

Émilie-Laure Zins, Sophie Rochut, Claude Pepe
LADIR, UMR 7075, Université P. et M. Curie, 4, Place Jussieu, 75005 Paris.

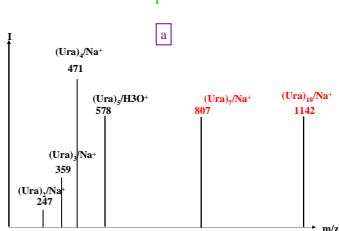
Introduction

Avant la division cellulaire, l'ADN se présente sous forme d'une structure lâche, non ordonnée, puis s'enroule et se structure pour former les chromosomes. Lors de ces enroulements successifs, l'ADN adopte une structure en double hélice à l'intérieur de laquelle sont localisés des cations. Selon la nature de ces cations (taille et coordination), l'emplacement de l'ADN peut être modifié, c'est ainsi que la présence d'un cation divalent modifie l'équilibre électrostatique local, et conduit à une déformation de l'ADN. Pour comprendre le rôle des cations dans l'ADN, nous étudions les structures des bases nucléiques en présence de cations tels que Li⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ et Be²⁺. Ces études sont réalisées expérimentalement en phase gazeuse par couplage électrospray-spectrométrie de masse (ESI/MS) et, en parallèle, des études de chimie quantique sont réalisées avec des méthodes hybrides Hartree-Fock/DFT, prenant la corrélation électronique en compte. Les méthodes de calculs utilisées sont celles qui permettent d'avoir une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux, telle que l'affinité cationique, pour pouvoir déterminer la structure des complexes cationisés.

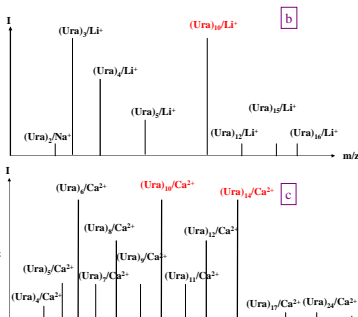
ÉTUDE EN COURS : Formation des décimères d'uracile.

I. Mise en évidence expérimentale des décimères d'uracile par ESI/MS

Spectres MS



Spectres MS obtenus à partir de solutions a) Uracile/Na⁺, b) Uracile/Li⁺ et c) Uracile/Ca²⁺



Influence de la nature du cation

Complexes Uracile/Na⁺ (a)

Le monomère, le dimère, le trimère, le tétramère, l'heptamère et le décimère cationisés ont été mis en évidence. L'intensité relative des pics correspondant à ces différents complexes ne suit pas une décroissance statistique : le tétramère et le décimère cationisés sont particulièrement stables.

Complexes Uracile/Li⁺ (b)

A partir de la solution Uracile/Li⁺, le dimère, le trimère, le tétramère, le pentamère, le décimère et le dodécimère cationisés ont été mis en évidence. Parmi ces complexes, le trimère et le décimère sont particulièrement stables.

Par rapport aux complexes Uracile/Na⁺, il est intéressant de noter, dans le cas des complexes Uracile/Li⁺,

- l'absence de l'heptamère cationisé,
- l'abondance du trimère cationisé,
- la présence du dodécimère cationisé

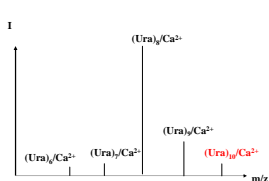
Ces différences traduisent l'influence de la taille du cation sur la complexation de l'uracile

Complexes Uracile/Ca²⁺ (c)

Autour de Ca²⁺, le tétramère, le pentamère, l'hexamère, l'heptamère, l'octamère, le nonamère, le décimère, l'undécimère, le dodécimère, le 14-mère, le 17-mère et le 24-mère ont été mis en évidence. Le cation Ca²⁺ ayant la même taille que Na⁺ les différences observées entre les spectres Uracile/Na⁺ et Ca²⁺ mettent en évidence l'influence de la charge du cation sur la complexation de l'uracile.

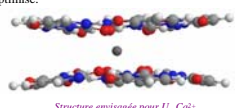
A partir de solutions Uracile/Li⁺, Uracile/Na⁺ et Uracile/Ca²⁺, des décimères cationisés particulièrement abondants ont été mis en évidence

II. Détermination de la structure des décimères

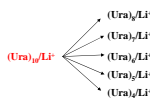


Spectre MS/MS obtenu à partir de U₁₀Ca²⁺

Après fragmentation de U₁₀Ca²⁺, les intensités des différents fragments observés suivent une distribution statistique proche d'une loi de Poisson. La perte de 1, 2, 3 ou 4 bases nucléiques serait donc équiprobable. Un décimère constitué par la superposition de deux pentamères plans, compatible avec ce spectre MS/MS, a pu être optimisé.

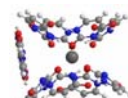


Structure envisagée pour U₁₀Ca²⁺



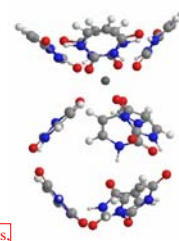
Chemins de fragmentation et structure envisagée pour le complexe U₁₀Li⁺

Les chemins de fragmentation des complexes U₁₀Ca²⁺ et U₁₀Li⁺ sont différents, ce qui traduit des caractéristiques structurales différentes. Dans le complexe U₁₀Li⁺, la perte d'une seule base nucléique n'a pas été observée. Une structure stable en accord avec ces résultats a pu être optimisée : un dimère interagissant par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, avec deux tétramères superposés.



