

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MENTOURI – CONSTANTINE

Faculté des sciences
Département de chimie

N° d'ordre :.....

Série :.....

Mémoire de **MAGISTER**

Intitulé

**Synthèse quelques nucléotides destinée
à la synthèse oligodéoxynucléotide.**

Option

CHIMIE ORGANIQUE

Présenté Par

REKKAB SEIFEDDINE

Devant la commission d'examen :

Pr. A. BELATTAR	Professeur	Président	Université Mentouri-Constantine
Dr. A. TABDJOUN	M. C.	Rapporteur	Université Mentouri-Constantine
Pr. E. LAIFA	Professeur	Examineur	Université Mentouri-Constantine
Dr. D. TEBBANI	M. C.	Examineur	Université Mentouri-Constantine

Soutenue le : 07/04/2010.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Produits Naturels d'Origine Végétal et de Synthèse Organique (L.P.N.O.V.S.O) de l'Université Mentouri – Constantine.

Je souhaite témoigner ma sincère reconnaissance à toutes les personnes qui, par leur enseignement, leurs conseils et encouragements ; j'ai permis de mener et de conclure mon travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Professeur A. Belattar chef d'équipe de laboratoire (L.P.N.O.V.S.O) qui m'a fait l'honneur de m'accepter dans son équipe de recherche, et pour ces précieux conseils qu'elle m'a prodigués pendant deux années de travail.

Je tiens à exprimer très chaleureusement toute ma reconnaissance à mon encadreur Monsieur Abbes Tabdjoun, maître de conférences à l'université Mentouri – Constantine pour son soutien actif et son aide précieuse, qu'il soit également remercié pour sa patience et sa tolérance face à mon caractère parfois têtu, qu'il trouve dans l'aboutissement de ce travail le témoignage de ma plus profonde gratitude.

A divers titre, j'ai tenu également à remercier

- Mr E. Laifa (Université Mentouri – Constantine) d'avoir accepté d'examiner ce travail.
- Mr D. Tebbani (Université Mentouri – Constantine) pour ces précieux conseils et ses aides matérielles et qui a très amicalement accepté de juger ce travail.

Dédicace

À mes parents,

À mes frères,

À ma famille,

À mes amis,

À mes collègues,

À la mémoire de ma sœur Imène,

Et à la fleur de mon cœur, et mon esprit toujours,

" Ma femme".

Abréviations

A	: adénine.
ADN	: acide désoxyribonucléique.
ARN	: acide ribonucléique.
B	: base.
BSA	: benzenesulfonic acid.
C	: cytosine.
CCM	: chromatographie sur couche mince.
CEM	: cellules de type lymphocytes.
CNEP	: 3'-O-(Chlorophényl)cyanoéthylphosphate.
CPG	: chromatographie sur phase gazeuse.
CuI	: iodure de cuivre.
DBMB	: 5'-O-dibromométhylbenzoyle.
DBU	: 1,8-diaza-bicyclo[5.4.0]undéc-7-ène.
DCA	: dichloroacétique.
DMAP	: N,N-diméthylamino-4-pyridine.
DMF	: diméthylformamide.
DMTr	: 4,4'-diméthoxytrityl.
EC₅₀	: concentration effective requise pour réduire de 50 % le niveau d'ARN/ADN viral (activité).
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
G	: guanine.
HEPT	: 1-[(2-hydroxyéthoxy)méthyl]-6-(phénylthio)thymine.
HPLC	: high-performance liquid chromatography.
HSV-1 et 2	: herpes simplex virus type 1 et 2.
Huh-7	: cellule hépatique.
Ib	: isobutyryl.
I.R	: infra-rouge.
MMTr	: monométhoxytrityl.
MPT	: cyclohexylammonium S,S-bis(4-méthoxyphényl)phosphodithioate.
MSTN	: (mésithylène-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole.
nt	: nucléotide.
P	: phosphite.
PBM	: cellules mononucléaires du sang périphériques humain.
ppm	: parties par millions.
Px	: phényle-9 xanthényl-9.
Py	: pyridine.
T	: thymine.
TBDMS	: tert-butyl diméthylesilane.
TBAF	: tétra-n-butylammonium florid.
TCA	: trichloroacetic acid.
TF	: transcription factor.
TFA	: trifluoroacetic acid.
THF	: térahydrofurane.
TPSNT	: 1-(2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol.
Tr	: trityl.
TSE	: triméthylsilyléthyl.
U	: uracile.
U.V	: ultra-violet.

VERO : cellule du callitriche africain.
VHB : virus de l'hépatite B.
VHC : virus de l'hépatite C.
VIH : virus de l'immunodéficience humaine.
VZV : varicella zoster virus.
ZnBr : bromure de zinc.

Listes des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ARN	11
2	Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ADN	11
3	Les modifications du code génétique standard dans les mitochondries	25
4	Les rendements et les conditions des réactions utilisées dans la synthèse des dérivés de déoxyguanosine.	54
5	Données RMN- ¹³ C et RMN ¹ H (250 MHz, C ₅ D ₅ N) du produit 87	76
6	Données I.R du produit 87	79
7	Données RMN ¹ H (250 MHz, C ₅ D ₅ N) du produit 88	82
8	Données I.R du produit 88	84
9	Données RMN- ¹³ C et RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) du produit 89.	86
10	Données I.R du produit 89	89
11	Données I.R du produit 91	91
12	Données I.R du produit 92	93
13	Données I.R du produit 93	95
14	Données RMN- ¹³ C et RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) du produit 94	97
15	Données I.R du produit 94	100
16	Données I.R du produit 96	102
17	Données I.R du produit 97	104
18	Données RMN- ¹³ C et RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) du produit 98	106
19	données I.R du produit 98	109
20	données I.R du produit 99	111
21	données I.R du produit 100	112
22	données I.R du produit 103	117
23	Données RMN- ¹³ C et RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) du produit 104	119
24	données I.R du produit 104	122

SOMMAIRE

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Chapitre I

Aperçu bibliographique sur les nucléotides	4
1 - Notions sur les nucléotides.....	5
1. 1. Définition	5
1. 2. Les constituants du nucléotide	5
1. 2. a) la base	5
1. 2. a) 1. Bases pyrimidiques	6
1. 2. a) 2. bases puriques	6
1. 2. a) 3. Biosynthèse et catabolisme des bases puriques et pyrimidiques	7
1. 2. a) 4. Les propriétés chimiques des bases puriques et pyrimidiques	7
1. 2. b) Le pentose	8
1. 2. b) 1. Le ribose	8
1. 2. b) 2. le désoxyribose	9
1. 2. c) L'acide phosphorique	9
1. 3. Structure et constitution du nucléotide	10
1. 3. a) Liaison base–pentose	10
1. 3. b) Liaison pentose – phosphates	10
1. 3. c) Nomenclature des différents nucléotides	11
1. 4. Du nucléotide à l'acide nucléique	12
1. 4. a) Les nucléotides forment les sous-unités de l'ADN et de l'ARN	12
1. 4. b) Le brin d'acide nucléique est un polymère linéaire	14
2 - Mécanismes de la transcription	16
2. 1. Réaction enzymatique de la synthèse d'ARN.....	16
2. 2. Synthèse d'ARN par l'ARN polymérase II	18
2. 3. Les ARN synthétisés subissent différentes modifications	19
2. 3. a) Enzyme Coiffante	19
2. 3. b) Coiffe 7-méthylguanosine triphosphate (Me-G-ppp-5').....	20
2. 3. c) La modification des ARN de façon covalente	21
2. 4. Synthèse des ARN ribosomiques.	23
2. 5. les modifications du code génétique	24
2. 5. a) le code génétique mitochondrial	24

2. 5. b) les mutations dans l'ADN mitochondrial	25
2. 5. c. La réparation des lésions de l'ADN	26

Chapitre II

Synthèse des nucléosides	29
1 - La synthèse chimique des nucléosides.....	30
1. 1. Historique	30
1. 2. La stratégie de la synthèse	30
1. 3. Les méthodes de synthèse	32
1. 3. a) La méthode du triester phosphate	33
1. 3. b) La méthode de Phosphoramidite (Phosphite)	34
1. 3. c) La méthode de H-phosphonate	34
1. 4. Synthèse des oligoribonucléotides	34
2 - Protection des nucléosides	35
2. 1. Les groupes protecteurs	35
2. 2. Protection du sucre	37
2. 2. a) La protection du 5'-OH	37
2. 2. b) la protection du 3'-OH	39
2. 3. Protection des bases Hétérocycliques	41
2. 3. a) Peracylation	41
2. 3. b) La protection de la désoxy-2'-adénosine	42
2. 3. c) Protection de désoxy-2'guanosine	43
2. 3. d) Protection de la désoxy-2'cytidine	45
3 - Le fonctionnement du support	45
4 - L'élimination des groupes protecteurs et la purification des oligonucléotides	46
4. 1. L'élimination des groupes protecteurs.....	46
4. 2. La purification des oligonucléotides.....	46
5 - Synthèse des oligonucléotides modifiés.....	47

Chapitre III

Applications de la synthèse sur les nucléosides et leurs intérêts biologiques	51
1 - Différente applications pour la synthèse des nucléosides	52
1. 1. Une stratégie pour la protection de déoxyguanosine	52

1. 2. Synthèse des dérivés du guanosine O-substitués	55
1. 3. La protection de la liaison glycosidique en série désoxy-2'-adénosine	56
1. 4. La réaction de la guanosine et la 2'-déoxyguanosine avec l'Acroléine	59
2. La synthèse et l'évaluation des nucléosides ciblant l'hépatite C	61
2. 1. L'effet de l'hépatite C	61
2. 2. La réaction de Sonogashira par le Palladium	61
2. 3. La réaction de Sonogashira en chimie des nucléosides	62
2. 4. Le nucléoside carbocyclique	65
2. 5. Synthèse de l'hétérocycle triazole <i>via</i> une cycloaddition 1,3-dipolaire	69

Chapitre IV

Partie expérimentale	71
Méthodes générales	72
1. a) La préparation de l'hydroxy-3-propionitrile HOCH ₂ CH ₂ CN	73
1. b) La préparation de Chlorure d'isobutyryl	74
2. a) Préparation de N ² -isobutyryl-2'-déoxyguanosine	75
2. b) Préparation de N ² -isobutyryl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine	76
2. c) Préparation de N ² -isobutyryl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine	80
2. d) Préparation de N ² -isobutyryl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine	85
3. a) Préparation de N ⁶ -benzoyl-2'-déoxyadénosine	90
3. b) Préparation de N ⁶ -benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine	92
3. c) Préparation de N ⁶ -benzoyl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine	94
3. d) Préparation de N ⁶ -benzoyl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine	96
4. a) Préparation de 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine	101
4. b) Préparation de 3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine	103
4. c) Préparation de 3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine	105
4. d) Préparation de 3'-O-(acétyl)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine	110

4. e) Préparation de 3'-O-(acétyl)- 2'-déoxythymidine	112
5. a) Préparation de N ⁴ -benzoyl-2'-déoxycytidine	114
5. b) Préparation de N ⁴ -benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine	115
5. c) Préparation de N ⁴ -benzoyl-3'-O-benzoyl,5'-O- (4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine	116
5. d) Préparation de N ⁴ -benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine	118
Conclusion générale	123
Les références.....	124

Introduction générale

Situation et présentation du sujet

La synthèse chimique des oligonucléotides a commencé en 1955 quand A. M. Michelson et A. R. Todd ont préparé le premier monophosphate du dinucléoside ^[1]. Ils ont utilisé la méthode du triester pour montrer que les oligonucléotides de série définie peuvent être préparés par des méthodes purement chimiques. En 1956 Khorana et coll. Ont synthétisé le même nucléotide par la méthode du diester avec succès ^[2].

Ce processus a dominé la synthèse de l'oligonucléotide jusqu'en 1970, et a été utilisé par Khorana et Coworkers pour la première synthèse totale d'un gène (ARNt alanine - spécifique de levure) ^[3].

La synthèse d'ADN est basée sur la séparation et l'hybridation des deux extrémités et la liaison enzymatique des molécules d'ADN, et les trois méthodes principales de la synthèse d'oligonucléotide sont le triester du phosphate, le phosphoramidite, et les méthodes H-phosphonate.

La synthèse d'un oligonucléotide demande une protection de tous les centres actifs, pour ne se passe qu'à un site bien défini, et deux types de groupements distingués : des groupements protecteurs permanents et intermédiaires.

La protection du sucre se fait par des groupements en fonction de son volume, et les bases hétérocycliques exigent une protection permanente afin d'éviter des réactions de phosphorylation secondaire, et après la synthèse il y a des conditions appliqués pour éliminer les groupes protecteurs selon la méthode utilisée.

Pour les réactions appliquées dans la synthèse des nucléosides ; Gaffney et Jones ^[4] réalise une stratégie du groupe protecteur pour la protection de déoxyguanosine qui comporte une protection O-6. Ainsi ; Petrove Daskalove et coll. ^[5] ont fait des réactions latérales dans la synthèse d'un monomère du guanosine et les oligomères de guanosine – riche ; ils ont utilisé un dérivé de guanosine capable d'élaborer un groupe du phosphate au groupement 5'-OH du ribose.

La synthèse d'un dérivé de 2'-déoxyadénosine obtenu par oxydation de 2'-déoxyadénosine ^[6], repose sur une méthodologie désormais classique en synthèse d'oligodésoxynucléotides.

La réaction de la guanosine et la 2'-déoxyguanosine avec l'Acroléine réalisée par Galliani et Pantarotto ^[7] sont une explication de la mutagénétique et la cancérogénétique de beaucoup de xénobiotiques électrophilique.

Dans l'activité biologique des nucléosides en chimie antivirale, visant plusieurs enzymes clés intervenant dans la réplication virale ^[8], peu d'entre eux ont été conçus pour viser l'ARN polymérase ARN dépendante nécessaire au VHC. Dans cette optique, des dérivés

carbocycliques de la Ribavirine, et des dérivés nucléosidiques du type 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile, ont été synthétisés en utilisant deux méthodes : la réaction de Sonogashira^[9] et la cyclisation 1,3-dipolaire.

Dans le premier chapitre de notre travail, nous décrivons les constituants et la structure du nucléotide et les unités de l'ADN et de l'ARN, ainsi tous les détails des mécanismes de la transcription.

Dans le deuxième chapitre, nous allons décrire la stratégie de la synthèse chimique et les méthodes de synthèse des nucléosides.

Dans le troisième chapitre, nous allons présenter des exemples de la synthèse des nucléosides et un aperçu de leurs intérêts biologiques.

Et notre application sera détaillée au quatrième chapitre.

CHAPITRE 1

Aperçu bibliographique sur les nucléotides

I- notions sur les nucléotides.

1. Définitions :

Les nucléotides sont des petites molécules formées par l'association de trois constituants distincts ^[10] :

- Une base, composé cyclique portant un ou des groupements azotés;
- Un sucre à 5 carbones ou pentose;
- Un ou plusieurs groupements phosphates liés au sucre.

La classification des différents nucléotides peut se faire en deux groupes selon la nature de leur sucre. Dans chacun de ces deux groupes, plusieurs nucléotides se distinguent par la nature de leur base.

En formant des polymères, appelés acides nucléiques, les nucléotides jouent un rôle crucial dans la conservation du patrimoine génétique et des informations nécessaires à la synthèse des protéines.

À l'état monomérique, ils jouent aussi un rôle majeur dans la fourniture d'énergie chimique et la transmission des signaux cellulaires ^[11].

2. les constituants du nucléotide :

Un nucléotide est constitué de l'enchaînement de trois éléments : une base, un pentose et un acide phosphorique (figure 1).

Phosphate

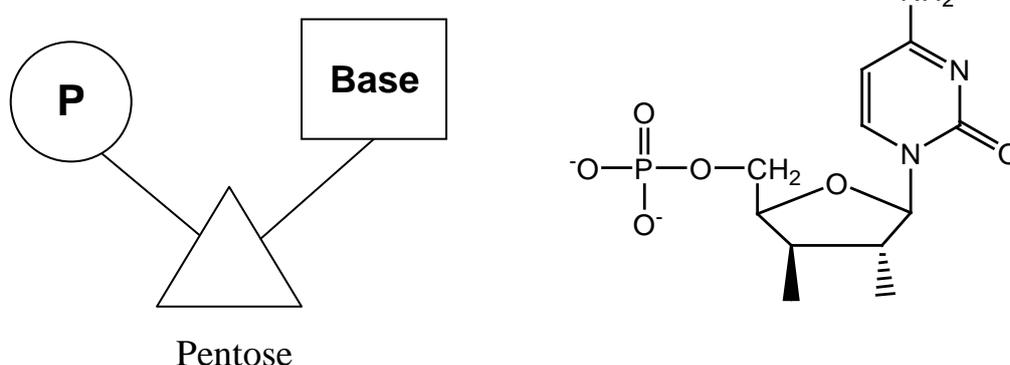


Figure 1 : Enchaînement des trois éléments constituant un nucléotide.

a) la base :

Appelées ainsi car elles sont capables de s'associer à un proton (H⁺) en solution acide, les bases nucléotidiques sont des composés cycliques azotés (figure 2).

Ces composés cycliques azotés se distinguent par la nature et le nombre de leur(s) cycle(s) (hexagonal ou pentagonal) et le nombre d'atomes d'azote par cycle ^[12].

Parmi les principales bases azotées cycliques (pyridine, pyrimidine, imidazole et purine), seules les bases pyrimidiques et puriques rentrent dans la composition des nucléotides cellulaires.

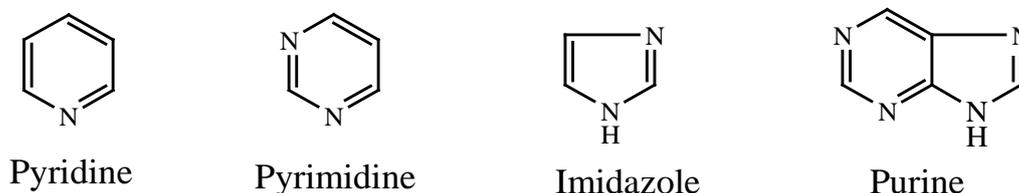


Figure 2. Les principales bases azotées cycliques.

Par convention, lorsqu'on représente ces formules, on n'écrit pas les atomes de carbones (C) des cycles, ni les hydrogènes (H) qui leur sont liés, mais simplement les atomes d'azote (N). Ces atomes d'azote doivent être écrits dans le noyau et non à côté^[11].

Les différentes bases azotées des nucléotides sont donc dérivées de la purine et la pyridine.

1. Bases pyrimidiques :

Elles sont formées d'un cycle hexagonal à quatre carbones et deux azotes. Différents substituants viennent se greffer sur ce cycle commun à toutes les bases pyrimidiques

Au niveau des carbones 4 (substituant R_1) et 5 (substituant R_2) (figure 3)^[12].

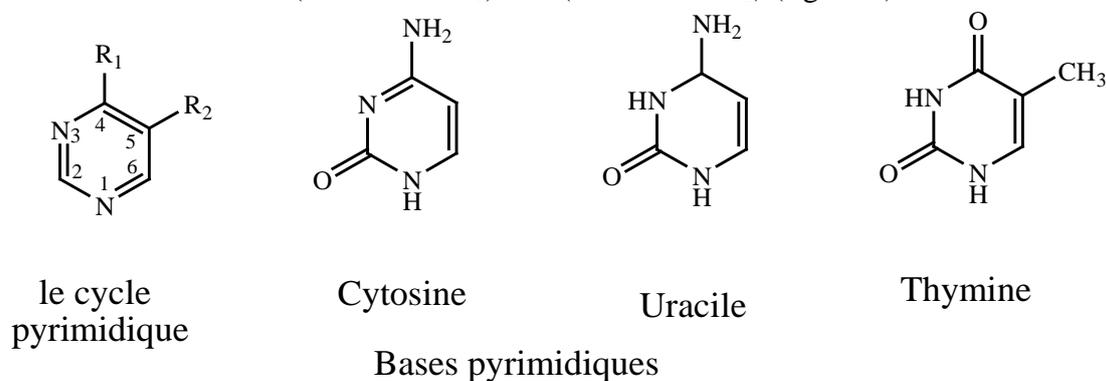


Figure 3. Le cycle commun et les différentes bases pyrimidiques des nucléotides.

2. bases puriques :

Elles sont formées de l'accolement d'un cycle hexagonal à quatre carbones et deux azotes et d'un cycle pentagonal à trois carbones et deux azotes^[10].

Différents substituants viennent se greffer sur le cycle hexagonal de l'hétérocycle commun à toutes les bases puriques au niveau des carbones 2 et 6 (figure 4).

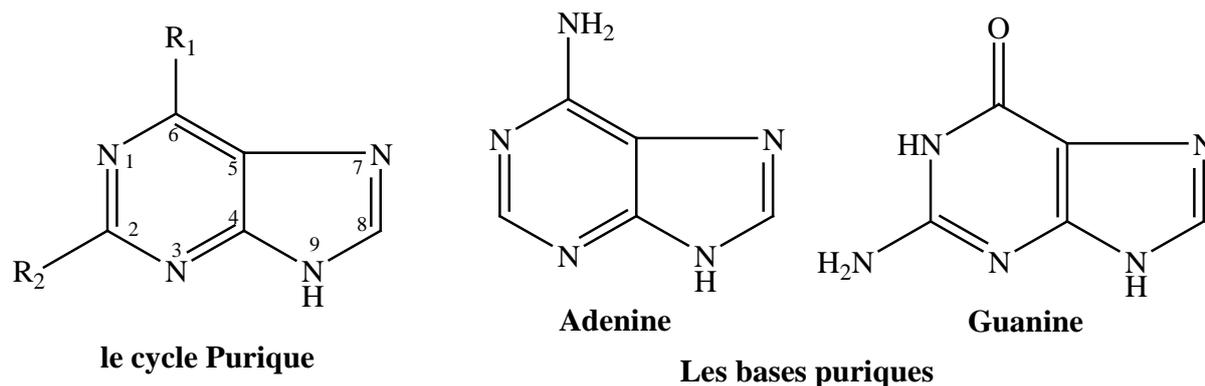


Figure 4. Le cycle commun et les différentes bases puriques.

3. Biosynthèse et catabolisme des bases puriques et pyrimidiques :

Le stock de bases puriques et pyrimidiques de l'organisme provient de la dégradation des acides nucléiques, polymères de nucléotides ^[12].

Cependant, l'organisme peut synthétiser ces bases en petites quantités.

La synthèse de NOVO ^[13] du cycle pyrimidique se fait par liaison entre deux composés carbonés:

- *Un acide aminé (l'acide aspartique);*
- *Un dérivé du cycle de l'urée (carbamoylphosphate)*

Le carbamoylaspartate ainsi formé est cyclisé, puis oxydé pour former la base pyrimidique.

La dégradation de ce cycle pyrimidique donnera l'urée et un composé semi-aldéhyde.

Les deux cycles de la base purique peuvent être synthétisés de NOVO et les principaux contributeurs des carbones et azotes de ces cycles sont des acides aminés (aspartate, glycine, glutamine) et des composés du métabolisme intermédiaire (formiate).

4. les propriétés chimiques des bases puriques et pyrimidiques:

Les bases azotées cycliques possèdent certaines propriétés chimiques, qui vont influencer la structure et la fonction des nucléotides ^[11].

Ces molécules sont des bases faibles et sont fortement conjuguées. Il existe une importante résonance des atomes des noyaux cycliques de ces bases.

En fonction du pH de la solution, la plupart des bases puriques et pyrimidiques existent sous forme de tautomères C=O ou C-OH (schéma 1) ^[12].

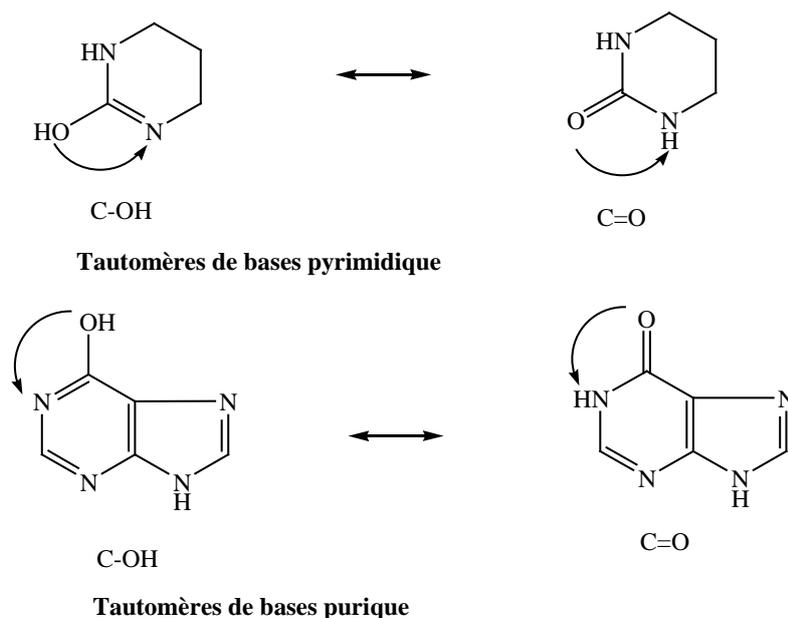


Schéma 1. Tautomères de bases purique et pyrimidique.

À pH physiologique les tautomères $C=O$ prédominent largement et ont été choisis dans les formules ci-dessus. Mais les formules des tautomères $C-OH$ sont plus faciles à retenir. À pH physiologique neutre, ces bases azotées sont hydrophobes et relativement insolubles dans l'eau. Ces propriétés changent en cas d'augmentation ou de baisse du pH.

b) Le pentose:

Le pentose est un sucre simple à 5 carbones. Ces carbones sont numérotés de 1 à 5. on numérote les atomes de carbone du pentose lié à la base cyclique azotées avec des "primes" pour éviter les confusions avec les numéros des bases ($C1'$, $C2'$,...etc.)^[11].

Dans les nucléotides, deux types de pentoses sont identifiés : le ribose et le déoxyribose.

1. Le ribose :

Monosaccharide formé d'un squelette à 5 carbones, non ramifié et sans double liaison, le ribose est un composant essentiel des nucléotides^[12].

Le premier carbone forme un groupement carbonyle (CHO), qui fait de ce sucre un aldose.

Les autres carbones portent chacun un groupement hydroxyle (OH). La structure du ribose peut être représentée sous forme linéaire, qui est la plus simple. Cependant, en solution aqueuse, le ribose a une structure cyclique par formation d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle (carbone 1') et l'hydroxyle du carbone 4' (schéma 2). Le polymère de nucléotides contenant du ribose (ribonucléotides) s'appelle l'acide ribonucléique ou ARN^[10].

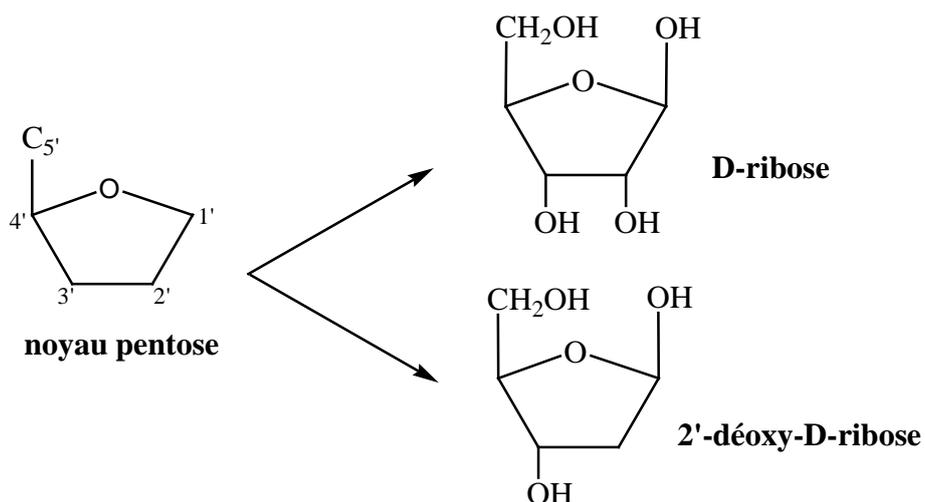


Schéma 2. Structure cyclique d'un pentose, du D-ribose et du 2'-déoxy-D-ribose.

2. le déoxyribose :

Le déoxyribose est un ribose dans lequel il manque un groupement hydroxyle (OH) en 2'. Cet OH est remplacé par un H. Comme le ribose, il est cyclique en solution aqueuse^[14].

Le déoxyribose est trouvé dans des nucléotides, appelés déoxyribonucléotides, qui constituent l'ADN.

c) L'acide phosphorique H_3PO_4 :

L'acide phosphorique est un tri-acide. Ce groupement phosphate rend donc le nucléotide chargé négativement^[12]. Dans un nucléotide libre, l'acide phosphorique est lié au sucre par une de ses fonctions acides (figure 5).

C'est le groupement hydroxyle (OH) du carbone 5' du pentose qui forme la liaison covalente. Le nucléotide libre peut contenir un, deux ou trois groupements phosphates. On parle alors de nucléotide mono-, di- ou triphosphate. Les phosphates sont alors liés entre eux par des liaisons « phosphoanhydride », riches en énergie chimique.

Dans les ADN et ARN, le seul groupement phosphate du nucléotide verra deux de ces trois fonctions acides estérifiées. La première fonction estérifiée permet la liaison au sucre du nucléotide. La deuxième fonction estérifiée assure l'association au sucre du nucléotide précédent^[14].

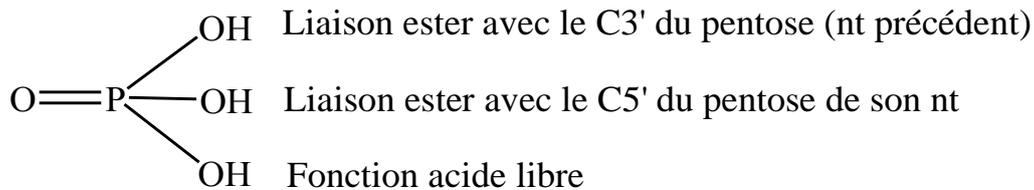


Figure 5. L'acide phosphorique.

3. Structure et constitution du nucléotide :

Un nucléotide est donc l'association d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre de type pentose et d'un phosphate.

Le pentose établit une liaison avec la base par son carbone 1' et avec le phosphate par son carbone 5' ^[12].

a) Liaison base–pentose :

La liaison qui unit l'ose et la base est une liaison β -osidique (figure 6).

Cette liaison se forme par élimination d'une molécule d'eau entre l'OH semi-aldéhydique (H en 9). C'est le même carbone 1' du pentose qui est impliqué dans la liaison glucidique dans les polysaccharides ^[14].

Cet assemblage ose–base s'appelle «nucléoside».

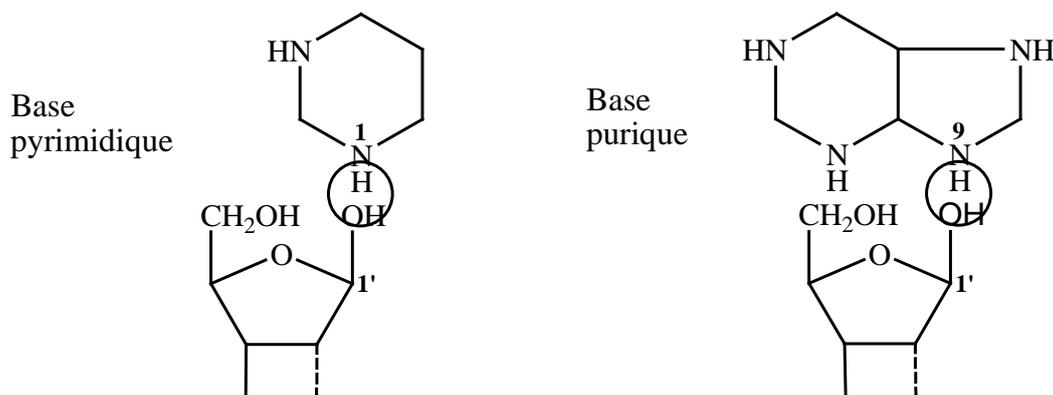


Figure 6. Liaison base pentose.

b) Liaison pentose–phosphates :

La liaison entre le pentose et l'acide phosphorique est une liaison ester (figure 7) ^[15]. Cette liaison se forme par élimination d'une molécule d'eau entre :

- OH d'un acide : il s'agit ici d'un OH de H_3PO_4 ;
- H d'un alcool : il s'agit ici de l'hydrogène de la fonction alcool en 5' du pentose.

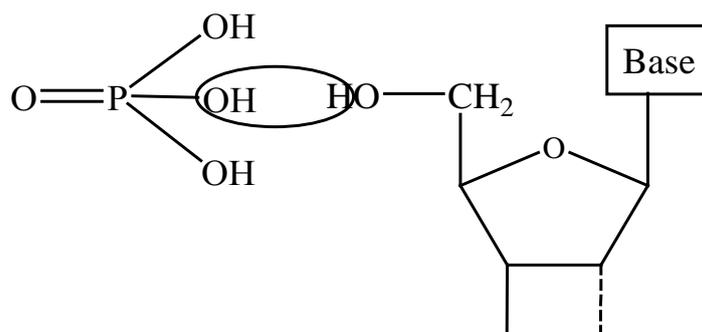


Figure 7: Liaison pentose-phosphate.

c) Nomenclature des différents nucléotides :

Par convention, l'association d'une base à un sucre de type pentose est appelée nucléoside, alors que l'association d'une base, d'un sucre et d'un phosphate est appelée nucléotide^[16].

Le nom du nucléoside ou du nucléotide dérive de celui de sa base (radical) suivi d'un suffixe «osine» (base purique) ou «idine» (base pyrimidique) pour les nucléosides et «ylique» (base purique) ou «idylique» (base pyrimidique) pour les nucléotides. Ces règles et les abréviations des nucléotides sont schématisées dans les tableaux 1 et 2^[17].

Tableau 1. Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ARN.

Base	Abréviation	Nucléoside	Nucléotide	Abréviation
Adénine	A	Adénosine	Acide adénylique	AMP
Guanine	G	Guanosine	Acide guanylique	GMP
Cytosine	C	Cytidine	Acide cytidylique	CMP
Uracile	U	Uridine	Acide uridylique	UMP

Tableau 2. Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ADN.

Base	Abréviation	Nucléoside	Nucléotide	Abréviation
Adénine	A	Désoxyadénosine	Acide désoxyadénylique	AMP
Guanine	G	Désoxyguanosine	Acide désoxyguanylique	GMP
Cytosine	C	Désoxycytidine	Acide désoxycytdilique	CMP
Thymine	T	Désoxythymidine	Acide (désoxy) thymidilique	UMP

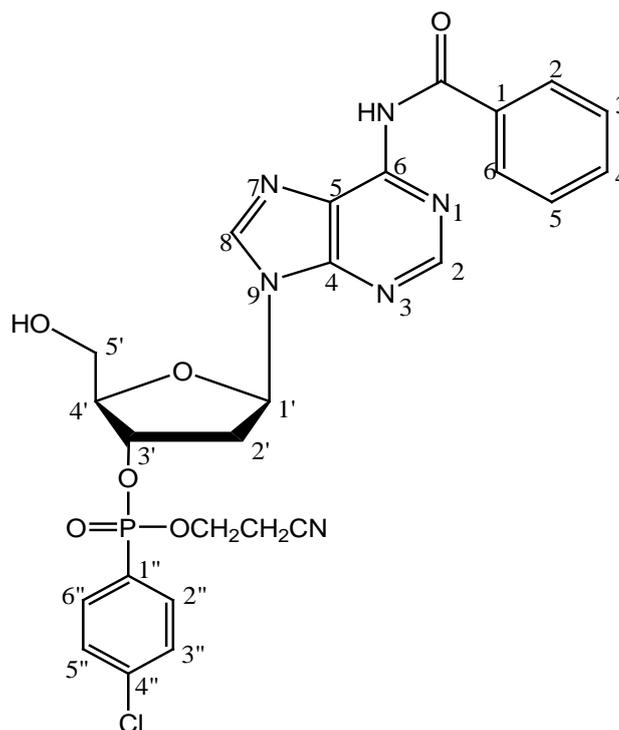


Figure 8.

Cette molécule est-le :

N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine

4. Du nucléotide à l'acide nucléique :

a) Les nucléotides forment les sous-unités de l'ADN et de l'ARN :

Les nucléotides contenant du ribose sont appelés *ribonucléotides* et ceux contenant du désoxyribose, *désoxyribonucléotides*^[14]. Les cycles à base d'azote sont généralement appelés base pour des raisons historiques : sous des conditions acides ils peuvent chacun fixer un H⁺ (proton) et augmenter ainsi la concentration en ions OH⁻ en solution aqueuse. Il existe une forte ressemblance familiale entre les différentes bases. La cytosine (C), la thymine (T) et l'uracile (U) sont appelées pyrimidines parce qu'elles dérivent toutes d'un cycle pyrimidine à six atomes ; la guanine (G) et l'adénine (A) sont des purines et possèdent un second cycle à cinq atomes associé au cycle à six atomes. Chaque nucléotide porte le nom de la base qu'il contient^[10].

Les nucléotides peuvent agir comme des transporteurs à court terme d'énergie chimique. En particulier, le ribonucléotide **adénosine triphosphate** ou **ATP** (figure 9) est utilisé pour transférer l'énergie dans des centaines de réactions cellulaires différentes.

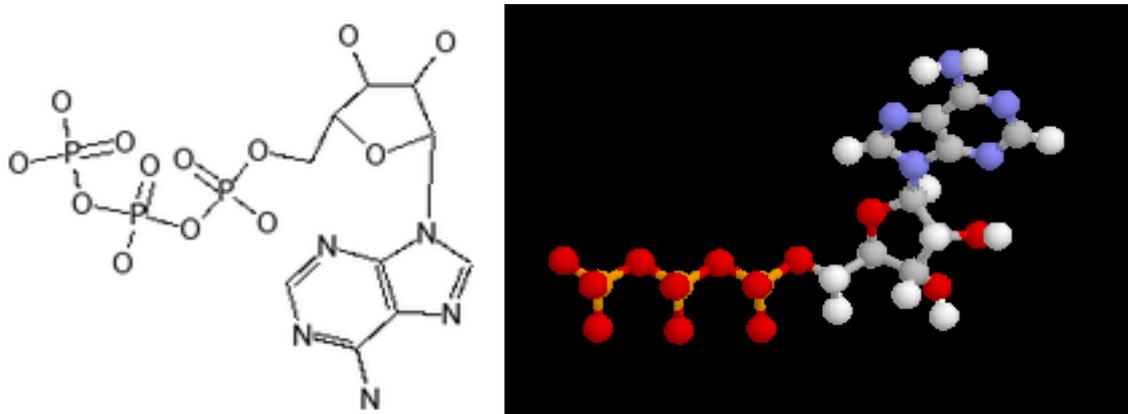


Figure 9. Structure chimique de l'adénosine triphosphate (ATP).

L'ATP est formé par des réactions entraînées par la libération d'énergie après la dégradation oxydative des denrées alimentaires ^[15]. Ses trois phosphates sont liés en série par deux *liaisons phosphoanhydride*, dont la rupture libère de grandes quantités d'énergie utile. Le groupement phosphate terminal, en particulier, est souvent détaché par hydrolyse, transférant souvent un phosphate à d'autres molécules et libérant l'énergie qui entraîne les réactions de biosynthèse énergie-dépendantes (schéma 3). D'autres dérivés des nucléotides servent de transporteurs pour le transfert d'autres groupements chimiques ^[12].

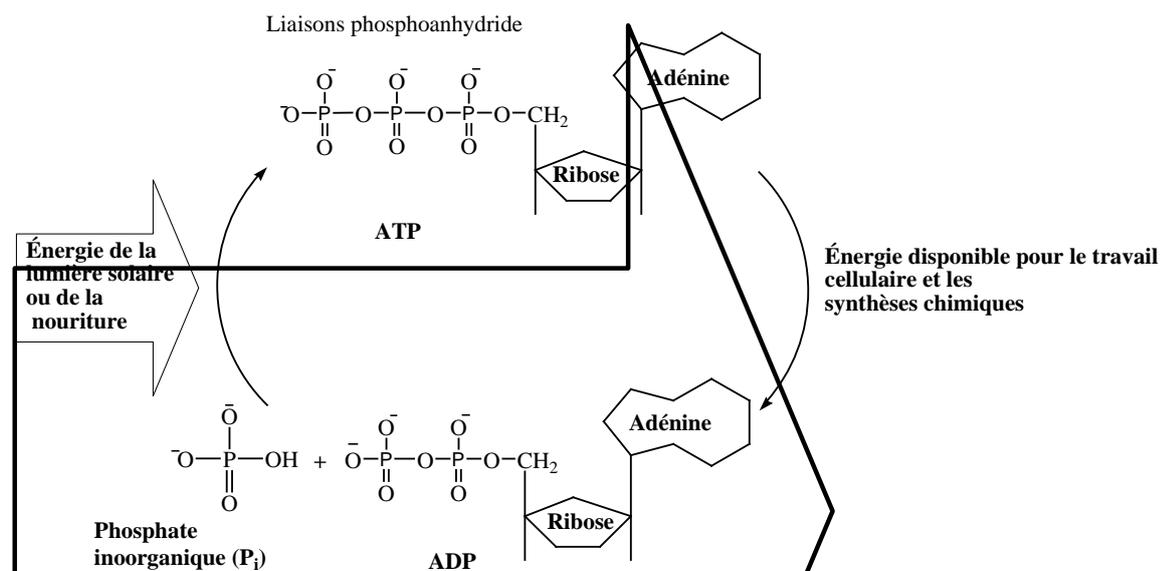


Schéma 3. La molécule d'ATP sert de transporteur d'énergie dans les cellules.

Cependant, le rôle le plus fondamental des nucléotides dans la cellule est le stockage et la libération des informations biologiques. Les nucléotides servent d'unités de construction des *acides nucléiques* – longs polymères dans lesquels les sous-unités de nucléotides sont reliées de façon covalente par des *liaisons phosphodiester* entre le groupement phosphate lié au glucide d'un nucléotide et le groupement hydroxyle du glucide du nucléotide suivant^[16].

Les chaînes d'acide nucléique sont synthétisées à partir de nucléosides triphosphates riches en énergie grâce à une réaction de condensation qui libère du pyrophosphate inorganique pendant la formation de la liaison phosphodiester.

Il existe deux types principaux d'acides nucléiques qui diffèrent selon le type de glucide de leur squelette sucre-phosphate. Ceux basés sur le ribose sont appelés **acides ribonucléiques** ou **ARN** et contiennent les bases A, G, C et U^[17]. Ceux basés sur le *déoxyribose* (dans lequel l'hydroxyle en position 2' du cycle carbone du ribose est remplacé par un hydrogène) sont appelés **acides déoxyribonucléiques** ou **ADN** et contiennent les bases A, G, C et T (T est chimiquement identique au U de l'ARN, avec simplement l'addition d'un groupement méthyle sur le cycle pyrimidine). L'ARN se trouve en générale dans les cellules sous forme d'une seule chaîne de polynucléotides, mais l'ADN est presque toujours sous forme molécule double brin – la double hélice d'ADN composée de deux chaînes de polynucléotides antiparallèles maintenues ensembles par des liaisons hydrogène entre les bases des deux chaînes^[15].

La séquence linéaire des nucléotides de l'ADN ou de l'ARN code pour l'information génétique de la cellule. La capacité des bases des différents acides nucléiques de se reconnaître et de s'apparier l'une avec l'autre par des liaisons hydrogène (appelée appariement de bases) – G avec C et A avec soit U soit T – est à la base de toute l'hérédité et de l'évolution.

b) Le brin d'acide nucléique est un polymère linéaire :

L'ADN et l'ARN sont constitués tous deux de seulement quatre nucléotides différents^[14]. Les nucléotides utilisés pour la synthèse de l'ADN et de l'ARN contiennent cinq bases différentes. Les bases adénine (A) et guanine (G) comportant une paire de noyaux couplés; les bases cytosine (C), thymine (T) et uracile (U) à un seul cycle. L'ADN et l'ARN ont trois de ces bases en commun : A, G, et C. T cependant n'est présente que dans l'ADN et U seulement dans l'ARN. (Ces abréviations à une lettre pour les bases sont couramment utilisées pour désigner tous les nucléotides constituant les polymères d'acides nucléiques).

Un brin d'acide nucléique possède un *squelette* constitué d'unités pentose phosphate répétées, à partir desquelles les bases puriques et pyrimidiques s'étendent, sous la forme de

groupements latéraux. Tout comme un polypeptide, un brin d'acide nucléique possède une orientation chimique : l'extrémité 5' présente un groupement hydroxyle ou phosphate sur le carbone 5' de son dernier sucre. L'extrémité 3' quant à elle possède habituellement un groupement hydroxyle au niveau du carbone 3' de son dernier sucre (schéma 4) ^[16].

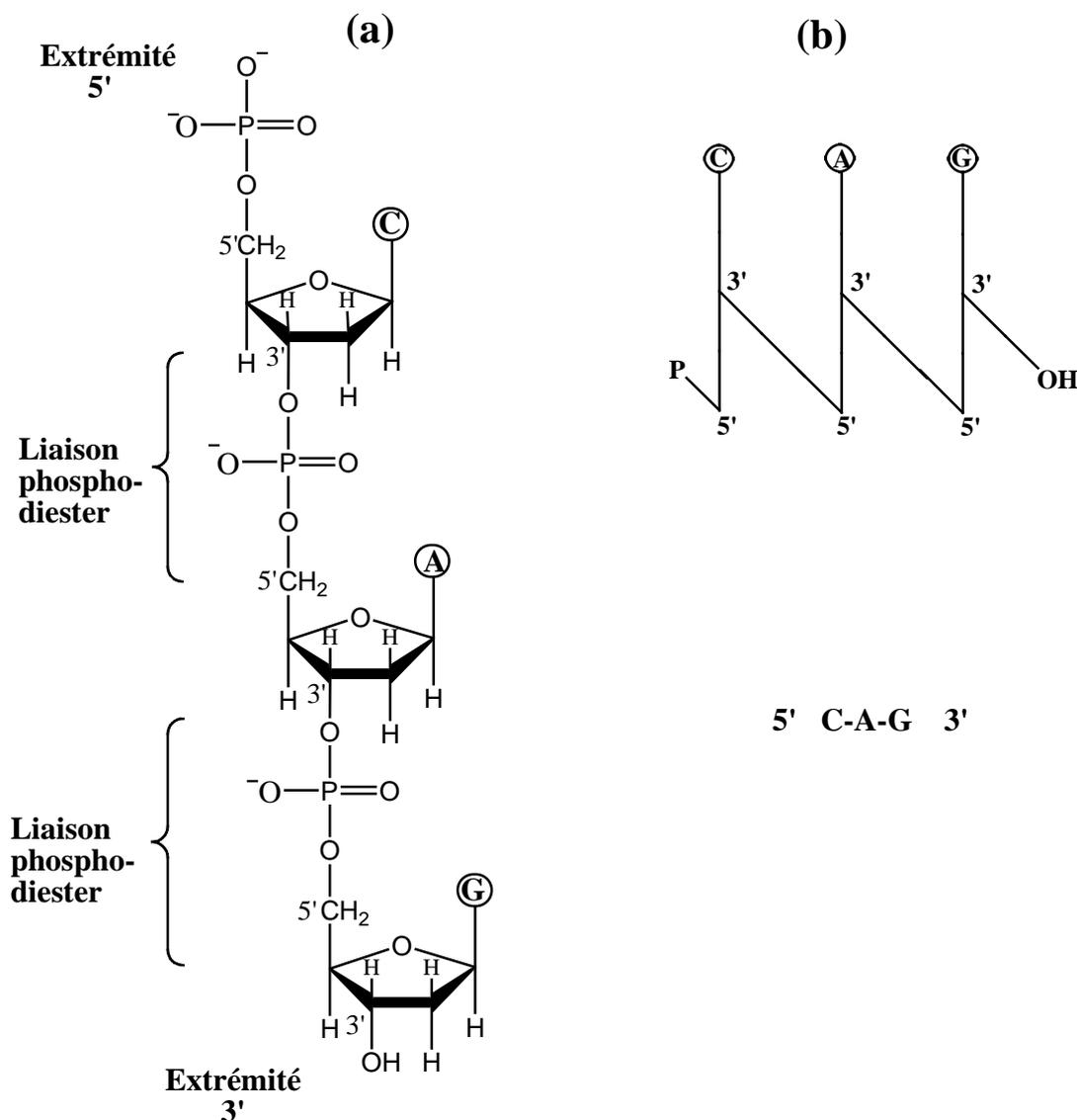


Schéma 4. Les représentations alternatives d'un brin d'acide nucléique illustrant son orientation chimique.

Cette orientation, ajoutée au déroulement de la synthèse dans le sens 5' vers 3', fait que par convention les séquences polynucléotidiques sont écrites et lues dans le sens $5' \rightarrow 3'$ (de gauche à droite).

Par exemple, la séquence AUG est supposée être (5') AUG (3'). L'orientation $5' \rightarrow 3'$ d'un brin d'acide nucléique est une propriété importante de la molécule ^[15].

La liaison chimique entre des nucléotides adjacents, couramment appelée **liaison phosphodiester**, est composée en réalité de deux liaisons phosphoester, l'une du côté 5' du phosphate et l'autre du côté 3' du sucre^[10].

La séquence linéaire de nucléotides associés par des liaisons phosphodiester constitue la structure primaire des acides nucléiques. Comme les polypeptides, les polynucléotides peuvent s'enrouler et se plier en conformations tridimensionnelles, stabilisées par des liaisons non covalentes. Bien que la structure primaire des ADN et des ARN soit généralement similaire, leurs conformations tridimensionnelles sont très différentes. Ces différences structurales sont essentielles pour que ces deux types d'acides nucléiques remplissent leurs fonctions spécifiques^[14].

II) Mécanismes de la transcription :

1. Réaction enzymatique de la synthèse d'ARN :

La synthèse d'ARN résulte d'une polycondensation de ribonucléotides monophosphates^[12]. Les caractéristiques de cette synthèse sont les suivantes :

- C'est une réaction enzymatique catalysée par une ARN polymérase ;
- La synthèse d'ARN débute par la condensation de deux ribonucléosides monophosphates contrairement à la synthèse d'ADN qui nécessite une amorce. L'un des ribonucléosides constituera (sous forme triphosphate) le premier nucléotide à l'extrémité 5' de la molécule, tandis que l'autre sera incorporé sous forme monophosphate^[16];
- L'élongation se produit toujours à l'extrémité 3' OH de la molécule ;
- La condensation se fait à partir d'un substrat activé (un des quatre ribonucléotides triphosphates ATP, UTP, GTP, CTP). L'hydrolyse des deux dernières liaisons phosphoanhydrides riches en énergie (42 KJ/mole) fournit l'énergie nécessaire à la condensation ;
- Après libération de deux phosphates, le nucléoside monophosphate restant formera une liaison ester entre une fonction acide de son phosphate et la fonction alcool (OH) libre du carbone 3' du dernier nucléotide de la chaîne. Par définition, cette réaction de condensation s'accompagne de la libération d'une molécule d'eau. Le résultat est l'incorporation d'un nouveau ribonucléoside monophosphate qui sera uni au précédent par l'intermédiaire d'un pont phospho-diester^[17].

La réaction inverse est une réaction d'hydrolyse de la liaison ester qui aboutit à la libération du dernier nucléotide et d'une molécule d'eau, ce qui libère le carbone 3' du nucléotide précédent (schéma 5).

La vitesse globale d'incorporation des nucléotides dans l'ARN est environ vingt fois supérieure à la vitesse d'incorporation de ces derniers dans l'ADN.

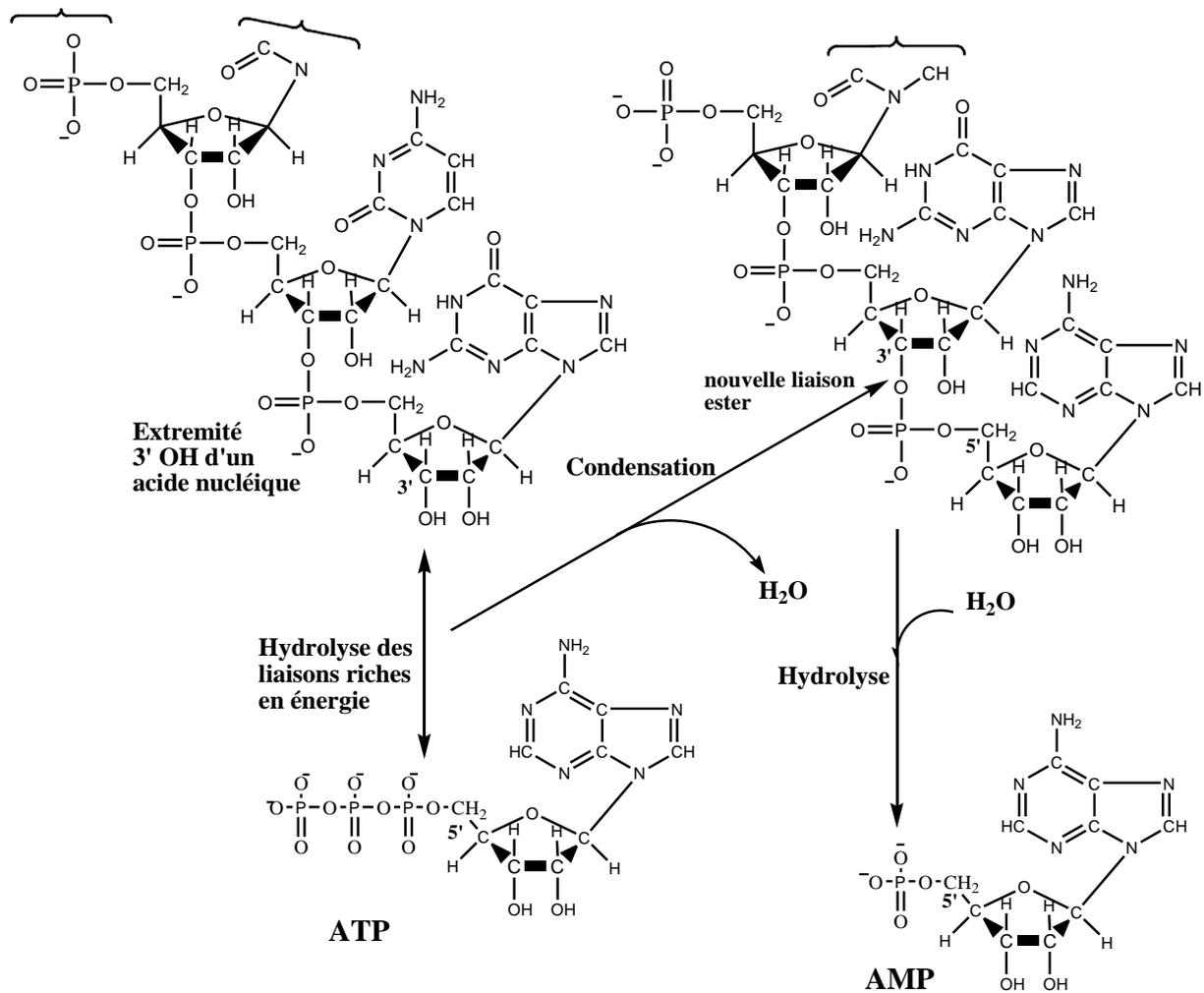


Schéma 5. Réactions catalytiques de synthèse et d'hydrolyse de l'ARN.

