

SUR LA STÉRÉOSPÉCIFICITÉ
DE LA RIBONUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE-RÉDUCTASE:
PRÉPARATION DE DÉSOXYRIBONUCLÉOSIDES
PYRIMIDIQUES DEUTÉRÉS

S. DAVID ET J. EUSTACHE

Laboratoire de Chimie des Composés Biologiques, Université de Paris-Sud, 91-Orsay (France)

(Reçu le 13 mai 1971; accepté le 14 juin 1971)

ABSTRACT

Methyl 2-deoxy-3,5,6-tri-*O-p*-nitrobenzoyl-*D-ribo*-hexofuranoside was converted into the glycosyl halide which was then condensed with 2,4-bis(trimethylsilyloxy)-pyrimidine in the presence of mercuric chloride to give, after alkaline methanolysis, 1-(2-deoxy- β -*D-ribo*-hexofuranosyl)uracil, in a yield too low for the reaction to be applied to deuterated compounds. Methyl 2-deoxy-*D-allo*furanoside-2-*d* was degraded into methyl 2-deoxy-*D-arabinofuranoside*-2-*d*. Its di-*p*-nitrobenzoate was converted into the glycosyl halide which was coupled with 2,4-bis(trimethylsilyloxy)-pyrimidine to give, after alkaline hydrolysis, deuterated deoxypyridine. Thiation-ammonolysis of a mixture of the 3',5'-di-*p*-nitrobenzoates of the latter compound and its α anomer gave the corresponding deoxycytidines. Comparison of the n.m.r. spectra of these compounds to that of deuterated deoxycytidine, prepared by the enzymic reduction of cytidine 5'-pyrophosphate with the *Escherichia coli* system in the presence of deuterium oxide confirmed that the substitution of a hydroxyl group by a hydrogen atom proceeds with retention of configuration.

SOMMAIRE

On a converti le méthyl 2-désoxy-3,5,6-tri-*O-p*-nitrobenzoyl-*D-ribo*-hexofuranoside en halogénure qui a été ensuite condensé avec la 2,4-bis(triméthylsilyloxy)-pyrimidine en présence de chlorure mercurique pour donner, après méthanolyse alcaline, le 1-(2-désoxy- β -*D-ribo*-hexofuranosyl)uracile, avec un rendement trop faible pour que la réaction soit applicable à des produits deutérés. On a dégradé le méthyl 2-désoxy-*D-allo*furanoside-2-*d* en méthyl 2-désoxy-*D-arabinofuranoside*-2-*d*. Le di-*p*-nitrobenzoate de celui-ci a été converti en halogénure, qui a été couplé avec la 2,4-bis(triméthylsilyloxy)pyrimidine, pour donner, après hydrolyse alcaline, la désoxyuridine deutérée. Par thiation et ammonolyse d'un mélange des 3',5'-di-*p*-nitrobenzoates de celle-ci et de son anomère α , on a préparé les désoxycytidines correspondantes. La comparaison des spectres de r.m.n. de ces composés à celui de la désoxycytidine deutérée, préparée par réduction enzymatique de la cytidine diphosphate par le système de *Escherichia coli* en présence de deutérium, confirme que la

substitution du groupe hydroxyle par un atome d'hydrogène a lieu avec rétention de configuration.

INTRODUCTION

La ribonucléoside-diphosphate-réductase de *Escherichia coli* catalyse la réduction des 5'-diphosphates de l'uridine, de la cytidine, de l'adénosine et de la guanosine en 2'-désoxyribonucléosides correspondants. Elle comprend deux sous-unités qui forment en présence de Mg²⁺ un complexe actif. Le donneur d'hydrogène est la forme réduite d'une protéine à cystéine, la thiorédoxine¹. On a isolé d'autres sources des enzymes similaires, et leur intérêt est manifestement considérable, car cette réduction est la seule voie connue de synthèse *in vivo* des constituants de l'acide désoxyribonucléique. De plus, on a montré récemment² que l'activité de ces enzymes augmentait notablement dans les tumeurs en croissance rapide.

