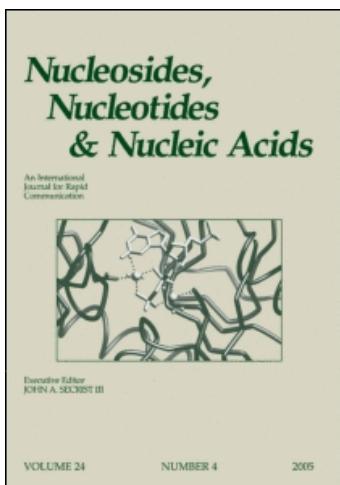


This article was downloaded by:
On: 27 January 2011
Access details: Access Details: Free Access
Publisher Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

Etude des Parametres Experimentaux Influencant la Formation de la Liaison Phosphotriester Activee par le BOP. Application en Synthese Oligodesoxyribonucleotidique

D. Molko^a; A. Guy^b; R. Téoule^a

^a Laboratoires de Chimie, Département de Recherche Fondamentale, Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, GRENOBLE CEDEX, France

To cite this Article Molko, D. , Guy, A. and Téoule, R.(1982) 'Etude des Parametres Experimentaux Influencant la Formation de la Liaison Phosphotriester Activee par le BOP. Application en Synthese Oligodesoxyribonucleotidique', Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 1: 1, 65 — 80

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328318208079403

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328318208079403>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

ETUDE DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX INFLUENÇANT
LA FORMATION DE LA LIAISON PHOSPHOTRIESTER ACTIVEE PAR LE BOP.
APPLICATION EN SYNTHESE OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDIQUE.

D. Molko, A. Guy et R. Téoule,

Laboratoires de Chimie, Département de Recherche Fondamentale,
Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble,
85 X, F.38041 GRENOBLE CEDEX, France.

Abstract : The optimum conditions for the use of BOP as the condensing reagent in oligonucleotide synthesis have been determinated. They were applied to a rapid preparation of an undecanucleoside decaphosphate.

INTRODUCTION.

La synthèse des oligonucléotides par la méthode des phosphotriesters a connu un développement considérable ces dernières années. Elle fait très souvent appel à des synthons nucléotidiques possédant en position 5' un groupement labile en milieu acide et en position 3' un groupement phosphate diester¹⁻⁶. La jonction d'un composé de ce type avec un nucléoside possédant l'hydroxyle en 5' libre est généralement effectuée par un agent de condensation de type arylsulfonyl azole⁷⁻¹². Récemment, un nouveau type de réactif capable de créer la liaison phosphotriester a été développé dans notre laboratoire : il s'agit des sels de phosphonium de l'hydroxybenzotriazole¹³⁻¹⁴.

Ces composés présentent l'avantage d'être très stables et de donner lieu à très peu de réactions parasites. Cependant, ces agents

de condensation sont caractérisés par des temps de réaction très longs, ce qui est un obstacle à leur utilisation intensive en chimie des oligonucléotides. Un moyen simple de jouer sur la vitesse de réaction est d'augmenter soit la concentration des réactifs, soit d'élever la température. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier en détail les paramètres influençant le rendement en phosphate triester obtenu à partir d'un mononucléoside monophosphate diester et d'un nucléoside 5' OH libre afin d'optimiser l'utilisation du BOP comme agent de condensation.

Nous avons ensuite appliqué ces résultats à la synthèse rapide d'un undécanucléoside décaphosphate utilisable pour l'étude des mécanismes de "splicing".

ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT DE LA FORMATION DE LA LIAISON PHOSPHOTRIESTER AVEC LE BOP.

Pour réaliser ce travail, un modèle simple a été choisi : la formation du dinucléoside monophosphate protégé de la thymidine. Les groupements protecteurs que nous avons employés sont : le groupement trityle pour masquer la fonction hydroxyle en position 5' du monomère 1 (Figure 1) et le groupement benzoyle en position 3' du nucléoside 2. La stabilité de ces groupements permet d'éviter des réactions

