manque deux étapes fait son apparition. Même si le pic à 566,3 Da n'a qu'une faible intensité, sa présence prouve la dispersité de l'échantillon (Figure II.11.b, composé II-8).

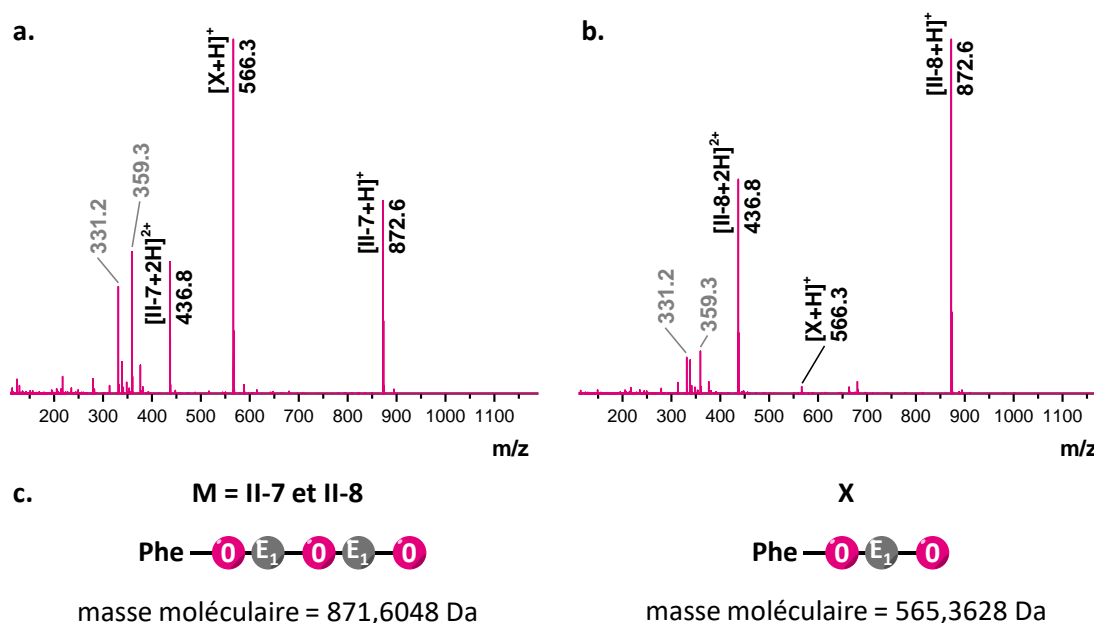


Figure II.11. Spectres ESI-HRMS des essais à temps réduits pour la synthèse de poly(triazole amide)s. Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. a. Amidification pendant 1h (II-7). b. CuAAC pendant 1h (II-8). c. Structures des différentes espèces observées.

Ces résultats montrent finalement la nécessité de conserver des temps de réaction de 2h pour les deux étapes impliquées dans les itérations de la synthèse des oligo(triazole amide)s. Même si la durée des cycles ne peut à priori pas être plus diminuée dans ces conditions, elle reste bien meilleure que celle des cycles des synthèses réalisées en 2009 et 2014,^[11,99] qui comptaient une étape de 20h et une autre de 4h.

2.2.4. Synthèse d'une chaîne plus longue

L'une des limitations qui peuvent être apportées par la synthèse sur support solide est l'impossibilité de synthétiser des chaînes relativement longues. En effet, lorsque les chaînes en croissance s'allongent, il est possible qu'elles s'entremêlent et que, à cause de l'encombrement qu'elles génèrent autour de la bille de résine, les fonctions terminales deviennent moins accessibles. Cela explique qu'après un certain nombre d'étapes de couplage, celles-ci puissent ne plus donner des rendements complets, induisant une dispersité des chaînes. Cette caractéristique étant particulièrement indésirable dans le cas de polymères à séquences définies, il est important de savoir s'il est possible de synthétiser des oligomères de masses un peu plus élevées que celles étudiées précédemment sans problème majeur. C'est pourquoi la synthèse d'une chaîne contenant non plus cinq, mais huit unités (quatre unités codantes et quatre espaceurs, composé II-9) est étudiée, afin d'observer si l'extension de l'oligomère ne présente pas de soucis de séquence tronquée notamment.

Échantillon	Masse $[M+2H]^{2+}$	
	m/z_{th}	m/z_{exp}
II-9	696,0307	696,0312

Tableau II.3. Masse mesurée pour la synthèse d'une chaîne plus longue (II-9).

Le spectre de masse de cet oligomère ne présente aucune anomalie (Figure II.12.a), attestant de l'uniformité de la chaîne. La structure du produit est même confirmée par l'analyse en

spectrométrie de masse en tandem (Figure II.12.b) du pic à 696.0 Da, correspondant à l'espèce II-9 doublement protonée (Tableau II.3). Les chemins de fragmentation observés sont les mêmes que précédemment, avec des ruptures au niveau des liaisons amides. Même si une chaîne de huit unités n'est pas encore d'une masse particulièrement élevée, cette étude montre que l'extension de la chaîne est potentiellement possible sans soucis majeur de rendement des dernières étapes de synthèse.

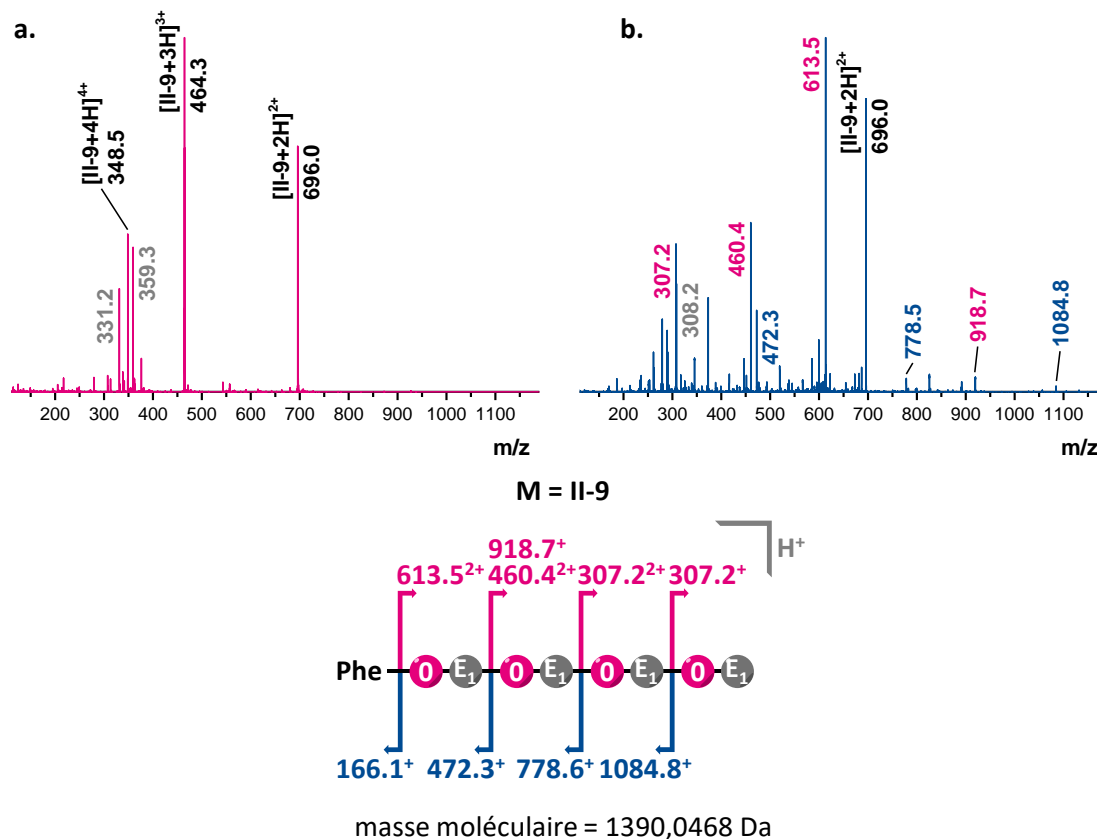


Figure II.12. Spectrométrie de masse pour la chaîne plus longue (II-9) de poly(triazole amide). a. Spectre ESI-HRMS. Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. b. Spectre de masse en tandem de l'ion de m/z 696,0 Da observé dans l'échantillon II-9. Les pics annotés en gris correspondent à des fragments internes.

Cependant, un problème subsiste pour une caractérisation plus poussée. En effet, la solubilité très faible dans la plupart des solvants ne permet pas, par exemple, d'analyser les composés synthétisés en chromatographie d'exclusion stérique par exemple.

3. Amélioration de la solubilité des composés synthétisés grâce à un nouvel espaceur

3.1. Stratégie générale

L'idée est alors de se rapprocher des structures qui étaient présentées dans les études précédentes, en remplaçant l'unité intercalante comprenant une chaîne alkyle par un espaceur contenant une chaîne PEG, qui est censée être plus hydrophile, et donc augmenter la solubilité des oligomères dans l'eau. Ainsi, le monomère AB utilisé précédemment, l'acide 5-héxynoïque (O), est conservé, mais le bloc CD, le 11-azidoundecan-1-amine (E_1), est remplacé par son homologue aux unités éthylène glycols, le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (E_2). En dehors de ce changement

d'espaceur, les conditions restent les mêmes pour les différentes étapes (Figure II.13). L'étape de couplage acide carboxylique-amine primaire se fait donc en 2h dans le DMF en présence de DIPEA et d'un mélange DIC/HOBt tandis que la CuAAC a lieu sous atmosphère inerte à température ambiante dans le DMF avec CuBr et dNbipy.

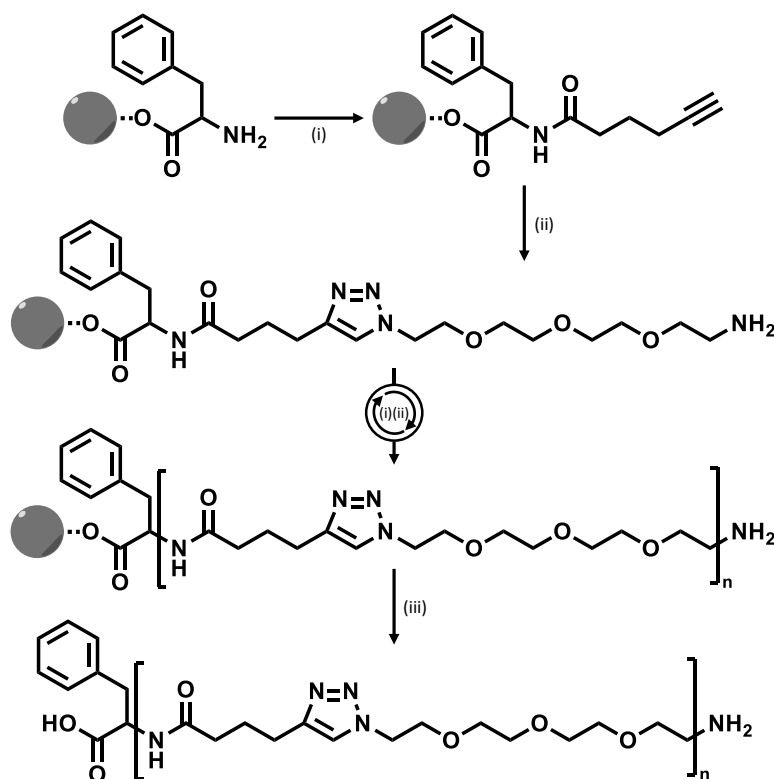


Figure II.13. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s à espaceurs PEG à partir d'une résine Phe-Wang. (i) Amidification : acide 5-héxynoïque (O), DIC, HOBt, DIPEA, DMF anhydre. (ii) CuAAC : 11-azido-3,6,9-trioxaundécane-1-amine (E_2), CuBr, dNbipy, DMF anhydre. (iii) Étape de clivage : TFA, DCM, 2h.

3.2. Synthèses d'oligomères

3.2.1. Nouvelles preuves de la nécessité de l'utilisation des micro-ondes

Deux chaînes de huit unités sont tout d'abord synthétisées. Dans le premier cas, les étapes d'amidification ont lieu à température ambiante (composé II-10) alors que dans le second cas, elles sont réalisées une nouvelle fois avec chauffage par les micro-ondes à 40°C (composé II-11).

Les résultats confirment la tendance décrite précédemment. En effet, la synthèse à température ambiante conduit à une forte dispersité des chaînes polymères due à la présence d'oligomères à séquences tronquées. En particulier, un pic à 551,7 Da sur le spectre ESI-HRMS de l'échantillon montre l'existence d'un oligomère X auquel il manque deux unités (Figure II.14.a). Cette observation est confirmée par l'analyse MS/MS réalisée sur cet ion (Figure II.14.c). Sur le spectre correspondant à la synthèse aux micro-ondes en revanche, même si ce pic ne disparaît pas, il est beaucoup moins présent (Figure II.14.b). C'est bien le produit ciblé (Tableau II.4, composé II-11), sous ses formes doublement protonée à 707,9 Da et triplement protonée à 472,3 Da, qui prédomine largement. L'analyse en masse en tandem du premier cité confirme la structure obtenue (Figure II.14.d). Un bémol subsiste : le pic parasite ne disparaît pas complètement, ce qui témoigne d'étapes incomplètes.

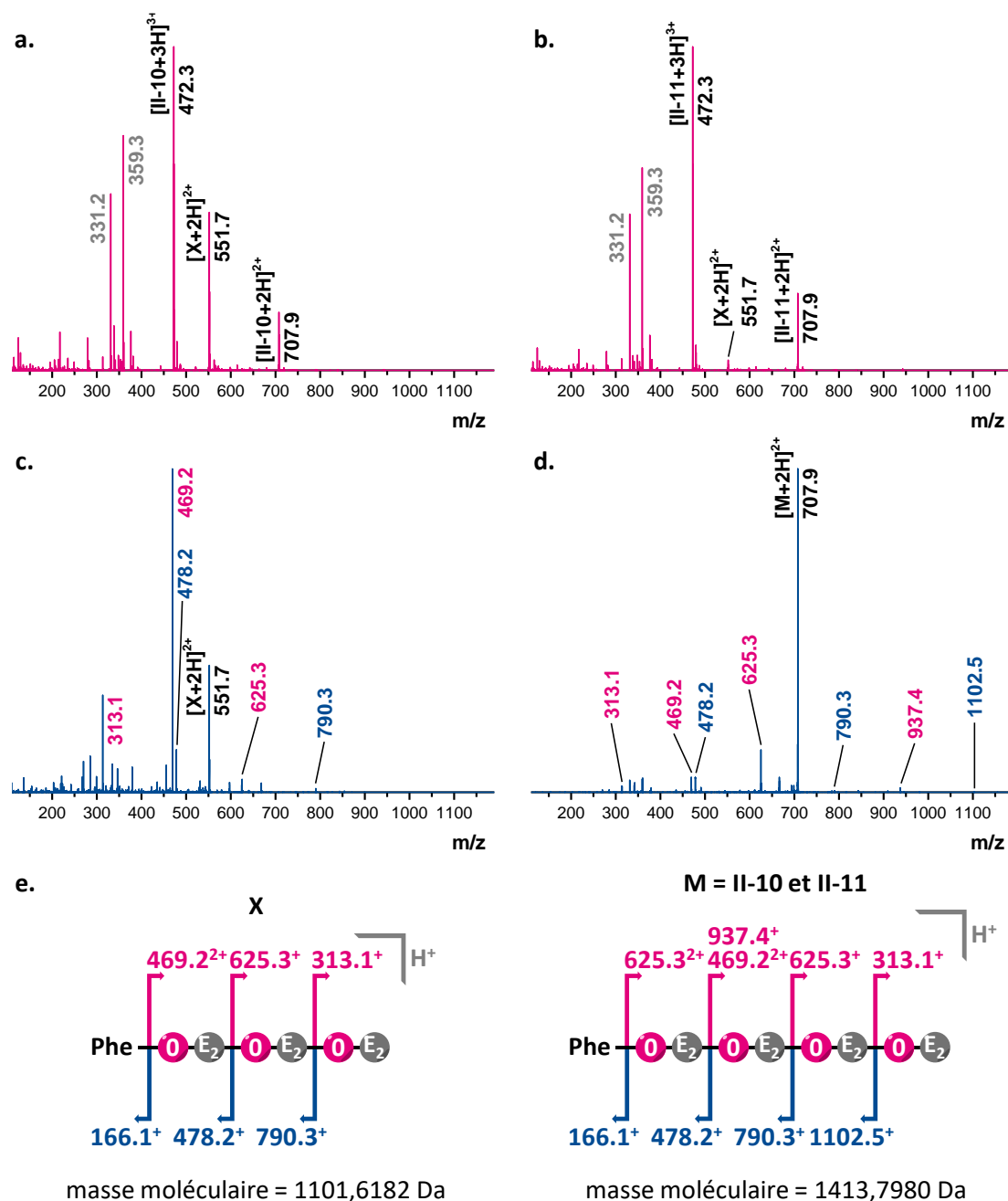


Figure II.14. Spectrométrie de masse pour les chaînes contenant les espaceurs PEG. a. Spectre ESI-HRMS de l'oligomère dont les amidifications sont effectuées à température ambiante (II-10). b. Spectre ESI-HRMS de l'oligomère dont les amidifications sont effectuées à 40°C au micro-onde (II-11). Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. c. Spectre de masse en tandem de l'ion de m/z 551,7 Da observé dans l'échantillon II-10. d. Spectre de masse en tandem de l'ion de m/z 707,9 Da observé dans l'échantillon II-11. Les pics annotés en gris correspondent à des fragments internes. e. Structures des différentes espèces observées.

Échantillon	Conditions de couplage	Masse $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	
		m/z_{th}	m/z_{exp}
II-11	40°C aux micro-ondes	707,9063	707,9063

Tableau II.4. Masse mesurée pour la synthèse d'une chaîne contenant des espaceurs PEG avec les amidifications effectuées au micro-onde (II-11).

L'objectif premier de ce changement de structure était le besoin d'améliorer la solubilité pour permettre une meilleure caractérisation, et notamment par chromatographie d'exclusion stérique,

afin de montrer l'uniformité des chaînes. Cependant, la solubilité du produit n'est pas significativement maximisée. De plus, la présence en bout de chaîne d'une amine primaire qui pourrait interagir fortement avec la colonne de l'appareil empêche une telle analyse. C'est pourquoi il est décidé d'une part de se limiter à des cycles menant à des oligomères avec un nombre impair d'unités, afin d'obtenir un alcyne terminal, et d'autre part de travailler désormais sur les débuts de chaînes qui pourraient aider avec le comportement en solution des oligomères.

3.2.2. Optimisation des bouts de chaînes dans le but d'améliorer la solubilité

Différentes séries d'oligomères sont donc synthétisées, terminant à chaque fois par un alcyne (Figure II.15). Pour chaque série, trois tailles de chaînes sont produites, contenant cinq, sept et neuf unités. Pour la première structure (composés II-12), la phénylalanine est conservée en tant que linker sur la résine, et donc en début de chaîne. Pour la deuxième série (composés II-13), celle-ci est remplacée par une glycine, un autre acide aminé de structure plus simple puisque par rapport à la phénylalanine, le groupement phényle est abandonné. Cependant, comme décrit précédemment (voir II.2.1), l'analyse d'oligomères présentant une glycine peut poser des problèmes, du fait de l'apparition de fragments due à l'hydrolyse acide de la glycine.^[480] La disponibilité d'une résine fonctionnalisée avec une glycine dans le commerce est en revanche un avantage majeur. Enfin, pour la troisième série d'oligomères synthétisés (composés II-14), aucun acide aminé n'est présent en début de chaîne. La synthèse a lieu directement sur une résine Wang dont la fonction finale est un groupement hydroxyle. La première étape de la synthèse n'est donc pas une amidification entre l'acide carboxylique du monomère et l'amine primaire de la résine mais une estérification entre l'acide carboxylique du monomère et l'alcool de la résine. Le cycle reprend ensuite son rythme classique en alternant CuAAC et amidifications.

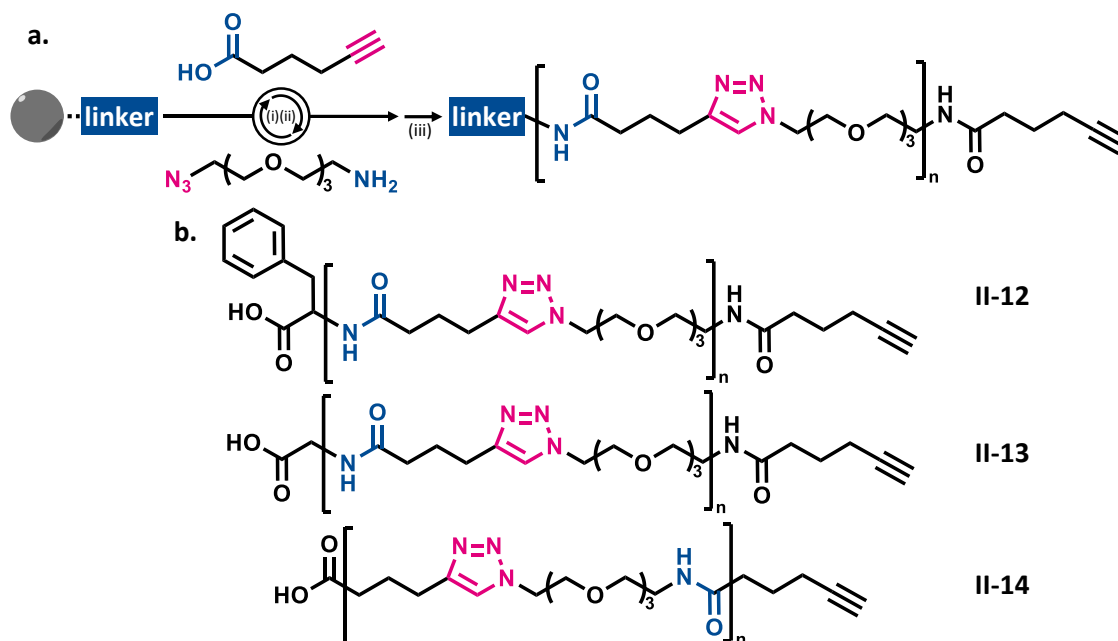


Figure II.15. Concept général pour le contrôle des bouts de chaînes des poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques. a. Schéma général pour la synthèse itérative des polymères. (i) Amidification. (ii) CuAAC. (iii) Étape de clivage. b. Structures des polymères synthétisés.

3.2.2.1. Une phénylalanine en début de chaîne

Dans le premier cas, le composé est synthétisé avec un linker phénylalanine. Contrairement aux résultats précédents, une forte dispersité est observée au fur et à mesure que les chaînes croissent. En effet, dès l'oligomère à cinq unités, le spectre ESI-HRMS montre que l'échantillon contient, comme le prouve le pic à 572,3 Da, un congénère X_1 de masse inférieure correspondant à un oligomère de trois unités (Figure II.16.a). Le produit visé II-12-5 est observé sous sa forme doublement protonée à 442,7 Da (Tableau II.5), à travers un pic de faible intensité. L'échantillon suivant présente les mêmes problèmes. L'oligomère à sept unités II-12-7 est à peine visible à 598,8 Da (Tableau II.5) alors que les impuretés, en l'occurrence l'oligomère à cinq unités X_2 et celui à trois unités X_1 , sont largement présents (Figure II.16.b). En ce qui concerne la séquence à neuf unités II-12-9 enfin, le scénario est le même. Le pic correspondant à celle-ci est à peine observable à 754,9 Da, alors que les impuretés, les séquences à sept (X_3), cinq (X_2) et trois unités (X_1), sont plus majoritaires (Figure II.16.c).

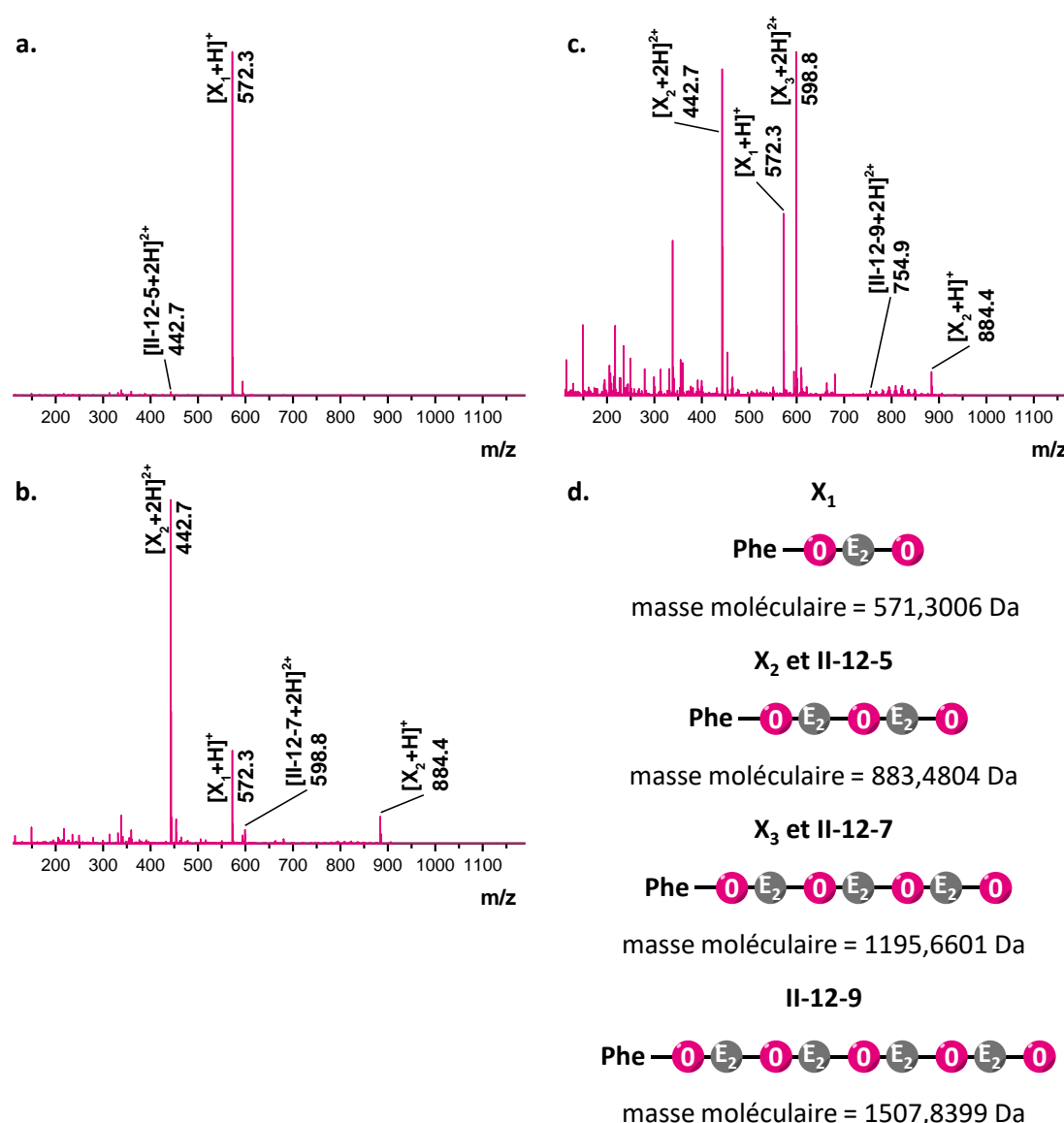


Figure II.16. Spectres ESI-HRMS des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale. Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. a. Oligomère clivé après cinq étapes (II-12-5). b. Oligomère clivé après sept étapes (II-12-7). c. Oligomère clivé après neuf étapes (II-12-9). d. Structures des différentes espèces observées.

Même si elle n'est toujours pas parfaite, la faible solubilité de ces trois échantillons permet, après filtration, de réaliser des analyses en chromatographie d'exclusion stérique. Les résultats confirment la tendance observée en spectrométrie de masse avec une dispersité (Tableau II.5) nettement visible (Figure II.17), preuve que la synthèse n'est pas au point.

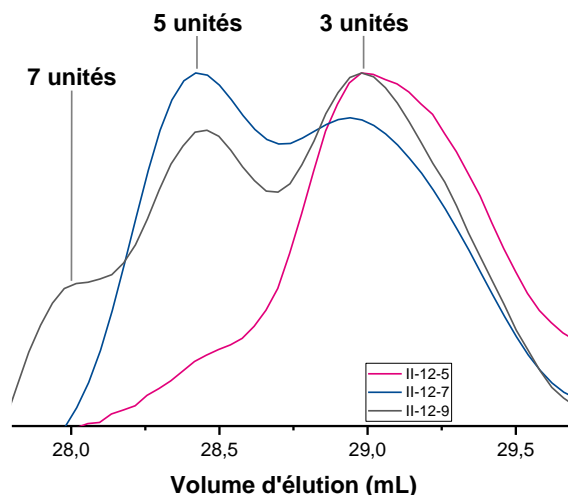


Figure II.17. Analyses SEC des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12).

Échantillon	Masse $[M+2H]^{2+}$		Dispersité \mathfrak{D}
	m/z_{th}	m/z_{exp}	
II-12-5	442,7475	442,7477	1,05
II-12-7	598,8373	598,8356	1,08
II-12-9	754,9272		1,08

Tableau II.5. Masses mesurées et dispersité des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12).

3.2.2.2. Utilisation de la glycine et les problèmes en découplant

L'utilisation d'une glycine en tant que linker permet une synthèse plus rapide du point de vue de l'expérimentateur puisque la résine fonctionnalisée est commerciale. La synthèse débute donc directement par la déprotection de l'amine primaire terminale de celle-ci. Cependant, même si aucun problème n'est observé durant les différentes étapes de la synthèse, les produits finaux obtenus (composés II-13-5, II-13-7 et II-13-9) sont complètement insolubles, à tel point que la SEC, comme l'ESI-HRMS sont impossibles. Ces oligomères ne pouvant pas être caractérisés, la synthèse d'oligo(triazole amide)s à séquences synthétiques sur une résine fonctionnalisée par une glycine est abandonnée.

3.2.2.3. Un bout de chaîne sans linker : le choix de la simplicité

Finalement, un essai est réalisé à partir d'une résine Wang non fonctionnalisée. La présence des linkers (phénylalanine ou glycine) permettait de débiter la croissance des chaînes d'une amine primaire, donnant lieu à des cycles de réactions uniquement composés d'amidifications et de CuAAC. L'absence de linker sur la résine Wang, qui se termine par un groupement hydroxyle, oblige à débiter par une étape d'estérification pour attacher le premier monomère portant un acide carboxylique. Cette étape est réalisée dans les mêmes conditions que la fonctionnalisation de la résine par la phénylalanine protégée (voir II.2.1), en présence de DCC et DMAP dans le DCM. La synthèse itérative reprend ensuite son cours normal avec une étape de CuAAC suivie d'une amidification.

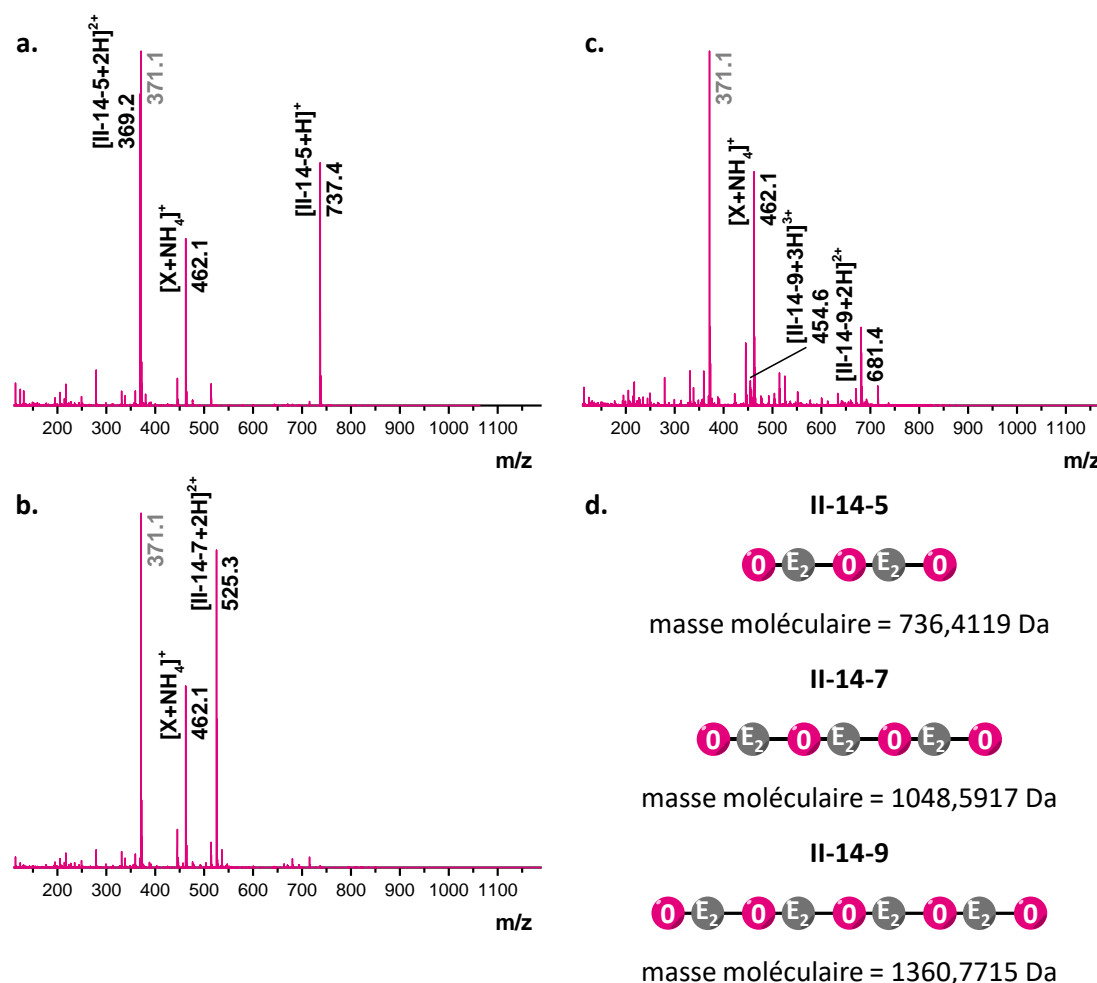


Figure II.18. Spectres ESI-HRMS des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal. Les ions non attribués sont non propres aux échantillons. a. Oligomère clivé après cinq étapes (II-14-5). b. Oligomère clivé après sept étapes (II-14-7). c. Oligomère clivé après neuf étapes (II-14-9). d. Structures des différentes espèces observées.

Encore une fois, trois oligomères de tailles différentes sont synthétisés, contenant cinq, sept et neuf unités. Les spectres de masse de chacun des échantillons montrent que l'oligomère ciblé est systématiquement présent (Tableau II.6), comme en témoignent les pics à 369,2 Da et 737,4 Da (II-14-5, Figure II.18.a), 525,3 Da (II-14-7, Figure II.18.b) et 454,6 Da et 681,4 Da (II-14-9, Figure II.18.c). Cependant, dans les trois cas, et malgré une étape de lavage des produits finaux par précipitation et centrifugation dans Et_2O , une impureté est visible à 445,1 Da ($[\text{X}+\text{H}]^+$) et 462,1 Da ($[\text{X}+\text{NH}_4]^+$). Cette impureté ne correspond à aucun congénère tronqué des séquences synthétisées.

De la même manière que pour les oligomères dont le début de chaîne est une phénylalanine, il a été possible, après filtration, de réaliser une analyse en SEC dans le THF. Celle-ci confirme cette tendance avec, à chaque fois, la trace de l'oligomère recherché (Tableau II.6), accompagné d'autres espèces (Figure II.19).

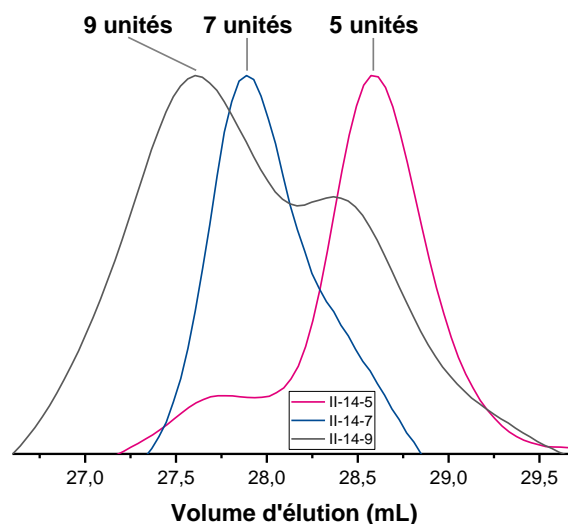


Figure II.19. Analyses SEC des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14).

Échantillon	Masse		Dispersité
	m/z_{th}	m/z_{exp}	\mathfrak{D}
II-14-5	737,4192 [M+H] ⁺	737,4180	1,08
II-14-7	525,3031 [M+2H] ²⁺	525,3017	1,09
II-14-9	681,3930 [M+2H] ²⁺	681,3957	1,09

Tableau II.6. Masses mesurées et dispersité des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14).

4. Analyses de chaînes uniques par les nanopores

4.1. Introduction aux analyses par les nanopores

Comme décrit précédemment (voir I.6.1), une technique d'analyse de polymères à séquences définies faisant intervenir des nanopores a fait son apparition dans les années 1990.^[9] Ces objets ont une structure tridimensionnelle qui présente une cavité dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre. Ils peuvent être produits synthétiquement – les nanopores synthétiques sont généralement percés dans une membrane à base de nitrure de silicium,^[481] mais récemment, de nouveaux systèmes ont été développés à partir de graphène^[482, 483] ou de disulfure de molybdène^[484, 485] – mais sont également régulièrement issus du milieu biologique. En effet, certaines protéines ont une conformation dans l'espace qui dévoile un vide en son cœur d'échelle nanométrique. L'intérêt de ces objets est que cet ordre de grandeur de leur diamètre correspond globalement à la taille de molécules, que ce soit des petites molécules ou certaines dimensions de plus grandes, comme des polymères, qui peuvent alors transiter à travers le pore.^[486] Dans le système qui est au centre de cette technique d'analyse, les pores sont intégrés à une membrane qui sépare et isole deux réservoirs.^[487] Les nanopores de protéines sont donc insérés dans des membranes bicouches lipidiques : ce sont des protéines transmembranaires. Les deux milieux qui entourent cette membrane, appelés cis et trans, contiennent une solution contenant des électrolytes, ainsi que des électrodes.^[422] Une fois la membrane « peinte » pour séparer ces milieux, la protéine, qui a été isolée, est ajoutée par le côté cis et s'insère dans la membrane. Une fois ce passage unique entre les deux réservoirs ouverts, les protéines en excès sont évacuées et un potentiel électrique peut être appliqué entre les deux côtés de la membrane, entraînant un déplacement des ions présents dans la solution à travers le pore.

L'analyse de molécules par les nanopores repose sur la mesure de l'intensité de ce courant. En effet, lorsqu'introduites dans l'un des deux réservoirs, les molécules analysées vont avoir tendance à également utiliser ce passage entre les deux milieux pour tenter de passer d'un côté à l'autre, et ce d'autant plus si elles sont chargées. Lors de leur séjour au cœur du nanopore, ces analytes interagissent avec celui-ci, entraînant un blocage du courant électrique qui est visible lors de la mesure. Ainsi, le nanopore joue en premier lieu un rôle de détection de l'analyte par l'évènement créé par ce blocage du courant. Le blocage mesuré du courant électrique induit par la molécule analysée est différent selon la taille, la structure et la composition de celle-ci, permettant à cette méthode de différencier les analytes, en plus de les détecter. C'est la base même de cette technique.^[486] Seulement cette détection dépend avant tout de la capacité des molécules à pénétrer dans le nanopore.

Dans les années 1990, les premières molécules détectées sont des acides nucléiques.^[422, 439] Ces biomacromolécules chargées dans le milieu subissent un phénomène de translocation à travers le nanopore. Cependant, afin que ce phénomène prenne place, il est avant tout nécessaire que les molécules entrent dans le nanopore. Le taux de capture des analytes par le nanopore est donc un facteur déterminant dans cette méthode.^[486] Ce taux de capture détermine en premier lieu la quantité de matière nécessaire à insérer dans le réservoir choisi afin d'obtenir des résultats. En effet, si les molécules sont en trop faible quantité, leurs entrées dans le pore, et par conséquent les évènements enregistrés, se feront plus rares. De la même manière, il n'est pas forcément utile d'en ajouter en excès si ce taux est déjà satisfaisant. Il existe plusieurs manières d'ajuster ce taux de capture pour optimiser cet aspect. Tout d'abord, le choix du côté de la membrane pour l'ajout de l'analyte est important. Effectivement, lors de son insertion dans la membrane, la protéine qui forme le nanopore, asymétrique (une extrémité forme un vestibule, plus large, alors que l'autre extrémité est composée du tonneau, plus étroit), prend la plupart du temps une orientation préférentielle, due à son mécanisme de formation spatiale lorsqu'elle perce la membrane.^[488] Cette orientation amène le vestibule du nanopore du côté cis alors que le tonneau ressort par conséquent du côté trans. Des études révèlent que de ce fait, les phénomènes de translocation des acides nucléiques sont beaucoup plus importants dans le sens cis→trans que dans le sens trans→cis.^[486] Cela s'explique à la fois par cette géométrie de la protéine, qui présente d'un côté un large vestibule facilement accessible et de l'autre un tonneau plus étroit, créant une barrière énergétique, et par la composition même des polypeptides qui la constituent, riches en acides aminés qui pourraient favoriser une répulsion électrostatique du côté trans, et au contraire pourvus d'acides aminés contribuant à l'attraction des analytes du côté cis.^[489] Il en ressort que pour obtenir un taux de capture plus important, il est nécessaire d'injecter les molécules à analyser du côté cis de la membrane. Un autre facteur influant sur ce taux est la valeur de la tension imposée au système. En effet, il existe une relation exponentielle entre le voltage choisi et le nombre d'évènements enregistrés.^[489] Cependant, il ne faut pas abuser de ce paramètre car un courant trop important entraîne un nombre croissant de collisions entre les macromolécules et le pore qui peuvent également induire un blocage du courant ne résultant donc pas de la translocation de ladite macromolécule. Ainsi, des interférences peuvent être observées.

