

# PREPARATION, ISOMERISATION ET CONFIGURATION ABSOLUE DES "HYDRATES" DE THYMIDINE

J. CADET\*, R. DUCOLOMB et R. TEOULE

CEA/CEN-G, Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie, 85 X-38041 Grenoble Cedex, France

(Received in France 7 September 1976; Received in the UK for publication 28 December 1976)

**Résumé**—Les (+) et (-) l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidines cis 4a, 5a sont préparés par réduction douce des formes (+) et (-) de la bromo-5-hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine trans 2a, 3a. Les "hydrates" trans 6a, 7a sont obtenus par chauffage de 4a ou 5a en solution aqueuse alcaline à 60°. L'isomérisation de 4a, 5a, 6a et 7a implique l'ouverture du cycle pyrimidique en 1,6, suivie d'une réaction de cétolo-énolisation. La détermination de la configuration des "hydrates" de thymidine repose sur l'obtention spécifique des formes énantiomères de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine par dégradation radio-induite de 4a, 5a, 6a, 7a et de la dihydro-5,6-thymine 5S 8b.

**Abstract**—The (+) and (-) cis-6-hydroxy-5,6-dihydrothymidines 4a and 5a have been prepared by mild reduction of (+) and (-) trans-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydrothymidine 2a and 3a. The trans "hydrates" 6a and 7a have been prepared by warming of 4a or 5a in alkaline aqueous solution at 60°C. The isomerization of 4a, 5a, 6a and 7a involved the opening of the pyrimidine ring at 1,6 position and subsequent keto-enolisation. The characterization of the configurations of "hydrates" is based on the specific formation of the enantiomeric forms of 6-hydroxy-5,6-dihydrothymine by radiation-induced degradation of 4a, 5a, 6a, 7a and 5,6-dihydrothymine 5S 8b.

L'inactivation cellulaire de nombreux microorganismes sous l'action des rayonnements UV résulte en partie de la photohydratation des constituants pyrimidiques des acides nucléiques.<sup>1</sup> Les "hydrates" d'uracile, de cytosine et de leurs dérivés nucléosidiques ont été obtenus par photolyse UV,<sup>2-4</sup> radiolyse gamma<sup>5</sup> et synthèse chimique.<sup>6-7</sup> Les isomères cis et trans de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine, longtemps supposés instables, ont été caractérisés plus récemment.<sup>8-10</sup> Le présent mémoire a trait à la préparation et à l'étude de l'isomérisation des quatres diastéréoisomères de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine 4a, 5a, 6a et 7a qui sont d'importants produits de dégradation radio-induite de la thymidine 1a en solution aqueuse désaérée.<sup>11</sup> L'obtention des énantiomères 5S, 6R (+) et 5S, 6S (-) de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine 4b, 6b par radiolyse gamma d'une solution aqueuse aérée de 5S (-) dihydro-5,6-thymine a permis la détermination de la configuration absolue des "hydrates" 4a, 5a, 6a et 7a.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Préparation des isomères cis 4a, 5a

La réduction de chacun des deux diastéréoisomères trans de la bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine 2a, 3a conduit avec un excellent rendement à la formation de 4a et 5a avec conservation du signe du pouvoir rotatoire

initial (Fig. 1). On note aussi la formation de thymidine 1a.

La transformation quantitative de 4a et 5a en thymidine 1a par dégradation thermique et hydrolyse en solution aqueuse acide ou alcaline est compatible avec leur qualité de  $\beta$  cétol.<sup>9,11</sup>

L'examen des spectres de RMN permet de définir sans ambiguïté la nature des nucléosides 4a, 5a. Les signaux du méthyle exocyclique et de H-6 apparaissent comme deux doublets en raison du couplage de chacun de ces protons avec H-5 vicinal. Les légères différences observées à la fois dans le méthanol-d<sub>4</sub> et l'oxyde de deutérium pour les valeurs de constantes de couplage du proton anomérique et du groupement méthylénique en 2' traduisent des modifications conformationnelles de la partie osidique. Il n'en est pas de même pour JH<sub>5</sub>-H<sub>6</sub> dont les valeurs (3.5 Hz) sont identiques pour les "hydrates" dans les deux solvants utilisés. Ces observations sont en faveur d'une conformation pseudo axiale-pseudo équatoriale des deux protons vicinaux H-5 et H-6 en accord avec la stéréospécificité de la réaction de réduction qui s'effectue avec rétention de configuration.<sup>12</sup>

Il faut noter aussi que la transformation des bromohydrines de thymidine 2a, 3a en "hydrate" cis 4a, 5a par hydrogénéation catalytique en présence de palladium s'effectue avec la même spécificité.

