

1985

7
A

BIBLIOTHEQUE DOCUMENTAIRE

0753.

ANNEE 1984-1985

NOTE DE SYNTHÈSE

présentée par

Marie-Christine LEROY

SUJET

MECANISMES DE RUPTURE

DES DIMERES DE LA THYMINE

D.E.S.S. INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE

ANNEE 1984-1985

NOTE DE SYNTHESE

présentée par

MARIE-CHRISTINE LEROY

SUJET

MECANISMES DE RUPTURE DES DIMERES DE LA THYMINE

Sous la direction de Monsieur PERICHET

Laboratoire de Photochimie Organique Université LYON I



TABLE DES MATIERES

I- REMARQUES PREALABLES SUR LE SUJET.....	p. 1
II- RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
1- Recherche manuelle.....	p. 2
2- Recherche automatisée.....	p. 2
3- Résultats.....	p. 4
III- SYNTHESE	
1- Introduction.....	p. 6
2- Mécanismes de monomérisation photosensibilisée du dimère cis-syn de la thymine	
A- Par les quinones.....	p. 7
B- Par les ions des métaux de transition.....	p. 8
C- Par les amino-acides.....	p. 9
D- Par les enzymes.....	p. 9
3- Autres méthodes de rupture du dimère...	p. 13
4- Conclusion.....	p. 14
Annexe I- Préparation du dimère cis syn in vitro.	p. 15
Annexe II- Techniques de séparation des produits..	p. 16
IV- BIBLIOGRAPHIE.....	p. 18

I. REMARQUES PREALABLES SUR LE SUJET

II existe quatre structures possibles pour les dimères du type cyclobutane de la thymine(1-2). Deux de ces dimères étant optiquement actifs, cela fait au total six dimères différents(fig.1). Hors, il est apparu que parmi ces dimères, un se formait préférentiellement par irradiation de deux molécules adjacentes de thymine sur le même brin de DNA. Cette dimérisation est responsable d'effets ayant une importance capitale en biologie. Nous essaierons donc de limiter la recherche bibliographique à ce composé: le dimère cis-syn de type cyclobutane de la thymine.

D'autre part, la thymine est une base pyrimidique constituant le DNA. In vivo, elle s'associe à un sucre, le désoxyribose, et c'est en tant que nucléotide appelé thymidine qu'elle intervient dans le DNA. Il était donc important d'élargir la recherche sur le dimère(cis-syn)de la thymine au dimère(cis-syn)de la thymidine, car suivant les auteurs, l'un ou l'autre terme sera employé.

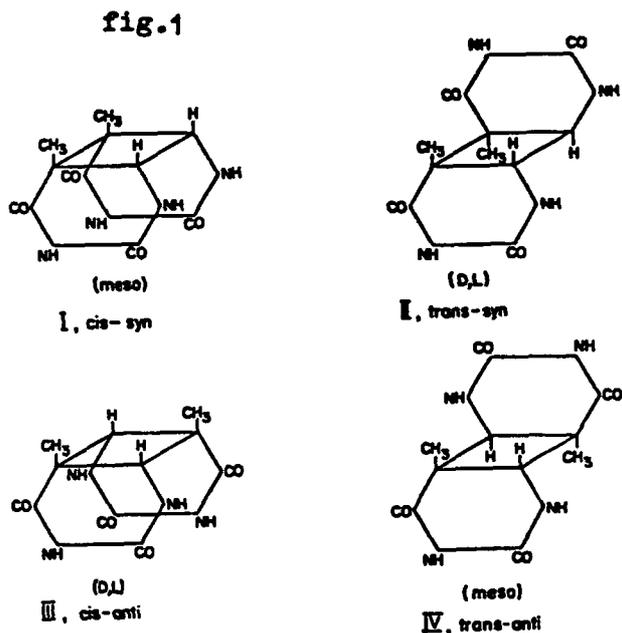


Fig. 1. Thymine dimer isomers.

II. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Recherche manuelle

Avant de commencer toute recherche automatisée, il est nécessaire de faire un travail préalable dans les documents papiers. Cela permet de retrouver quelques publications qui seront très utiles pour le choix des unitermes et des descripteurs. Et ceci d'autant plus, si le sujet n'appartient pas exactement au domaine de compétence de la personne à qui le travail est confié.

D'autre part, dans le cas d'une recherche exhaustive, il ne faut pas oublier que la période couverte par les bases de données ne dépasse guère une quinzaine d'années.

Nous avons consulté les Chemical Abstracts.

2. Recherche automatisée

Les interrogations ont eu lieu à l'URFIST, avec l'aide appréciable de Monsieur Lardy.

Parmi les bases de données accessibles sur Télésystème, nous avons utilisé PASCAL et EUCA.

- PASCAL

Cette base est produite par le CNRS. C'est une base pluridisciplinaire dans le domaine des sciences et techniques. Les articles la constituant proviennent à 90% du dépouillement de 9000 périodiques dont 62% sont européens et 28% U.S. Le taux d'accroissement est de 470 000 références par an et la mise à jour est mensuelle.

Elle se subdivise en deux bases:

PASCAL 73 couvrant les années 1973-1976
et comptant 1 700 000 références.

PASCAL comportant 2 900 000 références
depuis 1977.

L'interrogation peut se faire soit à l'aide de descripteurs répertoriés dans un thésaurus, soit à l'aide d'unitermes et la recherche se fait sur les mots du titre et sur le champ descripteurs.

C'est cette dernière solution qui a été retenue. La traduction française des publications en langue étrangère (62% anglais) n'étant systématique que depuis deux ans, il faut utiliser les unitermes français et anglais.

Stratégie de recherche:

Nous avons utilisé la troncature restreinte "?" qui peut se substituer à 0 ou 1 lettre.

ex:	DIMER??	pour	DIMER_ _	
			DIMERS_ _	Anglais
			DIMERE_ _	
			DIMERES	Français

Du fait de l'interpénétration des domaines (chimie-biologie), couverts par le sujet, nous aurions aimé restreindre le champ des recherches au seul domaine chimique.

