

CHROM. 12,171

## Note

### Séparations par chromatographie sur couche mince et par chromatographie liquide à haute performance de dinucléoside-monophosphates modifiés par action du rayonnement gamma

J. CADET et L. VOITURIEZ

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiochimie, BP 85 X, 38041 Grenoble Cédex (France)

(Reçu le 18 juin 1979)

La thymidyl-(3'-5')-thymidine ou d(TpT) constitue un excellent modèle pour l'étude des modifications chimiques radio-induites du fragment thymine de la molécule d'acide désoxyribonucléique en solution aqueuse<sup>1</sup>. L'action des radicaux hydroxyles issus de la radiolyse de l'eau<sup>2</sup> conduit à la formation prépondérante de dinucléoside-monophosphates modifiés sur le cycle pyrimidique<sup>3</sup>. Le mélange complexe ainsi obtenu n'a pu être résolu par l'utilisation de méthodes d'analyse d'esters phosphoriques telles que les séparations sur couche mince d'absorbants cellulosiques<sup>4-6</sup> ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)<sup>7,8</sup>. Une meilleure approche réside dans le choix d'un substrat convenablement protégé, en l'occurrence l'ester cyanoéthyle du dTpOAcT ou dTp(ce)OAcT (I). La séparation complète des principaux dérivés dinucléotidiques de radiolyse en solution aqueuse aérée de I a été obtenue par analyse chromatographique bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice. Le mélange de quatre diastéréoisomères résultant de la dihydroxylation de la liaison 5,6-pyrimidique ont été également séparés par HPLC de partage sur un support microparticulaire de silice.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### Chromatographie liquide à haute performance

Les séparations analytiques de chromatographie liquide à haute performance ont été effectuées avec un ensemble Waters (Milford, Mass., E.U.) comprenant un système de pompe M6000 et l'injecteur universel à boucle U6K. Les dinucléoside-monophosphates étaient détectés à une longueur d'onde de 260 nm avec un spectrophotomètre UV Cecil équipé d'une cuve de 8  $\mu$ l. Les colonnes (25 cm  $\times$  4.7 mm I.D.) ont été préparées par remplissage dynamique en voie humide selon la technique de Coq *et al.*<sup>9</sup> Les suspensions de microparticules (10  $\mu$ m) de silice Partisil (Whatman, Clifton, N.J., E.U.) dans le tétrachlorure de carbone et de silice greffée C<sub>18</sub> Nucleosil (Macherey-Nagel & Co, Duren, R.F.A.) dans le *n*-butanol étaient homogénéisées par sonication.

Les séparations à l'échelle préparative ont été effectuées sur une colonne Prep-Pak (30 cm  $\times$  5.7 cm I.D.) de silice Bondapak (50-70  $\mu$ m) à l'aide du chromatographe liquide Prep LC 500 équipé d'un réfractomètre différentiel Waters RI 401.

L'eau tridistillée et les solvants organiques étaient filtrés respectivement sur des membranes Millipore HA et FH (0.45  $\mu\text{m}$ ).

#### *Chromatographie sur couche mince*

Les analyses chromatographiques bidimensionnelles sur feuilles de plastique recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, R.F.A.) prêtes à l'emploi ont été effectuées à l'aide de systèmes de solvant I: chloroforme-méthanol-eau (4:2:1), phase inférieure additionnée de 5% de méthanol<sup>10</sup> et II: acétate d'éthyle-propanol-2-eau (75:16:9). Les dinucléoside-monophosphates froids sont détectés par observation du chromatogramme sous une lampe UV émettant à 254 nm. Les dérivés (<sup>14</sup>C) sont mis en évidence par autoradiographie après exposition d'un film Kodirex (Kodak) pendant 15 heures.

#### *Préparation des dinucléoside-monophosphates*

Le composé I a été préparé par condensation de la O-trityl-5'-thymidine et de la O-acétyl-3'-thymidine en présence de cyanoéthyl phosphate de pyridinium et de chlorure de triisopropylbenzène sulfonyle<sup>11</sup>.

