

## ISOMÉRISATION DES 5-BROMO-5,6-DIHYDRO-6-HYDROXYTHYMIDINES. PRÉPARATION DES FORMES ANOMÈRES DE LA THYMIDINE ET DE LA 1-(2-DÉSOXY-*D*-érythro-PENTOFURANOSYL)THYMINE\*

JEAN CADET ET ROBERT TEOULE

*Laboratoire de Radiobiologie, Département de Recherche Fondamentale, Centre d'Études Nucléaires de Grenoble, BP 85, Centre de Tri, 38041 Grenoble Cédex (France)*

(Reçu le 5 mai 1972, accepté après modification le 12 janvier 1973)

### ABSTRACT

The *trans* 5-(*R*), 6-(*R*) and 5-(*S*), 6-(*S*) diastereoisomeric forms of 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine were obtained by the action of bromine upon thymidine in aqueous solution. Treatment of these compounds with warm M hydrobromic acid both rearranges the sugar moiety and cleaves the glycosylamine bond; the yields of both processes were determined. Reduction of the halohydrins gave three isomeric compounds derived from thymidine : 1-(2-deoxy-*α*-D-*erythro*-pentofuranosyl)thymine, 1-(2-deoxy-*β*-D-*erythro*-pentopyranosyl)thymine and 1-(2-deoxy-*α*-D-*erythro*-pentopyranosyl)thymine. These isomerisations were also shown in the treatment of thymidine with hydrobromic acid, but, in the latter case, the process is less productive than in the former one. A mechanism for these reactions is discussed.

### SOMMAIRE

Les deux formes diastéréoisomères *trans* 5-(*R*), 6-(*R*) et 5-(*S*), 6-(*S*) de la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine ont été obtenues par action du brome sur la thymidine en solution aqueuse. Le chauffage de ces dérivés en milieu bromhydrique M conduit d'une part à un réarrangement de la partie osidique et d'autre part à une coupure de la liaison glycosylamine. L'importance relative de ces deux processus est précisée. Les trois formes isomères de la thymidine qui ont été préparées par réduction des halohydrines sont les 1-(2-désoxy-*α*-D-érythro-furanosyl)thymine, 1-(2-désoxy-*β*-D-érythro-pentopyranosyl)thymine et 1-(2-désoxy-*α*-D-érythro-pentopyranosyl)thymine. Ces réactions d'anomérisation et d'isomérisation ont été aussi mises en évidence par action de l'acide bromhydrique sur la thymidine; l'ampleur des phénomènes observés est cependant plus limitée. Le mécanisme de ces réactions est discuté.

### INTRODUCTION

Le phénomène d'anomérisation n'a pas été mis en évidence chez les nucléosides naturels sauf dans le cas particulier de la *pseudo*-uridine qui présente une liaison

\*Ce travail a fait, en partie, l'objet d'une communication devant la Société Chimique de France à Grenoble en décembre 1971. Résumé 11b (Juin 1972).

*C-glycosidique*<sup>1-3</sup>. Tout récemment Sanchez et Orgel<sup>4</sup>, en recherchant des conditions de synthèse prébiotique, ont montré que l'irradiation ultraviolette de la cytidine et de l'uridine conduisait à l'obtention des formes anomères et épimères correspondantes. Dans le cadre des travaux entrepris sur le comportement des constituants des acides nucléiques sous rayonnement gamma, il nous a paru intéressant de rechercher d'éventuelles modifications configurationnelles de la partie osidique de la thymidine. Nous avons montré que l'irradiation gamma de ce nucléoside en solution aqueuse conduisait d'une part aux produits de saturation de la double liaison en positions 5,6, d'autre part, aux dérivés de rupture de la liaison *N-glycosyle*<sup>5</sup> mais l'isomérisation du fragment désoxyribosidique n'a pas été observée.

Par contre, il nous a été possible d'obtenir les anomères pyranosiques et furanosiques des *trans*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidines par action de l'acide bromhydrique sur l'une des formes. Les diastéréoisomères 5-(R), 6-(R) et 5-(S), 6-(S) ont été séparés par chromatographie sur couche mince.

Ces réactions trouvent un champ d'application intéressant puisqu'elles permettent de préparer rapidement et avec un excellent rendement les formes anomères de la thymidine et de la 1-(2-désoxy-D-*érythro*-pentopyranosyl)thymine. Des réactions d'anomérisation et d'isomérisation engendrées par l'acide bromhydrique directement à partir de la thymidine sont aussi possibles, mais l'ampleur des phénomènes est plus limitée.

## RÉSULTATS

Quand on ajoute de l'eau de brome à une solution aqueuse de thymidine (1), on observe l'addition d'acide hypobromeux sur la double liaison du cycle pyrimidique. La saturation de la liaison 5,6-éthylénique se traduit par la perte de l'absorption u.v. à 260 nm et par le déplacement vers les hautes fréquences dans le spectre i.r. de la bande d'absorption de la fonction carbonyle en position C-4. La présence de l'atome de brome en C-5 est confirmée par le déplacement important vers les faibles champs du singulet correspondant au signal de résonance magnétique nucléaire des protons du groupement méthyle. Par analogie avec la thymine et en accord avec ce qu'on observe généralement pour les alcènes, l'addition d'acide hypobromeux sur la double liaison 5,6 de la thymidine (1) s'effectue préférentiellement en *trans* et conduit aux deux diastéréoisomères 5-(S), 6-(S) et 5-(R), 6-(R) de la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (2, 3) (Tableau I). Le chauffage de ces deux bromohydrides (+) 2 et (-) 3 en présence d'acide nitrique selon la méthode de Duschinsky et Fox<sup>8</sup> conduit respectivement par rupture de la liaison *N-glycosyle* aux deux formes énantiomères correspondantes de la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine de configuration *trans*. Par action du nucléophile OH<sup>-</sup> on obtient les deux glycols correspondants de configuration *cis*, c'est-à-dire 5-(S), 6-(R) et 5-(R), 6-(S) (4, 5) qui présentent les mêmes caractéristiques spectroscopiques et chromatographiques que les diols 5-(S), 6-(R) et 5-(R), 6-(S) préparés de manière stéréospécifique par oxydation de la thymidine par le permanganate de potassium<sup>5</sup> à pH 7,5. La nature chimique

TABLEAU I  
VALEURS DES  $R_F$  DES DIFFÉRENTS ISOMÈRES DE LA THYMIDINE ET DES BROMOTHYDRINES CORRESPONDANTS APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE<sup>a</sup>