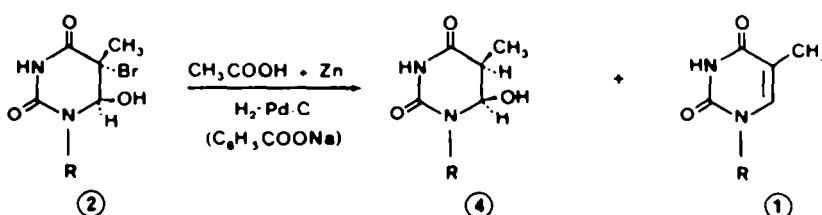


Fig. 1. Préparation des "hydrates" cis de thymidine 4a, 5a et de thymine 4b, 5b. (a) R = désoxy-2-érythropyranofuransylique; (b) R = H.

Un intermédiaire énolique est vraisemblablement impliqué dans la formation de **4a** et **5a** par analogie avec le mécanisme de réduction des  $\alpha$ -bromo cétones en milieu acide.<sup>14</sup> La formation transitoire d'un dérivé énolique a été récemment proposée pour rendre compte de la réduction spécifique du bromo-5-méthoxy-6-dihydro-5,6-uracile par le bisulfite. Une réaction compétitive d'élimination qui conduit au dérivé insaturé en 5,6 est aussi observée.<sup>15</sup>

#### Synthèse des isomères trans

Les "hydrates" **4a**, **5a** sont stables en solution aqueuse (pH 6.0) comparativement aux deux diastéréoisomères (+) et (-) de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-uridine.<sup>5</sup> Le chauffage de **4a** ou **5a** dans un mélange pyridine-eau (1-1) ou en solution aqueuse tamponnée (pH 7.4) à 60° pendant quatre heures engendre la formation de **5a** ou **4a** et des isomères trans **6a** et **7a**. On observe une déshydratation partielle en thymidine **1a** (Fig. 3).

La configuration trans des hydrogènes vicinaux H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> est confirmée par l'analyse de leurs caractéristiques de  $^1\text{H}$  RMN. Les faibles valeurs de couplage H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub> ( $J_{H_5, H_6} = 2$  Hz) sont en faveur d'une conformation pseudodééquatoriale. On note que H-5 de **6a** et **7a** résonne à une valeur de champ plus élevée ( $\delta = 2.74$ ) que le proton correspondant en conformation pseudoaxiale ( $\delta = 2.88$ ) des dérivés cis **4a**, **5a**. Des constatations similaires ont été effectuées avec des dérivés saturés en 5,6 de l'uracile qui adoptent en solution une conformation demi-chaise avec une déformation importante de C-5 et C-6 de part et d'autre du plan moyen.<sup>14,17</sup>

La conformation osidique des quatre diastéréoisomères **4a**, **5a**, **6a**, **7a** dépend étroitement de la configuration de C-6 de l'aglycone. Le déplacement de l'équilibre dynamique C<sub>2</sub>endo(S)  $\rightleftharpoons$  C<sub>2</sub>endo(N)<sup>18,19</sup> vers le conformère de type N est plus marqué pour les isomères 6R (population de type N ou P<sub>(N)</sub> = 36%) que pour les dérivés 6S (P<sub>(N)</sub> = 30%).

#### Etude du mécanisme d'isomérisation cis-trans

L'isomérisation de **4a** ou **5a** en **5a** (ou **4a**), **6a** et **7a**

présente des analogies avec la transformation de la dihydroxy-5,6-dihydro-5,6-thymine en dérivé trans.<sup>20</sup> La rupture initiale de la liaison 1,6 par tautomérisation chaîne-cycle a été proposée pour de nombreux dérivés pyrimidiques possédant une fonction carbinolamide.<sup>21,22</sup> Le caractère dicétone du dérivé acyclique ainsi formé favorise la mobilité de H-5. Le chauffage de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine *cis* **4a** ou **5a** dans le mélange oxyde de deutérium-pyridine (1-1) conduit, par cétoénolisation, à la formation d'hydroxy-6-deutéro-5-dihydro-5,6-thymidine comme le confirme la disparition partielle dans le spectre de RMN du signal de H-5.

Les données cinétiques relatives à l'isomérisation de **5a**  $^1\text{C}_2$  dans un mélange pyridine- $^1\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 3) sont aussi en faveur du mécanisme défini ci-dessus. L'isomère trans **7a**, le plus important quantitativement, et dont le signe de l'activité optique est opposé à celui de "l'hydrate" cis **5a** initial se forme par épimérisation du C-6. Ce fait est confirmé par la faible valeur du rapport  $^1\text{H}/^1\text{C}$  pour ce dérivé comparativement à la forte incorporation de tritium observée chez les deux autres diastéréoisomères néoformés. De plus, la présence de ces deux dernières substances en quantités sensiblement égales ne peut s'expliquer que par la disparition transitoire de l'asymétrie de C-6. Des données similaires sont obtenues pour l'isomérisation des diastéréoisomères trans **6a**, **7a** ou cis **4a**.

