

CHROM. 8574

SÉPARATION DES QUATRE DIASTÉRÉOISOMÈRES DE L'HYDROXY-6-DIHYDRO-5,6-THYMININE FORMÉS PAR RADIOLYSE γ DE LA THYMININE EN SOLUTION AQUEUSE DÉSAÉRÉE

J. CADET et R. TÉOULE

Centre d'Études Nucléaires de Grenoble, Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie, BP 85 - Centre de Tri, 38041 Grenoble Cedex (France)

(Reçu le 2 juin 1975)

SUMMARY

Separation of the four diastereoisomers of 6-hydroxy-5,6-dihydrothymidine formed by γ -radiolysis of thymidine in deaerated aqueous solution

The compounds produced by gamma irradiation of deaerated aqueous solutions of thymidine have been isolated by thin-layer chromatography. The separation of (+) and (-) *trans* and *cis* diastereoisomers of thymidine "hydrates" has been carried out. Correlations between conformations given by nuclear magnetic resonance spectra and R_f values are discussed.

INTRODUCTION

La photohydratation des bases pyrimidiques représente une des causes essentielles des effets biologiques du rayonnement UV¹⁻³. Les "hydrates" formés dans les chaînes d'acides nucléiques sont préparés *in vitro* par photolyse UV de solutions aqueuses d'uracile, de cytosine et de leurs dérivés nucléosidiques⁴⁻⁸. La récente caractérisation d'un "photohydrate" de thymine⁹, longtemps présumé instable^{10,11}, a fait suite à l'isolement par analyse chromatographique bidimensionnelle sur couche mince des deux isomères *cis* et *trans* de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine formés par irradiation γ de la thymine¹².

Dans cette note, la mise en évidence de la formation des "hydrates" de thymidine sous l'action du rayonnement γ sur la thymidine en solution aqueuse désaérée, est présentée.

L'analyse chromatographique bidimensionnelle sur couche mince de cellulose de 21 produits de radiolyse et la séparation complète des quatre diastéréoisomères de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine sont décrites.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chromatographie

Les plaques de cellulose F₂₅₄, prêtes à l'emploi, de 0.1 mm d'épaisseur sur

support d'aluminium proviennent des Établissements Merck (Darmstadt, R.F.A.).

Les séparations chromatographiques, de type ascendant, sont effectuées à 23° dans des cuves Desaga (20 × 9 × 20 cm) dont l'atmosphère est saturée avec le mélange de solvants (120 ml) servant au développement. Les systèmes d'éluants suivants ont été utilisés: I: chloroforme-méthanol-eau (4:2:1); phase inférieure additionnée de méthanol (5%, v/v); II: acétate d'éthyle-propanol-2-eau (75:16:9); III: propanol-eau (10:3); IV: propanol-2-solution saturée de (NH₄)₂SO₄-K₂HPO₄ 1 M (2:79:19).

Les durées de développement sont respectivement de 1 h 30 min pour le solvant I, 1 h 45 min pour le système II et 4 h pour les mélanges d'éluants III et IV.

Détection des produits

Les dérivés dioxo-2,4-pyrimidiques qui possèdent la liaison 5,6-éthylénique sont mis en évidence par la fluorescence qu'ils émettent sous une lampe de Wood (254 nm).

Les "hydrates" perdent la molécule d'eau d'addition par chauffage du chromatogramme pendant 1 h à 100°; les dérivés insaturés en 5,6 correspondant sont détectés par examen en lumière UV.

Les nucléosides sont mis en évidence par pulvérisation au chromatogramme avec le réactif à la cystéine¹³; une coloration jaune orange apparaît après chauffage à 100° pendant 10 min. La limite de détection est voisine de 5 µg.

Obtention des produits

Les solutions aqueuses dégazées de thymidine ¹⁴C₂ (10⁻³ M) sont irradiées (rayonnement γ du ⁶⁰Co, débit de dose 6100 rads/min) en tubes scellés pendant 1 h 30 min¹².

Les deux diastéréoisomères *cis* (+) et (-) de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine sont préparés par réduction en présence d'acide acétique et de zinc des bromo-5-hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine (5*R*, 6*R*) et (5*S*, 6*S*)^{14,15}. Les isomères *trans* sont obtenus simultanément par chauffage de chacun des deux hydrates *cis* dans une solution aqueuse de pyridine pendant 1 h à 60°.

