

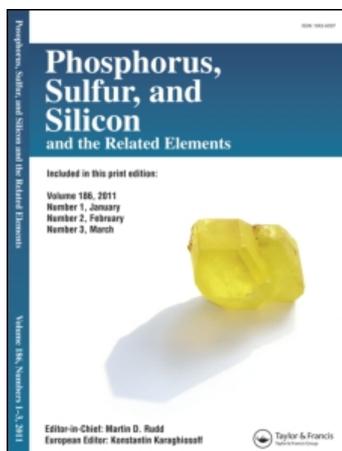
This article was downloaded by:

On: 30 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



## Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

### Oligothymidylates Comportant La Structure Alternee Alkylphosphotriester-Phosphodiester Et Lies De Facon Covalente A Un Agent Intercalant

U. Asseline<sup>a</sup>; C. Barbier<sup>a</sup>; N. T. Thuong<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S., 1A, avenue de la Recherche Scientifique, ORLEANS Cedex, France

**To cite this Article** Asseline, U. , Barbier, C. and Thuong, N. T.(1986) 'Oligothymidylates Comportant La Structure Alternee Alkylphosphotriester-Phosphodiester Et Lies De Facon Covalente A Un Agent Intercalant', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 26: 1, 63 – 73

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/03086648608084571

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/03086648608084571>

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.

## OLIGOTHYMYDYLATES COMPORTANT LA STRUCTURE ALTERNEE ALKYLPHOSPHOTRIESTER- PHOSPHODIESTER ET LIES DE FACON COVALENTE A UN AGENT INTERCALANT

U. ASSELINE, C. BARBIER et N. T. THUONG

*Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S., 1A, avenue de la Recherche  
Scientifique, 45045 ORLEANS Cedex, France*

Four oligothymidylates involving alternating alkylphosphotriester-phosphodiester backbones with the same steric configuration for all the phosphotriester groups  $[(\text{Tp}(\text{R})\text{Tp})_2(\text{CH}_2)_5\text{Acr } \mathbf{2b}\alpha; \mathbf{2b}\beta \text{ (R = Et); } \mathbf{2c}\alpha, \mathbf{2c}\beta \text{ (R = Me}_3\text{C-CH}_2)]$  have been synthesized by the phosphotriester method in solution from each pure  $\alpha$  and  $\beta$  isomers of the ethylated  $\mathbf{5b}$  or neopentylated  $\mathbf{5c}$  dinucleoside. This partial esterification of the phosphate groups stabilizes the nucleic acid chain against nucleolytic attack by  $P_1$  and  $S_1$  nucleases. This effect increases with the size of the alkyl groups. It also depends upon the steric configuration of the alkylphosphotriester groups: the  $\beta$  isomers are more resistant to  $S_1$  nuclease than the  $\alpha$  isomers. Tetrathymidylates bearing two "neopentyl" groups  $(\text{Tp}(\text{CH}_2\text{CMe}_3)\text{Tp})_2(\text{CH}_2)_5\text{Acr } \mathbf{2c}\alpha$  and  $\mathbf{2c}\beta$  give specific complexes with poly r(A) and the  $\beta$  isomer  $\mathbf{2c}$  binds a little stronger than the tetrathymidylate  $(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$ . The neopentyl group is stable under the conditions required for the synthesis of oligodeoxynucleotides involving the four nucleic acid bases. It can be used for the partial esterification of the phosphodiester groups.

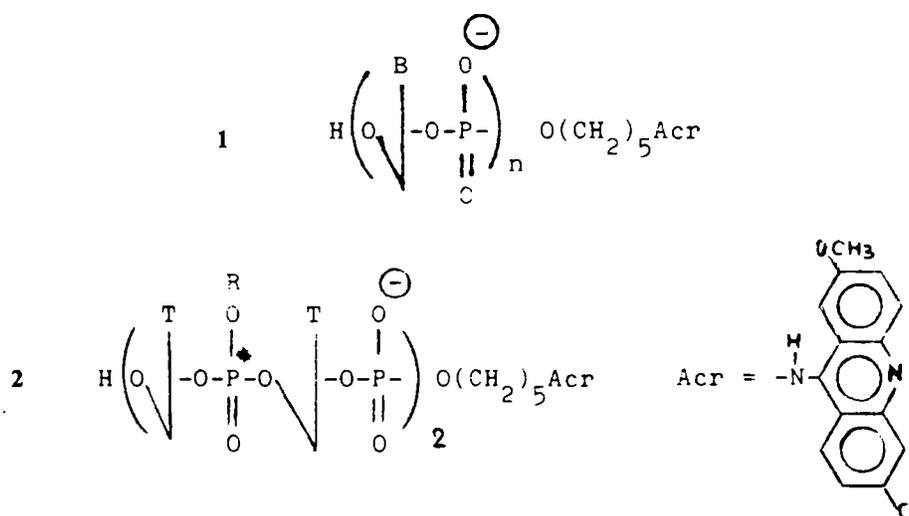
Quatre oligothymidylates comportant la structure alternée alkyl-phosphotriester-phosphodiester et dont tous les groupes alkylphosphotriesters possèdent la même configuration stérique  $[(\text{Tp}(\text{R})\text{Tp})_2(\text{CH}_2)_5\text{Acr}, \mathbf{2b}\alpha, \mathbf{2b}\beta \text{ (R = Et); } \mathbf{2c}\alpha, \mathbf{2c}\beta \text{ (R = Me}_3\text{C-CH}_2)]$  ont été synthétisés selon la méthode au phosphotriester en solution à partir de chacun des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  du dinucléoside éthylé  $\mathbf{5b}$  ou néopentylé  $\mathbf{5c}$ . Cette estérification partielle des groupes phosphates augmente la stabilité de la chaîne nucléotidique vis-à-vis de l'action des nucléases. Cet effet stabilisateur augmente avec la taille du groupe alkyle (en présence des endonucléases  $P_1$  et  $S_1$ ) et dépend de la configuration stérique des groupes alkylphosphotriesters (en présence de  $S_1$  les isomères  $\beta$  sont plus résistants que les isomères  $\alpha$ ). Les tétrathymidylates porteurs de deux groupes néopentyle  $(\text{Tp}(\text{CH}_2\text{CMe}_3)\text{Tp})_2(\text{CH}_2)_5\text{Acr } \mathbf{2c}\alpha$  et  $\mathbf{2c}\beta$  forment des complexes spécifiques avec l'acide polyriboadénylique; le complexe formé à partir de l'isomère  $\mathbf{2c}\beta$  est légèrement plus stable que celui formé à partir du tétrathymidylate  $(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$ . Le groupe néopentyl est stable dans les conditions de synthèse des oligodéoxynucléotides comportant les quatre bases nucléiques; il peut donc être utilisé pour estérifier partiellement les groupes phosphodiesters.

