

VIRGINIE CARRIER

**ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN DE LA FUSION DE POLYNUCLÉOTIDES
SYNTHÉTIQUES À DES TEMPÉRATURES SUPÉRIEURES À 100°C**

**Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)**

**Département de chimie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

JUIN 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43793-0

Canada

À Philippe

À Claudette et Simon

RÉSUMÉ

Dans un premier temps, nous avons étudié par spectroscopie Raman la fusion de l'acide polyguanylique-polycytidilique [poly(G) · poly(C)]. Plusieurs bandes caractéristiques provenant à la fois de la guanine et de la cytosine nous ont permis de suivre la dynamique de cette transition. De même, le comportement inusité des bandes associées à la guanine nous a conduit à la formulation d'une hypothèse sur l'association du polynucléotide une fois la température de fusion atteinte. Nous nous sommes de plus intéressés à l'influence de certains cations (Na⁺, TMAP) sur la stabilité du complexe et sur la réversibilité de la transition suite à sa fusion.

Nous avons également étudié l'acide polydésoxyguanylique-polydésoxycytidilique [poly(dG) · poly(dC)]. Dans ce cas, nous avons été en mesure d'observer que le complexe adopte deux conformations différentes à la température de la pièce, dans des proportions qui varient en fonction de la concentration ionique (0,1 et 0,5 M NaCl). Nous avons également réussi à mesurer la température de fusion de ce polynucléotide synthétique.

Enfin, nous avons étudié les transitions de la conformation B vers Z et de cette dernière vers la forme désordonnée (fusion) pour l'acide poly[désoxyguanylique-désoxycytidilique] [poly(dG-dC) · poly(dG-dC)] en présence de sels de magnésium et de sodium.

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mon directeur de recherche, M. Rodrigue Savoie. Ses nombreux conseils, sa compétence et son enthousiasme m'ont permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions. Je tiens également à remercier Pascal Mercier, qui m'a enseigné les rudiments de la spectroscopie Raman. Pascal m'a été d'une aide inestimable lors de l'apprentissage de cette technique.

Mes remerciements vont également à M. Denis Boudreau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au cours de l'été 1996. Cette expérience bénéfique a été pour moi une porte d'entrée sur le monde de la spectroscopie.

Je ne pourrais passer sous silence l'accueil très chaleureux de M. Frédéric Fages lors d'un stage effectué à l'Université de Bordeaux I. Je lui exprime ici ma sincère reconnaissance pour tous ses encouragements à mon égard.

J'adresse également mes remerciements à mes meilleurs amis, Philippe et Yannick, pour le soutien tant scientifique que personnel, de même qu'à mes collègues de travail (Christian Pellerin, Awa Dicko et France Fréchette) pour la bonne humeur qu'ils ont su faire régner dans le laboratoire au cours de la dernière année.

Un merci spécial à Claudette et Simon, Annie, Ann S. Carroll, et Claire Godbout pour m'avoir encouragée à donner, en tout moment, le meilleur de moi-même. Finalement, je souligne la contribution de gens extraordinaires : Lucienne, Bernard, Marie-Claude et Dominique, pour nous avoir fait vivre, à Philippe et à moi, une année inoubliable.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
CHAPITRE I	1
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Les acides nucléiques	1
1.2 Les conformations des polynucléotides	6
1.3 La spectroscopie Raman.....	14
1.4 Objet de la présente étude.....	19
CHAPITRE II.....	21
2 PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE.....	21
2.1 Préparation des échantillons.....	21
2.2 Le spectrophotomètre Raman.....	22
2.3 Le porte-échantillon	24
2.4 L'acquisition des données	26
2.5 Exemple d'application.....	26
CHAPITRE III.....	29
3 ACIDE POLYGUANYLIQUE-POLYCYTIDILIQUE.....	29
3.1 Introduction	29
3.1.1 L'acide polyguanylique-polycytidylique.....	29
3.1.2 L'acide polyguanylique	30
3.1.3 L'acide polycytidylique.....	33
3.2 Partie expérimentale	33
3.3 Résultats et discussion.....	35
3.4 Conclusion.....	45

CHAPITRE IV.....	47
4 ACIDE POLYDÉSOXYGUANYLIQUE-POLYDÉSOXYCYTIDILIQUE	47
4.1 Introduction	47
4.1.1 L'acide polydésoxyguanylique-polydésoxycytidilique	47
4.2 Partie expérimentale	49
4.3 Résultats et discussion.....	49
4.3.1 Étude en solution 0,1 M NaCl	49
4.3.2 Étude en solution 0,5 M NaCl	56
4.4 Comparaison avec l'acide polydéoxyadénylique-polydéoxythymidylique.....	61
4.5 Conclusion.....	65
CHAPITRE V	66
5 ACIDE POLY[DÉSOXYGUANYLIQUE-DÉSOXYCYTIDILIQUE]	66
5.1 Introduction	66
5.1.1 L'acide poly[désoxyguanylique-désoxycytidilique]	66
5.1.2 Facteurs favorisant la structure de type Z.....	68
5.1.3 Implications biologiques	70
5.2 Partie expérimentale	70
5.3 Résultats et discussion.....	71
5.3.1 Étude en présence d'ions magnésium.....	71
5.3.2 Étude en présence d'ions sodium	78
5.4 Conclusion.....	84
CHAPITRE VI.....	85
6 CONCLUSION GÉNÉRALE	85
RÉFÉRENCES.....	88

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1 : Enchaînement des bases A, G, T et C d'un fragment d'ADN	3
Figure 2 : Structure des paires de bases de l'ADN.....	5
Figure 3 : Définition des angles de torsion dans les nucléotides.....	6
Figure 4 : Énergie potentielle du furanose en fonction de l'angle δ ($35^\circ \leq \delta \leq 185^\circ$)	7
Figure 5 : Représentation des conformations C3'-endo et C2'-endo du furanose	8
Figure 6 : Orientation de la base par rapport au furanose	9
Figure 7 : Définition de l'angle de torsion autour de la liaison C4'-C5', en regardant le long de l'axe C4'→C5'	9
Figure 8 : ADN de type A (C3'-endo-anti), B (C2'-endo-anti) et Z (G : C3'-endo-syn et C : C2'-endo-anti)	12
Figure 9 : Paramètres hélicoïdaux des polynucléotides	13

Chapitre II

Figure 10 : Schéma optique du système d'illumination double utilisé pour le spectromètre Raman multicanal.....	23
Figure 11 : Schéma du monochromateur double Spex 1401.....	23
Figure 12 : Schéma du porte-échantillon utilisé au laboratoire.....	25
Figure 13 : Spectres Raman de l'ADN de thymus de veau (4 % en poids) à 25, 60, 90 et 135°C.....	28

Chapitre III

Figure 14 : Association prévalant dans le poly(G).....	31
Figure 15 : Spectre Raman du poly(G) (0,5 M LiCl) à 25 et 145°C.....	32
Figure 16 : Spectre Raman du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl à 25 et 135°C (G = guanine et C = cytosine)	36
Figure 17 : Dynamique de fusion du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl. Température de fusion mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1525 cm ⁻¹ [I(1525)] et de l'intensité de la bande à 1481 cm ⁻¹ [I(1481)] ainsi que la fréquence [ν (1481)] de la bande à 1481 cm ⁻¹ ..	39
Figure 18 : Dynamique de fusion du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl. Température de fusion mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1573 cm ⁻¹ [I(1573)] et de la fréquence [ν (1573)] de la bande à 1573 cm ⁻¹	40
Figure 19 : Spectre de différence obtenu en soustrayant le spectre du poly(C) en solution 0,5 M NaCl à 140°C de celui du poly(G) · poly(C) pris dans les mêmes conditions (A), spectre du poly(G) à 25°C (B) et à 145°C (C).	41
Figure 20 : Réversibilité de la fusion du poly(G) · poly(C), en solution 0,5 M NaCl, mesurée à partir de l'intensité relative de la bande à 1525 cm ⁻¹ par rapport à la bande du phosphate (1100 cm ⁻¹).....	43
Figure 21 : Intensités relatives de la bande à 1525 cm ⁻¹ (relativement à la bande à 1098 cm ⁻¹) en fonction de la température du poly(G) · poly(C) pour les conditions expérimentales suivantes : 0,1 M TMAP, 0,1 M NaCl, 0,5 M NaCl et 5 M NaCl.	44
Figure 22 : Dissociation de la double hélice de poly(G) · poly(C) à 130°C et formation de poly(G) associé en tétramère, puis dissociation du [poly(G)] ₄ à des températures supérieures à 140°C.	46

Chapitre IV

Figure 23 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à -15, 5 et 23°C.....	50
Figure 24 : Intensités relatives de différentes bandes caractérisant la proportion de conformation A dans le poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 et 0,5 M NaCl.....	51
Figure 25 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à 70 et 75°C	52
Figure 26 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à 100 et 105°C	53
Figure 27 : Variation de l'intensité relative et de la fréquence de la bande à 1485 cm ⁻¹ du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl de 20 à 140°C	54
Figure 28 : Variation de l'intensité relative et de la fréquence de la bande à 1527 cm ⁻¹ du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl de 20 à 140°C	55
Figure 29 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl à -15, 0 et 23°C.....	57
Figure 30 : Intensités relatives des bandes à 1486, 1535 et 1573 cm ⁻¹ du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl	59
Figure 31 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl à 105 et 110°C	60
Figure 32 : Spectre Raman du poly(dA) · poly(dT) en solution 0,5 M NaCl à -15 et 23°C	61
Figure 33 : Intensité relative de la bande à 1186 cm ⁻¹ relativement à celle de 1094 cm ⁻¹ du poly(dA) · poly(dT) lors d'une élévation et d'un abaissement de température.....	64

Chapitre V

Figure 34 : Spectre de dichroïsme circulaire du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) dans des conditions de faible et de forte concentration ionique.....	67
Figure 35 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl ₂) à 60 et 65°C.....	72

Figure 36 : Transformation du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl ₂) de la forme B à Z mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1487 cm ⁻¹ ainsi que de la fréquence de cette même bande.....	74
Figure 37 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl ₂) à 115 et 120°C.....	75
Figure 38 : Intensités relatives des bandes à 626 et 681 cm ⁻¹ ainsi que le rapport des intensités de la bande à 626 sur celle à 681 cm ⁻¹ du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl ₂).	76
Figure 39 : Intensités relatives des bandes à 1242 et 1290 cm ⁻¹ du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl ₂).....	77
Figure 40 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 3 M NaCl à 112 et 114°C.....	79
Figure 41 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 5 M NaCl à 20 et 115°C.....	80
Figure 42 : Diagramme de phase du poly(dG-dC) · poly(dG-dC)	81

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau 1 : Paramètres hélicoïdaux caractéristiques des polynucléotides appartenant aux familles A, B et Z.	11
Tableau 2 : Valeurs des largeurs et hauteurs (en Å) des sillons majeurs et mineurs dans la double hélice des polynucléotides.	11
Tableau 3 : Changements spectraux observés en spectroscopie Raman pour les polynucléotides contenant les bases guanine (G) et cytosine (C) lors du passage d'une conformation à une autre.	18

Chapitre III

Tableau 4 : Concentration en sel utilisée pour l'étude du poly(G) - poly(C), poly(G) et poly(C).....	34
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre IV

Tableau 5 : Fréquences des bandes pour des polymères contenant les bases adénine et thymine en fonction du type d'hélice.	63
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre V

Tableau 6 : Concentration en cations nécessaire pour l'obtention de la transition B \leftrightarrow Z dans le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) à la température de la pièce.....	69
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE I

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le travail effectué dans le cadre de cette recherche concerne l'étude par spectroscopie Raman du thermotropisme de polymères synthétiques dérivés de l'ADN. Les paragraphes qui suivent présentent les constituants de l'ADN ainsi que leurs conformations. Ces paramètres sont similaires chez les polymères synthétiques. Ces polynucléotides de synthèse simplifient grandement les études structurales puisqu'ils ne possèdent que deux des quatre bases constituant l'ADN. Le caractère nouveau de cette étude repose sur le fait que les expériences ont été effectuées sous pression, à l'aide d'un porte-échantillon spécialement conçu pour atteindre 200°C. L'originalité des résultats découle en grande partie de cette technique, ce qui explique pourquoi l'accent est mis sur les changements spectraux obtenus à haute température. Ce sont, entre autres, les températures de transition et de fusion entre les différentes conformations des polynucléotides que le lecteur découvrira dans les chapitres III, IV et V, et ce, principalement pour des polymères ne contenant que les bases guanine et cytosine.

1.1 *Les acides nucléiques*

Même si l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été découvert il y a près de 130 ans, ce composé a trop longtemps été ignoré, parce qu'il semblait trop simple pour posséder une fonction biologique particulière. Cette façon de voir les choses a changé radicalement dans les années 1940, alors que des chercheurs ont découvert que les chromosomes étaient composés de protéines et d'ADN. Il était déjà connu à cette époque que les chromosomes étaient responsables de l'hérédité d'un sujet. Cependant, les scientifiques n'étaient pas encore en mesure d'attribuer ce facteur héréditaire ni aux protéines, ni à l'ADN. Les expériences démontrèrent par la suite que c'était l'ADN qui constituait le matériel génétique. Toutefois, sa structure demeurait inconnue, même si on avait

identifié ses principaux constituants : furanose, phosphate et bases azotées (adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G)).

Plusieurs groupes de recherche entrèrent dans la course pour découvrir la structure de l'ADN. Une première série d'informations importantes fut obtenue en 1952 par le biochimiste Chargaff.¹ Il remarqua que le rapport adénine/thymine dans l'ADN est égal à 1, de même que le rapport cytosine/guanine. Peu de temps après, Franklind² et Gulland³ amenèrent une deuxième série d'informations pertinentes suite à des études par diffraction des rayons X sur des fibres d'ADN. Ces travaux suggérèrent que l'ADN prend la forme d'une hélice et que les différentes bases sont reliées entre elles par des liaisons hydrogène. Ces nombreuses informations-clés furent rassemblées par J. D. Watson et F. H. C. Crick et leur permis, en 1953, de publier leur découverte.^{4, 5} Ils proposèrent un modèle dans lequel le squelette de l'ADN est constitué de la séquence alternante désoxyribose - phosphate, les bases étant fixées sur les cycles désoxyribose. Deux brins complémentaires s'associent, les bases adénine-thymine (A-T) et cytosine-guanine (C-G) étant reliées entre elles de façon spécifique par des liens hydrogène. Ils ont également noté que le squelette suivait l'axe de la molécule, cette dernière étant enroulée à droite.

Cette découverte a offert pour la première fois une explication qui englobait toutes les données chimiques, biologiques et physiques disponibles à l'époque. Au cours des années subséquentes, d'autres expériences confirmèrent la théorie. Toutefois, puisque l'ADN est une molécule particulièrement complexe, plusieurs questions subsistent à propos des nombreux processus biologiques en jeu.

La figure 1 présente l'enchaînement des bases A, G, T et C dans un fragment d'ADN. Ce polymère a pour unités monomères des nucléotides, de sorte qu'il est en fait un polynucléotide. Chaque nucléotide est constitué d'une base hétérocyclique azotée, d'une unité désoxyribose (ou ribose dans le cas de l'acide ribonucléique (ARN)) et d'un groupement phosphate. L'unité ribose diffère de l'unité désoxyribose du fait que l'atome d'hydrogène en C2' y est remplacé par un groupement hydroxyle. Dans ce texte, l'unité furanose désignera le désoxyribose dans le cas de l'ADN ou le ribose dans le cas de l'ARN.

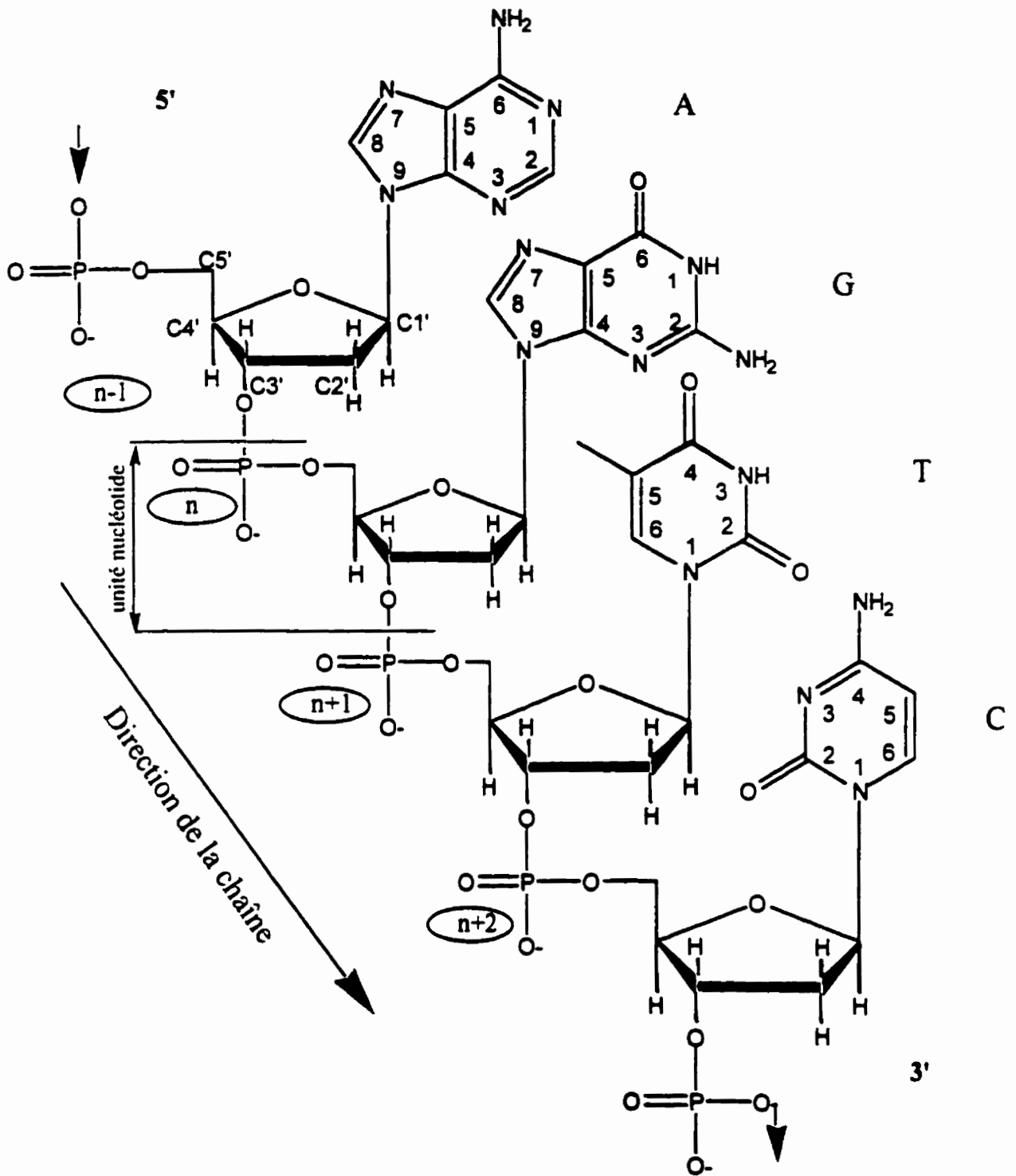


Figure 1 : Enchaînement des bases A, G, T et C d'un fragment d'ADN

On retrouve dans l'ADN quatre types différents de nucléotides, ne variant que par la base azotée. Les bases adénine et guanine appartiennent à la famille des purines et on les retrouve à la fois dans l'ADN et l'ARN. Les bases cytosine, thymine et uracile font parties de la famille des pyrimidines. La thymine est remplacée par l'uracile (U) dans l'ARN. L'uracile est semblable à la thymine, mais elle ne possède pas de groupement méthyle en C5. Par exemple, pour un même fragment d'ARN dans la figure 1, on remplacerait T par U et on retrouverait un groupe hydroxyle (-OH) en position C2'. En général, tous les atomes des bases pyrimidine et purine sont dans un même plan. Les bases sont reliées à l'unité furanose - phosphate par une liaison covalente entre la position C1' du furanose et les atomes N1 et N9 des bases dans les cas respectifs des pyrimidines et des purines.

Les différents nucléotides sont reliés entre eux par une liaison covalente 3',5'-phosphodiester, les chiffres indiquant les positions impliquées sur le furanose ainsi que la direction de la chaîne. Dans l'ADN, les deux hélices sont dans des directions opposées (5'-3' et 3'-5'), dites antiparallèles. Les « primes » (') sont utilisés pour distinguer les atomes des furanose de ceux des bases.

L'agencement des paires de bases entre les deux brins de l'hélice d'ADN résulte de l'effet des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires (voir figure 2). L'adénine et la thymine sont reliées par deux liaisons hydrogène. La cytosine et la guanine sont reliées de manière similaire, mais cette fois avec trois liaisons hydrogène entre les deux composantes. Dans chacun de ces arrangements, une base purine (deux cycles) est associée à une base pyrimidine (un cycle), ce qui confère un diamètre uniforme à la molécule d'ADN. Ce sont donc les liaisons hydrogène qui maintiennent les deux brins de l'hélice ensemble. L'énergie des paires donneurs - accepteurs formées se situe entre 5 et 25 Kj/mol, ce qui signifie que ces paires peuvent être séparées assez facilement.

Le squelette de l'ADN, soit la séquence furanose - phosphate, est chargé négativement, d'où la présence de contre-ions sodium ou potassium dans la structure. Cet enchaînement est également

responsable de la structure tridimensionnelle en forme d'hélice. De façon naturelle, les polynucléotides comme l'ADN ou l'ARN s'associent en hélice double de type Watson-Crick. Pour des polynucléotides synthétisés en laboratoire, on rencontre aussi des hélices doubles, mais il est également possible d'observer des hélices triples ou quadruples. Ces polynucléotides de synthèse sont conçus de façon à obtenir une séquence de nucléotides précise, ce qui rend la formation de structures tridimensionnelles particulières possibles.

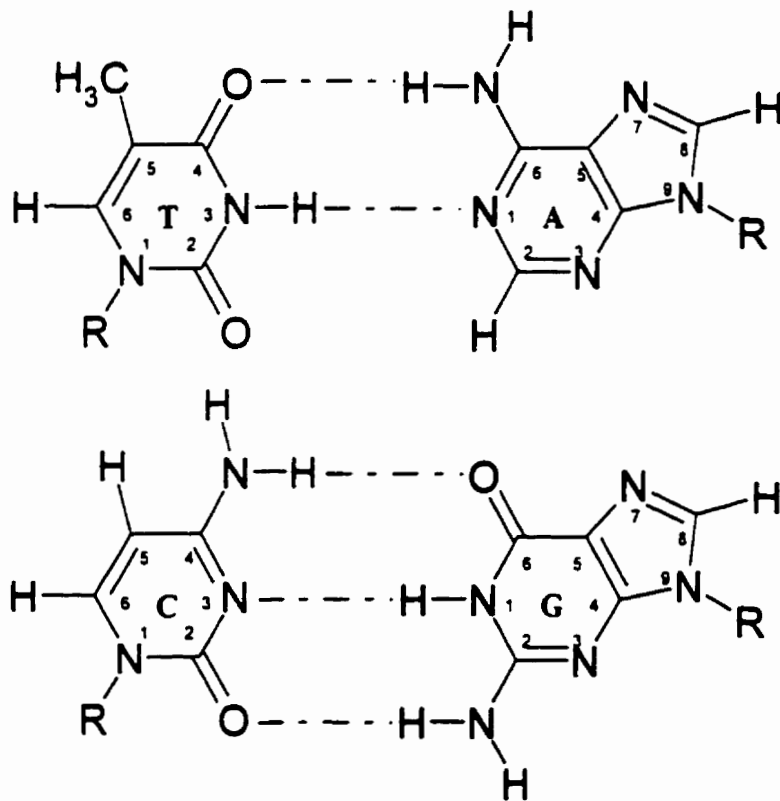
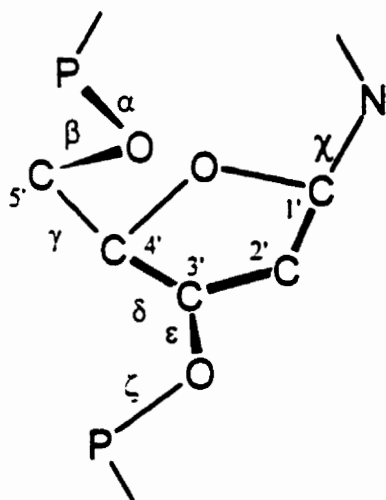


Figure 2 : Structure des paires de bases de l'ADN⁶

1.2 Les conformations des polynucléotides

Même si la double hélice d'ADN peut paraître inerte et rigide, elle est en fait très variable au niveau chimique et structural et elle peut adopter diverses conformations selon les conditions. La conformation d'un polynucléotide peut être décrite à l'aide de trois paramètres : la géométrie de l'unité furanose - phosphate, la conformation *syn-anti* de la liaison glycosidique et l'orientation de la liaison C4'-C5'. Les atomes des cycles furanose des ribo- ou désoxyribonucléotides ne se retrouvent jamais dans le même plan. Les conformations de ces cycles sont définies par les angles de torsion α , β , γ , δ , ϵ et ζ . Un angle de ce type est décrit dans un ensemble à quatre atomes A-B-C-D comme étant l'angle dièdre formé par les liaisons A-B et C-D lorsque l'on regarde le long de l'axe B-C. La figure 3 présente les angles de torsion ainsi que les atomes impliqués dans la définition de ces angles.



Angle de torsion	Atomes impliqués
α	${}^{(n-1)}\text{O3}'\text{-P-O5}'\text{-C5}'$
β	$\text{P-O5}'\text{-C5}'\text{-C4}'$
γ	$\text{O5}'\text{-C5}'\text{-C4}'\text{-C3}'$
δ	$\text{C5}'\text{-C4}'\text{-C3}'\text{-O3}'$
ϵ	$\text{C4}'\text{-C3}'\text{-O3}'\text{-P}^{(n+1)}$
ζ	$\text{C3}'\text{-O3}'\text{-P-O5}'^{(n-1)}$
χ	$\text{O4}'\text{-C1}'\text{-N1}'\text{-C2}'$ (pyrimidines) $\text{O4}'\text{-C1}'\text{-N9}'\text{-C4}'$ (purines)

Figure 3 : Définition des angles de torsion dans les nucléotides⁷

Si tous les atomes des cycles furanose étaient dans le même plan, ces cycles seraient dans un état énergétiquement défavorable, car tous les angles de torsion égaleraient 0° et les substituants attachés aux atomes de carbone seraient éclipsés. Le système réduit son énergie en adoptant préférentiellement certaines conformations. La figure 4 présente la courbe de l'énergie relative du furanose en fonction de l'angle δ . Sur cette figure, il y a deux minima d'énergie, dont un à un angle de 82° et l'autre à 144° . Ces deux valeurs correspondent respectivement à des conformations $C3'$ -endo et $C2'$ -endo du furanose. Le terme *endo* signifie que l'atome en jeu est du même côté que l'atome $C5'$, tel que représenté à la figure 5. Les différentes conformations du furanose amènent certaines variations au niveau de la distance séparant des groupements phosphate adjacents dans une chaîne de polynucléotide. Par conséquent, l'arrangement hélicoïdal des hélices sera macroscopiquement différent.

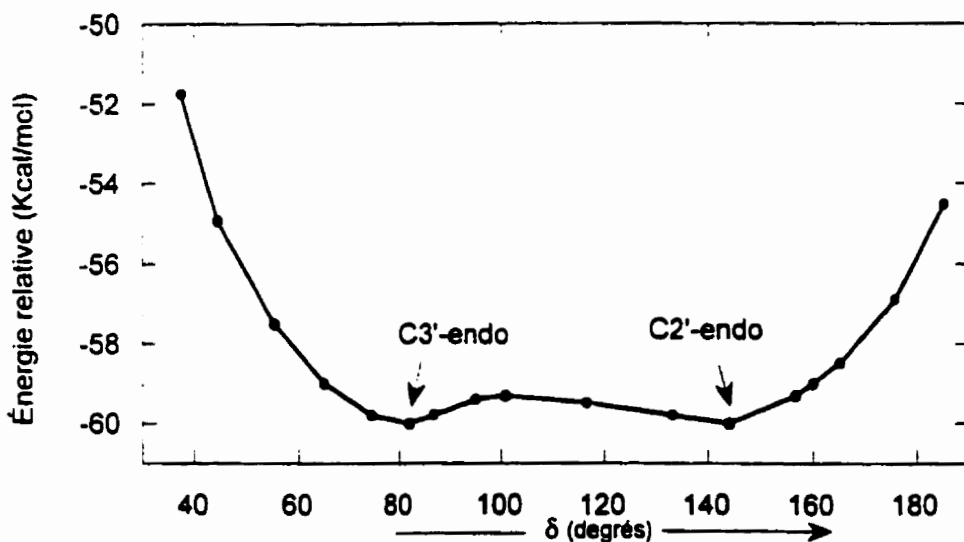


Figure 4 : Énergie potentielle du furanose en fonction de l'angle δ ($35^\circ \leq \delta \leq 185^\circ$)⁸

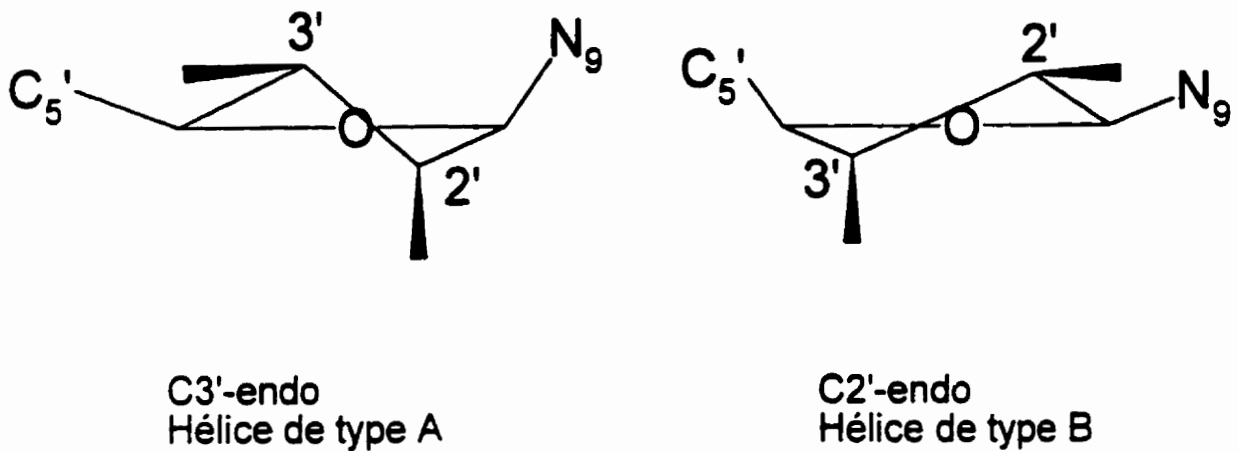


Figure 5 : Représentation des conformations C3'-endo et C2'-endo du furanose⁷

La base peut adopter deux orientations principales par rapport au furanose, soit celles *syn* et *anti*, définies par l'angle de torsion χ (voir figure 3). Sous la forme *anti* (valeur de l'angle χ entre 90° et -90° , sens anti-horaire), la base pointe vers l'extérieur du désoxyribose, alors que sous la forme *syn* (valeur de l'angle χ entre -90° et 90° , sens horaire), la base se retrouve au-dessus du furanose (figure 6). Les interactions et l'encombrement stérique seront plus importants dans ce dernier cas. La conformation préférentiellement adoptée par la base par rapport au furanose sera donc *anti*.