Une fois l'analyte capturé par le nanopore, d'autres éléments influent sur la qualité de l'analyse.^[486] Le premier d'entre eux est d'ordre purement géométrique puisqu'il concerne la taille des objets mis en jeu. Il paraît évident que l'intérieur du pore doit être d'un diamètre plus large que les ions présents dans le milieu tout d'abord (environ 0,1 nm), mais également plus large que certaines dimensions des analytes qui le traversent (environ 1,5 nm pour un simple brin d'ADN, 3 nm pour de l'ADN double brin).^[490] Parmi les nanopores biologiques les plus utilisés, l' α -hémolysine (Figure

II.20.a)^[488] présente un diamètre interne entre 2,6 et 1,4 nm qui paraît parfait pour des mesures sur les acides nucléiques.^[491] L'aérolysine (Figure II.20.b),^[492] une autre protéine transmembranaire, présente un tonneau de diamètre 1,7 nm qui correspond globalement aux standards requis.^[493] Ces nanopores dont le tonneau a un diamètre permettant de laisser passer un brin d'ADN, mais pas deux, démontrent une autre utilité. En effet, il a été montré qu'ils pouvaient, grâce à cette caractéristique, permettre de séparer deux brins d'ADN en conformation hélicoïdale.^[486] Cependant, un diamètre trop important en comparaison des molécules analysées entraînerait une diminution des interactions entre le nanopore et les espèces, et donc en une mesure moins efficace. Il est à noter que pour une mesure, pendant que l'analyte est présent dans le pore, il est nécessaire que de nombreux ions prennent le même chemin en simultané, d'où le besoin d'un diamètre du nanopore capable d'accueillir à la fois la molécule analysée et des ions.^[486]

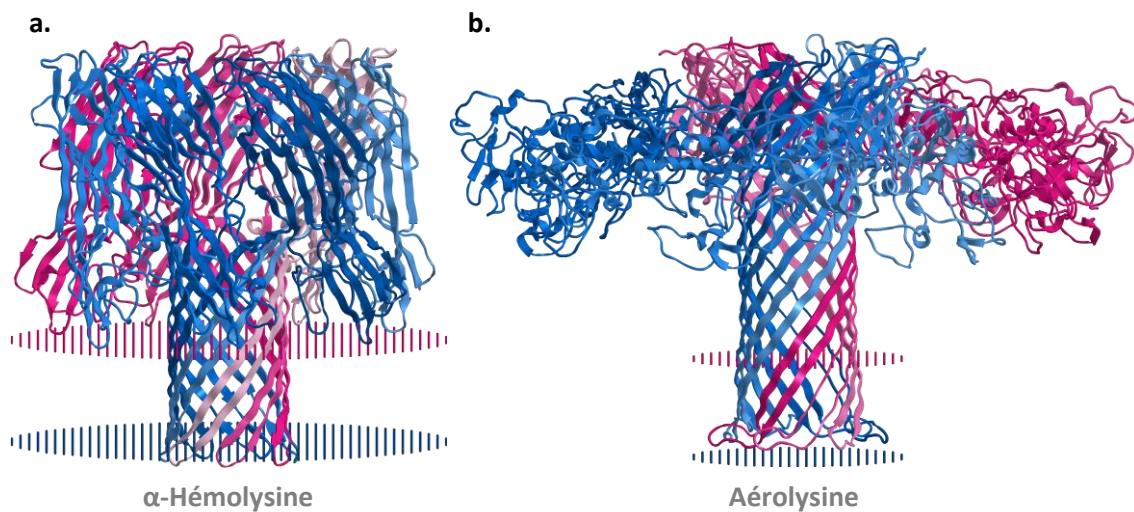


Figure II.20. Représentation de la structure tridimensionnelle de l'α-hémolysine (a) et de l'aérolysine (b), nanopores de protéines transmembranaires utilisés pour la caractérisation des poly(triazole amide)s contenant des séquences définies synthétiques.

Un autre facteur influençant la mesure est bien évidemment la composition des objets analysés.^[423, 486] Afin de différencier par exemple deux brins d'acides nucléiques, il est nécessaire qu'à compositions différentes, ils présentent une réponse différente à l'analyse, et c'est le cas. En effet, chacune des bases nucléiques interagit différemment avec l'intérieur du pore, permettant d'obtenir des intensités de blocage et des temps de séjour dans le pore différents.^[423] Les améliorations de la résolution des mesures et la mise au point d'un contrôle de la vitesse de passage des molécules à travers le pore permettent d'identifier individuellement chaque base d'un brin d'acide nucléique et ainsi de séquencer le code constituant celui-ci.^[424, 490, 491, 494] Au cours des analyses menées sur les acides nucléiques justement, un autre élément a été observé : l'influence de l'orientation des brins.^[422] Pour une seule composition d'homopolymère analysée, les signaux de plusieurs populations ont été remarqués. Ils correspondent simplement aux espèces s'étant insérées dans le pore par l'extrémité 3' et par l'extrémité 5', preuve de l'importance des bouts de chaînes et du contrôle du sens de capture.

Pour l'analyse de polymères synthétiques, certains de ces facteurs peuvent ne plus intervenir, comme l'orientation de la chaîne par exemple. En effet, pour des chaînes courtes moins rigides ne pénétrant pas dans le pore en étant déroulées comme les acides nucléiques, mais plutôt sous forme de pelotes, ces problématiques ne sont pas forcément à prendre en considération. Néanmoins, les

interactions avec l'intérieur du tonneau diffèrent toujours en fonction de la structure analysée, de même qu'en fonction de la taille des chaînes, entraînant des écarts d'intensités mesurées ainsi que des temps de séjours, qui permettent de différencier les espèces (Figure II.21).^[13, 440] Au final, avec une calibration adéquat, en connaissant la structure d'un échantillon, il est possible de retrouver sa masse très précisément, du fait du caractère statistique de l'analyse (une moyenne est calculée sur la mesure d'un grand nombre d'évènements dans le nanopore).

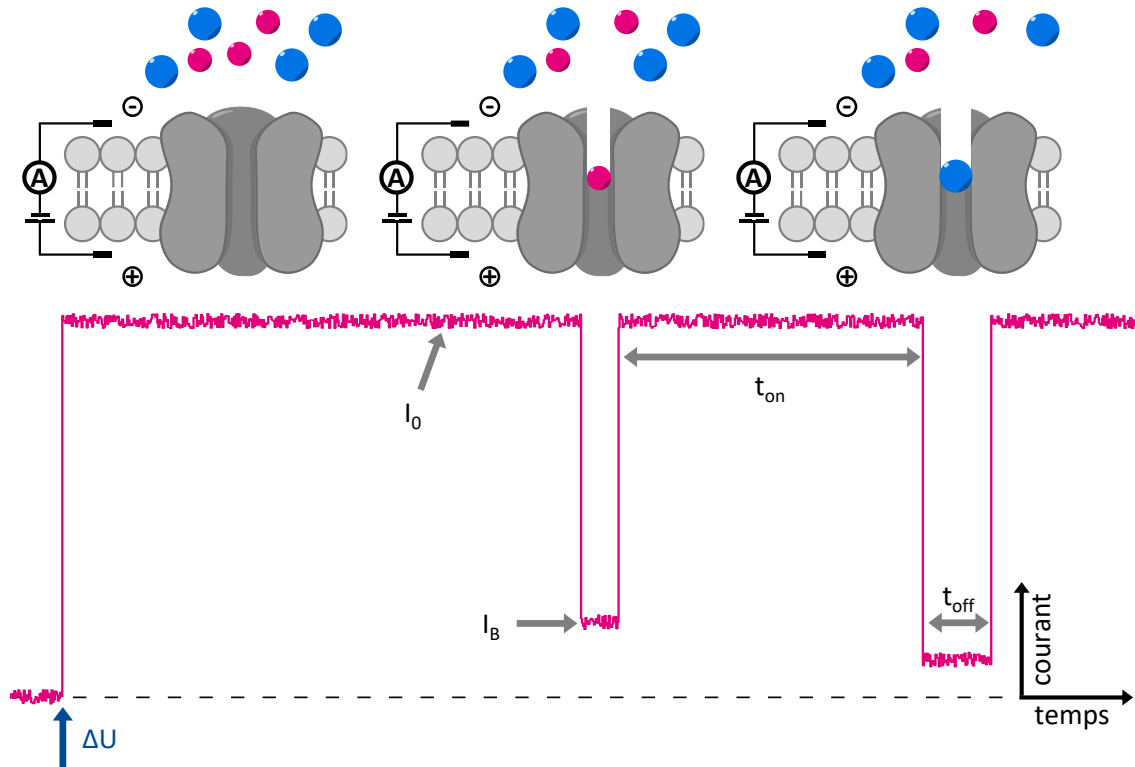


Figure II.21. Discrimination des pelotes de polymères de tailles et/ou structures différentes par les nanopores.

4.2. Analyses des oligo(triazole amide)s par les nanopores

Les analyses réalisées sur les structures synthétisées dans ce chapitre sont conduites par Monasadat Talarimoghari, du groupe de Jan C. Behrends. Toutes les mesures effectuées sur les poly(triazole amide)s synthétisés sont réalisées dans une solution de chlorure de potassium (KCl, 4 mol.L⁻¹) dans un tampon Tris (pour trishydroxyméthylaminométhane) dans l'eau distillée (pH=7,5). Chaque échantillon est inséré du côté cis de la membrane et analysé avec l' α -hémolysine et l'aérolysine (Figure II.20). Mais cette dernière, dont la géométrie et le taux de charge du tonneau diffèrent totalement de la première,^[14] ne donne pas d'interactions assez fortes pour permettre de discriminer les différentes tailles d'oligomères. L' α -hémolysine, en revanche, permet d'observer le passage des chaînes avec une intensité satisfaisante, que ce soit en mode positif ou en mode négatif. Le sens du courant électrique mène justement à des résultats légèrement différents selon qu'il est positif ou négatif. Quel que soit le voltage appliqué, les chaînes polymères entrent dans le nanopore du côté cis vers le côté trans, mais ce n'est pas le cas des ions présents dans le milieu, dont le sens de la traversée dépend évidemment du sens du courant électrique. La présence des chaînes PEG et des triazoles peut induire une charge positive des oligomères en interaction avec les ions potassium du milieu, qui explique les résultats différents entre les deux modes, un courant négatif agissant alors plus sur l'analyte chargé. Cela résulte en des temps de séjour plus long dans le nanopore, et en des interactions

plus fortes qui donnent des mesures et des discriminations plus précises pour chaque entité présente dans les échantillons, mais aussi des niveaux de conductances résiduelles différents pour un même analyte selon le mode utilisé.

Le traitement du signal de l'intensité du courant électrique à travers le pore formé par l' α -hémolysine permet d'accéder à un tracé du temps de séjour en fonction de la conductance résiduelle, c'est-à-dire du rapport de l'intensité mesurée et de l'intensité du courant ouvert (I/I_0). Ce diagramme est représentatif de l'intensité des événements pour chaque niveau de conductance qu'il est possible de déterminer par une analyse statistique du signal. De cette manière, le nombre d'évènements enregistrés pour chaque valeur de conductance, à laquelle correspond le séjour d'une taille de molécule, est retrouvé, et il est donc possible de discriminer les différents oligomères. Le caractère statistique du traitement permet même de se faire une idée des proportions de chaque molécule présente dans l'échantillon.

4.2.1. Analyse des poly(triazole amide)s porteurs d'une phénylalanine

La première série analysée est celle dont les débuts de chaînes sont constitués d'une phénylalanine (composés II-12). La caractérisation en ESI-HRMS et en SEC montrait une forte dispersité des chaînes avec la présence à chaque étape de congénères des étapes précédentes en grand nombre (voir II.3.2.2.1). Ces résultats sont confirmés par les analyses par le nanopore, qui sont présentées ici pour le mode négatif, pour une tension appliquée de -40 mV (exemple du composé II-12-7, Figure II.22).

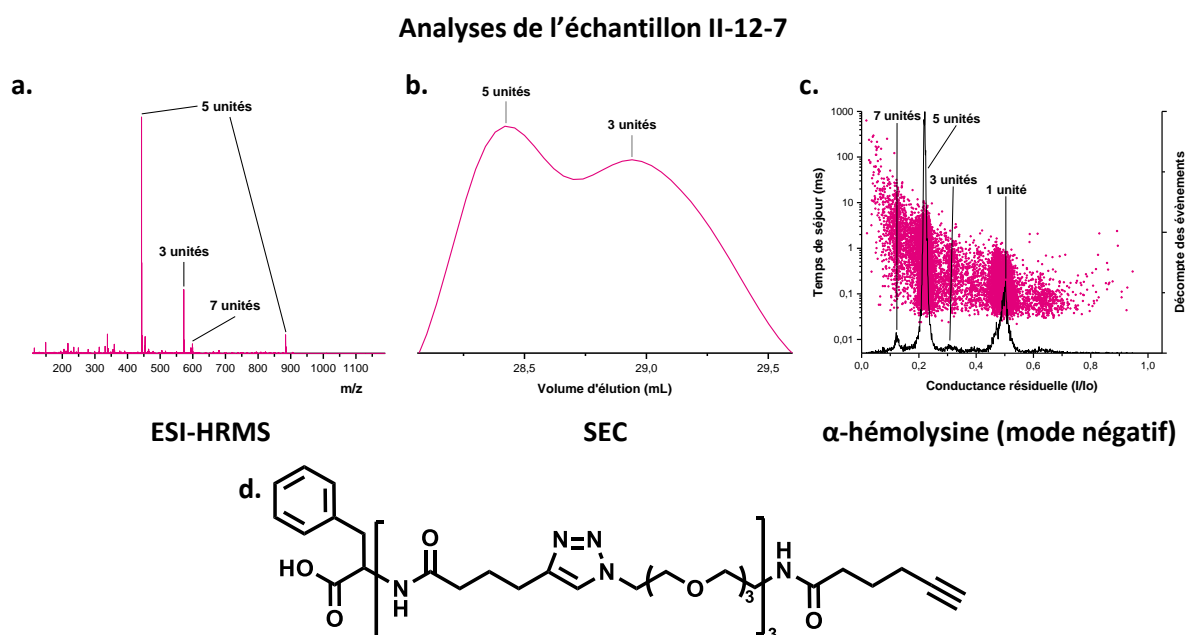


Figure II.22. Corrélation entre les analyses ESI-HRMS (a), SEC (b) et avec l' α -hémolysine (c) de l'échantillon contenant le composé II-12-7 (d).

Pour le premier oligomère analysé (composé II-12-5), clivé après cinq étapes itératives (trois unités codantes et deux espaceurs), différentes tailles de molécules sont déjà observées. En effet, en mode négatif (Figure II.23.a), trois pics à trois niveaux de conductance distincts sont clairement visibles, correspondant, comme le suggéraient les autres méthodes de caractérisation, aux oligomères résultants de cinq étapes comme prévu (composé II-12-5), mais avec une intensité très faible, mais

aussi de trois étapes et d'une seule étape de synthèse. La preuve de l'échec de certaines étapes de synthèse est déjà bien montrée par ce premier spectre. De la même manière, l'analyse de l'oligomère consécutif à sept étapes de synthèse (composé II-12-7, Figure II.23.b) révèle la présence de chaînes de quatre tailles différentes : les trois déjà observées sur l'échantillon précédent auxquelles s'ajoute la chaîne à sept unités qui était visée, mais toujours en intensité minimale. Enfin, l'échantillon censé contenir l'oligomère de neuf unités (composé II-12-9) inclut les chaînes de sept, cinq, trois et une unité comme précédemment (Figure II.23.c), mais le produit ciblé n'est pas visible.

Analyses par l' α -hémolysine en mode négatif (-40 mV)

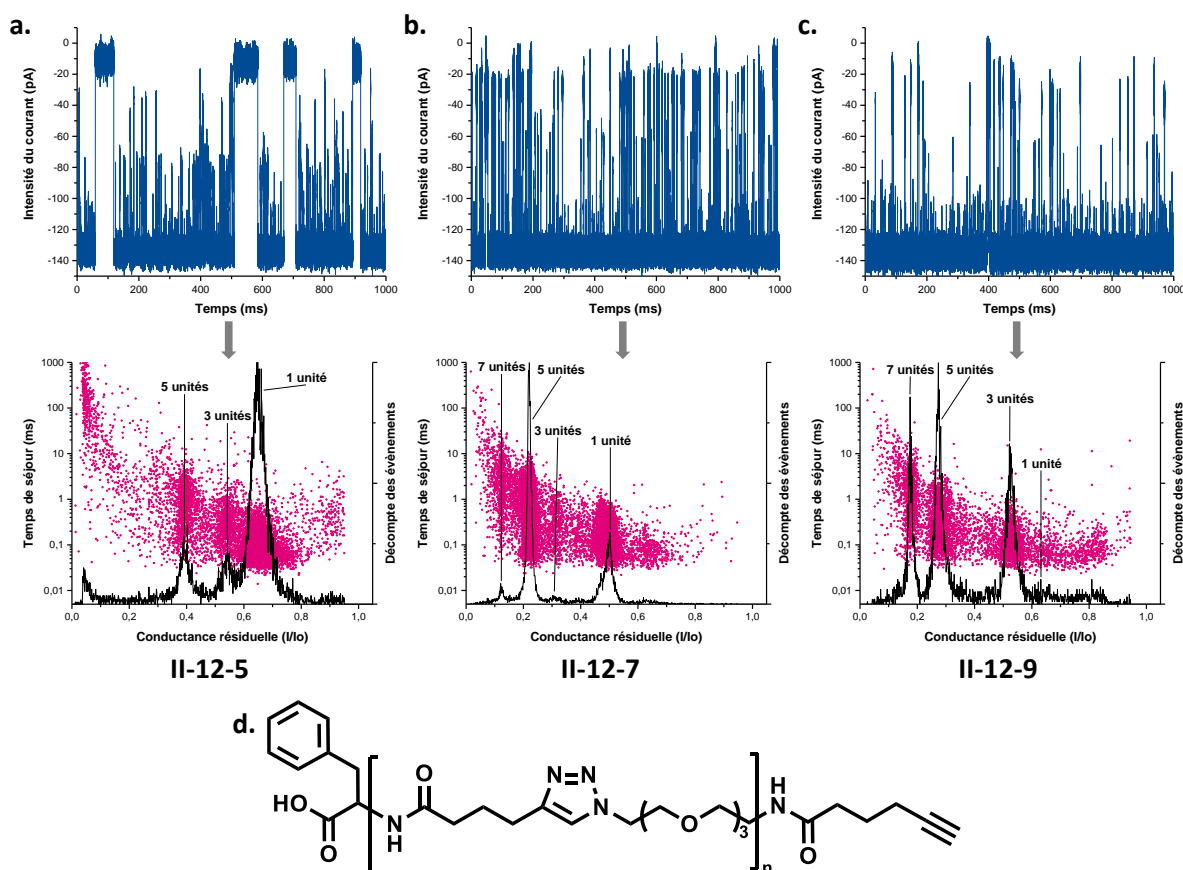


Figure II.23. Analyses par l' α -hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et une phénylalanine terminale (II-12) en mode négatif. En haut, enregistrement de l'intensité du courant électrique à travers le pore en fonction du temps. Au milieu, estimation statistique de l'abondance de chaque espèce observée selon la conductance résiduelle (I/I_0) qu'elle induit en traversant le pore. a. Oligomère clivé après cinq étapes (II-12-5). b. Oligomère clivé après sept étapes (II-12-7). c. Oligomère clivé après neuf étapes (II-12-9). d. Structure des oligomères analysés.

Ces analyses sont donc une preuve supplémentaire des problèmes rencontrés avec cette synthèse. Cependant, la structure donne de bonnes interactions avec le pore de protéine qui permettent de détecter et de différencier les oligomères avec précision. Comme pour les autres techniques de caractérisation, des améliorations sont donc prévues pour les résultats des analyses des oligomères ne portant plus de phénylalanine en débuts de chaînes.

4.2.2. Analyse des poly(triazole amide)s sans acide aminé terminal

Les analyses par l' α -hémolysine des poly(triazole amide)s à séquences définies synthétiques dont le début de chaîne n'est pas un acide aminé (composés II-14) sont également conformes aux techniques de caractérisation plus classiques utilisées auparavant (ESI-HRMS et SEC, voir II.3.2.2.3). L'absence du groupement phényle à l'extrémité ne change en rien les bonnes interactions observées entre l'analyte et le pore, et les chaînes sont une nouvelle fois parfaitement détectées et discriminées selon leur taille.

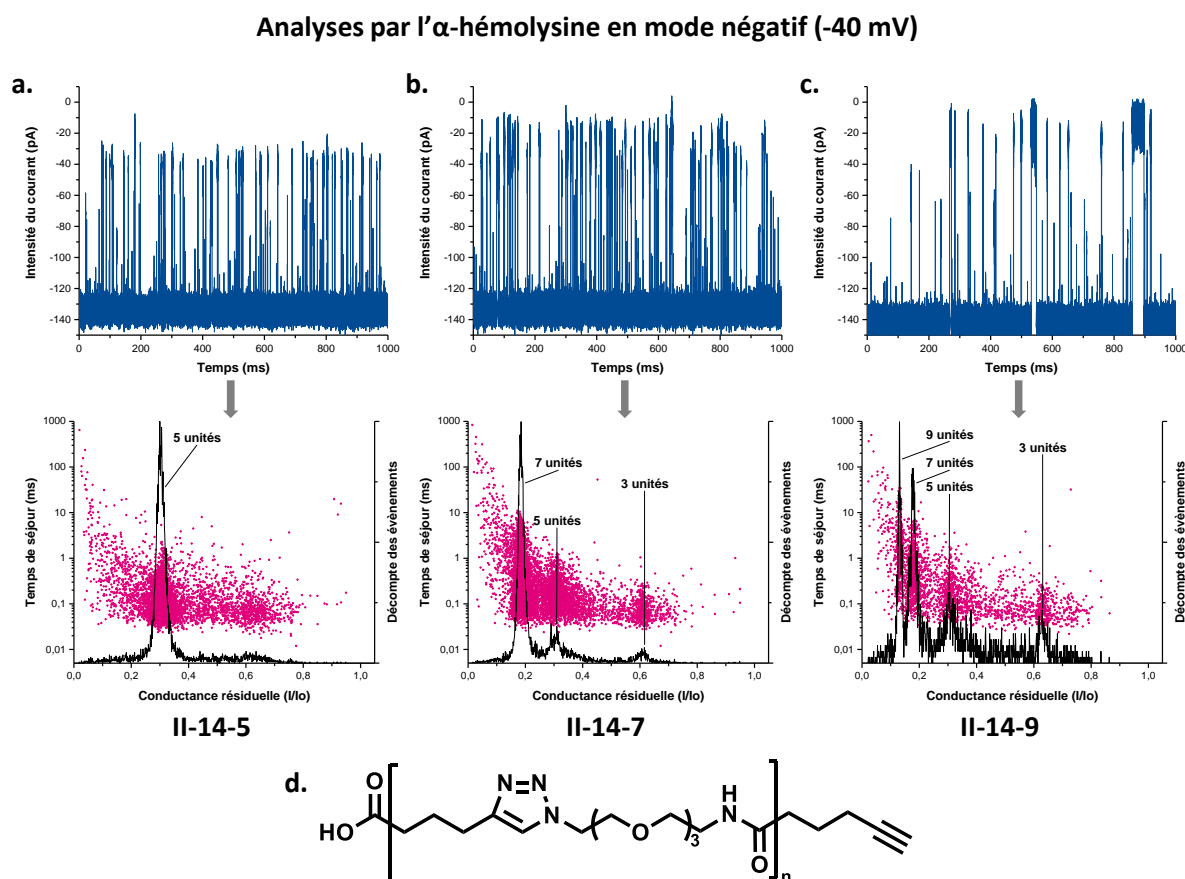


Figure II.24. Analyses par l' α -hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14) en mode négatif. En haut, enregistrement de l'intensité du courant électrique à travers le pore en fonction du temps. Au milieu, estimation statistique de l'abondance de chaque espèce observée selon la conductance résiduelle (I/I_0) qu'elle induit en traversant le pore. a. Oligomère clivé après cinq étapes (II-14-5). b. Oligomère clivé après sept étapes (II-14-7). c. Oligomère clivé après neuf étapes (II-14-9). d. Structure des oligomères analysés.

En particulier, le spectre correspondant à l'oligomère contenant cinq unités montre l'isomolécularité du produit (composé II-14-5, Figure II.24.a) à travers un pic unique à une conductance résiduelle aux alentours de 0,3 en mode négatif. Pour ce qui est de l'échantillon pour une synthèse comprenant deux étapes supplémentaires, l'oligomère à sept unités est également largement majoritaire (composé II-14-7, Figure II.24.b) même si des pics de plus faibles intensités correspondant à cinq et même trois unités seulement sont observables. Ceux-là restent cependant en très faible abondance. En ce qui concerne la chaîne de neuf unités (composé II-14-9), plusieurs espèces sont visibles dans cet échantillon (Figure II.24.c), parmi lesquelles le produit ciblé (à 0,16 en mode négatif), mais aussi les oligomères à sept, cinq et trois unités (respectivement à 0,18, 0,3 et 0,6). Le pic

correspondant au congénère à sept unités est assez intense, même si ce produit semble moins abondant que l'oligomère à neuf unités, preuve qu'ici encore, la synthèse était loin d'être parfaite.

Il est à noter qu'en mode positif (tension appliquée de +40 mV, Figure II.25.a), une espèce inconnue est visible à une conductance résiduelle de 0,2. Il pourrait s'agir de l'impureté X décrite précédemment sur les spectres de masse (voir II.3.2.2.3) ou bien d'agrégats de celle-ci. Quoiqu'il en soit, la présence de ce pic à une intensité de blocage plus élevée que l'oligomère de sept unités exclue qu'il s'agisse d'un poly(triazole amide) de plus grande taille, la méthode de synthèse ne le permettant en aucun cas. Un pic est d'ailleurs toujours présent en mode positif pour l'analyse de l'échantillon contenant l'oligomère à neuf unités (Figure II.25.b), aux environs de 0,18 également, qui pourrait être dû au même évènement.

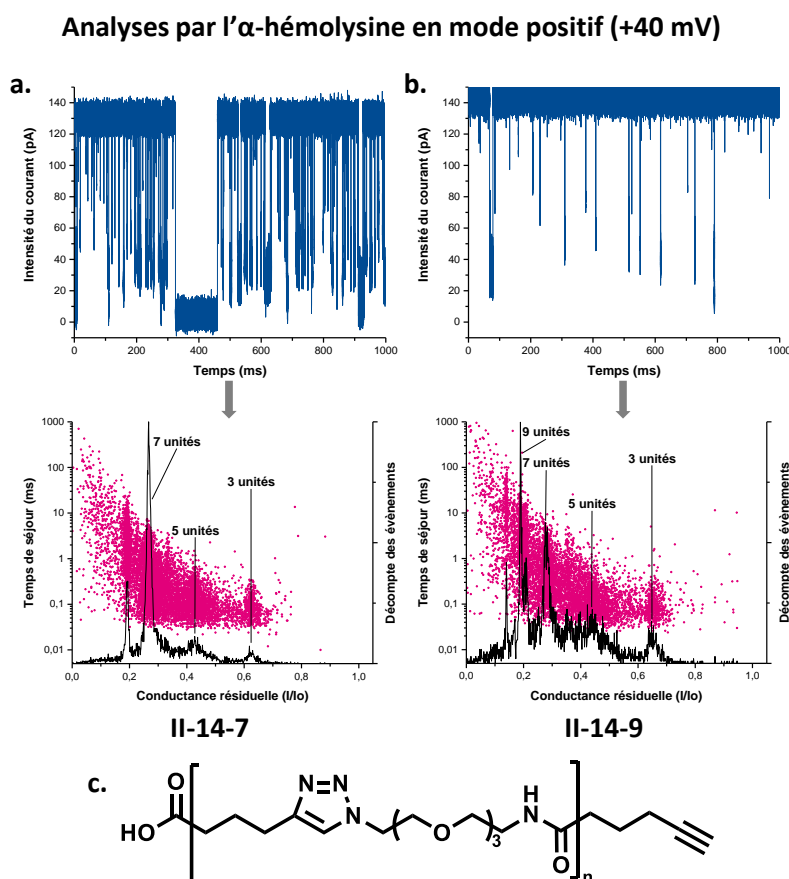


Figure II.25. Analyses par l' α -hémolysine des poly(triazole amide)s avec espaceurs PEG et sans acide aminé terminal (II-14) en mode positif. En haut, enregistrement de l'intensité du courant électrique à travers le pore en fonction du temps. Au milieu, estimation statistique de l'abondance de chaque espèce observée selon la conductance résiduelle (I/I_0) qu'elle induit en traversant le pore. a. Oligomère clivé après sept étapes (II-14-7). b. Oligomère clivé après neuf étapes (II-14-9). c. Structure des oligomères analysés.

La caractérisation par l' α -hémolysine des poly(triazole amide)s synthétisés paraît en tout cas une nouvelle fois très précise et permet bien d'identifier toutes les espèces présentes dans le milieu analysé.

5. Conclusions

L'approche itérative, orthogonale et supportée pour la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies synthétiques contenant des codes numériques est donc un succès. Les oligomères

recherchés sont obtenus avec des temps et des conditions de réactions optimisés par rapport à ce qui était décrit précédemment dans la littérature.^[11, 99] En particulier, le temps de réaction de l'étape de couplage peptidique est divisé par deux grâce à l'implémentation d'un chauffage au micro-onde tandis que la durée de la cycloaddition menant à la formation du triazole est diminuée d'un facteur dix. Plusieurs structures contenant différents bouts de chaînes et différents segments intercalaires ont ainsi été synthétisés, montrant la grande variété de structures qu'il serait possible d'atteindre. Cependant, quelques problèmes subsistent. En effet, la caractérisation de certains composés est rendue difficile par la très faible solubilité des produits dans la plupart des solvants usuels. De plus, lorsque celle-ci est possible, elle révèle que les chaînes synthétisées ne sont pas toujours isomoléculaires, preuve que ces conditions optimisées ne permettent pas forcément la reproductibilité. Ainsi, il serait peut-être nécessaire de répéter chaque étape afin d'assurer un rendement maximal pour chacune d'elles.

Ces structures se présentent néanmoins comme de très bons candidats pour une analyse par les nanopores. En effet, une caractérisation par l' α -hémolysine, nanopore de protéine classique pour l'étude de polymères synthétiques et notamment du PEG,^[14, 441] permet de détecter, mais aussi de discriminer tous les poly(triazole amide)s présents dans un échantillon selon leur taille. Cette analyse statistique donne également une idée de l'abondance de chaque espèce présente dans le milieu. Cette technique pourrait ainsi très prochainement devenir un outils majeur pour la caractérisation de polymères à séquences définies synthétiques.

Chapitre III

Développement d'une nouvelle voie de synthèse sans cuivre

1. Introduction

Dans le chapitre II, des poly(triazole amide)s contenant des séquences synthétiques définies sont synthétisés selon une approche itérative « AB+CD » faisant intervenir deux réactions orthogonales : le couplage peptidique acide carboxylique-amine primaire et la cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (I) (CuAAC). Un soucis majeur empêche ces synthèses d'être des succès complets : la très faible solubilité des produits dans la plupart des solvants usuels. Ce phénomène nuit grandement à la caractérisation facile des séquences, puisque des analyses basiques pour les polymères, telles que la chromatographie d'exclusion stérique par exemple, sont difficiles à obtenir. Il pourrait être dû à la présence de cuivre dans le milieu au cours de la synthèse (à chaque étape de CuAAC). En effet, les triazoles du squelette du polymère, formés pendant la croissance des chaînes sont également connus pour leur propriétés stabilisatrices du cuivre (I).^[371, 495] Leur ligation au cuivre résultant en la formation de complexes avec celui-ci rend son élimination difficile après la réaction. La solution saturée d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) utilisée pour les lavages après chaque étape de « click » pour complexer le cuivre et l'évacuer n'est peut-être pas suffisante et des traces peuvent subsister dans le milieu. Ainsi, il est possible que la présence de cuivre de manière pérenne dans le milieu réactionnel provoque non seulement une baisse des rendements pour les étapes suivantes, du fait de la formation de ces complexes cuivre-polymères qui peuvent prendre des conformations moins réactives, mais aussi, et pour les mêmes raisons, une baisse de la solubilité des produits clivés de la résine. De plus, il ne serait pas étonnant que, lors de leur croissance sur la résine, les chaînes de poly(triazole amide)s complexée par le cuivre ne soient pas non plus complètement solubilisées dans le solvant de la réaction, entraînant encore une fois une baisse de la réactivité et par le même coup, la dispersité de certains composés qui a pu être observée dans le chapitre précédent. Finalement, le cuivre étant identifié comme un suspect majeur dans l'explication de tous les problèmes relatifs à la synthèse des poly(triazole amide)s, une solution est imaginée afin de ne plus avoir recours à lui.

Une substitution à la CuAAC permettant la formation d'un groupement triazole sans intervention d'un catalyseur au cuivre existe : c'est la SpAAC (pour *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*). Cette réaction utilise deux fonctions réactives identiques à la CuAAC, un alcyne et un azoture, mais ici, l'alcyne est contenu dans un cycle tendu. Cette réaction de « click » sans cuivre, découverte inopinément dans les années 1950,^[496] est réintroduite en 2003 par l'équipe de Bertozzi pour une application biologique, en utilisant un dérivé de cyclooctyne.^[15] En effet, dans les synthèses imaginées pour une utilisation dans un milieu biologique, la présence de cuivre peut être problématique.^[16] C'est pourquoi la SpAAC présente de nombreux avantages. En plus de l'inutilité du catalyseur métallique, elle peut être conduite dans une grande variété de solvants, donne des rendements quasi-quantitatifs dans des conditions ne nécessitant pas beaucoup de réactifs (quantités stœchiométriques) et mène à des groupements triazoles intégrés au cycle très stables.^[497] De plus, selon la structure de cycloalcyne utilisée, la cinétique de la réaction peut être très élevée, permettant d'atteindre un rendement complet en quelques secondes seulement.^[16, 497]

Plusieurs alcynes cycliques ont été isolés par le passé,^[498, 499] mais les cycles trop grands sont trop stables alors que les cycles plus petits se décomposent trop rapidement pour être utilisés. En effet, l'instabilité des cycloalcynes, qui dépend de l'angle des liaisons carbone-carbone dans le cycle, diminue avec l'augmentation de la taille des cycles. Les cycles à neuf carbones ou plus, trop stables, ne sont donc pas réactifs alors que les cycles à sept carbones ou moins sont inutilisables.^[497] Restent donc

les cyclooctynes, contenant huit carbones, qui sont les dérivés cycliques d'alcynes les plus petits isolables, et donc les plus réactifs.^[500] Effectivement, les angles des liaisons autour de l'alcyne sont de 163°, inférieurs aux 180° habituels pour les alcynes linéaires.^[497, 501] Cela procure à la cyclooctyne une tension de cycle d'environ 18 kcal.mol⁻¹, comprise entre les 12 kcal.mol⁻¹ d'un cycloalcane saturé et les 25 kcal.mol⁻¹ d'un cycloalcyne à sept membres qui se décompose spontanément, par exemple.^[497, 502] La barrière énergétique à franchir pour l'addition d'un azoture est donc plus faible que pour un acétylène sans tension. Ces facteurs expliquent donc l'instabilité maîtrisée et par conséquent la forte réactivité de la cyclooctyne, qui peut subir, sans aide d'un catalyseur, une cycloaddition dipolaire [3+2] avec un azoture pour former un triazole (Figure III.1) dont la conformation est particulièrement stable.

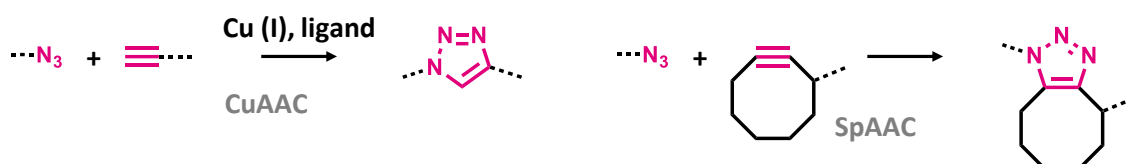


Figure III.1. Comparaison entre la CuAAC et la SpAAC pour la formation d'un triazole par cycloaddition alcyne-azoture.

Dans le but toujours d'augmenter la solubilité des poly(triazole amide)s à séquences synthétiques définies, mais aussi pour adopter une stratégie plus « verte », avec des conditions considérées comme plus respectueuses de l'environnement (absence de catalyseur métallique, réaction réalisée dans un solvant partiellement aqueux, économie d'atomes par le nombre de réactifs diminué), l'insertion de la SpAAC dans la synthèse itérative par une approche « AB+CD » de ces poly(triazole amide)s est étudiée dans ce chapitre.

2. Synthèse itérative d'un oligo(triazole amide) sans cuivre

2.1. Stratégie générale

La synthèse des poly(triazole amide)s à séquences synthétiques définies ne faisant plus intervenir de catalyseur au cuivre est donc réalisée grâce à deux réactions orthogonales : une réaction de couplage peptidique entre un acide carboxylique et une amine primaire, et une réaction de SpAAC entre un azoture et une cyclooctyne (Figure III.2). Deux types de monomères sont donc nécessaires aux cycles itératifs. Pour l'unité intercalante (bloc CD), la structure contenant les segments poly(éthylène glycol)s est conservée et c'est donc le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine qui est utilisé. Pour l'autre monomère (bloc AB), la structure conservée reste assez proche de l'acide 5-héxynoïque puisqu'une courte chaîne alkyle est entourée par un acide carboxylique d'une part, et par une cyclooctyne d'autre part, attachée par une liaison éther-oxyde. Comme précédemment, la différence entre une unité codant pour le bit 0 et une unité codant pour le bit 1 relève de la composition de la courte chaîne centrale de ce monomère. Dans la stratégie retenue ici, le monomère codant pour le bit 1 porte un groupement méthyle latéral qui diffère de la chaîne alkyle simple du monomère codant pour le bit 0 (groupement X sur la Figure III.2).

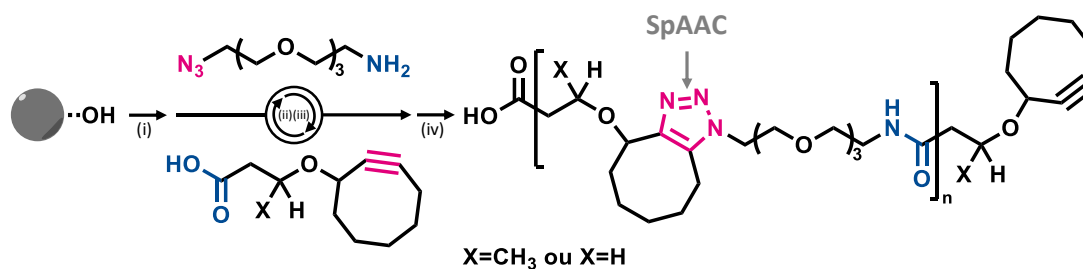


Figure III.2. Schéma général pour la synthèse itérative de poly(triazole amide)s à séquences définies contenant des séquences synthétiques grâce à une réaction de SpAAC à partir d'une résine Wang. (i) Estérification. (ii) SpAAC. (iii) Amidification. (iv) Étape de clivage.

La synthèse est réalisée à partir d'une résine Wang sans linker (Figure III.3), qui avait donné d'assez bons résultats lors de la synthèse avec cuivre (voir II.3.2.2.3). La différence majeure entre l'utilisation d'une résine Wang non fonctionnalisée ou d'une résine Wang porteuse d'un acide aminé, comme c'était le cas pour certaines synthèses du chapitre II, est la présence non plus d'une amine primaire terminale, mais d'un alcool.

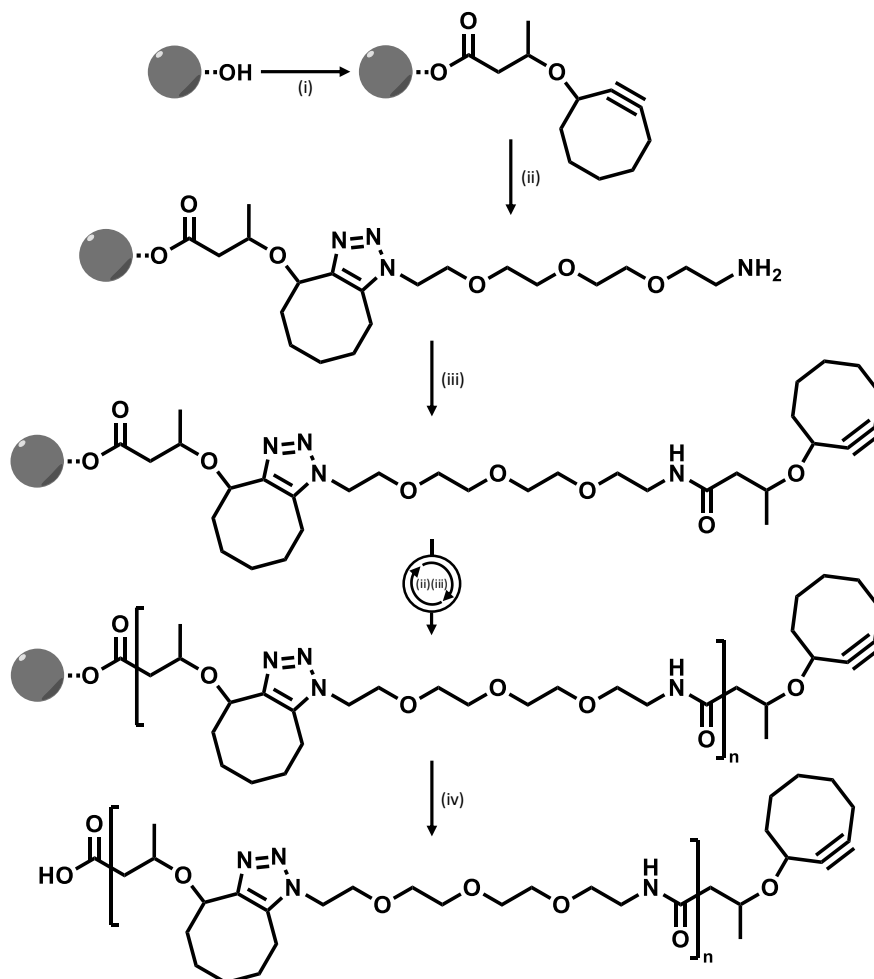


Figure III.3. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des poly(triazole amide)s avec des étapes de SpAAC à partir d'une résine Wang. (i) Estérification : monomère cyclooctyne (III-1), DCC, DMAP, DCM anhydre. (ii) SpAAC : 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (E_2), MeOH/H₂O (8:2). (iii) Amidification : monomère cyclooctyne (III-1), DIC, HOBT, DIPEA, DMF anhydre. (iv) Étape de clivage : TFA, DCM, 2h.

