

SYNTHÈSE des PRODUITS de RADIOLYSE de la THYMIDINE

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)

L'identification des produits de radiolyse γ de la thymidine **1** en solution aqueuse aérée est décrite dans un précédent mémoire 17. La synthèse chimique de ces nucléosides modifiés que nous présentons ici a permis de confirmer leur structure.

Les peroxydes de thymine ont été obtenus par différentes voies 2,37. La réaction de substitution de l'halogène de la bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine trans par l'ion perhydroxyle 37 a pu être transposée avec succès aux dérivés nucléosidiques. Les deux formes diastéromères trans *d* et *l* de la bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine **25** sont préparées par addition de brome à une solution aqueuse de thymidine **1** 47 alors que les iodo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans *d* et *l* **26** sont synthétisées selon une extension de la méthode de LIPKIN et coll. 57 : 600 mg de N-iodosuccinimide sont ajoutées à 240 mg de thymidine dissous dans 100 ml de diméthylsulfoxyde renfermant 100 μ l d'acide trifluoracétique et 1 ml d'eau. La disparition de la thymidine est totale au bout de 15 heures. Après évaporation à sec du milieu réactionnel, les deux iodohydrines trans *d* et *l* **26** sont séparées sur couche mince de silice à l'aide du solvant A 17.

Iodo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans *d* **26** (45 %) ($\alpha_D^{25} + 45,6^\circ$ (c 0,82, CH₃OH),
IR : $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1701 cm⁻¹ (C=O), RMN : (CD₃OD, TMS) δ CH₃(s) 2,13 ; H₆(s) 5,31 ; H₁' (pseudo triplet) 6,25 ppm, largeur 13,5 cps.

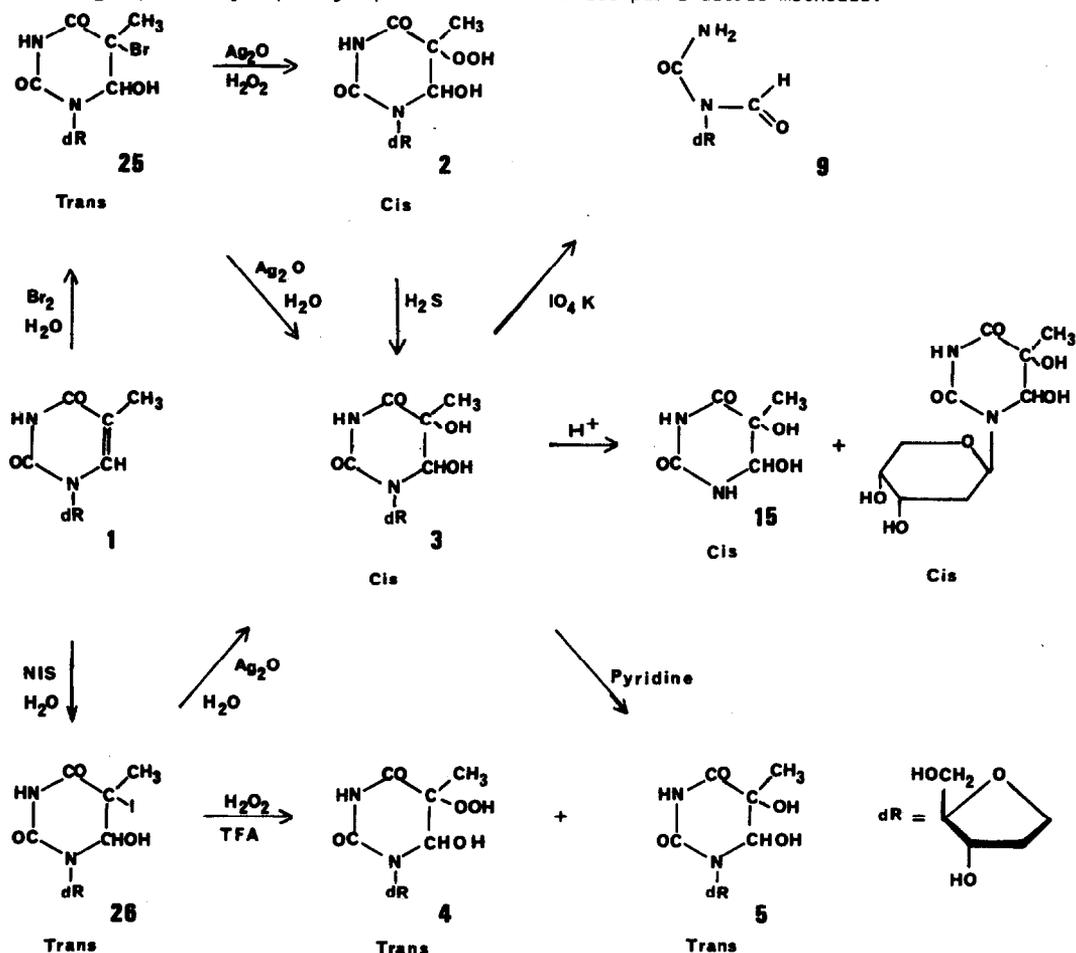
Iodo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans *l* **26** (32 %) ($\alpha_D^{25} - 31^\circ$ (c 0,67, CH₃OH),
IR : $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1701 cm⁻¹ (C=O), RMN : (CD₃OD, TMS) δ CH₃(s) 2,07 ; H₆(s) 5,40 ; H₁' (pseudo triplet) 6,03 ppm, largeur 14,6 cps.

