

BBA 96844

PEROXYDES FORMÉS PAR ACTION DU RAYONNEMENT  $\gamma$  SUR LA THYMINES EN SOLUTION AQUEUSE AÉRÉE

J. CADET ET R. TEOULE

*Laboratoire de Radiobiologie, Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, Cedex 85, Grenoble (France)*

(Reçu le 27 novembre, 1970)

## SUMMARY

*Peroxides produced from thymine by  $\gamma$  irradiation in aerated solution*

1. Chemical modifications of DNA upon  $\gamma$  irradiation play an important role in radiobiology. Peroxides produced from thymine by  $\gamma$  irradiation in aerated solution have been studied. Thymine hydroperoxides were the primary products and their chemical structures which were mostly unknown, have been determined.

2. The following hydroperoxides were identified:

*trans*-5-Hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydrothymine

*cis*-5-Hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydrothymine

*cis*-6-Hydroperoxy-5-hydroxy-5,6-dihydrothymine

5-Hydroperoxymethyl uracil

5-Hydroperoxy-5,6-dihydrothymine

*cis*-6-Hydroperoxy-5,6-dihydrothymine

*trans*-6-Hydroperoxy-5,6-dihydrothymine

*trans*-5,6-Dihydroperoxy-5,6-dihydrothymine

5-Hydroperoxy-5-methylhydantoin

5-Hydroperoxy-5-methylbarbituric acid

3. These compounds were separated by thin-layer chromatography involving new chromatographic solvents. By decomposition they were converted into alcohol besides other degradation products.

4. These  $^{14}\text{C}$ -labelled peroxides were synthesized by different methods which are described. A new way to obtain thymine peroxides based on the reaction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with halogenated derivatives of thymine, in the presence of  $\text{Ag}_2\text{O}$  is given.

5. Spectral analysis (ultraviolet, infrared, NMR, mass spectrometry) gave information on the configuration and the conformation of the products. Chemical couplings and  $J$  constants provided by NMR spectrometry were tabulated.

6. Quantitative analysis of peroxide formation and decomposition products was performed by  $^{14}\text{C}$  scintillation counting.

7. The peroxides obtained at pH 7 result from the action of oxygen on five different radicals:

5-Hydroxy-5,6-dihydro-6-thymyl

6-Hydroxy-5,6-dihydro-5-thymyl

(5-Uracyl)methyl

5,6-Dihydro-5-thymyl

5,6-Dihydro-6-thymyl

The isolation of peroxides is proof of the existence of these radicals which could be detected under different experimental conditions by EPR spectrometry.

The addition of  $O_2$  or  $O_2^-$  to the 6-hydroxy-5,6-dihydro-5-thymyl radical is preferentially performed in the *trans* configuration.

---

## INTRODUCTION

L'action des radiations ionisantes sur les organismes vivants résulte vraisemblablement d'une atteinte nucléaire de la cellule. Elle peut s'expliquer en termes de modifications chimiques des divers composants des acides nucléiques et en particulier des bases pyrimidiques et puriques.

De très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de ces transformations *in vitro*<sup>1-7</sup>; il a pu être montré que la double liaison 5-6 de la thymine ou de la cytosine était le site d'attaque préférentiel des radicaux issus de la radiolyse de l'eau. La disparition progressive du groupement chromophore avec l'augmentation de la dose de rayonnement<sup>8</sup> s'explique, en partie, en milieu aéré, par la peroxydation de la liaison éthylénique.

En irradiant des solutions aqueuses de DNA et de leurs constituants par des rayons X, en présence de  $O_2$ , WEISS<sup>1</sup> et DANIELS *et al.*<sup>9</sup> ont mis en évidence la formation de peroxydes qui ne représentent qu'une partie des produits de radioformation<sup>2</sup>.

A partir de la thymine, EKERT ET MONIER<sup>3</sup> et LATARJET *et al.*<sup>10</sup> on pu isoler par deux chromatographies successives sur colonne et sur papier les deux formes de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine; ces substances ont été préparées par synthèse chimique et retrouvées parmi les produits de radiolyse de la thymine. Les mesures de constantes de vitesse du second ordre des différents hydroperoxydes de synthèse ont confirmé que le groupement hydroperoxydique était bien en position 5 mais la cinétique ne permet pas de faire la distinction entre les formes *cis* et *trans*.

Dans les plus récents travaux relatifs à la radiolyse de la thymine en milieu aqueux aéré<sup>13</sup> le problème des peroxydes est peu étudié. Le présent travail a pour but, en mettant en évidence les différents modes de peroxydation de cette base pyrimidique, et en précisant la nature et l'importance quantitative des différents hydroperoxydes, d'établir des relations entre ces composés primaires et les divers produits plus stables de dégradation thermique ou radiolytique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Produits commerciaux*

La thymine est un produit Fluka: la  $[2-^{14}C]$ thymine d'activité spécifique 10 ou 48 mCi/mmol provient du Département des Radioéléments de Saclay (France).

### *Produits de base obtenus par synthèse*

La bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* et la dihydroxy-5,6 dihydrothymine *cis* ont été synthétisées d'après la méthode de BAUDISCH ET DAVIDSON<sup>15</sup>. Par chauffage en solution aqueuse de ce dernier composé, on obtient l'isomère *trans*<sup>16</sup>. La

dihydroxy-5,6 dihydrothymine *cis* peut aussi être obtenue par oxydation permanganique<sup>12</sup>.

L'hydroxy-5 dihydrothymine de forme *cis* a été préparée selon la méthode de NOFRE ET OGIER<sup>17</sup> alors que l'hydroxy-6 dihydrothymine *trans* a été synthétisée d'après le procédé mis au point dans notre laboratoire<sup>18</sup>.

L'hydroxy-5 dihydrothymine et la bromo-5 dihydrothymine ont été obtenues suivant le procédé de NOFRE *et al.*<sup>19</sup>.

La méthode de DOUMAS ET BIGGS<sup>20</sup> a permis de synthétiser l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique alors que l'hydroxyméthyl-5 uracile et le formyl-5 uracile ont été préparés selon la technique de CLINE *et al.*<sup>21</sup>.

L'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne a été synthétisée d'après la méthode de MURAHASHI *et al.*<sup>22</sup> et la pyruvyl-*N* formyl-*N'* urée a été préparée par oxydation de la dihydroxy-5,6 dihydrothymine *cis* avec le NaI (réf. 23).

### *Techniques d'irradiation*

L'irradiateur est du type piscine et la température de l'eau est de 12°. La solution de thymine de concentration  $2 \cdot 10^{-3}$  M, aérée à l'aide d'une pompe d'aquarium, est placée sous un flux de rayons  $\gamma$  de <sup>60</sup>Co émis par trois sources de 2000 Ci.

