

RADIOLYSE GAMMA DE SOLUTIONS AQUEUSES DE THYMINE A 77°K ET 195°K
IDENTIFICATION DU DIMERE DE TYPE CYCLOBUTANE *CIS SYN*

J. CADET

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

(Received in France 16 September 1976; received in UK for publication 7 October 1976)

Les intermédiaires radicalaires formés par irradiation gamma de solutions aqueuses gelées de thymine 1 ont été particulièrement étudiés (1-6). Toutefois la nature des produits finaux de ces réactions n'a pas à notre connaissance été établie. Seule une hypothèse relative à la formation radioinduite de cyclodimère a été proposée (7). Dans cette note l'identification des principaux produits de radiolyse gamma de solution aqueuse de 1 à 77°K et 195°K est présentée. La dimérisation de 1 à l'instar de ce qui est observé par photolyse UV dans les mêmes conditions (8-9) est le processus majeur de dégradation radiolytique de 1.

Les solutions de thymine ¹⁴C₂ 1 (20 mM) sont irradiées (⁶⁰Co) avec des débits de dose de 50 Krads/mn en solution aqueuse gelée en présence d'azote ou d'oxyde nitreux. Les produits d'irradiation sont séparés après dégel des solutions par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silice (10) (Table 1). L'identification du composé majeur (Table 1) au dimère de type cyclobutane *cis syn* 2 (Fig. 1) repose sur la comparaison de ses propriétés physicochimiques UV, IR et de spectroscopie de masse avec celles du produit témoin préparé par photolyse UV (254 nm) de 1 en solution aqueuse gelée (8).

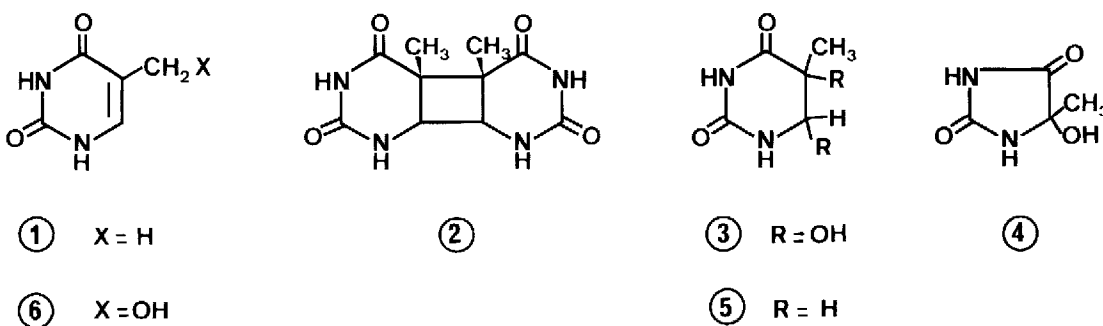


Fig. 1 Produits de dégradation radioinduite de la thymine 1 à 77°K et 195°K.

La monomérisation de 2 sous impact électronique conduit à la formation du pic de base (m/e = 127) correspondant à la thymine protonée (11-12). L'irradiation UV ($\lambda < 250$ nm) de 2 en solution aqueuse engendre 1 en parfait accord avec les propriétés de photoréversibilité des dimères pyrimidiques (13). Les produits mineurs de dégradation radioinduite (Fig. 1) sont caractérisés à l'aide de microréactions spécifiques qui permettent de déterminer la structure des substances à l'état de traces (14). La dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine *cis* 3 est oxydée par le métaperiodate de sodium en N₁-pyruvyl-N₂-formylurée avec un rendement voisin de 95 % (15). Le chauffage de ce diuréide en solution aqueuse engendre l'hydroxy-5-méthyl-5-hydantoïne 4 par cyclisation intramoléculaire avec hydrolyse d'un groupement formyl. La déshydratation de 4 en présence d'acide formique conduit à la formation de méthylène-5-hydantoïne

(16). L'hydrolyse alcaline de la dihydro-5,6-thymine 5 en acide uréido-3-isobutyrique s'effectue quantitativement (17).

La dégradation radioinduite de 1 fait intervenir différents mécanismes qui dépendent en partie de la température. Les radicaux qui proviennent de la radiolyse de l'eau (OH^\cdot et e^-) deviennent suffisamment mobiles à 135°K pour réagir avec 1 (18). La transformation des électrons en radicaux hydroxyles en présence de N_2O (19) se traduit par une disparition du dérivé pyrimidique dihydrogéné 5 avec une augmentation de l'importance des produits d'oxydation 3, 4 et 6. Un intermédiaire peroxydique qui résulterait de l'addition d'oxygène présent en faible quantité sur les radicaux hydroxy-5(6)-dihydrothyminyle-6(5) rend compte de la formation de 3 et 4 (20). Ces processus indirects qui sont relativement faibles dans nos conditions expérimentales augmentent avec la dilution de 1 (21). La formation stéréospécifique du dimère *cis-syn* 2, vraisemblablement par action directe du rayonnement, est liée à la structure cristalline de 1 dans la matrice de glace (22). Le rendement et la spécificité de la réaction de dimérisation qui ne dépendent pas de la température à laquelle l'irradiation a été effectuée (table 1) sont sensiblement modifiés par la substitution de l'azote 1 de la thymine (23). La photolyse ultraviolette de solutions aqueuses de 1 et de thymidine donnent lieu à des observations similaires (22).

