

Sur une NOUVELLE METHODE de SYNTHÈSE
des HYDROXY-HYDROPEROXYDES DERIVES de la THYMINE et 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 11 September 1973; received in UK for publication 14 September 1973)

L'irradiation gamma d'une solution aqueuse aérée (pH 1,7) de thymidine **1a** conduit à la formation prépondérante de deux hydroxy-hydroperoxydes nucléosidiques. La préparation de ces deux dérivés par action de l'eau oxygénée sur les diastéréoisomères trans (-) et (+) de l'hydroxy-6 iodo-5 dihydro-5,6 thymidine **2a, 3a** en présence d'acide trifluoroacétique a été effectuée récemment [1]. L'étude spectroscopique de masse à l'aide de marqueur ^{18}O et les considérations stéréochimiques qui sont développées dans la présente note permettent de préciser la position en 5 ou 6 du groupement -OOH et le mécanisme de cette nouvelle réaction de peroxydation.

1) - Obtention des peroxydes dérivés de la di-O-acétyl-3',5' thymidine

On étudie préalablement les dérivés acétylés de la thymidine parce qu'ils possèdent une volatilité suffisante en spectrométrie de masse.

a) Les deux formes trans (-) et (+) de la di-O-acétyl-3',5' hydroxy-6 iodo-5 dihydro-5,6 thymidine $^{18}\text{O}_{6\text{exo}}$ **2b, 3b** sont préparées par addition de 80 μl d'eau enrichie isotopiquement en ^{18}O (65 %) à 25 ml d'une solution de DMSO renfermant 160 mg de di-O-acétyl-3',5' thymidine **1b**, 300 mg de N-iodosuccinimide et 50 μl d'acide trifluoroacétique (fig. 1).

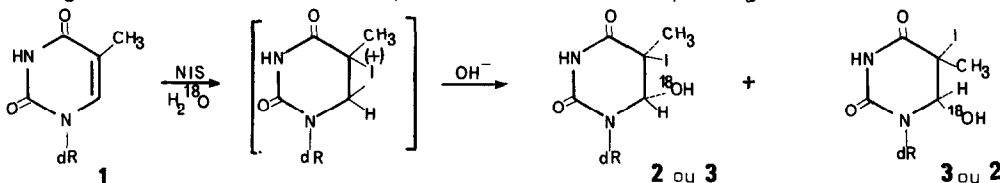


Fig. 1 : Préparation des hydroxy-6 iodo-5 dihydro-5,6 thymidine (**a**: dR = désoxy-2' β D-érythro-pentofuranosyl) et des di-O-acétyl-3',5' hydroxy-6 iodo-5 dihydro-5,6 thymidine (**b**: dR = di-O-acétyl-3',5' désoxy-2' β D érythro-pentofuranosyl).

b) Les deux iodohydrines diastéréoisomères trans **2b, 3b** obtenues sont dissoutes respectivement (50 mg) dans 10 ml d'eau oxygénée à 15 % acidifiée avec 15 μl d'acide trifluoroacétique et laissées en contact 15 heures à 23°C. L'analyse chromatographique bidimensionnelle sur couche mince de silice MN 300 (solvant I : CHCl_3 -MeOH (95:5) et solvant II : acétate d'éthyle) du milieu réactionnel montre dans chacun des cas la présence de deux hydroxy-hydroperoxydes nucléosidiques trans **4b** ou **5b** et cis **6b** ou **7b** (Fig. 2). La réduction de ces dérivés par un courant gazeux d' H_2S ou leur dégradation hydrolytique qui s'effectuent selon un mécanisme $\text{S}_\text{N}2$ au niveau de la liaison peroxydique [2, 3] engendre la formation de l'alcool correspondant **8b** ou **9b** et **10b** ou **11b** avec rétention de configuration (Fig. 4).

3) - Stéréochimie et mécanisme de la réaction pour les dérivés de la di-O-acétyl-3',5' thymidine et de la thymidine

Pour accéder aux dérivés de la thymidine non protégée on compare les dérivés résultant de la peroxydation directe de la thymidine et ceux obtenus par ammonolyse des dérivés di-O-acétylés. La substitution dans les conditions précitées de l'halogène en position 5 de la forme levogyre trans de la (di-O-acétyl-3',5' désoxy-2' β D érythro-pentofuranosyl)-1 hydroxy-6 iodo-5 dihydro-5,6 thymine **2b** se traduit par la formation des diols trans **8b** (-) et cis **10b** (-) après réduction des deux hydroxy-6 hydroperoxydes-5 **4b** et **6b** correspondants. Ces deux dérivés engendrent respectivement, par ammonolyse des groupements acétylés, les deux isomères levogyres trans **8a** et cis **10a** de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine qui diffèrent entre eux par la configuration de C-5. La solvolysé de l'iodohydrine de thymidine trans levogyre **2a** dans l'eau oxygénée acidifiée présente la même spécificité, et conduit aux mêmes substances **8a** (-) et **10a** (-).

