

SYNTHÈSE DE LA 5- β -D-RIBOFURANOSYLCYTOSINE (*PSEUDO*-CYTIDINE) ET DE SON ANOMÈRE α

SERGE DAVID ET A. LUBINEAU

Laboratoire de Chimie des Composés Biologiques, Bât. 420, Université de Paris-Sud,
91400-Orsay (France)

(Reçu le 5 octobre 1972; accepté le 15 novembre 1972)

ABSTRACT

The dilithio derivative of 2,4-di-*O,N*-trimethylsilylcytosine was condensed with 2,4:3,5-di-*O*-benzylidene-D-ribose to give a mixture of the protected, epimer at C-1' pentitols **5** and **6**; in addition, a compound substituted at N-3 or N-4, whose structure was not elucidated, was also obtained. The epimers were treated with acid to give 4-amino-2-hydroxy-5-(β - and α -D-ribofuranosyl)pyrimidine (**10** and **12**). The n.m.r. spectrum of **10** corresponds predominantly to the C-2' *endo* structure. On the other hand, the n.m.r. spectrum of **12** presents couplings identical with those of the " α -*pseudo*-uridine". On nitric deamination, each isomer gave in a highly preponderant yield the corresponding *pseudo*-uridine at C-1'.

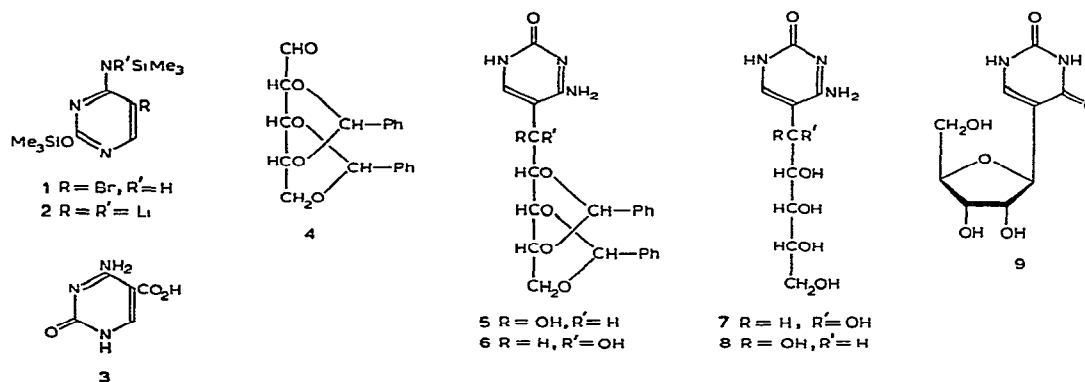
SOMMAIRE

Le dérivé dilithié de la 2,4-di-*O,N*-triméthylsilylcytosine est condensé avec le 2,4:3,5-di-*O*-benzylidène-D-ribose. Ceci donne à côté d'un composé substitué sur N-3 ou N-4, dont la structure exacte n'a pas été élucidée, un mélange de pentitols protégés **5** et **6**, épimères sur C-1', qui sont traités par l'acide pour donner les 4-amino-2-hydroxy-5-(β - et α -D-ribofuranosyl)pyrimidine (**10** et **12**). Le spectre de r.m.n. de **10** correspond à une forte prédominance de la structure C-2' *endo*; par contre, le spectre de r.m.n. de **12** présente les mêmes couplages que celui de l' α -*pseudo*-uridine». Par désamination nitreuse, chaque isomère donne, en grand excès, la *pseudo*-uridine de même configuration sur C-1'.

INTRODUCTION

La *pseudo*-uridine (**9**, 5- β -D-ribofuranosyluracile), un C-nucléoside, est, à l'état de phosphate, le plus abondant des nucléotides modifiés des acides nucléiques. Il y a plus d'une molécule d'acide *pseudo*-uridylique pour vingt nucléotides dans certains acides ribonucléiques de transfert, et on le rencontre aussi parfois dans l'acide ribonucléique ribosomal¹. On a récemment² examiné très en détail la synthèse de **9**. L'analogue **10**, dérivé de la cytosine, était encore inconnu—sauf peut-être à l'état d'acétal, en solution, où il avait été obtenu comme produit de transformation

de la *pseudo*-uridine, et caractérisé seulement par des données en spectrophotométrie ultra-violettes³. Notre présente synthèse a déjà été rapportée sous une forme abrégée⁴.