Ceci est théoriquement possible grâce au plan de classement du CNRS et grâce à l'opérateur booléen SAUF.

Mais dans l'un et l'autre cas, nous risquons de perdre un grand nombre de références. Nous avons donc décidé de tout "récupérer" et d'effectuer le tri ultérieurement.

Les unitermes ayant été choisis lors de la recherche manuelle, nous avons élaboré la stratégie de recherche suivante:

Etape 1:

THYMINE ET DIMER??

Etape 2:

CASSURE OU SCISSION OU RUPTURE OU DEGRADATION

Etape 3:

MONOMERISATION OU SPLITTING OU CLIVAGE OU BREAKING

Etape 4:

1 ET (2 OU 3)

Etape 5:

THYMIDINE ET DIMER??

Etape 6:

5 ET (2 OU 3)

Etape 7:

4 OU 6

Etape 8:

PHOTOREACTIVATION OU PHOTOSENSIBILISATION OU PHOTOSENSITIZATION

Etape 9:

PHOTOLYS?? OU HYDROGENOLYS??

Etape 10:

1 ET (8 OU 9)

Etape 11:

5 ET (8 OU 9)

Etape 12:

10 OU 11

Etape 13:

7 OU 13

- EUCA

Cette base est produite par le Chemical Abstract Service, représenté en France par le CNIC. Le domaine couvert est la chimie au sens large et les références proviennent de 14 000 périodiques de 150 pays différents de brevets, de thèses, de compte-rendu de congrès et d'ouvrages.

L'accroissement est de 400 000 références par an et la mise à jour est bimensuelle.

Sur le serveur Télésystème, EUCA se subdivise en quatre bases (ce qui n'est pas le cas sur l'Agence Spatiale Européenne):

-EUCA 67	1967-1971	avec 1,4 M	références
-EUCA 72	1972-1976	avec 1,6 M	"
-EUCA 77	1977-1981	avec 1,8 M	"
-EUCA 82	1982-	avec 0,8 M	"

Une particularité intéressante sur cette base:

Tous les composés chimiques sont répertoriés par un numéro: le Registry Number. Il est possible d'interroger directement par ce R.N.

Par exemple le R.N. du dimère cis-syn de la thymine est: 3660-32-0

Comme sur PASCAL, nous avons interrogé par un terme combiné à l'aide des opérateurs booléens.

Stratégie de recherche:

Etape 1:

/RN 3660-32-0

Etape 2:

THYMIDINE ET DIMER?

Etape 3:

1 OU 2

Devant le nombre restreint de documents sortis dans chacune des sous-bases, (entre 14 et 26), il a été jugé préférable, pour des questions de temps de connexion, de limiter la recherche à ces trois étapes élémentaires.

3. Résultats

De notre point de vue de chimiste, nous avons éliminé les publications à "caractère trop biologique" ce qui diminue sensiblement la pertinence. Pour une bonne estimation du système, nous donnerons une évaluation de la pertinence réelle (chimie + biologie).

TABLEAU DES RESULTATS:

BASE PERTINENCE	PASCAL	EUCA
Nombre total documents	41	72
Nombre documents retenus (pertinence)	15 (36,5%)	20 (27,8%)
Nombre documents pertinents (Chimie + Biologie)	19	27
Pertinence réelle	46%	37,5%

La pertinence plus faible sur EUCA s'explique par une stratégie de recherche plus large.

III. SYNTHESE

1. Introduction

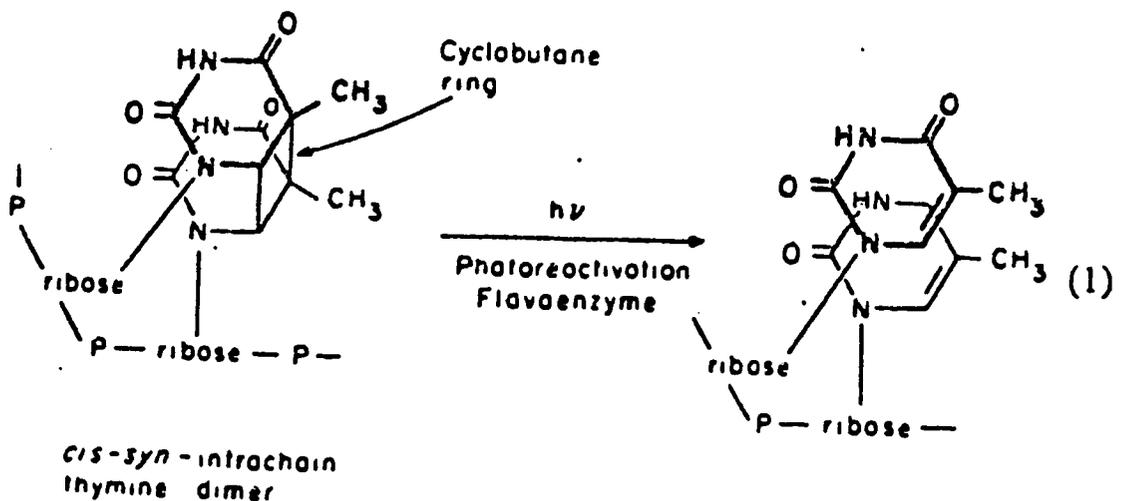
Comme nous l'avons déjà mentionné, la photosensibilisation du DNA "in vivo", à 280 nm, provoque la dimérisation de deux molécules adjacentes de thymine, situées sur le même brin de l'hélice. Le dimère de type cyclobutane ainsi formé (isomère cis-syn) est directement lié au blocage des virus et des bactéries et à l'activation des micro-organismes. Il est responsable pour 50 à 80% des lésions létales et mutagènes des cellules vivantes et possède des effets cancérogènes. Cette dimérisation est réversible et on observe alors un phénomène de régénération du DNA (fig.2). A cause de son rôle essentiel en biologie, les mécanismes de rupture du dimère font l'objet de nombreuses études.