La rotation autour de la liaison C4'-C5' permet à l'atome O5' d'assumer différentes positions par rapport au furanose (figure 7). C'est l'angle de torsion γ (voir figure 3) qui définit cette orientation. Il y a une similitude entre la rotation χ et γ . Dans les positions *syn* et +sc, la base et l'atome O5' sont situés au-dessus du furanose, alors que dans les positions *anti*, -sc ou +ap, la base et l'atome O5' sont dirigés vers l'extérieur du furanose.

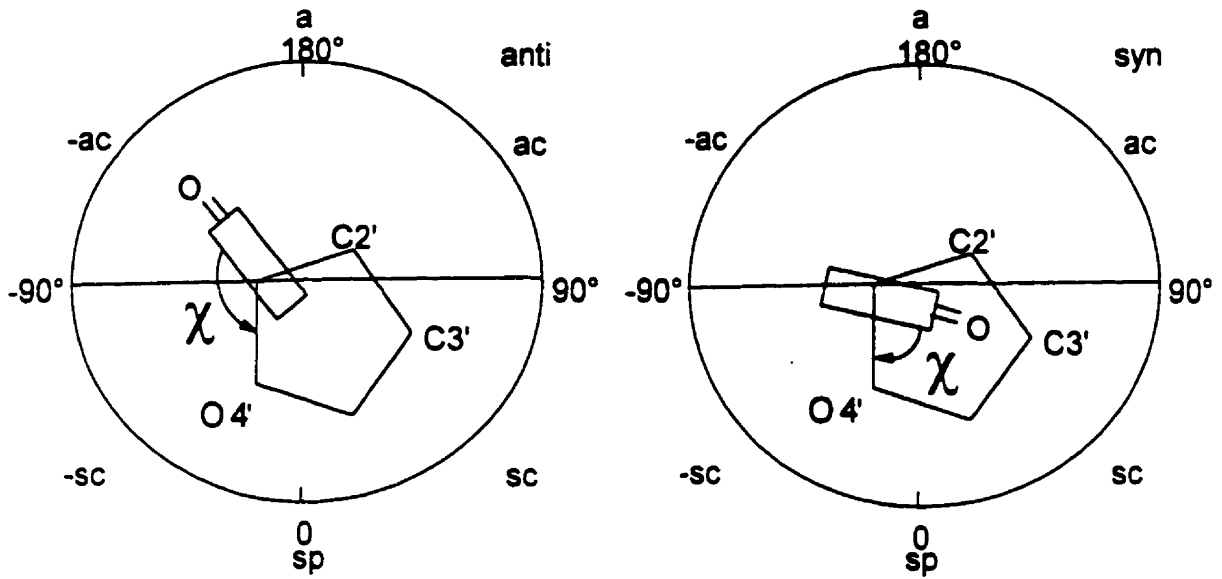


Figure 6 : Orientation de la base par rapport au furanose⁹

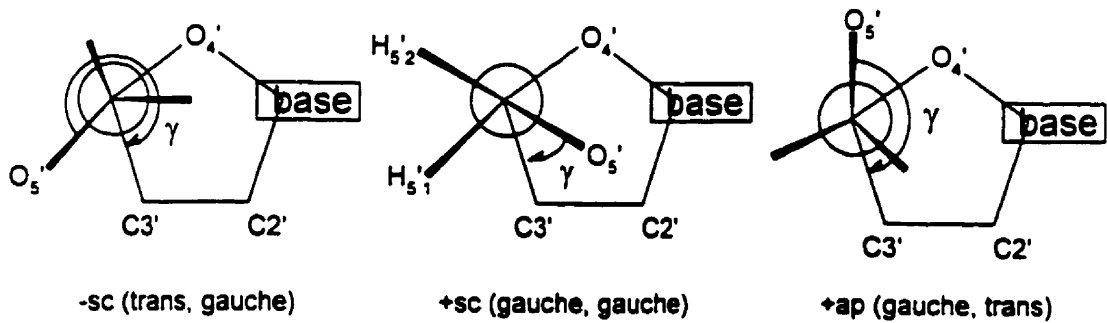


Figure 7 : Définition de l'angle de torsion autour de la liaison $C4' \rightarrow C5'$, en regardant le long de l'axe $C4' \rightarrow C5'$ ⁷

Lorsqu'un furanose adopte une conformation *C3'-endo-anti*, on le classe dans la famille A des polynucléotides. S'il adopte la conformation *C2'-endo-anti*, il appartient à la famille B. Les polydésoxyribonucléotides (type ADN) adoptent les conformations *C3'-endo-anti* (A) et *C2'-endo-anti* (B) alors que de façon générale pour les polyribonucléotides (type ARN), seule la conformation *C3'-endo-anti* (A) a été répertoriée, car le groupement hydroxyle en position C2' empêche la formation de l'autre conformation. La conformation Z, quant à elle, a été détectée pour la première fois par Pohl et coll.¹⁰ en 1972 chez le polymère synthétique poly(dG-dC) · poly(dG-dC). Des calculs théoriques suggèrent que cette structure résulterait de l'attraction électrostatique favorable entre l'anion phosphate et le groupement amino en C2 des bases guanine, ce qui favoriserait la position *syn* de ces bases (*C3'-endo-syn*). Quant à la base cytosine, elle conserverait la conformation *C2'-endo-anti*. Une hélice de type Z s'enroule vers la gauche, alors que pour les polynucléotides des familles A et B, les hélices s'enroulent vers la droite. Les tableaux suivants présentent les caractéristiques des hélices de type A, B et Z. Voir la figure 8 pour les représentations de ces mêmes conformations.

Tableau 1 : Paramètres hélicoïdaux caractéristiques des polynucléotides appartenant aux familles A, B et Z.

	Famille A	Famille B	Famille Z
Conformation du furanose	<i>C3'-endo-anti</i>	<i>C2'-endo-anti</i>	<i>G:C3'-endo-syn</i> <i>C:C2'-endo-anti</i>
Sens d'enroulement de l'hélice	droite	droite	gauche
Pas hélicoïdal (Å) [P]	28,2	33,7	45
Hauteur axiale par résidu (Å) [h]	2,56	3,37	3,7
Nombre de résidu par tour	11	10	12
Degré de rotation par résidu (angle de torsion) (Å) [θ_T]	32,7	36,0	-30
Angle entre le plan des paires de bases et l'axe de l'hélice (°) [θ_P]	20	-6	-7
Angle dièdre entre le plan des bases (°)	16	---	---
Diamètre de l'hélice (Å)	20	19,3	18
Dislocation (Å) [D]	4,7	-0,14	---

Tableau 2 : Valeurs des largeurs et hauteurs (en Å) des sillons majeurs et mineurs dans la double hélice des polynucléotides.

	Famille A	Famille B	Famille Z
<u>Sillon majeur</u>			
largeur	2,7	11,7	2,0
hauteur	13,5	8,5	13,8
<u>Sillon mineur</u>			
largeur	11	5,7	8,8
hauteur	2,8	7,5	3,7

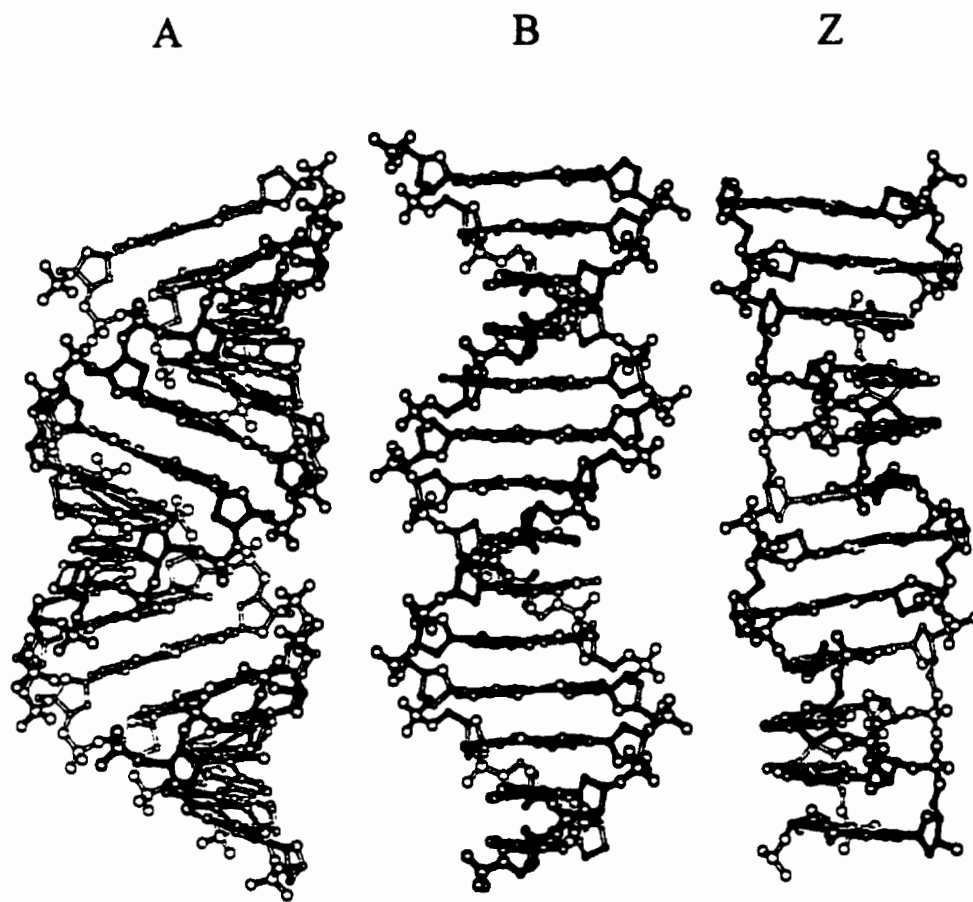
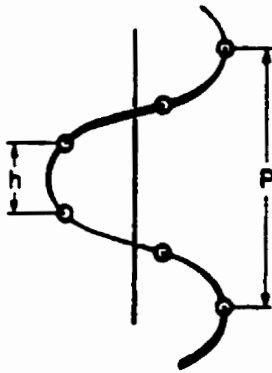


Figure 8 : ADN de type A (*C3'-endo-anti*), B (*C2'-endo-anti*) et Z (G : *C3'-endo-syn* et C : *C2'-endo-anti*)

Les informations recensées dans les tableaux 1 et 2 démontrent qu'il n'y a pas seulement la conformation du furanose qui importe pour définir le type d'hélice. Il faut également tenir compte des paramètres hélicoïdaux qui découlent des liaisons hydrogène qui relient les paires de bases entre elles : nombre de paires de bases par tour, inclinaison (angle entre la paire de bases et l'axe de l'hélice) et torsion (angle dièdre entre les plans des bases appariées) des paires de bases, angle de rotation des résidus, diamètre de l'hélice et nature des sillons. La figure 9 présente quelques paramètres hélicoïdaux.



θ_p : angle dièdre entre les plans des bases
 θ_T : angle entre le plan des bases et l'axe de l'hélice
D : dislocation, **P** : pas hélicoïdal
h : hauteur axiale par résidu
t : angle de torsion

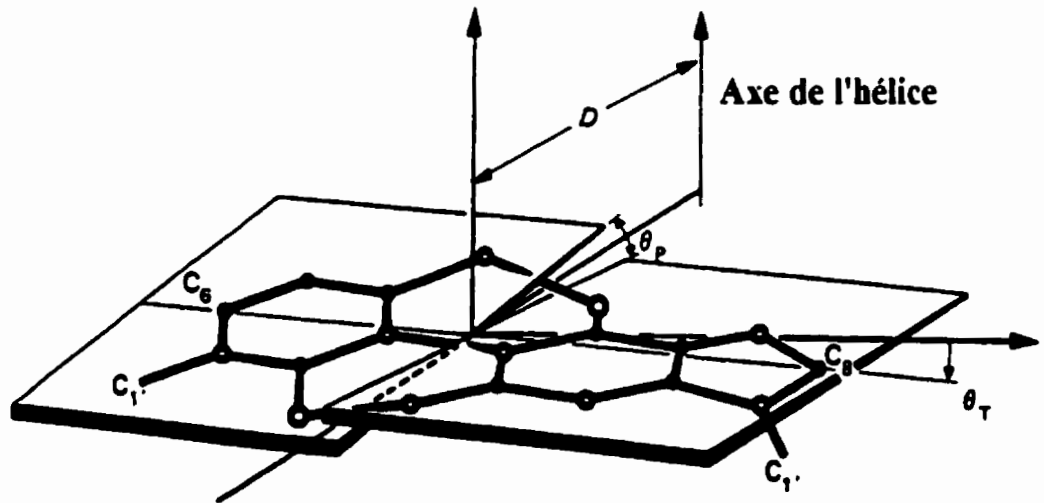
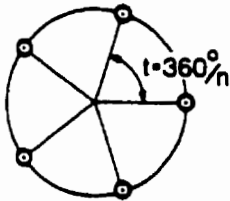


Figure 9 : Paramètres hélicoïdaux des polynucléotides

Dans l'ADN de type B, le sillon majeur est large et le sillon mineur est étroit. Dans les deux cas, les sillons sont modérément profonds et bien solvatés par les molécules d'eau. Des études approfondies par diffraction des rayons X de cristaux d'ADN ont démontré qu'à l'intérieur de la famille B, la configuration locale variait fortement en fonction de la séquence des bases. Dans l'ADN de type A, les paires de bases ont un angle d'inclinaison différent de celui dans la forme B et elles sont déplacées par rapport à l'axe de l'hélice. Il en résulte une hélice rigide avec peu de variation en fonction de la séquence des paires de bases. Le sillon majeur est profond et étroit alors que le sillon mineur est large et peu étroit. Le squelette de l'ADN de type Z est plus irrégulier que celui de la forme B. Les deux sillons qui courent le long des flancs de l'hélice B sont remplacés par un petit sillon unique et profond : les atomes qui définissent le grand sillon de l'ADN sous sa forme B se trouvent à la surface de la double hélice Z.¹¹ La caractéristique *syn-anti* alterne de façon régulière le long du squelette de l'hélice et, par conséquent, les groupements phosphate suivent une course en zigzag, d'où le nom de ce type d'ADN (Z).

Les séquences d'ADN sont donc identifiables par la nature des bases qui les composent et par les diverses géométries qu'adoptent les composantes. De plus, il est important de noter que des polymères de même composition, mais possédant des séquences différentes, peuvent avoir des propriétés structurales différentes.

1.3 La spectroscopie Raman

En 1928, C. V. Raman ainsi que son collègue K. S. Krishnan documentèrent le phénomène de diffusion inélastique de la lumière.¹² Ces physiciens avaient découvert que la longueur d'onde d'une petite fraction (0,001%) de la lumière diffusée par certaines molécules différait de celle du rayon incident et que le déplacement en longueur d'onde dépendait également de la structure chimique des molécules responsables de cette diffusion. C'est en convergeant les rayons du soleil, à l'aide d'un objectif de télescope et d'une deuxième lentille, sur différents échantillons

purs de liquides ou de gaz et en utilisant un système de filtres complémentaires entre l'échantillon et l'observateur qu'ils ont pu détecter une modification dans la radiation diffusée. À la fin des années 1930, la spectroscopie Raman - nommée d'après son découvreur - était devenue la principale méthode d'analyse chimique non-destructive. Cependant, après la Seconde Guerre Mondiale, cette méthode a été supplantée par la spectroscopie infrarouge, qui est devenue la technique la plus utilisée dû à un développement rapide de l'électronique et de détecteurs efficaces. Ce n'est que dans les années 1960, avec l'avènement des lasers, que des chimistes et des biochimistes reprirent de l'intérêt envers la spectroscopie Raman pour fins d'analyse structurale.

Il existe suffisamment de différence entre les vibrations qui sont actives en infrarouge et celles qui le sont en spectroscopie Raman pour que les deux techniques soient complémentaires plutôt que compétitives.¹³ Ces différences ne sont pas étonnantes si l'on considère que dans les deux cas, même si les modes de vibration sont les mêmes, les mécanismes d'interaction entre les photons et les molécules sont différents. La diffusion Raman résulte de la distorsion momentanée du nuage électronique d'une liaison par la lumière incidente, suivie de la ré-émission de la radiation après excitation d'une vibration ou rotation. L'effet implique la polarisabilité des molécules, qui est définie comme étant la facilité avec laquelle le nuage électronique peut être déformé par un champ électrique. Lorsque le champ électrique de la radiation interagit avec le nuage électronique d'un groupement quelconque, cela induit un moment dipolaire (μ) dont l'amplitude est fonction du champ électrique (E) associé au photon et de la facilité avec laquelle le nuage peut être déformé. On peut donc écrire l'équation suivante¹⁴:

$$\mu = \alpha E$$

où μ est le moment dipolaire induit et α est la polarisabilité de la molécule.

Si un faisceau de radiation monochromatique oscillant à une fréquence ν_{α} traverse un échantillon, le champ électrique (E) subit par chaque molécule est donné par

$$E = E_0 \sin(2\pi\nu_{\alpha}t)$$

Le moment dipolaire induit va donc osciller à la fréquence ν_{ex}

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \sin(2\pi\nu_{ex}t)$$

Comme la molécule peut simultanément subir des mouvements de rotation et de vibration, la polarisabilité de la molécule changera avec le temps :

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{vib}t)$$

où α_0 est la polarisabilité à l'équilibre et β est le taux de changement de la polarisabilité pendant la vibration. On obtient donc le moment dipolaire suivant :

$$\mu = [\alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{vib}t)] E_0 \sin(2\pi\nu_{ex}t)$$

La trigonométrie définit l'identité suivante :

$$\sin a \sin b = \frac{1}{2}[\cos(a-b) - \cos(a+b)]$$

Lorsque l'on applique cette identité, le moment dipolaire induit devient :

$$\mu = \alpha_0 E_0 \sin(2\pi\nu_{ex}t) + \frac{1}{2} E_0 \beta [\cos 2\pi(\nu_{ex} - \nu_{vib})t - \cos 2\pi(\nu_{ex} + \nu_{vib})t]$$

Le premier terme de l'équation indique que le dipôle oscillant peut émettre à la même longueur d'onde que la source d'excitation (ν_{ex}). Cette radiation, nommée Rayleigh, est par conséquent très intense. Les deuxième et troisième termes caractérisent l'effet Raman et correspondent aux fréquences Stokes ($\nu_{ex} - \nu_{vib}$) et anti-Stokes ($\nu_{ex} + \nu_{vib}$). Pour obtenir ces termes $[(\nu_{ex} \pm \nu_{vib})]$, il faut que β soit différent de zéro, ce qui veut dire qu'il doit absolument y avoir une variation de la polarisabilité de la molécule au cours de la vibration. Ce changement peut être en grandeur ou en direction.

La spectroscopie Raman est particulièrement bien adaptée à l'étude des conformations de systèmes biologiques comme les protéines et les polynucléotides. Dans les premiers travaux visant à caractériser la structure des polynucléotides, on retrouve les études menées par Erfurth et

Peticolas.^{15,16} Les fréquences et intensités de certaines bandes Raman peuvent en effet être des indicateurs de la conformation prévalant dans un polynucléotide. Le tableau 3 présente une série de changements qui surviennent dans les spectres Raman des polynucléotides contenant les bases guanine et cytosine lors du passage d'une conformation à une autre.

Les avantages importants de la spectroscopie Raman reposent sur le fait que l'eau ne cause pas ou peu d'interférences, ce qui permet d'obtenir des spectres de solutions aqueuses. De plus, des cellules de verre ou de quartz peuvent être utilisées, évitant ainsi les inconvénients liés à l'utilisation de fenêtres de sel (infrarouge). La technique ne requiert qu'une très petite quantité d'échantillon, qui peut être sous la forme solide, liquide ou gazeux.

Tableau 3 : Changements spectraux observés en spectroscopie Raman pour les polynucléotides contenant les bases guanine (G) et cytosine (C) lors du passage d'une conformation à une autre.¹⁷

Attribution	FD	B→FD	A	B→A	B	B→Z	Z
<i>C3'-endo-syn</i>	---	---	---	---	---	aug.	625
<i>C3'-endo-anti</i>	---	---	665	aug.	---	---	---
<i>C2'-endo-anti</i>	680	aug.	---	dim.	680	dim.	---
sq, C	782	---	783	---	784	dep.	784
<i>C3'-endo</i>	---	---	808	aug.	---	aug.	810 ep
<i>C2'-endo</i>	n. d.	aug.	---	dim.	829	dim.	n. d.
sq	---	---	852	aug.	---	aug.	855
PO ²⁻ , sq	1094	---	1100	---	1094	dim.	1094
G, C	---	---	1180	---	1180	dim./sep.	1180
	---	---	---	---	---	---	1188
C	1220 ep	dim. l.	1218	dim.	1218	dim.	1213
C	1240	aug.	1242	aug. l.	1240 ep	aug./dep.	1246
C	1255	aug.	1252	aug.	1260	aug./dep.	1265
C	1292	---	1295 ep	dim. l.	1293	---	1291
G	1320	aug.	1314	aug./dep.	1318	aug.	1317
G	1333 ep	dim. l.	n. d.	dim.	1334	---	n. d.
G	1361	dim. l.	1361	dim. l.	1362	dim./dep.	1355
G	---	---	1388	app.	---	---	---
sq, G, C	1416	dep.	1417	dep.	1420	sep.	1417
sq, G, C	---	---	---	---	---	---	1426
G	1486	---	1482	dep.	1489	---	1486
C	1528	aug.	---	---	---	---	---
G	---	---	1574	dep.	1578	---	1578

FD : Forme désordonnée, sq : squelette, dim. : diminution d'intensité, aug. : augmentation d'intensité, dep. : déplacement en fréquence, ep : épaulement, l. : léger changement d'intensité, app. : apparition, sep. : séparation

1.4 Objet de la présente étude

L'objet de notre recherche a porté sur l'étude, par spectroscopie Raman, du thermotropisme de polynucléotides synthétiques comportant les bases guanine (G) et/ou cytosine (C) de même que dans une faible proportion sur un polynucléotide synthétique comportant les bases adénine (A) et thymine (T). Pour tous ces polymères, il existe une dépendance entre la composition en nucléotides et la stabilité thermique. Par exemple, la double hélice d'ADN ou d'ARN présente des régions riches en paires A-T (U), qui fondent à des températures inférieures à celles des régions riches en paires G-C. Cela est dû au fait que les paires de bases G-C sont plus stables (trois liaisons hydrogène) que les paires de bases A-T (deux liaisons hydrogène). Les polynucléotides ne comportant que les bases G et/ou C forment des complexes particulièrement stables par association, certains ne se dissociant qu'à des températures supérieures à 100°C. L'étude du thermotropisme de polynucléotides à de telles températures a été très longtemps limitée parce que la solution aqueuse atteignait son point d'ébullition avant que n'ait lieu la dissociation du complexe, ce qui rendait la prise des mesures impossible dans des conditions normales de pression. Seules quelques études par spectroscopie UV avaient été menées, en utilisant un montage comprenant une cellule pressurisée.¹⁸ Pour faire l'étude de solutions aqueuses à des températures supérieures à 100°C par spectroscopie Raman, une méthode simple a été mise au point antérieurement au laboratoire.¹⁹ En effet, c'est par l'intermédiaire d'un capillaire scellé contenant les polynucléotides et inséré dans un porte-échantillon pouvant atteindre 200°C que des mesures inédites ont pu être obtenues.

Dans notre étude, nous avons évalué la stabilité thermique de trois polymères différents, ayant en commun les bases guanine et cytosine. Nous nous sommes également intéressés à la structure de ces polynucléotides à partir de leurs spectres. Dans un premier temps, lors d'un travail entamé à l'été 1997, nous avons étudié le complexe de poly(G) · poly(C) en présence de différents sels à diverses concentrations. Nous avons déterminé les points de fusion de ce polynucléotide pour les différentes conditions et le type d'association formée après la dissociation de la double hélice.

Par la suite, nous avons identifié pour le polymère non alterné poly(dG) · poly(dC) le type de conformation majoritaire à la température de la pièce (ainsi qu'à plus basse température), et déterminé ses températures de prétransition et de fusion. De plus, nous avons étudié le comportement spectral du poly(dA) · poly(dT) pour fin de comparaison avec le poly(dG) · poly(dC). Enfin, nous avons étudié le complexe de poly(dG-dC) · poly(dG-dC), qui se présente sous la forme d'une hélice de type B ou Z suivant la force ionique des solutions. Nous avons déterminé pour ce complexe les températures de transition entre la forme B et la forme Z et entre cette dernière et la forme désordonnée (fusion) à différentes concentrations ioniques.

Nos mesures sur ces systèmes en solutions salines de différentes concentrations ont été motivées par le fait qu'il existe une relation entre la concentration ionique du milieu et la stabilité thermique des complexes. Marmur et Doty²⁰ ont clairement démontré cette relation à l'aide d'ADN de *E. Coli*. D'après les résultats qu'ils ont obtenus, la stabilité thermique augmente lorsque la concentration en sel monovalent (en l'occurrence KCl) augmente.

CHAPITRE II

2 PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE

2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons (tous sous forme de sel de sodium) de poly(G) - poly(C), poly(G), poly(C), poly(dG-dC) - poly(dG-dC), poly(dG) - poly(dC) et de poly(dA) - poly(dT) provenaient de chez Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Canada). Quelques échantillons de poly(G) · poly(C) et de poly(G) ont été dialysés (montage en téflon provenant de chez Sialomed, Inc., Columbia, MD, USA). Les autres ont été utilisés sans purification supplémentaire. Des solutions de 2 et 4 % en poids ont été préparées en dissolvant respectivement 2 et 4 mg de polynucléotide dans 100 µl d'eau déminéralisée contenant divers sels à des concentrations de 0,1 à 5 M. Le pH de ces solutions a été mesuré avec une microélectrode reliée à un pH-mètre (Orion, model 721). En général, les solutions des polynucléotides achetés chez Sigma-Aldrich possédaient un pH de *ca.* 7.5 et étaient utilisées telles quelles. Cependant, le pH des échantillons achetés en quantité supérieure à 5 unités (1 unité est égale à une absorbance de 1,0 à une longueur d'onde de 260 nm dans 1 ml) était ajusté à 7,0 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1 M. Pour leur étude, les échantillons aqueux étaient contenus dans des capillaires à point de fusion en Pyrex (diamètre extérieur = 1,5 mm). Ces capillaires étaient remplis à une hauteur de 0,5 à 1 cm avec la solution et scellés 5 mm au-dessus du liquide, avec une torche miniature.

2.2 Le spectrophotomètre Raman

Les spectres Raman ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Raman (Spex, modèle 1401) contrôlé par micro-ordinateur. Une caméra CCD (Photometrics Ltd., détecteur EEV CCD-05-X, comprenant 1152 x 298 pixels) refroidie thermoélectriquement à -63°C est annexée à ce spectrophotomètre. Le bruit thermique diminuant de moitié à chaque chute de 6°C , ceci nous permettait d'obtenir des spectres avec un bon rapport signal sur bruit. La caméra CCD a remplacé le photomultiplicateur qui était utilisé auparavant.²¹ La longueur d'onde d'excitation du laser à l'argon ionisé (Spectra Physics, modèle 2020) était de 514,5 nm. Les spectres ont été obtenus avec une puissance à l'échantillon de 400 mW à la température de la pièce et de 150 mW à des températures supérieures à 150°C . Les spectres couvraient une région spectrale de 2000 cm^{-1} ($1,6\text{ cm}^{-1}/\text{canal}$) lorsque le réseau de 300 lignes par millimètre était utilisé. Des corrections pour la non-linéarité de la courbe de détection de la caméra CCD et la transmission du filtre (Holographic edge filter, Kaiser Optical System, Inc., Ann Arbor, MI, USA) ont été réalisées à l'aide d'une lampe incandescente. La raie Rayleigh (raie d'excitation du laser), qui est jusqu'à un million de fois plus intense que les raies provenant de l'effet Raman, était éliminée à l'aide d'un filtre. L'étalonnage en fréquence a été fait en utilisant les raies d'émission d'une lampe au néon, avec une précision de $\pm 1\text{ cm}^{-1}$.²² L'uniformité dans les mesures des fréquences sur une petite plage spectrale (par exemple, lors de l'évaluation du déplacement des bandes) pouvait atteindre $\pm 0,2\text{ cm}^{-1}$. La fente d'entrée était ajustée à $60\text{ }\mu\text{m}$, ce qui donnait une résolution de 5 cm^{-1} . Le temps d'acquisition des spectres variait de 30 à 200 secondes. Le temps d'acquisition était généralement plus court pour les températures élevées, ceci pour éviter toute décomposition des échantillons.

Les figures 10 et 11 montrent le système optique d'illumination double ainsi que la vue intérieure du parcours optique dans le monochromateur. Pour une description plus approfondie de l'appareil, le lecteur peut se référer à l'article de Savoie et coll.²³

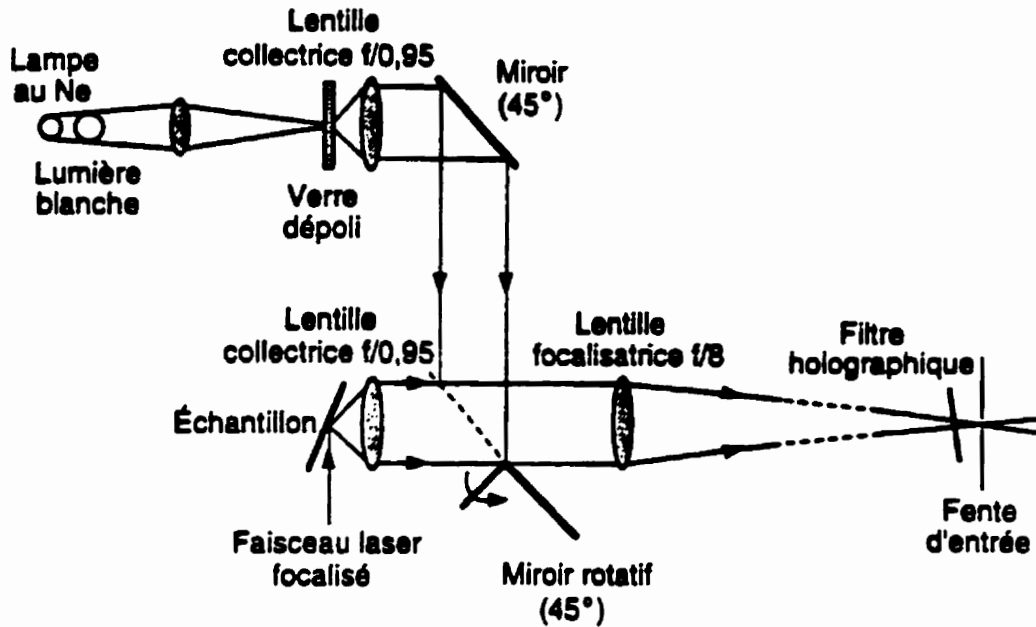


Figure 10 : Schéma optique du système d'illumination double utilisé pour le spectromètre Raman multicanal.

