

MONOMÉRISATION DE LA THYMINE DIMÈRE PAR IRRADIATION DU COMPLEXE THYMINE DIMÈRE-Hg²⁺

G. PERICHET, P. MEALLIER et B. POUYET

Laboratoires de Photochimie, Université Claude Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cédex (France)

M. PETIT-RAMEL et G. THOMAS-DAVID

Laboratoire de Chimie Analytique II, Université Claude Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cédex (France)

(Reçu le 9 mai, 1984; révisé le 28 juin, 1984)

Résumé

La thymine dimère (TD) donne la thymine monomère (TM) de diverses façons, entre autres par irradiation UV ou par photosensibilisation. Dans nos conditions expérimentales nous avons montré l'existence du complexe thymine monomère-Hg²⁺ [Hg(TM)⁺] et du complexe thymine dimère-Hg²⁺ [Hg(TD)]. Ces complexes absorbent à des longueurs d'onde plus grandes que Hg²⁺, TM ou TD. Une irradiation dans la bande d'absorption du complexe dimère [Hg(TD)] conduit au complexe du monomère [Hg(TM)⁺]. Une étude détaillée des complexes [Hg(TM)⁺] et [Hg(TD)] a été réalisée. A cause de la rapidité de la réaction, il est difficile d'en expliquer le mécanisme. Un modèle a été proposé.

Summary

The thymine dimer (TD) gives the thymine monomer (TM) by means of several processes, among which are UV irradiation and photosensitization. For our experimental conditions we have shown the existence of the thymine monomer-Hg²⁺ complex [Hg(TM)⁺] and the thymine dimer-Hg²⁺ complex [Hg(TD)]. These complexes absorb at wavelengths higher than those at which Hg²⁺, TM or TD absorb. Irradiation in the absorption band of the dimer complex [Hg(TD)] gives the monomer complex [Hg(TM)⁺] by breaking of the cyclobutane ring of the dimer. Detailed studies of [Hg(TM)⁺] and [Hg(TD)] complexes have been completed. Because of the fast rate of the reaction it is difficult to explain its mechanism. A model is proposed.

1. Introduction

Le dimère de la thymine (isomère *cis-syn*) absorbe de façon continue en dessous de 260 nm. Ce dimère peut être monomérisé de plusieurs façons: soit par irradiation en dessous de 250 nm pour redonner le monomère qui a une bande d'absorption à 262 nm; soit par photosensibilisation à l'aide de composés qui absorbent à des longueurs d'onde supérieures à 300 nm, c'est-à-dire à des longueurs d'onde bien supérieures à celles absorbées par le dimère [1 - 7]. Rosenthal *et al.* [2] utilisent $K_2Fe(CN)_6$ ou UO_2SO_4 et Lamola [8] le sulfate de 2-anthraquinone. Ces chercheurs montrent que le dimère et le photosensibilisateur ne forment pas de complexes au départ.

Nous avons mis au point une nouvelle méthode de monomérisation des dimères à partir de complexes thymine dimère- Hg^{2+} . Ces complexes thymine dimère- Hg^{2+} ont une bande d'absorption fortement décalée vers les grandes longueurs d'onde et une irradiation dans cette bande conduit au complexe thymine monomère- Hg^{2+} .

2. Détails expérimentaux

Dans la suite du texte, nous appellerons la thymine monomère (déprotoné une fois) TM, la thymine dimère (déprotoné deux fois) TD et l'ion mercurique Hg^{2+} simplement Hg.

La thymine monomère est un produit Merck (pureté, 99%). La thymine dimère a été préparée par irradiation d'une solution gelée de thymine monomère dans l'eau à la concentration de 10^{-3} M et à une température de -10 °C. L'irradiation a lieu à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure 150 W; les solutions sont ensuite évaporées à sec puis le résidu est dissous dans l'eau bouillante et filtré. Le filtrat est concentré et les cristaux de dimère apparaissent avant ceux du monomère résiduel. Shih Yi Wang [9] a montré que seul l'isomère *cis-syn* est synthétisé par cette méthode (Fig. 1).