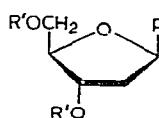
Composés	$R_F^b$	$R_F^c$
Thymidine (1)	0,37	0,52
<i>trans</i> -(+)-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (2)	0,42	0,81
<i>trans</i> -(-)-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (3)	0,34	0,77
<i>cis</i> -(+)-5,6-Dihydro-5,6-dihydroxythymidine (4)	0,18	0,31
<i>cis</i> -(-)-5,6-Dihydro-5,6-dihydroxythymidine (5)	0,12	0,32
1-(2-Desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)thymine (6)	0,37	0,46
1-(2-Desoxy- $\beta$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)thymine (7)	0,48	0,49
1-(2-Desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)thymine (8)	0,39	0,34
Thymine (9)	0,55	0,63
<i>trans</i> -5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (10)	0,51	0,92
<i>trans</i> -(+)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (11)	0,38	0,77
<i>trans</i> -(-)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (12)	0,47	0,83
<i>trans</i> -(+)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\beta$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (13)	0,41	0,79
<i>trans</i> -(-)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\beta$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (14)	0,34	0,77
<i>trans</i> -(+)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (15)	0,37	0,69
<i>trans</i> -(-)-5-Bromo-1-(2-desoxy- $\alpha$ -D- <i>erythro</i> -pentopyranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (16)	0,40	0,66
<i>trans</i> -(+)-5-Bromo-1-(3,5-di-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D- <i>fructo</i> -pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (17)	0,47 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
<i>trans</i> -(-)-5-Bromo-1-(3,5-di-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D- <i>fructo</i> -pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (18)	0,35 <sup>d</sup>	0,81 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>Silice Machery Nagel-S-HR. <sup>b</sup>Chloroforme-méthanol-eau (4:2:1), phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol. <sup>c</sup>Acétate d'éthyle-2-propanol-eau (75:16:9). <sup>d</sup>Chloroforme-méthanol (19:1). <sup>e</sup>Acétate d'éthyle.

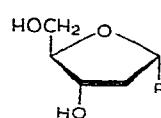
des bromohydrines peut être confirmée encore par réduction douce de celles-ci par l'acide acétique en présence de zinc.

Le chauffage de la solution aqueuse des bromohydrines **2**, **3** et de l'acide bromhydrique en concentrations molaires, pendant 30 min à 90° entraîne l'isomérisation du fragment osidique des bromohydrines, le départ de l'acide hypobromeux qui conduit aux formes isomères de la thymidine et la rupture de la liaison *N*-glycosyle. Quatorze substances nouvelles peuvent être séparées en partie par chromatographie sur couche mince (Tableau I). Cinq de ces produits possèdent le groupement chromophore des dérivés 2,4-dioxopyrimidiques qui présentent une forte absorption u.v. vers 260 nm. Neuf de ces composés sont saturés et bromés.

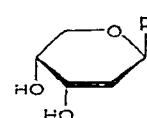
Les substances insaturées sont la thymidine (**1**), la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentofuranosyl)thymine (**6**), la 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (**7**), la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (**8**) et la thymine (**9**). Ces quatre substances proviennent du départ de l'acide hypobromeux des bromohydrines correspondantes. La thymine (**9**) et la thymidine (**1**) sont caractérisées sans difficulté par comparaison avec des substances témoins (spectres et chromatographies). Le composé **6**, qui présente un comportement chromatographique très voisin de celui de la thymidine, a été identifié à l'anomère  $\alpha$  de ce nucléoside. Le spectre de r.m.n. obtenu dans l'eau deutérée est en tout point identique à celui décrit par Lemieux<sup>9</sup>; en particulier les deux octets et le quadruplet correspondant respectivement aux signaux ( $H_{eq-2'}$ ,  $H_{ax-2'}$  et du proton anomère  $H-1'$ ) sont caractéristiques des 2'-désoxyribonucléosides pyrimidiques de configuration  $\alpha$ -D-furanique. L'examen des propriétés spectrales i.r. et de r.m.n. des substances **7** et **8** permet de définir sans ambiguïté leur nature nucléosidique et de confirmer la présence d'une double liaison en position 5,6 sur la partie pyrimidique. La réaction positive que ces dérivés donnent avec le métapériodate permet d'attribuer une configuration pyranique au cycle osidique. Ces produits **7** et **8** sont donc les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la 1-(2-désoxy-D-érythro-pentopyranosyl)thymine. La synthèse de ce dernier composé, selon une adaptation de la méthode de Niedballa et Vorbrüggen<sup>10</sup> par condensation de la thymine bis(triméthyl-



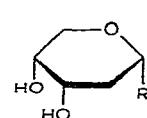
**1**  $R = Th$ ,  $R' = H$   
**2,3**  $R = ThBrOH$ ,  $R' = H$   
**17,18**  $R = ThBrOH$ ,  $R' = OAc$   
**19**  $R = Th$ ,  $R' = OAc$



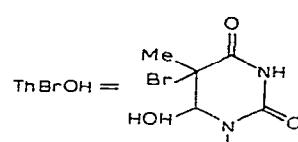
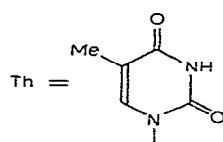
**6**  $R = Th$   
**11,12**  $R = ThBrOH$   
**13,14**  $R = ThBrO_2H$



