

SYNTHÈSE SIMPLIFIÉE DE SONDÉS MIXTES AVEC DES TRIAZOLO-NUCLEOSIDES

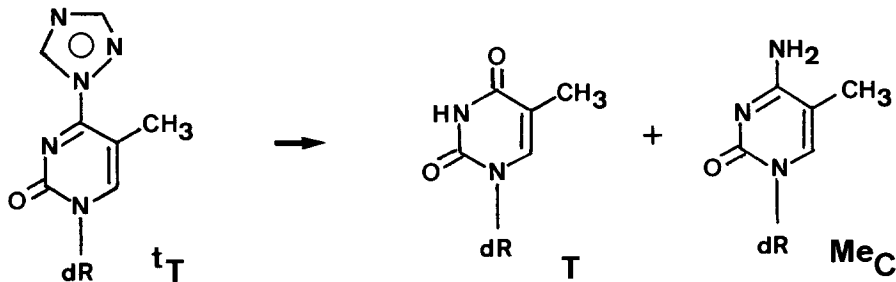
T. Huynh-Dinh, B. Langlois d'Estaintot, P. Allard et J. Igolen

Unité de Chimie Organique, Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, INSTITUT PASTEUR
28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX (France)

Summary : The incorporation of triazolo-nucleosides during the synthesis of a specific sequence yields, after treatment with a mixture of pyridine aldoximate-tetramethyl guanidine- concentrated ammonia, mixed probes oligonucleotides with practically equimolecular amounts of T/^{Me}C and G/^{NH₂}A at the degenerate sites.

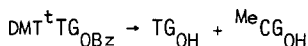
Du fait de la dégénérescence du code génétique, les mélanges d'oligodésoxynucléotides synthétiques ou "sondes mixtes" ont été largement utilisés pour l'hybridation avec des mARN ou cADN¹. Bien que des sondes complexes de 384² ou 1 024³ séquences aient été synthétisées pour servir avec succès à détecter des cADN et à provoquer des mutations dirigées, les problèmes posés par leur synthèse et purification ne sont pas encore complètement résolus.

Dans le cadre d'un programme de synthèse simplifiée de sondes mixtes, nous avons voulu savoir s'il était possible d'introduire dans une séquence *unique* des nucléosides modifiés, qui au déblocage final, donneraient un *mélange* de purines et pyrimidines aux sites ambigus A/G et C/T. Cette approche est inspirée des travaux de Sung⁴ qui, après incorporation d'une triazolo-4' pyrimidone ^tT dans un nonamère, a obtenu deux séquences définies comportant une thymidine T ou une méthyl-5 désoxycytidine ^{Me}C. Nous avons donc cherché les conditions optimales d'un "déblocage mixte" aboutissant à un mélange équimoléculaire de T et ^{Me}C, ce qui permettrait de conserver l'appariement des pyrimidines au niveau d'une ambiguïté T/C.



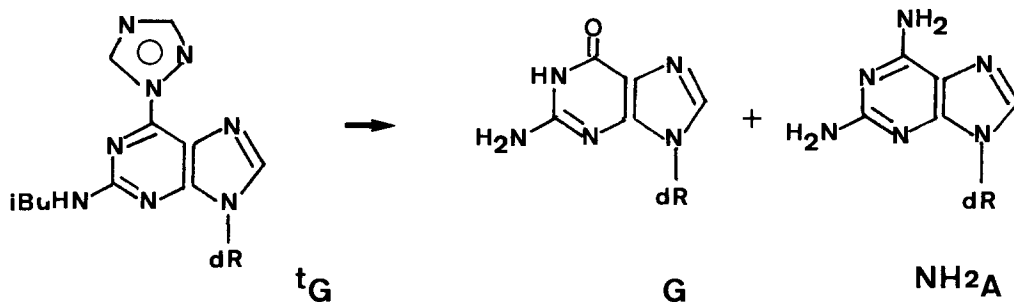
Le dimère $\text{DMT}^{\text{t}}\text{TG}_{\text{OBz}}$ a donc été synthétisé en phase liquide, avec la méthode au phosphotriester et les proportions des dimères, obtenus en fonction des différentes conditions de déblocage, ont été déterminées par CLHP⁵ en comparaison avec les deux dimères TG et MeCG authentiques préparés séparément. Les résultats sont résumés dans le Tableau I : les essais 1 et 2 confirment les résultats publiés⁴ et le meilleur déblocage mixte est donné par l'essai 6 (46 % TG et 54 % MeCG).

