

CYCLISATION RADICALEIRE DE LA DESOXY-2' ADENOSINE EN SOLUTION AQUEUSE, SOUS L'EFFET DU RAYONNEMENT GAMMA

N. MARIAGGI, J. CADET et R. TEOULE*

Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie, Centre d'Etudes Nucléaires, BP 85, Centre de Tri, 38041 Grenoble Cedex, France

(Received in France 19 January 1976; received in the UK for publication 23 March 1976)

Résumé—La cyclo-5',8 désoxy-2' adénosine 2 a été identifiée comme l'un des principaux produits de la radiolyse gamma de la désoxy-2' adénosine 1 ($G = 0.03$ en présence d'oxygène, $G = 0.05$ en absence d'oxygène). Cette substance est susceptible de jouer un rôle dans les phénomènes de mutagénèse radio-induites. Les études de $^1\text{H-RMN}$ à 250 MHz ont mis en évidence la géométrie remarquable de ce composé puisque trois constantes de couplage de protons vicinaux du fragment sucre ne sont pas détectées. L'étude du modèle montre en effet que les protons correspondants forment un angle voisin de 90° . La formation de 2 implique l'attaque de la double liaison C8-N7 par le radical en 5' de 1 produit sous l'action des radicaux $\text{OH}\cdot$ issus de la radiolyse de l'eau.

Abstract—5',8-Cyclo-2'-deoxy-adenosine 2 has been identified as one of the principal products of gamma radiolysis of 2'-deoxyadenosine ($G = 0.03$ in the presence of oxygen; $G = 0.05$ in the absence of oxygen). This compound is likely to play a role in the phenomena of radio-induced mutation. $^1\text{H-NMR}$ studies at 250 MHz have shown the remarkable geometry of the compound since three coupling constants of the vicinal protons of the sugar fragment have not been detected. The study of the model has in fact shown that the corresponding protons form an angle close to 90° . The formation of 2 shows that the C8-N7 double bond is attacked by the radical on the carbon 5' of 1, produced by the action of $\text{OH}\cdot$ radicals formed by the radiolysis of water.

L'effet primaire de la radiolyse gamma, en milieu aqueux, de l'adénine (constituant des acides nucléiques) se traduit par l'addition d'un radical $\text{OH}\cdot$ sur la double liaison C8-N7.¹⁻³ Lorsque la base est associée au ribose ou au désoxyribose une attaque de ce radical peut se produire également au niveau du sucre, dans une proportion voisine de 30% dans le cas d'un nucléotide.^{4,5}

Dans cette étude un dérivé de la désoxy-2' adénosine a été identifié, résultant de la formation d'une liaison entre le carbone 5' et le carbone 8 de la molécule. Le mécanisme radicalaire d'une cyclisation similaire a été envisagé par Keck.⁶ Cet auteur a identifié la cyclo-5',8 adénosine monophosphate et signale que d'autres nucléotides (GMP, IMP, dAMP) conduisent à des dérivés identiques, sous l'action du rayonnement gamma, en milieu désaéré. Le présent travail montre que cette réaction a lieu également à partir des nucléosides en milieu aéré ou en absence d'oxygène.

RESULTATS

Le Tableau 1 donne les valeurs des R_f du cyclonucléoside par rapport à deux autres produits de radiolyse de la désoxy-2' adénosine.⁷

Le produit étudié réagit très difficilement avec la cystéine en solution dans l'acide sulfurique, réactif spécifique du désoxyribose, ce qui peut laisser supposer que celui-ci a été modifié lors de l'irradiation.

Le spectre UV est voisin de celui de la désoxy-2' adénosine et le spectre IR ne présente pas de bande d'absorption vers 1720 cm^{-1} comme dans le cas de la dihydro-7,8 oxo-8 désoxy-2' adénosine.⁷ Les spectres UV et IR indiquent que le cycle purique est conservé et qu'aucun groupement OH ne s'est fixé sur la molécule.

