

SYNTHÈSE ET UTILISATION DES OLIGO- NUCLÉOTIDES



T. HUYNH-DINH

laoustier
TEC
DOC

EM
inter

TTTTCAGCTCGCGCCCCAAATG
AAACAGGTTATTGACCATTTGCG
AATGGTCAAACCTAAATCTACTC
TGGGAATCAACTGTTACATGGA
AGACACCGTACTTTAGTTGCAT
GTTGAGCTACAGCACCAGATTC
TCTAAGCCATCCGCAAAAATGAG
AAGGAGCAATTAAAGGTACTCT
CTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTC
GAAGCTCGAATTAAAACGCGAT
TTCGGGCTTCCTCTTAATCTTT
CGCTTTGCTTCTGACTATAATA
GACCTGATTTTTTGATTTATGGT
TCTGAACTGTTTAAAGCATTTG
ATGAATATTTATGACGATTCCGC
GCTATCCAGTCTAAACATTTTA
TCTGGCAAACTTCTTTTGCAA
TATTTTGGTTTTTATCGTCGTC
GGTTATGATAGTGTGCTCTTA
AATTCCTTTTTGGCGTTATGTAT
GAATGTGGTATTCTTAAATCTC
CTTTCTACCTGTAATAATGTTG
CGTTTTATTAACGTAGATTTTT
CCTGACTGGTATAATGAGCCAG
GCATAAGGTAATTCACAATGAT
TTAAACCATCTCAAGCCCAATT
CTGGTGTTTTCTCGTCAGGGCAA
TGAATGAGCAGCTTTGTTACGT
ATGAATATCCGGTTCTTGTCAA
ATGAAGGTCAGCCAGCCTATGC
ACACCGTTCATCTGTCCTCTTT
TCGTTCCGGCTAAGTAACATGGA
GATTTTCGACACAATTTATCAGG
ATCTCCGTTGTACTTTGTTTCG
ATCGCTGGGGGTCAAAGATGAG
ATTCTTTTCGCCTCTTTTCGTTT
TTCGTAGTGGCATTACGTATTT
TGGAACCTTCCTCATGAAAAG
CAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCT
GATGCTGTCTTTTCGCTGCTGAG
CGCAAAGCGGCCTTTAACTCC
AGCGACCGAATATATCGGTTAT
GGTTGTTGTCATTGTGCGCGCA
CAAGCTGTTTAAGAAATTCACCT
CTGATAAACCGATACAATTAAC
GAGCCTTTTTTTTTTGGAGATTT
AAATTATTATTTCGCAATTCCTT
TTCTATTCTCACTCCGCTGAAAC
TGTTTTAGCAAAACCCATACAG
ACTAACGTCTGGAAAGACGACA
CGTTACGCTAACTATGAGGGTT
GCTACAGGCGTTGTAGTTTGTA
ACTCAGTGTTACGGTACATGGG
CTTGCTATCCCTGAAAATGAGG
GGCGGTTCTGAGGGTG
GGTACTAAACCTCCTGA
ATTCCGGGCTATACTTA
GGCACTTATCCGCCTG
AACCCCGCTAATCCTAATCCTT
TCTCAGCCTCTTAATACTTTCA
AATAGGTTCCGAAATAGGCAGG



COLLECTION

GÉNIE GÉNÉTIQUE

G2

*Sous la direction
de G. Lucotte.*

*Cette collection a pour objectif
de fournir une panoplie
complète des aspects tech-
nologiques récents utilisés
dans le domaine en plein
essor du génie génétique.*

*Une vingtaine de volumes
sont prévus, ils ont été confiés
à des spécialistes du monde
de la recherche dans l'objectif
de concevoir des outils
pratiques présentant les
nombreuses applications de
cette nouvelle science, tout
particulièrement dans le
secteur médical.*

Ce livre présente une mise au point complète et concise sur la synthèse des oligonucléotides (ADN et ARN) et sur leurs utilisations.

Après un rapide historique sur l'évolution de la synthèse de l'ADN, l'auteur, **spécialiste incontesté**, développe dans une première partie les méthodes de protection des nucléotides ainsi que les techniques de déprotection, purification et vérification de séquences. Sont également étudiés dans cette partie, les problèmes posés par la synthèse des ARN.

