

RADIOSENSIBILISATION DE LA THYMINE EN PRESENCE DE TETRAMETHYL-2,2,6,6 PIPERIDONE-4 OXYLE-1. CARACTERISATION DES PRODUITS D'ADDITION

J. CADET, M. BERGER, M. GUTTIN-LOMBARD et M. J. BOBENRIETH*

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

(Received in France 9 August 1978; Received in the UK for publication 5 December 1978)

Résumé—L'addition des radicaux radio-induits dihydro-5,6-hydroxy-6-thyminyles-6 et dihydro-5,6-hydroxy-5-thyminyles-5 à la tétraméthyl-2,2,6,6-piperidone-4 oxyde-1 en solution aqueuse désaérée engendre respectivement les deux produits majeurs 2 et 3. La caractérisation de ces dérivés repose principalement sur les analyses de RMN, ^{13}C et de spectrométrie de masse (ionisation chimique, désorption de champ). Le dérivé N-oxyde 2 qui a été préparé de manière spécifique donne lieu à une réaction d'élimination de Cope et à une transposition radicalaire du cycle pyrimidinique.

Abstract—The reaction of 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-1-oxyl with radiation-formed 5,6-dihydro-6-hydroxy-thymin-5-yl and 5,6-dihydro-5-hydroxy-thymin-6-yl radicals in oxygen-free aqueous solution generate respectively two major products 2 and 3. The chemical assignment of both covalent addition derivatives is based mainly on ^{13}C NMR and mass spectrometry (chemical ionization and field desorption) analysis. The N-oxide 2, which was prepared in a specific manner, undergoes Cope elimination and radical rearrangement within the pyrimidine ring.

Les radicaux nitroxydes stables tels que la tétraméthyl-2,2,6,6 piperidone-4-oxyde-1 ou TAN ont la propriété de sensibiliser les cellules bactériennes hypoxiques à l'action des radiations ionisantes.^{1,2} Il est généralement admis que ces substances interagissent au niveau moléculaire avec les radicaux radio-induits dans les chaînes d'acides désoxyribonucléiques. Diverses études ont montré que le mode d'action de la molécule de TAN sur la thymine utilisée comme produit modèle fait intervenir deux mécanismes principaux.^{4,5} Dans un cas les radicaux anioniques pyrimidinyles qui résultent de l'interaction des électrons solvatés avec la thymine sont réoxydés quantitativement par le TAN car le potentiel d'oxydo-réduction de celui-ci est élevé.⁶ Le deuxième processus fait intervenir des réactions entre le nitroxyde et les radicaux dihydro-5,6 hydroxy-6(5)-thyminyles-5(6) engendrés par addition d'un radical hydroxyle sur la double liaison 5,6 de la pyrimidine.⁷ L'identification des produits finaux de ces réactions a fait l'objet de travaux préliminaires.^{8,9} La caractérisation de ces composés qui repose sur diverses analyses spectroscopiques (RMN ^{13}C , spectrométrie de masse) et l'étude de leurs propriétés spectroscopiques est présentée dans ce mémoire.

RESULTATS ET DISCUSSION

La radiolyse gamma d'une solution aqueuse désaérée de 1 mM thymine ^{14}C -2 1 en présence de 0.5 mM TAN engendre la formation de deux produits majeurs de dégradation 2 et 3 (Fig. 1) qui ont été séparés par chromatographie sur couche mince de silice (Tableau 1).

Ces dérivés qui ont été détectés par autoradiographie donnent lieu à une révélation caractéristique de la présence d'une fonction cétonique après pulvérisation du chromatogramme avec le réactif à la dinitrophényl-

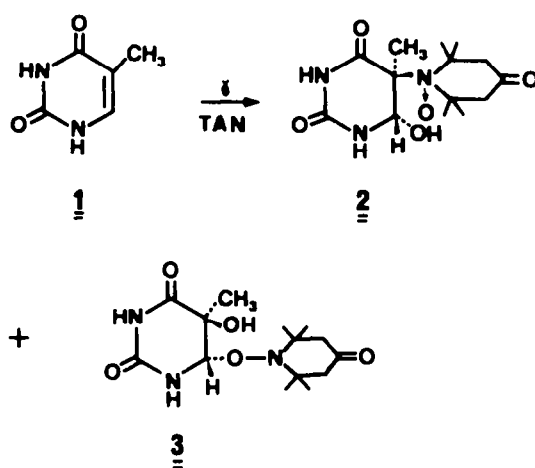


Fig. 1. Produits d'addition radio-induits de la thymine 1 en présence de tétraméthyl-2,2,6,6 piperidone-4 oxyde-1.

hydrazine. La formule brute de ces deux composés ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}_3$) est en faveur de structures correspondant à l'addition en 5,6 du cycle pyrimidinique d'un radical hydroxyle et d'une molécule de TAN comme le confirme l'analyse de RMN ^1H de 2 et 3. La disparition de l'absorption UV à 260 nm et le déplacement bathochrome de la vibration ν ($\text{C}=\text{O}$) de la fonction carbonyle en position 4 sont caractéristiques de la perte du caractère éthylénique de la liaison 5,6. Les pyrimidines saturées adoptent une conformation demi-chaîse en solution^{10,11} ou à l'état solide.¹²⁻¹⁴ Une relation a été établie entre la valeur du couplage H_1-H_6 et la conformation du proton $\text{H}-6$.¹⁰ Les valeurs élevées de $^3\text{J H}_1-\text{H}_6$ (≈ 4 Hz) observées dans le spectre respectif de RMN ^1H de 2 et 3 sont indicatives d'une orientation préférentielle de type pseudo-équatoriale pour $\text{H}-6$.

