

SYNTHÈSE DES 1-(5-DÉSOXY- $\beta$ -D-ribo-HEXOFURANOSYL)CYTOSINE ET 1-(2,5-DIDÉSOXY- $\beta$ -D-érythro-HEXOFURANOSYL)CYTOSINE, ET DE LEURS PHOSPHATES. CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UNE RIBONUCLÉOTIDE-RÉDUCTASE DE MAMMIFÈRE (RAT)

SERGE DAVID ET GÉRARD DE SENNYEV

*Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle, Bât. 420, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay (France)*

(Reçu le 24 juillet 1978; accepté sous forme modifiée le 20 janvier 1979)

ABSTRACT

Mild, acidic hydrolysis of 3-*O*-benzoyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-allofuranose gave a diol that was selectively benzoylated at O-6 in high yield by intermediate conversion to the stannylene derivative. The 3,6-dibenzoate was converted to the 5-*O*-tosyl derivative and thence to a mixture of iodides, which were reduced with tributylstannane to 3,6-di-*O*-benzoyl-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribohexofuranose (**6**). Acetolysis gave an anomeric mixture of diacetates, which, when treated with *N*-acetylbis(trimethylsilyl)cytosine gave the protected nucleoside, which was deprotected to free "homocytidine", 1-(5-deoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (**11**), by alkaline methanolysis. This was *N*-acetylated and then treated with acetone to give a protected nucleoside, which was labelled by oxidation to the aldehyde, reduction with sodium borotritide, and deprotection. Acidic methanolysis of **6** gave a mixture of methyl 2,6- and 3,6-di-*O*-benzoylfuranosides, the hydroxyl groups of which were treated by the tetrachloromethane-triphenylphosphine reagent to give the 2-chloro-2-deoxy (**21**) and 3-chloro-3-deoxy derivatives. Reduction of **21** gave methyl 3,6-di-*O*-benzoyl-2,5-dideoxy-D-erythro-furanoside, further transformed in 1-(2,5-dideoxy- $\beta$ -D-erythro-hexofuranosyl)cytosine mixed with the  $\alpha$  anomer. Phosphates and diphosphates of the nucleosides were prepared by extensions of known methods. The phosphate and the diphosphate of **11** act neither as substrates nor as inhibitors of a ribonucleotide-reductase from rat ascites tumor.

SOMMAIRE

L'intermédiaire commun, le 3,6-di-*O*-benzoyl-5-désoxy-1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranose (**6**) a été préparé à partir du 3-*O*-benzoyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose par hydrolyse de la fonction acétal en 5,6, benzoylation sélective en 6 (par l'intermédiaire du dérivé stannylène), ioduration en 5 et réduction radicalaire (tributylstannane). L'acétolyse de **6** donne un mélange anomérique d'acétates en 1 et 2, qui, traité par la *N*-acétylbis(triméthylsilyl)cytosine en présence de chlorure

stannique, conduit à un nucléoside protégé qui est transformé en 1-(5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (**11**) par méthanolyse alcaline. Le nucléoside **11** est *N*-acétylé et converti en acétal isopropylidénique. L'oxydation de la fonction alcool primaire en aldéhyde est suivie d'une réduction par le borohydrure de sodium tritié. La méthanolyse acide de l'intermédiaire **6** donne le mélange des méthyl  $\beta$ -D-furanosides, benzoylés en 2,6 et 3,6, dont les groupes hydroxyles libres sont substitués par du chlore par le réactif tétrachlorure de carbone-triméthylphosphine. La réduction du dérivé 2-chloro-2-désoxy donne le méthyl 3,6-di-*O*-benzoyl-2,5-didésoxy-D-érythro-hexofuranoside qui est converti en deux étapes en 1-(2,5-didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine accompagnée de son anomère  $\alpha$ . On prépare les phosphates et diphosphates des nucléosides selon des méthodes décrites. Le phosphate et le diphosphate de **11** ("homocytidine") ne sont ni substrats ni inhibiteurs de la ribonucléotide réductase d'une tumeur d'ascite du rat.

## INTRODUCTION

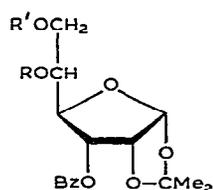
La seule voie de biosynthèse des désoxyribonucléotides connue à ce jour est la réduction des nucléotides correspondants<sup>1,2</sup>. Dans le système extrait de *Escherichia coli*, un composant, la "protéine B<sub>1</sub>" se lie au substrat et le réduit à l'aide de ses fonctions thiol<sup>3</sup>. Le mécanisme, qui est encore inconnu, met en jeu un radical libre, présent dans un deuxième composant du système, la "protéine B<sub>2</sub>". Dans le système extrait de *Lactobacillus leichmannii*, ce radical libre est solidaire de l'adénosylcobalamine. La réduction a lieu avec rétention de configuration chez les bactéries<sup>2</sup>, et chez un mammifère, le rat<sup>4</sup>. Il est remarquable que la réduction radicalaire des dérivés 2'-chloro-2'-désoxy- $\beta$ -D-ribo ou -arabino de divers nucléosides présente la même stéréospécificité<sup>5</sup>.

Les enzymes tolèrent des variations dans la base des nucléotides, et un certain nombre de nucléotides non présents dans les acides ribonucléiques sont réduits, quoiqu'en général avec un faible rendement. Dans une mesure comparable, l'enzyme tolère le remplacement de certains atomes d'oxygène par des atomes de soufre dans la chaîne polyphosphate<sup>6</sup>. Par contre, aucun des nucléotides de sucre modifié, essayés jusqu'à présent n'a été trouvé actif; ce sont les dérivés pentofuranosiques suivants: 2'-*O*-phosphonyl- $\beta$ -D-ribo<sup>7</sup>, 2'-*O*-méthyl- $\beta$ -D-ribo<sup>8</sup>, 3'-*O*-méthyl- $\beta$ -D-ribo<sup>8</sup>,  $\beta$ -D-arabino<sup>8</sup>,  $\beta$ -D-xylo, 2'-amino-, 2'-azido-, et 2'-chloro-2'-désoxy- $\beta$ -D-érythro<sup>9</sup>, 3'-désoxy- $\beta$ -D-érythro<sup>10</sup>. Comme tous ces nucléosides correspondent à des modifications du système *cis*-diol du D-ribose, on en a déduit que l'intégralité de ce système était indispensable. Il devenait logique alors d'étudier un nucléotide modifié dans la chaîne latérale du sucre, et nous avons choisi les composés **12** et **13**. Au vu du nombre considérable d'analogues de nucléosides qui ont été préparés ces dernières années, il est remarquable qu'on n'ait publié aucune synthèse de nucléosides du 5-désoxy-D-ribo-hexose, qui sont pourtant les homologues les plus évidents des ribonucléosides naturels, à l'exception de l'"homoadénosine"<sup>11</sup>. Nous avons choisi la cytosine comme base, parce que le diphosphate de cytidine est le substrat le plus actif de la ribonucléo-

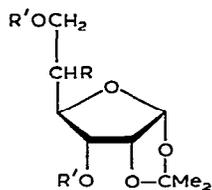
tide-réductase de *E. coli*. Tout renseignement sur un système d'importance aussi primordiale que la ribonucléotide-réductase est intéressant. De plus, cet enzyme est exceptionnellement actif dans les tumeurs et son étude est une voie d'approche rationnelle de chimiothérapie anticancéreuse. Nous avons déjà publié certaines de ces synthèses sous une forme abrégée<sup>12</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

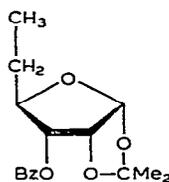
**Synthèse.** — Plutôt que d'essayer l'allongement de la chaîne latérale de la cytidine, nous avons préféré faire la synthèse d'un dérivé adapté du 5-désoxy-D-ribohexose et le condenser avec la N-acétylcytosine. Notre produit de départ est le 1,2:5,6-di-O-isopropylidène-α-D-allofuranose, désormais aisément accessible<sup>13</sup> en quantités de l'ordre de 100 g, qui possède la configuration D-ribo sur les carbones C-2, -3 et -4. La benzylation conventionnelle donne le composé totalement protégé **1** (92%). L'hydrolyse acide du groupement 5,6-O-isopropylidène est effectué par un traitement à l'acide acétique aqueux (60%) à 50° jusqu'à disparition de **1** (rendement 73%). On a protégé d'abord la fonction alcool primaire par benzylation monomoléculaire à -20°, ce qui nous a donné le 3,6-dibenzoate **3** (71%), transformé ensuite en tosylate **4** de la façon habituelle. Il est beaucoup plus commode de passer par l'intermédiaire



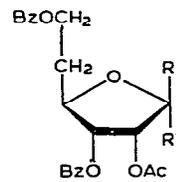
- 1 R, R' = CMe<sub>2</sub>  
 2 R = R' = H  
 3 R = H, R' = Bz  
 4 R = Ts, R' = Bz



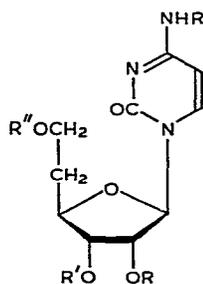
- 5 R = I, R' = Bz  
 6 R = H, R' = Bz



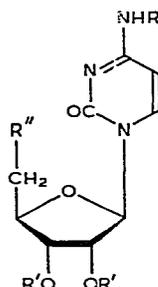
7



- 8 R = H, R' = OAc  
 9 R = OAc, R' = H



- 10 R = Ac, R' = R'' = Bz  
 11 R = R' = R'' = H  
 12 R = R' = H, R'' = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>  
 13 R = R' = H, R'' = O-PO(OH)-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>



- 14 R = Ac, R' = H, R'' = CH<sub>2</sub>OH  
 15 R = Ac, R', R' = CMe<sub>2</sub>, R'' = CH<sub>2</sub>OH  
 16 R = Ac, R', R' = CMe<sub>2</sub>, R'' = CHO  
 17 R = R' = H, R'' = CHTOH

du dérivé 5,6-*O*-dibutylstannylène du diol **2**, préparé dans le benzène selon la technique de Considine<sup>14</sup>. En traitant cette solution benzénique par 1.1 équivalent de chlorure de benzoyle, en présence de pyridine, on observe une réaction complète en 5 min à température ambiante. Ce n'est qu'après 20 min qu'il apparaît des traces d'un nouveau produit, probablement le dibenzoate. Nous ne savons pas sous quelle forme se trouve la fonction alcool secondaire dans ce milieu, mais en tout cas elle est suffisamment réactive pour être tosylée *in situ* en une nuit à température ambiante. On passe ainsi de **2** à **4** sans changer de récipient.