TABLEAU I



Essai				%TG	% MeCG
1	TMG-PAO 0,3 M 15 h, t.a.	NH_4OH conc., 5 h t.a.	AcOH 80 % 15 mn, t.a.	99	0
2	NH_4OH conc-dioxanne (3-1), 3 h, t.a.	NH_4OH conc-pyridine (1-2), 5 h, 50°C	"	0	99
3	TMG-PAO 0,3 M, 4 h, t.a.	NH_4OH conc., 15 h 50°C	"	93	7
4	TMG-PAO 0,3 M- NH_4OH conc. (1-10), 24 h, t.a.		"	35	65
5	TMG-PAO 0,3 M- NH_4OH conc. (1-10), 15 h, t.a.		"	43	56
6	TMG-PAO 0,3 M- NH_4OH conc. (1-10), 15 h, t.a puis 3 h 40°C		"	46	54

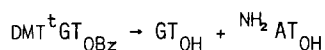
La deuxième étape consiste à vérifier si les conditions de déblocage mixte mises au point pour les pyrimidines restent valables pour les purines : il fallait donc préparer la triazololo-6 purine tG et la transformer en guanosine G et amino-2 adénosine NH_2A . Dans cette réaction, on introduit la possibilité d'une liaison hydrogène supplémentaire au cours de l'hybridation car l'appariement A-T (2 liaisons H) sera remplacé par une hybridation $\text{NH}_2\text{A-T}$ (3 liaisons H), plus stable⁶



Le $\text{DMT}^{\text{t}}\text{G}_p$ ⁷ est préparé par deux voies différentes, à partir de DMTG_{OH} (38 %) et DMTG_p (68 %) par action de l'o.chlorophényl phosphochloridate en présence de triazole, au lieu du nitro-triazole⁸. Le produit est purifié sur colonne de silice rapide et couplé en phase

liquide pour donner le dimère DMT^tGT. Ce dimère est mis à réagir dans les conditions du Tableau I et les résultats comparés en CLHP⁵ avec les deux dimères GT et NH₂AT préparés séparément. Le Tableau II résume les résultats obtenus : le déblocage avec l'ammoniaque concentrée ne suffit pas à enlever le deuxième groupement isobutyryl sur l' amino-2 adénosine, même dans les conditions décrites par Jones⁹ (65°C pendant 7 jours). La déprotection complète est obtenue avec l'éthylène diamine, à la température ambiante¹⁰.

TABLEAU II



Essai				%GT	%NH ₂ AT	% ⁱ BuNH ₂ AT
7	TMG-PAO 0,3 M 15 h, t.a.	NH ₄ OH conc. 5 h, t.a.	AcOH 80% 15 mn t.a.	100		
8	NH ₄ OH conc-dioxanne (3-1), 3 h, t.a.	NH ₄ OH conc-pyridine (1-2), 48 h 50°C	"			100
9	NH ₄ OH conc-dioxanne (1-1), 16 h, t.a.	NH ₄ OH conc-pyridine (1-2) 7 j, 65°C	"	5	10	84
10	TMG-PAO 0,3 M -NH ₄ OH conc. (1-10), 15 h, t.a. puis 6 h	50°C et 7 j. 65°C	"	56	13	31
11	NH ₄ OH conc-dioxanne (1-1), 3 h, t.a.	NH ₄ OH conc. 48 h 50°C Ethylène diamine 72 h, t.a.	"		100	
12	TMG-PAO 0,3 M-NH ₄ OH conc. (1-10), 15 h, t.a.	Ethylène diamine 72 h, t.a.	"	40	49	*