*Laboratoire de Spectrométrie de Masse, DCN/DCA/CAG/EAPC, CEA/CEN Grenoble.

Tableau 1. G de formation^a des principaux produits de dégradation radio-induite^b de la thymine 10⁻³ M en présence de TAN 5 × 10⁻⁴ M

PRODUITS	N ₂	N ₂ O
Thymine <u>1</u>	-1.19	-2.23
Dihydro-5,6-hydroxy-6-(tétraméthyl-2,2,6,6-oxo-pipéridinyl-1)-thymine-N'-oxyde <i>trans</i> <u>2</u>	0.22	0.39
Dihydro-5,6-hydroxy-5-(tétraméthyl-2,2,6,6-oxo-4-pipéridinoxy)-6-thymine <i>trans</i> <u>3</u>	0.23	0.38
Dihydro-5,6-dihydroxy-5,6-thymine <i>cis</i>	0.19	0.39
Dihydro-5,6-dihydroxy-5,6-thymine <i>trans</i>	0.04	0.14

^aNombre de molécules formées ou détruites pour une absorption de 100 eV.

^bDose de rayonnement = 195 krad.

Détermination du site d'attachement de la molécule de TAN

La seule considération des valeurs de déplacement chimique (δ) de RMN ¹H de 2 et 3 ne permet pas de préciser la position du substituant pipéridone sur les carbones 5 ou 6 en raison de l'absence de spécificité dans le déblindage de H-6 et du méthyle pyrimidinique par rapport aux valeurs correspondantes de δ des isomères *cis* et *trans* de la dihydro-5,6 dihydroxy - 5,6 - thymine (Tableau 2). Des constatations similaires avaient déjà été effectuées pour les différentes formes isomères de la dihydro - 5,6 - hydroperoxy - 6(5) - hydroxy - 5(6) - thymine.¹⁵

Par contre l'examen des valeurs de déplacement chimique de RMN ¹³C de ces mêmes substances et leurs comparaisons avec celles des deux diastéréoisomères de la dihydro - 5,6 - dihydroxy - 5,6 - thymine laissent apparaître des différences sensibles que l'on peut relier à la position du substituant pipéridone fortement électro-négatif (Tableau 2). Le glissement d'environ 9 ppm vers les faibles valeurs de champ du signal de résonance du C-5 de 2 et du C-6 de 3 est à relier à la présence du radical N-oxyde sur ces atomes de carbone. On note un léger blindage (\approx 1 ppm) des carbones situés en β . L'amplitude de l'effet α qui est sensiblement égale à celle due à une fonction peroxydique est voisine de 38 ppm pour les dérivés de la dihydro - 5,6 - thymine.¹⁶

Le déplacement du signal du méthyle pyrimidinique de 2 à haut champ est le reflet de la proximité atérique de ce groupement avec le cycle pipéridone tétrasubstitué. L'existence d'un effet γ (\approx 4 ppm) entre le méthyle de 3 et le radical pipéridinoxy rend compte d'une interaction *gauche* entre ces deux substituants et permet par là même d'attribuer la configuration *trans* à ce dérivé.

La confirmation de l'attachement de la molécule de TAN sur le C-5 de 2 a été obtenue par synthèse radio-chimique. L'irradiation gamma de la solution aqueuse désaérée de bromo - 5 - dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thymine *trans* 4 conduit de manière spécifique à la formation du radical dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thymine - 5 (Fig. 2) après capture dissociative de l'halogène par les électrons solvatés issus de la radiolyse de l'eau. La réaction de recombinaison de ce radical avec la molécule de TAN engendre quantitativement 2. Dans les mêmes conditions de dégradation radio-induite la bromo - 5 - dihydro - 5,6 - thymine 5 conduit à la formation du produit d'addition 6 instable qui est présent en faible quantité dans les solutions aqueuses de 1 irradiées en présence de TAN (Tableau 1).

Propriétés chimiques des produits d'addition

La réaction d'addition d'un nitroxyde avec un radical organique peut conduire à la formation d'une hydroxylamine substituée^{17,18} ou d'un dérivé de type N-oxyde.¹⁹

Tableau 2. Valeurs de déplacements chimiques^a de RMN ¹³C et ¹H de dérivés de dégradation radio-induite de la thymine^b

COMPOSES	rmn ¹³ C			rmn ¹ H	
	CH ₃ ^c	C-5	C-6	CH ₃ ^c	H-6
<u>2</u>	13.9	78.8	77.1	1.42	4.73
<u>3</u>	19.7	68.1	87.0	1.45	4.71
Dihydro-5,6-dihydroxy-5,6-thymine <i>cis</i>	19.5	69.5	78.4	1.26	4.36
Dihydro-5,6-dihydroxy-5,6-thymine <i>trans</i>	23.4	71.2	78.8	1.26	4.35
Dihydro-5,6-hydroperoxy-6-hydroxy-5-thymine <i>cis</i>	24.9	69.0	88.6	1.35	4.62

^aDéplacements chimiques (δ) exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane placé comme référence interne.