On sait que la substitution d'un groupement *p*-toluènesulfonate tel que celui en **4** risque d'avoir lieu sur C-6, à cause de la participation du groupement benzoate voisin, mais que la réaction des agents nucléophiles énergiques dans un solvant polaire aprotique a lieu sans transposition<sup>15</sup>. Effectivement, le traitement du dérivé tosyl **4**, par l'iodure de potassium dans l'hexaméthylphosphorotriamide donne presque quantitativement (97%) un mélange d'iodures isomères cristallisés, séparables par chromatographie. Il s'agit de deux épimères secondaires, de formule générale **5**: la réduction du mélange brut dissous dans le toluène par le tributylstannane (2 équiv.) en présence d'azobis(isobutyronitrile), donne, avec 89% de rendement, un composé cristallisé de p.f. 87° dont le spectre de r.m.n. ne présente pas le signal caractéristique du groupement CH-CH<sub>3</sub>, ce qui s'accorde avec la structure **6** du 5-désoxy- $\alpha$ -D-ribohexofuranose protégé. Lorsqu'on essaie de réduire le mélange **5**, en suspension méthanolique, par l'hydrogène à pression et température ordinaire, en présence de nickel de Raney W-4, on obtient, à côté de 49% de composé **6**, un liquide dont le spectre de r.m.n. présente le triplet caractéristique de CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> et auquel nous donnons la structure **7**.

On peut obtenir les deux acétates anomères **8** et **9**, actifs en synthèse nucléosidique, en hydrolysant le groupement *O*-isopropylidène du sucre bloqué **6** par l'acide acétique aqueux, puis en acétylant de façon conventionnelle le sucre réducteur ainsi obtenu. Le rendement n'est pas bon, mais néanmoins nous avons pu obtenir ainsi le nucléoside cristallisé **10**. La méthode la plus efficace pour préparer les acétates **8** et **9** est l'acétolyse de **6** par le système acide acétique-anhydride acétique-acide sulfurique (15:35:1), une nuit à température ambiante. Après le traitement habituel, la chromatographie sur colonne donne l'anomère  $\alpha$ -D, sirupeux **8** à l'état pur, puis une fraction moins pure, mais qui, d'après l'ensemble de ses propriétés, doit contenir essentiellement l'anomère  $\beta$ -D (**9**). L'acétolyse n'entraîne pas d'inversion de configuration sur C-2: chacun des deux acétates sirupeux obtenus, séparables sur couche mince ou sur colonne, peut être converti, avec le même rendement, en nucléoside **10**. Ils ne se séparent pas des acétates **8** et **9** en c.c.m. La méthanolyse alcaline en sucre libre donne dans tous les cas un composé de même comportement en chromatographie sur papier. Enfin, la formulation des produits d'acétolyse comme un mélange d'anomères **8** et **9** conduit à une relation cohérente entre pouvoir rotatoire et r.m.n., car on prévoit alors que l'isomère lévogyre doit avoir la configuration  $\beta$ -D- (**9**), or le signal de H-1 est un singulet, indiquant une disposition 1,2-*trans*.

Nous avons utilisé la méthode de couplage de Niedballa et Vorbrüggen<sup>16</sup>:

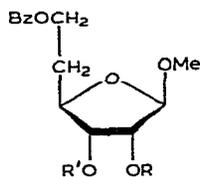
le mélange anomérique d'acétates **8** et **9** dissous dans le 1,2-dichloroéthane, est d'abord traité par le tétrachlorure d'étain, puis une nuit à température ambiante, par la *N*-acétylbis(triméthylsilyl)cytosine. On obtient ainsi le nucléoside complètement estérifié **10**, qui est converti quantitativement en 1-(5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (**11**) que nous appellerons désormais "homocytidine". Ce composé a été caractérisé par la préparation d'un picrate cristallisé. Sa configuration  $\beta$ -D est prévisible d'après sa préparation, car il y a un groupement ester participant en *trans* sur C-2 du sucre de départ. Cette configuration est confirmée par le spectre de dichroïsme circulaire, qui est presque identique à celui de la cytidine.

On a préparé le nucléotide **12** par la méthode de Yoshikawa *et al.*<sup>17</sup>, qui utilise l'oxychlorure de phosphore en présence de phosphate d'éthyle. Le produit brut en solution aqueuse est purifié sur une colonne de "Dowex-50" (H<sup>+</sup>). On observe un profil d'élution symétrique avec l'acide acétique 0,2M. La mousse obtenue par lyophilisation (90 %) paraît pure à l'examen sur couche mince de cellulose et présente les mêmes spectres ultraviolets que **11** en milieu neutre et acide. Elle consomme 1 équiv. de périodate, ce qui confirme que c'est bien la fonction alcool primaire qui a été estérifiée. Enfin, elle possède la composition attendue en phosphore.

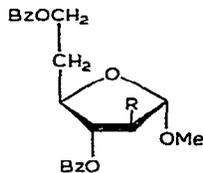
Le 5'-phosphate **12** est ensuite converti en 5'-diphosphate (**13**) en adaptant à l'échelle de 20  $\mu$ mol la méthode de Michelson décrite pour le diphosphate de cytidine<sup>18</sup>. Le produit obtenu a même comportement chromatographique sur colonne Dowex-1 (X-2) et sur papier que le diphosphate de cytidine.

On a marqué au tritium l'homocytidine **11** en oxydant la fonction alcool primaire en aldéhyde, ensuite réduit par le borohydrure tritié. On commence par une *N*-acétylation sélective par l'anhydride acétique dans l'éthanol bouillant qui donne le dérivé **14** cristallisé (94 %). On prépare le dérivé isopropylidène de **14** par l'acétone et l'acide *p*-toluènesulfonique, en veillant à éviter toute alcalinité au cours de l'isolement. On obtient ainsi une mousse (90 %) qui a les propriétés analytiques attendues pour la structure **15**. L'oxydation par le diméthyl sulfoxyde, en présence de dicyclohexylcarbodiimide et de trifluoroacétate de pyridinium<sup>19</sup> donne, avec un rendement estimé de  $\sim 70$  %, l'aldéhyde **16**, qui n'est pas cristallin. Il n'a pu être purifié qu'avec un faible rendement (34 %) par chromatographie sur gel de silice. On n'a pas trouvé la composition analytique attendue pour cet échantillon, mais le spectre de r.m.n. indique la présence d'un proton aldéhydique ( $\delta$  9,70); il est compatible par ailleurs, ainsi que le spectre ultra-violet. Cependant, il n'est pas nécessaire d'avoir l'aldéhyde pur pour le marquage, qui a été effectué sur une solution éthanolique débarassée de *N,N*-dicyclohexylurée, par addition de borotritide de sodium. Après la réduction, on achève la dé-*N*-acétylation par addition d'hydroxyde de sodium 0,1M, puis on hydrolyse l'acétal par l'acide trifluoroacétique aqueux à 90 %. On purifie la [6'-<sup>3</sup>H]-homocytidine (**17**) par chromatographie préparative sur papier. Le rendement chimique par rapport à l'aldéhyde est de 97 %. On prépare les phosphates pour les essais enzymatiques comme décrit ci-dessus.

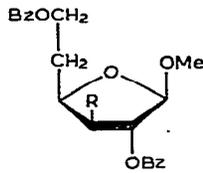
C'est également à partir de **6** que nous avons préparé la 1-(2,5-didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytidine (**26**), "homodésoxycytidine". L'hydrolyse de la



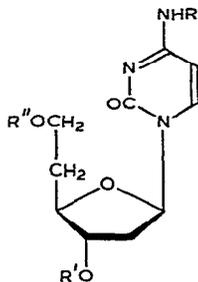
- 18 R = Bz, R' = H  
 19 R = H, R' = Bz  
 20 R = R' = Bz



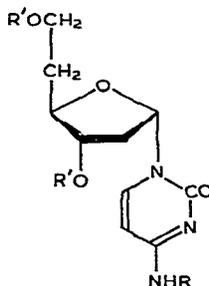
- 21 R = Cl  
 22 R = H



- 23 R = Cl  
 24 R = H



- 25 R = Ac, R' = R'' = Bz  
 26 R = R' = R'' = H  
 27 R = R' = H, R'' = OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>



- 28 R = Ac, R' = Bz  
 29 R = R' = H

fonction acétal par une résine acide en présence de méthanol donne, par suite de migration d'ester, un mélange distillable, mais non séparable de 2,6- et 3,6-dibenzoate (18 et 19). Le rendement est quantitatif. On obtient évidemment, par benzylation, un tribenzoate homogène 20. Le spectre de r.m.n. de 20, où le signal de H-1 n'est pas dédoublé, indique que c'est un méthyl  $\beta$ -D-glucoside. Le traitement du mélange (18 plus 19) en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone par la triphénylphosphine<sup>20</sup> remplace le groupe hydroxyle par un groupe de chlore, et on obtient les deux chlorures 21 et 23, séparables par chromatographie sur colonne, sirupeux et distillables. On peut aisément reconnaître l'atome de carbone substitué par du chlore sur ces deux composés en observant sur le spectre de r.m.n. le déblindage des protons en  $\alpha$  des fonctions benzoates. Le spectre du composé le plus polaire présente deux singulets à champs faibles ( $\delta$  5,41 et 4,97) attribués respectivement à H-2 et H-1. L'absence de couplage  $J_{2,3}$  indique que H-2 et H-3 sont en position *trans*, donc que le dérivé chloré a la structure 3-chloro-3-désoxy- $\beta$ -D-xylo (23), et que la substitution a eu lieu avec inversion de configuration.