Le mécanisme de la réaction est inconnu, mais la stéréospécificité du remplacement du groupe hydroxyle en 2' par un proton a déjà été étudiée. En effectuant la réaction dans l'oxyde de deutérium, Reichard *et al.*³ ont obtenu une désoxycytidine deutérée en 2', qu'ils ont examinée par r.m.n. Ils trouvent par double irradiation que le couplage de H-3' avec l'unique proton sur C-2' est de 6,5 Hz. Revenant alors au spectre de la désoxycytidine normale, ils en déduisent que les deux couplages de H-3' avec les protons sur C-2' sont 6,5 et 4-4,5 Hz. N'ayant pas de modèles deutérés, les auteurs se réfèrent à des calculs de Lemieux relatifs à la thymidine⁴. Cet auteur déduit de la formule de Karplus⁵ les valeurs $J_{2',3'} = 7,5$ Hz pour le couplage entre H-3' et le proton H-2' *cis*, et $J_{2'',3'} = 3,5$ Hz pour le couplage entre H-3' et le proton H-2'' *trans*. Il paraît donc probable qu'il y ait rétention de configuration lors de la réduction enzymatique³. Toutefois, seule la valeur moyenne des couplages a été vérifiée⁴, et l'écart entre $J_{2',3'}$ et $J_{2'',3'}$ observé par Reichard est nettement moindre que prévu. En raison du caractère approximatif de la relation de Karplus, et des problèmes soulevés par la conformation des furanoses, nous avons cherché une confirmation expérimentale directe en faisant la synthèse de nucléosides deutérés sur C-2'. Une démonstration par dégradation, qui n'utilise pas la r.m.n. et qui est applicable à des préparations enzymatiques partiellement purifiées, a été publiée ailleurs⁶.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

On a choisi comme produit de départ le méthyl 2-désoxy-D-*ribo*-hexofuranoside (**1**) déjà connu⁷, car ce composé est préparé à partir du méthyl 4,6-O-benzylidène-2-désoxy- α -D-*ribo*-hexopyranoside facilement accessible sous la forme deutérée^{8,9}. Le composé **1** donne un tri-*p*-nitrobenzoate **2**, poudre amorphe qui, dissoute dans l'acide acétique et traitée par un excès de chlorure d'hydrogène, se transforme en halogénure **3** cristallisé. On s'est inspiré, pour le couplage, de la synthèse de la thymidine de Wittenburg¹⁰, et on a traité l'halogénure **3** dans le benzène, par la 2,4-bis(triméthylsilyloxy)pyrimidine, en présence d'oxyde et de chlorure mercuriques. On obtient un

mélange α,β de nucléosides protégés sur le sucre, dont on peut séparer 11% d'anomère β pur cristallisé 4. Le nucléoside débloqué 5, résultant de la méthanolysé basique de 4 est également cristallisé. Ses propriétés spectrales et sa composition s'accordent totalement avec la structure proposée : en particulier, la courbe de dispersion rotatoire est monotone décroissante de 365 à 589 nm. Nous avons observé précédemment une courbe croissante avec l'anomère α , composé amorphe, dont l'orientation a été prouvée par dégradation en 1-(2-désoxy- α -D-*érythro*-pentofuranosyl)uracile⁸.

En essayant de préparer 5 par simple mélange du bromure de 2-désoxy-3-*O*-*p*-nitrobenzoyl-D-*ribo*-hexofuranosyle 5,6-carbonate avec la 2,4-diméthoxypyrimidine, nous avons obtenu⁸ exclusivement son anomère α . Nous avons imité les conditions décrites¹¹ pour la réaction analogue du bromure de 2-désoxy-3-*O*-*p*-nitrobenzoyl-D-*arabino*-hexofuranosyle 5,6-carbonate, parce que les auteurs de la publication jugeaient que l'unique nucléoside qu'ils avaient obtenu était l'anomère β . Cette conclusion reposait sur l'aspect du signal r.m.n. de H-1', un « triplet ». Robbins *et al.*¹² ont en effet observé, sur le spectre de nucléosides puriques et pyrimidiques du 2-désoxy-D-*érythro*-pentofuranose, que le signal de H-1' était un « triplet » pour les composés β et un quadruplet pour les composés α . Toutefois, nous avons trouvé que cette règle n'était pas généralisable aux nucléosides du 2-désoxy-D-*thréo*-pentofuranose : le signal du proton anomère du 1-(2-désoxy- β -D-*thréo*-pentofuranosyl)-5-méthyluracile, préparé selon Fox *et al.*¹³, est un quadruplet, δ 5,86, J 3,0 et 7,5 Hz (Fig. 1). Nous pensons donc que la structure du nucléoside décrit comme le 1-(2-désoxy- β -D-*arabino*-