^bLes spectres ont été enregistrés dans le diméthylsulfoxyde d₆ à l'aide d'un spectromètre Bruker WP 60 (RMN ¹³C), appareil VARIAN T-60 (RMN ¹H).

^cMéthyle pyrimidinique.

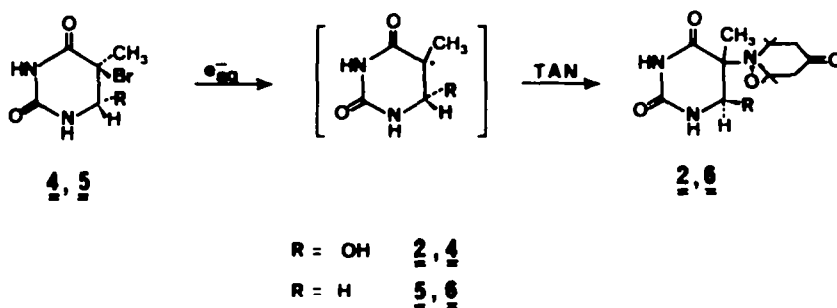


Fig. 2. Dégradation radio-induite de la bromo - 5 - dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thymine 4 et de la bromo - 5 - dihydro - 5,6 - thymine 5 en présence de triacétoneamine - N - oxyde.

La distinction entre ces deux composés repose généralement sur la facilité de réduction de l'hydroxylamine.²⁰ L'hydrogénolyse de 3 en présence de Pd/C engendre quantitativement la dihydro - 5,6 - dihydroxy - 5,6 - thymine *trans* et la tétraméthyl - 2,2,6,6 - pipéridone - 4. La rupture de la liaison N-O s'effectue avec une rétention de configuration du carbone 6, confirmant ainsi l'attribution *trans* du noyau pipéridone par rapport à l'hydroxyle (*vide supra*). Il est à noter que dans les mêmes conditions d'hydrogénation le dérivé 2 n'est pas modifié.

Par contre, ce dernier composé présente une plus grande instabilité que 3 en solution aqueuse. Les produits de dégradation de 2 ont été respectivement identifiés à l'hydroxyméthyl - 5 - uracile 7, l'hydroxy - 5 - méthyl - 5 - hydantoïne et à des traces d'acide méthyl - 5 - barbiturique par comparaison de leurs propriétés spectroscopiques avec celles des substances témoins.^{21,22} La transformation de 2 en 7 et en acide méthyl - 5 - barbiturique fait intervenir une réaction d'élimination de Cope²³ qui est caractéristique d'une structure de type N-oxyde. La première étape de cette réaction consiste en une abstraction d'un hydrogène situé en β de la fonction N-O consécutive à un état de transition cyclique pentagonal. Le dérivé pyrimidinique 4 formé transitoirement possède un groupement méthylène extrêmement réactif qui permet d'expliquer la formation d'hydroxy - méthyl - 5 - uracile 8 ou d'hydroperoxyméthyl - 5 - uracile 9 en présence respectivement d'eau et de peroxyde d'hydrogène. L'attaque nucléophile de la fonction méthylène exocyclique et l'élimination de l'hydroxyle porté par le carbone C-6 s'effectuent vraisemblablement selon un mécanisme concerté. Un intermédiaire similaire à 4 a été proposé par Pogolotti et Santi²⁴ pour rendre compte du mécanisme des réactions biologiques catalysées par la thymidylate synthétase et la désoxy-uridine monophosphate hydroxyméthylase.

La faible importance quantitative de l'acide méthyl - 5 - barbiturique qui résulte de l'autre possibilité d'élimination d'un hydrogène en β de la fonction nitroxyde est le reflet de contraintes stériques. Le gauchissement du cycle pyrimidique de 2 (*vide supra*) qui entraîne une orientation équatoriale-axiale préférentielle pour H-6 et le noyau pipéridone rend difficile l'établissement d'un état de transition cyclique plan. Par contre l'élimination d'un hydrogène du groupement méthyle ne doit pas être associée à un changement notable de la géométrie de la pyrimidine si l'état de transition de la réaction ne présente pas de caractère sp^3 marqué.

La formation d'hydroxy - 5 - méthyl - 5 - hydantoïne 10 (Rdt 10%) fait intervenir initialement une rupture homolytique de la liaison C-N qui constitue la première étape de la réaction de Meisenheimer.^{25,26} Les radicaux dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thyminyles - 5 ainsi produits peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire lorsqu'ils ne sont pas impliqués dans un effet de cage pour engendrer les espèces β -hydroxy-hydroperoxydes $T(OH)O_2$.²⁷ Ces dernières peuvent conduire par autoréaction à la formation de radicaux oxydes²⁸ qui subiraient alors une β -scission.^{27,29}