L'halohydrine dextrogyre **25** ou **26** (X = Br : 136 mg ; X = I : 156 mg) en solution 2.10⁻² M dans 20 ml d'eau oxygénée à 55 volumes est laissée en contact pendant 10 mn à 0°C avec 250 mg d'oxyde d'argent. L'hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis *d* **2** formé (40 %) par substitution de l'halogène selon un mécanisme préférentiellement SN₂ (réaction sensible au pouvoir nucléophile du substituant) est isolé par chromatographie préparative sur couche mince de silice à l'aide du solvant B 17. Il est à noter la présence dans le milieu réactionnel de dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine cis *d* **3** (40 %) et de traces de l'isomère trans *l* (*vide infra*).

Hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis *d* **2**. IR : $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1702 (C=O, 1050, 1089 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,50 ; H₆(s) 5,31 ppm.

L'hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis *l* **2** est obtenu avec un rendement de 35 % à partir des halohydrines trans *l* **25** et **26** dans les conditions précitées. IR : $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1703 (C=O), 1051, 1080 cm⁻¹ (C-OH), RMN (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,50 ; H₆(s) 5,37 ppm.

La préparation des deux hydroperoxydes *trans d* et *l* **4** a été effectuée à partir des formes *trans* de la iodo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine **26** dont l'atome d'iode est très réactif. Pratiquement, 100 mg de iodo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine *trans d* **26** sont dissous dans 20 ml d'eau oxygénée à 30 % renfermant 30 μ l d'acide trifluoroacétique concentré. La réaction se poursuit pendant 15 heures à température ambiante et après chromatographie sur couche mince à l'aide du solvant A, on obtient 35 % d'*hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans l* **4**. IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1702 cm^{-1} (C=O), RMN : (CD_3OD , TMS) δ $\text{CH}_3(\text{s})$ 1,54 ppm. Pour ces divers composés, la position du groupement hydroperoxydique doit être vérifiée par d'autres méthodes.



Dans les mêmes conditions, on recueille à partir de l'iodohydrine *trans l* **26**, l'*hydroxy-6 hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans d* **4**. IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1702 cm^{-1} (C=O), RMN : (CD_3OD , TMS) δ $\text{CH}_3(\text{s})$ 1,55 ppm.

