

SYNTHÈSE DES 5-MÉTHOXYMÉTHYL  
ET 5-ÉTHOXYMÉTHYL-DESOXYURIDINESS. BRICTEUX-GRÉGOIRE et W. G. VERLY (*Liège*)

## RÉSUMÉ

On a préparé, à partir de désoxyuridine, de la 5-méthoxyméthyl-désoxyuridine et de la 5-éthoxyméthyl-désoxyuridine. La pureté de ces produits a été démontrée par chromatographie sur papier dans deux systèmes différents, par un dosage des groupements alkoxyle, par la mise en évidence du désoxyribose et, enfin, par réduction catalytique en thymidine.

L'étude de l'action biologique des analogues de la thymidine suscite un grand intérêt. Certains de ces produits empêchent la biosynthèse de l'ADN (acide désoxyribonucléique), tandis que d'autres (comme la 5-bromo-désoxyuridine; Freese<sup>(1)</sup>), sont incorporés dans la macromolécule dont ils peuvent modifier la fonction; ces derniers sont des agents mutagènes. Quelques-unes de ces substances pourraient être utiles en chimiothérapie anticancéreuse et c'est la raison pour laquelle nous avons entrepris la synthèse de la 5-méthoxyméthyl-désoxyuridine (5-MMDU) et de la 5-éthoxyméthyl-désoxyuridine (5-EMDU).

Le point de départ de ces synthèses est la désoxyuridine (DU), produit de condensation de l'uracile et du désoxyribose. La désoxyuridine est d'abord transformée en son dérivé 5-hydroxyméthylrique (5-HMDU), lequel est ensuite étherifié par l'alcool approprié (voir fig. 1).

Pour préparer la 5-HMDU, Cline, Fink et Fink<sup>(2)</sup> font réagir la désoxyuridine avec la formaldéhyde, en présence d'acide chlorhydrique 3 N, à 50°C, pendant 4 jours. Ils isolent alors la 5-HMDU par chromatographie sur colonne de Dowex I et élution au moyen de HCl très dilué. Green, Barner et Cohen<sup>(3)</sup> réalisent la réaction de condensation entre la DU et la formaldéhyde en tube scellé, en présence de HCl très dilué, à 100°C, pendant 24 heures. La 5-HMDU est isolée par chromatographie

(1) E. FREESE, *J. Mol. Biol.*, **1**, 87 (1959).

(2) R. E. CLINE, R. M. FINK et K. FINK, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2521 (1959).

(3) M. GREEN, H. D. BARNER et S. S. COHEN, *J. Biol. Chem.*, **228**, 621 (1957).



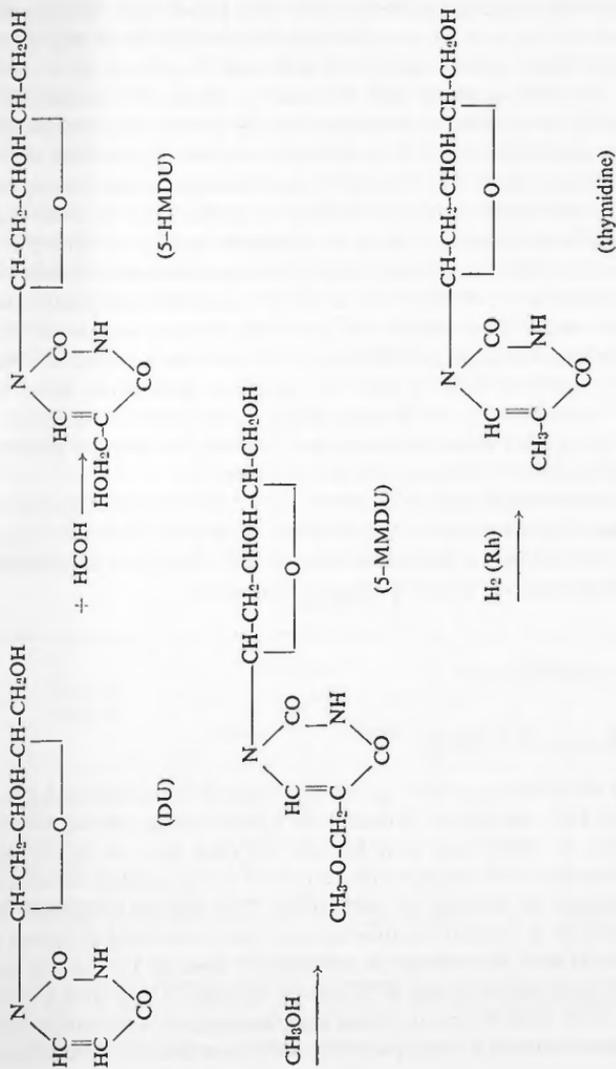


Fig. 1 — Schéma général des réactions.