Cette séquence de réactions apparaît être l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer l'ouverture de la liaison 5,6-pyrimidique. Le radical α -hydroxy-hydroperoxyde obtenu par addition d'une molécule d'oxygène peut perdre HO_2 pour engendrer la N_1 - formyl - N_2 - pyruvyl urée. L'hydrolyse de ce diuréide donne quantitativement l'hydroxy - 5 - méthyl - 5 - hydantoïne 10.³¹

La formation de 10 n'est pas observée lorsque la dégradation hydrolytique de 2 est effectuée en l'absence d'oxygène. On note par contre la présence de dérivés de type dimère résultant de la recombinaison de radicaux dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thyminyles.³²

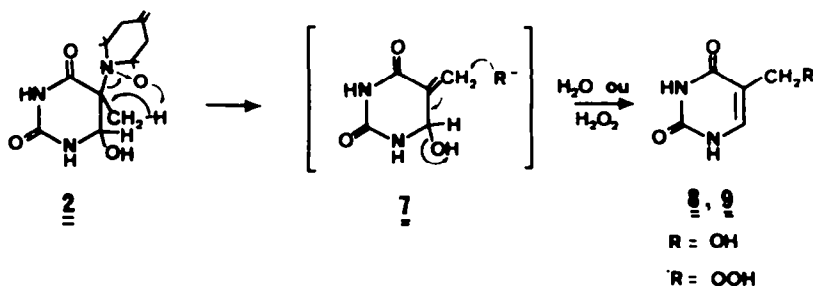


Fig. 3. Transformation de 2 en hydroxyméthyluracile 8 ou hydroperoxyméthyluracile 9 selon le mécanisme de Cope.

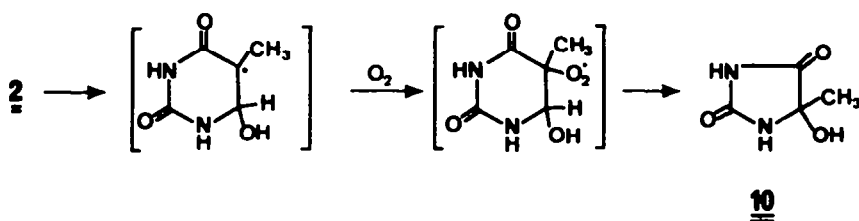


Fig. 4. Transposition radicalaire du dérivé N-oxyde 2 en solution aqueuse oxygénée.

Mécanisme de formation des produits d'addition

La dégradation radio-induite de la thymine 1 en solution aqueuse diluée s'effectue essentiellement par l'intermédiaire des espèces réactives suivantes:



En présence de TAN, seuls les radicaux hydroxyles jouent un rôle prépondérant dans la décomposition de 1. La transformation quantitative des e_{aq}^- en radicaux OH^\cdot dans les solutions saturées avec N_2O^{33} se traduit effectivement par un doublement du rendement radiochimique de 2 et 3 (Tableau 1). Dans ces mêmes conditions le produit 8 est formé avec une valeur de G sensiblement égale à celle observée en présence d'azote, suggérant que les radicaux dihydro-5,6-thiminyles-5 résultent essentiellement de l'addition sélective de l'atome d'hydrogène. Les réactions bimoléculaires du TAN avec les radicaux dihydro-5,6-hydroxy-6-thiminyles-5 et dihydro-5,6-hydroxy-6-thiminyles-6 conduisent respectivement aux produits finaux 2 et 3. La formation de 3 implique vraisemblablement une transposition du dérivé N-oxyde d'addition produit transitoirement.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres UV ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Cary, modèle 15. L'enregistrement des spectres IR été effectués sur un appareil Perkin-Elmer 177 en utilisant la micro-méthode en phase solide (KBr). Les spectres de RMN ^{13}C a été effectué à l'aide d'un spectromètre Bruker WP 60 par la méthode de transformée de Fourier. Les spectres de masse par impact électronique et ionisation chimique ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre de masse à double focalisation AEI MS 50 par introduction directe. En impact électronique le potentiel d'accélération des électrons est de 70 V. En ionisation chimique, le gaz réactif est le méthane.

La température de la source est de 100°. La détermination des masses exactes a été effectuée selon la technique du "peak matching". Les spectres de masse par désorption de champ ont été effectués sur un spectromètre de masse à double focalisation Varian-Mat 311 A. Les potentiels respectifs d'extraction et d'accélération sont de 6 kV et 3 kV. Le courant de chauffage de l'émetteur est de 16 mA pour le composé 3 et de 12 à 15 mA pour 2. La température de la source est de 120° environ.

Les points de fusion mesurés à l'aide d'un microscope à platine chauffante (Reichert) ne sont pas corrigés. Les analyses centésimales ont été effectuées par le Service Central de Micro-analyse du CNRS.

Les analyses de chromatographie liquide à haute performance ont été effectuées avec un appareil Waters R1 401 équipé d'une boucle à injection (Modèle U 6K). Les séparations ont été obtenues sur une colonne (0,46 x 25 cm) de phase inverse Lichrosorb RP 18 (Merck) à l'aide du système isocratique méthanol-eau (9:1).