**7**  $R = Th$   
**13,14**  $R = ThBrO_2H$



**8**  $R = Th$   
**15,16**  $R = ThBrOH$

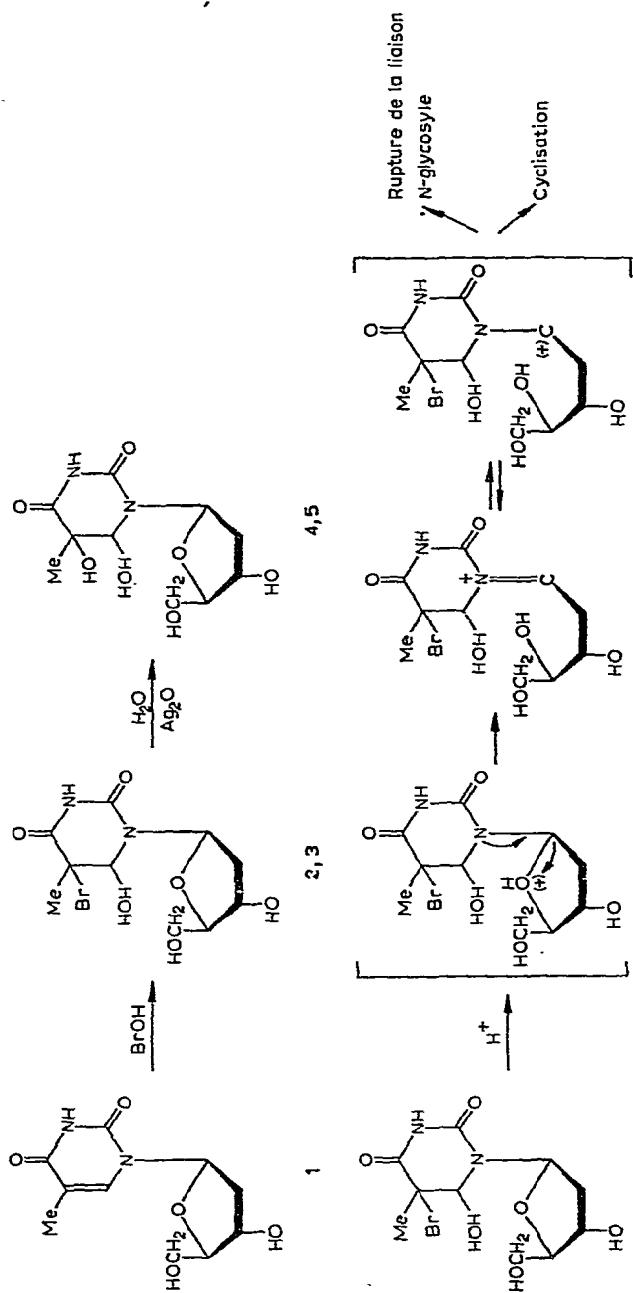


silylée) en O-2 et O-4 et du 2-désoxy-D-érythropentose triacétate en présence d'acide de Lewis, confirme cette hypothèse. La mesure des pouvoirs rotatoires et leur comparaison avec les valeurs données par Etzold<sup>7</sup> ont permis d'attribuer la configuration  $\alpha$  à 8 et  $\beta$  à 7. Les spectres de masse de la thymidine diacétylée en C-3' et C-5' et de la 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine diacétylée en C-3' et C-4' ont été comparés. Dans le premier cas, on constate une élimination caractéristique du fragment AcOH porté par C-5'. L'ion moléculaire  $m/e$  326 conduit à l'ion  $C_{11}H_{13}N_2O_5$  de  $m/e$  253; ce dernier perd à son tour une molécule d'acide acétique pour donner l'ion  $m/e$  193 de formule brute  $C_9H_9N_2O_3$ . On constate alors la rupture du fragment pyrimidique avec départ de HNCO et formation de  $C_8H_8NO_2$  de  $m/e$  150. Une certaine anomérisation doit se produire dans le spectrographe de masse, car la filiation perd de sa spécificité au cours de ces diverses réactions successives. On peut observer aussi que l'ion de masse  $m/e$  141, qui résulte du départ d'acide acétique à partir du fragment 2-désoxy-D-érythro-pentose diacétyle et protoné, est nettement plus important pour l'isomère pyranique. Ceci s'explique par la plus grande facilité d'élimination du groupement acétyle sur un carbone secondaire que sur un carbone primaire.

Les 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidines 5-(R), 6-(R) et 5-(S), 6-(S) (2) (3) et la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (10) ont été caractérisées parmi les neuf substances présentant le cycle pyrimidique bromé saturé en 5,6. Les six dérivés nucléosidiques 11, 12, 13, 14, 15, 16 sont des composés huileux qui n'ont pas été obtenus à l'état cristallisé. Ces substances ont pu cependant être préparées deux à deux par action de l'eau de brome respectivement sur la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentofuranosyl)thymine (6), la 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (7) et la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (8). Il s'agit donc vraisemblablement des diastéréoisomères (+) et (-) des bromohydrines *trans* des trois formes isomères de la thymidine (6, 7, 8). La réduction des différentes bromohydrines par le zinc et l'acide acétique conduit de manière quantitative et spécifique en présence d'ions  $H^+$ , après chauffage du milieu réactionnel, à la formation de la thymine (9) et des quatre isomères de la thymidine (1, 6-8).

L'utilisation de thymidine marquée au tritium sur le fragment osidique a permis de rechercher les dérivés 2-désoxy-D-érythro-pentosyles résultant de la rupture de la liaison N-glycosyle. Une substance tritiée a pu être isolée; elle présente un comportement chromatographique voisin de celui du 2-désoxy-D-érythro-pentose, mais ne donne pas lieu à une réaction positive avec le phtalate d'aniline. Des observations analogues effectuées lors du chauffage du 2-désoxy-D-érythro-pentose en milieu acide concentré traduisent des modifications des propriétés réductrices du sucre<sup>11</sup>. Des expériences faites avec un mélange de précurseurs marqués au carbone-14 et au tritium ont montré que la libération de ce dérivé osidique correspondait de manière quantitative à la formation de 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (10). Les deux substances dérivent de la même molécule initiale.

Le chauffage à 90° pendant 30 min du milieu réactionnel contenant la solution aqueuse de bromohydrines 2 et 3, synthétisées en présence de benzoate de sodium



(pH 5,5), n'entraîne qu'une débromation partielle de ces deux dérivés. Seule la thymidine est formée à l'exclusion de l'anomère  $\alpha$  et des formes pyraniques. En milieu basique, les dérivés 2 et 3 chauffés dans des conditions similaires dans une solution de phosphate trisodique 10MM engendrent la thymidine (50%) et les deux formes diastéréoisomères de diols *cis* (4 et 5) qui résultent de la substitution nucléophile de l'atome de brome des halohydrines. En milieu acide, les phénomènes d'anomérisation  $\alpha$ - $\beta$  et d'isomérisation furano-pyraniques deviennent importants dans une solution d'acide bromhydrique 0,5M à 90°. Pour préciser le phénomène, les halohydrines ont été réduites en  $\beta$ -cétols par le zinc et l'acide acétique, et transformées spécifiquement par chauffage en milieu acide en thymine et isomères de la thymidine. L'essentiel des résultats est consigné dans les Tableaux II et III. Les processus ont été suivis en fonction de la durée du chauffage. La formation des anomères pyraniques et furaniques est maximale pour une durée voisine de 30 min; au delà, la rupture de la liaison *N*-glycosyle devient prépondérante.

TABLEAU II

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE BROMHYDRIQUE SUR L'ISOMÉRISATION DES HALOHYDRINES 2, 3<sup>a</sup> APRÈS CHAUFFAGE DE 0,5 h À 90°

Concentration en acide bromhydrique	Proportions des composés obtenus (%)				
	1	6	7	8	9
0,01	100				
0,05		83,3 <sup>b</sup>			
0,1		73,5 <sup>b</sup>			
0,5		17,4	17,5	16,2	30,6
1		15,1	14,8	14,5	34,5
					21,1

<sup>a</sup>Concentration M. <sup>b</sup>Composés 1 et 6.

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ISOMÉRISATION DES HALOHYDRINES 2, 3 EN PRÉSENCE D'ACIDE BROMHYDRIQUE<sup>a</sup>

Température (°)	Proportions des composés obtenus (%)			
	1 et 6	7	8	9
30	100			
60		81,8	8,7	5,3
90		29,9	14,5	34,5
				21,1

<sup>a</sup>La concentration en acide bromhydrique et en halohydrines 2, 3 est M et la durée de chauffage 0,5 h.

Le chauffage dans une solution aqueuse d'acide bromhydrique M des bromhydrines de thymidine diacétylées en 5' et 3', (+)-17 et (-)-18 à une concentration 10MM entraîne leur désacétylation quasi totale. En milieu acide plus dilué (0,1M), 25 % de produits estérifiés à la fois en 3' et en 5' ont pu être retrouvés. La réduction de ces composés et le traitement de leurs dérivés de dégradation thermique par l'ammoniac en milieu alcoolique engendre la formation en quantités égales des anomères de la thymidine. Dans les mêmes conditions, les monoacétates conduisent à un mélange de formes anomères pyraniques et furaniques avec prédominance de ces derniers composés (80 % du total).

Les phénomènes d'anomérisation et d'isomérisation pyrano-furanique ont pu être mis en évidence en chauffant les bromhydrines de la 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine en milieu acide concentré et sont du même ordre que ceux observés dans le cas des dérivés de la thymidine naturelle.