RÉSULTATS

L'association des solvants I et II en analyse bidimensionnelle sur couche mince de cellulose F (Merck) permet de séparer la quasi totalité des 28 produits de radiolyse γ de la thymidine en solution aqueuse désaérée (Tableau I). Les quatre formes diastéréoisomères *cis* et *trans* de la dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine, l'hydroxy méthyl-5-désoxy-2'-uridine, les isomères *cis* et *trans* de la dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine et la thymine qui sont des produits communs de la radiolyse γ de la thymidine en présence et en absence d'oxygène sont séparés indifféremment sur gel de silice¹⁶ ou sur cellulose. Toutefois, seul l'emploi de l'absorbant cellulosique permet de résoudre les mélanges complexes de diastéréoisomères monohydrogénés ou dihydrogénés en 5-6 qui sont des produits spécifiques de radiolyse γ de la thymidine en solution aqueuse désaérée. Les formes 5*R* (+) et 5*S* (-) de la dihydrothymidine ou les deux diastéréoisomères (+) et (-) de l'hydroxy-5-dihydro-5,6-thymidine présentent des mobilités chromatographiques différentes (Tableau I). La séparation com-

TABLEAU I

VALEURS DE R_F DES DIFFÉRENTS PRODUITS DE RADIOLYSE FORMÉS PAR IRRADIATION γ DE LA THYMINDE EN SOLUTION AQUEUSE DÉSAÉRÉE SUR CELLULOSE F

Produits	Solvants			
	I	II	III	IV
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine <i>cis</i> (+)	0.13	0.22	0.51	0.78
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine <i>cis</i> (-)	0.08	0.20	0.51	0.78
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine <i>trans</i> (-)	0.09	0.35	0.61	0.72
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine <i>trans</i> (+)	0.12	0.47	0.51	0.72
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine <i>cis</i>	0.12	0.33	0.55	0.84
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine <i>trans</i>	0.10	0.50	0.63	0.78
Hydroxy-5-dihydro-5,6-thymidine (+)	0.19	0.30	0.57	0.65
Hydroxy-5-dihydro-5,6-thymidine (-)	0.17	0.32	0.57	0.65
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine <i>cis</i> (+)	0.29	0.52	0.62	0.54
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine <i>cis</i> (-)	0.20	0.43	0.62	0.54
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine <i>trans</i> (-)	0.21	0.43	0.68	0.63
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine <i>trans</i> (+)	0.31	0.52	0.62	0.62
Hydroxy-5-dihydro-5,6-thymine	0.30	0.51	0.65	0.75
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine <i>cis</i>	0.28	0.63	0.65	0.66
Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine <i>trans</i>	0.33	0.67	0.66	0.70
Thymine	0.51	0.68	0.74	0.42
Dihydro-5,6-thymidine (5S) (-)	0.39	0.48	0.64	0.45
Dihydro-5,6-thymidine (5R) (+)	0.43	0.52	0.64	0.45
Dihydro-5,6-thymine	0.53	0.71	0.74	0.49
Thymidine	0.45	0.64	0.68	0.36
Hydroxyméthyl-5-désoxy-2'-uridine	0.14	0.29	0.55	0.64

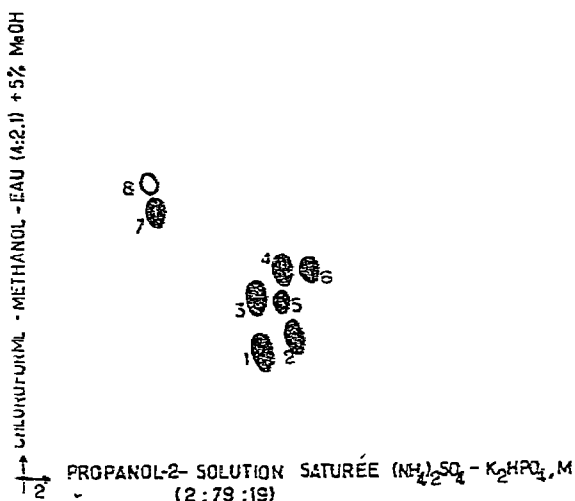


Fig. 1. Séparation bidimensionnelle sur couche mince de cellulose F Merck des "hydrates" de thymine et de thymidine. 1 = Hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine (5R, 6S) *cis* (-); 2 = hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine (5S, 6S) *trans* (-); 3 = hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine (5S, 6R) *cis* (+); 4 = hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine (5R, 6R) *trans* (+); 5 = hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine *cis*; 6 = hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine *trans*; 7 = thymidine; 8 = thymine.