La deuxième partie du livre est consacrée aux applications des oligonucléotides synthétiques, que ce soit pour des études spectroscopiques de structures, conformations et interactions avec différents ligands, ou en tant qu'outils pour le génie génétique et la biologie moléculaire : sondes d'hybridation, synthèse de gène, mutagenèse dirigée.

La troisième partie de ce volume se rapporte à l'utilisation thérapeutique potentielle des oligonucléotides.

Les spécialistes de biologie moléculaire, de biochimie, de pharmacologie, et les étudiants apprécieront la parution du **premier ouvrage en langue française** à traiter de la chimie et des applications des oligonucléotides.

2-85206-914-8



9 782852 069145

B

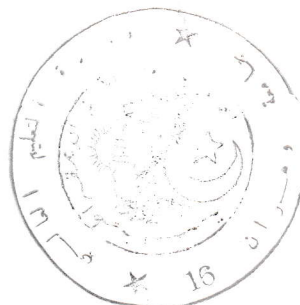
3

EXCLU DU PRET

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION



I STRUCTURE	5
II HISTORIQUE	8

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE D'ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES (ADN)

I STRATÉGIE DE SYNTHÈSE D'OLIGODÉSOXYNUCLÉOTIDES	15
1.1. Généralités	15
1.2. Evolution de la synthèse d'ADN	16
II PROTECTION DES NUCLÉOSIDES	18
2.1. Protection du sucre	18
2.2.1. Protection du 5'-OH • 2.2.2. Protection du 3'-OH	
2.2. Protection des bases hétérocycliques	19
2.2.1. Protection de la désoxy-2' adénosine • 2.2.2. Protection de la désoxy-2' guanosine • 2.2.3. Protection de la désoxy-2' cytidine	

3	MÉTHODE AU PHOSPHODIESTER	23
4	MÉTHODE AU PHOSPHOTRIESTER	26
	4.1. Synthèse en solution	26
	4.4.1. Agent phosphorylant bifonctionnel • 4.4.2. Agent phosphorylant monofonctionnel • 4.4.3. Agent de couplage	
	4.2. Synthèse en phase solide sur support insoluble	30
	4.2.1. Support • 4.2.2. Cycle de couplage	
5	MÉTHODE AU PHOSPHITE-PHOSPHORAMIDITE	36
	5.1. Synthèse en solution	36
	5.2. Synthèse sur support solide	36
	5.3. Synthèse automatisée	38
6	MÉTHODE AU H-PHOSPHONATE	43
7	DÉPROTECTION	48
8	PURIFICATION ET VÉRIFICATION DE LA STRUCTURE	51
	8.1. Dessalage	51
	8.2. Purification	51
	8.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide • 8.2.2. HPLC sur support en phase inverse • 8.2.3. HPLC sur résine échangeuse d'ions	
	8.3. Contrôle de la pureté	56
	8.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide • 8.3.2. Electrophorèse capillaire • 8.3.3. HPLC analytique	
	8.4. Dégradation enzymatique	63
9	VÉRIFICATION DE LA SÉQUENCE DE L'OLIGODÉSOXYNUCLÉOTIDE	64
	9.1. Séquençage chimique (Maxam-Gilbert)	64
	9.2. Séquençage enzymatique (Sanger)	64

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE D'ACIDES RIBONUCLÉIQUES (ARN)

1 PROTECTION DES NUCLÉOSIDES	79
1.1. Protection du ribose	79
1.2. Protection des bases	80
2 MÉTHODE AU PHOSPHORAMIDITE	82

CHAPITRE 3

OLIGONUCLÉOTIDES MODIFIÉS

1 MODIFICATIONS SUR LA BASE	89
2 MODIFICATIONS SUR LA LIAISON GLYCOSYDIQUE	93
3 MODIFICATIONS SUR LE SUCRE	94
3.1. Ethylène glycol, propanediol, et désoxyribitol	94
3.2. Glycérol	94
3.3. ADN/ARN mixte	95
3.4. Phosphodiester -2'-5', 3'-3' et 5'-5'	95
3.5. Branché -2'-3'	95
3.6. D-arabino oligonucleotides	96
3.7. ADN et ARN en série L	96
3.8. α ADN et ARN	96