Des processus similaires doivent être impliqués dans le mécanisme de deutération (C-5) des hydrates d'uridine<sup>5</sup> et d'acide uridylique<sup>23</sup> en présence de D<sub>2</sub>O.

*Détermination de la configuration absolue.* La configuration absolue des "hydrates" de thymidine repose sur l'obtention spécifique des énantiomères cis (+) 5S, 6R **4b** et trans (-) 5S, 6S **6b** à partir de la dihydro-5,6-thymine 5S **8a**.

La dégradation radio-induite de la dihydro-5,6-thymine racémique en solution aqueuse aérée conduit par l'intermédiaire des radicaux dihydro-5,6-thymin-5-yl et dihydro-5,6-thymin-6-yl<sup>24</sup> à la formation des hydroperoxydes-5 et -6.<sup>9</sup> La réduction stéréospécifique (S<sub>N</sub>R) de la liaison peroxydique en présence d'acide acétique et

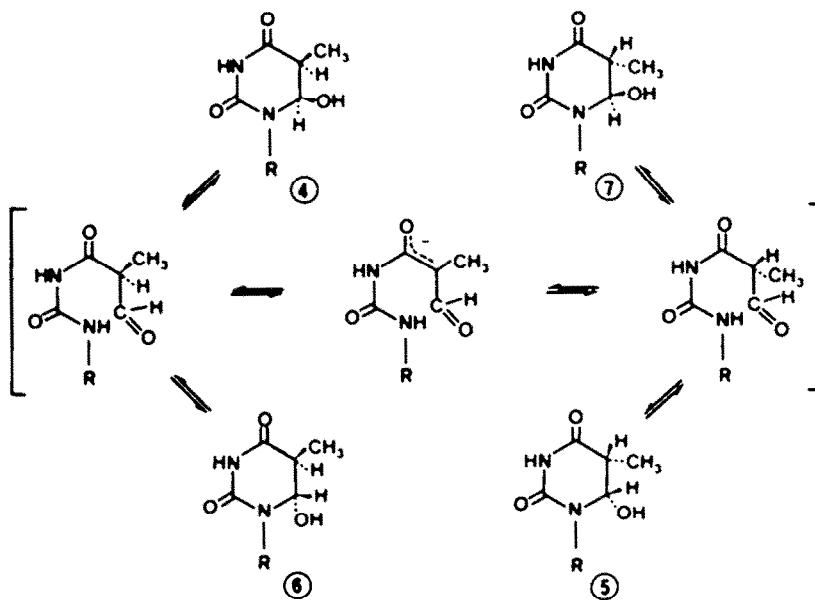


Fig. 2. Mécanisme d'isomérisation cis-trans (trans-cis) de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymidine par chauffage dans un mélange eau-pyridine ou en présence de tampon phosphate 0.3 M (pH 7.4).

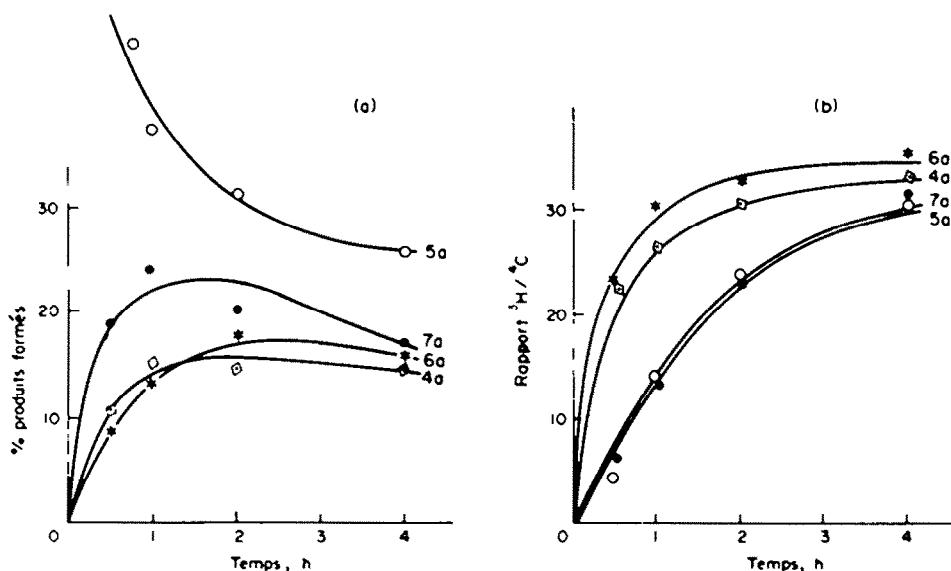


Fig. 3. Isomérisation de 5a par chauffage dans une solution pyridine-<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O. (A) Importance relative (en%) des différents diastéréoisomères en fonction de la durée du chauffage; (B) Rapport <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, produits séparés par chromatographie bidimensionnelle sur cellulose F (solvants A et C).