Dans la suite de l'exposé, nous étudierons les mécanismes de reactivation photosensibilisée:

- A- Par les quinones
- B- Par les ions des métaux de transition
- C- Par les amino-acides
- D- Par les enzymes

Nous mentionnerons ensuite rapidement quelques autres méthodes de rupture du dimère (Radiolyse, Thermolyse...) et nous donnerons une méthode in vitro de préparation du dimère ainsi que des techniques de séparation des produits.

fig.2



2. Mécanismes de monomérisation photosensibilisée du dimère cis-syn de la thymine.

A- Par les quinones:(3-4-13-15)

Les études portant sur ces produits comme photosensibilisateurs ont montré un taux de monomérisation du dimère élevé. Le dérivé utilisé est la 2-anthraquinonesulfate. Les solutions (substrat-sensibilisateur) sont désoxygénées et irradiées avec une longueur d'onde $\lambda = 360$ nm.

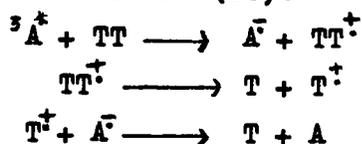
Le taux de production de thymine augmente linéairement avec la concentration en dimère. La photoréactivation est bloquée en présence d'oxygène. Cela s'explique par un phénomène de compétition: compétition entre l'inhibiteur (O_2) et le dimère pour réagir avec l'état excité du sensibilisateur.

Des expériences de photolyse éclairée de la 2-anthraquinonesulfate en solution désoxygénée permettent de mettre en évidence deux espèces intermédiaires ayant une durée de vie de l'ordre de 1ms. Ces espèces ont été identifiées comme étant une semiquinone cationique et une semiquinone anionique produites par la réaction suivante:



A : 3 état excité de la 2-anthraquinonesulfate.

A partir de ces résultats, un mécanisme réactionnel est proposé. La première étape consiste en une réaction entre l'état excité du sensibilisateur et une molécule de dimère (TT).



L'hypothèse de la formation de l'ion radicalaire $TT^{\cdot+}$ est étayée par plusieurs considérations;

La spectrométrie de masse du dimère montre un pic moléculaire $TT^{\cdot+}$ très faible. Par contre, elle indique un pic intense pour un nombre de masse correspondant au monomère (T). Il semble donc que le passage $TT^{\cdot+} \longrightarrow T$ par cassure du cycle cyclobutane soit une réaction très facile.

Le pouvoir oxydant de $^3A^*$ est grand.

Des études spectroscopiques (CIDNP) donnent des résultats analogues à ceux obtenus par RPE de radicaux cationiques de la thymine ($T^{\cdot+}$). Tout ceci tend à prouver l'existence de $T^{\cdot+}$ comme intermédiaire et jouant le rôle de support de transfert de charge.

B- Par les ions des métaux de transition: (5)

Les ions des métaux de transition, à cause de leur spectre d'absorption dans les grandes longueurs d'onde ($\lambda > 350$ nm) et de leurs propriétés électroniques, se sont révélés comme étant de bons photosensibilisateurs. Nous rapporterons ici la principale étude faite avec $K_3Fe(CN)_6$ et UO_2SO_4 .

La solution contenant le dimère et un sel est irradiée pendant trois heures et demi à une longueur d'onde $\lambda > 350$ nm.

Le taux de monomérisation est de 30% pour $K_3Fe(CN)_6$ et de 60% pour UO_2SO_4 . Les espèces en solution absorbant la lumière dans la région d'irradiation sont les ions UO_2^{2+} et $Fe(CN)_6^{3-}$ qui présentent respectivement une bande d'absorption à 415 nm et 405 nm.

Le mécanisme proposé est un transfert d'énergie du sensibilisateur vers le dimère. L'explication de ce mécanisme peut être envisagée de deux manières:

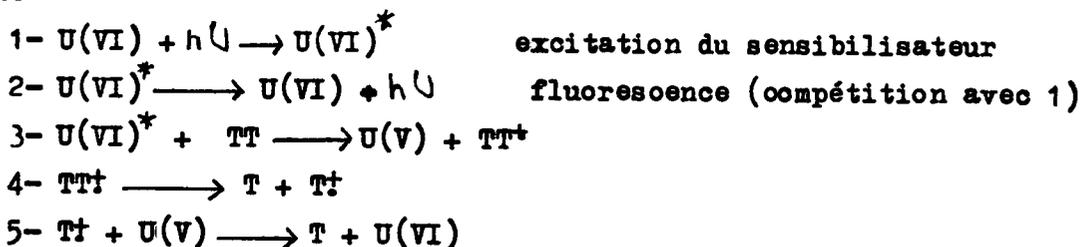
-formation préalable d'un complexe au départ.

-excitation du sensibilisateur et transfert de charge entre le dimère et le sensibilisateur.

La première hypothèse est rejetée car les études spectroscopiques n'ont pu mettre en évidence le complexe.

D'autre part, le taux de monomérisation augmente avec la température, dans un domaine compris entre 5°C et 50°C, alors que la constante de formation du complexe diminue dans ce même intervalle.

C'est donc la deuxième hypothèse qui est retenue avec le mécanisme suivant:



On observe un transfert de charge entre l'état fondamental du dimère et l'état excité du sensibilisateur (réac.3)

Des expériences du même type réalisées in vivo sur des molécules de DNA irradiées donnent les mêmes résultats.