préparative sur papier. Des deux méthodes, c'est la seconde qui nous a donné le meilleur rendement, à condition cependant de ne jamais dépasser 100°C; après 24 heures, la solution est colorée en jaune, alors qu'elle était brun très foncé par la méthode de Cline, Fink et Fink. En essayant de séparer directement les produits de la réaction par chromatographie sur papier, nous avons toujours été gênés par la présence de formaldéhyde. Nous avons résolu cette difficulté en séparant la formaldéhyde des produits de la réaction sur une colonne de Dowex I, sans essayer de recueillir séparément la DU et la 5-HMDU (en effet, la séparation chromatographique selon Cline et al. <sup>(2)</sup>, qui est extrêmement longue, ne nous a jamais donné un bon rendement en produit pur). La 5-HMDU est ensuite isolée et purifiée par chromatographie préparative sur papier; les papiers révélés en lumière ultra-violette sont découpés, les bandes correspondant à la 5-HMDU sont éluées à l'eau et les éluats réunis sont évaporés sous pression réduite ou lyophilisés. Nous ne sommes jamais parvenus à recristalliser la 5-HMDU, si ce n'est avec un rendement de quelques pour-cent. Pour la suite des synthèses, nous avons utilisé le produit lyophilisé, qui ne donnait qu'une seule tache par chromatographie sur papier dans deux systèmes différents, et dont les caractéristiques spectrales en lumière UV étaient correctes.

Les éthers méthylque et éthylique de la 5-HMDU ont été préparés en se basant sur la méthode que décrivent Cline et al. <sup>(2)</sup> pour les aglucones correspondants, dérivés de l'uracile. Les éthers sont purifiés par chromatographie sur papier à l'échelle préparative.

#### DÉTAILS EXPÉRIMENTAUX

##### 1) *Synthèse de la 5-HMDU*

500 mg de désoxyuridine et 5 ml de solution de formaldéhyde à 35%, 0.08 N en HCl, sont placés dans un tube à paroi épaisse, refroidi dans la carboglace et scellé sous vide. Le tube est placé dans un bain-marie thermostatique dont la température est réglée à 95°C pendant 24 heures. À ce moment, la solution est jaune foncé. Pour éliminer rapidement la formaldéhyde, le contenu du tube est versé sur une colonne de Dowex I (OH) de 11 mm de diamètre et 100 mm de hauteur. La résine a été préalablement régénérée par de la potasse caustique 2 N et lavée à l'eau bouillie. Une série d'anneaux bruns apparaissent dans la colonne qui est lavée abondamment à l'eau, puis éluée à l'aide de HCl 0.012 N; le débit

est assez rapide (1 goutte par seconde) et on recueille des fractions de 10 ml. On prélève de chaque tube une goutte que l'on dépose sur papier; on examine la tache à la lumière UV : toutes les fractions qui contiennent des produits fluorescents sont réunies et évaporées sous pression réduite en évitant de chauffer au delà de 40°C.

Le résidu, dissous dans 2 ml, est placé sur des feuilles de papier Whatman 3 MM de 46 × 49 cm. On dépose 200 µl à la fois, sous la forme d'un trait à 8 cm du bord supérieur du papier; on fait, en plus, d'un côté, un petit trait avec une solution de 5-HMDU témoin. L'éluant est du butanol-1 saturé d'eau, équilibré avec 1% de NH<sub>4</sub>OH concentré (solvant 1). L'éluion, par la méthode descendante, est prolongée pendant 48 heures; à ce moment, le solvant a largement dépassé le bord du papier. Le chromatogramme est examiné en lumière UV : de larges zones fluorescentes correspondent à la 5-HMDU, à la DU et à d'autres produits inconnus. La bande correspondant à la 5-HMDU est découpée de chaque feuille et est éluee à l'eau distillée. Les éluats sont réunis, une fraction aliquote est prélevée et diluée pour mesurer l'absorption à 264 mµ (coefficient d'absorption = 9 600 selon Cline et al. (2)) de façon à calculer la quantité de produit, puis la solution est lyophilisée. Le rendement, basé sur la mesure de l'absorption, était de 39 et 44% dans deux synthèses successives à partir d'environ 500 mg de désoxyuridine.

Le produit lyophilisé a été contrôlé par chromatographie sur papier dans le solvant 1 et le solvant 2 (butanol-2 saturé d'eau). Il ne donnait

TABLEAU I

Nom du produit	Solvant 1		Solvant 2	
	Avant	Après	Avant	Après
5-HMDU	0.42	1.04	0.55	0.73
5-MMDU	0.72	1.03	0.70	0.73
5-EMDU	1.08	1.04	0.80	0.74
thymidine	1.00	1.02	0.73	0.73

Rf des quatre désoxyribosides dans les solvants 1 et 2, avant et après hydrogénation.

Solvant 1 = butanol-1 saturé d'eau, équilibré avec 1% de NH<sub>4</sub>OH concentré. L'effluent déborde toujours largement le bord inférieur du papier de sorte que les Rf sont mesurés par rapport à la tache de thymidine dont la position est prise arbitrairement égale à 1.00.

Solvant 2 = butanol-2 saturé d'eau.

qu'une seule tache fluorescente en lumière UV (voir les Rf dans le tableau I) et une très légère fluorescence verte à la ligne de départ.