La première étape pour l'ajout d'un monomère AB est donc une estérification entre le groupement hydroxyle final de la résine et l'acide carboxylique du monomère. Cette réaction est réalisée dans les mêmes conditions que pour les estérifications du chapitre II, que ce soit pour la fonctionnalisation de la résine par une phénylalanine ou pour l'ajout du premier monomère. Ainsi, l'addition du monomère est assistée par le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et par la 4-diméthylaminopyridine (DMAP). Une fois ce premier monomère attaché, un bloc CD peut être ajouté. La réaction de SpAAC entre la cyclooctyne terminale de la chaîne et l'azoture de l'espaceur ne nécessite aucun catalyseur. Seul le monomère est déposé sur la résine, et la réaction a lieu dans un mélange méthanol/eau (8:2). En effet, même si beaucoup de SpAAC se font traditionnellement dans l'acétonitrile,^[15, 503] il est montré que d'une part, certaines cyclooctynes ont une meilleure solubilité dans le méthanol,^[504] et que d'autre part, l'ajout d'eau dans le milieu favorise et accélère la réaction.^[504, 505] Après cette étape, les chaînes en croissance sont terminées par une amine primaire qui peut subir une amidification dans les conditions classiques, c'est-à-dire avec le monomère AB, les agents de couplage, le diisopropylcarbodiimide (DIC) et l'hydroxybenzotriazole (HOBt), et une base, la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA). Des cycles de ces deux dernières étapes peuvent alors s'enchaîner jusqu'à obtenir la séquence souhaitée. Les chaînes sont ensuite clivées de la résine par rupture de la liaison ester qui lie les séquences au support, dans des conditions acides amenées par l'acide trifluoroacétique (TFA). Le procédé est donc très proche de la synthèse du chapitre II, et seule la SpAAC remplace la CuAAC. Pour cette étude, seul le monomère codant pour le bit 1 est utilisé en tant que bloc AB. La synthèse des deux monomères (bit 0 et bit 1) suit le même protocole, mais les réactifs de départ nécessaires pour le monomère codant pour 1 sont sensiblement moins coûteux, ce qui explique la préférence pour celui-ci pour le premier essai.

2.2. Synthèse du monomère contenant la cyclooctyne

L'une des raisons de la démocratisation limitée de la réaction de SpAAC est la difficulté à obtenir et isoler les composés contenant une cyclooctyne.^[16] Cependant, une route de synthèse assez rapide existe et a été optimisée pour l'obtention de la structure choisie pour l'unité codante des poly(triazole amide)s (Figure III.4). Le protocole habituel débute par la formation d'un cycle à huit carbone : le 8,8-dibromobicyclo[5.1.0]octane (III-1-1).^[506, 507] Cette réaction est réalisée à partir de cycloheptène et de bromoforme, avec l'assistance du *tert*-butylate de potassium (t-BuOK) pour un rendement de 47%, contre 70 à 90% habituellement obtenus dans la littérature. La littérature suggère ensuite l'utilisation du perchlorate d'argent (AgClO₄) pour catalyser l'ajout du segment alkyle se terminant par un acide carboxylique protégé sous la forme d'un ester. La formation de l'éther qui lie le cycle à huit carbones et cette seconde partie du monomère, à partir du 3-hydroxybutyrate d'éthyle, est possible à température ambiante avec un temps de réaction relativement court, compris entre 30 min et 1h30.^[507-510] Cependant, des expériences passées pour cette synthèse^[504] montrent que ces conditions donnent des rendements trop faibles. Il est donc préférable d'effectuer cette étape à reflux, avec un temps de réaction allongé, en l'occurrence 8h.^[511] Le perchlorate d'argent étant fortement explosif, il est nécessaire de s'assurer que l'atmosphère est bien inerte et de couvrir la réaction d'une feuille d'aluminium afin de la protéger de la lumière. Le rendement de 38% obtenu pour le composé III-1-2 n'est néanmoins pas tout à fait satisfaisant, en comparaison avec les 60% généralement décrits dans la littérature.

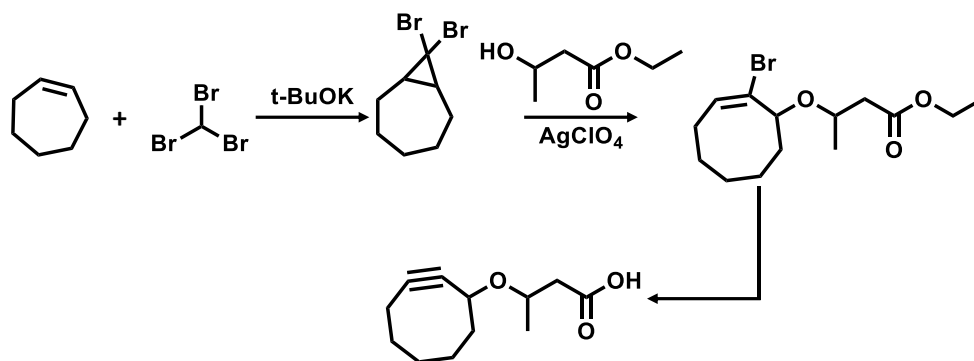


Figure III.4. Synthèse du monomère AB contenant la cyclooctyne codant pour le bit 1 (III-1).

La dernière étape, enfin, est en fait une double étape puisqu'elle concerne à la fois l'élimination du brome restant sur le cycle à huit carbones et la déprotection de l'acide carboxylique de l'autre côté du monomère. Une première méthode en deux temps est tout d'abord essayée. Un traitement avec du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) permet l'élimination du brome et la formation de la triple liaison dans le cycle tandis que l'hydroxyde de sodium (NaOH) permet ensuite la saponification de l'ester final.^[508] Cependant, dans ces conditions, le produit III-1 n'est isolé qu'avec un rendement de 14%, soit un rendement global de synthèse de 2,5%. Les quelques milligrammes obtenus n'étant même pas suffisants pour une caractérisation, une deuxième synthèse est effectuée avec des conditions différentes pour la dernière étape. Celle-ci est en effet effectuée avec du méthylate de sodium (MeONa), une base forte qui permet à la fois la déshydrohalogénéation menant à la formation de la cyclooctyne et l'hydrolyse de l'ester libérant l'acide carboxylique.^[509, 512] Le monomère III-1 est cette fois-ci isolé avec un rendement de 35%, soit un rendement global de synthèse de 6%, légèrement meilleur que précédemment, mais toujours loin de ce qui était espéré. De plus, le composé étant instable, la caractérisation par RMN montre clairement des sous-produits issus de sa décomposition (Figure III.5). Il est donc nécessaire de le conserver au congélateur et à l'abri de la lumière afin de le stabiliser au maximum. La quantité de monomère obtenue permet cependant de réaliser des essais de synthèse itérative d'oligomères.

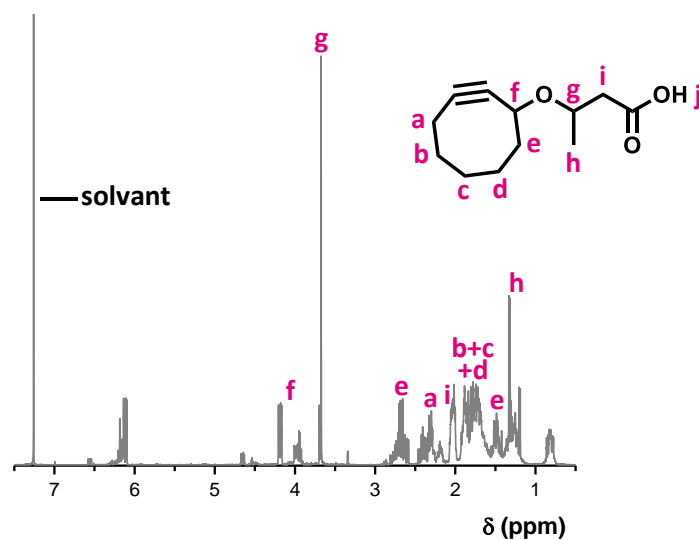


Figure III.5. RMN ^1H (CDCl_3) du monomère AB contenant la cyclooctyne codant pour le bit 1 (III-1).

2.3. Synthèse itérative d'un oligomère sans cuivre

Un oligomère de cinq unités (trois unités codantes (III-1) et deux unités intercalantes (E₂), composé III-2, Figure III.6) est donc synthétisé par le procédé itératif, orthogonal et supporté présenté précédemment (voir III.2.1). L'instabilité connue du monomère portant la cyclooctyne pousse à protéger, autant que faire se peut, le milieu réactionnel, et la résine entre chaque étape de synthèse, de la lumière, en recouvrant les différents réacteurs d'une feuille d'aluminium. Les étapes d'amidification et de SpAAC ont toutes lieu au micro-onde, qui est clôt et ne présente donc pas de problème majeur sur ce plan. De même, dès qu'aucune réaction n'a lieu pendant quelques heures, comme c'est le cas la nuit, la résine portant les chaînes en croissance est conservée au frais, toujours emballée par une feuille d'aluminium pour limiter les risques.

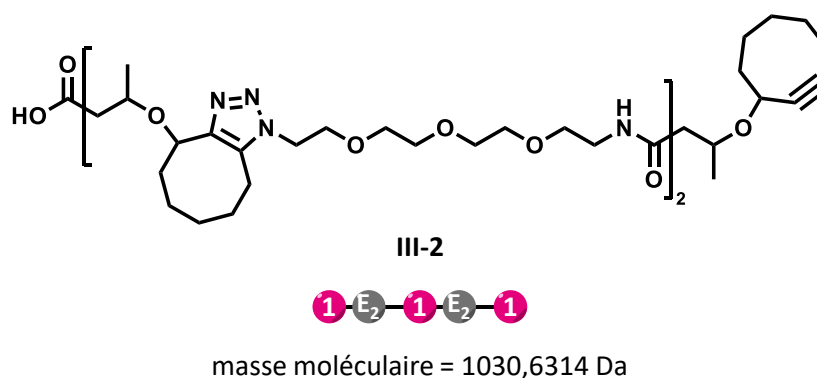


Figure III.6. Structure de l'oligo(triazole amide)s synthétisé par la nouvelle voie de synthèse sans cuivre (III-2).

Après clivage de la séquence de la résine, la précipitation dans de l'éther diéthylique fait bien apparaître un solide blanc, preuve qu'un composé est présent. Après centrifugation et séchage, celui-ci est immédiatement conservé sous vide, à l'abri de la lumière, au congélateur. Quelques fractions servent ensuite aux analyses. La première observation résulte des essais de solubilisation effectués sur le produit dans une variété de solvants. La solubilité ne paraît pas franchement améliorée par rapport aux synthèses au cuivre du chapitre II, si ce n'est dans l'eau, ou une légère diminution de la part de solide est observable à l'œil nu, en comparaison avec le composé II-14-5 (séquence O-E₂-O-E₂-O, voir II.3.2.2.3) par exemple. C'est, en partie, l'objectif qui était visé afin de faciliter la potentielle caractérisation par les nanopores, qui s'effectue dans l'eau. En revanche, pour les autres méthodes de caractérisation de routine, comme la chromatographie d'exclusion stérique dans le THF ou la spectrométrie de masse (ESI-HRMS) habituellement réalisée dans le méthanol, les analyses semblent, au premier abord, plus compliquées.

Comme pour l'étude précédente, la SEC dans le THF est possible après filtration des fractions solides restantes à l'aide d'un filtre de très faible porosité (de l'ordre de 0,2 μm). Cependant, cette technique ne garantit pas que les composés solubilisés analysés soient complètement représentatifs de l'intégralité de l'échantillon. De plus, en procédant ainsi, seule une très faible fraction des produits passe véritablement en solution, ce qui résulte en une détection minimale des espèces lors de l'analyse et donc en un tracé duquel il est impossible, au premier regard, de ressortir une quelconque information (Figure III.7.a). Cependant, grâce à un agrandissement sur la zone adéquate, il est possible d'observer la trace de deux espèces (Figure III.7.b) à un volume d'élution qui correspond globalement à celui des composés de masses moléculaires de l'ordre de grandeur de celui ciblé. Les produits sont certes très faiblement détectés mais il est tout de même possible d'en extraire quelques informations.

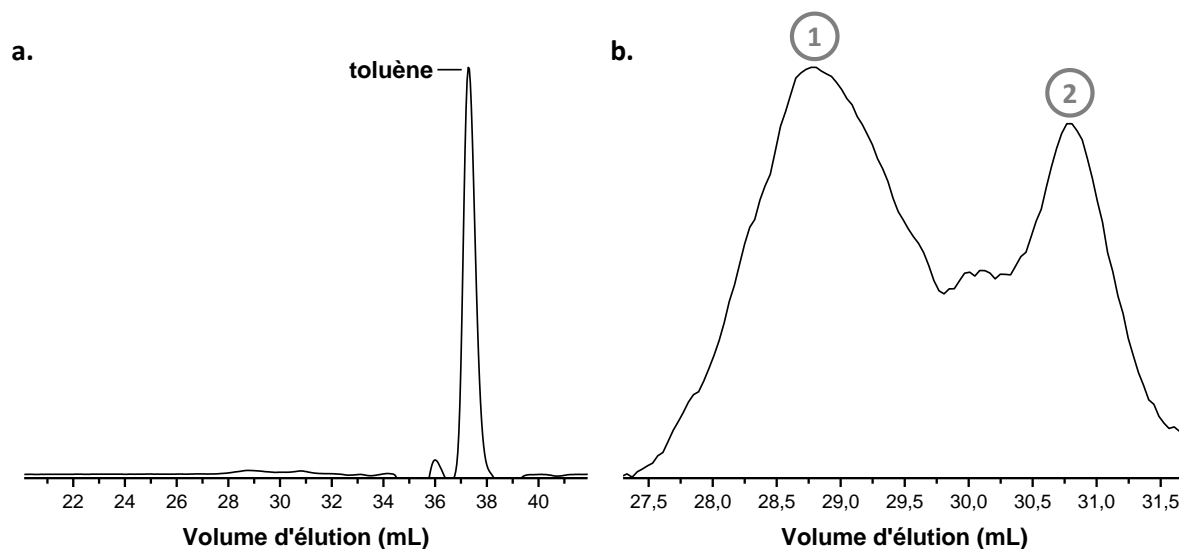


Figure III.7. Analyse SEC de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2). a. Spectre complet. b. Agrandissement sur la zone correspondant aux produits détectés (annotés 1 et 2).

Tout d'abord, il semble évident à première vue que l'échantillon n'est pas isomoléculaire. La dispersité de l'échantillon est calculé à $\mathfrak{D} = 1,12$. Deux espèces distinctes sont clairement visibles. Même si leurs masses précises ne peuvent pas être retrouvées, des ordres de grandeur sont identifiables. Ainsi, le composé annoté 1 à une masse au pic de l'ordre de 810 g.mol^{-1} tandis que pour le composé annoté 2, celle-ci est plutôt de l'ordre de 450 g.mol^{-1} . Impossible donc d'affirmer que l'un de ces deux composés est l'oligomère III-2 ciblé.

Échantillon	Composé	\bar{M}_N	\bar{M}_W	\mathfrak{D}
III-2	1	800	827	1,03
III-2	2	457	467	1,02

Tableau III.1. Données extraites de l'analyse SEC de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2). Pour les deux produits visibles, la masse molaire moyenne en nombre, la masse molaire moyenne en poids et la dispersité sont retranscrites.

Afin d'avoir plus de précision sur ces produits, et notamment leurs masses, qui pourraient attester de leur structure, une analyse en spectrométrie de masse est tentée par le laboratoire de Laurence Charles. L'utilisation du solvant usuel, le méthanol, ne permettant pas de détecter de produit en ESI-HRMS, d'autres sont essayés (eau, DMF, mélanges de ceux-ci), sans succès. Même le THF, qui avait donné des résultats en SEC ne permet pas de solubiliser assez de produit pour être ionisé et analysé. Il est fort probable que le produit, contenant une cyclooctyne terminale instable et sensible à la lumière, la chaleur ou encore l'air, se soit dégradé entièrement lors du transport et que les sous-produits qui résultent de cette dégradation, complètement insolubles, ne soient par conséquent pas visibles en spectrométrie de masse (Figure III.8). Cela expliquerait qu'une analyse réalisée sur le lieu de la synthèse et pour laquelle les conditions de conservation de l'échantillon sont contrôlées en permanence donne des résultats, aussi peu satisfaisants soient-ils, tandis qu'à solvant identique (le THF), une analyse suivant un transport de plusieurs heures dans des conditions incontrôlées ne donne rien.

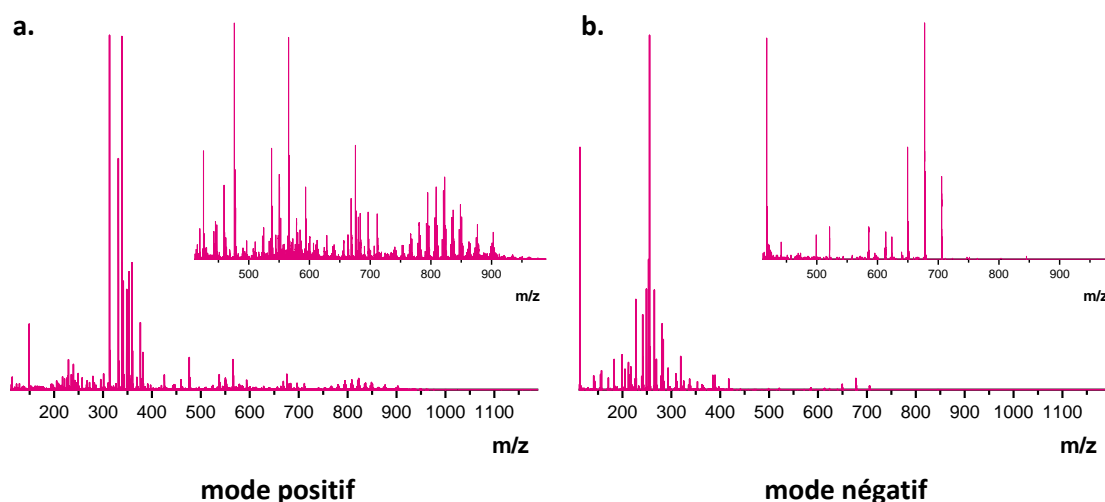


Figure III.8. Spectres ESI-HRMS de l'oligo(triazole amide) issu de la synthèse sans cuivre (III-2) en mode positif (a) et en mode négatif (b).

Plusieurs raisons peuvent expliquer tous ces problèmes de stabilité. Tout d'abord, il ne faut pas perdre de vue que le principe même de la SpAAC avec les cyclooctynes réside dans cette instabilité du cycle. En effet, c'est la tension de cycle qui active la réaction en présence du second réactif contenant l'azoture. Il est donc tout à fait logique que même en l'absence de celui-ci, le composé à base de cyclooctyne cherche à retrouver une conformation plus stable. En particulier, il forme des isomères plus stables du fait de la présence de moins d'insaturations (Figure III.9.b). Plusieurs formes sont suggérées dans la littérature, parmi lesquelles la forme bicyclo[4.2.0]oct-7-ène, la forme cycloocta-1,2-diène et la forme cycloocta-1,3-diène.^[496, 513, 514] Ces réarrangements peuvent avoir lieu de manière spontanée mais sont plus rapides et donc nombreux avec une activation soit par la lumière, soit par la chaleur. La cyclooctyne est également sensible aux bases, en présence desquelles elle peut subir une addition.^[514] Ce point peut avoir son importance lors de plusieurs étapes de la synthèse itérative mise en place pour les poly(triazole amide)s, comme le capping des fonctions qui n'ont pas réagi sur la résine après l'estérification, qui fait intervenir de la pyridine, ou alors les étapes d'amidification, pour lesquelles la DIPEA est utilisée. Comme précisé auparavant, la cyclooctyne peut également réagir rapidement et parfois très vivement avec l'air, et notamment avec l'oxygène qu'il contient.^[496, 515] Enfin, dans certaines conditions, une oligomérisation des composés contenant une cyclooctyne est décrite.^[514, 516] Cela résulte en la formation d'agrégats qui peuvent influencer sur la solubilité des produits dans certains solvants (Figure III.9.c). De plus, tous ces réarrangements et ces réactions subis par les cyclooctynes les rendent évidemment inactives vis-à-vis de la cycloaddition avec les azotures et empêchent donc la formation de triazoles comme prévu par la SpAAC. Ces phénomènes sont sans doute à l'origine des traces d'impuretés visibles lors de la caractérisation RMN du monomère juste après sa purification sur colonne de silice. Ces réactions secondaires peuvent évidemment également prendre place lorsque la cyclooctyne se trouve au bout des chaînes en croissance sur le support solide, induisant des potentielles réactions interchaînes qui, après clivage, mènent à des produits de structures, de masses et donc de séquences différentes de celles attendues. Quoi qu'il en soit, dans ce cas-là, comme lors des isomérisations, la chaîne attachée à la résine ne présente plus de site réactif et ne peut plus subir de cycloaddition SpAAC, et la croissance est alors bloquée et terminée. Encore une fois, la structure, la masse et la séquence du produit résultant diffèrent de celles visées.

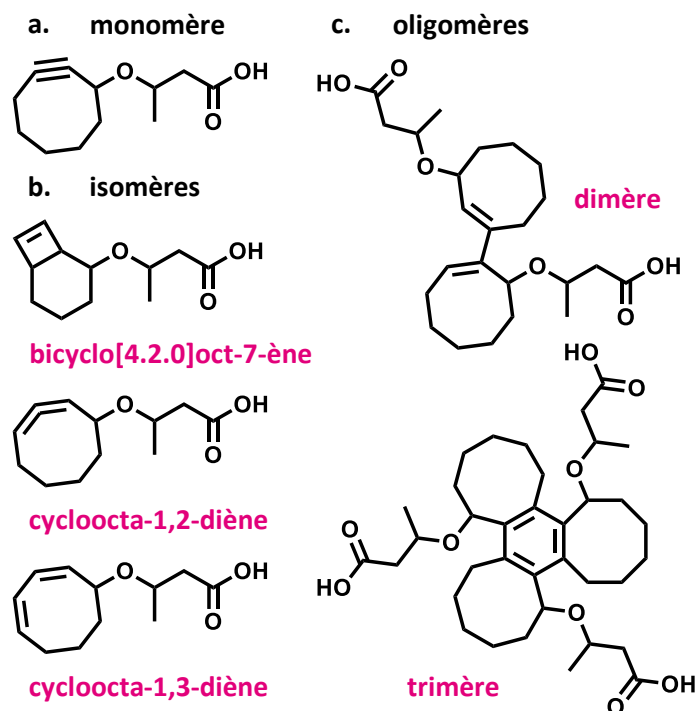


Figure III.9. Guide (non exhaustif) des réarrangements et réactions subis par le monomère codant pour le bit 1 contenant la cyclooctyne (III-2). a. Structure du monomère. b. Produits d'isomérisations. c. Produits d'oligomérisations.

La trop forte instabilité de la cyclooctyne et sa dégradation trop rapide malgré les précautions prises quant au stockage du produit ne permettent donc pas la synthèse, et encore moins la caractérisation d'oligo(triazole amide)s avec un procédé ne faisant pas appel à un catalyseur au cuivre. Afin de contrecarrer ces problèmes, plusieurs solutions existent. En premier lieu, un changement de stratégie pourrait être envisagé. En effet, l'approche « AB+CD » employée ici, calquée sur celle des synthèses du chapitre II, mène à des produits intermédiaires finissant par la cyclooctyne entre deux étapes. Ils ont alors tout le loisir de subir les réorganisations citées précédemment. En modifiant les fonctionnalités des deux monomères utilisés, ce contretemps pourrait être évité. Le bloc AB pourrait par exemple être porteur de l'acide carboxylique, comme c'est déjà le cas, et de l'azoture, en remplacement de la cyclooctyne, tandis que le monomère CD contiendrait en retour l'amine primaire et la cyclooctyne (Figure III.10). Ainsi, le cycle à huit carbone ne se présenterait, pendant la synthèse, sous la forme d'une cyclooctyne, seulement lors de l'ajout du monomère CD dans le milieu, et serait immédiatement stabilisé avec la formation du triazole au cours de cette étape. Les bouts des chaînes en croissance intermédiaires seraient alors, en alternance, un azoture ou une amine. Un élément reste à prendre en compte : la stabilité des nouveaux monomères. En effet, il ne faut pas perdre de vue que la présence d'un azoture dans un composé organique peut induire une certaine explosivité du produit en question. Il faut donc veiller, comme cela a été le cas dans toutes les structures utilisées jusqu'à présent, à ce que la structure utilisée pour le nouveau monomère AB respecte une composition satisfaisante en terme d'atomes d'azote, d'oxygène et de carbone, afin de limiter ces risques.^[370]

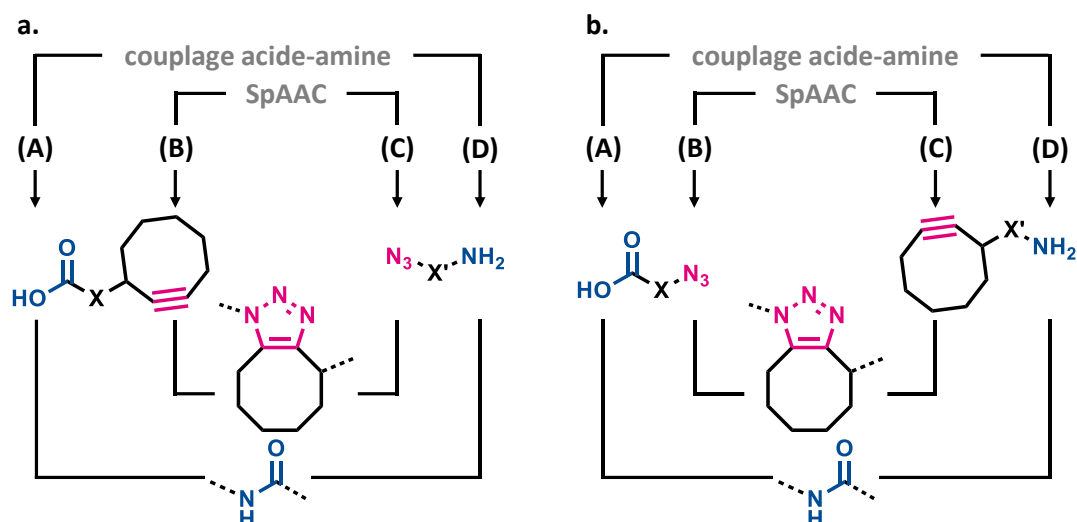


Figure III.10. Approches « AB+CD » possibles pour la voie de synthèse sans cuivre des poly(triazole amide)s. a. Stratégie utilisée. b. Stratégie imaginée pour limiter les cyclooctynes intermédiaires.

En complément, des nouvelles structures ont été développées ces dernières années, qui pourraient aider à faciliter cette voie de synthèse sans cuivre. Ces nouvelles générations de cyclooctynes (Tableau III.2) ont été créées avec l'objectif de stabiliser un peu plus les composés, mais aussi d'augmenter leur réactivité.^[497, 501, 517] Deux catégories ont été particulièrement étudiées : les composés fluorés et les composés diarylés. Les premiers, développés tout de suite après les premières utilisations de cyclooctynes dans les réactions de SpAAC, ont permis d'augmenter jusqu'à un facteur 60 la cinétique de la cycloaddition par l'insertion en α de l'alkyne de groupements électroattracteurs, tout en garantissant une compatibilité biologique chère au groupe de Bertozzi.^[501, 518-520] Les seconds, porteurs d'une cyclooctyne dibenzoannulée, sont également beaucoup plus réactifs de par l'augmentation de la contrainte du cycle induite par ces groupements aryles qui entourent le cycle à huit carbones.^[503, 521-525]

Nom de la structure	Abréviation	Structure	Année de découverte
Cyclooctyne	OCT		2004
Monofluorocyclooctyne	MOFO		2006
Difluorocyclooctyne	DIFO		2007
Dibenzocyclooctyne	DIBO		2008
Dibenzoazacyclooctyne	DIBAC		2010

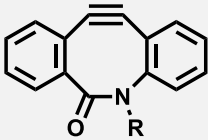
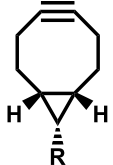
Nom de la structure	Abréviation	Structure	Année de découverte
Biarylazacyclooctynone	BARAC		2010
Bicyclononyne	BCN		2010

Tableau III.2. Liste (non exhaustive) des nouvelles générations de cyclooctynes pour une utilisation dans des réactions de cycloadditions.^[497]

De ces progrès divers pourraient être imaginées des nouvelles structures de monomères pour la synthèse de poly(triazole amide)s sans cuivre qui seraient plus stables, plus réactifs, et qui aideraient sans doute à obtenir les séquences souhaitées tout en améliorant les conditions.

3. Conclusions

Une voie de synthèse des poly(triazole amide)s ne faisant pas intervenir de catalyseur au cuivre, responsable de problèmes de réactivité et de solubilité notamment, est donc imaginée suite aux développements récents de la réaction de SpAAC (pour *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*). Un monomère contenant une cyclooctyne, fonction principale intervenant dans la SpAAC, est synthétisé. La cyclooctyne, grâce à la tension de son cycle induite par les angles autour de la triple liaison, réagit spontanément avec un azoture organique pour former un groupement triazole. Le catalyseur devient donc inutile et la synthèse, plus propre d'un point de vue environnemental, doit, en théorie, mener à des oligomères plus solubles dans les solvants usuels et donc plus facilement caractérisables.

Dans un premier temps, le monomère codant pour le bit 1, composé d'un acide carboxylique et d'une cyclooctyne, est synthétisé avec succès, même si le rendement global de cette synthèse est relativement faible. Cependant, la caractérisation de celui-ci par RMN dévoile déjà une dégradation spontanée du produit, très certainement due à la fois à l'air, à la température et à la lumière. Des conditions drastiques sont alors nécessaires pour la conservation du monomère. La synthèse d'un oligomère est ensuite effectuée à partir de ce monomère et de l'unité intercalante constituée d'une chaîne PEG déjà utilisée dans les synthèses avec cuivre. La caractérisation de la séquence se montre néanmoins très compliquée. En effet, la solubilité du produit n'est pas assez améliorée, rendant certaines analyses difficiles. De plus, l'analyse par SEC révèle la présence dans l'échantillon de plusieurs espèces, preuve de la polymolécularité des chaînes. Il est également impossible, à partir des informations données par cette technique, d'assurer que la séquence désirée ait été obtenue. Une étude en spectrométrie de masse pourrait éclaircir ce point, mais l'insolubilité des produits couplée à une probable dégradation due aux conditions de transport de ceux-ci rend cette analyse impossible.

Plusieurs solutions pourraient aider à résoudre les différents problèmes rencontrés avec le monomère et l'oligomère. D'abord, une structure de monomère inspirée des nouvelles générations de cyclooctynes, plus stables et plus réactives, devrait permettre de compléter les étapes plus facilement,

plus rapidement et avec un rendement quantitatif souhaitable pour une synthèse de polymère à séquence définie. Ensuite, un changement de stratégie itérative, à travers une inversion des fonctionnalités des monomères, permettrait de limiter le nombre d'intermédiaires finissant par une cyclooctyne entre deux étapes, empêchant par le même coup la dégradation des chaînes en croissance, et favorisant donc l'isomolécularité du produit final. La courte étude préliminaire pourrait donc être poussée un peu plus loin grâce à ces différentes perspectives afin de développer, avec succès, cette nouvelle voie de synthèse de poly(triazole amide)s sans cuivre.

Chapitre IV

Application à la synthèse d'acides xénonucléiques

1. Introduction

Le chapitre II et le chapitre III concernent la synthèse de polymères à séquences définies contenant des codes numériques synthétiques définis par des groupements latéraux disséminés le long des chaînes. Le langage binaire utilisé permet d'implémenter des messages en langage ASCII à raison d'un bit d'information par unité codante. Intercalés entre ces unités codantes, des espaceurs aident à conférer aux macromolécules des propriétés physiques mais n'apportent pas d'information au code de la chaîne. Cela entraîne une perte d'espace et donc une densité d'information qui n'est pas optimale. Afin de pallier ce problème, il est possible d'insérer à chaque étape de la synthèse une unité codante, qui augmenterait donc cette densité d'information.

Comme décrit dans le chapitre I (voir I.2.1.3.3), les acides xénonucléiques (XNAs) sont des analogues des acides nucléiques,^[7] qui portent les bases caractéristiques de ceux-ci (adénine, cytosine, guanine, thymine ou uracile) sur un squelette principale synthétique,^[49, 52, 526] qui peuvent être ordonnées en séquences aperiodiques.^[51] Ils forment donc un pont entre deux domaines majeurs : la biologie et la chimie de synthèse.^[527, 528] L'exemple le plus marquant est celui des acides nucléiques peptidiques (PNAs)^[17, 18, 53] de Peter E. Nielsen, décrit au début des années 1990. Sur la base d'une synthèse peptidique^[5] (voir I.2.2.3) à partir d'acides aminés modifiés, porteurs donc des bases azotées des acides nucléiques, il construit ces PNAs composés d'un squelette 2-aminoéthylglycine sur lequel sont attachées les bases. Il parvient donc à implémenter le long des chaînes, un code basé sur un alphabet quaternaire (en utilisant par exemple uniquement les bases A, C, T et G de l'ADN) pour lequel une base est insérée à chaque ajout d'un monomère. Cependant, la synthèse de ces PNAs, si elle n'est pas réalisée à l'aide de *templates* ADN ou ARN,^[54-56] repose, comme pour les synthèses de polypeptides traditionnelles, sur une approche itérative « AB+AB » (voir I.3.3.4) faisant donc intervenir des groupements protecteurs, et par conséquent, des étapes de déprotection (Figure IV.1). En effet, les acides aminés utilisés sont porteurs à la fois d'un acide carboxylique et d'une amine primaire, qui réagissent au cours d'une étape de couplage acide-amine. En l'absence de groupement protecteur, l'ajout du monomère en excès dans le milieu réactionnel entraînerait une polymérisation et donc l'addition de plusieurs unités pendant l'étape, résultant en une absence de contrôle de la séquence et en une polymolécularité des chaînes. Il est donc nécessaire de protéger l'amine primaire des monomères (voir I.2.2.3.3) afin d'empêcher cette polymérisation et de n'ajouter qu'une seule unité à chaque étape. Cependant, dans le but d'ajouter ensuite le synthon suivant, l'amine présente au bout de la chaîne en croissance doit être déprotégée, afin de pouvoir réagir à nouveau avec un acide carboxylique. Originellement utilisé, le groupement Boc est assez rapidement remplacé par un groupement Fmoc, clivable en conditions basiques.^[53] Cela permet de ne pas jouer sur les différents niveaux d'acidité entre déprotection de l'amine et clivage de la chaîne, assurant de ne pas séparer les chaînes de la résine en même temps que le Boc est éliminé. Les amines présentes sur les bases nucléiques sont, elles, protégées par un groupe Cbz, partant également dans les conditions acides du clivage final.

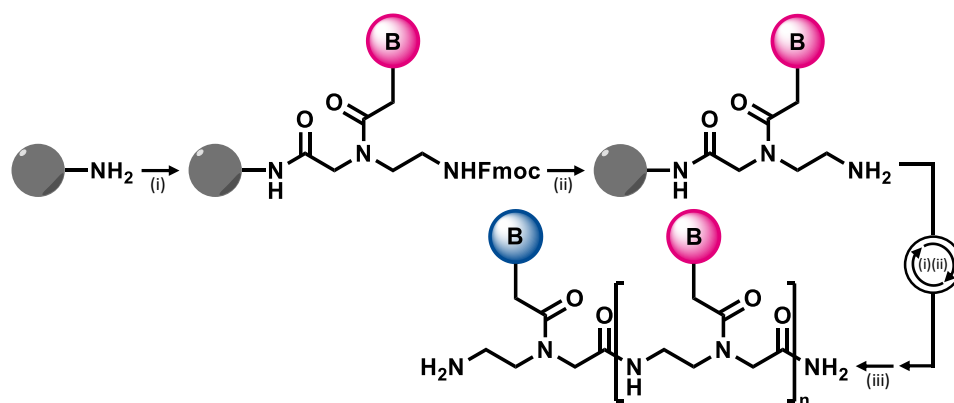


Figure IV.1. Schéma général de la synthèse des PNAs à partir d'une résine MBHA (voir I.2.2.3.1).^[53] (i) Amidification : monomère protégé, agent de couplage, base, solvant. (ii) Déprotection de l'amine terminale : pipéridine, solvant. (iii) Étape de clivage par HF.

Dans la lignée de ces travaux, le groupe de Winssinger décrit en 2010 la synthèse de PNAs « clickables » (cPNAs), intégrant des fonctions triazoles à certains points de la chaîne.^[529] En fait, une réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre est utilisée afin de lier des fragments de PNAs. Cette manœuvre a pour but premier d'améliorer les propriétés physiques des PNAs, et notamment leur résistance à la température et aux attaques chimiques et biologiques.

Un autre des intérêts de ces deux types de XNAs est leur capacité à interagir avec des acides nucléiques naturels. En effet, le squelette des PNAs par exemple a été imaginé de telle sorte que l'espacement des bases soit identique à celui de l'ADN ou de l'ARN.^[17] Cette propriété résulte en la possibilité de former des complexes en présence d'acides nucléiques double-brin ou simple-brin en respectant l'appariement des bases selon le schéma de Watson et Crick (voir I.2.1.1.1).^[17, 18, 57] La température de fusion de ces complexes est même, comme prévu, plus élevée que pour les complexes naturels,^[17, 57, 60] preuve de la stabilité plus importante des complexes de PNAs vis-à-vis de la température. De même, il a été montré que l'insertion de groupements triazoles, isostères des amides^[330] et déjà utilisés comme peptidomimétiques^[316] du fait de leur aptitude à donner des conformations spatiales similaires aux polypeptides^[352, 530, 531], en remplacement de certaines liaisons amides de la chaîne n'altérerait en rien la capacité de ces oligomères à s'hybrider avec les acides nucléiques naturels.^[529, 532]

Dans ce contexte, la synthèse d'oligo(triazole amide)s par une approche itérative « AB+CD » sur support solide telle que celle décrite dans le chapitre II est adaptée à la synthèse de XNAs (Figure IV.2.c), dans le but à la fois de faciliter les conditions de synthèse de certains analogues tels que les PNAs par l'abandon de la chimie de protection, mais aussi, sans altérer leur propension à s'hybrider avec des séquences naturelles complémentaires, d'améliorer leurs propriétés physiques et notamment d'augmenter la température de fusion des complexes formés avec les acides nucléiques. Ainsi, deux structures de monomères ont été imaginées pour permettre cette synthèse requérant deux réactions orthogonales que sont le couplage acide-amine permettant la formation d'un amide et la CuAAC menant à la formation d'un triazole. Un premier monomère est porteur des fonctions acide carboxylique et azoture, le second est composé des fonctions alcyne et amine primaire (Figure IV.2.a). Dans les deux cas, quatre dérivés sont synthétisés, portant l'une des quatre bases azotées de l'ADN : la thymine, l'adénine, la cytosine ou la guanine (Figure IV.2.b). Cette nouvelle classe de XNAs est nommée acide nucléique peptide triazole (PTzNA pour *peptide triazole nucleic acid*).

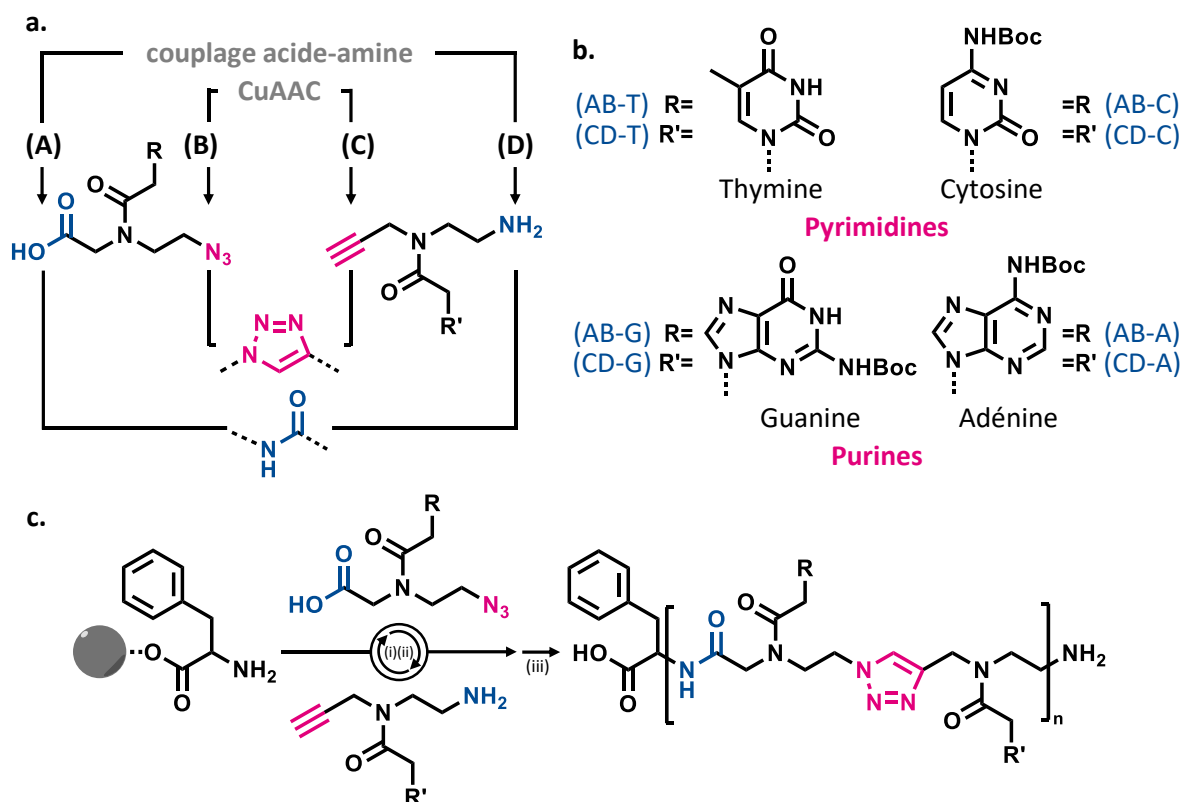


Figure IV.2. Concept général de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des PTzNAs. *a.* Stratégie « AB-CD » étudiée pour la synthèse des PTzNAs. Cette approche nécessite l'emploi de deux monomères AB et CD contenant quatre fonctions orthogonales A, B, C et D. *b.* Structure des monomères utilisés. *c.* Schéma général pour la synthèse itérative des polymères. (i) Amidification. (ii) CuAAC. (iii) Étape de clivage.