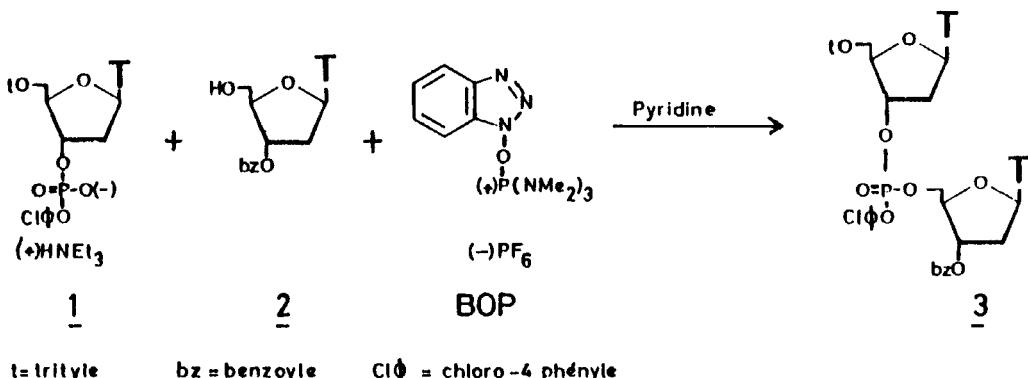


FIG. 1

parasites telles que la déprotection de l'hydroxyle en 5' ou la formation d'une liaison phosphotriester $3' \rightarrow 3'$ entre 1 et 2¹⁵.

Pour calculer le rendement de cette réaction, il a été procédé à l'intégration des aires des pics des composés 2 et 3 sur le diagramme analytique de HPLC des différents mélanges réactionnels bruts.

- Influence de la température.

1,2 équivalents de mononucléoside monophosphate 1 sont condensés avec 1 équivalent de nucléoside 2 en présence de 4 équivalents de BOP. La réaction est effectuée à quatre températures différentes : 20°C, 40°C, 60°C et 80°C. Des parties aliquotes sont prélevées au bout de 15 mn, 30 mn, 60 mn, 2 heures, 4 heures, 4 heures et 8 heures. Les courbes de la Figure 2 représentent l'évolution du rendement des réactions avec le temps.

L'examen de ces courbes révèle que l'élévation de la température augmente considérablement la vitesse de réaction. L'équilibre est atteint en 1 heure à 80°C. Nous avons également examiné nos échantillons par CCM et n'avons constaté une dégradation des réactifs ou produits qu'après quatre heures de réaction à 80°C.

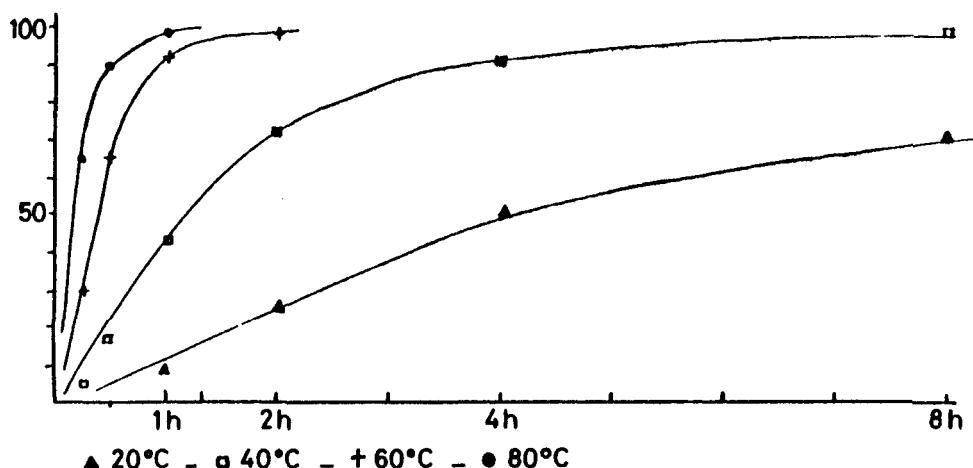


FIG. 2 : Rendement de la condensation entre 1 et 2 avec 4 eq. de BOP en fonction du temps et de la température.

La réaction effectuée à 20°C atteint 95% de rendement au bout de 16 heures et est complète après 3 jours.

- Influence de la quantité d'agent de condensation.

1,2 équivalents de diester 1 et de nucléoside entrant 2 sont condensés à 20°C en présence de respectivement 2, 4 et 8 équivalents de BOP. La Figure 3 indique les courbes obtenues.

Il apparaît que le maximum d'efficacité est atteint avec 4 équivalents de BOP et que l'augmentation à partir de ce seuil de la quantité d'agent de condensation dans le cas de la synthèse de ce dinucléotide ne modifie presque pas la vitesse de réaction. Pour la synthèse effectuée avec 2 équivalents, la réaction est quantitative au bout de trois jours.