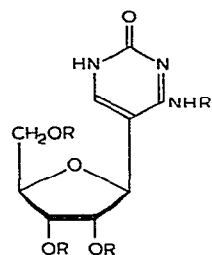


DISCUSSION

Nous sommes partis de la 5-bromocytosine, que nous n'avons pas pu acétyleter par l'anhydride acétique ni par le chlorure d'acétyle, seuls ou en présence de pyridine, sans doute en raison de son acidité (pK_a 3,1) et de l'encombrement dû à l'atome de brome. La silylation par l'hexaméthylidisilazane en présence de quantités catalytiques de triméthylchlorosilane donne une huile distillable (81%), qui d'après le spectre de r.m.n., contient deux groupements triméthylsilyles. Nous admettons que l'un d'eux est sur l'atome d'oxygène (structure 1) en raison de la préférence connue du silicium pour cette substitution. Le contrôle de la lithiation du dérivé 1 par le butyllithium, dans l'éther à -40° , indique que les substitutions des atomes de brome et d'hydrogène lié à l'atome d'azote, procèdent à des vitesses comparables. Il faut donc utiliser deux équivalents de butyllithium. Nous ne connaissons pas la situation exacte de l'atome de lithium lié à l'atome d'azote, et la structure 2 ne représente qu'une possibilité parmi d'autres. Le second atome de lithium est lié en C-5 : la carboxylation du mélange réactionnel donne comme seul produit de substitution la 4-amino-5-carboxy-2-hydroxypyrimidine (3).

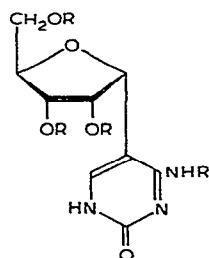
Au cours de la préparation du 2,4:3,5-di-*O*-benzylidène-D-ribose, 4, selon Zinner⁵, nous avons obtenu un rendement bien meilleur avec le chlorure de zinc qu'avec le chlorure d'hydrogène. Après réaction de l'aldéhyde 4 sur le dérivé dilithié 2, nous avons isolé trois produits solubles dans le chloroforme et séparables sur colonne de gel de silice : les polyols protégés 5 (11 %) et 6 (14 %) et un composé p.f. 197° , (19 %) auquel nous attribuons provisoirement une des structures 14 ou 15. Il restait dans la phase aqueuse de la cytosine (30%), et des traces de 5-bromocytosine.

Les formules provisoires 14 ou 15 sont compatibles avec la composition et le spectre u.v. (λ_{max} 299 nm, ϵ 19 000), qui ne peut pas être celui d'une cytosine substituée sans conjugaison sur l'un des atomes N-1, C-5, C-6 ou N-4. Il ne s'agit pas de l'hydrate d'une base de Schiff sur N-4 puisque le produit est obtenu par recristallisation dans



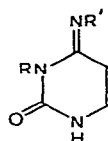
10 R = H

11 R = Bz



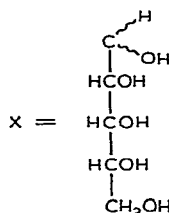
12 R = H

13 R = Bz



14 R = X, R' = H

15 R = H, R' = X



le méthanol. L'hydrolyse acide donne de la cytosine et un grand nombre de produits de décomposition où le D-ribose n'a pas été reconnu. La désamination nitreuse donne de l'uracile. Il est logique d'attendre une structure telle que **14** ou **15** de l'attaque du groupe carbonyle de **4** par la partie $(N=C-NSiMe_3)^- Li^+$ de la cytosine métallée. Le caractère électro-attracteur de C-1 du D-ribose, et une chélation éventuelle, peuvent contribuer à la stabiliser.

On a donné les orientations respectives D-*altro* et D-*allo* aux composés **5** ($\alpha_D^{25} -65^\circ$) et **6** ($\alpha_D^{25} +38^\circ$) en application de la règle générale (voir références citées dans la Réf. 2) selon laquelle, pour un polyol lié à un hétérocycle, α_D est positif si le groupe hydroxyle sur C-1' se présente à droite en projection Fischer, négatif dans l'autre cas. L'allure au départ (de 589 à 436 nm) de la dispersion rotatoire optique confirme notre attribution.

L'hydrolyse des composés **5** et **6** séparés isomérise de nouveau C-1', de sorte que nous l'avons pratiquée sur le mélange **5**+**6**, avec l'acide acétique aqueux à 80 %, pendant 1 h à 100°. Il n'y a pas de cyclisation dans ces conditions. Les polyols **7** et **8** sont élués en deux zones distinctes d'une colonne de Dowex-50 (H^+). Les spectres u.v., indiscernables, présentent l'effet bathochrome en milieu alcalin qui indique que N-1 est libre. Ces polyols réduisent tous deux quatre moles de periodate (Tableau 1). Leurs peracétates sont amorphes et décomposés par le gel de silice. Néanmoins on observe distinctement sur le spectre de r.m.n. des préparations brutes les six signaux caractéristiques des groupes O-acétyles et N-acétyles. Nous attribuons la configuration D-*allo* (**7**) au polyol le moins basique ($\alpha_D^{25} 0^\circ$), dont le dichroïsme circulaire est positif, et la configuration D-*altro* (**8**) au polyol le plus basique ($\alpha_D^{25} -39^\circ$) dont le dichroïsme circulaire est négatif. Ce dernier composé donne par désamination nitreuse un mélange (34 %), analysé selon Cohn⁶, de *pseudo*-uridine (**9**, 92 %) et d'« α -*pseudo*-uridine » (8 %). Apparemment l'analogue 4-hydroxy de **8** se forme d'abord, mais on

sait qu'il se cyclise de façon stéréosélective en *pseudo*-uridine en milieu légèrement acide². La stéréosélectivité est bien moindre en série *D-allo*; dans les mêmes conditions, l'anomère α domine cependant².