2. Synthèse itérative de PTzNAs

2.1. Stratégie générale

Comme pour les séquences synthétiques présentées dans le chapitre II, la synthèse des PTzNAs est basée sur deux réactions orthogonales mettant en jeu quatre fonctions réactives. Il est donc nécessaire d'utiliser deux types de monomères différents portant chacun deux de ces quatre fonctions. Les structures de monomères décrites par Winssinger en 2010,^[529] adaptées ici pour la synthèse des PTzNAs, présentent une différence par rapport à celles des monomères utilisés dans les précédents chapitres puisque les associations de fonctions ne sont pas les mêmes. En effet, alors que précédemment, le premier bloc portait les fonctions acide carboxylique et alcyne alors que le second portait les fonctions amine et azoture (voir II.2.1), ici, c'est le contraire : le monomère appelé AB est composé d'un acide carboxylique (A) et d'un azoture (B) et le monomère CD porte un alcyne (C) et une amine primaire (D). Ces deux types de monomères sont déclinés selon les quatre bases nucléiques de l'ADN, la thymine (T), l'adénine (A), la cytosine (C) et la guanine (D), donnant lieu à la formation d'une librairie de huit monomères (voir IV.2.2) à partir desquels il est possible de synthétiser n'importe quelle séquence.

La synthèse des oligomères est effectuée sur une résine Wang fonctionnalisée par un acide aminé comme celle qui a été utilisée dans le chapitre II (Figure IV.3). Des essais non concluants ayant été effectués sur une résine commerciale fonctionnalisée par une glycine (voir IV.2.3.1), c'est finalement la phénylalanine qui a été retenue. Le groupement Fmoc protégeant l'amine primaire de la

phénylalanine est éliminé grâce à la pipéridine et le premier monomère AB est ajouté par couplage acide carboxylique-amine primaire en présence d'un agent de couplage et d'une base. Une fois la réaction terminée et la résine lavée, une cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) a lieu pour attacher un monomère CD à l'azoture terminal. Cette étape est réalisée en présence d'une source de cuivre (I), d'un ligand et, si besoin, d'un réducteur du cuivre pour éviter qu'il ne s'oxyde en cuivre (II). Une amine primaire est de nouveau présente au bout des chaînes en croissance et un nouveau cycle peut avoir lieu. Pour ces deux réactions, les conditions diffèrent selon la base nucléique présente sur le monomère ajouté (voir IV.2.3). Des cycles de ces deux étapes sont effectués jusqu'à l'obtention de la séquence désirée. L'oligomère est alors séparé de la résine lors d'une étape de clivage en conditions acides, en présence d'acide trifluoroacétique (TFA), puis purifié par précipitation et par des lavages successifs au diéther (Et₂O).

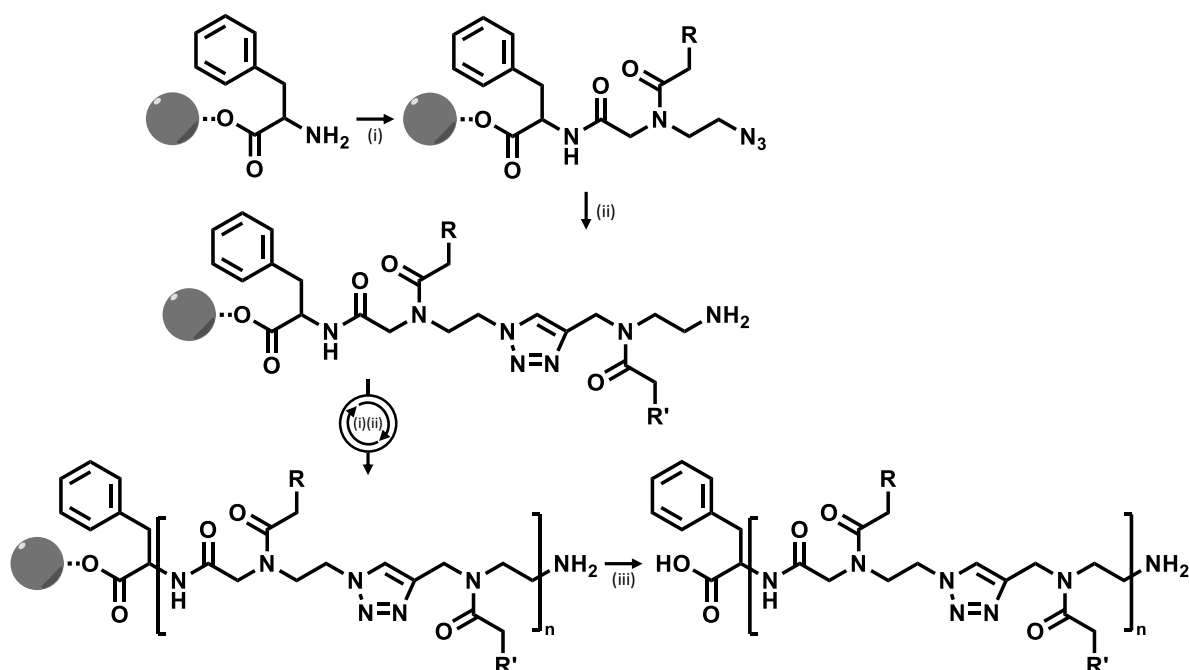


Figure IV.3. Schéma de la synthèse itérative, orthogonale et supportée des PTzNAs. (i) Amidification : monomère, agent de couplage, base, solvant. (ii) CuAAC : monomère, source de cuivre (I), ligand, solvant. (iii) Étape de clivage : TFA, DCM, 2h.

2.2. Synthèse des monomères

Une librairie de huit monomères est nécessaire à la synthèse des PTzNAs (Figure IV.4). Il est à noter que les amines primaires présentes sur les bases nucléiques (A, C et G seulement) sont protégées par un groupement Boc clivable en conditions acides.

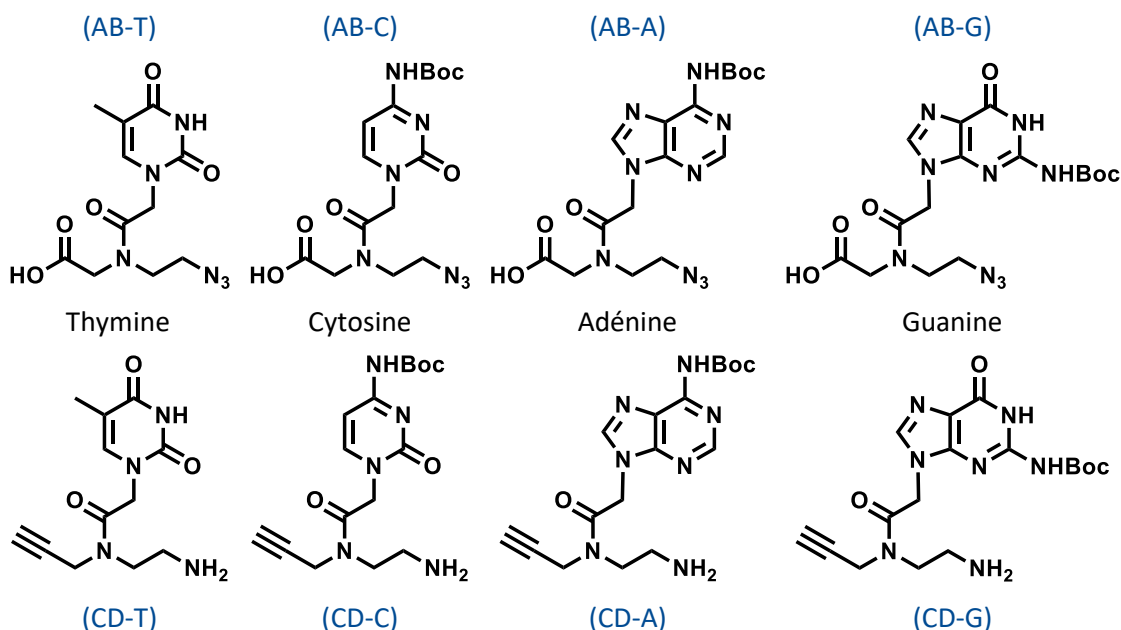


Figure IV.4. Structures chimiques des huit monomères utilisés pour la synthèse de PTzNAs.

2.2.1. Synthèses des blocs AB

Les monomères de type AB portant les fonctions acide carboxylique et azoture sont synthétisés en suivant le protocole précédemment décrit dans la littérature.^[529] Cette synthèse comprend trois étapes : la formation du squelette (sur lequel l'acide est protégé), la fonctionnalisation par la base nucléique à travers une liaison amide, et la déprotection de l'acide (Figure IV.5). L'acide est en premier lieu protégé par un groupement benzyle (Bn), qu'il est possible d'éliminer tout simplement en conditions basiques. Le squelette, formé donc d'un acide carboxylique protégé et d'un azoture entre lesquels est positionnée une amine servant à accueillir la base nucléique, est issu de l'addition d'azoture de sodium sur la 2-bromoéthylamine, en présence du bromoacétate de benzyle. La base, sous forme d'acide, est ensuite attachée par une amidification réalisée en présence d'un agent de couplage, l'héxafluorophosphate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium (HBTU), et d'une base, la triéthylamine. Enfin, la déprotection de l'acide carboxylique se fait en présence de soude.

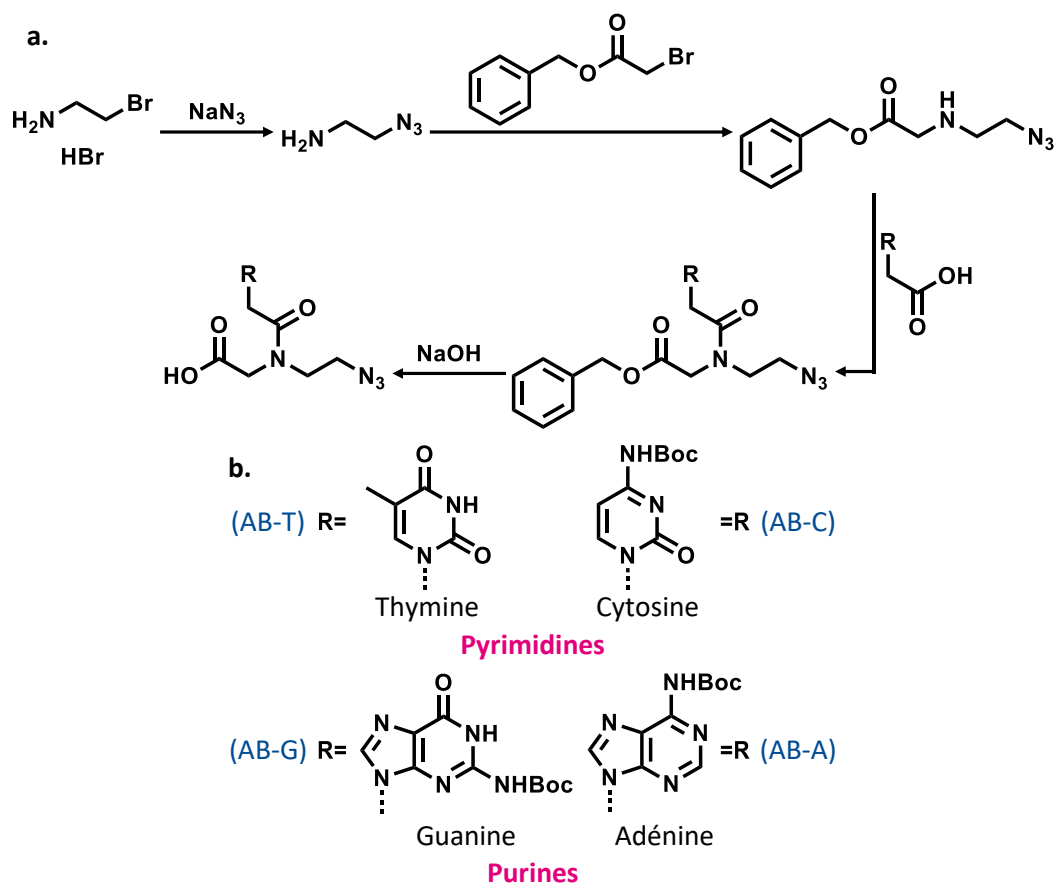


Figure IV.5. Synthèse des blocs AB. a. Schéma général de la synthèse des monomères AB. b. Structure des monomères obtenus.

2.2.2. Synthèses des blocs CD

En ce qui concerne les monomères de type CD, porteurs des fonctions alcyne et amine primaire, les protocoles décrits dans la littérature^[529] ne concernent que le cas où l'amine est protégée par un groupement méthyltrityle (Mtt), ce qui n'est pas nécessaire dans une approche orthogonale telle que celle utilisée pour les PTzNAs. C'est pourquoi les monomères déprotégés sont synthétisés. Les synthèses des monomères portant l'adénine (CD-A), la cytosine (CD-C) ou la guanine (CD-G) ont été réalisées par Laurence Oswald et se basent sur la même approche (Figure IV.6). Une étape de déprotection de l'amine est simplement ajoutée. La synthèse se fait donc en quatre étapes : la formation du squelette, la protection de l'amine terminale, l'ajout de la base nucléique par amidification et la déprotection de l'amine terminale. Le squelette est formé par l'addition de l'éthylène diamine sur le chlorure de propargyle. L'amine primaire terminale est ensuite protégée par un groupement Mtt amené par le chlorure de 4-méthyltrityle. L'amine secondaire restante, au milieu de la chaîne, permet d'attacher la base souhaitée dans les mêmes conditions que pour les blocs AB. L'amine primaire du squelette est finalement déprotégée grâce à un mélange acide trifluoroacétique/triisopropylsilane (TFA/TIS).

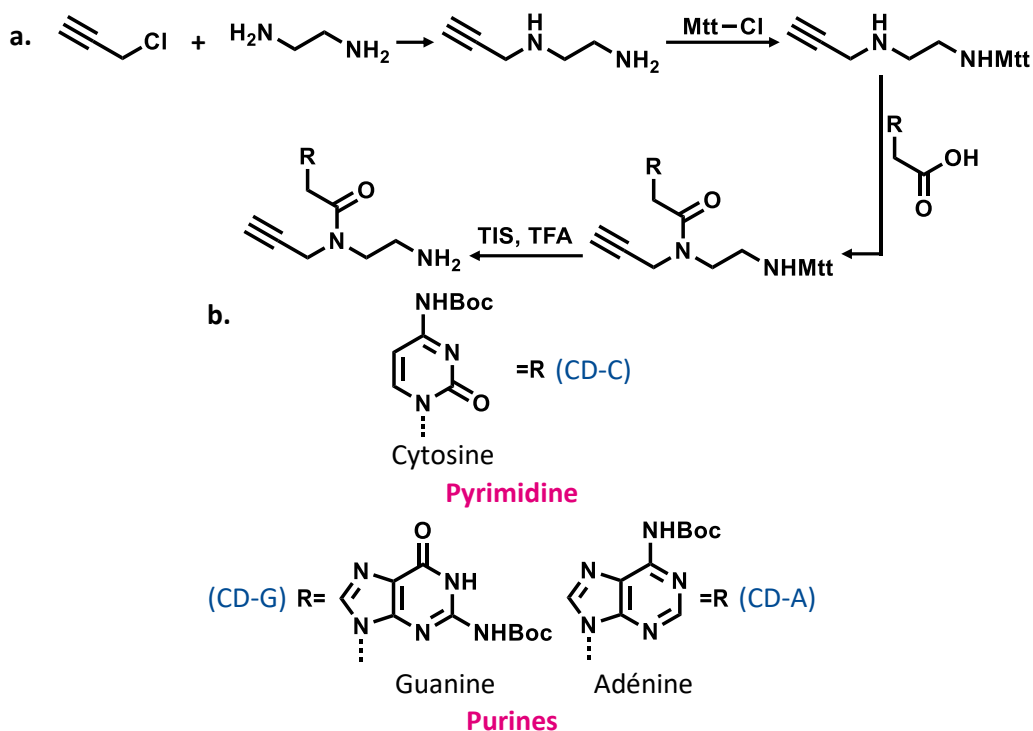


Figure IV.6. Synthèse des blocs CD. a. Schéma général de la synthèse des monomères CD. b. Structure des monomères obtenus.

Pour le monomère fonctionnalisé avec la thymine (CD-T), une stratégie un peu différente est utilisée (Figure IV.7). L'amine primaire du squelette n'est plus protégée par un groupement Mtt mais par un groupement Boc, dont la déprotection en milieu acide est plus aisée puisque la thymine elle-même ne comporte pas d'amine primaire. Le squelette protégé est cette fois-ci issu en une seule étape d'une réaction entre le N-Boc-éthylène diamine et le bromure de propargyle. La thymine est ensuite attachée comme précédemment et le Boc est finalement éliminé par ajout de TFA.

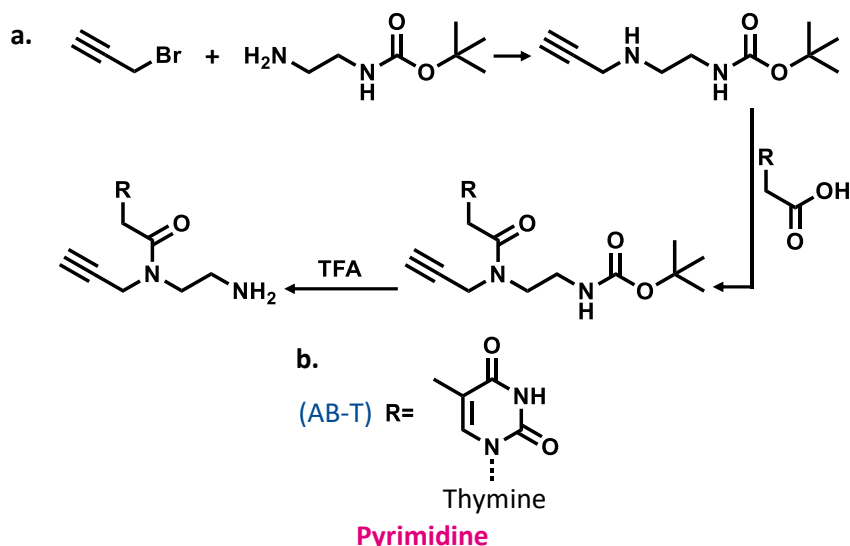


Figure IV.7. Synthèse du bloc CD-T. a. Schéma général de la synthèse du monomère CD-T. b. Structure du monomère obtenu.

2.3. Synthèse des oligomères

2.3.1. Des premières tentatives prometteuses

Quelques ajustements ont été apportés à la suite des premiers essais de synthèses de PTzNAs, les conditions ne menant pas forcément aux résultats escomptés. Néanmoins, ces tentatives ont amené des résultats prometteurs qui ont ouvert la voie à ces optimisations. Les monomères portant des thymines (AB-T et CD-T) étant les plus faciles à produire, et les moins coûteux, des homopolymères de séquences ne contenant que des thymines ont été synthétisés pour les premiers tests. Les réactions sont menées dans le DMF. Pour le couplage acide-amine, des solutions mères des réactifs sont préparées : une solution de concentration $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pour le monomère, une solution de concentration $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ pour l'agent de couplage et une solution de bases de concentration $1,8 \text{ mol.L}^{-1}$ en 2,6-lutidine et $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$ en DIPEA. Ces solutions sont ensuite mélangées dans les bonnes proportions pour activer tous les réactifs et déposées sur la résine. Pour ce qui est de la CuAAC, les réactifs sous forme solide (le monomère, la source de cuivre, CuBr, et le ligand, dNbipy) sont déposés sur la résine. Le tube subit des cycles vide-argon pour que la réaction se fasse sous atmosphère inerte et le solvant est finalement injecté. Le dispositif est agité pendant la réaction. Au-delà du choix des réactifs, plusieurs facteurs sont importants dans cette synthèse supportée, comme le volume de solution déposé et la concentration en réactifs dans le milieu, ou encore la capacité de la résine à gonfler dans le solvant choisi, qui modifie l'accessibilité des sites réactifs.

En premier lieu, la résine utilisée n'est pas fonctionnalisée par une phénylalanine mais c'est la résine Wang porteuse d'une glycine, commerciale, qui est choisie. Pour les premières synthèses, c'est l'agent de couplage HBTU qui est utilisé pour l'amidification. Le volume du mélange de réactifs déposé est alors d'environ $120 \mu\text{L}$ pour 10 mg de résine. La réaction est maintenue 1h. Pour l'étape de « click », ce sont $0,5 \text{ mL}$ de solvants qui sont injectés. Cette étape est réalisée en 3h. Dans ces conditions, la séquence de neuf thymines synthétisée est obtenue (composé IV-3). Cependant, le spectre MALDI-TOF du produit montre également la présence de tous les congénères des étapes précédentes aux séquences tronquées (Figure IV.8). Cet essai prouve tout de même qu'il est possible d'obtenir l'oligomère souhaité.

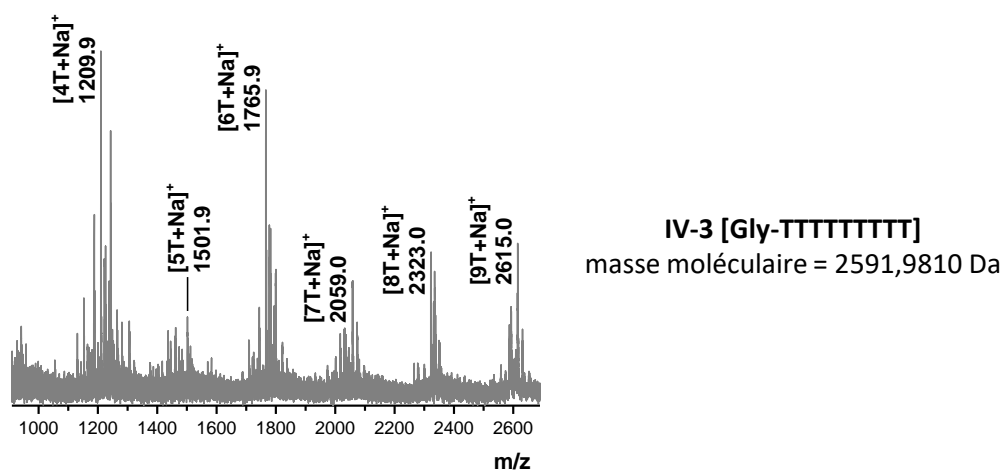


Figure IV.8. Spectre MALDI-TOF de la première séquence de PTzNA [Gly-TTTTTTTTT] (IV-3).

Des ajustements sont ensuite effectués. Notamment, les temps de réactions ont été doublés, le nombre de répétitions des étapes également, le volume de solution déposé a été augmenté (à

concentrations égales) afin de s'assurer que toute la résine était couverte, les quantités de matière ont été modifiées, certains réactifs également, et notamment l'agent de couplage pour l'amidification. Les résultats de ces essais ne sont cependant pas concluants puisque la polymolécularité des chaînes est toujours observée. Néanmoins, certains changements de conditions sont conservés comme le volume de solution déposé sur la résine plus important ou la répétition de l'étape d'amidification (la solution du mélange monomère/agent de couplage/base est finalement déposée deux fois pendant 30 min) par exemple. Finalement, grâce à la combinaison de ces optimisations, un oligomère isomoléculaire de huit thymines (composé IV-4) est tout de même obtenu et un suivi à chaque étape en MALDI-TOF permet de vérifier que celles-ci sont complètes (Figure IV.9). Des pics d'impuretés demeurent (visibles au niveau des deux dernières étapes notamment) mais ils ne correspondent pas aux produits des étapes précédentes et ne sont donc pas issus d'étapes incomplètes.

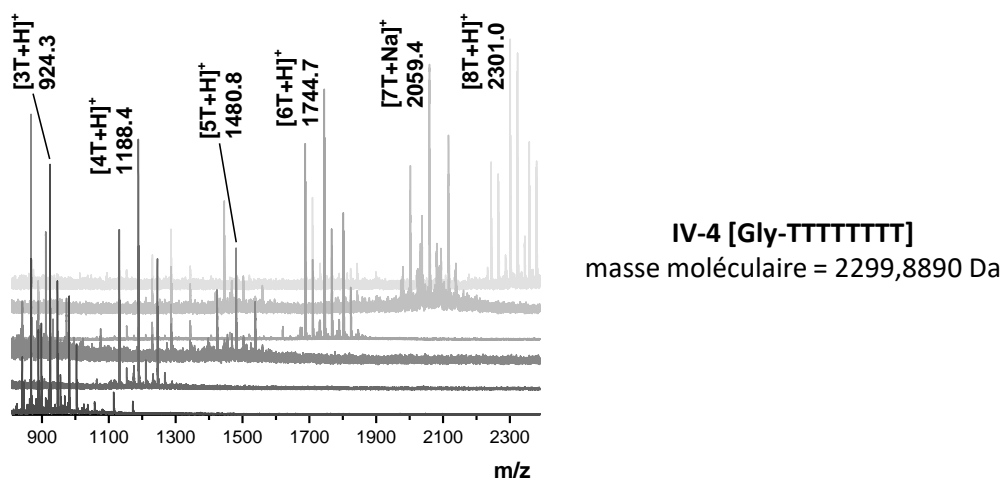


Figure IV.9. Superposition des spectres MALDI-TOF après les 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} étapes de synthèse de la séquence de PTzNA [Gly-TTTTTTTT] (IV-4) avec des conditions optimisées.

En plus de ces impuretés dont l'origine n'est pas claire, un autre problème subsiste dans ces analyses : la présence de pics satellites récurrents à ± 57 Da par rapport aux pics des produits. Comme brièvement expliqué dans le chapitre II (voir II.2.1), le faible encombrement de la glycine présente sur la résine et, après clivage, en début de chaîne, la rend vulnérable à une hydrolyse par un acide, comme le TFA justement utilisé pour le clivage. Cela provoque une fragmentation au niveau de cette glycine et des écarts de -57 Da, dont cette analyse est la parfaite illustration.^[480] Ce phénomène est en particulier largement observé pour l'analyse de protéines. Les pics présents à $+57$ Da peuvent eux s'expliquer tout simplement par la formation d'adduits avec des ions sodium et potassium au cours de l'analyse en spectrométrie de masse. Pour pallier ce problème, il est donc nécessaire de modifier le linker utilisé sur la résine, la glycine, par un autre qui ne subirait pas la fragmentation.

2.3.2. Une nouvelle résine : un changement clé

Une résine fonctionnalisée par une phénylalanine, comme pour les synthèses du chapitre II (voir II.2.1) est donc ensuite utilisée pour toutes les synthèses. Celle-ci, plus encombrée par la présence du groupement phényle, ne subit pas l'hydrolyse acide et n'est donc pas fragmentée. En outre, l'agent de couplage pour l'amidification utilisé jusqu'à présent, HBTU, est remplacé par une structure plus réactive découverte récemment,^[533-535] donnant de meilleurs rendements : l'héxafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HATU). Un oligomère contenant une séquence de huit thymines (composé IV-5) comme précédemment est synthétisé dans ces conditions

et paraît pratiquement isomoléculaire en analyse ESI-MS (Figure IV.10.a). Seul un congénère inférieur correspondant à une séquence de six thymines est visible sous sa forme doublement protonée de manière minoritaire à m/z 917,9 Da. Cette tendance est confirmée lors d'un second essai pour une chaîne un peu plus courte de six thymines (composé IV-6-6, Figure IV.10.b), qui comporte une nouvelle fois de manière très minoritaire des traces de séquences tronquées correspondant à 5 thymines (X_3), 4 thymines (X_2) et 3 thymines (X_1).

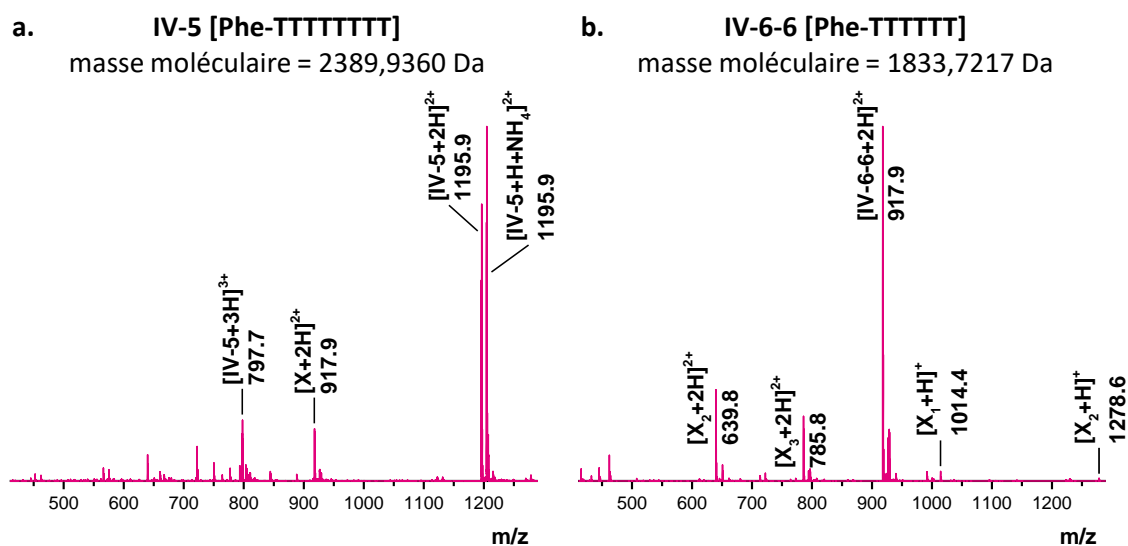


Figure IV.10. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTTTTTTT] (IV-5) (a) et [Phe-TTTTTT] (IV-6-6) (b) de PTzNAs.

Suivant le même protocole, des essais sont aussi conduits afin d'intégrer des cytosines, également dans la catégorie des pyrimidines puisque de structure très proche des thymines, dans la chaîne à plusieurs positions. Dans le premier oligomère synthétisé, la cytosine est placée en fin de séquence grâce à une réaction CuAAC (composé IV-7, Figure IV.11.a). Le spectre de masse correspondant est parfait puisque seule la séquence [Phe-TTTTTTC] est observée. C'est la preuve de l'efficacité de ces conditions pour les pyrimidines. De même, en plaçant une cytosine également en début de chaîne grâce à une amidification (composé IV-8, Figure IV.11.b), le composé [Phe-CTTTTC] est majoritaire, même si des impuretés correspondant à des séquences [Phe-TTTC] (X_2) et [Phe-CTTC] (X_1) sont visibles minoritairement.

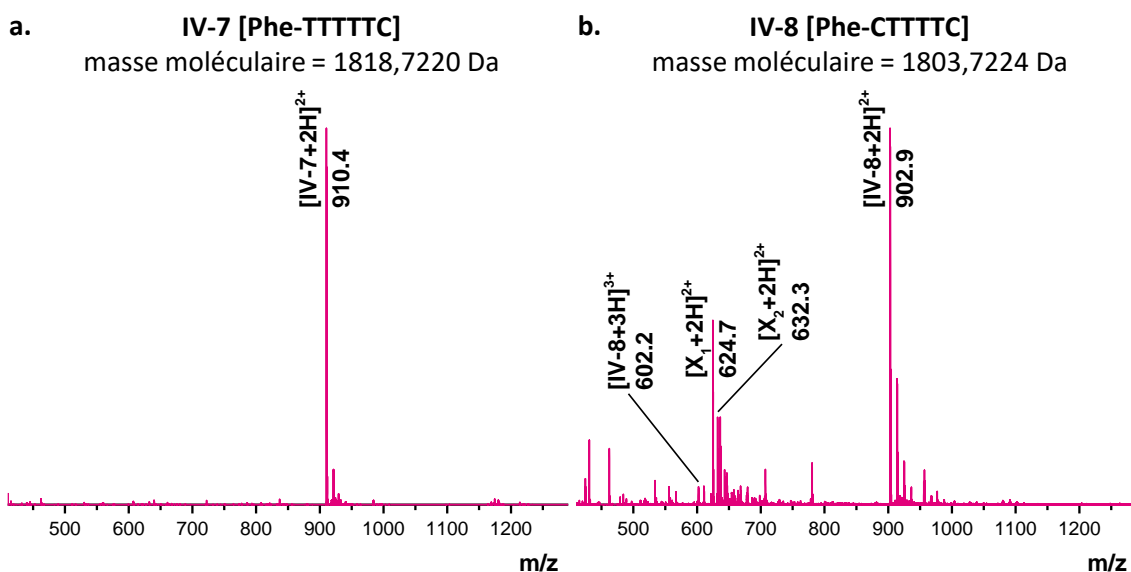


Figure IV.11. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTTTTC] (IV-7) (a) et [Phe-CTTTTC] (IV-8) (b) de PTzNAs.

2.3.3. Des problèmes avec certaines bases nucléiques : optimisation pour chaque situation

Si l'incorporation des bases pyrimidiques se déroule sans soucis, ce n'est pas forcément le cas des bases puriques. En effet, l'ajout par exemple d'une guanine en bout de chaîne par CuAAC est un échec. La séquence [Phe-TTTTTG] (composé IV-9) est à peine visible tandis que l'oligomère tronqué [Phe-TTTTT] contenant 5 thymines (X) est bien observé (Figure IV.12), preuve que l'addition du bloc CD-G est ratée.

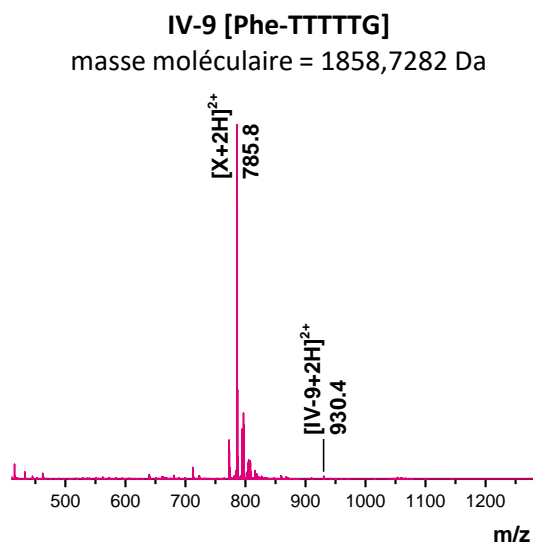


Figure IV.12. Spectre ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTTTG] (IV-9) (CuAAC avec CuBr/dNbipy).

De plus, même si l'ajout d'une guanine par amidification au milieu d'une séquence contenant déjà des thymines et une cytosine (séquence [Phe-TTCTGT], composé IV-10) est une réussite dans les mêmes conditions que pour les pyrimidines (Figure IV.13.a), la même expérience pour un ajout par réaction « click » (séquence [Phe-TCTGTT], composé IV-11) est loin d'être satisfaisante (Figure IV.13.b).

Seule une séquence tronquée [Phe-TCTT] (X) est alors observée à 632,3 Da sous une forme doublement protonée.

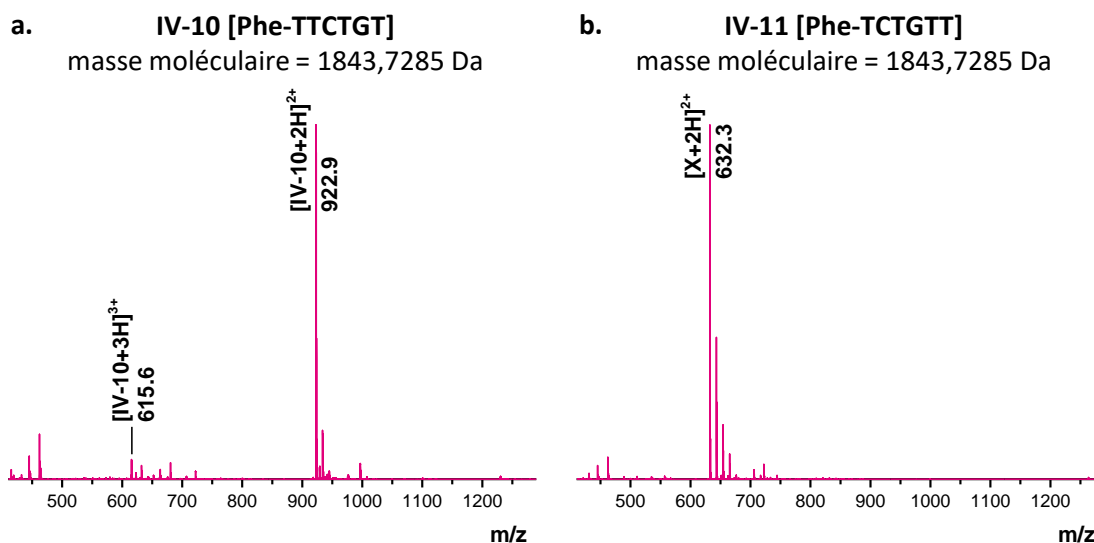


Figure IV.13. Spectres ESI-HRMS des séquences [Phe-TTCTGT] (IV-10) (a) et [Phe-TCTGTT] (IV-11) (CuAAC avec CuBr/dNbipy) (b) de PTzNAs.

Un essai d'ajouts en bouts de chaînes dans les mêmes conditions (séquence [Phe-GTTTTG], composé IV-12) donne le même résultat : la guanine du début de séquence est bien attachée par amidification tandis que pour celle de bout de chaîne, par CuAAC, ce n'est pas le cas. L'oligomère visé est cependant visible très minoritairement à 942,9 Da (Figure IV.14).

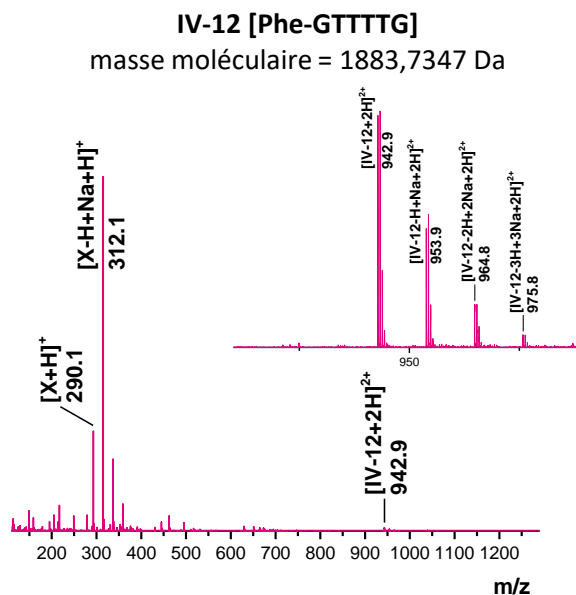


Figure IV.14. Spectre ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-GTTTTG] (IV-12) (CuAAC avec CuBr/dNbipy).

M = IV-13, IV-14, IV-15 et IV-16 [Phe-TTTGTT]
 masse moléculaire = 1858,7282 Da

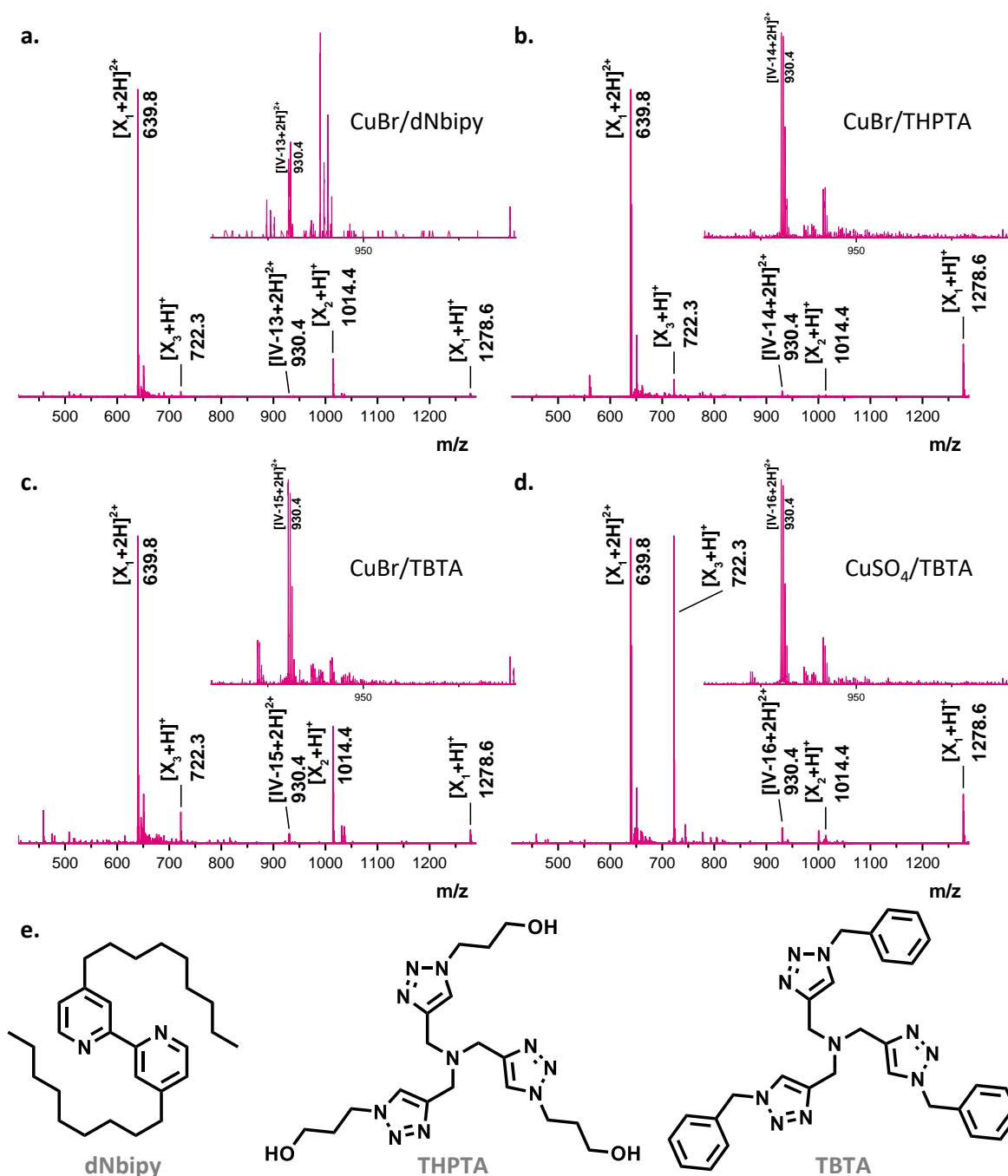


Figure IV.15. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTGTT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc CD-G. a. CuAAC du bloc CD-G avec CuBr/dNbipy (IV-13). b. CuAAC du bloc CD-G avec CuBr/THPTA (IV-14). c. CuAAC du bloc CD-G avec CuBr/TBTA (IV-15). d. CuAAC du bloc CD-G avec CuSO₄/TBTA (IV-16). e. Structures des différents ligands utilisés.