Sur le spectre de r.m.n. du chlorure le moins polaire, on observe un quadruplet à champ faible qui ne peut correspondre qu'à H-3, car le signal du proton anomère est un singulet. Nous avons donc bien le dérivé 2-chloro-2-désoxy; de plus, la disposition est 1,2-*trans*. L'élucidation de la configuration du résidu de chlore soulève, par contre, des difficultés déjà notées par Ritzmann *et al.*<sup>21</sup> dans une réaction analogue.

Si nous calquons notre interprétation sur la leur, le composé est  $\alpha$ -D-*arabino*, ce qui implique, aussi bien ici que dans l'exemple publié<sup>21</sup>, une anomérisation difficile à expliquer du produit de départ. Par contre, si l'on adopte la configuration  $\beta$ -D-*ribo*, il devient difficile d'expliquer le faible couplage  $J_{2,3}$  1,7 Hz, observé sur notre composé.

En tout cas, la connaissance de cette configuration n'est pas nécessaire à la poursuite de la synthèse. La réduction radicalaire du mélange des dérivés chlorés **21** et **23** donne un mélange séparable par chromatographie sur colonne des hexofuranoses 2,5-didésoxy (**22**) et 3,5-didésoxy (**24**), avec des rendements respectifs de 23 % et 15 % par rapport à **6**. Ceci est dû à l'inefficacité de la séparation. On reconnaît le dérivé 2,5-didésoxy sirupeux à son spectre de r.m.n. : le signal de l'un des CH<sub>2</sub> est un pseudo-septuplet, qui est simplifié en quadruplet par irradiation de H-1, ce qui prouve qu'il s'agit du signal des protons H-2. L'irradiation de ce massif H-2, H-2' transforme le signal de H-1 en singulet. Le quadruplet à champ faible  $\delta$  5,12 correspond à H-3, geminé à l'une des fonctions benzoates, et son irradiation permet de reconnaître H-4. L'irradiation de H-4 convertit le signal de H-3 en doublet, révélant un fort couplage  $J_{2,3}$  10 Hz avec le proton *cis* sur C-2. Cette attribution est confirmée par l'examen du spectre de r.m.n. de l'isomère cristallisé où le signal de H-1 a l'aspect d'un singulet, et celui de H-2 l'aspect d'un doublet ( $J_{2,3}$  4 Hz) dû au couplage avec H-3<sub>*cis*</sub>. Ce dérivé est donc l'isomère 3-désoxy- $\beta$ -D-*érythro* (**24**).

Selon une méthode générale<sup>22</sup>, on traite le furanoside **22**, dissous dans le 1,2-dichloroéthane et l'acétonitrile, par 1 équiv. de *N*-acétylbis(triméthylsilyl)cytosine, puis 1 équiv. de tétrachlorure d'étain, dissous dans le 1,2-dichloroéthane. L'élaboration des produits de réaction permet de séparer les nucléosides protégés  $\beta$  (**25**, 28 %, p.f. 140-1 °) et  $\alpha$  (**28**, 20 %, p.f. 196 °). Par méthanolyse alcaline de ces nucléosides bloqués, on obtient quantitativement, respectivement la 1-(2,5-didésoxy- $\alpha$ -D-*érythro*-hexofuranosyl)cytidine (**29**) amorphe, et le composé recherché, la 1-(2,5-didésoxy- $\beta$ -D-*érythro*-hexofuranosyl)cytidine (**26**) cristallisée. Sur le spectre de r.m.n. de ce dernier composé, H-1' apparaît comme un pseudo-triplet de largeur 13,5 Hz, comme dans le cas de la désoxycytidine, ce qui confirme la configuration  $\beta$ . Sur le spectre de **29**, le signal de H-1' est un quartet du 2ème ordre, de largeur 10,5 Hz. Le nucléoside **26** a été transformé en 5'-phosphate **27** par la même méthode que son homologue **11**.

*Essais enzymatiques.* — Le 5'-diphosphate de cytidine est le substrat normal d'un certain nombre de ribonucléotide-réductases qui catalysent sa réduction en 5'-diphosphate de désoxycytidine. Avec les préparations non purifiées, qui contiennent des kinases, on peut employer comme substrat l'acide cytidylique, qui est phosphorylé *in situ*. Le dosage le plus sensible de la ribonucléotide-réductase dans un extrait biologique consiste à hydrolyser, après l'incubation du précurseur marqué, les diphosphates en monophosphates par un acide minéral, puis à séparer sur une colonne Dowex-50 (H<sup>+</sup>) l'acide désoxycytidylique de l'acide cytidylique n'ayant pas réagi. Avant la chromatographie, on ajoute comme entraîneur de l'acide désoxycytidylique froid, et la correction du mode opératoire se vérifie au parallélisme des profils d'élution de radioactivité et d'absorption u.v.<sup>23</sup>. En appliquant cette technique aux nucléotides **12** et **27**, nous avons constaté qu'ils ne se séparent pas complètement sur colonne

TABLEAU I

RÉACTION DE NUCLÉOTIDES ET DES COMPOSÉS **13** ET **14** AVEC LA NUCLÉOTIDE-RÉDUCTASE

Préparation enzymatique	Substrat		Produit formé (d.p.m. $\times 10^{-3}$ )	Rend. (%)	
	Nom	$\mu\text{mol}$			$\mu\text{Ci}$
I	U- <sup>14</sup> C-CMP	50	1	71	3,2
	U- <sup>14</sup> C-CMP + <b>12</b>	50	1	80	3,6
		50	0		
II	U- <sup>14</sup> C-CDP	50	1	35	1,6
	U- <sup>14</sup> C-CDP + <b>13</b>	50	1	31	1,4
		50	0		
	6'- <sup>3</sup> H- <b>13</b>	50	2	0	0
III	U- <sup>14</sup> C-CMP	50	1	27	1,2
	6'- <sup>3</sup> H- <b>12</b>	40	2	0	0

Dowex-50 ( $\text{H}^+$ ), ce qui a imposé une étape supplémentaire de purification<sup>24</sup> sur plaque de cellulose PEI (voir Tableau I).

Le taux de réduction du phosphate d'homocytidine **12** par un extrait d'une tumeur ascitique (hépatome de Zajdela<sup>25</sup>) est inférieur à 1% de celui de l'acide cytidylique dans les mêmes conditions, et en fait, nous ne considérons pas que le nucléotide **12** est actif dans ce système. Pour nous assurer que le blocage n'avait pas lieu au niveau des kinases, nous avons essayé le diphosphate **13** qui est également inactif. De plus, on n'observe pas d'inhibition de la réduction enzymatique de l'acide cytidylique en présence de l'un ou l'autre des nucléotides **12** et **13** en quantité équimoléculaire.

Le substrat naturel de l'enzyme utilisé ici est probablement le 5'-diphosphate de cytidine, comme dans le cas des autres ribonucléotide-réductases de mammifères. On a suggéré que ce substrat devait se lier à la protéine B<sub>1</sub> en un complexe hautement ordonné, par les groupes phosphates et les deux groupes hydroxyles secondaires<sup>26</sup>. L'inactivité des dérivés de l'homocytidine indiquerait donc que l'allongement de la chaîne latérale rend impossible l'adaptation simultanée des phosphates et du système diol.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Méthodes générales.* — Le mot "chromatographie" se rapporte à la chromatographie sur colonne de gel de silice, avec l'éluant donné entre parenthèse. On a déterminé les spectres de r.m.n. avec le tétraméthylsilane comme référence interne, et sauf indications contraires, à 60 MHz dans le chloroforme-*d*.

*3-O-Benzoyl-1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose (1).* — On ajoute goutte à goutte du chlorure de benzoyle (44,5 mL, 1 équiv.) à une solution maintenue à 0° du 1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose<sup>10</sup> (100 g) dans la pyridine

anhydre (200 mL). Le lendemain on verse dans l'eau glacée, on filtre le précipité cristallin, recristallisé dans le mélange chloroforme-éther de pétrole (130 g, 92%), p.f. 72–73° (litt.<sup>27</sup>: p.f. 75–76°).

*3-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose* (2). — On maintient à 50° une solution de **1** (130 g) dans l'acide acétique aqueux à 60% (200 mL). Lorsque l'examen par c.c.m. (chloroforme-méthanol, 9:1 v/v) indique la disparition de **1**, on évapore à sec, extrait au chloroforme, et lave à l'eau la phase organique, qui est évaporée à sec. On recristallise le résidu dans le mélange chloroforme-éther de pétrole (80 g, 73%), p.f. 106–107° (litt.<sup>27</sup> p.f. 107–109°).