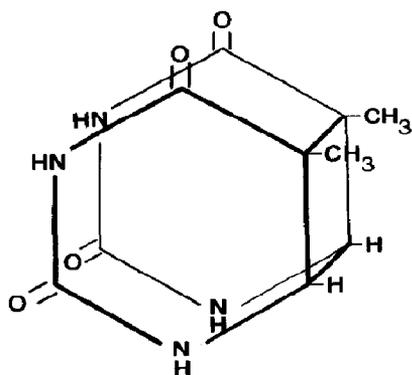


Fig. 1. Molécule thymine dimère (isomère *cis-syn*).

3. Complexe entre la thymine monomère, la thymine dimère et le cation Hg^{2+} : spectres d'absorption

De nombreux chercheurs [10 - 12] ont montré qu'il était possible de mettre en évidence des complexes entre la thymine monomère et les cations métalliques (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ...). Davidson et collègues [13, 14] ont étudié les liaisons thymine monomère- Hg^{2+} . Ils ont mis en évidence un complexe stable: ils supposent la formation du complexe $[\text{Hg}(\text{TM})_2]$.

Nous avons réalisé une étude analytique des complexes [15]. Ces études analytiques montrent (Tableaux 1 et 2) que de nombreux complexes peuvent se former entre la thymine monomère, la thymine dimère et Hg^{2+} . La concentration de ces différents complexes évolue suivant le pH et la concentration du ligand et du métal. En ce qui concerne notre étude photochimique, nous avons choisi un pH et des concentrations où pratiquement une seule espèce de complexe existe. Une étude spectroscopique des différentes espèces présentes est nécessaire.

On a regroupé dans un tableau (Tableau 3) et sur une figure (Fig. 2) les résultats spectroscopiques concernant le mercure sous forme $\text{Hg}(\text{ClO}_4) 2 \times 10^{-3}$ M, TM 10^{-4} M, pH 6,5, non déprotoné et TD 10^{-4} M, pH 6,5, non déprotoné. Le mélange de thymine monomère TM 10^{-4} M et de cation $\text{Hg}^{2+} 2 \times 10^{-3}$ M à pH 3,02 montre l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption dont le maximum est à 270 nm. Or les études analytiques montrent que dans ces conditions seul le complexe $[\text{Hg}(\text{TM})^+]$ existe avec une concentration de $8,9 \times 10^{-5}$ M. Ce complexe est formé par l'association du monomère déprotoné une fois TM et du cation Hg^{2+} . Le mélange de thymine dimère TD 10^{-4} M et de cation $\text{Hg}^{2+} 2 \times 10^{-3}$ M à pH 3,02 montre un fort déplacement de l'absorption vers les grandes longueurs d'onde sans toutefois

TABLEAU 1

Concentration des différentes espèces thymine monomère- Hg^{2+} absorbant en-dessus de 250 nm en fonction du pH

pH	$[\text{Hg}(\text{TM})^+]$ ($\times 10^5$ M)	$[\text{Hg}(\text{TM})_2]$ ($\times 10^6$ M)	TM	$[\text{H}(\text{TM})]$ ($\times 10^6$ M)
3,02	8,90	1,30	0	8,00
3,22	9,10	1,56	0	5,80
3,42	9,18	1,88	0	4,40
3,62	9,18	2,35	0	3,80
3,82	9,11	3,04	0	2,80
4,02	8,95	4,00	0	2,40
4,22	8,69	5,46	0	2,10
4,42	8,33	7,40	0	1,90
4,62	7,40	9,00	0	1,61
4,82	6,50	13,00	0	1,53
5,02	5,80	16,00	0	1,54

Toutes les concentrations sont en mole par litre. Les concentrations initiales avant mélange sont les suivantes: TM, 10^{-4} M; Hg^{2+} , 2×10^{-3} M.