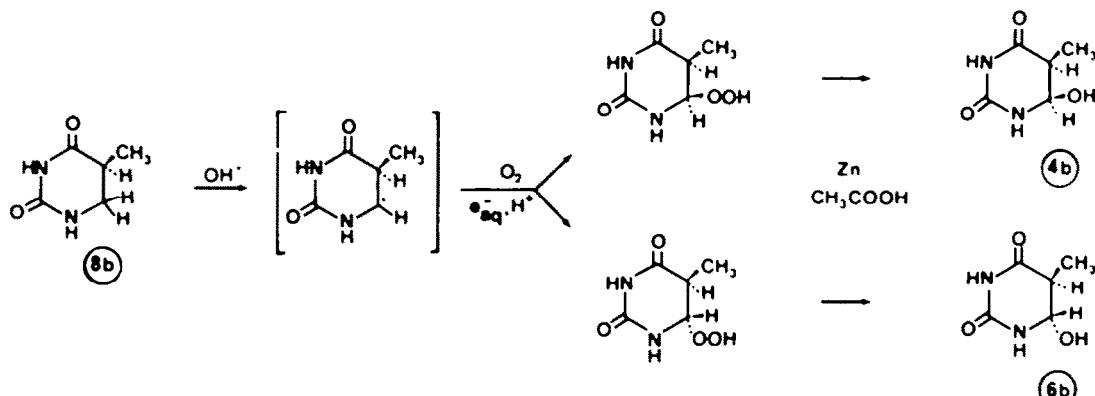


Fig. 4. Formation des "hydrates" 4b et 6b par dégradation radio-induite de la dihydro-5,6-thymine (-) 5S.

de zinc engendre l'alcool correspondant avec rétention de la liaison C-O (Fig. 4). Dans ces conditions, la transformation de la dihydro-5,6-thymine (-) 5S<sup>22</sup> en 4b et 6b s'effectue avec conservation de configuration du C-5. Il n'en est pas de même pour l'hydroxy-5-dihydro-5,6-thymine en raison de l'épimérisation du radical dihydro-5,6-thymine-5-yle.

Les quatre formes énantiomères de l'hydroxy - 6 - dihydro - 5,6 - thymine ont été obtenues spécifiquement par dégradation radio-induite de 4a, 5a, 6a et 7a en solution aqueuse aérée. La saturation de la liaison 5,6 de ces nucléosides se traduit par une attaque préférentielle du cycle furannique par les radicaux hydroxyles. La peroxidation des radicaux organiques résultant de l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur les carbones 1', 3', 4' et 5' engendre la libération de la liaison C-N avec libération de l'aglycone.<sup>23</sup> Les deux isomères cis 5S, 6R, 4b et 5R, 6S 5b ainsi obtenus présentent respectivement les mêmes propriétés optiques que les "hydrates" préparés par réduction des énantiomères trans 5R, 6R et 5S, 6S de la bromo - 5 - hydroxy - 6 - dihydro - 5,6 - thymine.<sup>24</sup> Par corrélation avec les isomères cis (+) 5S, 6R et trans (-) 5S, 6S il est possible d'établir la

configuration des énantiomères 4a, 6a et des nucléosides correspondants.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil Cary 15. Les spectres de RMN ont été obtenus à l'aide d'un appareil Varian T-60 à la température de 30°C. Le tétraméthylsilane est utilisé comme référence interne dans le méthanol-d<sub>4</sub>. L'enregistrement des spectres IR en phase solide a été effectué avec un spectrophotomètre Perkin Elmer 257. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été obtenus avec un spectrographe MS 50. Les données ont été traitées à l'ordinateur pour obtenir les formules moléculaires adéquates. Les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un polarimètre Quick Roussel-Jouan. Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichroïgraphe Roussel-Jouan 1960 à la température de 22°C.