L'hétérolyse de la liaison peroxidique par un courant gazeux d' H_2S ou par l'iodure de potassium en solution aqueuse s'effectue avec rétention de configuration selon un mécanisme $\text{S}_{\text{N}}2$ au niveau de l'oxygène et engendre quantitativement l'alcool de même configuration absolue.

Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine cis d 3 - $(\alpha)_D^{25} + 8,4^\circ$ (c 0,75, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1703 (C=O), 1090, 1051 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,41 ; H₆(s) 5,01 ; H₁' (pseudo triplet) 6,13 ppm, largeur 14,4 cps. Spectrométrie de masse du dérivé diacétylé en 3'5' C₁₄H₂₀O₉N₂ (M⁺).

Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine cis l 3 - $(\alpha)_D^{25} - 5,0^\circ$ (c 0,66, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1703 (C=O); 1090, 1051 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,41 ; H₆(s) 5,02 ; H₁(q) 6,00 ppm, largeur 14,3 cps. Spectrométrie de masse du dérivé diacétylé en 3' 5' : C₁₄H₂₀O₉N₂ (M⁺).

La configuration cis de ces dérivés a pu être confirmée : l'oxydation stéréospécifique de la thymidine avec KMnO₄ en milieu aqueux conduit à la formation de l'acide désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique **27** /67 et au mélange des diols cis *d* et *l* **3** qui n'avait pas encore été résolu /7,87.

Le chauffage de ces glycols cis dans la pyridine pendant 4 heures à 90°C entraîne leur transformation partielle en isomère trans. On obtient avec un rendement de 40 % à partir du diol cis *d* **3**, par épimérisation au niveau du carbone 5 : la *dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine trans l 5*. $(\alpha)_D^{25} - 12,7^\circ$ (c 0,80, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1702 (C=O), 1060 cm⁻¹ (C-OH), RMN (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,44 ; H₆(s) 5,01 ; H₁' (pseudo triplet) 6,11 ppm, largeur 14 cps.

A partir de l'isomère cis *l* **3**, la même spécificité est retrouvée pour la préparation de la *dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine trans d 5*. $(\alpha)_D^{25} + 41,2^\circ$ (c 0,78, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1702 (C=O), 1089, 1050 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (D₂O, TMS externe) δ CH₃(s) 1,46 ; H₆ 5,02 ; H₁' (pseudo triplet) 6,21 ppm, largeur 14 cps.

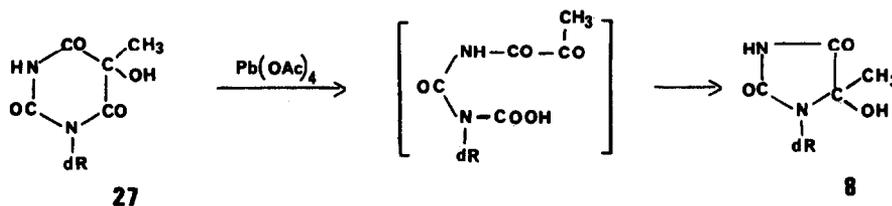
Le chauffage en milieu acide bromhydrique N/5 de ces différents diols pendant 1 heure à 100°C conduit à la libération des quatre formes énantiomères de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine en raison de la labilisation de la liaison N-glycosidique par perte du caractère pseudo aromatique du cycle pyrimidique. La présence dans l'hydrolysat des formes anomères furaniques et pyraniques de ces glycols résulte de l'anomérisation partielle de la partie osidique. Cette réaction, mise en évidence dans des conditions similaires sur les bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine /97 semble caractéristique des dérivés de saturation 5,6 des désoxy-2' ribonucleosides pyrimidiques présentant une fonction OH en position 6 et qui manifestent une stabilité suffisante en milieu acide.