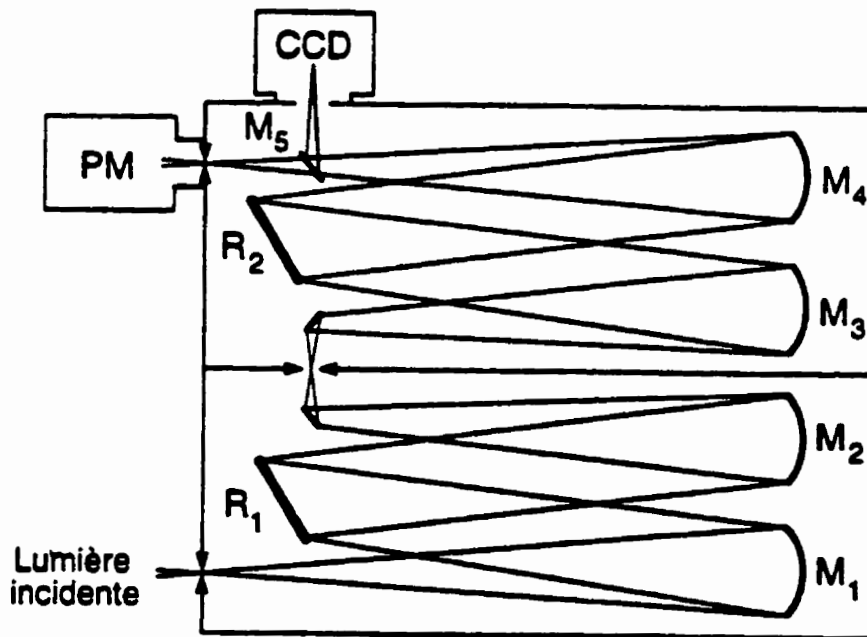


Figure 11 : Schéma du monochromateur double Spex 1401. Abréviations: M_1 à M_5 , miroirs; R_1 et R_2 , réseaux dispersifs, PM: tube photomultiplicateur; CCD: caméra CCD

2.3 Le porte-échantillon

Quelques systèmes ont été utilisés pour l'enregistrement de spectres Raman à des températures et pressions élevées.^{24, 25, 26} Le système en place au laboratoire est basé sur la technique de Bulmer et coll.²⁵ Le porte-échantillon est en fait un bloc de laiton dans lequel trois trous ont été percés le long d'axes orthogonaux (figure 12). Le capillaire est inséré au complet dans le premier trou horizontal. Les deux autres trous permettent le passage du faisceau laser à travers l'échantillon et le recouvrement de la radiation diffusée. C'est en ajustant le courant électrique (entre 0 et 10 ampères) qui traverse une résistance (140 Ω) imbriquée dans le bloc de laiton fixé à la base du porte-échantillon qu'il est possible d'atteindre des températures élevées (jusqu'à 200°C). Au fur et à mesure que la température de l'échantillon est augmentée, la solution demeure sous forme liquide, dû à l'effet d'« auto-pressurisation ». La température du porte-échantillon peut s'abaisser lentement en coupant l'alimentation en courant, et plus rapidement en soufflant de l'air avec un séchoir sur le bloc de laiton. Nous avons étalonné la température du porte-échantillon avec deux produits purs et solides (vaniline : MM = 152,15, pf = 81-83°C et acide citrique : MM = 192,12, pf = 152-154°C) ainsi qu'avec de l'eau à 100°C. Ce système relativement simple fonctionne très bien puisqu'il n'y a eu aucun bris de capillaire au cours des multiples expériences que nous avons effectuées, et ce même si la pression à l'intérieur des capillaires pouvait atteindre 10 atmosphères à 180°C. Toutefois, il a été quelquefois nécessaire de déplacer légèrement le capillaire avec une aiguille préalablement réchauffée, car des bulles d'air s'étant formées dans le liquide, cela laissait un espace vide dans le parcours du faisceau laser.

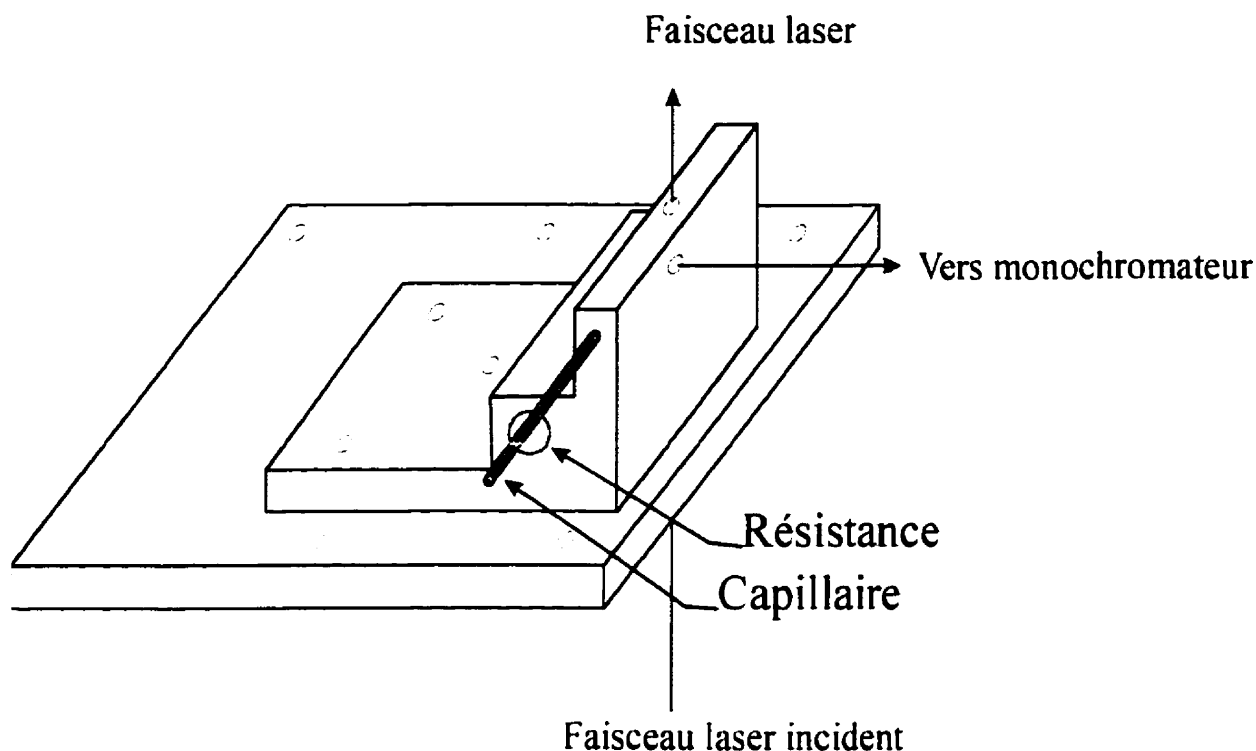


Figure 12 : Schéma du porte-échantillon utilisé au laboratoire

La température du porte-échantillon était mesurée avec un thermocouple et était contrôlée avec une précision de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Les divers étalonnages effectués ont permis de vérifier qu'il n'y avait pas de différence systématique de quelques degrés entre l'échantillon et le porte-échantillon. Dans ce genre d'expérience, un léger refroidissement aurait pu survenir à l'endroit où un trou a été percé dans le porte-échantillon pour permettre la détection du signal Raman. D'un autre côté, un réchauffement aurait pu survenir là où le faisceau laser traverse l'échantillon. Ces effets, surtout le dernier, sont difficiles à évaluer puisqu'ils dépendent de la nature de l'échantillon.

2.4 L'acquisition des données

L'acquisition et le traitement des spectres étaient contrôlés par ordinateur. La plupart des opérations ont été effectuées dans l'environnement du logiciel SpectraCalc (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, USA). L'acquisition des spectres et des photos de fond, la correction des pics parasites provenant de rayons cosmiques frappant le détecteur (spikes), l'étalonnage en fréquence à partir des raies du néon, la soustraction du bruit de fond et le calcul de la moyenne des photos individuelles étaient contrôlés par le programme principal. La caméra CCD était contrôlée par le programme CCD 9000 (Photometrics Ltd.). La programmation permettait d'éliminer automatiquement les pics parasites visibles sur les spectres. Cependant, le système n'étant pas infallible, toutes les photos étaient reprises une à une pour vérifier si des pics parasites n'auraient pas été oubliés par les moyens informatiques. D'autres tâches, comme le contrôle de la température du porte-échantillon, la rotation du miroir à 45°, l'ouverture et la fermeture de la lumière blanche et de celle au néon et l'ajustement du réseau étaient assurées par une carte informatique de fabrication locale.

Le spectre d'émission des raies du néon était enregistré au début de chaque expérience en vue de corriger les artefacts dus aux déplacements du réseau dispersif. Pour chaque spectre du néon enregistré, cinq spectres de la lampe incandescente étaient accumulés et leur moyenne calculée. Pour les spectres des échantillons, tout dépendant de la température, de 1 à 6 photos étaient recueillies chaque fois et leur moyenne calculée.

2.5 Exemple d'application

Le système décrit dans ce chapitre permet d'atteindre des températures supérieures à 100°C. Ceci présente un intérêt certain puisque la température de fusion de plusieurs polynucléotides synthétiques se situe au-delà de cette température. Auparavant, lorsque le capillaire n'était pas

scellé, la prise de spectres devenait difficile, voire impossible, dès 85°C dû à la formation de bulles d'air à l'intérieur du capillaire.

L'exemple qui suit concerne la fusion d'un échantillon d'ADN de thymus de veau (4 % en poids) provenant de chez Sigma-Aldrich. Il est connu depuis les années cinquante que la double hélice de l'ADN en solution aqueuse se dissocie coopérativement lorsque la température augmente. Comme nous l'avons vu précédemment, la température de fusion dépend du type d'ADN et du solvant.

Dans ce cas, l'échantillon a été chauffé de la température de la pièce jusqu'à 135°C à l'aide du porte-échantillon présenté à la section 2.3. La figure 13 regroupe des spectres à quatre températures différentes, en solution 0,5 M NaCl, dont deux au-dessous (25 et 60°C) et deux au-dessus de la température de fusion (90 et 135°C), déterminée à 88°C dans ces conditions.

Les spectres mettent en évidence le déplacement en fréquence et en intensité de certaines bandes. Notons sur les spectres une diminution de la bande à 834 cm^{-1} lorsque la température augmente, signe d'une dégradation de la conformation B lors de la perte de structure de la double hélice. De même, on voit sur les spectres une forte augmentation en intensité de la bande à 1235 cm^{-1} et une augmentation modérée de la bande à 1301 cm^{-1} . Quant à la bande à 1093 cm^{-1} , elle ne présente aucun changement lorsque la température augmente. Les changements spectraux observés lors de la fusion de l'ADN correspondent à ceux obtenus par Erfurth et Peticolas.²⁷ En fait, plusieurs chercheurs ont étudié l'ADN en présence d'ions alcalins (Na^+ , Li^+)²⁸, alcalino-terreux (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+})²⁹ et métalliques (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}).^{29, 30} L'idée générale ici n'est pas d'expliquer le comportement de chacune des bandes ni de discuter de la température de fusion mais plutôt de montrer la qualité des spectres obtenus, et ce même à des températures élevées (135°C). C'est cette même qualité des spectres qui nous permettra par la suite d'évaluer les changements qui ne se produisent qu'à haute température chez les polynucléotides synthétiques.

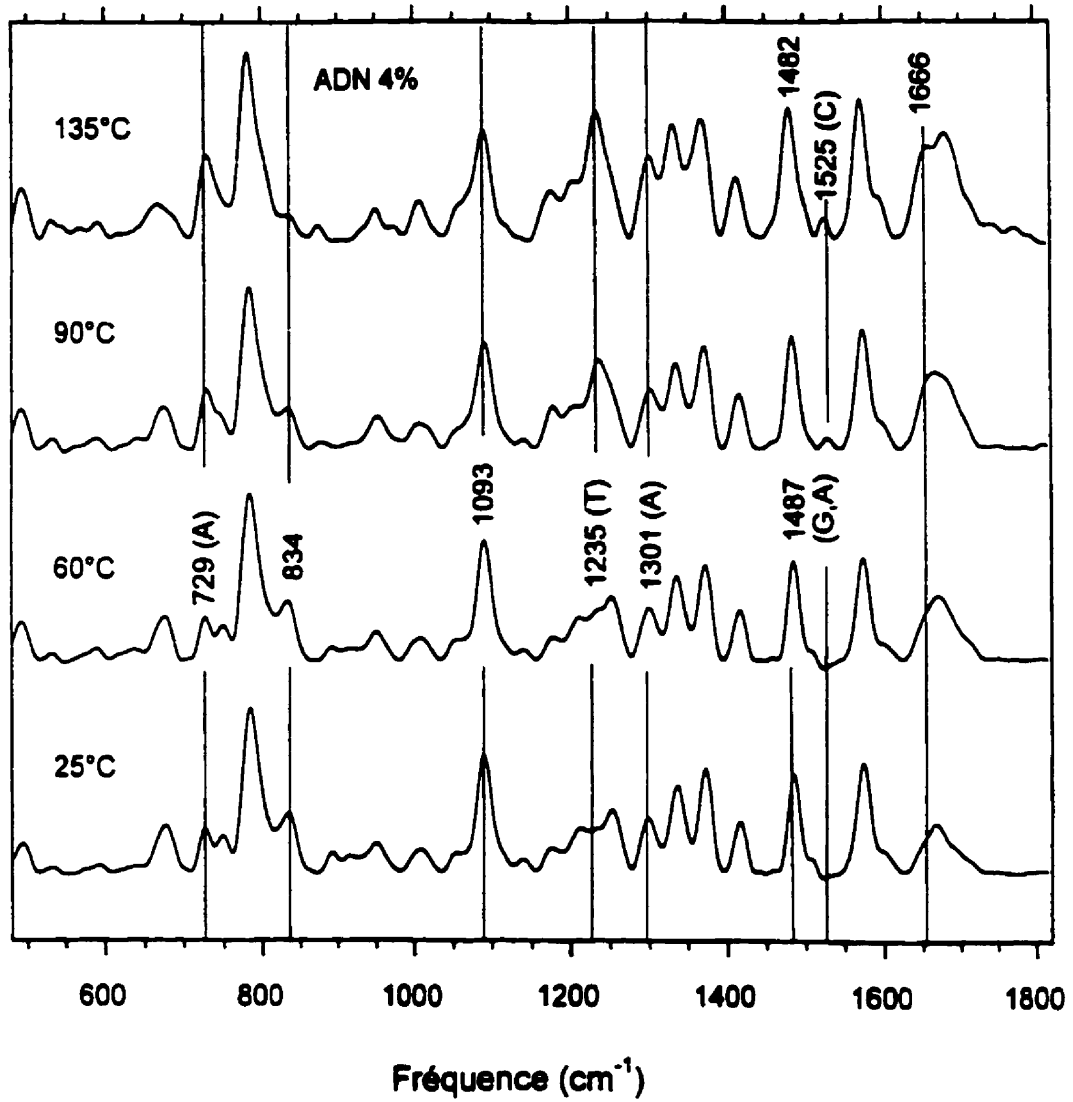


Figure 13 : Spectres Raman de l'ADN de thymus de veau (4 % en poids) à 25, 60, 90 et 135°C

CHAPITRE III

3 ACIDE POLYGUANYLIQUE-POLYCYTIDILIQUE [Poly(G) · Poly(C)]

3.1 Introduction

Suite à la détermination de la température de fusion du poly(G) par Mercier¹⁹, l'idée nous est venue d'étudier le thermotropisme de complexes contenant ce polymère. Les paires de bases guanine et cytosine sont, de façon générale, les paires de bases les plus fréquemment rencontrées dans l'ARN. L'étude du comportement spectral du complexe de poly(G) · poly(C) en relation avec sa structure est nécessaire puisqu'elle conduit à une meilleure compréhension de la structure de l'ARN. Le montage expérimental qui a été mis au point au laboratoire nous a permis de déterminer la dynamique de fusion du poly(G) · poly(C), à des températures supérieures à 100°C. Dans ce processus de dénaturation, les liens covalents du polynucléotide synthétique ne sont pas brisés. La transformation consiste plutôt en la séparation des deux brins de la double hélice. Comme le poly(G) · poly(C) se dissocie pour donner du poly(G) et du poly(C) lors de sa fusion, nous présentons plus bas quelques caractéristiques de chacun de ces polynucléotides.

3.1.1 L'acide polyguanylique-polycytidylique [Poly(G) · Poly(C)]

Le poly(G) · poly(C) forme un complexe extrêmement stable, dont la structure est formée d'une hélice double, hautement stabilisée par les trois liaisons hydrogène qui relient chacune des paires de bases. Nous étions intéressés à déterminer la température de fusion de ce polynucléotide, car

dans les études Raman précédentes^{31, 32} cette dernière n'a pu être observée, même à des températures aussi élevées que 90°C.

D'après Thiel et Gulschbauer³³, la formation de la double hélice pour des structures ne contenant que les bases guanine (G) et cytosine (C) n'est pas favorisée à des concentrations en sel inférieures à 1M. Ces auteurs préconisent alors la formation d'un mélange contenant à la fois des paires de bases C-C et G-C. Cependant, à la forte concentration en polynucléotide de 4 % en poids (0,08 M en phosphate) que nous avons utilisée, nous pensons que nous avons obtenu une association complète en double hélice.

3.1.2 L'acide polyguanylique [poly(G)]

Les informations qui suivent concernant le poly(G) sont importantes pour bien comprendre l'association en tétramère de ce composé. En effet, ce type d'association est un aspect clé de la recherche effectuée sur le poly(G) · poly(C), comme il le sera démontré subséquemment.

Plusieurs structures ont été proposées pour expliquer l'association du poly(G). Dès 1958, Rich et coll.³⁴ suggérèrent une hélice triple. Ensuite, Thiele et Guschlbauer³⁵ proposèrent une hélice quadruple enroulée à gauche. Ce modèle sera remplacé par une hélice parallèle enroulée à droite.³⁶ Les scientifiques reconnaissent maintenant le poly(G) comme étant associé en hélice droite à quatre brins, contenant des tétrades où chaque base est liée à ses voisins par des liaisons hydrogène de type N1...O-C6 et NH2...N7 (voir figure 14).^{36, 37} Le modèle indique que l'empilement parallèle des bases amène les atomes d'oxygène des carbonyles en C6 à proximité les uns des autres pour former un site de coordination par excellence pour les petits cations.^{38, 39} Des travaux de diffraction des rayons X ont démontré que le poly(G) appartient à la famille A des polynucléotides.⁴⁰ Cependant, Simard et coll.⁴¹ ont suggéré que certaines unités ribose du poly(G) associé en tétramère adopterait une conformation anormale reliée à la famille B des

polynucléotides plutôt qu'à la famille A, même si ce type de conformation (B) était auparavant considéré impossible dans un polyribonucléotide.

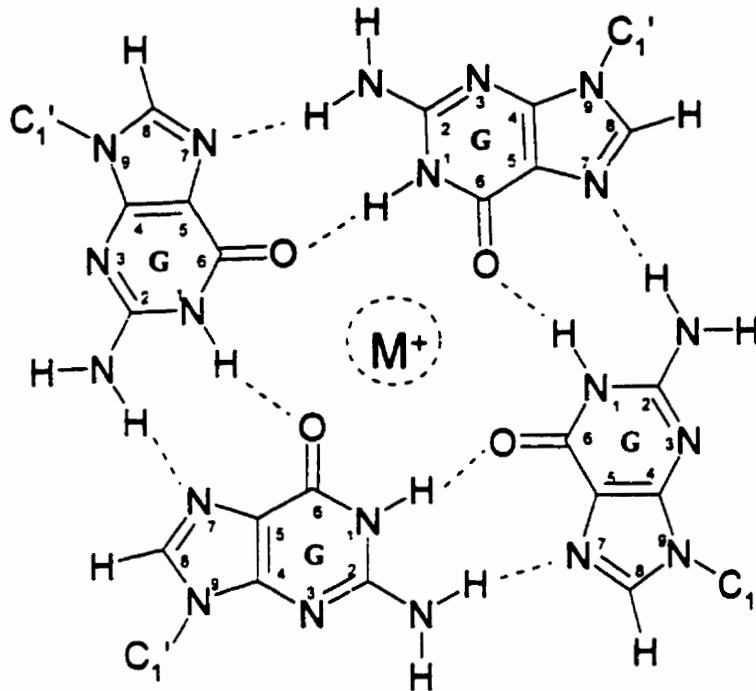


Figure 14 : Association prévalant dans le poly(G)

Le complexe de poly(G), extrêmement stable, ne fond pas au-dessous de 100°C à moins que des espèces déstabilisantes ne soient ajoutées à la solution.⁴² La température de la transition, estimée à plus de 100°C, n'avait pu être mesurée par spectroscopie avant l'étude réalisée au laboratoire par Mercier¹⁹, ce qui a permis d'obtenir de nouveaux résultats sur le comportement de ce polynucléotide à haute température. Quelques bandes spectrales caractéristiques, étudiées lors d'expériences menées par Audet et coll.⁴³ sur la guanosine monophosphate (5'-GMP), ont été utilisées pour identifier le phénomène de fusion du tétramère dans le poly(G). La figure 15 présente le spectre du poly(G) dans une solution de 0,5 M LiCl à 25 et 145°C.

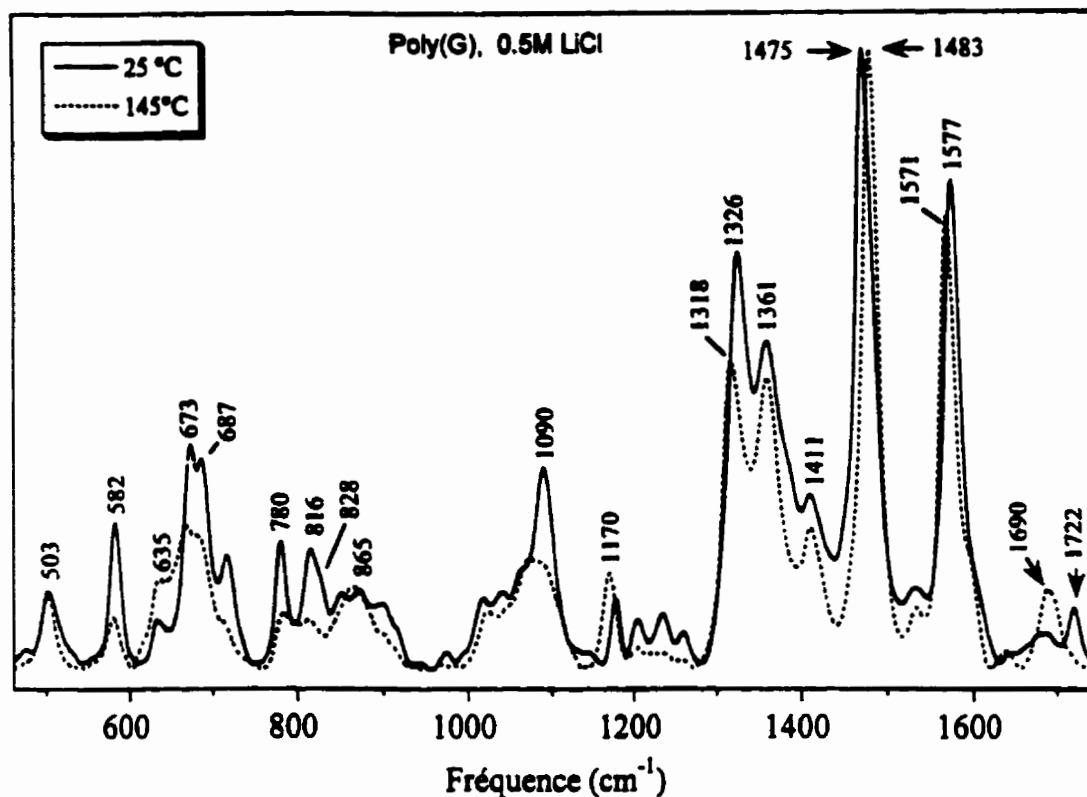


Figure 15 : Spectre Raman du poly(G) 0,5 M LiCl à 25°C et 145°C. Les spectres ont été normalisés par rapport à la bande à 1480 cm^{-1}

Il ressort de cette étude que la température de fusion (T_f) coopérative du poly(G) se produit à des températures élevées en présence de cations alcalins ($T_f = 129^\circ\text{C}$ pour 0,5 M LiCl, 135°C pour 0,5 M NaCl et 141°C pour 0,5 M KCl) et que la température de fusion diminue en présence d'espèces déstabilisantes ($T_f = 123^\circ\text{C}$ pour 0,1 M Me_4N^+ et 105°C pour 0,1 M Et_4N^+). De plus, une fois la température de fusion atteinte, le biopolymère se dissocie et se retrouve sous la forme d'un seul brin, ce qui le rend sensible à la dégradation. Malgré cela, la réapparition de la bande carbonyle à 1730 cm^{-1} lors du refroidissement de l'échantillon indique que l'hélice à quatre brins se reforme, du moins partiellement.

3.1.3 L'acide polycytidylique [Poly(C)]

Selon les conditions, le poly(C) existe sous la forme d'une hélice ordonnée simple ou double et sous la forme désordonnée (simple brin). Il appartient à la famille A des polynucléotides. Dans les solutions neutres, le poly(C) est sous la forme d'une hélice simple. Le squelette phosphodiester y est partiellement ordonné et le degré d'empilement des bases y est plutôt élevé.^{44,45} C'est la contrainte stérique à la rotation des liaisons du squelette phosphodiester, plutôt que les interactions entre les bases, qui confère au polynucléotide une structure ordonnée. L'ajout d'un proton au poly(C) (pK_a de 5,7 et de 3,0) résulte en la formation d'une double hélice. La stabilité thermique du poly(C) augmente lorsque le pH diminue et est maximale lorsqu'un proton est lié à chaque paire de bases. Une étude complète sur la dynamique de fusion du poly(C) dans un intervalle de pH de 6,6 à 4,1 a été menée par O'Connor et coll.⁴⁶ Dans notre cas, puisque nous avons travaillé à pH neutre, il n'y a pas eu d'effet de protonation et d'association. Les spectres que nous avons obtenus sont identiques à ceux obtenus par Chou et coll.⁴⁷ dans les mêmes conditions. Les changements en intensité des bandes Raman, représentatifs du désempilement thermique des bases, se produisent donc de façon progressive et non coopérative avec l'augmentation de la température.

3.2 *Partie expérimentale*

Les échantillons (4% en poids) ont été préparés en suivant la procédure décrite à la section 2.1. Le tableau 4 précise les concentrations en sel utilisées dans la présente étude. Pour chaque condition, trois expériences au moins ont été effectuées.

Tableau 4 : Concentration en sel utilisée pour l'étude du poly(G) · poly(C), poly(G) et poly(C).

	poly(G) · poly(C)	poly(G)	poly(C)
Concentration en sel	0,1 M NaCl † 0,5 M NaCl † 5 M NaCl 0,1 M TMAP**	0,5 M NaCl	0,5 M NaCl

† Certains échantillons ont été dialysés

** Tétraméthylammonium perchlorate

Dans le cas des échantillons dialysés, la chambre à dialyse du montage en téflon était remplie d'une solution de 200 µl du polynucléotide. Par la suite, le montage était placé dans un bécher de 400 ml contenant 100 ml de la solution utilisée pour solubiliser le polynucléotide. Le mélange était agité pendant un minimum de 12 heures. Les solutions de 0,1 M TMAP devaient être chauffées et subir un traitement au bain à ultrason pour permettre la dissolution du sel. Même avec ces traitements, la dissolution s'est avérée difficile.

Il nous est arrivé de rencontrer un phénomène de fluorescence dans les conditions de températures élevées lors de la prise de spectres. Cet inconvénient résultait sans doute d'une décomposition partielle de l'échantillon. Certains étaient plus sujets que d'autres à la fluorescence. Une fois celle-ci installée, elle ne disparaissait pas, même lors du refroidissement de l'échantillon, ce qui rendait la prise de mesures impossible avec une excitation laser à 514,5 nm. Comme la fluorescence affecte fortement l'allure des spectres, il devenait difficile de les normaliser sans changer les intensités relatives des bandes. Nous n'avons donc pas retenu les spectres affectés par la fluorescence.

3.3 Résultats et discussion

En spectroscopie Raman, plusieurs types de changements peuvent être utilisés pour suivre le passage d'un acide nucléique d'un état ordonné à un état désordonné (dissociation de la double hélice). Tout d'abord, des changements en intensité de certaines bandes associées aux vibrations des bases cycliques peuvent fournir des informations sur le degré d'empilement de ces bases. D'autre part, la fréquence de certaines bandes, comme celles associées à la vibration symétrique du squelette phosphodiester, à $810\text{-}815\text{ cm}^{-1}$ [-O-P-O-], sont caractéristiques de la conformation des ribose. De plus, des changements dans la région de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ peuvent caractériser la formation ou le bris de liaisons hydrogène reliant les paires de bases entre elles.

Les spectres Raman d'une solution aqueuse de poly(G) · poly(C) (0,5 M NaCl) à 25° et 135°C sont présentés à la figure 16. Ces spectres sont des spectres de différence obtenus par soustraction du spectre du solvant de ceux des échantillons enregistrés dans les mêmes conditions. Cette opération avait pour effet d'annuler la bande de l'eau à 1635 cm^{-1} . Les spectres ont été ensuite normalisés en intensité en utilisant la bande phosphate à 1098 cm^{-1} comme référence.³¹ Il a été démontré que les bandes associées aux groupements phosphate étaient peu influencées par l'association prévalant dans le polynucléotide ainsi que par la température.²⁷ Ces deux facteurs font en sorte que la bande à 1098 cm^{-1} est une bande de choix pour la normalisation lorsque aucun standard interne n'est ajouté à la solution. Le spectre à 25°C est semblable à celui publié par Lafleur et coll.³² dans les mêmes conditions.

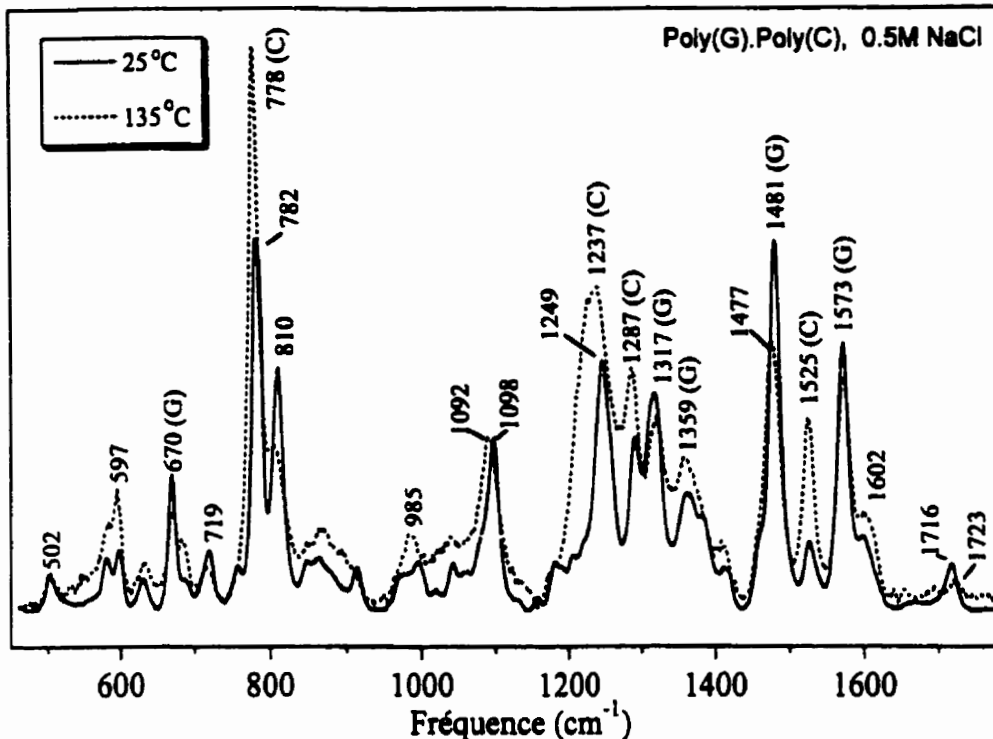


Figure 16 : Spectre Raman du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl à 25°C et 135°C (G = guanine et C = cytosine)

À 25°C, la fréquence de la bande à 1098 cm^{-1} est proche de la fréquence de 1100 cm^{-1} , qui est caractéristique d'un ribose possédant une conformation C3'-endo (famille A des polynucléotides). Plusieurs groupes de recherche ont démontré que la bande à 810 cm^{-1} est toujours présente sur les spectres de structures ribonucléiques ordonnées ou partiellement ordonnées.^{48, 49, 50} Cette bande est complètement indépendante de la composition en bases du polynucléotide, puisque la vibration impliquée origine du squelette phosphodiester.¹⁵ Le rapport de l'intensité de la bande à 810 cm^{-1} sur la bande à 1098 cm^{-1} établit une mesure du pourcentage de la conformation A dans le polynucléotide. Les expériences menées dans notre étude donnent une valeur du rapport I_{810}/I_{1098} de 1,4 à 95 °C et à pH 7,0, ce qui correspond à la valeur donnée dans la littérature par Brown et coll.³¹ Cette valeur équivaut à 82 % de conformation A dans le poly(G) · poly(C). De même, des simulations de modèles dynamiques fait par Cheatham et coll.

ont démontré que le poly(G) - poly(C) préférerait adopter la conformation A.⁵¹ Le 18 % restant adopterait difficilement la conformation B ou la forme désordonnée à la température de la pièce, le groupement hydroxyle en position C2' n'étant pas favorable à la formation de ces configurations.