*Anal.* Calc. pour C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>: C, 59,25; H, 6,22. Trouvé: C, 59,90; H, 6,30.

*3,6-Di-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranoside* (3). — On ajoute goutte à goutte du chlorure de benzoyle (6,5 mL, 1,1 équiv.) à une solution refroidie de **2** (16,8 g) dans la pyridine, en veillant à ce que la température ne dépasse pas –20°. L'addition terminée, on poursuit l'agitation, 1 h à –10°, puis une nuit à 0°. On verse dans l'eau glacée, on extrait au chloroforme, on lave la phase organique avec l'acide chlorhydrique aqueux 2M glacé, puis avec une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium et enfin, à l'eau. On évapore à sec la phase organique et cristallise le résidu dans éther-éther de pétrole (12,2 g, 54%), p.f. 106–107°,  $[\alpha]_D^{20} + 82^\circ$  (*c* 1, chloroforme). En effectuant la chromatographie des eaux-mères sur une colonne de gel de silice, avec élution par éther-éther de pétrole (1:1, v/v), on recueille un supplément de cristaux (4,3 g), amenant le rendement total à 71%.

*Anal.* Calc. pour C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>: C, 64,48; H, 5,65; O, 29,88. Trouvé: C, 64,34; H, 5,50; O, 29,67.

*3,6-Di-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidène-5-O-tosyl- $\alpha$ -D-allofuranose* (4). — On ajoute du chlorure de *p*-toluènesulfonyl (13,3 g, 2 équiv.) à une solution de **3** (30 g) dans le chloroforme, préalablement passé sur alumine neutre (activité 1) (200 mL), et la pyridine (50 mL). On maintient le mélange pendant 36 h à 40°, on le verse dans l'eau glacée, on extrait au chloroforme, on lave la phase organique avec l'hydroxyde de sodium aqueux M glacé, puis à l'eau. Après évaporation à sec, on recristallise le résidu dans le mélange benzène-éther de pétrole (35 g, 86%), p.f. 155–157°,  $[\alpha]_D^{20} + 94^\circ$  (*c* 1, dichlorométhane); r.m.n.:  $\delta$  1,25 (*s*, 3 H, CMe), 1,45 (*s*, 3 H, CMe), 2,25 (*s*, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), 4,20–5,40 (6 H, H-2 à H-6), 5,54 (*d*, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> 4,0 Hz, H-1), 6,90–8,00 (14 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>S: C, 61,84; H, 5,19; O, 27,46. Trouvé: C, 61,84; H, 5,25; O, 27,35.

*3,6-Di-O-benzoyl-5-désoxy-5-iodo-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-allofuranose* et *- $\beta$ -L-talofuranose* (5). — On maintient pendant 3 h à 100° une solution de **4** (20 g) et de iodure de potassium (11,2 g, 4 équiv.) dans l'hexaméthylphosphorotriamide (120 mL). On verse dans un mélange de glace et d'acide chlorhydrique M. On filtre le précipité, qui devient huileux par lavage à l'eau. On reprend cette huile au chloroforme. La phase organique est lavée avec l'acide chlorhydrique 2M glacé, puis avec le thio-sulfate de sodium et l'hydrogencarbonate de sodium aqueux, et enfin à l'eau. On évapore à sec et chromatographie le résidu (éther-éther de pétrole, 1:1, v/v). Par

recristallisation dans l'alcool, on obtient le mélange d'iodures diastéréoisomères (18 g, 97%). On sépare les deux constituants par chromatographie d'une petite quantité du mélange (éther-éther de pétrole, 1:2, v/v).

La première fraction contient le dérivé iodé, p.f. 65–67°, obtenu cristallin par évaporation du solvant,  $[\alpha]_D^{20} + 60^\circ$  (*c* 0,3, dichlorométhane); r.m.n. (100 MHz):  $\delta$  1,39 (s, 3 H, CMe), 1,60 (s, 3 H, CMe), 4,13 (m, 1 H, CHI), 4,70–5,30 (5 H, H-2, -3, -4, -6, -6'), 6,10 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  4,0 Hz, H-1), 7,50–8,40 (10 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $C_{23}H_{23}IO_7$ : C, 51,30; H, 4,30; O, 20,81; I, 23,57. Trouvé: C, 51,41; H, 4,45; O, 20,90; I, 23,04.

La deuxième fraction chromatographique contient le dérivé iodé isomère, p.f. 122–124° (éthanol),  $[\alpha]_D^{20} + 70^\circ$  (*c* 0,6, dichlorométhane); r.m.n. (100 MHz):  $\delta$  1,28 (s, 3 H, CMe), 1,50 (s, 3 H, CMe), 4,33 (m, 1 H, CHI), 4,60–4,82 (3 H), 5,00–5,15 (2 H), 6,00 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  4,0 Hz, H-1), 7,30–8,20 (10 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $C_{23}H_{23}IO_7$ : C, 51,30; H, 4,30; O, 20,81; I, 23,57. Trouvé: C, 51,74; H, 4,19; O, 21,25; I, 23,10.

*3,6-Di-O-benzoyl-5-désoxy-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranose (6).* —

On fait bouillir à reflux pendant 30 min une solution du mélange des iodures 5 (30 g, 55 mmol) dans le toluène anhydre (1 L) à laquelle on a ajouté du tributylstannane (26 mL, 110 mmol) et de l' $\alpha, \alpha'$ -azobis(isobutyronitrile) (3,5 g). On évapore à sec et chromatographie le résidu (éther-éther de pétrole, 1:1, v/v). On recristallise les fractions contenant 6 dans l'éther de pétrole (20,7 g, 89%), p.f. 85–87° (éthanol-eau),  $[\alpha]_D^{20} + 68^\circ$  (*c* 0,5, méthanol); r.m.n.:  $\delta$  1,24 (s, 3 H, CMe), 1,49 (s, 3 H, CMe), 2,10 (m de 4 raies, 2 H, H-5, -5'), 2,20–2,70 (4 H, H-3, -4, -6, -6'), 4,87 (pseudo-t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 4,5$  Hz, H-3), 5,80 (d, 1 H, H-1), 7,20–8,20 (10 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $C_{23}H_{24}O_7$ : C, 66,98; H, 5,87; O, 27,16. Trouvé: C, 66,81; H, 5,60; O, 27,15.

*3-O-Benzoyl-5,6-didésoxy-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranose (7).* —

On agite une suspension dans le méthanol du mélange d'isomères 5 (1,08 g) et de nickel de Raney W4 (5 g), en présence de diéthylamine (0,2 mL), dans l'hydrogène à la pression atmosphérique, à température ambiante. On observe l'absorption de 40 mL en 1 h. On évapore la solution, reprend le résidu à l'éther et filtre. On évapore à sec le filtrat et chromatographie le résidu (éther-éther de pétrole, 1:1, v/v). On élue d'abord 7, huile (0,26 g, 45%), p. éb. (0,01 mm) 160°,  $[\alpha]_D^{20} + 101^\circ$  (*c* 1, dichlorométhane); r.m.n.:  $\delta$  1,00 (t, 3 H,  $J_{5,6}$  7 Hz, H<sub>3</sub>-6), 1,30 (s, 3 H, CMe), 1,52 (s, 3 H, CMe), 1,61 (q, 2 H, 2 H-5), 4,0–5,0 (3 H, H-2, -3, -4), 5,80 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  4,0 Hz, H-1), 7,20–8,20 (5 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $C_{16}H_{20}O_5$ : C, 67,74; H, 6,90; O, 27,37. Trouvé: C, 67,70; H, 6,82; O, 27,18.

La poursuite de la chromatographie livre 6 (0,405 g, 49%), p.f. 87° (éthanol-eau).

*3,6-Di-O-benzoyl-1,2-O-isopropylidène-5-O-tosyl- $\alpha$ -D-allofuranose (4).* — On fait bouillir à reflux une suspension de 2 (8,1 g, 25 mmol) et d'oxyde de dibutylétain (6,25 g) dans le benzène (200 mL), avec entraînement azéotropique de l'eau formée

(Dean-Stark). Après 4 h, on évapore à sec la solution limpide, on refroidit à 20°, on reprend dans la pyridine (100 mL) et on ajoute du chlorure de benzoyle (3,5 mL; 1,1 équiv.). Après 5 min, le produit de départ a disparu (c.c.m.), on ajoute alors du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (7,0 g, 1,5 équiv.), et on laisse une nuit à 20°. On verse dans l'eau glacée (500 mL), on extrait au chloroforme (3  $\times$  100 mL), on lave plusieurs fois la phase organique avec l'acide chlorhydrique 0,5M glacé, puis avec l'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, enfin à l'eau. On évapore à sec et recristallise le résidu dans l'éther (6,9 g, 65%).

*1,2-Di-O-acétyl-3,6-di-O-benzoyl-5-désoxy- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranose (8)*. — On laisse pendant une nuit à température ambiante une solution de **6** (5 g) dans un mélange acide acétique–anhydride acétique–acide sulfurique conc., (50 mL, 15:35:1, v/v). On verse goutte à goutte dans un mélange d'eau et de glace, en neutralisant au fur et à mesure par addition simultanée d'hydrogénocarbonate de sodium. On extrait au chloroforme, on lave la phase organique avec l'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, puis à l'eau, et on l'évapore à sec. Le sirop résiduel (4,7 g) ne contient, d'après la c.c.m. (éther–éther de pétrole, 1:1, v/v) que les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$ . Par chromatographie d'une portion de ce sirop sur colonne de gel de silice (même éluant), on sépare d'abord l'anomère  $\alpha$  (**8**), sirop,  $[\alpha]_D^{20}$  21,6° (*c* 1,2, chloroforme); r.m.n. (CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  1,95 (Ac), 2,10 (Ac),  $\sim$ 2,20 (H<sub>2</sub>-5), 4,30–4,70 (3 H, H-4, -6, -6'), 5,40 (2 H, H-2, -3), 6,45 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> 4,5 Hz, F-1), 7,30–8,20 (10 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>: C, 63,15; H, 5,30; O, 31,55. Trouvé: C, 62,97; H, 5,19; O, 31,55.