Nous avons effectué une expérience en présence de seulement 0,5 équivalent de BOP. Nous avons pu observer que le rendement plafonne à 40%, ce qui montre que le BOP est un réactif qui se consomme. Ceci tendrait à montrer que la réaction nécessite un équivalent de BOP par mole de nucléotide. Ces résultats sont en accord avec les phénomènes

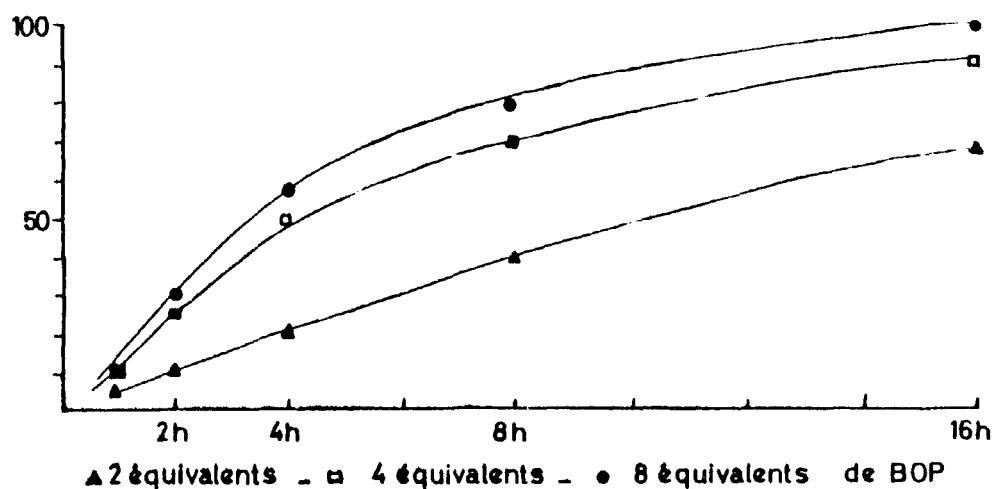


FIG.3 : Influence de la quantité de BOP sur le rendement de la condensation effectuée à 20°C.

observés par ^{31}P RMN qui mettent en évidence la présence d'hexaméthyl phosphorotriamide comme sous-produit du BOP.

- Influence de l'excès de phosphate diester par rapport au nucléoside entrant

De manière quasi générale¹⁶⁻¹⁹, lorsque les synthèses d'oligonucléotides sont effectuées à partir de synthons comportant deux ou trois bases, il est utilisé un excès de nucléotide -3' phosphate protégé en position 5' par rapport au dérivé 5' hydroxyle libre, afin de consommer totalement ce dernier réactif. Il en résulte une simplification des opérations de purification, parce qu'il est souvent malaisé d'éliminer l'excédent de nucléoside entrant renfermant un hydroxyle libre.

Nous avons réalisé la condensation à 40°C entre 1 et 2 en présence de 4 équivalents de BOP (pour 1 équivalent de 2) avec des rapports stoechiométriques 1/2 de 1 - 1,2 - 1,5 et 2. Les résultats obtenus sont portés dans la figure 4.

L'examen de ces courbes montre qu'à partir de 1,5 équivalent de 1 la réaction est complète en quatre heures à 40°C. Cependant, il

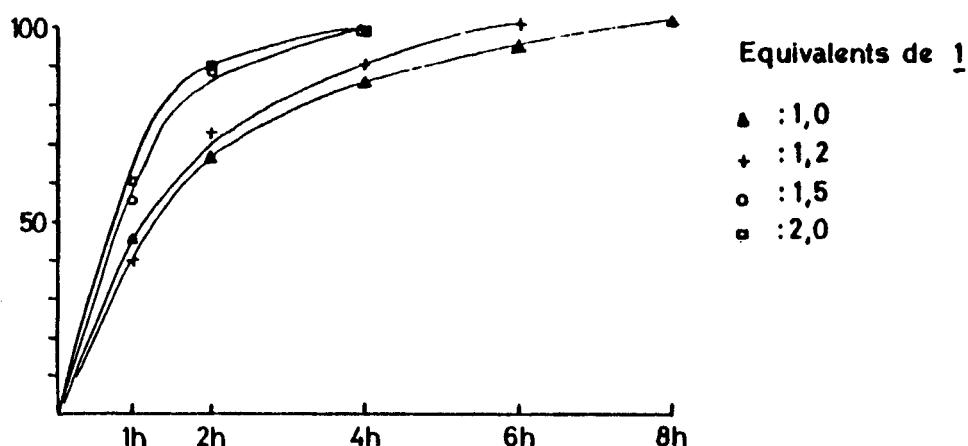


FIG.4 : Influence du rapport stoechiométrique 1/2 sur le rendement de la formation de 3.

apparaît que, à 1,2 équivalent de 1, le temps de réaction est long (6 heures).