En comparant les spectres du poly(G) - poly(C) à 25 et 135°C, on peut observer plusieurs changements. Parmi les plus significatifs, notons que la bande à 810 cm⁻¹ diminue en intensité, alors que la bande associée à l'élongation symétrique du groupement phosphate (PO₂⁻) se déplace de 1098 à 1092 cm⁻¹ en passant de 25 à 135°C. La bande à 670 cm⁻¹, présente également lors de l'auto-association de la 5'-GMP en hélice^{43, 52}, est caractéristique de la forme A. Cette bande diminue légèrement lors de la fusion alors que la bande à 680 cm⁻¹ (caractéristique de la forme désordonnée) augmente. D'autres bandes subissent également des changements importants en fréquence ou en intensité. Ces changements reflètent l'importante perte de structure résultant de la fusion de la double hélice.

Le spectre du poly(G) - poly(C) est particulièrement intéressant du fait qu'il contient des bandes provenant à la fois de la guanine et de la cytosine. Les deux types de bandes peuvent être utilisées pour suivre la dynamique de fusion du biopolymère. Celles de la cytosine à 782, 1249 et 1525 cm⁻¹ sont sensibles au degré d'empilement des bases et leur intensité augmente lorsque le degré d'empilement diminue, ce qui a pour effet d'augmenter la diffusion Raman de certains modes vibrationnels spécifiques des bases. On nomme ce phénomène hypochromisme Raman.⁵³

Deux méthodes nous permettent de déterminer la température de fusion d'un polynucléotide. On peut en effet suivre le tracé de l'intensité relative d'une bande caractéristique par rapport à une autre, ou la fréquence d'une bande en fonction de la température. La fréquence exacte est déterminée par la méthode du centre de gravité.⁵⁴ Cela consiste à évaluer l'intensité intégrée de la partie supérieure d'une bande et à déterminer à quel point sur l'échelle des fréquences la moitié de la valeur d'intégration est atteinte.

Nous avons choisi de suivre l'intensité de la bande à 1525 cm^{-1} relativement à celle à 1098 cm^{-1} pour déterminer la température de fusion du poly(G) · poly(C). La dynamique de fusion dans ce cas est coopérative, comme on peut le constater par l'augmentation rapide de l'intensité de la bande sur un court intervalle de température ($120\text{-}140^\circ\text{C}$) (figure 17). La température de fusion correspond au point milieu de la courbe, soit à 130°C . À cette température, la moitié des doubles hélices sont brisées (en moyenne). Nous avons également choisi d'observer le comportement d'une bande de la guanine, celle à 1481 cm^{-1} , pour suivre le processus de fusion. Nous avons observé un comportement particulier de l'intensité de cette bande. En effet, sa valeur diminue dans l'intervalle de température de $120\text{-}140^\circ\text{C}$ (donnant une température de fusion égale à 130°C) et augmente à nouveau au-delà de 140°C , pour atteindre le rapport d'intensité original. Ceci est différent de ce qui a été observé avec la bande cytosine à 1525 cm^{-1} , ce qui prouve que l'effet n'est pas dû à une diminution d'intensité de la bande de référence à 1098 cm^{-1} .

Le comportement du déplacement en fréquence de la bande à 1481 cm^{-1} suit de près celui de son intensité relative. La fréquence de cette bande décroît entre 120 et 140°C (avec une température de fusion de 130°C) et augmente de 140 à 155°C . Ce déplacement en fréquence est inusité, puisqu'il devrait varier de 1481 à 1483 cm^{-1} , cette dernière fréquence étant celle observée dans le poly(G) dissocié (voir figure 15). Nous avons également noté ce comportement avec une autre bande de la guanine, celle à 1573 cm^{-1} (figure 18), dont l'intensité relative diminue sur l'intervalle $125\text{-}140^\circ\text{C}$ pour ensuite remonter graduellement jusqu'à 155°C . Quant à sa fréquence, elle varie de 1571 à 1575 cm^{-1} entre 125 et 140°C et retourne à sa valeur de départ vers 155°C .

Nous pensons que les anomalies notées ci-haut sont dues à la formation du tétramère de poly(G) à la suite de la dissociation de l'hélice du poly(G) · poly(C).⁵⁵ Les changements des déplacements en fréquence associés à la bande guanine du poly(G) · poly(C) aux alentours de 140°C - température supérieure à la température de fusion déterminée (130°C) - seraient reliés à la formation de l'hélice à quatre brins du poly(G). En effet, l'association d'une seule base avec ses pairs (en l'occurrence la guanine) rend la formation de l'hélice quadruple plus facile que la reconstitution de la double hélice du poly(G) · poly(C). Les changements observés sont

caractérisés par une fréquence relativement basse de la bande à 1481 cm^{-1} sur le spectre à 135°C , soit 1477 cm^{-1} (1475 cm^{-1} dans le poly(G) à 25°C) et une fréquence plutôt élevée de la bande à 1573 cm^{-1} (1577 cm^{-1} dans le poly(G) à 25°C).

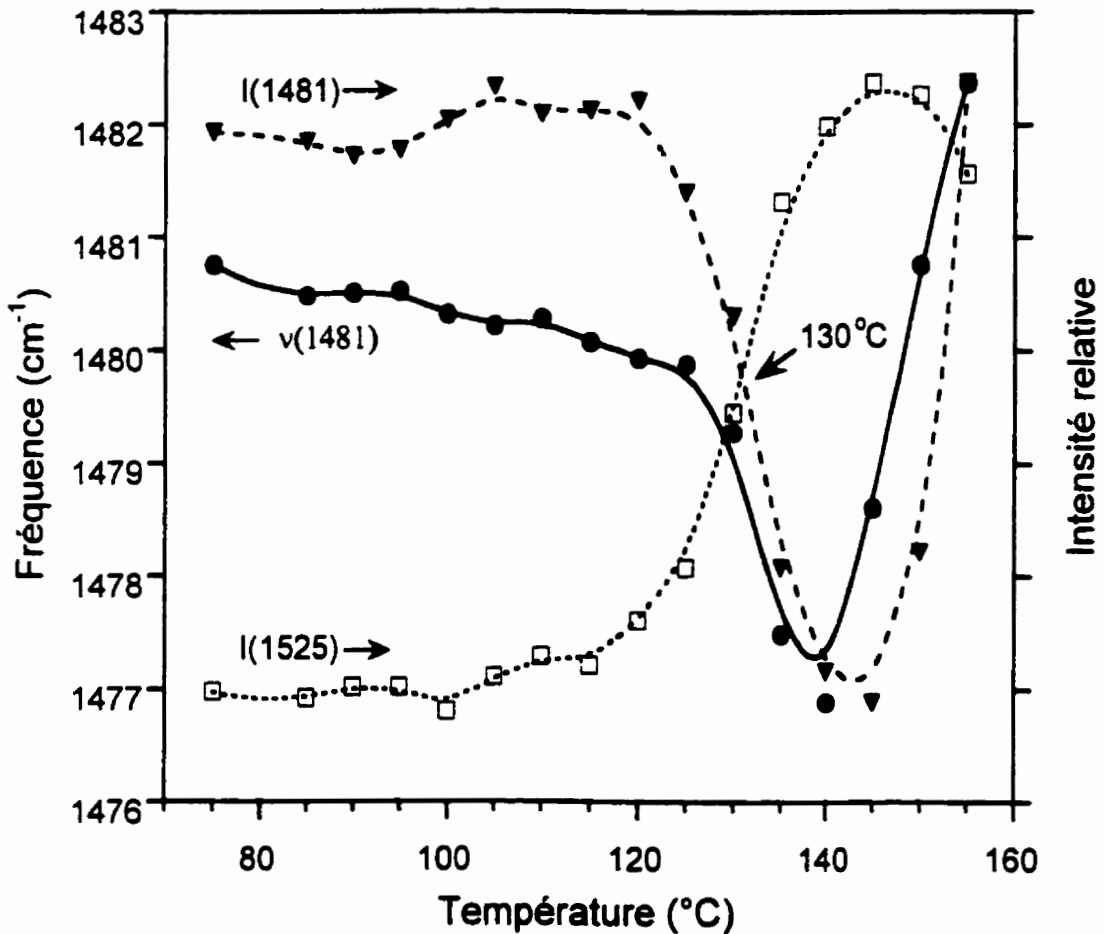


Figure 17 : Dynamique de fusion du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl. Température de fusion mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1525 cm^{-1} [$I(1525)$] et de l'intensité de la bande à 1481 cm^{-1} [$I(1481)$] ainsi que la fréquence [$\nu(1481)$] la bande à 1481 cm^{-1} . Les intensités sont relatives à la bande phosphate à 1098 cm^{-1} . La variation des intensités relatives est de 0,2 à 1,0 pour la bande à 1525 cm^{-1} et de 1,1 à 2,3 pour la bande à 1481 cm^{-1}

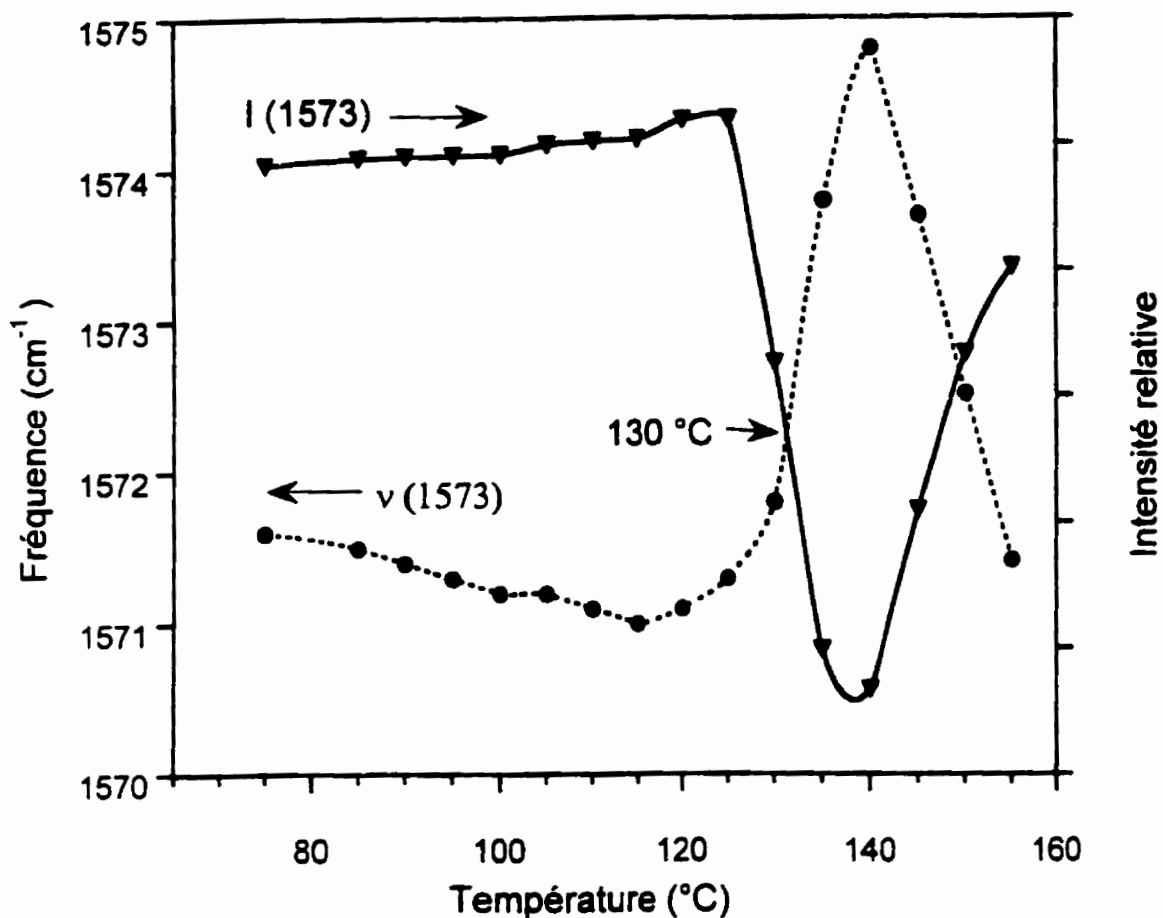


Figure 18 : Dynamique de fusion du poly(G) · poly(C) en solution 0,5 M NaCl. Température de fusion mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1573 cm⁻¹ [I(1573)] et de la fréquence [$\nu(1573)$] de la bande à 1573 cm⁻¹. L'intensité est relative à la bande phosphate à 1098 cm⁻¹. La variation de l'intensité relative est de 1,4 à 1,6 pour la bande à 1573 cm⁻¹

L'auto-association du poly(G) en hélice à quatre brins au-dessus de la température de fusion du poly(G) · poly(C) est encore plus évidente lorsque l'on regarde le spectre de différence [poly(G) · poly(C)] - [poly(C)]. Les spectres avant soustraction sont obtenus dans les mêmes conditions, soit 0,5 M NaCl et à une température de 140°C. Le spectre de différence (figure 19-A) est comparé à ceux du poly(G) sous forme de tétramère à 25°C (figure 19-B) et sous forme dissociée à 145°C (figure 19-C). Plusieurs bandes dans le spectre de différence

possèdent des fréquences intermédiaires entre celles du poly(G) à quatre brins (25°C) et dissocié (un seul brin, 145°C). Cela suggère la présence des deux états dans la solution une fois la température de fusion du poly(G) · poly(C) atteinte. La forme de la bande phosphate à 1090 cm^{-1} dans le spectre de différence ressemble plus à celle sur le spectre de poly(G) à 25°C (B) que sur le spectre de la forme dissociée (C). La plus forte évidence de la présence de poly(G) sous la forme tétramère dans le poly(G) · poly(C) à haute température est la présence d'une bande carbonyle à 1723 cm^{-1} , caractéristique de la structure à quatre brins du poly(G) à 25°C, sur le spectre de différence.

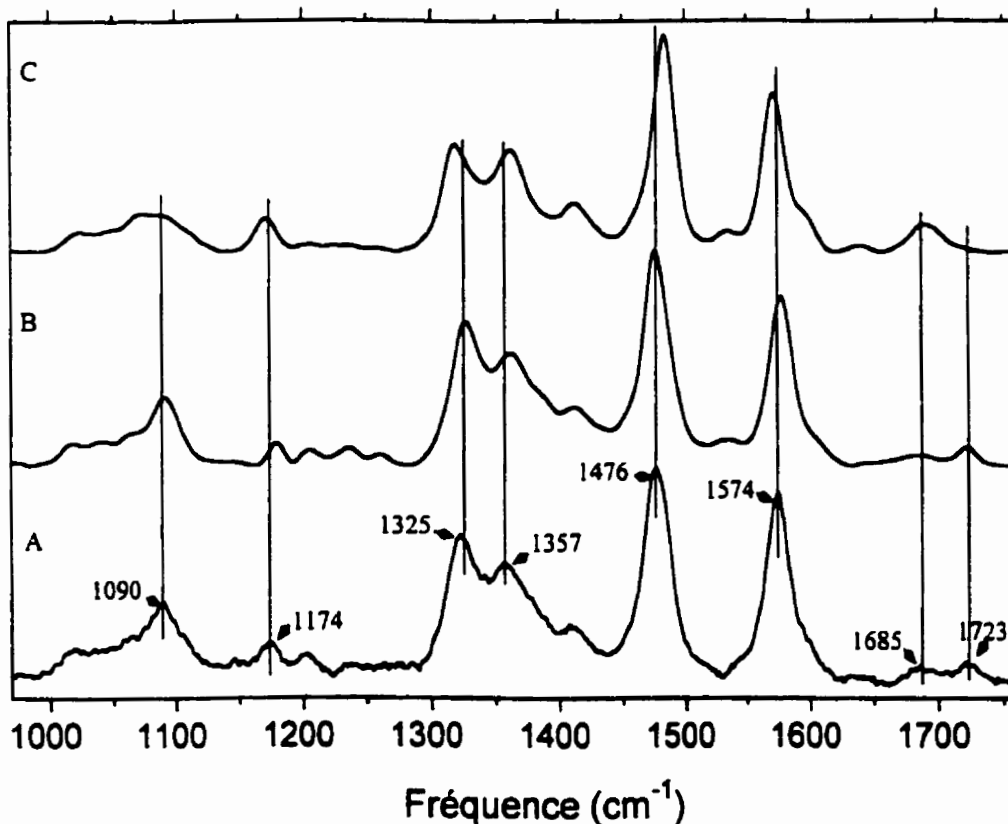


Figure 19 : Spectre de différence obtenu en soustrayant le spectre du poly(C) en solution 0,5 M NaCl à 140°C de celui du poly(G) · poly(C) pris dans les mêmes conditions (A), spectre du poly(G) à 25°C (B) et à 145°C (C)

Enfin, nous avons vérifié si la fusion du poly(G) · poly(C) est réversible, en faisant des expériences de cycles de température. Ces expériences consistaient à augmenter et diminuer la température de façon successive au voisinage de la température de fusion préalablement déterminée. De façon générale, la réorganisation de la double hélice de l'ADN et de polymères synthétiques suite à la fusion dépend de plusieurs facteurs, comme par exemple la force ionique des solutions, la concentration de l'échantillon et le temps alloué entre chaque prise de spectre. Les techniques de refroidissement lent et rapide (section 2,3) ont toutes deux été utilisées à tour de rôle. Que le refroidissement soit lent ou rapide, nous avons noté que la dissociation de la double hélice n'est plus réversible lorsque le polymère s'engage dans le processus de fusion. Un exemple de courbe de réversibilité est donné à la figure 20. Des spectres enregistrés plusieurs heures après l'atteinte de la température de fusion et le retour à la température de la pièce ont confirmé ce fait, appuyant ainsi l'hypothèse de la formation des tétramères de poly(G).

D'autres expériences ont été menées sur le complexe poly(G) · poly(C) en solutions aqueuses à des concentrations en NaCl de 0,1 M et 5 M ainsi qu'en présence de tétraméthylammonium perchlorate (TMAP) 0,1 M. Les températures de fusion ont été déterminées en traçant l'intensité de la bande à 1525 cm^{-1} relativement à celles à 782 , 810 et 1098 cm^{-1} , en fonction de la température. La figure 21, qui montre la variation de l'intensité de la bande à 1525 cm^{-1} relativement à celle à 1098 cm^{-1} , démontre bien que la stabilité du complexe varie en fonction de la nature et de la concentration ionique de la solution. Les températures de fusion obtenues sont les suivantes : $T_f = 125^\circ\text{C}$ pour 0,1 M NaCl, 145°C pour 5 M NaCl et 112°C pour 0,1 M TMAP. La structure du poly(G) · poly(C) est plus stable à plus forte concentration en sel, ce qui se traduit par une température de fusion plus élevée dans ces conditions. Une plus forte concentration en sel diminue en effet les répulsions électrostatiques sur le squelette phosphodiester, tout en stabilisant l'hélice.⁴²

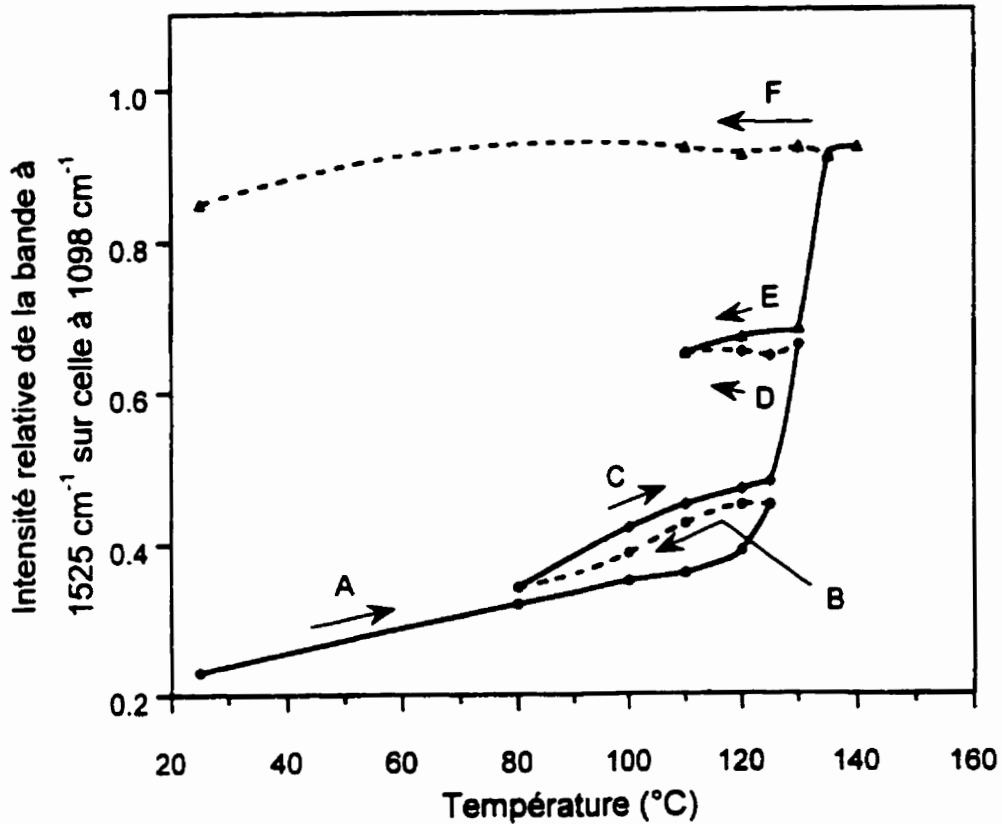


Figure 20 : Réversibilité de la fusion du poly(G) · poly(C), en solution 0,5 M NaCl, mesurée à partir de l'intensité relative de la bande à 1525 cm^{-1} par rapport à la bande du phosphate (1100 cm^{-1}). (A) Chauffage jusqu'à 125°C, (B) refroidissement jusqu'à 80°C, (C) rechauffage jusqu'à 130°C, (D) refroidissement jusqu'à 110°C, (E) rechauffage jusqu'à 140°C et (F) refroidissement jusqu'à 25°C

Tous les échantillons contenant le TMAP ont été dialysés dans le but de favoriser l'échange entre les ions Na^+ et Me_4N^+ . Le TMAP est une espèce déstabilisante car son efficacité à diminuer les interactions électrostatiques est faible⁴², d'où la faible valeur de la température de fusion (112°C). De plus, selon Davidson⁵⁶, l'ajout d'une plus forte concentration en sel de ce type diminue la température de fusion puisque les liaisons apolaires brisées par l'anion sont plus importantes que

la stabilisation apportée par le cation. Le TMAP offre un standard interne fiable, ses bandes étant distinctes des bandes de l'échantillon étudié. Les bandes du TMAP se retrouvent à 629, 749, 933, 1168 et 1454 cm^{-1} . Nous avons obtenu la même température de fusion lorsque les intensités relatives étaient calculées par rapport aux bandes à 933 et 1454 cm^{-1} du TMAP.

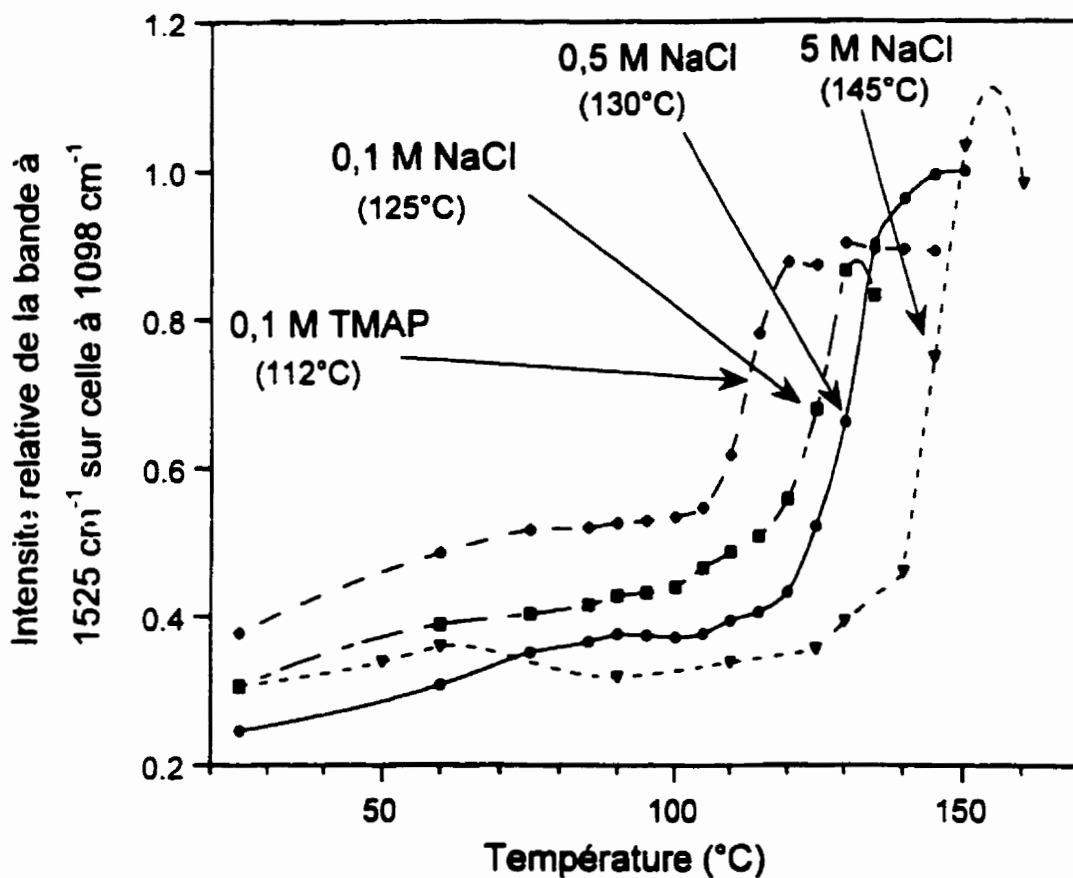


Figure 21 : Intensités relatives de la bande à 1525 cm^{-1} (relativement à la bande à 1098 cm^{-1}) en fonction de la température pour le poly(G) · poly(C) dans les conditions expérimentales suivantes : 0,1 M TMAP, 0,1 M NaCl, 0,5 M NaCl et 5 M NaCl

Dans les trois cas présentés plus haut (0,1 et 5 M NaCl, 0,1 M TMAP), la formation de l'hélice à quatre brins de poly(G) suite à la dissociation de la double hélice a pu être démontrée en suivant la bande guanine à 1481 cm^{-1} , ce comportement inusité étant le même qu'en solution 0,5 M NaCl. Par exemple, en solution de 0,1 M TMAP, l'intensité relative de la bande à 1481 cm^{-1} diminuait de 105°C à 125°C , puis augmentait jusqu'à 155°C . Puisque la température de fusion dans ces conditions (112°C) est inférieure de 18°C par rapport à la température obtenue en présence de 0,5 M NaCl (130°C), la formation de poly(G) associé en tétramère se produit à plus basse température qu'en solution 0,5 M NaCl (125°C au lieu de 140°C). Le même principe s'applique, tout dépendant de la température de fusion observée, en solution 0,1 et 5 M NaCl.

3.4 Conclusion

La température de fusion coopérative du complexe poly(G) - poly(C) en solution de NaCl a été déterminée en suivant plusieurs bandes hypochromiques associées à la cytosine (782 , 1249 et 1525 cm^{-1}). Cette température est respectivement de 145 , 130 , 125 et 112°C en solution aqueuse 5 M NaCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M NaCl et 0,1 M TMAP. On constate que la double hélice de poly(G) - poly(C) est stabilisée à fortes concentrations en sel alcalin, mais qu'elle est déstabilisée en présence de gros cations (TMAP). Ce phénomène se traduit par des températures de fusion plus élevées dans les cas où les concentrations en sel de sodium sont plus fortes.

D'autres changements associés aux bandes de la guanine (1481 et 1573 cm^{-1}) dans l'intervalle de température 125 - 155°C ont permis de mettre en évidence la formation de poly(G) associé en tétramère après la dissociation du complexe de poly(G) - poly(C), soit à une température supérieure à 130°C en solution 0,5 M NaCl, le $[\text{poly}(\text{G})]_4$ étant plus stable que la double hélice de poly(G) - poly(C) à haute température. Les spectres enregistrés plusieurs heures après le chauffage jusqu'à 130°C et le refroidissement à la température de la pièce ont démontré que le poly(G) - poly(C) ne revenait pas à son état initial. De plus, la présence de la bande carbonyle à

1723 cm^{-1} sur le spectre à 140°C appuie l'hypothèse de la formation de $[\text{poly}(\text{G})]_4$ dans ces conditions, puisque cette bande est caractéristique du poly(G) associé en tétramère. À des températures supérieures à 140°C, nous croyons que le $[\text{poly}(\text{G})]_4$ peut, à son tour, se dissocier puisqu'une faible bande à 1685 cm^{-1} est également présente sur le spectre de différence à 140°C (figure 19-A). Cette bande est caractéristique du poly(G) dissocié. La formation de $[\text{poly}(\text{G})]_4$ se produit également dans les autres conditions (5 M NaCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M NaCl et 0,1 M TMAP) après l'atteinte de la température de fusion. Le concept global est visualisé à la figure 22.