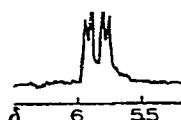
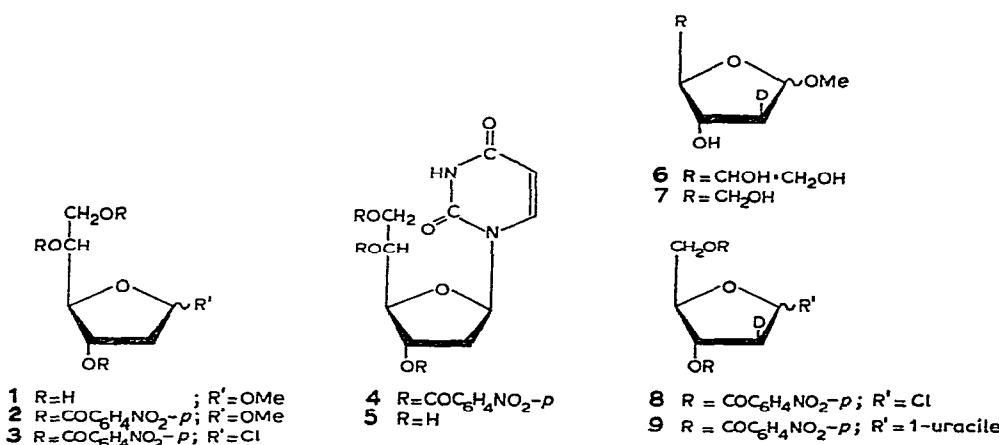


Fig. 1. Le signal de r.m.n. à 60 MHz de H-1' (δ 5,86, $J_{1',2}$ 3,0 et 7,5 Hz) du 1-(2-désoxy- β -D-*thréo*-pentofuranosyl)-5-méthyluracile, dissous dans l'oxyde de deutérium, en p.p.m. vers les champs faibles (référence interne: HDO, δ 4,50).



hexofuranosyl)uracile, sur la seule évidence de son spectre de r.m.n.¹¹, doit être réexamинée.

Le rendement en nucléoside **5** est trop faible pour qu'il soit utilisable à la synthèse de la désoxyuridine par coupure au périodate et réduction au borohydrure. Nous avons préféré effectuer cette séquence réactionnelle sur le méthyl 2-désoxy-D-allofuranoside-2-*d* (**6**) et avons ainsi obtenu avec 70% de rendement un 2-désoxy-D-*érythro*-pentofuranoside spécifiquement deutéré sur C-2, le méthyl 2-désoxy-D-arabinofuranoside-2-*d* (**7**). Pour préparer les nucléosides de **7**, nous l'avons converti en chlorure de 2-désoxy-3,5-di-*O*-*p*-nitrobenzoyl-D-arabinofuranosyle-2-*d* (**8**) et traité comme l'halogénure **3**. On isole par chromatographie sur colonne d'alumine neutre le mélange de nucléosides protégés **9** dont l'anomère β est séparé par cristallisation. Cet anomère est hydrolysé en désoxyuridine deutérée **10** par le méthanol ammoniacal. On a également effectué la thiation du mélange **9** selon la méthode décrite¹⁴ pour le dibenzoate de la désoxyuridine pure. Les constituants du mélange anomère de 4-thionucléosides résultant se différencient sur couche mince et on les sépare commodément à ce stade pour les ammonolyser ensuite. On obtient ainsi la désoxycytidine deutérée **11** [1-(2-désoxy- β -D-arabinofuranosyl-2-*d*)-cytosine] et son anomère α .