Il semblerait donc qu'une température de 50°C, un rapport stoechiométrique 4/1,5/1 pour les réactifs BOP/1/2 et un temps de réaction de 3 heures permettent de réaliser des synthèses en phase liquide dans des délais acceptables avec des rendements satisfaisants.

Pour mettre en application ces résultats, nous nous sommes proposés de synthétiser un undécanucléoside décaphosphate en effectuant chaque étape de synthèse selon les conditions expérimentales que nous venons de définir.

SYNTHESE DU UNDECANUCLEOSIDE DECAPHOSPHATE d(TpTpTpApTpCpGpApTpGpC)

La stratégie que nous exposons dans la figure 5 présente l'avantage de minimiser le nombre d'étapes de purification. En effet, la déprotection de l'extrémité 5' de l'oligonucléotide obtenu est effectuée directement sur le mélange réactionnel brut après évaporation de la pyridine. De plus, le traitement à l'acide benzène sulfonique a la propriété d'hydrolyser le BOP excédentaire et de faciliter son élimination par lavage à l'eau de la phase organique. Le groupement diméthoxy-4,4' trityle a été préféré au groupement trityle parce que sa déprotection nécessite des conditions opératoires plus douces.

Dans le tableau 1, nous avons rassemblé les résultats numériques relatifs à cette synthèse.

Lors de la préparation du composé 14, nous avons tenté de miniaturiser chaque étape de synthèse car, a priori, cela pouvait présenter deux avantages. D'abord, l'utilisation de faibles quantités de dinucléosides diphosphates permet une appréciable économie des produits de base qu'il est fastidieux de préparer. Ensuite, les mélanges réactionnels débarrassés du BOP ont une masse comprise entre 10 et 50 mg et il est alors possible de les fractionner en une seule injection sur des colonnes de hplc très performantes, dans des délais

dmt = diméthoxy-trityle

bz = benzoyle

an = anisoyle

ib = isobutyryle

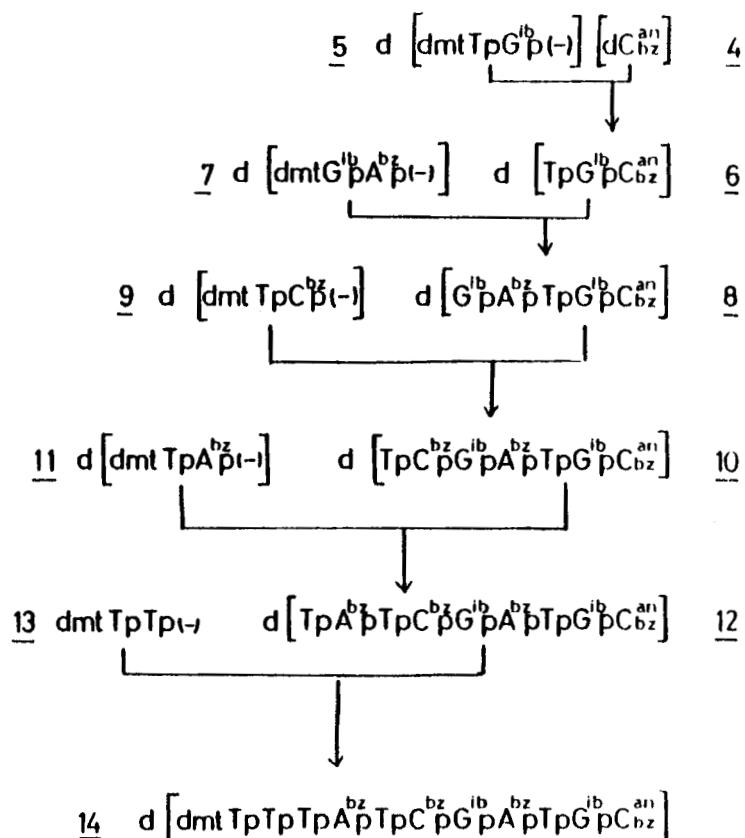
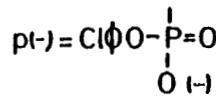
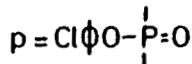