Des changements de conditions sont donc nécessaires pour les purines et notamment des blocs CD porteurs de l'alcyne et de l'amine primaire. La réaction de CuAAC mise en jeu fait intervenir une source de cuivre et un ligand qui forment un complexe qui doit être le plus stable possible pour catalyser au mieux la formation du triazole. L'utilisation du couple CuBr/dNbipy ne permet apparemment pas cette formation dans le cas de la guanine. Celle-ci perturbe en effet la coordination du ligand avec le cuivre en formant elle-même un complexe avec le cuivre. Le défi consiste donc à

trouver un ligand qui stabilise plus encore le cuivre et qui catalyse toujours la formation du triazole. Dans ce but, plusieurs ligands ont été essayés pour l'incorporation d'une guanine au milieu d'une chaîne de PTzNA constituée de thymines. Outre le 4,4'-dinonyl-2,2'-dipyridyl (dNbipy)^[327] utilisé habituellement (composé IV-13, Figure IV.15.a), deux structures assez similaires intégrant elles-mêmes trois triazoles qui stabilisent le catalyseur au cuivre^[371, 495, 529] sont essayées (Figure IV.15.e) : le tris-(hydroxypropyltriazolyméthyl)amine (THPTA) (composé IV-14, Figure IV.15.b) et le tris-(benzyltriazolyméthyl)amine (TBTA) (composé IV-15, Figure IV.15.c). Ces deux ligands sont connus pour avoir des caractéristiques stabilisantes du cuivre du fait de leur capacité à se lier de manière tétradentée à celui-ci, l'enveloppant ainsi complètement, et ne laissant aucun site de liaison disponible pour une potentielle déstabilisation du complexe catalyseur.^[371, 495] Comme c'est parfois le cas dans la littérature, TBTA est également couplé avec CuSO₄ en remplacement de la source habituelle de cuivre (I), CuBr (composé IV-16, Figure IV.15.d).^[529] Les résultats pour l'incorporation du bloc CD-G dans une séquence de PTzNA ne sont pas à la hauteur des espérances puisque dans tous les cas, le produit souhaité n'est pas observé de manière majoritaire. Cependant, une légère amélioration semble apparaître avec TBTA, et notamment lorsque celui-ci est couplé à CuSO₄, le pic de la séquence [Phe-TTTGTT] paraissant légèrement plus intense.

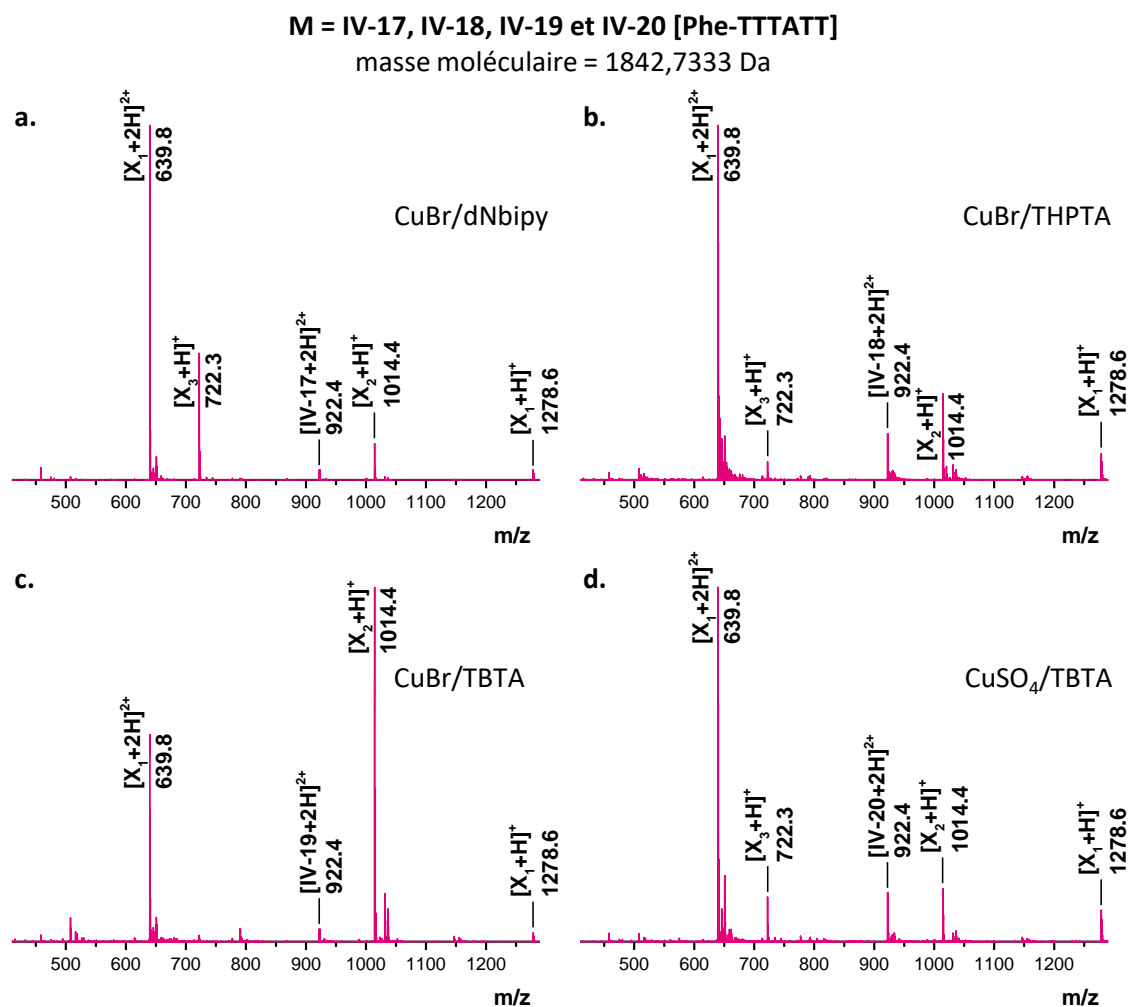


Figure IV.16. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTATT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc CD-A. a. CuAAC du bloc CD-A avec CuBr/dNbipy (IV-17). b. CuAAC du bloc CD-A avec CuBr/THPTA (IV-18). c. CuAAC du bloc CD-A avec CuBr/TBTA (IV-19). d. CuAAC du bloc CD-A avec CuSO₄/TBTA (IV-20).

Les mêmes essais sont conduits sur l'autre monomère CD portant une purine, celui de l'adénine (CD-A). Les résultats sont tout à fait comparables, et c'est encore une fois le couple $\text{CuSO}_4/\text{TBTA}$ (composé IV-20, Figure IV.16.d) qui semble donner le rendement le plus élevé pour la cycloaddition du bloc CD-A dans une chaîne de PTzNA, même si les chaînes sont loin d'être uniformes.

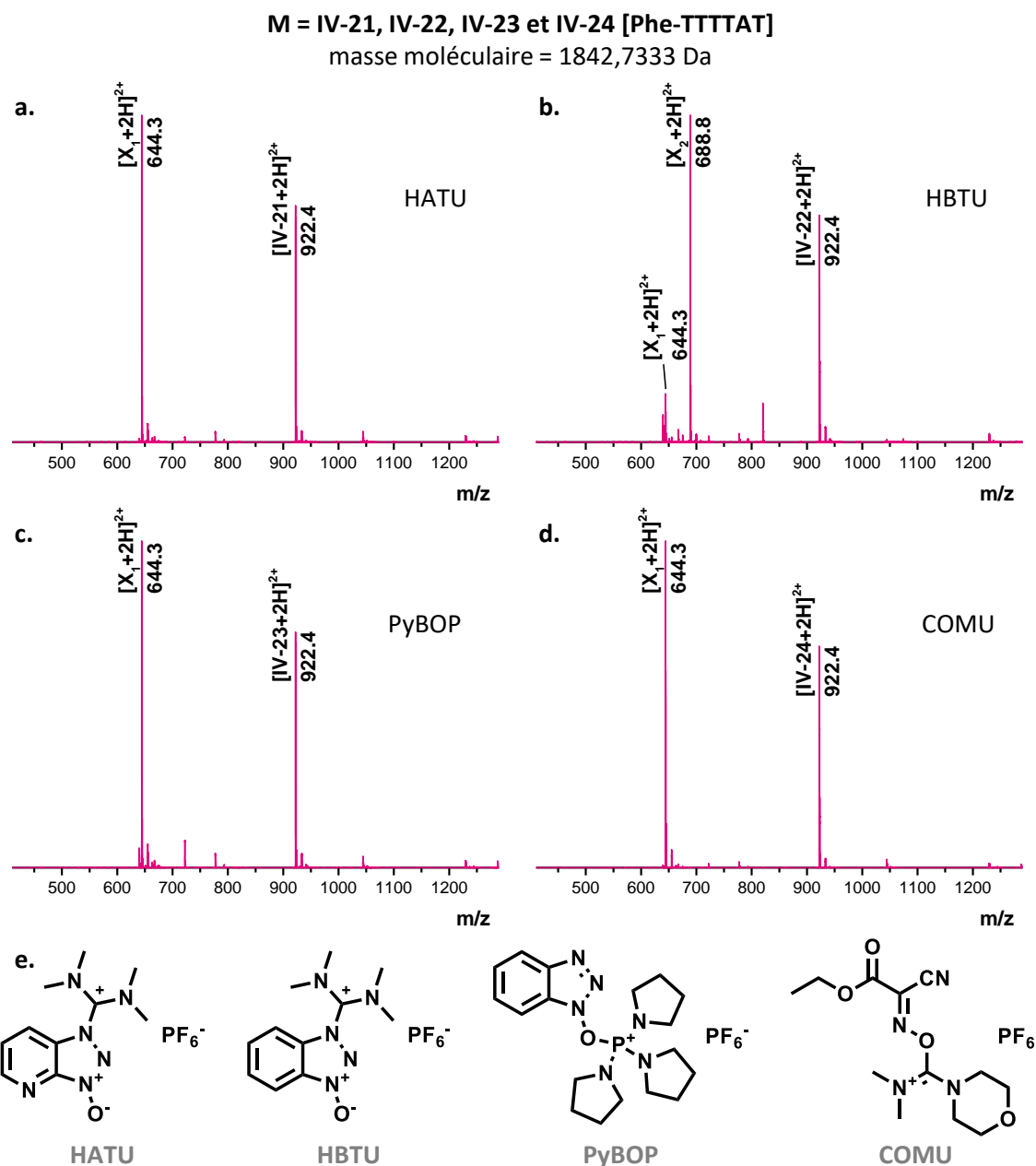


Figure IV.17. Spectres ESI-HRMS de la séquence de PTzNA [Phe-TTTTAT] synthétisée avec différentes conditions pour l'ajout du bloc AB-A. a. Agent de couplage pour l'addition de bloc AB-A : HATU (IV-21). b. Agent de couplage pour l'addition de bloc AB-A : HBTU (IV-22). c. Agent de couplage pour l'addition de bloc AB-A : PyBOP (IV-23). d. Agent de couplage pour l'addition de bloc AB-A : COMU (IV-24). e. Structure des différents agents de couplage utilisés.

De manière similaire, l'intégration du monomère AB-A demande quelques ajustements. En effet, contrairement aux trois autres blocs du même type, celui portant une adénine ne donne pas de rendement quantitatif lorsque l'amidification est menée avec l'héxafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HATU) (composé IV-21, Figure IV.17.a). Aussi, des expériences sont conduites avec des agents de couplage différents (Figure IV.17.e). Parmi ceux-là,

l'héxafluorophosphate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium (HBTU) (composé IV-22, Figure IV.17.b), déjà utilisé dans les premières synthèses, l'héxafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium (PyBOP) (composé IV-23, Figure IV.17.c), qui avait également déjà été essayé pour les premières optimisations sur la résine Gly-Wang, et enfin l'héxafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminooxy)diméthylamino-morpholino-carbenium (COMU) (composé IV-24, Figure IV.17.d), qui a également fait ses preuves dans la synthèse de polypeptides.^[536, 537]

Finalement, aucun de ces tests ne donne de différence significative par rapport à l'utilisation de HATU. En effet, sur tous les spectres ESI-HRMS, même si la séquence [Phe-TTTTAT] est largement observée, c'est aussi le cas d'impuretés, et notamment de la séquence tronquée [Phe-TTTA] ou [Phe-TTAT] (X_1) qui traduit du bon ajout de l'adénine mais d'étapes incomplètes pour l'ajout de thymines.

2.3.4. Conclusions des synthèses

Finalement, aucun problème majeur n'est à relever pour la synthèse de séquences de PTzNAs contenant des pyrimidines. L'ajout des blocs AB-T et AB-C par amidification en présence de HATU donne la plupart du temps un rendement quantitatif et la cycloaddition avec le couple CuBr/dNbipy pour l'incorporation des monomères CD-T et CD-C est également complète. Pour ce qui est des purines, le couplage acide carboxylique-amine primaire avec HATU permettant l'ajout des monomères AB-G et AB-A est également possible, même si pour l'adénine, des séquences tronquées sont présentes. En revanche, pour les blocs CD-G et CD-A, la CuAAC est incomplète. Leur incorporation nécessite un changement de conditions et c'est à priori le couple CuSO₄/TBTA qui donne les meilleurs résultats, bien que les produits requièrent toujours une purification par séparation, qui pourrait être réalisée par exemple par HPLC préparative.

Malgré tout, des séquences ont pu être synthétisées avec l'ensemble des monomères à disposition et leurs structures confirmées par détermination de leurs masses exactes en spectrométrie de masse ESI-HRMS (Tableau IV.1).

Échantillon	Séquence	Masse	
		m/z _{th}	m/z _{exp}
IV-6-2	Phe•T■T	722,3005 [M+H] ⁺	722,3021
IV-6-3	Phe•T■T•T	1014,3925 [M+H] ⁺	1014,3931
IV-6-4	Phe•T■T•T■T	639,7610 [M+2H] ²⁺	639,7623
IV-6-6	Phe•T■T•T■T•T■T	917,8681 [M+2H] ²⁺	917,8673
IV-5	Phe•T■T•T■T•T■T•T■T	1195,9753 [M+2H] ²⁺	1195,9771
IV-7	Phe•T■T•T■T•T■C	910,3683 [M+2H] ²⁺	910,3676
IV-8	Phe•C■T•T■T•T■C	902,8685 [M+2H] ²⁺	902,8672
IV-10	Phe•T■T•C■T•G■T	922,8715 [M+2H] ²⁺	922,8719
IV-12	Phe•G■T•T■T•T■G	942,8746 [M+2H] ²⁺	942,8735
IV-9	Phe•T■T•T■T•T■G	930,3714 [M+2H] ²⁺	930,3725
IV-16	Phe•T■T•T■G•T■T	930,3714 [M+2H] ²⁺	930,3727
IV-20	Phe•T■T•T■A•T■T	922,3739 [M+2H] ²⁺	922,3743
IV-24	Phe•T■T•T■A■T	922,3739 [M+2H] ²⁺	922,3741

Tableau IV.1. Valeurs expérimentales des m/z mesurés par ESI-HRMS pour les PTzNAs protonés synthétisés par chimie itérative « AB+CD » en phase solide. Les symboles • et ■ indiquent respectivement les liaisons amides et triazoles.

3. Etude des propriétés d'hybridation des PTzNAs

Comme décrit précédemment (voir IV.1), un des intérêts des XNAs est leur capacité à interagir avec les acides nucléiques naturels et à former des complexes avec ceux-là. Pour ce faire, les PNAs par exemple répondent aux règles d'appariement de Watson et Crick et forment donc des duplexes et des triplexes plus stables que pour des couples ADN-ADN.^[57] Ils présentent notamment une température de fusion (T_m) plus élevée, une plus grande résistance à la dégradation chimique ou enzymatique et une sensibilité accrues aux erreurs de complémentarité dans les séquences.^[529] De même, l'introduction de triazoles à certains points de la chaîne principale améliore encore la stabilité des complexes.^[532] Il paraît donc naturel d'essayer d'inspecter cette propriété pour les PTzNAs. Un bon moyen de vérifier cela est de réaliser des tests d'hybridation et de mesurer la température de fusion du complexe (voir I.2.1.1.3), c'est-à-dire la température à laquelle la moitié des liaisons hydrogènes entre bases complémentaires sont rompues.^[19] Pour ce faire, il est possible d'effectuer une mesure en spectroscopie UV-visible à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des bases nucléiques, en faisant varier la température. En effet, il est possible d'observer une variation importante de l'absorbance entre le cas où les bases sont appariées avec leur complémentaire et le cas où elles sont libres. Afin de connaître la conformation dans l'espace des molécules analysées, il est également possible d'effectuer une analyse du dichroïsme circulaire, dont le signal permet également de savoir si les complexes forment une hélice ou un feuillet par exemple, qui donnent des tracés particuliers, ou toute autre structure secondaire ou tertiaire.^[538] Une mesure en fonction de la température permet également d'observer les changements de conformation qui pourraient avoir lieu et ainsi de déterminer également la température de dénaturation des potentiels complexes. De telles expériences ont donc été menées sur une séquence de PTzNA afin de voir leur capacité à se lier aux séquences complémentaires naturelles.

3.1. Analyses en spectroscopie UV-visible en fonction de la température

Afin de réaliser les tests en spectroscopie UV-visible, une séquence de PTzNA et sa séquence complémentaire d'acide nucléique naturel sont nécessaires. Ici, une séquence [Phe-TTTTTTTT] (composé IV-5) est utilisée avec son complémentaire d'ADN, une séquence [AAAAAAAA]. Pour référence, des essais avec l'équivalent ADN de la séquence PTzNA ([TTTTTTTT]) sont également réalisés. Dans chaque expérience, deux cycles chauffage-refroidissement sont subis par le mélange des séquences dans une solution de tampon PBS (pour *phosphate buffer saline*) dans l'eau milli-Q. Ces cycles sont réalisés entre 3°C et 90°C à une vitesse de 1°C par minute avec des paliers de 10 min aux températures extrêmes. L'absorbance est mesurée à 260 nm comme précisé précédemment, et la concentration en oligomères est déterminée de telle sorte que l'absorbance du mélange se situe aux alentours de 1, afin d'être dans des conditions de mesure optimales.

La mesure de contrôle avec deux brins d'ADN complémentaires, en l'occurrence des homopolymères de thymine et d'adénine de huit unités, donne déjà des indications. En effet, le tracé de l'absorbance relative de l'échantillon en fonction de la température (Figure IV.18.a) montre un écart total d'environ 15% entre 3°C et 90°C alors que l'effet hyperchrome prédit qu'il devrait être compris entre 20% et 40% en théorie.^[539-541] De plus, l'absence de paliers clairement définis à basses et hautes températures rend difficile la lecture des données, le ralentissement de la pente étant moins visible. Enfin, les mesures enregistrées sur la phase montante des cycles (de 3°C à 90°C) semblent donner des résultats moins concluants que pour la phase descendante (de 90°C à 3°C), comme en témoigne la fin

des courbes correspondantes, pour lesquelles l'absorbance relative ne se stabilise absolument pas à 90°C. Il est à noter que les résultats entre les deux cycles sont très similaires, confirmant la reproductibilité de l'expérience. En traçant la dérivée de l'absorbance en fonction de la température (Figure IV.18.b), il est possible de ressortir un peu plus facilement l'information. En effet, lorsque l'absorbance augmente le plus nettement, c'est-à-dire à la température de fusion (T_m), la valeur de la dérivée atteint un maximum. Ainsi, il est possible de lire directement sur cette courbe une valeur de T_m . Ce tracé prouve une nouvelle fois que les données lors du refroidissement sont plus facilement exploitables. Pour cet échantillon ADN-ADN, une T_m aux alentours de 50°C est mesurée.

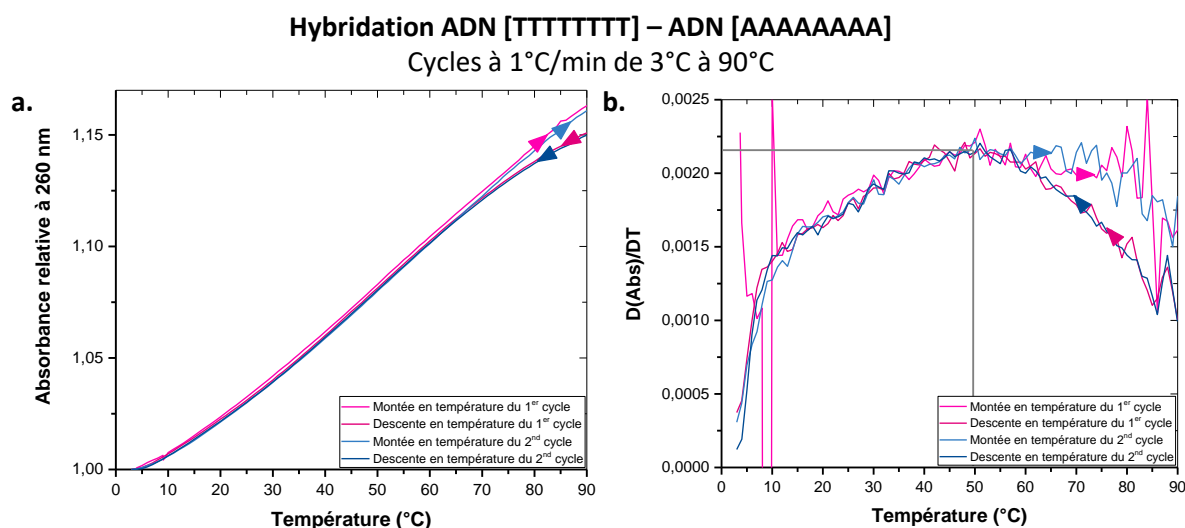


Figure IV.18. Spectres UV-visible de l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires de séquences [TTTTTTTT] et [AAAAAAAA]. Conditions : concentrations de 5 μ M pour chacun des oligomères dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q à 10 mM. Deux cycles chauffage-refroidissement sont subis par l'échantillon entre 3°C et 90°C à une vitesse de 1°C/min. a. Mesure de l'absorbance relative à 260 nm en fonction de la température. b. Dérivée première de l'absorbance en fonction de la température. Le maximum de cette dérivée est atteint au niveau de la température de fusion T_m du complexe ADN-ADN.

La différence entre les résultats en montée en température et lors de la descente est confirmée par l'analyse d'un mélange PTzNA-ADN (séquence [Phe-TTTTTTTT]) pour le brin de PTzNA et [AAAAAAAA] pour le brin d'ADN). En effet, l'analyse des données lors de la montée en température ne permet pas d'observer ni changement de pente pour l'absorbance relative (Figure IV.19.a), ni maximum pour sa première dérivée (Figure IV.19.b). Cependant, le changement de pente des courbes de refroidissement (Figure IV.19.c) est beaucoup moins tranchant que pour un couple ADN-ADN et le maximum de la dérivée beaucoup moins évident (Figure IV.19.d). S'il y avait une hybridation entre le brin d'ADN et le brin de PTzNA, la température de dénaturation serait mesurée aux environs de 42°C, c'est-à-dire à un niveau inférieur aux interactions entre brins d'ADN, mais il est difficile de conclure sur ces résultats. En revanche, un phénomène perturbateur est observé au cours des cycles de chauffage et de refroidissement entre 0°C et environ 30°C. En effet, un pic d'absorbance est clairement observé dans ces températures, plus net lors du chauffage, qui indiquerait peut-être une conformation particulière à basse température, comme la formation d'agrégats par exemple.

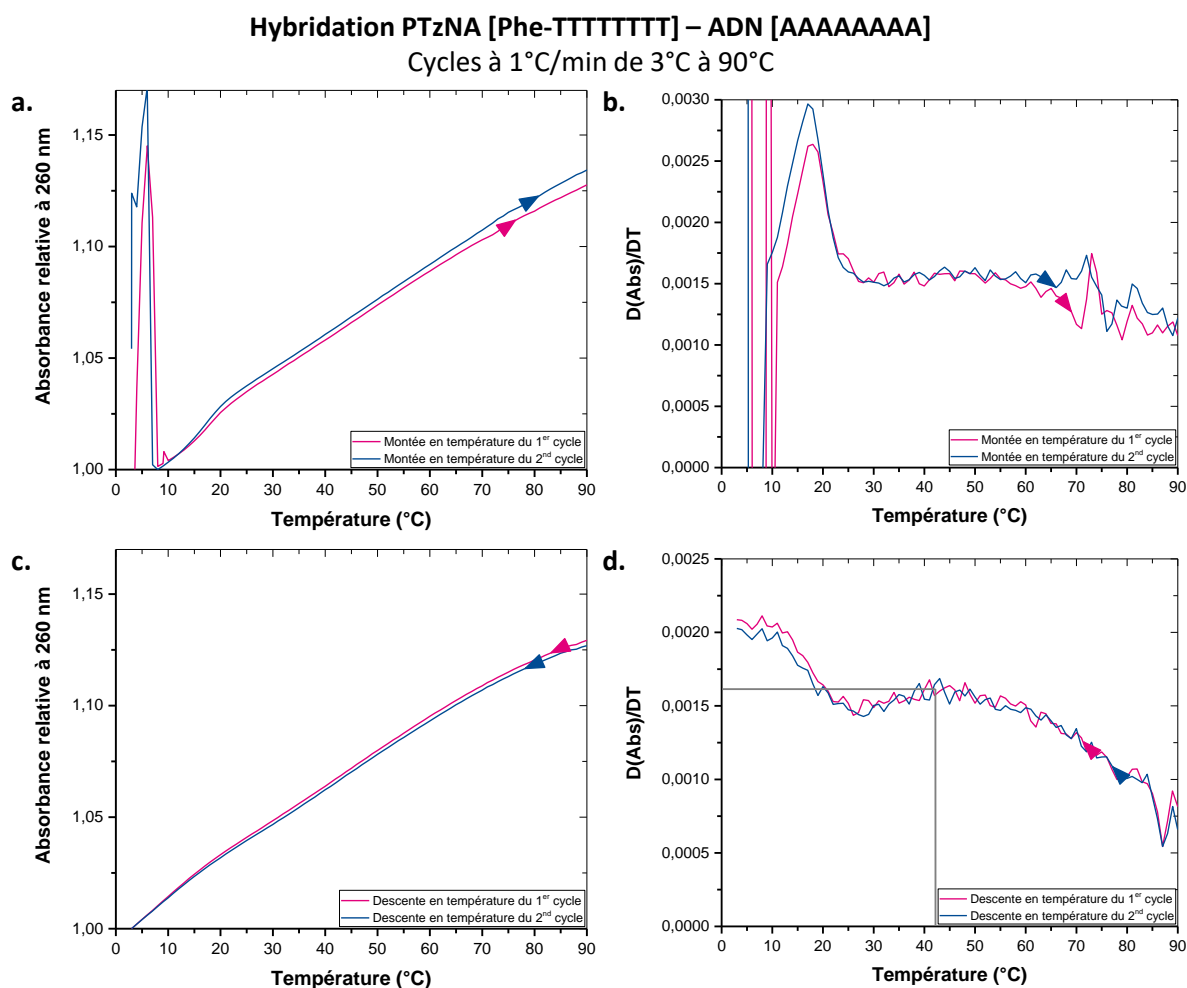
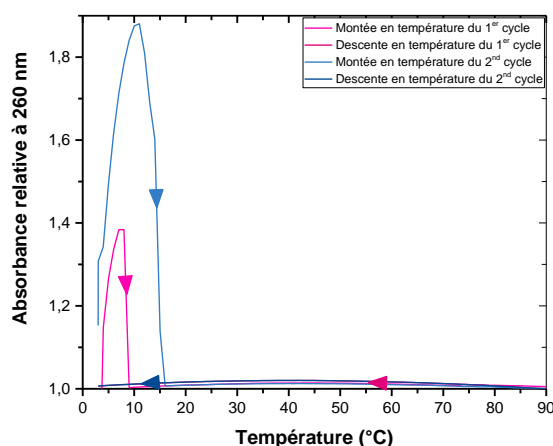


Figure IV.19. Spectres UV-visible de l'hybridation de deux brins de PTzNA et d'ADN complémentaires de séquences [Phe-TTTTTTTT] (PTzNA, IV-5) et [AAAAAAAA] (ADN). Conditions : concentrations de 5 μ M pour chacun des oligomères dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q à 10 mM. Deux cycles chauffage-refroidissement sont subis par l'échantillon entre 3°C et 90°C à une vitesse de 1°C/min. a. Mesure de l'absorbance relative à 260 nm en fonction de la température pour les montées en température. b. Dérivée première de l'absorbance en fonction de la température pour les montées en température. c. Mesure de l'absorbance relative à 260 nm en fonction de la température pour les descentes en température. d. Dérivée première de l'absorbance en fonction de la température pour les descentes en température.

Cependant, rien ne permet de conclure à la formation d'un complexe PTzNA-ADN, en atteste l'analyse des mêmes cycles de températures subis par le brin de PTzNA seul (Figure IV.20), qui montre de la même manière une variation forte de l'absorbance à des températures basses. Ces interactions observées sont donc uniquement dues aux molécules de PTzNA et il paraît alors intéressant d'essayer d'observer la conformation spatiale prise par celles-ci en fonction de la température. Des études du dichroïsme circulaire sont donc conduites.



Analyse PTzNA [Phe-TTTTTTTT]
Cycles à 1°C/min de 3°C à 90°C

Figure IV.20. Spectre UV-visible de l'analyse d'un brin de PTzNA de séquence [Phe-TTTTTTTT] (IV-5). Conditions : concentration de 10 μM pour l'oligomère dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q à 10 mM. Deux cycles chauffage-refroidissement sont subis par l'échantillon entre 3°C et 90°C à une vitesse de 1°C/min.

3.2. Étude de la conformation spatiale par mesure du dichroïsme circulaire

Les analyses de dichroïsme circulaire sont effectuées dans les mêmes conditions que pour la spectroscopie UV-visible, c'est-à-dire dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q, avec des concentrations en oligomères identiques. Un dispositif de contrôle de la température par effet Peltier permet d'enregistrer des spectres à différents paliers. L'analyse consiste en une mesure du dichroïsme circulaire $\Delta\epsilon$, c'est-à-dire de la différence d'absorption du milieu présentant une activité optique, comme c'est le cas lorsque les molécules ont des structures secondaires ou tertiaires, entre une onde polarisée circulairement à gauche et une onde polarisée circulairement à droite.^[542, 543] Selon la conformation des différentes espèces dans l'espace, et l'orientation de celle-ci (le sens de rotation d'une hélice par exemple), la lumière polarisée dans un sens est plus rapidement absorbée que celle polarisée dans l'autre sens, résultant en cette différence mesurable. Pour les acides nucléiques et les protéines, plusieurs domaines de longueurs d'ondes sont à distinguer.^[544, 545] En effet, tout ce qui se passe dans les UV lointains (240 nm et avant) est dû à la structure secondaire des chaînes qui dépend souvent de leur structure et de leur squelette alors que ce qui est mesuré après 240 nm est plutôt lié à la structure tertiaire des chaînes, et à comment elles interagissent ensemble en fonction de leur composition en bases nucléiques ou acides aminés. Dans le cas présent, les mesures sont effectuées à des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 320 nm. Il serait intéressant d'observer la réponse des produits dans des UV plus lointains, malheureusement, la solution tampon utilisée (PBS pour *phosphate buffer saline*), qui contient une quantité d'ions chlorure trop importante qui perturbe l'absorbance aux alentours de 200 nm, ne le permet pas.^[544, 545]

Les premières mesures sont à nouveau effectuées sur un mélange de deux brins complémentaires de PTzNA (séquence [Phe-TTTTTTTT], composé IV-5) et d'ADN (séquence [AAAAAAAA]) et montrent un spectre (Figure IV.21.a) qui ne présente pas de valeurs minimales ou maximales locales aux longueurs d'ondes caractéristiques de l'hélice alpha (bande positive à 193 nm, bandes négatives à 211 et 245 nm pour l'ADN, à 208 et 222 nm pour les protéines, puis bandes positives entre 260 et 280 nm)^[538, 544, 545] ou du feuillet beta (bande positive à 195 nm et bande négative à 218 nm)^[544, 545] par exemple, mais plutôt un tracé de conformation aléatoire. De plus, la forme de la courbe n'est pas significativement modifiée par les changements de température puisque seule l'intensité du signal mesuré varie. Cela montre qu'il n'y a pas de changement de structure secondaire ou tertiaire en fonction de la température, et donc a priori pas d'hybridation entre les brins de PTzNA

et d'ADN complémentaires. De plus, il est à noter que les phénomènes à basses températures observés en spectroscopie UV-visible ne sont pas visibles sur le dichroïsme circulaire. Ils ne relèvent donc pas de la conformation spatiale des molécules de PTzNA mais pourraient tout de même être le fruit d'agrégation de celles-ci.

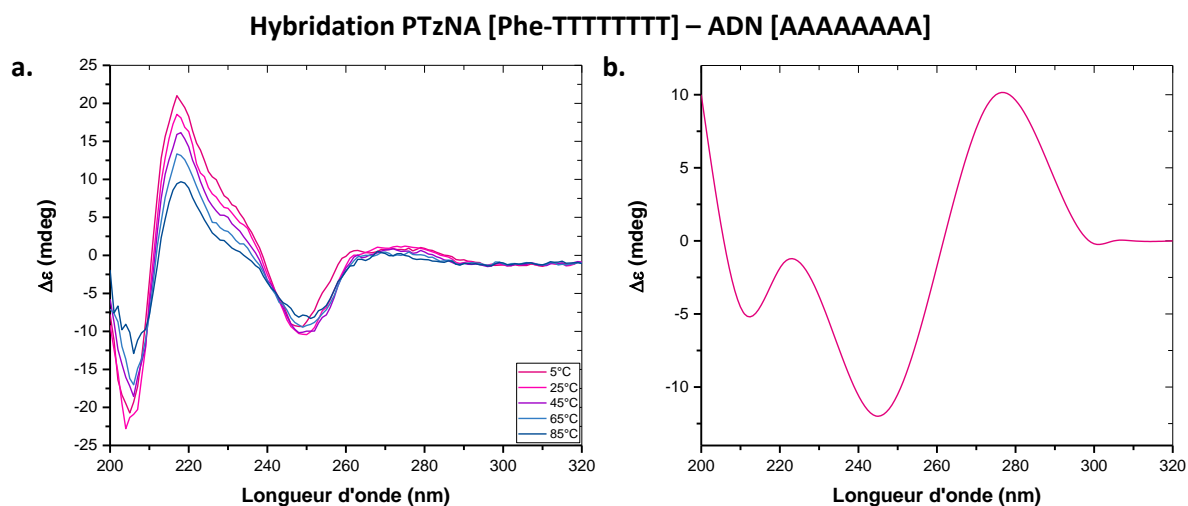


Figure IV.21. Analyse de l'hybridation de deux brins de PTzNA et d'ADN complémentaires de séquences [Phe-TTTTTTTT] (PTzNA, IV-5) et [AAAAAAAA] (ADN). a. Mesure du dichroïsme circulaire d'un mélange PTzNA (séquence [Phe-TTTTTTTT], IV-5) - ADN (séquence [AAAAAAAA]) à différentes températures. Conditions : concentrations de 5 μ M pour chacun des oligomères dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q à 10 mM. b. Représentation théorique du spectre de dichroïsme circulaire d'une hélice d'ADN double-brin.^[538, 546]

Des mesures complémentaires sont également réalisées sur des échantillons contenant chacun des deux brins étudiés séparément. La concentration en espèces totale est identique, ce qui signifie que la concentration de chaque espèce est doublée puisqu'il n'y a plus qu'un seul composé dans l'échantillon. Alors que le spectre de l'échantillon d'ADN montre le même dichroïsme circulaire que dans le cas du mélange (Figure IV.22.a), avec une intensité doublée sans doute du fait du doublement de la concentration de cette espèce, pour l'échantillon de PTzNA (Figure IV.22.b), le signal est plat et d'intensité nulle. Ces analyses montrent donc que le signal enregistré pour le mélange de ces deux composés n'était effectivement pas représentatif d'un phénomène d'hybridation des espèces mais qu'il correspondait uniquement à l'absorbance du brin d'ADN seul, le brin de PTzNA n'interagissant absolument pas avec et ne présentant lui-même aucune structure secondaire ou tertiaire. L'absence de changement de conformation entre basses et hautes températures est donc par la même occasion expliqué. Cela confirme la tendance observée en UV-visible, qui ne montrait pas clairement la formation d'un complexe PTzNA-ADN (voir IV.3.1).

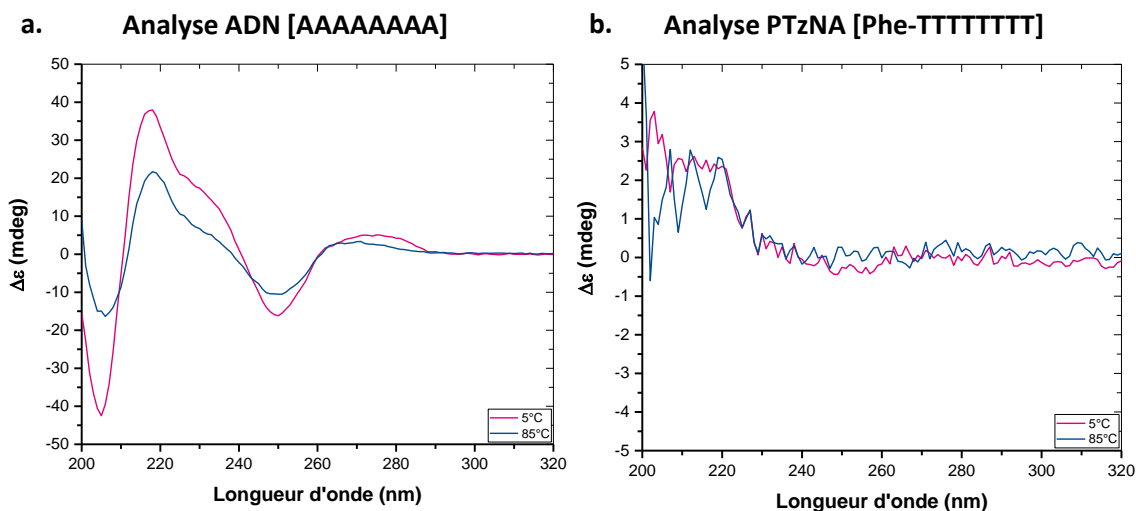


Figure IV.22. Mesures du dichroïsme circulaire sur un brin d'ADN (séquence [AAAAAAAA]) (a) et sur un brin de PTzNA (séquence [Phe-TTTTTTTT], IV-5) (b) à différentes températures. Conditions : concentration de 10 μM pour l'oligomère dans une solution de tampon PBS dans l'eau milli-Q à 10 mM.

Cette absence de structure secondaire propre et d'interaction avec des brins naturels complémentaires pourrait trouver sa source dans les conditions de synthèse utilisées. En effet, bien que considéré comme un isostère de la liaison peptidique,^[531, 532] l'anneau triazole est plus rigide que celui-ci et ne permet donc pas forcément à la molécule de prendre une conformation dans l'espace définie. La rotation de chaînes courtes^[532] n'est pas forcément adaptable à des segments plus longs. Plusieurs méthodes le permettent cependant. En contrôlant les positions de substitution du triazole grâce à la catalyse appropriée (qui induit une certaine régiosélectivité),^[547] il est possible d'induire une rotation de la chaîne polymère qui lui permet de prendre la forme d'une hélice par exemple. Dans ce cas, il est évidemment plus aisé de former des duplexes hélicoïdaux avec des brins d'ADN. Plusieurs formes existent pour le 1,2,3-triazole : la forme 1,4-substituée, qui est obtenue dans ce chapitre par CuAAC,^[330] la forme substituée 1,3, la forme substituée sur les positions 1 et 5 et la forme substituée 2,4, notamment. Chacune donne des résultats différents sur les propriétés physiques ou biologiques et il convient donc de sélectionner la meilleure forme dépendamment de l'application visée.

4. Conclusions

L'approche itérative, orthogonale et supportée pour la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies est donc transposée à la synthèse de séquences naturelles. Des acides xénonucléiques dont le squelette synthétique est composé d'un enchaînement de liaisons amides et triazoles sont obtenus grâce à des cycles de deux réactions, une amidification et une cycloaddition CuAAC, faisant intervenir deux types de monomères, AB et CD. Grâce à la déclinaison de chacun de ces deux types de blocs avec les quatre bases nucléiques de l'ADN, n'importe quelle séquence de PTzNA (pour *peptide triazole nucleic acid*) désirée est accessible. Les conditions de synthèse sont optimales pour l'addition des blocs porteurs des pyrimidines (la thymine et la cytosine). En revanche, lorsqu'il s'agit des purines (guanine et adénine), des ajustements sont effectués. Pour l'étape de CuAAC, le couple cuivre/ligand utilisé habituellement (CuBr/dNbipy) est remplacé par un autre (CuSO₄/TBTA) qui donne de meilleurs rendements. Cependant, la réaction est loin d'être complète, le produit souhaité n'étant obtenu que de manière minoritaire. Les séquences riches en purines sont donc plus compliquées à obtenir. Une étape de purification est à prévoir pour isoler la bonne séquence.