Le débit de dose (9000 rads/min) a été évalué selon la technique de FRICKE<sup>24</sup>.

Les solutions irradiées sont ensuite soumises immédiatement à l'analyse chromatographique ou lyophilisées pour les travaux à l'échelle préparative.

### *Analyses chromatographiques*

Le choix de l'adsorbant s'est révélé capital. La silice Macherey Nagel-S-HR en raison de la présence d'amidon comme liant permet une révélation aisée des peroxydes après pulvérisation d'une solution alcoolique de KI, le seuil de détection est inférieur à 0.1  $\mu$ g.

Il est à noter que les gels de silice G, HR et PF induisent une décomposition partielle des peroxydes au cours du développement.

Les différents hydroperoxydes ont été séparés par analyse bidimensionnelle en combinant les deux systèmes de solvants suivants: (A) chloroforme-méthanol-eau (4 : 2 : 1, v/v/v) + 2 % méthanol; (B) acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75 : 16 : 9, v/v/v) (voir paragraphe *Propriétés chromatographiques* dans RESULTATS et Tableaux IIa et IIb).

Pour les études de filiation des peroxydes la cellulose Merck a été utilisée avec les Solvants A et B ainsi que la cellulose MN 300 avec les systèmes d'éluants préalablement décrits<sup>25</sup>.

L'isolement de quantités importantes de produits a été effectué après dépôt linéaire et séparation monodimensionnelle sur plaques de silice de plus grande épaisseur (0.5 mm contre 0.2 mm).

### *Analyse quantitative*

La localisation des différents produits radioactifs sur le chromatogramme s'effectue par autoradiographie sur film Kodirex. Une activité globale de 0.2  $\mu$ Ci permet de déceler les diverses substances après un temps de contact de 15 h.

Les zones de silice contenant les différents produits sont détachées de la plaque de verre et mises en contact avec 1 ml d'eau. Après agitation, 30 ml de dioxanne con-

tenant le mélange scintillant sont ajoutés. La radioactivité est comptée au moyen d'un appareil TriCarb avec un rendement de 70 % alors que l'activité retrouvée est voisine de 100 %.

### *Analyses spectrographiques*

(1) *Les spectres d'absorption électronique* ont été obtenus sur un appareil Safas automatique.

(2) *Un spectrophotomètre Perkin Elmer, Modèle 257*, muni d'un dispositif de microanalyse a permis l'enregistrement des spectres infra-rouges en milieu solide sur pastille de KBr. Cependant, pour prévenir la décomposition des hydroperoxydes au contact du KBr il a été nécessaire d'opérer sur de plus grandes quantités de produits mis en suspension dans du nujol.

Les différentes substances résultant de la décomposition des peroxydes ont pu être identifiées par microspectrométrie en comparant leurs spectres infra-rouges avec ceux de produits témoins.

(3) *Les études de spectrographie RMN* ont été effectuées sur un appareil Varian A 60 dont la température au niveau de la sonde est maintenue à 30°. La concentration des divers produits dissous dans le  $[^2\text{H}_6]$ diméthylsulfoxyde variait entre 0.2 et 0.4 M. Le tétraméthylsilane a été utilisé comme référence interne.

## RÉSULTATS

La détermination de la structure chimique des hydroperoxydes engendrés par l'action du rayonnement  $\gamma$  sur la thymine en solution aqueuse aérée repose sur:

(I) l'étude de la structure des produits obtenus par dégradation thermique ou par substitution nucléophile des hydroperoxydes; (II) la synthèse chimique; (III) l'étude des propriétés chromatographiques; (IV) l'analyse spectrale des hydroperoxydes (ultra-violet, infra-rouge, RMN, masse).

Les peroxydes identifiés sont représentés dans la Fig. 1.

### *Produits obtenus par décomposition thermique ou réduction*

#### *Nature des produits de décomposition thermique*

(1) L'homolyse de la liaison oxygène-oxygène est provoquée par l'action de la chaleur. Pour les peroxydes relativement instables elle peut se produire à température ordinaire. La configuration de l'alcool auquel on aboutit en laissant traîner la solution est essentiellement la même que celle du peroxyde initial. On observe évidemment à côté de l'alcool d'autres produits de dégradation dus à des transpositions nucléophiles intramoléculaires ou à des réactions d'élimination<sup>26</sup>.

L'hydroperoxyméthyl-5 uracile donne surtout de l'hydroxyméthyl-5 uracile, des traces d'uracile et un peu de formyl-5 uracile par chauffage de la solution. Ce dernier produit s'obtient de manière quantitative quand on évapore l'hydroperoxyméthyl-5 uracile en présence de méthanol soit par un processus d'élimination avec formation de carbonyle, soit par une transposition nucléophile intramoléculaire.

L'hydroperoxy-5 dihydrothymine donne de manière quantitative de l'hydroxy-5 dihydrothymine alors que la décomposition des deux formes isomères de l'hydroperoxy-6 dihydrothymine conduit à la formation "d'hydrates" qui sont instables et qui par déshydratation donnent de la thymine.

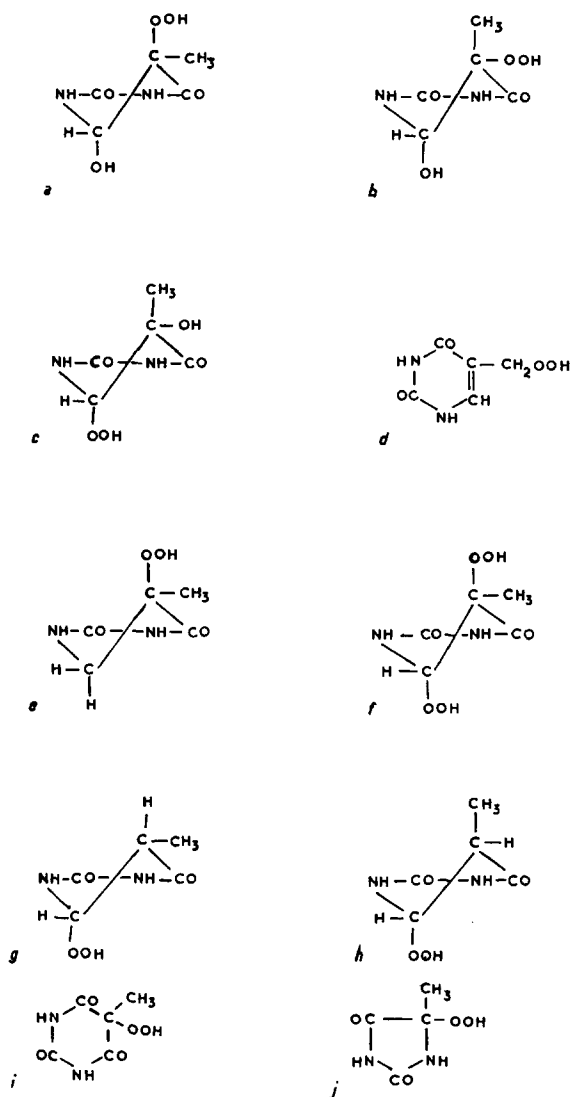


Fig. 1. Peroxydes formés au cours de l'action du rayonnement  $\gamma$  sur la thymine en solution aqueuse aérée. (conformations préférentielles dans le diméthylsulfoxyde, déduites des spectres de RMN.)