Le spectre de masse du produit acétylé donne la masse moléculaire m/e 333.10695 ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$), c'est-à-dire la masse moléculaire de la désoxy-2' adénosine diacétylée moins deux atomes d'hydrogène. Les exemples relevés

Tableau 1. R_f chromatographique des produits de radiolyse de la désoxy-2' adénosine

	Solvant I Silice	Solvant II Cellulose	Solvant III Cellulose
Cyclo-5',8 désoxy-2'-adénosine 2	0.19	0.19	0.22
Désoxy-2' adénosine 1	0.34	0.57	0.4
Adénine ⁷	0.34	0.50	0.32
Dihydro-7,8 oxo-8 désoxy-2' adénosine ⁷	0.46	0.67	0.46

dans la littérature et possédant des formules de ce type sont: soit des nucléosides cycliques contenant un pont oxygène entre le C5' et le C8,⁸ soit des composés ayant une double liaison C1'-C2',⁹ soit des nucléosides possédant une liaison C5'-C8.¹⁰

Le spectre présente un pic intense m/e 135 (adénine), contrairement aux cyclonucléosides ayant un pont oxygène C5'-O-C8, dont la fragmentation se caractérise par un pic intense m/e 151 (hydroxyadénine).⁸

La spectroscopie RMN permet de préciser la nature des deux protons absents et apporte la preuve d'une liaison C5'-C8. Le spectre RMN du composé (Fig. 1) en solution dans le DMSO a été obtenu à 250 MHz à 25°C . Les déplacements chimiques ont été calculés par rapport au TMS. Pour plus de clarté les protons échangeables ont été remplacés par du deuterium.

Sur ce spectre, en comparaison avec celui de la désoxy-2' adénosine^{11,12} on peut observer: l'absence d'un proton dans la région de 8 ppm qui correspond aux protons H2 et H8 de l'adénine, et l'absence d'un atome d'hydrogène dans l'un des singulets (4.60 et 4.46 ppm) ou dans le multiplet (4.20 ppm) ces pics représentant les protons H4', H5' et H3'.

Le quadruplet (4.20 ppm) a été attribué au proton H3' par découplage de spin, l'irradiation de celui-ci (Fig. 1B)

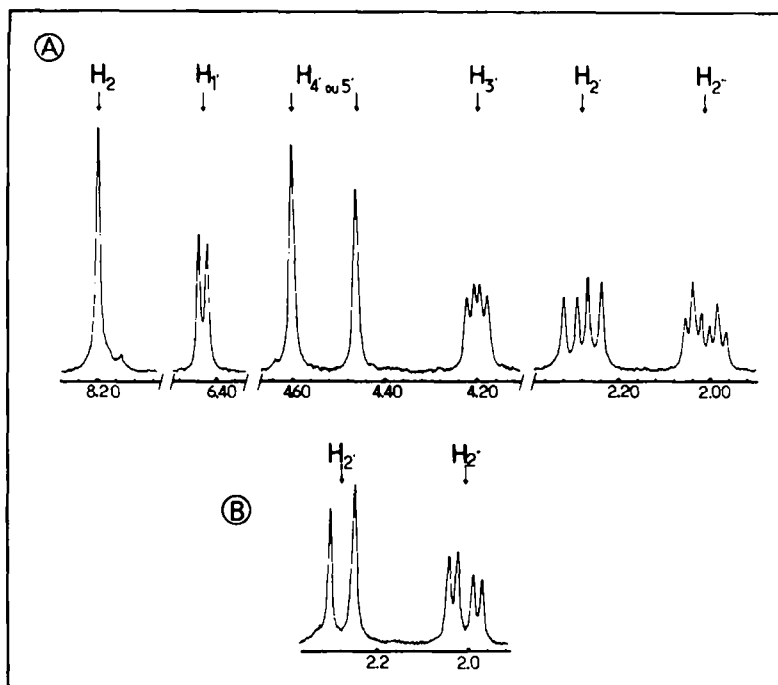


Fig. 1. (A) Spectre ^1H RMN de la cyclo-5',8 d'oxy-2' adénosine; (B) Irradiation du proton $\text{H}3'$.

modifiant les spectres des protons $\text{H}2'$ et $\text{H}2''$ et inversement.