Les séparations analytique et préparative ont été effectuées par chromatographie sur couche mince de silice Macherey Nagel MN-SHR UV 254 et de cellulose Merck F<sub>254</sub>, à l'aide des systèmes de solvants suivant : (A) chloroforme-méthanol-eau (4:2:1), phase inférieure additionnée de 5% de méthanol; (B) acétate d'éthyle, propanol-2-eau (75:16:9); (C) propane-2-ol-solution saturée (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> M(2:79:19). Les produits insaturés sont détectés par examen du chromatogramme sous

une lampe de Wood (254 nm). Les désoxy-2'-ribonucléosides sont mis en évidence par pulvérisation avec le réactif à la cystéine.<sup>27</sup> Les produits radioactifs (<sup>14</sup>C) sont détectés par autoradiographie à l'aide du papier Kodak Kodirex. Les mesures quantitatives ont été effectuées à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Packard. Les substances doublement marquées (<sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H) sont analysées avec un appareil "Oxymat" Packard. Le gaz carbonique <sup>14</sup>C et l'eau tritée ainsi obtenus sont dosés par scintillation. Les dégradations radioinduites sont effectuées dans un irradiateur de type piscine (<sup>60</sup>Co). Le débit de dose (8100 rad/mn) a été déterminé par la méthode de Fricke.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5S,6R-thymidine cis 4a*

La thymidine **1a** (193 mg) est dissoute dans 1.6 ml d'une solution aqueuse renfermant 180 mg de benzoate de sodium. On ajoute 100 µl de brome et l'ensemble est maintenu à +2°C pendant 10 min. La solution est évaporée à sec après élimination de l'excès de brome par barbotage d'air. L'addition au résidu huileux de 5 ml d'acétone entraîne la précipitation du bromure de sodium. Le mélange de bromohydrines **2a**, **3a**<sup>28</sup> après évaporation jusqu'à séchité du surageant est dissous dans 1.5 ml d'eau auxquels on ajoute 304 mg de zinc et 80 µl d'acide acétique. La réduction est totale au bout de 10 min. Après élimination des sels par filtration, le mélange réactionnel est chromatographié sur 6 plaques de silice de 20 × 20 cm. Le développement est effectué dans le solvant A. La zone de silice de *R*, 0.26 qui donne lieu à une légère fluorescence en lumière UV est extraite avec du méthanol (3 × 10 ml). On recueille après évaporation à sec du filtrat méthanolique 47 mg d'un composé huileux (Rd = 22%). Nous avons vérifié que la formation de **4a** résulte de la réduction de la bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans (+) **2a**:  $[\alpha]_D^{25} = -9.1^\circ$  (c 4.1, eau), IR (cm<sup>-1</sup>) 1698 (C=O), 1020, 1043, 1085 (C-OH). RMN (méthanol d<sub>4</sub>) δ 1.25 (d, 3, J<sub>CH<sub>2</sub></sub>, H<sub>1</sub>, -7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.27 (m, 2, largeur 16.5 Hz, H-2', H-2"), 2.88 (m, 1, H-5), 3.78 (m, 3, H-4', H-5<sub>a</sub>, H-5<sub>c</sub>), 4.39 (m, 1, H-3'), 5.20 (d, 1, J<sub>HH</sub>, -3.5 Hz, H-6), 6.25 (pseudo-triplet, 1, largeur 14 Hz, H-1') DC (c 1, CH<sub>3</sub>OH) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> + 70; (θ)<sub>200</sub> + 140; (θ)<sub>200</sub> + 460; (θ)<sub>200</sub> + 1290; (θ)<sub>200</sub> + 2080; (θ)<sub>200</sub> + 2210; (θ)<sub>200</sub> + 1970.

*Spectrométrie de masse du dérivé di-O-acétylé*: m/e = 344 (M<sup>+</sup>), 271 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOCH<sub>3</sub>), 242 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>2</sub>CO), 211 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>COOH), 201 (fragment désoxyribosidique diacétyle). Calc. pour C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 344.1220, trouvé: 344.1226.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5R,6S-thymidine cis 5a*

L'extraction de la deuxième bande de silice (*R*, 0.21) absorbant légèrement en lumière UV avec 3 × 5 ml de méthanol permet l'obtention de 19 mg d'un composé amorphe (Rd = 9%). Il est à noter qu'un deuxième mode de préparation de ces "hydrates" de configuration cis a été utilisé indifféremment, à partir de **3a**. On sature en hydrogène 12 ml d'une solution méthanolique renfermant 44 mg de benzoate de sodium et 16 mg de palladium 10% sur carbone; on ajoute 88 mg de **3a** dissous dans 2 ml de méthanol. La réduction s'effectue pendant 15 min sous une pression en hydrogène voisine de 1.5 atmosphère. Le catalyseur est éliminé par filtration sur Céelite. La solution alcoolique résultante après concentration sous vide est chromatographiée sur 4 plaques de silice de 20 × 20 cm à l'aide du solvant A. On obtient après extraction de la zone de silice (*R*, 0.21) 29 mg d'un produit huileux (Rd = 42%) identique à celui préparé ci-dessus.  $[\alpha]_D^{25} = +1.6^\circ$  (c 3.20, eau). IR (cm<sup>-1</sup>) 1699 (C=O), 1050, 1084 (C-OH). RMN (méthanol d<sub>4</sub>) δ 1.22 (d, 3, J<sub>CH<sub>2</sub></sub>, H<sub>1</sub>, -7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.23 (m, 2, H-2' et H-2"), 2.88 (m, 1, H-5), 3.77 (m, 3, H-4', H-5<sub>a</sub> et H-5<sub>c</sub>), 4.36 (m, 1, H-3'), 5.27 (d, 1, J<sub>HH</sub>, H<sub>1</sub>, -3.6 Hz, H-6), 6.21 (pseudo-triplet, 1, largeur 13.5 Hz, H-1') DC (c 1.3, méthanol) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> - 170; (θ)<sub>200</sub> - 240; (θ)<sub>200</sub> 340; (θ)<sub>200</sub> - 270; (θ)<sub>200</sub> - 175; (θ)<sub>200</sub> - 70; (θ)<sub>200</sub> + 0.

