

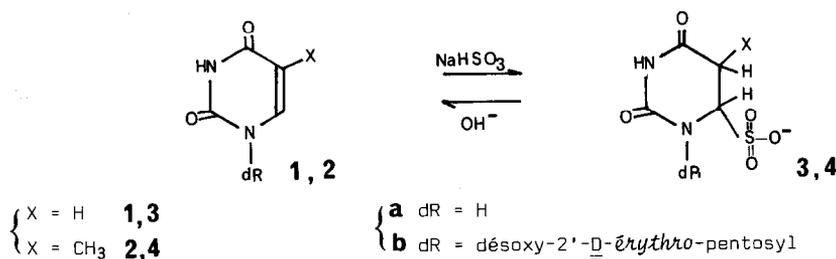
CHIMIE des ACIDES NUCLEIQUES. ANOMERISATION et ISOMERISATION FURANNO-PYRANNIQUE des DERIVES DIHYDRO-5,6 SULFONATE-6 de la DESOXY-2'-URIDINE et de la THYMIDINE en MILIEU ACIDE

Jean CADET

Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie,
Centre d'Etudes Nucléaires, BP 85, Centre de Tri, 38041 GRENOBLE (FRANCE).

(Received in France 18 January 1974; received in UK for publication 29 January 1974)

L'addition nucléophile de bisulfite de sodium sur la double liaison 5,6 de l'uracile **1a**, de la thymine **2a** et de leurs dérivés nucléosidiques conduit à la formation des dérivés dihydro-5,6 sulfonate-6 correspondants **3,4** [1, 2, 3]. L'alcalinisation du mélange réactionnel provoque une régénération quantitative de la liaison 5,6.

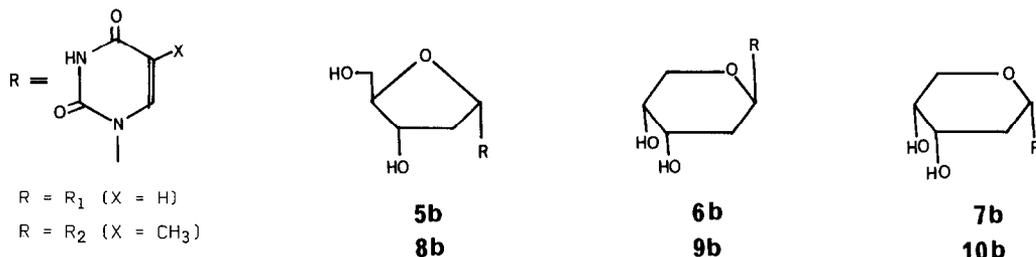


Une nouvelle propriété chimique des dérivés dihydro-5,6 sulfonate-6 de sodium des désoxy-2' ribonucléosides pyrimidiques est présentée dans cette note. Le chauffage en solution aqueuse bromhydrique M de la désoxy-2'-dihydro-5,6-uridine sulfonate-6 **3b** conduit après départ de bisulfite de sodium à la formation des quatre formes anomères pyranniques et furanniques de la désoxy-2'-uridine et à la libération partielle d'uracile **1a**. Ces réactions d'isomérisation du cycle osidique ont pu être étendues à la thymidine **2b**.

Identification des produits résultant de la solvolysé acide des dérivés dihydro-5,6 sulfonate-6 de la désoxy-2' uridine et de la thymidine.

Pratiquement, le mélange des deux diastéréoisomères de la désoxy-2'-dihydro-5,6-uridine sulfonate-6 **3b** ($5 \cdot 10^{-1}$ M) est chauffé pendant 45 minutes à 45°C dans une solution aqueuse d'acide bromhydrique M. La stabilité du fragment dihydro-5,6-uracilyle sulfonate-6 en milieu acide est confirmée par l'absence dans le spectre UV de la solution bromhydrique d'un maximum d'absorption à 260 nm qui est habituellement observé pour les dioxo-2,4-pyrimidines insaturées en 5,6. Le déplacement électrophorétique vers l'anode de l'ensemble des substances obtenues, sur couche mince de cellulose dans un tampon formiate 0.1 M (pH 3.4), est compatible avec le caractère ionique des dérivés dihydro-5,6-sulfonate-6. Toutefois, la séparation de ce mélange complexe de diastéréoisomères fortement polaires s'avère difficile. L'alcalinisation du mélange réactionnel par addition de NH_4OH conduit à pH 12 à une rapide régénération de la double liaison 5,6.