L'analyse chromatographique du mélange réactionnel résultant du chauffage en milieu acide bromhydrique M d'une solution molaire de bromhydrines 2 et 3 inertes radiochimiquement et de thymidine-<sup>14</sup>C permet de déceler la présence des diverses formes isomères de la thymidine et des dérivés bromés correspondants marqués au carbone-14 (50 % de l'activité initiale). Cette réaction, qui nécessite le départ d'acide hypobromeux de la molécule initiale, est à rapprocher des observations effectuées sur le 5,5-dibromo-5,6-dihydro-6-hydroxyuracile qui, dans des conditions similaires, conduit à l'oxydation de la thiourée<sup>12</sup>. Le chauffage d'une solution de bromhydrines en présence de thiourée qui provoque la destruction de l'acide hypobromeux conduit à une diminution importante des phénomènes d'isomérisation furano-pyranique avec formation prépondérante des anomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -furaniques.

L'action de l'acide bromhydrique sur la thymidine (1) a été étudiée dans les mêmes conditions que précédemment: en concentration molaire pour l'acide bromhydrique et la thymidine (1) aucune transposition de la partie osidique n'est décelable. Cependant, après dilution de la solution de thymidine (1), des réactions d'anomérisation et d'isomérisation furano-pyranique ont pu être mises en évidence. Ainsi, pour une concentration de thymidine (1) 10MM, après 30 min de chauffage, 6,5 % de l'isomère  $\alpha$ -pyranique (8) et 6 % de l'anomère  $\beta$  correspondant (7) sont formés contre 16 % de thymine (9). Un chauffage prolongé entraîne une prépondérance très nette de la rupture de la liaison N-glycosyle sur les phénomènes d'isomérisation.

## DISCUSSION

L'hydrolyse acide des nucléosides conduit à la rupture de la liaison N-glycosyle alors que la *pseudo*-uridine donne lieu à des réactions d'anomérisation et d'isomérisation en présence d'ions H<sup>+</sup>. La protonation de la molécule suivie de l'ouverture du cycle osidique semble être le processus commun à ces deux réactions. La base de Schiff formée dans le cas des nucléosides pyrimidiques est très instable et conduit de manière préférentielle à la libération de la base et du dérivé du sucre<sup>13-15</sup>, alors que l'ion carbonium de la *pseudo*-uridine ne permet l'obtention que des différentes

formes anomères et isomères à l'exclusion de l'uracile<sup>16</sup>. Il est bien établi que la disparition du caractère pseudo-aromatique de l'aglycone des nucléosides pyrimidiques due à la saturation de la double liaison 5,6 entraîne une labilisation de la liaison *N*-glycosyle en milieu chlorhydrique<sup>17,18</sup>. Ainsi, l'hydrolyse acide ménagée de la 5,6-dihydrothymidine conduit de manière quantitative à la libération de 2-désoxy-D-*érythro*-pentose et de 5,6-dihydrothymine<sup>19</sup>. Il n'en est pas de même pour la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine où, dans des conditions similaires, la libération de l'aglycone est plus faible et fait place en partie à un réarrangement de la partie osidique. La nature de ces transformations s'apparente aux phénomènes de mutarotation et d'isomérisation observés chez les glycosylamines en milieu acide<sup>20,21</sup> et un mécanisme voisin doit être impliqué. La présence d'anomères  $\alpha,\beta$ -furaniques et -pyraniques est compatible avec la formation d'une base de Schiff acyclique<sup>20</sup>. En raison du caractère électrophile de C-1', la condensation intramoléculaire avec les fonctions hydroxyles portées par C-4' et C-5' conduit aux quatre formes isomères possibles furaniques et pyraniques. La rupture de la liaison *N*-glycosyle est plus complexe; elle doit résulter en grande partie de l'attaque nucléophile compétitive de l'ion immonium par les ions hydroxyles<sup>20,21</sup>.

En milieu très acide, ce sentier réactionnel doit être de moindre importance et, dans ces conditions, l'hypothèse d'une protonation sur N-1 suivie de la libération de la partie pyrimidique selon un mécanisme<sup>22</sup> A<sub>1</sub> ne peut être rejetée totalement. En effet, l'importance relative de la liaison C-N devant les réactions de transposition de la partie osidique est conservée dans la zone de pH étudiée (Tableau II). Cependant, il faut remarquer que le chauffage prolongé (30 min) entraîne une augmentation de la libération de l'aglycone en raison de l'irréversibilité du processus lorsque les réactions d'isomérisation deviennent importantes (acide bromhydrique en solution 0,5M). D'autre part, la débromation, catalysée<sup>23-26</sup> par les ions H<sup>+</sup>, mais qui s'effectue indépendamment du réarrangement du cycle osidique, est notable dans ces conditions. Un équilibre s'établit dans le milieu entre l'acide hypobromeux, la thymidine et la bromohydrine. De ce fait, la présence de dérivés insaturés en 5,6 doit aussi favoriser la rupture au détriment de l'isomérisation.

Nous avons remarqué que le chauffage des deux diastéréoisomères *trans* de la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxy-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)thymine en milieu bromhydrique molaire ne donne lieu qu'à une faible libération de la *trans*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine. La remarquable stabilité de la liaison *N*-glycosyle de ces bromohydrines doit être reliée à la présence en position 2' de la fonction hydroxyle, dont le rôle exact est encore mal défini<sup>15,27</sup>. Le groupement hydroxyle peut être un site compétitif de protonation pour l'atome d'oxygène hemi-acétalique<sup>3</sup>; par effet inductif, il peut aussi empêcher la formation de l'ion immonium<sup>15</sup>. La nature de la partie osidique joue donc un rôle prépondérant dans les réactions d'isomérisation du cycle osidique, en analogie avec les différences de stabilité des 2'-désoxyribonucléosides et des ribonucléosides en milieu acide<sup>27,29,30</sup>. De plus, l'orientation de la réaction vers la rupture de la liaison *N*-glycosyle ou vers la transposition du cycle osidique est liée à la nature des substituants en position 6. La présence d'une fonction hydroxyle

sur le C-6 semble favoriser cette dernière réaction : ainsi, la 5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymidine chauffée en milieu acide se transforme partiellement en ses anomères  $\alpha$ , $\beta$ -furaniques et -pyraniques.

La nature des dérivés résultant de l'hydrolyse acide de la thymidine en milieu dilué est compatible avec la formation prépondérante d'une base de Schiff acyclique transitoire<sup>20</sup>; dans ces conditions, l'hypothèse de l'ion immonium semble prévaloir sur le mécanisme A<sub>1</sub> qui régit l'hydrolyse non catalytique des 2'-désoxyribonucléosides pyrimidiques en milieu légèrement acide<sup>22</sup>.

Nous avons pu montrer d'autre part que l'acide 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidylique chauffé en milieu acide bromhydrique ne donnait pas lieu au départ d'acide hypobromeux ni à une transposition de la partie osidique. La présence du groupement phosphorique en C-5' confère une plus grande stabilité à la molécule en milieu acide en accord avec des observations antérieures sur le dérivé nucléotidique de l'acide 5-hydroxy-5-méthylbarbiturique<sup>31</sup>.