La radiolyse gamma de solution aqueuse oxygénée de dTp(ce)OAcdT 10<sup>-3</sup>M a été effectuée à l'aide d'une source de cobalt-60. Le débit de dose qui a été déterminé par la méthode de Fricke<sup>12</sup> est de 13 krad/min. Les solutions irradiées étaient concentrées jusqu'à siccité par évaporation sous vide avant les analyses chromatographiques.

La caractérisation des dinucléoside-monophosphates radio-induits repose sur l'hydrolyse enzymatique de leur liaison phosphodiester par action des exonucléases de venin de serpent EC 3.1.4.1 (Sigma, St. Louis, Mo., E.U.) et de rate de veau EC 3.1.4.18 (Worthington, Freehold, N.J., E.U.). Les nucléosides ainsi libérés, correspondant respectivement aux fragments 3' et 5' terminaux, ont été identifiés par comparaison avec les substances témoins<sup>13,14</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Séparation des diastéréoisomères de l'ester cyanoéthylé de la thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine*

Le composé I a été purifié par chromatographie liquide préparative sur gel de silice Prepak 500 (Waters). Dans ces conditions plus de 1 g du triester I sont séparés de la thymidine-3'-O-acétyl résiduelle et des divers agents de condensation. Le dinucléoside-monophosphate I qui apparaît homogène par analyse chromatographique sur couche mince de silice (solvants I et II) ou par HPLC analytique sur colonne de Partisil (solvant II) est en fait constitué d'un mélange de deux diastéréoisomères (Fig. 1) en raison de la chiralité du groupement phosphate trisubstitué<sup>15,16</sup>. Les deux dinucléoside-monophosphates ont été séparés par chromatographie liquide de partage en phase inverse sur une colonne de silice greffée (RP-18) avec le système de solvants binaire eau-méthanol (7:3) (Fig. 2). L'excellente pureté de chacun des diastéréoisomères ainsi obtenu est confirmée par l'examen de leur spectre de résonance magnétique nucléaire protonique (Fig. 3). La grande similitude des paramètres de résonance magnétique nucléaire protonique à l'exception d'une légère différence dans les valeurs de déplacements chimiques des protons anomériques est en faveur d'une quasi identité des propriétés conformationnelles des cycles osidiques respectifs des deux diastéréoisomères.

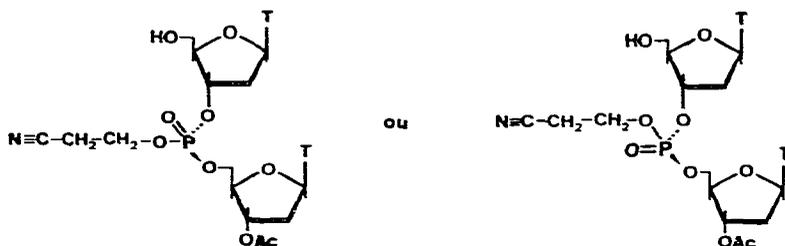


Fig. 1. Structure chimique des deux diastéréoisomères de I.

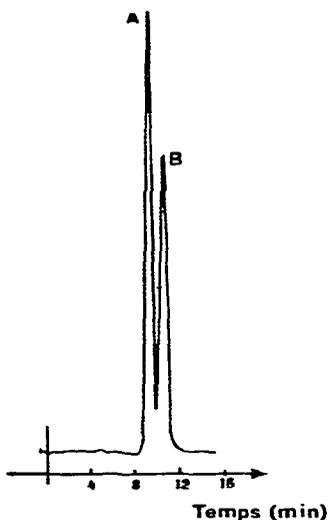


Fig. 2. Séparation des deux diastéréoisomères A et B de I par HPLC en phase inverse sur une colonne de silice  $C_{18}$  Nucléosil (débit 2 ml/min).  $k'_A = 8.2$ ;  $k'_B = 9.4$ .

mères. L'orientation différente (axiale ou équatoriale) du groupement cyanoéthyle pour chacun des deux dinucléotides<sup>17</sup> est probablement à l'origine de leur séparation ( $\alpha = 1.15$ ) sur colonne de silice greffée  $C_{18}$ . Ce comportement chromatographique distinct est le reflet de légères différences des forces dispersives entre soluté, solvant et phase stationnaire qui sont à l'origine d'interactions non spécifiques de type lipophile<sup>18,19</sup>.