C- Par les amino-acides: (3-6-12)

Les sensibilisateurs utilisés sont le D-L tryptophane et la D-L phényl-amine. Ces deux composés, après irradiation à 340-380 nm provoquent la monomérisation du dimère. Ces mêmes longueurs d'onde ne provoquent pas l'absorbance du dimère seul, ni des amino-acides. Ceci prouve que la monomérisation est due à la formation d'un complexe ayant lui une bande d'absorption dans la région étudiée. La quantité de thymine produite, selon que le dimère est en présence de D-L tryptophane ou de D-L phénylamine est différente. Cela est dû aux constantes d'équilibre de formation du complexe qui sont différentes. Plus la constante est élevée, plus la concentration en complexe est importante et plus la production en thymine est grande. ($K_{d-l \text{ tryp.}} > K_{d-l \text{ phén.}}$).

Les effets inhibiteurs de KCl et de KNO_3 sur ces amino-acides résulteraient d'une diminution de K , due à une augmentation de la force ionique de la solution. De plus, KNO_3 , de part son affinité électronique, pour une même force ionique, a un effet inhibiteur plus important que KCl.

Sur la base de ces expériences, il s'ensuit que les amino-acides forment avec le dimère un complexe moléculaire. Ce complexe semble être un complexe de transfert de charge (dans le sens sensibilisateur \rightarrow dimère), car le clivage s'effectue par irradiation à une longueur d'onde supérieure à celles correspondant aux composants individuels. Étant donné que de tels complexes subissent une dissociation ionique après irradiation, il est très probable que la monomérisation des dimères soit une réaction radicalaire.

D- Par les enzymes: (7-15)

Une étude systématique des dérivés de la flavine et de la 5-déazaflavine employées comme photosensibilisateurs du clivage des dimères de la thymine apporte des résultats importants sur:

- a) la nature des sensibilisateurs (actifs et inactifs)
- b) l'influence du temps d'irradiation
- c) l'influence du pH
- d) l'effet des concentrations

a) Nature des sensibilisateurs

- sensibilisateurs actifs

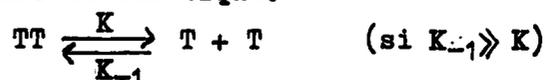
La flavine et la 5-déazaflavine provoquent, après irradiation à une longueur d'onde $\lambda = \lambda_{\text{max}}$ du sensibilisateur, la monomérisation du dimère. Cette réaction a lieu aussi bien in vivo qu'in vitro, c'est à dire, hors du milieu protéinique. Ces composés agissent comme catalyseurs, absorbant l'énergie lumineuse et la focalisant sur le dimère, entraînant ainsi la

monomérisation. Le sensibilisateur n'est pas dégradé au cours de la réaction. D'autres dérivés comme la 5-déazariboflavine et la 8-méthoxy-7,8-didéméthyl-N¹⁰-éthyl-5-déazaflavine possèdent les mêmes propriétés (fig.3).

- sensibilisateurs inactifs

Tous les dérivés de la flavine possédant un hétéroatome sur le carbone en C₈ (fig.3) sont inactifs. Cet hétéroatome, donneur d'électrons, augmente la densité électronique du cycle et est responsable du déplacement du λ max vers de plus grandes longueurs d'onde que pour les flavines correspondantes. C'est le cas par exemple de la 8-hydroxy-5-déazaflavine, de la 8-(diméthylamino)-riboflavine ($\lambda = 490$ nm) et de la 8-méthylamino-riboflavine ($\lambda = 470$ nm).

Ces composés contrairement à la flavine et à la 5-déazariboflavine ne peuvent à l'inverse dimériser la thymine. Cela montre bien l'inactivité de ces dérivés (substitués en C₈ avec un hétéroatome) et écarte l'hypothèse que l'absence de production de thymine à partir du dimère soit uniquement un problème de cinétique.



Il faut quand même noter que dans le cas de la 8-hydroxy-5-déazaflavine, il peut apparaître de temps en temps, en présence d'un excès de photosensibilisateur, une cassure du dimère. On observe alors la dégradation du sensibilisateur. Aucune explication n'est donnée à ce phénomène, explication qui ne pourrait venir que d'une étude photochimique très approfondie de ce composé.

b) Influence du temps d'irradiation

En présence d'un sensibilisateur actif, avec une irradiation à 400 ou 450 nm (respectivement pour la 5-déazaflavine et la flavine), on constate que le taux de production de thymine est une fonction linéaire du temps dans les premières soixante minutes d'irradiation. Pendant cette période 35 à 45% du dimère est converti en thymine. On évolue ensuite vers un palier se stabilisant au bout de deux heures. Le taux de monomérisation est alors de 50% environ. Une irradiation prolongée entraîne une dégradation du dimère et certainement celle du sensibilisateur. Même après dix-sept heures d'irradiation, en présence de 5-déazariboflavine, il n'a pas été possible d'observer une monomérisation complète du dimère.

c) Influence du pH

Quel que soit le sensibilisateur, celui-ci n'est actif que pour des valeurs de pH élevées ($\text{pH} > 10$)

Les valeurs de pK_a, du dimère d'une part (10,7) du photosensibilisateur d'autre part (10 pour l'état fondamental et pour les 1 et 3 états excités)

ne peuvent expliquer cette dépendance.

De plus, il est connu que plus le pH augmente, plus difficile est la formation de l'état triplet de la flavine après irradiation.

Il semble donc que ce phénomène soit dû à la formation de complexes moléculaires entre la flavine et la thymine dimère. Cette préassociation serait une phase essentielle pour la formation de thymine.

d) Influence des concentrations:

1- en substrat (dimère)

Quand les concentrations en dimère et en sensibilisateur sont égales, la quantité de thymine formée est une fonction linéaire de la concentration en substrat. La photolyse est alors une réaction du premier ordre vis à vis du dimère. On observe une saturation du substrat quand la proportion (dimère)/(sensibilisateur) atteint une valeur de 16 (ordre 0). Dans ces conditions, après deux à trois heures d'irradiation, chaque molécule de sensibilisateur provoque la monomérisation de quatre molécules de dimère.

