UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
AMIN AHMED OUAMEUR

# ÉTUDE STRUCTURALE DES INTERACTIONS ENTRE LES POLYAMINES ENDOGÈNES ET LES ACIDES NUCLÉIQUES: LES SIGNIFICATIONS BIOLOGIQUES

Mars 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

# AVANT-PROPOS

L'introduction (chapitre I) ainsi que les chapitres II, III et VI (conclusion générale) ont été rédigés en français. Les chapitres IV et V sont toutefois écrits en langue anglaise pour permettre leur publication dans des journaux scientifiques internationaux. Les références citées dans les articles sont placées dans leur chapitre respectif. Les références de l'introduction générale ainsi que de la conclusion générale sont regroupées et placées à la fin du mémoire, dans la section « bibliographie ».

## Remerciements

Ce projet a été réalisé au Laboratoire d'Interactions Biomoléculaires, Groupe de Recherche en Énergie et Information Biomoléculaire (GREIB), département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières.

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement mon superviseur, Dr. Heidar-Ali Tajmir-Riahi, pour m'avoir présenter au monde de la science et pour son appui pendant ce travail. Je remercie également sa femme, Mme Stavroula Diamantouglou pour son chaleureux accueil et son agréable compagnie.

Je remercie Dr Sridharan Govindachary pour sa critique et l'excellente correction de mon article.

Je remercie le professeur Robert Carpentier pour ses commentaires constructifs sur le manuscrit et pour sa soigneuse révision de la langue de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes collègues et amis à l'université de Trois-Rivières. Je dois mes remerciements spécialement à Alain Gauthier et à David Joly pour leur amitié et leur soutien constant durant mes études supérieures ici.

Enfin, mes remerciements vont naturellement à ma famille et parents, surtout mon frère Messaoud qui m'a aidé et soutenu moralement durant ces deux années.

Ce travail a été financé par Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) et Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

**Contributions**

La rédaction de ce mémoire est basée sur deux articles. Voici ma contribution à chacun d'eux.

Chapitre IV: Structural analysis of DNA interaction with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. Publié dans *Journal of Biological Chemistry*. Ahmed Ouameur, A. and H. A. Tajmir-Riahi. Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 42041-42054.

J'ai effectué l'ensemble des manipulations menant aux résultats présentés dans cette étude. J'ai analysé les résultats et rédigé l'article sous la supervision de mon directeur de recherche.

Chapitre V: Probing tRNA interaction with polyamines: stability and biological significance. Soumis pour publication dans le journal Biochimica et Biophysica Acta.

J'ai effectué l'ensemble des manipulations présentées dans ce chapitre. J'ai également analysé les résultats et rédigé l'article sous la supervision de mon directeur de recherche.

# RÉSUMÉ

Les polyamines (PA) sont de petites molécules que l'on trouve dans la majorité des cellules animales et végétales. Elles sont essentielles pour la vie et la division de la cellule. Les fonctions amine primaire et secondaire des polyamines sont protonées au pH physiologique, entraînant ainsi la formation de paires d'ions avec diverses structures de la cellule telles que les acides nucléiques, les protéines et les phospholipides. La découverte des niveaux élevés de polyamines dans les cellules cancéreuses a inspiré aux chercheurs l'idée que les polyamines pourraient directement agir sur les acides nucléiques. D'autres études ont même soutenu que l'interaction avec des acides nucléiques pourrait expliquer certaines des fonctions biologiques importantes des polyamines. Cela encourageait les chercheurs à étudier de façon approfondie les possibilités de liaison entre les polyamines endogènes et les acides nucléiques, en utilisant les techniques disponibles pour étudier les systèmes en interaction, telles que la spectroscopie vibrationnelle, la spectroscopie électronique, la spectroscopie à résonance magnétique, la diffraction par rayons X, études théoriques et études thermodynamiques.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet des trois polyamines naturelles (la putrescine, la spermidine et la spermine) et du cobalt(III)hexamine (comme contrôle) sur la structure des acides nucléiques. La caractérisation des interactions entre les polyamines et les acides nucléiques a été réalisée à l'aide des systèmes modèles PA-ADN de thymus de veau et PA-ARN de transfert de levure. Les complexes ont été formés à pH physiologique (7 ± 0.2), en maintenant la concentration de l'acide nucléique fixe et en variant les concentrations des polycations. La spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR) et l'électrophorèse capillaire (CE) ont occupé une place de choix dans cette études.