FIG. 5 : Stratégie d'assemblage du composé 14

TABLEAU 1

Oligonucléotide 5' OH libre	Dinucléoside diphosphate ajouté	BOP	Oligonucléotide obtenu	Rend ^t
mg (μmoles)	mg (μmoles)	mg(μmoles)	mg(μmoles)	
10(20) ⁴	35(27) ⁵	50(110)	23(16) ⁶	79%
20(14) ⁶	21(30) ⁷	35(80)	15,5(6,1) ⁸	45%
14(5,7) ⁸	11(8,6) ⁹	15(34)	17,4(5,2) ¹⁰	50%
15(4,5) ¹⁰	9(6,8) ¹¹	12(27)	10(2,3) ¹²	52%
9(2,1) ¹²	4(3,2) ¹³	6(13)	4(0,7) ¹⁴	35%

très brefs (20 mn environ). Ceci constitue à notre connaissance, la synthèse en phase liquide la plus miniaturisée qui ait été présentée.

2 mg du composé 14 ont été déprotégés selon les procédés rapportés dans la littérature^{10,20,21} puis purifiés par chromatographie d'exclusion²² et sur colonne de phase inverse²³. Une fraction a été marquée au ³²P à son extrémité 5' par la polynucléotide kinase²⁴ et la séquence d(TpTpTpApTpCpGpApTpGpC) a été analysée par la méthode de Maxam et Gilbert²⁴. La vérification du nucléotide terminal (qui n'est pas donné par le test de Maxam et Gilbert) et de la nature des liaisons internucléotidiques, a été réalisée par digestion par une endonucléase-3²⁵⁻²⁶.

CONCLUSION.

L'étude des paramètres expérimentaux influençant la formation de la liaison phosphotriester activée par le BOP nous a permis de définir des conditions optimales d'utilisation de cet agent en synthèse en phase liquide. Nous avons pu considérablement réduire les temps de réaction, ce qui diminue d'autant les délais d'assemblage d'un oligonucléotide. La méthode a été appliquée pour la synthèse d'un undécanucléoside décaphosphate.

PARTIE EXPERIMENTALE :

Les chromatographies sur couche mince de silice (Merck 60F254) ont été développées dans le mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (90:10:1) puis révélées à la lampe U.V. à 254 nm et par carbonisation après pulvérisation avec une solution de cystéine à 0,4% dans l'acide sulfurique 1,5 M.

Les études HPLC ont été réalisées sur un appareil VARIAN modèle 5000 équipé d'un détecteur à longueur d'onde variable UV Varichrom et d'un intégrateur CDS 111 L.

La pyridine (SDS qualité puran) a été portée 2 heures à reflux sur de la potasse pilée puis distillée sous pression atmosphérique et stockée sur tamis moléculaire 4A.

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés sur un appareil VARIAN EM.390. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal du TMS. La multiplicité des pics est représentée par une lettre minuscule entre parenthèses, s: singulet, d : doublet ... m pour multiplet.

- Etude des paramètres influençant la formation de la liaison phosphotriester avec le BOP.

La trityl-5' thymidine a été préparée selon le procédé rapporté²⁷ et phosphorylée selon la technique de REESE²⁸.

Le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxy-tris(diméthyl amino)phosphonium) a été synthétisé selon Dormoy et Castro²⁹. Après une recristallisation dans le mélange CH₂Cl₂-éther éthylique, il a été séché 4 h sous pression réduite en présence de P₂O₅ à 40°C.

Le benzoyl-3' thymidine² a été préparée à partir de la mono-méthoxy trityl-5' thymidine par action du chlorure de benzoyle suivie d'une détritylation par l'acide benzènesulfonique (ABS) et d'une purification par HPLC sur colonne de gel de silice.

RMN ¹H Pyridine d₅-TMS : H_{1'} : 6,80 ppm (t) ; H_{3'} : 5,85 ppm (m) ; H_{4'} : 4,43 ppm (q) ; H_{5'5"} : 4,13 ppm (d) ; H_{2'2"} : 2,65 ppm (m) ; CH₃(dT) : 1,76 ppm (s).

- Traitement des parties aliquotes des mélanges réactionnels.

Le mélange réactionnel est refroidi à -78°C puis transféré en boîte à gants sous atmosphère d'azote. L'aliquote (50 µl) est prélevé puis additionné de 10 µl d'eau et abandonné à température ambiante pendant 15 mn. Le solvant est chassé à l'évaporateur rotatif et le résidu sec repris par 2 ml de CHCl₃, filtré sur cartouche Millipore (0,45 µm) et directement injecté en HPLC.