2- en sensibilisateur

Dans ce cas la dépendance taux de thymine produite -- concentration en sensibilisateur est plus complexe.

Quand la concentration en sensibilisateur est inférieure à celle du dimère, la photolyse est une réaction du premier ordre vis à vis de la concentration en sensibilisateur.

Quand le rapport (sensibilisateur)/(dimère) est compris entre un et deux on a une réaction d'ordre zéro.

Quand le rapport (sensibilisateur)/(dimère) $\gg 1$, la production de thymine est inhibée. L'inhibition augmentant linéairement avec la concentration en photosensibilisateur. On est alors en présence d'une réaction d'auto-inhibition du sensibilisateur.

L'action des sensibilisateurs a d'autre part été mise en évidence:

- en comparant la courbe d'absorbance du sensibilisateur et la courbe de production de thymine. On constate une très bonne concordance entre le nombre de photons absorbés par le photosensibilisateur et la production de thymine.

- par des expériences d'inhibition chimique des photosensibilisateurs

Des inhibiteurs de formation de l'état triplet des sensibilisateurs (oxygène, diazabicyclo 2-2-2 octane ou dabco) bloquent la formation de thymine. De plus, l'alcool tertiobutyle ou n-butyle (à des concentrations quatre fois supérieure à celle des réactifs), bien que très connus pour leurs propriétés de "piégeage" d'espèce radicalaire, n'empêchent pas la

formation de thymine. Par contre, pour des concentrations plus élevées, la monomérisation est réduite de 60% à 80%.

A partir de ces résultats, un mécanisme de réaction est proposé:

L'état triplet de la flavine (ou d'un autre sensibilisateur actif) est certainement le maillon essentiel dans le processus de monomérisation du dimère. En effet, la thymine dimère n'absorbant pas la lumière dans la région visible ne peut pas avoir un état triplet d'énergie suffisamment basse pour pouvoir être peuplé par l'état triplet de la flavine. Le mécanisme envisagé est alors celui d'un transfert de charge entre l'état triplet de la flavine et le dimère. Ce transfert d'électron a lieu entre le dimère et le sensibilisateur, tout deux étant étroitement associés (complexe). Les flavines, dans leurs états triplets, sont connues pour attirer les électrons de composés contenant de l'azote. L'électron passerait donc du dimère vers l'état triplet du sensibilisateur pour donner un dimère radicalaire. En effet, seuls les sensibilisateurs à faible densité électronique sont actifs. Il reste encore à caractériser plus précisément le degré de protonation du complexe dimère-sensibilisateur.

schéma du mécanisme proposé:

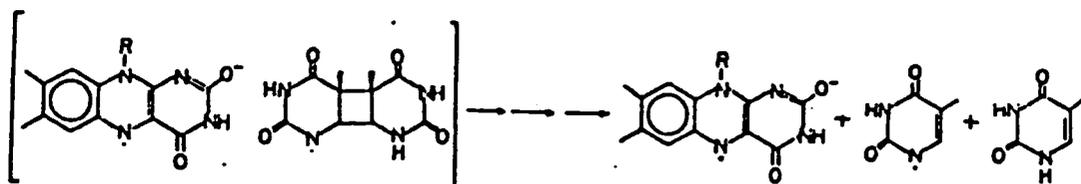
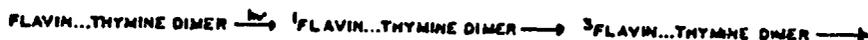
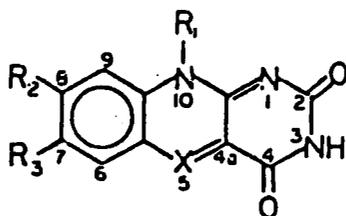


fig.3



- 5-deazariboflavin, X = C; R₁ = ribityl; R₂ = R₃ = CH₃
 8-hydroxy-7,8-dideméthyl-5-deazariboflavin, X = C; R₁ = ribityl;
 R₂ = OH; R₃ = H
 8-méthoxy-7,8-dideméthyl-N¹⁰-éthyl-5-deazaflavin, X = C; R₁ =
 CH₂CH₃; R₂ = OCH₃; R₃ = H
 lumiflavin, X = N; R₁ = R₂ = R₃ = CH
 riboflavin, X = N; R₁ = ribityl; R₂ = R₃ = CH₃
 8-hydroxyriboflavin, X = N; R₁ = ribityl; R₂ = OH; R₃ = CH₃

3- Autres méthodes de rupture du dimère

- rupture par thermolyse (3)

La monomérisation dans ce cas, est catalysée en milieu basique et implique la déprotonation d'un des azotes du cycle. Parallèlement à la monomérisation par cassure du cycle cyclobutane, il apparaît une réaction compétitive: l'hydrolyse des liaisons CO-N au sein du dimère.

- rupture par photolyse directe (3)

Les dimères seuls, irradiés avec des longueurs d'onde comprises entre 225 nm et 289 nm sont monomérisés. Le taux de production de thymine augmente quand la longueur d'onde diminue (60% à 90%).

Aucun autre produit de photolyse n'a été mis en évidence. Dans ce cas, le mécanisme de rupture du dimère est à rapprocher de la réaction inverse de cycloaddition de deux éthylènes. Les longueurs d'onde utilisées correspondent à une transition $n - \pi^*$ dans le groupe N-CO-N-CO.

L'énergie de vibration serait alors communiquée au cycle cyclobutane, et conduirait à la rupture du dimère.

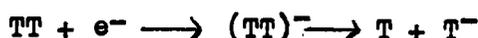
- rupture par radiolyse pulsée (8-9-10-11-14)

Cette méthode a été mise en oeuvre principalement pour essayer de simuler les phénomènes de transfert de charge des réactions photosensibilisées, tout en s'affranchissant des problèmes posés par la présence des coproduits présents dans les systèmes photochimiques.