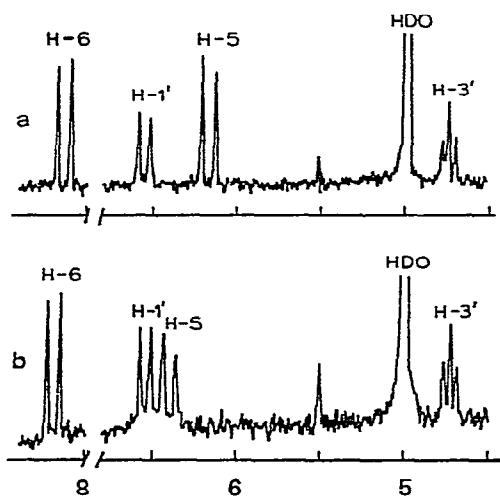
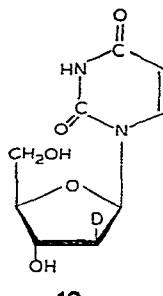


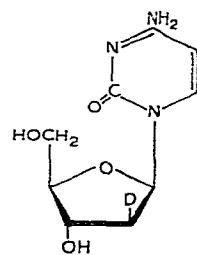
Fig. 2. Spectres de r.m.n. partiels à 100 MHz des nucléosides, dissous dans l'oxyde de deutérium, en p.p.m. à partir de l'hexaméthyldisilazane (référence externe) : (a) 1-(2-désoxy- β -D-arabinofuranosyl-2-*d*)-uridine (**10**) ; (b) 1-(2-désoxy- β -D-arabinofuranosyl-2-*d*)-cytosine (**11**).

On a reproduit sur la Fig. 2 les spectres de r.m.n. à 100 MHz de la désoxyuridine et de la désoxycytidine deutérée (**10** et **11**) après substitution des hydrogènes mobiles par du deutérium et dissolution dans l'oxyde de deutérium. Le seul proton sur C-2' est en *trans* par rapport à H-3' et nous l'avons appelé H-2''. Par rapport aux spectres ordinaires on observe la simplification attendue du signal des protons voisins. Le « triplet » de H-1' est devenu un doublet, $J_{1',2''}$ 6 Hz, et le multiplet de H-3' a pris l'aspect d'un triplet. Ce signal de H-3' correspond à deux couplages très voisins, et

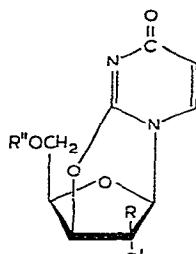
proches de 4 Hz, d'une part avec H-4', et d'autre part avec H-2'' (qui est en *trans* de H-3' d'après la synthèse). Par contre, sur le spectre de l'échantillon d'origine enzymatique, le signal de H-3' est un quadruplet, et le couplage avec l'unique proton sur C-2' est de 6,5 Hz³. Nous confirmons donc que dans ce dernier cas, c'est le deutérium qui est en *trans* de H-3', et que par conséquent la réduction a eu lieu avec rétention de configuration.



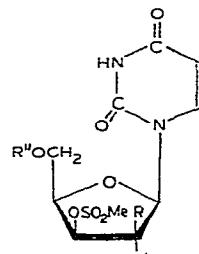
10



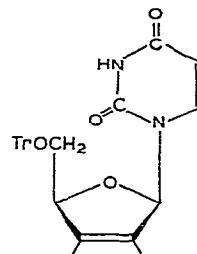
11



12 $R''=T$; $R'=H$; $R''=Tr$
12a $R''=H$; $R'=T$; $R''=Tr$



13 $R''=T$; $R'=H$; $R''=Tr$
13a $R''=H$; $R'=T$; $R''=Tr$



14

$T = {}^3H$; $Tr = \text{trityl}$

Par réduction enzymatique de la cytidine-2'-*t* diphosphate avec un extrait de *E. coli*, nous avons obtenu, après plusieurs étapes, un anhydronucléoside et un méthanesulfonate qui doivent avoir les structures respectives 12 et 13 si l'on admet qu'il y a rétention de configuration lors de la réduction, 12a et 13a dans l'autre hypothèse⁶. Ces deux composés subissent, en présence de *tert*-butylate de potassium, une élimination déjà décrite en série non tritiée¹⁵, et qui, dans notre cas, s'effectue sans perte de radioactivité spécifique. Le produit que nous obtenons est donc encore tritié sur C-2', et possède la structure 14. Pour que cette élimination se produise, la liaison (C-3')-O et une des liaisons (C-2')-H doivent devenir coplanaires. Sur un modèle moléculaire de 12, la liaison (C-3')-O paraît déjà pratiquement coplanaire à la liaison entre C-2' et l'hydrogène H-2 *trans*. L'élimination est donc probablement *trans*. Puisque la radioactivité spécifique est conservée, l'anhydronucléoside de départ a la structure 12. Que le résultat soit le même à partir de 13 indique que la conformation (concevable sur un furanose flexible) où les liaisons (C-3')-O et (C-2')-(H-2') sont

cis-coplanaires est défavorisée par rapport à celle où (C-2')-O et (C-3')-(H-2'') sont *trans*-antiparallèles.