Le spectre infrarouge constitue une investigation au niveau moléculaire. Il apporte des informations sur chacune des espèces présentes dans les complexes étudiés, i.e. polyamine-acide nucléique, et sur les interactions qui existent dans ces complexes. Comme la complexation de ces molécules organiques entraîne des variations structurales

observables sur ces spectres infrarouges, il est possible d'obtenir des informations sur les groupements fonctionnels impliqués dans les interactions. Avec la specroscopie FTIR, nous avons utilisé la technique de différence spectrale, qui consiste à retrancher le spectre de l'acide nucléique pur de ceux des complexes PA-acide nucléique. Cette technique nous a permis d'observer, en plus des variations dans les longueurs d'onde, les variations d'intensité des bandes et l'apparition des nouvelles bandes. Ces changements spectraux serviront d'information sur les groupements impliqués dans les interactions. Les expériences de FTIR ont donc été effectuées en solution aqueuse, à pH physiologique et à des ratios molaires PA/acide nucléique (r) de 0, 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4, 1/2 et 1.

Les paramètres (constante de liaison et la coopérativité) décrivant des interactions entre les polyamines et les acides nucléiques ont été estimés par l'utilisation de la méthode d'électrophorèse capillaire. Plusieurs techniques d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) ont été développées pour étudier les interactions biomoléculaires et pour pouvoir distinguer entre les complexes d'affinité faible et forte. Dans la technique d'ACE, les paramètres d'interaction sont estimés à partir du changement du temps de migration des complexes PA-acide nucléique à des ratios molaires PA/acide nucléique (r) de 0, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100, 1/50, 1/25, 1/12.5 et 1/6.25.

Nos résultats spectroscopiques ont permis de démontrer que les polyamines naturelles et le cobalt(III)hexamine peuvent avoir différents sites d'interaction sur l'ADN en fonction du ratio molaire. La putrescine se lie à la petite et la grande gouttière indépendamment du ratio alors que la spermidine préfère la petite gouttière à faible ratio et la grande gouttière à des ratios plus élevés. Quant à la spermine et le cobalt(III)hexamine, leur interaction se fait préférentiellement avec la grande gouttière. Les sites disponibles pour les interactions dans la grande gouttière sont le N7 des purines, $-NH_2$ de l'adénine et la cytosine, et $-CH_3$ de la thymine (interaction hydrophobe). Pour la petite gouttière on a N3 des purines, $-NH_2$ de la guanine et O2 de la thymine.

Les interactions entre les polyamines naturelles et l'ARNt impliquent particulièrement les bases et le sucre ribose. À faible ratio les principaux sites de liaison sont N7/O6 de la guanine, O2/O4 de l'uracile, N3 de l'adénine et 2'OH du ribose. Pour le cobalt(III)hexamine, les sites préférentiels de liaison sont N7 de guanine, O2 de l'uracile, O2/N4 de cytosine et les groupements phosphates. Aux concentrations élevées de polycation, les sites impliqués dans les interactions sont N7 des purines, O2 de l'uracile et les groupements phosphates. Les polyamines naturelles stabilisent l'ADN et l'ARNt sous leur conformation native (formes B et A, respectivement) alors que le cobalt(III)hexamine induit une transition partielle B→ A de l'ADN et provoque la condensation de l'ADN et l'ARNt à des ratios élevés. Nos résultats on permis de mettre en évidence la participation des groupements amines et méthylènes des polyamines naturelles et le cobalt(III)hexamine (groupements amines seulement) dans la complexation polyamine-acide nucléique.