L'expression génique aboutit à la synthèse, dans les cellules, d'ARN et de protéines, dont la structure primaire est déterminée par celle de l'ADN. L'expression d'un gène fait appel à l'une et/ou l'autre des deux étapes suivantes ^[12]:

- La structure primaire de l'ADN dirige la synthèse d'ARN dont la structure primaire reproduit celle de l'ADN. C'est la transcription. La synthèse de l'ARN se fait dans le sens 5' → 3' ;

- La structure de certains transcrits appelés ARN messagers (ARNm) dirige la synthèse de protéines dont la structure primaire reproduit par une séquence d'acides aminés l'information contenue dans la structure primaire de l'ADN. C'est la traduction (qui ne concerne que les gènes codant des protéines). Au cours de cette étape, l'ARNm sera traduit grâce aux ARNt qui reconnaissent les codons (triplet de nucléotides) grâce à une séquence complémentaire et qui portent l'acide aminé correspondant. La lecture de l'ARN au cours de la traduction se fait dans le sens 5' → 3' tandis que la synthèse de la protéine se fait de l'extrémité NH₂ terminale vers l'extrémité COOH terminale ^[14]. Chez les procaryotes, la transcription et la traduction ont lieu dans le même compartiment cellulaire, alors que chez les eucaryotes, elles ont lieu dans deux compartiments séparés, noyau et cytoplasme.

2. Synthèse d'ARN par l'ARN polymérase II :

L'ARN polymérase II est l'enzyme de la transcription des gènes codant des protéines ^[12]. Elle est inhibée spécifiquement par un poison extrait de l'amanite phalloïde, l' α -amanitine. Elle est présente dans tous les noyaux cellulaires. Sa masse moléculaire est de 500 000 daltons pour dix sous-unités ^[16].

La transcription qu'elle catalyse nécessite une matrice d'ADN constituée par le brin antisens, des ribonucléotides triphosphates servant de substrats (ATP, CTP, GTP et UTP), plusieurs cofacteurs protéiques (facteurs de transcription TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH, TFIIJ) et l'ion Mg²⁺. L'ARN synthétisé est le transcrit primaire ou ARNhn.

• Incorporation des nucléotides :

Chaque nucléoside triphosphate est sélectionné en fonction de sa complémentarité avec la base du brin ADN matriciel. La liaison riche en énergie entre le premier phosphate (estérifiant le carbone 5' du ribose et les deux autres phosphates sont hydrolysés, libérant un pyrophosphate qui sera hydrolysé ensuite par un pyrophosphatase.

Le phosphate restant est lié par une liaison ester au carbone 3' libre du dernier nucléotide du transcrit en cours de synthèse.

L'ARN polymérase construit un ARN hybridé avec le brin antisens de l'ADN, dont la séquence primaire est la copie du brin sens mais composée de ribonucléotides au lieu des désoxyribonucléotides et d'uracile à la place des thymine (schéma 6) ^[12].

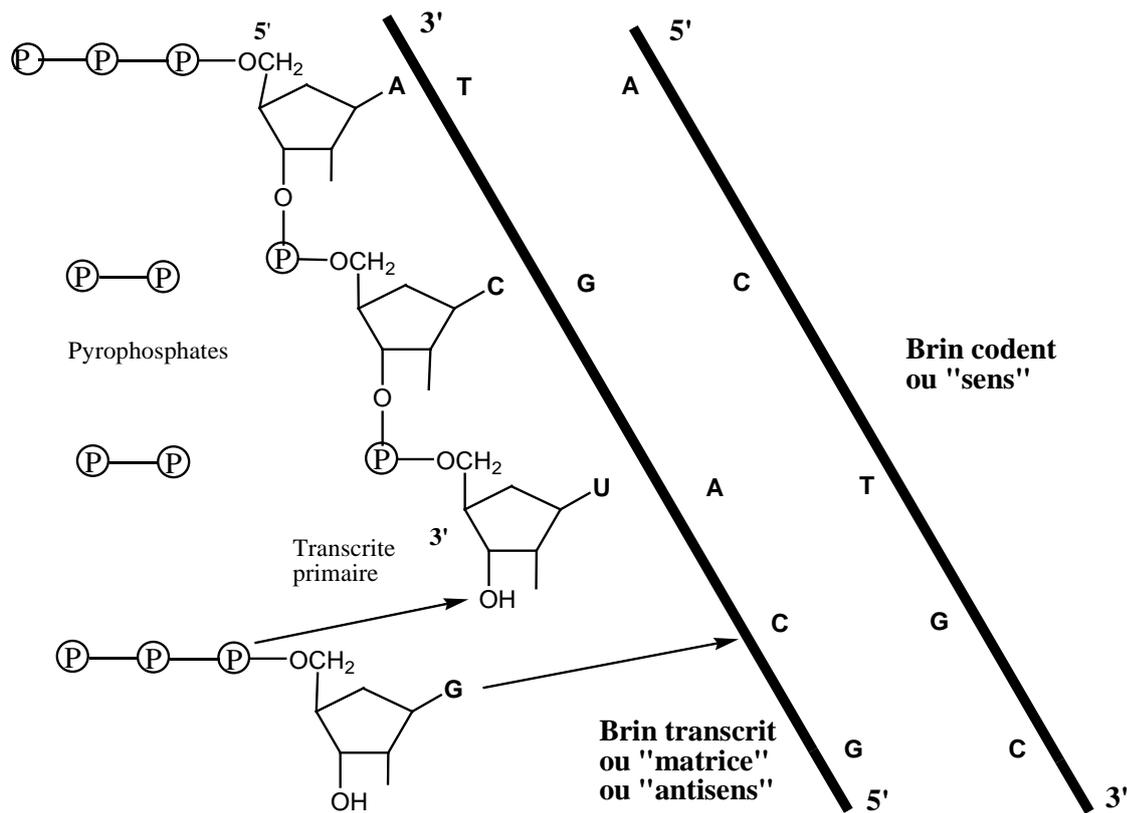


Schéma 6. Incorporation des nucléotides au cours de la transcription.

3. Les ARN synthétisés subissent différentes modifications :

Au cours de leur synthèse, les ARNm sont modifiés de façon covalente à leurs extrémités 5' et 3' ce qui les distingue des autres ARN.

a) Enzyme Coiffante :

Lorsque l'élongation du transcrit primaire commence, l'extrémité COOH terminale de la polymérase est phosphorylée^[12]. Cette phosphorylation entraîne la libération des protéines du complexe d'initiation. La première modification a lieu lorsque l'ARN en cours de synthèse mesure environ trente nucléotides de long^[16]. Cette modification porte sur l'extrémité qui exerce trois activités (schéma 7) :

- L'hydrolyse du phosphate γ du nucléotide 5' terminal du transcrit primaire ;
- Le transfert sur le phosphate β restant d'un guanylate à partir d'un GTP ;
- La méthylation de ce guanylate sur l'azote 7, avec pour cofacteur la S-adenosylméthionine qui est transformée en S-adenosylhomocystéine.

Les deux premières activités sont catalysées par une protéine de 68 kDa et la méthylation par une autre sous-unité de 57 kDa.

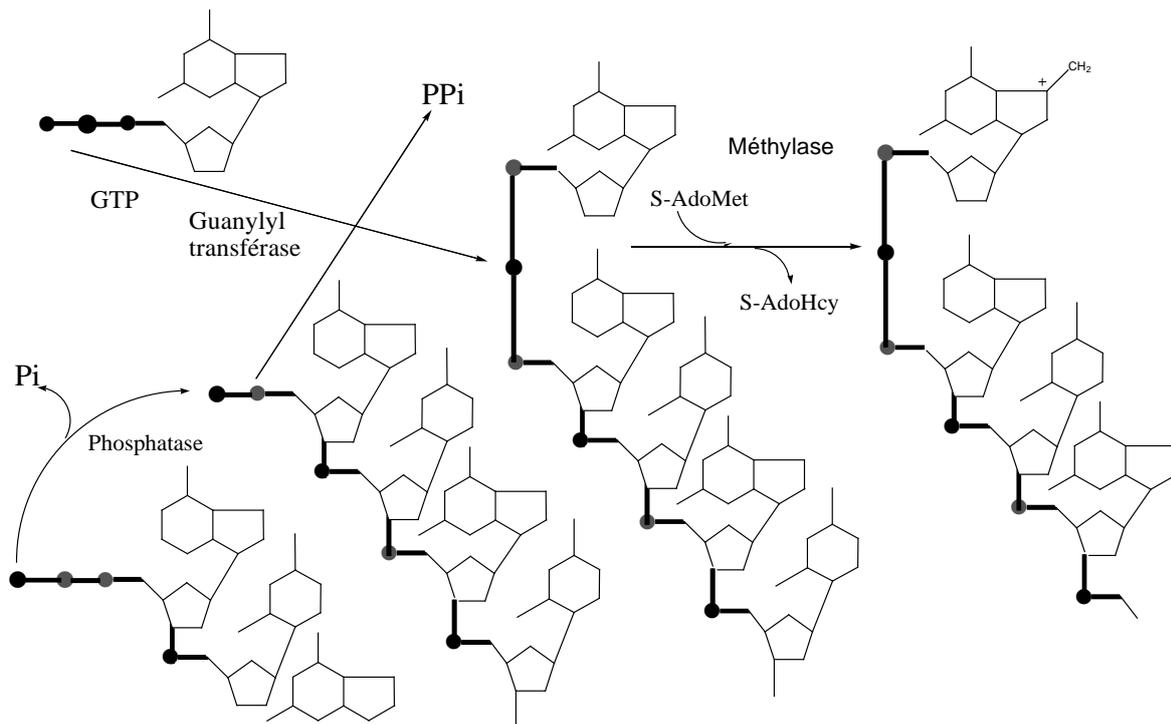


Schéma 7 : Enzyme coiffante des ARN synthétisés par l'ARN polymérase II.

b) Coiffe 7-méthylguanosine triphosphate (Me-G-ppp-5'):

Les ARNm sont exposés à des ribonucléotides dans le cytoplasme. Leur hydrolyse libère des nucléotides qui seront réutilisés pour la synthèse de nouveaux ARN^[12]. La coiffe (cap) des ARNm protège les ARNm d'exonucléases et de phosphatases en dissimulant leur extrémité 5' terminale (schéma 8). Elle joue également un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction.

La coiffe est constituée au minimum d'un GMP sur le deuxième phosphate β) du nucléotide situé à l'extrémité 5' du transcrit. Ce GMP est méthylé sur son azote 7. Si le nucléotide initial comprend une adénine celle-ci peut être méthylée sur la fonction amine^[16]. Les riboses des nucléotides initiaux sont quelquefois méthylés sur l'oxygène de la fonction alcool en 2'.

La coiffe Me-G-ppp-5' est caractéristique de tous les ARNm et de leurs précurseurs.

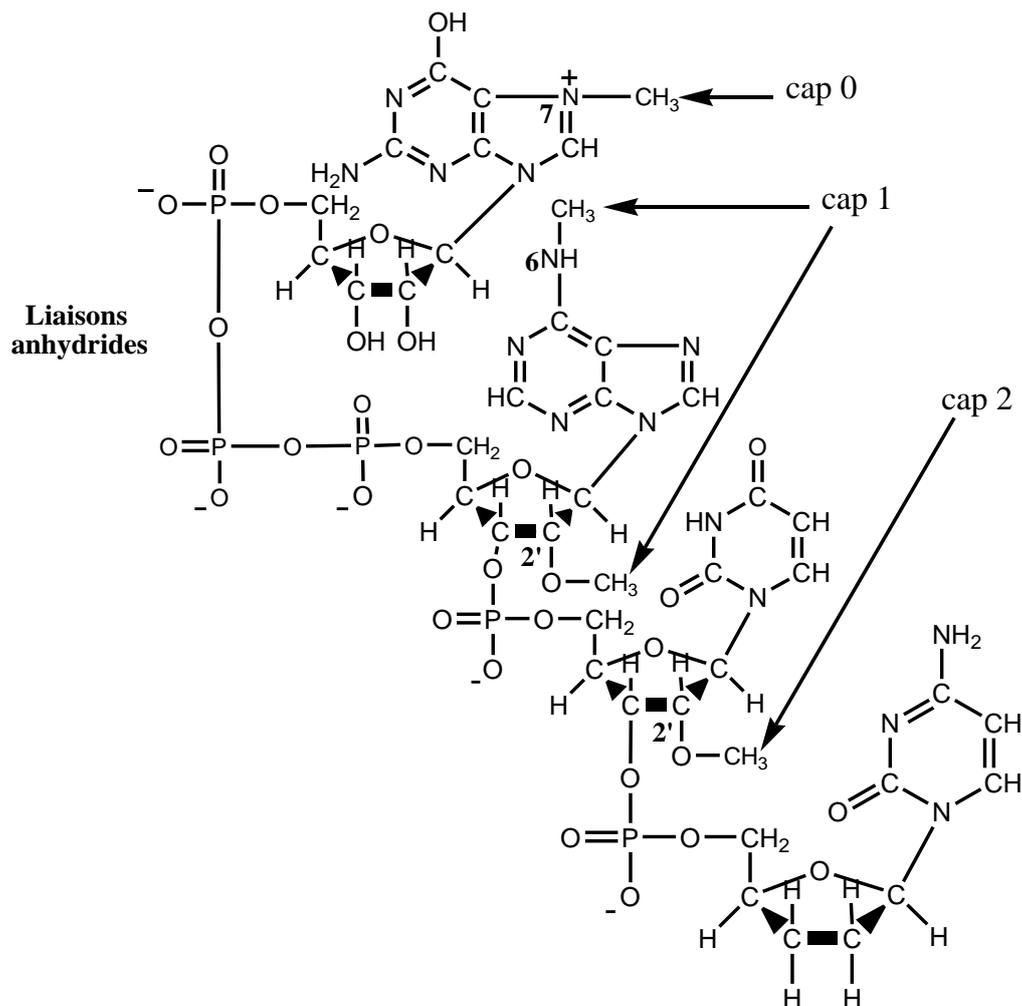


Schéma 8. Coiffe 7-méthylguanosine triphosphate Me-G-ppp-5' des ARNm.

c) La modification des ARN de façon covalente :

La plupart des ARN des eucaryotes étaient modifiés de façon covalente avant de pouvoir sortir du noyau et les ARNt ne font pas exception^[14]. Les ARNt eucaryotes sont synthétisés par l'ARN polymérase III. Les ARNt eucaryotes et bactériens sont typiquement synthétisés sous forme d'un gros précurseur d'ARNt puis sont coupés pour produire des ARNt matures. En plus, certains précurseurs d'ARNt (eucaryotes ou bactériens) contiennent des introns qui doivent être épissés^[11].

Cette réaction d'épissage est chimiquement différente de celle du pré-ARNm; au lieu de former un lasso intermédiaire, l'épissage de l'ARNt se produit par un mécanisme de coupure-collage catalysé par protéines (Figure 10). La coupure et l'épissage nécessitent un repliement correct du précurseur d'ARNt en sa configuration en fleur de trèfle.



Figure 10. Structure d'une endonucléase d'épissage de l'ARNt.

Comme les précurseurs d'ARNt mal repliés ne subissent pas de maturation correcte, on pense que les réactions de coupure et d'épissage agissent comme des étapes de contrôle de qualité de la formation des ARNt.

Tous les ARNt sont également soumis à divers modifications chimiques presque un nucléotide sur 10 de chaque ARNt mature est une version modifiée du ribonucléotide standard U, G, A, ou C^[14]. On connaît plus de 50 types de modifications de l'ARNt quelques-unes sont montrées dans la figure 11.

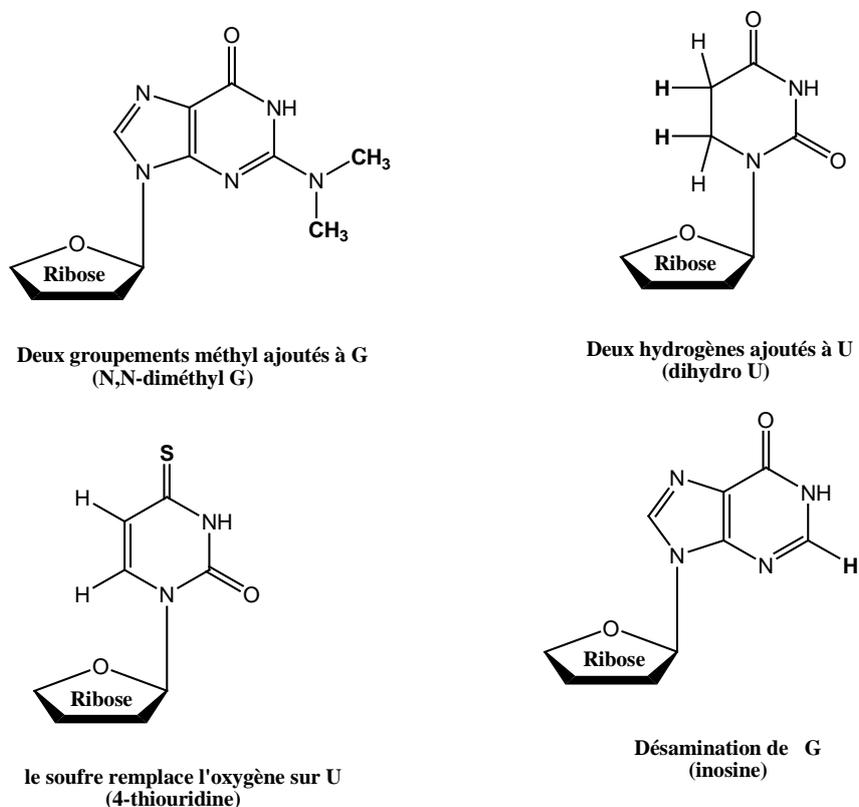


Figure 11. Quelques nucléotides inhabituels placés dans les molécules d'ARNt.

Certains nucléotides modifiés – en particulier l'inosine, produit par la déamination de la guanosine – modifient la conformation et l'appariement de bases de l'anticodon et facilitent ainsi la reconnaissance, par la molécule d'ARNt, du codon approprié sur l'ARNm. D'autres modifient la précision avec laquelle l'ARNt se fixe sur le bon acide aminé.

4. Synthèse des ARN ribosomiques :

Les ARN ribosomiques (ARNr) sont transcrits à partir de groupes de gènes identiques disposés en tandem^[12]. Alors que de très nombreuses molécules de protéines peuvent être synthétisées à partir d'un seul gène, il n'y a pas d'étape d'amplification pour la synthèse des ARNr. De grandes quantités d'ARN ribosomiques peuvent être produites grâce aux multiples copies des gènes codant ces ARN. La transcription continue de ces copies multiples de gènes assure une provision adéquate de molécules d'ARN qui sont immédiatement assemblées avec les protéines ribosomales pour former les ribosomes. Cet arrangement moléculaire a lieu dans le noyau, à l'intérieur d'une grande structure distincte appelée le nucléole, appareil de production des ribosomes, qui se forme autour des gènes des ARNr disposés en tandem, et provenant de plusieurs chromosomes^[10].

L'ARN polymérase I synthétise un transcrit primaire de 13000 nucléotides (nt), et l'ARN polymérase III synthétise le petit ARNr 5S de 120 nt.

La maturation du transcrit primaire précurseur des ARNr se fait par excision de trois fragments : l'ARNr 28S de 4518 nt, le 18S de 1874 nt et le 5.8 S de 160 nt. Presque la moitié de la séquence nucléotidique du transcrit primaire est dégradée dans le noyau

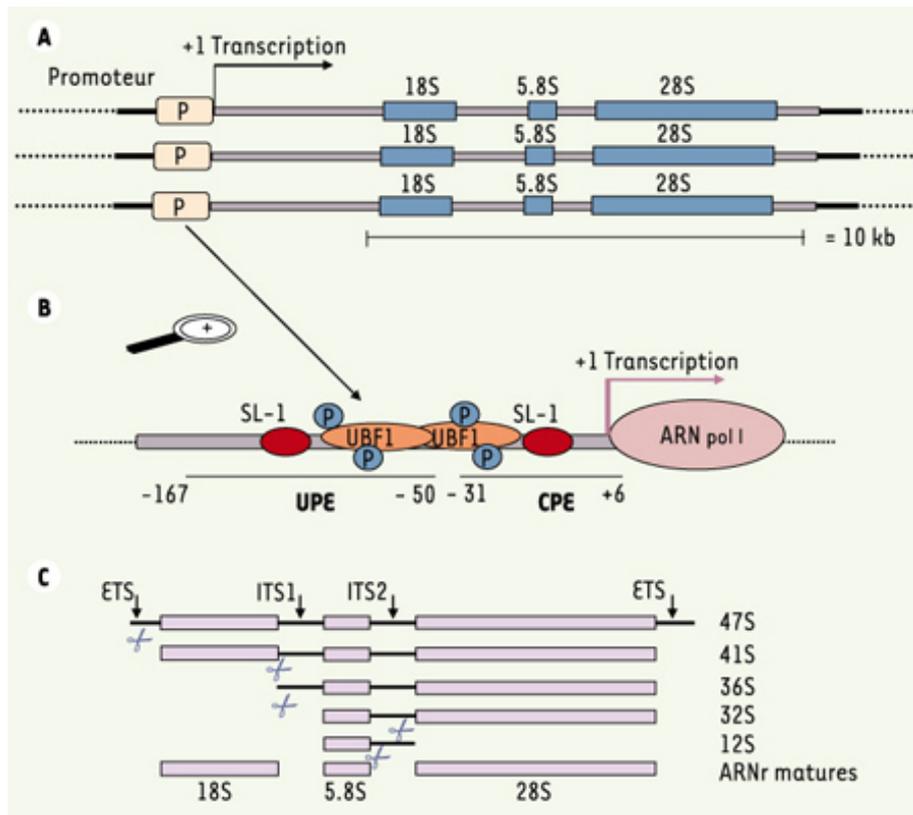


Schéma 9. Synthèse des ARNr.

Les ARNr 28 S, 5.8 S et 5S vont s'associer aux cinquante protéines pour former la grande sous-particule. L'ARNr 18S formera la petite sous-particule avec trente-trois protéines ^[12].

5. les modifications du code génétique :

a) le code génétique mitochondrial :

Le code génétique utilisé dans les mitochondries d'animaux et de champignons diffère du code standard utilisé dans tous les gènes nucléaires procaryotes et eucaryotes. Le code génétique diffère même dans les mitochondries d'espèces distinctes (Tableau 3).

On ignore pourquoi et comment ces différences sont apparues au cours de l'évolution. UGA par exemple, est normalement un codon stop mais il est lu comme un codon tryptophane par les systèmes de traduction de l'homme et des champignons ^[15]. En revanche, dans les mitochondries de plantes, UGA reste reconnue comme un codon stop. AGA et AGG, les codons nucléaires standard de l'arginine, codent également l'arginine dans les ADNmt de champignons et de plantes mais des codons stop dans l'ADNmt de mammifères et des codons sérine dans l'ADNmt de drosophile ^[14].

Tableau 3. Les modifications du code génétique standard dans les mitochondries

	Code standard	Mitochondries				
Codon	Protéines codées par l'ADN nucléaire	Mammifères	Drosophile	Neurospora	Levures	Plantes
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp	Trp	Stop
AGA,AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Ile	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Met	Ile
CUU, CUC CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

Comme le montre le tableau 3. Les mitochondries des plantes semblent utiliser le code génétique standard. Néanmoins, des comparaisons des séquences d'acides aminés des protéines mitochondriales de végétaux avec les séquences nucléotidiques des ADNmt de plantes suggèrent que CGG pourrait coder *soit* l'arginine (l'acide aminé «standard») soit le tryptophane. Cette non spécificité apparente du code mitochondrial des plantes s'explique par l'édition des transcrits mitochondriale d'ARN, qui peut convertir les résidus cytosine en résidus uracile. Si une séquence CGG est éditée en UGG, le codon spécifique le tryptophane, l'acide aminé standard pour UGG, alors que les codons CGG non édités codent l'arginine standard. Le système de traduction dans les mitochondries végétales utilise donc le code génétique standard^[15].

b) les mutations dans l'ADN mitochondrial :

La gravité d'une maladie provoquée par une mutation dans l'ADNmt mutant de type sauvage présents dans un type cellulaire particulier. En général, lorsque l'on trouve des mutations dans l'ADNmt, les cellules contiennent un mélange des ADNmt mutant et de type sauvage — un état appelé *hétéroplasmie*^[10]. À chaque fois qu'une cellule somatique ou germinale se divise, les ADNmt mutant et de type sauvage se répartissent au hasard entre les cellules filles, comme dans les cellules de levure. De ce fait, le génotype de l'ADNmt, qui fluctue d'une génération et d'une division cellulaire à l'autre, peut dériver vers des ADNmt essentiellement mutants ou sauvages. Puisque toutes les enzymes de la réplication et de la croissance des mitochondries telles que les ADN et ARN polymérases sont importées à partir du cytosol, un ADNmt mutant ne devrait pas constituer un «inconvenient pour la réplication». Les mutants

qui présentent de grandes délétions de leur ADNmt possèdent même peut-être un avantage pour la réplication car ils sont capables de se répliquer plus rapidement^[14].

Toutes les cellules possèdent des mitochondries. Pourtant, les mutations dans l'ADNmt affectent uniquement certains tissus. Ceux qui sont en général le plus touchés sont les tissus qui ont le plus besoin de l'ATP produit par phosphorylation oxydative et les tissus qui nécessitent la majorité ou la totalité des ADNmt de la cellule pour synthétiser des quantités suffisantes de protéines mitochondriales fonctionnelles^[14].

c) La réparation des lésions de l'ADN :

Il existe de multiples voies métaboliques de réparation de l'ADN qui utilisent différentes enzymes agissant sur différentes sortes de lésions. Deux voies métaboliques les plus utilisées diffèrent dans la façon de retirer la lésion de l'ADN.

La première voie métabolique, ou **réparation par excision d'une base**, implique une batterie d'enzymes appelées ADN *glycosylases*, dont chacune reconnaît un type spécifique de base alternée dans l'ADN et catalyse son retrait par hydrolyse^[10]. Il existe au moins six types d'enzymes, y compris celle qui retirent les C désaminées, les A désaminées, les différents types de bases alkylées ou oxydées, les bases à cycles ouverts et les bases dans lesquelles la double liaison carbone-carbone a été accidentellement transformée en liaison simple carbone-carbone^[11].

La deuxième voie métabolique de réparation majeure est appelée **réparation par excision de nucléotides**. Ce mécanisme peut réparer les dommages causés par presque toutes les modifications assez importantes de la structure de la double hélice d'ADN. Ces lésions «volumineuses» incluent celles engendrées par la réaction covalente des bases d'ADN avec de gros hydrocarbures (comme le benzopyrène, un carcinogène), ainsi que les divers dimères pyrimidiques (T-T, C-C et T-C) provoqués par la lumière solaire. Dans cette voie métabolique, un grand complexe multi - enzymatique examine l'ADN pour base spécifique. Dès qu'une lésion volumineuse a été trouvée, le squelette phosphodiester du brin anormal est coupé des deux côtés de la distorsion et l'oligonucléotide contenant la lésion est retiré de la double hélice d'ADN par une ADN hélicase. Le gros trou produit dans l'hélice d'ADN est ensuite réparé par une ADN polymérase et une ADN ligase (schéma 10)^[15].

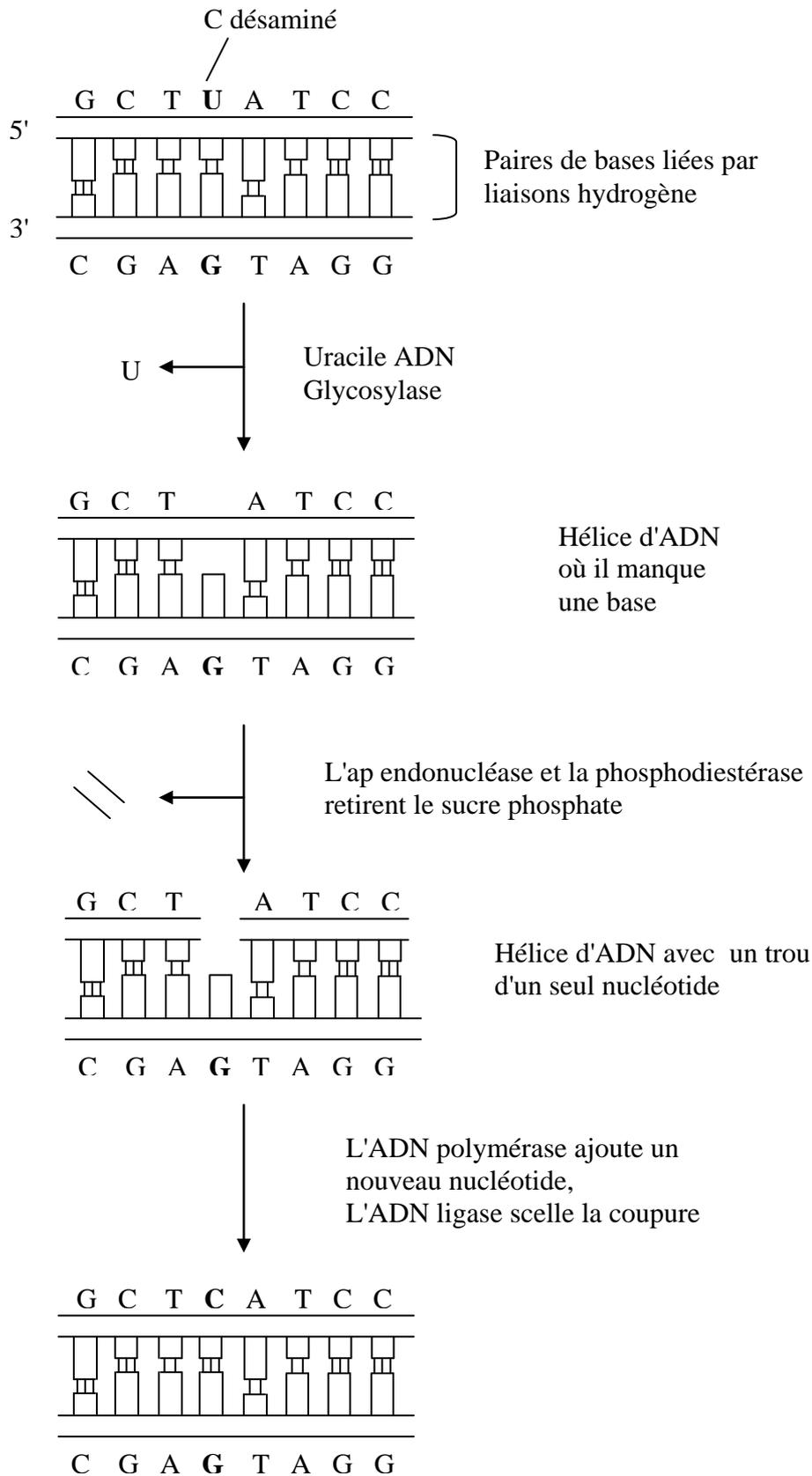


Schéma 10. (a) Réparation par excision d'une base.

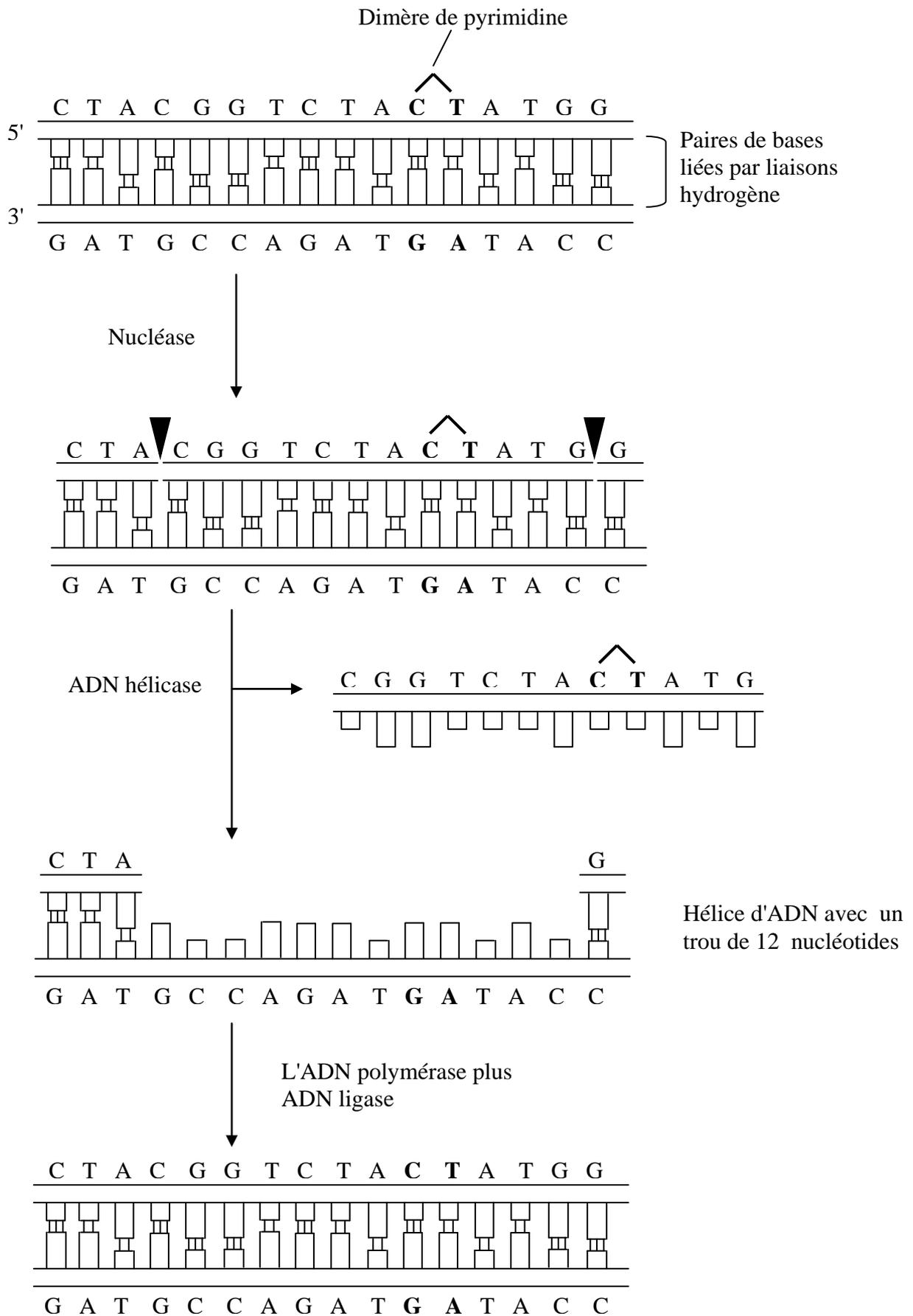


Schéma 10. (b) Réparation par excision de nucléotides.

Chapitre 2

Synthèse des nucléosides

I. La synthèse chimique des nucléosides :

I. 1. Historique :

Dans les dernières années, la rentrée des nouvelles méthodologies dans la chimie du nucléotide a simplifié formidablement la synthèse des oligonucléotides ^[18]. La phase moderne de la synthèse chimique des résidus de l'oligonucléotide principalement sur le développement des types de condenser des coefficients ^[19] et protéger des groupements ^[20] et appliquer la purification rapide et les procédures de la séparation ^[21].

La synthèse chimique des oligonucléotides a commencé en 1955 quand A. M. Michelson et A. R. Tood ont préparé le premier monophosphate du dinucléoside ^[1]. Ils ont utilisé la méthode du triester soi-disant de montrer que les oligonucléotides de série définie peuvent être préparés par des méthodes purement chimiques. En 1956 Khorana et coll. ont synthétisé le même nucléotide par la méthode du diester avec succès ^[2]. Ce processus a dominé la synthèse de l'oligonucléotide jusqu'aux le mi-1970s, et a été utilisé par Khorana et Coworkers pour la première synthèse totale d'un gène (ARNt alanine - spécifique de levure) ^[3]. L'importance des oligonucléotides synthétique a été généralement sous-estimée parce que la synthèse généralement était prenante et chère. C'était le progrès dans le génie génétique qui a résulté en un développement formidable dans la demande pour les oligonucléotides synthétisé qui, a mené au développement de nouveaux concepts de la synthèse et à l'automatisation d'ADN et la synthèse d'ARN.

I. 2. La stratégie de la synthèse :

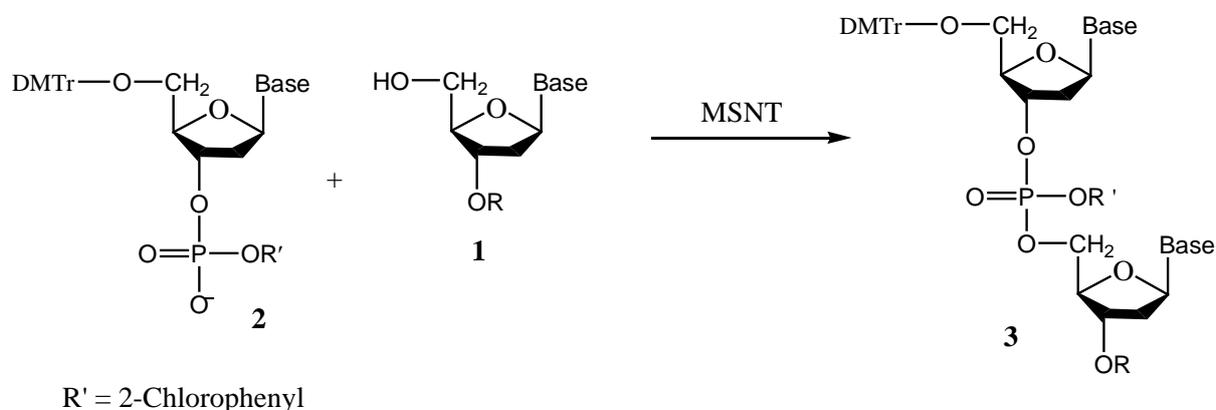
La synthèse chimique d'ADN consiste trois étapes :

- 1) La séparation synthétique des deux extrémités complémentaires.
- 2) L'hybridation des deux extrémités (formation des liaisons d'hydrogène entre l'A et le T, et entre le C et le G).
- 3) Lié enzymatiquement des molécules d'ADN pour donner de plus grandes unités d'ADN.

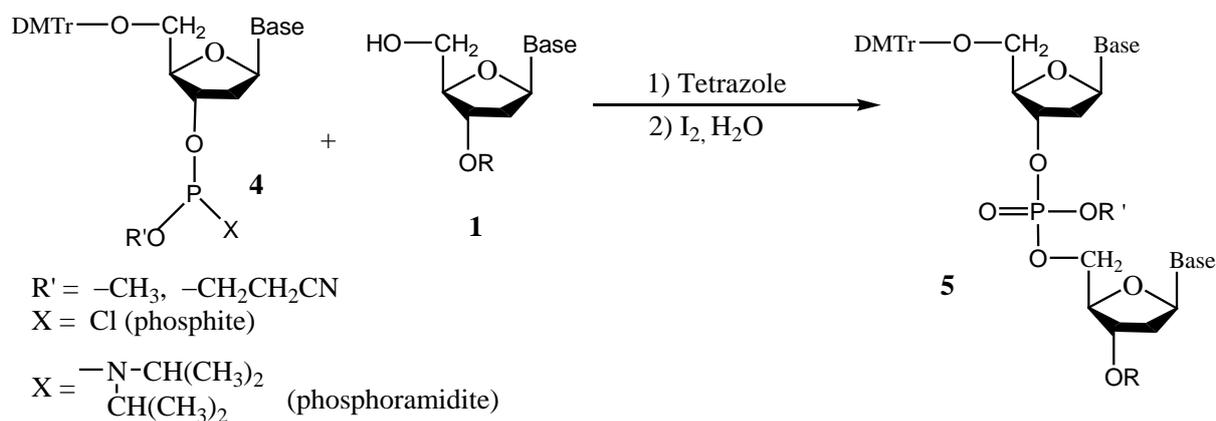
Les trois méthodes standard sont utilisées pour la synthèse des 3', 5'-internucléotide lié du phosphodiester. Ils sont différents dans le type de construction du monomère utilisé et connu comme le triester du phosphate, phosphoramidite (phosphite), et les méthodes de H-phosphonate (schéma 11).

Une oligomère peut être synthétisée par l'addition steppique de construction du monomère individuel ou en joignant l'oligomère déterminé (par exemple, dimères ou trimères).

La méthode du triester phosphate :



La méthode de Phosphoramidite (Phosphite) :



La méthode de H-phosphonate :

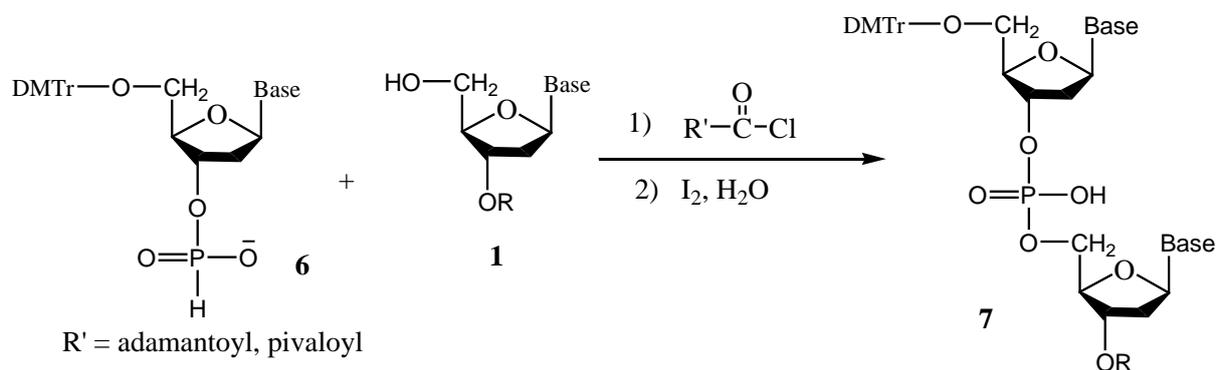


Schéma 11. Synthèse chimique d'oligodéoxynucléotides.

DMTr = 4,4'-diméthoxytrityl résidu ; MSNT = mésitylène sulfonylnitrotriazole;

R = le support du polymère.

Le concept précédent est employé dans la synthèse de la phase solide qui a été développée par R. Merrifield ^[22] presque simultanément pour les peptides et par R. L. Letsinger ^[23] pour les oligodéoxyribonucléotides. Le premier nucléoside (sucre et base) est lié de façon covalente à un support insoluble au groupement 3'-OH du sucre. Alors la synthèse steppe de la chaîne continue appropriée par la condensation des monomères du nucléoside. Comme les résidus du produit de la réaction ont immobilisé sur le support, il peut être libéré des autres réactifs en lavant facilement ; la purification chromatographique qui prend beaucoup de temps n'est pas exigée. La synthèse est emportée habituellement sur un échelle de 0.2 - 1 μ mol et tous les réactifs sont appliqués dans un grand excès. La synthèse de la phase solide des oligonucléotides peut être indiquée dans les étapes suivantes :

- 1) La préparation des unités du monomère qui sont protégées ou sont activées.
- 2) Le fonctionnement du support.
- 3) La synthèse de la série du nucléotide demandé par une des trois méthodes inscrites au-dessus.
- 4) Sectionné des groupes protecteurs et le support.
- 5) L'isolement et la purification de la série demandée.

I. 3. Les méthodes de synthèse :

Les trois méthodes principales de la synthèse d'oligonucléotide sont le triester du phosphate, le phosphoramidite (phosphite), et les méthodes H-phosphonate (schéma 11). La méthode du phosphoramidite est largement le plus utilisé (Schéma 12). Le cycle de la réaction appliqué :

- 1) Arraché le groupe DMTr de 5'-OH.
- 2) La condensation de la prochaine construction du monomère (allongement de la chaîne)
- 3) Protéger des groupements 5'-OH qui n'ont pas complètement réagi (couvrir).
- 4) Dans le phosphoramidite et le H-phosphonate traité, une étape d'oxydation supplémentaire est exigée après chaque étape de condensation ou à la fin de la synthèse pour obtenir le phosphodiester internucléotide respectivement désiré.

La chaîne d'allongement dans tous les processus se produit dans les directions



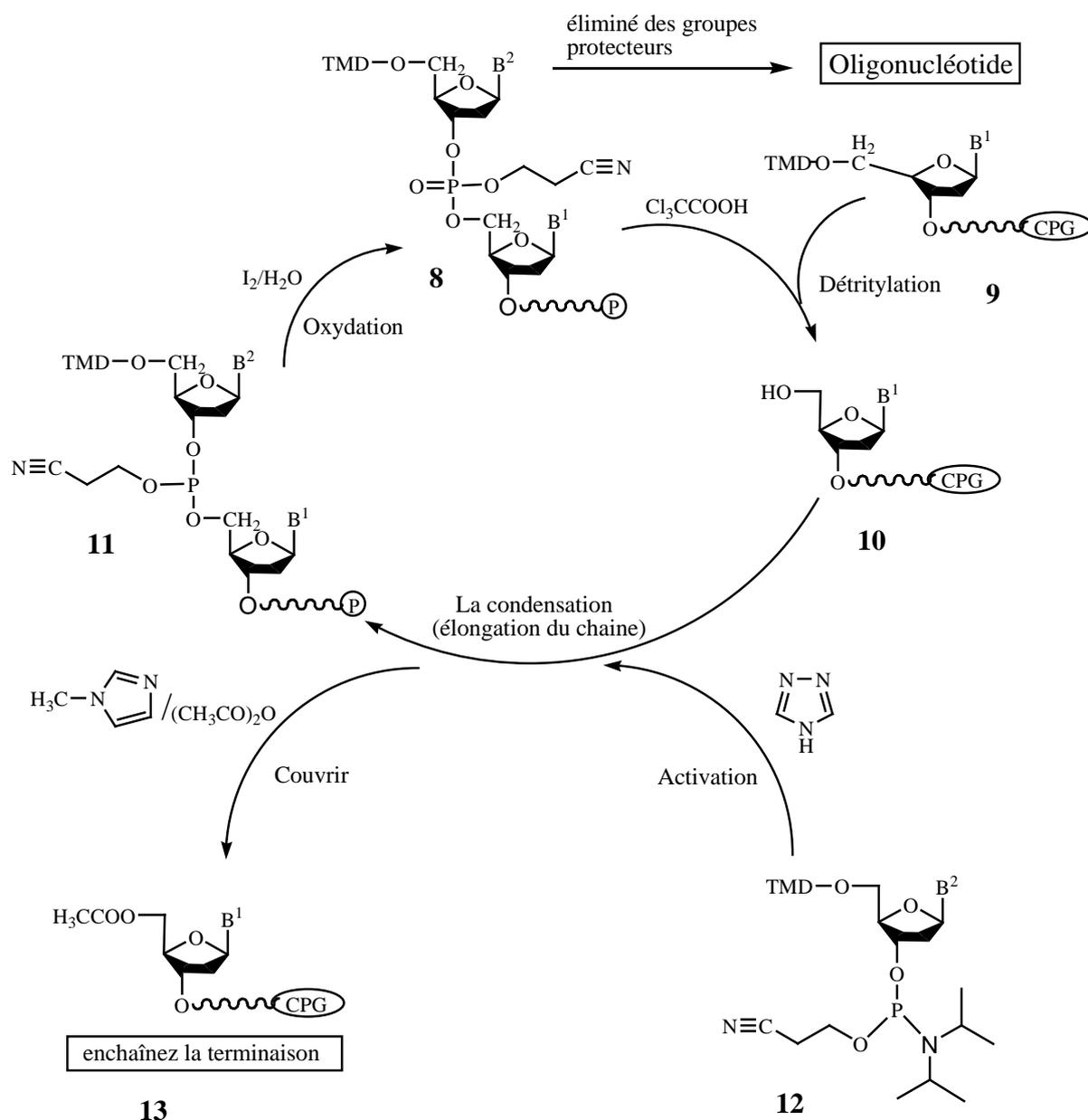


Schéma 12. Cycle de la synthèse d'après la méthode du phosphoramidite.

B = base; DMTr = 4,4'-diméthoxytrityle résidu.

I. 3. a) La méthode du triester phosphate :

Cette méthode a été utilisée pour synthétiser les oligonucléotides de construction convenables dans la solution ^[24-27]. Il peut être employé pour la synthèse de la phase solide de nucléotides jusqu'à obtenir une chaîne de longueur de 20 bases approximativement. La structure du monomère est un dérivé du phosphodiester du nucléoside protégé (Schéma 11) ^[26] qui réagit avec la terminaison 5'-libre d'un nucléoside du support – bonde pour donner un phosphotriester neutre. Plusieurs dérivés d'acides sulfonique aromatique ^[25, 28, 29], à l'origine 1-

(mesitylène-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (MSTN), servent comme des agents de condensation. La réaction peut être accélérée par des catalyseurs tels que le N-méthylimidazole^[30]. Cette méthode n'est pas utilisée largement pour tout plus long dû à des inconvénients tel que un grand durée de réaction, grand nombre des réactions latérales, et les coupures observées fréquemment ont causé par fractionnement incomplet pour l'internucléotide du groupe protecteur.

I. 3. b) La méthode de Phosphoramidite (Phosphite) :

Ce concept est semblable à la méthode du triester, mais la chaîne synthétisée implique l'intermédiaire du triester du phosphite trivalent. Actuellement, la structure du monomère préféré est les phosphoramidites du nucléoside soi-disant introduits par Caruthers et coll.^[31,32] Cela peut être activé avec le tétrazole. Après chaque étape de condensation, le triester du phosphite est converti au triester du phosphate par oxydation avec la solution d'iode. La haute réactivité exceptionnellement des résultats du phosphoramidites activés dans le temps de condensation de calcium est 1 min et ≥ 99 % de rendement par étape d'allongement de la chaîne.

I. 3. c) La méthode de H-phosphonate :

C'est la méthode de la synthèse la plus récente et presque simultanément a été développée par Garregg et coll.^[33] et par Froehler et Matteucci^[34]. La condensation est accomplie par l'activation de nucléoside 3'-phosphonate monomères hydrogéné avec le pivaloyle ou le chlorure d'adamantoyle. Comme la bonde de H-phosphonate n'est pas arrachée pendant le cycle de synthèse, seulement une étape d'oxydation est exigée à la fin de la réaction.

Cela considérablement réduit la durée du cycle. Un autre avantage pour la méthode du phosphoramidite est la plus haute stabilité des monomères. De plus, l'excès des H-phosphonates peut être régénéré après la synthèse, donc un coût de réduction ; cela devenir cette méthode particulièrement intéressante pour la synthèse à grande échelle. Comme que le dinucléoside d'une bonde H-phosphonate peut être attaquée facilement par les réactifs nucléophilique^[35], les thiophosphates de l'oligonucléotide ou l'analogue du phosphoramidate peuvent être préparés facilement par l'oxydation avec le soufre ou l'amine^[35,36].

I. 4. Synthèse des oligoribonucléotides :

La synthèse de la phase solide des oligoribonucléotides peut être conduite par le phosphoramidite^[37] ou la méthode du H-phosphonate^[38]. Un groupe protecteur supplémentaire est exigé pour le groupement 2'-OH du ribose^[28]. Le groupe du tert-butyl-diméthylsilyle a gagné la fixation pour synthétiser la phase solide avec les phosphoramidites du ribonucléoside. C'est stable sous les conditions exigées d'acidité pour

enlever le groupe DMTr et peut être l'arrachement avec le fluorure du tétrabutylammonium à la fin de la réaction. Cependant, la gêne stérique due aux résultats du groupe du tert-butylidiméthylsilyl avec un rendement de 95 % par étape d'allongement de la chaîne. D'où, cette méthode est convenable pour la synthèse des oligomères jusqu'à approximativement 40 nucléotides de longueur de la chaîne seulement.

II. Protection des nucléosides :

II. 1. Les groupes protecteurs :

La synthèse d'un oligonucléotide demande une protection de tous les centres réactifs, pour que la réaction de couplage ne se passe qu'à un site bien défini. Donc, le groupement protecteur doit avoir les caractéristiques qui suivent :

- 1- Relativement facile de l'introduire.
- 2- Stable sous les conditions de la réaction.
- 3- S'enlève quantitativement, soit à une étape de synthèse ou à la fin de la séquence, sans dégradation du composé final.
- 4- Sélective et donne un bon rendement du composé, facilement purifié par les techniques usuelles en chimie organique.

Et deux types de groupements peuvent être distingués : des groupements protecteurs permanents et intermédiaires.

Les groupements protecteurs permanents sont maintenus pendant la synthèse et reste attaché à la chaîne oligonucléotidique pendant toutes les étapes de synthèse et ne s'enlève qu'à la fin d'assemblage et qui protègent les fonctions aminées exocyclique de l'adénine, le cytosine, et le guanine ; le groupement OH de phosphore ; et le groupement 2'-OH de ribose (dans la synthèse d'ARN).

Les groupements protecteurs intermédiaires protègent le groupement de 5'-OH du sucre et permet de démasquer juste une fonction nécessaire avant un couplage et qui doit être enlevé rapidement et facilement, de façon répétitive, aux cours de l'assemblage.

Les groupements protecteurs les plus importants sont représentés dans la (figure 12). L'adénine et la cytosine sont converties habituellement à l'amide acide correspondant avec le chlorure du benzoyle en excès, l'amide de guanine est obtenu avec l'anhydride isobutyrique. Les groupements base - protecteur sont introduits avec une méthode développée par Ti et coll^[39]. À la fin de la synthèse, les groupements protecteurs sont enlevés avec 32 % d'ammoniaque liquide à 50-60° C dans 4-5 h.

Par la suite, en séquence le guanine - riches, la position O-6 de guanine peut être aussi protégé [40-43], habituellement avec un résidu de 4-nitrophényle [44].