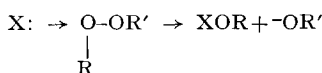
- a = hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans*
- b = hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis*
- c = hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine *cis*
- d = hydroperoxyméthyl-5 uracile
- e = hydroperoxy-5 dihydrothymine
- f = dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *trans*
- g = hydroperoxy-6 dihydrothymine *cis*
- h = hydroperoxy-6 dihydrothymine *trans*
- i = acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique
- j = hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne

L'hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne est très stable en solution; par chauffage il conduit à l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne.

L'acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique se décompose en acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique et donne d'autres dérivés provenant de la décomposition de ce dernier.

### (2) Action des réducteurs

L'hétérolyse de la liaison oxygène-oxygène peut être provoquée par substitution nucléophile intermoléculaire suivant le mécanisme  $SN_2$  (au niveau de l'oxygène) plutôt que le mécanisme  $SN_1$ .



Avec les composés soufrés tel que le bisulfite de sodium, le diméthylsulfoxyde, le disulfure de diphényle, la réaction est lente ou bien s'effectue en milieu alcalin. Dans ces conditions, les produits de réduction ne représentent qu'une faible partie des composés de dégradation.

La réduction avec  $H_2S$  à température ordinaire est par contre généralement très rapide et d'une excellente stéréospécificité; cependant, l'hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne est particulièrement résistant et le traitement doit être poursuivi plus longtemps.

On obtient pour tous les peroxydes, l'alcool de configuration correspondante avec peu de produits de décomposition. Il faut cependant faire une exception pour les hydroxy-6 dihydrothymine, le milieu acide dû à la présence de  $H_2SO_4$  entraînant une déshydratation rapide de ces  $\beta$ -cétols.

La réduction avec KI est donc préférable pour ces deux dernières substances. Il est nécessaire d'apporter à la solution si l'on a affaire à une quantité relativement importante de peroxyde, la quantité stoechiométrique de  $H^+$  indispensable à la réaction par l'intermédiaire d'un acide organique faible.

A partir de l'hydroperoxy-6 dihydrothymine *cis* on obtient l'hydroxy-6 dihydrothymine *cis*. De même à partir du peroxyde on obtient l'isomère *trans*.

### (3) Remarque

La connaissance de l'alcool dérivé est un excellent moyen pour accéder à celle de l'hydroperoxyde initial. Cependant, dans le cas des hydroxy-(5 ou 6) hydroperoxy-6 ou 5) dihydrothymine, on peut aisément déterminer la forme stérique (*cis* ou *trans*) de l'hydroperoxyde mais non la position sur le cycle du groupement hydroperoxydique c'est ce que montre le schéma suivant dans lequel les principales voies de dégradation sont rassemblées.

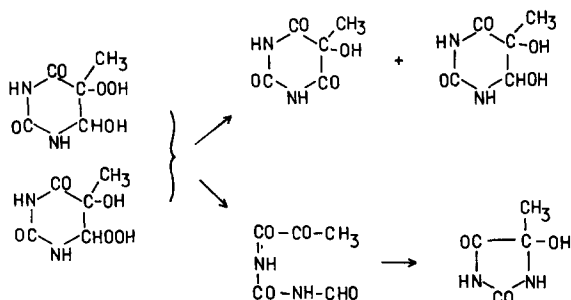


Fig. 2. Dégradation des hydroperoxy-(5 ou 6) hydroxy-(6 ou 5) dihydrothymine.

Quelques dosages ont été effectués. On laisse les peroxydes (1  $\mu$ g) marqués  $^{14}\text{C}$  à température ordinaire dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau, pendant 24 heures (Tableau I).

TABLEAU I  
Pourcentage des produits de dégradation des principaux peroxydes

| <i>Peroxydes</i>                                       | <i>Glycol<br/>trans</i> | <i>Glycol<br/>Cis</i> | <i>Formyl-N<br/>pyruvyl-N'<br/>urée</i> | <i>Hydroxy-5<br/>méthyl-5<br/>hydantoïne</i> | <i>Acide<br/>hydroxy-5<br/>méthyl-5<br/>barbiturique</i> | <i>Acétylurée</i> |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------|
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6<br>dihydrothymine <i>trans</i> | 59                      | 0.3                   | 27                                      | 3.5                                          | 4                                                        | 1.5               |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6<br>dihydrothymine <i>cis</i>   | 0.2                     | 43                    | 24.7                                    | 7.5                                          | Traces                                                   | —                 |
| Hydroperoxy-6 hydroxy-5<br>dihydrothymine <i>cis</i>   | 3                       | 72.7                  | 15                                      | 3.9                                          | 4.2                                                      | —                 |

### Synthèse des peroxydes

L'identification complète des différents hydroperoxydes, notamment celle des hydroperoxy-(5 ou 6) hydroxy-(6 ou 5) dihydrothymine et celle des hydroperoxy-6 dihydrothymine, repose sur la synthèse chimique. Certaines des méthodes décrites s'inspirent des travaux d'EKERT ET MONIER<sup>3</sup> et LATARJET *et al.*<sup>16</sup>.

#### (1) Préparation des produits intermédiaires de synthèse

(a) La bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine de forme *cis* est obtenue à partir de son isomère *trans*: 30 mg de bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine sont dissous dans 3 ml d'eau tamponnée à pH 9 avec du  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ; cette solution est chauffée 0.5 h à 100°. Il y a formation de dihydroxy-5,6 dihydrothymine de formes *cis* et *trans* et de bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis* avec un rendement variable (2–25 %).

(b) L'acide bromo-5 méthyl-5 barbiturique est préparé à partir de la bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine de forme *trans*: 25 mg de bromhydrine sont mis en contact avec 50  $\mu\text{l}$  de brome dans 50 ml pendant 15 h; le rendement est voisin de 50 %. Il a été obtenu, par ailleurs, selon la méthode de DOUMAS ET BIGGS<sup>20</sup>.

(c)  $\text{H}_2\text{O}_2$  réagit en milieu acide sur la bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* par une réaction qui est probablement du type  $\text{S}_{\text{N}}1$  catalysée par les protons: 450 mg de bromhydrine *trans* sont dissous dans 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 110 vol. auxquels 400  $\mu\text{l}$  de HCl sont additionnés; après 48 h d'agitation à température ambiante le mélange est évaporé à sec. On recueille pratiquement quantitativement la bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine *trans*.