La technique d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) a permis de caractériser les différentes constantes de liaison et la coopérativité des interactions des complexes polyamines-acides nucléiques. Ainsi les constantes d'affinité des polyamines naturelles pour l'ADN et l'ARN sont de l'ordre de $10^5$ $M^{-1}$. Le cobalt(III)hexamine possède deux affinités pour l'ADN et l'ARNt. Nous avons constaté l'éxistance d'une coopérativité de liaison dans les interactions entre les polyamines et les acides nucléique, toutefois elle est positive dans le cas des polyamines naturelles et negative dans le cas du cobalt(III)hexamine.

# TABLE DES MATIÈRES


| | | Page |
|---|---|---|
| **AVANT-PROPOS** | | **ii** |
| **RÉSUMÉ** | | **iv** |
| **TABLE DES MATIÈRES** | | **vii** |
| **LISTE DES FIGURES** | | **x** |
| **LISTE DES TABLEAUX** | | **xiii** |
| **LISTE DES ABRÉVIATIONS** | | **xiv** |
| **CHAPITRE I** | **INTRODUCTION** | **1** |
| **1.1** | **Problématique** | **1** |
| **1.2** | **But** | **2** |
| **1.3** | **Objectifs spécifiques** | **2** |
| **CHAPITRE II** | **ACIDES NUCLÉIQUES ET POLYAMINES** | **3** |
| **2.1** | **Généralités sur les acides nucléiques** | **3** |
| 2.1.1 | La structure des acides nucléiques | 3 |
| 2.1.2 | Conformations des acides nucléiques | 7 |
| **2.2** | **Polyamines endogènes** | **11** |
| 2.2.1 | Structure et propriétés | 11 |
| 2.2.2 | Métabolisme des polyamines | 11 |
| 2.2.2.1 | Biosynthèse des polyamines | 11 |
| 2.2.2.2 | L'interconversion des polyamines | 13 |
| 2.2.2.3 | La dégradation terminale des polyamines | 14 |
| **2.3** | **Interaction entre polyamines et acides nucléiques** | **14** |
| 2.3.1 | Interaction entre les polyamines et l'ADN | 15 |
| 2.3.2 | Interaction entre les polyamines et l'ARNt | 18 |
| **CHAPITRE III** | **PRINCIPALES MÉTHODOLOGIES** | **21** |
| **3.1** | **Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier** | **21** |
| 3.1.1 | Introduction | 21 |
| 3.1.2 | Interaction du rayonnement infrarouge et des molécules | 22 |
| 3.1.3 | Instrumentation | 25 |

3.1.3.1 Description d'un spectromètre FTIR ..... 25
3.1.3.2 Interféromètre de Michelson ..... 26
3.1.4 Interprétation des résultats ..... 28
**3.2 Électrophorèse capillaire ..... 30**
3.2.1 Principe de base ..... 30
3.2.2 Mobilité éléctrophorétique et flux électro-osmotique ..... 30
3.2.2.1 Mobilité éléctrophorétique ..... 32
3.2.2.2 Flux électro-osmotique ..... 32
3.2.3 Instrumentation ..... 33
3.2.3.1 Le capillaire ..... 35
3.2.3.2 Mode d'injection de l'échantillon ..... 35
3.2.3.3 Mode de détection ..... 36
3.2.4 Calcul des paramètres d'affinité ..... 36
3.2.4.1 Analyse de Scatchard (cas d'un seul site de liaison) ..... 37
3.2.4.2 Le paramètre de coopérativité $n_H$ ..... 39

**CHAPITRE IV STRUCTURAL ANALYSIS OF DNA INTERACTIONS WITH BIOGENIC POLYAMINES AND COBALT(III)-HEXAMINE STUDIED BY FOURIER TRANSFORM INFRARED AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS ..... 41**