TABLEAU 2

Concentrations des différentes espèces thymine dimère-Hg²⁺ absorbant en-dessus de 250 nm en fonction du pH

pH	[Hg(TD)] ($\times 10^{-5}$ M)	[HgH ⁻ (TD)]
3,02	9,2	0
3,22	9,6	0
3,42	9,8	0
3,62	9,9	0
3,82	9,9	0
4,02	10,0	0
4,22	10,0	0
4,42	10,0	0
4,62	10,0	0
4,82	9,9	0
5,02	9,8	0

Toutes les concentrations sont en mole par litre. Les concentrations initiales avant mélange sont les suivantes: TD, 10^{-4} M; Hg²⁺, 2×10^{-3} M.

TABLEAU 3

Résultats spectroscopiques

Complexe	Concentration dans l'eau, pH 3,02	Longueur d'onde d'absorption (nm)	Densité optique	Coefficient d'absorption sous 1 cm
Hg(ClO ₄) ₂	2×10^{-3} M	Spectre continu pour $\lambda < 260$ nm	0,24 à 230 nm	1200 à 230 nm
TM	10^{-4} M	Maximum à 262 nm		7600 à 262 nm
TD	10^{-4} M	Spectre continu pour $\lambda < 270$ nm	0,15 à 230 nm	1500 à 230 nm
[Hg(TM) ⁺]	$8,9 \times 10^{-5}$ M	Maximum à 270 nm		7500 à 270 nm
[Hg(TD)]	$9,2 \times 10^{-5}$ M	Spectre continu pour $\lambda < 300$ nm		Voir Tableau 4

de maximum. L'absorption commence en dessous de 300 nm (pour le dimère seul et le mercure seul, elle ne commence qu'au-dessus de 260 nm).

L'étude de l'évolution de l'absorption à 270 nm en fonction du pH comparée aux valeurs trouvées par voie analytique [15] montre qu'il s'agit dans ces conditions uniquement du complexe [Hg(TD)] avec une concentration de $9,2 \times 10^{-5}$ M. Ce complexe est formé par l'association du dimère déprotoné deux fois TD et du cation Hg²⁺. Le Tableau 4 donne les valeurs du coefficient d'absorption moléculaire de [Hg(TD)] en fonction de la longueur d'onde.