Si l'on accepte la *trans*-élimination, les dégradations fournissent une preuve indépendante de la rétention de configuration dans la réduction par le système de *E. coli*. Inversement, si l'on admet que cette stéréospécificité enzymatique est démontrée par les études en r.m.n., la conservation de la radioactivité dans ces réactions peut être considérée comme une preuve (en partie biochimique) de la *trans*-élimination.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — On a effectué les chromatographies sur couche mince (c.c.m.) sur gel de silice avec les mélanges chloroforme-méthanol comme irrigant, sauf indication contraire. On a déterminé les spectres de r.m.n. à 60 MHz dans les solvants indiqués, avec, comme référence interne, le tétraméthylsilane dans les solvants organiques, et le signal HDO, fixé à δ 4,50 dans l'oxyde de deutérium. Les conditions étaient différentes pour les composés deutérés. Les constantes de couplage sont données en Hz.

Méthyl 2-désoxy-3,5,6-tri-O-p-nitrobenzoyl-D-ribo-hexofuranoside (2). — À une solution du méthyl 2-désoxy-D-ribo-hexofuranoside⁷ (1, 1,48 g) dans la pyridine (20 ml), on ajoute lentement à 0° le chlorure de *p*-nitrobenzoyle (6,3 g). Après 10 jours à 4°, avec agitation intermittente, on ajoute au mélange une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (30 ml), puis on verse dans de l'eau glacée (500 ml). Après 2 h d'agitation, le solide est filtré, lavé à l'eau et séché à 40° sous vide (4,68 g, 75%).

Chlorure de 2-désoxy-3,5,6-tri-O-p-nitrobenzoyl-D-ribo-hexofuranosyle (3). — On fait passer un courant de chlorure d'hydrogène dans une solution maintenue à 0° du composé 2 (4,68 g) dans l'acide acétique anhydre (30 ml). La cristallisation de 3 commence après 10 min. On interrompt le courant après 15 min, on maintient encore 10 min à 0°, on ajoute alors un excès d'éther sec, on filtre et lave à l'éther les cristaux qui sont séchés sous vide en présence de pentoxyde de phosphore à température ambiante (3,43 g, 73%), p.f. 92-95°, déc. 110°.

I-(2-Désoxy-3,5,6-tri-O-p-nitrobenzoyl-β-D-ribo-hexofuranosyl)uracile (4). — On agite pendant 24 h à 25° une suspension du chlorure 3 (3,18 g, 3 mmoles) dans le benzène sec (50 ml) contenant la 2,4-bis(triméthylsilyloxy)pyrimidine (2,30 g, 9 mmoles), de l'oxyde jaune de mercure (2,25 g) et du bromure mercurique (2,25 g). On agite ensuite vigoureusement avec une solution d'iodure de potassium à 20% (400 ml) jusqu'à disparition de la couleur de l'oxyde jaune de mercure. On filtre et on lave avec la solution d'iodure de potassium, puis à l'eau. La poudre blanche séchée (2,17 g) ne contient plus d'halogénose, d'après l'examen en c.c.m. (chloroforme à 10% de méthanol). On l'incorpore à une bouillie de 3 g d'alumine dans un peu de chloroforme, et on dépose le tout au sommet d'une colonne (2 × 35 cm) d'alumine neutre Prolabo, équilibrée dans le chloroforme. On examine les fractions par c.c.m. (chloroforme-méthanol 19:1). Avec le chloroforme à 3% de méthanol, on élue: a) en tête des produits

de décomposition de l'halogénose, b) le nucléoside protégé (anomère β pur) qui cristallise en petite quantité, c) un mélange de nucléosides protégés anomères. Le mélange c) est recristallisé dans l'acétone-éther, avec ensemençement par les cristaux obtenus en b). On obtient ainsi le composé 4 (328 mg, 11%), p.f. 207-207,5°; n.m.r. (acétone- d_6) : δ 5,6 (doublet, $J_{5,6}$ 8,2 Hz, H-6), 6,4 (« triplet », J 7,5 Hz, H-1') et 7,75 (doublet, J 8,2, Hz, H-5).