### INTRODUCTION

En vue de mettre au point de nouvelles substances utilisables pour le contrôle sélectif de l'expression des gènes, nous avons récemment synthétisé une nouvelle famille de composés comportant un oligodéoxyribonucléotide lié de façon covalente à un agent intercalant par l'intermédiaire d'une chaîne polyméthylène  $1^{1-3}$  (oligo dN-bras-intercalant). Les études d'interaction de ces substances avec les acides nucléiques, réalisées par spectroscopie d'absorption, de fluorescence<sup>2,3</sup> et de RMN<sup>4</sup> montrent que les "oligo dN-bras-intercalant" forment des complexes spécifiques avec les séquences nucléiques complémentaires et que l'intercalant, par son affinité pour les plateaux de bases, stabilise le complexe formé.

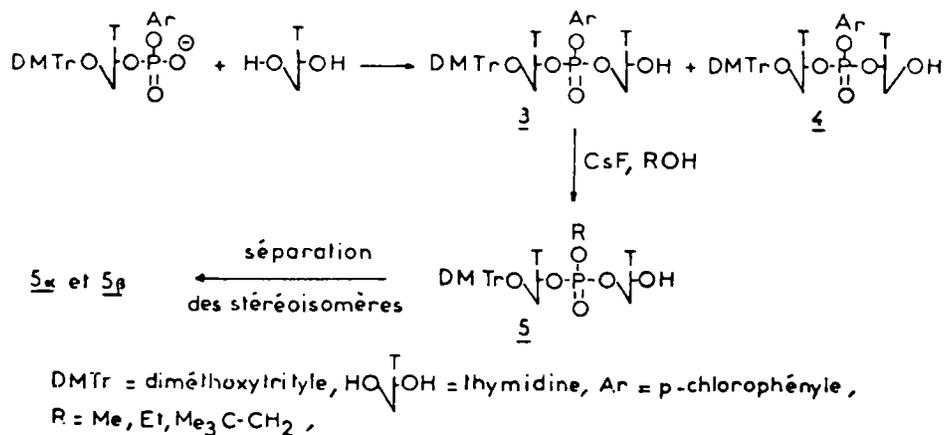
Afin d'améliorer le système "oligo dN-bras-intercalant" en vue de son utilisation *in vivo*, nous avons entrepris la modification de la chaîne nucléotidique en remplaçant partiellement les groupes phosphodiester chargés négativement par des groupes phosphotriesters non chargés ou porteurs d'une charge positive.<sup>5</sup> Cette substitution a pour objectif d'obtenir des composés plus stables vis-à-vis des nucléases et d'augmenter l'affinité du système pour la séquence nucléique complémentaire par réduction des répulsions électrostatiques entre les charges négatives de l'oligonucléotide et celles de la séquence cible complémentaire.

Nous décrivons dans ce travail la synthèse et quelques propriétés des oligothymidylates possédant la structure alternée "alkylphosphotriester-phosphodiester" 2 dans laquelle les groupes phosphotriesters possèdent la même configuration stérique.



## RESULTATS

La synthèse des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  des dinucléoside alkylphosphotriesters 5 est réalisée selon le Schéma 1. Le couplage du diméthoxytritylthymidine 3'-arylphosphodiester avec un excès de thymidine (2 équivalents)<sup>6</sup> en présence de mésitylène sulfonyltétrazolide (MSTe)<sup>7,8</sup> conduit essentiellement au dinucléoside-(3'-5')-arylphosphotriester 3 et de l'ordre de 5 à 7% de dérivé 3'-3' 4 (RF = 0.44, solvant A) qui peuvent être séparés par chromatographie sur silice en présence du solvant A. Dans le système D, le dinucléoside arylé 3 donne deux taches dont les intensités sont voisines.<sup>9</sup> La transestérification réalisée avec le diastéréoisomère arylé 3 en présence du couple ROH, CsF<sup>10</sup> (ROH = MeOH, EtOH et Me<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>-OH) dans CH<sub>2</sub>CN ou en présence d'alcoolate de potassium ROK (R = Me, Et) dans le THF conduit à de nouveaux mélanges de stéréoisomères (Rf Tableau I), avec des proportions voisines de 50%. La réaction de transestérification en présence du couple ROH, CsF bien que beaucoup plus lente (2 à 3 heures) qu'en présence d'alcoolate (quelques minutes) est plus simple à réaliser et conduit aux dinucléoside alkylphosphotriesters 5 sous forme de diastéréoisomères avec des rendements de l'ordre de 70 à 80% selon