Les chromatographies sur couche mince (ccm) ont été

effectuées sur des plaques de silice MN-S-HR/UV 254 (Machery Nagel) ou des feuilles plastiques recouvertes de silice précèta à l'emploi (Merck). Les systèmes de solvants suivants ont été utilisés - A: chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5% de méthanol; B: acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9); C: chloroforme-méthanol (95:5) et D: acétate d'éthyle-méthanol (75:8). Les produits radioactifs sont détectés sur le chromatogramme par autoradiographie à l'aide du papier Kodak Kodirex. Les mesures quantitatives de radioactivité ont été effectuées avec un spectromètre à scintillation liquide Packard (Tricarb). La thymine $^{14}\text{CH}_3$ provient du Département des Radioéléments de Saclay.

La bromo-5-dihydro-5,6-hydroxy-6-thymine *trans* a été préparée par action de l'acide hypobromeux sur la thymine.³⁴ La bromo-5-dihydro-5,6-thymine a été obtenue selon le procédé de Notre *et al.*³⁵ La tétraméthyl-2,2,6,6-piperidone-4-oxyle-1 a été synthétisée selon la méthode de Brière *et al.*³⁶

Dihydro-5,6-hydroxy-6-(tétraméthyl-2,2,6,6-oxo-4-pipéridinyl-1)-5-thymine-N'-oxyde *trans* 2

La solution aqueuse (1000 ml) de thymine 1 (125 mg) et de TAN (350 mg) préalablement désaérée par balayage d'un courant gazeux d'azote est soumise à l'action des rayons gamma d'une source de ^{60}Co (débit de dose 56 krad/min) pendant 45 min. La solution irradiée est ensuite évaporée sous vide jusqu'à sécheresse. Le résidu résultant est chromatographié sur 8 plaques de silice 20 x 20 cm à l'aide du système de solvant A. La zone de silice de R_f 0,55 qui absorbe en lumière UV et renferme les deux produits majeurs d'addition radio-induits et la thymine 1 est extraite avec 3 x 8 ml de méthanol. La solution alcoolique est concentrée sous vide et le mélange de produits est séparé par chromatographie couche mince sur 3 plaques de silice. Le développement chromatographique (solvant D) est répété trois fois dans la même direction après séchage intermédiaire du chromatogramme. L'extraction méthanolique (3 x 5 ml) de la zone de silice (R_f 0,79), qui absorbe légèrement sous une lampe de Wood et qui donne une réaction colorée avec le réactif à la 2,4-dinitrophénylhydrazine³⁷ conduit à l'obtention de 32 mg de 2 sous forme cristalline (Rdt = 10%). P.f. 125° dec. UV ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$) 240 nm ($\epsilon = 4 \times 10^3$); IR (cm^{-1}) 1725 (C=O), 1310, 1235 (N-O). RMN ^1H (diméthylsulfoxyde d_6) δ 1.02 (s, 3, CH_3), 1.06 (s, 3, CH_3), 1.12 (s, 6, 2 x CH_2), 1.18 (s, 3, CH_3), 1.45 (s, 3, CH_3 pyrimidique), 2.15 (d, 4, 2 x CH_2), 2.61 (d, 4, 2 x CH_2), 4.73 (d, 1, $J_{\text{K},1} = 4.5$ Hz, H-6), 6.13 (s, large, 1, OH-6), 8.45 (s, 1, $J_{\text{K},1} = 4.5$ Hz, NH-1), 10.15 (s, 1, NH-3). RMN ^{13}C (diméthylsulfoxyde d_6) δ 13.9 (9, CH_3 pyrimidique), 22.5 (9, 2 x CH_2), 32.7 (9, CH_2), 33.1 (9, CH_2), 52.6 (t, CH_2), 53.1 (t, CH_2), 62.1 (s, C-2) ou C-6 pipéridone), 62.2 (s, C-6 ou C-2 pipéridone), 77.1 (d, C-6), 78.8 (s, C-5), 170.6 (s, C-4). Spectrométrie de masse, IE: *m/e* (intensité relative) 172 (3.6); 171 (34.0); 170 (2.8); 157 (9.4); 156 (100.0); 140 (3.0); 114 (9.1); 101 (3.0); 100 (67.9); 87 (2.6); 86 (3.2); 84 (5.1); 83 (67.9); 74 (24.2); 73 (20.8); 72 (52.8); 70 (11.3); 58 (5.1); 57 (7.2); 56 (35.8); 55 (17.0); 54 (2.8); 53 (2.5); 43 (9.1); 42 (9.4); 41 (18.9); 39 (7.9). IC: *m/e* 212 (1.9); 200 (1.5); 173 (6.5); 172 (54.2); 171 (41.7); 170 (12.7); 157 (2.7); 156 (27.1); 154 (11.2); 140 (3.7); 139 (2.1); 127 (9.4); 116 (3.7); 114 (10.4); 101 (2.3); 99 (14.8); 98 (6.0); 85 (7.1); 83 (5.6); 75 (4.6); 74 (100.0); 70 (3.3); DC: *m/e* 340 (12.9); 339 (7.1); 314 (3.6); 313 (5.0); 296 (5.0); 295 (15.7); 172 (15.7); 171 (100.0); 170 (42.9); 143 (17.9); 142 (10.7); 125 (11.4). Analyse: trouvée: C, 50.74; H, 7.61; N, 12.68. Calc. pour $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_3$, H_2O (331.36): C, 50.44; H, 7.45; N, 12.85%.