Par chauffage pendant une heure à 100° dans les solutions molaires d'acide chlorhydrique, les dérivés **7** et **8** se cyclisent, de même que **5** et **6**, qui perdent d'abord leurs groupements benzylidènes. Le dérivé *D-altro* (**6**) réagit trois fois plus vite que l'isomère *D-allo* (**5**). Dans le meilleur cas, la réaction est environ 50 fois plus lente que la cyclisation analogue dans la série de l'uracile, telle qu'elle a été décrite dans des conditions comparables². Ce ralentissement, dû évidemment à l'acquisition d'une charge positive par la cytosine dans le milieu, est néanmoins insuffisant pour orienter la réaction vers une cyclisation C-2'-O-5' qui a été observée dans d'autres cas⁷. On peut séparer deux isomères **10** et **11** dans les mêmes conditions que **7** et **8** et on peut directement les obtenir, avec un faible rendement, respectivement 4 % et 2,7 %, par hydrolyse de l'extrait chloroformique brut de la réaction du composé lithié.

TABLEAU I

EQUIVALENTS DE PERIODATE CONSOMMÉS

	Durée (min): 5	15	30	60	600	960
Composé 8	1,9	2,4		3,1	3,9	4,0
Composé 10	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9	0,9
Cytidine	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9

Nous attribuons la structure **10** au composé le plus basique, p.f. 161°, bien que sa composition soit la même que celle de **7** ou **8**, et la structure **12** au composé le moins basique, p.f. 202°, poudre amorphe non purifiable de composition intermédiaire. Il s'agit en effet de monohydrates stables : chacun des deux donne un dérivé (*N*-benzoyl-tri-*O*-benzoyle) cristallisé ayant la composition correcte, et réduit exactement une mole de periodate (Tableau I). Les dérivés peracétylés sont amorphes et instables; cependant l'examen par r.m.n. des gommages sommairement purifiées indique clairement la présence de trois groupes *O*-acétyles et d'un groupe *N*-acétyle.

Les deux composés ont un pouvoir rotatoire et un dichroïsme circulaire $\Delta\epsilon$ négatif. Ces deux constantes sont le plus négatives pour le composé le moins basique, p.f. 202°, et nous attribuons à ce dernier la structure **12**, 5- α -*D*-ribofuranosylcytosine (« α -*pseudo*-cytidine »). Son spectre de r.m.n. dans l'oxyde de deutérium présente presque les mêmes couplages que celui de l'« α -*pseudo*-uridine » dans la pyridine², avec une translation presque uniforme des signaux, voisine de 0,5 p.p.m. Par désamination nitreuse, on obtient un mélange des deux *pseudo*-uridines, où domine l'anomère α (75 %).

À l'isomère, p.f. 161°, le plus basique et le moins lévogyre, nous attribuons la structure **10**, 5- β -*D*-ribofuranosylcytosine (« *pseudo*-cytidine »). Par désamination nitreuse on obtient un mélange de *pseudo*-uridine (88 %) et de son isomère α (12 %), identifiés par chromatographie et électrophorèse sur papier. Les cristaux obtenus à

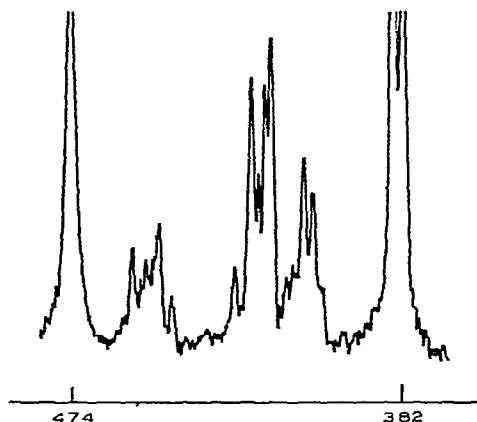


Fig. 1. Spectre de r.m.n. partiel de la 4-amino-2-hydroxy-5- β -D-ribofuranosylpyrimidine (10), en p.p.m. vers les champs faibles, signal DHO δ 4,74.