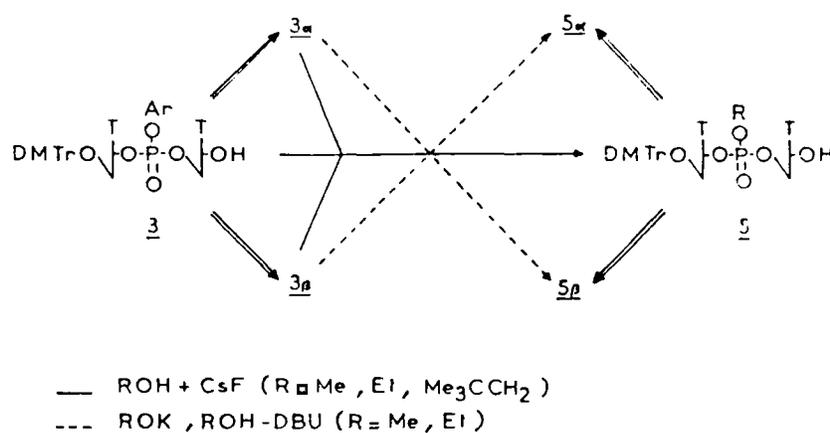
SCHEMA 1

TABLEAU 1

COMPOSES	Chromatographie sur couche mince <sup>a</sup> R(f)				
	A	B	C	D	E
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10, v/v	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15, v/v	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80:20, v/v	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ 50:40, v/v	$\text{iso-PrOH}/\text{Me}_2\text{S}$ 85:15, v/v
DMTrT	0,52				
DMTrTp	0	0			0,51
DMTrTpT <u>3</u>	a	0,38	0,54	0,48	
	b	0,37	0,52	0,42	
DMTrTp(R)T <u>5</u>	a	0,26	0,48	0,20	
	b	0,25	0,47	0,16	
	a	0,28	0,50	0,32	
	b	0,27	0,47	0,24	
	a	0,30	0,53	0,51	
	b	0,29	0,47	0,45	
DMTrTp(R)Tp <u>6</u>	b	0	0,05	0,26	0,53
	a	0	0,05	0,26	0,53
	c	0	0,05	0,27	0,54
	b	0	0,05	0,27	0,54
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> OH <u>7</u>		0,17	0,41		
DMTrTp(R)Tp(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr <u>8</u>	b	0,18	0,38		
	a	0,18	0,38		
	c	0,21	0,41		
	b	0,20	0,40		
Tp(R)Tp(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr <u>9</u>	b		0,22		
	a		0,22		
	c		0,24		
	b		0,23		
DMTrTp(R)Tp(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr <u>10</u>	b	0,17	0,33		
	a	0,17	0,33		
	c	0,18	0,35		
	b	0,18	0,35		

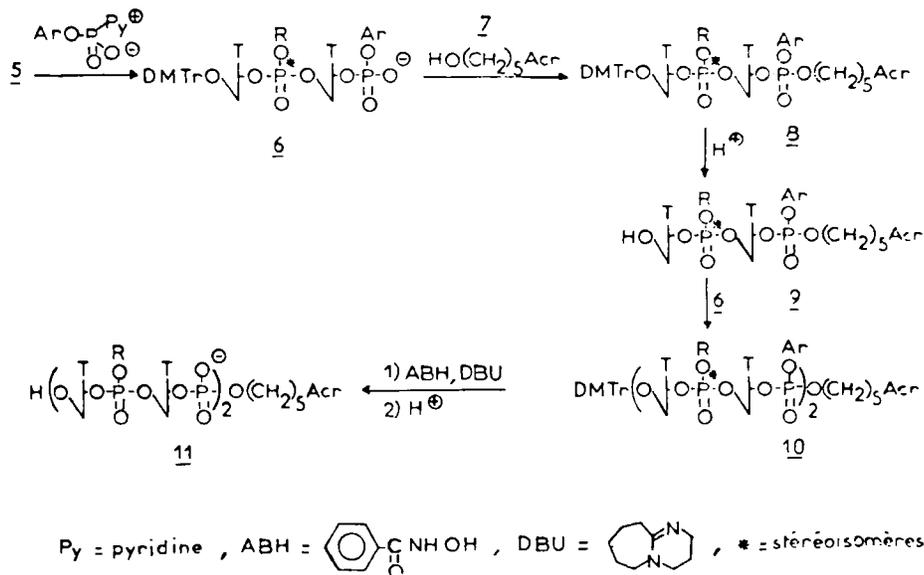
<sup>a</sup> Support: gel de silice 60 F 254 (Merck), DMTrT = diméthoxytritylthymidine, p = p-chlorophénylphosphoester, p(R) = alkylphosphoester; a: R = Me, b: R = Et et c: R =  $\text{Me}_3\text{C-CH}_2$ , α = isomère α et β = isomère β.