Dihydro - 5,6 - hydroxy - 5 - (tétraméthyl - 2,2,6,6 - oxo - 4 - pipéridinoxy) - 6 - thymine trans 3

Un deuxième dérivé ($R_f = 0.66$) situé entre la thymine ($R_f = 0.53$) et le dérivé N-oxyle 2 donne sur les chromatogrammes précédents une réaction positive avec le réactif à la 2,4 - dinitro-phénylhydrazine. L'extraction de la zone de silice correspondante avec 3×10 ml de méthanol conduit après évaporation à sec de la solution alcoolique à l'obtention de 29 mg de 3 à l'aspect huileux (Rdt = 9%). IR (cm^{-1}) 1730 (C=O), 1310, 1240 (N-O). RMN ^1H (diméthylsulfoxyde d_6) δ 0.94 (s, 3, CH_3), 1.11 (s, 6, $2 \times \text{CH}_3$), 1.30 (s, 3, CH_3), 1.45 (s, 3, CH_3), 2.13 (d, 4, $2 \times \text{CH}_2$), 2.64 (d, 4, $2 \times \text{CH}_2$), 4.71 (d, 1, $J_{6,1} = 4.5$ Hz, H-6), 8.23 (d, 1, $J_{1,6} = 4.5$ Hz, NH-1), 10.0 (s, 1, NH-3). RMN ^{13}C (diméthylsulfoxyde d_6) δ 19.7 (9, CH_3 pyrimidique), 22.1 (9, $2 \times \text{CH}_3$), 32.7 (9, CH_3), 33.1 (9, CH_3), 53.0 (t, $2 \times \text{CH}_2$), 62.0 (s, C-2 ou C-6 pipéridone), 63.5 (s, C-6 ou C-2 pipéridone), 68.1 (s, C-5), 87.0 (d, C-6), 172.4 (s, C-4). Spectrométrie de masse, IE: m/e (intensité relative), 171 (9.0); 170 (100.0); 156 (9.7); 152 (5.2); 143 (9.0); 142 (97.0); 140 (10.4); 128 (10.4); 126 (6.7); 124 (3.7); 114 (10.4); 113 (1.9); 112 (2.8); 111 (4.6); 110 (3.9); 100 (8.6); 99 (9.3); 86 (29.9); 84 (11.2); 83 (52.2); 74 (3.4); 73 (6.7); 72 (7.5); 71 (3.7); 70 (4.1); 60 (16.4); 59 (52.2); 56 (41.0); 55 (33.6); 42 (18.7); 41 (29.9). IC: m/e 314 (3.1); 173 (4.1); 172 (34.4); 171 (9.4); 170 (2.2); 156 (12.5); 154 (7.8); 143 (8.4); 140 (3.1); 127 (9.7); 116 (2.8); 114 (2.7); 113 (3.7); 101 (3.7); 100 (4.7); 99 (10.9); 98 (3.1); 87 (3.2); 85 (53.1); 84 (3.7); 83 (4.7); 75 (4.4); 74 (100.0); 70 (4.1); 58 (5.6); 57 (18.8); 56 (6.9); 55 (3.7). DC: m/e 315 (10.9); 314 (23.6); 313 (41.8); 171 (36.4); 170 (45.5); 143 (100.0).

Radiolyse gamma de solution aqueuse de bromo - 5 - dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 thymine trans 4 en présence de TAN

Une solution aqueuse désaérée (200 ml) de 50 mg de bromo - 5 - dihydro - 5,6 - hydroxy - 6 - thymine 4 renfermant 70 mg de TAN est irradiée dans les conditions précédentes pendant 2 h 30 min (dose intégrée = 2100 krad). L'analyse chromatographique bidimensionnelle (systèmes de solvants A et B) d'une partie aliquote de la solution irradiée montre que la bromohydrine 4 a fait place au dérivé majeur N-oxyle 2. Ce dernier est purifié par chromatographie semi quantitative sur 6 plaques de silice 20×20 cm avec le système de solvant D. L'extraction méthanolique (3×10 ml) de la zone de R_f 0.79 permet l'obtention de 22 mg de 2a qui présente des caractéristiques spectroscopiques IR, RMN ^1H avec le produit obtenu précédemment (*vide supra*). Le dérivé N-oxyle apparaît homogène en chromatographie liquide haute performance sur colonne de phase inverse Lichrosorb RP 18 (10 μm); $k' = 0.87$ avec le mélange eau-méthanol (5:5) comme système de solvant.