La mise en évidence de réactions d'anomérisation et d'isomérisation furano-pyranique de la thymidine et de ses bromohydrines doit permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent l'hydrolyse acide des 2'-désoxyribonucléosides pyrimidiques. D'autre part, l'action de l'acide bromhydrique sur les 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidines constitue, grâce à sa simplicité de mise en œuvre et aux rendements obtenus, une voie de synthèse intéressante des formes anomères pyraniques et furaniques de la thymidine. Des résultats positifs ont été obtenus avec la 2'-désoxyuridine et certains de ses dérivés de substitution en position 5 (Br, CH<sub>2</sub>OH). Ces réactions d'isomérisation sont susceptibles de recevoir une application plus générale pour les 2'-désoxyribonucléosides.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Méthodes générales.* — La séparation des différents produits obtenus par synthèse est effectuée par chromatographie sur couche mince de silice Machery-Nagel-S-HR et de silice Merck F à l'aide des systèmes suivants : (A) Chloroforme-méthanol-eau (4:2:1), phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol; (B) acétate d'éthyle-2-propanol-eau (75:16:9), (C) 2-butanone-2-propanol-ammoniaque (6:1:1); (D) chloroforme-méthanol (19:1); (E) acétate d'éthyle. L'association des solvants (A) et (B) en chromatographie bidimensionnelle permet de séparer la quasi totalité des diverses bromohydrines. L'utilisation du système (C) est plus restreinte en raison de son caractère basique, mais il donne une bonne résolution des différentes formes isomères de la thymidine.

Les produits radioactifs sont révélés par autoradiographie à l'aide du papier Kodak « Kodirex ». Un temps de contact de 15 h est suffisant pour déceler des taches chromatographiques dont l'activité en carbone 14 est voisine de 0,1  $\mu$ Ci. La détection des produits tritiés est plus difficile en raison de la faible énergie du rayonnement  $\beta$  émis, et on a recours au procédé de révélation autoradiographique par scintillation solide<sup>32</sup>. Une activité de 10  $\mu$ Ci est décelée après 72 h de contact. L'examen du

chromatogramme en lumière u.v. à 254 nm permet de localiser les dérivés pyrimidiques insaturés. Dans les mêmes conditions, les bromohydrides donnent lieu à une légère absorption dont l'intensité est nettement plus faible que celle de la thymidine. Le 2-désoxy-D-*érythro*-pentose est mis en évidence par la réaction colorée qu'il donne avec le phtalate d'aniline<sup>36</sup>. Les bromohydrides sont caractérisées par la libération d'iode après pulvérisation d'une solution éthanolique saturée en iodure de potassium.

Les spectres u.v. sont enregistrés sur un appareil Cary (Modèle 15) et les spectres i.r. sont obtenus avec des pastilles de bromure de potassium de 1,5 mm sur un appareil Perkin-Elmer (Modèle 257). Les spectres de r.m.n. sont enregistrés à l'aide d'un appareil Varian A 60. Le tétraméthylsilane est utilisé comme référence interne dans le méthanol-*d*<sub>4</sub> ou le chloroforme-*d*; pour l'eau deutérée, le calibrage se fait avec le tétraméthylsilane placé comme référence externe. Un spectrographe de masse MS 9 AEI, muni d'un dispositif d'introduction directe, permet l'enregistrement des spectres d'impact électronique. Les données ont été traitées à l'ordinateur pour obtenir les formules brutes moléculaires adéquates. Les points de fusion ont été mesurés au moyen d'un bloc chauffant équipé d'un microscope (Reichert) et les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un Quick-Polarimètre (Roussel et Jouan).

Les zones radioactives détectées par autoradiographie sont placées dans 2 ml d'eau auxquels on ajoute 30 ml d'un liquide scintillant. Le rendement de comptage des produits marqués au carbone 14 est voisin de 68% alors qu'il est de 20% pour les dérivés tritiés.

*Produits.* — L'acide thymidylique-2-<sup>14</sup>C et la thymidine-5-*t* proviennent du Département des Radioéléments de Saclay (France) alors que la thymidine-2-<sup>14</sup>C a été fournie par le Centre d'Études Nucléaires de Mol (Belgique). La *trans*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine est synthétisée d'après la méthode de Davidson<sup>32</sup>; l'isomère *cis* est obtenu d'après le procédé mis au point par les auteurs<sup>33</sup>. L'acétylation des dérivés nucléosidiques est effectuée par action de l'anhydride acétique en présence de pyridine selon la méthode de Michelson<sup>34</sup>.

*Bromation de la thymidine (1).* — La bromation des différentes formes anomères et isomères de la thymidine a été effectuée selon une adaptation de la méthode de Moore<sup>26</sup>. Le brome est additionné à la solution aqueuse de nucléoside en présence de benzoate de sodium afin de neutraliser l'acide bromhydrique formé et d'éviter les phénomènes d'isomérisation de la partie osidique lors de l'évaporation à sec du milieu réactionnel. En raison du caractère nucléophile de l'anion benzoate, une réaction d'addition parasite a lieu et conduit à la formation d'un mélange de 6-benzoyloxy-5-bromo-5,6-dihydrothymidines et de dérivés hydroxylés en position 5 correspondants. L'importance quantitative de ces composés (10 à 15%) est réduite par la dilution des réactifs (10mm). Pratiquement, 30 µl de brome sont ajoutés progressivement à 100 ml d'une solution aqueuse 0,01M en thymidine (240 mg) à 0° renfermant 300 mg de benzoate de sodium. Le déroulement de la réaction est suivie par la disparition de l'absorption u.v. à 260 nm; celle-ci est totale au bout de

10 min. La solution est évaporée jusqu'à siccité et le résidu est repris avec 20 ml d'acétone anhydre, ce qui provoque la précipitation du bromure de sodium. Le surnageant est évaporé à sec et le produit huileux obtenu est dissous dans 10 ml d'eau. L'acide benzoïque et une partie des 6-benzyloxy-5-bromo-5,6-dihydro-thymidines sont alors éliminés par deux extractions de la phase aqueuse avec 10 ml de chloroforme. Les essais de précipitation fractionnée n'ayant pu aboutir, il a été nécessaire de procéder à la séparation des deux diastéréoisomères *trans* des 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine par chromatographie préparative.

*trans*-*(+)*-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (2). — Le mélange des deux diastéréoisomères (+) et (-) (340 mg) est chromatographié sur quatre plaques de silice (20 × 40 cm) et élut avec le système de solvant A. La zone de silice renfermant la bromohydrine ( $R_F$  0,42) est localisée par examen du chromatogramme en lumière u.v. Trois extractions avec 20 ml de méthanol permettent d'obtenir 136 mg d'un produit à l'aspect huileux qui précipite partiellement (30 mg) dans 5 ml d'acétate d'éthyle. L'addition d'éther (5 ml) entraîne la précipitation d'une substance (100 mg) qui présente les mêmes caractéristiques que le dérivé ci-dessus, soit au total 41 %. Ce composé blanchâtre prend très rapidement un caractère amorphe,  $[\alpha]_D^{25} +40,9^\circ$  ( $c$  0,46, eau); données i.r. :  $\nu_{max}^{KBr}$  1700 (C=O), 1048, 1085  $\text{cm}^{-1}$  (C-O); données de r.m.n. (méthanol- $d_4$ ) :  $\delta$  1,92 (s, Me), 2,30 (m, H-2'), 3,76 (m, H-5' et H-4'), 4,41 (m, H-3'), 5,28 (s, H-6) et 6,30 (t,  $J_{1',2'} \text{ ax}$  et  $J_{1',2'} \text{ eq}$  6,9 Hz, H-1'). Le nécessité de conférer une plus grande volatilité aux bromhydrines pour la détermination du s.m. nous a conduit à rechercher l'obtention de dérivés acétylés sans modifier toutefois la partie pyrimidique. L'action de l'anhydride acétique en présence de pyridine<sup>34</sup> sur la *trans*-*(+)*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine entraîne la formation en quantités sensiblement égales de bromhydrines triacétylées en positions 6, 3' et 5' et diacétylée en positions 3' et 5'; cette dernière, qui présente une mobilité chromatographique plus faible, a pu être séparée par chromatographie sur couche mince au moyen du solvant D ( $R_F$  0,47). Le dérivé présente les mêmes propriétés spectrales et chromatographiques que la bromohydrine dextrogyre obtenue par action du brome sur la thymidine diacétylée (*vide infra*). Ces deux procédés ont été utilisés indifféremment pour préparer les diverses bromhydrines diacétylées :  $m/e$  424, 422 ( $M^{+ \cdot}$ ), 351, 349 ( $M^{+ \cdot} - \text{AcOCH}_2$ ), 343 ( $M^{+ \cdot} - \text{Br}^{\cdot}$ ), 326 ( $M^{+ \cdot} - \text{BrOH}$ ), 304, 302 ( $M^{+ \cdot} - 2 \text{ AcOH}$ ), 201 (fragment 2-désoxy-D-érythro-pentosyle diacétylé $^{+ \cdot}$ ); ce composé diacétylé est identique au produit 17.