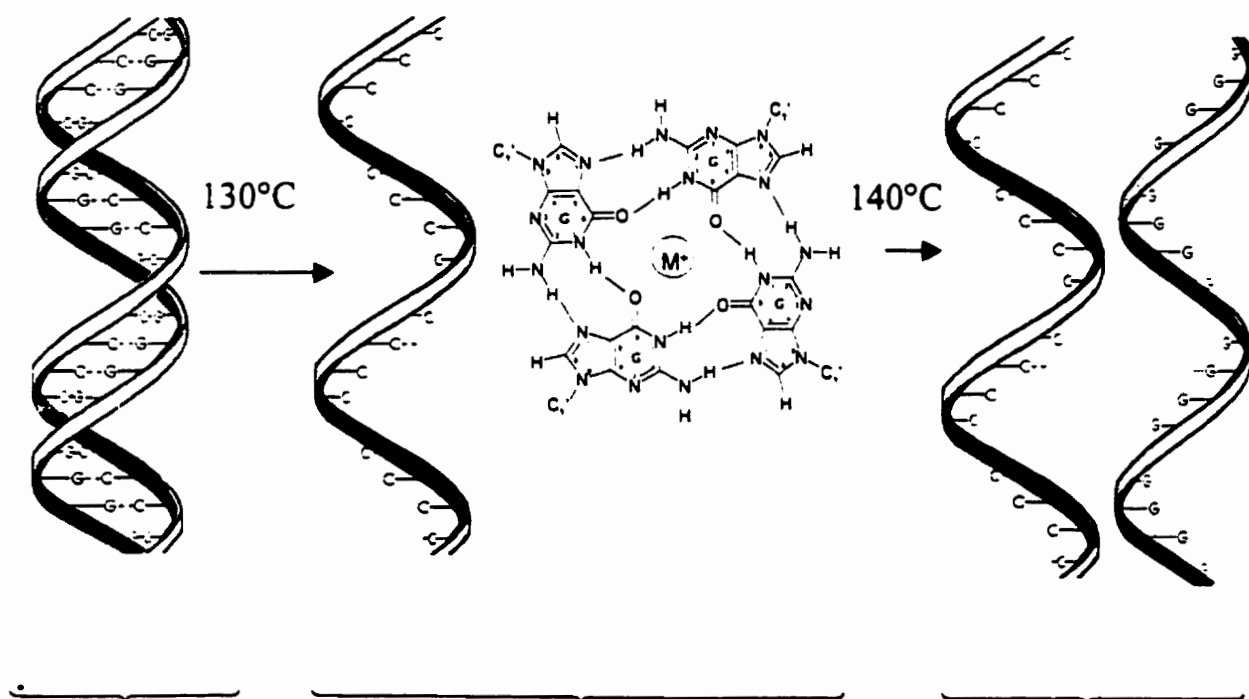


Figure 22 : Dissociation de la double hélice de poly(G) · poly(C) à 130°C et formation de poly(G) associé en tétramère, puis dissociation du $[\text{poly}(\text{G})]_4$ à des températures supérieures à 140°C

Finalement, les spectres démontrent que les polynucléotides dans le poly(G) · poly(C) à 95 °C possèdent une conformation majoritairement de type C3'-endo. Cette proportion diminue de beaucoup dès le début de la fusion, suite à la dissociation de la double hélice et à l'augmentation subséquente de la quantité de $[\text{poly}(\text{G})]_4$ dans le mélange.

CHAPITRE IV

4 ACIDE POLYDÉSOXYGUANYLIQUE-POLYDÉSOXYCYTIDILIQUE [Poly(dG) · Poly(dC)]

4.1 Introduction

Dans le cadre de nos travaux sur le thermotropisme du poly(G) · poly(C), nous avons décidé de poursuivre l'étude avec le composé poly(dG) · poly(dC), qui diffère du poly(G) · poly(C) uniquement par l'absence du groupement hydroxyle en position C2' des unités ribose. En ce sens, la forme déoxy du poly(dG) · poly(dC) ressemble plus à l'ADN que le poly(G) · poly(C). L'absence de ce groupement spécifique diminue la stabilité du polymère, comme il le sera démontré au cours de ce chapitre. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la caractérisation de la conformation de ce polynucléotide en fonction de la température ainsi qu'à la température à laquelle se produit sa fusion en présence d'ions sodium à différentes concentrations. Nous avons par la suite fait des expériences avec le poly(dA) · poly(dT) pour fin de comparaison avec le poly(dG) · poly(dC).

4.1.1 L'acide polydésoxyguanylique-polydésoxycytidilique [Poly(dG) · Poly(dC)]

Dès 1974, Arnott et coll.⁵⁷ ont étudié des fibres de poly(dG) · poly(dC) et ont conclu que ce polymère préfère la conformation A. En 1985, Nishimura et coll.⁵⁸ ont interprété plusieurs changements spectraux comme étant le passage de la conformation A vers B induits par dilution (de 0,2 à 0,01 M NaCl). En 1986, Benevides et coll.⁵⁹ présentaient les résultats qu'ils avaient obtenus par spectroscopie Raman d'un modèle de conformation A, $([r(\text{GCG})d(\text{CGC})]_2)$, ne

comportant que les bases guanine et cytosine. En comparant leurs résultats et ceux obtenus par diffraction des rayons X, ils ont pu identifier les bandes Raman caractéristiques de la conformation A pour la séquence guanine/cytosine, dont celle à $668 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, valable pour les résidus ribo- et désoxyribonucléiques. Dans cette même étude, ils ont travaillé sur le poly(dG) · poly(dC) en solution de 2 et 4 % en poids (0,1 M NaCl). Ils ont conclu que lorsque le polymère est en concentration de 4 % en poids, il adopte la conformation A, alors qu'à 2 % en poids, le complexe adopte la forme B. Les spectres Raman aux deux concentrations étant différents, ces chercheurs ont avancé l'idée que la formation d'agrégats moléculaires pouvait influencer et même déterminer la structure secondaire du complexe. Par la suite, peu d'études structurales ont été réalisées sur ce polymère.

Pour de nombreux polynucléotides synthétiques, les températures de fusion sont bien connues et regroupées dans le « Handbook of Biochemistry and Molecular Biology ». ⁶⁰ Cependant, ce texte ne relève qu'une seule température de fusion pour le poly(dG) · poly(dC) en présence d'ions sodium, soit 82°C en solution 0,01 M NaCl. Pour des concentrations en sodium plus élevées, il est simplement mentionné que les températures de fusion sont supérieures à 100°C. À notre connaissance, la littérature ne fait pas mention des différentes conformations obtenues en fonction de la température pour ce composé.

Nous n'avons pas étudié individuellement chacun des constituants du poly(dG) · poly(dC), seul le poly(dC) ayant été investigué, à cause du coût élevé et de la faible disponibilité du poly(dG) seul. À l'instar du poly(dG) · poly(dC), le poly(dC) en solution neutre est moins stable que le poly(C). Il ne présente pas de transition brusque, mais plutôt un comportement non coopératif en fonction de l'augmentation de la température. Par ailleurs, une étude menée par Dugaiczky et coll. ⁶¹ visant à obtenir des informations structurales par microscopie électronique sur le poly(dG) a suggéré que le composé pouvait adopter la forme d'une hélice triple, double ou simple. Selon ces chercheurs, les différents modes d'association pourraient être des représentations de l'état dénaturé de l'hélice associée en tétramère.

4.2 Partie expérimentale

Nous avons utilisé deux concentrations en sel de sodium (0,1 et 0,5 M NaCl) pour l'étude du poly(dG) · poly(dC). Les échantillons ont été préparés en suivant la procédure décrite à la section 2.1, avec des concentrations en polynucléotide de 2% en poids. Aucun des échantillons n'a été dialysé. En présence de 0,1 M et 0,5 M NaCl, trois et neuf expériences ont été effectuées respectivement. Nous avons utilisé le porte-échantillon décrit à la section 2,3 de même qu'un deuxième qui permettait de couvrir un intervalle de température de -15 à 80°C. Ce dernier porte-échantillon était refroidi à l'aide d'un élément Peltier.⁶²

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Étude en solution 0,1 M NaCl

La figure 23 présente les spectres du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à 23. 5 et -15°C. À 23°C, la présence de la bande à 683 cm⁻¹ ainsi que l'absence de la bande à 664 cm⁻¹ sur le spectre indique que le complexe 2 % en poids est principalement sous la forme B, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Benevides et coll.⁵⁹ Toutefois, la présence d'un léger épaulement à 806 cm⁻¹ sur ce spectre est un indicateur de la forme A. Pour vérifier si la proportion du polynucléotide en conformation A variait en fonction de la température, nous avons enregistré des spectres au-dessous de la température de la pièce et ce, jusqu'à -15°C. On voit sur le spectre à -15°C qu'il y a augmentation d'intensité des bandes à 664, 806, et 1314 cm⁻¹ (toutes caractéristiques de la forme A) et diminution de la bande à 683 cm⁻¹ (forme B). Les composés desoxyribonucléiques peuvent être différenciés des composés ribonucléiques par la fréquence associée à la vibration C3'-*endo-anti*, qui est légèrement plus élevée dans le premier cas par rapport au deuxième (668 cm⁻¹ dans l'ADN de thymus de veau et 665 cm⁻¹ pour les doubles hélices d'ARN).⁵⁸ L'intensité relative de la bande à 806 cm⁻¹ (forme A) sur celles à 784 et 1093 cm⁻¹ est représentée à la figure 24. Sur la même figure est également représenté le rapport

de l'intensité de la bande à 664 cm^{-1} (forme A) relativement à celle à 683 cm^{-1} (forme B), ce ratio étant un autre indicateur de la proportion de la forme A dans le polymère. Dans les trois cas (trait plein sur le graphique), on remarque que la proportion de la forme A augmente lorsque la température diminue. Nous avons quantifié le pourcentage de conformation A pour le poly(dG) · poly(dC) en solution $0,1\text{ M NaCl}$ à l'aide du rapport I_{806}/I_{1093} . Brown et coll.³¹ ont déterminé qu'une valeur de 1,7 correspondait à 100 % de la conformation de type A. Nous avons estimé qu'à la température de la pièce, la conformation A représentait 50 % du polymère alors qu'à -15°C , cette valeur était de 75 %. Cependant, puisque le composé n'adopte pas totalement l'une ou l'autre des deux conformations, il est normal de voir des bandes caractéristiques du caractère B. Par exemple, la bande à 830 cm^{-1} est toujours présente sur le spectre alors que la bande à 683 cm^{-1} est plus intense que celle à 664 cm^{-1} , et ce en dépit de l'augmentation de la forme A. Tous ces changements sont réversibles lors du retour à la température de la pièce.

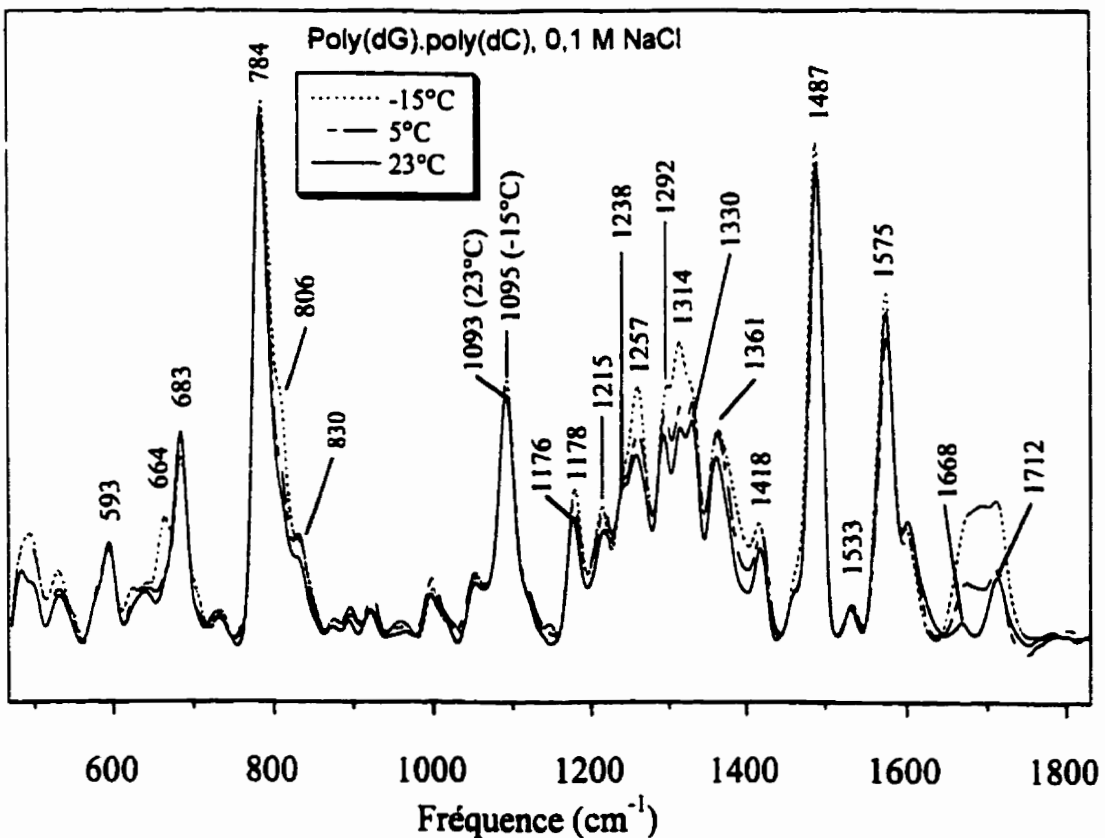


Figure 23 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution $0,1\text{ M NaCl}$ à $-15, 5$ et 23°C

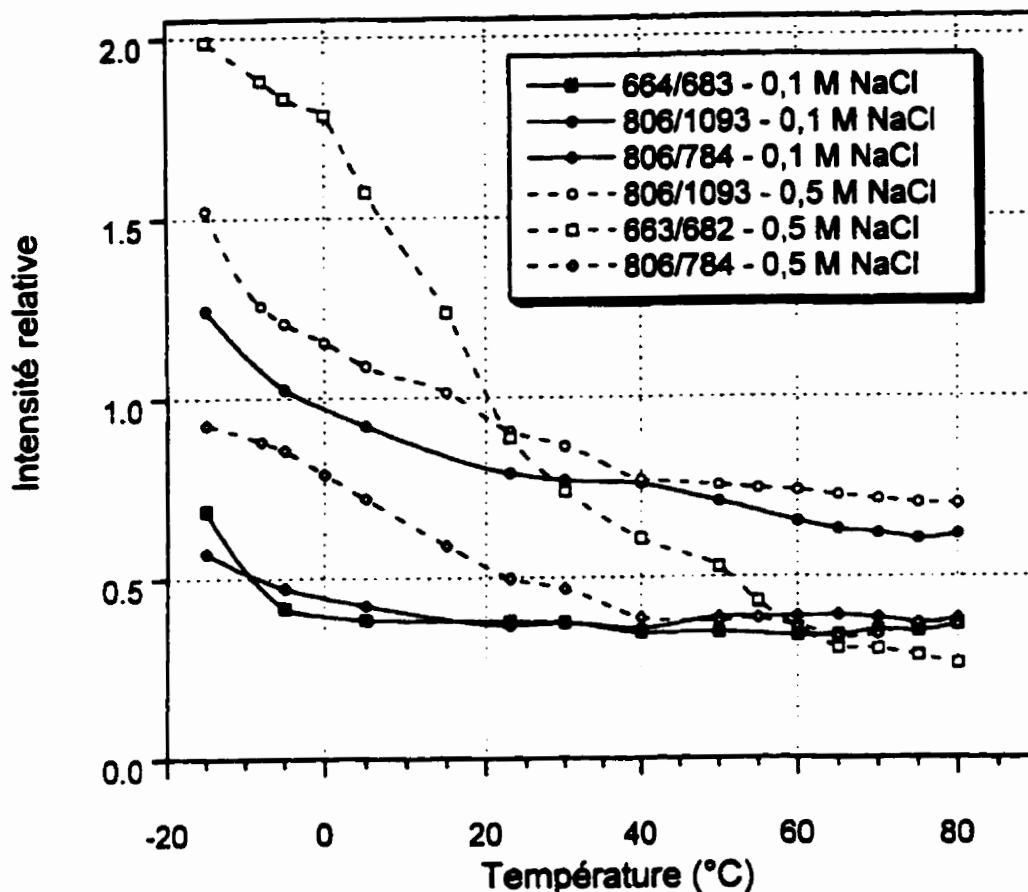


Figure 24 : Intensités relatives de différentes bandes caractérisant la proportion de conformation A dans le poly(dG) ·poly(dC) en solution 0,1 et 0,5 M NaCl

Plusieurs spectres ont été enregistrés entre 20 et 130°C dans le but d'évaluer d'autres changements spectraux caractéristiques du thermotropisme du poly(dG) ·poly(dC). Nous avons choisi de suivre en fréquence et en intensité relative les bandes à 1485 cm^{-1} (figure 27) et 1527 cm^{-1} (figure 28) pour déterminer la température de fusion du complexe. Pour chacune des deux fréquences, les tracés nous suggèrent qu'il se produit des changements structuraux entre 70 et 75°C et entre 100 et 105°C. La première transition se produit à 73°C. La figure 25 présente les spectres de part et d'autre de cette transition. À cette température, il y a entre autre une augmentation en intensité des bandes associées la cytosine à 1238, 1251 et 1527 cm^{-1} . Par contre, les bandes à 1314, 1329 et 1485 cm^{-1} diminuent légèrement en intensité. La fréquence de la bande à 1485 cm^{-1} suit de près le comportement de son intensité relative, avec un déplacement

vers les basses fréquences (de 1485 à 1483,7 cm^{-1} entre 70 et 75°C, figure 27). Pour la bande à 1527 cm^{-1} , le déplacement se produit également vers les basses fréquences (de 1529 à 1527 cm^{-1} entre 70 et 75°C). Dans ce cas, le comportement en fréquence est différent du tracé de l'intensité relative, cette dernière doublant lors de la transition. À la température de transition, d'autres changements sont visibles, dont une transformation dans la région des groupements carbonyle (1650-1750 cm^{-1}). La bande à 1712 cm^{-1} laisse place à deux bandes à 1686 et 1708 cm^{-1} .

La deuxième transition, due à la fusion du complexe, se produit à une température de 103°C (voir figure 26). L'intensité relative de la bande à 1485 cm^{-1} continue de diminuer alors que celle à 1527 cm^{-1} augmente. Le comportement de cette dernière bande associée à la cytosine dans le poly(dG) · poly(dC) concorde avec celui du poly(dC) seul, exhibant une augmentation graduelle de son intensité relative avec une élévation de température. Lors de cette deuxième transition, la fréquence de la bande à 1708 se déplace à 1721 cm^{-1} .

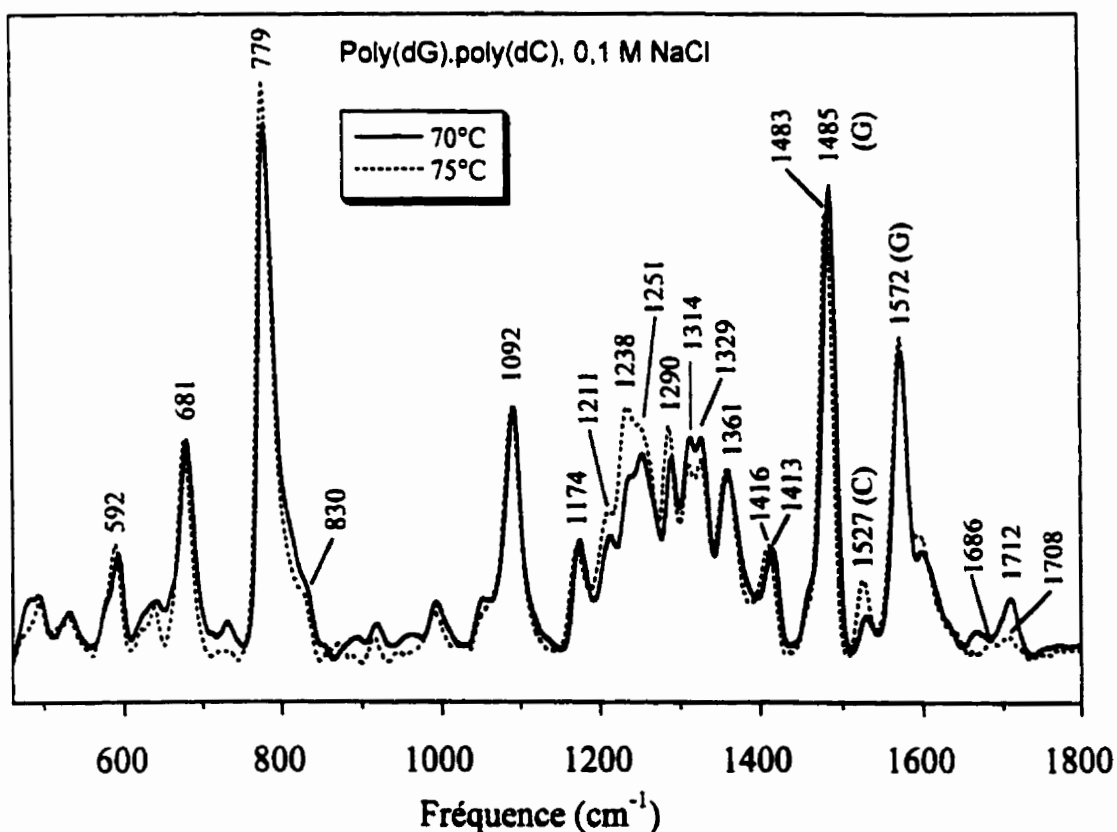


Figure 25 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à 70 et 75°C

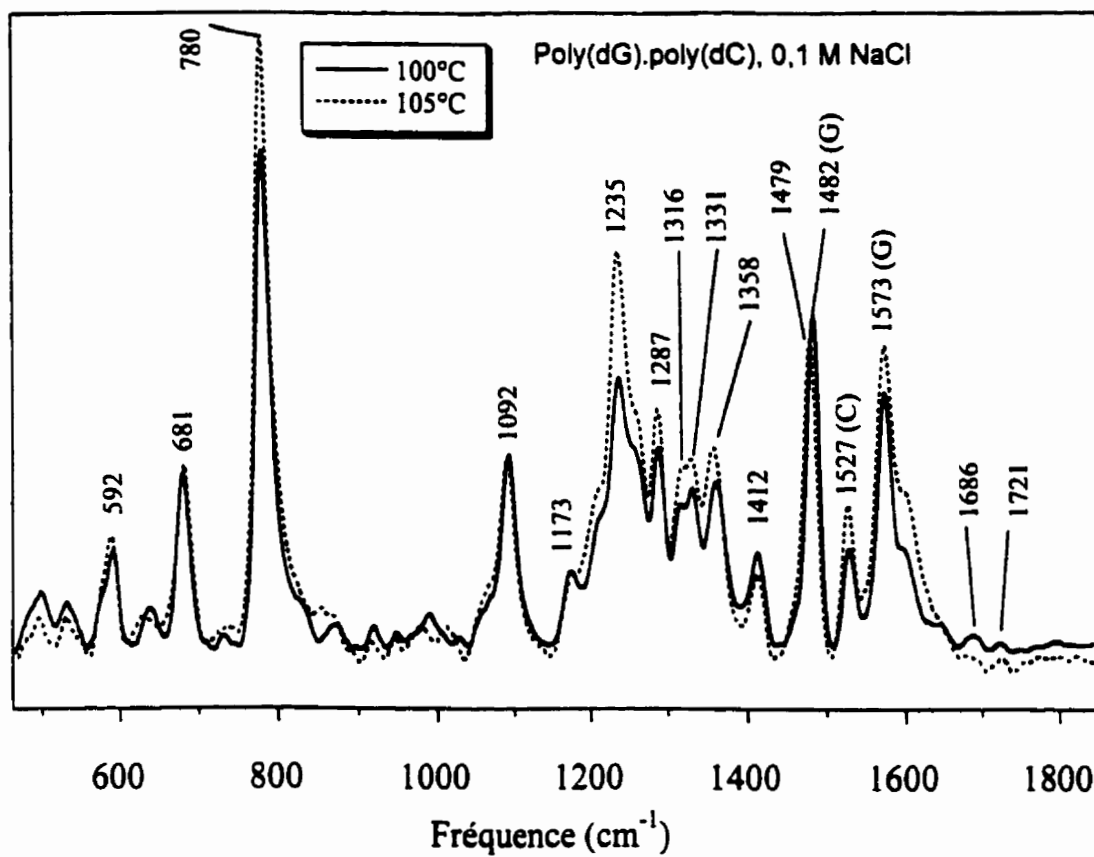


Figure 26 : Spectre Raman du poly(dG) ·poly(dC) en solution 0,1 M NaCl à 100 et 105°C

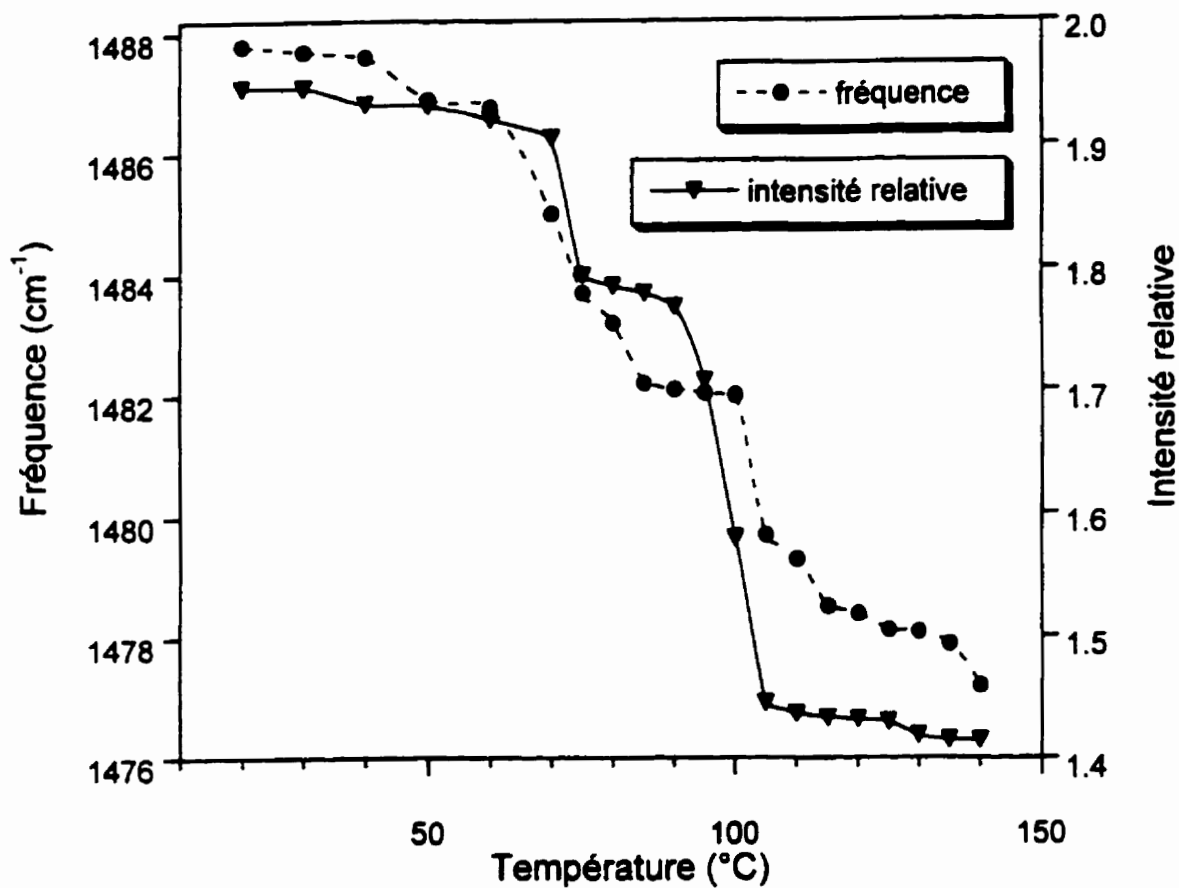


Figure 27 : Variation de l'intensité relative et de la fréquence de la bande à 1485 cm^{-1} du $\text{poly(dG)} \cdot \text{poly(dC)}$ en solution $0,1\text{ M NaCl}$, de 20 à 140°C . Les intensités sont relatives à la bande phosphate.

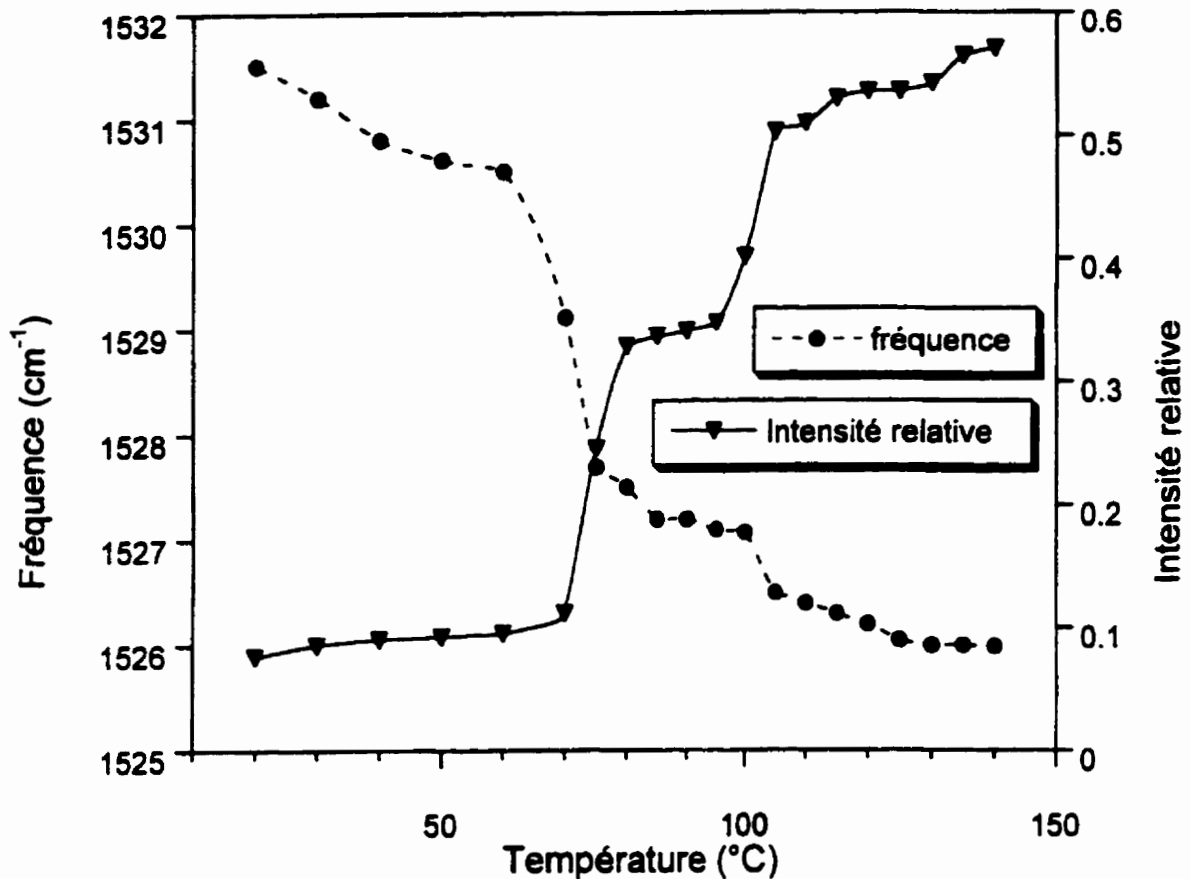


Figure 28 : Variation de l'intensité relative et fréquence de la bande à 1527 cm^{-1} du $\text{poly(dG)} \cdot \text{poly(dC)}$ en solution $0,1\text{ M NaCl}$, de 20°C à 140°C . Les intensités sont relatives à la bande phosphate.

Nous estimons que la première transition serait en fait une prétransition où aurait lieu une réorganisation du complexe avant que ne se produise sa fusion définitive. En effet, l'apparition des deux fréquences dans la région des groupements carbonyle suppose que certaines liaisons hydrogène se briseraient, laissant les groupements carbonyle des cycles guanine et cytosine libres de se réorganiser.