Dihydro - 5,6 - (tétraméthyl - 2,2,6,6 - oxo - 4 - pipéridinyl - 1) - 5 - thymine - N - oxyle 6

La solution aqueuse (200 ml) préalablement désoxygénée de 80 mg de bromo - 5 - dihydro - 5,6 - thymine ^{14}C -2 5 et de 70 mg de TAN est irradiée pendant 2 h 30 min (dose absorbée: 2100 krad). Dans ces conditions, la pyrimidine initiale est complètement dégradée comme le montre l'analyse chromatographique d'une partie aliquote du milieu d'irradiation sur couche mince de silice (systèmes de solvants A et B). La solution irradiée est concentrée sous vide et chromatographiée sur 4 plaques de silice 20×20 cm à l'aide du solvant C. La bande de silice (R_f 0.64, détectée par autoradiographie, et qui donne une révélation positive avec le réactif à la 2,4-dinitro-phénylhydrazine est extraite avec 3×10 ml de méthanol. L'évaporation à sec de la solution alcoolique permet l'obtention de 16 mg de 5 qui se dégrade partiellement au cours de la purification. Deux produits de décomposition qui sont plus polaires que 5 ont été séparés par chromatographie sur couche mince de silice avec le solvant A. La pyrimidine absorbant fortement à 254 nm a été identifiée à la thymine et le deuxième composé à la dihydro - 5,6 - hydroxy - 5 - thymine par comparaison de ses propriétés spectroscopiques (IR, spectrométrie de masse) avec celles de la substance témoin.³⁴ P.f. 255°, lit.³⁵ 225°; spectrométrie de masse, I.E: m/e 144 (M^+).

La transformation de 4 en ces deux produits est complète au

bout de 3 h en solution aqueuse à 20° (60% de thymine 1 et 40% d'hydroxy - 5 - dihydro - 5,6 - thymine 4).

Hydrogénation catalytique de la dihydro - 5,6 - hydroxy - 5 - tétraméthyl - 2,2,6,6 - oxo - 4 - pipéridinoxy) - 6 - thymine 3

Le mélange de 50 mg de 3 et de 2.5 g de palladium 10% sur carbone dans 50 ml d'une solution aqueuse de méthanol (1:1) v/v est soumis à une hydrogénation dans un autoclave sous une pression de 50 bars pendant 5 h à 20°. Le catalyseur est éliminé par filtration sur un lit de Celite. La solution est évaporée jusqu'à siccité et le résidu huileux est chromatographié sur 2 plaques de silice 20×20 cm à l'aide du système de solvants B. Le produit majeur (R_f 0.45) qui est détecté sur le chromatogramme par autoradiographie ou après pulvérisation avec le réactif au para diméthylbenzaldehyde ou pDAB est extrait avec 3×5 ml de méthanol. L'évaporation à sec de la solution alcoolique conduit à l'obtention de 16 mg de 5,6 - dihydroxy - 5,6 - dihydrothymine trans (Rdt = 63%). P.f. 219-220° (Lit.^{38,39} 218-219°, 219-220°). Spectrométrie de masse, IE: m/e (intensité relative) 115 (M^+ -NH-CHOH, 100). IC: m/e 161 (100); 143 (45); 89 (15); 46 (12).

Dégradation hydrolytique de la dihydro - 5,6 - hydroxy - 6(tétraméthyl - 2,2,6,6 - oxo - 4 - pipéridinyl - 1) - 5 thymine - N' - oxyle trans 2

Le dérivé N-oxyle 2 ^{14}C -2 (200 mg) est dissous dans 40 ml d'une solution aqueuse oxygénée dont la température est maintenue à 25°. La transformation de 2 qui est suivie par l'analyse chromatographique de parties aliquotes du milieu réactionnel à l'aide des systèmes de solvants A et B est complète au bout de 72 h. Les trois dérivés pyrimidiques majeurs de décomposition sont séparés par chromatographie sur 2 plaques de silice 20×20 cm avec le système de solvants B. L'extraction des trois zones radioactives (R_f 0.74, R_f 0.69 et R_f 0.32) avec 3×5 ml de méthanol conduit respectivement après évaporation de la solution alcoolique à l'obtention de 11 mg d'hydroxy - 5 - méthyl - 5 hydantoïne 10 (Rdt 13%) de 5 mg d'acide méthyl-5 barbiturique (Rdt 5%) et de 34 mg d'hydroxyméthyl-5 uracile 8 (Rdt 38%). Ces trois pyrimidines présentent des caractéristiques spectroscopiques (IR, spectrométrie de masse) identiques à celles des substances témoins. Hydroxyméthyl-5 hydantoïne 10, p.f. 166° (Lit.³⁹, 166); spectrométrie de masse, I.E: m/e (intensité relative) 132 (M^+ , 0.7); 102 (M^+ -CO, 52.2). Acide méthyl - 5 - barbiturique p.f. 203 (Lit.²⁷ 203).

Hydroperoxyméthyl-5-uracile 9

La dégradation de 20 mg de 2 dans 15 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (15%) pendant 65 h à 25° engendre un produit majeur qui a été séparé par chromatographie sur 2 plaques de silice (solvant B). L'extraction de la zone de silice (R_f 0.58) qui absorbe fortement à 254 nm et qui donne lieu à une libération d'iode après pulvérisation du chromatogramme avec une solution d'iode de potassium est effectuée à l'aide de 3×5 ml de méthanol. L'évaporation à sec de la solution alcoolique permet l'obtention de 12 mg d'hydroperoxyméthyl - 5 - uracile 9 (Rdt 30%) identique au produit de synthèse.^{40,41} p.f. > 230° dec).

Remerciements—Nous remercions M. J. C. Promé du Centre de Recherche de Biochimie et Génétique Cellulaires de Toulouse pour l'enregistrement des spectres de masse par désorption de champ.