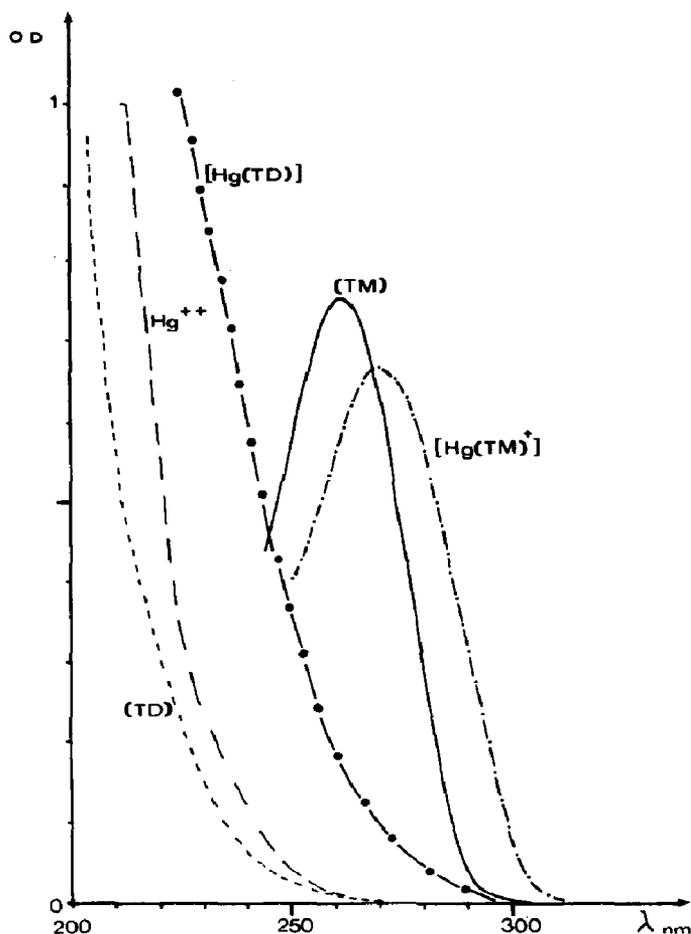


Fig. 2. Spectres d'absorption des complexes suivants dissous dans l'eau avec les concentrations données: Hg^{2+} , 2×10^{-3} M; TM, 10^{-4} M; TD, 10^{-4} M; $[\text{Hg}(\text{TM})^+]$, $8,9 \times 10^{-5}$ M; $[\text{Hg}(\text{TD})]$, $9,2 \times 10^{-5}$ M.

TABLEAU 4

Coefficient d'absorption moléculaire de $[\text{Hg}(\text{TD})]$ en fonction de la longueur d'onde

λ (nm)	300	290	280	270	260	250	240	230
ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}^1$)	0	217	235	976	1956	3804	6521	9565

4. Irradiation du complexe $[\text{Hg}(\text{TD})]$

La solution précédente qui contient le complexe $[\text{Hg}(\text{TD})]$ est irradiée à l'aide d'une lampe à arc concentré dans le xénon 450 W, suivie d'un monochromateur Bausch et Lomb type Haute Intensité réglé à 280 nm. Ainsi seul le complexe $[\text{Hg}(\text{TD})]$ absorbe cette lumière, puisque le mercure (sous

forme de $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ et le dimère seul (TD) n'absorbent qu'en dessous de 260 nm.

On voit rapidement évoluer le spectre d'absorption de la solution irradiée (Fig. 3), et au bout de 50 min d'irradiation on obtient entre le spectre final (noté 6) et le spectre initial de $[\text{Hg}(\text{TD})]$ (noté 1) un spectre (noté 7) qui est très comparable au spectre du complexe $[\text{Hg}(\text{TM})^+]$, avec un maximum vers 270 nm.

Pour confirmer ce fait, nous avons réalisé une chromatographie liquide haute performance des solutions avant et après irradiation. Nous avons bien obtenu le pic correspondant à la thymine monomère.

Nous avons irradié le dimère TD seul à pH 10. A ce pH, le dimère est déprotoné deux fois (position N(3)) et le spectre d'absorption est légèrement décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à TD non déprotoné

