

IRRADIATION GAMMA de la THYMIDINE en SOLUTION AQUEUSE AEREE

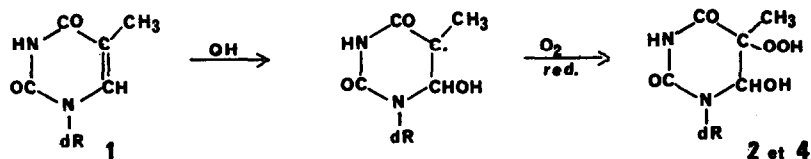
Jean CADET et Robert TEOULE

Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie
 Centre d'Etudes Nucléaires, BP 85 Centre de Tri, 38041 - GRENOBLE FRANCE -
 (Received in France 23 June 1972; received in UK for publication 25 June 1972)

Les principaux effets biologiques des radiations ionisantes sont liés à des modifications chimiques du matériel génétique [1,2]. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'étude de la radiolyse gamma de la thymidine **1** en milieu aqueux et aéré (pH 6) que nous présentons dans cette note et qui fait suite aux travaux concernant les bases pyrimidiques [3]. La nucléoside (10^{-3} M) est soumis à l'action des rayons γ du ^{60}Co (8000 rads/mn) à 16°C . Les produits de radiolyse formés par absorption de doses comprises entre 150 et 810 Krads sont séparés par chromatographie préparative (Tableau I).

Produits de radiolyse résultant de l'hydroxylation du cycle pyrimidique

L'interaction du rayonnement γ avec les molécules d'eau se traduit par la formation d'espèces actives dont les principales sont : H^\bullet , OH^\bullet et e_{aq}^- ; en milieu oxygéné et pour la concentration en thymidine utilisée, seuls les radicaux OH participent au découplage de la liaison 5,6 éthylénique selon le schéma proposé par WEISS et SCHOLLES [4], LATARJET [5].



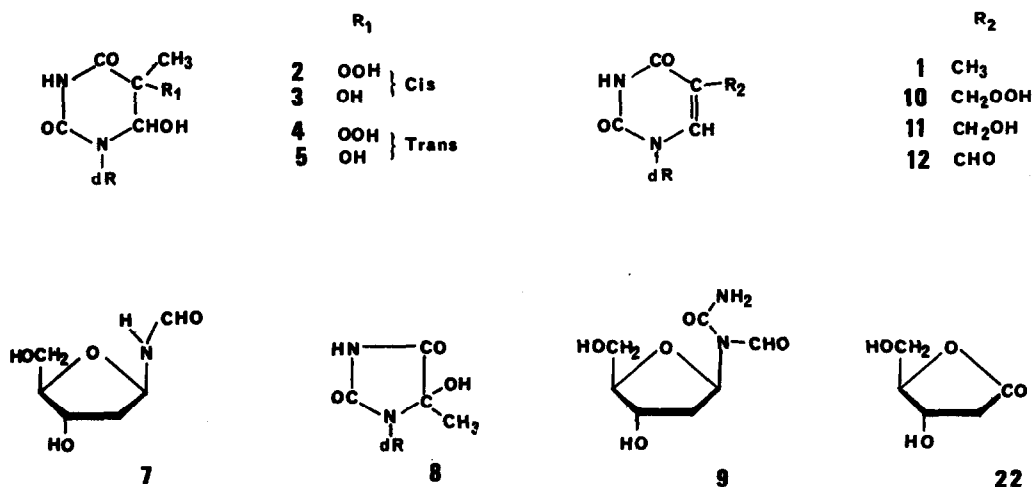
dR = Désoxy-2'- β -D ribofuranosyl

Les radicaux hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidyle-5 [6] sont stabilisés par O_2 ou par l'oxygène moléculaire pour donner naissance aux peroxydes correspondants. La présence d'une asymétrie moléculaire au niveau de la partie osidique fait apparaître une diastéréoisomérie pour chacun des dérivés nucléosidiques d'addition 5-6. Ainsi, les deux formes cis 5R,6S et 5S,6R de l'hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine *d* et *l* **2**^{*} ont pu être isolées et caractérisées. En solution aqueuse, les peroxydes sont instables et la transformation quantitative en diol 5,6 **3** avec rétention de configuration se fait vraisemblablement selon un processus hydrolytique non radicalaire du type $\text{S}_{\text{N}}2$ au niveau de l'oxygène; ce mécanisme est en parfait accord avec les données récentes relatives à la faible chaleur d'activation nécessaire à la dégradation des hydroxyhydroperoxydes de thymine en milieu aqueux [7].