partir de l'éthanol n'abaissent pas le p.f. d'un échantillon authentique de *pseudo*-uridine. La proportion de *pseudo*-uridine dans le mélange de désamination étant nettement plus élevée que dans le mélange (33:17) obtenu par équilibration acide⁸, on peut déduire que le produit initial de la désamination est l'anomère β , ce qui confirme que le produit de départ était la *pseudo*-cytidine. Le spectre de r.m.n. du composé 10 dans l'oxyde de deutérium est assez différent de celui de la *pseudo*-uridine (Fig. 1). Le couplage $J_{1',2'}$ est élevé (8,0 Hz) et les signaux de H-2' et H-3' se trouvent par hasard très voisins, si bien qu'il y a un couplage virtuel entre H-1' et H-3'. L'analyse peut se faire par comparaison avec des spectres calculés⁹ et donne $J_{2',3'}$ 5,5 Hz et $J_{3',4'}$ 0 Hz. Dans l'approximation de Karplus on prévoit¹⁰ pour la conformation C-2' *endo* les angles dièdres Φ et les couplages : $\Phi_{1',2'}$ 165°; $J_{1',2'}$ 9,5 Hz; $\Phi_{2',3'}$ 45°, $J_{2',3'}$ 6,3 Hz; $\Phi_{3',4'}$ 105°, $J_{3',4'}$ 0,4 Hz. La base est sensiblement plus encombrante que les pyrimidines ordinaires des nucléosides, à cause de la fonction amine en position ortho, et cette conformation du cycle lui permet de se rapprocher au maximum de l'orientation équatoriale.

Pour les deux C-nucléosides 10 et 12, les déplacements de signaux par acétylation confirment les attributions : en particulier les signaux attribués à H-1' et H-4' sont beaucoup moins perturbés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Les points de fusion (bloc Köffler) ne sont pas corrigés. Les quatre chromatographies principales sont désignées par A,B,C,D; le fractionnement est suivi par enregistrement de l'absorption de l'effluent à 280 nm. Les irrigants utilisés sont : (a) En chromatographie sur couche mince de gel de silice (c.c.m.) les mélanges E (acétate d'éthyle-alcool-propylique-eau, 65:23:12) et F (chloroforme-méthanol, 10:1); (b) en chromatographie sur papier (c.p.), les mélanges G

(alcool butylique-eau-acide acétique, 5:3:2) et H (2-propanol-ammoniaque-eau, 7:1:2). Présentation des spectres u.v. : (solvant), λ remarquable en nm, (ϵ); c est voisin de 10^{-4} M. Présentation des spectres de r.m.n. : (fréquence, solvant, référence), δ (multiplicité, intensité, 3J , attribution).

2,4:3,5-Di-O-benzylidène-D-ribose diéthyl dithioacétal (4). — On agite jusqu'à dissolution une suspension de chlorure de zinc (350 g) dans le benzaldéhyde (1 litre), puis on ajoute le D-ribose diéthyl dithioacétal (70 g) et on poursuit l'agitation pendant 30 min. On verse de l'éther de pétrole (60–70°) presque bouillant (5 l) en maintenant une agitation vigoureuse. On décante le surnageant du précipité huileux de chlorure de zinc, et on en chasse les produits volatils en terminant l'évaporation sous 0,1 mmHg. On recristallise le résidu pâteux dans le méthanol aqueux (74 g; 62%), p.f. 120°.

5-Bromo-4-triméthylsilylamino-2-triméthylsilyloxyypyrimidine (1). — On fait bouillir pendant 16 h à reflux une suspension de 5-bromocytosine (4,5 g) dans l'hexaméthylidisilazane (12 ml) et le triméthylchlorosilane (0,15 ml). Par distillation du liquide, on élimine l'excès de réactif puis on recueille le composé **1** (6,4 g; 81%), p.eb._{0,1mm} 100°; données de r.m.n. (60 MHz, chloroforme-*d*, tétraméthylsilane) : δ 0,33 (s, 1 H, H-6), 4,89 (s, 18 H, Me₃Si-).

5-Lithio-4-(N-lithio-N-triméthylsilylamino)-2-triméthylsilyloxyypyrimidine (2). — Au composé **1** (2,1 g; 6,4 mmoles), dissous dans l'éther sec (100 ml) maintenu sous azote et refroidi à –70°, on ajoute goutte à goutte le butyllithium (7 mmoles) dans l'éther (20 ml); on maintient pendant 15 min à –70°, puis on laisse réchauffer à –40°. À ce stade, on prélève une fraction qu'on hydrolyse à l'acide acétique dilué : l'examen par c.c.m. (E) montre la présence de cytosine et de 5-bromocytosine en quantités égales. On ajoute alors du butyllithium (7 mmoles) dans l'éther (20 ml) et on maintient pendant 10 min à –40°. La substitution du brome par le lithium est maintenant complète : par hydrolyse d'une fraction aliquote, on n'obtient plus que de la cytosine.