la nature du groupe alkyle. La séparation des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  des dinucléoside alkylphosphotriesters **5a**, **5b** et **5c** (**9**) est réalisée par chromatographie sur silice en présence du système de solvant D. Les stéréoisomères **5a $\alpha$** , **5a $\beta$** , **5b $\alpha$**  et **5b $\beta$**  sont également obtenus en séparant les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  du dinucléoside arylphosphotriester **3** par chromatographie sur silice puis en les traitant avec un léger excès d'alcoolate de potassium dans le THF ou en présence d'alcool et de DBU. Cette réaction réalisée à partir de l'isomère **3 $\alpha$**  conduit uniquement aux isomères **5a $\beta$**  ou **5b $\beta$** . De même, les isomères **5a $\alpha$**  et **5b $\alpha$**  sont formés à partir de l'isomère **3 $\beta$**  (Schéma 2). A partir de chacun des isomères **3 $\alpha$**  et **3 $\beta$**  et en présence d'alcool et de CsF on obtient les dinucléoside alkylphosphotriesters **5a**, **5b** et **5c** sous forme de diastéréoisomères (Schéma 2). Le diastéréoisomère du dinucléoside arylphosphotriester **3** et le diastéréoisomère du dinucléoside méthylphosphotriester **5a** après respec-



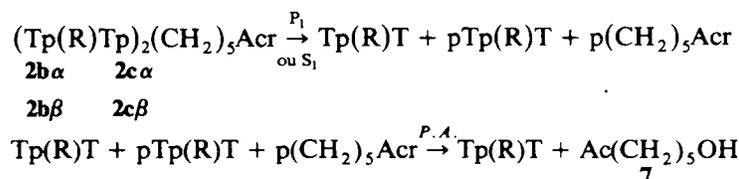
SCHEMA 2

tivement désarylation par l'ion benzohydroxamate<sup>11</sup> et déméthylation par le thiophénol en présence de triéthylamine<sup>12</sup> puis détritulation par l'acide acétique<sup>7</sup> conduisent au dinucléoside monophosphate TpT. Ce dernier est totalement dégradé par le venin de serpent en thymidine et en thymidine 5'-phosphate et par l'extrait de la rate de veau en thymidine 3'-phosphate et en thymidine. Chacun des stéréoisomères du dinucléoside éthylphosphotriester (**5b $\alpha$**  et **5b $\beta$** ) ou du dinucléoside néopentylphosphotriester (**5c $\alpha$**  et **5c $\beta$** ) traité avec le *p*-chlorophénylphosphopyridinium (Schéma 3), conduit au dinucléotide 3'-arylphosphodiester correspondant **6** avec des rendements pratiquement quantitatifs. Le couplage de **6** avec le méthoxy-2, chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine **7** en présence de MSTe donne le dimère **8** avec des rendements voisins de 70% après purification sur silice. L'allongement de la chaîne se fait par détritulation de **8** puis couplage de l'hydroxyle-5' de **9** avec le diester **6** pour conduire au tétranucléotide totalement protégé **10**. Après déprotection totale (désarylation en présence du couple acide benzohydroxamique-DBU<sup>11</sup>, puis détritulation par l'acide acétique<sup>7</sup>) les tétranucléotides **2** sont purifiés par HPLC en phase inverse. ( $T_R$  **2b $\alpha$**  = 185 secondes,  $T_R$  **2b $\beta$**  = 200 secondes,  $T_R$  **2c $\alpha$**  = 301 secondes,  $T_R$  **2c $\beta$**  = 323 secondes).<sup>13</sup>



SCHEMA 3

Les études de dégradation enzymatique<sup>14</sup> ont été réalisées avec deux exonucléases (une exonucléase 5' extraite de la rate de veau<sup>15</sup> et une exonucléase 3' extraite du venin de serpent<sup>15</sup> *Crotalus durissus*) et deux endonucléases: (P<sub>1</sub> extraite de *Penicillium citrinum*<sup>16</sup> et S<sub>1</sub> extraite de *Aspergillus oryzae*<sup>17</sup>). Les composés **2b $\alpha$** , **2b $\beta$** , **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$**  sont stables vis-à-vis des exonucléases 5' (rate de veau) et 3' (venin de serpent) alors que dans les mêmes conditions, les oligothymidylates (Tp)<sub>n</sub>T sont complètement dégradés en T et en pT en présence de venin et en Tp et T en présence de l'extrait de rate. L'action des endonucléases P<sub>1</sub> et S<sub>1</sub> à forte concentration (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour P<sub>1</sub> et 0.1 unité/ml pour S<sub>1</sub>) sur les substances synthétisées conduit dans tous les cas au bout d'une heure d'incubation à trois composés (Rf Tableau II). Par chromatographie sur couche mince, ces composés sont identifiés au dinucléoside alkylé, à un composé ionique comportant la thymidine et à un composé ionique renfermant le chromophore de l'acridine. Après action des monophosphatases alcalines (P.A.)<sup>14</sup> deux composés sont identifiés: le dinucléoside alkylé et la méthoxy-2, chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine **7**.