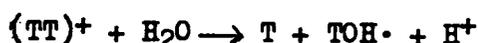
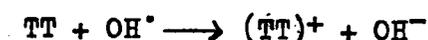
L'étude de la durée de vie des électrons en fonction de l'augmentation de concentration en dimère confirme l'hypothèse de l'attaque du dimère par les électrons. D'autre part, l'évolution du spectre d'absorption du monomère en fonction du nombre d'électrons incidents, prouve sans ambiguïté que le monomère est le principal produit de la radiolyse mais pas nécessairement le seul.

Suivant les conditions d'expérience deux mécanismes sont proposés:

(1): en solution saturée en N_2



(2): en solution saturée en N_2O



Les dérivés actifs de l'indole (tryptophane) sont connus pour être donneurs d'électrons dans leurs états excités et réagissent avec le dimère conformément à la réaction (1).

D'autres molécules ayant pour premier état excité le triplet $n - \pi^*$

(ex: benzophénone) sont accepteurs de protons et peuvent faciliter le mécanisme (2).

4. Canclusion

D'après les études de réactivations photosensibilisées, nous pouvons classer les photosensibilisateurs en deux groupes.

-Les photosensibilisateurs ne formant pas de complexe au départ avec le dimère.

C'est le cas des quinones et des ions des métaux de transition. Le transfert de charge entre le sensibilisateur, dans un état excité, et le dimère provoque un intermédiaire radicalaire: l'ion TT. Vient ensuite la monomérisation proprement dite avec le retour du sensibilisateur à son état fondamental.

-Les photosensibilisateurs formant un complexe avec le dimère. C'est le cas des amino-acides et des enzymes. Le complexe moléculaire est alors formé dès le départ et l'irradiation conduit à un état excité de ce complexe. Le transfert de charge se produit à l'intérieur du complexe, qui, après dissociation ionique, redonne la thymine monomère. Dans un cas comme dans l'autre, si les premières étapes (formation ou non d'un complexe) sont bien déterminées et bien maîtrisées, il reste toujours une ombre quant au mécanisme de formation de la thymine monomère. Les intermédiaires réactionnels ont des durées de vie trop courtes et il n'a pas encore été possible de les mettre en évidence par les méthodes physiques (y compris la spectroscopie laser qui peut détecter des radicaux dont la durée de vie est de l'ordre de quelques nanosecondes). Dans toutes ces réactions, de même que l'irradiation du DNA provoquait une dimérisation sélective, avec formation de l'isomère cis-syn, l'action des photosensibilisateurs est elle aussi sélective; seuls les isomères cis-syn de type cyclobutane sont monomérisés. Le système photochimique décrit dans la réaction photosensibilisée par les enzymes peut servir de modèle pour une étude in vivo de la régénération du DNA. Ce système, d'une part a pour base le mécanisme des réactions catalysées par des enzymes (très courant dans le domaine biologique), et d'autre part simule un processus plus rare de conversion directe d'énergie lumineuse en énergie chimique.

Annexe I - Préparation du dimère cis-syn in vitro (16)

Il est possible de préparer selectivement in vitro le dimère de type cyclobutane cis-syn de la thimine.

Une solution à 1% en thymine est refroidie à -78°C . La solution gelée est ensuite irradiée (1 à 4 heures suivant les lampes utilisées) par une longueur d'onde $\lambda = 250 \text{ nm}$. Après rechauffement, la solution est portée à 100°C , filtrée, puis laissée à 4°C pendant une nuit pour permettre la cristallisation.

Les photoproduits de la thymine (dimères) précipitent ($s=0,5 \text{ g/l}$ dans l'eau à température ambiante) alors que la thymine reste en solution ($s=4 \text{ g/l}$ dans l'eau à température ambiante).

Les dimères sont isolés puis purifiés par recristallisation successives. On obtient ainsi des longues aiguilles blanches de dimère cis-syn.

Annexe II - Techniques de séparation des produits

La séparation des dimères et monomères de la thymine est réalisée par différentes méthodes chromatographiques.

1- Chromatographie sur couche mince (17-18-19)

Dans ce domaine, des méthodes de plus en plus performantes ont été mises au point pour :

- qualitativement, palier au phénomène de contamination des zones de la thymine dimère et de la thymine monomère.

- quantitativement, pouvoir détecter dans les échantillons étudiés des taux de thymine dimère ou monomère de l'ordre de 0,02%.

C'est pourquoi, on utilise la technique de chromatographie à deux dimensions sur couche mince de cellulose.

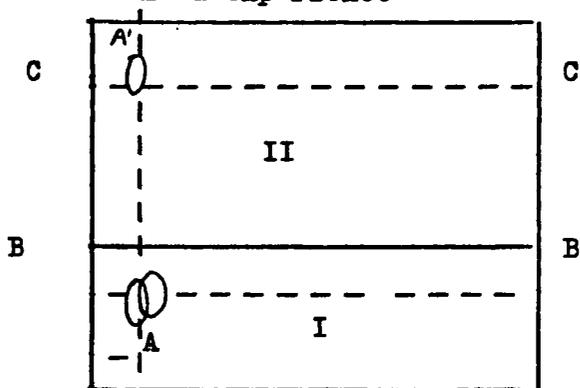
De plus, par rapport à la chromatographie sur papier, cette méthode a l'avantage d'un gain de temps considérable (4 à 5 heures pour la cellulose contre 19 à 20 heures pour le papier) et d'une manipulation plus facile. Cette technique étant surtout utilisée par les biologistes, les échantillons étudiés sont marqués au H et les quantités de produits séparés sont déterminées par mesure de radioactivité.

Le DNA (E.Coli) marqué, mis dans une solution tampon 0,05M de tris-HCl 3 à pH 8 (c= 50-100µg/l) est irradié par des rayonnements U.V.