*Analyses chromatographiques des dinucléoside-monophosphates formés par radiolyse gamma de solution aqueuse de dTp(ce)OAcdT(I)*

La dégradation radio-induite de I en solution aqueuse aérée engendre principalement aux faibles doses de rayonnement des dinucléoside-monophosphates modifiés sur un des deux cycles pyrimidiques<sup>3</sup>. La dégradation hydrolytique des hydroxy-5(6)-hydroperoxydes 6(5) formés transitoirement<sup>20</sup> conduit à la formation de huit diastéréoisomères possibles présentant un résidu dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine (II-IX) (Fig. 4) et aux deux dérivés de type formamide (X et IX). Le mélange de ces divers nucléotides a été totalement résolu par analyse chromatographique bidimension-

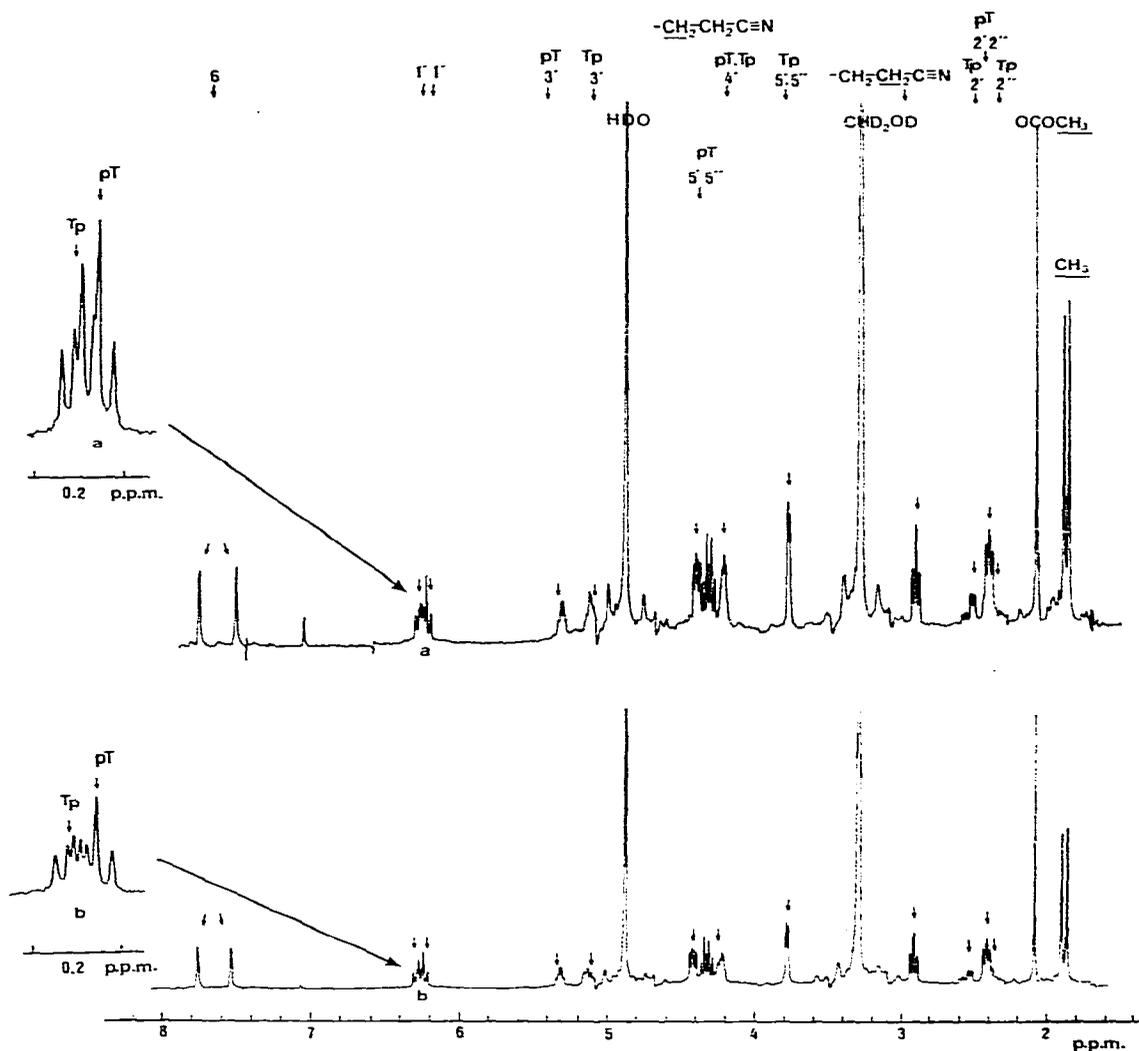
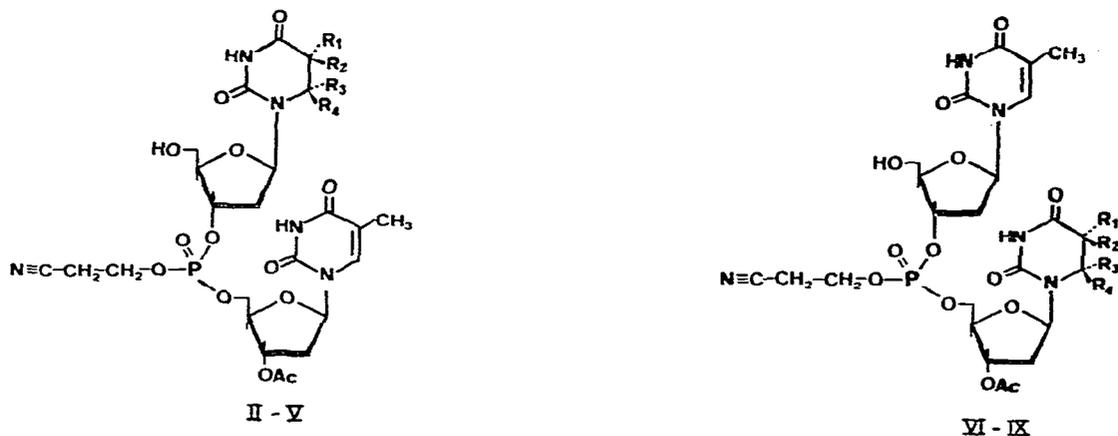