A plus faible concentration l'endonucléase P<sub>1</sub> (diluée 70 fois) dégrade totalement le tétranucléotide (Tp)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr **1** ( $n = 4$ ) après 12 minutes d'incubation, les tétranucléotides éthylés **2b $\alpha$**  et **2b $\beta$**  après environ 30 minutes et les composés néopentylés **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$**  après un peu plus d'une heure. En présence de S<sub>1</sub> diluée (50 fois), et dans les conditions qui permettent l'hydrolyse totale de (Tp)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr en

TABLEAU 2

COMPOSES	Chromatographie sur couche mince <sup>†</sup> R(f)			
	A	B	C	F
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 90:10, v/v	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 85:15, v/v	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 80:20, v/v	iso-PrOH/NH <sub>4</sub> OH/ H <sub>2</sub> O 65:9:15, v/v
T	0,10		0,53	
Tp	0	0		0,20
pT	0	0		0,20
p(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr	0	0		0,21
HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr		0,17	0,41	
Tp(R)T	b { α	0,10		0,50
		β	0,10	0,50
	c { α	0,11		0,57
		β	0,11	0,57
pTp(R)T	b { α	0	0	0,24
		β	0	0,24
	c { α	0	0	0,30
		β	0	0,30
[Tp(R)Tp] <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr <u>2</u>	b { α	0	0	0,46
		β	0	0,46
	c { α	0	0	0,49
		β	0	0,49
(Tp) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr <u>1</u>	0	0	0	0,40

† Support: gel de silice 60 F 254 (Merck); Tp = thymidine 3'-phosphate; pT = thymidine 5'-phosphate; p =  $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$ ; b: R = Et, c: R = Me<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>, α = isomère α et β = isomère β.

30 minutes les taux de dégradation observés pour les composés **2**, après le même temps d'incubation, sont les suivants: 30% pour **2bα**, 10% pour **2bβ** et **2cα** et 0% pour **2cβ**. Après 4 heures d'incubation, les taux d'hydrolyse observés sont voisins de 80% pour **2bα**, 50% pour **2bβ** et **2cα** et seulement de 20% pour **2cβ**.

Des études de stabilité comparatives en milieu alcalin, à 20°C (soude 0.4 N dans MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20, v/v, 35 équivalents par groupe alkylphosphotriester) ont été réalisées avec trois types de composés: les dinucléosides **5a**, **5b** et **5c** sous forme de mélange racémique, les dinucléotide 3-phosphodiester **6bα** et **6cα** et les tétranucléotides **2bα** et **2cα**. Avec les dinucléosides **5b**, **5c** nous obtenons essentiellement un composé tritylé identifié à la diméthoxytritylthymidine et un composé non ionique identifié à la thymidine. Dans le cas du dinucléoside méthylé **5a** nous observons en plus la formation d'un composé ionique tritylé (R<sub>f</sub> = 0.10, solvant C) dont l'intensité est équivalente à celle de la diméthoxytritylthymidine libérée. Ce même produit ionique tritylé est aussi formé dans des proportions plus faibles (environ 4 fois moins) dans le cas du dinucléoside éthylé **5b** ce qui suggère qu'il s'agit probablement du dinucléoside DMTrTpT. A côté de ces trois produits, nous observons également la formation de deux autres dérivés ioniques, l'un tritylé (R = 0.14), solvant C) et l'autre renfermant seulement de la thymidine (R<sub>f</sub> = 0.05, solvant C) qui sont probablement les diesters DMTrTp(R) et p(R)T. La somme des intensités de ces deux composés est inférieure à celle des produits non ioniques

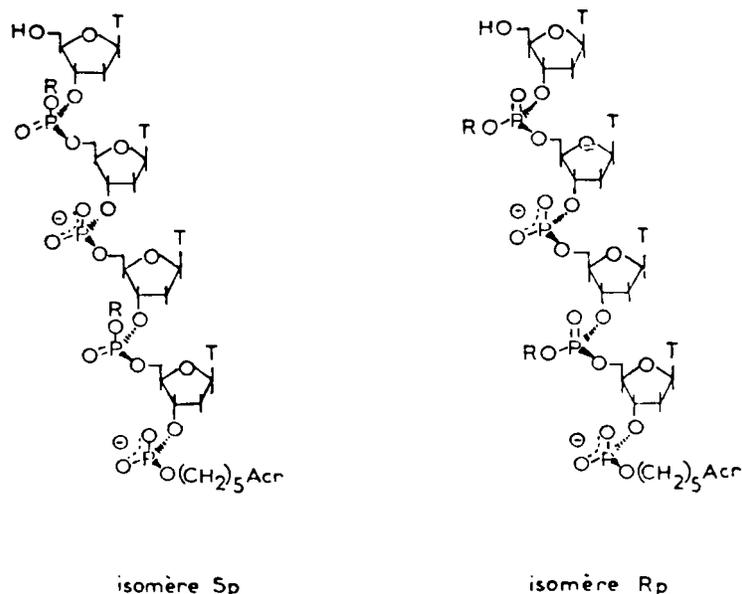
libérés (diméthoxytritylthymidine et thymidine). La dégradation du dinucléoside monophosphotriester **5a** est presque totale après 23 heures alors que dans les mêmes conditions **5b** n'est hydrolysé qu'à environ 50% et que **5c** est presque intact. Ce dernier ne présente qu'environ 10% de dégradation au bout de trois jours. Dans le cas des dinucléotide 3'-phosphodiester **6b $\alpha$**  et **6c $\alpha$**  nous observons également la libération de la diméthoxytritylthymidine et d'un produit non tritylé (il s'agit probablement du composé *p*(R)Tp). Les vitesses d'hydrolyse des dinucléotides **6** sont comparables à celles observées avec les dinucléosides **5**.