(d) Il est plus difficile d'obtenir l'isomère *cis* de ce même peroxyde en raison principalement de son instabilité configurationnelle en solution. Il est cependant possible de le synthétiser à partir de la bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis* mais il est nécessaire d'opérer sur un temps plus court et, par conséquent, sur des solutions plus diluées. Le peroxyde n'a pu être obtenu à l'état pur à cause de la présence de bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* qui présente des valeurs de  $R_F$  voisines (Tableau IIa).

#### (2) Peroxydes dérivés de la thymine

(a) Synthèse globale. L'action de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur la thymine à pH 6 en présence de  $\text{OsO}_4$  conduit en partie au schéma proposé par EKERT ET MONIER<sup>3</sup>.

En milieu acide, à côté de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine de forme *trans* (15–20 %) et de forme *cis* (12–15 %), de l'hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine (3–4 %), il faut noter la présence de l'hydroperoxyméthyl-5 uracile (2–3 %), de la dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *trans* (2–3 %) et de l'acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique (3–4 %) et parfois de traces d'hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne. Il est à remarquer que l'hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine de forme *trans* n'a pas été retrouvée.

Pratiquement, 50 mg de thymine sont dissous à 0° dans 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 55 vol. en présence de  $\text{OsO}_4$ ; on acidifie avec 80  $\mu\text{l}$  de HCl concentré; le mélange réactionnel est agité dans une chambre froide à 4° pendant 8 h, puis évaporé à température ambiante.

(b) Synthèses spécifiques. (i) Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis*. Les voies de synthèse de ce peroxyde peuvent être résumées dans la Fig. 3.

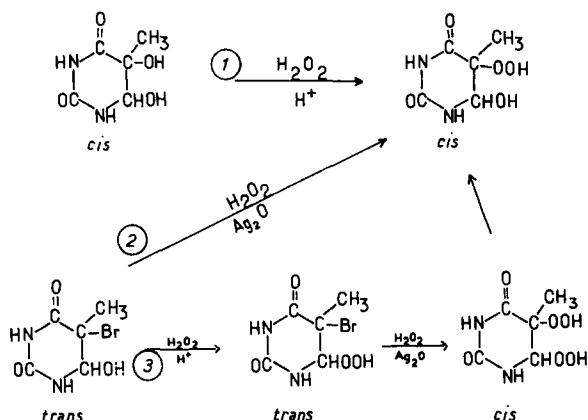


Fig. 3. Synthèse de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis*.

Réaction 1: On laisse reposer 100 mg de glycol *cis* de thymine dissous dans 40 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 110 vol. acidifiés par 150  $\mu$ l de HCl concentré, 24 h à température ambiante; le résidu sec provenant de l'évaporation est chromatographié dans le Solvant A. Le rendement est de 98 %.

Réaction 2: La réaction est du type S<sub>N</sub>2 puisqu'elle s'effectue avec inversion complète de configuration et quelle est sensible au pouvoir nucléophile du réactif: elle est beaucoup plus rapide avec OOH<sup>-</sup> que par attaque de OH<sup>-</sup>.

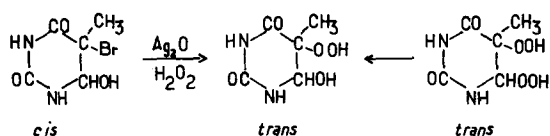
La bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* (11.25 mg) est dissoute dans 0.8 ml d'eau. On ajoute 0.4 ml de tampon citrate de sodium, pH 4.8, 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % et 22.5 mg de Ag<sub>2</sub>O. On laisse 0.5 h la solution en contact à 0°. Le rendement est voisin de 30 %.

Réaction 3: La décomposition du dihydroperoxyde *cis* en solution conduit à la formation de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis* et aux produits de dégradation thermique de ce dernier.

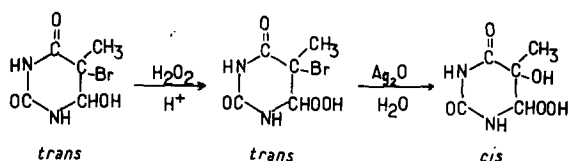
(ii) *Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine trans* (Fig. 4). La dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *trans* se décompose en solution aqueuse pour donner une faible quantité d'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans*; cette transformation peut être suivie en RMN par l'examen des différents spectres enregistrés au cours du temps.

La bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine de forme *cis* traitée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de Ag<sub>2</sub>O donne les deux configurations de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine. La réaction est au moins partiellement du type S<sub>N</sub>2 car il a été montré que, dans les mêmes conditions expérimentales, sans Ag<sub>2</sub>O, une inversion partielle de la bromhydrine *cis* est observée; de plus, l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* tend à se transformer en solution en forme *cis*.

Pratiquement, 3 mg de bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine sont dissous dans 0.2 ml d'eau tamponnée avec 0.1 ml d'une solution de citrate de sodium à pH 4.8. On ajoute 6 mg de Ag<sub>2</sub>O et 0.25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 110 vol. goutte à goutte dans un bain de glace. On laisse reposer 0.5 h sous agitation et on évapore en 5 min à température ordinaire. Le rendement est de 25 %.

Fig. 4. Synthèse de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans*.

(iii) *Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine cis*. Cette substance a été préparée suivant le procédé d'EKERT ET MONIER<sup>8</sup>. L'action de  $\text{Ag}_2\text{O}$  en présence d'eau sur le bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine est lente et de ce fait la réaction ne s'arrête pas au stade du peroxyde puisque ce dernier est instable en solution (Fig. 5).

Fig. 5. Synthèse de l'hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine *cis*.

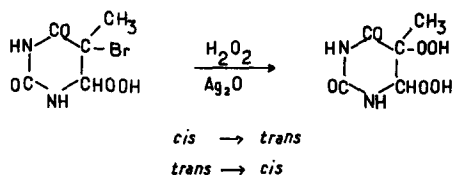
Pratiquement, 11 mg de bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine *trans* sont dissous dans 1.7 ml d'eau et 0.3 ml de tampon citrate à température ordinaire, en présence de 22 mg de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . Après agitation du mélange pendant 4 h à 4°, on centrifuge et on chromatographie le surnageant.

Dans ces conditions favorables, le rendement en hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine *cis* est de 2 %. On note la présence d'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans* qui pourrait apparaître par un mécanisme  $\text{S}_{\text{N}}1$ .

(iv) *Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine trans*. Ce produit n'a pu être obtenu en raison vraisemblablement de son instabilité en solution qui résulte de sa configuration *trans* et de la position du groupement peroxydique sur le cycle.

(v) *Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine cis*. La synthèse est schématisée dans la Fig. 6.

La bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine *trans* est traitée par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , 12 mg de ce peroxyde sont dissous dans 0.8 ml d'eau tamponnée avec du citrate de sodium (0.4 ml) à pH 4.8. On ajoute à 4° 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 110 vol. et le mélange est agité pendant 10 min à 4°. Par chromatographies successives avec dépôts linéaires, ce produit est obtenu avec un rendement de 5-6 %.

Fig. 6. Synthèse des dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *cis* et *trans*.

(vi) *Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine trans*. La préparation de ce produit est calquée sur le processus ci-dessus à partir de la bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine *cis* (cf. Fig. 6).

(vii) *Hydroperoxy-6 dihydrothymine cis et trans*. L'hydroxy-6 dihydrothymine de forme *cis* (méthyl par rapport à OH) en présence de  $H_2O_2$  donne quantitativement l'hydroperoxy-6 dihydrothymine avec environ 60 % de forme *cis* et 40 % de forme *trans* selon un mécanisme vraisemblablement  $S_N1$  (Fig. 7).

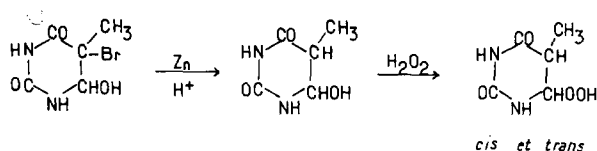


Fig. 7. Synthèse de l'hydroperoxy-6 dihydrothymine *cis et trans*.

Ainsi on laisse reposer pendant 3 h à température ambiante 100 mg d'hydroxy-6 dihydrothymine *cis* en présence de 100 ml de  $H_2O_2$  à 55 vol. et 400  $\mu$ l de HCl concentré. Après évaporation les deux isomères de l'hydroperoxy-6 dihydrothymine sont séparés par chromatographie dans le Solvant B sur silice.

(viii) *Hydroperoxy-5 dihydrothymine*. Les essais de synthèse à partir de la bromo-5 dihydrothymine par substitution nucléophile et par action de  $H_2O_2$  sur l'hydroxy-5 dihydrothymine ont échoué. Cependant, ce peroxyde et les deux formes de l'hydroperoxy-6 dihydrothymine ont pu être obtenus par action du rayonnement  $\gamma$  sur une solution aqueuse aérée de dihydrothymine.

(ix) *Acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique*. Nous n'avons pas réussi à peroxyder l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique par le  $H_2O_2$ . Ce peroxyde a pu être préparé en traitant 11.25 mg d'acide bromo-5 méthyl-5 barbiturique dissous dans 0.4 ml de tampon citrate, pH 4.8, et 0.8 ml d'eau par 22.5 mg de  $Ag_2O$  en présence de 1 ml de  $H_2O_2$  à 30 % à 4°. Le mélange réactionnel est agité 10 min puis évaporé et chromatographié. Le rendement est de 30 % (Fig. 8).

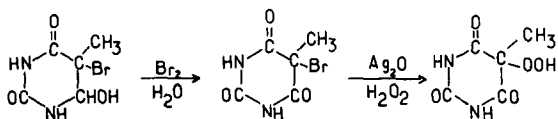


Fig. 8. Synthèse de l'acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique.

(x) *Hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne*. Elle s'obtient en laissant en contact une nuit l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne avec  $H_2O_2$  à 110 vol. acidifiée à pH 1.5. Le rendement est quantitatif.

(xi) *Hydroperoxyméthyl-5 uracile*. L'hydroxyméthyl-5 uracile (200 mg) est traitée par 80 ml de  $H_2O_2$  en présence de 300  $\mu$ l de HCl. On laisse 48 h en contact, puis on évapore et on soumet le résidu à l'analyse chromatographique dans le Solvant B. Le rendement est de 30 %.

*Propriétés chromatographiques*

Quand on compare la position des peroxydes par rapport à celle de l'alcool correspondant sur silice MN-S-HR dans le couple de solvants: chloroforme-méthanol-eau (4 : 2 : 1, v/v/v) dans le 1<sup>er</sup> sens (axe des ordonnées) et acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75 : 16 : 9, v/v/v) dans le 2<sup>ème</sup> sens (axe des abscisses) on constate que le peroxyde est situé à droite et légèrement plus haut que le composé hydroxylé, cette différence est accentuée pour les dihydroperoxydes.

Les valeurs rassemblées dans le Tableau II ont été obtenues à partir d'une même chromatographie bidimensionnelle pour avoir un ensemble cohérent en raison des variations importantes de  $R_F$  observées sur silice. Cependant, la position relative des différents produits est généralement conservée.

TABLEAU IIa

 $R_F$  DES ALCOOLS ET DES PEROXYDES

| Substance                                           | $R_F$       |           |
|-----------------------------------------------------|-------------|-----------|
|                                                     | Solvant A * | Solvant B |
| Dihydroxy-5,6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 0.34        | 0.30      |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>   | 0.38        | 0.43      |
| Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine <i>cis</i>   | 0.38        | 0.52      |
| Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine <i>cis</i>         | 0.41        | 0.60      |
| Dihydroxy-5,6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 0.30        | 0.45      |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i> | 0.36        | 0.70      |
| Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine <i>trans</i>       | 0.40        | 0.83      |
| Hydroxyméthyl-5 uracile                             | 0.42        | 0.32      |
| Hydroperoxyméthyl-5 uracile                         | 0.50        | 0.58      |
| Hydroxy-5 dihydrothymine                            | 0.54        | 0.43      |
| Hydroperoxy-5 dihydrothymine                        | 0.60        | 0.65      |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>                 | 0.57        | 0.55      |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 0.63        | 0.69      |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>               | 0.57        | 0.55      |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 0.66        | 0.71      |
| Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne                       | 0.53        | 0.74      |
| Hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne                   | 0.56        | 0.81      |
| Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique               | 0.55        | 0.68      |
| Acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique           | 0.59        | 0.87      |
| Bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>       | 0.71        | 0.89      |
| Bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>   | 0.75        | 0.95      |
| Bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>         | 0.65        | 0.84      |
| Bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>     | 0.68        | 0.89      |

\* 2 migrations successives. On ajoute parfois 1 % de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

TABLEAU IIb

 $R_F$  DES AUTRES SUBSTANCES DANS LE MÊME SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE

| Substance                | $R_F$     |           |
|--------------------------|-----------|-----------|
|                          | Solvant A | Solvant B |
| Thymine                  | 0.78      | 0.63      |
| Urée                     | 0.34      | 0.20      |
| Dihydro-5,6 thymine      | 0.80      | 0.57      |
| Acétylurée               | 0.79      | 0.70      |
| Formylurée               | 0.73      | 0.69      |
| Pyruvyl- <i>N</i> ' urée | 0.77      | 0.94      |
| Acide parabanique        | 0.69      | 0.94      |

### Analyses spectrographiques

#### (1) Spectrométrie RMN

Les spectres RMN de quelques hydroperoxydes ont été décrits<sup>27</sup> et ils ont servi à élucider la structure de composés peroxydiques inconnus<sup>28</sup>.