Pour cela il est fréquemment utilisé une lampe à vapeur de mercure (type 15W G.E).

Suivant les expériences envisagées, on peut prévoir l'incubation ou non du DNA avec des enzymes spécifiques de régénération.

Schéma d'expérience



L'échantillon (1 à 2µl) est déposé au point A. Par chromatographie ascendante on procède à une première séparation. L'éluant est un mélange n-butanol/eau dans un rapport de volume (86/14). La ligne joignant les points C est le front de solvant.

Ce premier passage dure 2h1/2 à 3h à température ambiante.

Après séchage de la plaque, on retire le support cellulosique de la plaque de verre et il est découpé suivant la ligne joignant les points B.

La plupart de la thymine monomère se trouve dans la partie II et un mélange monomère-dimère est resté dans la zone I.

La ligne de migration de la thymine monomère (A') est recouverte d'une bande de scotch adhésive séparée arbitrairement en 5 à 6 sections. Chaque

segment est alors découpé et la radioactivité mesurée. La partie I est replacée sur la plaque de verre, la grande dimension parallèle au sens de chromatographie. On procède à une deuxième chromatographie ascendante (dans une direction perpendiculaire à la première) avec un éluant différent (solution saturée de sulfate d'ammonium/solution 1M d'acétate de sodium/2-propanol dans les rapports de volume:80/18/2).

Dans ce cas la chromatographie est terminée quand le front de solvant atteint la trace du point D. La durée de cette phase est d'environ 1h1/2. De même que précédemment, une bande de scotch adhésive est collée sur la zone de migration du dimère et découpée en sections de 0,5cm de longueur. Les quantités de produits sont mesurées par radioactivité. La thymine dimère ($R_f=0,75$) et la thymine monomère ($R_f=0,55$) sont ainsi séparées du mélange initial.

2- Chromatographie liquide haute performance (20-21-22)

Cette méthode (R.P.H.P.L.C) est très utilisée pour séparer les composants des acides nucléiques (bases, nucléosides, mono et oligonucléotides). Appliquée aux photoproduits des acides nucléiques, (dont la plupart d'entre eux sont des dimères de la pyrimidine de type cyclobutane ou non cyclobutane) cette technique est rapide, fait preuve d'une bonne résolution et permet, grâce à un détecteur U.V., d'identifier directement les produits. C'est ainsi qu'il a été possible de séparer les dimères cis-syn de la thymine de ceux de l'uracyle-thymine; séparation impossible avec la chromatographie par échange d'ions. Le montage expérimental comprend une colonne de type ODS (octadecylsilyl) dont les particules ont une taille d'environ 10 μ m de diamètre. Cette colonne est précédée d'une colonne du même type. (plus courte: 50mm contre 250mm). Les échantillons sont introduits au moyen d'un injecteur après irradiation par une lampe à vapeur de mercure (254nm, 15W). Un spectromètre U.V. détecte les différents constituants du mélange. Les phases mobiles utilisées sont soit des solutions $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 50mM-méthanol pur (A) soit des solutions $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,12M / $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M dans un mélange eau-méthanol 1/1 (B). Les expériences se font à température ambiante dans un gradient d'éluant B dans A généré à un taux de 1ml/mn.

D'autres expériences, à partir du même dispositif de base sont faites sur des échantillons marqués et les quantités des différents constituants séparés par des temps d'élution différents sont détectées par un compteur à scintillations.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. SMITH K.C.; Biochem. Biophys. Res. Com.; Vol. 25(4), p.426-433; (1966)
'An isomer of the cyclobutane-type thymine dimer produced in the presence of adenine.'
2. BEN-HUR E., BEN-ISHAI R.; Biochim. Biophys. Acta; Vol. 166, p.9-15; (1968)
'Trans-syn thymine dimers in U.V irradiated DNA: identification and photoreactivability.'
3. LAMOLA A.A.; Mol. Photochem.; Vol. 4(1), p.107-133; (1972); 72 ref.
'Photosensitization in biological systems and the mechanism of photoreactivation.'
4. BEN-HUR E., ROSENTHAL I.; Photochem. Photobiol.; Vol. 11(3), p.163-168; (1970)
'Photosensitized splitting of pyrimidine dimers.'
5. ROSENTHAL I., RAO M., SALOMON J.; Biochim. Biophys. Acta; Vol. 378(1), p.165-168; (1975)
'Transition metal-ion photosensitized monomerization of pyrimidine dimers.'
6. BALGAVY P., SERSEN F.; Chem. Zvesti; Vol. 37(2), p.243-249; (1983)
'Monomerization of thymine dimers photosensitized by aromatic amino-acids.'
7. ROKITA S.E., WALSH C.T.; J. Am. Chem. Soc.; Vol. 106(16), p.4589-4596; (1984)
'Flavin and 5-deazaflavin photosensitized cleavage of thymine dimers: a model of in vivo light requiring DNA repair.'
8. SANTUS R., HELENE C., OVADIA J., GROSSWEINER L.I.; Photochem. Photobiol.; Vol. 16(1), p.65-67; (1972)
'Splitting of thymine dimers by hydrated electrons.'
9. GROSSWEINER L.I., KEPTA A.G., SANTUS R., VIGIL J.A.; Int. J. Radiat. Biol.; Vol. 25(5), p.521-523; (1974)
'Thymine dimer splitting by ionizing radiation.'
10. HAYASHI T., OGRISO O., NAMIKI M.; Bull. Chem. Soc. Jap.; Vol. 46(12), p.3896-3898; (1973)
'The dimerization of thymine glycol and the splitting of the dimer by gamma irradiation in an aqueous system.'
11. CADET J.; Tetrahedron Lett.; Vol. 47, p.4275-4277; (1976)
'Radiolyse gamma de solutions aqueuses de thymine à 77K et 195K: identification du dimère de type cyclobutane cis-syn.'