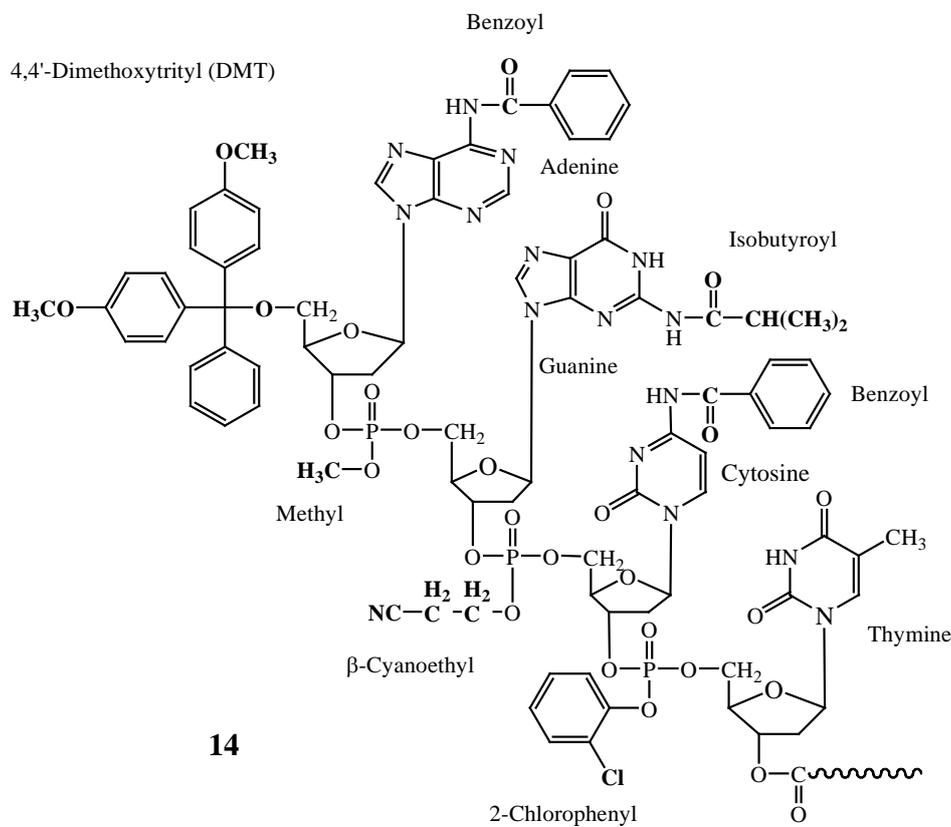


Figure 12. Les groupements protecteurs (caractère gras) utilisés dans la synthèse des oligonucléotides.

C'est particulièrement important pour atteindre des bons rendements dans le triester traiter parce qu'autrement la sulfonation avec l'agent de condensation se produit facilement.

L'amidine la plus labile ou les groupements d'acyle base - protecteur est d'intérêt pour la synthèse modifiée des oligonucléotides phosphate parce qu'ils sont plus sensibles à l'hydrolyse que leurs analogues du diester ; et le traitement avec l'ammoniaque à 60° C peuvent causer considérablement la rupture d'extrémité [45-47]. Les exemples importants de tels groupes sont le résidu de 4-phénoxyacétyle pour l'adénine et la guanine et le résidu d'isobutyroyle pour la cytosine.

Le résidu du tert-butyldiméthylsilyle est préféré comme un groupement protecteur pour le groupement 2'-OH de sucre dans la synthèse de la phase solide des oligoribonucléotides [37].

Le groupement 5'-OH de déoxyribose ou de ribose est habituellement bloqué avec le groupement 4,4'-diméthoxytrityle [48] qui peut être enlevé après chaque étape de couplage par

l'hydrolyse d'acide douce avec 3 % d'acide di- ou trichloroacétique dans le dichlorométhane [30].

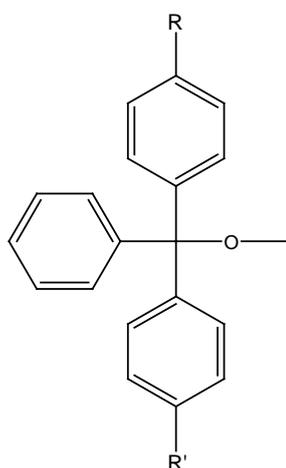
Dans la méthode du triester le groupement 2-chlorophényle est utilisé pour protéger le phosphore [19 f], tant que dans la méthode du phosphoramidite, le groupement β -cyanoéthyle est préféré au groupement du méthyle originellement usagé [31,32]. Le groupement β -cyanoéthyle peut être enlevé facilement à la fin de la synthèse par une β -élimination avec l'ammoniaque liquide [49]. Aucun groupement protecteur phosphorés internucléotide est exigé dans le processus H-phosphonate.

II. 2. Protection du sucre :

II. 2.a) La protection du 5'-OH :

La protection intermédiaire de l'hydroxyle primaire, est faite par un éther qui est acido-labile. Parmi les groupements les plus utilisés on a le chlorure de diméthoxy-4,4'-trityl (DMTr) (15c) [48,50] qui est introduit sélectivement sur l'alcool primaire à cause de son volume. On peut également utiliser d'autres groupements protecteurs avec un ordre d'enlèvement comme il suit :

DMTr (15c) > MMTr (15b) > Tr (15a) ou le phényle-9Xanthényl-9 (pixyl ou Px) (16) [51] (Figure 13).

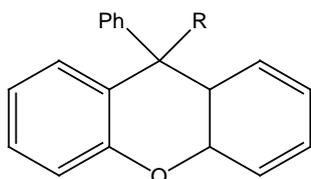


15 a : R = R' = H Triphénylméthyl (Trityl)

15 b : R = H, R' = OCH₃ *p*-Anisoyl diphénylméthyl (monométhoxytrityl, MMTr)

15 c : R = R' = OCH₃ di (*p*-Anisoyl)diphénylméthyl (diméthoxytrityl, DMTr)

le groupe 5'-O-triphényl et ces dérivés mono- et di-méthoxy



16 : a R = OH

b R = C

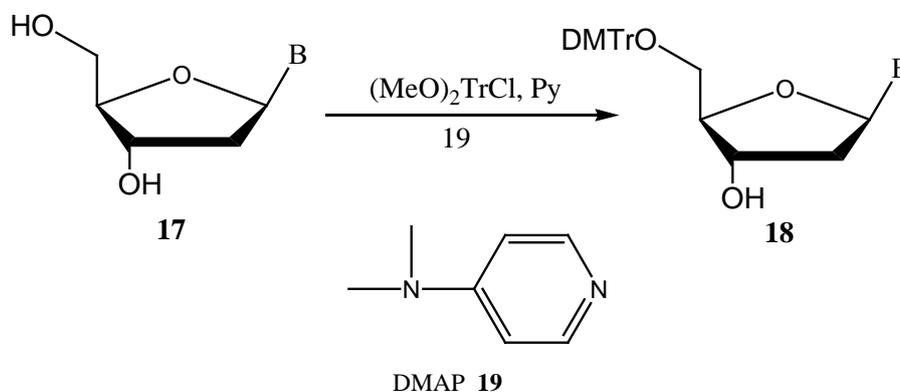
Le phényl-9-xanthényl-9

Figure 13.

Ces groupements, en plus de la protection de la position 5'-OH, donnent une lipophilie au nucléoside qui lui permet de se solubiliser dans les solvants organiques, et facilitant ainsi la rapidité de montage de la séquence et la purification sur colonne de silice.

La réaction de tritylation consiste à agiter le nucléoside de départ en présence de DMTrCl dans la pyridine avec ou sans activateur, la N,N-diméthylamino-4-pyridine (DMAP) à température ambiante (Figure 14).

Le 5'-DMTr nucléoside (**18**) est purifié par simple chromatographie sur colonne de silice avec du dichlorométhane enrichi en méthanol.

**Figure 14.**

En général le 5'-DMTr nucléoside (**18**) est instable en solution ou à la chaleur, mais il se conserve bien à sec, et précipite à partir d'une solution de dichlorométhane avec l'éther de pétrole.

La réaction de détritylation peut s'accompagner d'une réaction de dépurination, surtout dans le cas de la N-désoxy-2'adénosine qui est très sensible en milieu acide. Alors, deux acides ont été étudiés pour la détritylation :

Les acides protiques comme l'acide benzènesulfonique (BSA), l'acide dichloroacétique (DCA), le trichloroacétique et le trifluoroacétique (TFA).

Un acide non – protique, le bromure de zinc (ZnBr)^[52], ce dernier est montré comme un bon réactif de détritylation avec un très faible taux de dépurination, mais ce réactif ne s'est pas imposé dans la synthèse oligonucléotidique, car la vitesse de détritylation diminue avec la longueur de la chaîne.

Généralement les acides les plus utilisés reste le DCA, TCA et le TFA à 2-3 % dans différents solvants organiques ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH} \dots$) et dont ils donnent une déprotection complète dans quelques minutes ^[53,54].

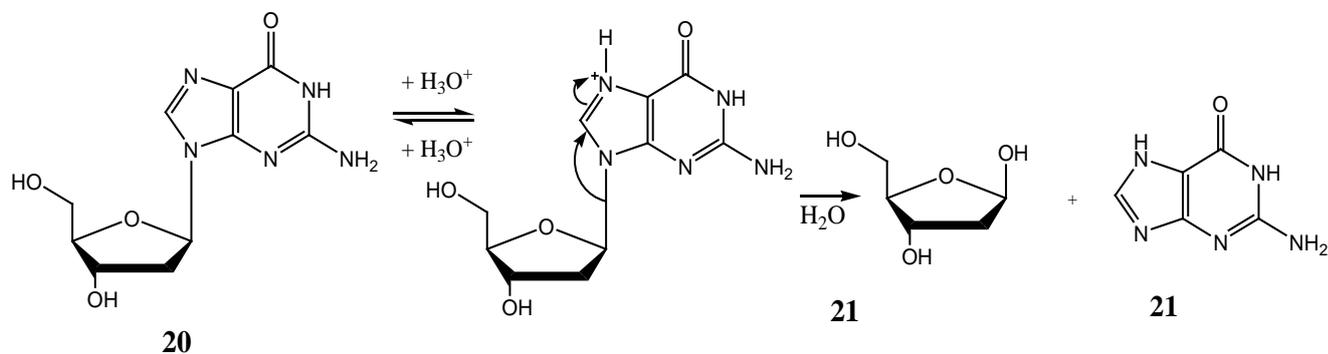


Schéma 13. (Dépurination)

Le Px (**16**) est utilisé surtout avec les dérivés qui ne se cristallisent pas facilement et dont leur précipité est généralement contaminé par des impuretés, bien que le Px donne de bonnes propriétés de cristallisation meilleure qu'avec le DMTr, l'habileté est similaire.

II. 2. b) la protection du 3'-OH :

Puisque la synthèse s'effectue dans le sens $3' \rightarrow 5'$ de la séquence, le premier nucléoside terminal en 3' doit avoir son 3'-OH protégé pendant la synthèse en phase liquide, cette tâche est exécutée simplement par un groupement acylant, le benzoyl par exemple qui s'enlève en fin de synthèse par l'ammoniaque en même temps que les groupements protecteurs des amines exo-cycliques.

Dans le cas d'une synthèse sur support solide, le 3'-OH est relié au support solide par une fonction ester (Schéma 14).

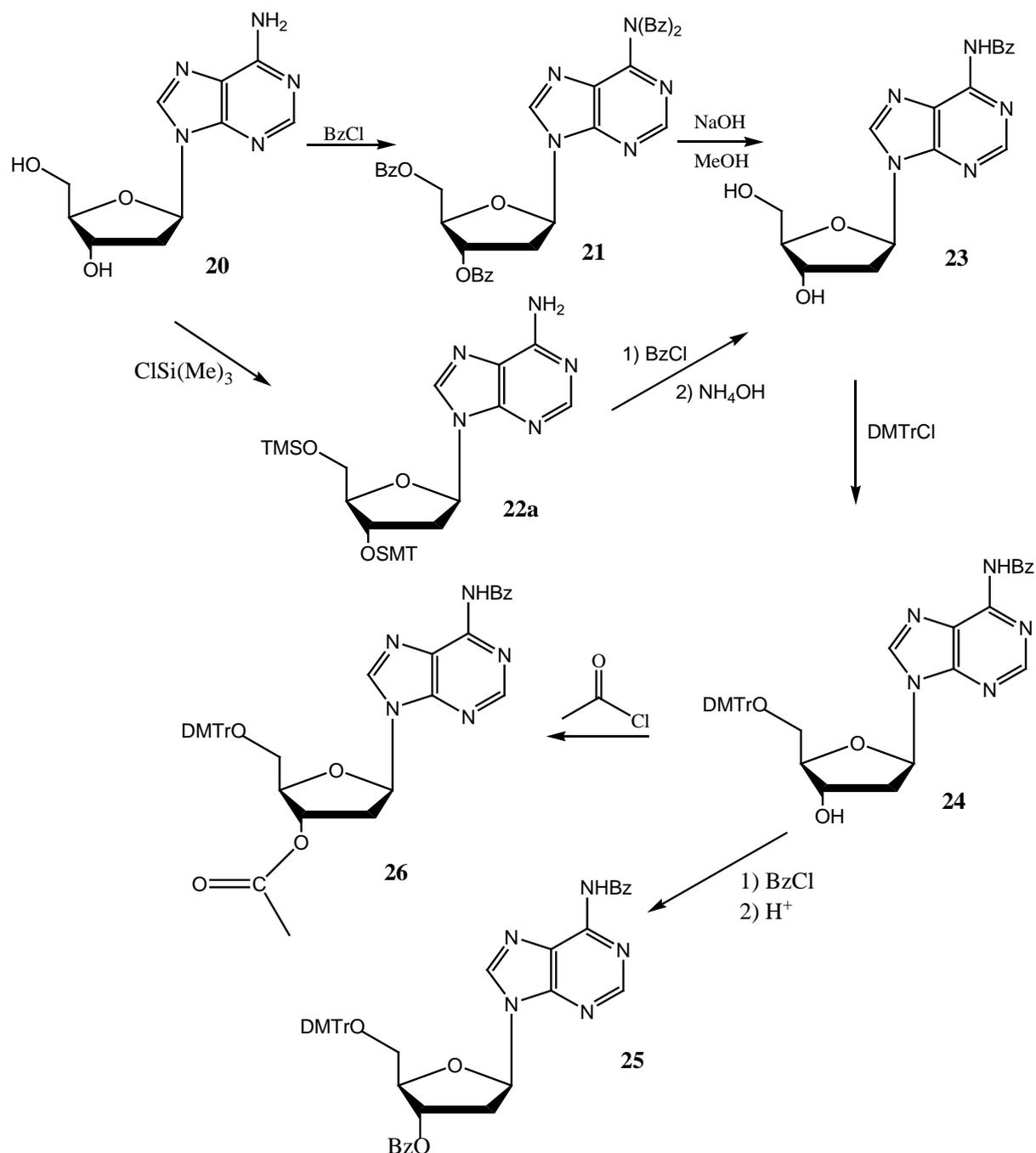


Schéma 14.

II. 3. Protection des bases Hétérocycliques :

Les nucléosides déoxycytidine, déoxyadénosine, déoxyguanosine possédant des groupements amines exo-cycliques exigent une protection permanente afin d'éviter des réactions de phosphorylation secondaire sur ces positions.

La protection est généralement achevée par l'acylation^[48,50,55], bien que plusieurs alternatives aient été proposées, les groupes protecteurs les plus populaires restent le Benzoyle pour le

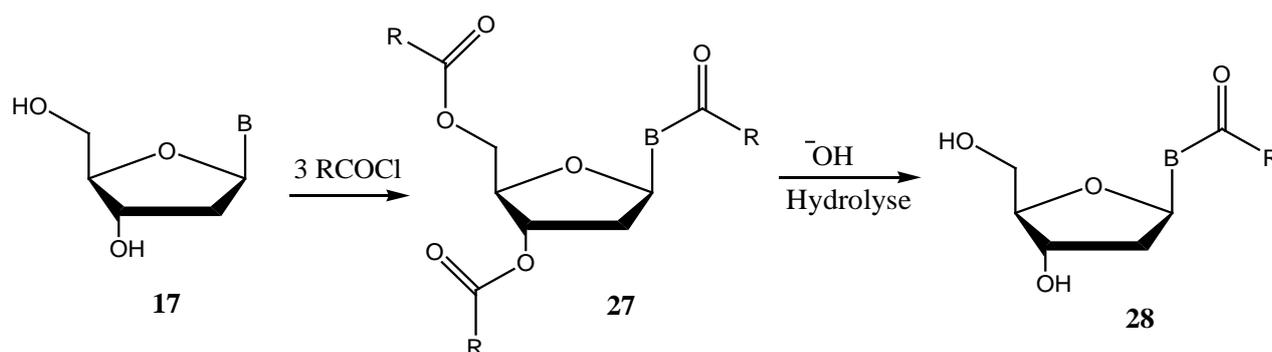
déoxycytidine et le déoxyadénosine et l'isobutyryle pour le déoxyguanosine, le Thymine ne demande pas de groupe protecteur.

Ces groupes sont enlevés en fin de synthèse par l'ammoniaque ou l'ion oximate^[56]. Plus la caractérisation des réactions associées aux guanosine a nécessité l'introduction d'un deuxième groupe protecteur à la position O-6.

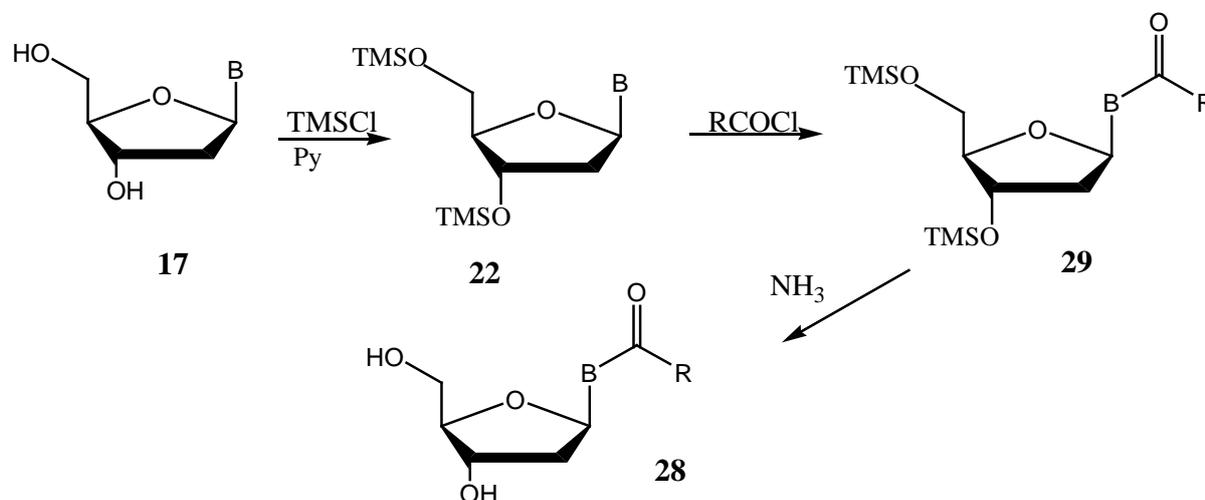
Bien que des méthodes de benzoylation sélectives soient décrites, la méthode la plus utilisée consiste en une per-acylation, suivie par une hydrolyse sélective à pH > 10 qui clive les esters tout en laissant les N-alcoyl nucléosides intacts.

II. 3. a) Peracylation :

Puisqu'on a besoin seulement des groupes amines protégés, nous avons référence à une per-acylation (Schéma 15).



Le rendement en général est faible, alors on a tendance à une autre méthode de protection qui est la " Protection Transitoire" développée depuis 1982 (Schéma 16).



II. 3. b) La protection de la déoxy-2'-adénosine :

La déoxy-2'-adénosine (**20**) est protégée par une benzylation / débenzylation sélective ^[48,50] avec un bon rendement (schéma 14). Cependant, cette méthode est longue, en plus, elle demande l'isolement des composés intermédiaires, mais l'étape la plus critique reste l'hydrolyse pour contrôler des esters benzoïques, sans toucher aux groupements benzamides. Pour l'autre approche, la protection transitoire des OH reste toujours possible, avec un éther silylé ^[53,39]. Cependant, le rendement, peut chuter quand on travaille sur de grande quantité, car la qualité de chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) est primordiale, ainsi que la vitesse d'addition, qui ne doit pas générer une acidité et une surchauffe locale susceptible de dépuriner.

Envers les acides la N-benzoyldéoxy-2'adénosine est plus fragile, et le taux de dépurination est six fois supérieur à celui de l'adénosine de départ, ceci est expliqué par une protonation préférentielle en N-7, alors que la déoxy-2'adénosine est protoné préférentiellement en N-1 ^[48,50]. Mais la présence d'un groupe acyle ^[57] substituant la fonction amine en -6, rend la protonation en -7 plus facile ^[58] et donc la coupure de la liaison glycosidique.

Laquelle c'est la raison pour des efforts sont portés sur la recherche de nouvelles conditions de déblocage ^[19 d, 59] et en particulier sur l'utilisation des acides de Lewis ^[60] suite aux travaux de Vasella ^[61] ou encore des nitrites.

Une autre possibilité consiste à utiliser un nouveau type de groupe protecteur de la fonction 5'-OH et c'est le sens des travaux de l'équipe de Reese ^[62], une troisième approche consiste à modifier la sensibilité de la liaison glycosidique.

II. 3. c) Protection de déoxy-2'-guanosine :

Pour des raisons de solubilité, la déoxy-2'guanosine est protégé par un groupement isobutyryle qui est introduit par une acylation suivie d'une hydrolyse ou bien par la méthode de protection transitoire avec un triméthylsilyle ^[53,63].

Coté rendement la déoxy-2'-guanosine est le nucléoside le plus difficile à manipuler, car il est en générale inférieur à ceux des autres nucléosides, ce faible rendement revient aux réactions secondaires qui donnent des produits colorés ou fluorescents attribués à la réactivité de l'oxygène en position O-6 envers les agents de condensation et de phosphorylations. Evidement ce problème de dégradation, augmente avec la longueur de l'oligomère, et à l'exposition longue et répéter de ces facteurs.

Reese a rapporté que la déoxy-2'-guanosine et ces dérivés, était sulfonylé à la position O-6 avec du chlorure d'arènesulfonyl dans la pyridine, ce qui mène à la libération de HCl durant la réaction de condensation ^[64]. D'autre part, la guanosine peut réagir avec un excès de 1-(mesithylène-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (MSTN) (**31a**), pour donner les dérivés 6-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-) (**32**) ^[40], surtout quand le temps de la réaction de phosphorylation est plus long (Schéma 17).

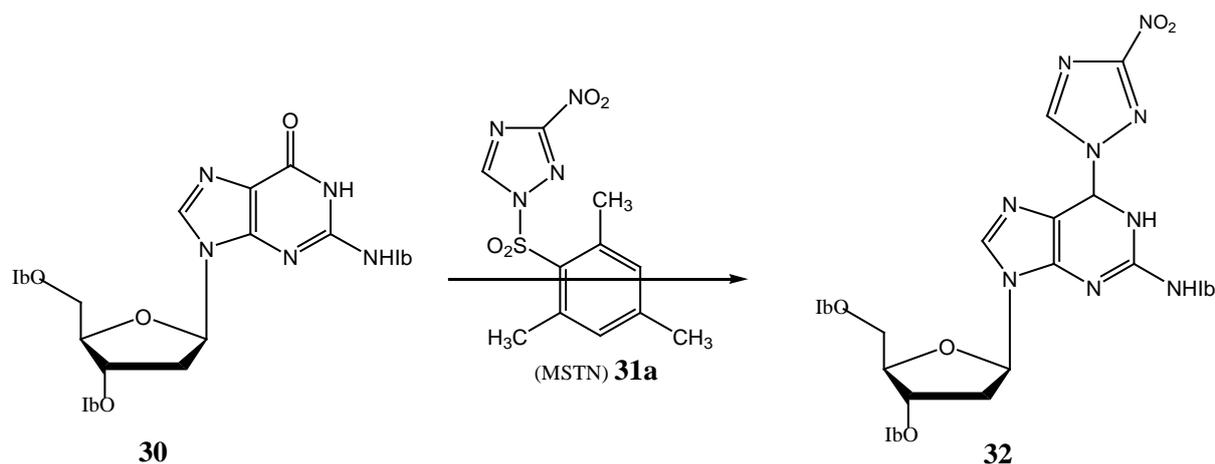


Schéma 17.

Pour minimiser les réactions secondaires avec le (MSTN) il faut éviter l'utilisation d'un excès du composé phosphodiester et de (MSTN) et réduire le temps de la réaction de condensation. Le 1-(2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (TPSNT) (**31b**) réagir, en donnant des réactions secondaires.

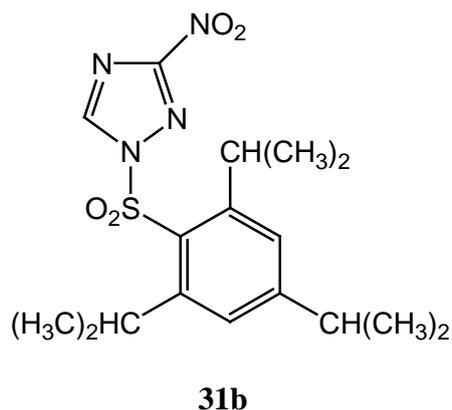


Figure 15.

D'autres chimistes ont supposé les dérivés du tétrazole, comme le 1-(mésithylène-2-sulfonyl)-1,2,3,4-tétrazole, qui réagi avec un bon rendement.

Plusieurs équipes de recherches ont abordé le problème de la protection de O-6, donc elles ont développé une nouvelle stratégie de protection incluant des groupes protecteurs comme : le

tri-méthylsilyléthyle, clivé par l'ion fluoride dans des conditions neutres, et les groupes d'éthyles substitués, qui sont clivés par une réaction de β -élimination.

L'équipe de Reese^[62] a introduit le (2-nitrophényl); alors que plusieurs groupements substituants O-6, comme le silyle, sulfonyle, phosphoryle, et le phosphinothiole ont été introduits par Hata^[5], et le triméthylsilyl par Jones^[4].

Dans son travail de protection par le groupement 2'-nitrophényl, Reese^[62] a procédé à la transformation de 2-N-(4-t.Buthylphénylacétyl)-désoxy-2'-guanosine (**33**) à ces dérivés 6-O-(2-nitrophényl) (**34**) avec un rendement de 37 % (Schéma 18).

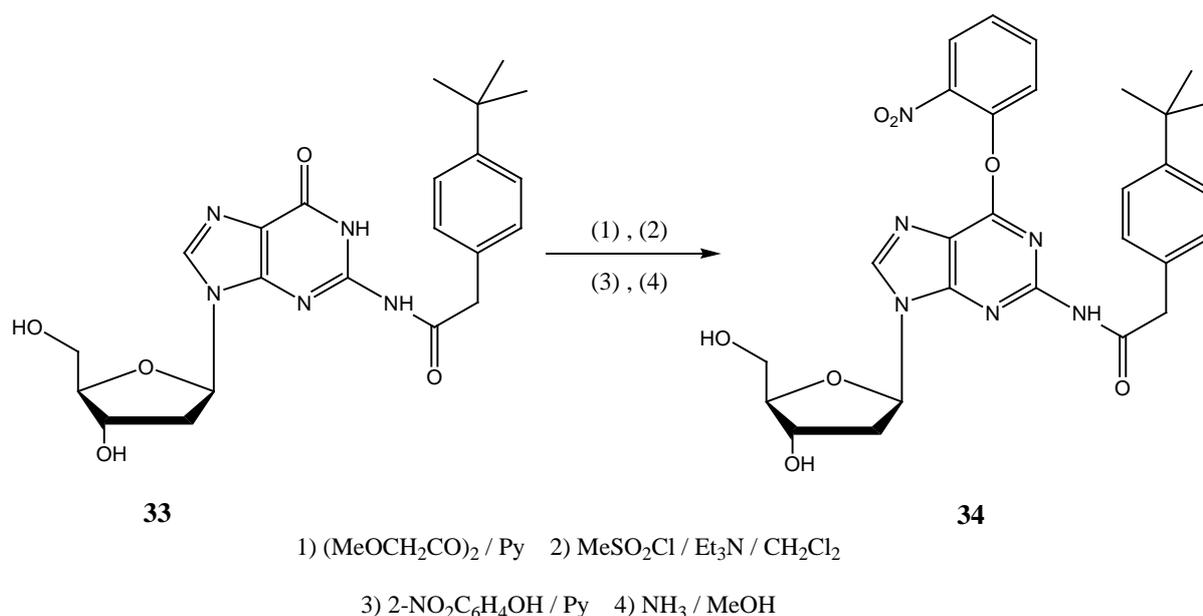


Schéma 18.

II. 3. d) Protection de la désoxy-2'cytidine :

Comme dans le cas d'adénosine, le groupement amino-4 de désoxy-2'-cytidine est protégé par un benzoyle, mais on peut faire une protection sélective avec l'anhydride benzoïque qui benzoyle l'amine exocyclique, sélectivement sans estérifier les fonctions hydroxyle^[65] (Schéma 19).

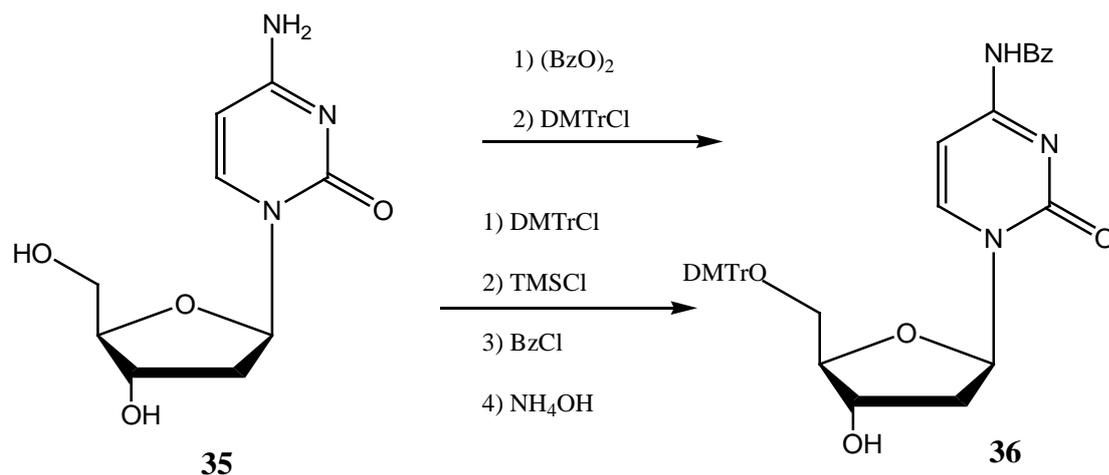


Schéma 19.

III. Le fonctionnement du support :

Le polystyrène ^[66], le polyacrylamide ^[67], la cellulose ^[68], et la silice ^[69] ont été utilisés pour la synthèse de la phase solide des oligodéoxyribonucléotides. Actuellement la matière du support préférée est un verre du pore contrôlé (CPG) ^[70,71] fonctionné avec un espace d'amine alkylé de longue chaîne. La matière est relativement rigide, elle est inerte à tous les réactifs utilisés dans la synthèse.

De plus, il résiste le plus haut effort mécanique appliqué aux grands nombres des réactions exécuté dans les synthétiseurs automatiques. La distribution des pores étroite de ce support permis d'avoir des paramètres de diffusion uniforme et, par conséquent, un taux de débit plus reproductibles et une disponibilité des pores du support utilisé.

Le support est fonctionné pour un alkylamine par silanization avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane ^[69,72]. L'échauffement et le traitement subséquent avec le méthanol produire un échange du groupement silyle et une hydrolyse de groupes externes, fortement arrangés ^[73]. Pour synthétiser l'extrémité 3'-OH du nucléoside de l'ADN est lié au support par un espace du succinyle ^[69,74,75]. Les groupes aminés du support qui n'ont pas réagi sont couverts avec l'anhydride acétique ^[74]. Pour déterminer le chargement du support avec la matière du nucléoside, un aliquote est traité avec l'acide fort pour enlever le résidu de DMTr. La solution orange produit contient le cation du diméthoxytrityle ^[76] peut être déterminé en mesurant l'absorbance à 495 nm. Habituellement le chargement moyen est 15-25 μmole par gramme de CPG.

IV. L'élimination des groupes protecteurs et la purification des oligonucléotides :

IV. 1. L'élimination des groupes protecteurs :

Après la synthèse, l'oligomère est encore complètement protégé et attaché au support. L'arrachement des groupes protecteur devrait commencer toujours par l'internucléotide qui protège le groupe de phosphore pour prévenir une extrémité déformée [29,77].

Si la méthode du triester est utilisée, le groupe 2-chlorophényle est éliminé par le traitement avec un " aldoximate " [78] ; la base des groupes protecteurs et le support sont enlevés avec 32 % d'ammoniaque liquide à 50° C. Finalement, le traitement avec 80 % d'acide acétique arrache le group DMTr, à condition à n'est pas exigé la purification par l'HPLC (La haute performance chromatographie liquide) - phase renversée.

Si les phosphoramidites du méthyle sont utilisés pour la synthèse, la première étape du déprotection est le traitement avec le thiophénole pour arracher le groupe du méthyle [79]. Cependant, si les phosphoramidites β -cyanoéthyle sont utilisés, alors le traitement avec l'ammoniaque à 50° C est suffisant pour enlever tous les groupes protecteurs y compris le support.

IV. 2. La purification des oligonucléotides :

Du moment que la condensation ne donne pas 100 % de rendement avec l'associant des étapes, les petites chaînes homologues sont présents par l'addition des résultats. Par exemple, pour un oligonucléotide avec 70 bases et un 98.5 % de rendement par étape de condensation, les comptes alternés du résultat sont ≤ 35 % du rendement total. Une étape de purification est exigée par conséquent pour une oligomère plus longue [80].

L'HPLC ou gel de polyacrylamide électrophorèse est utilisé communément pour la séparation du produit. La purification par la phase renversée HPLC est idéal pour la séparation habituelle d'oligonucléotides contient 40-50 nucléotides [80,53]. Ici, la série des produits qui est encore tritylé est élué avant. L'efficacité de la séparation peut être augmentée avec la haute affinité spéciale qui protège des groupes qui alloué la purification de la chaîne avec 150 bases [81]. Si le groupe du trityle est arraché avant la purification, le caractère du polyanionique dominé. Alors c'est plus avantageux de séparer le produit demandé par chromatographie d'ion exchange.

Le gel électrophorèse sur le polyacrylamide sous des conditions transformer est la méthode la plus efficace pour la séparation de l'oligonucléotide [82,83] ; les produits homologues sont séparés selon la dimension. Habituellement la série des produits qui est la plus longue séquence a la plus basse mobilité. Les fragments individuels deviennent visible sur l'exposition à UV (λ 254 nm) et ils sont coupé hors de la matière du gel. L'extraction avec le

glacé tampon ou l'électroéluant et subséquent dessalement (filtration du gel) rendement demandé de l'oligonucléotide.

V. Synthèse des oligonucléotides modifiés :

Les oligonucléotides liés à une série des produits définis sous des conditions d'hybridation spécifiquement convenables. Relativement les petits oligonucléotides (< 20 bases) sont utilisés pour des nouveaux drogues désigne les stratégies impliquer visant l'intervention de l'expression génétique au niveau de la transcription ou la traduction^[84].

Pour les applications chimiothérapeutiques *in vivo* ont basé sur l'hybridation séquence - spécifique (inhibition de l'anti-sens), les oligonucléotides nucléase - résistants sont exigés (les plus importants sont montrés dans le figure 16). Ils peuvent être obtenus par modifié la partite importante du phosphate des oligonucléotides, en utilisant les α -anomères (46) ou 2'-O-alkyl-ribosides (45).

Malgré les changements, ces oligonucléotides hybrider avec la série des réactions et ils peuvent traverser des membranes cellulaires dû plus facilement à leur nature lipophile.

Les applications de ces analogues comme les oligonucléotides de l'anti-sens sont résumée dans^[84-86].

Les analogues Phosphothioate (37). Dans lequel un atome non lié du groupe de phosphate est remplacé par un atome du soufre à une seule position spécifique ou à toutes les positions dans la chaîne, peut être synthétisé par la méthode phosphoramidite ou par le H-Phosphonate^[87-89]. Habituellement, la réaction de la sulfonation est toujours migrée avec une solution de soufre dans la pyridine et le disulfure du carbone^[90]. Les autres réactifs de la sulfonation qui peuvent être utilisés aussi dans la synthèse sont décrits dans^[91,92].

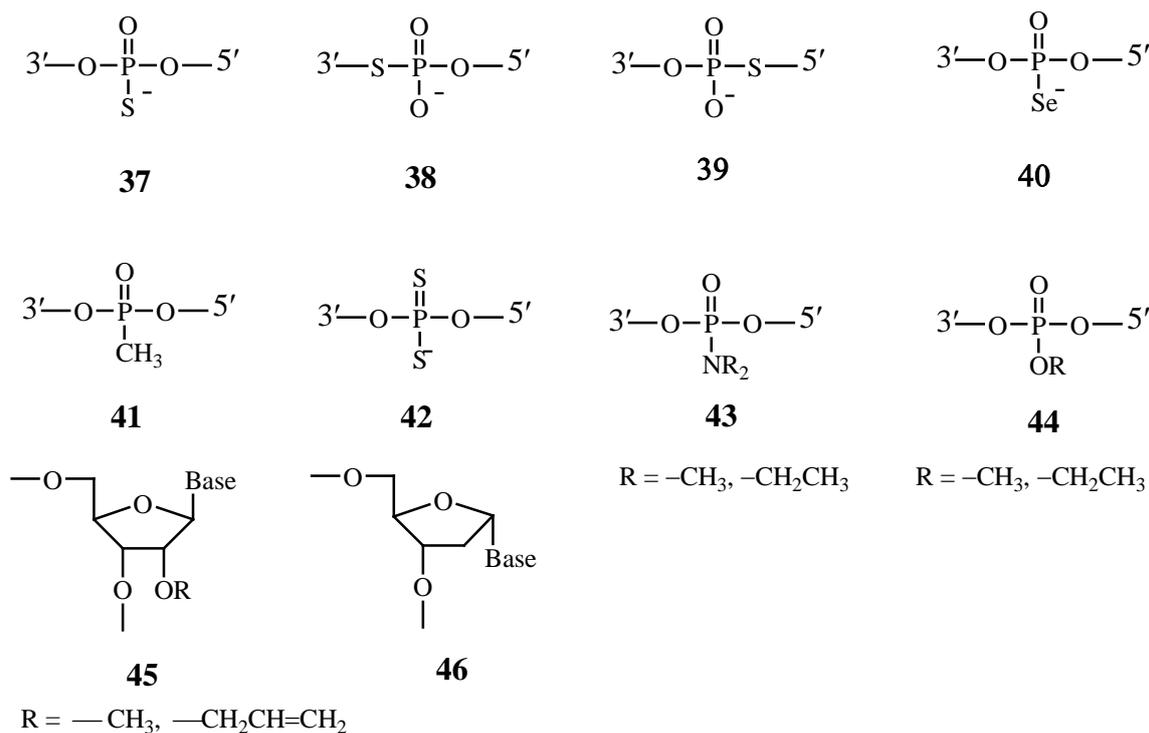


Figure 16. Les oligonucléotides modifié

Comme l'ADN mère, les analogues du phosphorodithioate (**42**) sont des produit stéréochimiquement uniforme et peut être préparé par la méthode du phosphoramidite avec les monomères du thiophosphoramidite correspondant ^[93].

Les méthylphosphonates (**41**), les phosphoramidates (**43**), et les phosphotriesters (**44**) ne sont pas des ions et ils ont un caractère hydrophobe plus que ce trouve dans les acides nucléiques naturelles. La synthèse des oilgonucléosides méthylphosphonates sont décrite dans ^[94-97], et ils sont bien migrer avec le nucléoside 3'-méthylphosphonous acide imidazolide qu'ils sont préparés de méthylphosphonous acide bisimidazolide et le nucléoside bien protégé complètement. Ou bien, Le H-phosphonate est réagi avec le chlorure du tert-butyl diméthylsilyle pour donner le silylphosphite et par l'oxydation successive avec l'alkyle ou l'aryle halogéné ^[98]. Ts'o et Miller ^[97] ont conduit toutes les rapports sur l'activité biologique de ces analogues de l'oligonucléotide (lesquels ont été nommés " matagen ", un acronyme pour brasser la bande pour expression du gène).

Les phosphoramidates (**43**) peut être préparé par réagir les oligonucléotides de H-phosphonate avec une solution d'amine convenable dans le tétrachlorure du carbone ^[88].

Les 2'-O-méthylribonucléotides (**45**) sont bien établi les nucléosides modifiés qui sont utilisé comme structure du monomère pour la synthèse de l'oligonucléotide ^[99]. Les synthèses du phosphoramidites du nucléoside correspondant sont décrites dans ^[100].

Les oligonucléotides avec α -2'-déoxynucléosides (α -ADN) forme β -ADN avec ADN naturel ; cette forme a des extrémités parallèles et elle est aussi nucléase résistant ^[101,102].

Pour augmenter les nombres liés de l'oligonucléotide final, la pénétration d'un agent (par exemple, 2-méthoxy-6-chloro-9-aminoacridine ^[103,104] ou phénazine ^[105]) peut être lié de façon covalente avec l'oligonucléotide. Ces agents accèdent « intérieurement » entre les bases paires de double hélice, se multiple le partenaire stable.

Une deuxième méthode implique la construction des groupes réactifs (par exemple, psoralen ^[106 - 108], azidophénacyle ou dérivé de azidoproflavine, proflavines, et porphyrines ^[109 - 113]) qui sont activé par l'UV ou par la lumière visible et peut croisé avec l'ADN ou l'ARN mère.

Les endonucléases sont des enzymes agissent ^[114] sur les oligonucléotides qui portent un groupe qui peut capter le fractionnement spécifique de l'acide nucléique fondamental après avoir lié à la cible. Tels groupes sont susmentionné les groupe photoréactifs : le traitement subséquent avec le pipéridine permis de sectionné la série des produits dans des pores croisé. La lumière directe raison de fractionnement à pH neutre est réaliser avec les éllipticiens et les dérivés du diacapyrène ^[113]. Les métaux moléculaires ont lié à les oligonucléotides (e. g. iron.- EDTA ^[115-117], cuivre - phénanthroline ^[118-121], ou fer - porphyrin ^[122]) relativement le rôle spécifique principal à fractionné la série des réactions. L'enzyme non spécifique de l'ADN ou l'ARN limité ont borné à un oligonucléotide complémentaire peut aussi détruire l'acide nucléique fondamental ^[123,124].

Le Nonradioactive connue des oligonucléotides synthétiser est devenu une technique importante dans la biologie moléculaire et plusieurs procédures chimiques ont été développées. Les oligonucléotides sont liés de façon covalente aux groupes indicateurs tels que les fluorescentes colorés, les biotines, et d'autres groupes biologiquement actifs. Ces groupes rapporteurs peuvent être liés à un oligonucléotide au extrémité 5'-OH, et les extrémité 3'-OH, la partie importante du phosphate, ou un des bases. L'attachement aux extrémités 5'-OH par la protection de l'aminoalkyle ou par le phosphoramidites du thioalkyle est très connu. Cet aminoalkyle ou thioalkyle sont ajoutés dans la dernière étape de synthèse et ils sont produise un amine ou thiol terminal libre après l'arrachement des groupes protecteurs ^[125-127]. La série de réaction avec la molécule de l'indice activée (e. g. biotine-N-hydroxysuccinamide) donne l'oligonucléotide indiqué.

Un grand nombre prenantes deux fonctions (par exemple, ester maleimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimide) a été décrit lesquels permis l'accouplement aux enzymes ^[128], les peptides, et les proteins lié avec les oligonucléotides par des groupes amino de l'acide aminé ou les groupes thiol de cystéine.

L'attachement au extrémité 3'-OH peut être emporté dehors à l'unité du ribose avec l'ARNt₄ ligase, suivi par fractionnement périodique du ribose cyclique, et amination réduite subséquent ^[129,130]. Le rapport par un groupement d'extrémité 3' du thiol est décrit dans ^[131]. Ainsi, le support modifié est commercialement disponible c'est-à-dire les rendement du groupe amino - aliphatique primaire au extrémité 3' ^[132].

Aux groupes reporter de la bonde internucléotide peut être attaché, par exemple, avec la liaison phosphoramidate ^[133 - 135].

L'attachement des groupes reporteurs aux bases modifiées habituellement réalisé à la position C-5 des pyrimidine ou le position C-8 de purines ^[136].

Durant la synthèse d'oligonucléotide, le déoxyuridine phosphoramidite protégé complètement ^[137] a modifié avec le résidu du trifluoroacétylaminopropenyle est inséré à la position demandé dans la série (habituellement à C-5); après le fractionnement du groupe protecteur, le groupe couplé est lié avec la fonction amine produisait, Les autres nombres des position libre a été décrit (par exemple, la position C-4 ^[138 - 140] de 2'-déoxycytidine et la position N-6 de l'adénine cyclique ^[141] ou la fonction amine exocyclique de guanine résidu ^[142]).

Chapitre 3

Applications de la synthèse sur les nucléosides et leurs intérêts biologiques

I. Différentes application pour la synthèse des nucléosides :

I. 1. Une stratégie pour la protection de déoxyguanosine :

Le problème de temps des réactions latérales des résidus du guanine pendant la synthèse de l'oligonucléotide continue à être cité ^[18d,59b,71,143-145], malgré l'avancement majeures dans la méthodologie synthétique rapportée ces dernières années. L'origine du problème semble être dans la susceptibilité de l'oxygène 6- de guanine envers la sulfonylation par des agents condensés ^[64,146,147] et envers la phosphorylation par des nucléotides activé ^[148]. Bien que quelques dérivés formés puissent être convertis sous le produit original ^[144,148], dans plusieurs exemples, ils dégradent aux matières polaires.

Les problèmes dans la dégradation du guanine sont plus dur avec l'oligomère le plus long ^[149], où a répété l'accomplir des résidus du guanine pour la sulfonylation possible ou la phosphorylation mène a baisser les constantes dans le rendement avec la longueur de la chaîne croissante. L'usage de la réaction très courts pour les réactions de condensation peut minimiser, mais ne peut pas éliminer ce type de dégradation, et peut mener à une réaction incomplète.

Gaffney et Jones ^[4] ont éliminé cette dégradation par développé une stratégie du groupe protecteur pour le guanine qui comporter une protection O-6 ^[150]. Pour le groupe protecteur lui-même ils ont choisi de réaliser sur le group triméthylsilyléthyle, arraché sous des conditions neutres avec l'ion du fluorure ^[151-155], et ont substitué des groupes d'éthyle qui sont arrachés par des réactions de β -élimination.

Comme plusieurs de celui-ci a été développé (comme les groupes protecteurs du phosphate) ^[18d,156], les groupes avec une grande gamme de stabilités sont disponibles rapidement pour choisir celui qui est le plus convenable pour compléter la stratégie synthétique particulière.

La synthèse de **48c**, **49c**, et **50c** a été réalisé de **47a** comme se déterminé précédemment. Les composés **51c** et **52c** ont été préparé de **47b**, comme ils n'ont pas survécu les conditions basiques employées pour l'hydrolyse de 3' et 5' des groupes d'isobutyryle. En fait, les conditions normalement utilisées pour la désilylation de fluorure du tétra-n-butylammonium (TBAF) dans le THF arraché aussi les racines de cyanoéthyle O-6 et le 4-nitrophenéthyle. Cependant, cette élimination peut être évitée qu'on utilise un réactif désilylé contient un mélange de TBAF et de pyridine HF ^[157] (Schéma 20).

Avec 2 M HF/1M de TBAF dans la pyridine (1 eq TBAF) la désilylation est complète en 24 heures, sans éliminer le groupe protecteur de guanine. Le réactif est commodément préparé par l'addition du montant de TBAF/THF exigé et le HF aqueuse dans la pyridine en excès et on sèche par la concentration sur l'évaporateur rotatif.

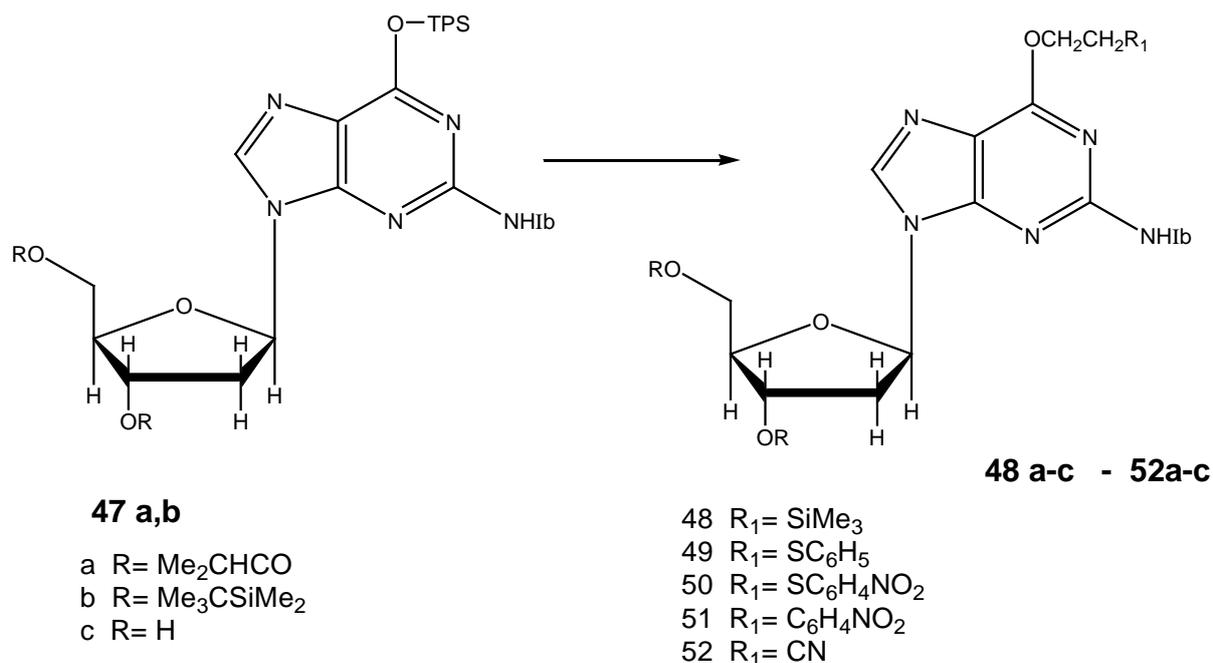


Schéma 20.

Les propriétés de ces cinq groupes protecteurs sont résumées dans le tableau dessous. Être utile à l'addition avec la stratégie synthétique de groupe protecteur qui doit rencontrer des conditions intenses. Ceux qui est inclure une simple pénétration, un bon rendement de fractionnement sous des conditions douces, et une compatibilité avec des autres groupes protecteurs et des procédures employées pendant la synthèse. Comme chaque groupe protecteur peut être introduit dans un bon rendement, et arraché sous des conditions douces, c'est clair que n'a pas chacun entre eux est convenable pour toutes les attendants de l'oligonucléotide synthétiser.

Le triméthylsilyléthyle (TSE), par exemple, a été trouvé un groupe extraordinaire ; Sensible à l'acide, et aussi employées communément les mêmes conditions douces pour arracher le groupe 5'-diméthoxytrityle ainsi enlèvent le groupe TSE. Cependant, c'est stable pendant l'enlèvement d'un groupe protecteur alternatif 5', et le groupe 2-dibromométhylbenzoylé (DBMB) ^[20f]. D'autre coté, les groupes phénylthioéthyle et 4-nitrophénylthioéthyle, sont effectivement stables, jusqu'à ce que oxydé au sulfoxyde, ils sont compatible avec toutes les méthodes synthétiques. Comme prévu, le **50c** est fractionnée plus rapidement après l'oxydation que le **49c**, mais il est beaucoup plus résistant à l'oxydation et donc paraît qu'il ne donne aucun avantage sur ce dernier. Le groupe nitrophényléthyle paraît être aussi applicable généralement, et il a l'avantage que n'aucune étape d'oxydation est exigé avant l'arrachement par le DBU.

Tableau 4 : les rendements et les conditions des réactions utilisées dans la synthèse des dérivés de déoxyguanosine.

Le composé	Le rendement	Les conditions des réactions	La compatibilité ^a
50c	65 %	5 eq TBAF/THF, 5min ou ZnBr ₂ /CH ₃ NO ₂ , 10 min	DBMB CNEP
51c	81 %	1) NaIO ₄ , 6 h. 2) DBU, 18 h ou NH ₄ OH, 50° C, 24 h.	DMT DBMB ou CNEP
52c	75 %	1) NaIO ₄ , 24 h. 2) DBU, 1 h ou NH ₄ OH, 50° C, 2 h.	DMT DBMB ou CNEP

Les réactifs : le TBAF/THF est une solution (1M) de fluorure du tétra-n-butylammonium Dans le tétrahydrofurane, le BDU est le 1, 8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ène, le DMT est le groupe 5'-O-diméthoxytrityle, le DBMB est le groupe 5'-O -dibromométhylbenzoyle, le CNEP est le groupe 3'-O-(Chlorophényl)cianoéthylphosphate ^[4].

^aLa compatibilité avec le DBMB informe qu'il y a aucune élimination de groupe protecteur était détecter après 5 heures avec les ions Ag⁺ et après 5 heures avec le Na₂CO₃ (0.2 M) dans le (dioxane: eau); avec le CNEP aucune élimination après 2 heures avec (triéthylamine: acétonitrile)(1 : 1); avec le DMT aucune élimination après 1 heure avec le ZnBr₂ dans le nitrométhane, ou une demi-heure avec 2 % d'acide du toluènesulfonique.

Et quant simplifier l'élimination, le groupe cyanoéthyle paraît être le plus attendu, comme il est arraché avec l'ammoniaque liquide simplement. Bien que ce soit arraché dans l'ammoniaque liquide et avec le triéthylamine liquide c'est relativement stable par rapport au triéthylamine sous des conditions anhydres. Par exemple, dans le 1 :1 mélange de triéthylamine : acétonitrile utilisé pour l'élimination β de la fonction 3'-cyanoéthyle phosphate **52b** montré seulement 50 % d'arrachement après 20 heures.

Gaffney et Jones ^[4] ont traité des échantillons de **48a**, **49a**, **50a**, **51b**, et **52b** 5 équivalent de chacun avec des agents de condensation ; le 1-(mésitylène-2-sulfonyl)-4-nitroimidazole, le 1-(mésitylène-2-sulfonyl)-tétrazole, le tétrazole du triisopropylbenzenesulfonyle, et le chlorure du triisopropylbenzenesulfonyls plus le tétrazole dans la pyridine pour 24 heures. Dans chaque cas, il n'y avait aucune dégradation détecter par la CCM. Sous ces conditions le déoxyguanosine triisobutyryle est largement dégradé lui-même. Donc certainement chaque

groupe protège le cycle de la guanine. Comme attendu, les réactions de condensation qui impliquent ces dérivés du déoxyguanosine protégés précèdent avec un très bon rendement et sans les couleurs foncés et les autre produits secondaires évident dans ces réactions.

En plus la protection des résidus de guanine pendant les réactions de condensation est favorable, chaque groupe protecteur amélioré aussi la solubilité et les propriétés chromatographique du déoxyguanosine et les oligomères qui les contiennent.