*trans*-*(-)*-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (3). — L'extraction avec du méthanol (3 × 10 ml) de la bande donnant lieu à la plus faible absorption en lumière u.v. ( $R_F$  0,34) permet de recueillir après évaporation à sec (*vide supra*) 91 mg (27 %) d'un produit huileux; ce dernier est précipité quantitativement dans 6 ml d'un mélange acétate d'éthyle-éther (1:1). Le composé cristallin obtenu après filtration et plusieurs lavages à l'éther se transforme rapidement en une pâte amorphe incolore,  $[\alpha]_D^{25} -19,6^\circ$  ( $c$  0,25, eau); données i.r. :  $\nu_{max}^{KBr}$  1700 (C=O), 1047, 1080  $\text{cm}^{-1}$  (C-O); données r.m.n. (méthanol- $d_4$ ) :  $\delta$  1,90 (s, Me), 2,26 (m, H-2'), 3,75 (m, H-5'), 3,81 (m, H-4'), 4,37 (m, H-3'), 5,37 (s, H-6) et 6,30 (q, H-1'); s.m. du dérivé diacétylé en

*3'* et *5'* : *m/e* 424, 422 ( $M^{+ \cdot}$ ), 351, 349 ( $M^{+ \cdot} - AcOCH_2$ ), 343 ( $M^{+ \cdot} - Br^-$ ), 326 ( $M^{+ \cdot} - BrOH$ ), 304, 302 ( $M^{+ \cdot} - 2 AcOH$ ), 201 (fragment osidique diacétyle $^+$ ); ce compose diacétylé est identique au produit **18**.

*trans-(+)-5-Bromo-1-(3,5-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (17).* — En raison de la faible solubilité de la *3',5'-diacétyl-thymidine (19)* dans l'eau, la bromation est effectuée en milieu dilué (20 mM en nucléoside). Le brome (180 µl) est ajouté progressivement à 300 ml d'une solution aqueuse **19** (1,98 g) refroidie dans un bain de glace. L'addition d'acide hypobromeux est effective au bout de 10 min. Le milieu réactionnel est concentré par évaporation sous vide et 50 ml de chloroforme sont ajoutés aux 40 ml de solution aqueuse restante. La phase organique est lavée deux fois avec 40 ml d'eau, puis séchée sur du sulfate de sodium. L'évaporation de la solution chloroformique fournit 2,52 g d'un résidu huileux qui est dissous à chaud dans 20 ml d'éthanol. Après refroidissement, de fines aiguilles (400 mg) sont obtenues; la concentration de la solution éthanolique (10 ml) entraîne une deuxième précipitation (320 mg),  $[\alpha]_D^{25} + 20,8^\circ$  (*c* 0,30, méthanol). L'ensemble des précipités est recristallisé dans l'éthanol sous forme d'aiguilles translucides, p.f. 144–147°,  $[\alpha]_D^{25} + 21,2^\circ$  (*c* 0,42, méthanol); données i.r. :  $\nu_{max}^{KBr}$  1722 (C=O), 1240 cm $^{-1}$  (C–O acétoxy); données de r.m.n. (chloroforme-*d*) :  $\delta$  2,01 (s, Me), 2,11 (s, 6 H, OAc), 2,36 (m, H-2') 4,20 (m, H-4'), 4,33 (m, H-5'), 5,19 (s, H-6), 5,26 (m, H-3'), 6,48 (t,  $J_{1',2'ax}$  et  $J_{1',2'eq}$  7,5 Hz, H-1') et 8,75 (s, H-3); s.m. : *m/e* 424, 422 ( $M^{+ \cdot}$ ).

*Anal.* Calc. pour  $C_{14}H_{19}BrN_2O_8$  : C, 39,71; H, 4,49; Br, 18,91; N, 6,62. Trouvé : C, 39,90; H, 4,61; Br, 19,13; N, 6,90.

*trans-(-)-5-Bromo-1-(3,5-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (18).* — Les eaux-mères de la préparation de **17** sont évaporées à sec et le résidu huileux (1,2 g) est chromatographié sur dix plaques de silice (20 × 20 cm) à l'aide du solvant E. Deux bandes d'égales intensités sont observées en lumière u.v. (254 nm). L'extraction de la zone supérieure avec 3 × 40 ml de méthanol permet d'obtenir 430 mg du diastéréoisomère dextrogyre (*vide supra*), soit au total 69 % alors que la bande inférieure ( $R_F$  0,81) fournit 410 mg (17 %) de bromohydride lévogyre qui a pu être cristallisée dans le méthanol sous formes de petites aiguilles, p.f. 142–145°,  $[\alpha]_D^{25} - 33,3^\circ$  (*c* 0,51, méthanol); données i.r. :  $\nu_{max}^{KBr}$  1722 (C=O), 1240 cm $^{-1}$  (C–O acétoxy); données de r.m.n. (chloroforme-*d*) :  $\delta$  2,01 (s, Me), 2,10 (s, 6 H, OAc), 2,36 (m, H-2'), 4,20 (m, H-4'), 4,33 (m, H-5'), 5,19 (s, H-6), 5,26 (m, H-3'), 6,47 (t, H-1') et 8,75 (s, H-3); s.m. : *m/e* 424, 422 ( $M^{+ \cdot}$ ).

*Anal.* Calc. pour  $C_{14}H_{19}BrN_2O_8$  : C, 39,71; H, 4,49; Br, 18,91; N, 6,62. Trouvé : C, 39,47; H, 4,67; Br, 18,49; N, 6,33.