REFERENCES

- ¹P. T. Emmerson et P. Howard-Flanders, *Radiat. Res.* 26, 54 (1965).
- ²E. Wold et T. Brustad, *Acta Chem. Scand. B* 29, 781 (1975).
- ³I. Johansen, R. Gulbrandsen, E. M. Fielden et O. Sabora, *Radiat. Res.* 70, 597 (1977).
- ⁴P. T. Emmerson, *Advances in Radiation Chemistry* (Edited by M. Burton and J. L. Magee), Vol. 3, p. 209, Wiley Interscience, New York (1972).
- ⁵S. Kato, M. Kuwabara et G. Yoshii, *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 7, 579 (1975).

- ⁶T. Brustad, W. B. G. Jones et E. Wold, *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 33 (1973).
- ⁷E. Wold et T. Brustad, *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 153 (1973).
- ⁸J. Cadet, M. Guttin-Lombard et R. Téoule, *Int. J. Radiat. Biol.* **30**, 1 (1976).
- ⁹J. Cadet et R. Téoule, *J. Radiat. Res.* **18**, 93 (1977).
- ¹⁰M. Chabre, D. Gagnaire et C. Nofre, *Bull. Soc. Chim. France* **108** (1966).
- ¹¹A. R. Katritzky, M. R. Nesbit, B. J. Kurtev, M. Lyapova et I. G. Pojarieff, *Tetrahedron* **25**, 3807 (1969).
- ¹²M. Sundaralingam, A. T. Rao et J. Abola, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 7055 (1971).
- ¹³D. Suck, W. Saenger et K. Zechmeister, *Acta Cryst. B* **28**, 596 (1972).
- ¹⁴A. Grand et J. Cadet *Ibid.* **34**, 1524 (1978).
- ¹⁵J. Cadet et R. Téoule, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **59**, 1047 (1974).
- ¹⁶J. Cadet, R. Ducolomb et A. M. Giroud, en préparation.
- ¹⁷E. G. Rozantzev et V. A. Goluber, *Izv. Akad. Nauk SSR, Ser. Khim.* **891** (1966).
- ¹⁸K. Murayama, S. Morimura et T. Yoshioka, *Bull. Chem. Soc. Japan* **42**, 1640 (1969).
- ¹⁹G. D. Mendenhall et K. V. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 6395 (1973).
- ²⁰E. Testa, B. J. R. Nicolans, L. Mariani et G. Pagani, *Helv. Chim. Acta* **46**, 766 (1963).
- ²¹S. Murahashi, K. Y. Kosai et F. Doura, *Bull. Chem. Soc. Japan* **39**, 1559 (1966).
- ²²B. Dumas et H. G. Biggs, *J. Biol. Chem.* **237**, 2306 (1962).
- ²³A. C. Cope, T. T. Foster et P. H. Towle, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3929 (1949).
- ²⁴A. L. Pogliotti et D. V. Santi, *Biochemistry* **13**, 456 (1974).
- ²⁵J. P. Lorand, R. W. Grant, P. A. Samuel, E. O'Connell et Z. Zaro, *Tetrahedron Letters* **4087** (1969).
- ²⁶A. R. Lepley, P. M. Cook et G. F. Willard, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1101 (1970).
- ²⁷G. Scholes, *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids* (Édité par S. Y. Wang), Vol. 1, p. 521. Academic Press, New York (1976).
- ²⁸D. Lindsay, J. A. Howard, E. C. Horswill, L. Iton et K. U. Ingold, *Can. J. Chem.* **51**, 870 (1973).
- ²⁹C. von Sonntag, K. Neuwald, H. P. Schuchmann, F. Weeke et E. Janssen, *J. Chem. Soc. Perkin II* **171** (1975).
- ³⁰Y. Ilan, J. Rabani et A. Herglein, *J. Phys. Chem.* **80**, 1558 (1976).
- ³¹R. Téoule et J. Cadet, *Molecular Biology Biochemistry and Biophysics* (Édité par J. Hüttermann, W. Köhnlein, R. Téoule et A. J. Bertinchamps) Vol. 27, p. 171. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978).
- ³²L. S. Myers Jr., M. L. Hollis, L. M. Theard, F. C. Peterson et A. Warnick, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2875 (1970).
- ³³E. J. Hart, *Radiat. Res. Rev.* **3**, 285 (1972).
- ³⁴O. Baudisch et D. Davidson, *J. Biol. Chem.* **64**, 233 (1925).
- ³⁵C. Nofre, A. Cier, R. Chapuriat et J. P. Mareschi, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **332** (1965).
- ³⁶R. Brière, H. Lemaire et A. Rassat, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **3273** (1965).
- ³⁷A. Mehlitz, K. Gierschner et T. Minas, *Chem. Ztg* **87**, 573 (1963).
- ³⁸L. R. Subbaraman, J. Subbaraman et E. J. Behrman, *J. Org. Chem.* **38**, 1499 (1973).
- ³⁹J. Cadet, J. Ulrich et R. Téoule, *Tetrahedron* **31**, 2057 (1975).
- ⁴⁰J. Cadet et Téoule, *Biochim. Biophys. Acta* **238**, 8 (1971).
- ⁴¹B. S. Hahn et S. Y. Wang, *J. Org. Chem.* **41**, 567 (1976).