*Spectrométrie de masse du dérivé di-O-acétylé*: m/e = 344 (M<sup>+</sup>), 271 (M<sup>+</sup>-COOCH<sub>3</sub>), 242 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>2</sub>CO), 211 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>COOH), 201 (fragment désoxyribosidique diacétyle). Calc. pour C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 344.1220, trouvé: 344.1198.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5S,6S-thymidine trans 6a*

L'hydroxy-6 dihydro-5S,6R-thymidine cis **4a** (160 mg) est

dissoute dans 10 ml d'une solution aqueuse de pyridine (1-1). L'ensemble est placé dans une étuve à la température de 60°C pendant 3 h. La solution est alors évaporée jusqu'à séchité. Le résidu huileux ainsi obtenu est chromatographié sur 6 plaques de cellulose Merck F<sub>214</sub> (20 × 20 cm) à l'aide du solvant A. Le développement chromatographique est répété trois fois dans la même direction après séchage intermédiaire du chromatogramme. Cinq zones dont quatre de faible intensité qui correspondent respectivement à la thymidine **1a** et aux "hydrates" **4a**, **5a** et **7a** sont observées en lumière UV. Une meilleure localisation des bandes radioactives est obtenue par autoradiographie. La deuxième zone de cellulose (*R*, 0.31) est extraite avec 3 × 6 ml de méthanol. L'évaporation à sec de la solution alcoolique donne 20 mg (Rd 14%) de **6a** à l'aspect huileux.  $[\alpha]_D^{25} = -11.3^\circ$  (c 6.8, CH<sub>3</sub>OH). IR (cm<sup>-1</sup>) 1690 (C=O), 1030, 1080 (C-OH). RMN (méthanol d<sub>4</sub>) δ 1.21 (d, 1, J<sub>CH<sub>2</sub></sub>, H<sub>1</sub>, -7.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.74 (m, 1, H-5), 3.75 (m, 3, H-4', H-5<sub>a</sub> et H-5<sub>c</sub>), 4.36 (m, 1, H-3'), 5.19 (d, 1, J<sub>HH</sub>, H<sub>1</sub>, -1.9 Hz, H-6), 6.20 (m, 1, H-1'). DC (c 0.80, CH<sub>3</sub>OH) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> + 1120; (θ)<sub>200</sub> + 3760; (θ)<sub>200</sub> + 5350; (θ)<sub>200</sub> + 5680; (θ)<sub>200</sub> + 1025; (θ)<sub>200</sub> ± 0.

*Analyse du dérivé di-O-acétylé en 3',5'*: Calc. pour C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 344.1220, trouvé: 344.1250.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5R,6R-thymidine trans 7a*

L'extraction méthanolique (3 × 6 ml) de la quatrième zone radioactive (*R*, 0.43) des chromatogrammes précédents conduit après évaporation à sec à l'obtention de 16 mg de **7a** (Rd 10%) à l'aspect huileux.  $[\alpha]_D^{25} = +49.6^\circ$  (c 2.4, CH<sub>3</sub>OH). IR (cm<sup>-1</sup>) 1710-1680 (C=O), 1035, 1082 (C-OH). RMN (méthanol d<sub>4</sub>) δ 1.21 (d, 3, J<sub>CH<sub>2</sub></sub>, H<sub>1</sub>, -7.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.22 (m, 2, H-2' et H-2"), 2.74 (m, 1, H-5), 3.76 (m, 3, H-4', H-5<sub>a</sub> et H-5<sub>c</sub>), 5.12 (d, 1, J<sub>HH</sub>, H<sub>1</sub>, -6.6 Hz), DC (c 1.4, CH<sub>3</sub>OH) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> - 170; (θ)<sub>200</sub> - 720; (θ)<sub>200</sub> - 330; (θ)<sub>200</sub> ± 0. Analyse du dérivé di-O-acétyl-3',5': calculé pour C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 344.1220, trouvé: 344.1215.