**4.1 Résumé ..... 42**
**4.2 Summary ..... 44**
**4.3 Introduction ..... 45**
**4.4 Experimental procedures ..... 47**
4.4.1 Materials ..... 47
F4.4.2 Preparation of stock solutions ..... 48
4.4.3 FTIR spectra ..... 48
4.4.4 Circular dichroism measurements ..... 50
4.4.5 Capillary electrophoresis ..... 50
4.4.5.1 Data analysis ..... 51
**4.5 Results ..... 53**
4.5.1 Polyamines-DNA complexes studied by FTIR spectroscopy ..... 53
4.5.2 DNA structural changes at high polycation concentrations ..... 57
4.5.3 DNA conformation ..... 60
4.5.4 Stability of polyamines-DNA adducts by capillary electrophoresis ..... 61
**4.6 Discussion ..... 63**
4.6.1 Effect of biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine on conformation and stability of calf-thymus DNA ..... 63

4.6.2 Preferential binding models for polyamine-DNA complexes and their biological implication ..... 65
4.6.2.1 Putrescine ..... 66
4.6.2.2 Spermidine ..... 66
4.6.2.3 Spermine ..... 67
**4.7 Acknowledgments ..... 69**
**4.8 References ..... 69**

**CHAPITRE V PROBING tRNA INTERACTION WITH POLYAMINES: STABILITY AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE ..... 87**

**5.1 Résumé ..... 88**
**5.2 Summary ..... 90**
**5.3 Introduction ..... 91**
**5.4 Materials and methods ..... 93**
5.4.1 Materials ..... 93
5.4.2 Preparation of stock solutions ..... 94
5.4.3 FTIR spectra ..... 94
5.4.4 Capillary electrophoresis ..... 95
5.4.4.1 Data analysis ..... 96
**5.5 Results and discussion ..... 98**
5.5.1 Interaction of polyamines with tRNA studied by FTIR spectroscopy ..... 98
5.5.1.1 General features of infrared spectra of tRNA ..... 98
5.5.1.2 Infrared spectra of tRNA-polyamine complexes at low polycation concentrations (r=1/80-1/20) ..... 99
5.5.1.3 Infrared spectra of tRNA-polyamine complexes at high polycation concentration (r=1/4) ..... 102
5.5.2 Interaction of polyamines with RNA studied by capillary electophoresis . 104
**5.6 Acknowledgments ..... 107**
**5.7 References ..... 107**

**CHAPITRE VI CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE ..... 120**

**6.1 Conclusions ..... 120**
**6.2 Perspectives de recherche ..... 126**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 128**

# LISTE DES FIGURES


2.1 Structure complète du tétranucléotide. Cette chaîne d'ADN est composée des bases thymine, adénine, cytosine et guanine. Notez que les nucléotides sont liés par les groupements phosphates qui sont reliés entre le carbone 5' et le carbone 3' des molécules adjacentes de sucre déoxyribose ..... 4

2.2 Appariements de Watson-Crick. En haut la paire G-C, en bas la paire A-T. Les lignes incurvées représentent les ponts d'hydrogène ..... 6

2.3 Diagramme schématique montrant deux vues de côté du $tRNA^{phe}$ de la levure. Le squelette ribose-phosphate est montré sous forme d'un tube enroulé et les chiffres se rapportent à des résidus de nucléotide dans l'ordre. Les paires de bases dans la double région sont montrées comme des échelons. Les bases qui ne sont pas impliquées dans la liaison hydrogène avec les autres bases sont montrées en tant que tiges raccourcies fixées au tube enroulé ..... 7

2.4 Conformation B, A et Z de l'ADN. Le squelette sucre-phosphate est montré en couleurs rouge et bleu..... 9

2.5 La structure de la guanosine dans l'ADN-B et Z ..... 9

2.6 Métabolisme des polyamines de l'arginine jusqu'à la spermine ..... 12

2.7 Diagramme schématique montrant les sites de liaison des deux molécules de spermine et des ions de magnesium sur l'ARNt de levure ..... 20