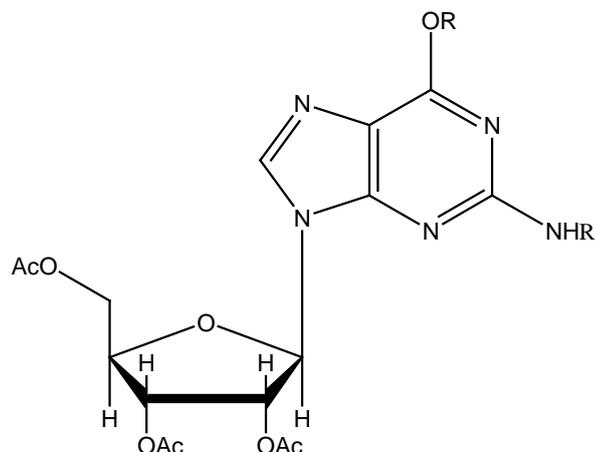
Chacun des dérivés protégés du déoxyguanosine rapportés est préparé facilement et chacun est arraché sous des conditions douces avec un bon rendement. De plus, la grande gamme de stabilités disponible dans cette série attribuer la flexibilité maximale dans la stratégie synthétique désigner.

I. 2. Synthèse des dérivés du guanosine O-substitués :

Plusieurs (arylsulfonyl)azoles ^[19] a fixé pour être un bon agents de condensation depuis que le temps de réaction de la condensation est existe apparaître diminué et les rendements d'oligomères sont habituellement hauts. Récemment, Narang ^[143,158] et Itakura ^[159] ont développer des méthodes rapides et pratiques pour la synthèse des oligodéoxyribonucléotides qui démontre des bons applications à la synthèse chimique des fragments de double structure des gènes bioactives de la lactose ^[158a], les hormones humain ^[159a,b], et l'insuline ^[143,158b,159c,d]. Ohtsuka et Ikehara ^[160] ont rapporté aussi l'azoles d'arènesulfonyle utilisé dans la synthèse " unité - type " qui nécessite la synthèse totale d'ARNt. Ces nouveaux systèmes synthétiques sont acceptés d'une manière satisfaisante. Cependant, ces paraît que la préparation de guanosine contenant l'oligomère par améliorée le phosphotriester le plus entraîner implique des problèmes synthétiques, surtout, en cas des rendements de l'accouplement. Ce problème est plus sévère dans le cas des séries du ribose. Dans les années précédentes, Reese ^[64; 146,161] a rapporté ces dérivés du guanosine qui étaient sulfoné à la position O-6 de la guanine avec les chlorures d'arènesulfonyle dans la pyridine. Il bien proposé que pendant l'allongement des chaînes d'oligonucléotide ces réactions latérales nécessaire peuvent se fixe à la position O-6 de guanosine. En effet, Petrove Daskalove et coll. ^[5] ont rencontré des problèmes semblables à cause de ces réactions latérales dans la synthèse d'un monomère du guanosine (l'unité de nucléotide) et les oligomères de guanosine - riche.

Dans la synthèse des oligoribonucléotides, ils ont besoin d'un dérivé de guanosine de haute lipophilie capable d'élaborer un groupe du phosphate au groupement 5'-OH du ribose. Par conséquent, la réaction entre le N²-tritylguanosine et le cyclohexylammonium S,S-bis(4-

méthoxyphényle) phosphorodithioate (MPT) a été réalisé en utilisant le chlorure de 2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl (TPS) (réaction TPS - MPT) d'après le procédé établi^[162].



53 : R = H, R' = Tr

54 : R = H, R' = Bz

Figure 17.

Cependant, le produit 5'-O-phosphorylé n'a pas été obtenu et quelques sous-produits non identifiés ont été formés. Le rapport déterminé de la réaction TPS - MPT sur les dérivés de guanosine les plus simplifiés (i. e. a complètement protégé) comme le 2',3',5'-tri-O-acétyl-N²-tritylguanosine (**53**) et le 2',3',5'-tri-O-acétyl-N²-benzoylguanosine (**54**) sont révélés ces réactions de substitution O-6 des composés susmentionnés se produisent facilement sous des conditions semblables. Cela à conduire à étudier la protection de la position O-6 de dérivé de guanosine qui donnerait largement quelque aperçu sur la synthèse de l'oligonucléotide.

I. 3. La protection de la liaison glycosidique en série déoxy-2'-adénosine :

Depuis le premier nucléotide, préparé il y a une bonne soixantaine d'années par Fischer^[163], la synthèse d'oligodéoxynucléotides, c'est-à-dire de fragments d'ADN, a maintenant atteint un régime de croisière : la stratégie retenue (méthode au phosphite ou au phosphate, synthèse « à la main » ou automatisée) en est désormais l'aspect principal^[164].

Toutefois, il subsiste encore quelques points critiques parmi lesquels le problème de la dépurination, c'est-à-dire de la coupure éventuelle de la liaison glycosidique, au cours de la synthèse. Celle-ci a été mise en évidence dans la série la plus sensible, celle de la déoxy-2'-adénosine, par Khorana et coll.^[48] Lorsque le milieu réactionnel est acide, comme cela est rencontré lors de la déprotection du groupe trityle, généralement utilisé pour protéger la fonction en -5'. C'est la raison pour laquelle des efforts récents ont porté sur la recherche de

nouvelles conditions de déblocages ^[19d,59] et, en particulier, sur l'utilisation des acides de Lewis ^[211,60] suite aux travaux de Vasella ^[61] ou encore des nitrites ^[165]. Une autre possibilité consiste à utiliser un nouveau type de groupe protecteur de la fonction alcool en -5' et c'est le sens des travaux de l'équipe de Reese ^[20f,62]. Une troisième approche consiste à modifier la sensibilité de la liaison glycosidique.

Le passage, par oxydation, d'un système hétérocyclique azoté au N-oxyde correspondant en modifie de manière importante la distribution électronique et la réactivité et c'est le cas, en particulier, des purines ^[166] comme cela a été montré depuis les premiers travaux de Brown et coll. ^[167]

La protection de la liaison glycosidique par N-oxydation de la base purique en série désoxy-2' adénosine a donc été envisagée.

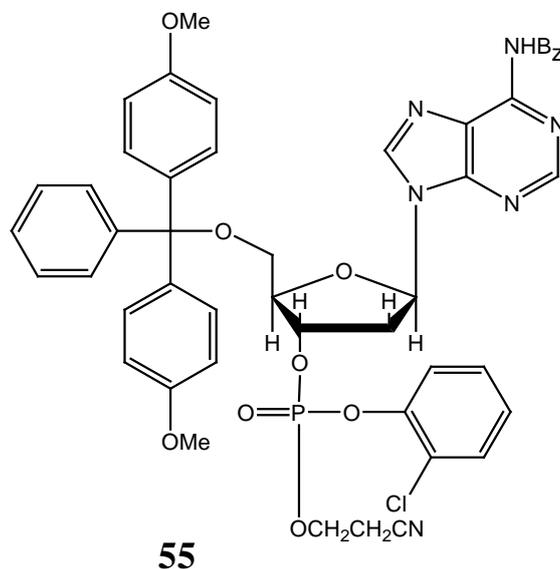


Figure 18.

Le substrat **55** d'étude retenu a été ; en effet, celui-ci incorpore, d'une part, tous les groupes protecteurs et les fonctions rencontrées lors de la synthèse d'oligodéoxynucléotides et de plus, il s'agit d'un composé particulièrement sensible à une éventuelle dépurination : la présence d'un groupe acyle ^[57] substituant la fonction aminée en -6, rend la protonation en -7 plus facile ^[58] et donc la coupure de la liaison glycosidique ^[168].

La synthèse de **55** ^[6] à partir du N-1 oxyde de désoxy-2'-adénosine **56** ^[169], obtenu par oxydation ^[169,170] de la désoxy-2'-adénosine, repose sur une méthodologie classique en synthèse d'oligodéoxynucléotides. Le passage de **56** au dérivé N-6 benzoylé **57** s'effectue par perbenzoylation (Bz₂O, DMAP) – le dérivé tétrabenzoylé **58** pouvant être isolé à ce stade par cristallisation, suivie de coupure sélective des fonctions esters (NaOH – EtOH – Py; 4°C).

L'action du chlorure de *p*-diméthoxy trityle DMT-Cl sur le brut ainsi obtenu conduit à **59** avec un rendement global de 40 % depuis **56**. La phosphorylation ^[145] de la fonction alcool restante donne alors accès au mononucléotide **55**.

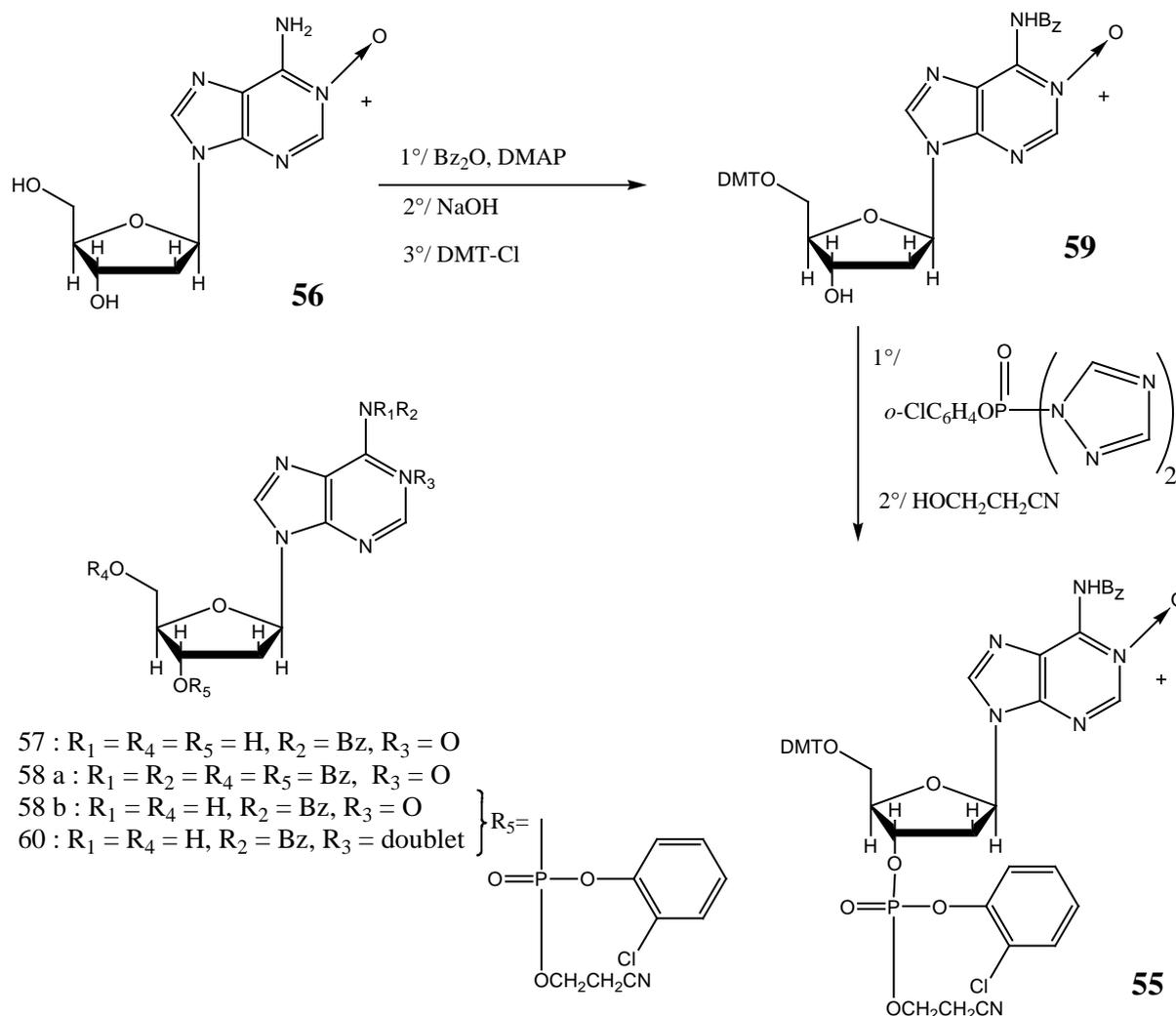


Schéma 21.

L'action de l'acide benzenesulfonique qui est, parmi les agents acides utilisés lors de la déprotection de la fonction trityle, celui conduisant le plus facilement à une éventuelle dépurination ^[19d,59] donne accès (acide benzène sulfonique à 2 % dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 – quelques minutes), à un produit unique, **59**, aucune dépurination ne pouvant être observée.

La liaison glycosidique est donc stable dans ces conditions, ce qui montre l'efficacité de sa protection ; la N-oxydation s'ajoute ainsi aux différentes méthodes déjà proposées pour éviter la coupure adénine-déoxy-2'-ribose lors de la déprotection du groupe *p*-diméthoxytrityle.

Toutefois, son applicabilité resterait limitée ^[171] s'il n'était possible de retourner au système de départ, c'est-à-dire de procéder à la réduction du N-oxyde ^[172].

Deux méthodes se sont révélées performantes, un produit unique **60**, comparé à un échantillon authentique ^[145]. Etant obtenu : l'action de l'hexachlorodisilane ^[173,174] ou, mieux encore, pour des raisons pratiques, celle du phosphite de triméthyle ^[175]. Appliquée à **55**, **60** est également obtenu, la réduction s'accompagnant d'une détritylation. Ces réactions de désoxygénation, devant être effectuées à température ambiante en raison de la fragilité des substrats, sont relativement lentes (quelques jours), mais Mortin et coll. ^[6] ont observé que dans le second cas, la présence d'un excès de chlorure de cérium (CeCl₃.6H₂O) rendait la désoxygénation ((CH₃O)₃P – CH₃OH 50/50) complète en moins d'une journée.

I. 4. La réaction de la guanosine et la 2'-déoxyguanosine avec l'Acroléine :

Plusieurs rapports donnent avec la réactivité de la partie de la purine de la guanosine avec les réactifs électrophiliques ^[176]. Ces réactions sont peut-être une explication de la mutagénétique et la cancérogénétique de beaucoup de xénobiotiques électrophilique. Galliani et Pantarotto ^[7] ont réalisé la réaction de la guanosine et la 2'-déoxyguanosine avec l'Acroléine.

La guanosine (2gr) a été dissous dans le diméthylsulphoxide (20 ml) et traité avec l'acroléine (4 ml). La solution a été gardée à une température ambiante pendant deux jours. Le benzène (200 ml) a été ajouté et le mélange a été mis sous agitation pendant deux heures. Après la séparation de la solution pure, le résidu était broyé dans l'éthanol. Le précipité a été filtré et cristallisé deux fois avec le mélange (éthanol / eau) (1/1). Le composé **61** (1.9 gr après la cristallisations) était séparé par la CCM (gel de silice, chloroforme: méthanol (7:3), R_f = 0.32).

L'analyse élémentaire a donné: C 44.01 %, H 5.19 %, et N 19.46 %. Ces valeurs sont logiques avec la formule C₁₃H₁₅N₅O₆.H₂O; une mole d'eau par une mole de **61** a été éliminé après avoir été réagir à 90° C toute la nuit. Le spectre de ¹³C de **61** dans le diméthylsulphoxide a montré trois pics en plus le spectre particulier de guanosine ^[177], à 25.6 ppm, 32.2 ppm, et 68.6 ppm respectivement. Le spectre off - résonance a montré les pics à 25.6 ppm et 32.2 ppm comme un triplet, et le pic à 68.6 ppm comme un doublet. Ces données sont logiques avec la présence d'un groupe du méthylène sur un atome d'azote, un groupe du méthylène se lié avec deux atomes du carbone, et un groupe du méthine tel que CH-O ou N-CH-O. Le spectre H¹ RMN de composé **61** coïncide avec le spectre de la guanosine (après avoir éliminé deux protons sur les atomes d'azote) avec les signaux suivants : un large signal à 1.6 ppm (2H), un multiplet à 3.7 ppm (2H), un large singulet à 5.0 ppm (1 H), et un doublet légèrement large à 8.3 ppm (1 H).

La distribution aléatoire de l'intensité de la dernière résonance suggère que ce signal peut être éliminé en mélangeant avec le D₂O est donné par deux groupes hydroxyle diastérotopiques par effet de simple couplage spin - spin. Toutes ces données suggèrent la structure (a) pour le composé **61**. Les signaux de la résonance du proton ont été confirmés par les expériences de RMN 2D. La structure alternative, obtenue à partir de l'addition de Michael de N₁ pour la double liaison C=C de l'acroléine, paraît être réglée de côté par la résonance du proton à 8.3 ppm qui sont typiques pour un hydroxyle engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire, comme c'est le cas dans la structure (a). De plus ; la résonance à 3.7 ppm est compatible avec les valeurs rapportées pour les N²-alkylguanines [176c]. Le large signal du proton peut être attribué à la présence en même temps des deux diastéromères de **61**.

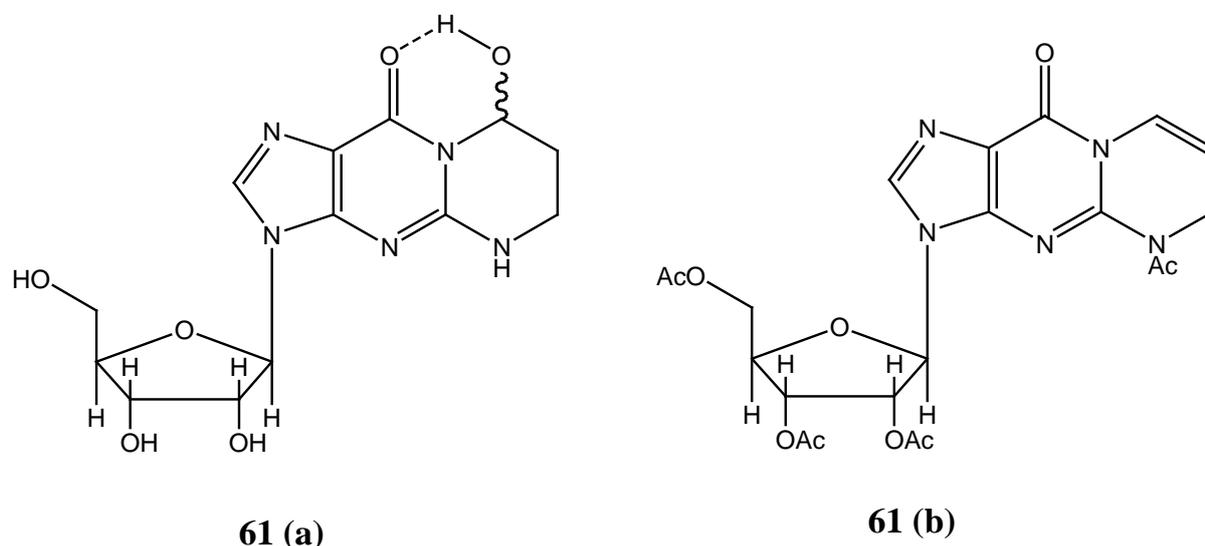


Figure 19.

Le composé **61** a été traité aussi avec l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre à 80° C pendant deux heures. Après la dilution dans le benzène et l'évaporation sous pression réduite, le produit majoritaire est purifié par chromatographie de gel de silice, et a été obtenu se forme huile jaunâtre qui a solidifié sous pression réduite. Son spectre de masse a montré le pic moléculaire à $m/z = 489$; son spectre de ¹³C a montré que les quatre groupes acétyle ont été fixés et que le groupe méthylène à 25.6 ppm et les groupes méthine à 68.6 ppm avait disparu; le deuxième groupe du méthylène avait été substitué à 40.0 ppm. La formation de la double liaison C=C a été contrôlée par l'apparition des deux doublets dans le spectre off - résonance à 107.2 ppm et 126.1 ppm respectivement. Le spectre de proton confirme la présence de deux protons du vinyle et la protection du groupe de méthylène près de l'atome

d'azote dont la résonance avait été changée à 4.5 ppm par l'introduction du groupe d'acétyle sur le N₂. Donc le dérivé tétraacétyle assigne la structure (**61 b**).

Les analogues adductifs ont été formés qu'on a traité le 2'-déoxyguanosine avec l'acroléine dans les mêmes conditions, comme il a été confirmé par le RMN ¹³C. Quand le guanosine a été traité avec le crotonaldéhyde et le cinnamaldehyde, aucuns adductif ne pourraient être observés par la CCM après deux jours.

L'adductif a été observé par la CCM dans le cas de méthylvinylcétone, mais cette formation était beaucoup plus lente que dans le cas d'acroléine.

II. La synthèse et l'évaluation des nucléosides ciblant l'hépatite C :

II. 1. L'effet de l'hépatite C :

Le virus de l'hépatite C est un problème de santé publique majeur, puisque 180 millions de personnes sont chroniquement infectées dans le monde, et sont susceptibles de présenter une cirrhose ou un cancer du foie. Un seul traitement a été approuvé, à base de Ribavirine et d'interféron alpha, mais il permet de traiter moins de 50 % des personnes infectées, et présente de nombreux effets secondaires. Devant ce constat, il paraît urgent d'aboutir à une polythérapie plus adaptée. En dépit du succès des nucléosides en chimie antivirale, visant plusieurs enzymes clefs intervenant dans la réplication virale, peu d'entre eux ont été conçus pour viser l'ARN polymérase ARN dépendante nécessaire au VHC^[8]. Dans cette optique, des dérivés carbocycliques de la Ribavirine, et des dérivés nucléosidiques du type 5-haloéthynyl- ou 5-(1,2-dihalo)vinyluracile, ont été synthétisés en utilisant deux méthodes : la réaction de Sonogashira^[9] et la cyclisation 1,3-dipolaire. Ce sont des outils puissants de la chimie organique qui permettent l'accès à des structures nucléosidiques et la réalisation de modifications chimiques ultérieures. Les composés ainsi préparés ont été testés pour leur activité antivirale.

II. 2. La réaction de Sonogashira par le Palladium :

Les réactions d'addition ou de substitution catalysées au Pd se sont particulièrement développées depuis de nombreuses années^[178]. Ces réactions régio- et stéréospécifiques avec des complexes au Pd permettent de nombreuses modulations et une adaptation à un grand nombre de substrats, ce qui en fait actuellement un outil de choix en chimie organique. Les complexes de palladium sont ainsi utilisés lors de couplages avec différents dérivés organométalliques comme les dérivés de l'étain (réaction de Stille), du magnésium (réaction de Kumada), du silicium (réaction de Hiyama) et comme les dérivés du bore (Réaction de

Suzuki-Miyaura). On trouve également des couplages avec des alcynes (réaction de Sonogashira) ou des alcènes (réaction de Heck), avec des amines (réaction de Buchwald-Hartwig) et enfin des réactions d'allylations catalysées au Pd (0) (réaction de Tsuji-Trost) (Schéma 22).

Parmi toutes les possibilités qu'offrent ces réactions catalysées au palladium (Schéma 22), la réaction de Sonogashira est plus particulièrement intéressée, comme une méthode d'obtention des analogues de nucléosides. En effet, cette méthode est la plus appropriée pour coupler un alcyne en position 5 de l'uracile. L'alcyne ainsi greffé pourra subir différentes modifications chimiques pour garantir l'obtention des composés souhaités.

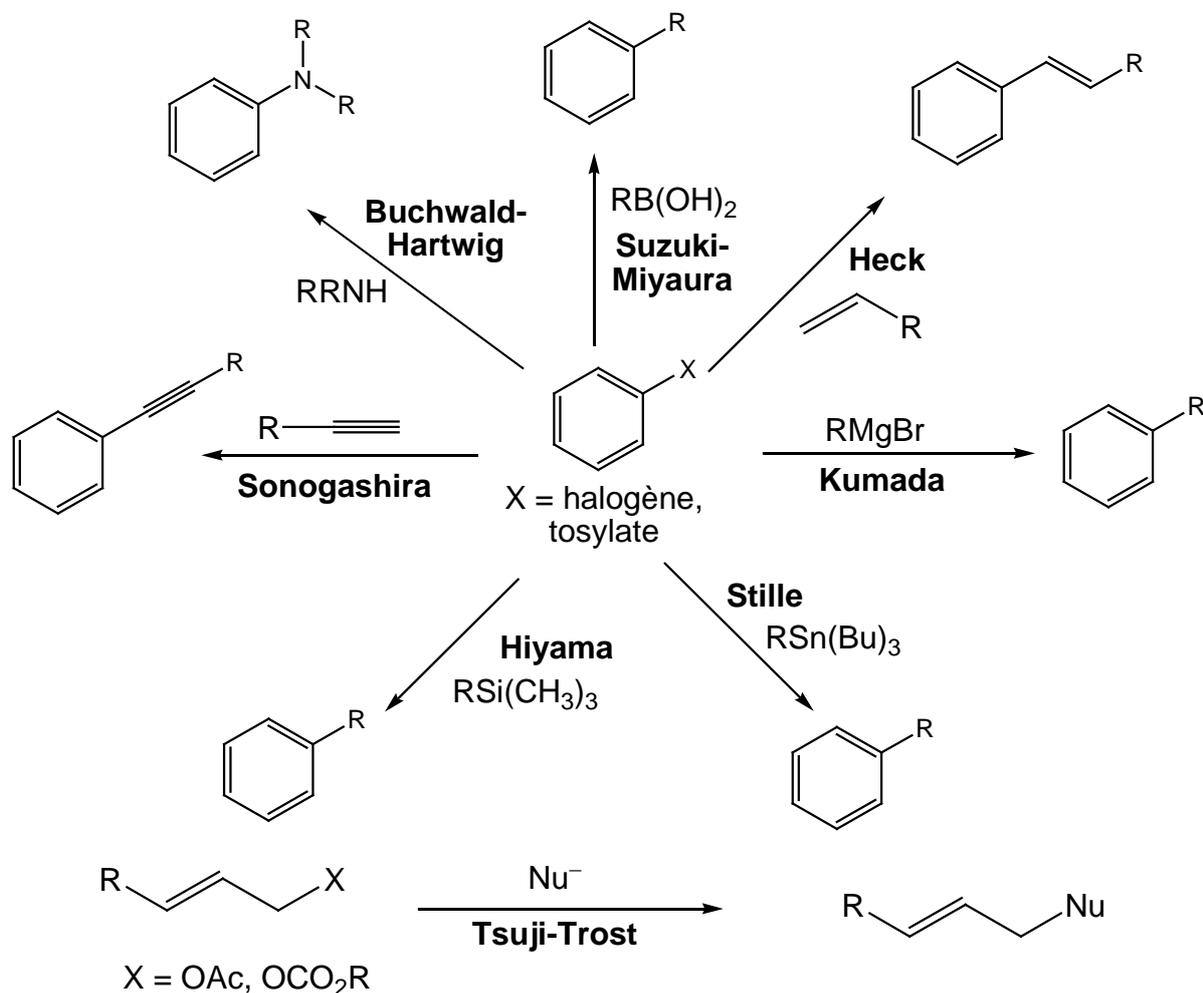


Schéma 22.

II. 3. La réaction de Sonogashira en chimie des nucléosides :

Cette réaction catalysée au Pd(0) peut être utilisée pour la modification d'une structure de type nucléosidique^[9]. La modification de l'hétérocycle sur un nucléoside, *via* une réaction de couplage de Sonogashira, permet une fonctionnalisation en position C-5 de pyrimidines ou sur

les positions C-2, C-6 ou C-8 de purines, et a été largement utilisée par le passé pour l'accès à des structures aux propriétés variées (Schéma 23).

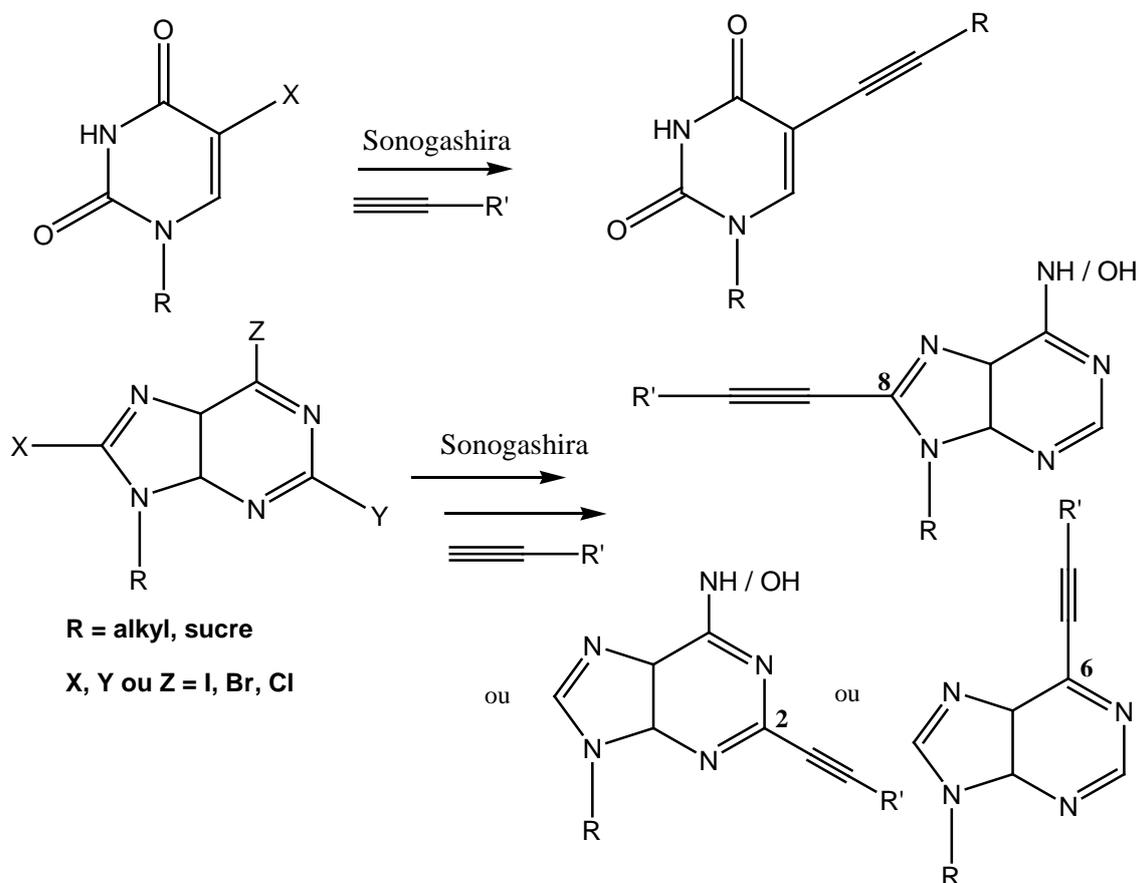


Schéma 23.

Par exemple, cette réaction de Sonogashira a été appliquée à la synthèse d'analogues d'un agent anti-VIH : le HEPT ^[179]. Le composé iodé **62** a été engagé dans des réactions de type Sonogashira avec différents alcynes dans un mélange MeCN/Et₃N et en présence de CuI et de palladium pour donner les dérivés **63 a-c** avec des rendements modérés à bons (Schéma 24).

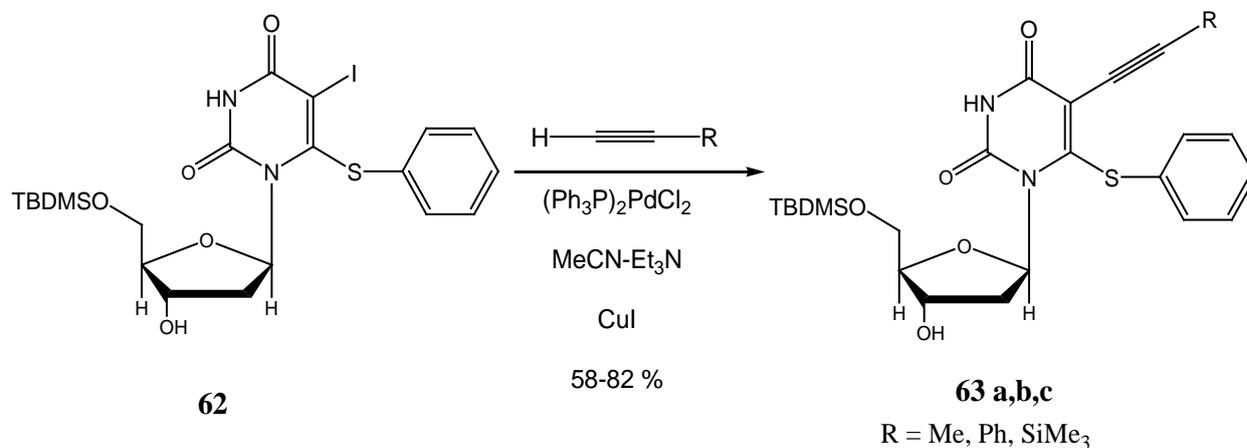
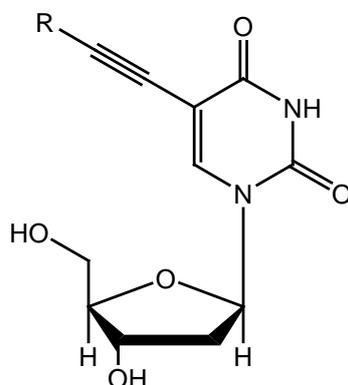


Schéma 24.

Cette réaction a aussi été utilisée pour l'obtention des nucléosides **64a-d** aux propriétés anti-herpétiques. Les 5-alkynyl-2'-déoxyuridines **64a-d** ont également été évaluées en tant qu'agents antiviraux (Figure 20) ^[8].



64 a,b,c,d

R = Bu, Ph, Cl(CH₂)₃, NC(CH₂)₃.

Figure 20.

Lors des réactions de Sonogashira sur la 5-iodo-2'-déoxyuridine **65** ^[180], la formation minoritaire de composés de type furanopyrimidine **67** parfois peut être observée, issus de la cyclisation de l'alkyne **66** (Schéma 25). L'équipe de McGuigan ^[181] a récemment montré que ces dérivés bicycliques de type **67** possèdent une activité et une sélectivité remarquable vis-à-vis du VZV (Varicella Zoster Virus). La cyclisation du composé **66** pour donner **67** a été décrite par Robins ^[182] avec des rendements relativement faibles (< 20%), et a été optimisée par Aucagne (rendement quantitatif) ^[183].

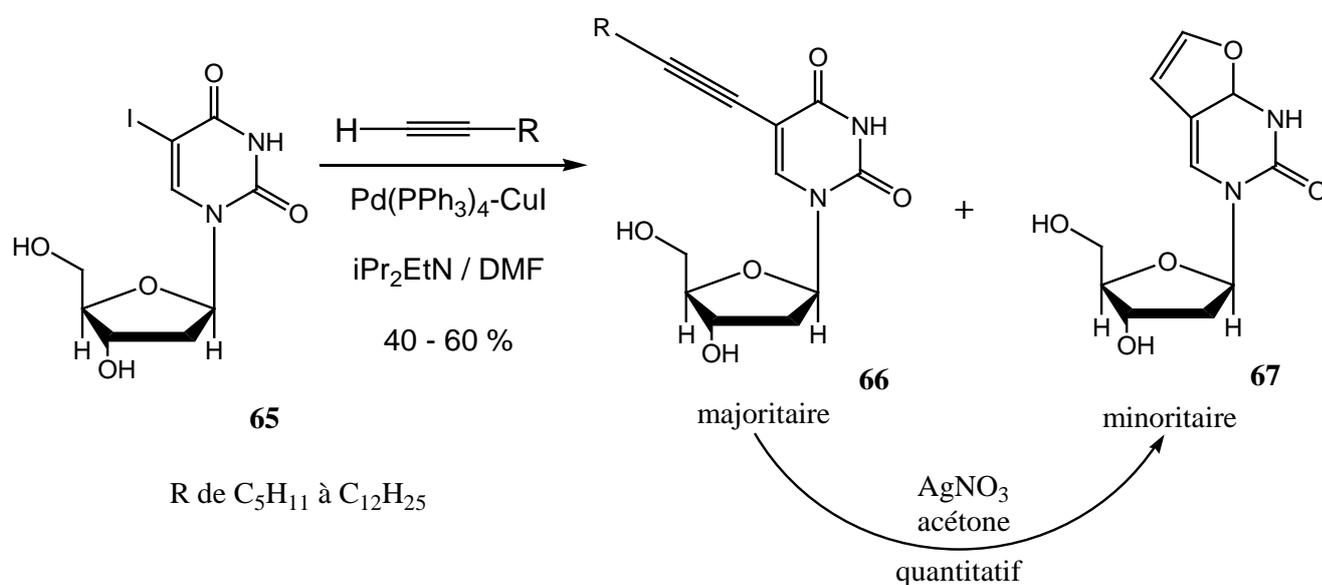


Schéma 25.

Le couplage de Sonogashira a aussi été réalisé sur diverses positions d'une base purique. Par exemple, un couplage de Sonogashira en position 6 suivi d'un couplage catalysé au cuivre donne l'accès à des paires de bases covalentes **68-69**, qui peuvent s'intercaler dans l'ADN, inhibant ainsi sa synthèse de *novo* et la division cellulaire ^[184]. Tandis qu'un couplage en position 2 permet d'obtenir des agonistes des récepteurs d'adénosines **70** (Figure 21) ^[185].

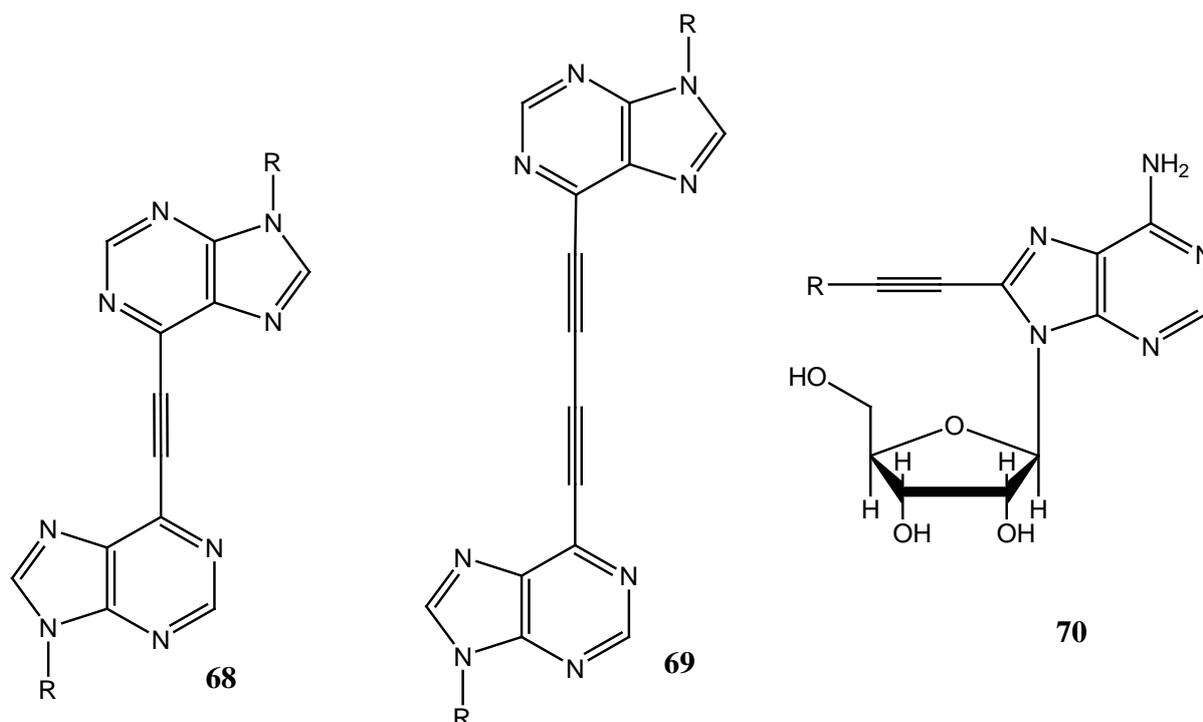


Figure 21 : Formule chimique d'intercalant de l'ADN (**68-69**) et de la 2-éthynyl-adénosine (**70**), agoniste des récepteurs d'adénosine.

II. 4. Le nucléoside carbocyclique :

Un nucléoside carbocyclique est un analogue de nucléoside naturel, dans lequel l'atome d'oxygène du furanose est remplacé par un groupement méthylène. En conséquence, la liaison *N*-glycosidique est résistante aux enzymes spécifiques de nucléosides du type hydrolases et phosphorylases, ce qui rend le nucléoside carbocyclique plus résistant à la dégradation métabolique ^[186]. Il est intéressant de noter que dans certains cas, la substitution d'un sucre par un carbocycle n'affecte pas la reconnaissance du nucléoside par les enzymes telles que les kinases ou les enzymes cibles. Grâce à cela, les nucléosides carbocycliques ont retenu l'attention en tant qu'agents potentiels utilisables en chimiothérapie (Figure 22) ^[187], tels l'Abacavir **73** ou l'Entecavir **74** ^[188].

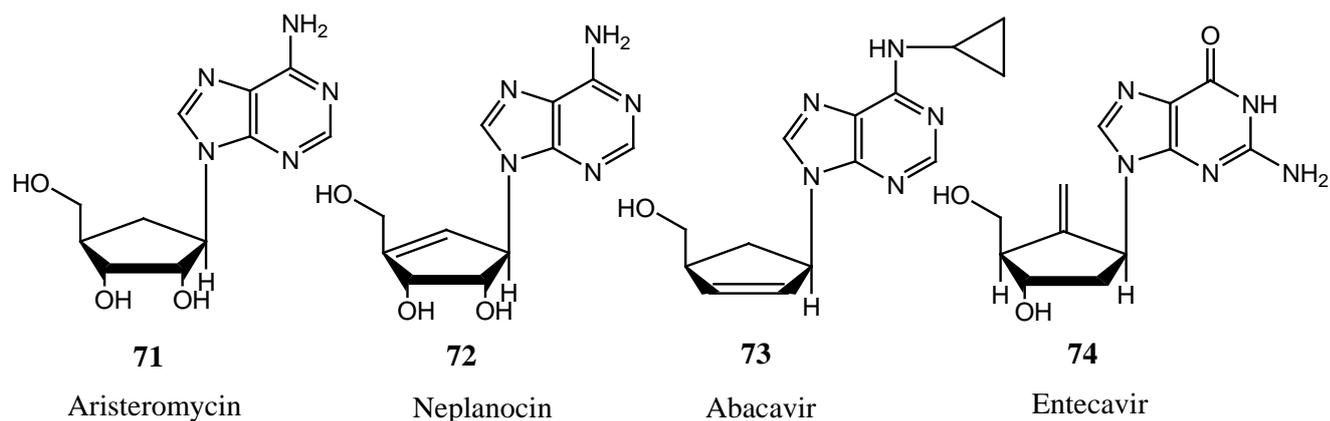


Figure 22 : nucléosides carbocycliques importants en chimiothérapie antivirale.

L'importance pharmaceutique du nucléoside carbocyclique a incité la conception et la synthèse de beaucoup d'exemples de ce type de composés montrant une activité contre le VIH, le VHB ou les virus à herpès HSV-1 et HSV-2 ^[189]. Récemment, des nucléosides carbocycliques ont été reportés comme présentant des activités antivirales contre des virus orthopox (dont la variole) ^[190] ou le West Nile virus ^[191]. Ce dernier faisant partie de la famille *Flaviviridae* comme l'hépatite C, et servant également de modèle pour des tests d'inhibition de la réplication de ce virus, ^[192] il paraît intéressant de considérer les carbocycles comme des agents potentiels anti-VHC.

Il n'existe qu'un seul traitement contre le VHC. Il s'agit d'une thérapie combinée d'interféron α et de ribavirine (**75**), un analogue de nucléoside naturel comportant un hétérocycle 1,3,5-triazole. Des analogues de ce nucléoside ont été synthétisés par Saito ^[193], de nature carbocyclique et comportant un hétérocycle de type 1,2,3-triazole (Figure 23).

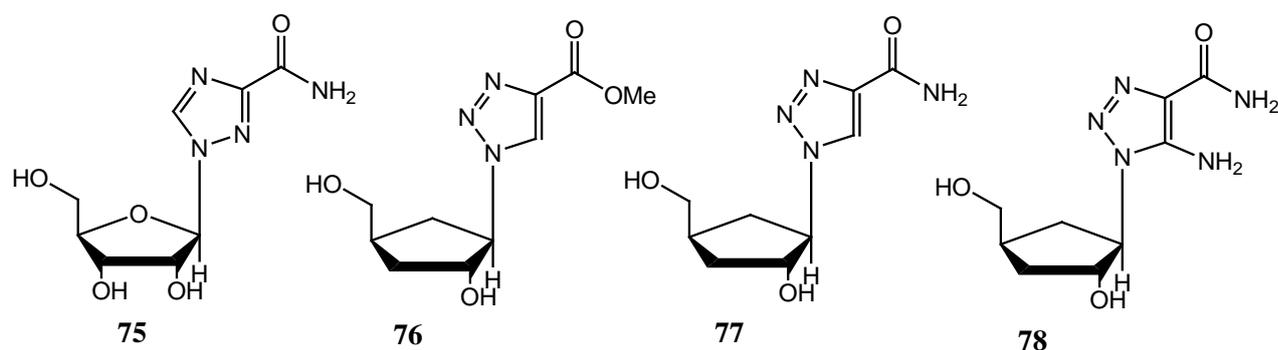


Figure 23 : Ribavirine **75** et ces analogues carbocycliques **76-78** portant un hétérocycle de type triazole

Joubert et coll ^[194] ont introduite un tel hétérocycle en raison de l'attention qu'a suscité cette structure depuis de nombreuses années en terme d'activité biologique ^[195] : certaines molécules possédant ce motif ont en effet montré des activités antivirales ^[196], antitumorales, ^[197]Antimicrobiennes ^[198] ou anti-prolifératives ^[199].

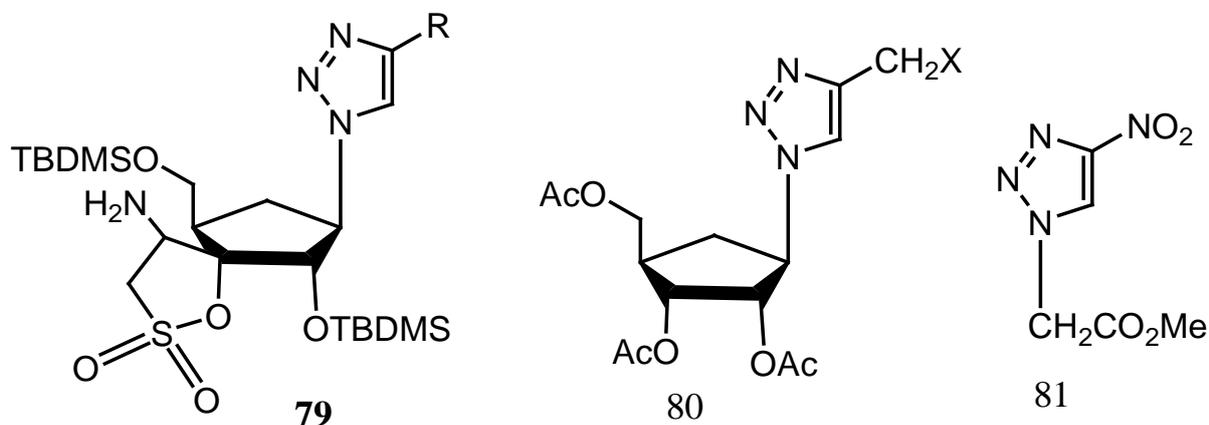


Figure 24 : Structures chimiques de triazoles bioactifs.

Par exemple, **79** a montré une activité anti-VIH, ^[200] tandis que **80** possède une activité cytostatique ^[201]. **81** quant à lui est un radio-sensibilisateur ^[202] (Figure 24).

Malheureusement, de tous les composés synthétisés (**76-78**), aucun n'a montré un pouvoir d'inhibition de la réplication du VHC supérieur à celui de la ribavirine **75** dans le système réplicon (cellules Huh-7). De plus un seul d'entre eux (**78**) a montré un pouvoir d'inhibition (EC₅₀) modéré contre le VIH-1 dans les cellules PBM de l'ordre du micromolaire (43,8 μM) sans aucune cytotoxicité vis-à-vis des cellules PBM, CEM, VERO et Huh-7.

Ce manque d'activité peut avoir plusieurs origines. La première serait que ces analogues de nucléosides sont trop polaires pour rentrer dans la cellule. La seconde hypothèse serait une absence de reconnaissance par les kinases. N'étant pas phosphorylés, les nucléosides ne pourraient pas atteindre leur forme active triphosphorylée. Ou alors, et c'est une autre possibilité, bien qu'ils soient triphosphorylés par les kinases, ils ne cibleraient pas la polymérase virale et ne pourraient donc pas viser la réplication du VHC.

Joubert et coll ^[194] ont modifié la structure de cette famille de nucléosides, par l'introduction d'un alcyne portant une chaîne alkyle et/ou aryle en position 5, pour augmenter la lipophilie de la molécule. Ils ont conservés l'hétérocycle triazole pour ses propriétés chimiques et biologiques dignes d'intérêt, et le carbocycle pour sa stabilité accrue par rapport au sucre furanose. Ils ont choisi de rester en série 3'-déoxyribofuranosyle dans le but de valoriser la synthèse du composé **78** (Schéma 26).

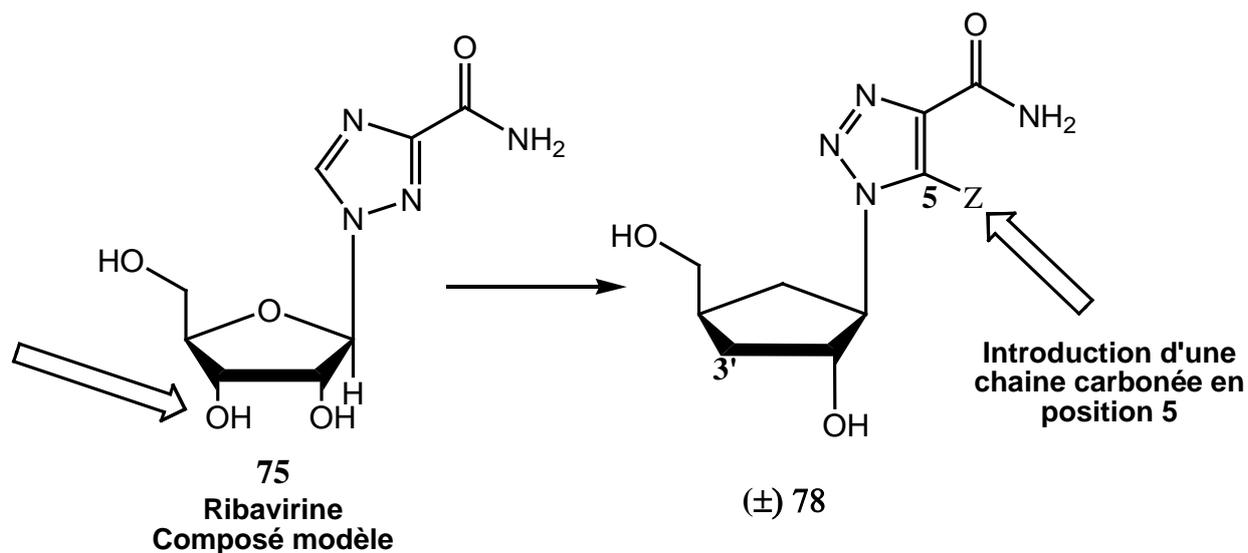


Schéma 26. Nouveaux analogues à synthétiser.

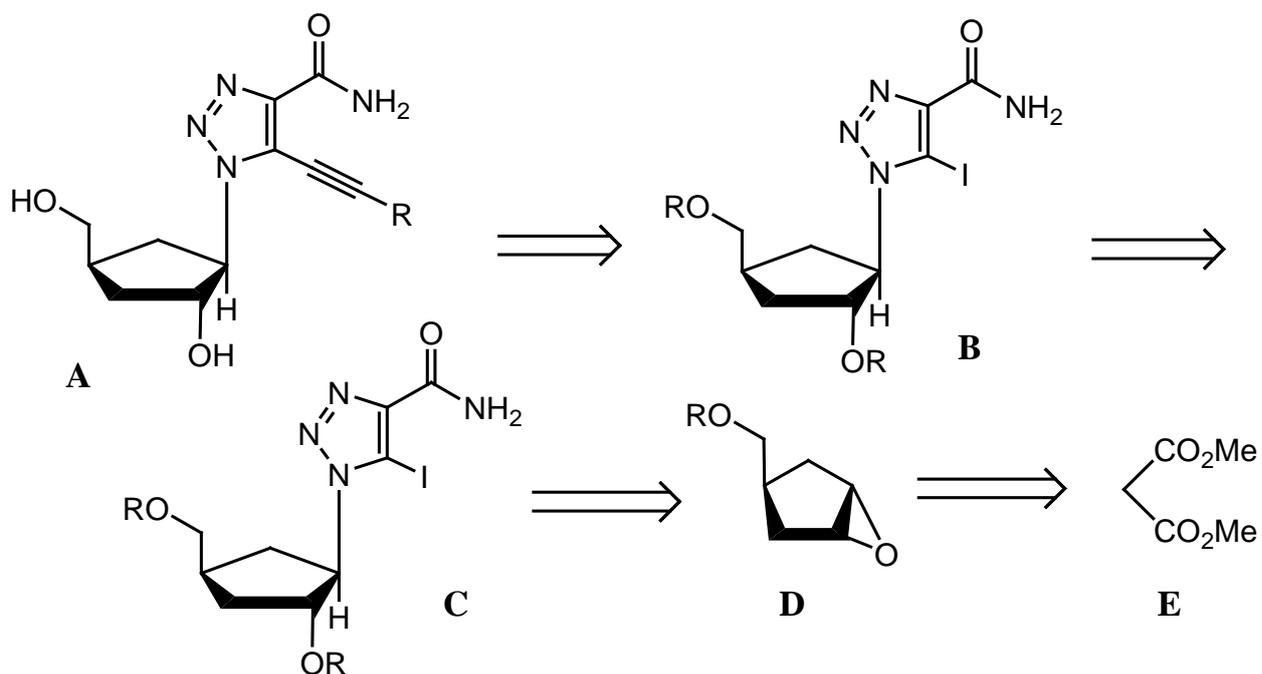


Schéma 27. Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention de nouveaux dérivés triazolo carbocycliques.

L'introduction de la chaîne carbonée pour obtenir le composé **A** se fait en dernier pour permettre une fonctionnalisation variée, *via* une réaction de couplage de Sonogashira catalysée au palladium sur le composé **B**, qui est obtenu par transformation d'une amine en iode sur **C**. L'hétérocycle du composé **C** est introduit *via* une ouverture de l'époxyde **D** et par construction *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire. Enfin, l'époxyde **D** proviendrait lui-même d'une synthèse malonique à partir de **E**.