- Analyse HPLC des mélanges réactionnels.

Elle est effectuée sur une colonne de silice Partisil 10 (Whatman) (4,7x250 mm). L'élution est réalisée à 1,5 ml/mn avec du

chloroforme additionné de 1%, en volume, de méthanol. Dans ces conditions, les pics correspondant à la benzoyl-3' thymidine (2) et au dinucléoside monophosphate protégé de la thymidine (3) apparaissent nettement séparés avec des temps de rétention respectifs de 5,9 mn et 4,9 mn. Les aires ont été intégrées et le rendement calculé par la méthode de normalisation de surfaces après que les facteurs de réponse relative de chaque composé aient été calculés.

- Dépendance de la température.

40 mg (50 μ moles) de sel de triéthylammonium de 1 ont été séchés par 3 évaporations de 2 ml de pyridine anhydre, joints à 15 mg (43 μ moles) de 2 et coévaporés 3 fois avec 2 ml de pyridine anhydre. 76 mg (175 μ moles) de BOP ont été ajoutés dans 2 ml de pyridine. Le mélange a été séparé en quatre fractions de 500 μ l chacune portées à 20°C, 40°C, 60°C et 80°C. Les prélèvements ont été effectués après 15 mn, 30 mn, 60 mn, 2 heures, 4 h et 8 heures. Les résultats obtenus sont exposés dans la figure 2.

- Influence de la quantité d'agent de condensation (BOP).

40 mg (50 μ moles) de 1 sont séchés par trois évaporation de pyridine (3x2 ml) joints à 15 mg (43 μ moles) de 2 et séchés soigneusement par trois évaporation supplémentaires de pyridine. Le mélange est repris par 1,5 ml de pyridine anhydre et des fractions de 500 μ l de cette solution sont versées dans des flacons contenant 12,5 mg (32 μ moles), 25,5 mg (64 μ moles) et 51 mg (128 μ moles) de BOP, soit respectivement 2, 4, et 8 équivalents. Les mélanges réactionnels sont abandonnés à température ambiante et les prélèvements ont été effectués après 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 16 h de réaction. Les résultats obtenus sont exposés dans la figure 3.

- Influence de la stoechiométrie du monomère monophosphate 1.

15 mg (42 μ moles) du composé benzoylé 2 sont séchés par 3 évaporation de pyridine anhydre et additionnés de 77 mg (175 μ moles) de BOP. 1,5 ml de pyridine sont utilisés pour dissoudre ce mélange.

50 mg (63 µmoles) de sel de triéthylammonium de 1 sont séchés par 3 évaporations de pyridine. Ils sont repris par 1,8 ml de pyridine et séparés en 3 fractions de 400 µl (14 µmoles), 600 µl (21 µmoles), 800 µl (28 µmoles) et évaporés à sec. A chaque fraction sont ajoutés 500 µl de la solution de 2 et de BOP afin de réaliser des mélanges réactionnels contenant 1,0, 1,5 et 2,0 équivalents de 1 par équivalent de 2. Les trois tubes sont portés à 40°C et les prélèvements sont effectués après 1 h, 2 h, 4 h et 8 h de réaction. Les résultats obtenus sont exposés dans la figure 4.

Synthèse du undécanucléoside décaphosphate 14

- Anisoyl -N₄ benzoyl-3' désoxy-2' cytidine (4)

5 g (7,5 mmoles) d'anisoyl-N₄ diméthoxytrityl-5' désoxy-2' cytidine sont mis en réaction avec 4,5 ml (1,25 mmoles) de chlorure de benzoyle dans 50 ml de pyridine. Après 2 heures de réaction à température ambiante, le mélange est refroidi au bain de glace et additionné de 10 ml de MeOH et le solvant est chassé sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par 50 ml de chloroforme et lavé avec 3x50 ml de NaHCO₃ à 5% et 3x50 ml d'eau. La phase chloroformique est séchée sur sulfate de sodium, puis le solvant est évaporé. L'huile jaune résultante est reprise par 50 ml de mélange CHCl₃/MeOH 7/3 (v/v) et additionnée de 50 ml de solution à 2% d'acide benzène sulfonique dans ce même solvant. La réaction de détritylation est stoppée après 15 mn par ajout de 50 ml de solution à 5% de NaHCO₃. La phase chloroformique est récupérée et le composé recherché est extrait avec 2x50 ml de CHCl₃. Après séchage sur sulfate de sodium, le mélange est évaporé à sec et fractionné sur colonne HPLC de gel de silice (2,5 cm x 50 cm). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de MeOH dans le CHCl₃ (0 à 8 % en 30 mn). Les fractions contenant le nucléoside sont réunies et le solvant est chassé à l'évaporateur rotatif. 2,51 g de composé 4 ont été recueillis (Rdt : 72%).