Fig. 3. Spectres de résonance magnétique nucléaire protonique (250 MHz) des diastéréoisomères A (supérieur) et B (inférieur) de I dans le méthanol deutérié.

nelle sur couche mince de gel de silice (Fig. 5) à l'aide des systèmes de solvant préalablement mis au point pour la séparation de déoxy-2'-ribonucléosides<sup>10</sup>. Les triesters modifiés sur le fragment terminal 3' montrent une plus grande mobilité chromatographique que les dérivés correspondant de dégradation en 5' dans les deux solvants I et II (Tableau I). L'accessibilité des fonctions polaires hydroxyles et formamide qui jouent un rôle important dans le comportement chromatographique de II-XI par le biais d'interactions avec les groupements silanols de la phase stationnaire apparaît plus difficile pour les dérivés de modifications en 3' (VI-IX et XI) que pour leurs homologues en 5' (II-V et X). L'examen de modèles moléculaires éclatés de VI-IX et XI montre que la fonction diol ou formamide se trouve à proximité du groupement phosphate lorsque l'aglycone adopte une conformation *anti* préférentielle autour de la



	R <sub>1</sub> =	R <sub>2</sub> =	R <sub>3</sub> =	R <sub>4</sub> =
II, VI	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH
III, VII	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H
IV, VIII	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H
V, IX	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH

Fig. 4. Structure chimique des diastéréoisomères pyrimidiques *cis* et *trans* de la thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (VI-IX) et de la dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (II-V).