Les deux hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans^{*} 5S,6S et 5R,6R *d* et *l* **4** présentent des propriétés similaires et en particulier se transforment quantitativement en solution aqueuse en glycol *d* et *l* **5** avec conservation de la configuration absolue initiale.
^{*} L'Étude de la configuration absolue aux Rayons X de ces substances est en cours.

La prédominance de ces deux peroxydes sur les formes *cis* correspondantes *d* et *l* **3** (Tableau 1) est à relier à l'addition radicalaire préférentiellement *trans* observée généralement sur les alcènes. La comparaison des propriétés chimiques des hydroxyhydroperoxydes de thymine [37] et de celles de leurs dérivés désoxyribosidiques laissent apparaître des différences importantes ; en particulier, il est à noter l'absence, dans le processus de dégradation thermique de ces nucléosides, de réactions conduisant à l'ouverture du cycle pyrimidique au niveau 5,6 et à la transformation en acide désoxy-2'- β -D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [87]. Ce dérivé n'a pas été retrouvé dans le milieu d'irradiation. Ces mêmes peroxydes, sous l'action du rayonnement γ , donnent lieu, en partie, à la formation de pyruvamide **6** qui a pu être caractérisé sous forme de dinitrophénylhydrazone et à la désoxy-2'- β -D ribofuranosyl-1 formamide. Les quatre formes isomères possibles de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *d* et *l* **3, 5** résultent en grande partie de la transformation des hydroxyhydroperoxydes correspondants *d* et *l* **2, 4** induite par les radicaux libres issus de l'irradiation sans toutefois exclure totalement la possibilité d'une homolyse de la double liaison 5,6 pyrimidique de la thymidine par deux radicaux OH. Ces diols 5,6 importants quantitativement et qui présentent une grande stabilité chimique, liée à une faible réactivité vis à vis des radicaux hydroxyles, peuvent jouer un rôle notable en radiobiologie.

Des réactions de réarrangement du cycle pyrimidique sont aussi observées; les deux diastéréoisomères 5R et 5S^x de la désoxy-2'- β -D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne *d* et *l* **8** ont pu être isolés en faibles quantités et caractérisés. Il en est de même pour la désoxy-2'- β -D ribofuranosyl-1N formyl-N urée **9**.



dR = Désoxy-2'- β -D ribofuranosyl

TABLEAU I - Produits de radiolyse gamma de la thymidine en solution aqueuse aérée 10^{-3} M à pH 6 et à 16°C.

SUBSTANCES	RF _A	RF _B	G
1 Thymidine	0,37	0,52	-1,92
2 Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis <i>d</i>	0,17	0,38	0,044
- Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis <i>l</i>	0,15	0,47	0,048
3 Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine cis <i>d</i>	0,18	0,31	0,092
- Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine cis <i>l</i>	0,12	0,32	0,096
4 Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans <i>d</i>	0,18	0,70	0,070
- Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans <i>l</i>	0,16	0,60	0,130
5 Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine trans <i>d</i>	0,15	0,53	0,154
- Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine trans <i>l</i>	0,13	0,43	0,134
6 Pyruvamide	0,62	0,84	0,490
7 Désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 formamide	0,20	0,24	0,380
8 Désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne <i>d</i>	0,25	0,57	0,025
- Désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne <i>l</i>	0,29	0,61	0,025
9 Désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 formyl-N urée	0,33	0,61	0,100
10 Hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine	0,24	0,50	0,031
11 Hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine	0,23	0,35	0,044
12 Formyl-5 désoxy-2' uridine	0,33	0,62	0,046
13 Thymine	0,55	0,66	0,144
14 Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine trans	0,21	0,78	0,032
15 Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis	0,20	0,46	0,030
16 Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine trans	0,17	0,61	0,045
17 Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique	0,34	0,77	0,016
18 Formyl-N pyruvyl-N' urée	0,59	0,94	0,028
19 Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne	0,32	0,82	0,039
20 Formyl urée	0,54	0,68	0,010
21 Acétylurée	0,58	0,69	0,026
22 δ Désoxy-2' ribonolactone	0,37	0,64	0,120

Chromatographie sur couche mince de silice MN-S-HR (Macherey Nagel)

A : Chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol

B : Acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9)

G : Nombre de molécules détruites ou formées pour une absorption de 100 eV. pour une dose d'irradiation de 200.000 rads (débit de dose : 8000 rads/minute).