Carboxylation. — On ajoute un grand excès de dioxyde de carbone au reste de la solution étherée maintenu à –40°, on laisse revenir à 20° pendant la nuit, et on verse dans de l'eau et de l'acide acétique, de façon que le pH final soit 5. On décante l'éther et on filtre la phase aqueuse, recueillant ainsi la 4-amino-5-carboxy-2-hydroxypyrimidine (**3**) qui est recristallisée dans l'eau (40%), p.f. 256°, identique à celui d'un échantillon authentique.

4-Amino-5-(2,4:3,5-di-O-benzylidène-D-altro-pentahydroxypentyl)-2-hydroxypyrimidine (5). — À une solution du composé **1**, (16,7 g; 50 mmoles) dans l'éther sec (100 ml) sous azote et à –70°, on ajoute goutte à goutte le butyllithium (100 mmoles) dans l'éther (50 ml). On laisse réchauffer à –40°, et après 15 min à cette température, on ajoute, par petites portions, sans ouvrir l'enceinte réactionnelle, le 2,4:3,5-di-O-benzylidène-D-ribose (**4**, déshydraté juste avant l'emploi par chauffage à 100° pendant 3 h sous 0,1 mmHg et pulvérisé). On maintient encore pendant 2 h la suspension obtenue à –40°, puis on laisse réchauffer à 20° en 16 h. On verse ensuite la solution devenue homogène dans l'eau acidifiée par l'acide acétique de façon à obtenir un pH final compris entre 6 et 6,5. On extrait 3 fois au chloroforme, qui est ensuite lavé à l'eau. L'examen par c.c.m. (E) de la phase aqueuse indique la présence de cytosine

et de traces de 5-bromocytosine. Selon le dosage u.v., 15 mmoles de bases pyrimidiques n'ont pas réagi. La phase chloroformique est séchée puis évaporée à sec (résidu A; 40 g).

On chromatographie 8 g de A sur gel de silice Merck (<0,08 mm) (400 g), avec élution de fractions de 18 ml par le mélange chloroforme-méthanol (9:1, chromatographie A). On recueille et réunit les fractions 83-105, on évapore à sec et recristallise le résidu dans le méthanol, ce qui donne le composé **5** (471 mg; 11%), p.f. 265°, homogène par c.c.m. (F); $[\alpha]_D^{20}$ -65° (c 0,63; méthanol); spectre u.v. : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 272 nm (ϵ 5 100).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 63,15; H, 5,30; N, 9,61. Trouvé : C, 63,14; H, 5,31; N, 9,45.

4-Amino-5-(2,4:3,5-di-O-benzylidène-D-allo-pentahydroxypentyl)-2-hydroxypyrimidine (6). — On réunit et évapore les fractions 68-82 de la chromatographie A. On adsorbe le résidu sur une colonne de gel de silice Merck (400 g) et on élue au chloroforme-méthanol (25:2) par fractions de 17 ml (chromatographie B). On réunit et évapore à sec les fractions 108-125, et recristallise le résidu dans le méthanol (0,6 g, 14%), homogène en c.c.m. (F) et se décomposant sans fondre; $[\alpha]_D^{20}$ +38°, $[\alpha]_{436}^{20}$ +132° (c 0,495, méthanol); spectre u.v. : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 272 nm (ϵ 7 800).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 63,15; H, 5,30; N, 9,61. Trouvé : C, 62,76; H, 4,90; N, 9,83.

L'évaporation à sec des fractions 90-102 de la chromatographie B donne un solide (**15** ou **14**) (810 mg; 19%), recristallisé dans l'alcool, p.f. 197°, homogène en c.c.m. (F); spectre u.v. : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 299 nm (ϵ 19 000), $\lambda_{\min}^{\text{MeOH}}$ 253 nm (ϵ 6 500); $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ 292 nm (ϵ 9 600).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 63,15; H, 5,30; N, 9,61. Trouvé : C, 63,45; H, 5,30; N, 9,92.