R.M.N. ^1H : Pyridine d₅ TMS : H_{1'}=6,80 ppm (t) ; H_{3'}=5,85 ppm (m) ; H_{4'}=4,55 ppm (q) ; H_{5'5''}=4,20 ppm (d) ; H_{2'2''}=2,8 ppm (m).

- Dinucléosides diphosphate 5, 7, 9, 11, et 13.

La synthèse de ces composés a été rapportée précédemment ¹³. Leur phosphate terminal a été déprotégé du groupement cyano-2 éthyle selon le procédé suivant : 10 μmoles de composé complètement protégé sont dissoutes dans 0,3 ml de mélange pyridine-eau 3/1 (v/v) et additionnées à 0°C de 75 μl de triéthylamine. Après 5 mn l'avancement de la réaction est contrôlé par CCM et elle est généralement stoppée après 15 mn par évaporation à sec. L'acrylonitrile formé et la triéthylamine excédentaire sont chassés sous vide (10^{-2} mm Hg) par coévaporation de pyridine (3x500 μl).

- Méthode générale de couplage d'oligonucléotides avec le BOP.

Le composé hydroxylé en position 5' (10 μmoles) est additionné au composé ayant un phosphate 3' terminal diester (12 μmoles) et il est procédé à 3 évaporations de pyridine anhydre (200 μl). L'agent de condensation (BOP-50 μmoles) est additionné sous forme solide, et l'ensemble est repris par 200 μl de pyridine anhydre et porté pendant 3 heures à 50°C. 100 μl d'eau sont alors ajoutés et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par 500 μl de mélange CHCl₃-MeOH 7/3 et additionné à -20°C de 500 μl de solution à 2% d'acide benzénésulfonique (ABS) dans le même mélange. Le tube est stocké à -20°C pendant qu'il est effectué un contrôle par CCM de l'avancement de la détritylation. Quand la réaction est totale, il est procédé au lavage du mélange par successivement 2x1 ml de solution aqueuse à 5% de NaHCO₃ et 3x1 ml d'eau. Les phases sont vigoureusement agitées et décantées par centrifugation à 5000 tours/mn environ. La phase supérieure est éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur.

Le solvant est ensuite chassé sous pression réduite et l'émulsion obtenue est diluée par 150 μl de CHCl₃ et fractionnée sur

colonne de gel de silice (Partisil 10, Whatmann 9,5 x 300 mm) éluée à 3,5 ml/mn par un gradient en 15 mn de 0 à 15% de méthanol dans le chloroforme. Les fractions contenant l'oligonucléotide recherché sont réunies et évaporées à sec. Les données pondérales relatives à la synthèse du composé 14 figurent dans le tableau 1.

- Analyse du composé 14

La déprotection des groupements phosphates, des groupements amides protecteurs des nucléobases, du groupement benzoyle en 3' et de l'extrémité 5' de 14 ont été effectués selon les procédés préalablement décrits ^{10,13,20,21}.

Le résidu de déprotection après lyophilisation a été repris par 200 µl d'eau et purifié par chromatographie d'exclusion ²² (Colonne Waters I.125 "Protein Analysis Column". Solvant T.E.A.A. 0,025 M) ; la fraction contenant 14 déprotégé a été recueillie entre 6,8 et 7,8 ml. Une deuxième purification a été effectuée sur colonne Lichrosorb RP8 (Merck) (4,7x250 mm) éluée par un gradient en 15 mn de 20 à 30% de MeOH dans le TEAA 0,1 M. Dans ces conditions, le composé recherché est élué en 8 mn. A partir de 2 mg de 14 protégé, nous avons recueilli 1,2 OD₂₆₀, soit 50 µg environ.

Le marquage en 5' est effectué avec la T₄ polynucléotide kinase et l'adénosine triphosphate $\gamma^{32}\text{P}$ sur 10 pmoles environ. Le composé est purifié sur gel dénaturant de polyacrylamide à 20%, élué, précipité et séquencé en utilisant les techniques décrites par Maxam et Gilbert ²⁴. L'identité de l'extrémité 5' terminale a été révélée par analyse sur plaque de PEI Cellulose (20x20 cm) (Schleicher et Schüll) en utilisant une solution molaire en LiCl ³⁰ et du formate d'ammonium 0,5 M à pH 3,5 ³¹ comme éluants en deux dimensions à partir du mélange de nucléosides monophosphates-5' produits par digestion totale avec la phosphodiesterase de venin de serpent, de l'oligomère marqué.