Les deux singulets correspondant chacun à un seul proton sont attribués au proton $\text{H}4'$ et à un proton $\text{H}5'$. En effet l'élimination d'un atome d'hydrogène a eu lieu en $5'$, car deux atomes d'hydrogène sur le même carbone $5'$ seraient obligatoirement couplés (ou, s'ils étaient équivalents auraient le même déplacement chimique).

Puisqu'il manque un seul proton du désoxyribose, le groupement $\text{OH}5'$ a été conservé. Il n'existe donc pas de pont oxygène entre le sucre et la base.

Pour attribuer l'un des deux singulets au proton $\text{H}4'$ ou $\text{H}5'$, le produit a été acétylé. En effet l'acétylation de la fonction $\text{OH}5'$ doit entraîner un déplacement chimique important de l'un des singulets comme le montre le tableau 2.

Les résultats obtenus, ne sont pas assez précis pour l'attribution des singulets mais confirment cependant l'existence d'une fonction OH en $\text{C}5'$ et montrent que l'acétylation a eu lieu en $5'$ et en $3'$.

Pour des raisons stériques le carbone $5'$ ne peut s'associer qu'au carbone 8 de la base et le pic situé à 8.2 ppm correspond à l'hydrogène $\text{H}2$.

Les couplages $J_{1,2}$, $J_{3,4}$, et $J_{4,5}$ sont nuls (Fig. 1) ou trop faibles pour être détectés, résultats observés par Duong *et al.*¹⁰ sur un dérivé de la cyclo-5',8 d'oxy-5' adénosine.

Le modèle moléculaire de la cyclo-5',8 d'oxy-2' adénosine montre qu'effectivement il existe des angles dièdres voisins de 90° entre les liaisons $\text{C}_1\text{H}_1\text{--C}_2\text{H}_2$, $\text{C}_3\text{H}_3\text{--C}_4\text{H}_4$ et $\text{C}_4\text{H}_4\text{--C}_5\text{H}_5$. L'absence de couplage trans

entre $\text{H}1'$ et $\text{H}2'$ explique la présence du doublet à 6.43 ppm ($\text{H}1'$) et permet d'attribuer le quadruplet situé à 2.27 ppm au proton $\text{H}2'$ et le sextuplet situé à 2.01 ppm au proton $\text{H}2''$.

Les valeurs obtenues pour les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont rassemblées dans le Tableau 3.

Par analogie avec les hypothèses faites sur le mécanisme de formation de la cycloadénosine monophosphate⁶ on peut envisager le schéma réactionnel Fig. 2.

Des résultats d'analyse RPE¹³ sur des cristaux de d'oxy-2' adénosine irradiée sont compatibles avec la formation d'un radical en $\text{C}5'$, dû à l'élimination d'un atome d'hydrogène. D'autre part des études récentes¹⁰ ont permis de vérifier que la production d'un tel radical dans un nucléoside purique entraîne la cyclisation en $\text{C}5'\text{--C}8$ de la molécule.

Les valeurs de G (nombre de molécules formées pour 100 eV) sont du même ordre de grandeur en présence ou non d'oxygène: $G = 0.03$ et $G = 0.05$ pour une solution de 10^{-3} M/l, irradiée à la dose de 20,000 rads.

Dans le cas de l'AMP Keck⁶ a supposé que le radical analogue à **b** (Fig. 2) participe à une réaction de dismutation avec le radical résultant de l'addition de OH^\cdot en $\text{C}8$ qui conduirait à deux produits en égales quantités: le nucléotide cyclique et un dérivé résultant de l'hydratation de la double liaison $\text{N}7\text{--C}8$. Dans le cas de la d'oxy-2' adénosine, ce dérivé (hydroxy-8 dihydro-7,8

Tableau 2.