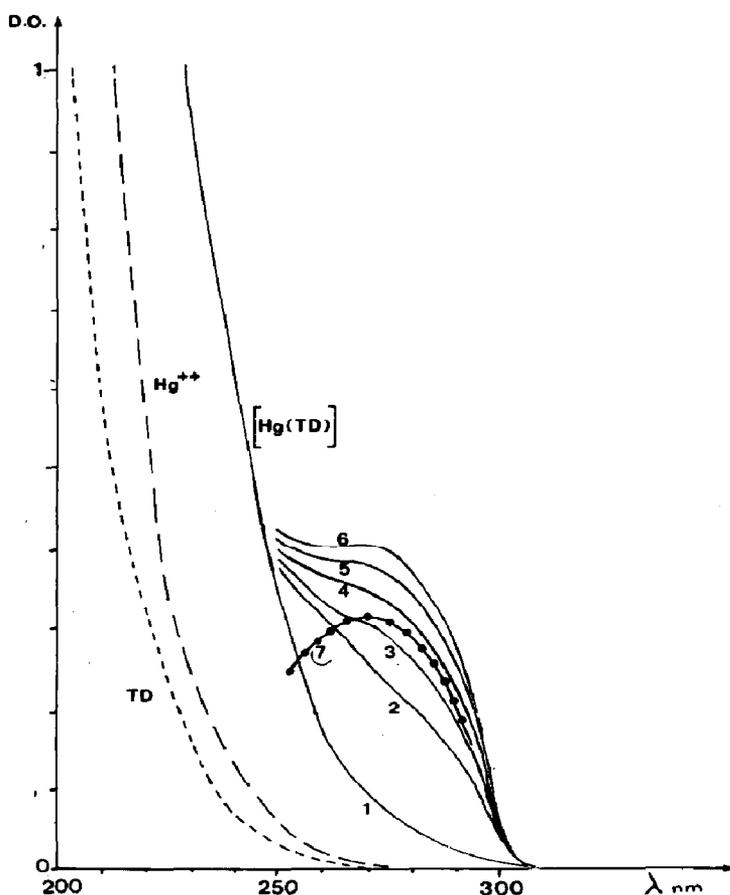
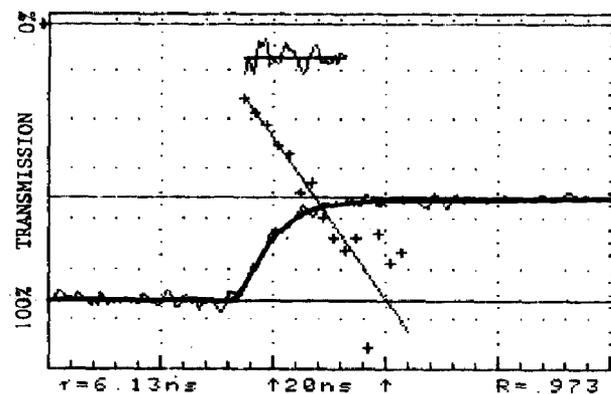
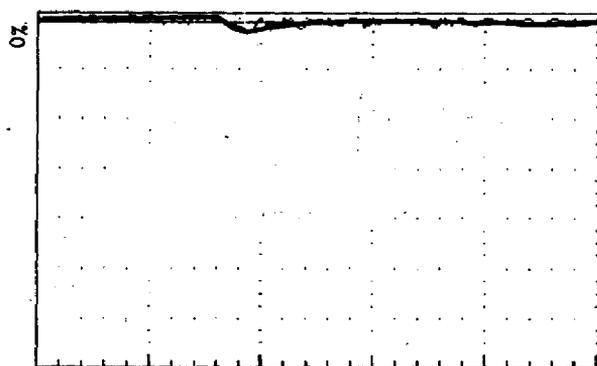


Fig. 3. Variations du spectre d'absorption de $[\text{Hg}(\text{TD})]$ par irradiation à 280 nm (pH = 3,02): spectre 1, avant irradiation; spectre 2, après 10 min d'irradiation; spectre 3, après 20 min d'irradiation; spectre 4, après 30 min d'irradiation; spectre 5, après 40 min d'irradiation; spectre 6, après 50 min d'irradiation; spectre 7, différence entre les spectres 6 et 1. Le maximum du spectre 7 est situé à 270 nm (il est corrigé de la disparition de $[\text{Hg}(\text{TD})]$).

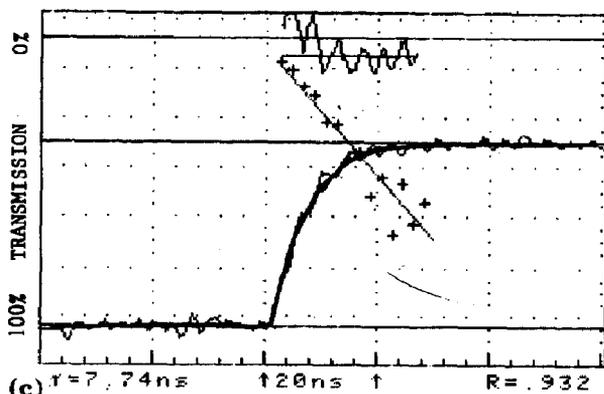
à pH = 6,5. L'absorption commence à 280 nm (au lieu de 260 nm pour TD à pH = 6,5). L'irradiation de TD à pH 10 à 280 nm (et même à 270 nm) dans les mêmes conditions que pour le complexe [Hg(TD)] ne provoque pas la formation du monomère.