5-(p-altro-Pentahydroxypentyl)-4-amino-2-hydroxypyrimidine (8). — On hydrolyse le résidu A (8 g) soit par chauffage pendant 1 h à 100° dans l'acide acétique aqueux à 80 %, soit par reflux pendant 2 min dans le méthanol (30 ml) et l'acide chlorhydrique concentré (3 ml). On refroidit aussitôt et on évapore à sec sous 0,1 mmHg. Le résidu, repris dans le minimum d'eau, est adsorbé sur une colonne de Dowex 50 (H^+ , 100 ml). On élue par fractions de 25 ml avec l'acide sulfurique 0,1 M (chromatographie C). On réunit les fractions 157-183, neutralise au carbonate de baryum, filtre, concentre à 50 ml, filtre à nouveau, puis on fait passer la solution filtrée à travers une colonne de résine Dowex 50(H^+ , 10 ml), qui est ensuite lavée à l'eau distillée (200 ml). On élue alors, par l'ammoniacal M, le composé **8**, (140 mg; 6,1 %), p.f. 195-6°, homogène en c.p. : R_F 0,28 (G), 0,19 (H); $[\alpha]_D^{25}$ -39° (c 0,1 eau); dichroïsme circulaire : $\lambda_{\max}$ 272 nm, $\Delta\epsilon$ -0,97; spectre u.v. : pH 1,0, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 284 (ϵ 8 200), $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$ 244 (ϵ 1 250); pH 5,5, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 274 (ϵ 5 000), $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$ 232 (ϵ 3 200); pH 13, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 287 (ϵ 6 500), $\lambda_{\min}$ 255 nm (ϵ 1 500); données de r.m.n. (100 MHz, oxy de de deutérium triméthylsilylpropanesulfonate de sodium) : δ ca. 3,8 (m, 5 H, H-2', H-3', H-4', 2 H-5'), 5 (s, 1 H, H-1'), 7,7 (s, 1 H, H-6); il y a un très faible couplage $J_{6,1}$ visible sur spectre agrandi.

Anal. Calc. pour $C_9H_{15}N_3O_6$: C, 41,38; H, 5,79; N, 16,09; O, 36,75. Trouvé : C, 41,43; H, 5,74; N, 15,93; O, 36,85.

Acétylation. — On traite le composé **8** (60 mg) dans la pyridine (1 ml) et l'anhydride acétique (0,5 ml); après agitation pendant 2 jours on évapore à sec et on obtient une gomme homogène en c.c.m. (F); données de r.m.n. (100 MHz, chloroforme- d , tétraméthylsilane) : δ 2,05, 2,09, 3,12, 3,17 (4 s de 3 H, 4 OAc), 2,36 (s, 3 H, NAc), 6,15 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2 Hz, H-1'), 8,14 (s, 1 H, H-6).

Désamination. — À une solution du composé **8** (48 mg) dans l'eau (2 ml) on ajoute du nitrite de sodium (140 mg), puis de l'acide acétique (0,15 ml). Après 3,30 h à 60°, on évapore à sec, on chasse les dernières traces d'acides volatils dans un dessiccateur en présence d'hydroxyde de potassium et d'anhydride phosphorique; on reprend par le minimum d'eau, adsorbe sur une colonne Dowex 50(H⁺) et élué à l'eau les *pseudo*-uridines (17 mg, 34%). On sépare le mélange selon Cohn⁶ sur Dowex 1(Cl⁻) (10 ml) en « β -*pseudo*-uridine » (15 mg, 92%), p.f. 218–220° et « α -*pseudo*-uridine » (1,4 mg, 8%).

5-(D-allo-Pentahydroxypentyl)-4-amino-2-hydroxypyrimidine (7). — On réunit les fractions 130–153 de la chromatographie C, et on continue comme pour l'isomère *altro*. Le composé **7** précipite à l'état de poudre amorphe à partir du méthanol aqueux (90 mg; 39%), p.f. 173–5°; $[\alpha]_D^{25}$ 0° (c 1,0 eau); homogène en c.p. : R_F 0,28 (G), 0,19 (H); dichroïsme circulaire, $\lambda_{\max}$ 272 nm, $\Delta\epsilon$ +0,28; le spectre u.v. est identique à celui du composé **8**; r.m.n. (60 MHz, diméthyl sulfoxyde- d_6 , tétraméthylsilane) : δ 3,3, 3,5 (m, 5 H, de H-2' à H-5'), 4,47 (s, 1 H, H-1'), 4,3–5,3 (m, 3 H, 3 OH), 6,8 (large, 2 H, NH₂), 7,4 (s, 1 H, H-6), 10,5 (1 H, NH); les signaux attribués à OH, NH et NH₂ disparaissent par échange avec du deutérium.

Anal. Calc. pour $C_9H_{15}N_3O_6$: C, 41,38; H, 5,79; N, 16,09; O, 36,75. Trouvé : C, 41,00; H, 5,85; N, 15,28; O, 37,66.