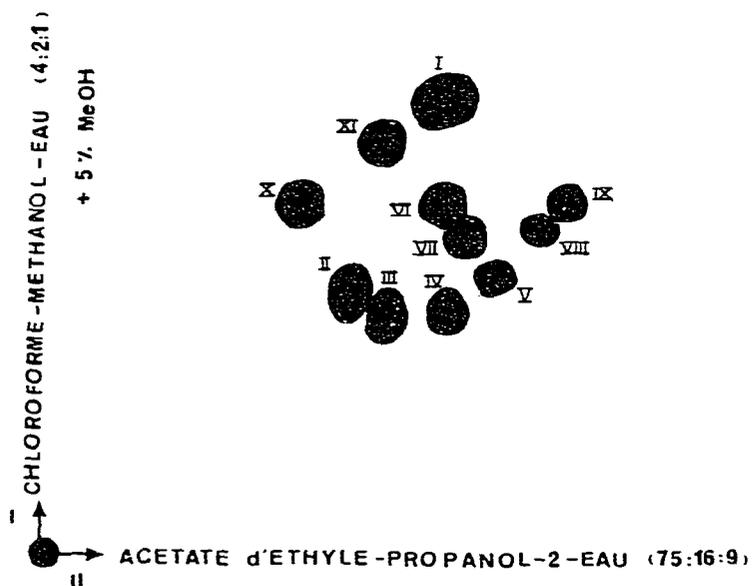


Fig. 5. Séparation bidimensionnelle sur couche mince de silice des principaux dinucléotides radio-induits de I (voir Fig. 4 et Tableau I).

TABLE I

VALEURS DE  $R_F$  DE DINUCLÉOSIDE-MONOPHOSPHATES RADIO-INDUITS

Solvant I = chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5% de méthanol;  
 solvant II = acétate d'éthyle-propanol-2-eau (75:16:9).

Esters cyanoéthyliques	Valeurs de $R_F$	
	Solvant I	Solvant II
Thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (I)	0.67	0.53
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidylyl (5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> )- <i>cis</i> (+) (3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (II)	0.38	0.40
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidylyl (5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )- <i>cis</i> (-) (3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (III)	0.34	0.42
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidylyl (5 <i>S</i> , 6 <i>S</i> )- <i>trans</i> (-) (3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (IV)	0.35	0.53
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidylyl (5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> )- <i>trans</i> (+) (3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (V)	0.40	0.60
Thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> )- <i>cis</i> (+) (VI)	0.51	0.53
Thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )- <i>cis</i> (-) (VII)	0.45	0.56
Thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (5 <i>S</i> , 6 <i>S</i> )- <i>trans</i> (-) (VIII)	0.46	0.66
Thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> )- <i>trans</i> (+) (IX)	0.51	0.70
O-Acétyl-3'-thymidylyl-(5'-3')-N (désoxy-2-β-D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-formamide (X)	0.50	0.34
Thymidylyl-(3'-5')-N (O-acétyl-3-désoxy-2-β-D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-formamide (XI)	0.60	0.46

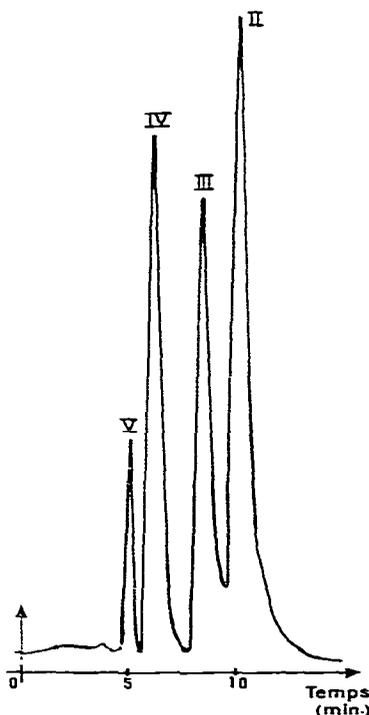


Fig. 6. Séparation des produits II-V sur colonne de silice Partisil 10  $\mu$ m à l'aide du solvant II (débit 1 ml/min).  $k'_{II} = 3.8$ ;  $k'_{III} = 3.0$ ;  $k'_{IV} = 2.0$  et  $k'_V = 1.4$ .

liaison N-glycosylique comme cela a été montré récemment pour les nucléosides correspondants<sup>21</sup>.