L'extraction méthanolique des zones de cellulose de *R*, 0.28, 0.40, 0.54 permet l'obtention respectivement de 12 mg de **5a** (Rd 8%), 26 mg de **4a** (Rd 16%) et 24 mg de **1a** (Rd 16%).

#### *Hydroxy-6 dihydro-5S,6R-thymine cis 4b*

L'hydroxy-6 dihydro-5S,6R-thymidine cis <sup>14</sup>C-**4a** (52 mg) dans 200 ml d'eau irradiée (<sup>60</sup>Co) pendant 1 h en présence d'oxygène avec un débit de dose de 8100 rad/mn. La solution aqueuse est évaporée jusqu'à séchité sous vide en chauffant légèrement (35°C). Le résidu huileux est chromatographié sur une plaque de silice 20 × 20 cm à l'aide du solvant A. La bande de *R*, 0.34 décelée par autoradiographie est extraite avec du méthanol (3 × 1 ml). On obtient 11 mg d'un produit blanchâtre (Rd = 37%).  $[\alpha]_D^{25} = +24^\circ$  (c 1.26, eau). IR (cm<sup>-1</sup>) 1730 (C=O), 1065, 1110 (C-OH). DC (c 1.65, CH<sub>3</sub>OH) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> + 365; (θ)<sub>200</sub> + 1155; (θ)<sub>200</sub> + 1680; (θ)<sub>200</sub> + 1780; (θ)<sub>200</sub> + 1550; (θ)<sub>200</sub> + 890.

Une substance présentant les mêmes caractéristiques spectrales et chromatographiques est obtenue par réduction douce de la bromo-5-hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine trans (+) **2b**.<sup>28</sup> Pratiquement, on laisse en contact pendant 10 min, 8 mg de **2b** dans 0.2 ml d'eau en présence de 50 mg de poudre de zinc et 10 µl d'acide acétique. On obtient après séparation sur couche mince de silice (solvant A), 3 mg de **4b**.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5R,6S-thymine cis 5b*

Le diastéréoisomère lévogyre **5a** (48 mg) est irradié dans les conditions définies ci-dessus. L'hydroxy-6 dihydro-5R,6S-thymine cis **5b** formé est isolé par chromatographie sur couche mince; on obtient après extraction de la bande de silice de *R*, 0.34 (solvent A) 9 mg d'un produit à l'aspect blanchâtre (Rd = 31%).  $[\alpha]_D^{25} = -25^\circ$  (c 1.34, H<sub>2</sub>O). IR (cm<sup>-1</sup>) 3430, 3250 (NH et OH), 1730 (C=O), 1065, 1110 (C-OH). DC (c 1.42, CH<sub>3</sub>OH) (θ)<sub>200</sub> ± 0; (θ)<sub>200</sub> - 370; (θ)<sub>200</sub> 1155; (θ)<sub>200</sub> - 1715; (θ)<sub>200</sub> - 1750; (θ)<sub>200</sub> - 1550.

#### *Radioolyse γ de la dihydro-5,6 thymine 5S (-) en présence d'oxygène*

La dihydro-5,6 thymine 5S (-) <sup>14</sup>C-**2b** (32 mg) est irradiée (<sup>60</sup>Co) en solution aqueuse (25 ml) aérée pendant 1 h. On ajoute ensuite 50 mg de poudre de zinc et 40 µl d'acide acétique au milieu d'irradiation. La réduction des peroxydes organiques est

totale au bout de 5 min comme le montre l'analyse chromatographique d'une partie aliquote de la solution. Le milieu réactionnel est évaporé à sec; le résidu huileux obtenu est chromatographié sur deux plaques de cellulose F à l'aide du solvant B.

#### *Hydroxy-6 dihydro-5S,6R-thymine cis 4b*

La zone de cellulose de  $R_f$  0,63 est extraite avec  $3 \times 2$  ml de méthanol. L'hydrate obtenu (6,2 mg) avec un rendement de 20% présente les mêmes caractéristiques spectrales et chromatographiques que le dérivé 4b obtenu précédemment (*vide supra*).

#### *Hydroxy-6 dihydro-5S,6S-thymine trans 6b*

Le produit correspondant à la bande radioactive la plus élevée ( $R_f$  ~ 0,67) est extrait avec  $3 \times 2$  ml de méthanol. On obtient 5,5 mg d'une substance blanchâtre ( $R_d = 18\%$ ) après évaporation à sec des trois filtrats méthanoliques.  $[\alpha]_D^{25} = -38.8^\circ$  (c 1,30, eau). IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3520, 3350, 3180 (OH), 1715 (C=O), 1035, 1090 (C-OH). DC (c 0,87,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $(\theta)_{260} \pm 0$ ;  $(\theta)_{250} + 330$ ;  $(\theta)_{240} + 560$ ;  $(\theta)_{230} + 650$ ;  $(\theta)_{220} + 265$ ;  $(\theta)_{212} \pm 0$ ;  $(\theta)_{200} - 1915$ .