*Anomérisation et isomérisation des 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (+) et (-).* — Le brome (60 µl) est ajouté à 2 ml d'une solution aqueuse molaire de thymidine (**1**, 480 mg) non tamponnée. La bromation est effective au bout de 10 min et se traduit par une décoloration du milieu réactionnel, dont la concentration en acide bromhydrique est alors voisine de la normalité. Cette solution est chauffée à l'étuve à 90° pendant 30 min. L'analyse chromatographique (solvants A et B) montre

la présence de sept substances donnant lieu à une révélation positive à l'iodure de potassium. Ces dérivés ont pu être séparés par chromatographie préparative sur couche mince à l'aide des solvants A ou B et identifiés aux différentes formes anomères et isomères de la 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (*vide supra*) et à la *trans*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine. La thymine et les anomères  $\alpha, \beta$  des formes furaniques et pyraniques de la thymidine qui sont présents en faibles quantités (5 à 6%) ont pu être caractérisés par comparaison de leurs propriétés chromatographiques et spectrales i.r. avec celles des produits témoins.

*Transformation des bromohydrides en dérivés de la thymidine correspondants.* — Le mélange des bromohydrides furaniques et pyraniques (610 mg) décrit dans le paragraphe précédent est réduit selon la méthode utilisée pour la préparation des 5,6-dihydro-6-hydroxythymines<sup>37</sup>. À 2 ml de la solution initiale, on ajoute 240 µl d'acide acétique et 750 mg de poudre de zinc dans 2 ml d'eau (concentration finale en nucléoside 0,5M). La réaction est complète au bout de 10 min. Les sels sont éliminés par filtration et la solution est évaporée à sec sous pression réduite en chauffant à 50°.

*1-(2-Désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (7).* — Le résidu huileux (480 mg) obtenu selon les conditions précitées et renfermant la thymine et les quatre formes isomères de la thymidine est chromatographié sur six plaques de silice (20 × 40 cm) à l'aide de l'éluant A. La bande de  $R_F$  0,37 décelée par examen en lumière u.v. et qui donne une réaction positive avec le métaperiodate est extraite avec du méthanol (3 × 20 ml). L'évaporation à sec de la solution alcoolique permet d'obtenir 110 mg d'un produit qui est cristallisé dans le 2-propanol (23%), p.f. 222–224°,  $[\alpha]_D^{25} + 26,5^\circ$  (*c* 0,55, eau); données i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1681 (C=O), 1072, 1091  $\text{cm}^{-1}$  (C–O); données de r.m.n. (méthanol-*d*<sub>4</sub>) : δ 1,91 (d,  $J_{6,\text{Me}}$  1,1 Hz, Me), 2,20 (m, H-2'), 6,03 (q, H-1') et 7,51 (d, H-6); s.m. : *m/e* 242 ( $\text{M}^+$ ), 127 (thymine protonée), 117 (2-désoxy-D-érythro-pentose); lit.<sup>7</sup> : p.f. 222–224°,  $[\alpha]_D^{25} + 27^\circ$  (*c* 1,08, eau).

*1-(2-Désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (8).* — La zone de silice ( $R_F$  0,47) est extraite avec du méthanol (3 × 20 ml). La solution est évaporée à siccité et 225 mg d'un mélange des deux formes anomères de la thymidine et de la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (8) à l'aspect huileux sont obtenus. Ces produits sont chromatographiés sur trois plaques de silice (20 × 40 cm) à l'aide du système de solvant B. L'examen du chromatogramme en lumière u.v. (254 nm) montre la présence de deux bandes d'inégales intensités dont la plus faible se colore en jaune après pulvérisation d'une solution de métaperiodate. Cette zone de silice est extraite trois fois avec du méthanol (10 ml). Après évaporation à sec de la solution, 70 mg de 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (8) sont recueillis et recristallisés dans le 2-propanol (15%), p.f. 212–215°,  $[\alpha]_D^{25} - 46,7^\circ$  (*c* 0,82, eau); données i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1688 (C=O), 1052, 1082  $\text{cm}^{-1}$  (C–O); spectre de r.m.n. (méthanol-*d*<sub>4</sub>) : δ 1,91 (d,  $J_{6,\text{Me}}$  1,1 Hz, Me), 1,92 (m, H-2'), 5,66 (q, H-1') et 7,73 (d, H-6); s.m. : *m/e* 242 ( $\text{M}^+$ ), 127 (thymine protonée), 117 (2-désoxy-D-érythro-pentose); lit.<sup>7</sup> : p.f. 212–215°,  $[\alpha]_D^{25} - 46,6^\circ$  (*c*, 1,2, eau).

*Anomérisation des (+)-et (-)-5-bromo-1-(3,5-di-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentofuranosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymines.* — Le mélange (420 mg) des diastéréo-

isomères (+) et (-) de la 5-bromo-1-(3,5-di-*O*-acétyl-2'-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pento-furanosyl)-5,6-dihydro-6-hydroxythymine (**17**, **18**, 10mm) est chauffé pendant 30 min à 90° dans 100 ml d'une solution aqueuse d'acide bromhydrique 0,1M; 120  $\mu$ l d'acide acétique et 380 mg de poudre de zinc sont alors ajoutés et laissés en contact pendant 15 min. La solution est filtrée et le solvant est évaporé à sec. Le résidu huileux est dissous dans 5 ml d'un mélange eau-chloroforme (1:1). La phase organique est lavée plusieurs fois avec 5 ml d'eau et après évaporation sous pression réduite, 330 mg d'une huile sont obtenus. La chromatographie de contrôle (solvants D et E) montre la présence d'une substance qui présente les mêmes valeurs de  $R_F$  que la 3,5-di-*O*-acétylthymidine (**19**) et des traces de dérivés monoacétylés. Une suspension de 100 mg de ces substances diacétylées dans 5 ml de méthanol saturé avec de l'ammoniac est maintenue pendant 15 h à la température du laboratoire. L'évaporation à sec de la solution alcoolique permet d'obtenir 68 mg d'un résidu huileux, qui est chromatographié sur deux plaques de silice (20 × 40 cm) au moyen de l'éluant B. La bande de  $R_F$  0,46 est extraite avec du méthanol (3 × 5 ml) et après évaporation de la solution à sec, on obtient 28 mg d'un produit huileux qui a pu être identifié à la 1-(2-désoxy- $\alpha$ -D-érythro-pentofuranosyl)thymine (**6**)  $[\alpha]_D^{25} +7,1^\circ$  (*c* 0,91, eau); données de r.m.n. (méthanol-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  1,90 (d,  $J_{6,Me}$  1,1 Hz, Me), 6,23 (q, largeur 10,8 Hz, H-1') et 7,81 (d, H-6); s.m.: *m/e* 242 (M<sup>+</sup>), 127 (thymine protonée), 117 (2-désoxy-D-érythro-pentose); lit.<sup>38</sup>:  $[\alpha]_D^{25} +7,2^\circ$  (*c* 2, eau).

L'extraction de la deuxième bande de silice qui吸orbe fortement en lumière u.v. ( $R_F$  0,52) fournit, après évaporation de la solution méthanolique (3 × 5 ml), 25 mg de thymidine (**1**).