Cependant, même si les rendements de la synthèse ne sont pas parfaits et les polymères obtenus pas uniformes, cette étude ouvre des perspectives intéressantes pour la synthèse orthogonale d'acides nucléiques.

En ce qui concerne les propriétés d'hybridation des PTzNAs avec les brins d'ADN complémentaires, les résultats de l'étude préliminaire menée ne montrent pas clairement de phénomène qui pourrait correspondre à la formation d'un complexe. En effet, à la manière des PNAs,^[17, 18, 52, 57] des cPNAs^[529] ou des TzNAs,^[532] la formation de complexes XNA-ADN était attendue avec une stabilité accrue par rapport aux complexes ADN-ADN classiques. Cependant, même si la tendance semble plutôt dans le sens de la possibilité d'une mesure de température de dénaturation en spectroscopie UV-visible, celle-ci n'est pas corrélée avec les mesures de dichroïsme circulaire. Des pistes pourraient néanmoins être creusées au niveau de la synthèse des composés afin de surmonter ce problème et de rendre plus clairs de tels phénomènes. En effet, le design des monomères utilisés pourrait être revu afin d'assurer que la distance entre les bases favorise la formation d'un hybride. De plus, une modification des conditions de formation des groupements triazoles, certainement trop rigides, pourrait aider à induire une structure spatiale des PTzNAs et ainsi faciliter leurs interactions avec les brins d'ADN complémentaires. Enfin, l'observation d'une potentielle hybridation serait certainement plus franche avec des séquences complémentaires un peu plus longues qui créeraient des liens plus forts entre les brins. L'obtention de duplexes PTzNA-ADN ne semble donc pas inaccessible.

Conclusion générale

En conclusion, les travaux de cette thèse ont été entièrement consacrés à la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies et à l'étude de certaines de leurs propriétés. Les synthèses ont été réalisées sur support solide, selon un procédé multi-étapes itératif, avec une approche orthogonale. Cela signifie que deux catégories de monomères sont mises en jeu, portant quatre fonctions réactives qui ne peuvent réagir que deux à deux, dans des réactions chimiosélectives. En l'occurrence, la liaison amide est obtenue par couplage entre un acide carboxylique et une amine primaire tandis que le groupement triazole est issu d'une cycloaddition d'un alcyne et d'un azoture. La synthèse itérative permet ainsi de réguler l'enchaînement des monomères et donc de créer une séquence d'unités monomères définie, et la chimiosélectivité des réactions permet de s'affranchir d'étapes de déprotection souvent nécessaires dans des synthèses multi-étapes traditionnelles, telle que la synthèse peptidique.


L'étude du **chapitre II** s'est tournée vers l'optimisation des conditions de synthèse des poly(triazole amide)s contenant des séquences codées synthétiques. En définissant deux unités codantes, l'une pour un bit 0 et l'autre pour un bit 1, il est possible, grâce au procédé itératif, d'écrire un message le long des chaînes polymères sous la forme d'un code binaire, et donc d'encoder de l'information numérique sur ces chaînes. Dans le cas étudié, le monomère codant pour le bit 0 était l'acide 5-héxynoïque, duquel il est facile d'envisager un monomère codant pour le bit 1, qui comporterait un carbone supplémentaire, dans la chaîne principale avec l'acide 6-heptynoïque ou dans une chaîne latérale. Ces blocs contenant une fonction acide carboxylique d'une part, et une fonction alcyne d'autre part, un second type de monomère, portant un azoture et une amine primaire, était nécessaire à la synthèse des polymères. Ce monomère est considéré comme une unité intercalante, c'est-à-dire qu'elle n'apporte pas d'information à la séquence implémentée sur les chaînes mais peut être utilisée afin de contrôler les propriétés du composé synthétisé. Deux espaceurs de ce type ont été utilisés : le 11-azidoundécane-1-amine (E_1) et le 11-azido-3,6,9-trioxaundécane-1-amine (E_2). Les temps de réaction de chacune des étapes de la synthèse ont été grandement améliorés, passant de 4h à 2h par simple introduction d'un chauffage au micro-onde pour le couplage peptidique, avec un mélange de N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) comme agent de couplage aidé par la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA) en tant que base, et de 20h à 2h pour la cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre (CuAAC), grâce à un couple CuBr/4,4'-dinonyl-2,2'-bipyridyl (dNbipy). Les structures très proches des unités intercalantes, l'une étant plus hydrophile que l'autre, auraient dû permettre de contrôler la solubilité des oligomères. Cependant, aucun des deux espaceurs n'a donné de résultat convaincant, les chaînes étant relativement insolubles dans la plupart des solvants usuels. Des expériences ont donc été menées en faisant varier les bouts de chaînes afin d'apporter un nouveau contrôle de la solubilité. Des résines Wang fonctionnalisées avec trois différents linkers (une phénylalanine, une glycine et une résine Wang classique) ont été utilisées à cette fin. Encore une fois, aucun progrès n'a été observé concernant la solubilité des produits synthétisés, laissant la caractérisation de ceux-ci compliquée, même si dans la plupart des cas (seules les chaînes débutant par une glycine sont à exclure), des analyses en spectrométrie de masse et en chromatographie d'exclusion stérique ont été possibles.

Le comportement des deux séries de polymères caractérisées (celle dont les chaînes débutent par un simple acide carboxylique et celle dont les chaînes débutent par une phénylalanine) a également été étudié dans des analyses par des nanopores. Dans cette technique, un nanopore est inséré dans une membrane, créant un tunnel entre deux réservoirs contenant une solution saline, par lequel passe un courant électrique. Les chaînes polymères, ajoutées à l'un des réservoirs, traversent

alors ce pore sous l'impulsion du courant électrique et lors de leur passage dans le tunnel, bloquent partiellement celui-ci. Les interactions analyte-nanopore varient selon la nature du composé, il est facile de discriminer des produits de structures ou de tailles différentes simplement par observation de l'intensité de blocage du courant ou de la durée des événements enregistrés. Les résultats obtenus pour les différentes tailles et structures de poly(triazole amide)s à séquences définies analysées par l' α -hémolysine ont confirmé ce phénomène et permis de différencier les analytes de manière précise et statistique, donnant ainsi une indication sur la composition et la pureté des échantillons. Cette méthode se présente donc comme un bon complément aux autres techniques de caractérisation auxquelles les poly(triazole amide)s ont été soumis, puisque tous les résultats sont corrélés.

Afin de résoudre les problèmes de solubilité rencontrés avec les poly(triazole amide)s synthétisés, une nouvelle voie de synthèse a été imaginée dans le **chapitre III**. En effet, la faible capacité des oligomères à être solubilisés dans la plupart des solvants usuels a été attribuée à l'utilisation du cuivre comme catalyseur des étapes de CuAAC, qui est capable de se lier et par conséquent de former un complexe stable avec les triazoles des chaînes en croissance. Ce phénomène peut résulter en une baisse de la réactivité des différents produits mis en jeu, et donc en une baisse de rendement de la synthèse, ainsi qu'en la formation d'espèces agrégées plus volumineuses et moins solubles. Ainsi, une synthèse s'affranchissant de ces étapes de CuAAC avec catalyse au cuivre a été mise en place en ayant recours à des réactions de SpAAC (pour *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*). Celles-ci, faisant appel à des alcynes non plus linéaires mais cycliques, reposent sur la forte réactivité des fonctionnalités par elles-mêmes, du fait de la tension de cycle présente dans le cycloalcyne. L'alcyne cyclique le plus petit (et donc plus réactif) isolable est la cyclooctyne, c'est pourquoi un nouveau monomère AB (codant pour le bit 1, tel que le suggère la présence d'un groupement méthyle latérale) porteur d'un acide carboxylique et d'une cyclooctyne a été synthétisé. Cette synthèse, dont le rendement global est moyen, a résulté en l'obtention d'un composé tout de même relativement instable vis-à-vis de l'air, de la lumière ou de la chaleur, et qui a donc nécessité des conditions de conservation strictes. Malgré celles-ci, la caractérisation par RMN a révélé la présence d'impuretés dues à la dégradation du monomère, avant même qu'une synthèse itérative d'oligo(triazole amide) ne puisse être entreprise. Lorsque cette dernière a été réalisée, malgré toutes les précautions prises, la caractérisation n'a pas été facilitée. En effet, la solubilité du produit obtenu n'a pas été améliorée par rapport aux synthèses faisant intervenir le catalyseur au cuivre. De plus, si l'analyse en SEC a montré la présence de deux espèces dans l'échantillon, preuve de la dispersité des chaînes, mais de l'existence de composés résultant de la synthèse, l'ESI-HRMS n'a rien donné, aucune espèce n'apparaissant sur les spectres. Ce résultat a été attribué à la dégradation du produit pendant le transport, ainsi qu'à des réarrangements donnant des produits complètement insolubles. En effet, plusieurs phénomènes pourraient être issus de l'instabilité de la cyclooctyne, comme des isomérisations, menant à des intermédiaires non réactifs, ou des oligomérisations, donnant des agrégats de monomères ou de chaînes polymères non réactifs et insolubles. Récemment, des pistes ont été étudiées afin de résoudre ces soucis, et notamment la création de nouvelles générations de cyclooctynes, plus stables, et permettant des SpAAC plus rapides. Même si ce concept aurait dû mener à une synthèse plus verte (étant données l'absence de cuivre et l'utilisation de solvants plus respectueux de l'environnement, comme l'eau), cette étude préliminaire n'a pas vraiment abouti, malgré les nombreuses pistes qui pourraient permettre des améliorations.

Enfin, le projet du **chapitre IV** a consisté en la synthèse de poly(triazole amide)s à séquences définies naturelles. Suivant l'exemple des acides nucléiques peptidiques (PNAs) de Nielsen, une



structure comprenant un squelette poly(triazole amide) sur lequel sont attachées les bases de l'ADN a été imaginé (PTzNAs). La stratégie de synthèse est pratiquement identique à celle des poly(triazole amide)s à séquences définies synthétiques, et seule une inversion des fonctions réactives dans les monomères est à noter. Ainsi, les monomères AB portent un acide carboxylique et un azoture, tandis que les blocs CD sont composés d'un alcyne et d'une amine primaire. Cette approche ne nécessite pas d'unité intercalante et chaque monomère, AB ou CD, comporte une des quatre bases de l'ADN (thymine, cytosine, guanine ou adénine). La densité d'information a donc été doublée par rapport aux synthèses précédentes. Une bibliothèque de huit monomères différents (quatre blocs AB et quatre blocs CD) a donc été constituée pour permettre la synthèse de n'importe quelle séquence de PTzNA. Les synthèses d'oligomères ont été réalisées sur une résine Wang fonctionnalisée par une phénylalanine, donnant une amine primaire terminale sur laquelle il est possible de débiter le processus itératif, qui a été préférée à la glycine du fait de sa plus grande résistance à l'hydrolyse acide qui facilite la caractérisation des produits. Les premiers essais ont été effectués avec les monomères porteurs de thymines, puis, une fois les étapes optimisées, les autres monomères ont été intégrés au fur et à mesure. Au final, aucun problème majeur n'a été rencontré lors des ajouts des monomères par couplage peptidique lorsque l'agent de couplage utilisé était l'héxafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HATU) et les bases activatrices la 2,6-lutidine et la DIPEA. Cependant, une distinction a été faite pour les étapes de CuAAC entre les purines et les pyrimidines. Pour ces dernières, le couple CuBr/dNbipy, déjà utilisé dans le chapitre II, est adapté, alors que pour les blocs porteurs de guanines ou d'adénines, il a été remplacé par un couple CuSO₄/tris-(benzyltriazolylméthyl)amine (TBTA). Des dispersités ont été observées pour certaines séquences, preuve de la nécessité d'intégrer une étape de purification des oligomères afin d'isoler les bonnes séquences.

Une étude des propriétés d'hybridation d'une séquence de huit thymines de PTzNA avec la séquence complémentaire d'ADN a ensuite été conduite. Tandis que les analyses en spectroscopie UV-visible laissaient imaginer la formation d'un complexe qui fondait avec une augmentation de la température, cette tendance n'a pas été confirmée par les mesures de dichroïsme circulaire, qui n'ont pas permis d'identifier de conformation spatiale connue correspondant à un duplexe ou triplex, ni même de changement de celle-ci avec la température. Plusieurs pistes pourraient néanmoins être étudiées pour permettre d'observer des phénomènes de complexation PTzNA-ADN. Par exemple, la synthèse de séquences plus longues, une modification des conditions de formation des groupements triazoles, et notamment au niveau de la catalyse, ou encore le contrôle plus précis des distances interbases devraient aider à induire de telles évènements.

Au final, les travaux de cette thèse ont permis d'ouvrir des perspectives intéressantes pour la synthèse itérative, orthogonale et supportée de poly(triazole amide)s contenant des séquences définies numériques ou naturelles. Plusieurs techniques de caractérisation ont pu être appliquées à ceux-ci, comme la chromatographie d'exclusion stérique, la spectrométrie de masse (et la spectrométrie de masse en tandem) ou encore l'analyse par les nanopores, une technique très prometteuse mais peu courante, qui a donné des résultats très encourageants pour la détection et la discrimination des différentes espèces présentes dans les échantillons. Malgré les quelques soucis de solubilité et de dispersité des produits, le développement d'une nouvelle voie de synthèse s'affranchissant de la catalyse au cuivre, entamé dans cette étude, pourrait permettre d'atteindre des rendements complets et des produits plus solubles. Enfin, dans le cas des séquences génétiques, de nombreuses pistes ont été envisagées afin de favoriser des interactions avec des séquences de

biopolymères, et notamment les acides nucléiques naturels, ouvrant la voie à une grande variété d'applications. Finalement, les travaux de cette thèse ont mené à de nombreuses synthèses concluantes de polymères à séquences définies encodés numériquement et naturellement, très encourageantes pour le développement de nouvelles propriétés et applications de ces polymères.

Partie expérimentale

1. Techniques d'analyse et matériel utilisé

1.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans le $\text{DMSO}-d_6$ ou dans le CDCl_3 sur un appareil Bruker Avance 400 MHz.

1.2. Chromatographies

Chromatographie sur couche mince (CCM) : les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silice (gel de silice MERCK 60F 254, épaisseur : 0,25 mm). Elles ont été révélées avec la ninhydrine, une solution d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol ou une solution de molybdate d'ammonium cérique dans l'eau.

Chromatographie liquide sur colonne : les purifications par chromatographie sur colonne ont été réalisées sur gel de silice en éluant sous pression d'air (MERCK, granulométrie 70-200 mm (70-230 Mesh)).

Chromatographie d'exclusion stérique : les chromatographies d'exclusion stériques ont été réalisées par Mélanie Legros et Catherine Foussat, sur un système équipé d'une pompe Shimadzu LC20-AD, d'un dégazeur en ligne Shimadzu DGU-20A, d'un injecteur automatique Shimadzu SIL-20A, d'un four à colonne Shimadzu CTO-20A à 35°C, d'un détecteur réfractométrique Shimadzu RID-10A, d'un détecteur UV Shimadzu SPD-20A et de quatre colonnes PLGel monoporosité (granulométrie : 5 μm , longueur : 30 cm, diamètre interne : 7,5 mm) en série avec des pores de dimensions variées : 50 Å, 100 Å, 500 Å, 1000 Å (domaine de séparation : 100 à 60 000 g/mol). L'étalonnage des masses molaires a été réalisé à partir de standards de polystyrène linéaires (courbe établie à partir de 10 standards fournis par Polymer Laboratories, masses molaires comprises entre 162 et 20 650 g/mol). Les analyses ont été réalisées dans le THF (qualité HPLC) avec un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec le toluène comme marqueur.

1.3. Spectrométrie de masse

Spectrométrie MALDI-TOF : les analyses de masse ont été effectuées sur un spectromètre Autoflex IITM MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne). L'acquisition a été réglée pour des masses allant de 600 à 3000 m/z. L'équipement a dans un premier temps été calibré avec un mélange de 7 peptides (Bruker Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne). La préparation des échantillons a été effectuée selon la méthode de la goutte séchée : le produit à analyser (1 grain) est solubilisé dans 100 μL d'une solution composée d'un mélange eau milli-Q/ACN/TFA (50:50:0,1) ; la matrice (acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)) est diluée dans ce même mélange (5 mg dans 0,5 mL). 15 μL de chacune de ces deux préparations sont prélevés et 1 μL du mélange final est déposé sur la plaque d'échantillons et laissé à l'air libre, à température ambiante, jusqu'à évaporation totale du mélange de solvants.

Spectrométrie ESI-HRMS et masse en tandem : les spectres de masse haute résolution et MS/MS, réalisés par le groupe de Laurence Charles, ont été obtenus grâce à l'utilisation d'un spectromètre de masse QStar Elite (Biosystems SCIEX, Concors, ON, Canada), équipé d'une source d'ionisation par electrospray. Les ions sont mesurés par un analyseur de masse à temps de vol comportant un accélérateur orthogonal. En mode MS, les mesures de masse exacte ont été réalisées en utilisant les ions de référence du poly(propylène glycol) ou du poly(éthylène glycol) comme étalon

interne. En mode MS/MS, un quadripôle a été utilisé pour sélectionner l'ion précurseur. Celui-ci est ensuite soumis à une CID (Collision-Induced Dissociation) dans une cellule de collision. Le gaz de nébulisation est l'air (10 psi), et l'azote est utilisé comme gaz rideau (20 psi) et gaz de collision. L'acquisition et le traitement de données ont été réalisés à l'aide du logiciel Analyst (QS 2.0) de chez Applied Biosystems.

1.4. Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Varian Cary 5000 équipé d'un porte-cellules thermostaté.

Des solutions mères de PTzNA [Phe-TTTTTTTT] et d'ADN [TTTTTTTT] et [AAAAAAAA] sont préparées dans de l'eau milli-Q ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Une solution de tampon PBS est également préparée ($10,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de tampon phosphate, $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KCl et $139,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NaCl, $\text{pH}=7,4$).

Pour les mesures, un mélange d'oligomère de thymine (ADN ou PTzNA) et d'oligomère d'adénine complémentaire (ADN) est préparé ($10 \mu\text{L}$ de chaque solution mère) avec le tampon PBS ($980 \mu\text{L}$), résultant en des concentrations de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour chaque oligomère, 10 mmol.L^{-1} pour le tampon phosphate, $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ pour KCl et 137 mmol.L^{-1} pour NaCl ($\text{pH}=7,4$). La solution mélange est placée dans une cuvette UV-visible en quartz de contenance $1400 \mu\text{L}$ (chemin optique de 1 cm) scellée.

Les échantillons sont d'abord soumis à une chauffe rapide de la température ambiante à 90°C à une vitesse de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, et, après 10 min de palier à 90°C , refroidis jusqu'à 3°C à la même vitesse de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Ils sont ensuite sujets à deux cycles successifs de chauffage et refroidissement entre 3°C et 90°C à une vitesse de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. A la fin de ces cycles de changements de température, les échantillons sont ramenés à température ambiante. Pendant ces cycles, les variations du signal d'absorbance UV-visible sont enregistrées à 260 nm .

1.5. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre de dichroïsme circulaire "J-810" de Jasco équipé d'un thermostat à effet Peltier PTC-423S/L de Jasco également.

Des solutions mères de PTzNA [Phe-TTTTTTTT] et d'ADN [TTTTTTTT] et [AAAAAAAA] sont préparées dans de l'eau milli-Q ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Une solution de tampon PBS est également préparée ($10,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de tampon phosphate, $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KCl et $139,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NaCl, $\text{pH}=7,4$).

Pour les mesures, un mélange d'oligomère de thymine (ADN ou PTzNA) et d'oligomère d'adénine complémentaire (ADN) est préparé ($10 \mu\text{L}$ de chaque solution mère) avec le tampon PBS ($980 \mu\text{L}$), résultant en des concentrations de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour chaque oligomère, 10 mmol.L^{-1} pour le tampon phosphate, $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ pour KCl et 137 mmol.L^{-1} pour NaCl ($\text{pH}=7,4$). La solution mélange est placée dans une cuvette UV-visible en quartz de contenance $3500 \mu\text{L}$ (chemin optique de 1 cm) scellée.

Les spectres de dichroïsme circulaire pour des longueurs d'onde comprises entre 180 et 400 nm sont enregistrés à différentes températures (5°C , 25°C , 45°C , 65°C et 85°C) après stabilisation complète de celles-ci.

1.6. Analyses par les nanopores

Les analyses de détection et discrimination par nanopores ont été réalisées par Monasadat Talarimoghari et Jan C. Behrends.

Les bicouches lipidiques ont été obtenues de manière automatisée^[548] à partir d'une solution de diphytanoyl-phosphocholine (DPhPC, Avanti Lipids, Alabaster, AL, États-Unis) dans l'octane (2 mg.mL⁻¹) disposée sur une puce à réseau de micro-électrodes MECA-16 (cavités de diamètre 50 µm, Ionera Technologies GmbH, Freiburg, Allemagne). Les bicouches ont été mises sous tension électrique en utilisant un amplificateur patch-clamp Axopatch-200B, le signal du courant a été filtré à un seuil de 100 kHz (filtre de Bessel à 4 pôles intégré à l'Axopatch) puis à 50 kHz (filtre de Bessel à 8 pôles, Modèle 9002, Frequency Devices, Ottawa, IL, États-Unis) et digitalisé à une fréquence d'échantillonnage de 500 kHz grâce à un convertisseur analogique-numérique NI-PCI6221 (National Instruments, Austin, TX, États-Unis) couplé au logiciel GePulse (Michael Pusch, University of Genova, Italie). Pour les nanopores, l' α -hémolysine (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Allemagne) et la proaérollysine (Aerohead Scientific, Saskatoon, Canada) ont été utilisées. Tous les analytes ont été solubilisés dans un premier temps dans le méthanol, puis 5 µL de ces solutions de polymères ont été ajoutés à 150 µL d'une solution aqueuse de KCl (4 mol.L⁻¹) contenant un tampon trishydroxyméthylaminométhane (Tris) et dont le pH a été contrôlé à hauteur de 7,5.

1.7. Micro-onde

Les synthèses au micro-onde ont été réalisées en utilisant le micro-onde Monowave 300 Anton Paar, sous agitation magnétique à 600 rpm.

1.8. Synthèses itératives

Les synthèses sur phase solide sont réalisées dans des tubes d'extraction en phase solide (SPE) de 1 mL, 3 mL, 6 mL, 12 mL ou 20 mL en polypropylène composé d'un fritté de 20 µm de porosité et fournis par SUPELCO® prolongé par un robinet de vidange et muni d'un septum (bouchon à jupe en caoutchouc) pour les étapes de dégazage.

Les réactions sont agitées à l'aide d'un agitateur IKA KS 130 basic.

2. Réactifs et solvants

Tous les produits chimiques et solvants ont été utilisés sans purification supplémentaire, sauf indication contraire.

Acide trifluoroacétique (TFA, Sigma-Aldrich, 99%), acide chlorhydrique (HCl, Sigma-Aldrich, 37%), acide acétique (AcOH, Fisher Chemical, 99.7%), hydroxyde de sodium (NaOH, VWR, 99%), hydroxyde de potassium (KOH, VWR, 87%), sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄, Fischer Scientific, 99.6%), 1,11-dibromoundécane (Sigma-Aldrich, 98%), azoture de sodium (NaN₃, Alfa Aesar, 99%), phtalimide de potassium (Alfa Aesar, 98%), hydrate d'hydrazine (Aldrich, 98%), cycloheptène (Alfa Aesar, 96%, stabilisé avec 0.1% de BHT), *tert*-butoxyde de potassium (t-BuOK, Alfa Aesar, 97%), bromoforme (Alfa Aesar, 97%), perchlorate d'argent anhydre (AgClO₄, Alfa Aesar), 3-hydroxybutyrate d'éthyle (Alfa Aesar, 98%), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU, TCI, 98%), méthylate de sodium (MeONa, Alfa Aesar, 98%), solution de bromure de propargyle (Alfa Aesar, 80% dans le toluène, stabilisé avec MgO), N-Boc-éthylènediamine (Alfa Aesar, 98%, contient jusqu'à 5% de *tert*-butanol), 2-

bromoéthylamine, bromure d'hydrogène (Alfa Aesar, 98%), bromoacétate de benzyle (Alfa Aesar, 97%), acide 1-thymine acétique (Aldrich, 98%), triéthylamine (Merck, 97%), hexafluorophosphate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium (HBTU, Iris Biotech, 99%), résine Fmoc-Gly-Wang (Novabiochem, taux de fonctionnalisation de 0,23 mmol.g⁻¹), résine Wang (Iris Biotech, taux de fonctionnalisation de 0,22 mmol.g⁻¹), Fmoc-L-phénylalanine (Fmoc-Phe-OH, Iris Biotech, 99%), 4-diméthylaminopyridine (DMAP, Aldrich, 99%), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Alfa Aesar, 99%), anhydride acétique (Alfa Aesar, 99%), pyridine anhydre (Sigma-Aldrich, 99.8%), pipéridine (Alfa Aesar, 99%), acide 5-héxynoïque (Alfa Aesar, 97%), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC, Aldrich, 99%), hydrate de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, Aldrich, 97%), hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HATU, Iris Biotech, 99%), hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium (PyBOP, Novabiochem, 99%), hexafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminooxy)diméthylamino-morpholino-carbenium (COMU, Alfa Aesar, 98%), N-diisopropyléthylamine (DIPEA, Alfa Aesar, 99%), 2,6-lutidine (Alfa Aesar, 98%), 4,4'-dinonyl-2,2'-bipyridyl (dNbipy, TCI, 98%), tris-(hydroxypropyltriazoilméthyl)amine (THPTA, Aldrich, 95%), sulfate de cuivre (II) (CuSO₄, Sigma-Aldrich, 99%), acide L-ascorbique (Sigma-Aldrich, 99%), sel d'ascorbate de sodium (Alfa Aesar, 99%), acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA, Sigma, 99.9%, sel de disodium), chloroforme deutéré (CDCl₃, Aldrich, 99.8%), chloroforme anhydre (Sigma-Aldrich, 99%, stabilisé avec de l'amylène), diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-*d*₆, Aldrich, 99.8%), diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO anhydre, Sigma-Aldrich, 99.9%), acétone anhydre (Fischer Scientific), acétone (Carlo Erba, 99.8%), méthanol anhydre (MeOH anhydre, Sigma-Aldrich, 99.8%), méthanol (MeOH, Carlo Erba, 99.9%), méthanol (MeOH, Carlo Erba, 99.9%), tétrahydrofurane (THF, Aldrich, 99%, stabilisé avec BHT), 1,4-dioxane (Sigma-Aldrich, 99.5%), toluène anhydre (Sigma-Aldrich, 99.8%), n-pentane anhydre (Alfa Aesar, 99.8%), n-pentane (Carlo Erba, 95%), acétate d'éthyle (EtOAc, Carlo Erba, 99.8%), cyclohexane (cHex, Carlo Erba, 99.8%), éthanol absolu (EtOH, VWR, 99.8%), dichlorométhane anhydre (DCM anhydre, Sigma-Aldrich, 99.8%, stabilisé avec de l'amylène), dichlorométhane (DCM, Sigma-Aldrich, 99.9%, stabilisé avec de l'amylène), dichlorométhane (DCM, Carlo Erba, 99.9%, stabilisé avec de l'amylène), N,N-diméthylformamide anhydre (DMF anhydre, Sigma-Aldrich, 99.8%), N,N-diméthylformamide (DMF, Sigma-Aldrich, 99%), 1-méthyl-2-pyrrolidinone anhydre (NMP anhydre, Sigma-Aldrich, 99%), éther diéthylique (Et₂O, Carlo Erba, 99.5%, stabilisé avec BHT). Le bromure de cuivre (I) (CuBr, Sigma-Aldrich, 98%) a été lavé à l'acide acétique glacé dans le but d'éliminer toutes les espèces solubles oxydées, filtré, lavé à l'éthanol, et séché.

Pour les chapitres II et III, le 11-azido-3,6,9-trioxaundécane-1-amine (E₂) a été synthétisé par Laurence Oswald selon un protocole adapté de la littérature.^[549, 550]

Pour le chapitre IV, les blocs AB-C, AB-G et AB-A, ainsi que les blocs CD-C, CD-G et CD-A ont été synthétisés par Laurence Oswald. Les synthèses des monomères sont adaptés d'une publication.^[529] De même, le ligand tris-(benzyltriazoilméthyl)amine (TBTA), a été synthétisé par Abdelaziz Al-Ouahabi d'après une publication précédente.^[371] La séquence d'ADN [TTTTTTTT] utilisée pour les analyses en spectroscopie UV-visible et en dichroïsme circulaire a été synthétisée par Niklas König sur un synthétiseur d'oligonucléotides Expedite 8900 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, États-Unis) tandis que la séquence [AAAAAAAA] est commerciale (Eurogentec, Seraing, Belgique).

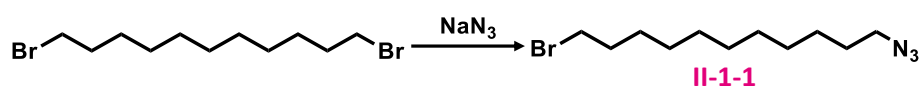
3. Synthèses

3.1. Synthèses du Chapitre II

3.1.1. Synthèse de l'espaceur E₁ contenant une chaîne alkyle (II-1)

Cette synthèse est adaptée de publications.^[449, 551]

Étape 1 : Synthèse du 1-azido-11-bromoundécane (II-1-1).

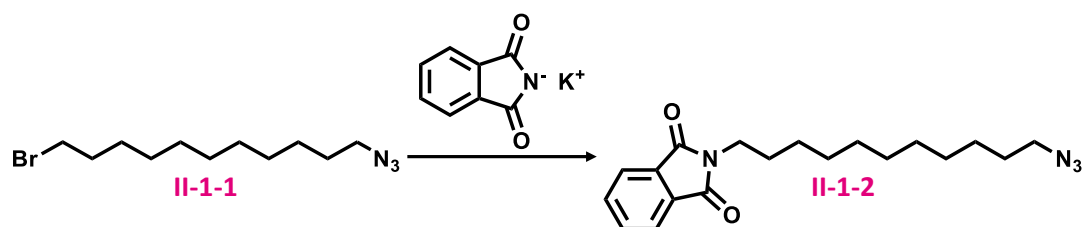


À une solution de 1,11-dibromoundécane (10 g, 31,8 mmol, 1,5 éq.) dans le DMF anhydre (50 mL) à 60°C est ajouté NaN₃ (1,38 g, 21,2 mmol, 1 éq.) par portions pendant 30 min. Le mélange est agité pendant 5h à 60°C. Le solvant est ensuite évaporé et de l'éther diéthylique (100 mL) ainsi qu'une solution de NaOH 1M (100 mL) sont ajoutés. Après agitation, le mélange est extrait avec de l'éther diéthylique, puis les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au n-pentane. Le composé II-1-1 est isolé sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 59% (3,47 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1.49-1.23 (m, 14H, -CH₂-(CH₂)₇-CH₂-), 1.65-1.55 (m, 2H, -CH₂-CH₂-N₃), 1.86 (q, 2H, -CH₂-CH₂-Br), 3.26 (t, 2H, -CH₂-N₃), 3.42 (t, 2H, -CH₂-Br).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 26.9, 28.3, 28.9, 29.0, 29.3, 29.6, 33.0, 34.2, 51.4.

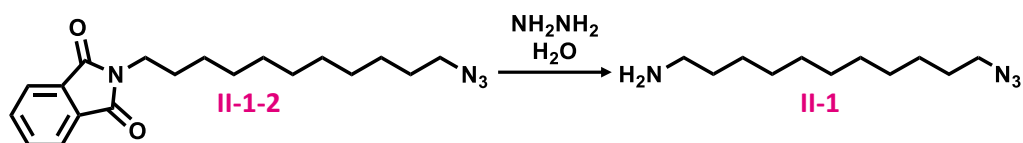
Étape 2 : Synthèse du 1-phthalimido-11-azidoundécane (II-1-2).



Au phthalimide de potassium (1,5 g, 8,1 mmol, 1,5 éq.) est ajoutée une solution du composé II-1-1 (1,5 g, 5,4 mmol, 1 éq.) dans le DMF anhydre (30 mL). Après 5h d'agitation à 70°C, le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au dichlorométhane. Le composé II-1-2 est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 76% (1,41 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1.41-1.22 (m, 14H, -CH₂-(CH₂)₇-CH₂-), 1.63-1.55 (m, 2H, -CH₂-CH₂-N₃), 1.72-1.63 (m, 2H, -CH₂-CH₂-N-), 3.26 (t, 2H, -CH₂-N₃), 3.68 (t, 2H, -CH₂-N-), 7.74-7.69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-C-), 7.87-7.82 (m, 2H, -CH₂-C-).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 26.8, 27.0, 28.8, 29.0, 29.3, 29.5, 38.2, 51.6, 123.3, 132.3, 134.0, 168.6.

Étape 3 : Synthèse du 11-azidoundécane-1-amine (II-1).

À une solution du composé II-1-2 (1 g, 2,9 mmol, 1 éq.) dans l'éthanol (40 mL) est ajouté de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g, 10,2 mmol, 3,5 éq.). Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 4h, puis refroidi à température ambiante. Une solution de KOH 1M (50 mL) est alors ajoutée et le solvant évaporé. Le mélange est extrait au dichlorométhane, puis les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Le composé II-1 est isolé sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 97% (601 mg).

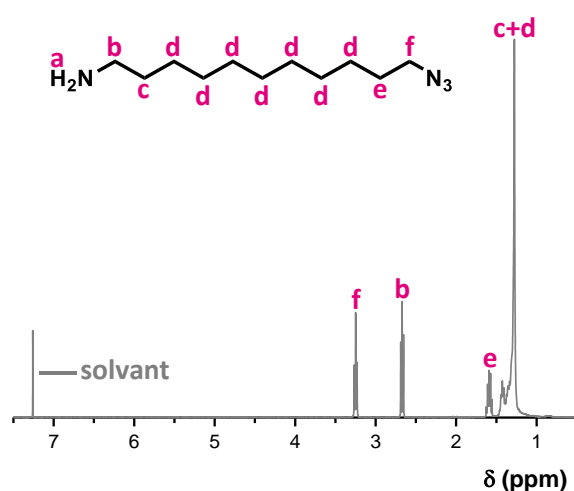


Figure E.1. RMN ¹H (CDCl₃) du composé II-1.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1.48-1.24 (m, 16H, -CH₂-(CH₂)₇-CH₂-), 1.64-1.56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-N₃), 2.68 (t, 2H, -CH₂-NH₂), 3.26 (t, 2H, -CH₂-N₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 26.9, 27.0, 29.0, 29.3, 29.6, 29.7, 34.1, 42.5, 51.7.

3.1.2. Préparation de la résine fonctionnalisée avec une phénylalanine**Étape 1 : Fonctionnalisation de la résine.**

300 mg de résine Wang (taux de fonctionnalisation = 0,22 mmol.g⁻¹) sont introduits dans un tube d'extraction en phase solide (SPE) de 6 mL, muni d'un robinet, déposés au fond sur le fritté. Le tube est rempli avec du DCM de sorte que la résine puisse gonfler. Après 10 min, le tube est vidé mais la résine pas complètement séchée. Le HO-Phe-Fmoc (102 mg, 0,264 mmol, 4 éq.), la DMAP (16 mg, 0,132 mmol, 2 éq.) et le DCC (54 mg, 0,264 mmol, 4 éq.) sont introduits dans le tube, sur la résine. Le tube SPE est fermé grâce à un bouchon à jupe en caoutchouc, et après 3 cycles vide-argon, 5 mL de DCM anhydre sont injectés. Après dissolution complète des réactifs, le tube est laissé à agiter pendant 24h à température ambiante. Le réacteur est ensuite vidé et la résine lavée abondamment au DMF afin d'éliminer les sous-produits insolubles dans le DCM. Elle est ensuite lavée plusieurs fois par du DMF et du DCM et séchée complètement sous flux d'air.

Étape 2 : Capping des fonctions n'ayant pas réagi.

Le tube SPE contenant la résine fonctionnalisée est à nouveau clos à l'aide d'un bouchon à jupe en caoutchouc, puis de l'anhydride acétique (0,83 mL) et de la pyridine (4,17 mL) sont injectés. Après 1h d'agitation à température ambiante, le tube est vidé et la résine lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x). La résine est ensuite complètement séchée sous flux d'air.

Étape 3 : Détermination du niveau de substitution.

10 mg de résine Fmoc-Phe-Wang sont introduits dans un pilulier de 30 mL et couverts de 0,5 mL d'une solution de pipéridine à 30% dans le DMF pendant 30 min à température ambiante. 19,5 mL d'éthanol absolu sont introduits dans le pilulier, la solution est mélangée et la résine décantée au fond du flacon pendant 5 min. Le surnageant éthanoïque est prélevé et introduit dans une cuvette de 1 cm, puis analysé en spectroscopie UV-visible. L'absorbance de l'échantillon à 300 nm est mesurée. Le taux de fonctionnalisation par la phénylalanine est calculé grâce au coefficient d'extinction du groupement Fmoc à 300 nm grâce à l'équation suivante :

$$\text{taux de fonctionnalisation (mmol.g}^{-1}\text{)} = \frac{3.05 \times A_{300}}{m}$$

où m = masse du support (mg) et A_{300} = absorbance à 300 nm.

Étape 4 : Activation de la résine Fmoc-Phe-Wang.

300 mg de résine Fmoc-Phe-Wang (taux de fonctionnalisation = 0,22 mmol.g⁻¹) sont utilisés comme support solide et placés dans un tube SPE de 6 mL. Avant les étapes itératives, les billes de résine gonflent 10 min en étant agitées dans le DCM à température ambiante. Le groupement Fmoc est ensuite éliminé par traitement avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF pendant 20 min. Cette étape de déprotection est répétée pour assurer l'élimination complète du groupement protecteur de la résine. La résine est alors lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) et séchée complètement sous flux d'air.

Le même protocole est appliqué dans le cas d'une synthèse sur résine Fmoc-Gly-Wang commerciale.

3.1.3. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Phe-Wang à température ambiante

Étape 1 : Couplage acide carboxylique-amine primaire pour l'ajout des blocs AB (i).

Trois solutions sont préparées : une solution d'agent de couplage (0,5 mol.L⁻¹ pour COMU, 0,5 mol.L⁻¹ pour chaque dans le cas du mélange DIC/HOBt, dans le DMF anhydre), une solution de base (DIPEA, 1,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre) et une solution de monomère (acide 5-héxynoïque, 0,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre). La résine est conditionnée avec du DMF anhydre. Le tube est vidé mais la résine n'est pas complètement séchée. Dans un pilulier de 3 mL, un mélange composé des solutions de monomère (4 éq.), d'agent de couplage (3,5 éq.) et des bases (6 éq.) est préparé. Ce mélange est laissé 2 min pour activer l'acide carboxylique du monomère puis collecté à l'aide d'une micropipette (2,937 mL) et déposé sur la résine, sur le fritté dans le fond du tube, qui est agité pendant 2h. La résine est alors lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) et séchée complètement sous flux d'air.

Étape 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par de cuivre (I) (CuAAC) pour l'ajout des blocs CD (ii).

Sur la résine précédemment conditionnée avec du DMF anhydre, la source de cuivre (CuBr, 3 éq.), le ligand (dNbipy, 6 éq.) et le monomère (11-azidoundecan-1-amine (E₁) ou 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (E₂), 6 éq.) sont déposés. Un bouchon à jupe en caoutchouc scelle le tube SPE (surmonté de parafilm) et trois cycles vide-argon sont réalisés pour assurer une atmosphère sans oxygène dans le tube. 5 mL de solvant (DMF anhydre) sont injectés dans le tube sous argon. 1 mL d'une solution saturée d'acide L-ascorbique dans l'eau distillée est également injecté. Une autre couche de parafilm est fixée sur le bouchon pour empêcher l'air d'entrer par les trous d'injection dans le septum. Le tube est agité 2h à température ambiante. La solution est ensuite drainée et la résine lavée une première fois avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x), puis avec une solution saturée d'EDTA dans un mélange eau distillée/DMF (1:1) pendant 30 min pour éliminer les traces de cuivre restantes, puis à nouveau avec des solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x). Elle est enfin séchée complètement sous flux d'air.

Étape 3 : Procédure générale pour le clivage des oligomères (iii).

Le clivage des chaînes de poly(triazole amide)s de la résine est réalisé dans une solution de TFA dans le DCM (1:1 v:v) pendant 2h à température ambiante dans un pilulier de 10 mL. Après la réaction, la solution est filtrée dans un tube de centrifugation, concentrée et précipitée dans de l'éther diéthylique froid (8 à 10 volumes). Le tube est ensuite centrifugé pendant 20 à 9500 tours par minute et le surnageant retiré. Le solide obtenu est enfin complètement séché *in vacuo*.

3.1.4. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Phe-Wang ou Gly-Wang au micro-onde**Étape 1 : Couplage acide carboxylique-amine primaire pour l'ajout des blocs AB (i).**

Trois solutions sont préparées : une solution d'agents de couplage (0,5 mol.L⁻¹ pour chacun des agents du mélange DIC/HOBt, dans le DMF anhydre), une solution de base (DIPEA, 1,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre) et une solution de monomère (acide 5-héxynoïque, 0,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre). La résine est complètement séchée avec de l'éther diéthylique et insérée dans un tube de 10 mL adapté pour le micro-onde. Dans un pilulier de 3 mL, un mélange composé des solutions de monomère (4 éq.), d'agent de couplage (3,5 éq.) et des bases (6 éq.) est préparé. Ce mélange est laissé 2 min pour activer l'acide carboxylique du monomère puis collecté à l'aide d'une micropipette (2,937 mL) et déposé sur la résine, dans le fond du tube. Celui-ci est soumis à un chauffage par micro-ondes pendant 2h. La résine est alors à nouveau transférée dans un tube SPE et lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) puis séchée complètement sous flux d'air.