PRODUITS	Rf ^a		G ^b 77° K		G 195° K	
	Solv. A	Solv. B	N ₂	N ₂ O	N ₂	N ₂ O
Thymine <u>1</u>	0.55	0.66	- 0.82	- 1.16	- 0.90	- 0.94
Dimère <i>cis syn</i> <u>2</u>	0.16	0.21	0.79	0.80	0.70	0.68
Dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine <u>3</u>	0.20	0.46	-	0.16	-	0.01
Hydroxy-5-méthyl-5-hydantoïne <u>4</u>	0.32	0.82	-	-	-	0.02
Dihydro-5,6-thymine <u>5</u>	0.59	0.57	-	-	0.02	-
Hydroxy méthyl-5-uracile <u>6</u>	0.25	0.42	-	-	0.04	0.05

Table 1 Valeurs de Rf et de G ($\times 10^2$) des produits de radiolyse gamma de la thymine à 77°K et 195°K

a) Solvant A chloroforme - méthanol - eau (4 : 2 : 1) phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol - Solvant B acétate d'éthyle - isopropanol - eau (75 : 16 : 9)

b) Valeurs de G obtenues pour des doses de 9 Mrads (77° K) et de 50 Mrads (195° K) par comptage radiochimique.

D'autres analogies entre le mode d'action des rayonnements gamma et ultraviolet concernent la nature des intermédiaires radicalaires de ces réactions. La formation d'ions radicalaires selon un processus d'absorption biphotonique a été mise en évidence dans les solutions aqueuses de thymine irradiées à 77° K en lumière UV (24).

D'autre part, l'interaction du rayonnement gamma avec la thymidine-5'-monophosphate en solution aqueuse gelée engendre des radicaux anionique et cationique (18). La recombinaison de ces espèces radicalaires pourrait être impliquée dans les mécanismes de dimérisation (25) de 1 par irradiation gamma et photolyse ultraviolette.

Remerciements

L'auteur remercie le Dr. V.A. SHARPATYI et le Dr. TEOULE pour les nombreuses discussions et ~~une~~ ~~volonté~~ pour son excellente collaboration technique.

REFERENCES

1. R.A. HOLROYD et J.W. GLASS, Int. J. Radiat. Biol., 14, 445 (1968)
2. B.B. SINGH, Adv. Biol. Med. Phys., 12, 245 (1968)
3. Y. LION et A. VAN DE VORST, Int. J. Radiat. Phys. Chem., 3, 513 (1971)
4. T. HENRIKSEN et W.B. JONES, Radiat. Res., 38, 173 (1969)
5. O. KAALHUS et S.A. JOHANSEN, Ann. N.Y. Acad. Sci., 222, 432 (1973)
6. S. CANNISTRARO, Y. LION et A. VAN DE VORST, Radiat. Res., 64, 581 (1975)
7. L.S. MYERS, W.T. TSUKAMOTO et D.E. HOLMES, Radiat. Res., 25, 222 (1965)
8. R. BEUKERS et W. BERENDS, Biochim. Biophys. Acta., 41, 550 (1960)
9. S.Y. WANG, Nature (Londres), 188, 844 (1960)
10. J. CADET et R. TEOULE, J. Chromatogr., 407 (1973)
11. J. ULRICH, R. TEOULE, R. MASSOT et A. CORNU, Org. Mass Spectrom., 2, 1183 (1969)
12. C. FENSELAW et S.Y. WANG, Tetrahedron, 25, 2853 (1970)
13. T. MONTENAY-GARESTIER, M. CHARLIER et C. HELENE, Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, S.Y. WANG Ed., Academic Press, New-York, Vol. 1, p. 381 (1976)
14. R. TEOULE, A. BONICEL, C. BERT, J. CADET et M. POLVERELLI, Radiat. Res., 57, 46 (1974)
15. R. TEOULE, J. CADET et J. ULRICH, C. R. Acad. Sci., Série C 270, 262 (1970)
16. S. MURAHASHI, K.S. YUKI et F. DOURA, Bull. Chem. Soc. Japan, 39, 1559 (1966)
17. Y. KONDO et B. WITKOP, J. Am. Chem. Soc., 90, 764 (1968)
18. S. GREGOLI, M. OLAST et A. BERTINCHAMPS, Radiat. Res., 65, 202 (1976)
19. G. SCHOLES, P. SHAW, R.L. WILLSON et M. EBERT, Pulse Radiolysis, M. Ebert, J.P. Keene, A.J. Swallow et J.H. Baxendale Eds., Academic Press, New-York, p. 151 (1965)
20. R. TEOULE et J. CADET, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1269 (1971)
21. V.A. SHARPATYI, J. CADET et R. TEOULE, à paraître
22. G.J. FISHER et H.E. JOHNS, Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, S.Y. Wang Ed., Academic Press, New-York, Vol. 1, p. 221 (1976)
23. La dégradation radio-induite de la thymidine 10 mM en solution aqueuse à 77°K conduit à la formation prépondérante de dihydrothymidine 5R et 5S. Trois dimères nucléosidiques sont produits en quantités sensiblement égales.
24. M.D. SEVILLA, J. Phys. Chem., 75, 626 (1971)
25. E.J. COREY, J.D. BASS, R. LEMAHIEU et R.B. MITRA, J. Amer. Chem. Soc., 86, 5570 (1964)