Anal. Calc. pour $C_{31}H_{23}N_5O_{15}$: C, 52,76; H, 3,26; N, 9,93. Trouvé : C, 52,43; H, 3,35; N, 10,33.

1-(2-Désoxy- β -D-ribo-hexofuranosyl)uracile (5). — À une suspension de nucléoside protégé 4 (120 mg, 0,2 mmole) dans le méthanol anhydre (10 ml), on ajoute une solution M de méthanolate de sodium dans le méthanol (0,4 ml) et on agite pendant 150 min à 20°. On ajoute la résine Dowex-50 (H^+ , 1 g), et on agite jusqu'à neutralité. On ajoute de l'eau (10 ml) et on poursuit l'agitation pendant 5 min. On filtre la résine, on la met en suspension dans l'acide acétique (5 ml), on filtre, on réunit les filtrats et on évapore le méthanol. On extrait trois fois la phase aqueuse résiduelle au chloroforme, on l'évapore à sec et on la dessèche complètement par coévaporation avec de l'éthanol absolu. Le résidu mousseux est repris dans le méthanol bouillant (1,5 ml). Les cristaux précipitent au refroidissement. Après 1 h, on ajoute de l'éther (1 ml), on filtre et on sèche (34 mg, 66%), p.f. 167,5-168,5°; u.v. : $\lambda_{max}^{H_2O}$ 260 nm (ϵ 10 000) (c 5.10 $^{-5}$, pH 7); n.m.r. (D_2O) : δ 5,50 (doublet, J 8,2 Hz, H-6), 5,90 (« triplet » J 7,5 Hz, H-1') et 7,4 (doublet, J 8,2 Hz, H-5); o.r.d. : $[\alpha]_{589}^{20}$ 0°, $[\alpha]_{430}^{20}$ 4°, $[\alpha]_{365}^{20}$ 8° (c 0,4, eau).

Anal. Calc. pour $C_{10}H_{14}N_2O_6$: C, 46,51; H, 5,47; N, 10,85. Trouvé : C, 46,73; H, 5,71; N, 10,83.

Méthyl 2-désoxy-D-arabinofuranoside-2-d (7). — À une solution du méthyl 2-désoxy-D-allofuranoside-2- d^8 (6) (1,780 g, 10 mmoles) dans l'eau (300 ml) et l'éthanol (150 ml), on ajoute une solution de métapériodate de sodium à 5% (58 ml, 1,4 équivalent) et on ajuste au pH 7 avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. On laisse reposer pendant 2 h à l'abri de la lumière, puis on ajoute du borohydrure de sodium (380 mg, 10 mmoles). Après 30 min d'agitation, on concentre à 50 ml, on ajoute de l'éthanol (300 ml) et on filtre les sels minéraux. On évapore à sec le filtrat et on le dessèche par coévaporation avec de l'éthanol absolu. On mélange le résidu avec 5 g d'alumine (voir ci-après) et on dépose au sommet d'une colonne (2 × 19 cm) de 40 g d'alumine basique (Fluka, 5016 A, activité 1). On élue par le chloroforme à 5% de méthanol par fraction de 15 ml. On recueille les fractions 5-30, homogènes en c.c.m., qui sont réunies et évaporées à sec (1,036 g, 70%).

1(2-Désoxy-3,5-di-O-p-nitrobenzoyl- α , β -D-arabinosyl-2-d)uracile (9). — Ce produit est préparé selon la méthode de R. K. Ness¹⁶. Le 2-désoxy-D-érythro-pentose deutéré 7 est converti en halogénure 8 (2,064 g, 4,58 mmoles) qui est mis en suspension dans le benzène sec (10 ml) contenant la 2,4-bis(triméthylsilyloxy)pyrimidine (1,152 g, 4,6 mmoles), de l'oxyde jaune de mercure (1,125 g) et du bromure mercurique (1,125 g) préalablement séchés par coévaporation avec du benzène sec. On agite pendant 24 h à 20°. On traite de la même façon que dans la synthèse de 4 pour obtenir une poudre

blanchâtre. Celle-ci est chromatographiée sur 100 g d'alumine neutre avec élution par le chloroforme à 4% de méthanol, par fraction de 15 ml. On réunit les éluats contenant les deux anomères reconnus par c.c.m. et on les évapore à sec (384 mg, 16%).