Une substance présentant les mêmes propriétés est obtenue par irradiation gamma de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine trans (-) 6a en présence d'oxygène avec un rendement de 40%.

#### *Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine*

L'extraction de la zone de cellulose ( $R_f$  0,51) avec  $3 \times 5$  ml de méthanol permet l'obtention après évaporation à sec des filtrats alcooliques de 3 mg d'une substance ( $R_d \approx 10\%$ ) qui présente les mêmes caractéristiques spectrales de masse et IR que l'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine obtenue par synthèse.<sup>23</sup> Ce composé ne présente pas d'activité optique.

**Remerciements**—Les auteurs remercient Mme S. Georges pour son excellente collaboration technique et M. J. Ulrich pour l'enregistrement des spectres de masse.

#### BIBLIOGRAPHIE

<sup>1</sup>M. P. Gordan, C. Huang et J. Hurter, *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids* (Edited by S. Y. Wang), Vol. 2, p. 265. Academic Press, New York (1976).

- <sup>2</sup>W. J. Wechter et K. C. Smith, *Biochemistry* **7**, 4064 (1968).
- <sup>3</sup>G. De Boer et H. E. Johns, *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 18 (1970).
- <sup>4</sup>I. Pietrzykowska et D. Shugar, *Acta Biochim. Polon.* **21**, 187 (1974).
- <sup>5</sup>R. Ducolomb, J. Cadet, C. Taieb et R. Teoule, *Biochim. Biophys. Acta* **432**, 18 (1976).
- <sup>6</sup>R. Kleber, E. Fahr et E. Boebinger, *Naturwiss.* **52**, 513 (1965).
- <sup>7</sup>H. Gattner et E. Fahr, *J. Ann. Chem.* **670**, 84 (1963).
- <sup>8</sup>C. Nofre et M. H. Ogier, *C. R. Acad. Sci. Paris* **263C**, 1401 (1966).
- <sup>9</sup>J. Cadet et R. Teoule, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* **22**, 273 (1971).
- <sup>10</sup>G. J. Fisher et H. E. Johns, *Photochem. Photobiol.* **18**, 23 (1973).
- <sup>11</sup>J. Cadet et R. Teoule, *J. Chromatog.* **115**, 191 (1975).
- <sup>12</sup>G. J. Fisher et H. E. Johns, *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids* (Edited by S. Y. Wang), Vol. 1, p. 170. Academic Press, New York (1976).
- <sup>13</sup>J. Cadet et R. Teoule, *C. R. Acad. Sci. Paris* **272D**, 2254 (1971).
- <sup>14</sup>E. J. Corey et R. A. Sneen, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 6269 (1956).
- <sup>15</sup>G. S. Rork et I. H. Pitman, *Ibid.* **97**, 5566 (1975).
- <sup>16</sup>M. Chabre, D. Gagnaire et C. Nofre, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **108** (1966).
- <sup>17</sup>A. R. Katritzky, M. R. Nesbit, B. J. Kurtev, M. I. yapova et I. G. Pojarlieff, *Tetrahedron* **25**, 3807 (1969).
- <sup>18</sup>C. Altona et M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2333 (1973).
- <sup>19</sup>J. Cadet et R. Ducolomb, *Table Ronde Internationale. "Nucléosides et Activités Biologiques"*, Montpellier (1974).
- <sup>20</sup>J. Cadet, J. Ulrich et R. Teoule, *Tetrahedron* **31**, 2057 (1975).
- <sup>21</sup>S. Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6199 (1958).
- <sup>22</sup>Y. Kondo et B. Witkop, *Ibid.* **90**, 764 (1968).
- <sup>23</sup>R. W. Chambers, *Ibid.* **90**, 2192 (1968).
- <sup>24</sup>L. S. Myers et L. M. Theard, *Ibid.* **92**, 2868 (1970).
- <sup>25</sup>M. Dizdaroglu, K. Neuwald et C. von Sonntag, *Z. Naturforsch. 31b*, 227 (1976).
- <sup>26</sup>J. Cadet et R. Teoule, *Carbohydrate Res.* **29**, 345 (1973).
- <sup>27</sup>J. G. Buchanan, *Nature* **168**, 1091 (1951).
- <sup>28</sup>C. Nofre, A. Cier, R. Chapurlat et J. P. Mareschi, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **332** (1965).