Étape 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par de cuivre (I) (CuAAC) pour l'ajout des blocs CD (ii).

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 2 du 3.1.2.

Étape 3 : Procédure générale pour le clivage des oligomères (iii).

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 3 du 3.1.2.

3.1.5. Synthèse itérative d'oligomères sur une résine Wang au micro-onde

Étape 1 : Estérification pour le premier ajout d'un bloc AB (i).

300 mg de résine Wang (taux de fonctionnalisation = $0,22 \text{ mmol.g}^{-1}$) sont introduits dans un tube d'extraction en phase solide (SPE) de 6 mL, muni d'un robinet, déposés au fond sur le fritté. Le tube est rempli avec du DCM de sorte que la résine puisse gonfler. Après 10 min, le tube est vidé mais la résine pas complètement séchée. Le monomère (acide 5-héxynoïque, 4 éq.), la DMAP (2 éq.) et le DCC (4 éq.) sont introduits dans le tube, sur la résine. Le tube SPE est fermé grâce à un bouchon à jupe en caoutchouc, et après 3 cycles vide-argon, 5 mL de DCM anhydre sont injectés. Après dissolution complète des réactifs, le tube est laissé à agiter pendant 24h à température ambiante. Le réacteur est ensuite vidé et la résine lavée abondamment au DMF afin d'éliminer les sous-produits insolubles dans le DCM. Elle est ensuite lavée plusieurs fois par du DMF et du DCM et séchée complètement sous flux d'air.

Le tube SPE contenant la résine fonctionnalisée est ensuite à nouveau clos à l'aide d'un bouchon à jupe en caoutchouc, puis de l'anhydride acétique (0,83 mL) et de la pyridine (4,17 mL) sont injectés. Après 1h d'agitation à température ambiante, le tube est vidé et la résine lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x). La résine est ensuite complètement séchée sous flux d'air.

Étape 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par de cuivre (I) (CuAAC) pour l'ajout des blocs CD (ii).

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 2 du 3.1.2.

Étape 3 : Couplage acide carboxylique-amine primaire pour l'ajout des blocs AB (iii).

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 1 du 3.1.3.

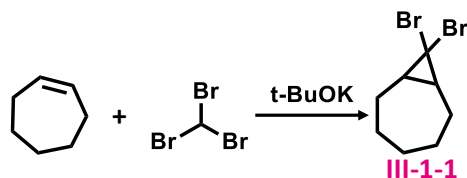
Étape 4 : Procédure générale pour le clivage des (iv).

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 3 du 3.1.2.

3.2. Synthèses du Chapitre III

3.2.1. Synthèse du monomère avec la cyclooctyne (III-1) – 1^{er} essai

Étape 1 : Synthèse du 8,8-dibromobicyclooctane (III-1-1)



À une solution de cycloheptène (2,0 g, 20,8 mmol, 1 éq.) et de t-BuOK (4,7 g, 41,6 mmol, 2 éq.) dans le n-pentane anhydre (5 mL) est ajouté du bromoforme (7,9 g, 31,2 mmol, 1,5 éq.) au goutte à goutte pendant 6h, à -10°C , sous argon. Le mélange est ramené à température ambiante puis la réaction est laissée sous agitation toute la nuit. De l'eau (30 mL) est ensuite ajoutée, puis le pH du milieu est neutralisé avec une solution de HCl 1M. Le mélange est alors extrait avec du n-pentane, les phases organiques combinées sont lavées à l'eau, séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Le produit brut est enfin

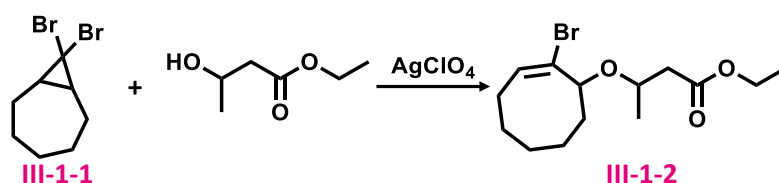
purifié par co-évaporation avec quelques millilitres de chloroforme et le composé III-1-1 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 47% (3,12 g).

R_f (cHex/EtOAc 95:5) = 0,78.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1.23-1.11 (m, 3H, $-\text{CH}-\text{CHH}'-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CHH}'-(\text{CH}_2)_2-$), 1.43-1.30 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHH}'-$), 1.76-1.65 (m, 2H, $-\text{CH}_-$), 1.94-1.78 (m, 3H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHH}'-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CHH}'-(\text{CH}_2)_2-$), 2.32-2.21 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CHH}'-\text{CH}_2$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 28.14, 29.03, 32.36, 34.84, 40.83.

Étape 2 : Ajout de l'éthyle 3-hydroxybutyrate – 1^{ères} conditions (III-1-2)



À une solution 3-hydroxybutyrate d'éthyle (22,2 g, 168 mmol, 30 éq.) et de perchlorate d'argent anhydre (3,5 g, 16,8 mmol, 3 éq.) dans le toluène anhydre (5 mL) agitée sous argon est ajoutée une solution du composé III-1-1 (1,5 g, 5,6 mmol, 1 éq.) dans un mélange de toluène anhydre (3 mL) et de pyridine anhydre (4 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4h, à l'abri de la lumière. Les résidus solides sont alors filtrés, le mélange est lavé à la saumure (100 mL) puis extrait avec Et_2O . Les phases organiques combinées sont alors lavées à l'eau puis séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5). Le composé III-1-2 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 35% (625 mg).

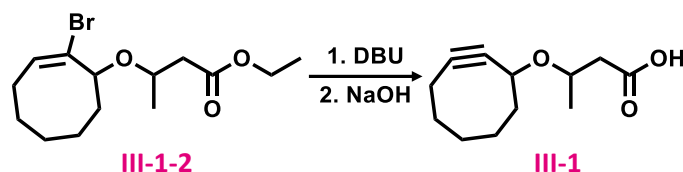
R_f (cHex/EtOAc 9:1) = 0,57.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1.35-1.18 (m, 8H, $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 2.05-1.42 (m, 6H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2.45-2.24 (m, 2H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CHCH}_3-$), 2.82-2.54 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}-\text{CBr}-\text{CH}-\text{CH}_2-$), 4.20-3.90 (m, 4H, $-\text{CBr}-\text{CH}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-$, $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 6.19-6.13 (m, 1H, $-\text{CBr}-\text{CH}-\text{CH}_2-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 14.37, 19.25, 21.50, 26.42, 28.49, 33.43, 36.70, 40.05, 40.19, 41.53, 42.75, 60.53, 70.38, 71.47, 82.75, 84.14, 131.02, 133.55, 133.80, 171.48, 171.72.

ESI-HRMS (mode positif) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z_{\text{th}} = 319.0903$, $m/z_{\text{exp}} = 319.0901$.

Étape 3 : Formation de la cyclooctyne et déprotection de l'acide carboxylique – 1^{ères} conditions (III-1)



À une solution du composé III-1-2 (0,5 g, 1,6 mmol, 1 éq.) dans le DMSO anhydre (6 mL) agitée sous argon à 80°C est ajouté du DBU (0,5 g, 3,1 mmol, 2 éq.). Le mélange est agité pendant 15 min puis du

DBU (1,9 g, 12,5 mmol, 8 éq.) est à nouveau ajouté. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 80°C pendant 72h. Une fois le mélange refroidi à température ambiante, une solution de NaOH (0,25 g, 6,3 mmol, 4 éq.) dans l'eau (1 mL) est ajoutée et la réaction est agitée une nuit. Le mélange est ensuite acidifié jusqu'à pH=1 par ajout d'une solution de HCl 1M (25 mL), puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont alors séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10), avec 1% d'acide acétique. Le composé III-1 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 14% (46 mg).

R_f (cHex/EtOAc 9:1) = 0,22.

Le produit s'étant décomposé rapidement à la lumière et à l'air, sa caractérisation n'a pas été possible.

3.2.2. Synthèse du monomère avec la cyclooctyne (III-1) – 2^{ème} essai

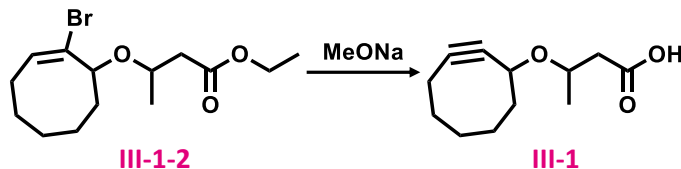
Étape 1 : Synthèse du 8,8-dibromobicyclooctane (III-1-1)

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 1 du 3.2.1.

Étape 2 : Ajout de l'éthyle 3-hydroxybutyrate – 2^{ndes} conditions (III-1-2)

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 2 du 3.2.1 à partir de 9,3 mmol (2,5 g) du composé III-1-1, sauf pour le temps de reflux, qui est de 8h au lieu de 4h. Le composé III-1-2 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 38% (1,12 g).

Étape 3 : Formation de la cyclooctyne et déprotection de l'acide carboxylique – 2^{ndes} conditions (III-1)



À une solution de MeONa (0,9 g, 16,4 mmol, 7 éq.) dans le méthanol anhydre (30 mL) agitée sous argon pendant 10 min est ajouté le composé III-1-2 (0,75 g, 2,3 mmol, 1 éq.) au goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 72h. Après un ajout d'eau (2 mL) et une agitation pendant une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est acidifié jusqu'à pH=1 par ajout d'une solution d'HCl 1M (35 mL), puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont alors séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au dichlorométhane/méthanol (de 100/0 à 96/4). Le composé III-1 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 35% (170 mg).

R_f (DCM) = 0,36.

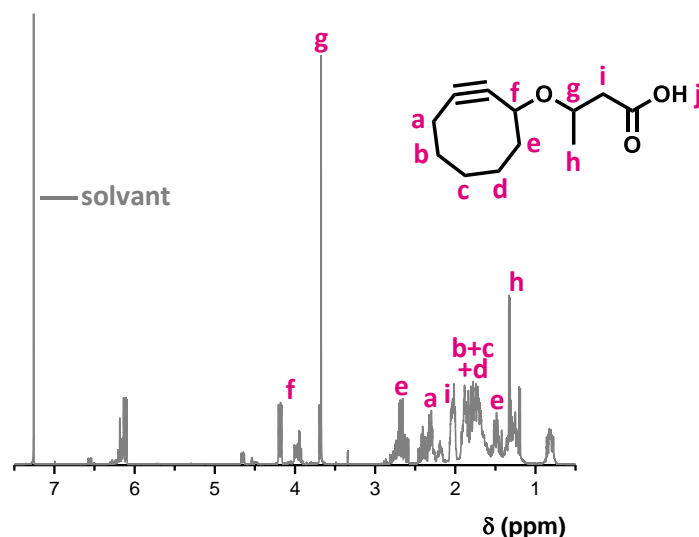


Figure E.2. RMN ^1H (CDCl_3) du composé III-1.

Du fait de la décomposition du produit à la lumière et à l'air, des pics correspondant à des impuretés (produits de la dégradation) sont observés en RMN.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1.40-1.07 (m, 3H, $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-$), 1.57-1.41 (m, 1H, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}-\text{CHH}'-$), 1.96-1.58 (m, 6H, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2.12-1.97 (m, 2H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CHCH}_3-$), 2.49-2.13 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$), 2.92-2.56 (m, 1H, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}-\text{CHH}'-$), 3.72-3.64 (m, 1H, $-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-$), 4.23-3.89 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 19.22, 21.50, 24.10, 26.40, 27.01, 28.31, 28.44, 29.11, 30.43, 33.39, 33.44, 36.69, 36.79, 40.02, 40.14, 40.66, 41.17, 42.51, 42.88, 68.94, 70.29, 71.36, 77.56, 82.75, 84.09, 172.16.

3.2.3. Synthèse itérative d'un oligo(triazole amide) à séquence définie sans cuivre sur une résine Wang

Étape 1 : Estérification pour le premier ajout d'un bloc AB (i).

50 mg de résine Wang (taux de fonctionnalisation = $0,22 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) sont introduits dans un tube d'extraction en phase solide (SPE) de 6 mL, muni d'un robinet, déposés au fond sur le fritté. Le tube est rempli avec du DCM de sorte que la résine puisse gonfler. Après 10 min, le tube est vidé mais la résine pas complètement séchée. Le monomère contenant la cyclooctyne (III-1 (1), 4 éq.), la DMAP (2 éq.) et le DCC (4 éq.) sont introduits dans le tube, sur la résine. Le tube SPE est fermé grâce à un bouchon à jupe en caoutchouc, et après 3 cycles vide-argon, 2,5 mL de DCM anhydre sont injectés. Après dissolution complète des réactifs, le tube est laissé à agiter pendant 24h à température ambiante. Le réacteur est ensuite vidé et la résine lavée abondamment au DMF afin d'éliminer les sous-produits insolubles dans le DCM. Elle est ensuite lavée plusieurs fois par du DMF et du DCM et séchée complètement sous flux d'air.

Afin d'assurer un rendement maximal, cette étape est répétée.

Le tube SPE contenant la résine fonctionnalisée est ensuite à nouveau clos à l'aide d'un bouchon à jupe en caoutchouc, puis de l'anhydride acétique (0,83 mL) et de la pyridine (4,17 mL) sont injectés. Après

1h d'agitation à température ambiante, le tube est vidé et la résine lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x). La résine est ensuite complètement séchée sous flux d'air.

Étape 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par de cuivre (I) (CuAAC) pour l'ajout des blocs CD (ii).

La résine est complètement séchée avec de l'éther diéthylique et insérée dans un tube de 10 mL adapté pour le micro-onde. Le monomère (11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (E₂), 6 éq.) est déposé sur la résine dans le fond du tube puis 2,5 mL de solvant (mélange MeOH/H₂O 8:2) sont ajoutés. Le tube est soumis à un chauffage par micro-ondes pendant 2h. La résine est alors à nouveau transférée dans un tube SPE et lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) puis séchée complètement sous flux d'air.

Étape 3 : Couplage acide carboxylique-amine primaire pour l'ajout des blocs AB (iii).

Trois solutions sont préparées : une solution d'agents de couplage (0,5 mol.L⁻¹ pour chacun des agents du mélange DIC/HOBt, dans le DMF anhydre), une solution de base (DIPEA, 1,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre) et une solution de monomère (III-1 (1), 0,2 mol.L⁻¹ dans le DMF anhydre). La résine est complètement séchée avec de l'éther diéthylique et insérée dans un tube de 10 mL adapté pour le micro-onde. Dans un pilulier de 3 mL, un mélange composé des solutions de monomère (4 éq.), d'agent de couplage (3,5 éq.) et des bases (6 éq.) est préparé. Ce mélange est laissé 2 min pour activer l'acide carboxylique du monomère puis collecté à l'aide d'une micropipette (490 µL) et déposé sur la résine, dans le fond du tube. Celui-ci est soumis à un chauffage par micro-ondes pendant 2h. La résine est alors à nouveau transférée dans un tube SPE et lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) puis séchée complètement sous flux d'air.

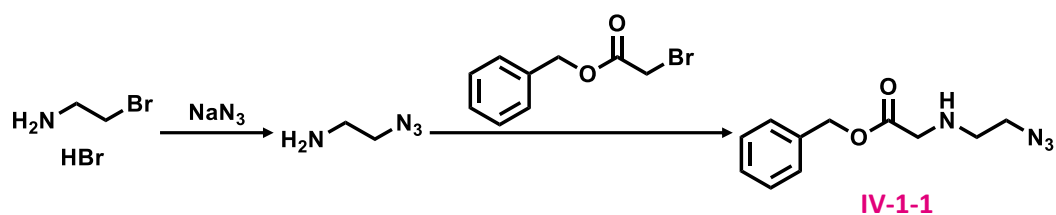
Étape 4 : Procédure générale pour le clivage des oligomères et la déprotection des groupements Boc des bases (iv).

Le clivage des chaînes de poly(triazole amide)s de la résine est réalisé dans une solution de TFA dans le DCM (1:1 v:v) pendant 2h à température ambiante dans un pilulier de 10 mL. Après la réaction, la solution est filtrée dans un tube de centrifugation, concentrée et précipitée dans de l'éther diéthylique froid (8 à 10 volumes). Le tube est ensuite centrifugé pendant 20 à 9500 tours par minute et le surnageant retiré. Le solide obtenu est enfin complètement séché *in vacuo*.

3.3. Synthèses du Chapitre IV

3.3.1. Synthèse du synthon AB-T (IV-1)

Étape 1 : Synthèse du squelette acide carboxylique (protégé) – azoture (IV-1-1).



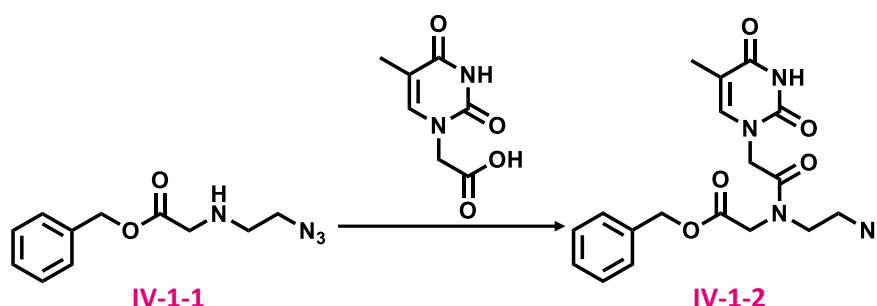
À une solution de 2-bromoéthylamine hydrobromure (10 g, 48,8 mmol, 1 éq.) dans le DMF (25 mL) est ajouté NaN₃ (3,49 g, 53,7 mmol, 1,1 éq.). Le mélange réactionnel est agité à 60°C pendant 3h. La

réaction est ensuite refroidie à 0°C puis de la triéthylamine (13,7 mL, 97,6 mmol, 2 éq.) est ajoutée, suivie par du bromoacétate de benzyle (6,21 mL, 39,0 mmol, 0,8 éq.). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 2h puis dilué avec Et₂O (200 mL) et lavé à la saumure (200 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée, puis purifiée sur colonne de silice en éluant au cyclohexane/acétate d'éthyle (de 70/30 à 0/100). Le composé IV-1-1 est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 40% (3,7 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 2.28 (br s, 1H, -CH₂-NH-CH₂-), 2.75 (t, 2H, -NH-CH₂-CH₂-), 3.34 (t, 2H, -NH-CH₂-CH₂-), 3.43 (s, 2H, -CO-CH₂-NH-), 5.13 (s, 2H, -CH₂-O-CO-), 7.40-7.36 (m, 5H, (-CH-)₅).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 47.59, 49.83, 50.43, 65.41, 127.91, 127.96, 128.35, 136.04, 172.00.

Étape 2 : Ajout de la thymine (IV-1-2).

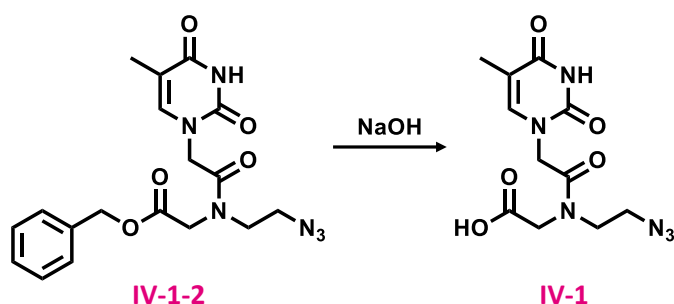


À une solution d'acide 1-thymine acétique (1,57 g, 8,5 mmol, 1 éq.) dans le DMF anhydre (25 mL) est ajoutée de la triéthylamine (1,18 mL, 8,5 mmol, 1 éq.) et HBTU (3,23 g, 8,5 mmol, 1 éq.) à température ambiante. Après agitation du milieu pendant 15 min, une solution du composé IV-1-1 (1,99 g, 8,5 mmol, 1 éq.) dans le DMF anhydre (10 mL) est ajoutée, suivie par de la triéthylamine (1,18 mL, 8,5 mmol, 1 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante toute la nuit. La réaction est arrêtée avec de l'eau (20 mL). Le mélange est agité pendant 20 min puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont alors lavées à la saumure puis séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant au cyclohexane/acétate d'éthyle (de 50/50 à 0/100). Le composé IV-1-2 est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 76% (2,6 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 1.75 (s, 3H, -C-CH₃), 3.49-3.42 (dt, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 3.64-3.59 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 4.46-4.17 (ds, 2H, -CH₂-CO-N-), 4.72-4.52 (ds, 2H, -O-CO-CH₂-), 5.21-5.14 (ds, 2H, -CH₂-O-), 7.22 (s, 1H, -N-CH-C-), 7.40-7.36 (m, 5H, (-CH)₅), 11.26 (s, 1H, -CO-NH-CO-).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 11.81, 46.30, 46.76, 47.80, 48.03, 48.23, 49.02, 65.90, 66.56, 108.03, 108.20, 127.80, 128.00, 128.07, 128.19, 128.37, 128.42, 135.51, 135.74, 141.83, 142.08, 150.90, 164.34, 167.63, 167.92, 168.78, 169.23.

Étape 3 : Déprotection de l'acide carboxylique (IV-1).



À une solution du composé IV-1-2 (1,7 g, 4,2 mmol, 1 éq.) dans le 1,4-dioxane (5 mL) est ajoutée une solution de NaOH 2M (10 mL, 20 mmol, 4,8 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h puis acidifié jusqu'à pH=2 en ajoutant une solution de HCl 4M (4 mL, 16 mmol, 3,8 éq.). De l'acétone froid est ajouté et le précipité obtenu est filtré. La solution est concentrée et l'opération est répétée jusqu'à ce que l'ajout d'acétone froid n'entraîne plus l'apparition de précipité. La solution est alors complètement évaporée jusqu'à l'obtention d'un solide blanc lavé abondamment avec Et₂O. Après séchage, le composé IV-1 est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 91% (1,2 g).

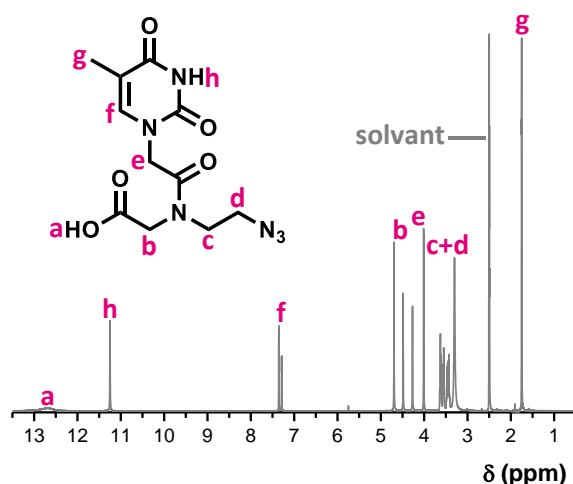


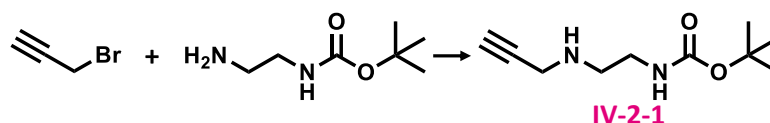
Figure E.3. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) du composé IV-1.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 1.75 (s, 3H, -C-CH₃), 3.52-3.40 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 3.63-3.55 (dt, 2H, -N-CH₂-CH₂-), 4.27-4.01 (ds, 2H, -CH₂-CO-N), 4.70-4.49 (ds, 2H, HO-CO-CH₂-), 7.35-7.29 (ds, 1H, -N-CH-C-), 11.25 (s, 1H, -CO-NH-CO-), 12.69 (br s, 1H, HO-CO-CH₂-).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) : 11.84, 46.32, 46.63, 47.77, 47.85, 48.28, 48.99, 49.03, 108.01, 108.14, 142.02, 142.20, 150.94, 164.39, 167.42, 167.91, 170.27, 170.63.

3.3.2. Synthèse du synthon CD-T (IV-2)

Étape 1 : Synthèse du squelette alcyne – amine (protégée) (IV-2-1).

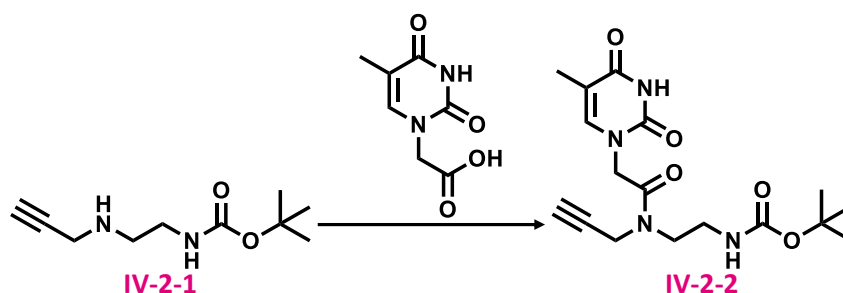


À une solution de bromure de propargyle (2,8 g, 18,8 mmol, 1,5 éq.) et DBU (2,8 mL, 18,8 mmol, 1,5 éq.) dans le toluène anhydre (25 mL) est ajoutée une solution de N-Boc-éthylènediamine (2 g, 12,48 mmol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL). La réaction est agitée à 60°C toute la nuit. Le mélange est concentré et purifié sur colonne de silice en éluant au n-pentane/acétate d'éthyle (de 30/70 à 0/100). Le composé IV-2-1 est isolé sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 36% (900 mg).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1.44 (s, 9H, $-(\text{CH}_3)_3$), 2.21 (t, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.81 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.23 (q, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 3.42 (d, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.90 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 28.55, 37.92, 40.20, 42.24, 48.02, 71.62, 73.34, 79.32, 82.09, 156.20.

Étape 2 : Ajout de la thymine (IV-2-2).

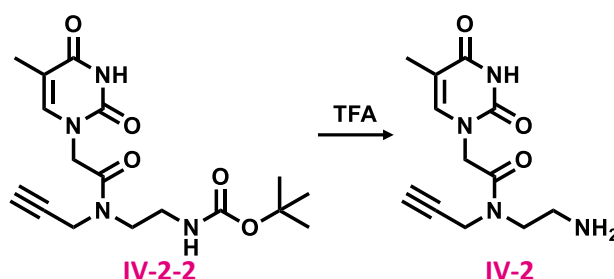


À une solution d'acide 1-thymine acétique (915 mg, 4,97 mmol, 1,1 éq.) dans le DMF anhydre (7 mL) est ajoutée de la triéthylamine (690 μL , 4,99 mmol, 1,1 éq.) et HBTU (1,89 g, 4,99 mmol, 1,1 éq.) à température ambiante. Après agitation du milieu pendant 15 min, une solution du composé IV-2-1 (900 mg, 4,55 mmol, 1 éq.) dans le DMF anhydre (6 mL) est ajoutée, suivie par de la triéthylamine (690 μL , 4,99 mmol, 1,1 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante toute la nuit. La réaction est arrêtée avec de l'eau (20 mL). Le mélange est agité pendant 20 min puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont alors lavées à la saumure puis séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice en éluant à l'acétate d'éthyle. Le composé IV-2-2 est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 60% (1 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1.43 (s, 9H, $-(\text{CH}_3)_3$), 1.91 (s, 3H, $-\text{C}-\text{CH}_3$), 2.43-2.28 (dt, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.42-3.32 (dq, 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.60 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 4.24-4.16 (dd, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.61-4.57 (ds, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{N}-$), 5.10-4.93 (ds, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 7.00 (s, 1H, $-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-$), 8.68 (br s, 1H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 12.25, 14.18, 21.01, 28.37, 35.40, 38.06, 38.73, 46.47, 48.20, 60.36, 72.83, 74.07, 110.91; 141.02, 141.22, 151.27, 156.21, 164.31, 166.66, 167.19, 167.52, 171.11.

Étape 3 : Déprotection de l'amine (IV-2).



À une solution du composé IV-2-2 (1 g, 2,7 mmol) dans le DCM (13 mL) est ajouté du TFA (1,3 mL). Après agitation à température ambiante pendant 3h, le mélange est concentré, resolubilisé dans un volume minimum de DCM puis précipité dans du Et₂O, filtré et lavé abondamment avec du Et₂O. Après une dernière filtration, le composé IV-2 est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 83% (600 mg).

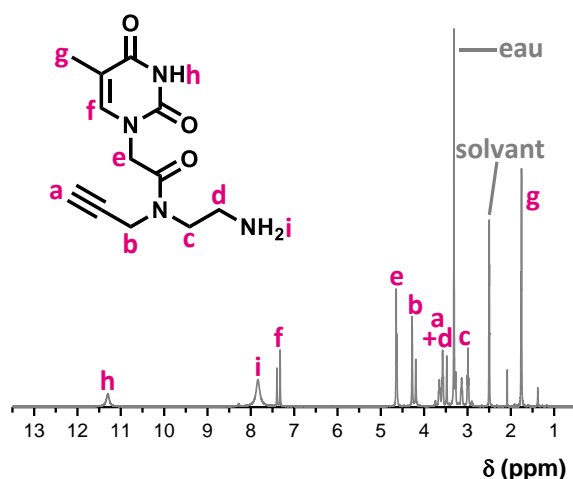


Figure E.4. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) du composé IV-2.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm) : 1.75 (s, 3H, -C-CH₃), 2.99-2.90 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 3.48-3.27 (dt, 1H, -C≡CH), 3.74-3.58 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 4.28-4.19 (dd, 2H, -CH₂-C≡CH), 4.65-4.63 (ds, 2H, -CH₂-CO-N-), 7.40-7.33 (s, 1H, -N-CH-C-), 7.84 (br s, 2H, -CH₂-NH₂), 11.30 (br s, 1H, -CO-NH-CO-).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm) : 11.88, 34.25, 36.54, 43.14, 43.50, 47.90, 48.07, 74.62, 75.81, 78.72, 79.34, 108.16, 142.04, 151.04, 158.34, 158.66, 164.36, 166.75, 167.80.

3.3.3. Synthèse des oligomères de PTzNAs

3.3.3.1. Préparation de la résine

Étape 1 : Fonctionnalisation de la résine.

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 1 du 3.1.1.

Étape 2 : Capping des fonctions n'ayant pas réagi.

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 2 du 3.1.1.

Étape 3 : Détermination du niveau de substitution.

Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'étape 3 du 3.1.1.

Étape 4 : Activation de la résine Fmoc-Phe-Wang.

10 mg de résine Fmoc-Phe-Wang (taux de fonctionnalisation = $0,18 \text{ mmol.g}^{-1}$) sont utilisés comme support solide et placés dans un tube SPE de 1 mL. Avant les étapes itératives, les billes de résine gonflent 10 min en étant agitées dans le DCM à température ambiante. Le groupement Fmoc est ensuite éliminé par traitement avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF pendant 20 min. Cette étape de déprotection est répétée pour assurer l'élimination complète du groupement protecteur de la résine. La résine est alors lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) et séchée complètement sous flux d'air.

Le même protocole est appliqué dans le cas d'une synthèse sur résine Fmoc-Gly-Wang commerciale.

3.3.3.2. Synthèse itérative

Étape 1 : Couplage acide carboxylique-amine primaire pour l'ajout des blocs AB (i).

Trois solutions sont préparées : une solution d'agent de couplage ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le DMF anhydre), une solution de bases (DIPEA et 2,6-lutidine dans le DMF anhydre, respectivement $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$ et $1,8 \text{ mol.L}^{-1}$) et une solution de monomère ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le DMF anhydre). La résine est conditionnée avec du DMF anhydre. Le tube est vidé mais la résine n'est pas complètement séchée. Dans un pilulier de 1 mL, un mélange composé des solutions de monomère (4 éq.), d'agent de couplage (3,5 éq.) et des bases (6 éq. pour chacune) est préparé. Ce mélange est laissé 2 min pour activer l'acide carboxylique du monomère puis collecté à l'aide d'une micropipette ($66,7 \mu\text{L}$) et déposé sur la résine, sur le fritté dans le fond du tube, pendant 30 min. Le tube SPE est ensuite vidé et un mélange frais des solutions ($66,7 \mu\text{L}$) est déposé pour 30 min. La résine est alors lavée avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x) et séchée complètement sous flux d'air.

Étape 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par de cuivre (I) (CuAAC) pour l'ajout des blocs CD (ii).

Sur la résine précédemment conditionnée avec du DMF anhydre, la source de cuivre (CuBr pour les monomères CD-T et CD-C, CuSO_4 pour les monomères CD-G et CD-A) (3 éq.), le ligand (dNbipy pour les monomères CD-T et CD-C, TBTA pour les monomères CD-G et CD-A) (6 éq.) et le monomère (7,5 éq.) sont déposés. Un bouchon à jupe en caoutchouc scelle le tube SPE (surmonté de parafilm) et trois cycles vide-argon sont réalisés pour assurer une atmosphère sans oxygène dans le tube. 0,5 mL de solvant (DMF anhydre pour les monomères CD-T et CD-C, NMP anhydre pour les monomères CD-G et CD-A) sont injectés dans le tube sous argon. Pour les monomères nécessitant l'utilisation de TBTA, 0,1 mL d'une solution saturée d'acide L-ascorbique dans l'eau distillée sont également injectés. Une autre couche de parafilm est fixée sur le bouchon pour empêcher l'air d'entrer par les trous d'injection dans le septum. Le tube est agité 2h à température ambiante. La solution est ensuite drainée et la résine lavée une première fois avec différents solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x), puis avec une solution saturée d'EDTA dans un mélange eau distillée/DMF (1:1) pendant 30 min pour éliminer les traces de cuivre restantes, puis à nouveau avec des solvants (DMF 4x, DCM 4x, DMF 2x et DCM 2x). Elle est enfin séchée complètement sous flux d'air.

Étape 3 : Procédure générale pour le clivage des oligomères et la déprotection des groupements Boc des bases (iii).

Le clivage des brins de PTzNA de la résine est réalisé dans une solution de TFA dans le DCM (1:1 v:v) pendant 1h à température ambiante dans un pilulier de 1 mL. Après la réaction, la solution est filtrée à travers un petit fritté dans un microtube, concentrée et précipitée dans de l'éther diéthylique froid (8 à 10 volumes). Le microtube est ensuite centrifugé et le surnageant retiré. Le solide obtenu est lavé plusieurs fois avec Et₂O de la même manière et enfin complètement séché *in vacuo*.

Références bibliographiques

- [1] PlasticsEurope, "Plastics - the Facts 2017", **2017**.
- [2] J.-F. Lutz, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700582.
- [3] K. Matyjaszewski, *Science* **2011**, *333*, 1104.
- [4] L. Y. Qiu, Y. H. Bae, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1.
- [5] R. B. Merrifield, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1985**, *24*, 799.
- [6] J.-F. Lutz, J.-M. Lehn, E. W. Meijer, K. Matyjaszewski, *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1*, 16024.
- [7] J.-F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto, *Science* **2013**, *341*, 1238149.
- [8] H. M. Colquhoun, J.-F. Lutz, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 455.
- [9] H. Mutlu, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 13010.
- [10] T. T. Trinh, C. Laure, J.-F. Lutz, *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216*, 1498.
- [11] T. T. Trinh, L. Oswald, D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 141.
- [12] J.-A. Amalian, T. T. Trinh, J.-F. Lutz, L. Charles, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3715.
- [13] J. J. Kasianowicz, J. W. F. Robertson, E. R. Chan, J. E. Reiner, V. M. Stanford, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 737.
- [14] G. Baaken, I. Halimeh, L. Bacri, J. Pelta, A. Oukhaled, J. C. Behrends, *ACS Nano* **2015**, *9*, 6443.
- [15] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- [16] J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2182.
- [17] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [18] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895.
- [19] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, "Biochemistry", 8th revised edition, W.H. Freeman, **2015**.
- [20] V. Zhirnov, R. M. Zadegan, G. S. Sandhu, G. M. Church, W. L. Hughes, *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 366.
- [21] O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137.
- [22] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964.
- [23] M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, *171*, 738.
- [24] M. Meselson, F. W. Stahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 671.
- [25] R. Okazaki, T. Okazaki, K. Sakabe, K. Sugimoto, A. Sugino, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *59*, 598.
- [26] J. Marmur, P. Doty, *Nature* **1959**, *183*, 1427.
- [27] J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 109.
- [28] S. Nakano, M. Fujimoto, H. Hara, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2957.
- [29] N. Sugimoto, M. Katoh, S. Nakano, T. Ohmichi, M. Sasaki, *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 74.
- [30] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11211.
- [31] J. SantaLucia, Jr., H. T. Allawi, P. A. Seneviratne, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3555.
- [32] S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson, *Nature* **1961**, *190*, 576.
- [33] A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1955**, *0*, 2632.
- [34] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212.
- [35] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821.
- [36] Y. Lapidot, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3852.
- [37] Y. Lapidot, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3857.
- [38] K. L. Agarwal, H. Buchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. Rajbhandary, J. H. Van de Sande, V. Sgaramella, H. Weber, T. Yamada, *Nature* **1970**, *227*, 27.
- [39] H. G. Khorana, *Science* **1979**, *203*, 614.
- [40] M. H. Caruthers, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 1420.
- [41] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526.
- [42] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5319.
- [43] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278.
- [44] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655.

- [45] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 719.
- [46] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859.
- [47] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223.
- [48] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281.
- [49] Y. Brudno, D. R. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 265.
- [50] N. ten Brummelhuis, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 654.
- [51] J.-F. Lutz, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 1020.
- [52] P. E. Nielsen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 167.
- [53] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5.
- [54] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578.
- [55] D. M. Rosenbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924.
- [56] R. E. Kleiner, Y. Brudno, M. E. Birnbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4646.
- [57] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566.
- [58] B. Armitage, D. Ly, T. Koch, H. Frydenlund, H. Ørum, H. G. Batz, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 12320.
- [59] B. Armitage, T. Koch, H. Frydenlund, H. Ørum, G. B. Schuster, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 715.
- [60] U. Giesen, W. Kleider, C. Berding, A. Geiger, H. Ørum, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5004.
- [61] J. P. Vernille, L. C. Kovell, J. W. Schneider, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1314.
- [62] F. Totsingan, "Synthesis and Applications of PNA and Modified PNA in Nanobiotechnology", **2018**.
- [63] E. Buxbaum, "Fundamentals of protein structure and function", Springer, **2007**.
- [64] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318.
- [65] G. A. Grant, "Synthetic peptides: a user's guide", Oxford University Press, **2002**.
- [66] E. Bayer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *30*, 113.
- [67] G. A. Grant, "Design and Application of Synthetic Peptides", dans *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**.
- [68] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2982.
- [69] V. du Vigneaud, C. Ressler, C. J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3115.
- [70] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [71] R. B. Merrifield, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1947.
- [72] R. B. Merrifield, *Science* **1965**, *150*, 178.
- [73] E. Bayer, M. Mutter, *Nature* **1972**, *237*, 512.
- [74] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, *232*, 341.
- [75] G. B. Fields, "Introduction to peptide synthesis", dans *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2002**.
- [76] M. Stawikowski, G. B. Fields, "Introduction to peptide synthesis", dans *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., **2012**.
- [77] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239.
- [78] C. G. Fields, G. B. Fields, "Solvents for solid-phase peptide synthesis", dans *Peptide Synthesis Protocols*, Springer, **1995**, p. 29.
- [79] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [80] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4427.
- [81] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.
- [82] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045.
- [83] J. M. Palomo, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 32658.
- [84] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Progr. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1.
- [85] H. G. Börner, *Progr. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 811.
- [86] N. Badi, J.-F. Lutz, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3383.
- [87] S. C. Solleder, R. V. Schneider, K. S. Wetzler, A. C. Boukis, M. A. R. Meier, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1600711.

- [88] C. A. Alabi, "Iterative Synthetic Methods for the Assembly of Sequence-Controlled Non-Natural Polymers", dans *Sequence-Controlled Polymers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2018**, p. 159.
- [89] B. J. Backes, J. A. Ellman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 86.
- [90] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- [91] J. A. Moss, "Guide for Resin and Linker Selection in Solid-Phase Peptide Synthesis", dans *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., **2005**.
- [92] P. Wentworth Jr., K. D. Janda, *Chem. Commun.* **1999**, 1917.
- [93] P. H. Toy, K. D. Janda, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 546.
- [94] L. Andersson, L. Blomberg, M. Flegel, L. Lepsa, B. Nilsson, M. Verlander, *Biopolymers* **2000**, *55*, 227.
- [95] H. Hayatsu, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3880.
- [96] H. Lönnberg, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1368.
- [97] S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5095.
- [98] A. Meszynska, N. Badi, H. G. Börner, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3887.
- [99] S. Pfeifer, Z. Zarafshani, N. Badi, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9195.
- [100] S. Pfeifer, J.-F. Lutz, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 940.
- [101] S. Binauld, D. Dameron, L. A. Connal, C. J. Hawker, E. Drockenmüller, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 147.
- [102] J. C. Barnes, D. J. C. Ehrlich, A. X. Gao, F. A. Leibfarth, Y. Jiang, E. Zhou, T. F. Jamison, J. A. Johnson, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 810.
- [103] L. Oswald, A. Al Ouahabi, L. Charles, J.-F. Lutz, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3462.
- [104] R. Szweda, C. Chendo, L. Charles, P. N. W. Baxter, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8312.
- [105] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197.
- [106] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 537.
- [107] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 539.
- [108] R. Arshady, E. Atherton, R. C. Sheppard, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 1521.
- [109] E. Atherton, C. Bury, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3041.
- [110] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 538.
- [111] E. Atherton, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 165.
- [112] J. C. M. van Hest, *Polym. Rev.* **2007**, *47*, 63.
- [113] M. Meißler, S. Wieczorek, N. ten Brummelhuis, H. G. Börner, "Synthetic Aspects of Peptide- and Protein-Polymer Conjugates in the Post-click Era", dans *Bio-inspired Polymers*, The Royal Society of Chemistry, **2016**, p. 1.
- [114] N. ten Brummelhuis, P. Wilke, H. G. Börner, "Peptide Synthesis and Beyond the Use of Sequence-Defined Segments for Materials Science", dans *Sequence-Controlled Polymers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2018**, p. 117.
- [115] N. ten Brummelhuis, S. Wieczorek, P. Wilke, T. Schwemmer, H. G. Börner, "Peptide-Polymer Conjugates as Model Systems To Explore the Functional Space of Precision Polymers", dans *Sequence-Controlled Polymers: Synthesis, Self-Assembly, and Properties*, American Chemical Society, **2014**, p. 55.
- [116] H.-A. Klok, *Macromolecules* **2009**, *42*, 7990.
- [117] L. Hartmann, K. Neuhaus, "Glycopolymers", dans *Bio-inspired Polymers*, The Royal Society of Chemistry, **2016**, p. 31.
- [118] Y. Abdouni, G. Yilmaz, C. R. Becer, "Sequence and Architectural Control in Glycopolymer Synthesis", dans *Sequence-Controlled Polymers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2018**, p. 229.
- [119] C. R. Becer, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 742.
- [120] R. F. T. Stepto, "Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendations 2009)", dans *Pure Appl. Chem.*, **2009**, p. 81/351.
- [121] S. Fakirov, "Introduction", dans *Fundamentals of Polymer Science for Engineers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2017**, p. 3.
- [122] D. Crespy, M. Bozonnet, M. Meier, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3322.
- [123] L. H. Baekeland, US Patent 942 699, **1907**.