La poursuite de la chromatographie décrite ci-dessus donne une huile,  $[\alpha]_D^{20}$  –19,7° (*c* 1,1, chloroforme), qui contient vraisemblablement l'anomère  $\beta$ , *1,2-di-O-acétyl-3,6-di-O-benzoyl-5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranose (9)* d'après le spectre de r.m.n. (CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  2,00 (s, Ac), 2,04 (s, Ac),  $\sim$ 2,20 (H<sub>2</sub>-5), 4,30–4,70 (3 H, H-4, -6, -6'), 5,45 (2 H, H-2, -3), 6,20 (s, 1 H, H-1), 7,30–8,10 (10 H, aromatiques).

*Anal.* Calc. pour C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>: C, 63,15; H, 5,30; O, 31,55. Trouvé: C, 62,50; H, 5,26; O, 31,11.

*Autre préparation de 8 et 9 à partir de 6*. — On dissout **6** dans l'acide acétique pur, puis on ajoute de l'eau jusqu'à formation d'un trouble. On chauffe à 100° jusqu'à disparition du produit de départ (2 h). On évapore à sec, on élimine les traces d'acide acétique par coévaporation avec du toluène et on traite par 2,5 équiv. d'anhydride acétique (pyridine). Après 12 h à 20°, le traitement habituel donne le mélange de **8** et **9**, identique au mélange précédemment obtenu dans les propriétés suivantes: c.c.m. (éther–éther de pétrole, 1:1, v/v); *R<sub>F</sub>* 0,40 et 0,52; méthanolyse alcaline (NaOMe) en 5-désoxy-D-ribo-hexose (*R<sub>F</sub>* 0,32, sur papier Whatman, irrigant acétate d'éthyle-pyridine–eau, 2:1:2, v/v); conversion en nucléoside **10**, p.f. (seul et en mélange) 180°.

*4-N-Acétyl-1-(2-O-acétyl-3,6-di-O-benzoyl-5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)-cytosine (10)*. — À une solution de **8** et **9** (477 mg, 0,87 mmol) dans le 1,2-dichloroéthane anhydre (50 mL), on ajoute du tétrachlorure stannique (0,4 mL, 3,48 mmol) et on agite pendant 20 min à température ambiante. On ajoute rapidement la *N*-acétylbis(triméthylsilyl)cytosine (358 mg, 0,87 mmol) en solution dans le 1,2-di-

chloroéthane. Après une nuit à température ambiante, on verse dans l'hydrogéné-carbonate de sodium aqueux saturé. On extrait au chloroforme et lave à l'eau, et on filtre la phase organique sur Kieselgur. On évapore à sec et purifie le produit par chromatographie (acétate d'éthyle), puis cristallisation dans l'éthanol (280 mg, 49%), p.f. 181–183°,  $[\alpha]_D^{20} + 5^\circ$  ( $c$  0,2, dichlorométhane);  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  217 ( $\epsilon$  26 000), 232 ( $\epsilon$  29 500), 282 ( $\epsilon$  6100), 298 ( $\epsilon$  6500), épaulement à 247 nm; r.m.n.:  $\delta$  2,02 (s, 3 H, OAc), 2,32 (s, NAc),  $\sim$ 2,40 (2 H-5'), 4,35–4,75 (4 H, H-3', -4', H<sub>2</sub>-6'), 5,70 (massif, 2 H, H-2', -4), 6,08 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  4,0 Hz, H-1'), 7,30–8,20 (12 H, aromatiques), 10,33 (s, 1 H, NH).

*Anal.* Calc. pour C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>: C, 61,20; H, 4,95; N, 7,65; O, 26,20. Trouvé: C, 61,01; H, 4,99; N, 7,66; O, 26,06.

*1-(5-Désoxy-β-D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (11).* — On dissout 10 (550 mg, 1 mmol) dans le méthylate de sodium 50mM dans le méthanol (20 mL) et on abandonne pendant une nuit à température ambiante. On fait passer la solution sur une colonne de Dowex 50 (H<sup>+</sup>) qui est lavée au méthanol, puis à l'eau. On élue ensuite le nucléoside par l'ammoniaque M. On évapore à sec et on obtient le nucléoside sous forme de mousse (250 mg, 96%), pure selon l'examen par c.c.m.:  $R_F$  0,47 (butanol-acide acétique-eau, 5:3:2, v/v), 0,51 (2-propanol-ammoniaque-eau, 7:1:2),  $[\alpha]_D^{20} + 59^\circ$  ( $c$  0,2, eau);  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  272 ( $\epsilon$  8300),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$  250 nm ( $\epsilon$  5900), épaulement à 230 ( $\epsilon$  7400),  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  (50mM) 278 ( $\epsilon$  12 000),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  (50mM) 242 ( $\epsilon$  1580), épaulement à 214 nm ( $\epsilon$  8500); dichroïsme circulaire (solution aqueuse):  $\theta_{218} - 10 400$ ,  $\theta_{271} + 12 600$  (pour la cytidine<sup>28</sup>:  $\theta_{220} - 11 300$ ,  $\theta_{271} + 12 700$ ); r.m.n. [60 MHz, D<sub>2</sub>O, 3-(triméthylsilyl)propane-1-sulfonate de sodium (TMPS)]:  $\delta$  2,10 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-5'), 3,70–4,50 (5 H, H-2', -3', -4', H<sub>2</sub>-6), 5,90 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3,5 Hz, H-1'), 6,08 (d, 1 H,  $J_{5,6}$  7,5 Hz, H-6), 7,68 (d, 1 H, H-5). Le nucléoside 11 a pu être recristallisé une fois, p.f. 116–117° (éthanol-éther), mais pas absolument pur.

*Anal.* Calc. pour C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 46,69; H, 5,88; N, 16,34. Trouvé: C, 46,02; H, 6,03; N, 15,92.

On obtient le picrate par dissolution dans une solution aqueuse à 1% d'acide picrique et filtration, p.f. 197° (eau).

*Anal.* Calc. pour C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>: C, 39,51; H, 3,73. Trouvé: C, 39,85; H, 3,97.

*1-(5-Désoxy-β-D-ribo-hexofuranosyl 6-phosphate)cytosine (12).* — À une solution d'homocytidine 11 (128 mg) dans le phosphate triéthylique (1,2 mL) on ajoute à 0° de l'oxychlorure de phosphore (0,2 mL). Après 2 h à température ambiante, on hydrolyse par l'eau glacée (1 mL) et on dépose sur une colonne (1 × 30 cm) de Dowex 50 (W-X-8, H<sup>+</sup>) 100–200 mesh). On élue à l'acide acétique 0,5M, on recueille et évapore les fractions absorbantes à 280 nm. Le monophosphate lyophilisé est une mousse (136 mg, 90%),  $[\alpha]_D^{20} + 52^\circ$  ( $c$  0,6 eau).

*Anal.* Calculé pour C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P: P, 9,2. Trouvé: P, 9,2.

Le phosphate 12 consomme un équivalent de periodate (dosage selon Avigad<sup>29</sup>).

*4-N-Acétyl-1-(5-désoxy-β-D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (14).* — À une suspension d'homocytidine 11 (260 mg, 1,01 mmol) dans l'éthanol absolu bouillant à reflux (20 mL), on ajoute progressivement de l'anhydride acétique (5 × 0,4 mL)

en 5 h. Après 1 h de reflux supplémentaire, puis refroidissement, on ajoute de l'éther (100 mL). On filtre après une nuit à 4° 14 (285 mg 94%), p.f. 165°,  $[\alpha]_D^{20} +77^\circ$  (c 0,2, eau).

*Anal.* Calc. pour  $C_{12}H_{17}N_3O_6$ : C, 48,16; H, 5,73; N, 14,04; O, 32,08. Trouvé: C, 47,98; H, 5,84; N, 13,85; O, 31,82.

*4-N-Acétyl-5-désoxy-(2,3-O-isopropylidène- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine (15).* — On agite pendant une nuit une solution de 14 (285 mg) dans l'acétone anhydre (30 mL) en présence d'acide *p*-toluènesulfonique anhydre (1,9 g). On verse goutte à goutte dans une suspension (en excès) de résine Dowex 1 (X-2,  $HCO_3^-$ , 50–100 mesh) dans l'eau (200 mL). On filtre et évapore le filtrat: mousse (290 mg, 90%), homogène en c.c.m. (chloroforme-méthanol, 9:1, v/v), p.f. 195–196° (acétate d'éthyle-éther),  $[\alpha]_D^{20} +37^\circ$  (c 0,5, dichlorométhane); r.m.n. (90 MHz):  $\delta$  1,31, 1,53 (2s, 3 H,  $CMe_2$ ), 2,00 (pseudo-q, 2 H, H-5', -5''), 2,23 (s, 3 H, NAc), 3,77 (2 H, H-6', -6''), 4,30 (q, 1 H,  $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 5$  Hz, H-4'), 4,77 (dd, 1 H,  $J_{2',3'} 6$  Hz, H-3'), 5,03 (dd, 1 H,  $J_{1',2'} 1$  Hz, H-2'), 5,68 (d, 1 H, H-1'), 7,45 (d, 1 H,  $J_{5,6} 7$  Hz, H-5), 7,75 (d, 1 H, H-6), 10,25 (s, 1 H, NH).