Cyclo-5',8 d'oxy-2' adénosine	Proton	$\text{H}3'$	$\text{H}4'$ ou $5'$	$\text{H}5'$ ou $4'$
	δ ppm	4.20	4.46	4.60
Di-O-acétyl-3',5' cyclo-5',8 d'oxy-2' adénosine	Proton	$\text{H}3'$	$\text{H}4'$	$\text{H}5'$
	δ ppm	5.36	4.96	6.77

Tableau 3. Caractéristiques RMN de la cyclo-5',8 d'oxyadénosine

	$\text{H}2$	$\text{H}1'$	$\text{H}2'$	$\text{H}2''$	$\text{H}3'$	$\text{H}4'$ ou $5'$	$\text{H}5'$ ou $4'$
δ ppm	8.20	6.43	2.27	2.01	4.20	4.46	4.60
	$J1'2'$	$J1'2''$	$J3'2'$	$J3'2''$			
JHz	4.7	-13.2	7.3	4.1			

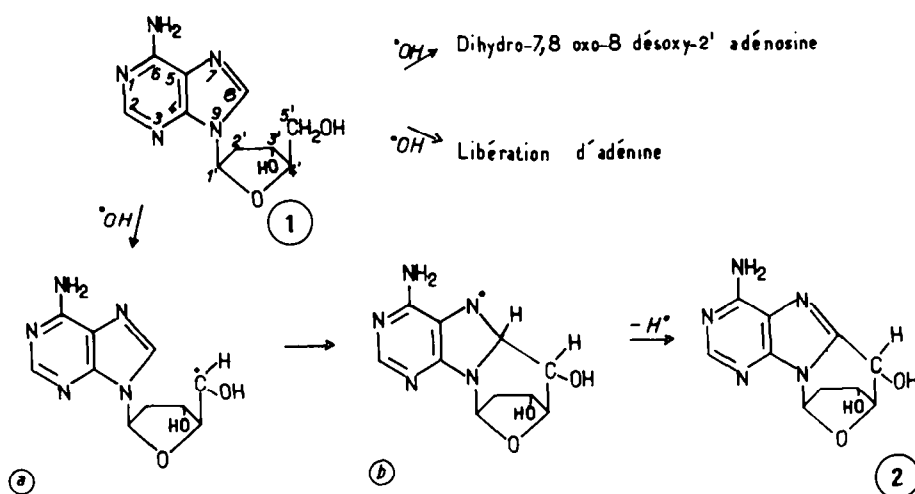


Fig. 2. Hypothèse de formation de la cyclo-5',8 désoxy-2' adénosine par irradiation de la désoxy-2' adénosine.

désoxy-2' adénosine) n'a pas été isolé. Le mécanisme de formation de la cyclo-5',8 désoxy-2' adénosine n'est donc pas encore élucidé. Quoiqu'il en soit l'identification de ce composé confirme l'existence d'un troisième processus radicalaire, autre que l'addition d'un radical $\text{OH}\cdot$ en position 8 et la rupture de la liaison N-glycosidique,⁷ et montre que le carbone 8 peut réagir selon deux voies différentes.

METHODES EXPERIMENTALES

La désoxy-2' adénosine utilisée est un produit commercial Sigma. La produit marqué ^{14}C -8 est fourni par le Département des Radioéléments de Saclay.

Séparation et extraction de la cyclo-5',8 désoxy-2' adénosine

Une solution aqueuse de désoxy-2' adénosine (4×10^{-3} M/l), 250 ml, est irradiée par une source de ^{60}Co (21.000 rad/min) à une dose de 5×10^6 rads. La solution, réduite à 5 ml par évaporation est déposée sur 20 plaques de silice (20×20 cm) Macherey Nagel. Les produits de radiolyse sont séparés dans le système de solvants I: acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75-16-9). Le dérivé étudié, repéré par UV ou autoradiographie est élué trois fois par 10 ml d'eau. Après centrifugation de la silice et réduction de la solution celle-ci est déposée sur 4 plaques de cellulose Merck. Une deuxième chromatographie est faite dans le système de solvants II: phase organique de mélange chloroforme-méthanol-eau (4-2-1) + 5% de méthanol + 1% d'acide acétique. Après extraction par du méthanol, centrifugation et filtration de la solution sur filtre Millipore UGWPO1300, le produit obtenu (4 mg) est analysé par les différentes méthodes spectroscopiques citées ci-dessous.