*trans*-(+)-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine. — La *trans*-(+)-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (**2**, 120 mg) est dissoute dans 16 ml d'acide nitrique fumant et l'ensemble est porté au bain-marie bouillant pendant 20 min<sup>8</sup>. L'acide nitrique est éliminé par évaporation sous vide (0,01 mm de mercure) et le résidu huileux obtenu est chromatographié sur deux plaques de silice (20 × 20 cm) à l'aide du solvant A. La bande de  $R_F$  0,51 est extraite avec du méthanol (3 × 4 ml). On obtient après évaporation à sec de la solution alcoolique 25 mg (30%) d'un produit qui a pu être précipité par l'addition de 5 ml d'éther et qui présente les mêmes caractéristiques chromatographiques et i.r. que la *trans*-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine racémique<sup>32</sup> (**10**);  $[\alpha]_D^{25} +47,0^\circ$  (*c* 0,45, eau).

*trans*-(-)-5-Bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine. — La *trans*-(-)-5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymidine (**3**) (65 mg) est traitée pendant 20 min dans 8 ml d'acide nitrique fumant portés au bain-marie bouillant. Après évaporation sous vide (0,01 mm de mercure), le résidu huileux est chromatographié dans le solvant A sur plaque de silice (20 × 20 cm). L'extraction avec du méthanol (3 × 2 ml) de la bande de  $R_F$  0,51 donne 12 mg (28%) de 5-bromo-5,6-dihydro-6-hydroxythymine, qui a pu être précipitée par addition à la solution de 2 ml d'éther,  $[\alpha]_D^{25} -46,5^\circ$  (*c* 0,60, eau).

Synthèse directe de la 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-érythro-pentopyranosyl)thymine (**7**). — Elle est effectuée selon une adaptation du procédé de Niedballa et Vorbrüggen<sup>10</sup>.

La 2,4-bis(triméthylsilyloxy)thymine (114,2 mg, 0,42mm) et 104 mg d'un mélange des triacétates de 2-désoxy-D-*érythro*-pentase pyranique et furanique (0,4mm) sont dissous dans 8 ml de dichloroéthane anhydre; 34 µl de chlorure stannique sont alors ajoutés et le mélange est soumis à l'agitation pendant 4 h; 4 ml d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium sont ensuite additionnés. La phase organique est lavée, séchée sur du sulfate de sodium et filtrée sur Célite. Après évaporation, le résidu huileux est chromatographié à l'aide du solvant D. La bande de  $R_F$  0,47, donnant lieu à une forte absorption en lumière u.v., est extraite avec 3 × 5 ml de méthanol. L'huile résultante (40 mg) est laissée en contact pendant une nuit dans 2 ml d'une solution méthanolique saturée avec de l'ammoniac; la séparation chromatographique à l'aide du solvant B du résidu huileux obtenu après évaporation à sec du solvant permet de recueillir 13 mg de  $\beta$ -thymidine (1) et 11 mg de 1-(2-désoxy- $\beta$ -D-*érythro*-pentopyranosyl)thymine (7, 10%).

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M<sup>mes</sup> Voituriez et Georges, M<sup>elle</sup> Pouchot et M. Bert pour l'importante contribution qu'ils ont apportée à ce travail. Leurs remerciements vont aussi à MM. Fromageot et Coursaget du Département de Biologie du C.E.N. (Saclay), qui a fourni la thymidine marquée et à MM. Cornu et Ulrich pour les mesures de spectrométrie de masse.

#### RÉFÉRENCES

- 1 W. E. COHN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1488.
- 2 R. W. CHAMBERS, dans J. N. DAVIDSON ET W. E. COHN, (Eds.), *Progr. Nucleic Acid Res.*, Academic Press, New York, 5 (1966) 349.
- 3 R. W. CHAMBERS, V. KURKOV ET R. SHAPIRO, *Biochemistry*, 2 (1963) 1192.
- 4 R. A. SANCHEZ ET L. E. ORGEL, *J. Mol. Biol.*, 47 (1970) 531.
- 5 J. CADET ET R. TEOULE, *Communication à la Société Chimique de France*, Assemblée annuelle, Lyon, n° 7b (avril 1971), résumé n° 44.
- 6 G. ETZOLD ET P. LANGEN, *Naturwissenschaften*, 53 (1966) 178.
- 7 G. ETZOLD, R. HINSCHE ET P. LANGEN, *Chem. Ber.*, 101 (1968) 226.
- 8 R. DUSCHINSKY, T. GABRIEL, W. TAUTZ, M. HOFFER, E. GRUNBERG, J. H. BURCHENAL ET J. J. FOX, *J. Med. Chem.*, 10 (1967) 47.
- 9 R. U. LEMIEUX, *Can. J. Chem.*, 39 (1961) 116.
- 10 U. NIEDBALLA ET H. VORBRÜGGEN, *Angew. Chem. Internat. Ed. Engl.*, 9 (1970) 461.
- 11 S. ITZHAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 541.
- 12 T. B. JOHNSON, *J. Amer. Chem. Soc.*, 82 (1940) 2269.
- 13 G. W. KENNER, *Ciba Found. Symp. Chem. Biol. Purines*, (1957) 312.
- 14 C. A. DEKKER, *Ann. Rev. Biochem.*, 29 (1960) 453.
- 15 R. E. GARRETT, J. K. SEYDEL ET A. J. SHARPEN, *J. Org. Chem.*, 31 (1966) 2219.
- 16 C. T. YU ET F. W. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 393.
- 17 P. A. LEVENE ET F. B. LAFORGE, *Ber.* 45 (1912) 608.
- 18 W. E. COHN ET D. G. DOHERTY, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78 (1956) 2863.
- 19 Y. KONDO ET B. WITKOP, *J. Amer. Chem. Soc.*, 90 (1968) 704.
- 20 H. S. ISBELL ET H. L. FRUSH, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 1309.
- 21 B. CAPON ET B. E. CONNETT, *Tetrahedron Lett.*, 22 (1964) 1395.
- 22 R. SHAPIRO ET S. KANG, *Biochemistry*, 8 (1969) 1806.
- 23 A. S. JONES ET D. L. WOODHOUSE, *Nature*, 183 (1959) 1603.

- 24 D. BARSZCZ, Z. TRAMER ET D. SHUGAR, *Acta Biochim. Pol.*, 10 (1963) 9.
- 25 W. E. COHN, *Biochem. J.*, 64 (1956) 28P.
- 26 A. M. MOORE ET A. M. ANDERSON, *Can. J. Chem.*, 37 (1959) 590.
- 27 K. E. PFTZNER ET J. G. MOFFATT, *J. Org. Chem.*, 29 (1964) 1508.
- 28 G. N. RICHARDS, *Chem. Ind. (London)*, (1955) 228.
- 29 A. WACKER ET L. TRAGER, *Z. Naturforsch.*, B, 18 (1963) 13.
- 30 B. CAPON, *Chem. Rev.*, 9 (1969) 407.
- 31 J. CADET ET R. TEOULE, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. C*, 271 (1970) 1632.
- 32 O. BAUDISCH ET D. DAVIDSON, *J. Biol. Chem.*, 64 (1925) 233.
- 33 J. CADET ET R. TEOULE, *Biochim. Biophys. Acta*, 238 (1971) 8.
- 34 D. H. HAYES, A. M. MICHELSON ET A. R. TODD, *J. Chem. Soc.*, (1955) 808.
- 35 K. RANDERATH, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 991.
- 36 S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 991.
- 37 J. CADET ET R. TEOULE, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 22 (1971) 273.
- 38 M. HOFFER, *Chem. Ber.*, 93 (1960) 2777.