4-Amino-2-hydroxy-5- β -D-ribofuranosylpyrimidine (10). — On fait bouillir à reflux pendant 1 h une solution du résidu A (8 g) dans l'eau (30 ml), le méthanol (30 ml) et l'acide chlorhydrique concentré (6 ml). On refroidit, évapore à sec, reprend le résidu dans le minimum d'eau, et l'adsorbe sur une colonne de Dowex 50 (H⁺, 100 ml). On élue avec l'acide sulfurique 0,1M par fractions de 25 ml (chromatographie D). On réunit les fractions 228–280 qui sont neutralisées comme dans la préparation de **8**. Le résidu de l'évaporation de la solution ammoniacale est recristallisé dans l'alcool aqueux (85 mg, 4%), p.f. 160–1°; $[\alpha]_D^{25}$ –58,5° (c 1, eau); homogène en c.p. : R_F 0,42 (G), 0,26 (H); sur papier phosphate de cellulose (Whatman) : R_F 0,27 (tampon acétate, pH 3,4), 0,72 (tampon acétate, pH 4,6); dichroïsme circulaire : $\lambda_{\min}$ 272 nm, $\Delta\epsilon$ –0,445; spectre u.v. : pH 1, $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 281 (ϵ 9 550), $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 244; pH 5,5, $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 271 (ϵ 5 900), $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 252; pH 13, $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 284 (ϵ 7 450) $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 254 nm; r.m.n. (100 MHz, D₂O; DHO : δ 4,74) : δ 3,82 (s, 1 H, H-5'), 3,84 (s, 1 H, H-5''), 4,11 (d, 1 H, H-4'), 4,23 (m, 2 H, H-2', H-3'), 4,55 (m, 1 H, H-1'), 7,37 (s, 1 H, H-6), pour les couplages, voir Discussion.

Anal. Calc. pour $C_9H_{13}N_3O_5 \cdot H_2O$: C, 41,38; H, 5,79; N, 16,09. Trouvé : C, 41,75; H, 5,71; N, 16,01

Acétylation. — Une suspension du composé **10** (30 mg) dans la pyridine (1 ml) et l'anhydride acétique (0,5 ml) est agitée pendant 16 h à 20°. On évapore à sec sous 0,1 mmHg, et on examine directement le résidu instable; données de r.m.n. (60 MHz, chloroforme-*d*, tétraméthylsilane) : δ 2,16 (s, 9 H, 3 OAc), 2,50 (s, 3 H, NAc), 4,39 (m, 3 H, H-4', 2H-5'), 4,90 (m, 1 H, H-1'), 5,30 (m, 2 H, H-2', H-3'), 7,74 (s, 1 H, H-6).

4-Benzamido-2-hydroxy-5-(2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)pyrimidine (11). — On garde pendant 15 h à 20° une solution du composé **10** (30 mg) dans la pyridine (1 ml) et le chlorure de benzoyle (0,1 ml). On verse dans l'eau glacée, extrait au chloroforme et purifie le résidu de l'extraction sur une colonne de gel de silice (50 g) avec élution par le mélange chloroforme-méthanol (1:1) avec contrôle par c.c.m. On recristallise dans l'alcool (55 mg, 75 %), poudre microcristalline, p.f. 224–6°, recristallisant en aiguilles à cette température, avec nouvelle fusion à 243°; spectre u.v. : $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}}$ 231 (ϵ 42 500), $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}}$ 238 (ϵ 6 800), $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}}$ 267 (ϵ 10 450), 325 nm (ϵ 20 200).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9$: C, 66,76; H, 4,51; N, 6,49. Trouvé : C, 66,70; H, 4,33; N, 6,30.

4-Amino-2-hydroxy-5- α -D-ribofuranosylpyrimidine (12). — On traite comme dans la préparation de **8** les fractions 175–226 réunies de la chromatographie D. Le composé précipite de l'alcool aqueux à l'état de poudre amorphe (56 mg, 2,7 %), p.f. 202–4°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -80^\circ$ (*c* 1, eau); les constantes chromatographiques sont identiques à celles de **10** dans les quatre systèmes décrits; dichroïsme circulaire : $\lambda_{\max}$ 272 nm, $\Delta\epsilon -1,43$; spectre u.v. : pH 1, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 284 (ϵ 8 900), $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}}$ 244; pH 5,5, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 273 (ϵ 5 100), $\lambda_{\min}$ 252; pH 13, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 286 (ϵ 7 300), $\lambda_{\min}$ 255 nm; données de r.m.n. (100 MHz, D_2O ; DHO δ 4,74) : δ 3,62 (q, 1 H, $J_{5,5''}$ 12,5 Hz, $J_{4,5'}$ 5 Hz, H-5'), 3,84 (q, 1 H, $J_{5,5''}$ 12,5 Hz, $J_{4,5''}$ 2,5 Hz, H-5''), 4,00 (m, 1 H, H-4'), 4,32 (m, 2 H, H-2', H-3'), 4,92 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2,5 Hz, H-1'), 7,58 (s, 1 H, H-6).

Anal. Calc. pour $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$: C, 42,85; H, 5,59; N, 16,65. Trouvé : C, 42,20; H, 5,44; N, 16,41.

Acétylation. — On procède comme pour l'anomère β (**10**); données de r.m.n. (60 MHz, chloroforme-*d*, tétraméthylsilane) : δ 2,15, 2,22 (s, 9 H, 3 OAc), 2,45 (s, 3 H, NAc), 4,3–4,5 (m, 3 H, H-4', H-5', H-5''), 5,00 (d, 1 H, $J_{1,2}$, 3 Hz, H-1'), 5,2–5,7 (m, 2 H, H-2', H-3'), 7,9 (s, 1 H, H-6).