3.8 Le spectre électromagnétique..... 22

3.9 Changement dans le moment dipolaire pendant les vibrations moléculaires. a) Chlorure d'hydrogène: le moment dipolaire est changé pendant la vibration. b) Dioxyde de carbone, vibration antisymétrique: contrairement à l'état d'équilibre dipôle-libre, les centres de charges négatives (O) et de charge positives (C) oscillent pendant la vibration. c) Dioxyde de carbone, vibration symétrique: les centres de gravité des charges négatives (O) et positives (C) sont confondus: aucun changement du moment dipolaire ..... 24

3.10 Groupements fonctionnels et leur fréquence d'absorption (en $cm^{-1}$) caractéristique ..... 25

3.11 Diagramme schématique d'un spectromètre de transformée de Fourier avec un interféromètre classique de Michelson ..... 27

3.12 Méthodologie générale d'obtention et d'interprétation des spectres des complexes polyamine-acide nucléique..... 29

3.13 Diagramme schématique de la surface du capillaire et la génération de flux électro-osmotique..... 31

3.14 Migration de l'analyte en présence de flux électro-osmotique..... 31

3.15 Électrophorèse capillaire modèle Beckman Pace/MDQ..... 34

3.16 Schéma d'une installation d'électrophorèse capillaire..... 34

3.17 Diagramme de Scatchard de l'équation (6)..... 39

3.18 Diagramme de Hill..... 40

4.1 Chemical structures of spermine, spermidine, putrescine and cobalt(III)hexamine. C, N and H atoms are shown in cyan, blue and white colours, respectively..... 47

4.2 FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure DNA, free polyamine, and (A) Spermine-, (B) Spermidine-DNA adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra), and difference spectra for polyamine-DNA adducts obtained at various polyamine/DNA(P) molar ratios (bottom two spectra)..... 79

4.3 FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure DNA, free polyamine, and (A) Putrescine-, (B) Cobalt(III)hexamine-DNA adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra), and difference spectra for polyamine-DNA adducts obtained at various polyamine/DNA(P) molar ratios (bottom two spectra)..... 80

4.4 Intensity ratio variations for several DNA in-plane vibrations as a function of polyamine concentration. (A, B, C and D) Intensity ratios for the DNA bands at 1717 (guanine), 1663 (thymine), 1609 (adenine), 1492 (cytosine) and 1222 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$ vib.) for spermine, spermidine, putrescine and cobalt(II)hexamine, respectively..... 81

4.5 CD spectra of highly polymerised calf thymus DNA in 25 mM NaCl (pH ~ 7) at 25 °C and at various concentrations of cobalt(III)hexamine: (a) pure DNA (1.25 mM); (b) Co(III)/DNA(P) = 1/15; (c) Co(III)/DNA(P) = 1/10; (d) Co(III)/DNA(P) = 1/8; (e) Co(III)/DNA(P) = 1/6; (f) Co(III)/DNA(P) = 1/4..... 82

4.6 (A) Plot of increase in migration time (in minutes) of polyamine-DNA complexes from capillary electrophoresis following incubation of a constant concentration of DNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. The increase in migration time of the polyamine-DNA complexes was determined by subtracting the migration time of pure DNA from that of each polyamine-DNA adducts. (B and C) Scatchard plots for biogenic polyamine-, and cobalt(III)hexamine-DNA complexes, respectively. (D) Hill plots for polyamine-DNA complexes..... 83

4.7 Preferential binding models proposed for putrescine-DNA complexes. (A) Phosphate and purine-N7, and phosphate-phosphate intra-groove from the same strand of the major groove. (B) Phosphate and thymine-O2 from the same strand of the minor groove..... 84

4.8 Preferential binding models proposed for spermidine-DNA complexes. (A) Three phosphates adjacent from the same strand of the major groove. (B) Intrastrand across the major groove. (C) Intrastrand across the minor groove..... 85