Comparativement au poly(G) · poly(C), qui possède une température de fusion de 125°C en solution 0,1 M NaCl, le poly(dG) · poly(dC) dans les mêmes conditions (température de fusion observée = 103°C) est beaucoup moins stable que ce dernier dû à l'absence du groupement hydroxyle en position C2'. Cette observation va dans le même sens que la comparaison des températures de fusion de l'ARN et de l'ADN, la température de fusion de ce dernier étant plus faible que pour l'ARN.⁶³

4.3.2 Étude en solution 0,5 M NaCl

On retrouve à la figure 29 les spectres du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl à trois températures différentes, soit 23, 0 et -15°C. Tout comme sur le spectre en solution 0,1 M NaCl, on peut remarquer à la température de la pièce certaines bandes, par exemple celles à 663 et 682 cm⁻¹, caractéristiques des conformations A et B. D'autres fréquences de bandes sont plus typiques de la forme B, comme celles à 784 cm⁻¹ et 1094 cm⁻¹. Les fréquences des bandes à 806 et 1312 cm⁻¹ suggèrent quant à elles la présence de la forme A. Toutes ces bandes nous laissent croire à un mélange des deux conformations. Nous avons appliqué la même procédure que dans le cas où la concentration en ions sodium était de 0,1 M NaCl pour vérifier si la proportion du polynucléotide en conformation A variait en fonction de la température. Nous avons enregistré des spectres à tous les 5°C au-dessous de la température de la pièce et ce, jusqu'à -15°C. On remarque qu'en passant de 23 et -15°C, il y a augmentation d'intensité des bandes à 663, 806, 850 et 1312 cm⁻¹ (toutes caractéristiques de la forme A) et diminution de la bande à 682 cm⁻¹ (forme B). La figure 24 représente l'intensité relative de la bande à 806 cm⁻¹ (forme A) sur celles à 784 et 1094 cm⁻¹ (trait pointillé sur le graphique). De même, on retrouve sur cette figure le rapport de l'intensité de la bande à 663 cm⁻¹ (forme A) relativement à celle à 685 cm⁻¹ (forme B). Il est clair que la proportion de la forme A augmente lorsque la température diminue (À -15°C, $I_{806}/I_{1093} = 1,52$, ce qui équivaut à 90 % de conformation de type A alors qu'à 23°C ce même pourcentage est de 55 %). Cette conformation serait dominante dans le mélange jusqu'à une température de 30°C (ratio des bandes 663/682 = 0,50) après quoi la proportion de la forme B

continuerait d'augmenter jusqu'aux alentours de 65°C. À cette température, les courbes atteignent un plateau, indiquant que la composition ne varie plus en fonction de la température (55 % de conformation de type B).

Le changement en fréquence de la bande phosphate varie également dans le sens d'une plus grande proportion de la forme A à basse température. La fréquence de 1094 cm⁻¹ à 23°C se déplace à 1097 cm⁻¹ à -15°C, cette fréquence étant voisine de celle caractéristique de la forme A (1100 cm⁻¹). Tous les changements qui se produisent entre 23 et -15°C sont complètement réversibles lors du retour à la température de la pièce.

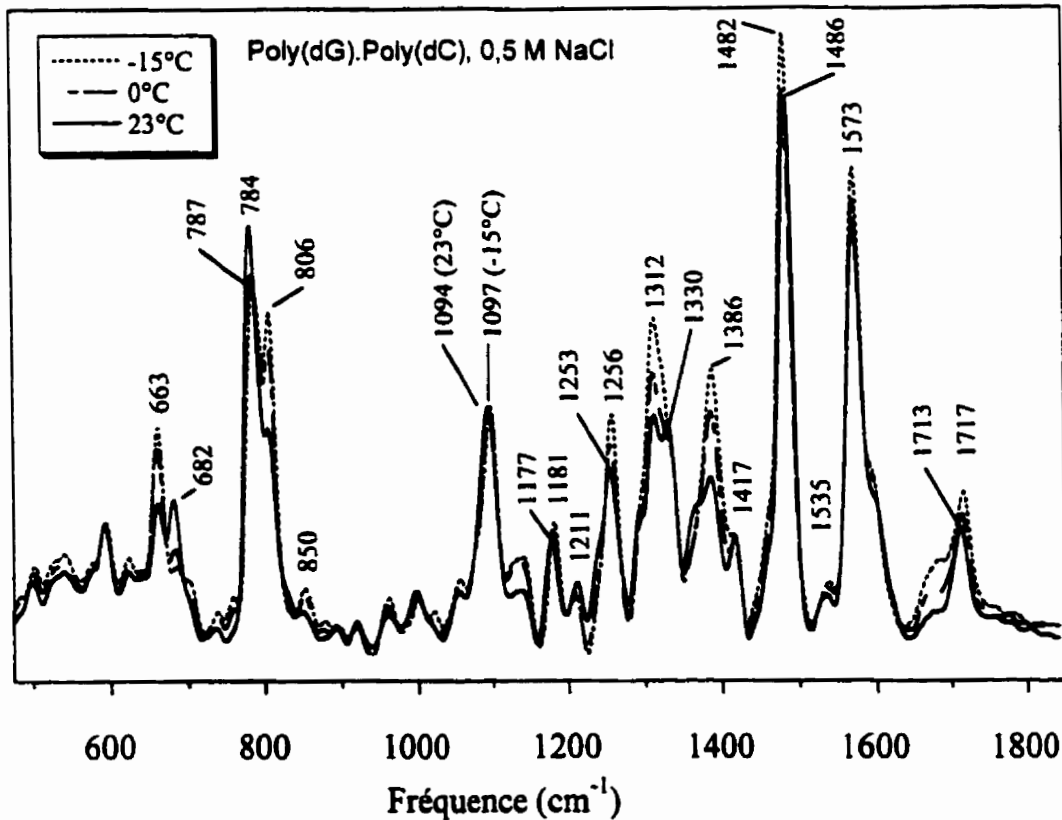


Figure 29 : Spectre Raman du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl à -15, 0 et 23°C

Nous avons choisi de suivre le tracé de l'intensité relative des bandes à 1486, 1535 et 1573 cm^{-1} pour déterminer la température de fusion du poly(dG) · poly(dC) dans ces conditions. Le tracé nous indique qu'il se produit deux transitions, comme dans le cas précédent (0,1 M NaCl). Cependant, la première transition se produit à une température plus faible (63°C) que celle déterminée dans 0,1 M NaCl (73°C). Les spectres du poly(dG) · poly(dC) à 60 et 70°C ne sont pas reproduits ici, les comportements observés étant très semblables à ceux des spectres de la figure 25. Notons que deux bandes apparaissent également dans la région des carbonyle. La bande à 1714 cm^{-1} (caractéristique des groupements carbonyle engagés dans une liaison hydrogène) se transforme en deux bandes (1688 et 1723 cm^{-1}), qui se déplacent en fréquence lorsque la température augmente (1696 et 1728 cm^{-1} à 130°C). Les autres changements majeurs sont l'augmentation en intensité de la bande à 1237 cm^{-1} et le déplacement en fréquence de la bande de 1314 cm^{-1} (60°C) à 1317 cm^{-1} (70°C). Tous ces changements sont significatifs de l'augmentation du caractère B dans le composé. Les fréquences des bandes à 682, 781 et 1093 cm^{-1} posent un certain problème pour identifier de façon certaine la conformation B puisque ces fréquences sont très proches ou identiques à celles de la forme désordonnée. Toutefois, puisque ces changements sont réversibles, l'hypothèse d'une réorganisation du complexe semble plausible. Lors de cette prétransition, la variation de l'intensité relative de la bande de la cytosine est beaucoup plus grande que lorsque ce sont les bandes de la guanine qui sont utilisées (voir figure 30). En effet, la bande à 1535 cm^{-1} augmente graduellement en intensité jusqu'au double de sa valeur initiale, alors que les bandes à 1486 et 1573 cm^{-1} ne présentent qu'une faible diminution d'intensité relative lors de cette première transition. Il semble donc que les résidus de la cytosine soient plus affectés par cette transition que ceux de la guanine.

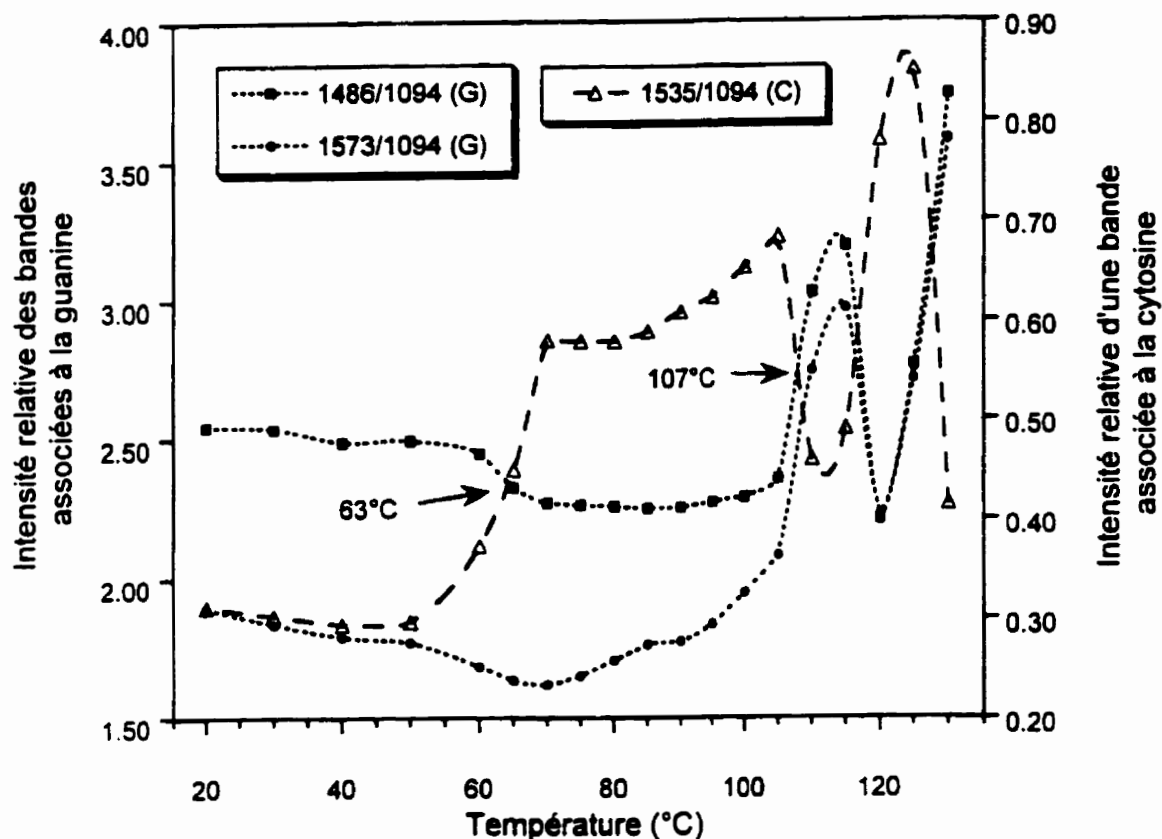


Figure 30 : Intensités relatives des bandes à 1486, 1535 et 1573 cm^{-1} du poly(dG) · poly(dC) en solution 0,5 M NaCl

La deuxième transition, celle de fusion, se produit à une température de 107°C. Cette transition n'est pas réversible. On note sur les spectres de la figure 31 une forte diminution en intensité des bandes à 781, 1236, 1288 et 1528 cm^{-1} lors de cette transition. Toutes ces bandes sont associées aux vibrations de la cytosine. Quant aux bandes qui ont subi une augmentation en intensité (682, 1333, 1358, 1478 et 1574 cm^{-1}), cela est dû aux vibrations des résidus de la guanine. Que seules les bandes associées à la cytosine subissent une diminution d'intensité est en soi un comportement inhabituel. Ces résultats nous portent à croire que cette perte de signal des résidus de la cytosine serait dû à une précipitation du poly(dC) dans le mélange de polymères à haute

température. De plus, l'intensité relative de la bande à 1535 cm^{-1} démontre un comportement hors de l'ordinaire à des températures supérieures à 115°C , présentant notamment un maximum à 120°C (voir figure 30). La forte concentration ionique utilisée aurait une influence au niveau de la précipitation d'une des composantes du polymère.

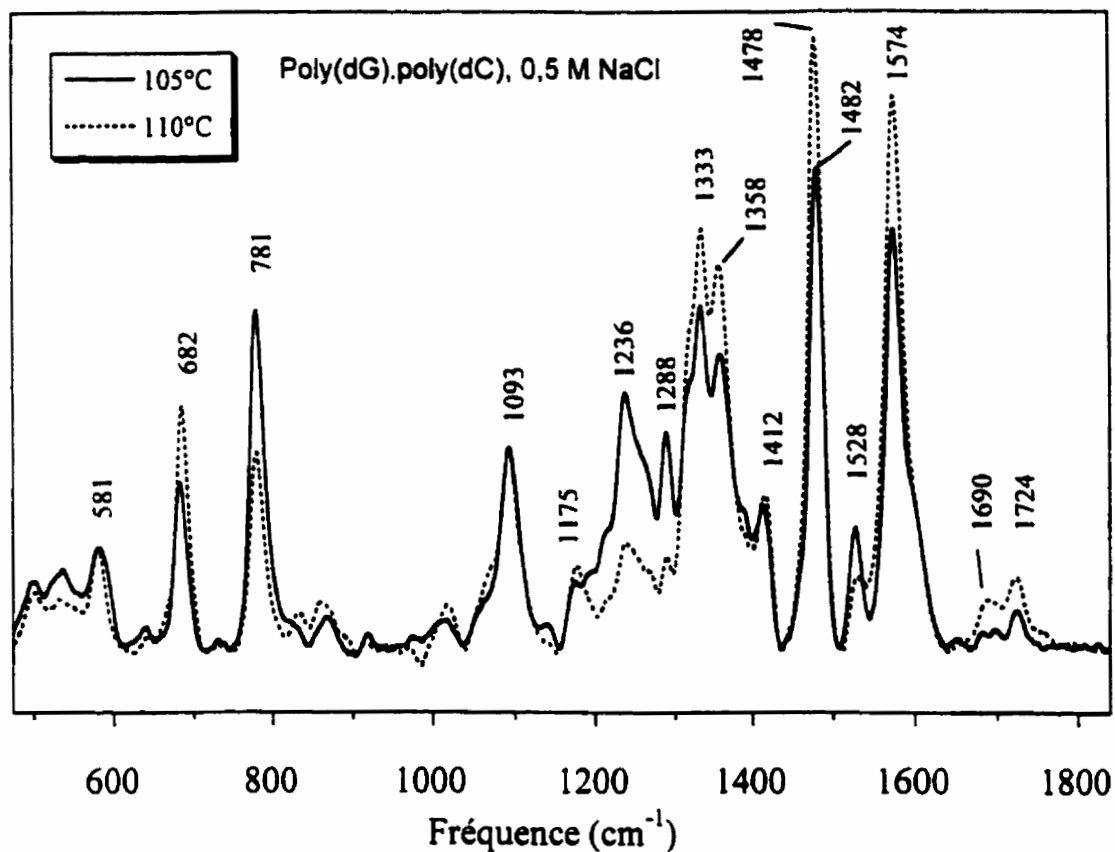


Figure 31 : Spectre Raman du poly(dG) ·poly(dC) en solution 0,5 M NaCl à 105 et 110°C

4.4 Comparaison avec l'acide polydéoxyadénylique-polydéoxythymidylique [Poly(dA) · poly(dT)]

Pour fin de comparaison avec le comportement spectral à basse température et à la température de fusion du poly(dG) · poly(dC), nous avons choisi d'étudier le poly(dA) · poly(dT). Les résultats obtenus pour ce biopolymère seront présentés très succinctement ci-dessous. Nous avons étudié le complexe en solution 0,5 M NaCl. Les concentrations en échantillon utilisées étaient de 2 % en poids. Seul le porte-échantillon qui couvre la plage de température de -15 à 80°C a été utilisé, car nous nous attendions à une température de fusion inférieure à 100°C. La figure suivante présente les spectres à -15 et 23°C du poly(dA) · poly(dT) en solution 0,5 M NaCl. Ces spectres ont été normalisés par rapport à la bande à 1094 cm⁻¹.

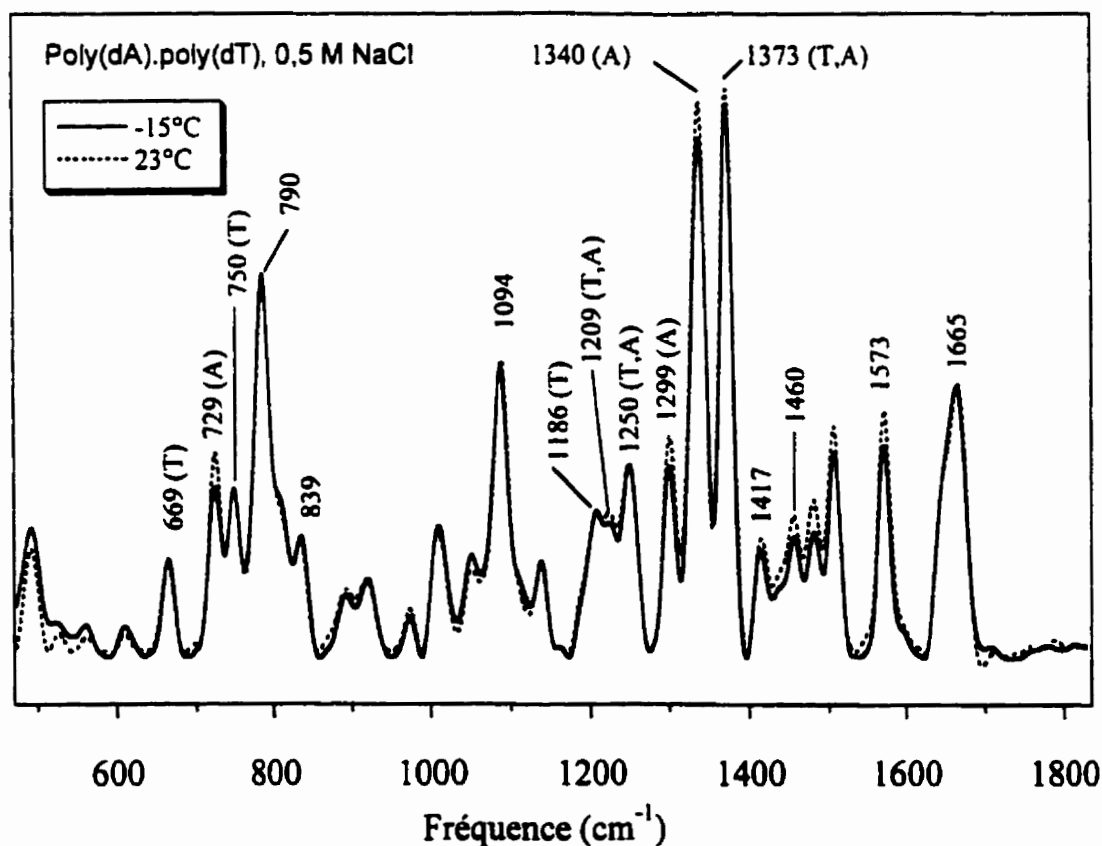


Figure 32 : Spectre Raman du poly(dA) · poly(dT) en solution 0,5 M NaCl à -15 et 23°C

La conformation de type B est favorisée lorsque la concentration en sel est faible puisque dans ces conditions, tous les groupes fonctionnels (phosphates, bases et furanoses) sont monohydratés. Dans le cas particulier d'une longue séquence adénine thymine, la couche monomoléculaire d'eau court le long du sillon mineur et stabilise la conformation B, ce qui fait en sorte que le poly(dA) · poly(dT) offre une résistance aux transformations en d'autres types d'hélices. C'est exactement ce que l'on observe à la figure 32. D'après les fréquences relevées sur ces spectres, il est clair que ces dernières indiquent que le polymère est sous la forme B. Ceci a pu être vérifié à l'aide du tableau 5, les fréquences des bandes de la figure 32 étant en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature. De plus, les intensités des bandes caractéristiques de la conformation globale de l'échantillon indique que celle-ci n'est pas modifiée dans ce domaine de température, contrairement au cas du poly(dG) · poly(dC).

Des températures de fusion ont été déterminées pour ce composé à 48°C (0,01 M NaCl) et 68,5°C (0,1 M NaCl).⁶⁰ Lorsque la concentration en sel augmente (1 M NaCl), la transformation de la forme B vers la forme A n'a pas lieu. Il se produit plutôt la formation d'une hélice triple : une double hélice de type Watson et Crick accueille en son sillon majeur un brin supplémentaire de poly(dT). Ce dernier brin forme des liaisons hydrogène de type Hoogsteen avec le poly(dA). Cette association est parallèle alors que le duplex de type Watson et Crick est antiparallèle. En 1974, Arnott et coll.⁶⁴ ont utilisé des modèles moléculaires et des données de diffraction des rayons X pour conclure que le triplex $d(T)_n \cdot d(A)_n \cdot d(T)_n$ appartenait à la famille A des polynucléotides. Par la suite, des données obtenues par spectroscopie Raman⁶⁵ et infrarouge⁶⁶ ont clairement démontré que la structure adoptait la conformation B. Puis, Raghunathan et coll.⁶⁷ ont proposé un nouveau modèle dans lequel les trois brins de l'hélice triple sont symétriques, ce qui confère au polymère une conformation identique le long du squelette.

Tableau 5 : Fréquences des bandes pour des polymères contenant les bases adénine et thymine en fonction du type d'hélice.¹⁷

Attribution	FD	A	B
sq	---	644	644 ep
T	667	666	670
		706	n. d.
A	728	729	729
T	747	747	750
sq, T	794	779	793
C3'-endo, sq	---	807	---
C2'-endo, sq	n. d.	n. d.	841
PO ²⁻ , sq	1096	1102	1094
T	1186	---	1186
T, A	1208	n. d.	1209
T	1237	1239	1240 ep
T, A	1255 ep	1255 ep	1255
A	1307	1301	1303
A	1334	1334	1341
T, A	1374	1374	1376
		1402	n. d.
A, sq	1421	1415	1420
A, sq	1462	1462	1462
A	1483	1478	1483

FD : Forme désordonnée, sq : squelette, ep : épaulement, n.d. : non-disponible

Dans ce cas, le suivi de l'intensité relative de la bande à 1186 cm^{-1} en fonction de la température nous a permis de fixer la température de fusion à 75°C (figure 33), valeur qui est logique en comparaison avec celle de $68,5^\circ\text{C}$ obtenue en solution $0,1\text{ M NaCl}$.⁶⁰ Pour ce qui est des autres changements se produisant lors de la fusion, notons l'augmentation en intensité des bandes à 729 , 1204 et 1236 cm^{-1} . La bande à 729 cm^{-1} présente également un élargissement lors de la fusion. En général, lors de la fusion, les bandes s'élargissent dû à l'augmentation des interactions entre les bases et les molécules de solvant. Dans ce cas-ci, Terpstra et coll.⁶⁸ ont déterminé que l'élargissement de cette bande était dépendante de la structure du squelette. D'après eux, la perturbation proviendrait du mouvement de l'unité furanose - phosphate relativement à la base.

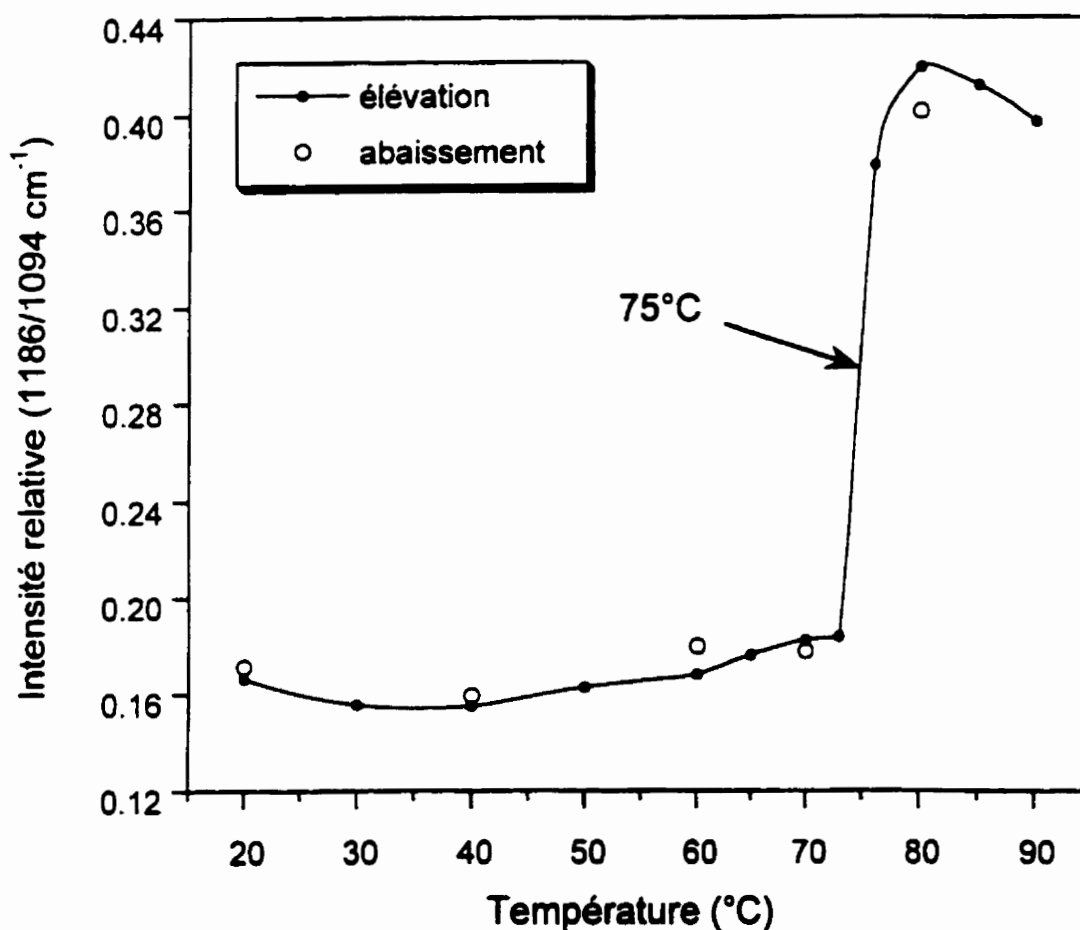


Figure 33 : Intensité relative de la bande à 1186 cm^{-1} relativement à celle de 1094 cm^{-1} du $\text{poly(dA)} \cdot \text{poly(dT)}$ lors d'une élévation (●) suivie d'un abaissement (○) de température

4.5 Conclusion

L'étude du complexe de poly(dG) · poly(dC) à basse température nous a permis d'observer différentes proportions des conformations A et B dans ce polymère. En effet, en solution 0.1 et 0.5 M NaCl, la proportion de conformation A augmente dans le complexe lorsque la température diminue. Dans les conditions de 0.1 M NaCl à -15°C, le pourcentage du caractère A est évalué à 75 % alors que pour la même température dans les conditions de 0,5 M NaCl, la conformation A est majoritaire à 90 %. Les pourcentages restant de 25 et 10 % respectivement sont associés à la conformation de type B.

Le suivi des intensités relatives des bandes à 1487 et 1527 cm⁻¹ nous a permis de localiser deux transitions dans le poly(dG) · poly(dC), une première à 73°C puis une deuxième à 103°C dans le cas où les expériences ont été menées en solution 0.1 M NaCl. La première correspond à une prétransition, où se produit une certaine réorganisation du complexe. La deuxième température caractérise la fusion. Les résultats ont démontré que la première transition était réversible alors qu'une fois le processus de fusion engagé, la réversibilité n'a pu être observée.

La première transition a été observée à 63°C dans le poly(dG) · poly(dC) en solution 0.5 M NaCl. Cette température de prétransition est inférieure de 10°C à celle qui a été observée en solution 0.1 M NaCl. L'autre transition, celle de fusion, se produit à 107°C. On observe à plus haute température une diminution anormale des bandes associées à la cytosine, effet que l'on explique par une précipitation du poly(dC) suite à la dissociation du complexe.

Quant au poly(dA) · poly(dT), nous avons vérifié que sa conformation à la température de la pièce, soit la forme B, ne varie pas lorsque la température diminue, contrairement au poly(dG) · poly(dC) en solution 0.1 et 0,5 M NaCl. La température de fusion de ce complexe a été évaluée à 75°C en solution 0,5 M NaCl.

CHAPITRE V

5 ACIDE POLY[DÉSOXYGUANYLIQUE-DÉSOXYCYTIDILIQUE] [Poly(dG-dC) · Poly(dG-dC)]

5.1 Introduction

Les chapitres précédents ont fourni l'occasion de décrire la transition d'un polynucléotide de la forme ordonnée à celle désordonnée. Comme nous l'avons vu, cette transition peut être induite par une variation de température, mais aussi de pH, de force ionique et de composition du solvant. Le présent chapitre porte sur la transition entre les deux formes ordonnées du copolymère alterné poly(dG-dC) · poly(dG-dC), soit les conformations B et Z, et la transition de la forme Z à désordonnée. Cette dernière transition a été difficile à localiser et elle n'a été observée que dans deux conditions particulières. C'est d'ailleurs la transition de la forme Z à désordonnée qui confère un caractère nouveau à la présente étude, puisque la transition B → Z ainsi que la nature de la conformation Z sont bien documentées dans la littérature.⁶⁹

5.1.1 L'acide poly[désoxyguanylique-désoxycytidilique] [poly (dG-dC) · poly (dG-dC)]

Le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) existe sous deux formes différentes. En 1972, Pohl et coll.¹⁰ ont démontré qu'en solution aqueuse à faible concentration en sel, le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) se retrouve sous la forme B. En augmentant la concentration en sel jusqu'à 4 M NaCl, ils ont remarqué une nette inversion dans le spectre du dichroïsme circulaire du complexe (figure 34). De même, la spectroscopie RMN démontrait une séparation du pic du ³¹P en un doublet et

suggérait que la double hélice nouvellement formée contenait deux groupements phosphate non équivalents. L'augmentation de la concentration en ions magnésium produisait le même effet, mais à des concentrations beaucoup plus faibles. Pohl et coll. ont fait de nombreuses autres études de ce genre pour vérifier l'effet de différents sels sur la structure du polynucléotide.^{70, 71} Cependant, la nature de la conversion demeurait inexplicée. En 1979, la diffraction des rayons X sur un cristal de d(CpGpCpGpCpG) révéla une conformation inhabituelle de cet ADN à double hélice antiparallèle, dans lequel les bases étaient de type Watson et Crick. Wang et coll.¹¹ venaient d'identifier la conformation Z.