*Anal.* Calc. pour  $C_{15}H_{21}N_3O_6$ : C, 53,09; H, 6,24; N, 12,39; O, 28,29. Trouvé: C, 53,24; H, 6,30; N, 12,36; O, 28,17.

*4-N-Acétyl-1-(5-désoxy-2,3-O-isopropylidène- $\beta$ -D-ribo-hexodialdo-1,5-furanosyl)cytosine (16).* — On prépare une solution de pyridine (0,8 mL) et d'acide trifluoracétique (0,4 mL) dans le diméthyl sulfoxyde (10 mL) (A) et une solution de dicyclohexylcarbodiimide (7,25 g) dans le diméthyl sulfoxyde (7,5 mL) et le benzène (2,5 mL) (B). Au produit 15 (290 mg), dissous dans A (0,8 mL), on ajoute le mélange B (1,3 mL). Après une nuit à 20°, on ajoute de l'eau (10 mL), on attend 30 min et on filtre la *N,N*-dicyclohexylurée. On évapore à sec sous vide élevé, et on extrait la *N,N*-dicyclohexylurée restante à l'acétate d'éthyle. On peut estimer un rendement voisin de 75% en aldéhyde d'après la c.c.m. (acétate d'éthyle-acétonitrile, 17:3, v/v), par examen en lumière u.v. ou pulvérisation d'une solution sulfurique de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. Par chromatographie sur une colonne de gel de silice (même éluant), on obtient un échantillon homogène en c.c.m. (100 mg, 34%);  $\lambda_{max}^{EtOH} 214$  ( $\epsilon$  12 000), 249 ( $\epsilon$  11 300), 294 ( $\epsilon$  4600),  $\lambda_{min}^{EtOH} 224$  ( $\epsilon$  3530), 272 nm ( $\epsilon$  2820); r.m.n. (90 MHz):  $\delta$  1,31, 1,53 (2 s,  $2 \times 3$  H,  $CMe_2$ ), 2,28 (s, 3 H, NAc), 3,0 (2 H, m, H<sub>2</sub>-5'), 4,6 (1 H, H-4'), 4,9 (1 H, H-3'), 5,25 (q, 1 H,  $J_{1',2'} 1$  Hz,  $J_{2',3'} 6$  Hz, H-2'), 5,60 (d, 1 H, H-1'), 7,45 (d, 1 H,  $J_{5,6} 7$  Hz, H-5), 7,7 (d, 1 H, H-6), 9,75 (d, 1 H,  $J_{5',6'} 5$  Hz, H-6').

*1-(5-Désoxy- $\beta$ -D-[6-<sup>3</sup>H]ribo-hexofuranosyl)cytosine (17).* — L'acétal 15 (10 mg, 27  $\mu$ mol) est oxydé comme décrit ci-dessus par les mélanges A (70  $\mu$ L) et B (40  $\mu$ L). Après une nuit à 20°, on ajoute 2 gouttes d'eau, abandonne 30 min, reprend à l'acétate d'éthyle ( $3 \times 1$  mL), filtre la *N,N*-dicyclohexylurée et évapore la solution. On dissout dans l'alcool ( $\sim 4$  mL) et on dose le nucléoside présent par u.v. Une portion aliquote (0,26 mL, 2  $\mu$ mol de nucléoside) est traitée par le borohydrure de sodium tritié (1  $\mu$ mol, 10 mCi) dans l'eau ( $5 \times 0,2$  mL). On attend une nuit, on ajoute de l'hydroxyde de sodium 0,1M et on attend une journée. On ajoute une solution aqueuse

à 90% d'acide trifluoracétique (1 mL). Après 30 min on évapore à sec, rajoute de l'eau (0,5 mL) et évapore à sec à nouveau. On dépose sur une colonne (1 × 10 cm) de résine Dowex 50 (W-X-8, H<sup>+</sup>, 100–200 mesh) et on lave à l'eau jusqu'à ce que l'activité de l'effluent soit constante et presque nulle (total élué 2,9 mCi). On élue alors l'homocytidine tritiée **17** par l'ammoniaque M (6,9 mCi).

L'échantillon est purifié par trois chromatographies sur papier préparatives, consécutives, avec les systèmes suivants: 1-butanol-éthanol-eau, 4:1:2; 2-propanol-ammoniaque-eau, 7:1:2; acétate d'éthyl-2-propanol-eau, 3:3:2, tous v/v), sans baisse d'activité spécifique. On recueille 1,28  $\mu\text{mol}$  de **17**, d'activité 2,3 Ci/mmol.

*1-(5-Désoxy- $\beta$ -D-[6-<sup>3</sup>H]-ribo-hexofuranosyl 6-phosphate)cytosine (6'-H-12).* — On dilue **17** avec de l'homocytidine froide jusqu'à une activité finale de 50 mCi par mmol. On transfère le nucléoside (5  $\mu\text{mol}$ ) dans un tube à centrifugeuse, dissous dans 2 gouttes d'eau et lyophilise. On refroidit à 0° une solution d'oxychlorure de phosphore (1 mL) dans le phosphate triéthylique (5,5 mL). On ajoute 13  $\mu\text{L}$  de cette solution au nucléoside lyophilisé refroidi à 0°, et on agite pendant 1 h à 0°. On hydrolyse à l'eau glacée (0,5 mL), neutralise avec une goutte d'ammoniaque concentrée et évapore à sec. On dissout dans l'eau (0,5 mL) et dépose sur une colonne (1 × 10 cm) de Dowex 50 (W-X-2, H<sup>+</sup>, 200–400 mesh). Le phosphate tritié est élué en un seul pic (3,1  $\mu\text{mol}$ , 52 mCi/mmol). On vérifie l'absence d'homocytidine par chromatographie sur papier [éluant: acétate d'ammonium 5M (20 mL)-tétraborate de sodium saturé (80 mL)-éthanol (220 mL)-EDTA 0,5M (0,5 mL),  $R_F \sim 0$ ]. On conserve à -30° en solution aqueuse (30  $\mu\text{Ci/ml}$ ).

*1-(5-Désoxy- $\beta$ -D-[6-<sup>3</sup>H]-ribo-hexofuranosyl-6-trihydrogénodiphosphate)cytosine, (6'-<sup>3</sup>H-13).* — Au monophosphate décrit ci-dessus, forme acide (20  $\mu\text{mol}$ ) on ajoute 1,1 équiv. d'hydroxyde de méthyl(trioctyl)ammonium dans le méthanol (0,1 mL). On chauffe pendant 15 min à 80°; la dissolution est alors complète. On évapore et sèche le sel résiduel par 4 coévaporations successives avec le *N,N*-diméthylformamide anhydre. On reprend dans le même solvant (50  $\mu\text{L}$ ) et ajoute le diphénylchlorophosphonate (7  $\mu\text{L}$ ), puis immédiatement du *p*-dioxane anhydre (0,13 mL) et de la tributylamine (6  $\mu\text{L}$ ). Après 2 h à 20°, on ajoute de l'éther sec (0,6 mL) et agite fortement. On élimine la phase étherée et coévapore le résidu avec du *p*-dioxane sec. On ajoute alors du phosphate de tributylammonium (40 mmol) dans la pyridine anhydre (70  $\mu\text{L}$ ). Après une nuit à température ambiante, on évapore le solvant, on précipite par addition d'éther, on dissout le précipité dans un mélange eau-alcool 1:1 et on ajuste le pH à 4 avec de l'acide chlorhydrique. Après 2 h, on amène au pH 2,5 et on précipite avec une solution saturée de chlorure de calcium et un excès d'alcool. On centrifuge le précipité, on le dissout dans un peu d'eau et le dépose sur une colonne (1 × 13 cm) de résine Dowex 1 (X-2, Cl<sup>-</sup>, 100–200 mesh). On lave à l'eau, puis à l'acide chlorhydrique mM, et enfin on élue le diphosphate par une solution de chlorure de lithium 10mM dans l'acide chlorhydrique mM. On neutralise par l'hydroxyde de lithium. La solution contient 2,6  $\mu\text{mol}$  (13%) d'activité spécifique 40,5 Ci/mol. On concentre à 0,5 mL et on enlève les sels minéraux par passage sur une colonne (1 × 85 cm) de Biogel P-2 (100–200 mesh), en éluant à l'eau. Le comportement

chromatographique de 6'- $^3\text{H}$ -13 est identique à celui de cytidine diphosphate, sur résine échangeur Dowex 1 (X-2,  $\text{Cl}^-$ ) (éluant,  $\text{LiCl}$  mM dans  $\text{HCl}$  aqueux mM), sur plaque de cellulose PEI (éluant,  $\text{NaCl}$  2M-4%  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1:2, v/v), et sur papier (éluant, 2-méthylpropanol-acide formique-eau, 3:2:1, v/v). On conserve le produit dans l'eau à  $-30^\circ$  (20  $\mu\text{Ci/ml}$ ).