4.9 Preferential binding model proposed for spermine-DNA complexes..... 86

5.1 Chemical structures of biogenic polyamines putrescine, spermidine and spermine..... 93

5.2 FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure tRNA, free polyamine, and spermine-tRNA (A) and spermidine-tRNA (B) adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra) and difference spectra for polyamine-tRNA adducts obtained at various polyamine/tRNA(P) molar ratios (bottom two spectra)..... 116

5.3 FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure tRNA, free polyamine, and putrescine-tRNA (A) and cobalt(III)hexamine-tRNA (B) adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra) and difference spectra for polyamine-tRNA adducts obtained at various polyamine/tRNA(P) molar ratios (bottom two spectra)..... 117

5.4 Relative intensity variations in arbitrary units for several tRNA in-plane vibrations as a function of polyamine concentration. A–D, relative intensity for the tRNA bands at 1698 (guanine), 1653 (uracil), 1608 (adenine), 1488 (cytosine) and 1244 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$ vib.) for spermine, spermidine, putrescine and cobalt(II)hexamine, respectively..... 118

5.5 A, plot of the difference in migration time (in minutes) of polyamine-tRNA complexes from capillary electrophoresis following incubation of a constant concentration of tRNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. The difference in migration time of the polyamine-tRNA complexes was determined by subtracting the migration time of pure tRNA from that of each polyamine-tRNA adducts. B and C, Scatchard plots for biogenic polyamine-tRNA, and cobalt(III)hexamine-tRNA complexes, respectively. D, Hill plots for polyamine-tRNA complexes..... 119

# LISTE DES TABLEAUX


2.1 Paramètres structuraux des trois principales conformations de l'ADN ..... 8

4.1 Measured wavenumbers, relative intensities and assignments for the main infrared bands of calf-thymus DNA in aqueous solution at pH 7.0 ± 0.2 .... 77

4.2 Experimental values of the migration time of pure DNA and polyamine-DNA adducts following incubation of a constant concentration of DNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. Incubations were carried out in the run buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ± 0.2) at 25 °C for 30 min prior to capillary electrophoresis ..... 78

5.1 Measured wavenumbers, relative intensities and assignments for the main infrared bands of Baker's yeast tRNA in aqueous solution at pH 7.0 ± 0.2 ..... 114

5.2 Experimental values of the migration time of pure tRNA and polyamine-tRNA adducts following incubation of a constant concentration of tRNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. Incubations were carried out in the run buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ± 0.2) at 25 °C for 30 min prior to capillary electrophoresis ..... 115

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| ADN | acide déoxyribonucléique |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNt | ARN de transfert |
| Spm | spermine |
| Spd | spermidine |
| Put | putrescine |
| Co(III) | cobalt(III)hexamine |
| CE | "capillary electrophoresis" |
| ACE | "affinity capillary electrophoresis" |
| FTIR | "Fourier transform infrared" |
| CD | "circular dichroïsm" |
| ctDNA | "calf thymus DNA" |
| A | adénine |
| G | guanine |
| C | cytosine |
| T | thymine |
| U | uracile |
| r | "polyamine/nucleique acid (P) molar ratio" |
| mM | milimolaire |
| PA | polyamine |
| ODC | "ornithine decarboxylase" |
| ADC | "arginine decarboxylase" |
| SAMDC | "*S*-adenosylmethionine decarboxylase" |
| SSAT | "spermidine/spermine acetyltransferase" |
| PAO | "polyamine oxidase" |
| FAD | "flavine adenine dinucleotide" |
| DFMO | "2-(difluoromethyl)ornithine" |

# CHAPITRE I

# INTRODUCTION

## 1.1 Problématique

Les polyamines sont des composants basiques de la cellule dont les cibles fonctionnelles vont des acides nucléiques aux lipides constitutifs des membranes. Leur rôle spécifique dans des fonctions cellulaires essentielles sont a l'origine de l'intérêt scientifique et médical que l'on peut porter a leurs cibles d'interactions en particulier les acides nucléiques: les polyamines peuvent influencer l'expression des gènes par plusieurs mécanismes distincts, induire un changement de conformation de l'ADN et l'ARN ainsi que la condensation de la chromatine, protèger l'ADN contre les radicaux libres et les radiations ainsi que moduler la synthèse protéique par différentes manières.