L'oxydation des glycols de thymidine **3** (10⁻² M) par le métapériodate de sodium (0,2 M) en solution aqueuse pendant 40 minutes à 25°C conduit par l'intermédiaire de la désoxy-2'-β-D ribofuranosyl formyl-N pyruvyl-N' urée instable qui n'a pu être isolée, à la formation d'acide pyruvique et de *désoxy-2'-β-D-ribofuranosyl-1 formyl-N urée 9*. IR : ν_{\max}^{KBr} 1713, 1605 (C=O); 1089, 1015 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (CD₃OD, TMS) H formyl (s) 9,03 ; H₁ (pseudo triplet) 6,28 ppm, largeur 14,5 cps. Spectrométrie de masse du dérivé diacétylé : C₁₁H₁₆O₇N₂ (M⁺).

L'action du tétraacétate de plomb (40°C, 90 mn) sur l'acide désoxy-2'-β-D ribofuranosyl hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique **27** /97 se traduit par la formation de manière quantitative des deux diastéréoisomères *d* et *l* de la désoxy-2'-β-D ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne **8**.

Désoxy-2'-β-D-ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne **8**. (α_D^{25} -3,5° (c 0,79, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1790, 1725 (C=O), 1065, 1040 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (CD₃OD, TMS) δ CH₃(s) 1,56 ; H_{1'}(q) 5,65 ppm, largeur 15,5 cps. Spectrométrie de masse du dérivé diacétylé 3' 5' : C₁₁H₁₆O₇N₂ (M⁺).

Désoxy-2'-β-D-ribofuranosyl-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne **8**. (α_D^{25} -39,4° (c 0,87, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1781, 1720 (C=O), 1090, 1040 cm⁻¹ (C-OH), RMN : (CD₃OD, TMS) δ CH₃(s) 1,58 ; H₁ (pseudo triplet) 6,28 ppm, largeur 14,5 cps. Spectrométrie de masse du dérivé diacétylé en 3' 5' : C₁₁H₁₆O₇N₂ (M⁺).



La fonction hydroxyle en position 5 de l'hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine **11** présente une réactivité importante vis à vis des agents nucléophiles [10,11]. Le traitement de ce nucléoside (2.10⁻³ M) par l'eau oxygénée à 110 volumes en milieu chlorhydrique N/10 à 25°C pendant 4 heures conduit avec un excellent rendement (60 %) à l'hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine **10**. Celle-ci a pu être séparée de trois peroxydes saturés en 5,6 et de l'alcool initial (10 %) par chromatographie sur couche mince de silice à l'aide du solvant B. Hydroperoxyméthyl-5 désoxy-2' uridine : (α_D^{25} + 33° (c 0,63, H₂O), IR : ν_{\max}^{KBr} 1690 cm⁻¹ (C=O), RMN : (D₂O, TMS externe) δ CH₂(s) 4,68 ; H₆(s) 7,98.

Bibliographie

- [17] J. CADET et R. TEOULE, *Tetrahedron Letters*
 [27] B. EKERT et R. MONIER, *Nature* (Lond) **184** (1959) B.A. 58
 [37] J. CADET et R. TEOULE, *Biochim. Biophys. Acta* **238** (1971) 8
 [47] J. CADET et R. TEOULE, *C. R. Acad. Sc. PARIS D*, **272** (1971) 2254
 [57] D. LIPKIN et J.A. RABI, *J. Am. Chem. Soc.* **93** (1971) 3309
 [67] J. CADET et R. TEOULE, *C. R. Acad. Sc. PARIS C* **271** (1970) 1632
 [77] P. HOWGATE, A.S. JONES et J.R. TITTENSOR, *J. Chem. Soc. (C)* (1968) 275
 [87] S. IIDA et H. HAYATSU, *Biochim. Biophys. Acta*, **228** (1971) 1
 [97] J. ULRICH, J. CADET et R. TEOULE, *Org. Mass. Spectrom.* (publication en cours)
 [107] R.E. CLINE, R.M. FINK et K. FINK, *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 2521
 [117] D.V. SANTI, *J. Heterocyclic Chem.* **4** (1967) 475
 [127] Nous remercions Mmes VOITURIEZ et GEORGES, Mlle POUCHOT pour leur collaboration technique.