Mesures Quantitatives

Une solution aqueuse de désoxy-2' adénosine ^{14}C -8 (10^{-3} M/l) est irradiée à 20.000 rad (2800 rad/min), en milieu aéré ou en absence d'oxygène. Dans le premier cas, une pompe à aquarium assure l'apport d'oxygène nécessaire au maintien à l'état aéré de la solution sous irradiation. Pour les mesures en absence d'oxygène, la désaération de la solution est faite par dégazage sous vide. Les valeurs de G ont été évaluées par rapport à la totalité des produits de radiolyse marqués sur le carbone 8 et séparés en analyse

bidimensionnelle sur plaques de cellulose dans les systèmes de solvants II et III: acétate d'éthyle, méthanol, eau (75-16-20) + 2% d'acide acétique. Les produits radioactifs sont extraits par 1 ml HCl 0.1 N et agités pendant 3 h à 50°C. Après addition de liquide scintillant (Instagel Packard), les comptages sont effectués sur un appareil Tricarb.

Caractéristiques de la cyclo-5',8 désoxy-2' adénosine

Spectre UV (appareil Cary 15). $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ m}\mu$ (pH 2), 267 m μ (pH 6.3) 268 m μ (pH 11.2). Spectre IR (appareil Perkin Elmer 257) $\nu = 1675 \text{ cm}^{-1}$, 1610 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 820 cm^{-1} . Spectre de masse du dérivé acétylé (appareil AEI MS9) *m/e* 333 (18) 291 (17.6), 290 (14.0), 276 (5.0), 274 (3.0), 232 (14.0), 231 (9.2), 230 (18.0), 202 (12.0), 190 (17.0), 185 (10.0), 165 (30.0), 164 (45.0), 163 (16.0), 162 (17.0), 136 (16.0), 135.0 (72.0), 108 (11.4), 81 (46.0), 43 (100.0). Spectre RMN (appareil Cameca 250 MHz) caractéristiques dans Tableau 3 (c = 0.15 M/l, $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$).

Remerciements—Nous remercions M. Ulrich pour les mesures de spectrométrie de masse, et M. Reutenauer pour l'enregistrement du spectre RMN à 250 MHz.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹J. J. Conlay, *Nature* **197**, 555 (1963).
- ²C. Ponnampuram, R. M. Lemmon et M. Calvin, *Radiat. Res.* **18**, 540 (1963).
- ³J. J. van Hemmen et J. F. Bleichrodt, *Ibid.* **46**, 444 (1971).
- ⁴G. Scholes, J. F. Ward et J. Weiss, *J. Mol. Biol.* **2**, 379 (1960).
- ⁵G. Scholes, R. O. Willson et M. Ebert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **17** (1969).
- ⁶K. Keck, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1034 (1968).
- ⁷N. Mariaggi et R. Teoule, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (sous presse).
- ⁸M. Ikeda, Y. Tamura et M. Ikehara, *J. Heterocycl. Chem.* **7**, 1377 (1970).
- ⁹M. J. Robins et R. A. Jones, *J. Org. Chem.* **39**, 113 (1974).
- ¹⁰K. N. V. Duong, A. Gaudemer, M. D. Johnson, R. Quilivic et J. Zylber, *Tetrahedron Letters* 2997 (1975).
- ¹¹K. N. Slessor et A. S. Tracey, *Carbohydr. Res.* **27**, 407 (1973).
- ¹²L. Galtin et J. C. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4464 (1962).
- ¹³C. Alexander, J. Franklin et C. E. Franklin, *J. Chem. Phys.* **54**, 1909 (1971).