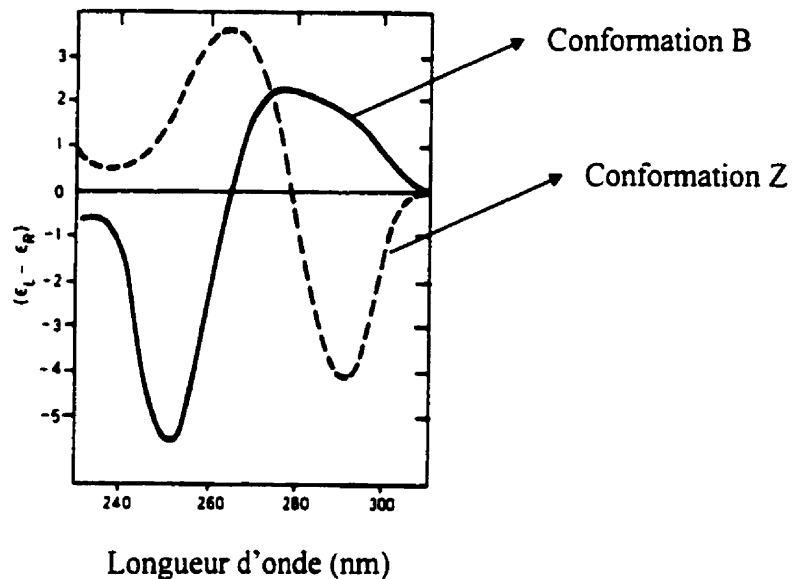


Figure 34 : Spectre de dichroïsme circulaire du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) dans des conditions de faible concentration ionique (0,2 M NaCl —, forme B) et de forte concentration ionique (3,5 M NaCl ---, forme Z)¹⁰

Haworth et coll.⁷² ont suggéré que le mécanisme de transition de la forme B vers Z implique la séparation des paires de bases suivie de leur désempilement, avant que les bases guanine seules, initialement sous la forme *anti*, ne soient converties à la forme *syn*. Les bases cytosine font une rotation mais demeurent sous la forme *anti*. Les paires de bases se reforment ensuite sous la force des liaisons hydrogène, de type Watson et Crick. Une séparation complète des brins n'est

pas requise dans ce processus, puisque la transformation peut s'effectuer progressivement le long de l'hélice.

5.1.2 Facteurs favorisant la structure de type Z

Il existe différents facteurs favorisant l'une ou l'autre des structures de type B ou Z. Depuis quelques années, les chercheurs pensaient que le groupe amino C2 de la base guanine et la séquence alternante purine-pyrimidine étaient des pré-requis essentiels pour la formation de l'ADN de type Z. C'est pour cette raison que le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) a été largement utilisé lors d'études sur les facteurs affectant l'équilibre $B \leftrightarrow Z$. Or, en 1985, Wang et coll.⁷³ ont démontré à partir de la structure cristalline $d(\text{Br}^{\prime}\text{CGATBr}^{\prime}\text{CG})_2$, que la conformation de type Z pouvait également se former dans une séquence non alternante.

Habituellement, les hélices enroulées vers la droite sont des structures plus stables énergétiquement que les hélices enroulées vers la gauche. L'instabilité de l'hélice de type Z a pu être expliquée en terme de compétition entre les interactions d'empilement des bases, qui sont stabilisantes, et les déformations du squelette furanose - phosphate, qui déstabilisent le système.⁷⁴ En effet, la distance entre deux groupements phosphate est de 7,7 Å dans l'ADN de type Z, comparativement à 11,7 Å dans l'ADN de type B. Il n'est pas surprenant que les premières observations concernant l'ADN de type Z aient été faites en solutions contenant de fortes concentrations en sels, puisque ces concentrations élevées diminuent les répulsions phosphate - phosphate, qui sont particulièrement importantes dans l'ADN de type Z.⁷⁵ D'autres facteurs diminuent également l'énergie de l'ADN de type Z, ce qui fait que l'équilibre est dirigé vers cette conformation. Les fortes concentrations en ions chlorure requises pour que la transition $B \rightarrow Z$ se produise peuvent être significativement réduites si de l'alcool, des ions divalents ou de la spermine (N, N'-bis[3-aminopropyl]-1,4-butanediamine) sont ajoutés au polynucléotide, à des concentrations aussi faibles que 2 µM. La stabilisation de l'hélice de type Z par des métaux de transition peut être expliquée par l'interaction entre le site N7 des purines et l'ion métallique, ce

qui stabilise la base en position *syn*.⁷⁶ Le tableau suivant présente différentes concentrations en cations nécessaires pour obtenir la transition B→Z dans le poly(dG-dC) · poly(dG-dC).

Tableau 6 : Concentration en cations nécessaire pour l'obtention de la transition B↔Z dans le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) à la température de la pièce.⁷

Ion	Concentration
Na ⁺	2500 mM
Mg ²⁺	700 mM
Ca ²⁺	100 mM
Ba ²⁺	40 mM
Spermine ³⁺	Agrégats
Mg ²⁺ + 20% éthanol	0,4 mM
Mg ²⁺ + 10% éthanol	4 mM

De même, les ions cobalt(II), nickel(II)⁷⁷ et mercure(II)⁷⁸ stabilisent la structure Z à différentes concentrations. Des modifications chimiques peuvent également être responsables de la création de la forme Z. Par exemple, lorsque les pyrimidines et les purines sont substituées en C6 et C8 respectivement, les substituants interagissent directement avec le ribose et peuvent déplacer l'équilibre *syn-anti* vers l'orientation *syn*, ce qui en retour favorise la conformation Z.

5.1.3 Implications biologiques

Des études ont démontré le rôle biologique probable de la conformation de type Z, qui dépendrait de la facilité avec laquelle l'hélice peut subir un changement conformationnel de la forme B à Z. Dans l'ADN de cellules eukaryotiques, la séquence dm^5C-dG revient très souvent, suite à la méthylation de l'ADN.⁷⁹ Cette séquence joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes. En conditions physiologiques normales, la séquence peut se transformer en ADN de type Z.^{80, 81} Une autre expérience a prouvé que la forme Z existe bien dans les chromosomes. Des lapins ont reçu des injections de poly(dG-dC) - poly(dG-dC) modifié chimiquement et ils se sont mis à produire des anticorps anti-Z.⁸² Une équipe de chercheurs a avancé l'hypothèse que l'ADN de type Z serait également impliqué dans la régulation de l'ADN superenroulé.⁸³ Le rôle global de ce type d'ADN n'est pas encore clair. Sa fonction serait peut être régulatrice, puisque la transformation B→Z serait réversible.

5.2 *Partie expérimentale*

Nous avons utilisé cinq conditions différentes pour l'étude du poly(dG-dC) - poly(dG-dC), soit 0,1, 1, 3 et 5 M NaCl ainsi que 100 mM $MgCl_2$. Les échantillons ont été préparés en suivant la procédure décrite à la section 2,1. Des solutions de 2% en poids ont été préparées dans le cas du chlorure de magnésium et de 4% en poids dans le cas du chlorure de sodium. Aucun des échantillons n'a été dialysé. Pour chaque condition, au moins deux expériences ont été effectuées.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Étude en présence d'ions magnésium

La figure 35 présente les spectres du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 100 mM MgCl₂ à des températures de 60 et 65°C, ces températures délimitant la transition B→Z.

Pour l'identification qualitative des structures A, B et Z, Benevides et coll.³⁴ proposent les bandes intenses dans la région de 750 à 850 cm⁻¹, associées à des vibrations du squelette phosphodiester. En effet, puisque les squelettes des formes B et Z sont très différents, les changements en fréquence sont caractéristiques pour chacune des formes. Pour l'analyse quantitative des principales conformations, ces mêmes chercheurs proposent d'utiliser les fréquences à 668 ± 2, 682 ± 2, et 625 ± 2 cm⁻¹, pour caractériser respectivement les conformations de type A (C3'-*endo-anti*), B (C2'-*endo-anti*) et Z (C3'-*endo-syn*). La région spectrale de 620 à 690 cm⁻¹ est des plus utiles pour définir les conformations impliquées. Dans ce cas, les vibrations proviennent non pas du squelette, mais plutôt de la guanine, qui est couplée au cycle furanose par la liaison glycosidique. Les fréquences des bases guanine sont influencées par la géométrie du cycle furanose et par l'angle de torsion χ (voir figure 3).

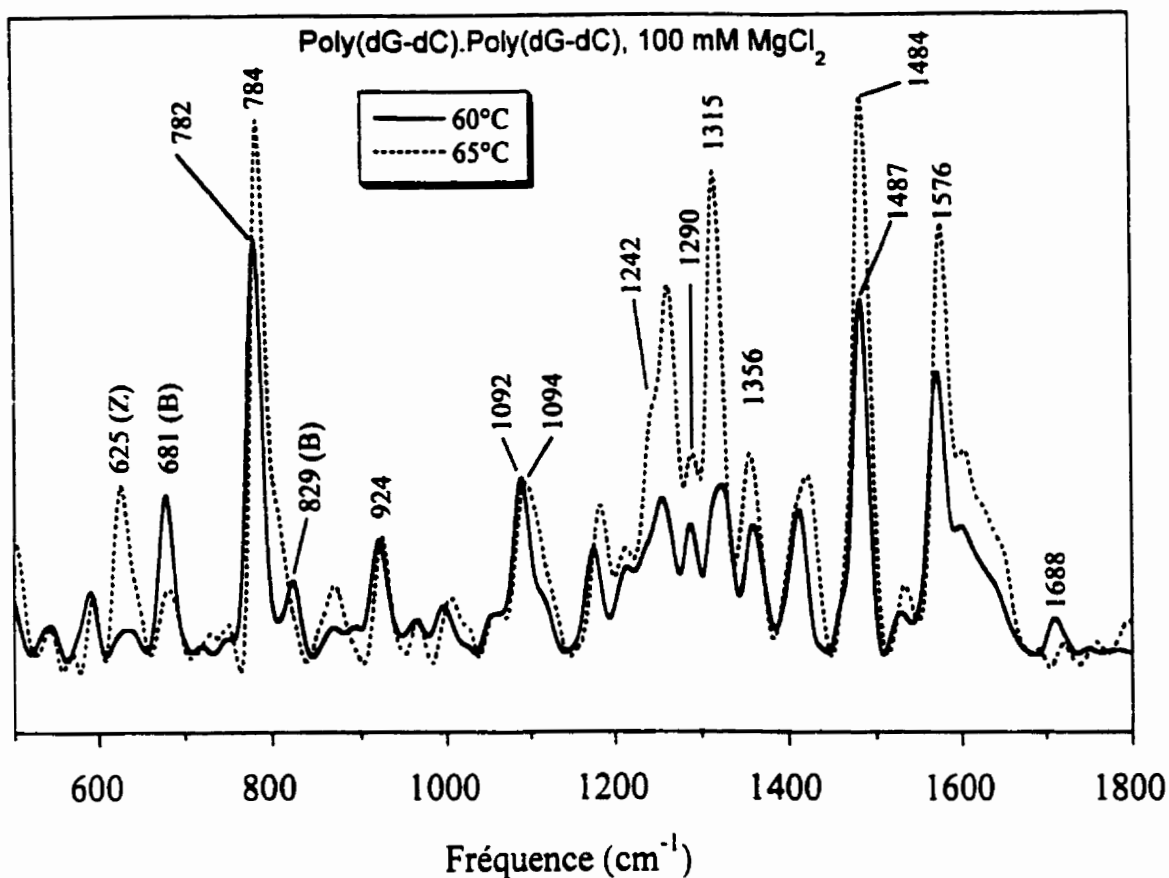


Figure 35 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl₂) à 60 et 65°C

En solution aqueuse 100 mM MgCl₂, le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) se trouve sous la forme B à la température de la pièce, tel qu'indiqué par les fréquences des bandes à 681, 829 (C2'-endo) et 1092 cm⁻¹ (associée à l'élongation symétrique du groupement PO₂⁻). La transition de la forme B vers la forme Z se produit à une température de 62°C sous ces conditions. À cette température, il y a une nette diminution en intensité des bandes à 681 et 829 cm⁻¹ et une forte augmentation de la bande à 625 cm⁻¹, suite au changement d'orientation des bases purines (guanine) qui passent de la conformation *anti* à *syn* sous l'effet de l'inversion de la double hélice. De même, la bande à 829 cm⁻¹, qui provient de l'élongation antisymétrique du groupement phosphodiester, se déplace à une fréquence plus basse, soit 800 cm⁻¹ dans le spectre de la forme Z.⁸⁵ La température de transition de la forme B à Z observée ici est semblable à celle obtenue par extrapolation des

données de Behe et coll.⁸⁶ Ces chercheurs ont déterminé par dichroïsme circulaire qu'à des concentrations plus faibles que 20 mM en $MgCl_2$, la température de transition de la forme B à Z

varie peu, alors qu'entre 200 et 600 mM, la température de transition diminue linéairement avec le logarithme de la concentration en ions magnésium. Lorsque la concentration en $MgCl_2$ atteint 700 mM, il n'est plus nécessaire de chauffer le polynucléotide pour avoir une stabilisation de la forme Z. Le comportement du déplacement en fréquence de la bande à 1487 cm^{-1} (associée à la guanine) nous permet de suivre la dynamique de la transition de la forme B à Z. La fréquence de cette bande décroît jusqu'à 1484 cm^{-1} entre 60 et 65°C . Le rapport de l'intensité de la bande à 1487 cm^{-1} sur celle à 1092 cm^{-1} constitue un autre indicateur de la transition (figure 36). On remarque une augmentation rapide de son intensité entre 60 et 65°C (variation de 2,0 à 3,5). Les bandes à 1487 et 1576 cm^{-1} sont sensibles au phénomène d'hypochromisme Raman. L'augmentation d'intensité de ces bandes lors de la transition B vers Z indique que le degré d'empilement des bases diminue. Cette transition est coopérative. Une fois qu'un noyau de type Z est formé dans l'hélice B, la transformation structurale est induite dans les nucléotides adjacents.

Quant au passage de la forme Z à désordonnée, nous avons déterminé que cela se produit à une température de 117°C . La figure 37 présente les spectres à 115 et 120°C , de part et d'autre de la transition. Le graphique des intensités relatives des bandes à 626 et 681 cm^{-1} (figure 38) montre bien la transition de la forme B à Z de même que celle de la forme Z à désordonnée.

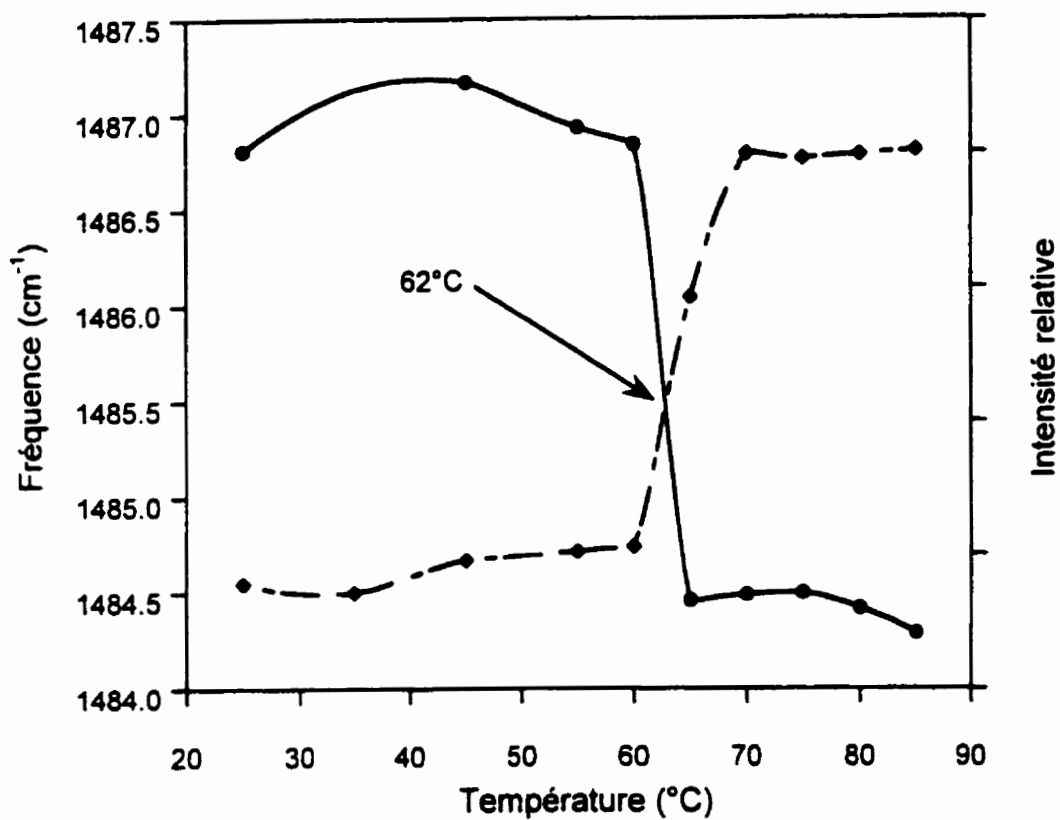


Figure 36 : Transformation du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl₂) de la forme B à Z mesurée à partir de l'intensité de la bande à 1487 cm⁻¹ (losanges) ainsi que de la fréquence (cercles) de cette même bande. L'intensité relative varie de 2,0 à 3,5.

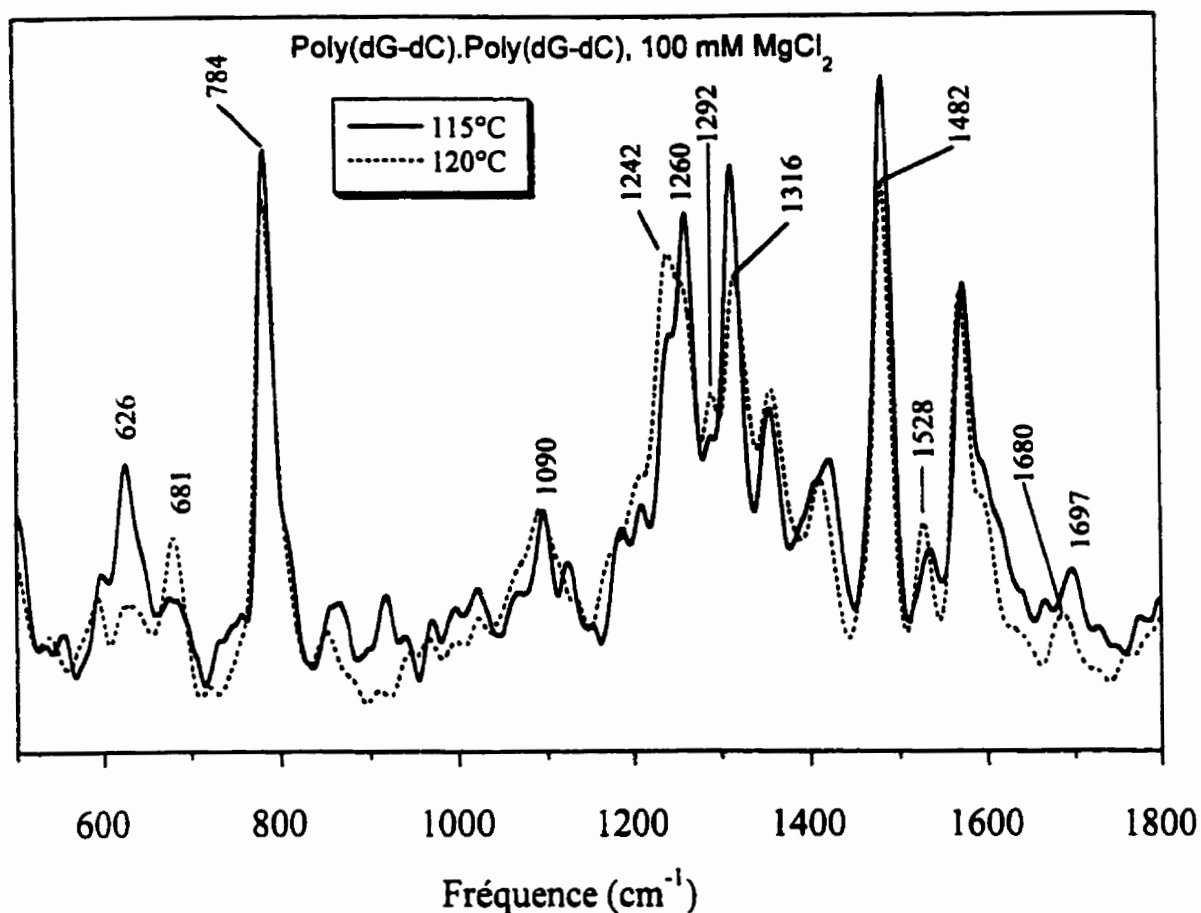


Figure 37 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl₂) à 115 et 120°C

La bande à 626 cm⁻¹ est peu présente dans la forme initiale du composé (forme B). Le rapport de cette bande relativement à celle 1092 cm⁻¹ augmente rapidement lors de la transition de la forme B vers la forme Z, pour demeurer constant de 70 à 110°C et diminuer considérablement lorsque le polymère passe à la forme désordonnée. L'intensité de la bande à 681 cm⁻¹ relativement à 1092 cm⁻¹ est par ailleurs élevée avant que le composé n'atteigne la température de transition, puis diminue rapidement par la suite. Le signe le plus évident de la transformation de la forme Z à celle désordonnée est la réapparition à haute température de la bande à 681 cm⁻¹ - également caractéristique de la forme désordonnée - et dont l'intensité est très faible dans la forme Z. Le ratio de la quantité de conformation Z sur la conformation B peut être calculé à partir du rapport de l'intensité de la bande à 626 cm⁻¹ sur celle à 681 cm⁻¹.^{84, 87} Ce ratio, faible avant la transition de

la forme B à Z, augmente rapidement à la température de transition pour ensuite diminuer graduellement lors de la réapparition de la bande à 681 cm^{-1} dans la forme désordonnée. D'autres bandes attirent également notre attention, par exemple celles à 1242 et à 1290 cm^{-1} (associées à la cytosine), qui augmentent en intensité et s'élargissent lors des deux transitions. Le graphique 39 présente la variation de l'intensité relative de ces deux bandes en fonction de la température. Les deux courbes ont un comportement similaire. Les intensités des bandes à 1242 et 1290 cm^{-1} augmentent de 47% et 36% entre 60 et 65°C et de 20% et 16% de 115 à 120°C respectivement.

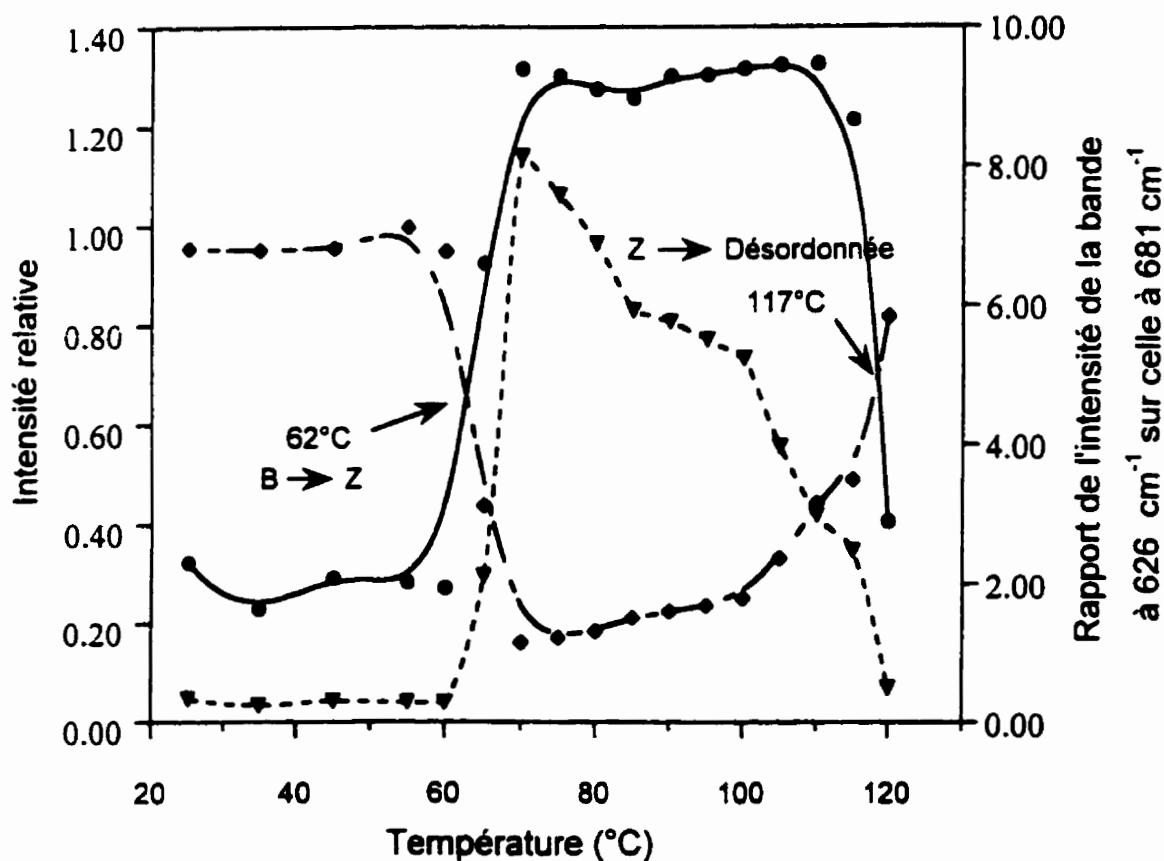


Figure 38 : Intensités relatives des bandes à 626 (cercles) et 681 cm^{-1} (losanges) ainsi que le rapport des intensités de la bande à 626 sur celle à 681 cm^{-1} (triangles) du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl_2). Les intensités sont relatives à la bande phosphate à 1092 cm^{-1} .

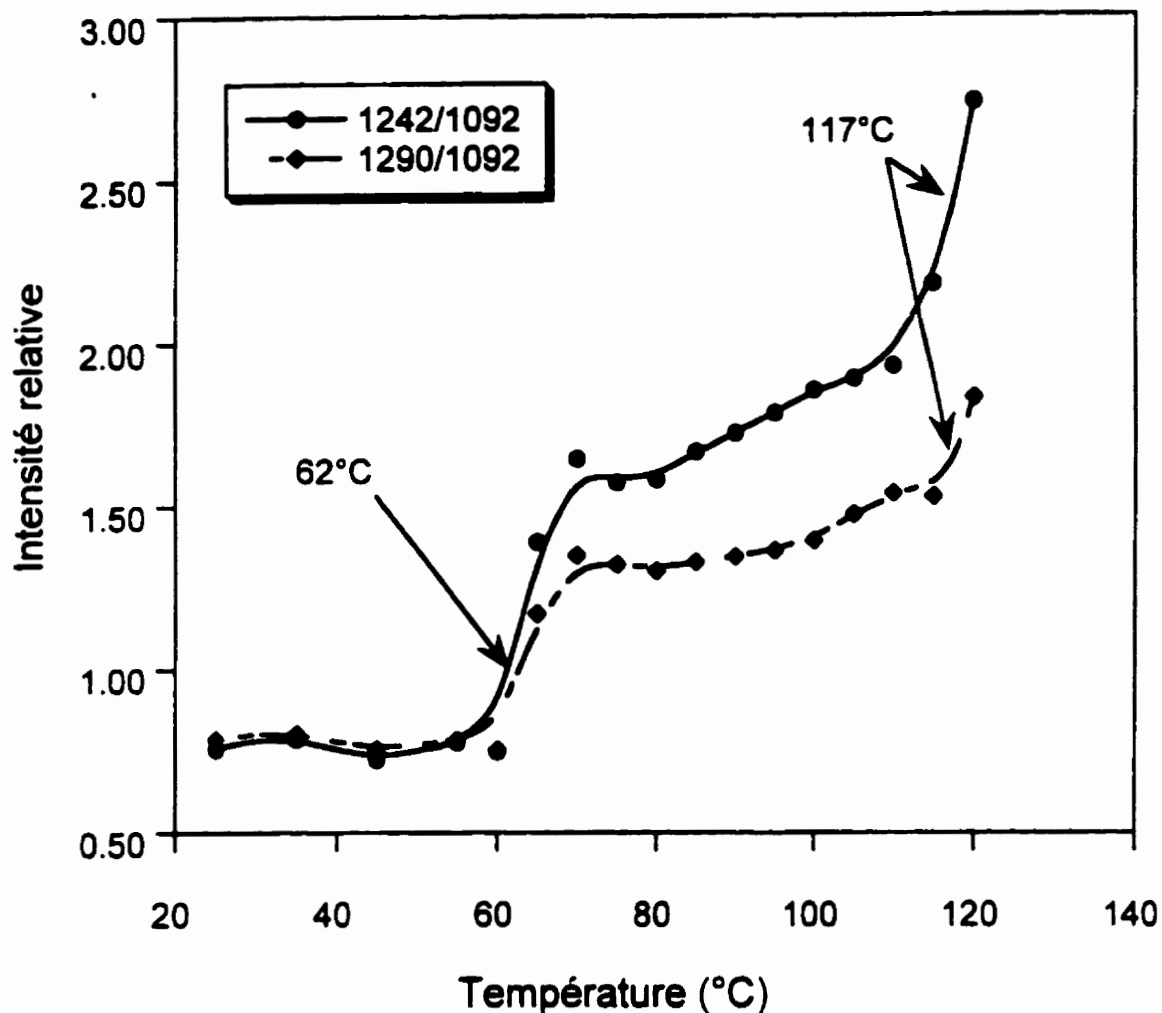


Figure 39 : Intensités relatives des bandes à 1242 et 1290 cm^{-1} du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) (100 mM MgCl_2)

L'enregistrement de spectres à des températures supérieures à 120°C aurait été souhaitable pour soutenir le fait que la transition se produit bien à 117°C puisque cela nous aurait permis d'établir une plage de température où se produit la transition. Malheureusement, cela n'a pas été possible car les échantillons étaient sensibles à la fluorescence lorsque soumis à des températures supérieures à 120°C.

5.3.2 Étude en présence d'ions sodium

Étude en solution de plus de 2,5 M NaCl

L'équipe de Behe et coll.⁸⁶ soutient qu'à des concentrations inférieures à 2,3 M NaCl, la forme B est observée à la température de la pièce alors qu'à des concentrations supérieures à 2,5 M NaCl, c'est la forme Z qui est retrouvée. Entre 2,3 et 2,5 M NaCl, le phénomène inverse se produit, la forme Z étant plus stable que la forme B à la température de la pièce. Nous avons décidé de prendre des mesures au-dessus de la concentration critique (2,5 M) pour observer la transition de la forme Z à désordonnée.

En solution 3 M NaCl, le polymère adopte la conformation Z à la température de la pièce. La présence de la bande à 625 cm^{-1} est un bon indicateur de la conformation C3'-*endo-syn* (Z) de même que l'absence de la bande à 829 cm^{-1} (B). Dans ce cas-ci, nous n'avons observé qu'une seule transition, de la forme Z à désordonnée à 113°C , puisque le polymère était déjà sous la forme Z à 23°C . La figure 40 présente les spectres du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) à 112 et 114°C . Le suivi du processus de fusion peut se faire à l'aide des bandes à 625 et 683 cm^{-1} . Entre 20 et 112°C , l'intensité relative de la bande à 625 cm^{-1} est constante, puis elle diminue fortement lors de la fusion. L'intensité relative de la bande à 683 cm^{-1} (677 cm^{-1} à 114°C) est faible avant d'atteindre la transition, pour augmenter rapidement par la suite, cette bande étant également caractéristique de la forme désordonnée. Dans les deux cas, on peut observer la grande coopérativité de la transition. Plusieurs changements spectraux obtenus sur les spectres de la forme désordonnée en solution 3 M NaCl sont semblables à ceux obtenus en solution 100 mM MgCl_2 , comme par exemple la bande de la cytosine à 1240 cm^{-1} qui augmente en intensité tout en se déplaçant à 1236 cm^{-1} . Une autre bande de la cytosine, celle à 1529 cm^{-1} , présente un comportement typique des changements obtenus lors de cette transition. Cette bande varie en fréquence de 1529 à 1525 cm^{-1} entre 112 et 114°C alors que son intensité relative double.