3.9. ADN carbocyclique	9
3.10. 4'-thio.....	9
3.11. ARN alcoylés en 2'.....	9
3.12. Morpholine carbamate.....	9
3.13. Bis(hydroxyméthyl)cyclobutyl	9
3.14. Analogue pyranosyl.....	9

4 MODIFICATIONS DE LA LIAISON PHOSPHODIESTER _____ 9

4.1. Thiophosphate 3' et 5'.....	9
4.2. Méthyl et alcoylphosphonate	9
4.3. Phosphorothioate	10
4.4. Phosphoroséléniate.....	10
4.5. Phosphorodithioate.....	10
4.6. H-Phosphonothioate	10
4.7. Méthyl phosphonothioate.....	10
4.8. Phosphotriester	10
4.9. N-alcoyl phosphoramidate	10
4.10. Phosphoramidate 3'-NH-P-O-5'.....	10
4.11. Boranophosphate.....	10

5 REMPLACEMENT DU PHOSPHORE PAR UN AUTRE ATOME _____ 10

5.1. Sulfamate.....	10
5.2. Sulfonate	10
5.3. Sulfonamide.....	10
5.4. Diisopropyl(di-oxy)silyl	10
5.5. Carbonate.....	10

5.6. Carbamate.....	104
5.7. Acétate ou carboxyméthyl.....	104
5.8. Méthylène acétal.....	105
5.9. Méthyl hydroxylamine	105
5.10. Oligonucléotides "plastiques".....	105
5.11. Acides nucléiques peptidiques (PNA)	106

C H A P I T R E 4

ÉTUDE DES STRUCTURES ET INTERACTIONS DES OLIGONUCLÉOTIDES

1 ÉTUDE STRUCTURALE DES OLIGONUCLÉOTIDES	111
2 INTERACTIONS OLIGONUCLÉOTIDES-LIGANDS	112

C H A P I T R E 5

UTILISATIONS D'OLIGONUCLÉOTIDES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

1 ÉLUCIDATION DU CODE GÉNÉTIQUE	117
2 IDENTIFICATION ET ISOLATION DE FRAGMENTS DE GÈNES	118
2.1. Sondes uniques	118
2.2. Sondes mixtes	118
2.3. Sondes uniques à très longue séquence	119
2.4. Sondes avec des nucléosides modifiés.....	120

3	MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE	12
----------	---------------------------	----

4	SYNTHÈSE DE GÈNE	12
----------	-------------------------	----

C H A P I T R E 4

UTILISATION THÉRAPEUTIQUE POTENTIELLE

1	OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS	13
----------	----------------------------------	----

1.1.	Pénétration cellulaire - Oligonucléotides méthylphosphonates	13
------	--	----

1.2.	Résistance aux enzymes de dégradation - Oligonucléotides phosphorothioates	13
------	--	----

1.3.	Spécificité et affinité - Oligonucléotides-intercalants et Oligonucléotides peptidiques	13
------	---	----

2	OLIGONUCLÉOTIDES ANTIGÈNES	14
----------	-----------------------------------	----

3	OLIGONUCLÉOTIDES RÉACTIFS - NUCLÉASES ARTIFICIELLES	14
----------	--	----

4	RIBOZYMES	14
----------	------------------	----

4.1.	Ribozymes de <i>Tetrahymena thermophila</i>	14
------	---	----

4.2.	Ribozymes issus de la ribonucléase P.	14
------	---------------------------------------	----

4.3.	Ribozyme à tête de marteau	14
------	----------------------------	----

4.4.	Ribozymes en épingle à cheveux	14
------	--------------------------------	----

5	SÉLECTION IN VITRO-AMPLIFICATION	15
----------	---	----

6	PHARMACOCINÉTIQUE ET TOXICOLOGIE DES OLIGODÉSOXYNUCLÉOSIDES	15
----------	--	----

C O N C L U S I O N

ANNEXES	16
----------------	----

INDEX	16
--------------	----