4-Benzamido-2-hydroxy-5-(2,3,5-tri-O-benzoyl- α -D-ribofuranosyl)pyrimidine (13). — On procède comme pour l'anomère β (**11**) jusqu'à l'obtention de la phase chloroformique. Celle-ci est lavée avec une solution aqueuse M d'hydrogénosulfate de potassium, avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, à l'eau, et évaporée à sec. On recristallise le résidu dans l'alcool (60 mg, 81 %), p.f. 223°; spectre u.v. : $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 230 (ϵ 41 500), 266 (ϵ 11 600), 322 (ϵ 22 000), $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}}$ 237, 287 nm.

Anal. Calc. pour $\text{C}_{36}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9$: C, 66,76; H, 4,51; N, 6,49. Trouvé : C, 66,57; H, 4,68; N, 6,61.

Autres préparations des deux anomères 10 et 12. — a) On chauffe pendant 1 h à 100° une solution du composé **5** (597 mg) dans l'acide chlorhydrique aqueux M (50 ml). On refroidit, évapore à sec et sépare sur Dowex 50(H^+ , 100 ml) comme

décrit ci-dessus (chromatographie D), par fractions de 25 ml. À partir des fractions 228–280 réunies, on recueille l'anomère β (**10**, 80 mg, 24 %), p.f. 160°, et à partir des fractions 175–226 l'anomère α (**12**, 83 mg, 25 %).

b) On traite de même le composé **6** (567 mg). On recueille les isomères β (**10**, 26 mg, 9 %) et α (**12**, 22 mg, 7,5 %).

Désaminations nitreuses. — On maintient pendant 6 h à 60° une solution de **10** (30 mg) dans l'eau (2 ml), à laquelle on a ajouté du nitrite de sodium (120 mg) et de l'acide acétique (0,2 ml). On ajoute alors une solution aqueuse (33 %) de méthylamine (0,2 ml). Après 1 h à température ambiante, on ajuste le pH entre 5 et 6 avec de l'acide acétique et on fait passer sur une colonne de Dowex 50 (H⁺) et on élue les *pseudo*-uridines à l'eau. On évapore à sec l'effluent et coévapore plusieurs fois avec de l'eau et de l'alcool. Le résidu est recristallisé dans l'alcool, p.f. 218°, seul ou du mélange avec un échantillon authentique de *pseudo*-uridine, et se comporte de même en chromatographie sur papier (irrigant G) et en électrophorèse sur papier (tampon borate, pH 9,6). On réunit cristaux et eaux-mères et on les analyse par le système de Cohn⁸ (colonne de Dowex 1(Cl⁻, 10 ml), volume de chaque tampon : 1 l). D'abord passe l'anomère α (1,5 mg, 12 %), puis l'anomère β (11 mg, 88 %).

La même suite d'opérations, à partir de 30 mg de **12** a donné un mélange de *pseudo*-uridines (11,5 mg, 38 %) qui contient l'anomère α (8,5 mg, 75 %) et l'anomère β (2,9 mg, 25 %).

Oxydation périodique des composés 8, 10 et de la cytidine. — L'oxydation périodique de la 5-(D-*altro*-pentahydroxypentyl)-4-amino-2-hydroxypyrimidine (**8**), de la 4-amino-2-hydroxy-5- β -D-ribofuranosylpyrimidine (**10**) et de la cytidine a été effectuée selon Avigad¹¹ en solution aqueuse à une concentration en substrat 60 μ M et en périodate 0,5mM.

RÉFÉRENCES

- 1 R. H. HALL, *The Modified Nucleosides in Nucleic Acids*, Columbia University, New York, 1971, p. 172.
- 2 U. LERCH, M. G. BURDON ET J. G. MOFFATT, *J. Org. Chem.*, **36** (1971) 1507.
- 3 A. M. MICHELSON ET W. E. COHN, *J. Biochem.*, **1** (1962) 490.
- 4 S. DAVID ET A. LUBINEAU, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. C*, **275** (1972) 331.
- 5 H. ZINNER ET E. WITTENBURG, *Chem. Ber.*, **94** (1961) 1298.
- 6 W. E. COHN, *Biochem. Prep.*, **10** (1963) 135.
- 7 M. BOBEK, J. FARKAŠ ET F. ŠORM, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34** (1969) 1673.
- 8 W. E. COHN, *J. Biol. Chem.*, **235** (1960) 1488.
- 9 J. I. MUSER ET E. J. COREY, *Tetrahedron*, **18** (1962) 791.
- 10 F. HRUSKA, A. A. GREY ET I. C. Q. SMITH, *J. Amer. Chem. Soc.*, **92** (1970) 4038.
- 11 G. AVIGAD, *Carbohydr. Res.*, **11** (1969) 119.