1-(2-Désoxy- β -D-arabinosyl-2-d)uracile (10). — Le produit précédent (384 mg) est dissous dans l'acétone chaude. Par refroidissement et ensemencement, l'anomère β cristallise (60 mg, p.f. 235° (litt.¹⁷ : p.f. 240° pour l'analogue non deutéré). On met en suspension dans le méthanol (5 ml) que l'on sature d'ammoniac à 0°. Le produit se dissout. Après 24 h on évapore à sec, reprend à l'eau, extrait plusieurs fois à l'éther. Il n'y a plus dans la phase aqueuse de *p*-nitrobenzamide décelable par c.c.m. (méthanol-chloroforme 1:6). On évapore la phase aqueuse. Le résidu (10, 21 mg, 80%), est dissous dans l'oxyde de deutérium et la solution est lyophilisée pour la détermination du spectre de r.m.n. à 100 MHz (hexaméthyldisilazane, référence externe) : δ 2,70 (large signal, de 10 Hz, H-2'), 4,07 (deux doublets, 2H-5'), 4,30 (multiplet, H-4'), 4,74 (« triplet », $J_{2',3'}\cdot 4$ Hz, $J_{3',4'}\cdot 4$ Hz, H-3'), 6,16 (doublet, $J_{5,6}$ 8 Hz, H-5), 6,55 (doublet $J_{1',2'}\cdot 6$ Hz, H-1') et 8,13 (doublet $J_{5,6}$ 8 Hz, H-6).

1-(2-Désoxy- β -D-arabinosyl-2-d)cytosine (11). — À une solution de nucléosides protégés 9 (324 mg, 0,6 mmole) dans la pyridine (18 ml) on ajoute du pentasulfure de phosphore (687 mg, 3,1 mmoles) et des traces d'eau (0,02 ml). Après 6 h de chauffage à reflux, il n'y a plus de produit de départ (c.c.m. : chloroforme-méthanol 10:1). On décante le liquide surnageant, on l'évapore à sec, on reprend le résidu dans du toluène et on évapore à sec. Le résidu gommeux est extrait avec du dichlorométhane (2×50 ml). L'extrait lavé à l'eau et évaporé à sec donne un résidu (250 mg), qui est chromatographié sur une plaque de gel de silice de 2 mm (Merck) (benzène-acétate d'éthyle 2:1). Il y a deux bandes principales qui sont séparées et éluées avec le chloroforme à 20% de méthanol : anomère β (33 mg, R_F 0,57), anomère α (31 mg, R_F 0,43), rendement total 19%.

L'anomère β est dissous dans l'éthanol absolu (15 ml), saturé à 0° en ammoniac. Après 18 h à 100°, le maximum d'absorption à 330 nm des dérivés sur N-1 du 4-thiouracile a disparu et a été remplacé par celui de la désoxycytidine en milieu alcalin (λ_{max} 270 nm). On évapore à sec, reprend le résidu à l'eau, extrait la phase aqueuse à l'éther, puis l'évapore à sec (10 mg). On purifie le résidu par chromatographie sur papier épais Whatman 3 MM (acétate d'éthyle-alcool propylique-eau 4:2:1) en recueillant la bande, visible en u.v., qui se trouve au même niveau qu'un témoin de désoxycytidine. Le spectre u.v. d'une fraction (1%) du produit obtenu, en solution aqueuse alcaline (5 ml) (λ_{max} 272, λ_{min} 250 nm $\epsilon_{272}/\epsilon_{250}$ 1,5) est identique à celui d'une solution $3,3 \cdot 10^{-5} M$ de désoxycytidine dans les mêmes conditions; on en déduit un rendement de 3,7 mg; r.m.n. (D_2O ; réf. externe : hexaméthyldisilazane) : δ 2,71 (large signal de 14 Hz, H-2'), 4,09 (multiplet, 2 H-5'), 4,36 (doublet de doublet, $J_{3',4'}\cdot 4,0$ Hz, $J_{4',5'}\cdot 8,5$ Hz, H-4'), 4,72 (« triplet », $J_{2',3'}\cdot 4,0$ Hz, $J_{3',4'}\cdot 4,0$ Hz, H-3'), 4,99 (HDO), 6,39 (doublet, $J_{5,6}$ 8,0 Hz, H-5), 6,54 (doublet, $J_{1',2'}\cdot 6,5$ Hz, H-1') et 8,18 (doublet, $J_{5,6}$ 8,0 Hz, H-6); litt.¹⁸ : $J_{1',2'} = J_{1',2'} = 6,1$ Hz.