L'attaque radicalaire au niveau du méthyle juxtanucléaire est un processus secondaire ; elle se traduit par la formation du radical (désoxy-2'- β -D ribofuranosyl-1 uracyl)-5 méthyle qui conduit après intervention de l'oxygène à l'hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine **10**. Ce peroxyde est relativement stable à l'état sec (1/2 vie \approx 6 jours) ; il se dégrade plus rapidement en milieu aqueux et engendre principalement l'hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine **11** et la formyl-5 désoxy-2' uridine **12**. La présence de ce dernier composé dans le milieu d'irradiation s'explique par la transformation pratiquement totale sous rayonnement de l'hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine **10** en ce dérivé aldéhydique.

Produits de radiolyse résultant de la rupture de la liaison N-glycosidique

La thymine **13** est le produit quantitativement le plus important des dérivés de rupture de la liaison N-glycosidique. L'hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine trans **14**, les isomères cis et trans de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine **15**, **16**, l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique **17**, la formyl-N glyoxyl-N' urée **18**, l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne **19**, la formyl urée **20**, l'acétylurée **21** et la formyl-5 uracile (traces) ont pu être isolés et caractérisés par comparaison de leurs Rf chromatographiques, de leurs spectres IR, RMN et de masse avec ceux des produits témoins /37. La plupart de ces produits résultent à la fois d'une dégradation sous rayonnement de la thymine libérée et de la rupture de la liaison C-N des nucléosides transformés (glycol, formyl-5 désoxy-2' uridine, ...).

La présence de la δ désoxy-2' D ribonolactone **22** a pu être décelée et confirmée par la synthèse chimique (action du brome sur le désoxy-2'-D-ribose). RMN : (DMSO, TMS) δ CH₂ (m) 3,55 ; H₂' (q) 2,83 ppm ; JH₂' H₃' = 6 cps ; H₂" (q) 2,19 ppm ; JH₂" H₃" = 2,6 cps. IR : $\nu_{C=O}$ 1770 cm⁻¹. Spectre de masse : (M⁺) C₅H₈O₄.

Bibliographie

- /17 Progress in Nucleic Acid Research, Ed. DAVIDSON et COHN, Academic Press (LONDON)
A. WACKER 1 (1969) 369 ; J.J. WEISS 3 (1964) 103 ; D.T. KANAZIR 9 (1969)
- /27 E. FREESE - Angew Chem. Internat. Edt. 8 (1969) 12
- /37 R. TEOULE et J. CADET - Chem. Comm. 20 (1971) 1269
Biochim. Biophys. Acta 238 (1971) 8
J. of Chromatog. 43 (1969) 368
C.R. Acad. Sc. PARIS D, 268 (1969) 2501
Bull. Soc. Chim. FRANCE 3 (1970) 927
C.R. Acad. Sc. PARIS, C, 270 (1970) 362
- J. ULRICH, R. TEOULE, R. MASSOT et A. CORNU, Org. Mass. Spectr. 2 (1969) 1183
- /47 G. SCHOLLES et J. WEISS - Nature 185 (1960) 305
- /57 R. LATARJET, B. EKERT, S. APELGOT et N. REBEYROTTE - J. Chem. Phys. 58 (1960) 1046
- /67 H. DERTINGER et C. NICOLAU - Biochim. Biophys. Acta 199 (1970) 316
- /77 M.C. SCHWEIBERT et M. DANIELS - Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3 (1971) 353
- /87 J. CADET et R. TEOULE - C.R. Acad. Sc. PARIS C, 271 (1970) 2632
- /97 Nous remercions Mmes VOITURIEZ et GEORGES, Mlle POUCHOT pour leur collaboration technique.