Récemment, la résonance magnétique nucléaire a été proposée comme méthode de mesure quantitative de la fonction hydroperoxyde. Dans les exemples cités dans la littérature, à 60 mégacycles, on observe un déplacement chimique vers les faibles champs du signal porté par le carbone contigu à la fonction hydroperoxydique (carbone en  $\alpha$ ) de l'ordre de 20 Hz par rapport à la position qu'il occupait pour l'alcool; pour les protons en  $\beta$  le déplacement est compris entre 1 et 4 Hz<sup>29</sup>.

Dans le cas présent, pour les hydroperoxy- (5 ou 6) hydroxy- (6 ou 5) dihydrothymine, la situation est beaucoup plus compliquée que pour une chaîne aliphatique simple; un rapide examen du Tableau III suffit à le montrer et il n'est pas possible dans

TABLEAU III

SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DANS LE DIMÉTHYLSULFOXYDE DES HYDROPEROXYDES ET DES ALCOOLS DÉRIVÉS—VALEURS DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES

Spectres enregistrés sur un appareil Varian A 60; 60 mégacycles. Référence interne: triméthylsilane.

| Nature de la substance                              | $\nu H(CH_3)$ | $\nu H_6$ | $\nu H_7$ | $\nu H_1$ |
|-----------------------------------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| Dihydroxy-5,6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 76            | 262       |           | 480       |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>   | 80            | 273       |           | 491       |
| Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine <i>cis</i>   | 80            |           |           |           |
| Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine <i>cis</i>         | 84            | 280       |           | 493       |
| Dihydroxy-5,6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 76            | 261       |           | 477       |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i> | 80            | 277       |           | 496       |
| Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine <i>trans</i>       | 86            | 290       |           | 505       |
| Hydroxyméthyl-5 uracile                             |               | 430       | 245       |           |
| Hydroperoxyméthyl-5 uracile                         |               | 447       | 267       |           |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>                 | 63            | 280       |           | 480       |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 66            | 291       |           | 505       |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>               | 66            | 272       |           | 476       |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 70            | 283       |           | 507       |
| Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne                       | 82            |           |           | 497       |
| Hydroperoxy-5 méthyl-4 hydantoïne                   | 82            |           |           | 506       |
| Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique               | 87            |           |           |           |
| Acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique           | 87.5          |           |           |           |
| Bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>       | 107           | 286       |           | 509       |
| Bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>   | 113.5         | 308       |           | 515       |

les limites de nos conditions expérimentales de déterminer à partir de la valeur du déplacement chimique du méthyle ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) la position 5 ou 6 du groupement hydroperoxydique. Quoiqu'il en soit la similitude des spectres entre le produit hydroxylé et son peroxyde fournit des informations de structure très intéressantes. Elle apporte une confirmation supplémentaire aux formules proposées (voir Tableaux III et IV).

Tous nos spectres RMN ont été enregistrés dans le diméthylsulfoxyde avec le triméthylsilane comme référence interne. La RMN permet de suivre la cinétique de formation des substances de dégradation des peroxydes à 30° dans le diméthylsulfoxyde. Ainsi la pyruvyl-*N* formyl-*N'* urée apparaît par décomposition de l'hydro-

TABLEAU IV

SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE ENREGISTRÉS DANS LE DIMÉTHYLSULFOXYDE — VALEURS APPROXIMATIVES DES CONSTANTES DE COUPLAGE

Spectres enregistrés sur un appareil Varian A 60; 60 mégacycles. Référence interne: triméthylsilane.

| Nature de la substance                              | $JH(CH_3)-H_5$ | $JH_5-H_6$ | $JH_1-H_6$ |
|-----------------------------------------------------|----------------|------------|------------|
| Dihydroxy-5,6 dihydrothymine <i>cis</i>             |                |            | 4.9        |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>   |                |            | 4.5        |
| Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i> |                |            | 4.5        |
| Hydroxyméthyl-5 uracile                             |                |            | 5.7        |
| Hydroperoxyméthyl-5 uracile                         |                |            | 5.5        |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>                 | 6.9            | 3.7        | 3.6        |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 7.2            | 4.9        | 4.5        |
| Hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>               | 7.2            | 2.2        | 3.7        |
| Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 7.5            | 1.5        | 4          |
| Bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>       |                |            | 5          |
| Bromo-5 hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>   |                |            | 4.5        |

peroxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans*; elle se caractérise par son signal méthyle à 100 Hz et un singulet dû au groupement formyle à 534 Hz. Le produit principal est le glycol de thymine qu'on peut identifier grâce au singulet du méthyle à 76 Hz alors que le peroxyde initial présentait une résonance à 80 Hz; on remarque aussi des traces d'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique qui donnent un singulet de faible amplitude à 87 Hz.

Un autre exemple intéressant est celui de la décomposition du dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *trans*. On observe tout d'abord la formation de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *trans*; au fur et à mesure que s'estompent les signaux du dihydroperoxyde, on voit apparaître la dihydroxy-5, 6 dihydrothymine *trans* et la formyl-*N* pyruvyl-*N'* urée; après décomposition totale des deux peroxydes, les différents signaux observés correspondent à ceux du glycol et du diuride qui ne peut pas se recycler en hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne dans le diméthylsulfoxyde en absence d'eau.

La valeur élevée de la constante de couplage  $JH_6-H_1$  qui est comprise entre 3.6 et 4.9 Hz (Tableau IV) nous montre<sup>13</sup>, que dans le diméthylsulfoxyde, le proton porté par le carbone 6 est préférentiellement dans une position pseudoéquatoriale.

## (2) Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge des divers peroxydes présentent une grande analogie avec les spectres des alcools correspondants sauf en ce qui concerne la zone des vibrations de valence C—O qui est peu exploitable. La vibration d'allongement de la liaison O—O est difficilement perceptible.

Pour l'hydroperoxyméthyl-5 uracile, la présence de deux bandes d'absorption à 1450–1375  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des vibrations symétriques et asymétriques des déformations du groupement méthylénique.

## (3) Spectrographie de masse

Le mode de fragmentation des hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine *cis* et *trans* rappelle celui du glycol de la thymine. Cependant, le processus de dégradation à partir de  $(M+H)^+$  n'apparaît pas<sup>42</sup>.