Les résultats obtenus avec le tétranucléotide **2b $\alpha$**  indique environ 25% de dégradation au bout de 21 heures et 50% au bout de quatre jours [formation d'un produit majoritaire plus ionique que **2b** ( $R_f = 0.36$  syst F) renfermant à la fois la thymidine et le chromophore de l'acridine et de deux autres produits en quantités beaucoup plus faibles ( $R_f = 0.58$  et  $R_f = 0.32$ , syst F) renfermant également le colorant et la thymidine]. Le composé **2c $\alpha$**  est stable au bout de 21 heures et ne présente que quelques pour cent de dégradation après quatre jours.

Les études d'interaction des tétranucléotides néopentylés **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$**  avec le poly r(A) ont été réalisées par spectroscopie d'absorption. La formation des complexes est caractérisée par un hypochromisme important et un déplacement bathochrome ainsi que par la présence de trois points isobestiques dans la région 320–530 nm. L'étude des variations spectrales en fonction de la concentration en poly r(A) permet de déterminer la stoechiométrie de la réaction d'association. Les titrations ont été effectuées à 2°C avec des solutions  $5.10^{-5}$  M en oligonucléotide **2** dans le tampon cacodylate de sodium  $10^{-2}$  M à force ionique 0.1 M en NaCl, (pH 7) en ajoutant des quantités connues de poly r(A). Les modifications spectrales atteignent une limite lorsque le rapport A/T est proche de 1. Une élévation de la température provoque la dissociation des complexes. Leur stabilité peut être déterminée par leur température de demi-dissociation ( $T_m$ ). Les valeurs de  $T_m$  ont été déterminées par mesure de l'hypochromicité à  $\lambda = 425$  nm en utilisant des concentrations en complexes égales à  $5.10^{-5}$  M dans le tampon cacodylate de sodium  $10^{-2}$  M et NaCl 0.1 N (pH 7), le rapport entre la concentration en thymine et adénine étant égal à 1 ( $T_m$  **2c $\alpha$**  = 11.1°C,  $T_m$  **2c $\beta$**  = 33.2°C).

## DISCUSSION

Les stéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  des tétrathymidylates alternés éthylphosphotriester-phosphodiester et néopentylphosphotriester-phosphodiester comportant le groupe acridine en 3' (**2b** et **2c**) ont été synthétisés. Cette structure a été choisie du fait de la possibilité d'obtenir des composés dont les groupes phosphotriesters possèdent la même configuration stérique  $S_p$  et  $R_p$  (Schéma 4). L'étape clef de cette synthèse concerne la préparation et la séparation des stéréoisomères des dinucléoside éthylphosphotriesters **5b $\alpha$**  et **5b $\beta$**  et des dinucléoside néopentylphosphotriesters **5c $\alpha$**  et **5c $\beta$** . Ces stéréoisomères sont obtenus en séparant par chromatographie sur silice soit les diastéréoisomères de DMTrTp(Et)T **5b** et de DMTrTp(CH<sub>2</sub>—CMe<sub>3</sub>)T **5c** obtenus par transestérification du diastéréoisomère de DMTrTp(Ar)T **3** en présence d'alcool et de fluorure de césium selon la méthode d'Ogilvie<sup>10</sup> soit en séparant les deux stéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  du dinucléoside arylphosphotriester **3** puis en les traitant



SCHEMA 4

par un léger excès d'alcoolate de potassium dans le THF. La réaction de transestérification en présence d'alcoolate est stéréospécifique. A partir de l'isomère  $\alpha$  du dinucléoside arylé **3** on obtient les isomères  $\beta$  des dinucléosides alkylés **5a** et **5b**; de même, les isomères **5a $\alpha$**  et **5b $\alpha$**  sont formés à partir de **3 $\beta$** . Elle semble provoquer une inversion de configuration du groupe phosphotriester dans la mesure où les isomères **3 $\alpha$** , **5a $\alpha$**  et **5b $\alpha$** , d'une part, et **3 $\beta$** , **5a $\beta$**  et **5b $\beta$**  (**9**), d'autre part, possèdent la même configuration stérique. La transestérification réalisée à partir de chacun des isomères **3 $\alpha$**  et **3 $\beta$**  purs en présence d'alcool et de CsF conduit pratiquement au même mélange racémique de dinucléoside alkylphosphotriesters **5** (Schéma 2). Cette racémisation, déjà signalée par Miller<sup>18</sup> dans le cas du dinucléoside dDMTrib Gp(Ar)bzA en présence d'éthanol et de CsF serait due soit à un échange rapide entre l'anion fluorure du CsF et le fluorophosphate intermédiaire soit à la structure de type trans-di-fluorophosphorane de l'intermédiaire activé.<sup>19</sup> Les résultats de la transestérification et l'obtention du TpT à partir des diastéréoisomères des dinucléosides arylés **3** et méthylés **5a** confirment la structure des stéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  des dinucléosides alkylphosphotriesters **5a**, **5b** et **5c** préparés.

A partir de chacun des stéréoisomères du dinucléoside éthylphosphotriester (**5b $\alpha$**  et **5b $\beta$** ) et du dinucléoside néopentylphosphotriester (**5c $\alpha$**  et **5c $\beta$** ) la synthèse des tétrathymidylates alternés alkylphosphotriester-arylphosphotriester **10** est réalisée selon le Schéma 3. Après élimination sélective des groupes *p*-chlorophényles des phosphates par un traitement avec l'ion benzohydroxamate en milieu aprotique, puis détritulation, les tétrathymidylates alternés alkylphosphotriester-phosphodiester sont obtenus sous forme de stéréoisomères (**2b $\alpha$** , **2b $\beta$** , **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$** ).