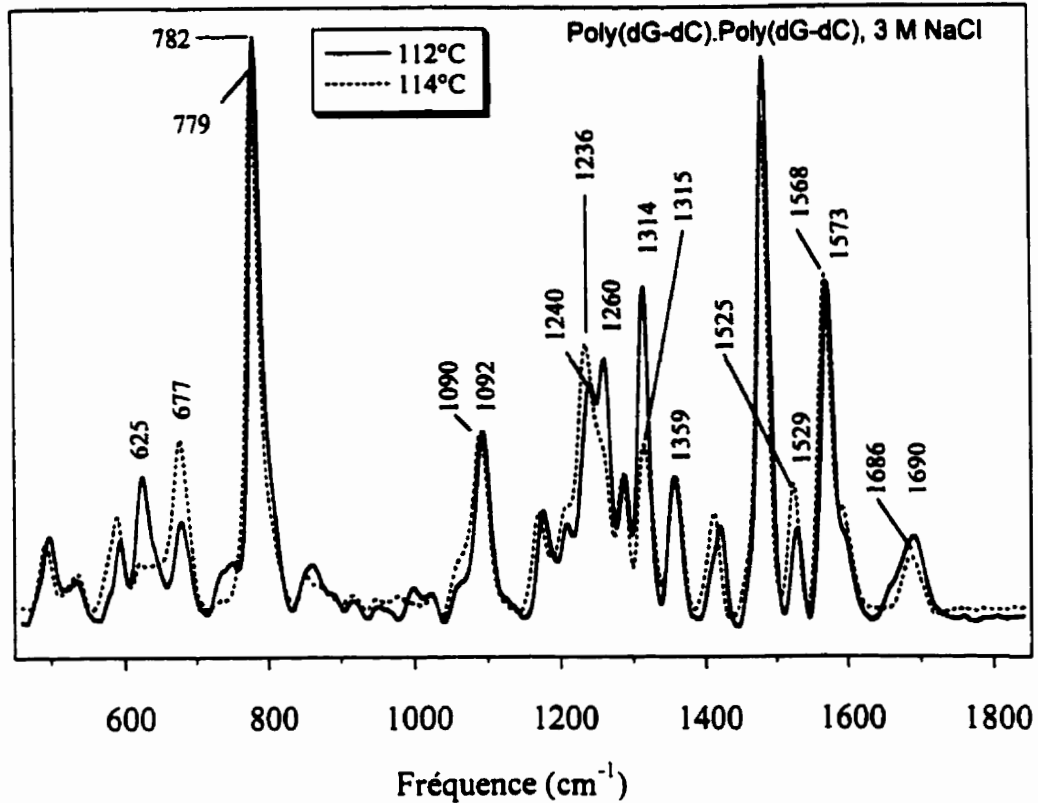


Figure 40 : Spectre Raman du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 3 M NaCl à 112 et 114°C

En plus des expériences menées en solution 3 M NaCl, nous avons enregistré des spectres en solution 5 M NaCl. Ces spectres sont représentés à la figure 41. À la température de la pièce, le spectre du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) démontre une conformation de type Z dans ces conditions, ce qui est en accord avec les résultats de Behe et coll.⁸⁶, la concentration de 5 M NaCl étant bien au-dessus de la concentration critique de 2,5 M pour l'obtention de la transition B → Z.

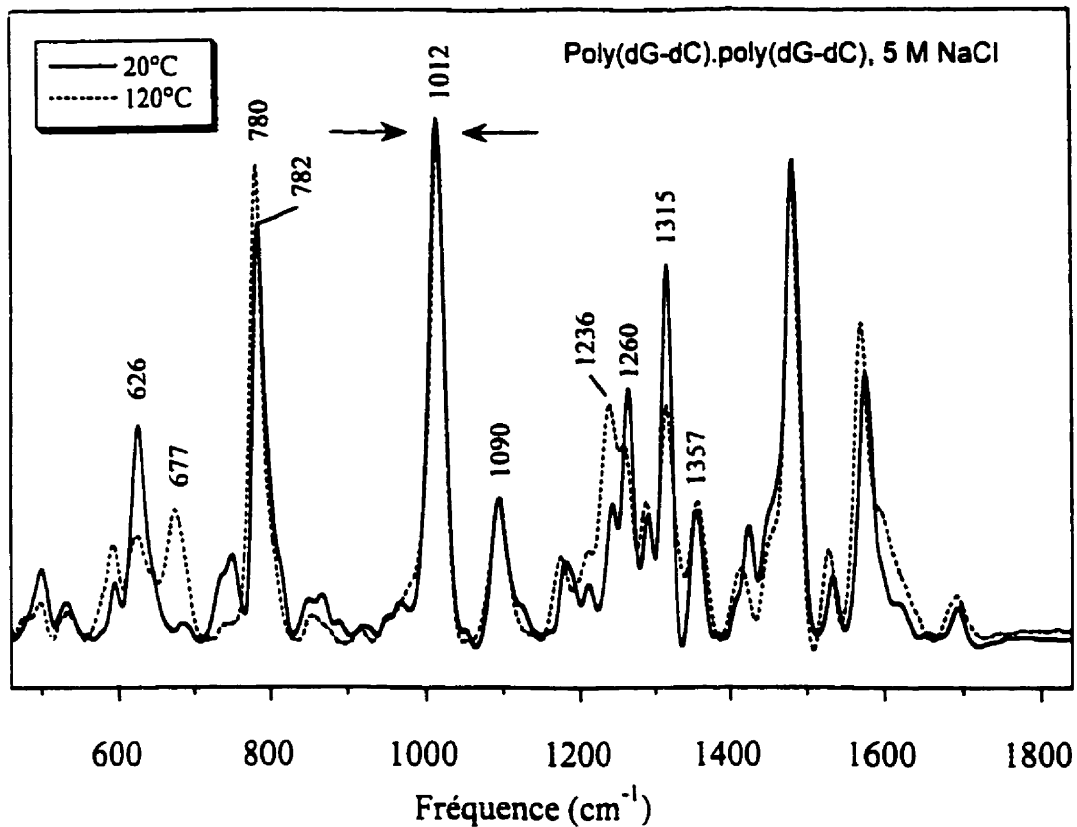


Figure 41 : Spectre Raman du poly(dG-dC) -poly(dG-dC) en solution 5 M NaCl à 20 et 115°C

Une bande particulièrement intense à 1012 cm^{-1} dans le spectre du poly(dG-dC) -poly(dG-dC) en solution 5 M NaCl n'a pas été observée avec les autres conditions, ce qui nous laisse croire qu'elle pourrait être due à une dégradation de l'échantillon. Nous avons vérifié que cette bande n'était pas due à un tampon phosphate (ajouté à l'échantillon par la compagnie qui fabrique le produit) en étudiant un tampon à $\text{pH} = 7$ préparé à partir de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. Les fréquences des bandes phosphate de ce tampon sont de 874 , 988 et 1076 cm^{-1} , ces fréquences différant d'au moins 22 cm^{-1} de celle à 1012 cm^{-1} . La bande à 1012 cm^{-1} nous laisse perplexe sur les résultats obtenus à haute température avec cet échantillon.

En 1993, Klump et coll.⁸⁸ ont étudié par spectroscopie UV, Raman et DSC (analyse enthalpique différentielle) plusieurs polynucléotides possédant les séquences alternantes purines/pyrimidines. Ils ont examiné, plus particulièrement par spectroscopie UV, les changements de conformation induits thermiquement dans le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en fonction de la concentration en ions sodium, en présence et en absence de nickel(II). Pour ce faire, ils ont mesuré les changements des températures de transition en fonction de la concentration totale en cations. Entre 1 et 100 mM de NaCl, ils ont noté qu'à chaque fois que la concentration est multipliée par dix, la température de transition de la forme B à désordonnée augmente de 17°C, pour atteindre une valeur maximale de 115°C à 200 mM de NaCl. À une concentration supérieure en NaCl, le système bifurque, ce qui résulte en la conversion de la forme B à Z, puis de Z à désordonnée lorsque la température continue d'augmenter. Un aperçu des températures de transition obtenues est illustré à la figure 42.

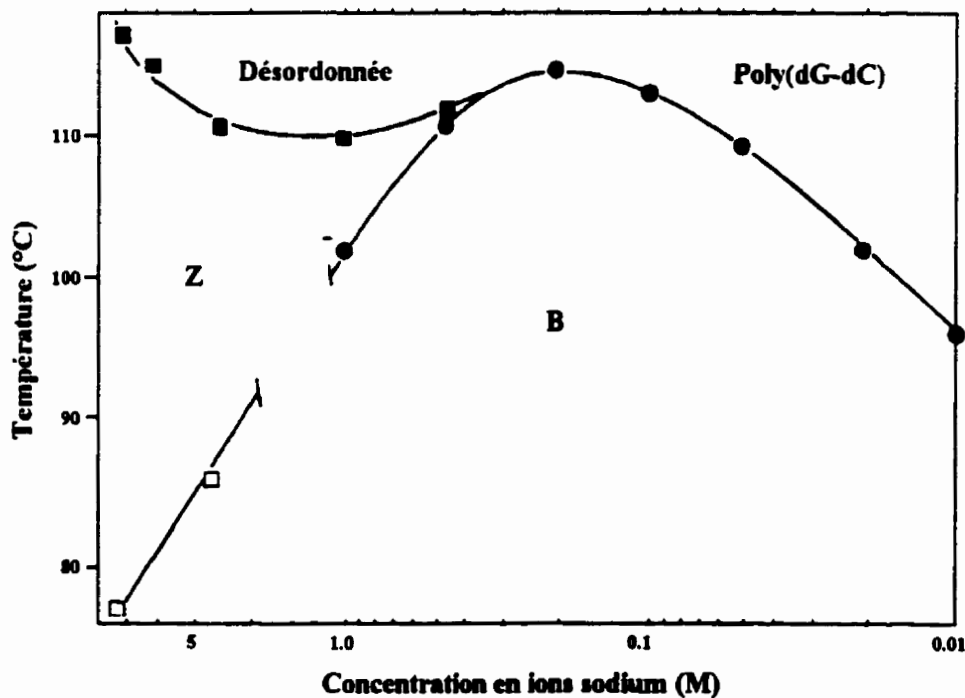


Figure 42 : Diagramme de phase du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) : température de transition en fonction de la concentration en ions sodium⁸⁸

Ce graphique précise qu'à la température de la pièce en solution 3 M NaCl, le poly(dG-dC) - poly(dG-dC) se trouve sous la forme B. Or, nous venons de démontrer à l'aide du spectre Raman qu'en solution 3 M NaCl, le composé est sous la forme Z. À cette température, il en est de même pour le poly(dG-dC) - poly(dG-dC) en solution 5 M NaCl, mais puisque nous soupçonnons une dégradation de l'échantillon, nous ne pouvons pas nous fier à ce résultat. Il semble donc que la frontière séparant les domaines d'existence des formes B et Z dans le graphique publié par Klump et coll.⁸⁸ soit anormalement déplacée du côté des hautes concentrations en ions sodium.

Étude en solution de moins de 2,3 M NaCl

Les spectres en solution 1 M NaCl ressemblent beaucoup à ceux enregistrés dans 0,1 M NaCl. Dans les deux cas, une transition s'y produit à 113 °C. Il y a, à cette température, l'apparition de bandes caractéristiques de la forme Z et une complète disparition de la bande à 829 cm⁻¹, caractéristique de la forme B. Les bandes identifiées lors des expériences menées en solution 100 mM MgCl₂, comme celles à 1240 et 1288 cm⁻¹, peuvent être utilisées pour suivre la dynamique de la transition puisque ces dernières augmentent en intensité et s'élargissent lors du passage de la conformation B vers Z (voir figure 35).

En 1970, soit neuf ans avant la découverte de la forme Z de l'ADN, Wells et coll.⁸⁹ ont mesuré par spectroscopie UV-visible les températures d'une transition du poly(dG-dC) - poly(dG-dC) en solution aqueuse à six concentrations en sodium différentes (de 3,0 X 10⁻⁴ à 1,0 X 10⁻² M). Ces températures de transition variaient de 75 à 94°C à mesure que la concentration ionique augmentait. À l'époque, la transition observée était interprétée comme le passage de l'état ordonné du composé à l'état désordonné. Aujourd'hui, d'après Behe et coll.⁸⁶, c'est la transition de la forme B à Z qui se produit dans ces conditions et c'est ce que Wells et coll.⁸⁹ auraient observé en 1970. Nous avons utilisé des concentrations en ion sodium de dix et cent fois supérieures à la concentration la plus élevée de Wells et coll.⁸⁹ Nous constatons, tout comme

dans le cas du poly(G) · poly(C), l'effet stabilisateur d'une plus forte concentration ionique sur le polymère poly(dG-dC) · poly(dG-dC), ce qui fait en sorte que la transition a lieu à plus haute température (113°C dans 100 mM NaCl versus 94°C dans 10 mM NaCl). Toutefois, cet effet stabilisateur ne semble pas augmenter à des concentrations supérieures à 0,1 M NaCl puisque nous obtenons la même température de transition en solution 1 M NaCl. D'autre part, tel que nous l'avons déterminé précédemment, l'ion sodium possède un effet stabilisateur modéré par rapport à l'ion magnésium.

La température de transition obtenue par Klump et coll.⁸⁸ pour le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 0,1 M NaCl est de 114°C mais, d'après la figure 42, la transition serait entre la forme B et désordonnée. Comme il est mentionné ci-haut, nous pensons plutôt que cette transition est de B à Z puisqu'il y a alors apparition dans le spectre d'une bande à 626 cm⁻¹. La concentration critique étant de 2,3 M pour l'obtention de la forme B à la température de la pièce, nos résultats sont en accord avec ceux de Behe et coll.⁸⁶ Dans ces deux cas, les températures de transition obtenues ne correspondent pas à celles avancées par Klump et coll.⁸⁸ Notons cependant que nos mesures avec les solutions 0,1 M et 1 M NaCl ne nous ont permis de mesurer les températures de fusion du complexe dans ces conditions, dû à la présence de fluorescence sur les spectres à haute température.

Dans les cas où il y a divergence entre nos résultats et ceux de Klump et coll.⁸⁸, nous croyons qu'une erreur a pu se glisser sur le diagramme de phase présenté à la figure 42, là où le système bifurque. Selon nos résultats, la région II devrait être plus étendue. Les résultats que nous avons obtenus sont plausibles puisqu'ils tombent dans la plage de concentrations critiques définies par Behe et coll.⁸⁶ Bien que les techniques utilisées n'étaient pas les mêmes, l'origine de la différence pourrait se situer au niveau des concentrations en polynucléotides utilisées. En effet, les concentrations utilisées en spectroscopie UV sont relativement faibles par rapport à celles utilisées en spectroscopie Raman.

5.4 Conclusion

Nous avons évalué les températures de transition de la forme B à Z à 62°C et de Z à désordonnée à 117°C pour le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en solution 100 mM MgCl₂. La première température de transition est comparable à celle de la littérature alors que la deuxième est inédite. Lorsque les spectres ont été enregistrés en solutions aqueuses contenant des ions sodium (0,1, 1, et 3 M), toutes les transitions ont été observées à 113°C. Le fait que la transition B → Z se soit produite à la même température dans les conditions de 0,1 et 1 M NaCl démontre le faible effet stabilisateur de cet ion à ces concentrations. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer la transition de la forme Z à désordonnée puisqu'une forte fluorescence s'était développée dans les échantillons. Enfin, en présence de 3 M NaCl, la transition observée était de la forme Z à désordonnée.

Le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) étant un copolymère synthétique alterné, les bases adjacentes dans chaque brin ont un recouvrement plus prononcé dans un copolymère que dans un homopolymère. Nous n'avons pas été en mesure d'obtenir les températures de fusion du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) en présence de 0,1 et 1 M NaCl, ce qui rend les comparaisons avec le poly(dG) · poly(dC) impossibles. Toutefois, pour un nombre de liaisons hydrogène presque identique, le meilleur recouvrement d'un copolymère explique sa plus grande stabilité par rapport à un homopolymère, ce qui fait que le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) est plus stable que le poly(dG) · poly(dC).⁹⁰

CHAPITRE VI

6 CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons pour objectif, dans la première partie de ce travail, de déterminer la température de fusion du poly(G) - poly(C) en solution aqueuse (130°C en solution 0,5 M NaCl). La qualité des spectres obtenus à haute température était en partie due au scellage du capillaire contenant l'échantillon et à son introduction dans un porte-échantillon unique. Ce porte-échantillon, qui pouvait atteindre 200°C, nous a permis de mesurer avec précision plusieurs températures auxquelles se dissocient la double hélice, selon le type de cation monovalent et la concentration ionique utilisée. Les diverses expériences menées en présence de sels de sodium et de tétraméthylammonium (TMAP) ont révélé que ni les sels, ni la concentration de ces derniers n'influençaient la conformation de type A adoptée par le poly(G) - poly(C). Toutefois, les sels de tétraméthylammonium sont reconnus pour déstabiliser les structures ordonnées, alors que l'augmentation en concentration des sels monovalents stabilise les doubles hélices. Les études menées au laboratoire ont donné les résultats escomptés, soit des températures de fusion plus faibles (par rapport à celle obtenue avec 0,5 M NaCl) en présence du TMAP (112°C) et plus élevées lorsque la concentration en sodium augmentait (125°C et 145°C en solutions 0,1 et 0,5 M respectivement). En plus, nous avons caractérisé, à l'aide des bandes de la guanine à 1481 et 1573 cm^{-1} , la formation d'une structure en tétramère du poly(G) suite à la séparation des deux brins du complexe. La non réversibilité de la transition de même que la présence de la bande à 1723 cm^{-1} sur le spectre du [poly(G) - poly(C) - poly(C)] à 140°C appuient la formation de [poly(G)]₄ dans ces conditions.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la spectroscopie Raman pour caractériser la conformation du poly(dG) - poly(dC) en fonction de la température. Nous avons observé des mélanges de conformations différentes selon les concentrations en ions sodium utilisées, pour des températures qui variaient de celle de la pièce à -15°C. Il semble que la concentration ionique affecte fortement ce comportement du complexe. À 23°C, les conformations de ce complexe en

solutions 0,1 et 0,5 M NaCl sont également distribuées entre la forme A et B. À -15°C , la conformation A est majoritaire dans les deux solutions. En présence de 0,1 et 0,5 M NaCl, les échantillons présentaient tous deux une prétransition à 73 et 63°C respectivement. Les modifications sur ces spectres n'indiquent pas de changements conformationnels majeurs mais plutôt une altération de l'association des paires de bases ainsi qu'une hydratation des groupements carbonyle. Ces modifications sont accompagnées d'une légère distorsion de la double hélice, d'où la diminution du degré d'empilement des bases associées à la cytosine. Nous avons déterminé les températures de fusion à 103°C (0,1 M NaCl) et 107°C (0,5 M NaCl). Cependant, la chute de signal des bandes associées à la cytosine suite à la fusion dans le deuxième cas a été expliquée par la précipitation du poly(dC). Il aurait été intéressant de faire varier les concentrations de sodium entre 0,1 et 0,5 M pour vérifier à partir de quelle concentration le poly(dC) commence à précipiter.

Enfin, l'étude des transitions du poly(dG-dC) · poly(dG-dC) a fait l'objet du chapitre V. Nous avons observé en solution 100 mM MgCl_2 , les températures de transition de la forme B vers Z (62°C) et entre la forme Z et désordonnée ($T_{\text{fusion}} = 117^{\circ}\text{C}$). Nous avons également fait des expériences en présence de 0,1, 1, 3 et 5 M NaCl. Seule la transition de la forme B vers Z a pu être observée en présence de 0,1 et 1 M NaCl. Cette transition a été évaluée à 113°C dans les deux cas. La fusion était impossible à percevoir dû à la fluorescence qui s'était développée dans les échantillons. En présence de 3 M NaCl, le composé était déjà sous la forme Z, et par conséquent seule la fusion a été observée à 113°C . Les essais menés sur le polynucléotide en présence de 5 M NaCl ont été infructueux puisque les spectres présentaient une bande inconnue très intense à 1012 cm^{-1} .

Nous avons constaté que le poly(dG) · poly(dC) adoptait la conformation A beaucoup plus facilement que le poly(dG-dC) · poly(dG-dC) pour une même concentration ionique. Ceci a pu être vérifié sur les spectres à la température de la pièce à l'aide des bandes à 806 cm^{-1} (caractéristique de la forme A) et 829 cm^{-1} (caractéristique de la forme B).

De tous les polynucléotides que nous avons étudié, le poly(G) · poly(C) est le plus stable. Le poly(A) · poly(T) est moins stable thermiquement que ce dernier puisque les polymères contenant les bases adénine et thymine se dissocient à des températures inférieures à ceux contenant les bases guanine et cytosine. Nous avons mesuré expérimentalement la fusion du poly(dA) · poly(dT), qui de façon théorique devait être inférieure à celle du poly(A) · poly(T) dans les mêmes conditions dû à l'absence du groupement hydroxyle en position C2'. En effet, la température de fusion s'est révélé être plutôt faible (75°C). Finalement, la conformation B de ce composé ne subissait pas de changement conformationnel lorsque la température diminuait.

Il serait intéressant d'étendre l'étude sur la stabilité thermique de ces mêmes biopolymères en présence d'autres cations monovalents (comme K⁺ et Li⁺) ou encore divalents et d'évaluer les changements conformationnels susceptibles de se produire en fonction de la température.

RÉFÉRENCES

1. Zamenhof, S., Brawermann, G., Chargaff, E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1952**, 9, 402-405.
2. Franklind, R. E., Gosling, R. G., *Nature*, **1953**, 172, 156-157.
3. Gulland, J. M., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **1947**, 12, 95-103.
4. Watson, J. D., Crick, F. H. C., *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
5. Watson, J. D., Crick, F. H. C., *Proc. Roy. Soc. (Londres) Ser. A*, **1954**, 223, 80-96.
6. Blackburn, M., Gait, M. J., *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, **1990**, IRL Press, Oxford.
7. Saenger, W., *Principles of Nucleic Acids Structure*, **1984**, Springer-Verlag, New-York.
8. Levitt, M., Warshel, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 2607-2613.
9. IUPAC-IUB Joint commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, **1983**, 131, 9-15.
10. Pohl, F. M., Jovin, T. M., *J. Mol. Biol.*, **1972**, 67, 375-396.
11. Wang, A. H. J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Crawford, J. L., van Boom, J. H., van der Marel, G., Rich, A., *Nature*, **1979**, 282, 680-686.
12. Raman, C. V., Krishnan, K. S., *Nature*, **1928**, 121, 501, 3048.
13. Skoog, D. A., Leary, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*, **1992**, 4^{ième} éd., Saunders College Publisher, USA.
14. Banwell, C. N., McCash, E. M., *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, **1994**, 4^{ième} ed., McGraw Hill Book Company, U. K.
15. Erfurth, S. C., Kiser, E. J., Peticolas, W. L., *Proc. Nat. Sci.*, **1972**, 69, 4, 938-941.
16. Erfurth, S. C., Bond, P. J., Peticolas, W. L., *Biopolymers*, **1975**, 14, 1245-1257.
17. Peticolas, W. L., Evertsz, E., *Methods Enzymol.*, **1992**, 211A, 335-352.
18. Blake, R., Lefoley, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 518, 233-246.
19. Mercier, P., *mémoire de maîtrise*, **1997**, Université Laval, Québec, Canada.
20. Marmur, J., Doty, P., *J. Mol. Biol.*, **1962**, 5, 109-118.
21. Simard, C., *thèse de doctorat*, **1994**, Université Laval, Québec, Canada.
22. Savoie, R., Pigeon-Gosselin, M., *Can. J. Spectros.*, **1983**, 28, 133-138.
23. Savoie, R., Pézolet, M., Dallaire, S., Simard, C., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **1994**, 39, 164-173.

24. Irish, D. E., Jarv, T., Ratcliffe, C. I., *Appl. Spectrosc.*, **1982**, 36, 137-140.
25. Bulmer, J. T., Irish, D. E., Odberg, L., *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 3806-3811.
26. Edwards, H. G. M., Farwell, D. W., Turner, J. M. C., Williams, A. C., *Appl. Spectrosc.*, **1997**, 51, 101-107.
27. Erfurth, S. C., Peticolas, W. L., *Biopolymers*, **1975**, 14, 247-264.
28. Wolf, B., Berman, S., Hanlon, S., *Biochem.*, **1975**, 14, 1653-1660.
29. Zimmer, Ch., Luck, G., Triebel, H., *Biopolymers*, **1974**, 13, 425-453.
30. Eichhorn, G. L., Shin, Y. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 26, 7323-7328.
31. Brown, K. G., Kiser, E.J., Peticolas, W. L., *Biopolymers*, **1972**, 11, 1855-1869.
32. Lafleur, L., Rice, J., Thomas, G. J. Jr., *Biopolymers*, **1972**, 11, 2423-2437.
33. Thiele, D., Gulschbauer, W., *Biopolymers*, **1971**, 10, 143.
34. Rich, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1958**, 29, 202-205.
35. Thiele, D., Guschlbauer, W., *Biophysik*, **1973**, 9, 261-277.
36. Zimmerman, S. B., Cohen, G. H., Davies, D. R., *J. Mol. Biol.*, **1975**, 92, 181-192.
37. Arnott, S., Chandrasekaran, R., Martilla, C. M., *Biochem. J.*, **1974**, 141, 537-543.
38. Tougard, P., Chantot, J. F., Guschlbauer, W., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1973**, 308, 9-16.
39. Zimmerman, S. B., *J. Mol. Biol.*, **1976**, 106, 663-672.
40. Chou, C. H., Thomas, G. J. Jr., Arnott, S., Campbell-Smith, P. J., *Nucleic Acids. Res.*, **1977**, 4, 2407-2419.
41. Simard, C., Savoie, R., *Biopolymers*, **1994**, 34, 91-100.
42. Howard, F. B., Frazier, J., Miles, H. T., *Biopolymers*, **1977**, 16, 791-809.
43. Audet, P., Simard, C., Savoie, R., *Biopolymers*, **1991**, 31, 243-251.
44. Hartman, K. A., Rich, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2033-2039.
45. Porschke, D., *Biochem.*, **1976**, 15, 1495-1499.
46. O'Connor, T., Scovell, W. M., *Biopolymers*, **1981**, 20, 2351-2367.
47. Chou, C. H., Thomas, G. J. Jr., *Biopolymers*, **1977**, 16, 765-789.
48. Small, E. W., Peticolas, W. L., *Biopolymers*, **1971**, 10, 1377-1416.
49. Thomas, G. J. Jr, Medeiros, G. D., Hartman, K. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, 44, 587-592.

50. Aylward, N. N., Koenig, J. L., *Macromolecules*, **1970**, 3, 590-596.
51. Cheatham, T. E., Srinivasa, J., Case, D. A., Kollman, P. A., *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, **1998**, 16, 2, 265-280.
52. Small, E. W., Peticolas, W. L., *Biopolymers*, **1971**, 10, 1377-1416.
53. Duchesne, J., *Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids*, Academic Press, New-York, **1973**.
54. Cameron, D. G., Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., *Appl. Spectrosc.*, **1982**, 36, 245-250.
55. Mercier, P., Carrier, V., Roy, S., Savoie, R., *Biopolymers*, **1999**, 49, 21-28.
56. Davidson, J. N., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, **1972**, 7^{ème} éd., Academic Press, New-York.
57. Arnott, S., Selsing, E., *J. Mol. Biol.*, **1974**, 88, 551-552.
58. Nishimura, Y., Torigoe, C., Tsuboi, M., *Biopolymers*, **1985**, 24, 1841-1844.
59. Benevides, J. M., Wang, A. H. J., Rich, A., Kyogoku, Y., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Thomas, G. J. Jr, *Biochem.*, **1986**, 25, 41-50.
60. Fasman, G. D., *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, **1975**, 3^{ème} éd., CRC Press, Cleveland, U. S. A.
61. Dugaiczky, A., Robberson, D. L., Ullrich, A., *Biochem.*, **1980**, 19, 5869-5873.
62. Pézolet, M., Boulé, B., Bourque, D., *Rev. Sci. Instrum.*, **1983**, 54, 1364-1367.
63. Freifelder, D., *The DNA molecule :structure and properties*, **1978**, W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
64. Arnott, S., Selsing, E., *J. Mol. Biol.*, **1974**, 88, 509-521.
65. Thomas, G. A., Peticolas, W. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 993-996.
66. Howard, F. B., Miles, H. T., Liu, K., Frazier, J., Raghunathan, G., Sasisekharan, V., *Biochem.*, **1992**, 31, 10671-10677.
67. Raghunathan, G., Miles, H. T., Sasisekharan, V., *Biochem.*, **1993**, 32, 2,455-462.
68. Terpstra, P. A., Otto, C., Greve, J., *Biopolymers*, **1997**, 41, 751-763.
69. Ho, P. S., Mooers, B. H. M., *Nucleic Acids Sci.*, **1997**, 1, 65-90.

70. Pohl, F. M., Jovin, T. M., Baehr, W., Holbrook, J. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1972**, 69, 3805-3809.
71. Pohl, F. M., Ranade, A., Stockburger, M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1973**, 335, 85-92.
72. Haworth, I. S., Rodger, A., Richards, W. G., *J. Biol. Struct. & Dyn.*, **1992**, 10, 195-211.
73. Wang, A. H. J., Gessner, R. V., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Rich, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3611-3615.
74. Pattabiraman, N., Rao, S. N., Scott, K., Langridge, R., Kollman, P. A., *Biopolymers*, **1987**, 26, 403-414.
75. Rich, A., Nordheim, A., Wang, A. H. J., *Annu. Rev. Biochem.*, **1984**, 53, 791-846.
76. Adam, S., Bourtayre, P., Liquier, J., Tailandier, E., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 8, 3501-3513.
77. Sunderman, F. W. Jr., *Advances in Modern Toxicology*, vol. 2, Goyer, R. A., Mehlman, M. A., Eds. Wiley, **1978**, 257-295.
78. Keller, P. B., Hartman, K. A., *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, **1987**, 4, 6, 1013-1026.
79. Razin, A., Riggs, A. D., *Science*, **1980**, 210, 604-610.
80. Behe, M., Felsenfeld, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 1619-1623.
81. Krueger, W. C., Prairie, M. D., *Biopolymers*, **1985**, 24, 905-910.
82. Nickol, J., Behe, M., Felsenfeld, G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 1771-1775.
83. Klysik, J., Stirdivant, S. M., Larson, J. E., Hart, P. A., Wells, R. D., *Nature*, **1981**, 290, 672-677.
84. Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr., *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 16, 5747-5761.
85. Benevides, J. M., Wang, A. H. G., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Rich, A., Thomas, G. J. Jr., *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 5913-5925.
86. Behe, M. J., Felsenfeld, G., Szu, S. C., Charney, E., *Biopolymers*, **1985**, 24, 289-300.
87. Thamann, T. J., Lord, R. C., Wang, A. H. J., Rich, A., *Nucleic Acids Res.*, **1981**, 9, 20, 5443-5457.
88. Klump, H. H., Schmid, E., Wosgien, M., *Nucleic Acid Res.*, **1993**, 21, 2343-2348.

89. Wells, R. D., Larson, J. E., Grant, R. C., Shortle, B. E., Cantor, C. R., *J. Mol. Biol.*, **1970**, *54*, 465-497.
90. Chen, Y. Z., Prohofsky, E. W., *Biopolymers*, **1993**, *33*, 797-812.