### 2) Synthèse de la 5-MMDU

356 mg de 5-HMDU sont dissous dans 36 ml de méthanol contenant 0.07 ml de HCl concentré. La solution est portée à ébullition, sur bain-marie, pendant 4.30 heures. Des tentatives de précipitation par addition d'éther et d'éther de pétrole à la solution méthanolique refroidie ont échoué, même après concentration de cette dernière. Finalement la solution est évaporée. Le résidu dissous dans 1 ml d'eau environ, est placé sur 6 feuilles de 46 × 49 cm de papier Whatman 3 MM, sous forme de longs traits à 8 cm du bord supérieur. Le papier est élué, en chromatographie descendante, par du butanol-2 saturé d'eau (solvant 2), pendant 17 heures. La bande principale, révélée en lumière UV, est découpée de chaque feuille et éluée. Les éluats sont réunis et évaporés jusqu'à 1 ou 2 ml, puis lyophilisés; il reste 330 mg d'une poudre blanc-crème.

Ce produit, chromatographié sur papier Whatman 1 dans les solvants 1 et 2, donne une seule tache dont le Rf (voir tableau I) est le même que celui du 5-méthoxyméthyl-uracile synthétisé par Cline et al. (2). Cependant la tache se colore en rose lorsqu'on la vaporise avec une solution de cystéine dans l'acide sulfurique, réaction spécifique des désoxyribosides (Buchanan, (1)). Le microdosage du groupement méthoxyle a donné 95% de la valeur théorique.

### 3) Synthèse de la 5-EMDU

320 mg de 5-HMDU sont chauffés à reflux pendant 24 heures dans 35 ml d'alcool éthylique absolu contenant 0.07 ml de HCl concentré. L'addition d'éther et d'éther de pétrole à la solution éthanolique légèrement concentrée par évaporation, a produit la précipitation d'environ 60 mg d'un produit blanc, difficile à redissoudre dans l'éthanol, que l'on a écarté lorsqu'on s'est aperçu que ce produit n'était pas fluorescent dans l'UV; il ne pouvait donc s'agir de la 5-EMDU. Le surnageant a été évaporé, déposé sur 6 feuilles de papier Whatman 3 MM et chromatographié dans le système butanol-2 saturé d'eau (solvant 2). Sur chaque feuille, la bande principale, située au Rf 0.90, a été découpée et éluée. Les éluats réunis ont été évaporés jusqu'à 1 ou 2 ml, puis lyophilisés.

---

(1) J. G. BUCHANAN, *Nature*, **168**, 1091 (1951).

Le résidu (environ 300 mg) est légèrement jaunâtre. Par chromatographie sur papier Whatman 1 dans les solvants 1 et 2, il ne donne qu'une seule tache visible à l'UV (voir Rf dans tableau I), tache qui donne une réaction positive avec le réactif spécifique des désoxyribosides (Buchanan), (4). Le dosage du groupement éthoxyle a donné 91% de la valeur théorique.

#### 4) Hydrogénation des 5-HMDU, 5-MMDU et 5-EMDU

L'hydrogène, en présence du catalyseur rhodium déposé sur alumine, réduit les groupements 5-hydroxyméthyle, 5-méthoxyméthyle et 5-éthoxyméthyle, en groupements méthyle, lorsque la réduction s'opère dans l'acide acétique à 50%. La 5-HMDU est donc réduite en thymidine.

Pour prouver que les groupements méthoxyle de la 5-MMDU et éthoxyle de la 5-EMDU sont bien fixés en position 5 sur l'anneau pyrimidine, nous avons réduit les deux produits de synthèse par l'hydrogène, en présence de rhodium sur alumine, dans l'acide acétique à 50%, en espérant obtenir de la thymidine.

Environ 5 mg de thymidine, de 5-HMDU, de 5-MMDU et de 5-EMDU sont dissous séparément dans 4 ml d'acide acétique à 50%. On y ajoute 5 mg de catalyseur rhodium sur alumine et on agite en présence d'hydrogène sous une pression légèrement supérieure à une atmosphère. Après 1h30, le catalyseur est éliminé par filtration, la solution est évaporée et le résidu repris dans 0.5 ml d'eau; 5  $\mu$ l sont déposés sur papier Whatman 1, en même temps que des témoins de 50  $\mu$ g de thymidine, de 5-HMDU, de 5-MMDU et de 5-EMDU, et des chromatographies descendantes sont effectuées avec les deux solvants habituels. Comme le montre le tableau I, le Rf de la thymidine ne change pas après hydrogénation, montrant ainsi qu'elle n'est pas réduite, en particulier à l'endroit de la double liaison. Les Rf des produits de réduction de la 5-HMDU, de la 5-MMDU et de la 5-EMDU sont égaux à ceux de la thymidine et nettement différents de ceux des produits avant hydrogénation, dans les deux solvants utilisés (tableau I).

*Laboratoire des Isotopes  
Département de Biochimie  
UNIVERSITÉ DE LIÈGE*

*Communiqué à la Société Chimique de Belgique  
le 18 janvier 1965.*

[Faint paragraph of text]

[Faint paragraph of text]