(a) $\lambda = 280 \text{ nm}$



(b)



(c) $\tau = 7.74 \text{ ns}$

Fig. 4. (a) Cinétique d'absorption d'une solution de [Hg(TD)] par spectroscopie laser. (b) "Fluorescence" ou toute autre émission ou lumière diffractée du laser à 280 nm. (c) Montée de l'absorption triplet-triplet de la benzophénone à 530 nm.

5. Etude du phénomène par spectroscopie laser

Bonneau[†] a bien voulu étudier la réaction par spectroscopie laser. Des impulsions laser de 200 ps à 266 nm sont envoyées sur la solution précédente contenant le complexe [Hg(TD)]. On note les résultats suivants (Figs. 4 et 5).

(1) Il y a apparition d'une bande d'absorption correspondant à celle de [Hg(TM)⁺]. La montée de l'absorption de [Hg(TM)⁺] se fait avec une "constante de temps" de 6 à 7 ns. Cette constante de temps est essentiellement due au temps de réponse du système. En effet, le résultat est identique pour la benzophénone dont on sait que la constante de temps de formation du triplet est *inférieure à 1 ns*. Donc la formation de [Hg(TM)⁺] se fait avec une constante de temps très courte, inférieure à 5 ns. De plus, il n'y a pas d'autre absorption; on ne peut rien dire sur la formation d'éventuelles espèces intermédiaires.

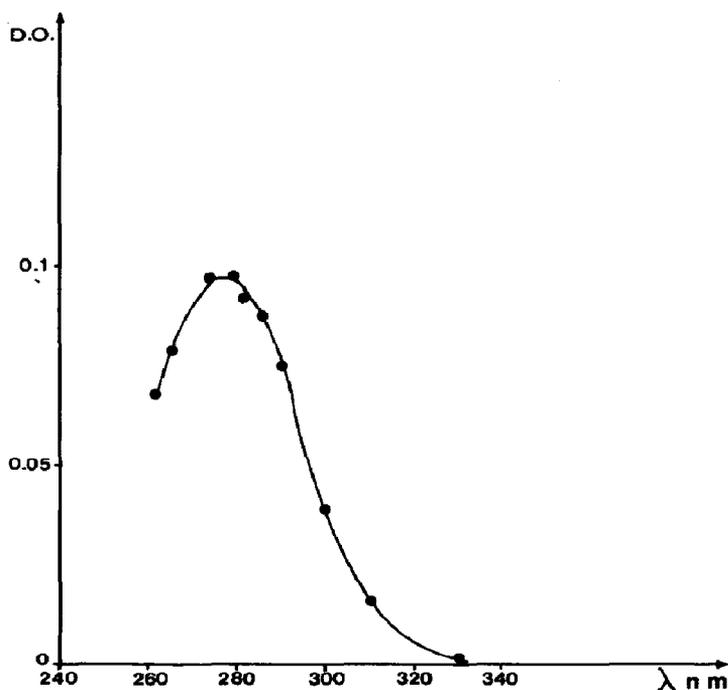


Fig. 5. Variations de densité optique mesurées 100 ns après excitation par une impulsion laser de 200 ps à 266 nm. L'espèce correspondant à ce spectre est formée en moins de 10 ns et reste stable. Le spectre réel devrait être corrigé de la légère disparition de [Hg(TD)], ce qui aurait tendance à déplacer légèrement le maximum vers les courtes longueurs d'onde. Ce spectre correspond bien à celui de [Hg(TM)⁺].

[†] Nous remercions R. Bonneau, Laboratoire de Chimie Physique, Université de Bordeaux I, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cédex, France, pour l'aide qu'il nous a apportée.