12. BALGAVY P.;Z.Naturforsch.(C);Vol.28(11-12),p.757-760;(1973)
'Effect of potassium nitrate on photoreactivation of E.Coli cells.'
13. ROTH H.D.,LAMOLA A.A.;J.Am.Chem.Soc.;Vol.94(3),p.1013-1014;(1972)
'Cleavage of thymine dimers sensitized by quinones:chemically induced dynamic nuclear polarization in radical ions.'
14. DEERING R.A.,SNIPES W.;Biophys.J.;Vol.8(3),p.326-329;(1968)
'Gamma irradiation of thymine dimers in aqueous solution.'
15. LAMOLA A.A.;J.Am.Chem.Soc.;Vol.88(4),p.813-817;(1966)
'Sensitized photochemical splitting of thymine dimer.'
16. WULFF D.L.,FRAENKEL G.;Biochim.Biophys.Acta;Vol.51,p.354;(1961)
'Preparation of thymine photoproducts.'
17. AUER B.,KLOCKER H.,BURTSCHER H.J.,HIRSCH-KAUFFMANN M.;Naturwiss.;Vol.69(7),p.340;(1982)
'A sensitive assay for thymine dimers.'
18. GOLDMANN K.,FRIEDBERG E.C.;Anal.Biochem.;Vol.53(1),p.124-131;(1973)
'Measurement of thymine dimers in DNA by thin layer chromatography.'
19. CADET J.,VOITURIEZ L.,HAHN B.S.,WANG S.Y.;J.Chromatogr.;Vol.195(1),
p.139-145;(1980)
'Separation of cyclobutyl dimers of thymine and thymidine by high performance liquid chromatography and thin layer chromatography.'
20. BRETER H.J.,WEINBLUM D.,ZAHN R.;Anal.Biochem.;Vol.61(2),p.362-366;
(1974)
'Highly sensitive method for the estimation of pyrimidine dimers in DNA by high pressure liquid cation-exchange chromatography.'
21. DEMIDOV V.,POTAMAN V.N.;J.Chromatogr.;Vol.285(1),p.135-142;(1984)
'High performance liquid chromatography of the photoproducts of nucleic acid components.'
22. CADET J.,GENTNER N.E.,ROZGA B.,PATERSON M.C.;J.Chromatogr.;Vol.280(1),
p.99-108;(1983)
'Rapid quantification of U.V. induced thymine containing dimers in human cells DNA by reversed phase high performance liquid chromatography.'

Pour compléments:

BALGAVY P., SERSEN F., NACY A.; *Stud. Biophys.*; Vol. 93(2), p.81-88; (1983)

'Some physical properties of thymine dimer aggregates with aromatic amino-acids in aqueous solutions and solid phase.'

NISHIMOTO S., IDE H., NAKAMICHI K., KAGIYA T.; *J. Am. Chem. Soc.*; Vol. 105(22), p.6740-6741; (1983)

'Radiation induced reduction of thymine in aqueous solution: isolation and characterization of a novel dimeric product.'

PAC C., KUBO J., MAJIMA T., SAKURAI H.; *Photochem. Photobiol.*; Vol. 36, p.273-282; (1982)

'Structure reactivity relationships in redox-photosensitized splitting of pyrimidine dimers and unusual enhancing effect of molecular oxygen.'

YASUO KITA, TAIZO UNO; *J. of Polym. Sc.*; Vol. 19, p.3315-3324; (1981)

'Fonotional monomers and polymers: photochemical reactions on the synthetic polymers containing thymine bases in the presence of adenine!

ZHANG J.S., QIEN G.L., ZHANG W.L.; *Radiat. Phys. Chem.*; Vol. 17(4), p.207-211; (1981)

'The dimerization of thymine in frozen aqueous solutions induced by gamma radiation. Separation and identification of dimer.'

RAHN R.O.; *Acta Biol. Med. Germ.*; Vol. 38(9), p.1225-1231; (1979)

'Triplet sentization of DNA.'

FAHR E., ROTH G.P., WUESTENFELD P.; *Z. Naturforsch. (B)*; Vol. 33(6), p.646-651; (1978)

'Gas chromatographic study of products formed by U.V. irradiation of uracil and thymine in solution and ice matrix.'

SCHUSTER D.I., GUPTA A.B.; *Photochem. Photobiol.*; Vol. 25(3), p.239-242; (1977)

'Photochemistry of ketones in solution. A study of photosensitized splitting of dimethyl thymine dimers.'

CHARLIER M., HELENE C.; *Photochem. Photobiol.*; Vol. 21(1), p.31-37; (1975)

'Photosensitized splitting of pyrimidine dimers in DNA by indole derivatives and tryptophan containing peptides.'

FISHER G.J., VARGHESE A.T., JOHNS H.E.; Photochem. Photobiol.; Vol. 20, p.109-120; (1974)

'U.V. induced reactions of thymine and uracil in the presence of cysteine.'

RAHN R.O., LANDRY L.C., CARRIER W.L.; Photochem. Photobiol.; Vol. 19(1), p.75-79; (1974)

'Formation of chain breaks and thymine dimers in DNA upon photosensitization at 313nm with acetophenone, acetone or benzophenone.'

VARGHESE A.J.; Photochem. Photobiol.; Vol. 13, p.357-364; (1971)

'Photochemistry of thymidine as a thin film.'

HERBERT M.A., LEBLANC J.C., WEINBLUM D., JOHNS H.E.; Photochem. Photobiol.; Vol. 9, p.33-43; (1969)

'Properties of thymine dimers.'

COOK J.S.; Photochem. Photobiol.; Vol. 6, p.97-101; (1967)

'Direct demonstration of the monomerization of thymine containing dimers in U.V. irradiated DNA by yeast photoreactivating enzyme and light.'