L'anomère α de la 4-thiouridine protégée est ammonolysé, purifié et dosé de la

même façon en utilisant un témoin non deutéré (rdt. 3 mg); r.m.n. (D_2O , signal de HOD fixé à δ 4,78 p.p.m. en référence interne) : δ 2,30 (large signal de 12 Hz, H-2''), 3,81 (quadruplet, 2 H-5'), 4,28 (multiplet, H-3', H-4'), 4,78 (HDO), 6,19 (doublet, $J_{5,6}$ 8,0 Hz, H-5), 6,27 (doublet $J_{1',2''}$ 3,0 Hz, H-1') et 8,03 (doublet, $J_{5,6}$ 8,0 Hz, H-6).

Par rapport au spectre d'un témoin d'« α -désoxycytidine » ordinaire pris dans les mêmes conditions, on observe la simplification du signal de H-2'', la disparition du signal de H-2', le changement de forme du signal mixte H-3', H-4', la transformation du quadruplet de H-1', avec disparition du couplage $J_{1',2'}$, 7 Hz, le reste étant identique; litt.¹⁸ : $J_{1',2'}$, 7,0 et 3,0 Hz pour la 1-(2-désoxy- α -D-érythro-pentofuranosyl)-cytosine.

RÉFÉRENCES

- 1 P. REICHARD, *Eur. J. Biochem.*, 3 (1968) 259.
- 2 H. L. ELFORD, M. FREESE, E. PASSAMANI ET H. P. MORRIS, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5228.
- 3 L. J. DURHAM, A. LARSSON ET P. REICHARD, *Eur. J. Biochem.*, 1 (1967) 92.
- 4 R. U. LEMIEUX, *Can. J. Chem.*, 39 (1961) 116.
- 5 M. KARPLUS, *J. Chem. Phys.*, 30 (1959) 11.
- 6 S. DAVID ET C. ROUZEAU, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 43 (1971) 46.
- 7 C. C. BHAT, K. V. BHAT ET W. W. ZORBACH, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 197.
- 8 S. DAVID ET J. EUSTACHE, *Carbohydr. Res.*, 16 (1971) 469.
- 9 R. F. BUTTERWORTH, P. M. COLLINS ET W. G. OVEREND, *J. Chem. Soc. D*, (1969) 378.
- 10 E. WITTENBURG, *Chem. Ber.*, 101 (1968) 1095.
- 11 K. V. BHAT ET W. W. ZORBACH, *Carbohydr. Res.*, 6 (1968) 63.
- 12 H. J. ROBINS ET R. K. ROBINS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 87 (1965) 4934.
- 13 J. J. FOX ET N. C. MILLER, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 936.
- 14 I. WEMPEN, R. DUSCHINSKY, L. KAPLAN ET J. J. FOX, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 4755.
- 15 J. P. HORWITZ, J. CHUA, I. L. KLUNDT, M. A. DAROOGE ET M. NOEL, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 1896.
- 16 R. N. NESS dans W. W. ZORBACH ET R. S. TIPSON (Réds.), *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, Interscience, New York, 1968, p. 123, Vol. 1.
- 17 M. PRYSTAS ET F. SORM, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 30 (1965) 1960.
- 18 R. J. CUSHLEY, I. WEMPEN ET J. J. FOX, *J. Amer. Chem. Soc.*, 90 (1968) 709.

Carbohydr. Res., 20 (1971) 319-327