*Méthyl-2,6-di-O-benzoyl-* (18) et *méthyl-3,6-di-O-benzoyl-5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranoside* (19). — On fait bouillir à reflux une solution de 6 (4 g) dans le méthanol anhydre (20 mL) en présence de résine Dowex 50 (W X-8,  $\text{H}^+$ , 100-200 mesh, 0,5 g) séchée jusqu'à ce que la c.c.m. (éther-éther de pétrole, 1:1, v/v) indique la disparition du produit de départ. On filtre et évapore à sec la solution. Le résidu (3,9 g, 100%) ne contient (c.c.m.) que les isomères 18 et 19, p. éb. (0,02 mm)  $230^\circ$ .

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$ : C, 65,27; H, 5,74; O, 28,99. Trouvé: C, 65,02; H, 5,88; O, 28,92.

*Méthyl-2,3,6-tri-O-benzoyl-5-désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranoside* (20). — La benzylation (pyridine) du mélange de 18 et 19 donne un produit unique en c.c.m. (éther-éther de pétrole, 1:1), v/v, p.f.  $68-69^\circ$  (hexane); r.m.n.:  $\delta$  2,30 (q, 2 H,  $\text{H}_2-5$ ), 3,45 (s, 2 H, Me), 4,50 (m, 3 H, H-4,  $\text{H}_2-6$ ), 5,05 (s, 1 H, H-1), 5,50 (m, 2 H, H-2, -3), 7,0-8,4 (H aromatiques).

*Méthyl-3,6-di-O-benzoyl-2-chloro-2,5-didésoxy- $\alpha$ -D-arabino-hexofuranoside* (21) et *méthyl-2,6-di-O-benzoyl-3-chloro-3,6-didésoxy- $\beta$ -D-xylo-hexofuranoside* (23). — On fait bouillir pendant une nuit à reflux une solution du mélange de 18 et 19 décrit ci-dessus (3,7 g) et de triphénylphosphine (6,4 g) dans le tétrachlorure de carbone (150 mL). Après filtration, on évapore à sec, reprend à l'éther, et filtre à nouveau. La solution filtrée donne, par évaporation à sec, le mélange de 21 et 23 (3 g) directement utilisable à l'étape suivante. La chromatographie (éther-éther de pétrole, 1:2, v/v) sépare d'abord 21, p. éb. (0,02 mm)  $188^\circ$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +46^\circ$  (c 0,7, dichlorométhane); r.m.n. ( $\text{CCl}_4$ ):  $\delta$  2,30 (m, 2 H,  $\text{H}_2-5$ ), 3,40 (s, 3 H, OMe), 4,23 (d, 1 H,  $J_{2,3}$  1,5 Hz, H-2), 4,4-4,7 (m, 3 H, H-4,  $\text{H}_2-6$ ), 5,08 (s, 1 H, H-1), 5,30 (q, 1 H,  $J_{3,4}$  4,5 Hz, H-3), 7,3-8,0 (10 H aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_6$ : C, 62,30; H, 5,22; Cl, 8,75; O, 23,71. Trouvé: C, 62,38; H, 5,25; Cl, 9,02; O, 23,59.

La poursuite de l'éluion donne 23, p. éb. (0,02 mm)  $200^\circ$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +27^\circ$  (c 0,9, dichlorométhane); r.m.n. ( $\text{CCl}_4$ ):  $\delta$  2,20 (q, 2 H, H-5), 3,42 (s, 3 H, OMe), 4,4 (m, 4 H, H-3, -4,  $\text{H}_2-6$ ), 4,97 (s, 1 H, H-1), 5,40 (s, 1 H, H-2), 7,5-8,2 (10 H aromatiques).

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_6$ : C, 62,30; H, 5,22. Trouvé: C, 62,30; H, 5,20.

*Méthyl-3,6-di-O-benzoyl-2,5-didésoxy- $\alpha$ -D-érythro-hexofuranoside* (22) et *méthyl-2,6-di-O-benzoyl-3,5-didésoxy- $\alpha$ -D-érythro-hexofuranoside* (24). — On fait bouillir à reflux pendant 0,5 h une solution du mélange des chlorures 21 et 23 (3 g), de tributylstannane (8 mL) et d' $\alpha,\alpha'$ -azobis(isobutyronitrile) (0,5 g) dans le toluène (200 mL). La c.c.m. (éther-éther de pétrole, 1:1 v/v) indique la disparition des chlorures de départ. On évapore à sec. La chromatographie (oxyde d'isopropyle-éther de pétrole, 1:1, v/v) du résidu sépare, après une fraction non identifiée (0,4 g), le furanose 24 (0,55 g, 15% par rapport à 6), p.f.  $58-60^\circ$  (cyclohexane),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -4^\circ$

(*c* 0,5, dichlorométhane); r.m.n. (240 MHz, CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  2,09 (m, 2 H, 2 H-5), 2,29 (m, 2 H, H-3), 3,41 (s, 3 H, OMe), 4,49 (m, 3 H, H-4, H<sub>2</sub>-6), 4,93 (s, 1 H, H-1), 5,31 (d, 1 H, H-2), 7,37–8,0 (H aromatiques).

*Anal.* Calc. pour C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>: C, 68,09; H, 5,99; O, 25,92. Trouvé: C, 68,10; H, 6,15; O, 25,80.

On élue ensuite un mélange non identifié (0,27 g), puis le furanose **22** pur (0,83 g, 23% par rapport à **6**), p. éb. (0,02 mm) 193°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +95° (*c* 0,4, dichlorométhane); r.m.n. (240 MHz, CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  2,24 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-5), 2,48 (m, 2 H, 2 H-2), 3,36 (s, 3 H, OMe), 4,24 (m, 1 H, H-4), 4,45 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-6), 5,02 (d, 1 H, H-1), 5,12 (m, 1 H, H-3), 7,40–7,92 (H aromatiques).

*Anal.* Calc. pour C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>: C, 68,09; H, 5,99; O, 25,92. Trouvé: C, 68,10; H, 5,81; O, 25,68.

**4-N-Acétyle-1-(3,6-di-O-benzoyl-2,5-didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine (25).** — À une solution du furanose **22** (0,35 g, 0,95 mmol) sec dans le 1,2-dichloréthane (15 mL) et l'acétonitrile (1,2 mL) anhydres, on ajoute une solution à 14% (m/v) de *N*-acétylbis(triméthylsilyl)cytosine dans le 1,2-dichloroéthane (2,1 mL, 1 équiv.), puis une solution à 30% (v/v) de tétrachlorure stannique dans le 1,2-dichloroéthane (0,4 mL, 1 équiv.). Après une nuit à 20°, on verse dans l'hydrogénéocarbonate de sodium aqueux, on filtre et extrait la phase aqueuse avec du 1,2-dichloroéthane. La chromatographie (acétate d'éthyle–2-propanol, 9:1, v/v) de l'extrait donne d'abord le furanoside **22** (73 mg), puis le  $\beta$ -nucléoside protégé **25** (131 mg, 28%), p.f. 140–141° (éthanol), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +49,4° (*c*, 0,85, éthanol);  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  218 ( $\epsilon$  2800), 230 ( $\epsilon$  30 600), 282 ( $\epsilon$  6400), 300 ( $\epsilon$  7500), épaulement à 248 nm; r.m.n. (90 MHz):  $\delta$  6,30 pseudo-t, 1 H, H-1), 9,6 (s, 1 H, NH).

*Anal.* Calc. pour C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: C, 63,53; H, 5,13; N, 8,55; O, 22,79. Trouvé: C, 63,77; H, 5,22; N, 8,48; O, 22,94.

**4-N-Acétyle-1-(3,6-di-O-benzoyl-2,5-didésoxy- $\alpha$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine (28).** — La poursuite de la chromatographie décrite ci-dessus donne, après une fraction mixte (65 mg), l' $\alpha$ -nucléoside protégé **28** (94 mg, 20%), p.f. 196° (éthanol), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –62,4° (*c* 0,8, éthanol);  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  218 ( $\epsilon$  27 600), 230 ( $\epsilon$  29 600), 274 ( $\epsilon$  5200), 282 ( $\epsilon$  5800), 300 nm ( $\epsilon$  7500), épaulement à 248 nm; r.m.n. (90 MHz):  $\delta$  2,30 (s, 3 H, NAc), 6,25 (q du 2ème ordre, 1 H, H-1'), 10,07 (s, 1 H, NH).

*Anal.* Calc. pour C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: C, 63,53; H, 5,13; N, 8,55; O, 22,79. Trouvé: C, 63,77; H, 5,22; N, 8,48; O, 22,94.

**1-(2,5-Didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine (26).** — On laisse pendant une nuit à 20° une solution de **25** (83 mg, 0,17 mmol) dans le méthylate de sodium 0,05M dans le méthanol (5 ml), puis on la filtre par une colonne de Dowex 50 (H<sup>+</sup>), qui est lavée au méthanol, puis à l'eau. On élue enfin le nucléoside par l'ammoniaque M. On évapore à sec: cristaux (40 mg, 98%), p.f. 158–159° (éthanol), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +56° (*c* 1,55, eau);  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  272 ( $\epsilon$  8800), épaulement 228 ( $\epsilon$  7600),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$  250 ( $\epsilon$  6000),  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  50mm 214 ( $\epsilon$  14 200), 280 ( $\epsilon$  12 700),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  (50mm) 248 nm ( $\epsilon$  38 000); r.m.n. (90 MHz, D<sub>2</sub>O, TMPS):  $\delta$  1,95 (2 H, pseudo-q,  $J_{4',5'} = J_{5',6'} = 3,5$  Hz, H-5'), 2,30 (m, 2 H,

2 H-2'), 3,80 (t, 2 H, H<sub>2</sub>-6'), 4,0-4,5 (m, 2 H, H-3', H-4'), 6,07 (d, 1 H, J<sub>5,6</sub> 8 Hz, H-5), 6,25 (t, 1 H, J<sub>1',2'</sub> + J<sub>1',2''</sub> 13,5 Hz, H-1'), 7,70 (d, 1 H, H-6).