* autres produits non identifiés

En conclusion, les résultats décrits montrent qu'il est possible, en introduisant des triazolo-nucléosides dans une séquence déterminée, d'obtenir un déblocage mixte en mélange T/^{Me}C et G/^{NH₂}A aux sites ambigus. L'avantage de cette méthode réside en un contrôle plus rigoureux du rendement de couplage¹¹ aux sites ambigus, une simplification de la synthèse des sondes mixtes et aussi une meilleure hybridation de ces sondes puisqu'un certain nombre d'adénosines y sont remplacées par des amino-2 adénosines.

Nous avons ainsi préparé la sonde mixte 5'OH C_C^TC_C^TTG_G^ATACATCAT 3'OH par deux méthodes en phase solide : d'abord de façon classique avec des trimères¹ puis avec ^tT et ^tG aux sites ambigus. Les essais comparatifs de ces 2 sondes pour screener une banque de cADN clonés seront publiés ultérieurement.

REFERENCES ET NOTES

1. R.B. Wallace, M.J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima et K. Itakura, *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9, 879.
2. A.S. Whitehead, G. Goldberger, D.E. Woods, A.F. Markham et H.R. Colten, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1983, 80, 5387.

3. D. Kalderon, W.D. Richardson, A.F. Markham et A.E. Smith, *Nature*, 1984, 331, 33.
4. L.S. Sung, *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9, 6139.
5. Colonne Zorbax ODS 9,3 mm diamètre interne ou (HS-5 C-18 Perkin-Elmer de 4,6 mm de diamètre interne). Tampon A : acétate de triéthylammonium 0,01 M pH 7 ; Tampon B : mélange (tampon A-acétonitrile 1-1) ; Gradient linéaire avec 10 % de A en accroissant la proportion de B pour obtenir en 20 mn 50 % A - 50 % B. Débit 5,5 ml/mn ou (1,8 ml/mn). Temps de rétention (mn) : TG 6,69 (4,14) ; ^{Me}CG 5,48 (3,25) ; GT 7,40 (5,32) ; ^{NH₂}AT 8'44 (6'52) ; ^{iBuNH}AT 10'80 (8'74).
6. J.A. Cavallès, J.-M. Neumann, S. Tran-Dinh, T. Huynh-Dinh, B. Langlois d'Estaintot et J. Igolen, *Eur. J. Biochemistry*, (sous presse)
7. Purification par chromatographie sur silice Merck 7734. CCM : Rf = 0,58 (CH₂Cl₂-MeOH 4-1) ; UV (EtOH 96°) : 338 nm (4 200), 300 nm (3 100), 252 nm (16 800), 231 nm (32 000) ; MS (EI, 70 ev) : 300 (100) DMT, 273 (33) ^{tG}^{iBu}, 115 (5) deoxyribose.
8. C.B. Reese et A. Ubasawa, *Tetrahedron Lett.*, 1980, 21, 2265.
9. B.L. Gaffney, L.A. Marky et R.A. Jones, *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 4351.
10. R.W. Barnett et R.L. Letsinger, *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 991
11. Un contrôle du rendement de couplage dans la synthèse de sondes mixtes peut être effectué avec des groupements protecteurs colorés en 5' : E.F. Fisher et M.H. Caruthers, *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, 1589 ; J. Jiricny et M.B. Jones, *Cruacham Highlights*, Février 1984.

Abréviations : t : triazolo ; DMT : diméthoxy-4,4' trityl ; TMG : tétraméthyl guanidine ; PAO : pyridine-2 aldoxime ; P : o.chlorophényl cyanoéthyl phosphate.

(Received in France 28 October 1984)