- [124] J. K. Stille, *J. Chem. Educ.* **1981**, *58*, 862.
- [125] W. H. Carothers, *Chem. Rev.* **1931**, *8*, 353.
- [126] P. J. Flory, *Chem. Rev.* **1946**, *39*, 137.
- [127] M. Zhang, S. M. June, T. E. Long, "Principles of Step-Growth Polymerization (Polycondensation and Polyaddition)", dans *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, M. Möller, Elsevier, **2012**, p. 7.
- [128] W. H. Carothers, J. W. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 1559.
- [129] W. H. Carothers, *DuPont*, US Patent 2 130 523, **1935**.
- [130] W. H. Carothers, *DuPont*, US Patent 2 190 770, **1936**.
- [131] *I.G.F. AG*, DE Patent 728 981, **1937**.
- [132] O. Bayer, *Angew. Chem.* **1947**, *59*, 257.
- [133] W. H. Carothers, *Trans. Faraday Soc.* **1936**, *32*, 39.
- [134] Z.-L. Li, Z.-C. Li, "Periodic Copolymers by Step-Growth Polymerization", dans *Sequence-Controlled Polymers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2018**, p. 349.
- [135] G. Natta, G. Dall'Asta, G. Mazzanti, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1964**, *3*, 723.
- [136] M. Lindmark-Hamberg, K. B. Wagener, *Macromolecules* **1987**, *20*, 2949.
- [137] K. B. Wagener, J. M. Boncella, J. G. Nel, *Macromolecules* **1991**, *24*, 2649.
- [138] N. F. Sauty, L. C. da Silva, M. D. Schulz, C. S. Few, K. B. Wagener, *App. Pet. Res.* **2014**, *4*, 225.
- [139] M. D. Schulz, K. B. Wagener, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 1936.
- [140] S. Binauld, D. Damiron, T. Hamaide, J.-P. Pascault, E. Fleury, E. Drockenmuller, *Chem. Commun.* **2008**, 4138.
- [141] C.-H. Wang, Z.-Y. Song, X.-X. Deng, L.-J. Zhang, F.-S. Du, Z.-C. Li, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 474.
- [142] R. M. Stayshich, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10920.
- [143] C. Zhang, Q. Wang, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1180.
- [144] C. Zhang, J. Ling, Q. Wang, *Macromolecules* **2011**, *44*, 8739.
- [145] J.-J. Yan, D. Wang, D.-C. Wu, Y.-Z. You, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6057.
- [146] K. Satoh, M. Mizutani, M. Kamigaito, *Chem. Commun.* **2007**, 1260.
- [147] M. Mizutani, K. Satoh, M. Kamigaito, *Macromolecules* **2009**, *42*, 472.
- [148] K. Satoh, S. Ozawa, M. Mizutani, K. Nagai, M. Kamigaito, *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 6.
- [149] T. Yokozawa, Y. Ohta, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1950.
- [150] E. Simon, *Annalen der Pharmacie* **1839**, *31*, 265.
- [151] M. Berthelot, *Bulletin de la Société Chimique de Paris* **1866**, *6*, 289.
- [152] H. Staudinger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1920**, *53*, 1073.
- [153] P. J. Flory, "*Principles of polymer chemistry*", Cornell University Press, **1953**.
- [154] M. Szwarc, *Nature* **1956**, *178*, 1168.
- [155] O. W. Webster, *Science* **1991**, *251*, 887.
- [156] N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, S. Pispas, H. Iatrou, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3747.
- [157] R. Faust, J. P. Kennedy, *Polym. Bull.* **1986**, *15*, 317.
- [158] M. Minoda, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* **1990**, *23*, 4889.
- [159] S. Aoshima, S. Kanaoka, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5245.
- [160] C. W. Bielawski, R. H. Grubbs, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1.
- [161] M. Ouchi, T. Terashima, M. Sawamoto, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4963.
- [162] M. Ouchi, M. Sawamoto, *Macromolecules* **2017**, *50*, 2603.
- [163] W. A. Braunecker, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 93.
- [164] M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987.
- [165] C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3661.
- [166] J. Nicolas, Y. Guilleaneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes, B. Charleux, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 63.
- [167] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* **1995**, *28*, 1721.
- [168] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614.
- [169] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- [170] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559.

- [171] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer* **2008**, *49*, 1079.
- [172] P. J. M. Stals, Y. Li, J. Burdyńska, R. Nicolaÿ, A. Nese, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11421.
- [173] K. Matyjaszewski, N. V. Tsarevsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6513.
- [174] M. Szwarc, M. Levy, R. Milkovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2656.
- [175] C. J. Hawker, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 1456.
- [176] D. Mecerreyes, G. Moineau, P. Dubois, R. Jerome, J. L. Hedrick, C. J. Hawker, E. E. Malmström, M. Trollsas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1274.
- [177] K. Matyjaszewski, M. J. Ziegler, S. V. Arehart, D. Greszta, T. Pakula, *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 775.
- [178] S. S. Sheiko, S. A. Prokhorova, K. L. Beers, K. Matyjaszewski, I. I. Potemkin, A. R. Khokhlov, M. Möller, *Macromolecules* **2001**, *34*, 8354.
- [179] K. Matyjaszewski, S. Qin, J. R. Boyce, D. Shirvanyants, S. S. Sheiko, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1843.
- [180] J.-F. Lutz, N. Jahed, K. Matyjaszewski, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 1939.
- [181] J. A. Opsteen, J. C. M. van Hest, *Chem. Commun.* **2005**, 57.
- [182] T. Yamamoto, Y. Tezuka, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1930.
- [183] F. S. Bates, M. A. Hillmyer, T. P. Lodge, C. M. Bates, K. T. Delaney, G. H. Fredrickson, *Science* **2012**, *336*, 434.
- [184] N. Badi, D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214*, 135.
- [185] K. A. Davis, K. Matyjaszewski, "Statistical, Gradient, Block, and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations", dans *Statistical, Gradient, Block and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations*, Springer, **2002**, p. 1.
- [186] K. A. Davis, K. Matyjaszewski, "Linear Block Copolymers", dans *Statistical, Gradient, Block and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations*, Springer, **2002**, p. 30.
- [187] K. A. Davis, K. Matyjaszewski, "Statistical Copolymers", dans *Statistical, Gradient, Block and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations*, Springer, **2002**, p. 14.
- [188] D. Benoit, C. J. Hawker, E. E. Huang, Z. Lin, T. P. Russell, *Macromolecules* **2000**, *33*, 1505.
- [189] S. Pfeifer, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9542.
- [190] S. Pfeifer, J.-F. Lutz, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10949.
- [191] M. Zamfir, J.-F. Lutz, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1138.
- [192] N. Baradel, S. Fort, S. Halila, N. Badi, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 2335.
- [193] N. Baradel, O. Gok, M. Zamfir, A. Sanyal, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7280.
- [194] S. Srichan, L. Oswald, M. Zamfir, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1517.
- [195] S. Srichan, H. Mutlu, N. Badi, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *126*, 9385.
- [196] S. Srichan, N. Kayunkid, L. Oswald, B. Lotz, J.-F. Lutz, *Macromolecules* **2014**, *47*, 1570.
- [197] S. Srichan, H. Mutlu, J.-F. Lutz, *Eur. Polym. J.* **2015**, *62*, 338.
- [198] J.-F. Lutz, B. V. K. J. Schmidt, S. Pfeifer, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 127.
- [199] B. V. K. J. Schmidt, N. Fechner, J. Falkenhagen, J.-F. Lutz, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 234.
- [200] O. Shishkan, M. Zamfir, M. A. Gauthier, H. G. Börner, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1570.
- [201] R. K. Roy, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12888.
- [202] J.-F. Lutz, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2696.
- [203] D. Chan-Seng, M. Zamfir, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 12254.
- [204] A. Anastasaki, V. Nikolaou, G. S. Pappas, Q. Zhang, C. Wan, P. Wilson, T. P. Davis, M. R. Whittaker, D. M. Haddleton, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3536.
- [205] G. Gody, T. Maschmeyer, P. B. Zetterlund, S. Perrier, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2505.
- [206] G. Gody, T. Maschmeyer, P. B. Zetterlund, S. Perrier, *Macromolecules* **2014**, *47*, 3451.
- [207] G. Gody, R. Barbey, M. Danial, S. Perrier, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 1502.
- [208] A. Kuroki, I. Martinez-Botella, C. H. Hornung, L. Martin, E. G. L. Williams, K. E. S. Locock, M. Hartlieb, S. Perrier, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 3249.
- [209] V. du Vigneaud, C. Ressler, C. J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4879.

- [210] V. du Vigneaud, *Science* **1956**, *123*, 967.
- [211] M. Bodanszky, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5688.
- [212] V. du Vigneaud, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1960**, *88*, 537.
- [213] N. Feuerbacher, F. Vögtle, "Iterative Synthesis in Organic Chemistry", dans *Dendrimers*, Springer, **1998**, p. 1.
- [214] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665.
- [215] S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819.
- [216] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, *1978*, 155.
- [217] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- [218] D. A. Tomalia, J. M. J. Fréchet, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2719.
- [219] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, R. Pashaei-Asl, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 247.
- [220] D. A. Tomalia, D. M. Hedstrand, M. S. Ferritto, *Macromolecules* **1991**, *24*, 1435.
- [221] D. A. Tomalia, *Sci. Am.* **1995**, *272*, 62.
- [222] G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
- [223] C. Wörner, R. Mülhaupt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306.
- [224] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1010.
- [225] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.
- [226] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules* **1990**, *23*, 4726.
- [227] K. L. Wooley, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 1059.
- [228] C. J. Hawker, R. Lee, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4583.
- [229] R. Roy, *Polym. News* **1996**, *21*, 226.
- [230] R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291.
- [231] A. Imberty, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490.
- [232] D. N. Posnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719.
- [233] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5409.
- [234] K. Takizawa, C. Tang, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1718.
- [235] K. Takizawa, H. Nulwala, J. Hu, K. Yoshinaga, C. J. Hawker, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5977.
- [236] R. Eritja, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 53.
- [237] T. G. W. Edwardson, K. M. M. Carneiro, C. J. Serpell, H. F. Sleiman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 4567.
- [238] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1303.
- [239] R. Warrass, P. Walden, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*, 125.
- [240] P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13382.
- [241] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141.
- [242] N. R. Wurtz, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1201.
- [243] J. Farrera-Sinfreu, A. Aviño, I. Navarro, J. Aymamí, N. G. Beteta, S. Varón, R. Pérez-Tomás, W. Castillo-Avila, R. Eritja, F. Albericio, M. Royo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2440.
- [244] B. Baptiste, C. Douat-Casassus, K. Laxmi-Reddy, F. Godde, I. Huc, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7175.
- [245] S. J. Dawson, X. Hu, S. Claerhout, I. Huc, "Solid Phase Synthesis of Helically Folded Aromatic Oligoamides", dans *Methods in Enzymology*, V.L. Pecoraro, Academic Press, **2016**, p. 279.
- [246] X. Hu, S. J. Dawson, Y. Nagaoka, A. Tanatani, I. Huc, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1137.
- [247] V. Kuksa, R. Buchan, P. Kong Thoo Lin, *Synthesis* **2000**, *2000*, 1189.
- [248] D. Jönsson, A. Undén, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3125.
- [249] N. Umezawa, Y. Horai, Y. Imamura, M. Kawakubo, M. Nakahira, N. Kato, A. Muramatsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, T. Higuchi, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1811.
- [250] K. Burgess, D. S. Linthicum, H. Shin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 907.

- [251] K. Burgess, J. Ibarzo, D. S. Linthicum, D. H. Russell, H. Shin, A. Shitangkoon, R. Totani, A. J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1556.
- [252] J.-M. Kim, Y. Bi, S. J. Paikoff, P. G. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5305.
- [253] A. Boeijen, R. M. J. Liskamp, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999*, 2127.
- [254] A. Boeijen, J. van Ameijde, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8454.
- [255] G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, J.-P. Briand, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1553.
- [256] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, G. Guichard, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3130.
- [257] O. Brümmer, B. Clapham, K. D. Janda, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2257.
- [258] T. M. Fyles, C.-W. Hu, H. Luong, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8545.
- [259] T. M. Fyles, H. Luong, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 725.
- [260] J. K. Young, J. C. Nelson, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10841.
- [261] J. C. Nelson, J. K. Young, J. S. Moore, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8160.
- [262] E. L. Elliott, C. R. Ray, S. Kraft, J. R. Atkins, J. S. Moore, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5282.
- [263] L. Jones, J. S. Schumm, J. M. Tour, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1388.
- [264] C. A. Briehn, T. Kirschbaum, P. Bäuerle, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 352.
- [265] N. F. Utesch, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 237.
- [266] A. Al Ouahabi, L. Charles, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5629.
- [267] A. Al Ouahabi, M. Kotera, L. Charles, J.-F. Lutz, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1077.
- [268] N. F. König, A. Al Ouahabi, S. Poyer, L. Charles, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 7297.
- [269] N. F. König, S. Telitel, S. Poyer, L. Charles, J.-F. Lutz, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700651.
- [270] P. R. L. Malenfant, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **1998**, 2657.
- [271] O. Renaudet, J.-L. Reymond, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 397.
- [272] N. G. Angelo, P. S. Arora, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7963.
- [273] U. S. Gunay, B. E. Petit, D. Karamessini, A. Al Ouahabi, J.-A. Amalian, C. Chendo, M. Bouquey, D. Gigmes, L. Charles, J.-F. Lutz, *Chem* **2016**, *1*, 114.
- [274] R. Kakuchi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 46.
- [275] S. C. Solleder, M. A. R. Meier, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 711.
- [276] S. C. Solleder, S. Martens, P. Espeel, F. E. Du Prez, M. A. R. Meier, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13906.
- [277] W. Konrad, F. R. Bloesser, K. S. Wetzels, A. C. Boukis, M. A. R. Meier, C. Barner-Kowollik, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 3413.
- [278] A. C. Boukis, M. A. R. Meier, *Eur. Polym. J.* **2018**, *104*, 32.
- [279] S. C. Solleder, K. S. Wetzels, M. A. R. Meier, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 3201.
- [280] O. E. Vercillo, C. K. Z. Andrade, L. A. Wessjohann, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 205.
- [281] K. Rose, J. Vizzavona, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7034.
- [282] L. Hartmann, E. Krause, M. Antonietti, H. G. Börner, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1239.
- [283] L. Hartmann, S. Häfele, R. Peschka-Süss, M. Antonietti, H. G. Börner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2025.
- [284] L. Hartmann, H. G. Börner, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3425.
- [285] L. Hartmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 8.
- [286] J. W. Grate, K.-F. Mo, M. D. Daily, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 3925.
- [287] M. Porel, C. A. Alabi, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13162.
- [288] M. Porel, J. S. Brown, C. A. Alabi, *Synlett* **2015**, *26*, 565.
- [289] M. Porel, D. N. Thornlow, N. N. Phan, C. A. Alabi, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 590.
- [290] M. Matsugi, D. P. Curran, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2717.
- [291] W. Zhang, D. P. Curran, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11837.
- [292] B. M. Trost, *Science* **1983**, *219*, 245.
- [293] B. M. Trost, *Science* **1991**, *254*, 1471.
- [294] C.-H. Wong, S. C. Zimmerman, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1679.
- [295] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646.
- [296] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, T. Ruoying, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, P. A. Bartlett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9367.

- [297] J. Sun, R. N. Zuckermann, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4715.
- [298] A. M. Rosales, R. A. Segalman, R. N. Zuckermann, *Soft Matter* **2013**, *9*, 8400.
- [299] A. S. Knight, E. Y. Zhou, M. B. Francis, R. N. Zuckermann, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 5665.
- [300] K. Kirshenbaum, A. E. Barron, R. A. Goldsmith, P. Armand, E. K. Bradley, K. T. V. Truong, K. A. Dill, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4303.
- [301] M. T. Dohm, R. Kapoor, A. E. Barron, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 2732.
- [302] R. Luxenhofer, C. Fetsch, A. Grossmann, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 2731.
- [303] P. Espeel, L. L. G. Carrette, K. Bury, S. Capenberghs, J. C. Martins, F. E. Du Prez, A. Madder, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 13261.
- [304] P. Espeel, F. Goethals, F. Driessen, L.-T. T. Nguyen, F. E. Du Prez, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 2449.
- [305] S. Martens, J. van den Begin, A. Madder, F. E. Du Prez, P. Espeel, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14182.
- [306] R. K. Roy, A. Meszynska, C. Laure, L. Charles, C. Verchin, J.-F. Lutz, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8237.
- [307] R. K. Roy, C. Laure, D. Fischer-Krauser, L. Charles, J.-F. Lutz, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15677.
- [308] C. Laure, D. Karamessini, O. Milenkovic, L. Charles, J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 10722.
- [309] G. Cavallo, A. Al Ouahabi, L. Oswald, L. Charles, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9417.
- [310] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [311] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [312] S. Martens, J. O. Holloway, F. E. Du Prez, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700469.
- [313] J.-F. Lutz, H. Schlaad, *Polymer* **2008**, *49*, 817.
- [314] D. D. Díaz, S. Punna, P. Holzer, A. K. McPherson, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 4392.
- [315] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- [316] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674.
- [317] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216.
- [318] J.-F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 958.
- [319] B. J. Adzima, C. N. Bowman, *AIChE J.* **2012**, *58*, 2952.
- [320] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen, Z. Zhong, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4969.
- [321] P. Espeel, F. E. Du Prez, *Macromolecules* **2015**, *48*, 2.
- [322] C. Barner-Kowollik, F. E. Du Prez, P. Espeel, C. J. Hawker, T. Junkers, H. Schlaad, W. Van Camp, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 60.
- [323] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388.
- [324] H. Li, R. Aneja, I. Chaiken, *Molecules* **2013**, *18*, 9797.
- [325] B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020.
- [326] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Frechet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928.
- [327] J.-F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6376.
- [328] C. Barner-Kowollik, A. J. Inglis, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 987.
- [329] R. Huisgen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *2*, 565.
- [330] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [331] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- [332] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51.
- [333] M. Meldal, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1016.
- [334] N. V. Sokolova, V. G. Nenajdenko, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16212.
- [335] G. Delaittre, N. K. Guimard, C. Barner-Kowollik, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1296.
- [336] J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018.
- [337] G. Lu, S. Lam, K. Burgess, *Chem. Commun.* **2006**, 1652.
- [338] S. Binauld, C. J. Hawker, E. Fleury, E. Drockenmuller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6654.
- [339] P. Cheshev, A. Marra, A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3225.
- [340] M. Lo Conte, A. Marra, A. Chambery, S. S. Gurcha, G. S. Besra, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6326.

- [341] Y. Jiang, M. R. Golder, H. V.-T. Nguyen, Y. Wang, M. Zhong, J. C. Barnes, D. J. C. Ehrlich, J. A. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9369.
- [342] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3729.
- [343] F. Amir, Z. Jia, M. J. Monteiro, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16600.
- [344] N. G. Angelo, P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17134.
- [345] F. A. Leibfarth, J. A. Johnson, T. F. Jamison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 10617.
- [346] T. T. Trinh, L. Oswald, D. Chan-Seng, L. Charles, J.-F. Lutz, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11961.
- [347] D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 291.
- [348] D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, "Solid-Phase Synthesis as a Tool for the Preparation of Sequence-Defined Oligomers Based on Natural Amino Acids and Synthetic Building Blocks", dans *Sequence-Controlled Polymers: Synthesis, Self-Assembly, and Properties*, American Chemical Society, **2014**, p. 103.
- [349] D. Chan-Seng, J. Louwsma, J.-F. Lutz, S. Joly, *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39*, e1700764.
- [350] N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558.
- [351] M.-A. Berthet, Z. Zarafshani, S. Pfeifer, J.-F. Lutz, *Macromolecules* **2010**, *43*, 44.
- [352] K. Oh, Z. Guan, *Chem. Commun.* **2006**, 3069.
- [353] J. K. Pokorski, L. M. Miller Jenkins, H. Feng, S. R. Durell, Y. Bai, D. H. Appella, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2381.
- [354] T.-B. Yu, J. Z. Bai, Z. Guan, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1097.
- [355] Y. Chen, Z. Guan, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4577.
- [356] C. Caumes, T. Hjelmgaard, R. Remuson, S. Faure, C. Taillefumier, *Synthesis* **2011**, *2011*, 257.
- [357] A. S. Norgren, C. Budke, Z. Majer, C. Heggemann, T. Koop, N. Sewald, *Synthesis* **2009**, *2009*, 488.
- [358] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845.
- [359] G. Yilmaz, C. R. Becer, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 3046.
- [360] D. F urniss, T. Mack, F. Hahn, S. B. L. Vollrath, K. Koroniak, U. Schepers, S. Br ase, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 56.
- [361] G. Yilmaz, C. R. Becer, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 39.
- [362] D. Ponader, S. Igde, M. Wehle, K. M arker, M. Santer, D. Bl eger, L. Hartmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1603.
- [363] Y. Abdouni, G. Yilmaz, C. R. Becer, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700212.
- [364] H. Jang, A. Fafarman, J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1951.
- [365] A. M. Rosales, B. L. McCulloch, R. N. Zuckermann, R. A. Segalman, *Macromolecules* **2012**, *45*, 6027.
- [366] B. A. Laurent, S. M. Grayson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4238.
- [367] O. Roy, S. Faure, V. Thery, C. Didierjean, C. Taillefumier, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 921.
- [368] J. M. Holub, H. Jang, K. Kirshenbaum, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3275.
- [369] M. Zamfir, P. Theato, J.-F. Lutz, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1796.
- [370] S. Binauld, "Nouvelles strat gies pour l' laboration de polytriazoles lin aires et cycliques par "Click Chemistry"", **2009**.
- [371] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [372] T. Posner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 646.
- [373] W. Xi, S. Pattanayak, C. Wang, B. Fairbanks, T. Gong, J. Wagner, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 14462.
- [374] O. T r n , M. A. R. Meier, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*, 1689.
- [375] J. Han, Y. Zheng, B. Zhao, S. Li, Y. Zhang, C. Gao, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4387.
- [376] Y. Zheng, S. Cai, L. Peng, Y. Jin, H. Xu, Z. Weng, Z. Gao, B. Zhao, C. Gao, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 6202.
- [377] N. Franz, L. Menin, H.-A. Klok, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 5390.
- [378] X. Elduque, A. S nchez, K. Sharma, E. Pedroso, A. Grandas, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 832.
- [379] F. Driessen, F. E. Du Prez, P. Espeel, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 616.
- [380] X. Elduque, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2843.

- [381] C. Paris, O. Brun, E. Pedroso, A. Grandas, *Molecules* **2015**, *20*, 6389.
- [382] F. Wojcik, D. Ponader, S. Mosca, L. Hartmann, "Recent Advances in Solid Phase Polymer Synthesis: Polyamides from Tailor-Made Building Blocks", dans *Sequence-Controlled Polymers: Synthesis, Self-Assembly, and Properties*, American Chemical Society, **2014**, p. 85.
- [383] D. Comegna, F. De Riccardis, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3898.
- [384] F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Götze, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3090.
- [385] F. Wojcik, S. Lel, A. G. O'Brien, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2395.
- [386] C. Gerke, M. F. Ebbesen, D. Jansen, S. Boden, T. Freichel, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 787.
- [387] F. Goethals, D. Frank, F. E. Du Prez, *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *64*, 76.
- [388] Z. Zhang, Y.-Z. You, D.-C. Wu, C.-Y. Hong, *Polymer* **2015**, *64*, 221.
- [389] L. Yang, Z. Zhang, B. Cheng, Y.-Z. You, D.-C. Wu, C.-Y. Hong, *Sci. China: Chem.* **2015**, *58*, 1734.
- [390] L. Yu, L.-H. Wang, Z.-T. Hu, Y.-Z. You, D.-C. Wu, C.-Y. Hong, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 1527.
- [391] Z. Zhang, Y.-Z. You, D.-C. Wu, C.-Y. Hong, *Macromolecules* **2015**, *48*, 3414.
- [392] Z. Zhang, Z.-B. Tan, C.-Y. Hong, D.-C. Wu, Y.-Z. You, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 1468.
- [393] M. A. Tasdelen, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2133.
- [394] G. Hizal, U. Tunca, A. Sanyal, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2011**, *49*, n/a.
- [395] C. F. Hansell, P. Espeel, M. M. Stamenović, I. A. Barker, A. P. Dove, F. E. Du Prez, R. K. O'Reilly, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13828.
- [396] A. Gandini, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1.
- [397] S. Billiet, K. De Bruycker, F. Driessen, H. Goossens, V. Van Speybroeck, J. M. Winne, F. E. Du Prez, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 815.
- [398] B. Vonhören, O. Roling, K. De Bruycker, R. Calvo, F. E. Du Prez, B. J. Ravoo, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 331.
- [399] O. Roling, K. De Bruycker, B. Vonhören, L. Stricker, M. Korsgen, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, F. E. Du Prez, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 13126.
- [400] S. Vandewalle, S. Billiet, F. Driessen, F. E. Du Prez, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 766.
- [401] K. De Bruycker, S. Billiet, H. A. Houck, S. Chattopadhyay, J. M. Winne, F. E. Du Prez, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3919.
- [402] N. Zydziak, F. Feist, B. Huber, J. O. Mueller, C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1799.
- [403] N. Zydziak, W. Konrad, F. Feist, S. Afonin, S. Weidner, C. Barner-Kowollik, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13672.
- [404] Y. Ji, L. Zhang, X. Gu, W. Zhang, N. Zhou, Z. Zhang, X. Zhu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 2328.
- [405] I. H. G. S. Consortium, *Nature* **2001**, *409*, 934.
- [406] J. C. Venter, *et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304.
- [407] J. R. Ecker, W. A. Bickmore, I. Barroso, J. K. Pritchard, Y. Gilad, E. Segal, *Nature* **2012**, *489*, 52.
- [408] E. S. Lander, *Nature* **2011**, *470*, 187.
- [409] P. Edman, *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 283.
- [410] F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* **1951**, *49*, 463.
- [411] K. Biemann, S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, *6*, 1.
- [412] K. Biemann, *Biol. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99.
- [413] K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *259*, 1.
- [414] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, *Science* **1993**, *262*, 89.
- [415] H. Steen, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 699.
- [416] F. Sanger, J. E. Donelson, A. R. Coulson, H. Kössel, D. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 1209.
- [417] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, *94*, 441.
- [418] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 560.
- [419] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463.
- [420] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L. E. Hood, *Nature* **1986**, *321*, 674.
- [421] D. C. Koboldt, K. M. Steinberg, D. E. Larson, R. K. Wilson, E. R. Mardis, *Cell* **2013**, *155*, 27.

- [422] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 13770.
- [423] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 1079.
- [424] Y.-L. Ying, J. Zhang, R. Gao, Y.-T. Long, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 13154.
- [425] M. Wanunu, A. Meller, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1580.
- [426] D. H. Stoloff, M. Wanunu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 699.
- [427] E. Beamish, H. Kwok, V. Tabard-Cossa, M. Godin, *J. Vis. Exp.* **2013**, e51081.
- [428] R. Hill, J. R. Lewis, J. L. Simonsen, *Trans. Faraday Soc.* **1939**, *35*, 1073.
- [429] K. Tada, T. Saegusa, J. Furukawa, *Makromol. Chem.* **1964**, *71*, 71.
- [430] H. J. Harwood, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1965**, *4*, 1051.
- [431] S. Tsuge, S. Hiramitsu, T. Horibe, M. Yamaoka, T. Takeuchi, *Macromolecules* **1975**, *8*, 721.
- [432] J. C. Randall, "Polymer sequence determination: carbon-13 NMR method", Elsevier, **1977**.
- [433] F. A. Bovey, P. A. Mirau, "NMR of Polymers", Academic Press, **1996**.
- [434] F. A. Bovey, *J. Polym. Sci.* **1962**, *62*, 197.
- [435] F. A. Bovey, "High resolution NMR of macromolecules", Elsevier, **1972**.
- [436] H. M. Colquhoun, Z. Zhu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5040.
- [437] A. E. Tonelli, *Macromolecules* **1977**, *10*, 153.
- [438] A. E. Tonelli, *Macromolecules* **2009**, *42*, 3830.
- [439] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, J. J. Kasianowicz, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8517.
- [440] J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Rubinson, O. V. Krasilnikov, J. J. Kasianowicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 8207.
- [441] J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo, J. W. F. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 12080.
- [442] G. Baaken, N. Ankri, A.-K. Schuler, J. Rühle, J. C. Behrends, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8080.
- [443] M. Boukhet, N. F. König, A. Al Ouahabi, G. Baaken, J.-F. Lutz, J. C. Behrends, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700680.
- [444] M. Talarimoghari, G. Baaken, R. Hanselmann, J. C. Behrends, *Eur. Phys. J. E* **2018**, *41*, 77.
- [445] M. S. Montaudo, *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 108.
- [446] T. Gruending, S. Weidner, J. Falkenhagen, C. Barner-Kowollik, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 599.
- [447] M. G. Paulick, K. M. Hart, K. M. Brinner, M. Tjandra, D. H. Charych, R. N. Zuckermann, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 417.
- [448] J.-A. Amalian, A. Al Ouahabi, G. Cavallo, N. F. König, S. Poyer, J.-F. Lutz, L. Charles, *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52*, 788.
- [449] L. Charles, G. Cavallo, V. Monnier, L. Oswald, R. Szweda, J.-F. Lutz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28*, 1149.
- [450] L. Charles, C. Laure, J.-F. Lutz, R. K. Roy, *Macromolecules* **2015**, *48*, 4319.
- [451] D. Karamessini, S. Poyer, L. Charles, J.-F. Lutz, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700426.
- [452] D. Karamessini, B. E. Petit, M. Bouquey, L. Charles, J.-F. Lutz, *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1604595.
- [453] J.-A. Amalian, S. Poyer, B. E. Petit, S. Telitel, V. Monnier, D. Karamessini, D. Gignes, J.-F. Lutz, L. Charles, *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**, *421*, 271.
- [454] A. Burel, C. Carapito, J.-F. Lutz, L. Charles, *Macromolecules* **2017**, *50*, 8290.
- [455] J.-F. Lutz, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 84.
- [456] Y. Mai, A. Eisenberg, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5969.
- [457] J.-F. Lutz, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 55.
- [458] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 113.
- [459] H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 115.
- [460] J.-F. Lutz, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 3459.
- [461] N. Giuseppone, J.-F. Lutz, *Nature* **2011**, *473*, 40.
- [462] G. Guichard, I. Huc, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5933.
- [463] M. Ouchi, N. Badi, J.-F. Lutz, M. Sawamoto, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 917.

- [464] T. Terashima, T. Mes, T. F. A. De Greef, M. A. J. Gillissen, P. Besenius, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4742.
- [465] R. V. Mannige, T. K. Haxton, C. Proulx, E. J. Robertson, A. Battigelli, G. L. Butterfoss, R. N. Zuckermann, S. Whitelam, *Nature* **2015**, *526*, 415.
- [466] G. M. Church, Y. Gao, S. Kosuri, *Science* **2012**, *337*, 1628.
- [467] N. Goldman, P. Bertone, S. Chen, C. Dessimoz, E. M. LeProust, B. Sipos, E. Birney, *Nature* **2013**, *494*, 77.
- [468] R. N. Grass, R. Heckel, M. Puddu, D. Paunescu, W. J. Stark, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 2552.
- [469] M. Blawat, K. Gaedke, I. Hütter, X.-M. Chen, B. Turczyk, S. Inverso, B. W. Pruitt, G. M. Church, *Procedia Comput. Sci.* **2016**, *80*, 1011.
- [470] J. Bornholt, R. Lopez, D. M. Carmean, L. Ceze, G. Seelig, K. Strauss, *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Architectural Support for Programming Languages and Operating Systems (Association for Computing Machinery)* **2016**, *50*, 637.
- [471] Y. Erlich, D. Zielinski, *Science* **2017**, *355*, 950.
- [472] L. Sennels, T. Bentin, *Artif. DNA PNA XNA* **2012**, *3*, 109.
- [473] S. L. Shipman, J. Nivala, J. D. Macklis, G. M. Church, *Nature* **2017**, *547*, 345.
- [474] M. Castillo, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2014**, *35*, 1.
- [475] J.-F. Lutz, *Macromolecules* **2015**, *48*, 4759.
- [476] T. Sarkar, K. Selvakumar, L. Motiei, D. Margulies, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11374.
- [477] J.-F. Lutz, "Bientôt des disques durs en plastique ?", dans *ARTE Journal*, ARTE, info.arte.tv/fr/bientot-des-disques-durs-en-plastique, **2017**.
- [478] U. Jinbo, T. Kato, M. Ito, *Entomol. Sci.* **2011**, *14*, 107.
- [479] D. Paunescu, W. J. Stark, R. N. Grass, *Powder Technol.* **2016**, *291*, 344.
- [480] H. Zhong, S. L. Marcus, L. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 471.
- [481] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, J. A. Golovchenko, *Nature* **2001**, *412*, 166.
- [482] C. A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. D. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, A. T. C. Johnson, M. Drndić, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2915.
- [483] G. F. Schneider, S. W. Kowalczyk, V. E. Calado, G. Pandraud, H. W. Zandbergen, L. M. K. Vandersypen, C. Dekker, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3163.
- [484] K. Liu, J. Feng, A. Kis, A. Radenovic, *ACS Nano* **2014**, *8*, 2504.
- [485] A. B. Farimani, K. Min, N. R. Aluru, *ACS Nano* **2014**, *8*, 7914.
- [486] M. Wanunu, *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 125.
- [487] L. J. Steinbock, A. Radenovic, *Nanotechnology* **2015**, *26*, 074003.
- [488] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, *Science* **1996**, *274*, 1859.
- [489] S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, J. J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 3057.
- [490] D. Branton, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1146.
- [491] Y. Feng, Y. Zhang, C. Ying, D. Wang, C. Du, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2015**, *13*, 4.
- [492] M. T. Degiacomi, I. Iacovache, L. Pernot, M. Chami, M. Kudryashev, H. Stahlberg, F. G. van der Goot, M. Dal Peraro, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 623.
- [493] R. Stefureac, Y.-T. Long, H.-B. Kraatz, P. Howard, J. S. Lee, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9172.
- [494] J. M. Urban, J. Bliss, C. E. Lawrence, S. A. Gerbi, *bioRxiv* **2015**.
- [495] X.-M. Liu, A. Thakur, D. Wang, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2653.
- [496] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153.
- [497] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16.
- [498] A. T. Blomquist, R. E. Burge, L. H. Liu, J. C. Bohrer, A. C. Sucusy, J. Kleis, *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73*, 5510.
- [499] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260.
- [500] H. Meier, *Synthesis* **1972**, *1972*, 235.
- [501] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272.
- [502] R. D. Bach, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5233.
- [503] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199.

- [504] C. Laure, "Synthèse orthogonale de polymères à séquences contrôlées, optimisés pour la lecture de données digitales", **2017**.
- [505] R. N. Butler, W. J. Cunningham, A. G. Coyne, L. A. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11923.
- [506] C. Airoldi, S. Mourtas, F. Cardona, C. Zona, E. Sironi, G. D'Orazio, E. Markoutsas, F. Nicotra, S. G. Antimisiaris, B. La Ferla, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 43.
- [507] M. A. van Dongen, J. E. Silpe, C. A. Dougherty, A. K. Kanduluru, S. K. Choi, B. G. Orr, P. S. Low, M. M. Banaszak Holl, *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 1696.
- [508] A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498.
- [509] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 583.
- [510] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878.
- [511] I. Singh, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2706.
- [512] A. Bernardin, D. Bonnaffe, I. Texier-Nogues, *C.à.I.E. Atomique*, EP 2 314 566 (B1), **2018**.
- [513] L. Brandsma, H. D. Verkruisje, *Synthesis* **1978**, *1978*, 290.
- [514] A. Krebs, J. Wilke, "Angle strained cycloalkynes", dans *Wittig Chemistry*, Springer, **1983**, p. 189.
- [515] A. Greenberg, J. F. Liebman, "*Strained Organic Molecules*", Academic Press, **1978**.
- [516] T. Harris, I. V. Alabugin, "Cyclooctyne", dans *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2017**.
- [517] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612.
- [518] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644.
- [519] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793.
- [520] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486.
- [521] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285.
- [522] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2076.
- [523] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688.
- [524] M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168.
- [525] L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11313.
- [526] C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 841.
- [527] V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. McLaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, *Science* **2012**, *336*, 341.
- [528] A. I. Taylor, V. B. Pinheiro, M. J. Smola, A. S. Morgunov, S.-Y. Peak-Chew, C. Cozens, K. M. Weeks, P. Herdewijn, P. Holliger, *Nature* **2015**, *518*, 427.
- [529] D. Chouikhi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5476.
- [530] W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366.
- [531] V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971.
- [532] G. Devi, K. N. Ganesh, *Artif. DNA PNA XNA* **2010**, *1*, 68.
- [533] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [534] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [535] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401.
- [536] R. Subiros-Funosas, G. A. Acosta, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6200.
- [537] A. El-Faham, R. Subiros-Funosas, R. Prohens, F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404.
- [538] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčuk, M. Vorlíčková, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713.
- [539] A. M. Michelson, *Nature* **1958**, *182*, 1502.
- [540] J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515.
- [541] M. D'Abramo, C. L. Castellazzi, M. Orozco, A. Amadei, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8697.
- [542] A. Rodger, B. Nordén, "*Circular dichroism and linear dichroism*", Oxford University Press, **1997**.
- [543] L. Mendonca, "Dynamique conformationnelle des protéines étudiée par dichroïsme circulaire résolu en temps", **2013**.

- [544] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119.
- [545] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876.
- [546] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, K. Bednářová, D. Renčiuk, J. Kypr, *Chirality* **2012**, *24*, 691.
- [547] M. Corredor, J. Solà, I. Alfonso, "Disubstituted 1,2,3-triazoles as amide bond mimetics", dans *Targets in Heterocyclic Systems*, Soc. Chim. It., **2018**.
- [548] J. M. del Rio Martinez, E. Zaitseva, S. Petersen, G. Baaken, J. C. Behrends, *Small* **2015**, *11*, 119.
- [549] M. Gonçalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Lain, M. Bayle, X. Canron, N. Betz, A. Bikfalvi, G. Déléris, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1411.
- [550] S. Karsten, A. Nan, R. Turcu, J. Liebscher, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*, 3986.
- [551] C. Romuald, G. Cazals, C. Enjalbal, F. Coutrot, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 184.

Liste des publications

1. G. Fiers, D. Chouikhi, L. Oswald, A. Al Ouahabi, D. Chan-Seng, L. Charles, J.-F. Lutz, Orthogonal Synthesis of Xeno Nucleic Acids. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22 (50), 17945.
2. G. Fiers, M. Talarimoghari, J. C. Behrends, J.-F. Lutz, **en préparation**.

Résumé

Les poly(triazole amide)s sont une classe de polymères à séquences définies synthétisés par une approche « AB+CD » itérative, chimiosélective et supportée. Cette stratégie permet de contrôler parfaitement la séquence des monomères, puisque les unités constitutives sont ajoutées une à une. De plus, la chimiosélectivité des réactions de couplage permet de s'affranchir d'étapes de déprotection. En outre, l'utilisation d'un support solide minimise également le temps d'expérimentation et facilite les étapes de lavage, réduisant donc le temps total de synthèse. Cette voie de synthèse a été utilisée pour la préparation de différents types de polymères fonctionnels. Premièrement, plusieurs oligomères comme des structures composées de chaînes alkyles ou PEG ont été préparées, contenant des séquences de monomères non naturels qui forment un code binaire. Ces produits ont été analysés grâce à deux techniques de séquençage : la spectrométrie de masse en tandem et l'analyse de chaînes uniques par les nanopores. Une synthèse sans cuivre de ce type d'oligomères a également été considérée. Enfin, une nouvelle classe d'acides xénonucléiques (XNAs), les peptide triazole nucleic acids (PTzNAs), a été synthétisée et étudiée. En particulier, les propriétés d'hybridation de ces polymères contenant des séquences génétiques ont été examinées.

Mots-clés : polymères à séquences définies, synthèse itérative, polymères numériques synthétiques, analyse par les nanopores, acides xénonucléiques.

Résumé en anglais

Poly(triazole amide)s are a class of sequence-defined polymers synthesized via a chemoselective iterative "AB+CD" approach on a solid support. This strategy allows to perfectly control the sequence of monomers, since the building blocks are added one by one. Moreover, the chemoselectivity of the coupling reactions enables to avoid the use of deprotection steps and to save time. In addition, the use of a solid support also minimizes the experiment time and facilitates the cleaning steps, thus reducing the total synthesis time. This synthesis pathway was used for the synthesis of different types of functional polymers. First of all, several oligomers such as structures based on alkyl or PEG chains were prepared, containing sequences of non-natural monomers that form a binary code. Those products were analyzed with two sequencing techniques: tandem mass spectrometry and nanopore single-chain analysis. A copper-free synthesis of this type of oligomers was also considered. Then, a new class of xeno nucleic acids (XNAs), peptide triazole nucleic acids (PTzNAs) was synthesized and studied. In particular, the hybridization properties of those natural sequence-containing polymers were investigated.

Keywords: sequence-defined polymers, iterative synthesis, synthetic digital polymers, nanopore analysis, xeno nucleic acids.