Les endonucléases P<sub>1</sub> et S<sub>1</sub> à forte concentration dégradent totalement et uniquement les liaisons 3'-phosphodiester des tétrathymidylates (**2b $\alpha$** , **2b $\beta$** , **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$** )

pour conduire au dinucléoside alkylphosphotriester Tp(R)T, au 5' monophosphate  $p$ Tp(R)T et au monophosphate du groupe intercalant  $p(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$ . Ces résultats montrent que les groupes phosphotriesters et phosphodiester sont alternés et que le premier phosphate internucléotidique (côté 5') et le phosphate-3' terminal sont respectivement substitués par un groupe alkyle et par le groupe acridine. L'inactivité de la 5' exonucléase extraite de la rate de veau et de la 3' exonucléase du venin de serpent vis-à-vis des composés **2** confirme le blocage du premier phosphate internucléotidique (côté 5') et de l'hydroxyle 3' terminal. En présence de concentrations plus faibles en enzyme nous observons que l'estérification partielle des phosphates internucléotidiques par un groupe alkyle R a un effet protecteur pour les groupes phosphodiester adjacents. Cet effet protecteur augmente avec la taille du substituant R. L'endonucléase  $P_1$  dégrade les tétranucléotides partiellement substitués par les groupes néopentyles (**5c $\alpha$**  et **5c $\beta$** ), respectivement environ 2, 5 et 6 fois plus lentement que les dérivés éthylés (**5b $\alpha$**  et **5b $\beta$** ) et le composé non substitué  $(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$ . La vitesse d'hydrolyse des stéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  des tétramères **5b** d'une part et **5c** d'autre part sont très voisines en présence de la nucléase  $P_1$ . Vis-à-vis de la nucléase  $S_1$  la stabilisation de la chaîne nucléotidique par l'estérification partielle des phosphates augmente aussi avec la taille du groupe alkyle. L'effet stabilisateur dépend également de la configuration stérique des groupes alkylphosphotriesters. Les isomères **2b $\beta$**  et **2c $\beta$**  sont respectivement plus stables que les composés **2b $\alpha$**  et **2c $\alpha$**  (environ deux à trois fois).

Les études d'interaction des tétranucléotides porteurs du groupe néopentyle **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$**  avec les polynucléotides, réalisées par spectroscopie d'absorption, ont montré que l'estérification partielle des phosphates par un groupe alkyle volumineux ("néopentyle") n'altère pas la spécificité des interactions. Il se forme des complexes de stoechiométrie 1:1 (A:T) (résultats publiés ultérieurement) avec le poly r(A) pour **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$** . La stabilité des complexes formés, mesurée par leur température de demi-transition ( $T_m$ ) dépend de la structure des groupes néopentylphosphotriesters. L'isomère  $\beta$  conduit à la formation d'un complexe plus stable que l'isomère  $\alpha$ . La différence de  $T_m$  est voisine de 20°C. Dans les mêmes conditions le complexe formé à partir de l'isomère  $\beta$  est légèrement plus stable que le complexe formé à partir du tétranucléotide  $(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$ , [ $T_m(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr} = 29.7^\circ\text{C}$  (3),  $T_m$  **2c $\alpha$**  = 11.1°C,  $T_m$  **2c $\beta$**  = 33.2°C].

En vue de synthétiser des composés alternés alkylphosphotriester-phosphodiester comportant les quatre nucléosides, nous avons testé la stabilité des groupes alkylphosphotriester en milieu alcalin. La soude a été choisie en remplacement de l'ammoniaque concentrée (habituellement utilisée pour la déprotection des bases nucléiques) en raison du manque de stabilité de la liaison amino-9 acridine en présence de cette dernière. Cette étude a été réalisée d'abord avec les diastéréoisomères des dinucléosides **5a**, **5b** et **5c** car ces composés dont l'hydroxyle 5' est bloqué par un groupe trityle stable en milieu alcalin donnent des produits de dégradation faciles à identifier. Les résultats obtenus montrent que l'hydrolyse en milieu alcalin des dinucléoside alkylphosphotriesters se fait essentiellement au niveau des liaisons internucléotidiques dans le cas des dérivés éthylé **5b** et néopentylé **5c**. La fragilité des liaisons internucléotidiques a été observée par Reese et coll.<sup>20</sup> et Van Boom et coll.<sup>21</sup> dans les études de déprotection des nucléotides arylphosphotriesters en milieu alcalin. Les vitesses de dégradation obtenues avec les dinucléotides

3'-phosphodiester **6b $\alpha$**  et **6c $\alpha$**  sont comparables à celles des dinucléosides **5b** et **5c**. Dans ces derniers cas, la présence de l'hydroxyle 3' libre a peu d'influence sur la vitesse d'hydrolyse. La stabilité du groupe néopentyle phosphotriester à la fois sous forme de dinucléoside **5c**, dinucléotide **6c $\alpha$**  et tétranucléotide **2c $\alpha$**  montre que ce groupement peut être utilisé pour protéger partiellement les groupes phosphodiester d'oligodésoxynucléotides.