### Dosages des peroxydes formés sous rayonnement

Les peroxydes marqués<sup>14</sup>, dérivant de la [<sup>14</sup>C]thymine soumise au rayonnement ont été dosés par comptage de la radioactivité. Les différents peroxydes se forment en quantités très inégales. Les valeurs de *G* rassemblées dans le Tableau V sont données à titre indicatif pour une solution de thymine de concentration  $2 \cdot 10^{-3}$  M et de pH 5, soumise à un flux  $\gamma$  de 9000 rads/min pendant 1 h.

TABLEAU V

| Substance                                              | <i>G</i> |
|--------------------------------------------------------|----------|
| a. Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>trans</i> | 0.83     |
| b. Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>   | 0.31     |
| c. Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine <i>cis</i>   | 0.08     |
| d. Hydroperoxyméthyl-5 uracile                         | 0.047    |
| e. Hydroperoxy-5 dihydrothymine                        | 0.062    |
| f. Dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine <i>trans</i>       | 0.009    |
| g. Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>cis</i>             | 0.027    |
| h. Hydroperoxy-6 dihydrothymine <i>trans</i>           | 0.028    |
| i. Hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne                   | 0.005    |
| j. Acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique           | 0.011    |

Il est à noter que ces deux dernières substances et la dihydroperoxy-5,6 dihydrothymine *trans* ne se forment qu'en milieu acide. Dans les solutions dont le pH est voisin de la neutralité les sept autres peroxydes sont obtenus en quantité plus faible avec des *G* de formations variables suivant l'irradiation; mais l'importance relative de ces produits est conservée.

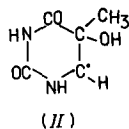
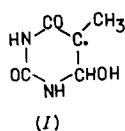
### DISCUSSION

#### Nature des radicaux dont dérivent les peroxydes

Certains radicaux thymyle mis en évidence par les travaux de RPE ou de radio-lyse pulsée peuvent être les produits transitoires qui après stabilisation par réaction successive très rapide avec O<sub>2</sub> puis avec les espèces réductrices e<sup>-</sup> ou H, et H<sup>+</sup> conduisent à la formation des peroxydes.

#### (I) Hydroperoxy-(5 ou 6) hydroxy-(6 ou 5) dihydrothymines

L'action de l'eau oxygénée en présence de Ti<sup>3+</sup>, véritable agent radiomimétique sur la thymine en solution aqueuse conduit à la formation de deux types de radicaux hydroxydihydrothymyle (I) et (II)<sup>30,31</sup>.



Le site d'attaque préférentiel par les radicaux OH semble être le carbone-6 qui présente un indice de valence libre plus élevé que le carbone-5.

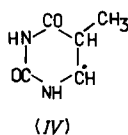
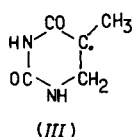
EKERT ET MONIER<sup>3</sup> en isolant les deux formes isomères de l'hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydrothymine avaient déjà obtenu ce résultat. L'existence du radical (II) avait pu être supposée en milieu désaéré après l'isolement de l'hydroxy-5 dihydrothymine.

L'identification de l'hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine *cis* en milieu aéré confirme en grande partie les données de RPE bien que le rapport de la concentration des deux types de radicaux ne soit pas égal à celui des peroxydes correspondants. L'ordre d'importance est conservé et il faut tenir compte de la stabilité des hydroperoxydes, expliquant l'absence de l'hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydrothymine *trans* dans les produits de radiolyse et sa difficulté à le synthétiser.

(2) *Hydroperoxy-(5 ou 6) dihydrothymines*

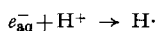
L'action du rayonnement  $\gamma$  et ultra-violet sur la thymine en milieu solide conduit à la formation du radical dihydrothymyle-5 (III)<sup>32,33</sup>. La même observation a pu être faite après bombardement de cette base pyrimidique par des atomes d'hydrogène ou de deutérium<sup>35-37</sup>.

Plus récemment, HENRIKSEN ET SNIPES<sup>38</sup> dans des conditions d'irradiation semblables ont émis l'hypothèse de la formation d'un radical dihydrothymyle-6 (IV).



Les travaux de radiolyse pulsée sur la thymine en solution aqueuse non aérée montrent l'existence de radicaux dihydrothymyle; une espèce transitoire présentant une absorption à 400 nm pourrait correspondre au radical III<sup>39</sup>.

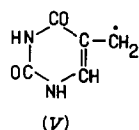
LOMAN ET BLOK<sup>40</sup> ont pu par l'action de compétiteurs calculer la constante de vitesse de réaction des atomes d'hydrogène avec la thymine ( $8 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) qui est inférieure à celle du radical OH ( $4 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ). En raison de la présence d'oxygène dans le milieu ( $1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) et qui réagit très rapidement avec H ( $2.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ), une faible partie des radicaux H• va participer à l'homolyse de la double liaison 5-6. Il faut souligner qu'en milieu acide l'importance quantitative des dihydroperoxydes correspondants est plus grande en raison de la transformation partielle de  $e_{aq}^-$  en H• suivant l'équation:



L'attaque radicalaire par les atomes d'hydrogène semble se produire de manière plus spécifique en position 5.

(3) *Hydroperoxyméthyl-5 uracile*

En irradiant un cristal de thymidine, PRUDEN *et al.*<sup>41</sup> ont mis en évidence la formation d'un radical résultant du départ d'un atome d'hydrogène du méthyle juxtanucléaire. De même HUTTERMANN<sup>42</sup> émet l'hypothèse de l'existence du radical (uracyl-5) méthyle (V) formé par irradiation du monohydrate de thymine.



En milieu aqueux aéré, la formation de ce radical résulte vraisemblablement de l'attaque des radicaux H et OH.

## CONCLUSION

L'irradiation de la thymine en milieu aqueux aéré conduit à pH 6.5 à la formation de sept peroxydes dont les caractéristiques chimiques, spectroscopiques et chromatographiques ont pu être précisées. La synthèse chimique confirme ces résultats. En milieu acide il apparaît trois peroxydes supplémentaires dont la structure a aussi été déterminée.

Plusieurs modes de peroxydation, en accord avec les résultats de RPE et de radiolyse pulsée, ont pu être ainsi proposés.

Il faut souligner par ailleurs la stéréospécificité partiellement *trans* de l'addition de O<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub><sup>-</sup> sur le radical hydroxy-6 dihydrothymyle-5.

## RÉSUMÉ

1. Les modifications chimiques du DNA résultant de l'action des radiations ionisantes jouent un rôle important en radiobiologie. Les peroxydes formés par irradiation  $\gamma$  de la thymine en milieu aqueux aéré sont les produits primaires de réaction. Leurs structures chimiques étaient en grande partie inconnues; elles ont été déterminées au cours de ce travail.