II. 5. Synthèse de l'hétérocycle triazole *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire :

Les composés possédant un motif 1,2,3-triazoles sont utilisés pour leur valeur thérapeutique^[203], ou en tant qu'intermédiaires synthétiques dans la préparation de nombreux composés médicaux,^[204] et trouvent de nombreuses applications dans la chimie industrielle.^[205]

La cycloaddition 1,3-dipolaire, qui est une réaction de cycloaddition entre un dipôle 1,3 (azide) et un alcyne (ou un alcène) substitué pour former un cycle à 5 chaînons (Schéma 28), est la meilleure méthode pour la préparation de composés de type 1,2,3-triazoles,^[206,207]

D'une part, l'introduction d'un groupement azido dans une molécule organique *via* une substitution nucléophile d'un halogénure ou l'ouverture d'un hétérocycle avec de l'azoture de sodium est aisée (NaN_3 est un excellent nucléophile de part sa petite taille).^[208] D'autre part, plusieurs partenaires de cycloaddition peuvent être utilisés pour produire une large variété d'hétérocycles. Rolf Huisgen^[209] a été le premier à entrevoir les perspectives offertes par cette réaction et l'importance que prendrait cette réaction pour la synthèse organique en faisant varier le dipôle 1,3 lors de la mise au point de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

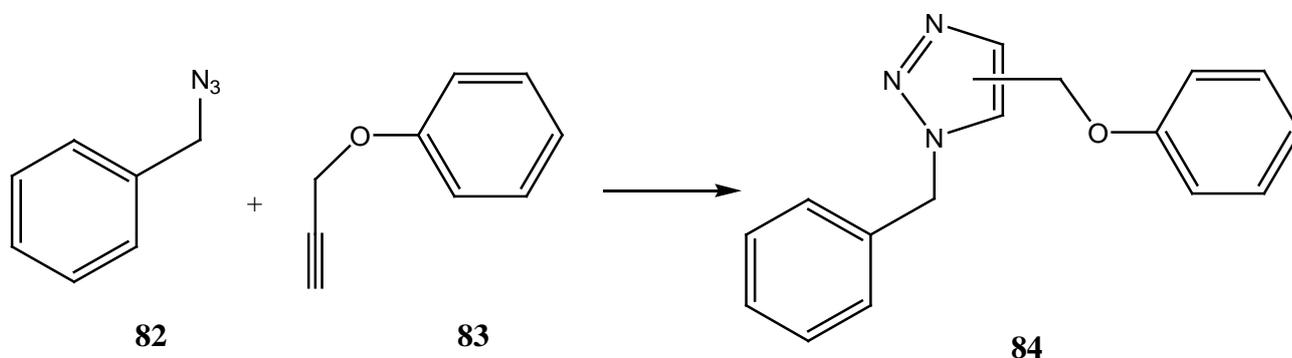


Schéma 28. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

Dans la réaction ci-dessus (Schéma 28), l'azoture **82** réagit d'une manière ordonnée avec l'alcyne **83** pour donner le triazole **84** sous forme d'un mélange d'un produit d'addition 1.4 et d'un produit d'addition 1.5 à 98° C en 18 heures. La régiosélectivité de la réaction peut être améliorée par ajout de cuivre.^[210]

Les cycloadditions ont un temps de réaction plus faible lorsque l'acétylène porte un groupement électroattracteur, alors que leur présence sur l'azoture produit l'effet inverse.

Plusieurs substituants activateurs portés sur l'acétylène ont été utilisés comme l'alkoxycarbonyle^[211] ou d'autres groupes électroattracteurs tels que les groupements carboxylique, acyle, cyano, arylique, haloalkyle, triméthylsilyle, phénylesulfonyle ou phosphonates fonctionnalisés.^[212] Une fonctionnalisation sur l'acétylène joue un rôle important dans la cinétique des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire ; par exemple, les réactions avec des substituants de type alkoxycarbonyle sont rapides et requièrent une basse température de réaction.

Chapitre 4

Partie expérimentale

Méthodes générales :

Les manipulations en milieu anhydre sont effectuées dans a verreries séchées à l'étuve, avec des solvants anhydres distillés selon les procédés décrits par Perrin ^[213].

Ainsi le dioxane est distillé sur P₂O₅ et le sodium et la pyridine distillée sur BaO et le NaH et le triéthylamine distillé après quand le mettre sur le KOH.

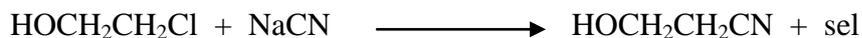
Les contrôles chromatographiques sur couche mince sont réalisés sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice E. Merck 60 G₂₅₄ (épaisseur 0,2 mm). La visualisation est effectuée sous une lampe UV à 254 nm.

Les séparations chromatographiques flash sont effectuées sur gel de silice E. Merck (0,063 - 0,2 mm) ou (0,2 - 0,5 mm).

Les spectres infra rouge (I.R) sont enregistrés sur un spectromètre Shimadzu FTIR-8201 PC.

Les échantillons sont préparés sous forme de pastille de bromure de potassium (KBr pellet) pour les solides et sous forme de film entre deux pastilles de chlorure de sodium pour les huiles et les gommés. La longueur d'onde des bandes est exprimée en cm⁻¹.

Les spectres de RMN sont donnés avec un appareille H-250.13 MHz, les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tetraméthylesilane (TMS) utilisé comme référence. Les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

1. a) La préparation de l'hydroxy-3-propionitrile HOCH₂CH₂CN :

Dans un ballon tricol on introduit 90 gr de NaCN finement broyée, et 126 ml de HOCH₂CH₂Cl et fait 36 ml d'eau distillé, puis on lie le thermomètre et l'agitateur mécanique a travers le tricol, on met l'ensemble dans un bain marie et on chauffe à 45° C pendant une heure avec une forte agitation, on lever la température à 48° C pendant une heure, et on augmenté encore la température à 50° C pendant 5 heures.

Et pour que non pas abîmer la réaction, il faut que la température ne dépasse pas 50° C.

On refroidit le mélange réactionnel à température ambiante, on filtre sur Büchner, on fait une distillation sous vide, (115° – 116° C/ 10 mmHg).

Notre produit est passé en troisième dans le mélange parce qu'il a la température d'ébullition la plu élever dans les conditions normal (228° C / 760 mmHg).

Finalement, on met le produit dans un ballon bien fermer.

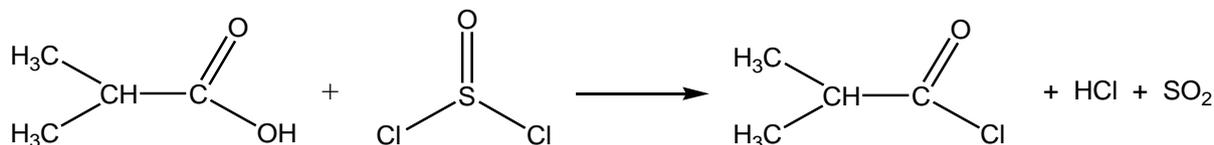
1. b) La préparation d'isobutyryl chloride :

Schéma 29.

Dans un tricol on met 50 ml (0,685 moles) de SOCl₂ fraîchement distillé, et on lie le thermomètre et le réfrigérant , protéger de l'humidité par le CaCl₂ et une ampoule a brome.

On met l'ensemble dans un bain marie à 0° C, on ajoute 56 ml (0,602 moles) d'acide isobutyryle goutte à goutte, et on augmente la température à 80° C pendant une demi-heure.

Finalement, on fait le distillation du produit obtenu (89 – 91° C) dans un bain d'huile, et on conserve le produit bien fermer.

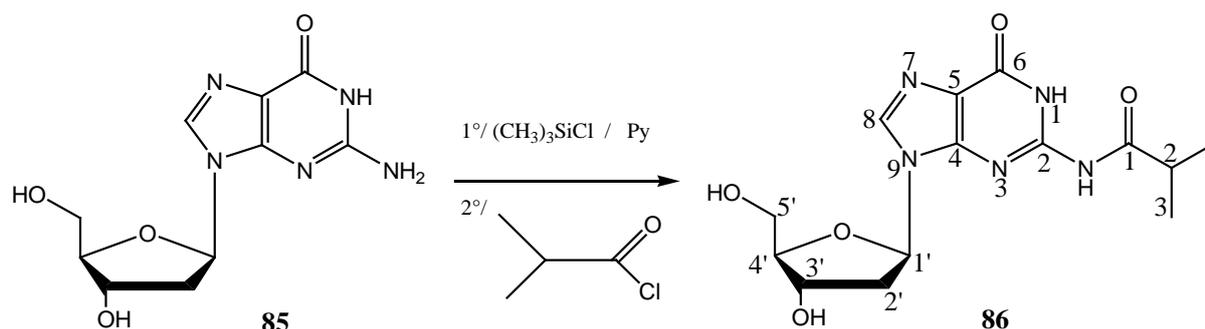
2. a) Préparation de N²-isobutyryl-2'-déoxyguanosine :

Schéma 30.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (3,745 mmoles) de 2'-déoxyguanosine (**85**) et on sèche avec (3 × 6,8 ml) de pyridine anhydre et on dissout dans 10,21 ml (0,126 moles) de solvant (pyridine) et on ajoute 2,37 ml (18,725 mmoles) de Chlorotriméthylsilane avec l'agitation pendant deux heures et demi pour fixer les groupement hydroxyl 3', 5'- du sucre, puis on ajoute 3,064 ml (29,25 mmoles) d'isobutyrylchloride et on suit l'agitation encore deux heures et demi.

Et pour finir la réaction on ajoute 1,021ml (56,72 mmoles) d'eau ; après 5 minutes on ajoute 1,021 ml (54,65 mmoles) d'ammoniaque et après 10 minutes on refroidit dans un bain de glace et on évapore.

On ajoute après 30 ml d'eau et on fait une extraction avec le chloroforme (3 × 20 ml).

Notre produit est soluble dans l'eau, on le concentre au maximum à l'évaporateur rotatif, jusqu'à l'obtention d'un produit solide, et il est blanc.

m = 0,77 gr. Rdt. = 63,25 %.

R_f = 0,55 MeOH / CHCl₃ (1/19). T_f = 84 – 86° C.

2. b) Préparation de N²-isobutyryl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine :

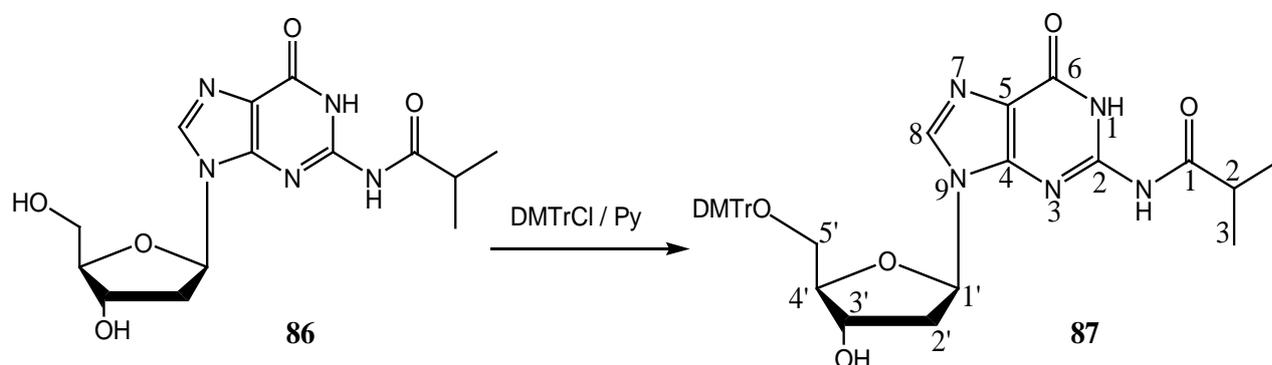


Schéma 31.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,5 gr (1,483 mmoles) de N²-isobutyryl-2'-déoxyguanosine (**86**), et on sèche avec (2 × 3ml) de pyridine anhydre, et on met 5,93 ml (73,58 mmoles) de même pyridine et on ajoute 0,52 gr (1,63 mmoles) de Chloro-4,4'-diméthoxytrityl avec l'agitation pendant deux heures, et on ajoute encore 0,052 gr (0,163 mmole) de ce réactif ; après deux heures, on ajoute 2,23 ml (38,87 mmoles) d'éthanol et après 30 minutes, on évapore sans sécher la solution, puis on ajoute 30 ml de chloroforme et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

On sèche avec le Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

On fait une Chromatographie sur colonne (0 – 8 %) MeOH, CH₃Cl.

On obtient un solide blanc.

m = 0,64 gr. Rdt = 67,5 %.

T_f = 144 – 146° C, R_f = 0,66 MeOH / CHCl₃ (1/19).

Tableau (5) : Données RMN-¹³C et RMN¹H (250 MHz, C₅D₅N) du produit 87.

Le groupement de carbone ^{13}C	Déplacement chimique δ (ppm)	Le groupement de proton ^1H	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
$\text{N}^2\text{-C=O}$	181.45	N_1H	10.21	H, s
$5'\text{-O-C}_4, \text{C}_4''$	160.28	$\text{N}^2\text{-H}$	9.98	H, s
$\text{O=C}_6\text{-N}$	157.40	$\text{N=C}_8\text{H}$	9.19	H, s
$=\text{C}_4\text{-N}$	150.52	$5'\text{-O-C}_4'\text{H (Ar)}$	9.00	H, tt, $J_o = 8.65$ Hz
$\text{N=C}_2\text{-N}$	150.27	$5'\text{-O-C}_3'\text{H},$	8.79	2H, m (td)
$\text{N=C}_8\text{-N}$	147.02	$5'\text{-O-C}_5'\text{H (Ar)}$		
$5'\text{-O-C}_1' \text{ (Ar)}$	138.50	$5'\text{-O-C}_2'\text{H}, \text{C}_6'\text{H (Ar)}$	8.70	2H, m (ddd)
$5'\text{-O-C}_1 \text{ (Ar)}$	137.65	$5'\text{-O-C}_2'\text{H}, \text{C}_6'\text{H (Ar)}$	8.38	2H, t, $J_o = 8.71$ Hz
$5'\text{-O-C}_1'' \text{ (Ar)}$	137.56	$5'\text{-O-C}_2''\text{H}$ $5'\text{-O-C}_6''\text{H (Ar)}$	8.13	2H, dd, $J_o = 12.87$ Hz $J_m = 6.43$ Hz
$5'\text{-O-C}_3', \text{C}_5'$	131.82	$5'\text{-O-C}_3'\text{H},$ $5'\text{-O-C}_5'\text{H (Ar)}$	7.13	2H, m
$5'\text{-O-C}_2, \text{C}_6$	129.87	$5'\text{-O-C}_3''\text{H},$ $5'\text{-O-C}_5''\text{H (Ar)}$	6.42	2H, dd, $J_o = 8.33$ Hz $J_m = 4.85$ Hz
$5'\text{-O-C}_2'', \text{C}_6''$	129.51	$\text{C}_1'\text{H}_e$	6.14	H, dd, $J_{ea} = 4.22$ Hz
$5'\text{-O-C}_2', \text{C}_6'$	128.43	$\text{C}_4'\text{H}_e$	4.44	H, td, $J_{ea} = 6.48$ Hz $J_{ee} = 2.92$ Hz
$5'\text{-O-C}_4'$	127.53	$\text{C}_5'\text{H}_e$	4.37	H, dd, $J_3 = 4.34$ Hz $J_{gém} = 6.87$ Hz
$=\text{C}_5\text{-N}$	123.32	$\text{C}_5'\text{H}_a$	4.18	H, m, (dd)
$5'\text{-O-C}_3, \text{C}_5,$ C_3', C_5'	114.87	$\text{C}_3'\text{H}_e$	3.69	H, m (td)
$5'\text{-O-C}$	88.69	$-\text{O-CH}_3$	3.49	3H, s
C_4'	87.95	$-\text{O-CH}_3$	3.48	3H, s
C_1'	85.16	$\text{N}^2\text{-HC}_2$	3.23	H, septdoublet
C_3'	72.89	$\text{C}_2'\text{H}_e$	3.23	H, m, (ddd)
C_5'	66.24	$\text{N}^2\text{- (CH}_3)$	2.77	3H, d, $J_3 = 2.42$ Hz
$2(-\text{O-Me})$	56.40	$\text{N}^2\text{- (CH}_3)$	2.74	3H, d, $J_3 = 2.43$ Hz
C_2'	42.01	$\text{C}_2'\text{H}_a$	2.38	H, m (ddd)
$\text{N}^2\text{- O=C-C}_2$	37.49	$\text{HO-C}_3'$	2.36	H, s

N ² - C ₃	20.39
---------------------------------	-------

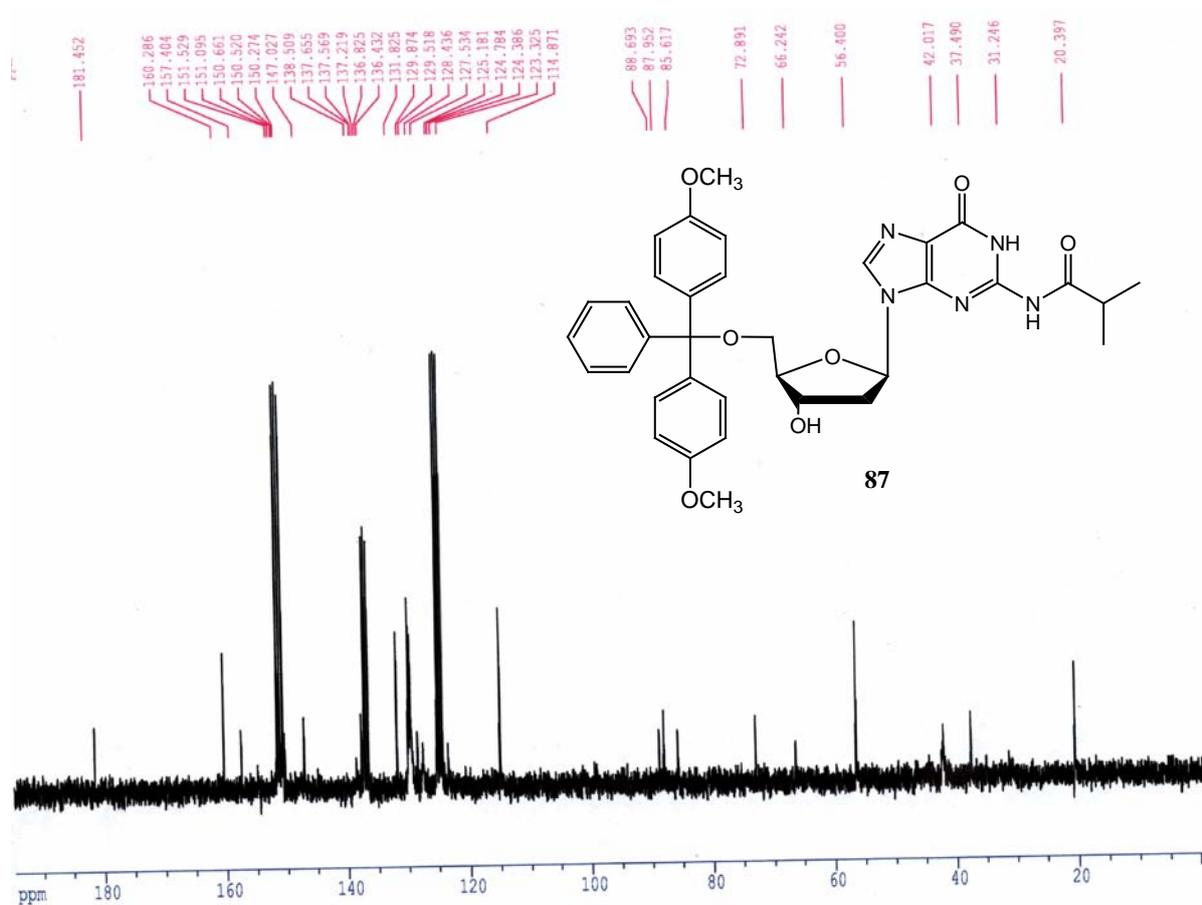


Figure 25. Spectre RMN ¹³C (250 MHz, C₅D₅N) du nucléoside 87.

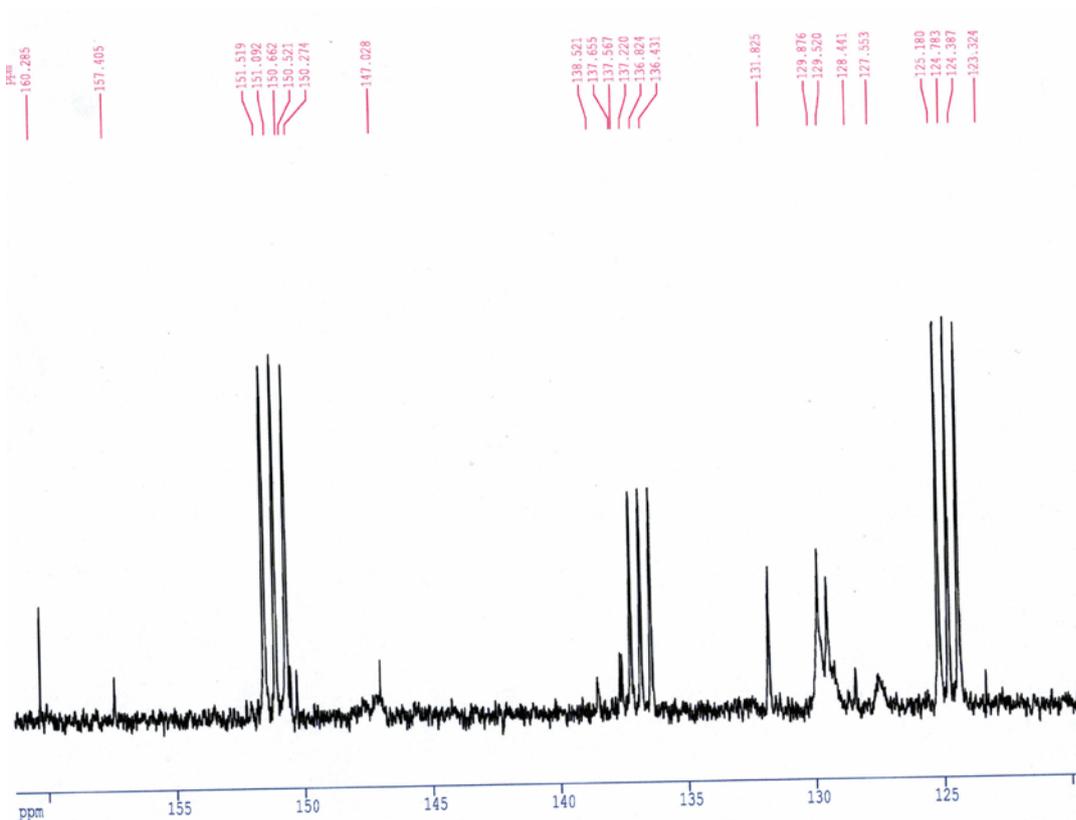


Figure 26. L'extension de ce spectre.

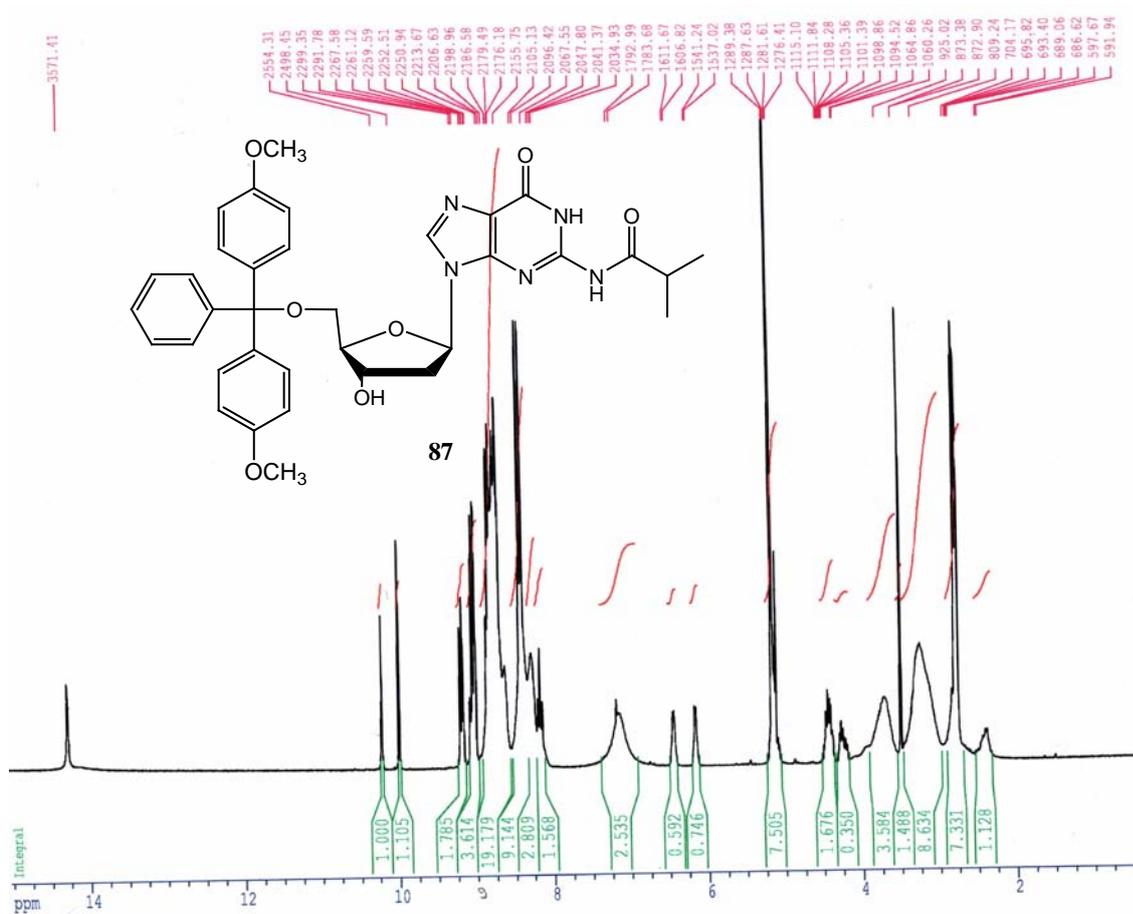


Figure 27. Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du nucléoside 87.

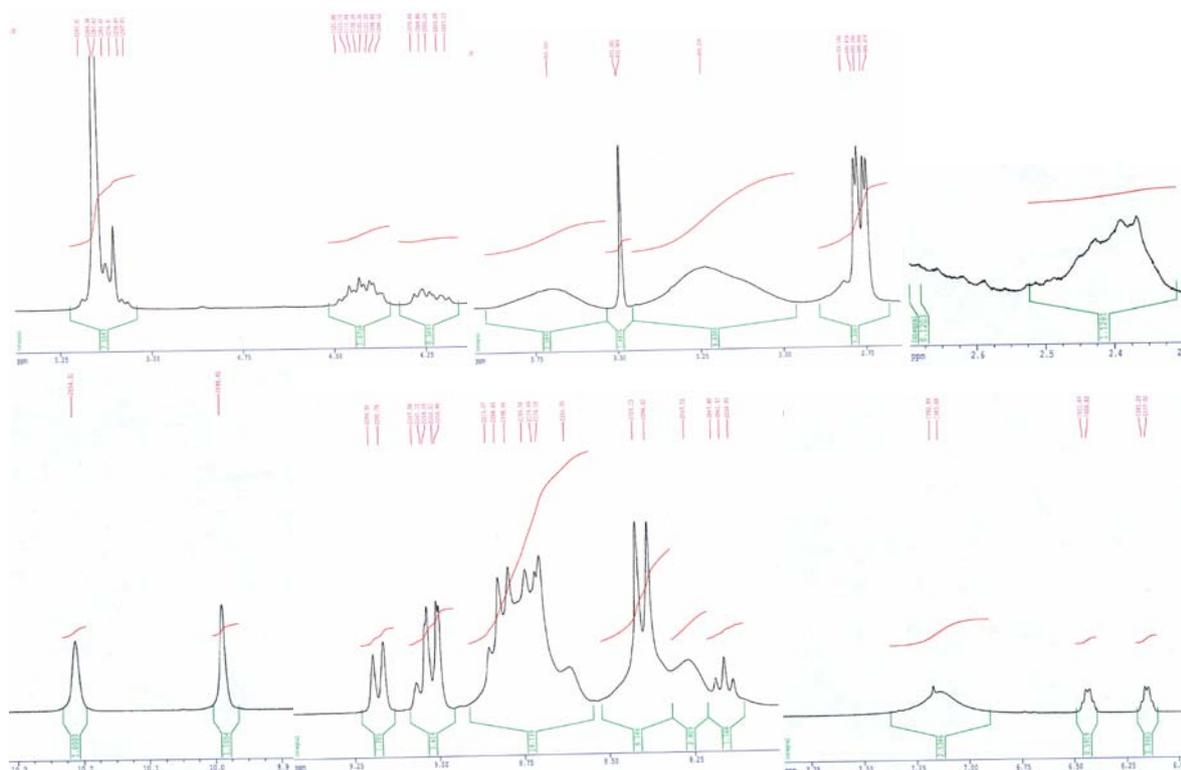


Figure 28. L'extension de ce spectre.

Tableau (6) : données I.R du produit 87.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O–H	alcool secondaire	3197
ν_a CH ₂	aliphatique	2935
ν C=O	amide secondaire	1681
ν C=C	C=C conjuguée	1608
ν C=N	couplé avec ν C=C	1558
δ N–H	amide secondaire	1508
δ CH ₂	cycloalcane	1469
δ_s CH ₃	aliphatique	1404
ν C–N	amide secondaire	1249
ν C–C	isopropyl	1180
ν C–O–C	ether aliphatique	1087
ν C–O	alcool	1033

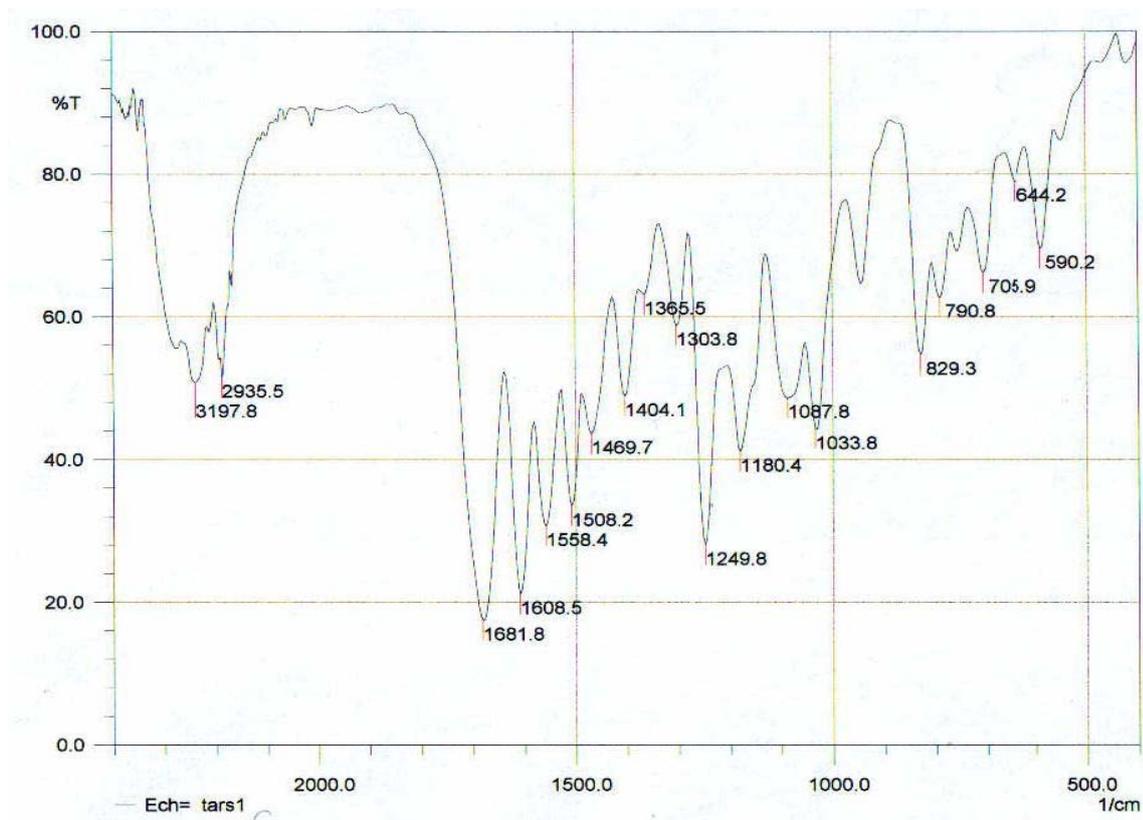


Figure 29. Spectre IR du nucléoside 87.

2. c) Préparation de N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine :

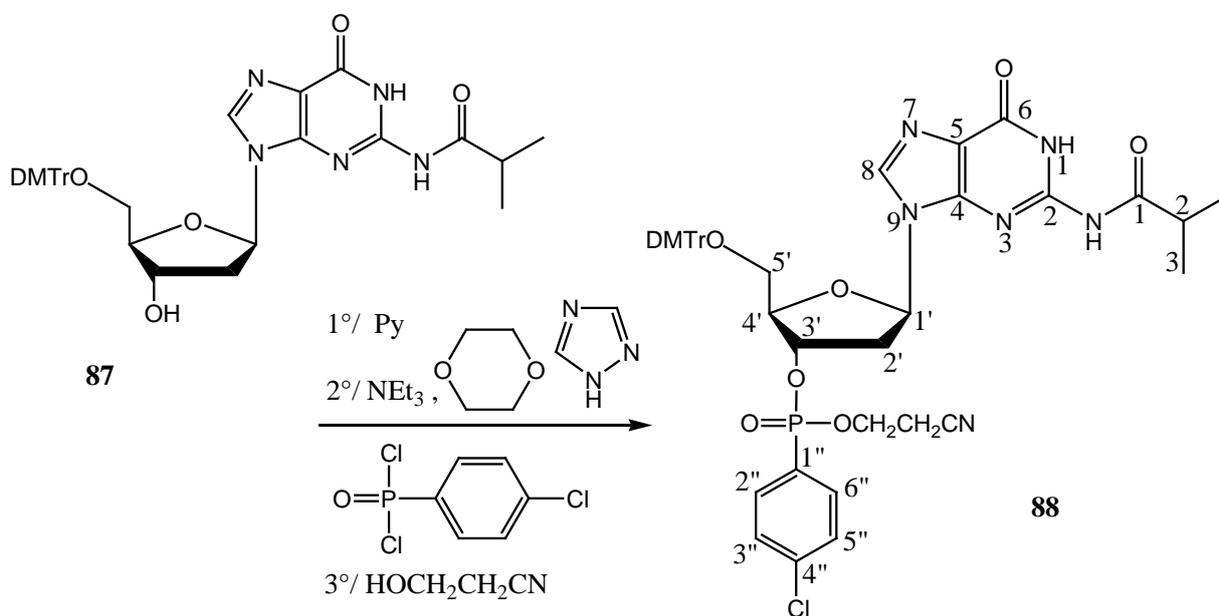


Schéma 32.

Dans un ballon monocol de 100ml, on met 0,4 gr (5,67 mmoles) du triazole, 0,66 ml (4,78 mmoles) du triéthylamine, et 6,67 ml (78 mmoles) de dioxane anhydre, et avec l'agitation on ajoute 0,4 ml (2,85 mmoles) du *p*-Chlorophénylphosphodichloridate.

Et après 30 minutes d'agitation on filtre rapidement le mélange sur un autre mélange qui contient 0,5 gr (0,797 mmoles) de N²-isobutyryl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine (**87**) bien séché par la pyridine anhydre (3 × 4 ml) et 4 ml (49,6 mmoles) de pyridine.

On laisse la réaction à température ambiante pendant deux heures puis on ajoute 0,5 ml (7,33 mmoles) de 3-hydroxypropionitrile et on laisse pendant deux heures et demi, on contrôle par CCM (CHCl₃/ MeOH : 19/1).

Finalement, on refroidit dans bain de glace et on ajoute 1 ml (55,55 mmoles) d'eau, et on évapore rapidement à l'évaporateur rotatif.

Après, on ajoute 30 ml de chloroforme, et on fait une extraction avec (2 × 15 ml) d'eau, et on neutralise par NaHCO₃, on sèche par Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

On obtient un mélange des produits, on fait un CCM dans les plaques pour séparer notre produit, on obtient un solide vert jaunâtre.

$m = 0,134 \text{ gr}$, Rdt. = 19,66 %.

$T_f = 168 - 170 \text{ }^\circ \text{C}$, R_f = 0,80 MeOH / CHCl₃ (1/19).

Le mécanisme de la réaction est basé sur la formation d'un intermédiaire contient deux unités de triazole et un *p*-Chlorophénylphosphodichloridate, il réagit avec le produit de départ avant la fixation de 3-hydroxypropionitrile.

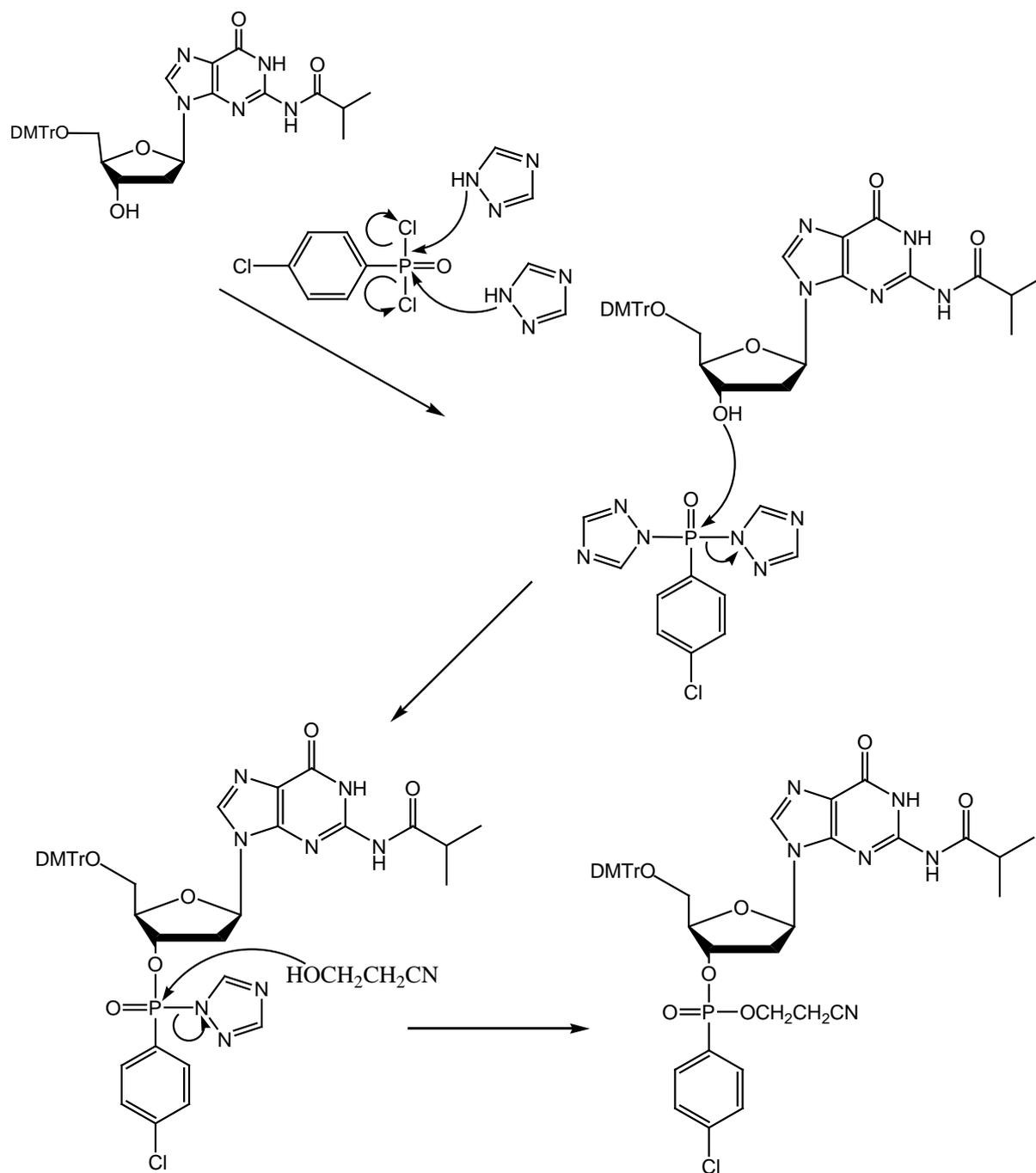


Schéma 33.

Tableau (7) : Données RMN¹H (250 MHz, C₅D₅N) du produit 88.

Le groupement de proton	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
N_1H	8.46	H, s
N^2-H	7.75	H, s
C_8H	7.72	H, s
$C_2''H, C_6''H$ (Ar)	7.56	2H, m (dd)
$C_3''H, C_5''H$ (Ar)	7.50	2H, m (dd)
$5'-O-HC_2, HC_6$ (Ar)	7.35	2H, m (dd)
$5'-O-HC_2'', HC_6''$ (Ar)	7.31	2H, m (dd)
$5'-O-HC_2', HC_6', HC_4',$ HC_3', HC_5' (Ar)	7.19	5H, s
$5'-O-HC_3, HC_5$ (Ar)	6.94	2H, dd, $J_o = 8.66$ Hz
$5'-O-HC_3'', HC_5''$ (Ar)	6.88	2H, dd, $J_o = 8.74$ Hz
C_1H_e	6.64	2H, dd, $J_{ea} = 4.69$ Hz
OCH_2CCN	5.09	2H, m (dd)
C_4H_e	4.64	H, m (td)
C_5H_e	4.57	H, m (dd)
C_5H_a	4.12	H, m (dd)
C_3H_e	3.66	H, m (td)
$2(-O-CH_3)$	3.66	6H, s
$-CH-CN$	3.35	H, t, $J_3 = 7.70$ Hz
$-CH-CN$	3.32	H, t, $J_3 = 6.98$ Hz
N^2-HC_2	2.91	H, septdoublet, $J_3 = 6.56$ Hz
C_2H_e	2.73	H, m (dt)
C_2H_a	1.98	H, dt, $J_{gém} = 10.59$ Hz
$N^2-C(CH_3)_2$	1.23	6H, d, $J_3 = 6.78$ Hz

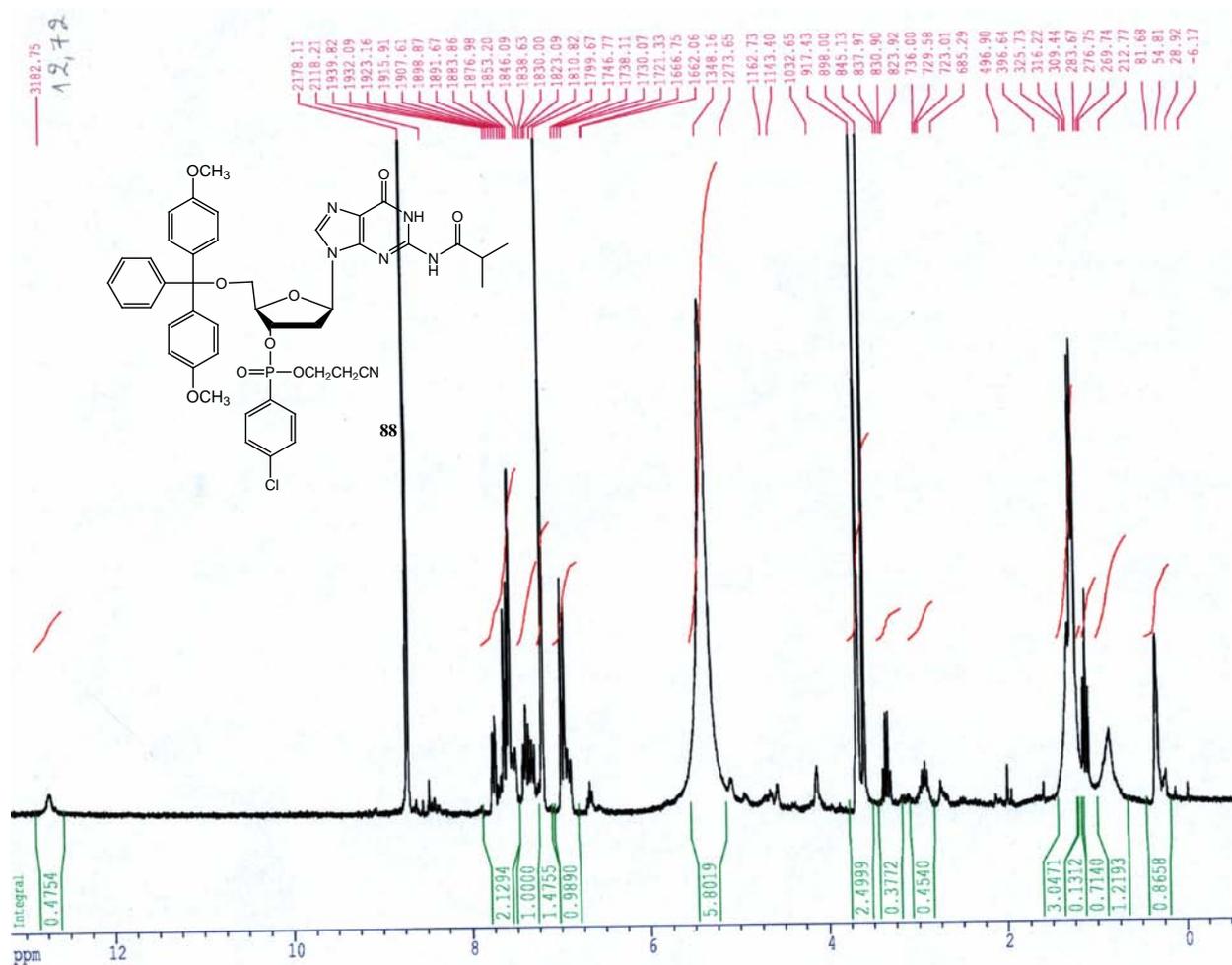


Figure 30. Spectre RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du nucléotide 88.

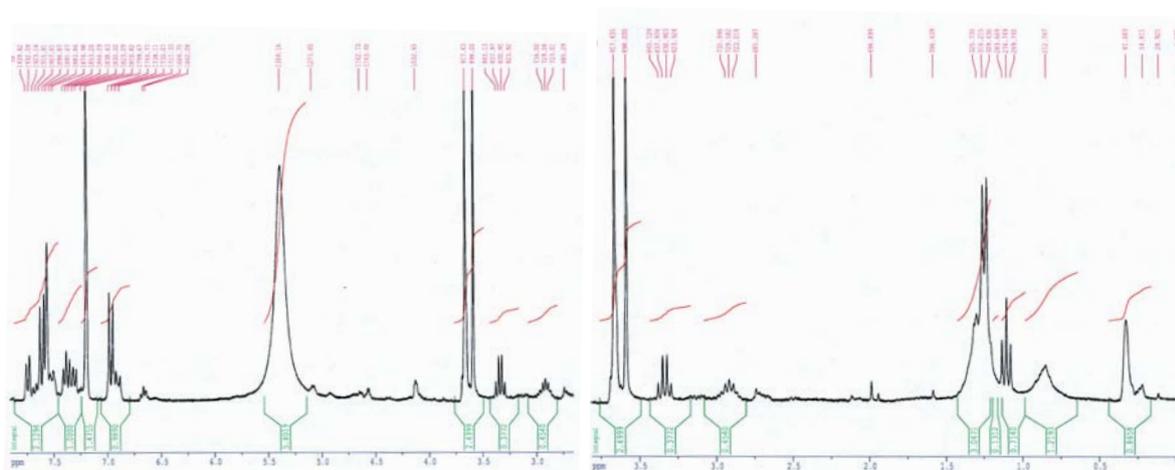
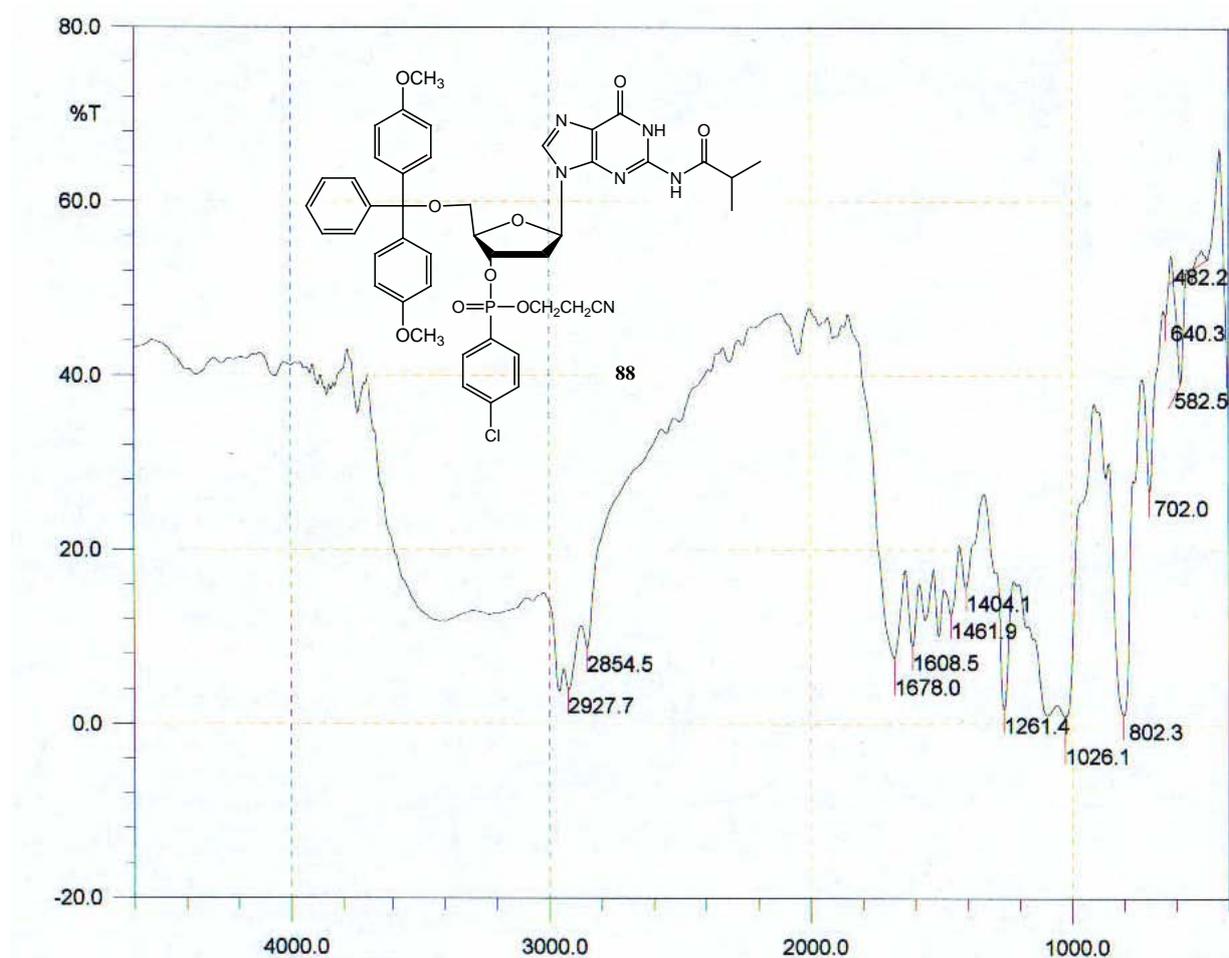


Figure 31. L'extension de ce spectre.

Tableau (8) : données I.R du produit 88.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
$\nu_a \text{CH}_2$	aliphatique	2927
$\nu_s \text{CH}_3$	aliphatique	2854
$\nu \text{C=O}$	amide secondaire	1678
$\nu \text{C=C}$	C=C conjuguée	1608
δCH_2	cycloalcane	1461
$\delta_s \text{CH}_3$	aliphatique	1404
$\nu \text{P=O}$	ester phosphorique	1261
$\nu \text{P-O-C}$	phosphate aliphatique	1026
$\nu \text{C-Cl}$	composé monochloré	802

**Figure 32.** Spectre IR du nucléotide 88.

2. d) Préparation de

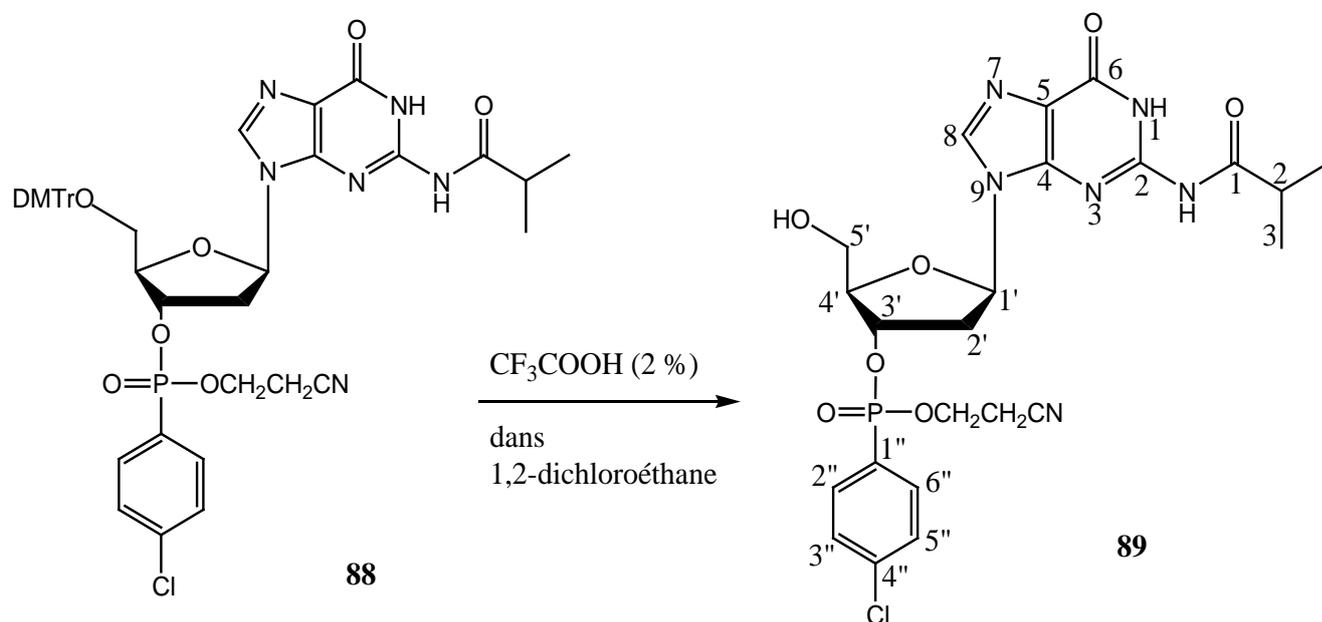
N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine :

Schéma 34.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,5 gr (0,585 mmoles) de N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyguanosine (**88**), et on dissout dans 5 ml de 1,2-dichloroéthane ClCH₂CH₂Cl, on refroidit jusqu'à 0° C, on ajoute 5 ml d'acide trifluoroacétique (2 %) dans 1,2-dichloroéthane, on observe l'apparition d'une couleur orange foncé.

On laisse le mélange pendant une heure à température ambiante, on neutralise le milieu réactionnel par une solution de KHCO₃ jusqu'à la disparition de la couleur orange.