## CONCLUSION

Nous avons préparé quatre oligothymidylates possédant la structure alternée alkylphosphotriester-phosphodiester dont tous les groupes alkylphosphotriesters possèdent la même configuration stérique  $(Tp(R)Tp)_2(CH_2)_5Acr$  ( $R = Et$ , **2b $\alpha$**  et **2b $\beta$** ;  $R = Me_3C-CH_2$ , **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$** ). La synthèse a été réalisée selon la méthode au phosphotriester en solution à partir de chacun des isomères des dinucléosides éthylés **5b $\alpha$**  et **5b $\beta$**  d'une part et néopentylés **5c $\alpha$**  et **5c $\beta$**  d'autre part. Les résultats des études de stabilité de ces substances vis-à-vis des nucléases ont montré que l'estérification partielle des phosphates a un effet protecteur pour les groupes phosphodiester adjacents et que cet effet augmente avec la taille du substituant (les dérivés néopentylés **2c** sont plus stables que les dérivés éthylés). Vis-à-vis de l'endonucléase  $S_1$  l'effet protecteur dépend également de la configuration stérique du groupe alkylphosphotriester. Les isomères **2b $\beta$**  et **2c $\beta$**  sont respectivement plus stables que les isomères **2b $\alpha$**  et **2c $\alpha$** . Les études d'interaction des composés néopentylés, **2c $\alpha$**  et **2c $\beta$**  avec les polynucléotides réalisées par spectroscopie d'absorption ont montré que l'estérification partielle par un groupe alkyle volumineux n'altère pas la spécificité et qu'elle conduit même à une légère augmentation de l'affinité dans le cas de l'isomère **2c $\beta$** . Enfin, le groupe néopentylphosphotriester est stable en milieu alcalin dans les conditions de déprotection des bases nucléiques, ce qui permet d'envisager la synthèse de séquences de type alterné néopentylphosphotriester-phosphodiester comportant les quatre nucléosides en vue d'études *in vivo*.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions la Ligue Nationale Française contre le Cancer et la Fédération des Centres de Lutte contre le Cancer de l'aide financière apportée à la réalisation de ce travail.

## REFERENCES ET NOTES

1. U. Asseline, N. T. Thuong et C. Hélène, *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **297**, 369-372 (1983).
2. U. Asseline, F. Toulmé, N. T. Thuong, M. Delarue, T. Montenay-Garestier et C. Hélène, *The EMBO Journal*, **3**, 795-800 (1984).
3. U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulmé, N. T. Thuong, T. Montenay-Garestier et C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3297-3301 (1984).
4. G. Lancelot, U. Asseline, N. T. Thuong et C. Hélène, *Biochemistry*, (sous presse).
5. U. Asseline, N. T. Thuong et C. Hélène, *J. Biol. Chem.*, (soumis pour publication).
6. R. L. Letsinger et K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4801 (1967); *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3350 (1969).
7. J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl et R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353-371 (1977).
8. N. T. Thuong, M. Chassignol, G. Lancelot, R. Mayer, B. Hartmann, M. Leng et C. Hélène, *Biochimie*, **63**, 775-784 (1981).

9. On appelle  $\alpha$  l'isomère qui possède le Rf supérieur et  $\beta$  l'isomère qui possède le Rf inférieur dans le système D;  $Rf\alpha > Rf\beta$ .
10. K. K. Ogilvie et S. L. Beaucage, *Nucleic Acids Res.*, **7**, 805–823 (1979).
11. U. Asseline et N. T. Thuong, *Tetrahedron Letters*, **26**, (8), 1005–1008 (1985).
12. G. W. Daub et E. E. Van Tamelen, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3526–3528 (1977).
13. Après purification, les oligothymidylates **2ba**, **2b $\beta$** , **2ca** et **2c $\beta$**  ont été analysés par HPLC en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub> (MicroPak-SPC 18) (Merck). Reverse phase column (4.5 mm  $\times$  15 cm). Solvant A: acétate d'ammonium 0.127 M dans CH<sub>3</sub>CH/H<sub>2</sub>O, 2:98, v/v, pH 5.9. Solvant B: acétate d'ammonium 0.114 M dans CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 48:52, v/v, pH 5.9. Débit 1.2 ml/mn, 75% B isochratique, température 20°C, détecteur: 254 nm.
14. Les nucléases utilisées sont des produits Boehringer (Mannheim).
15. P. S. Miller, N. Dreon, S. M. Pulford et C. McParland, *The J. of Biol. Chem.*, **225**, 9659–9665 (1980).
16. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica cat. No: 236225.
17. a) T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 158–168 (1966);  
b) V. M. Vogt, *Eur. J. Biochem.*, **33**, 192–200 (1973);  
c) W. D. Sutton, *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 522–531 (1971).
18. P. S. Miller, S. Chandrasegaran, D. L. Dow, S. M. Pulford et L. S. Kan, *Biochemistry*, **21**, 5468–5474 (1982).
19. R. J. P. Corriu, J. P. Dutheil et G. F. Lanneau, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1060–1065 (1984).
20. J. H. Van Boom, P. M. J. Burgers, P. H. Van Deursen, R. Arentzen et C. B. Reese, *Tetrahedron Letters*, 3785 (1974).
21. J. F. M. de Rooij, J.G. Wille-Hazeleger, P. M. J. Burgers et J. H. Van Boom, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2237–2259 (1979).