*Anal.* Calc. pour C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 49,78; H, 6,27; N, 17,42; O, 26,53. Trouvé: C, 49,63; H, 6,35; N, 17,14; O, 26,81.

*1-(2,5-Didésoxy- $\alpha$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine (29).* — On procède comme pour l'anomère  $\beta$  (26). Mousse après lyophilisation (33 mg, 82%),  $[\alpha]_D^{20}$   $-20^\circ$  (c 1,25 eau);  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  272 ( $\epsilon$  8100) avec épaulement à 228,  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$  250 nm ( $\epsilon$  4700),  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  (50mm) 214 ( $\epsilon$  10 000), 280 ( $\epsilon$  12 800),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$  (50mm) 248 nm ( $\epsilon$  3100); r.m.n. (90 MHz, D<sub>2</sub>O, TMPS): 1,8 (pseudo-q, 2 H, J<sub>5',6'</sub> = J<sub>4',5'</sub> = 3,5 Hz, H<sub>2</sub>-5'), 2,2 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-2'), 3,75 (t, 2 H, H<sub>2</sub>-6'), 4,2-4,6 (m, 2 H, H-4', -3'), 6,1 (q, 1 H, largeur 10,5 Hz, H-1'), 6,05 (d, 1 H, J<sub>5,6</sub> 8 Hz, H-5), 7,78 (d, 1 H, H-6).

*Picrate*, p.f. 171°.

*Anal.* Calc. pour C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>: C, 40,85; H, 3,85; N, 17,87; O, 37,41. Trouvé: C, 40,66; H, 3,95; N, 18,01; O, 37,25.

*1-(2,5-Didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl 6-phosphate)cytosine (27).* — À une solution refroidie à 0° du nucléoside 26 (120 mg, 0,5 mmol) dans le phosphate tri-éthyle (1,2 mL) on ajoute POCl<sub>3</sub> (0,2 mL). Après 2 h à 0°, on hydrolyse par 1 mL d'eau glacée et on chromatographie sur colonne de Dowex 50 (W-X8, H<sup>+</sup>, 100-200 mesh) avec élution par l'acide acétique aqueux 0,5M. On obtient le phosphate 27 qui cristallise par évaporation, p.f. 205-206°,  $[\alpha]_D^{20}$  +72° (c 0,5 eau);  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  275 ( $\epsilon$  11 800),  $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$  245 ( $\epsilon$  4700).

*Anal.* Calc. pour C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P·H<sub>2</sub>O: P, 9,1. Trouvé: P, 9,0.

*Préparation des extraits enzymatiques.* — La source d'enzyme est l'hépatome de Zajdela<sup>25</sup> tumeur du rat à croissance ascitique, facilement transplantable par transmission intrapéritonéale, et comparable par sa croissance rapide et son caractère stable (950ème passage) à l'hépatome de Novikoff, variante ascitique. La tumeur d'origine est un hépatome provoqué par l'administration chronique de diméthyl-aminobenzène.

Le liquide ascitique est soutiré du rat 6 jours après l'injection intrapéritonéale. On centrifuge à 800 rev./min. pendant 5 min. à 0° et on lave les cellules avec une solution de chlorure de sodium à 9‰. On centrifuge alors à 5000g pendant 5 min. Les cellules (6 mL) sont suspendues dans 1,5 vol. d'eau distillée, broyées avec un appareil de Potter-Elvehjem pendant 5 min, et centrifugées à 105 000g pendant 45 min. Le liquide surnageant est pipeté et congelé dans l'azote liquide.

Juste avant l'emploi, l'extrait est dialysé pendant 2 h contre du Tris 0,02M, pH 6,5, contenant du mercaptoéthanol à la conc. mM et le pH du dialysat est ajusté à 7 avec l'hydroxyde de sodium 0,2M.

*Essais enzymatiques.* — Les concentrations pour un volume total de 0,12 mL de milieu sont: substrat 0,4mM, MgCl<sub>2</sub> 4,2mM, FeCl<sub>3</sub> 25 $\mu$ M, ATP 6,25mM, NADPH 1,25mM, KF 8,3mM, Tris-HCl (pH 8) 8,3mM, extrait 80  $\mu$ L. L'incubation dure 30 min à 37°.

Les protéines sont précipitées par 0,1 mL d'acide perchlorique M, puis après addition d'1  $\mu$ mol de désoxynucléotide entraîneur, la solution est plongée dans un

bain-marie bouillant. Au bout de 10 min environ, les liaisons diphosphates sont hydrolysées et la solution acide refroidie est neutralisée par l'hydroxyde de potassium 4M en présence d'indicateur Rouge de phénol. Le perchlorate de potassium précipite à 0° pendant ~30 min. Après centrifugation, le liquide surnageant est déposé sur une colonne (0,9 × 25 cm) de Dowex 50 (W-X2, H<sup>+</sup>, 200–400 mesh). Les nucléotides monophosphates sont élués par l'acide acétique 0,2M. L'élué est contrôlé par mesure de l'absorption u.v. à 280 nm sur des fractions d'environ 2,5 mL. On constate la superposition des courbes d'absorption u.v. et de radioactivité. Les fractions correspondant au désoxynucléotide sont collectées et, après concentration, déposées sur plaque de cellulose PEI (élué avec LiCl 2M–H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4%, 1:2, v/v). La zone correspondant au désoxynucléotide est découpée, lavée au méthanol sec et éluée à l'acide acétique M. On effectue alors les mesures de radioactivité et d'absorption u.v. correspondantes.

#### REMERCIEMENTS

La Ligue Nationale Française contre le Cancer nous a apporté son aide matérielle et accordé une bourse à l'un d'entre nous (G. de S.).

#### RÉFÉRENCES

- 1 P. REICHARD, *Eur. J. Biochem.*, 3 (1968) 259–266.
- 2 H. P. C. HOGENKAMP, *Struct. Bonaing (Berlin)*, 20 (1974) 24–58.
- 3 L. THELANDER, *J. Biol. Chem.*, 149 (1974) 4858–4862.
- 4 C. AUGÉ, S. DAVID ET F. ZAJDELA, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 275 (1972) 2187–2190.
- 5 S. DAVID ET C. AUGÉ, *Carbohydr. Res.*, 28 (1973) 125–128; J. M. ROBINS ET M. MACCOSS, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 4660–4666.
- 6 U. VON DÖBELN ET F. ECKSTEIN, *Eur. J. Biochem.*, 43 (1974) 215–220.
- 7 J. P. VERHEYDEN ET J. G. MOFFATT, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 1236–1241.
- 8 H. FOLLMANN ET H. P. C. HOGENKAMP, *Biochemistry*, 10 (1971) 186–192.
- 9 L. THELANDER, B. LARSSON, J. HOBBS ET F. ECKSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 251 (1976) 1398–1405.
- 10 R. L. SUHADOLNIK, S. I. FINKEL ET B. M. CHASSY, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3532–3537; B. M. CHASSY ET R. L. SUHADOLNIK, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3538–3541.
- 11 K. J. RYAN, H. ARZOUMANIAN, E. M. ACTON ET L. GOODMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 2503–2508.
- 12 S. DAVID ET G. DE SENNYEY, *C.R. Acad. Sci., Ser. C*, 279 (1974) 651–654; *ibid.*, 288 (1976) 21–23.
- 13 D. C. BAKER, D. HORTON ET C. G. TINDALL JR., *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 192–197.
- 14 W. J. CONSIDINE, *J. Organomet. Chem.*, 5 (1966) 263–266.
- 15 R. C. CHALK, D. H. BALL ET L. LONG, JR., *Carbohydr. Res.*, 20 (1971) 151–164.
- 16 U. NIEDBALLA ET H. VORBRÜGGEN, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 9 (1970) 461–462.
- 17 M. YOSHIKAWA, T. KATO ET I. TAKENISHI, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 42 (1969) 3505–3508.
- 18 M. MICHELSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1964) 1–13.
- 19 K. E. PFITZNER ET J. G. MOFFATT, *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (1965) 5670–5678.
- 20 J. B. LEE ET T. J. NOLAN, *Can. J. Chem.*, 44 (1966) 1331–1334.
- 21 G. RITZMANN, R. S. KLEIN, D. H. HOLLENBERG ET J. J. FOX, *Carbohydr. Res.*, 39 (1975) 227–236.
- 22 U. NIEDBALLA ET H. VORBRÜGGEN, *J. Org. Chem.*, 39 (1974) 3654–3660.
- 23 E. C. MOORE, *Methods Enzymol.*, 12A (1967) 155–164.
- 24 K. RANDEATH ET E. RANDEATH, *Methods Enzymol.*, 12A (1967) 323–347.
- 25 F. ZAJDELA, *Colloq. Fr.-Sov., Quelques problèmes posés par la cellule cancéreuse*, Gauthier-Villars, Paris, 1964.
- 26 H. FOLLMANN, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 13 (1974) 569–579.

- 27 T. NAKA, T. HASHIZUME ET M. NISHIMURA. *Tetrahedron Lett.*, (1971) 95-98.
- 28 D. W. MILES, W. H. INSKEEP, M. J. ROBINS, M. W. WINKLEY, R. K. ROBINS ET H. EYRING, *J. Am. Chem. Soc.*, 91 (1969) 831-838.
- 29 G. AVIGAD, *Carbohydr. Res.*, 11 (1969) 119-123.