(2) Le spectre d'absorption (Fig. 5) est réalisé en effectuant une série de mesures aux différentes longueurs d'onde. Pour chacune, on mesure l'augmentation de la densité optique entre 100 et 200 ns après l'excitation (on a alors atteint le "plateau", puisque l'espèce se forme en moins de 20 ns). On mesure aussi l'intensité du laser qui change légèrement de coup à coup. Les variations de densité optique sont normalisées à une énergie d'excitation constante. Ce spectre montre un maximum à 276 nm, mais il n'est pas corrigé de la disparition de [Hg(TD)], ce qui aurait tendance à déplacer légèrement le maximum vers les courtes longueurs d'onde.

6. Discussion

Nous avons mis en évidence la formation de [Hg(TM)⁺] par irradiation du complexe [Hg(TD)]:

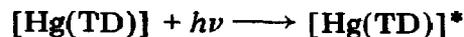


Cette réaction consiste à casser le cycle cyclobutane du dimère, en irradiant le complexe [Hg(TD)] à une longueur d'onde qu'il absorbe (280 nm) mais que n'absorbe pas le dimère seul. Cette réaction ressemble au processus de restauration de l'acide désoxyribonucléique irradié à l'aide d'enzyme de photoréactivation [5, 7, 16].

A cause de la constante de temps très courte de la réaction, il n'a pas été possible de mettre en évidence des espèces intermédiaires.

Roth et Lamola [6] ont étudié le processus de monomérisation du dimère de la 1,3 diméthyl thymine à l'aide de photosensibilisateurs et en utilisant la méthode de polarisation nucléaire de spin. Ils mettent en évidence un complexe formé par une paire d'ions radicaux (A⁻, radical du sensibilisateur; DMT⁺, radical de la 1,3 diméthyl thymine monomère), mais ils n'expliquent pas la cassure du dimère qui a lieu préalablement et, comme dans la réaction qui nous concerne, trop rapidement.

Il semble que la réaction de monomérisation ait lieu directement à partir du complexe [Hg(TD)] avec une très grande constante de vitesse, certainement dans la cage formée par le dimère et l'ion Hg²⁺. On peut supposer que le mécanisme le plus probable est identique à celui proposé par Rosenthal *et al.* [2] lors de la monomérisation des dimères de thymine photosensibilisés par UO₂SO₄. On aurait alors dans notre cas



Comme nous l'avons montré ci-dessus, rien ne permet de vérifier ce schéma.

Références

- 1 A. Wachter et H. Delleweg, *Photochem. Photobiol.*, 3 (1964) 369.
- 2 I. Rosenthal, M. Rao et J. Salomon, *Biochim. Biophys. Acta*, 378 (1975) 165.
- 3 A. A. Lamola, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 813.
- 4 I. Rosenthal et D. Elad, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32 (1968) 599.
- 5 C. Helene et M. Charlier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43 (1971) 252.
- 6 H. D. Roth et A. A. Lamola, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 1013.
- 7 C. Helene, M. Charlier, J. J. Toulme et F. Toulme, dans P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg et C. F. Fox (éds.), *DNA Repair Mechanisms*, Academic Press, New York, 1978.
- 8 A. A. Lamola, *Mol. Photochem.*, 4 (1972) 107.
- 9 Shih Yi Wang, *Photochem. Photobiol.*, 3 (1964) 395.
- 10 J. Shack et B. Bynum, *Nature (London)*, 84 (1959) 635.
- 11 G. Felsenfeld et S. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 234.
- 12 G. Zubay et P. Doty, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 47.
- 13 T. Yamane et N. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 2599.
- 14 R. Ferreira, F. Ben-Zui, T. Yamane, J. Vasilevskis et N. Davidson, dans S. Kirschner (éd.), *Advances in Coordination Compounds*, MacMillan, New York, 1961, p. 457.
- 15 M. Petit-Ramel, G. Thomas-David, G. Perichet et B. Pouyet, *Can. J. Chem.*, 61 (1) (1984) 22.
- 16 C. Helene et M. Charlier, *Biochimie*, 60 (1978) 1110.