Chemins de fragmentation de complexe U₁₀Na⁺

A partir de l'ion parent U₁₀Na⁺, un seul fragment a été observé, correspondant à la perte simultanée de trois bases nucléiques, indiquant que, dans ce décimère, trois bases nucléiques ont un statut particulier, elles sont fortement liées entre elles, mais elles interagissent faiblement avec le reste de la structure. Une structure stable, compatible avec ces résultats MS/MS a été obtenue.



Structure envisagée pour U₁₀Na⁺

Pour les trois décimères d'uracile étudiés, les optimisations de géométrie ont permis de proposer des structures stables, en accord avec les résultats MS/MS.

PROJET : Recherche théorique et expérimentale des conditions d'existence de « nombres magiques ».

I. Complexes d'uracile

Complexation de bases nucléiques modifiées

Principe de l'étude

Toutes les structures envisagées font intervenir des interactions de type liaisons H. Ainsi, le fait de remplacer un atome donneur ou accepteur de liaisons H par un groupement ne pouvant pas intervenir dans de telles interactions permettrait d'infirmer ou de confirmer les structures proposées.

De façon à tester l'influence de la gêne stérique, il est possible d'utiliser une base nucléique modifiée dans laquelle un des atomes d'hydrogène n'intervenant dans aucune interaction de type liaisons H est substitué par un groupement méthyle.

Choix des bases nucléiques modifiées

L'influence de l'existence de liaisons H sur la formations des décimères pourra être déterminée en étudiant des solutions de 1MeUracile, en présence de cations.

L'étude de la complexation de la thymine (5MeUracile) en présence de cations permettrait d'évaluer l'influence de la gêne stérique sur la formation des décimères.

Cette étude a pour objectif de confirmer expérimentalement les structures des décimères envisagées théoriquement.



Énergies des interactions mises en jeu dans les complexes

Tous les complexes envisagés font intervenir à la fois des interactions entre le cation et les bases nucléiques, et entre les différentes bases nucléiques. Il sera nécessaire de déterminer l'importance relative des interactions entre les différentes bases nucléiques d'une part et entre les bases nucléiques et le cation d'autre part, de façon à mieux comprendre les chemins de fragmentations observés en MS/MS.

II. Influence de la nature de la base nucléique

Étant données les applications biologiques éventuelles, il sera nécessaire, pour toutes les bases nucléiques autour de tous les cations présents dans les milieux biologiques, de rechercher la nature et la structure de complexes particulièrement stables : la formation de complexes d'uracile, de cytosine, de guanine, d'adénine et de thymine autour de cations alcalins et alcalino-terreux sera étudiée expérimentalement et théoriquement. Bien que plus difficile à étudier théoriquement, la complexation des bases nucléiques en présence de fer ferreux et ferrique sera également étudiée, en raison de son intérêt biologique.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à la formation de complexes faisant intervenir des bases nucléiques différentes. Puis nous étudierons l'influence de la présence des sucres portés par les nucléosides constituant l'ADN et l'ARN, sur la formation des ces complexes.

III. Étude de la formation des décimères en ESI/MS

Influence des conditions expérimentales sur l'intensité relative des complexes

L'existence du nombre magique 10 pour les décimères d'uracile en présence de Na⁺, Li⁺ et Ca²⁺ n'avait jamais été observée auparavant. Les conditions de nébulisation de la solution semblent jouer un rôle fondamental dans la formation de tels complexes. Une étude systématique de l'influence des différents paramètres intervenant lors de la nébulisation de la solution semble indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes de formation des complexes observés en ESI/MS.

Étude par dynamique moléculaire

En utilisant des champs de force et des modèles de solvation des molécules, et en fonction des résultats qui auront été obtenus en FT-ICR et par les calculs théoriques, il sera possible d'étudier les changements structuraux successifs intervenant dans les gouttelettes au cours de la désolvation, et conduisant à la formation des décimères en phase gazeuse. Des réactions en phase gazeuse pourront également être modélisées.

Formation des complexes en phase gazeuse ou dans la gouttelette?

Étude expérimentale FT-ICR

Le mécanisme de formation des complexes non covalent en ESI n'est pas clairement établi. En particulier, il est communément admis que l'observation de nombres magiques traduit une stabilité particulière des complexes dans des milieux biologiques, mais ceci n'a jamais été prouvé.

Une étude FT/ICR permettrait de déterminer si les décimères d'uracile peuvent se former en faisant réagir les bases nucléiques et les cations en phase gazeuse.

Détermination de l'énergie interne nécessaire à la formation de complexes non covalents

Tous les résultats de ces études successives, ainsi que les résultats concernant l'étude de l'énergie interne déposée sur les ions benzylpyridinium en ESI/MS pourront être exploités pour déterminer l'énergie interne des décimères cationisés d'uracile en sortie de source. Ces résultats permettront peut-être de déterminer les conditions optimales pour l'étude de la formation de nombres magiques particuliers.

Étude théorique

La structure des décimères d'uracile les plus stables en phase gazeuse sera recherchée, de façon à déterminer si les complexes observés expérimentalement correspondent aux structures les plus stables d'un point de vue thermodynamique en phase gazeuse.

Une étude théorique de la formation des décimères en présence de molécules de solvant sera également réalisée, de façon à déterminer l'influence éventuelle de la solvation.

Comme dans le cas des ions benzylpyridinium, une méthode d'étalonnage des appareils ESI/MS sera proposée. Les deux types d'étalonnages, pour des complexes faisant intervenir soit des interactions covalentes, soit des interactions non covalentes, seront comparés. On pourra ainsi déterminer s'il est possible de proposer un étalon qui pourrait être utilisé pour tous les types de complexes.