Ces analyses sur couche mince ont été transposées en HPLC de partage sur gel de silice Partisil pour le système de solvant II. En particulier les quatre diastéréoisomères des esters cyanoéthylés de la thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymidine (II-VI), sont totalement séparés sur une colonne de Partisil microparticulaire de 10  $\mu\text{m}$  (25 cm  $\times$  4.7 mm) en moins de 15 min (Fig. 6).

## CONCLUSION

Les séparations analytiques sur couche mince de silice des principaux produits de dégradation radio-induite des esters cyanoéthylés de la thymidylyl-(3'-5')-O-acétyl-3'-thymidine (I) peuvent être effectuées à une échelle semi-préparative. L'hydrolyse-alcaline ménagée<sup>11</sup> des triesters phosphoriques ainsi obtenus engendre quantitativement les dinucléoside-monophosphates déprotégés correspondants. L'accessibilité à ces dérivés rend possible l'analyse de leurs propriétés conformationnelles par résonance magnétique nucléaire protonique et l'étude de la spécificité d'exonucléases<sup>22,23</sup> telles que les phosphodiesterases de rate et de venin de serpent.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. Téoule et J. Cadet, *Mol. Biol., Biochem. Biophys.*, 27 (1978) 171. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 171-203.
- 2 G. Scholes, dans S. Y. Wang (Rédacteur), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1976, pp. 521-577.
- 3 J. Cadet et L. Voituriez, *Symposium Radiation Chemistry of DNA and DNA Model Compounds*, Mülheim, Mars 1979, Livre des résumés pp. 65-68.
- 4 K. B. Freeman, P. V. Hariharan et H. E. Johns, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 833.
- 5 D. Lando, J. De Rudder et M. Privat de Garilhe, *J. Chromatogr.*, 30 (1967) 143.
- 6 S. A. Narang et J. J. Michniewicz, *Anal. Biochem.*, 49 (1972) 379.
- 7 P. M. J. Burgers et F. Eckstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 15 (1978) 4798.
- 8 H. J. Fritz, R. Belagaje, E. L. Brown, R. J. Fritz, R. A. Jones, R. G. Lees et H. G. Khorana, *Biochemistry*, 17 (1978) 1257.
- 9 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 10 J. Cadet et R. Téoule, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 407.
- 11 R. L. Letsinger et K. K. Ogilvie, *J. Amer. Chem. Soc.*, 91 (1969) 3350.
- 12 H. Fricke, *Amer. J. Roentgenol.*, 18 (1927) 430.
- 13 J. Cadet et R. Téoule, *Tetrahedron Lett.*, 31 (1972) 3229.
- 14 J. Cadet, J. Ulrich et R. Téoule, *Tetrahedron*, 31 (1975) 2057.
- 15 G. De Boer, P. S. Miller et P. O. P Ts'o, *Biochem.*, 12 (1973) 720.
- 16 R. W. Adamiak, M. Z. Barciszewska, E. Biola, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz et M. Wiewióroski, *Nucleic Acids Res.*, 3 (1976) 3397.
- 17 J. Yano, P. S. Miller, D. Cheng, P. O. P Ts'o et L. S. Kan, *Biophys. J.*, 25 (1979) 222a.
- 18 Cs. Horváth, W. Melander et I. Molnár, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.
- 19 H. Colin et G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 141 (1977) 289.
- 20 G. Scholes, J. F. Ward et J. Weiss, *J. Mol. Biol.*, 2 (1960) 379.
- 21 J. Cadet, R. Ducolomb et F. E. Hruska, *Biochim. Biophys. Acta*, 563 206.
- 22 H. S. Brown et R. Shapiro, *Biochim. Biophys. Acta*, 475 (1976) 241.
- 23 K. K. Ogilvie et F. E. Hruska, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68 (1976) 375.