2. Nous avons pu identifier les hydroperoxydes suivant:

Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine *trans*

Hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine *cis*

Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine *cis*

Hydroperoxyméthyl-5 uracile

Hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine

Hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymine *cis*

Hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymine *trans*

Dihydroperoxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans*

Hydroperoxy-5 méthyl-5 hydantoïne

Acide hydroperoxy-5 méthyl-5 barbiturique

3. La mise au point de nouveaux systèmes de solvants en chromatographie sur couche mince a permis de séparer ces composés. Par décomposition des peroxydes, les alcools correspondants ainsi que d'autres produits de dégradation sont obtenus.

4. Les différentes méthodes de synthèse de ces peroxydes marqués au <sup>14</sup>C sont décrites. Une nouvelle voie générale d'obtention de ces peroxydes utilisant l'action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les dérivés halogénés de la thymine en présence Ag<sub>2</sub>O a été trouvée.

5. Les analyses spectrales (ultra-violet, infra-rouge, RMN, spectrométrie de masse) permettent de définir la configuration et parfois la conformation des produits. Les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage obtenus par spectrométrie RMN sont données.

6. La formation et la décomposition des peroxydes ont été mesurées par comptage de radioactivité  $^{14}\text{C}$ .

7. Les peroxydes obtenus à pH 7 résultent de l'action de l'oxygène sur cinq radicaux différents:

Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymyle-6

Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymyle-5

(Uracyl-5) méthyle

Dihydro-5,6 thymyle-5

Dihydro-5,6 thymyle-6

L'isolement des peroxydes fournit la preuve de l'existence de ces radicaux qui avaient été décelés dans d'autres conditions expérimentales par spectrométrie RPE.

L'addition de  $\text{O}_2$  ou  $\text{O}_2^-$  sur le radical hydroxy-6 dihydro-5,6 thymyle-5 s'effectue préférentiellement en *trans*

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme S. Georges pour sa très importante collaboration technique.

Nos remerciements vont aussi à M. le Professeur Rinalde, Mme L. Voituriez et Mlle F. Pouchot.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. WEISS, dans M. HAISSINSKY, *Actions Chimiques et Biologiques des Radiations, Les Peroxydes Organiques en Radiobiologie*, 4<sup>e</sup> Série Masson, Paris, 1958, p. 44.
- 2 D. BARSZCZ ET D. SHUGAR, *Acta Biochim. Polon.*, 8 (1961) 455.
- 3 B. EKERT ET R. MONIER, *Nature*, 184 (1959) BA 58.
- 4 B. EKERT, *Nature*, 188 (1960) 309.
- 5 C. NOFRE ET A. CIER, *Bull. Soc. Chim.*, 4 (1966) 1326.
- 6 N. M. KHATTAK ET J. H. GREEN, *Intern. J. Radiation Biol.*, 11 (1966) 577.
- 7 V. DRASIL ET L. RYZNAR, *Biochim. Biophys. Acta*, 166 (1968) 600.
- 8 E. BARROW, P. JOHNSON ET A. CORBURE, *Radiation Res.*, 1 (1954) 410.
- 9 M. DANIELS, G. SCHOLES, J. WEISS ET C. M. WHEELER, *J. Chem. Soc.*, (1957) 226.
- 10 R. TEOULE, Thèse de Doctorat ès Sciences, Lyon, No. 667, 1970.
- 11 N. P. KRUSHINSKAYA, *Radiobiologiya*, 5 (1965) 645.
- 12 D. BARSZCZ, Z. TRAMER ET D. SHUGAR, *Acta Biochim. Polon.*, 10 (1963) 9.
- 13 C. NOFRE, Thèse de Doctorat ès Sciences, Lyon, 1968, No. 498, p. 29.
- 14 V. DRASIL ET L. RYZNAR, *Biophys. Aspects Radiation Qual. Rept. Vienna*, (1967-68) 17.
- 15 O. BAUDISCH ET D. DAVIDSON, *J. Biol. Chem.*, 64 (1925) 233.
- 16 R. LATARJET, B. EKERT, S. APELGOT ET N. REBEYROTTE, *J. Chim. Phys.*, 58 (1961) 1046.
- 17 C. NOFRE ET M. H. OGIER, *Compt. Rend., Sér. C*, 263 (1966) 1401.
- 18 R. TEOULE ET J. CADET, *Intern. J. Applied Radiation Isotopes*, 22 (1971) sous presse.
- 19 C. NOFRE, A. CIER, R. CHAPURLAT ET J. P. MARESCHI, *Bull. Soc. Chim.*, (1965) 332.
- 20 B. DOUMAS ET H. G. BIGGS, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2306.
- 21 R. E. CLINE, R. M. FINK ET K. FINK, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2521.
- 22 S. MURAHASHI, H. YUKI, K. KOSAI ET F. DOURA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 39 (1966) 1559.
- 23 R. TEOULE ET J. CADET, *Compt. Rend., Sér. C*, (1970) 362.

- 24 H. FRICKE, *Am. J. Roentgenol.*, 18 (1969) 430.
- 25 R. TEOULE ET J. CADET, *J. Chromatog.*, 43 (1969) 368.
- 26 A. G. DAVIES, *Organic Peroxides*, Butterworths, London, 1961.
- 27 A. G. DAVIES, D. G. HARE ET R. F. M. WHITE, *J. Chem. Soc.*, (1960) 1040.
- 28 W. F. BRILL, *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (1965) 3286.
- 29 G. A. WARD ET R. D. MAIR, *Anal. Chem.*, (1959) 538.
- 30 M. G. ORMEROD ET B. B. SINGH, *Intern. J. Radiation Biol.*, 10 (1966) 533.
- 31 C. NICOLAU, M. MACMILLAN ET R. O. C. NORMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 413
- 32 A. SHIELDS ET W. GORDY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 269.
- 33 P. PERSHAN, R. G. SHULMAN, B. J. WYLUDA ET J. EISINGER, *Physics*, 1 (1964) 163.
- 34 P. PERSHAN, R. G. SHULMAN, B. J. WYLUDA ET J. EISINGER, *Science*, 148 (1968) 378.
- 35 H. C. HELLER ET T. COLE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1486.
- 36 J. N. HERAK ET W. GORDY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1287.
- 37 D. E. HOLMES ET L. S. MYERS, *Nature*, 209 (1966) 1017.
- 38 T. HENDRIKSEN ET W. SNIPES, *Rept. UCRL*, 19298 (1969).
- 39 L. S. MYERS JR. ET L. M. THEARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 92 (1970) 2868.
- 40 H. LOMAN ET J. BLOK, *Radiation Res.*, 36 (1968) 1.
- 41 B. PRUDEN, W. SNIPES ET W. GORDY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53 (1965) 917.
- 42 J. HUTTERMANN, *Intern. J. Radiation Biol.*, 17 (1970) 249.
- 43 J. ULRICH, R. TEOULE, R. MASSOT ET A. CORNU, *Organic Mass Spectrometry*, Vol. 2, 1969, p. 1183.

*Biochim. Biophys. Acta*, 238 (1971) 8-26