L'analyse chromatographique bidimensionnelle (solvant 1 : $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (4:2:1), phase inférieure additionnée de 5 % de CH_3OH ; solvant 2 : acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9) sur couche mince de silice MN-S-HR (Macherey Nagel) [4] permet alors de séparer cinq substances qui absorbent fortement en lumière UV (254 nm). Quatre de ces composés donnent une révélation caractéristique du fragment désoxyribosidique après pulvérisation du chromatogramme avec le réactif à la cystéine [5]. Les cinq substances ont été séparées par chromatographie préparative dans les conditions précitées. Le dérivé de rupture de la liaison N-glycosidique a été identifié à l'uracile **1a** (11 %), R_{f1} 0.36, R_{f2} 0.46. La désoxy-2'-uridine **1b** (21 %), R_{f1} 0.28, R_{f2} 0.44 et la (désoxy-2'- α -D-ribofurannosyl)-1 uracile **5b** (15 %), $(\alpha)_D^{25} -14^\circ$ (\underline{c} 0.81, eau), [Lit⁶ $(\alpha)_D^{25} -13.5^\circ$ (\underline{c} 0.16, eau)], R_{f1} 0.28, R_{f2} 0.41 ont pu être caractérisés par comparaison de leurs propriétés spectrales de masse, UV, IR, RMN avec celles des substances témoins [6]. En particulier, le signal de RMN du proton anomère de **5b** se présente sous la forme d'un quadruplet en accord avec les observations similaires effectuées antérieurement sur les désoxy-2'-ribonucléosides pyrimidiques de configuration α furannique [7]. Les deux derniers nucléosides ont été identifiés respectivement à la (désoxy-2'- β -D-ribofuranosyl)-1-uracile **6b** (16 %), p.f. 200-202°, $(\alpha)_D^{25} +25.6^\circ$ (\underline{c} 2.1, eau), [Lit⁸ p.f. 200-202°, $(\alpha)_D^{20} +28.6^\circ$ (\underline{c} 2.52, eau)], R_{f1} 0.33, R_{f2} 0.42 et à la (désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-uracile **7b** (18 %), $(\alpha)_D^{25} -37.4^\circ$ (\underline{c} 2.35, eau), [Lit⁸ $(\alpha)_D^{21} -43.9^\circ$ (\underline{c} 1.84, eau)], R_{f1} 0.29, R_{f2} 0.33 [9]. La présence d'une fonction α diol est confirmée par la réaction positive donnée par **6b** et **7b** avec le métaperiodate. D'autre part, l'élimination de deux molécules d'eau à partir du pic moléculaire ($m/e = 228$) est plus importante pour les isomères pyraniques que pour les isomères furanniques [10, 11].



Le chauffage de **4b** dans une solution aqueuse de HBr M à 45°C conduit après alcalinisation du mélange réactionnel à la formation des cinq substances suivantes qui ont été obtenues par chromatographie préparative : thymine **2a** (10 %), R_{f1} 0.55, R_{f2} 0.66 ; thymidine **2b** (22 %), R_{f1} 0.37, R_{f2} 0.52 ; (désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-thymine **8b** (15 %), p.f. 188°, $(\alpha)_D^{25} +7.1^\circ$ (\underline{c} 1.25, eau), [Lit¹² p.f. 187°, $(\alpha)_D^{25} +7.2^\circ$ (\underline{c} 2, eau)], R_{f1} 0.37, R_{f2} 0.46 ; (désoxy-2'- β -D-ribofuranosyl)-1-thymine **9b** (14 %), p.f. 222-224°, $(\alpha)_D^{25} +26.5^\circ$ (\underline{c} 0.85, eau) [Lit¹³ p.f. 222-224°, $(\alpha)_D^{20} +27^\circ$ (\underline{c} 1.08, eau)], R_{f1} 0.48, R_{f2} 0.49 ; (désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-thymine **10b** (18 %), p.f. 212-215°, $(\alpha)_D^{25} -46.6^\circ$ (\underline{c} 1.35, eau), [Lit¹³ p.f. 210-215°, $(\alpha)_D^{20} -46.6^\circ$ (\underline{c} 1.2, eau)], R_{f1} 0.39, R_{f2} 0.34.

Aspect quantitatif

L'importance quantitative des réactions de réarrangement et d'hydrolyse de **3b** en fonction de la durée de chauffage (Tableau 1) et de la concentration en HBr (Tableau 2) a été précisée en dosant par scintillation liquide les isomères de la désoxy-2'-uridine et l'uracile $^{14}\text{C}_2$.

Des résultats identiques ont été obtenus avec **4b**. Le chauffage de **3b** ou **4b** à 45°C en milieu HBr M au-delà de 45 minutes entraîne une augmentation sensible de la rupture de la liaison N-glycosidique au détriment de l'isomérisation*.