REMERCIEMENTS

Ce travail a obtenu le soutien financier de l'INSERM (contrat n° 124.024) que nous remercions vivement.

REFERENCES

- 1 J.C. Catlin et F. Cramer., J. Org. Chem., 38, 245 (1973).
- 2 N.T. Thuong, M. Chassignol et C. Barbier, Tetrahedron Lett., 851(1981).
- 3 K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.H. Wightman et S.A. Narang J. Amer. Chem. Soc. , 97, 7327 (1975).
- 4 N. Katagiri, K. Itakura et S.A. Narang, J. Amer. Chem. Soc. 97, 7332 (1975)
- 5 G.R. Gough, S.K. Singleton, H.L. Weith et P.T. Gilham, Nucleic Acids Res., 6, 155 (1979)
- 6 D. Molko, R.B. Derbyshire, A. Guy, A. Roget et R. Téoule, Tetrahedron Lett., 2159 (1980)
- 7 Yu. A. Berlin, O.G. Chakhamakhcheva, V.A. Efimov, M.N. Kolosov et V.G. Korobko, Tetrahedron Lett., 1353, (1973)
- 8 N. Katagiri, K. Itakura et S.A. Narang, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 525 (1974)
- 9 J. Stawinski, T. Hozumi et S.A Narang, Can. J. Chem., 54, 670 (1976)
- 10 C.B. Reese, R.L. Titmas et L. Yau, Tetrahedron Lett., 2727 (1978).
- 11 C.B. Reese et A. Ubasawa, Tetrahedron Lett., 2265 (1980).
- 12 G.R. Gough, K.J. Collier, H.L. Weith et P.T. Gilham, Nucleic Acids Res. 7, 1955 (1979).

- 13 R. Téoule, R.B. Derbyshire, A. Guy, D. Molko et A. Roget, Nucleic Acids Res. Special Pub., 7, 23 (1980).
- 14 B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin et C. Selve, Tetrahedron Lett., 1219 (1975).
- 15 D. Molko, B. Castro, A. Guy et R. Téoule, soumis au Nouveau Journal de Chimie (1981).
- 16 W.L. Sung, H.M. Siung, R. Brousseau, J. Michniewicz, R. Wu et S.A. Narang, Nucleic Acids Res., 7, 2199 (1979).
- 17 G.R. Gough, C.K. Singleton, H.L. Weith et P.T. Gilham, Nucleic Acids Res., 7, 1557 (1979).
- 18 R. Crea, A. Kraszewski, T. Hirose et K. Itakura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978).
- 19 K. Itakura, N. Katagiri et S.A. Narang, Can. J. Chem., 52, 3689 (1974).
- 20 M.J. Gait, M. Singh, R.C. Sheppard, M.D. Edge, A.R. Greene, G.R. Heathcliffe, T.C. Atkinson, C.N. Newton et A.F. Markham, Nucleic Acids Res., 8, 108 (1980).
- 21 J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, L.P. Bahl et R. Wu, Nucleic Acids Res., 4, 353 (1977).
- 22 D. Molko, R. Derbyshire, A. Guy, A. Roget, R. Téoule et A. Boucherle, J. Chromatogr., 206, 493 (1981).
- 23 H.J. Fritz, R. Belagate, E.L. Brown, R.H. Fritz, R.A. Jones, R.G. Lees et H.G. Khorana, Biochemistry, 17, 1257 (1978).

- 24 A.M. Maxam et W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 (1977).
- 25 J.H. Van Boom et J.F.M. de Rooy, J. Chromatogr., 131, 169 (1977).
- 26 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabham, et R. Wu, Nucleic Acids Res. 1, 331 (1974).
- 27 H.G. Khorana, J.P. Vizlovyi et R.K. Ralph, J. Amer. Chem. Soc., 84, 414 (1962).
- 28 J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, Tetrahedron Lett., 5059 (1979).
- 29 J.R. Dormoy et B. Castro, Tetrahedron Lett., 3321 (1979).
- 30 E. Randerath et K. Randerath, J. Chromatogr., 16, 126 (1964).
- 31 P. Derumez et G. Biserte, J. Chromatogr., 31, 598 (1967).