On ajoute 30 ml de Chloroform, et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

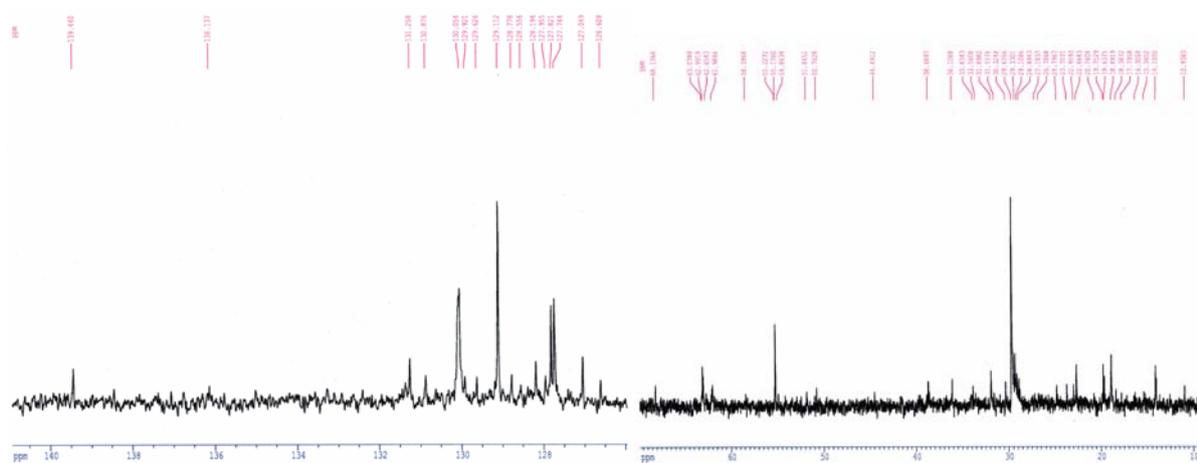
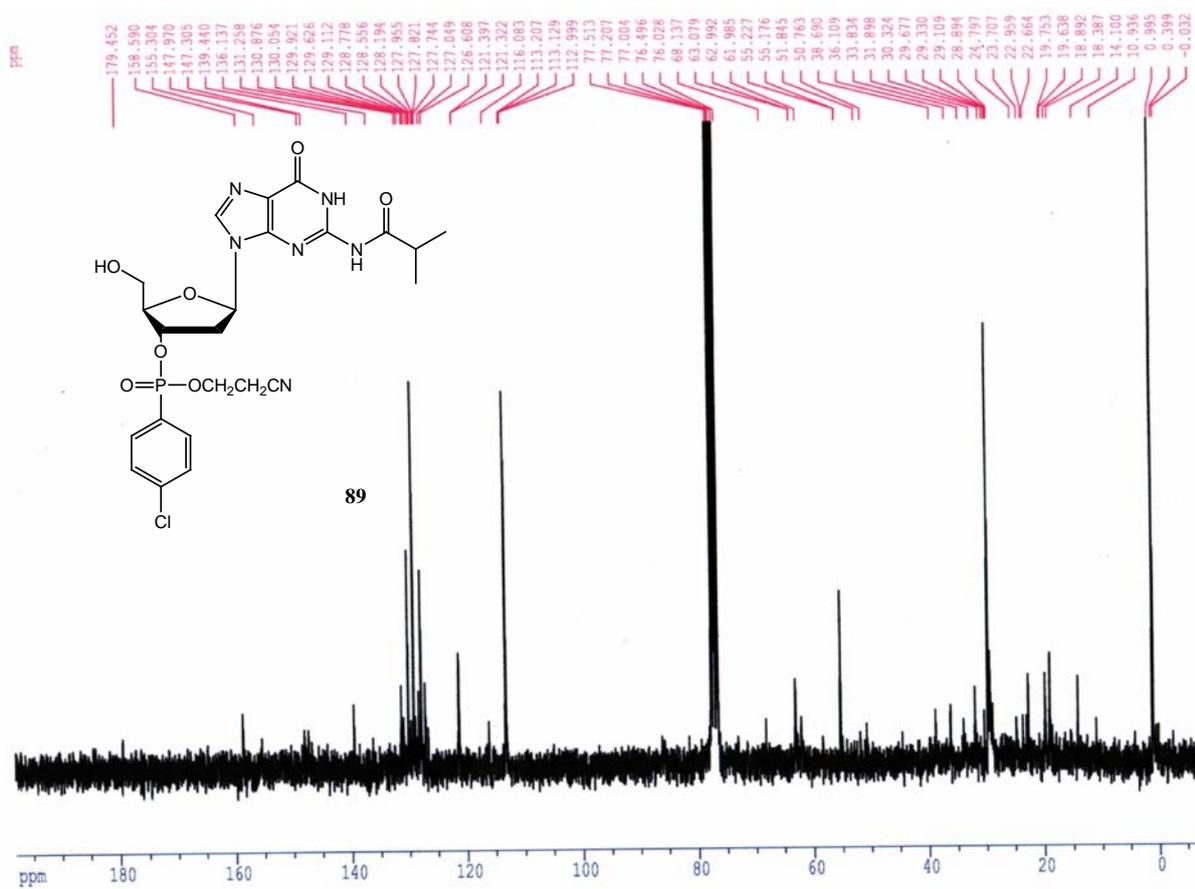
On ajoute le Na₂SO₄ pour éliminer les traces d'eau, on filtre, on évapore au maximum à l'évaporateur rotatif, et on fait une chromatographie sur colonne (0 - 8 %) MeOH, CHCl₃.

m = 0,287 gr, Rdt. = 88,85 %.

R_f = 0,19 MeOH / CHCl₃ (1/19). T_f = 204 -205° C.

Tableau (9) : Données RMN-¹³C et RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du produit 89.

Le groupement de carbone	Déplacement chimique δ (ppm)	Le groupement de proton	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
N ² -C=O	179.45	N ₁ H	8.09	H, s
O=C ₆	158.59	N ² -H	7.70	H, s
=C ₄ -N	147.97	C ₈ H	7.44	H, s
=C ₂ -N	139.44	C ₂ 'H, C ₆ 'H (Ar)	7.33	2H, m (dd)
N=C ₈ -N	130.05	C ₃ 'H, C ₅ 'H (Ar)	7.23	2H,dd,J _o =6.73Hz
C ₄ '-Cl (Ar)	129.11	C ₁ 'H _e	6.83	H, m (ddd)
C ₆ ' (Ar)	127.82	OCH ₂ CCN	4.41	2H, t, J= 4.42 Hz
C ₂ ' (Ar)	127.74	C ₄ 'H _e	3.70	H, td, J= 6.87 Hz
C ₁ ' (Ar)	127.04	C ₅ 'H _e	3.41	H, m
C ₅ ' (Ar)	121.39	C ₅ 'H _a	3.09	H,dd, J= 6.54 Hz
C ₃ ' (Ar)	121.32	C ₃ 'H _e	2.82	H, td, J=5.94 Hz
CN	113.20	N ² -HC ₂	2.34	H,ddd,J ₃ =7.92Hz
=C ₅ -N	113.13	HO-C ₅ '	2.20	H, s
C ₄ '	68.17	CH ₂ CN	2.06	2H, m (t)
C ₁ '	63.07	C ₂ 'H _e	1.69	H, m
C ₃ '	62.99	C ₂ 'H _a	1.65	H, m
O=PO-CH ₂	55.22	C(CH ₃) ₂	1.27	6H, m
C ₅ '	55.17			
C ₂ '	36.10			
N ² -C ₂	31.89			
CH ₂ CN	19.75			
N ² -C ₃	18.38			



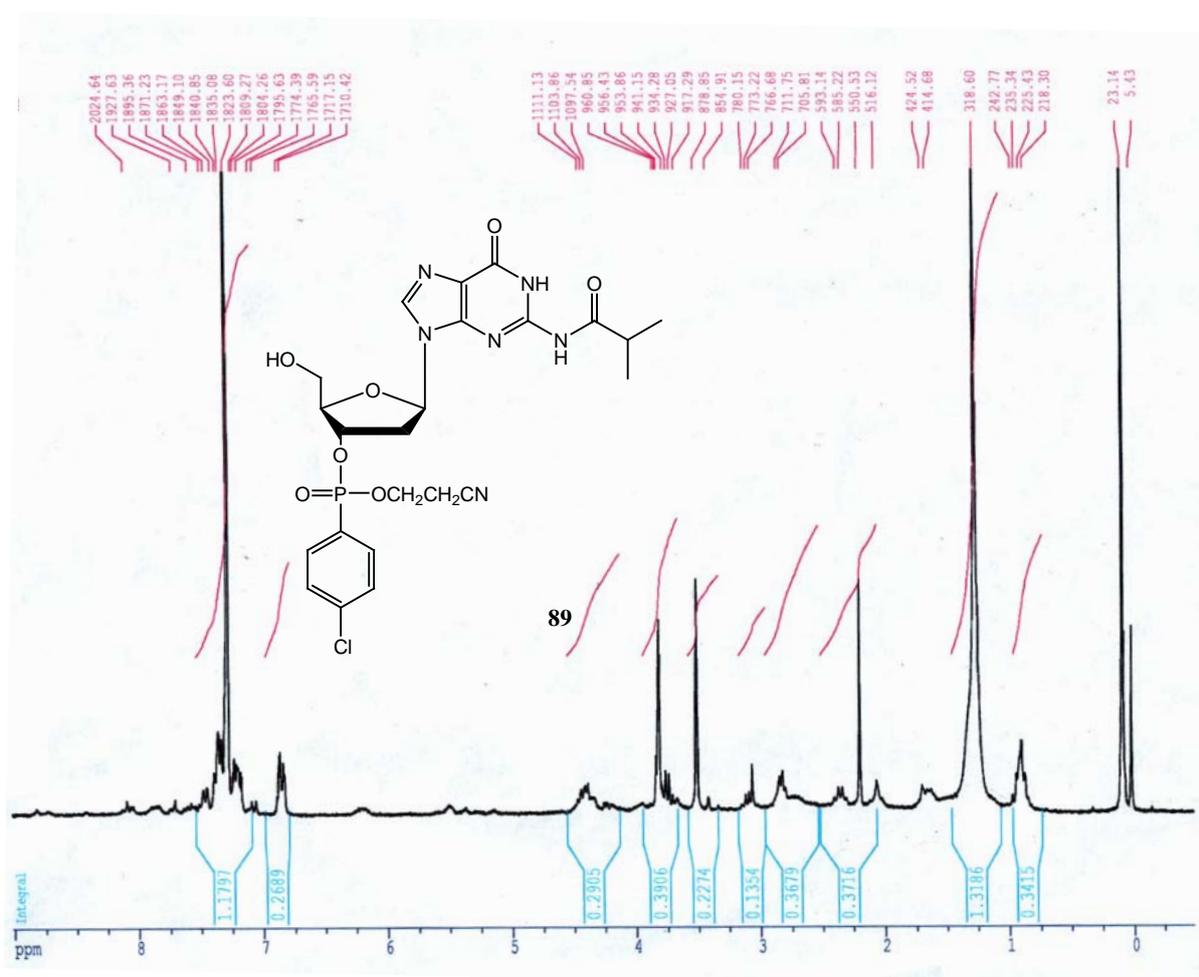
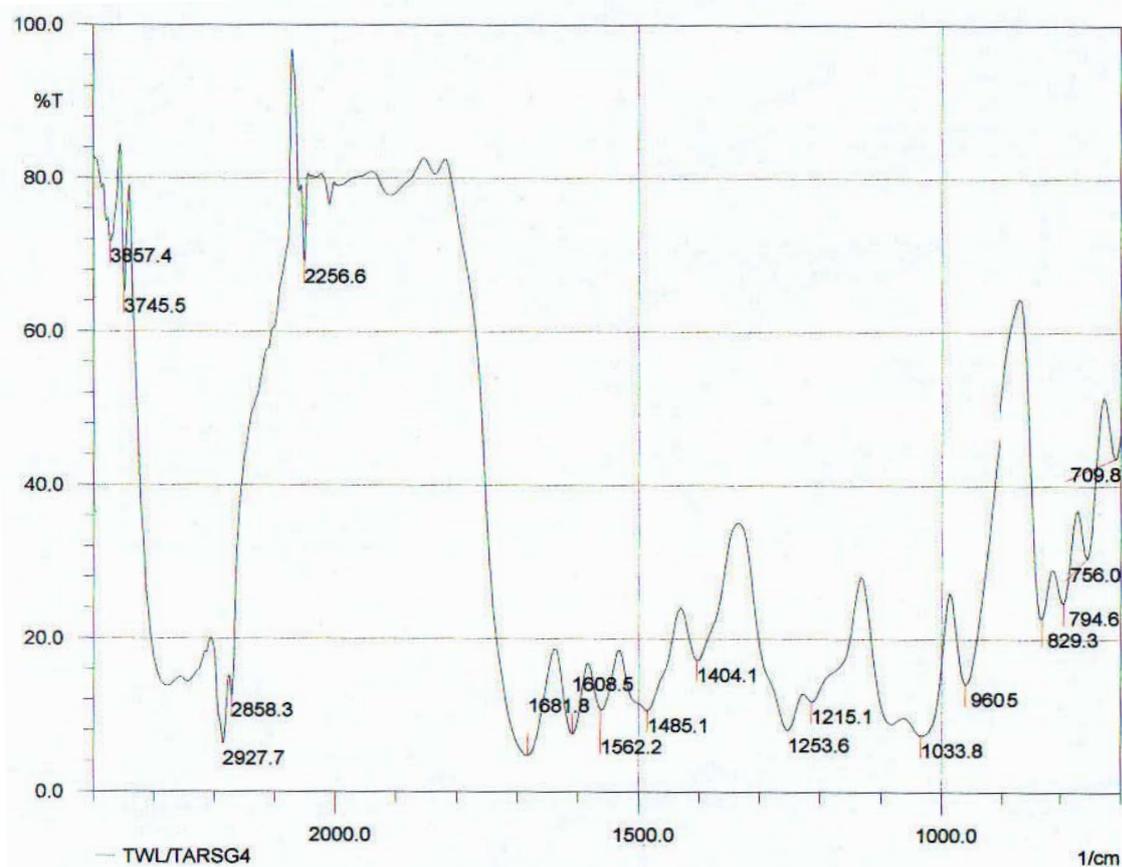


Figure 35. Spectre RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du nucléotide 89.

Tableau (10) : données I.R du produit 89.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool	3745
ν_a CH ₂	aliphatique	2927
ν_s CH ₃	aliphatique	2858
ν C≡N	nitrile saturé	2256
ν C=O	amide secondaire	1681
ν C=C	C=C conjuguée	1608
ν C=N	couplé avec ν C=C	1562
δ CH ₂	cycloalcane	1485
δ_s CH ₃	aliphatique	1404
ν P=O	ester phosphorique	1253
ν C-N	amide secondaire	1215
ν P-O-C	phosphate aliphatique	1033
ν C-O-C	cyclique	960
ν C-Cl	composé monochloré	829

**Figure 36.** Spectre IR du nucléotide 89.

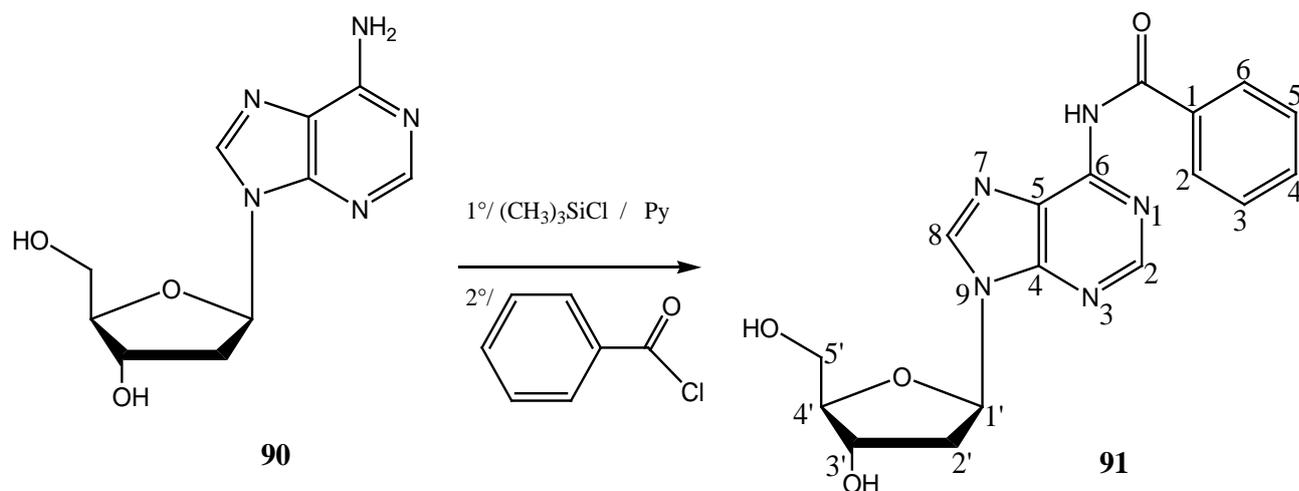
3. a) Préparation de N⁶-benzoyl-2'-déoxyadénosine :

Schéma 35.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (4 mmoles) de 2'-déoxyadénosine (**90**), et on sèche avec (3 × 10 ml) de pyridine et on dissout dans 20 ml (0,248 moles) de solvant (pyridine) et on ajoute 2,56 ml (20 mmoles) de Chlorotriméthylsilane avec l'agitation pendant une heures et demi, puis on ajoute 2,3 ml (20 mmoles) de Chlorure de benzoyle et on suit l'agitation encore deux heures et demi.

On refroidit à 0° C et on ajoute 4 ml (0,222 moles) d'eau ; après 5 minutes on ajoute 8 ml (0,428 moles) d'ammoniaque et on refroidit pendant 30 minutes on sèche dans l'évaporateur rotatif et on ajoute 50 ml d'eau et on fait une extraction avec (3 × 20 ml) d'éther diéthylique.

Notre produit est soluble dans la phase aqueuse, on sépare, on refroidit, et on filtre les cristaux former.

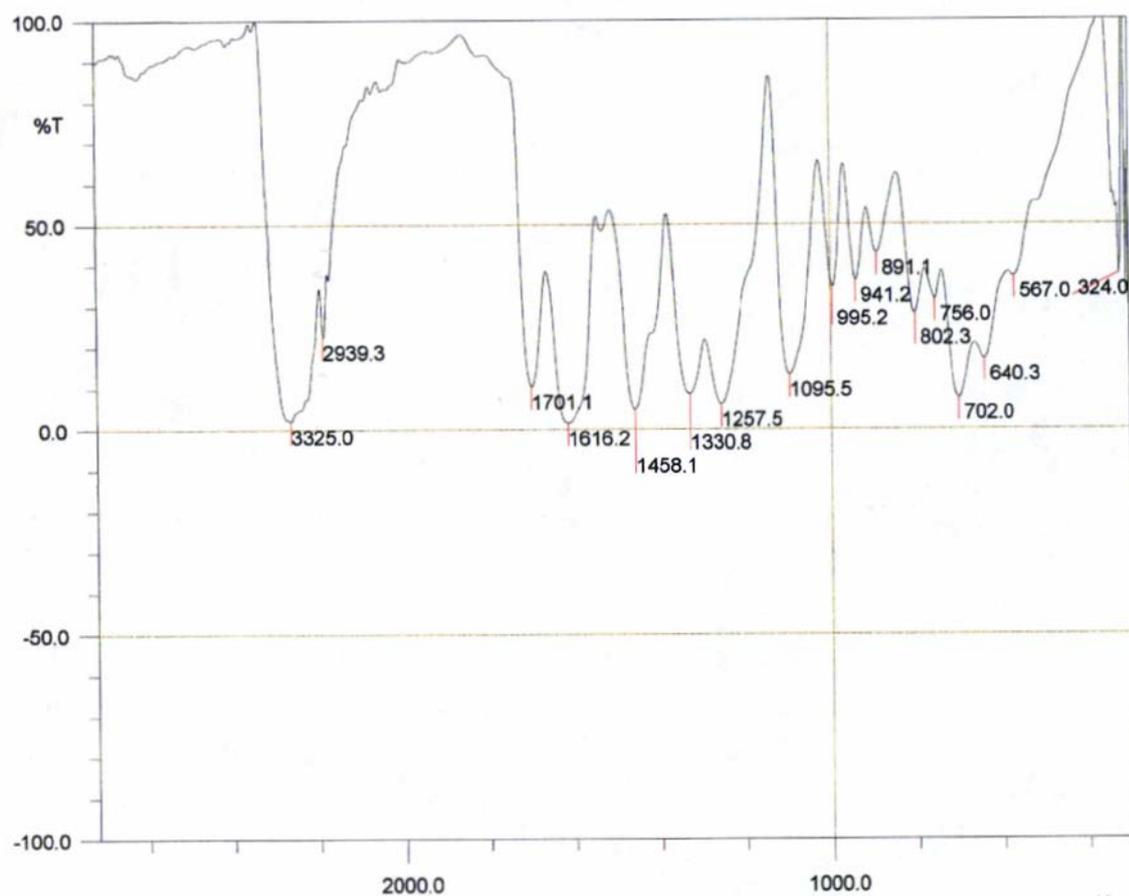
On obtention un solide blanc.

m = 1,18 gr, Rdt = 84 %.

T_f = 109 – 111° C. R_f = 0,30 MeOH / CHCl₃ (1/19).

Tableau (11) : données I.R du produit 91.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool	3325
ν_a CH ₂	aliphatique	2939
ν C=O	amide secondaire	1701
ν C=C	C=C conjuguée	1616
δ CH ₂	cycloalcane	1458
ν C-N	amide secondaire	1257
ν C-O	alcool	1095
ν C-O-C	cyclique	941

**Figure 37.** Spectre IR de nucléoside 91.

3. b) Préparation de N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine :

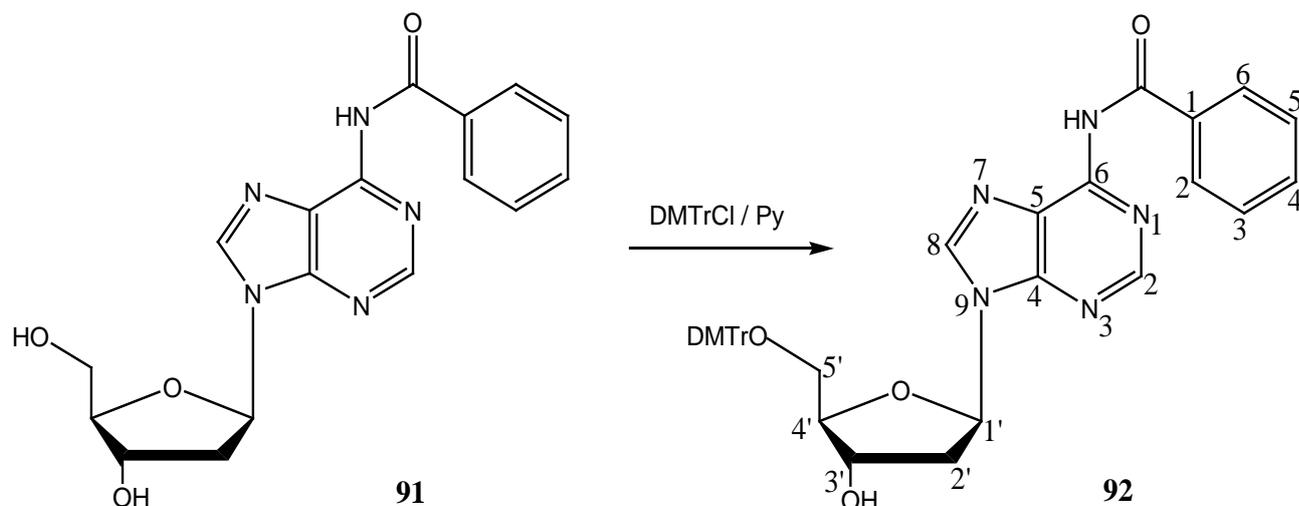


Schéma 36.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,5 gr (1,4 mmoles) de N⁶-benzoyl-2'-déoxyadénosine (**91**), et on sèche avec (2 × 3ml) de la pyridine anhydre, et on met 5,6 ml (69,46 mmoles) de même pyridine et on ajoute 0,503 gr (1,54 mmoles) de Chloro-4,4'-diméthoxytrityl avec l'agitation pendant deux heures, et on ajoute encore 0,05 gr (0,154 mmoles) de ce réactif ; après deux heures, on ajoute 2,1 ml (36,7 mmoles) d'éthanol et après 30 minutes, on évapore sans sécher la solution, puis on ajoute 30 ml de chloroforme et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

Notre produit est soluble dans la phase organique, on sèche avec le Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

On fait une Chromatographie sur colonne (0 – 5 %) MeOH, CH₃Cl.

On obtient un produit visqueux jaunâtre.

m = 0,788 gr ; Rdt = 87 %.

T_f = 123 – 124° C, R_f = 0,54 (MeOH/CHCl₃) (1/19).

Tableaux (12) : données I.R du produit 92.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool primaire	3282
ν CH	alcène	3004
ν_a CH ₂	aliphatique	2935
ν_s CH ₃	O-CH ₃	2837
ν NH	- ⁺ NH-(plusieurs bandes)	2759, 2551, 2405
ν C=O	amide secondaire	1705
ν C=C	C=C non conjuguée	1608
ν C=C	noyau aromatique	1581
ν C=N	couplé avec ν C=C	1508
δ CH ₂	cycloalcane	1452
δ_s CH ₃	aliphatique	1299
ν C-N	amide secondaire	1249
ν C-C	tertiobutyl	1178
ν_a C-O-C	ether aliphatique	1078
ν C-O	alcool	1031
ν_a C-O-C	cyclique	945

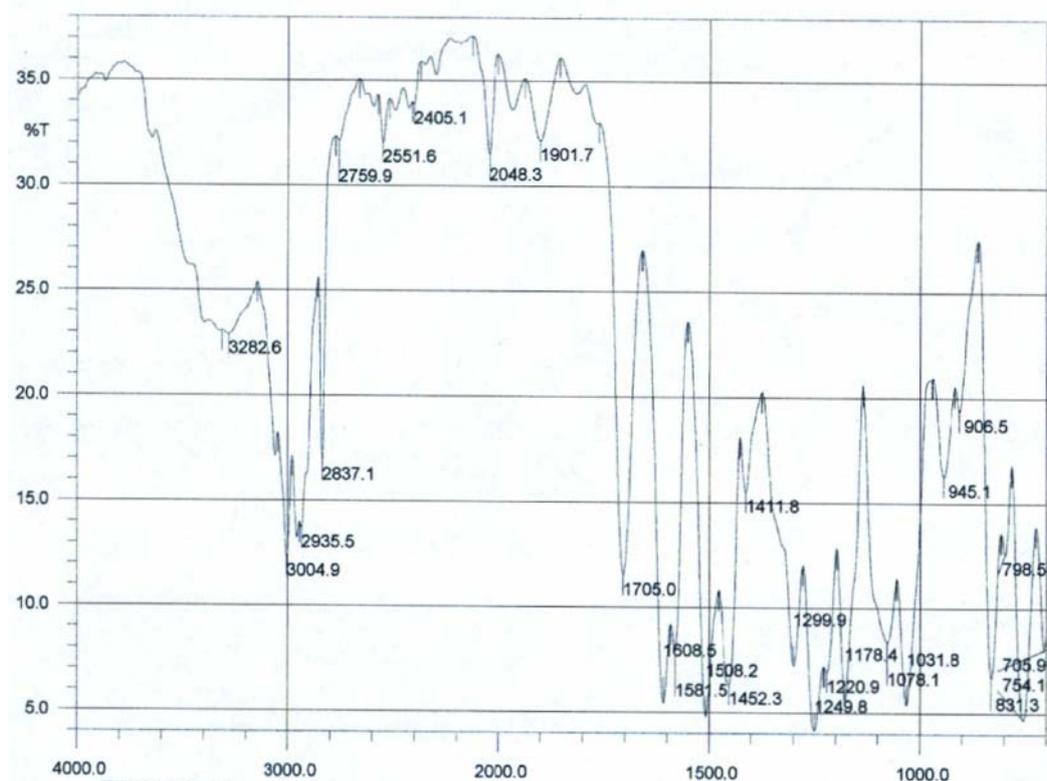


Figure 38. Spectre IR de nucléoside 92.

3. c) Préparation de N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine :

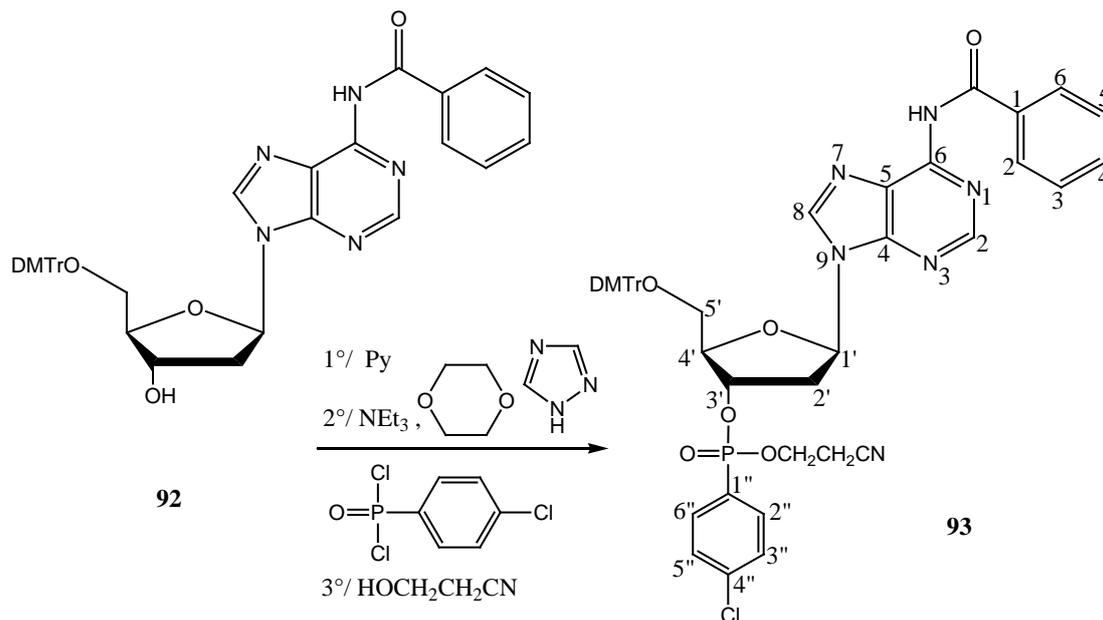


Schéma 37.

Dans un ballon monocol de 100ml, on met 0,303 gr (4,3 mmoles) du triazole, 0,506 ml (3,797 mmoles) du triéthylamine, et 5,06 ml (59,45 mmoles) de dioxane anhydre, et avec l'agitation on met 0,303 ml (1,898 mmoles) du *p*-Chlorophénylphosphodichloridate.

Après 30 minutes d'agitation on filtre rapidement le mélange sur un autre mélange qui contient 0,788 gr (1,256 mmoles) de N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine (**92**) bien séché par la pyridine anhydre (2 × 3 ml) et 1,5 ml (18,6 mmoles) de pyridine.

On laisse la réaction à température ambiante pendant deux heures puis on ajoute 0,36 ml (5,063 mmoles) de 3-hydroxypropionitrile et on laisse pendant deux heures et demi, on contrôle par CCM (CHCl₃/ MeOH : 19/1).

Finalement, on refroidit dans un bain de glace et on ajoute 1 ml (55,55 mmoles) d'eau, et on évapore rapidement à l'évaporateur rotatif.

Après, on ajoute 30 ml de chloroforme, et on neutralise par NaHCO₃ et on fait une extraction avec (2 × 15 ml) d'eau, notre produit est soluble dans la phase organique, on sèche par Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

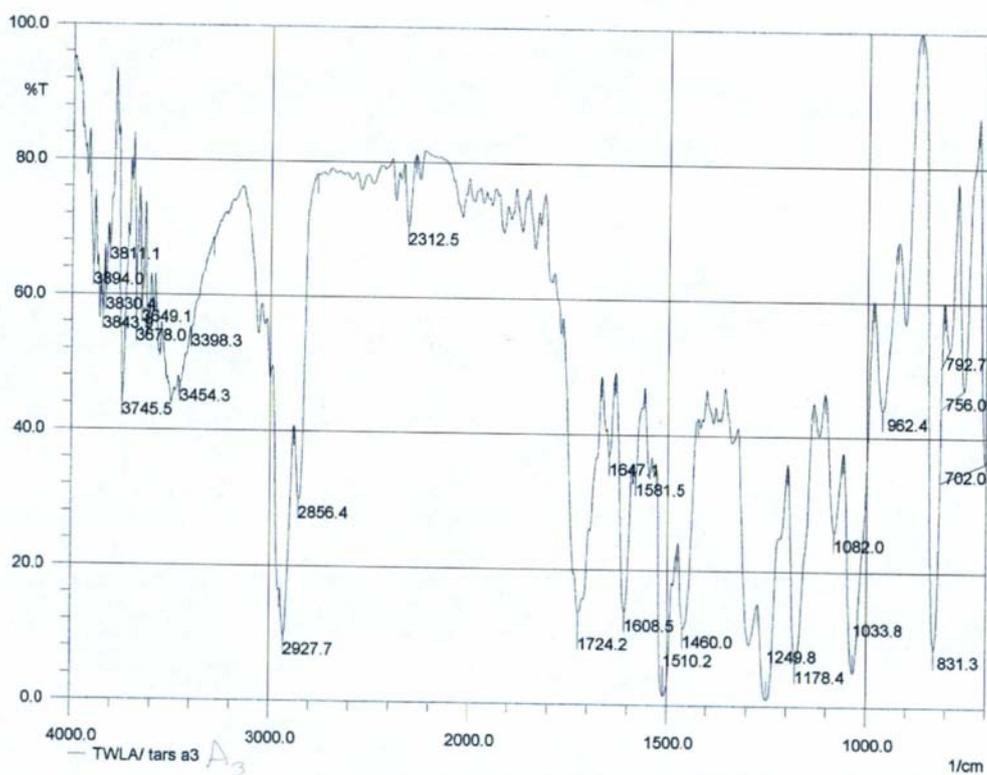
On obtient un mélange des produits, on sépare notre produit par CCM dans les plaques.

On trouve des taches montre la dépurination de ce produit. On obtient un solide jaune.

m = 0,104 gr, Rdt. = 8,37 %, R_f = 0,76 MeOH / CHCl₃ (1/19). T_f = 162-163° C.

Tableau (13) : données I.R du produit 93.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν NH	amide	3454
ν_a CH ₂	aliphatique	2927
ν_s CH ₃	O-CH ₃	2856
ν C \equiv N	nitrile saturé	2312
ν C=O	amide secondaire	1724
ν C=C	C=C conjuguée	1608
ν C=C	noyau aromatique	1581
ν C=N	Couplée avec C=C	1510
δ CH ₂	cycloalcane	1460
P=O	ester phosphorique	1249
ν C-C	tertiobutyl	1178
ν C-O-C	ether aliphatique	1082
ν P-O-C	phosphate aliphatique	1033
ν C-O-C	cyclique	962
ν C-Cl	composé monochloré	831

**Figure 39.** Spectre IR de nucléotide 93.

3. d) Préparation de

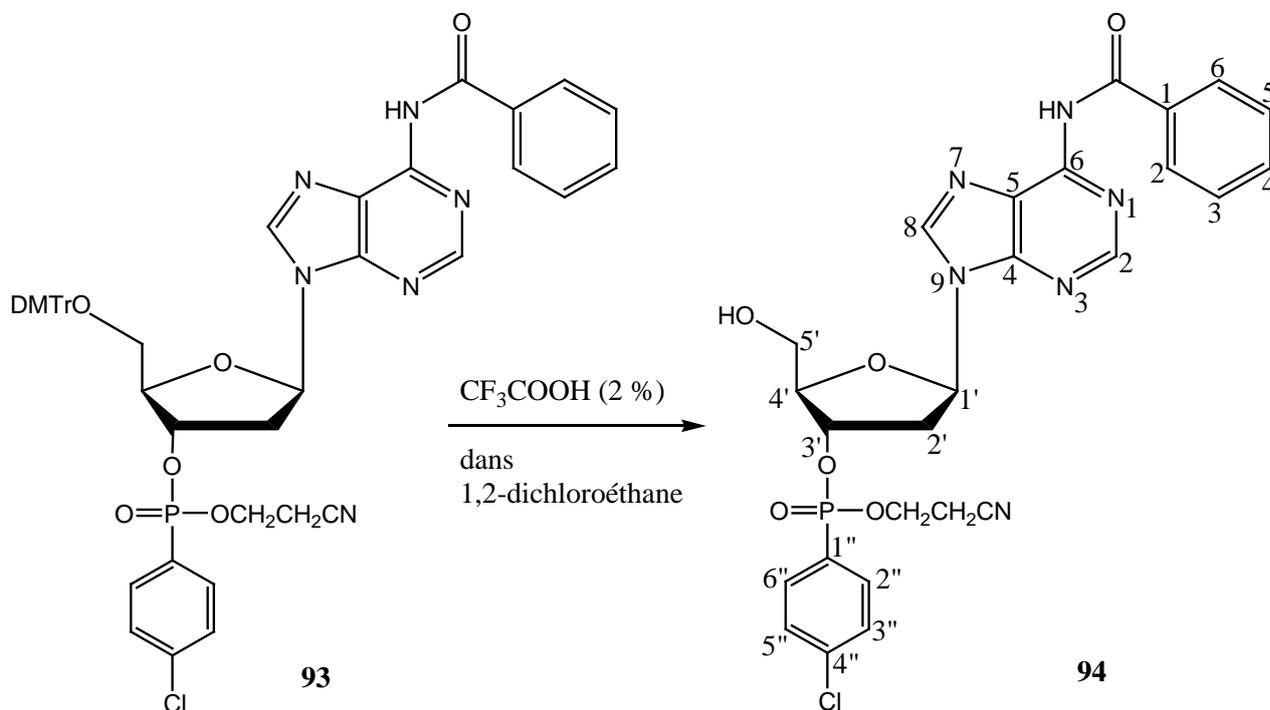
N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine :

Schéma 38.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,212 gr (0,239 mmoles) de N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxyadénosine (**93**), et on dissout dans 3 ml de 1,2-dichloroéthane ClCH₂CH₂Cl, on refroidit au bain de glace, et on ajoute 3 ml d'acide trifluoroacétique (2 %) dans 1,2-dichloroéthane, on observe l'apparition d'une couleur orange foncé.

On laisse le mélange pendant 6 heures à température ambiante, on suit la réaction par CCM (1/19) MeOH/CHCl₃, en fin on neutralise le milieu réactionnel par une solution de KHCO₃ jusqu'à la disparition de la couleur orange.

On ajoute 20 ml de Chloroforme, et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

On ajoute le Na₂SO₄, on filtre, on évapore au maximum à l'évaporateur rotatif, et on fait une chromatographie sur colonne (0 – 6 %) MeOH, CHCl₃.

m = 0.033 gr; Rdt = 24,13 %.

R_f = 0.08 (MeOH/CHCl₃) (1/19). T_f = 198-199° C.

Tableau (14) : Données RMN-¹³C et RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du produit 94.

Le groupement de carbone	Déplacement chimique δ (ppm)	Le groupement de proton	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
N ⁶ - C=O	158.6	C ₈ H	8.09	H, s
=C ₂ -N	139.3	C ₂ H	8.03	H, s
=C ₆ -N	137	N ⁶ -C ₂ H, C ₆ H (Ar)	7.70	2H, m (dt)
=C ₄ -N	133			
N=C ₈ -N	131.26	C ₂ 'H, C ₆ 'H (Ar)	7.56	2H, m (dd)
=C ₄ '-Cl	130.87	N ⁶ -C ₄ H (Ar)	7.30	H, m (tt)
N ⁶ - C ₁ (Ar)	129.63	N ⁶ -C ₃ H, C ₅ H (Ar)	7.18	2H, td, J _o = 8.51 Hz
C ₂ '', C ₆ ' (Ar)	129.10			
C ₁ ' (Ar)	128.78	HN ⁶ -	7.06	H, s
N ⁶ - C ₄	127.96	C ₃ 'H, C ₅ 'H (Ar)	6.84	2H,dd, J _o =8.49Hz
N ⁶ - C ₃ , C ₅	127.83	C ₁ 'H _e	5.38	H, m (dd)
C ₃ '', C ₅ ' (Ar)	127.73	OCH ₂ CCN	4.25	2H, m (t)
N ⁶ - C ₂ , C ₆	127.06	C ₄ 'H _e	3.51	H, m (td)
=C ₅ -N	113.20	C ₅ 'H _e	2.37	H, m (dd)
-CN	113.14	C ₃ 'H _e	2.34	H, m (td)
C ₄ '	79	HO-C ₅ '	2.20	H, s
C ₁ '	76.48	C ₅ 'H _a	2.04	H, m (dd)
C ₃ '	68.14	C ₂ 'H _e	1.69	H, m (dt)
O-CH ₂	65	C ₂ 'H _a	1.63	H, m (dt)
C ₅ '	55.23	CH ₂ CN	2.06	2H, m (t)
C ₂ '	38.69			
O-C-CH ₂ - CN	22.67			

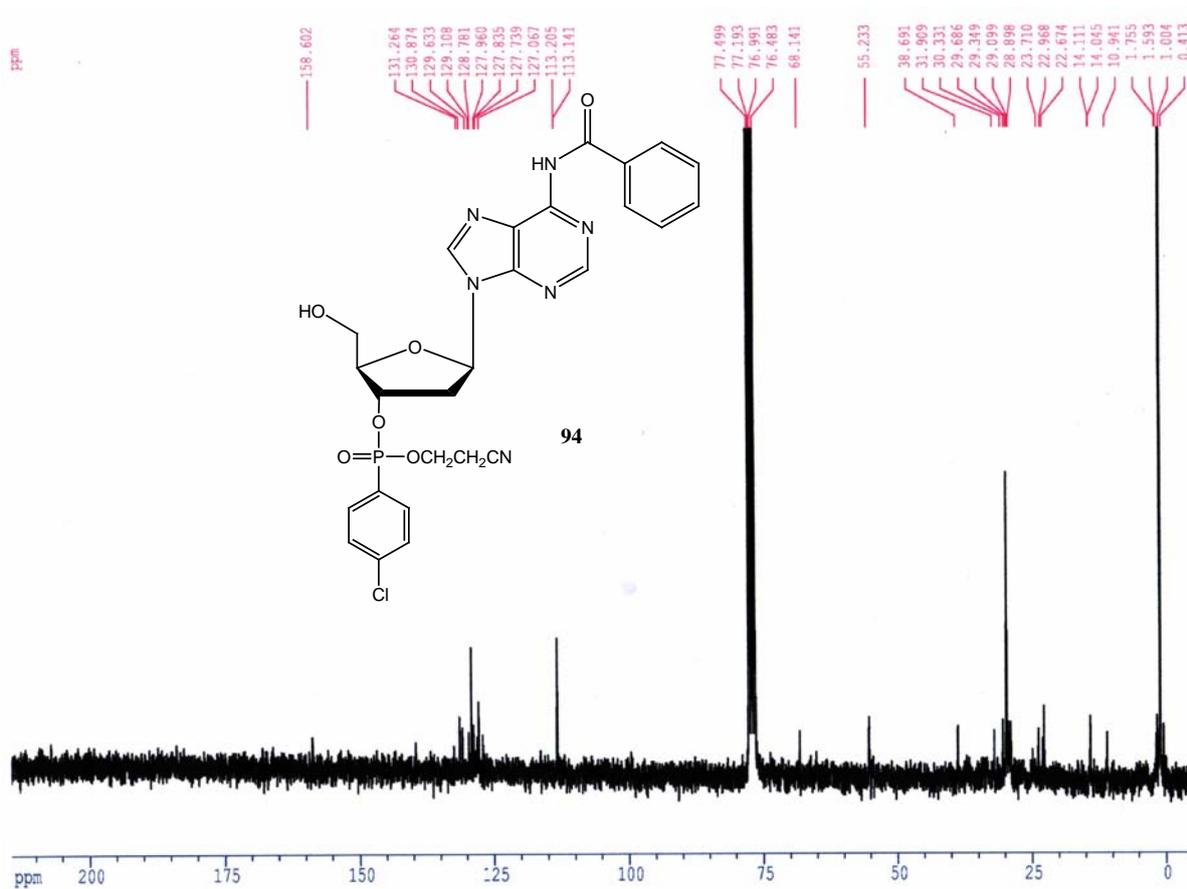


Figure 40. Spectre RMN¹³C (250 MHz, CDCl₃) du nucléotide 94.

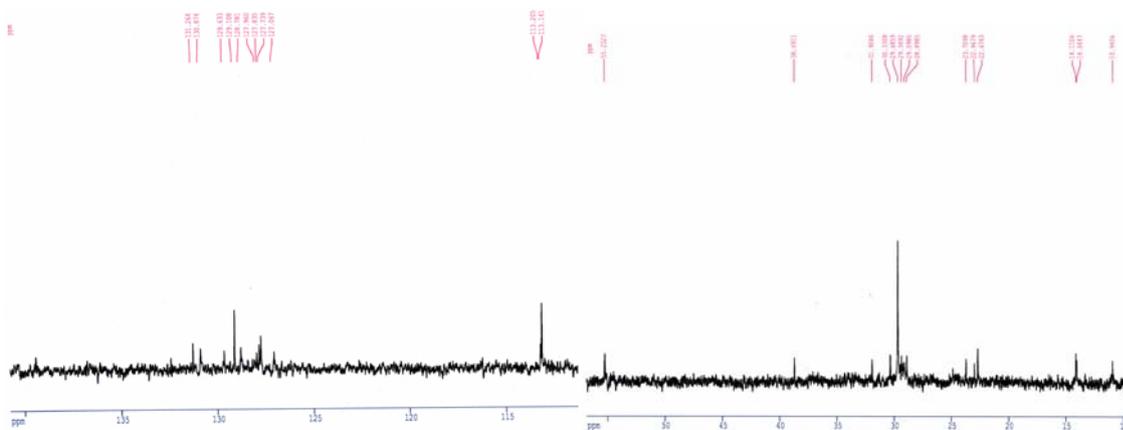


Figure 41. L'extension de ce spectre.

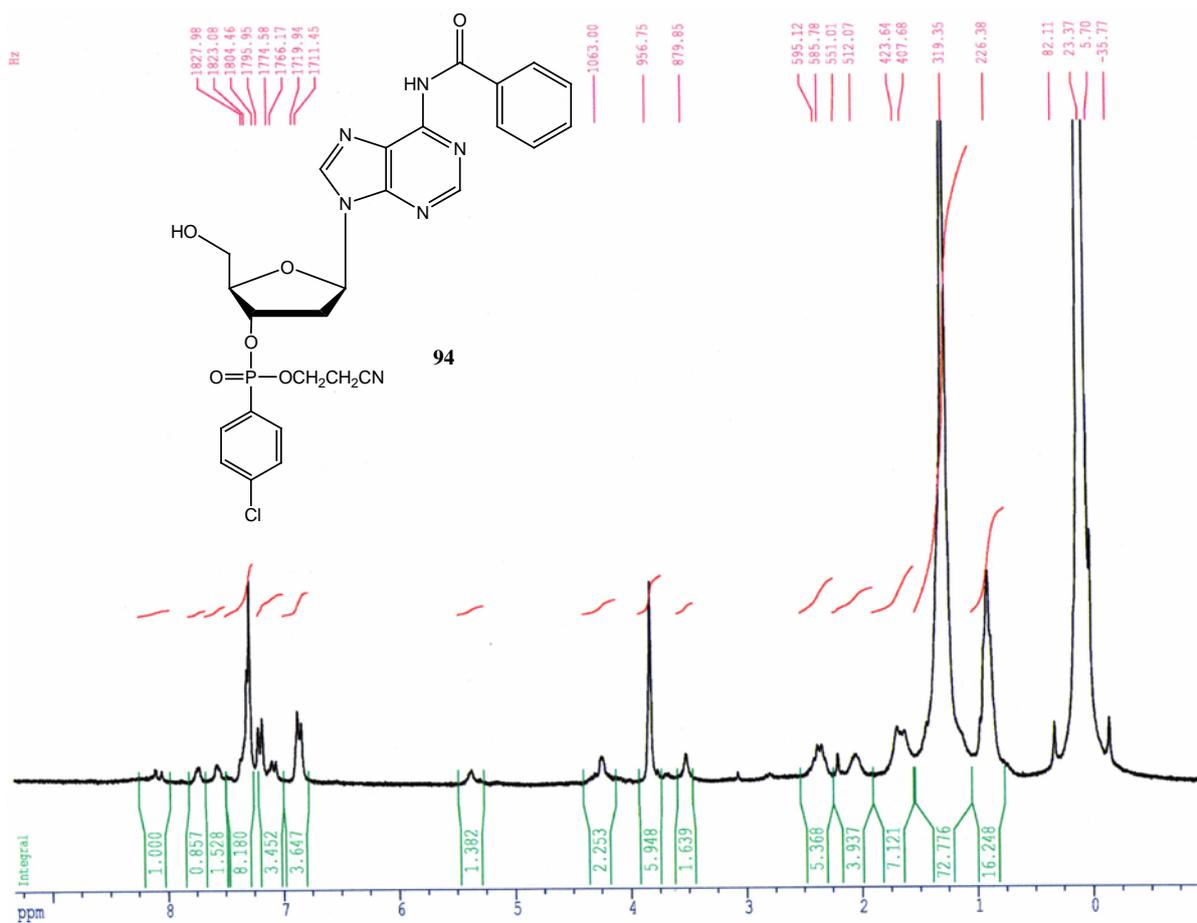


Figure 42. Spectre RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du nucléotide 94.

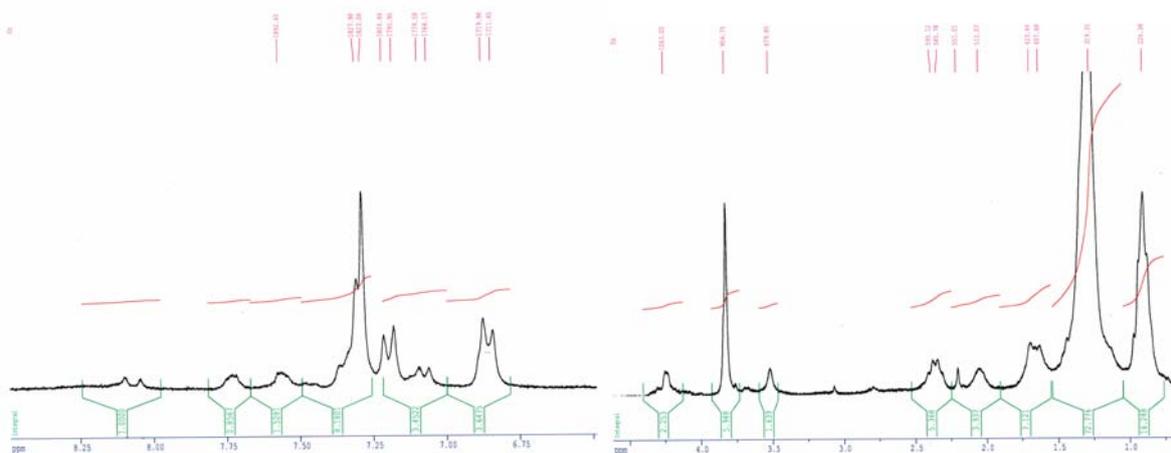
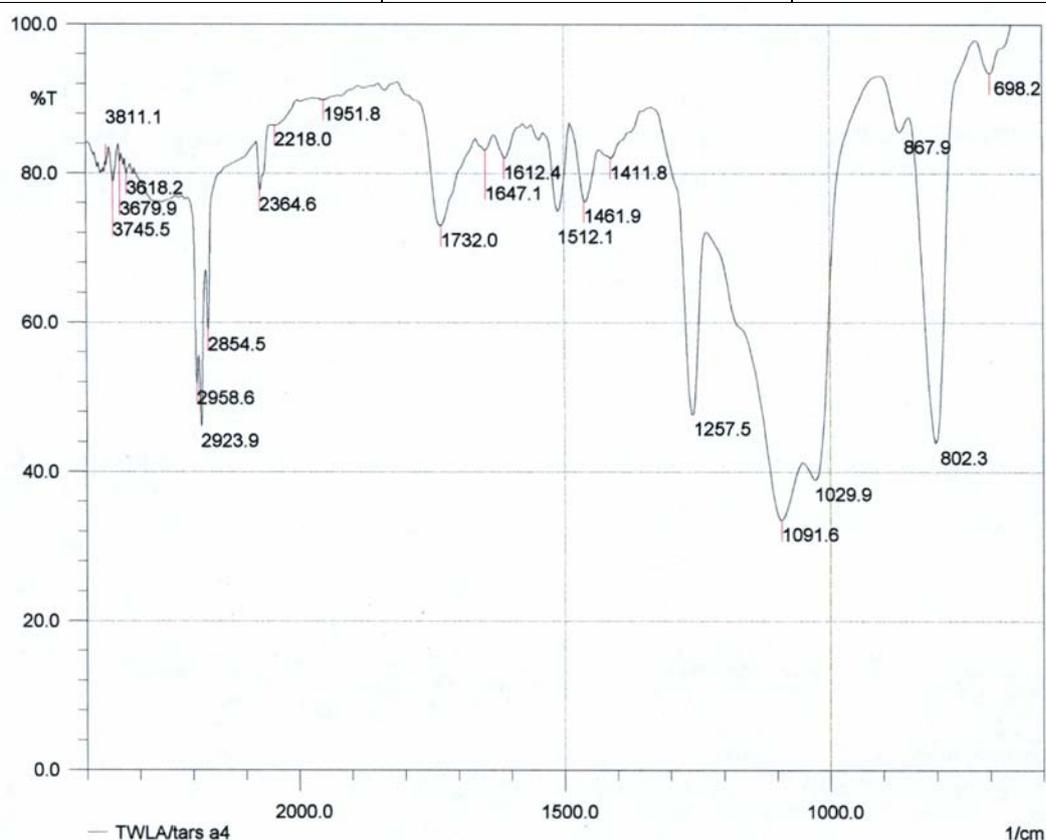


Figure 43. L'extension de ce spectre.