La substitution de l'ion iode n'est pas sensible à la nucléophilie du solvant ; en solution aqueuse méthanolique, la vitesse de transformation des iodohydrines en diol cis et trans est voisine de celle observée dans un mélange eau oxygénée-méthanol. Un mécanisme de substitution de type S_N1 rend compte de la stéréochimie et de l'aspect cinétique de la réaction.

4) - Application à la détermination de structure des hydroxyhydroperoxydes formés par radiolyse des constituants élémentaires des acides nucléiques.

La structure des hydroxy-hydroperoxydes de thymine avait été jusqu'à présent basée sur la réaction de substitution de l'halogène de la bromo-5 hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymine par les ions OH^- . Les méthodes expérimentales et spectroscopiques utilisées ne permettaient pas toutefois jusqu'à présent de déterminer de manière précise la nature des peroxydes obtenus [1, 5].

Dans un travail récent, nous avons montré que la substitution du brome ou de l'iode des halohydrines correspondantes de la thymine et de la thymidine par l'ion perhydroxyle en présence d'oxyde d'argent s'effectue en fait avec un réarrangement anionotropique [6]. Dans ces conditions, on obtient les hydroxy-5 hydroperoxydes-6 de thymine ou de thymidine avec prépondérance des isomères cis.

La solvolysé des iodohydrines de thymidine engendre la formation d'hydroxy-6 hydroperoxydes- (vide supra). Ces deux études s'avèrent complémentaires et permettent de déterminer désormais, sans ambiguïté, la nature des différents peroxydes formés par irradiation gamma de la thymidine en solution aqueuse aérée (tableau 1). Des résultats similaires ont été obtenus avec la thymine, en conséquence, il est nécessaire d'attribuer de nouvelles structures à certaines de ces substances de radiolyse [1, 5].

La structure et l'importance quantitative des hydroxy-hydroperoxydes de radiolyse gamma de la thymine en milieu aqueux aéré sont présentés dans le tableau 2.

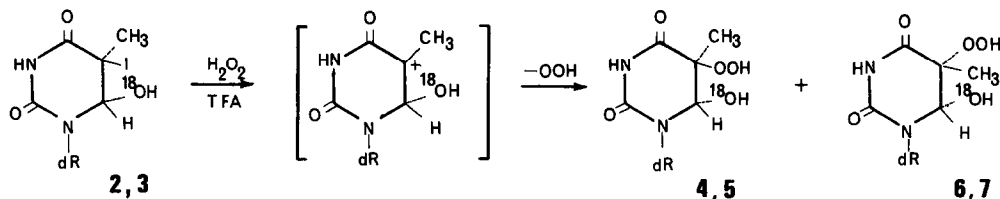


Fig. 2 : Substitution d'une iodohydrine de thymidine (dR = **a**) ou de di-O-acétyl-3',5' thymidine (dR = **b**) dans l'eau oxygénée en présence d'acide trifluoroacétique.

2) - Détermination par spectrométrie de masse de la position du groupement OOH chez les hydroxy-hydroperoxydes de la thymidine di-O-3',5' acétylée

Elle a été étudiée par deux voies différentes :

a) La fragmentation par impact électronique de **8b, 9b** et **10b, 11b** donne les ions caractéristiques du glycol de thymine qui provient, dans les conditions d'enregistrement du spectre, de l'ion moléculaire protoné ou non par rupture de la liaison N-glycosidique. La localisation du marquage isotopique sur C-6 et par conséquent de OOH sur C-5 est confirmée par l'observation dans le spectre de masse du glycol de thymine de doublets correspondant aux fragments $(C_4H_5NO_3)^+$ (m/e 115, 117) et $(NH_2=CHOH)$ (m/e 46, 48) [4, 6] d'après le schéma suivant :