PRODUITS	TEMPS			
	7.5 min.	15 min.	30 min.	45 min.
Désoxy-2'-uridine	: 90	: 70.8	: 41.2	: 27.4
(Désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-uracile	: 5.1	: 17.3	: 23.4	: 18.4
(Désoxy-2'- β -D-ribofuranosyl)-1-uracile	: 1.2	: 3.2	: 12.2	: 17
(Désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-uracile	: 1.5	: 4.8	: 14.5	: 22.2
Uracile	: 2.2	: 3.9	: 8.7	: 15

Tableau 1 : Importance quantitative de l'uracile et des isomères de la désoxy-2'-uridine après alcalinisation (pH 12) du mélange réactionnel résultant du chauffage des diastéréoisomères de la dihydro-5,6 désoxy-2'-uridine en présence d'acide bromhydrique M à 45°C.

PRODUITS	CONCENTRATIONS			
	0.1 M	0.25 M	0.5 M	0.75 M
Désoxy-2'-uridine	: 94	: 78.1	: 46.3	: 37.3
(Désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-uracile	: 2.3	: 8.1	: 27.2	: 24.2
(Désoxy-2'- β -D-ribofuranosyl)-1-uracile	:	: 3	: 6.9	: 11.3
(Désoxy-2'- α -D-ribofuranosyl)-1-uracile	:	: 5.3	: 9.8	: 15.2
Uracile	: 3.7	: 5.5	: 9.8	: 12

Tableau 2 : Influence de la concentration en acide bromhydrique sur l'isomérisation de la désoxy-2'-uridine après chauffage de **3b** à 45°C pendant 45 minutes, suivie de l'alcalinisation du mélange réactionnel (pH 12).

Mécanisme

Le chauffage à 90°C en milieu HBr M des dérivés de saturation 5,6 de la thymidine et d'halogéno-5 désoxy-2'-uridine qui présentent une fonction OH ou un groupement méthoxy en position 6 entraîne une anomérisation et une isomérisation de leur cycle osidique [10, 14]. Ces réactions de réarrangement ont pu être étendues dans des conditions de température plus douces, aux dérivés dihydro-5,6-sulfonate-6 de désoxy-2'-ribonucléosides pyrimidiques. Les processus d'anomérisation et d'isomérisation furanno-pyrannique de **3b** et **4b** en présence de HBr M s'apparentent au mécanisme de mutarotation des glycosylamines en milieu acide [15] et ont déjà été commentés [10, 14]. L'anomère α furannique se forme plus rapidement que les isomères pyranniques (Tableau 1). LEMIEUX et al. ont effectué des constatations similaires en étudiant la mutarotation du désoxy-2'- β -D-*erythro*-pentose en solution aqueuse [16]. L'entropie d'activation requise pour la condensation intramoléculaire d'une fonction hydroxyle sur un centre

carboné est en effet plus favorable à la formation d'un O-hétérocycle à cinq chaînons qu'à celle de son homologue à six éléments [17]. L'augmentation de la durée de chauffage entraîne une diminution de l'importance relative de l'anomère α furannique devant celle des isomères pyraniques (Tableau 1). La plus grande stabilité de **6b** et **7b** doit être reliée à la plus faible basicité de leur oxygène semi-acétalique [16].

Bibliographie

- [1] SHAPIRO R., SERVIS R.E., WELCHER M., J. Amer. Chem. Soc. **92** (1970) 422
- [2] HAYATSU H., WATAYA Y., KAI K., IIDA S., Biochemistry **9** (1970) 2858
- [3] HAYATSU H., WATAYA Y., KAI K., J. Amer. Chem. Soc. **92** (1970) 724
- [4] CADET J., TEOULE R., J. Chromatog. **76** (1973) 407
- [5] BUCHANAN J.G., Nature (London) **168** (1951) 1091
- [6] PRYSTAS M., FARKAS J., SORM F., Coll. Czech. Chem. Com. **30** (1965) 3123
- [7] LEMIEUX R.U., Can. J. Chem. **39** (1961) 116
- [8] WITTENBURG E., Chem. Ber. **101** (1968) 2132
- [9] Tous les produits ont des analyses élémentaires en accord avec la structure proposée
- [10] QUELO H., CADET J., TEOULE R., C. R. Acad. Sc. PARIS, C, **275** (1972) 1137
- [11] ULRICH J., CADET J., TEOULE R., Org. Mass. Spectrom. **7** (1973) 543
- [12] HOFFER M., Chem. Ber., **93** (1960) 2777
- [13] ETZOLD G., HINTSCHE R., LANGEN P., Chem. Ber. **101** (1968) 226
- [14] CADET J., TEOULE R., Carbohydr. Res. **29** (1973) 345
- [15] ISBELL H.S., FRUSH H.L., J. Org. Chem. **23** (1958) 1309
- [16] LEMIEUX R.U., ANDERSON L., CONNER A.H., Carbohydr. Res. **20** (1971) 59
- [17] CAPON B., Quart. Rev. (London) **18** (1954) 45

* Ces conditions (chauffage de **3b** ou **4b** pendant 45 minutes à 45°C et concentration molaire en HBr) sont optimales pour l'obtention des isomères pyraniques **6b**, **7b** ou **9b**, **10b**.