Tableau (15) : données I.R du produit 94.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν NH	amide	3745
ν OH	alcool	3618
ν CH	alcène	2958
ν_a CH ₂	aliphatique	2923
ν_s CH ₃	O-CH ₃	2854
ν C≡N	nitrile saturé	2364
ν C=O	amide secondaire	1732
ν C=C	C=C conjuguée	1647
ν C=C	noyau aromatique	1612
ν C=N	Couplée avec C=C	1512
δ CH ₂	cycloalcane	1461
ν P=O	ester phosphorique	1257
ν P-O-C	phosphate aliphatique	1091
ν C-O-C	cyclique	1029
ν C-Cl	composé monochloré	802

**Figure 44.** Spectre IR de nucléotide 94.

4. a) Préparation de 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine :

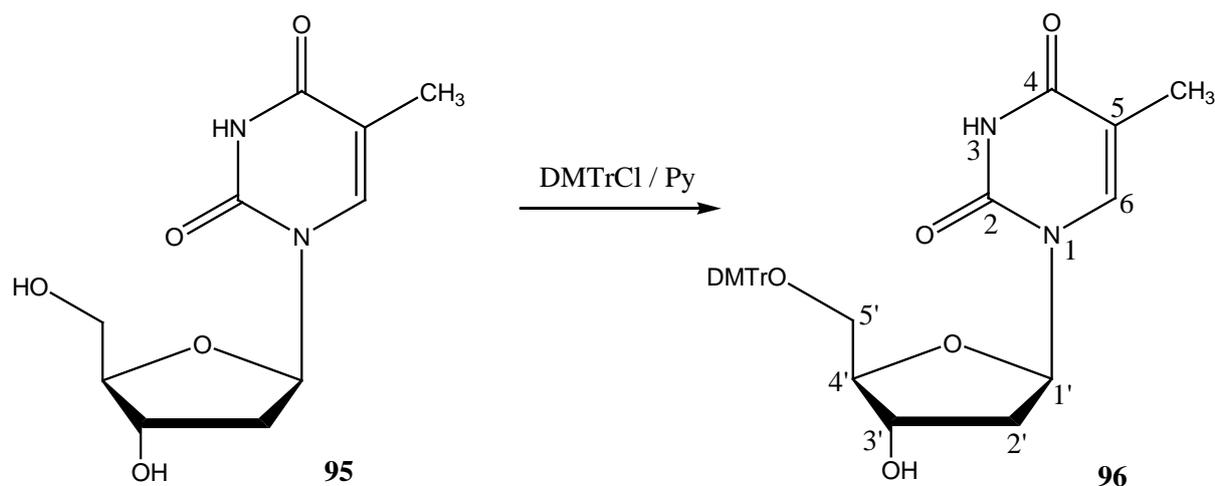


Schéma 39.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (4,132 mmoles) de 2'-déoxythymidine (**95**), et on sèche avec (2 × 8 ml) de pyridine anhydre, et on met 16,5 ml (0,2 moles) de même pyridine et on ajoute 1,45 gr (4,54 mmoles) de Chloro-4,4'-diméthoxytrityl avec l'agitation pendant deux heures, et on ajoute encore 0,145 gr (0,454 mmoles) de ce réactif ; après deux heures, on ajoute 6,2 ml (108,5 mmoles) d'éthanol et après 30 minutes, on évapore sans sécher la solution, puis on ajoute 30 ml de chloroforme et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

Notre produit est soluble dans la phase organique, on sèche avec le Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

On fait une Chromatographie sur colonne (0 – 5 %) MeOH, CH₃Cl.

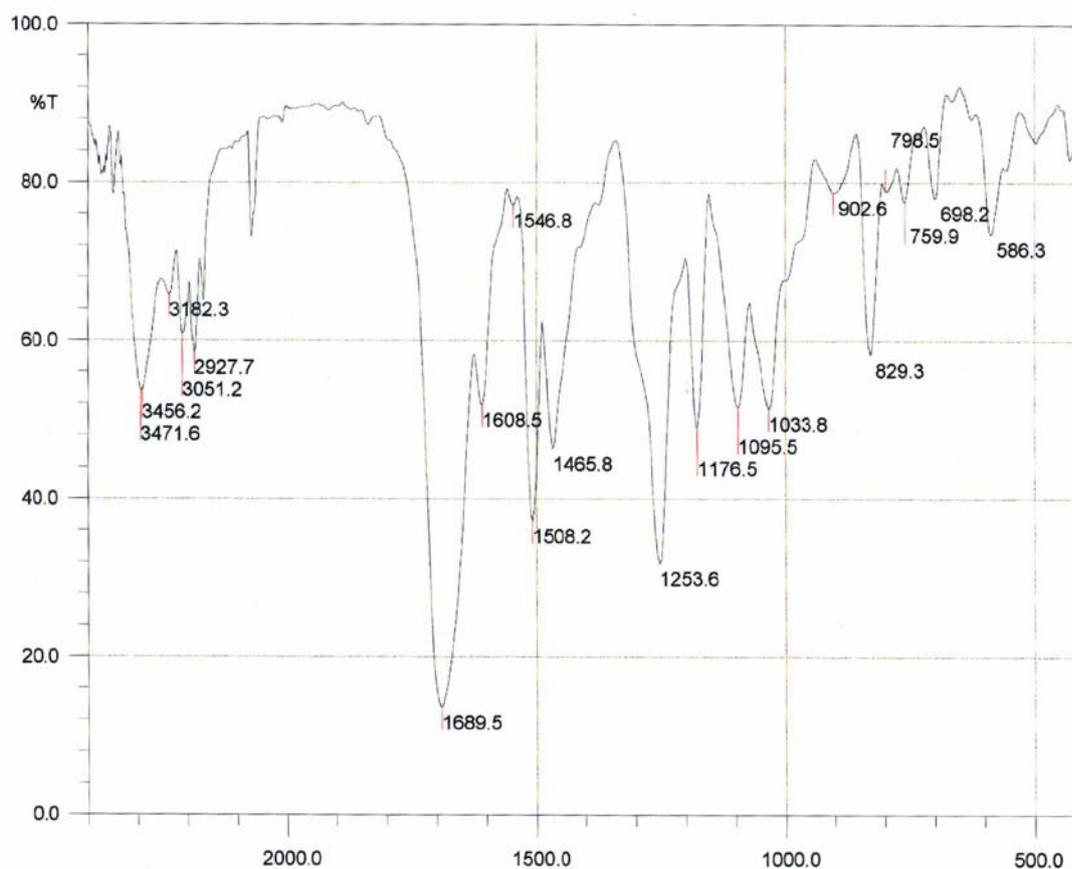
On sépare le produit et on le bien séché dans le bain d'huile, on obtient un solide blanc.

m = 1,64 gr ; Rdt = 70,37 %.

T_f = 143 – 144° C. R_f = 0,47 (MeOH/CHCl₃) (1/19).

Tableau (16) : données I.R du produit 96.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool secondaire	3456
ν CH	aromatique	3051
ν_a CH ₂	aliphatique	2927
ν C=O	amide secondaire	1689
ν C=C	noyau aromatique	1608
δ N-H	amide secondaire	1508
δ CH ₂	cycloalcane	1465
ν C-N	amide secondaire	1253
ν_a C-O-C	ether aliphatique	1095
ν C-O	alcool	1033
ν_a C-O-C	cyclique	829

**Figure 45.** Spectre IR de nucléoside 96.

4. b) Préparation de 3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine :

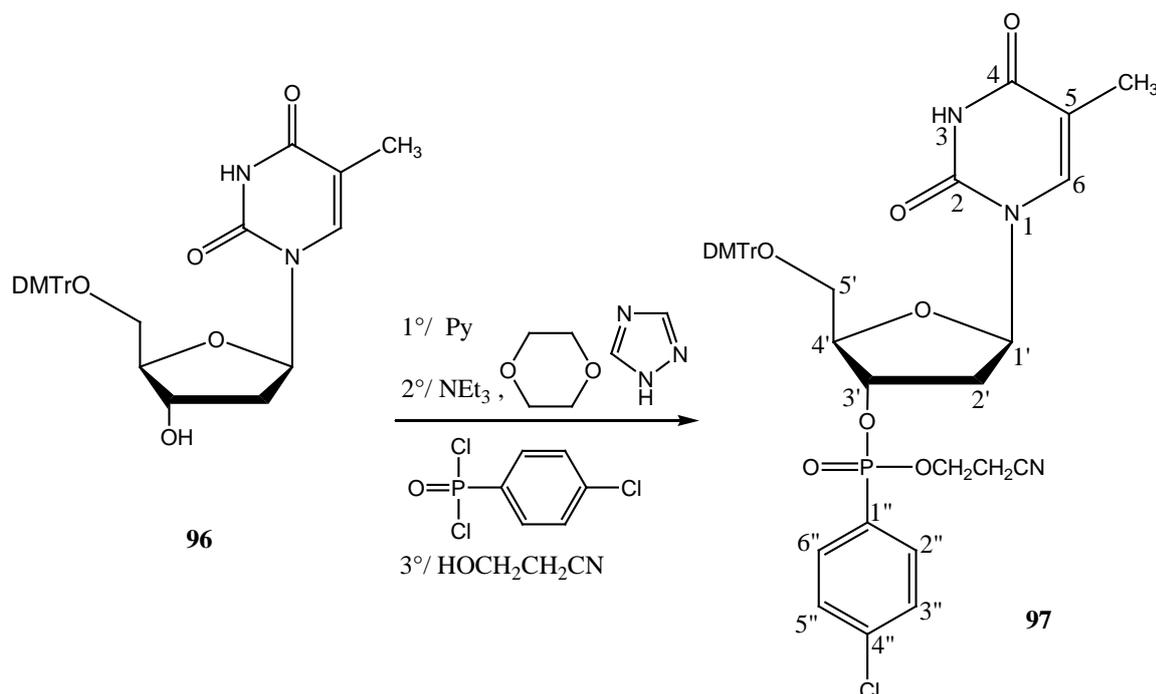


Schéma 40.

Dans un ballon monocol de 100ml, on met 0,22 gr (3,18 mmoles) du triazole, 0,376 ml (2,638 mmoles) du triéthylamine, et 3,67 ml (43,12 mmoles) de dioxane anhydre, et avec l'agitation on met 0,22 ml (1,352 mmoles) du *p*-Chlorophénylphosphodichloridate.

Après 30 minutes d'agitation on filtre rapidement le mélange sur un autre mélange qui contient 0,2 gr (0,367 mmoles) de 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine (**96**) bien séché par (2 × 3 ml) de pyridine anhydre et 2 ml (24,81 mmoles) de pyridine.

On laisse la réaction à température ambiante pendant une heure puis on ajoute 0,257 ml (3,768 mmoles) de 3-hydroxypropionitrile et on laisse la réaction pendant deux heures, on contrôle par CCM (CHCl₃, MeOH : 19/1).

Finalement, on refroidit dans bain de glace et on ajoute 1 ml (55,55 mmoles) d'eau, et on évapore rapidement à l'évaporateur rotatif.

Après, on ajoute 30 ml de chloroforme, et on neutralise par NaHCO₃ et on fait une extraction avec (2 × 15 ml) d'eau, on sépare la phase organique qui contient notre produit et on sèche par Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

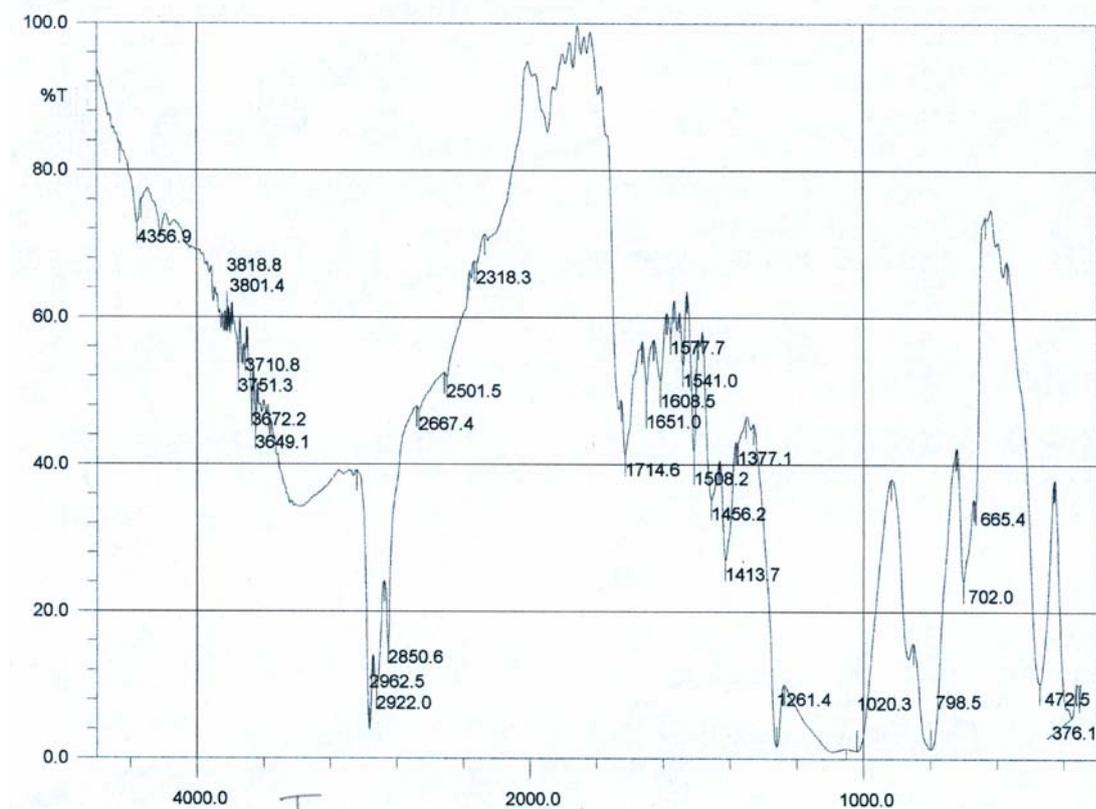
On obtient un mélange des produits, on sépare notre produit par les plaques de CCM.

On obtient un produit vert jaunâtre visqueux.

m = 0,045 gr, Rdt = 15,90 %, R_f = 0,53 MeOH / CHCl₃ (1/19). T_f = 169-170° C.

Tableau (17) : données I.R du produit 97.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
$\nu_a \text{CH}_3$	aliphatique	2962
$\nu_a \text{CH}_2$	aliphatique	2922
$\nu_s \text{CH}_3$	O-CH ₃	2850
νNH	- ⁺ NH-(plusieurs bandes)	2667, 2501
$\nu \text{C}\equiv\text{N}$	nitrile saturé	2318
$\nu \text{C}=\text{O}$	amide secondaire	1714
$\nu \text{C}=\text{C}$	C=C conjuguée	1651
$\nu \text{C}=\text{C}$	noyau aromatique	1508
δNH	amide secondaire	1456
δCH_2	cycloalcane	1413
$\delta_s \text{CH}_3$	aliphatique	1377
P=O	ester phosphorique	1261
$\nu \text{P}-\text{O}-\text{C}$	phosphate aliphatique	1020
$\nu \text{C}-\text{Cl}$	composé monochloré	798

**Figure 46.** Spectre IR de nucléotide 97.

4. c) Préparation de

3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine :

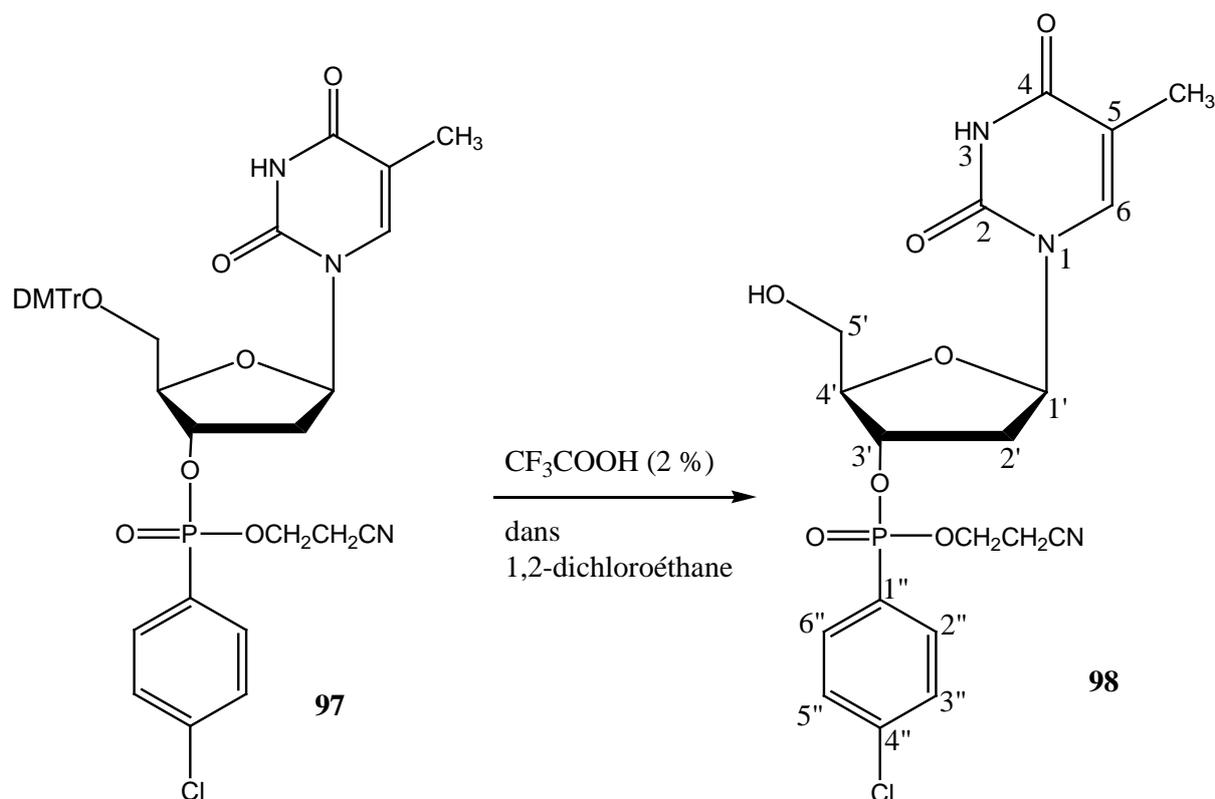


Schéma 41.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,3 gr (0,389 mmoles) de 3'-O-(4''-Chlorophenyl- O-cyanoéthylphosphoro),5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine (**97**), et on dissoudre dans 3 ml de 1,2-dichloroéthane $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, on refroidit au bain de glace, et on ajoute 3 ml d'acide trifluoroacétique (2 %) dans 1,2-dichloroéthane, on observe l'apparition d'une couleur orange foncé, et elle disparaît quand ajoute encore 2 ml de l'acide pour confirmer l'enlèvement total du DMTr de notre produit.

On laisse le mélange pendant 5 heures à température ambiante, on suit la réaction par CCM (1/19) $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, en fin on neutralise le milieu réactionnel par une solution de KHCO_3 .

On ajoute 20 ml de Chloroforme, et on fait une extraction avec (2×20 ml) d'eau.

On ajoute le Na_2SO_4 , on filtre, on évapore au maximum à l'évaporateur rotatif et on fait une chromatographie sur colonne (0 – 3 %) MeOH , CHCl_3 .

$m = 0.110$ gr, Rdt = 60,21 %.

$R_f = 0,25$ $\text{MeOH} / \text{CHCl}_3$ (1/19). $T_f = 210\text{-}212^\circ \text{C}$.

Tableau (18) : Données RMN-¹³C et RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du produit 98.

Le groupement de carbone	Déplacement chimique δ (ppm)	Le groupement de proton	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
O=C ₄	179.36	N ₃ H	8.6	H, s
O=C ₂	155.45	C _{2''} H, C _{6''} H (Ar)	7.7	2H, m (dd)
C=C ₆ -N	153.13	C _{3''} H, C _{5''} H (Ar)	7.6	2H, m (dd)
C _{4''} (Ar)	145.81	=C ₆ H	7.2	H, s
C _{2''} , C _{6''} (Ar)	135.82	HC _{1'}	6.8	H, m (dd)
C _{1''} (Ar)	130.87	O-C ₄ H _e	4.23	H, m (td)
C _{3''} , C _{5''} (Ar)	128.78	C _{5'} H _e	3.82	H, m (dd)
CH ₂ -CN	113.13	C _{3'} H _e	3.5	H, m (td)
O=C-C ₅ =	≈ 111	C _{5'} H _a	3.1	H, m (dd)
O-C _{4'}	≈ 87	C _{2'} H _e	2.39	H, m (dt)
O-C _{1'}	77,18	P-O-CH ₂	2.36	H, m (dd)
O-C _{3'}	68.13	C _{2'} H _a	2.21	H, m (dt)
P-O-CH ₂	≈ 63	C _{5'} OH	2.08	H, s
O-C _{5'}	43.40	CH ₂ -CN	1.6	2H, m (dd)
C _{2'}	38.69	=C ₅ -CH ₃	1.15	3H, s
CH ₂ -CN	22.67			
=C ₅ -CH ₃	≈ 14			

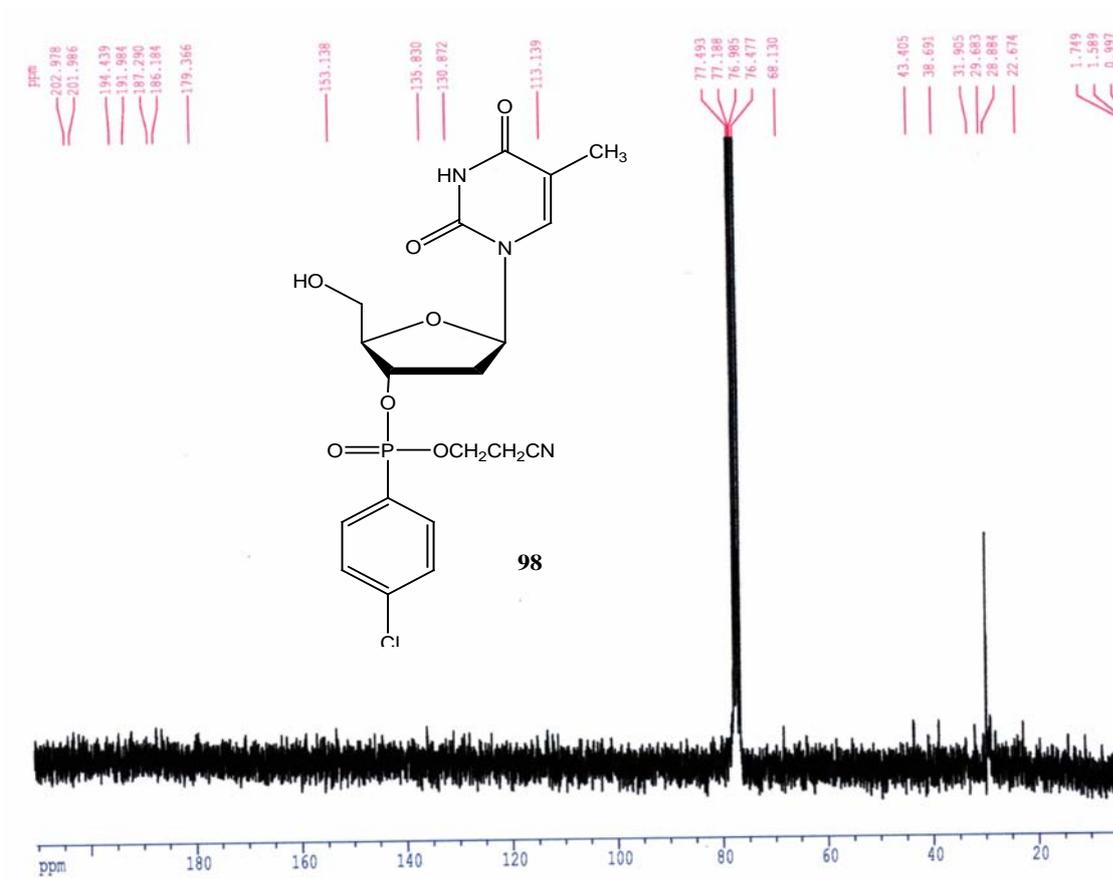


Figure 47. Spectre RMN¹³C (250 MHz, CDCl₃) du nucléoside 98.

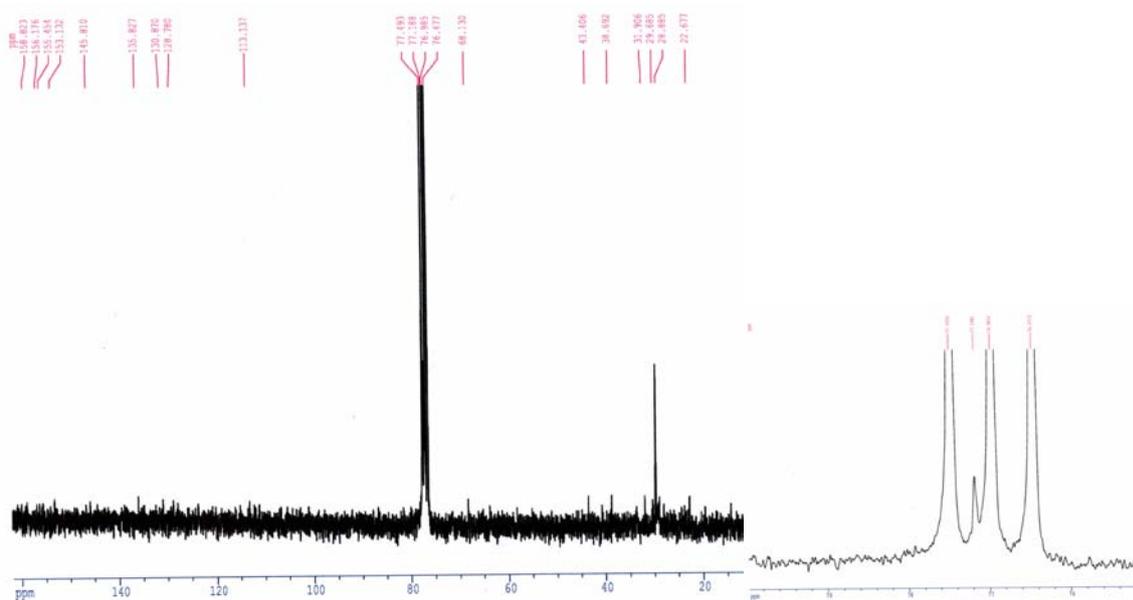
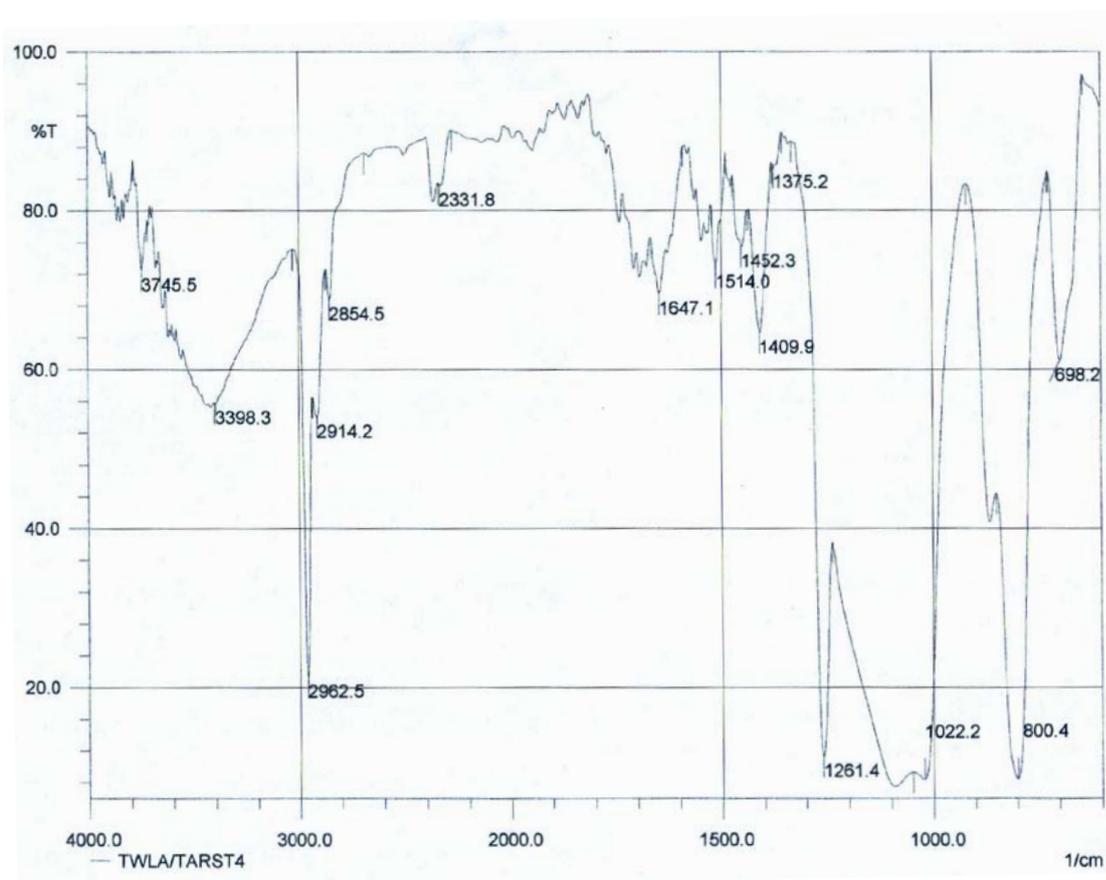


Figure 48. L'extension de ce spectre.

Tableau (19) : données I.R du produit 98.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν OH	alcool primaire	3398
ν_a CH ₃	aliphatique	2962
ν_a CH ₂	aliphatique	2914
ν C \equiv N	nitrile saturé	2331
ν C=O	amide secondaire	1647
δ NH	amide secondaire	1514
δ CH ₂	cycloalcane	1409
ν P=O	ester phosphorique	1261
ν P-O-C	phosphate aliphatique	1022
ν C-Cl	composé monochloré	800

**Figure 51.** Spectre IR de nucléotide 98.

4. d) Préparation de 3'-O-(acétyl)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine :

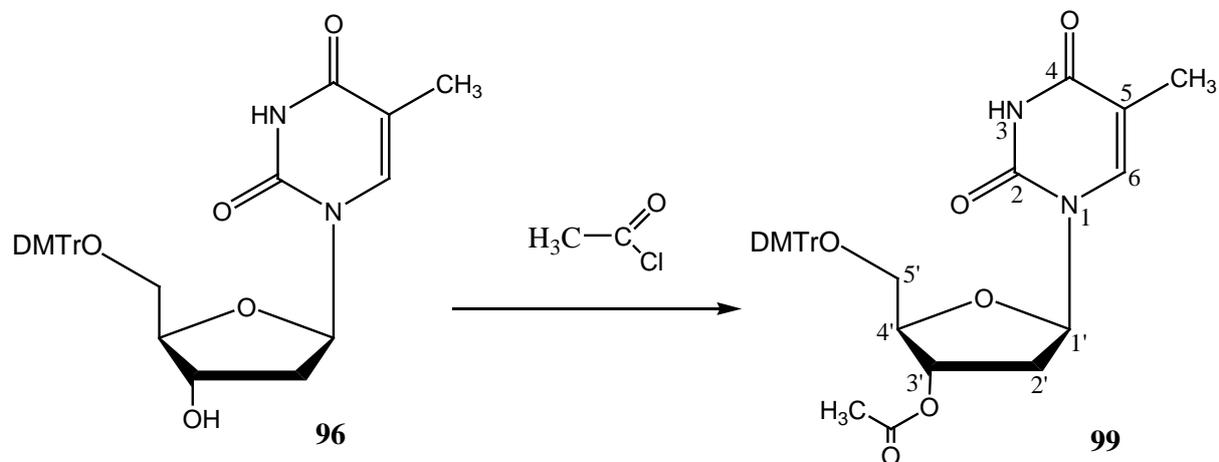


Schéma 42.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0.5 gr (0.919 mmoles) de 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine (**96**), et on sèche avec (2 × 3 ml) de pyridine anhydre et on met 4,6 ml (0,057 moles) de pyridine et on ajoute 0,71 ml (4,59 mmoles) d'acétylchlorure avec l'agitation pendant deux heures et demi.

On refroidit à 5° C et on ajoute 0,92 ml (51,08 mmoles) d'eau ; après 5 minutes on ajoute 1,84 ml (98,39 moles) d'ammoniaque et on refroidit pendant 30 minutes on sèche dans l'évaporateur rotatif et on ajoute 40 ml d'eau et on fait une extraction avec (3 × 20 ml) d'éther diéthylique.

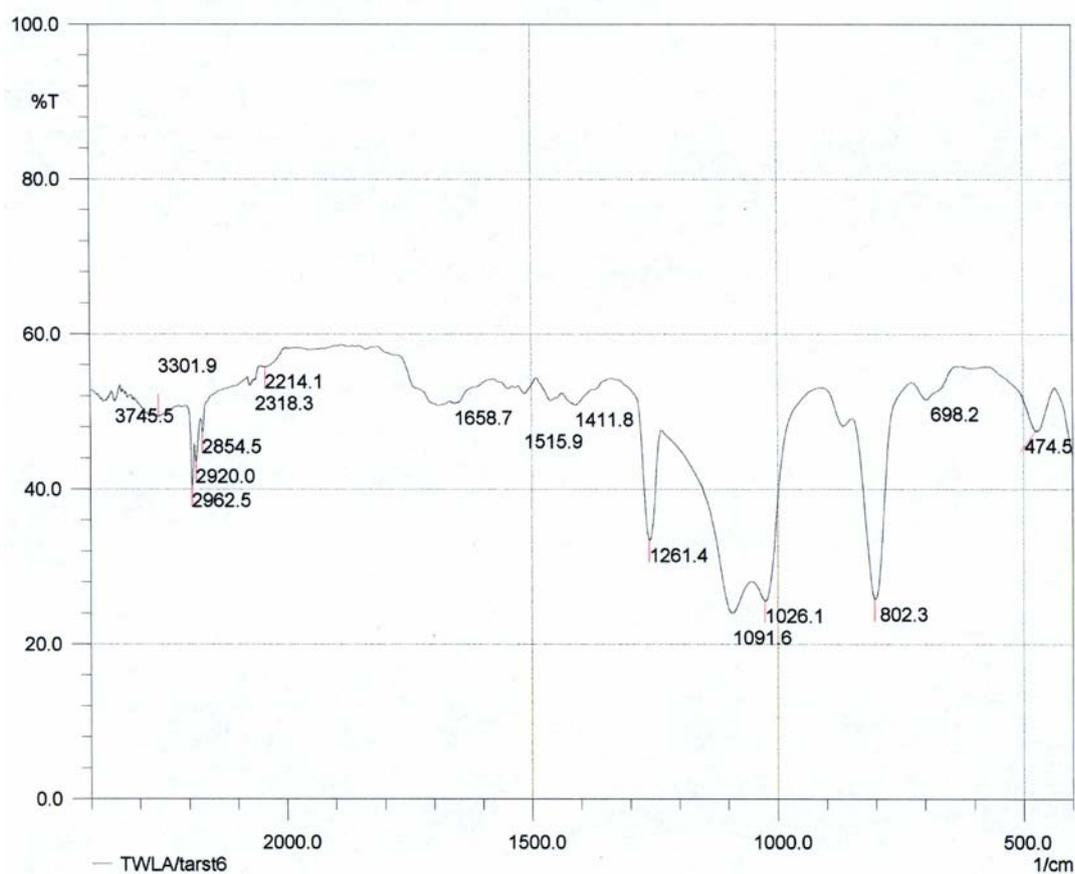
Notre produit est soluble dans la phase organique, on sépare, on refroidit, et on filtre les cristaux former.

m = 0,25 gr ; Rdt = 45 %.

T_f = 132 – 134° C. R_f = 0,59 (MeOH/CHCl₃) (1/19).

Tableau (20) : données I.R du produit 99.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
$\nu_a \text{CH}_3$	aliphatique	2962
$\nu_a \text{CH}_2$	aliphatique	2920
$\nu_s \text{CH}_3$	$\text{O}-\text{CH}_3$	2854
$\nu \text{C}=\text{O}$	amide secondaire	1658
$\delta \text{N}-\text{H}$	amide secondaire	1515
$\nu \text{C}=\text{C}$	noyau aromatique	1411
$\nu \text{C}=\text{O}$	ester aliphatique	1261
$\nu_a \text{C}-\text{O}-\text{C}$	ether aliphatique	1091
$\delta \text{C}-\text{H}$	aromatique	1026
$\nu_a \text{C}-\text{O}-\text{C}$	cyclique	802

**Figure 52.** Spectre IR de nucléoside 99.

4. e) Préparation de 3'-O-(acétyl)-2'-déoxythymidine :

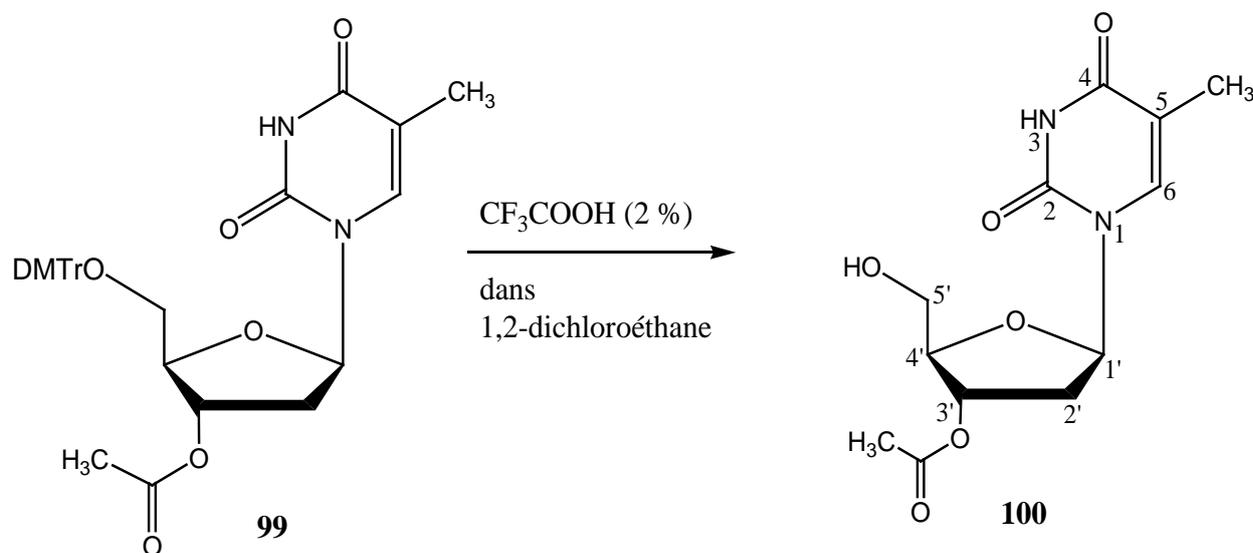


Schéma 43.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 0,5 gr (0,853 mmoles) de 3'-O-(acétyl)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxythymidine (**99**), et on dissout dans 4 ml de 1,2-dichloroéthane ClCH₂CH₂Cl, on refroidit jusqu'à 0° C, on ajoute 4 ml d'acide trifluoroacétique (2 %) dans 1,2-dichloroéthane, on observe l'apparition d'une couleur orange foncé.

On laisse le mélange pendant 5 heures à température ambiante, on suit la réaction par CCM (1/19) MeOH/CHCl₃, en fin on neutralise le milieu réactionnel par une solution de KHCO₃ jusqu'à la disparition de la couleur orange.

On ajoute 30 ml de Chloroforme, et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

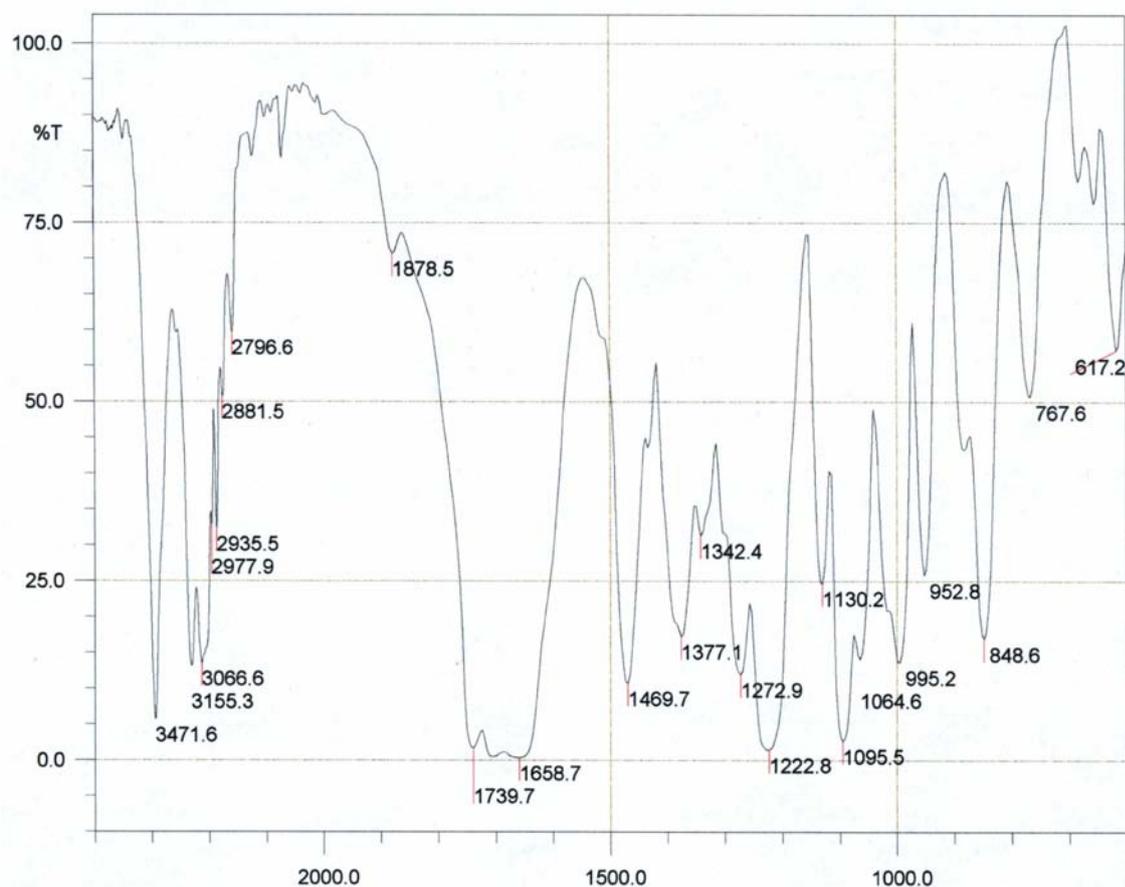
On ajoute le Na₂SO₄ pour éliminer les traces d'eau, on filtre, on évapore au maximum à l'évaporateur rotatif, et on fait une chromatographie sur colonne (0 - 8 %) MeOH, CHCl₃.

m = 0,164 gr ; Rdt = 67,7 %.

T_f = 159 – 160° C. R_f = 0,38 (MeOH/CHCl₃) (1/19).

Tableau (21) : données I.R du produit 100.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool primaire	3471
ν CH	alcène	3066
ν_a CH ₃	aliphatique	2977
ν_a CH ₂	aliphatique	2935
ν C=O	ester saturé	1739
ν C=O	amide secondaire	1658
δ CH ₂	cycloalcane	1469
δ CH ₃	aliphatique	1377
ν C-H	tertiaire	1342
ν_a C-O-C	ester aliphatique	1272
ν C-N	amide secondaire	1222
ν_a C-O-C	ether aliphatique	1095
ν C-O	alcool	1064
ν_a C-O-C	cyclique	848

**Figure 53.** Spectre IR de nucléoside 100.

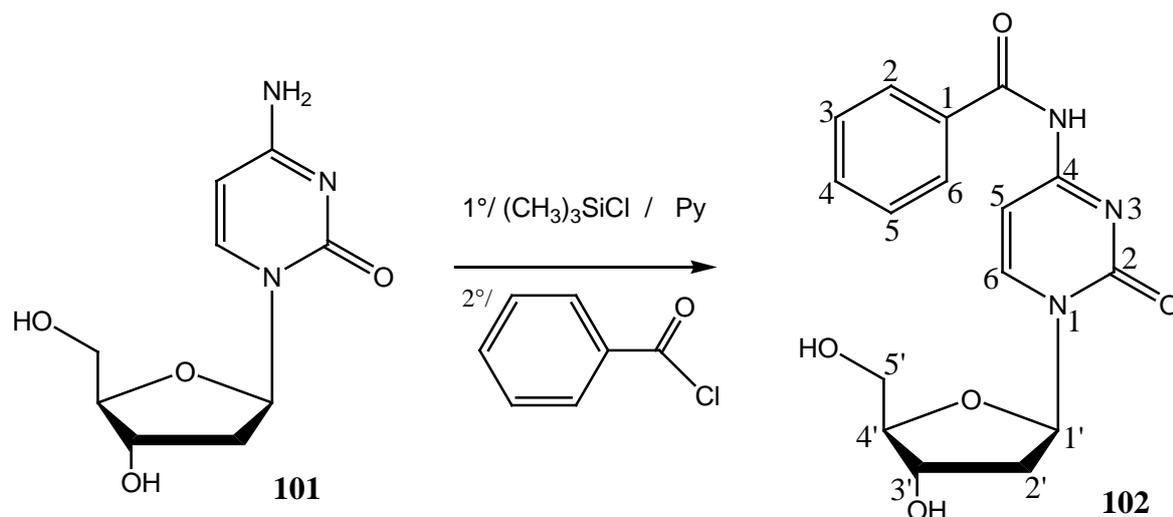
5. a) Préparation de N⁴-benzoyl-2'-déoxycytidine :

Schéma 44.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (4,405 mmoles) de 2'-déoxycytidine (**101**), et on sèche avec (3 × 11 ml) de pyridine anhydre et on met 22 ml (272,91 mmoles) de même pyridine et on ajoute 2,82 ml (22,3 mmoles) de Chlorotriméthylsilane avec l'agitation pendant une heure et demi, puis on ajoute 2,53 ml (21,96 mmoles) de benzoylchlorure et on suivre l'agitation encore deux heures et demi.

On refroidit à 5° C et on ajoute 4,405 ml (244,72 mmoles) d'eau ; après 5 minutes on ajoute 8,81 ml (471,6 mmoles) d'ammoniac et on refroidit pendant 30 minutes on sèche dans l'évaporateur rotatif et on ajoute 50 ml d'eau et on fait une extraction avec (3 × 20 ml) d'éther diéthylique.

Notre produit est soluble dans la phase aqueuse, on sépare, on refroidit, et on filtre les cristaux former.

On obtention un solide blanc.

m = 1,26 gr, Rdt = 86 %.

T_f = 236-237° C. R_f = 0,12 MeOH / CHCl₃ (1/19).

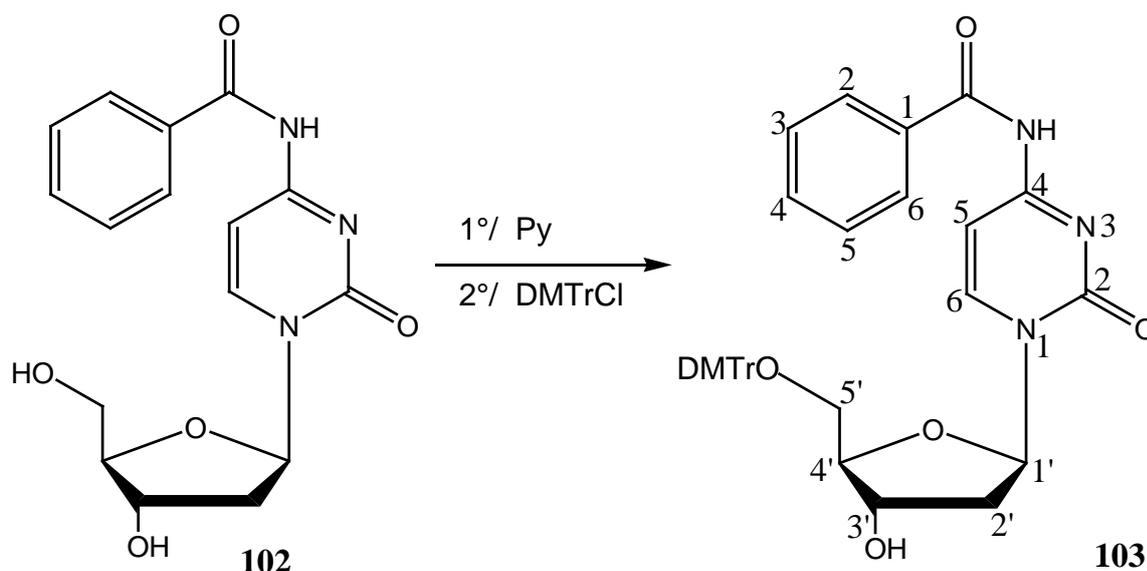
5. b) Préparation de N⁴-benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine :

Schéma 45.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (3,021 mmoles) de N⁶-benzoyl-2'-déoxycytidine (**102**), et on sèche avec (2 × 6 ml) de pyridine anhydre, et on met 12,08 ml (149,91 mmoles) de même pyridine et on ajoute 1,124 gr (3,32 mmoles) de 4,4'-diméthoxytritylchlorure avec l'agitation pendant deux heures, et on ajoute 0,112 gr (0,33 mmoles) du même réactif ; après deux heures, on ajoute 4,53 ml (79,3 mmoles) d'éthanol et après 30 minutes, on évapore sans sécher la solution, puis on ajoute 30 ml de chloroforme et on fait une extraction avec (2 × 20 ml) d'eau.

Notre produit est soluble dans la phase organique, on sèche avec le Na₂SO₄ anhydre, on filtre et on évapore.

On fait une Chromatographie sur colonne (0 – 6 %) MeOH, CH₃Cl.

On obtient un produit visqueux jaunâtre.

m = 1,37 gr ; Rdt = 71 %.

T_f = 192-194° C, R_f = 0,30 (MeOH/CHCl₃) (1/19).

5. c) Préparation de

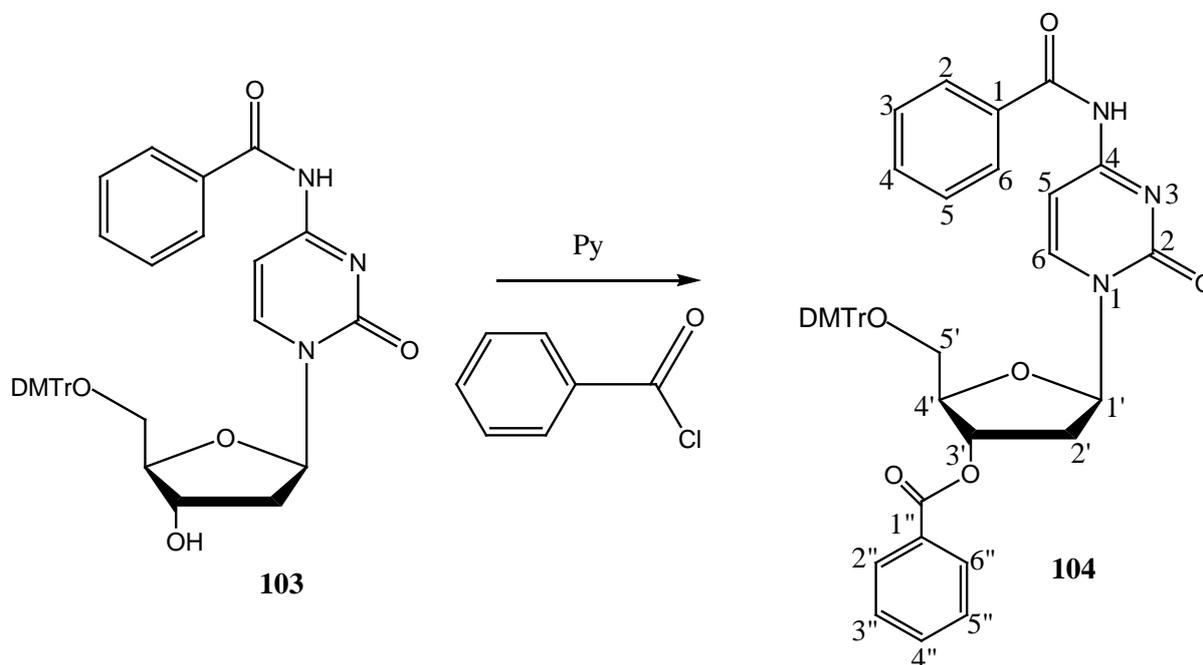
N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl,5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine :

Schéma 46.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (1,58 mmoles) de N⁴-benzoyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine (**103**), et on sèche avec (3 × 4 ml) de pyridine anhydre et on met 8 ml (100 mmoles) de même pyridine et on ajoute 0,9 ml (7,88 mmoles) de benzoylchlorure avec l'agitation pendant deux heures.

On refroidit à 5° C et on ajoute 1,56 ml (87,76 mmoles) d'eau ; après 5 minutes on ajoute 3,16 ml (169,13 mmoles) d'ammoniaque et on refroidit pendant 30 minutes, on sèche dans l'évaporateur rotatif et on ajoute 50 ml d'eau et on fait une extraction avec (3 × 20 ml) d'éther diéthylique.

Notre produit est soluble dans la phase organique, on sépare, on refroidit, et on filtre les cristaux formés.

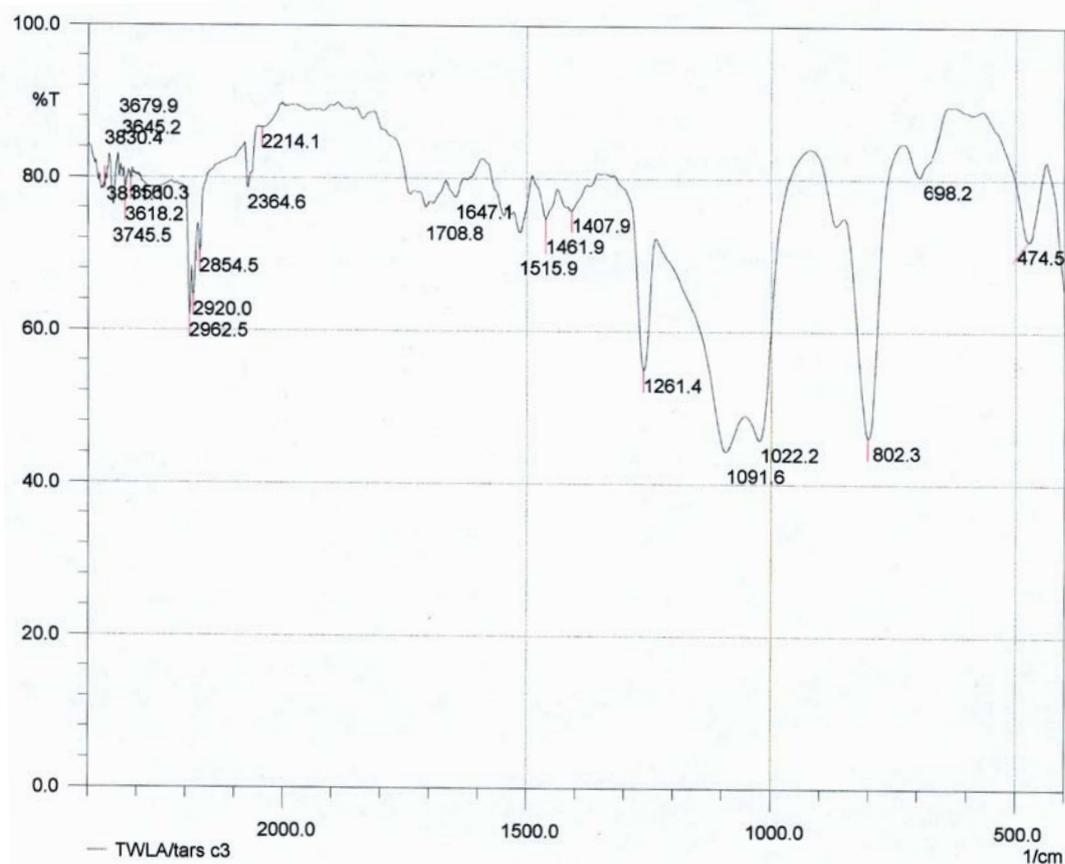
On obtient un solide blanc.

m = 0,49 gr, Rdt = 42 %.