plète des quatre "hydrates" de thymidine qui n'est que partielle dans ces conditions a été réalisée en associant les solvants I et IV en chromatographie bidimensionnelle (Fig. 1). Une étude récente de résonance magnétique nucléaire à 250 MHz des quatre diastéréoisomères de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine dans $^2\text{H}_2\text{O}$ a montré qu'il existe une corrélation étroite entre la conformation du cycle osidique et la configuration absolue du C-6 de la base pyrimidique. Le déplacement de l'équilibre pseudo-rotationnel C_3 'endo(N) \leftrightarrow C_2 'endo(S)^{17,18} vers le conformère C_2 'endo est plus important pour les diastéréoisomères levogyres 6S que pour leurs homologues dextrogyres 6R. La mobilité chromatographique différente des "hydrates" (+) et (-) dans le solvant I peut être reliée à la conformation du cycle furannique et par là même à l'accessibilité des groupements hydroxyles. Le système de solvant IV qui s'avère très complémentaire permet la séparation des isomères *cis* et *trans*; dans ces conditions le comportement chromatographique des nucléosides dépend essentiellement de la configuration de l'aglycone.

REMERCIEMENT

Les auteurs remercient Mme. Georges pour sa collaboration technique.

RÉSUMÉ

L'analyse chromatographique des produits de radiolyse γ de la thymidine en solution aqueuse désaérée a été effectuée sur couche mince de cellulose dans quatre systèmes de solvants. La séparation des diastéréoisomères *cis* (+) et (-) et *trans* (+) et (-) de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine a été effectuée. Des corrélations entre la conformation du cycle furannique des "hydrates" de thymidine obtenue par analyse de résonance magnétique nucléaire et les valeurs de R_F ont été établies.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. D. Small, M. Tao et M. P. Gordon, *J. Mol. Biol.*, 38 (1968) 75.
- 2 F. P. Ottensmeyer et G. F. Whitmore, *J. Mol. Biol.*, 38 (1968) 17.
- 3 J. F. Remsen, N. Miller et P. A. Cerutti, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 65 (1970) 460.
- 4 S. Y. Wang, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (1958) 6196.
- 5 E. Fahr, H. Gattner, G. Dorhofer, R. Kleber et H. Popp, *Z. Naturforsch.*, 22B (1967) 1256.
- 6 W. J. Wechter et K. C. Smith, *Biochemistry*, 7 (1968) 4064.
- 7 I. Pietrzykowska et D. Shugar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37 (1969) 225.
- 8 G. de Boer et H. E. Johns, *Biochim. Biophys. Acta*, 204 (1970) 18.
- 9 G. J. Fisher et H. E. Johns, *Photochem. Photobiol.*, 18 (1973) 23.
- 10 S. Y. Wang, *Nature (London)*, 184 (1959) 59.
- 11 I. Pietrzykowska et D. Shugar, *Science*, 161 (1968) 1248.
- 12 J. Cadet et R. Téoule, *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 22 (1971) 273.
- 13 J. G. Buchanan, *Nature (London)*, 168 (1951) 1091.
- 14 J. Cadet et R. Téoule, *Carbohydr. Res.*, 29 (1973) 345.
- 15 J. Cadet et R. Téoule, *C. R. Acad. Sci., Ser. D*, 272 (1971) 2254.
- 16 J. Cadet et R. Téoule, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 407.
- 17 R. M. Sarma et R. J. Mynott, *J. Amer. Chem. Soc.*, 95 (1973) 1641.
- 18 C. Altona et M. Sundaralingam, *J. Amer. Chem. Soc.*, 95 (1973) 2333.