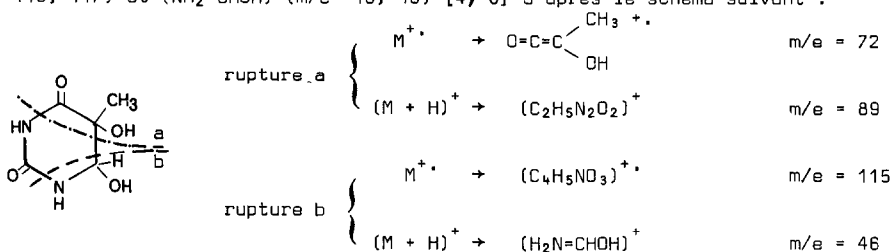


Fig. 3 : Fragmentation de la dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine sous impact électronique [4]

b) L'oxydation par $NaIO_4$ de la di-O-acétyl-3',5' dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine **10b** ou **11b** conduit à la formation de N-(di-O-acétyl-3',5' désoxy-2' β D érythro-pentofuranosyl) formamide (Fig. 4), par l'intermédiaire de la N-(di-O-acétyl-3',5' désoxy-2' β D érythro-pentofuranosyl) N-formyl urée instable.

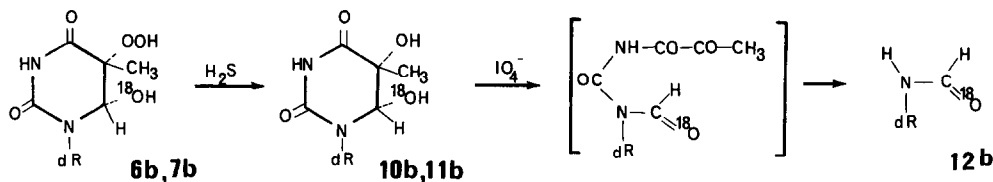


Fig. 4 : Oxydation du diol $^{18}O_{6_{exo}}$ de la di-O-acétyl-3', 5' thymidine (dR = **b**)

Le taux d'enrichissement en ^{18}O de **12b** mesuré par spectrométrie de masse est voisin de 65 %.

Tableau 1 : Radiolyse de la thymidine à pH 5,5

S U B S T A N C E S	:	III	:	IV	:	G
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis (-)	:	0,15	:	0,47	:	0,28
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine cis (+)	:	0,17	:	0,38	:	0,27
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine cis (-)	:	0,15	:	0,47	:	0,20
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine cis (+)	:	0,15	:	0,47	:	0,22
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans (+)	:	0,16	:	0,60	:	0,60
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine trans (-)	:	0,16	:	0,60	:	0,58
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans (+)	:	0,18	:	0,70	:	0,44
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans (-)	:	0,16	:	0,60	:	0,42

Tableau 2 : Radiolyse de la thymine à pH 5,5

S U B S T A N C E S	:	III	:	IV	:	G
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine cis	:	0,38	:	0,43	:	0,31
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine cis	:	0,38	:	0,52	:	0,08
Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine trans	:	0,36	:	0,72	:	} 0,83
Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine trans	:	0,36	:	0,72	:	

Légende : Valeurs de Rf et importance quantitative (G : nombre de molécules formées pour une absorption de 100 eV.) des hydroxy-hydroperoxydes résultant de l'irradiation (800 000 rads) de la thymidine et de la thymine en solution aqueuse aérée. III : chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol ; IV : acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9)

Bibliographie

- [1] J. CADET et R. TEQULE, Tetrahedron Lett. (1972) 3229
- [2] A.G. DAVIES dans Organic Peroxides, Butterworths (London) (1961) 128
- [3] M.C. SCHWEIBERT et M. DANIELS, Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3 (1971) 353
- [4] J. ULRICH, R. TEQULE, R. MASSOT et A. CORNU, Org. Mass Spectrom. 2 (1969) 1183
- [5] B. EKERT et R. MONIER, Nature 184 (1959) BA 58
G. SCHOLLES, J.F. WARD et J. WEISS, J. Mol. Biol. 2 (1960) 379
D. BARSZCZ et D. SHUGAR, Acta Biochim. Polon 8 (1961) 455
M. DANIELS et A. GRIMISON, Biochim. Biophys. Acta. 142 (1967) 292
V. DRASIL et L. RYZNAR, Biophysical Aspects of Radiation Quality, AIEA, Vienne (1968) 17
N.P. KRUSHINSKAYA, Radiobiologiya 5 (1965) 645
J. CADET et R. TEQULE, Biochim. Biophys. Acta 238 (1971) 8
R. TEQULE et J. CADET, Chem. Comm. 20 (1971) 1269
- [6] J. CADET et R. TEQULE, C. R. Acad. Sc. (1973) C, 276, 1743.