T_f = 163-164° C, R_f = 0,65 MeOH / CHCl₃ (1/19).

Tableau (22) : données I.R du produit 104.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
$\nu_a \text{CH}_3$	aliphatique	2962
$\nu_a \text{CH}_2$	aliphatique	2920
$\nu_s \text{CH}_3$	-O-CH ₃	2854
$\nu \text{C=O}$	amide secondaire	1708
$\nu \text{C=C}$	noyau aromatique	1647
$\delta \text{N-H}$	amide secondaire	1515
δCH_2	cycloalcane	1461
$\delta_s \text{CH}_3$	aliphatique	1407
$\nu_a \text{C-O-C}$	ester benzoïque	1261
$\nu \text{C-C}$	tertiobutyl	1091
$\nu \text{C-O-C}$	ether aliphatique	1022

**Figure 54.** Spectre IR de nucléoside 104.

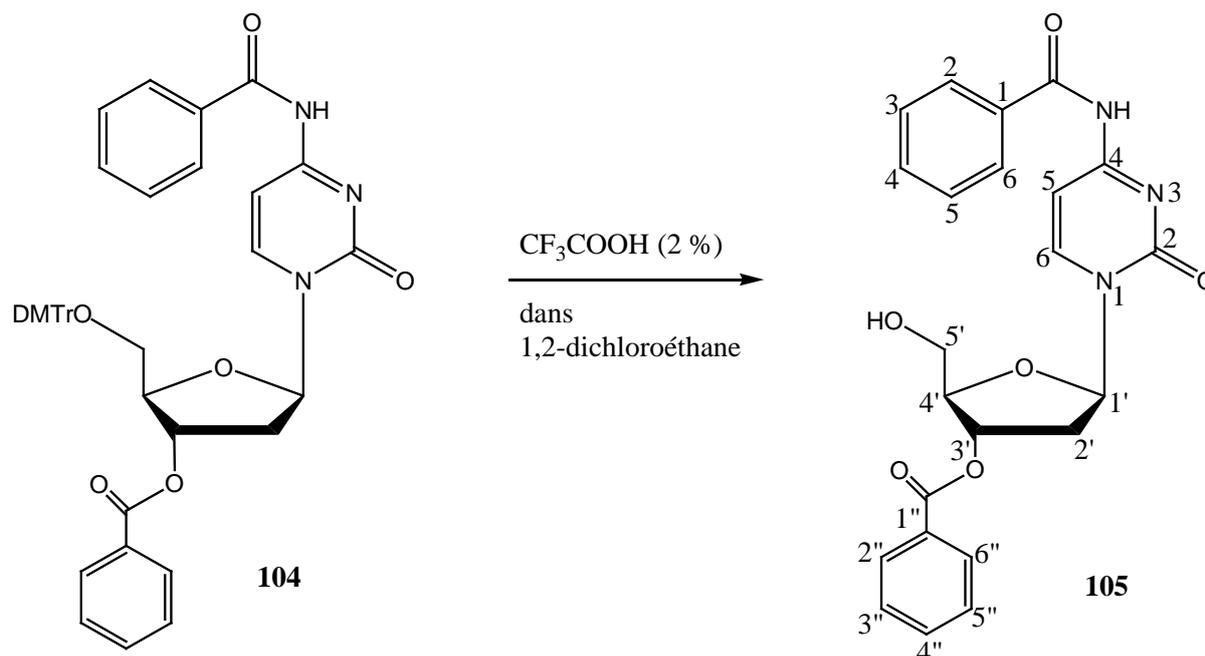
5. d) Préparation de N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine :

Schéma 46.

Dans un ballon monocol de 100 ml, on met 1 gr (1,356 mmoles) de N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl, 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-déoxycytidine (**104**), et on dissout dans 5 ml de 1,2-dichloroéthane $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, on refroidit au bain de glace, et on ajoute 5 ml d'acide trifluoroacétique (2 %) dans 1,2-dichloroéthane, on observe l'apparition d'une couleur orange foncée.

On laisse le mélange pendant 6 heures à température ambiante, on suit la réaction par CCM (1/19) MeOH/ CHCl_3 , en fin on neutralise le milieu réactionnel par une solution de KHCO_3 jusqu'à la disparition de la couleur orange.

On ajoute 30 ml de Chloroforme, et on fait une extraction avec (2×20 ml) d'eau.

On ajoute le Na_2SO_4 , on filtre, on évapore au maximum à l'évaporateur rotatif, et on fait une chromatographie sur colonne (0-6 %) MeOH, CHCl_3 .

$m = 0,37$ gr, Rdt = 62 %.

$T_f = 212-214^\circ \text{C}$. $R_f = 0,44$ MeOH / CHCl_3 (1/19).

Tableau (23) : Données RMN-¹³C et RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du produit 105.

Le groupement de carbone	Déplacement chimique δ (ppm)	Le groupement de proton	Déplacement chimique δ (ppm)	type de signal
N ⁴ -C=O	207.01	N ⁴ -H	8.38	H,d, J = 7.42 Hz
O=C-C ₁ '	166.26	C ₂ 'H, C ₆ 'H (Ar)	8.05	2H, dt, J _o = 7.37 Hz
O=C ₂	162.34	N ⁴ -HC ₂ , HC ₆ (Ar)	7.90	2H, dt, J _o = 7.62 Hz
N=C ₄ -N	≈ 145	N ⁴ -HC ₄	7.63	H, m (tt) (Ar)
=C ₆ -N	133.58	HC ₄ ' (Ar)	7.61	H, m (tt) (Ar)
N ⁴ -C ₁ (Ar)	133.21	N ⁴ -HC ₃ , HC ₅ (Ar)	7.53	2H, td, J _o = 7.7 Hz
C ₄ ' (Ar)	132.99	C ₃ 'H, C ₅ 'H (Ar)	7.49	2H, td, J _o = 7.28 Hz
N ⁴ -C ₃ , N ⁴ -C ₅ , C ₃ ' , C ₅ ' (Ar)	129.74	HC ₅	6.42	H, dd, J _{cis} = 6.25 Hz
N ⁴ -C ₄ (Ar)	129.19	HC ₆	5.64	H, dd, J _{cis} = 6.22 Hz
C ₂ ' , C ₆ ' (Ar)	129.03	C ₁ 'H _e	4.38	H, dd, J _{ea} ≈ 3 Hz
N ⁴ -C ₂ , N ⁴ - C ₆ (Ar)	128.52	C ₄ 'H _e	4.08	H, m (td), J _{ee} ≈ 2 Hz
C ₁ ' (Ar)	127.56	C ₃ 'H _e	3.51	H, m (td)
=C ₅ -	88.16	C ₅ 'H _e	2.88	H,ddd, J ₃ ≈ 4 Hz J _{gém} = 14.23 Hz
C ₄ '	86.06	C ₅ 'H _a	2.55	H,ddd, J ₃ ≈ 7 Hz J _{gém} = 14.5 Hz
C ₁ '	77.19	C ₂ 'H _e	1.71	H, m (dt)
C ₃ '	75.22	C ₂ 'H _a	1.34	H, m (dt)
C ₅ '	62.47	C ₅ 'OH	1.27	H, s
C ₂ '	38.73			

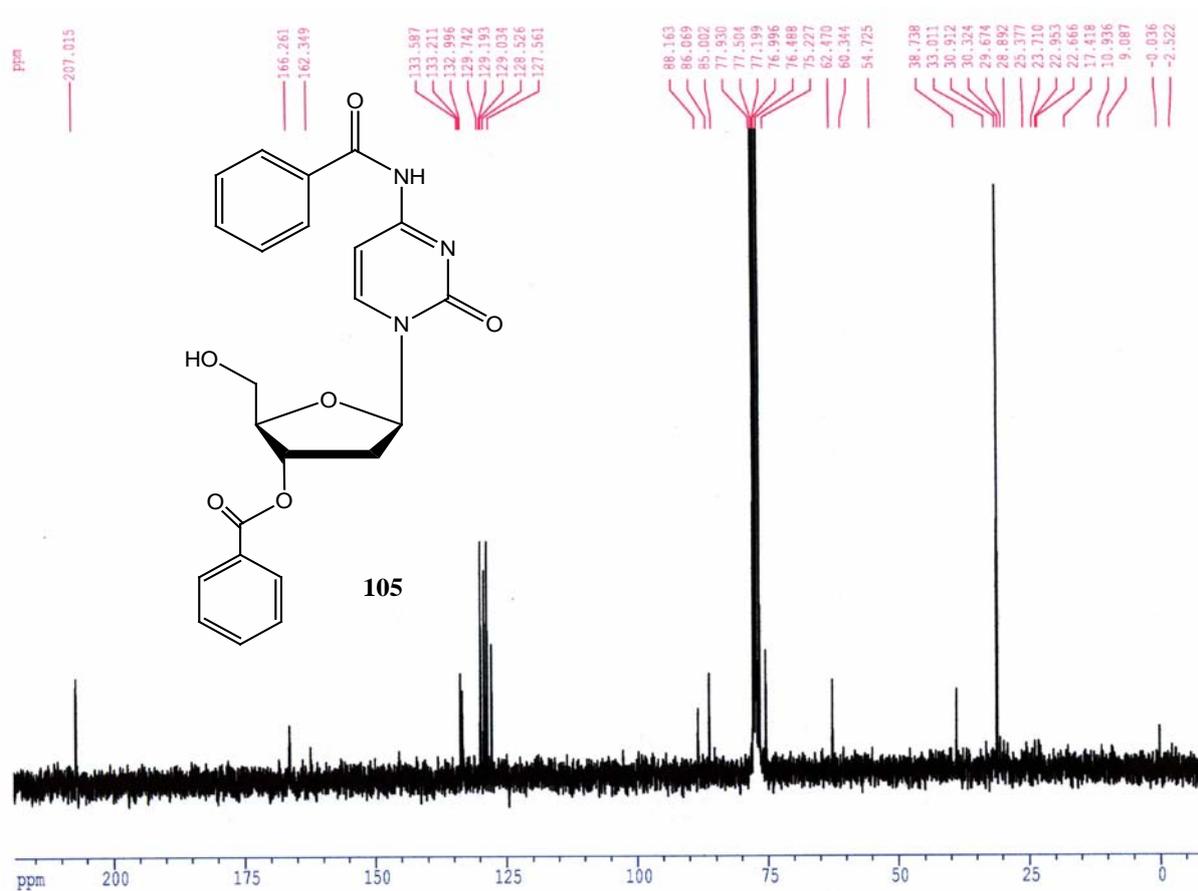


Figure 55. Spectre RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3) du nucléoside 105.

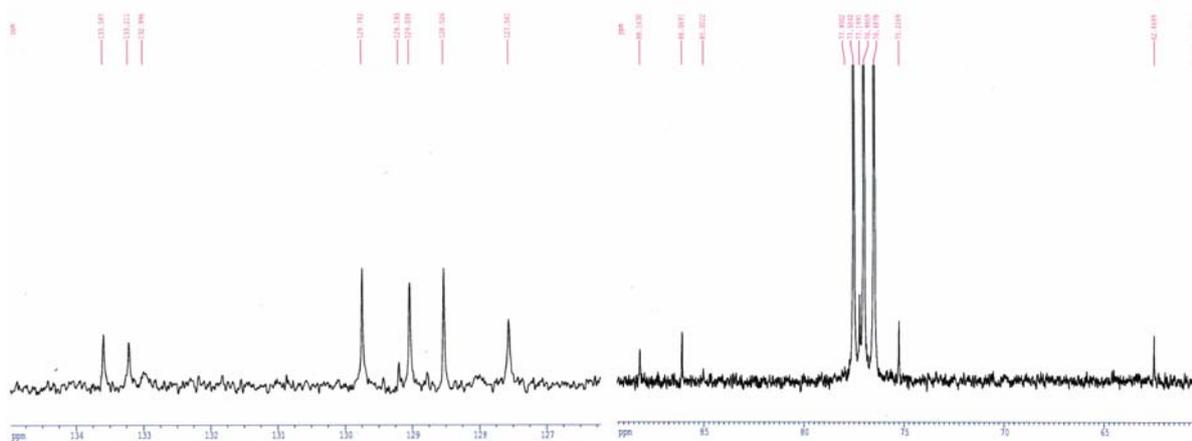


Figure 56. L'extension de ce spectre.

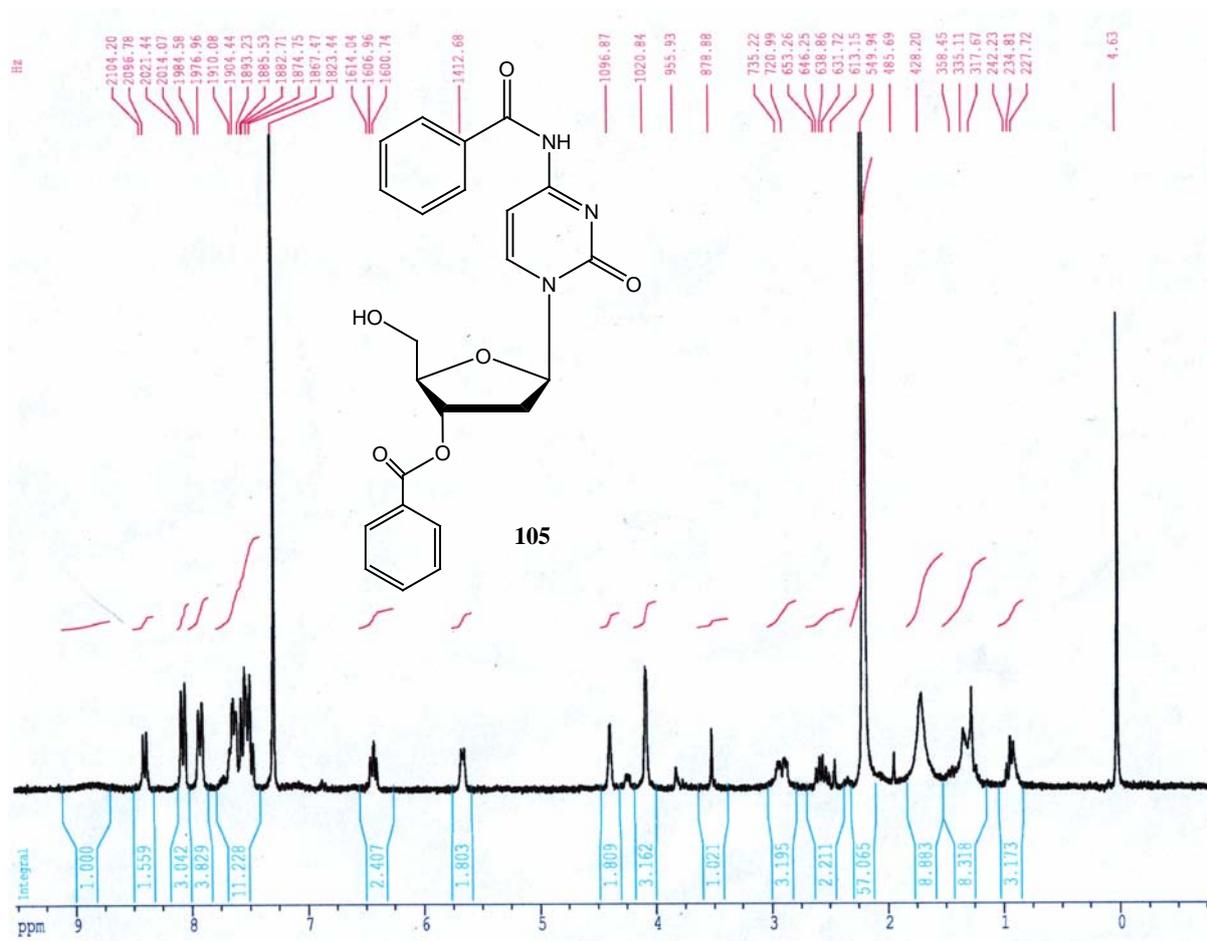


Figure 57. Spectre RMN¹H (250 MHz, CDCl₃) du nucléoside 105.

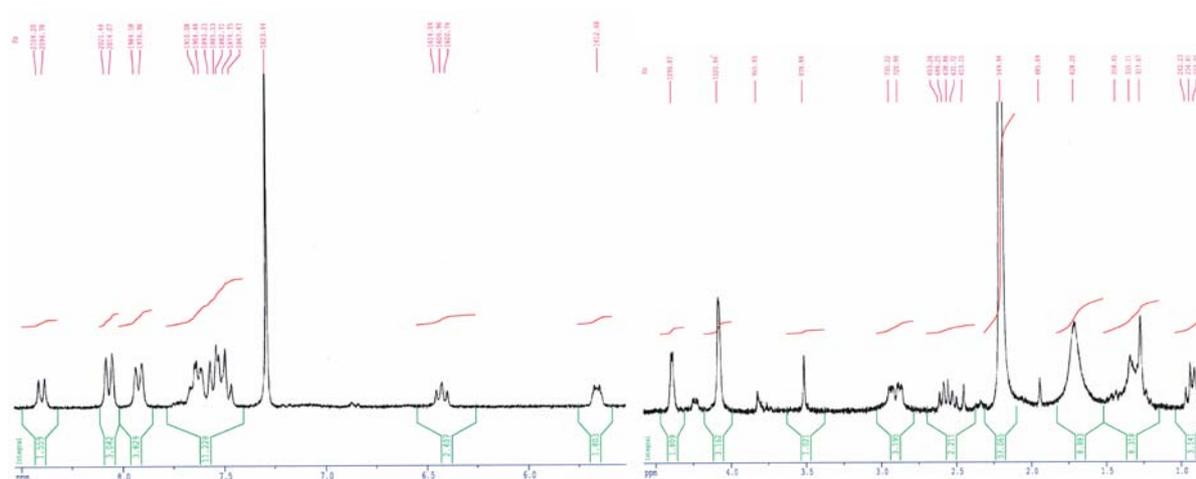
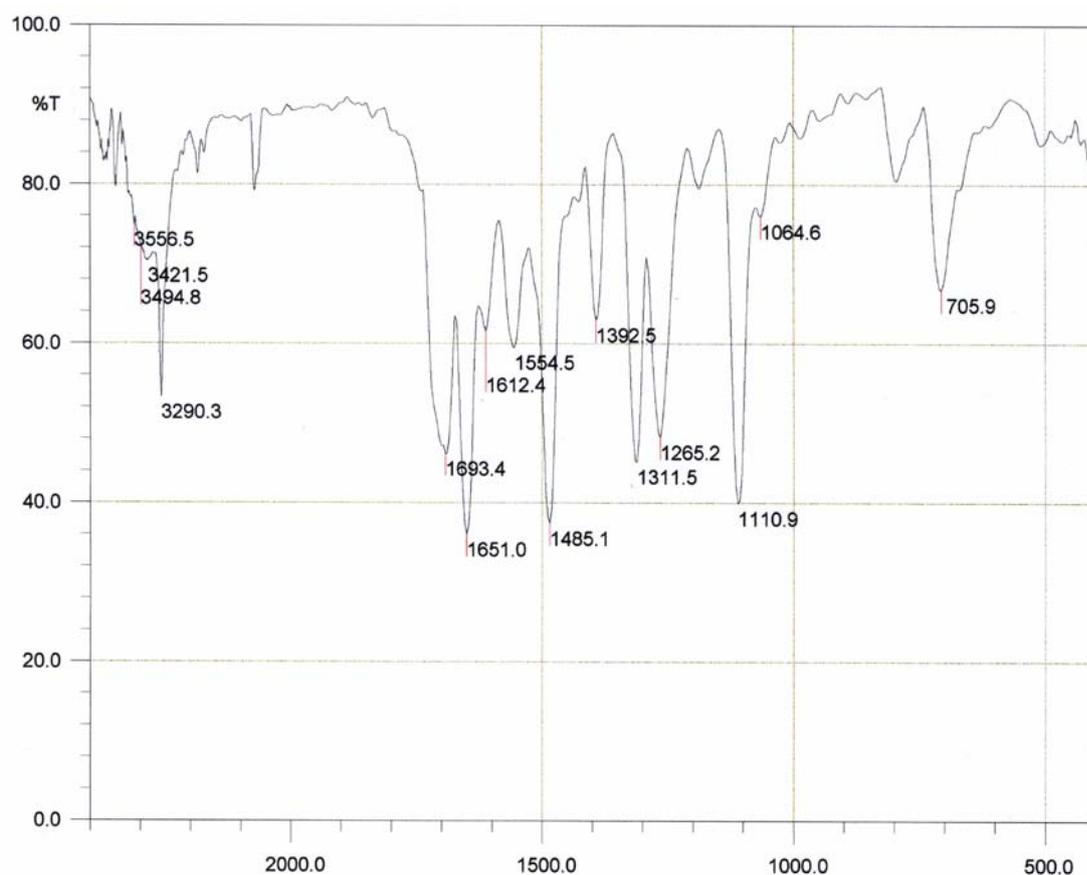


Figure 58. L'extension de ce spectre.

Tableau (24) : données I.R du produit 105.

Le groupement	La fonction	L'absorption cm^{-1}
ν O-H	alcool primaire	3290
ν C=O	amide secondaire	1693
ν C=C	C=C non conjuguée	1651
ν C=C	noyau aromatique	1612
δ N-H	amide secondaire	1554
δ CH ₂	cycloalcane	1485
ν_a C-O-C	ester benzoïque	1311
ν C-N	amide secondaire	1265
ν C-O	alcool	1110
δ CH	aromatique	1064

**Figure 59.** Spectre IR de nucléoside 105.

Conclusion générale :

Les nucléotides sont des petites molécules formées par l'association d'une base, un sucre et un ou plusieurs groupements phosphate, ils sont les constituants principales de l'ADN et de l'ARN ; en forment des polymères, appelés acides nucléiques, ils conservent les informations génétiques et les informations nécessaires à la synthèse des protéines, et jouent un rôle majeur dans la fourniture d'énergie chimique et la transmission des signaux cellulaires.

La synthèse des oligonucléotides a une large application dans l'étude enzymatique bien développées ces dernières années.

Nos travaux ont consisté à synthétiser des dérivés de nucléotides des quatre bases ; adénine, guanine, cytosine et thymine, à partir des nucléosides commerciaux par des réactions de substitutions pour protéger les centre actifs au moyen des groupes protecteurs relativement facile de l'introduire et vers des sites spécifiques.

Ce l'a conduire de synthétiser ces quatre dérivés nucléotidiques :

- N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine.
- N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine.
- 3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine.
- N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine.

Ces nucléotides sont destinés à la synthèse des oligodéoxynucléotides contenant des sites de reconnaissance normaux pour des enzymes comme BspI et HaiIII ou des sites modifier.

CC↓GG

Les références:

1. Michelson A. M. and Todd A. R.; *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632.
2. Khorana H. J., Tener G. M., Moffatt J. G. and Pol E. H.; *Chem. Int.(London)*, **1956**, 34, 1523.
3. Khorana H. J.; *Science (Washington, D. C.)*, **1979**, 203, 614.
4. Gaffney B. L. and Jones R. A.; *Tetrahedron Lett*, **1982**, 23, 2257.
5. Petrove Daskalove H., Sekine M. and Hata T.; *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1981**, 54, 3076.
6. Morin C.; *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 53.
7. Galliani G. and Pantarotto C.; *Tetrahedron Lett*, **1983**, 24, 4491.
8. De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Barr P. J., Jones A. S., Walker R. T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 2947.
9. Chodkiewicz W., Cadiot P.; *C.R. Hebd. Sceances. Acad. Sci.* **1955**, 241, 1055.
10. Ayala F. J.; *Biologie moléculaire et évolution*, **1982**.
11. Primrose S., Twyman R. and Old R.; *Principes de génie génétique*, **2004**.
12. Etienne J., Clauser É., Housset C. and Roingard P.; *Biochimie génétique Biologie moléculaire*, **2001**.
13. Novo K., Ammor M., Durrbach A., Kriaa F. and Charpentie B., Service de néphrologie; CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.
14. Bruce A., Alexander J., Julian L., Martin R., Keith R. and Peter W.; *Biologie Moléculaire de la cellule* 5^{ème} édition **2005**.
15. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger and Scott ; *Biologie Moléculaire de la cellule* 4^{ème} édition **2004**.
16. Robinson G. A., Butcher R. W. and Sutherland E. W.; *Cyclic AMP*, Academic Press, NewYork-London **1971**.
17. Suhadolink R. J.; *Nucleoside Antibiotics*, wiley-Interscience, NewYork **1979**.
18. a) Zhdanov R. I. and Zhenodareva S. M.; *Synthesis*, **1975**, 222; b) Kossel H. and Seliger H., *Fortschr ; Chem. Org. Naturstoffe*, **1975**, 32, 298; c) Amarnath V. and Broom A. D.; *Chem. Rev.*, **1977**, 77, 183; d) Reese C. B.; *Tetrahedron*, **1978**, 34, 3143; e) Ikehara M., Ohtsuka E. and Markham A. F.; *Adv. Carbohydr. Chem. And Biochem.*, **1978**, 36, 135.

19. a) Katagiri N., Itakura K. and Narang S. A.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1974**, 325; b) Katagiri N., Itakura K., and Narang S. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 7332; c) Stawinski J. Hozumi T., and Narang S. A.; *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 670; d) Stawinski J. Hozumi T., and Narang S. A. Bahl C. P., and Wu R.; *Nucleic Acids Res.*, **1977**, 4, 353; e) Van Boom J. H., Burgers P. M. J., Van der Marel G., Verdegeel C. H. M., and Wille G.; *ibid.*, **1977**, 4, 1047; f) Reese C. B., Titmas R. C., and Yau L.; *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 2727; g) de Rooij J. F. M., Wille-Hazeleger G., van Deursen P., H., Serdijn J., and van Boom J. H.; *recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1979**, 98, 537; h) Gait M. J. and Popov S. G.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2841; i) Ogilvie K. K. and Pon R. T.; *Nucleic acids Res.*, **1980**, 8, 2105.
20. a) Reese C. B. and Yau L.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, 1050; b) Ohtsuka E., Tanaka T. Wakabayashi T., Taniyama Y. and Ikehara M.; *ibid.*, **1978**, 824; c) Jones S. S. and Reese C. B.; *J. Chem. Soc.*, **1979**, 2762; d) Arentzen R. van Boeckel C. A. A., van der Marel G. and van Boom J. H.; *Synthesis*, **1979**, 137; e) Markiewicz W. T.; *J. Chem. Research (S)*, **1979**, 24; f) Chattopadhyaya J. B., Reese C. B. and Todd A. H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 987; g) Kaszewski A. Stawinski J. and Wiewiorowski M.; *Nucleic Acids Res.* **1980**, 10, 2301; h) Lesnikowski Z. J., Stec W. J. and Zielinski W. S.; *Synthesis*, **1980**, 397; i) Uhlmann E. and Pfeleiderer W.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1181; j) Verdegaal C. C. M., Jansee P. L., de Rooij J. F. M. and van Boom J. H.; *ibid.*, **1980**, 21, 1571.
21. a) Letsinger R. L. and Lunsford W. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655; b) Ogilvie K. K., Theriault N. and Sadana K. L.; *ibid.*, **1977**, 99, 7741; c) Agarwal K. L. and Riftina F.; *Nucleic Acids Res.*, **1978**, 5, 2809; d) Ogilvie K. K., Beaucage S. L., Schfman A. L., Theriault N. Y. and Sadana K. L.; *Can. J. Chem.*, **1978**, 56, 2768; e) Crea R., Hirose T. and Itakura K.; *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 395; f) Ogilvie K. K. and Theriault N. Y.; *ibid.*, **1979**, 2111; g) Miyoshi K. and Itakura K.; *ibid.*, **1979**, 3635; h) Gait M. J. and Sheppard R. C.; *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 6, 1259; i) Gough G. R., Singleton C. K., Weith H. L. and Gilham P. T.; *ibid.*, **1979**, 6, 1557; j) Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N. and Shabarova Z. A.; *ibid.*, **1979**, 6, 2041; k) Ogilvie K. K., and Theriault N. Y.; *Can. J. Chem.*, **1979**, 57, 3140; l) Matteucci M. D. and Caruthers M. H.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 719; m) Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C. Edge

- M. D., Green A. R., Heathcliffe G. R., Atkinson T. C., Newton C. R. and Markham A. F.; *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 8, 1081; n) Greskowiak K. Adamiak R. W. and Wiewiorowski M.; *ibid.*, **1980**, 8, 1097; o) Ogilvie K. K. and Pon R. T.; *ibid.*, **1980**, 8, 2105; p) Crea R. and Horn T.; *ibid.*, **1980**, 8, 2331.
22. Marrifield R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 85, 3821.
 23. Letsinger R. L. and Lunsford W. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3045.
 24. Catlin J. C. and Cramer F.; *J. Org. Chem.*, **1973**, 83, 245.
 25. Narang S. A., Hsiung H. M. and Brousseau R.; *Methods Enzymol.*, **1979**, 68, 90.
 26. Jones S. S. et al; *Tetrahedron*, **1980**, 36, 3075.
 27. van Boom J. H. et al; *J. Chem Soc. Chem. Commun.*, **1971**, 869.
 28. Ohtsuka E., Iwai S. in Narang (ed.) ; *Synthesis and application of DNA and RNA*, Academic Press, San Diego-New York-Berkley-Boston **1987**.
 29. van Boom J. H. et al; *J. Chem Soc. Chem. Commun.*, **1976**, 167.
 30. Sproat B. S., Gait M. J. in Gait (ed) M. J.; *Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford – Washington **1984**, 83.
 31. Beaucage S. L. and Caruthers M. H.; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859.
 32. McBride L. J. and Caruthers M. H.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 245.
 33. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J. and Strömberg R.; *Chem. Scr.*, **1985**, 25, 280.
 34. Froehler B. C. and Matteucci M. D.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 469.
 35. Froehler B. C.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 5575.
 36. Froehler B. C. Ng P. and Matteucci M. D.; *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 4831.
 37. Usman N., Ogilvie K. K., Jiang M. -Y. and Cedergren R. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 7845.
 38. Stawinski J., Strömberg R., Thelin M. and Westman E.; *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 9285.
 39. Ti G. S., Gaffney B. L. and Jones R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 1316.
 40. Reese C. B. and Ubasawa A.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 2265.
 41. Kaszewski A. Stawinski J. and Wiewiorowski M.; *Nucleic Acids Res.* **1980**, 10, 2301.
 42. Pon R. T., Usman N., Damha M. J. and Ogilvie K. K.; *Nucleic Acids Res.*, **1985**, 14, 6453.
 43. Ogilvie K. K. and Pon R. T., Damha M. J.; *Nucleic Acids Res.*, **1985**, 13, 6447.

44. Himmelsbach et al; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 11, 59.
45. Froehler B. C., Matteucci M. D.; *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 22, 8031.
46. Schulhof J. C., Molko D. and Teoule R.; *Nucleic Acids. Res.*, **1987**, 15, 397.
47. Schulhof J. C., Molko D. and Teoule R.; *Nucleic Acids. Res.*, **1988**, 16, 319.
48. Schaller H. Weimann G., Lerch B. and Khorana H. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3821.
49. Sinha N. D., Biernat J., McMagnus J. and Köster H.; *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 4539.
50. Agarwel K. L., Yamazaki A., Cashion P. J. and Khorana H. G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1972**, 11, 451.
51. Chattopadhyaya J. B. and Reese C. B.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 639.
52. a) Matteucci M. D. and Caruthers M. H.; *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 21, 3243.
b) Tanaka T. and Letsinger R. L.; *Nucleic Acids Res.*, **1982**, 10, 3249.
53. McLaughlin L. W. and Piel N. in Gait M. J. (ed.); *Oligonucleotide Synthesis : A Practical Approach*, IRL Press, Oxford – Washington **1984**, 117.
54. Eckstein F. (ed.); *Oligonucleotides and analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford **1991**.
55. Gilham P. T. and Khorana H. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 4647.
56. Patel J. P., Chancey M. A., Milican T. A., Bose C. C. and Eaton M. A. W.; *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 6853.
57. Narang S. A., Itakura K. and Wightman K. H.; *Can. J. Chem.* **1972**. 50. 769.
58. Maki T., Suzuki M., Kamesama K. and Sako M.; *Chem. Comm.* **1981**, 658.
59. a) Gait M. G., Popov S. G., Singh M. and Titmas R. C.; *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 7, 234; b) Duckworth M. L., Gait M. G., Geolet P., FangHong G., Singy M. and Titmas R. C.; *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 1691.
60. a) Igolen J. and Morin C.; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4802 ; b) Kohli V., Blöcker H. and Köster H.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2683 ; c) Kierzek R., Ito H., Baht R. and Itakura K.; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 3761 ; d) Köster H. and Sinha N. D.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 23, 2641.
61. Vasella A.; *Helv. Chem. Acta.* **1977**, 60, 426.
62. Chattopadhyaya J. B. and Reese C. B.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 639.
63. Buchi H. and Khorana H. G.; *J. Mol. Biol.*, **1972**, 251.

64. Bridson P. K., Markiewicz W. T. and Reese C. B.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1977**, (447,791).
65. Otter B. A. and Fox J. J.; *Synthetic Procedures in Nucleic Acids Chemistry*, Zurbach W. W. and Tipson R. S. Edits.; *intersciences*, New York, **1968**, 1, 285.
66. Ito H., Ike Y. and Ikuta S.; *Nucleic Acids Res.*, **1982**, 10, 1755.
67. Miyoshi K., Arentzen R., Huang T. and Itakura K.; *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 8, 5507.
68. Crea R. and Horn T.; *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 8, 2331.
69. Matteucci M. D. and Caruthers M. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 3171.
70. Efimov V. A., Reverdatto S. V. and Chakhmakhcheva O. B.; *Nucleic Acids Res.*, **1982**, 9, 6675.
71. Adams S. P. et al; *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 661.
72. Nemer M. J. and Ogilvie K. K.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 4159.
73. Wadell T. G., Leyden D. E. and de Bello M. T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 5303.
74. Caruthers M. H. in Gassen H. G., Lang A. (eds.); *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, A Laboratory Manual*, Verlag Chemie, Weinheim **1982**, 71.
75. Bannwarth W. and Laiza P.; *DNA*, **1986**, 5, 413.
76. Chow F., Kempe T. and Palm G.; *Nucleic Acids Res.*, **1981**, 9, 2807.
77. van Boom J. H. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1977**, 4, 1047.
78. van Tamelen E. E. and Daub S. V.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 3526.
79. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T.; *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory press **1989**.
80. McLaughlin L. W., Krusch J. U. in Gasen H. G., Lang (eds) A.; *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments : A Laboratory Manual*, Verlag Chemie, Weinheim **1982**.
81. Schmidt G. and Seliger H.; *J. Chromatogr.*, **1987**, 397, 141.
82. Wu R. in Gait (ed.) M. J.; *Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford – Washington **1984**, 135.
83. Maxam A. M. and Gilbert W.; *Methods Enzymol*, **1980**, 65, 499.
84. Zon G.; *Pharmaceutical Research*, **1988**, 5 N° 9, 539.
85. Hélène C. and Toulmé J.-J.; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1990**, 1049, 99.
86. Stein C. A. and Cohen J. S.; *Cancer Research*, **1988**, 48, 2659.

87. Stec W. J., Zon G., Egan W. and Stec B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6077.
88. Froehler B. C.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 5565.
89. Andrus A., Efcavitch J. W., McBrid L. J. and Glusti B.; *Tetrahedron Lett*, **1988**, 29, 861.
90. Dahl B. H., Bjergarde K., Sommer V. B. and Dahl O.; *Nucleosides & Nucleotides*, **1989**, 8, 1023.
91. Beaucage S. L. et al; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1254.
92. Kamer P. C. J., et al; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6757.
93. Brill W. K.-D., Tang J.-Y., Ma Y.-X. and Caruthers M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 2321.
94. Miller P. S., Fang K. N., Kondo N. S. and Ts'o P. O. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 6657.
95. Miller P. S. et al; *Biochimie*, **1985**, 67, 769.
96. Miller P. S. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 6225.
97. Miller P. S. et al; *Biochemistry*, **1986**, 25, 5092.
98. de Vroom E. et al; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1987**, 106, 65.
99. Inoue H. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 6131.
100. Sproat B. S., Beijer B. and Iribarren A.; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, 18, 41.
101. Sequin U.; *Experientia*, **1973**, 29, 1059.
102. Imbach J. L., Rayner B. and Morvan F.; *Nucleosides & Nucleotides*, **1989**, 8, 627.
103. Hélène C. et al; *Biochimie*, **1985**, 66, 777.
104. Zerial A., Thuong N. T. and Hélène C.; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 9909.
105. Vlassov V. V. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 4065.
106. Gamper H. B., Cimino G. D. and Hearst J. E.; *J. Mol. Biol.*, **1987**, 197, 349.
107. Shi Y. B., Gamper H. B., Hearst J. E.; *J. Mol. Biol.*, **1988**, 263, 527.
108. Miller P. S. and Ts'o P. O. P.; *Anti-Cancer Drug Des*, **1987**, 2, 117.
109. Asseline et al; *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1984**, 81, 3297.
110. Le Doan T. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 7749.
111. Praseuth D., Perrouault L. and Le Doan T.; *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1988**, 85, 1349.
112. Praseuth D. et al; *Biochemistry*, **1988**, 27, 3031.
113. Hélène C., Le Doan T., Thuong N. T. in Nielsen (ed.) P. E.; *Photochemical Probes in Biochemistry*, Kluwer Publ., Norwell MA, **1989**, 219.

114. Hélène C., Thuong N. T., Saison-Behmoaras T. and François J. C.; *Tibtech*, **1989**, 7, 310.
115. Boutorin A. S. et al; *FEBS Lett.*, **1984**, 43.
116. Chu B. C. F. and Orgel L. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1985**, 82, 963.
117. Dreyer G. B. and Dervan P. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 968.
118. Chen C. H. B. and Sigman D. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, 7147.
119. Chen C. H. B. and Sigman D. S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6570.
120. François J.-C. et al; *Biochemistry*, **1988**, 27, 2272.
121. François J.-C. et al; *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 5891.
122. Le Doan T. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 8643.
123. Corey D. and Schultz P.; *Science (Washington, D. C.)*, **1987**, 238, 1401.
124. Zuckermann R. N. and Schultz P. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 1766.
125. Applied Biosystems; *DNA Synthesizer*, User Bulletin, No. 49, Foster City **1988**.
126. Beckman Instruments; *Aminomodifiers and Easy Label Kits*, User Manual, Palo Alto **1990**.
127. Chu B. C. F., Wahl G. M. and Orgel L. E.; *Nucleic Acids Res.*, **1985**, 11, 6513.
128. Jablonski E., Moomaw E. W., Tullis R. H. and Ruth J.-L.; *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 6115.
129. Lemaitre M., Bayard B. and Lebleu B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 648.
130. Lemaitre M., Bisbal C., Bayard B. and Lebleu B.; *Nucleosides & Nucleotides*, **1987**, 6, 311.
131. Zuckermann R., Corey D. and Schultz P.; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 5305.
132. Nelson P. S., Frye R. A. and Liu E.; *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 7187.
133. Agrawal S. and Tang J.-Y.; *Tetrahedron Lett*, **1990**, 31, 1543.
134. Letsinger R. L. and Schott M. E., US 4 547 569, **1985**.
135. Jäger A., Levy M. J. and Hecht S. M.; *Biochemistry*, **1988**, 27, 7237.
136. Langer R. P., Waldrop A. A. and Ward D. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 6635.
137. Cook A. F., Vuocolo E. and Brakel C. L.; *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 4077.
138. Urdea M. S. et al; *Gène*, **1987**, 61, 253.
139. Gillam I. C. and Tener G. M.; *Anal. Biochem*, **1986**, 257, 199.

140. Pieles U., Sproat B. S., Neuner P. and Cramer F.; *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 8967.
141. Gebeyehu G. et al; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 16, 4934.
142. Tchen P., Fuchs R. R. P., Sage E. and Leng M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 3466.
143. Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewicz J. and Narang S. A.; *Nucleic Acids Res*, **1979**, 7, 1371.
144. Chattopadhyaya J. B. and Reese C.B.; *Nucleic Acids Res*, **1980**, 8, 2039.
145. Broka C., Hozumi T., Arentzen R. and Itakura K.; *Nucleic Acids Res*, **1980**, 8, 5461.
146. Reese C. B. and Ubasawa A.; *Tetrahedron Lett*, **1980**, 2265.
147. Daskalove H. P., Sekine M. and Hata T.; *Tetrahedron Lett*, **1980**, 3899.
148. Gough G. R., Collier K. J., Weigh H. L. and Gilham P. T.; *Nucleic Acids Res*, **1979**, 7, 1955.
149. Seth A. K. and Jay E.; *Nucleic Acids Res*, **1980**, 8, 5545.
150. Jones S. S., Reese C. B., Sbanda S. and Ubasawa A.; *Tetrahedron Lett*, **1981**, 4755.
151. Sieber P.; *Helv. Chem. Acta.*, **1977**, 60, 2711.
152. Carpino L. A., Tsao J.-H., Ringsdorf H., Fell E. and Hettrich G.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, 358.
153. Lipshutz B. H. and Pegram J. J.; *Tetrahedron Lett*, **1980**, 3343.
154. Gioeli C., Balgobin N., Josephson S. and Chattopadhyaya J. B., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 969.
155. Lipshutz B. L., Pegram J. J. and Morey M. C.; *Tetrahedron Lett*, **1981**, 4603.
156. Uhlmann E. and Pfeleiderer W.; *Nucleic Acids Research*, **1978**, Special Publication No. 4 s 25.
157. Jones R. A., Fritz H.-J. and Khorana H. G.; *Biochem*, **1978**, 17, 1268.
158. a) Bahl C. B., Wu R., Itakura K. Katagiri N. and Narang S. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1976**, 73, 91; b) Sung W. L., Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewicz J., Wu R. and Narang S. A.; *ibid.*, **1979**, 7, 2199.
159. a) Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F. and Boyer H. W.; *Science*, **1977**, 198, 1056; b) Goeddel V. D., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansure D. G., Ross M. J., Miozzari G. Crea R. and Seeburg P. H.; *Nature*, **1979**, 281, 544; c) Crea R., Kraszewski A.,

- Hirose T. and Itakura K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, 75, 5765; d) Goddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K. and Riggs A. D.; *ibid.*, **1979**, 76, 106.
160. Ohtsuka E., Tanaka T. and Ikehara M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 6409; Ohtsuka E., Tanaka T. and Ikehara M.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 28, 120.
161. Bridson P. K., Markiewicz W. T. and Reese C. B.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, 447.
162. Sekine M., Hamaoki K. and Hata T.; *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 2325.
163. Fischer E. ; *Chem. Ber.* **1914**, 47, 3193.
164. a) Morin C. ; *l'Actualité Chim.*, **1981**, p 29; b) Téoule R. ; *La recherche*, **1982**, 340; c) Chausson L. ; *Biofuture*, **1982**, 41.
165. Fuji K., Ichikawa K. and Fujita E.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3561.
166. MacCoss M., Ryu E. K., White R. S. and Last R. L.; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 788.
167. Stevens M. A., Magrath D. I., Smith H. W. and Brown G. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2755.
168. a) Garrett E. R. and Mehta P. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8532; b) Kryzosiak W. and Reese C. B.; *Tetrahedron.* **1978**, 34, 318; c) York J. L.; *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 2171.
169. Klenow H. and Frederiksen S.; *Biochem. Biophys. Acta.* **1961**, 52, 384.
170. Kikugawa K., Suehiro H., Yanase R. and Aoki A.; *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, 25, 1959.
171. Eschenmoser A.; *Quarterly Reviews Chem. Soc.*, **1970**, 24, 407.
172. Katritzky A.R. and Lagowski J.M.; *Chemistry of Heterocyclic N-oxides*, Academic Press, London & New-York, **1970**, 170.
173. Naumann cf. K., Zon G. and Mislow K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 7012.
174. a) Kummer V. D., Seshradi T. and Anorg Z.; *Allg. Chem.*, **1976**, 425, 326; b) Barton D. H.R., Beugelmans R. And Yong R. N.; *Nouv. J. Chimie.* **1978**, 2, 363; c) Hortmann A. G., Koo J. and Yu C. C.; *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2289; d) Homaidan F. R. and Issidores C. H.; *Heterocycles*, **1981**, 16, 411.
175. a) Boulton A. J., Gray A. C. G. and Katritzky A. R.; *J. Chem. Soc.* **1965**, 5958; b) Ackrell M., Altaf-Urrahman M., Boulton A. J. and Brown R. C.; *J. Chem. Soc. Perkin I.* **1972**, 1587; c) Dirlam J. P. and Mc Farland J. W.; *J. Org. Chem.*

- 1977, 42, 1360; d) Kameko C., Yamamoto A. and Gomi M.; *Heterocycles*, **1979**, 12, 227.
176. a) Eyring E. J. and Ofengand J.; *Biochemistry*, **1967**, 6, 2500; b) Goldschmidt B. M., Blazej T. P. and Van Duuren B. L.; *Tetrahedron Lett*, **1968**, 1583; c) Shapiro R., Cohen B. I., Shiuey S. J. and Maurer H.; *Biochemistry*, **1969**, 8, 238; d) Moschel R. C. and Leonard N. J.; *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 294; e) Sattangi P. D., Leonard N. J. and Frihart C. R.; *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 3292; f) Goldschmidt B. M. and Van Duuren B. L.; *Tetrahedron Lett*, **1979**, 1177.
177. Marzilli L. G., deCastro B. and Solorzano C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 461.
178. Campagne J.-M., Prim D.; *Les complexes de palladium en synthèse organique*. Edition CNRS, **2001**.
179. Tanaka H., Baba M., Hayakawa H., Sakamaki T., Miyasaka T., Ubasawa M., Takashima H., Sekiya K., Nitta I., Shigeta S., Walker R. T., Balzarini J. and De Clercq E.; *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 349.
180. Crisp G. and Flynn B. L.; *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6614.
181. McGuigan C., Yarnold C. J., Jones G., Velasquez S., Barucki H., Brancale A., Andrei G., Snoeck R. and De Clercq E.; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4479.
182. Robins M. J. and Barr P. J.; *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1854.
183. Aucagne V.; Amblard F.; Agrofoglio L.A.; *Synlett*. **2004**, 2406.
184. Hocek M.; Votruba I.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1055.
185. Muller C.E.; *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 1269.
186. Crimmins M.T.; *Tetrahedron*. **1998**, 54, 9229.
187. a) Zhu X.; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid*. **2000**, 19, 651; b) Agrofoglio L. A., Suhas E., Farese A., Condom R., Challand S. R., Earl R. A. and Guedj R.; *Tetrahedron*. **1994**, 50, 10611; c) Borthwick A.D. and Biggadike K.; *Tetrahedron*. **1992**, 48, 571; d) Ferrero E. and Gotor V.; *Chem. Rev.* **2000**, 1000, 4319.
188. Marquez V.V. and Lim L.-I.; *Med. Res. Rev.* **1986**, p 6.
189. Agrofoglio L.A. and Challand, S.R.; *Kluwer Academic*: Dordrecht, **1998**; p 174.
190. Chu C.K., Jin Y.H., Baker R.O. and Huggins J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 9.
191. Song G.Y., Paul V., Choo H., Morrey J., Sidwell R.W., Schinazi R.F. and Chu C.K.; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3958.

192. a) Buckwold V.E., Wei J., Wenzel-Mathers M. and Russell, J.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 2293. b) Malet I., Wychowski C., Huraux J.M. Agut H. and Cahour A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 253, 257.
193. Saito Y., Escuret V., Durantel D., Zoulim F., Schinazi R. F. and Agrofoglio L.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3633.
194. Escuret V., Aucagne V., Joubert N., Durantel D., Rapp K. L., Schinazi R.F., Zoulim F. and Agrofoglio L.A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6015.
195. Fan W.-Q., Katritzky A. R.; *In Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 4; Katritzky A. R., Rees C. W. and Scriven C. W. V., Eds.; *Elsevier Science: Oxford*, **1996**, 1-126.
196. a) Velaquez S., Alvarez R., Perez C., Gago F., De Clercq E., Balzarini J., Camarasa M.-J.; *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, 9, 481; b) Yokoyama M., Nakao E., Sujino K., Watanabe S. and Togo H.; *Heterocycles.* **1990**, 31, 1669.
197. a) Dehne H.; *In Methoden der Organischen Chemie*, Schumann E., Ed.; Thieme: Stuttgart, **1994**, 8, 305; b) Wamho H.; *in Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R.; Rees C. W., Eds.; Pergamon: Oxford, **1984**; 5, 669; c) Abu-Orabi S. T., Atfah M. A., Jibril I., Mari'I F. M., Ali A. A.-S.; *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, 26, 1461.
198. Chen M.D., Lu S.J., Yuag G.P., Yang S.Y. and Du X.L.; *Heterocyclic Comm.* **2000**, 6, 421.
199. Manfredini S., Vicentini C.B., Manfrini M., Bianchi N., Rutigliano C., C. Mischiati C., Gambari R.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2343.
200. a) Alvarez R., Velazquez S., San-Felix A., Aquaro S., De Clercq E. D., Perno C. F., Karlsson A., Balzarini, J. and Camarasa M. J.; *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4185. b) San-Felix A., Alvarez R., Velazquez S., De Clercq E., Balzarini J. and Camarasa M. J.; *Nucleosides & Nucleotides.* **1995**, 14, 595.
201. a) Alonso R., Camarasa M. J., Alonso G. and De las Heras F. G.; *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, 15, 105; b) De la Heras F., Alonso R., Alonso G., Contreras A. and Sanchez R.; *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 496.
202. Kagitani T., Minagawa M., Nakahara Y., Kimura R., Tsubakimoto T., Oshiumi R. and Sakano K.; JP 198762039525, **1987**.
203. Sanghvi Y. S., Bhattacharya B. K., Kini G. D., Matsumoto S. S., Larson S. B., Jolley W. B., Robins RK., and Revankar G.R.; *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 336.
204. Kolb H. C. and Sharpless K. B.; *Drug Discovery Today.* **2003**, 8, 1128.

205. a) Peto C., Batta G., Gyorgydeak Z., Sztaricskai, F.; *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15, 465; b) Kume M., Kubota T., Kimura Y., Nakashimizu H., Motokawa K., Nakano M.; *J. Antibiot.* **1993**, 46, 177; c) Moltzen E. K., Pedersen H., Bogeso K. P., Meier E., Frederiksen K., Sanchez C. and Lembol H. L.; *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4085; d) Norris P., Horton D. and Levine B. R.; *Heterocycles.* **1996**, 43, 2643.
206. Bigge C.F., Bridges A.J., Casimiro-Garcia A., Fakhoury S. A. Lee H.T., Reed J. E., Schaum R.P., Schlosser K.M., Sexton K. E. and Zhou H.; WO 2003018553, **2003**.
207. Thompson C.M. and Hergenrother P.M.; *Macromolecules.* **2002**, 35, 5835.
208. Scriven E. F. V. and Turnbull K.; *Chem. Rev.* **1988**, 88, 297.
209. a) Huisgen R.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, 75, 742; b) Huisgen R.; *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. Padwa A, Ed.; Wiley: New York, **1984**, pp.1-176.
210. Huisgen, R.; *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604.
211. a) Benson F. R. and Savell W. L.; *Chem. Rev.* **1950**. 1-68; b) Boyer J. H.; *In Heterocyclic Compounds*; Elderfield R. C., Ed.; Wiley: New York, **1961**; 7, Chapter 5, pp 384; c) Lwowski W.; *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa A., Ed.; Wiley-Interscience: New York, **1984**; 1, pp 559.
212. a) Tamura Y., Chun M. W., Kwon S., Bayomi S. M., Okada T. and Ikeda M.; *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 3515; b) Abu-Orabi S. T., Atfah M. A., Jibril I., Mari'I F. M. and Ali A. A.-S.; *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26, 1461; c) Lalezari I., Gomez L. A. and Khorshidi M.; *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, 27, 687; d) Gouault N., Cupif J.-F., Sauleau A. and David M.; *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7293.
213. Perrin D. D., Armarego W. L. F., and Perrin D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford, **1986**.

RESUME :

Dans ce travail, nous avons synthétisé des dérivés de nucléotides des quatre bases; adénine, guanine, cytosine et thymine; a partir des nucléosides commerciaux par la protection des centre actifs par des groupes protecteurs vers des sites spécifiques conduisant aux quatre produits suivant :

- N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine.
- N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine.
- 3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine.
- N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine.

Ces produits sont destinés à la synthèse des oligodésoxynucléotides contenant des sites de reconnaissance normaux ou des sites modifier.

ABSTRACT:

In this work, we have synthesized nucleotides derivatives of the bases; adenine, guanine, cytosine and thymine; using a commercial nucleosides. The synthesis was by protection of centre reagent by defenders groups towards specific sites leading (driving) to four following products:

- N²-isobutyryl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoethylphosphoro)-2'-deoxyguanosine.
- N⁶-benzoyl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoethylphosphoro)-2'-déoxyadenosine.
- 3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoethylphosphoro)-2'-deoxythymidine.
- N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-deoxycytidine.

These products are intended for the synthesis of oligodesoxynucleotids containing normal sites of gratitude (recognition) or modified sites.

ملخص:

في هذا العمل، قمنا بإصطناع مشتقات النيكلوتيدات لأربعة قواعد : أدينين، ثوانين، سايتوزين وتايمين إنطلاقاً من نيكلوتيدات تجارية، وهذا بحمايتي المراكز الفعالة بمجموعات حامية في مواقع محددة. وتم الحصول على الأربعمركبات التالية :

- N²-isobutyryl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine.
- N⁶-benzoyl-3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine.
- 3'-O-(4"-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine.
- N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine.

هذه المركبات تستعمل لإصطناع نيكلوتيد حلزوني يحتوي على مواقع إما محددة طبيعية أو متحورة.

TITRE DU MEMOIRE :

Synthèse quelques nucléotides destinée à la synthèse oligodéoxynucléotide.

AUTEUR :

REKKAB Seifeddine

Université Mentouri – Constantine.

RESUME

Dans ce travail, nous avons synthétisé des dérivés de nucléotides des quatre bases; adénine, guanine, cytosine et thymine; a partir des nucléosides commerciaux par la protection des centre réactifs par des groupes protecteurs vers des sites spécifiques conduisant aux quatre produits suivant :

- N²-isobutyryl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyguanosine.
- N⁶-benzoyl-3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxyadénosine.
- 3'-O-(4''-Chlorophenyl-O-cyanoéthylphosphoro)-2'-déoxythymidine.
- N⁴-benzoyl-3'-O-benzoyl-2'-déoxycytidine.

Ces produits destinés à la synthèse des oligodéoxynucléotides contenant des sites de reconnaissance normaux ou des sites modifier.

Mots clés :

Déoxyadénosine, déoxyguanosine, déoxycytosine, déoxythymidine, nucléotide, nucléoside, oligodéoxynucléotide.