De nombreuses études ont été effectuées sur les interactions entre les polyamines naturelles et les acides nucléiques. Cependant, il existe des controverses concernant les sites de liaison spécifiques des polyamines sur l'ADN, et les modèles d'interactions proposés par ces études ne sont pas toujours en concordance. Ces différences dans les résultats pourraient être dues aux différentes techniques utilisées par ces études et aux divers modèles utilisés pour décrire les interactions entre les polyamines et les acides nucléiques. Ajoutant à cela, la plupart des études se sont intéressées uniquement au complexe spermine-ADN et on a très peu d'information sur les autres polyamines. A notre connaissance, notre étude est la première qui a utilisé la spectroscopie infrarouge et l'électrophorèse capillaire pour d'écrire les interactions entre les polyamines naturelles et les acides nucléiques en conditions physiologiques.

## 1.2 But

Le but de cette étude était d'acquérir des connaissances fondamentales sur les interactions entre les polyamines et les acides nucléiques. Ces nouvelles connaissances seront utiles à l'amélioration de procédés de fabrication des analogues des polyamines en tant qu'agent anticancéreux.

## 1.3 Objectifs spécifiques

1. Identifier les sites impliqués dans la formation des complexes polyamine-acides nucléiques ainsi que la nature des interactions impliquées en fonction du ratio molaire PA/acides nucléiques par la spectroscopie infrarouge. L'étude combinée de déplacement de la longueur d'onde des bandes indicatrices, de la variation de leur intensité ainsi que la technique de la différence spectrale, nous permettra d'établir quelles parties des biomolécules sont impliquées dans les interactions et de conclure sur le mode de liaison des polyamines.

2. Étudier l'évolution de la structure et la conformation des acides nucléiques en présence de différentes concentrations en polyamines. Cette étude va se faire par l'examen des bandes indicatrices sensibles au changement de la conformation et la technique de différence spectrale.

3. Déterminer les paramètres d'interactions telles que la constante d'association et la coopérativité des complexes polyamine-acides nucléiques par la technique d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE).

4. Proposer des modèles d'interactions pour les complexes polyamine-ADN en se basant sur les résultats spectroscopiques obtenus et établir une corrélation entre ces modèles et leur signification biologique.

# CHAPITRE II

# ACIDES NUCLÉIQUES ET POLYAMINES

## 2.1 Généralités sur les acides nucléiques

### 2.1.1 La structure des acides nucléiques

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule d'importance biologique fondamentale, car elle constitue le support de l'information génétique : elle est le principal véhicule du phénomène de l'hérédité (Lewin, 1999).

Du point de vue chimique, un acide nucléique est une succession de nucléotides reliés chimiquement (figure 2.1). Chaque nucléotide contient une base azotée aromatique, un sucre pentose et un groupement phosphate. Les bases azotées sont réparties en deux catégories; les purines et les pyrimidines. Les deux purines, *adénine* et *guanine*, sont présentes à la fois dans l'ADN et l'ARN. L'adénine a un groupement amine ($-NH_2$) en position C6 de l'anneau de purine, la guanine a un groupement amine en position C2 et un groupement carbonyle en position C6. Les deux pyrimidines généralement trouvées dans l'ADN sont la *thymine* et la *cytosine*. La thymine contient un groupement méthyle ($-CH_3$) en position C5 et des groupement carbonyles en positions C4 et C2. La cytosine contient un atome d'hydrogène en position C5 et un groupement amine en C4. L'uracile est semblable à la thymine mais ne contient pas de groupement méthyle en position C5. L'uracile est un composant de l'acide ribonucléique (ARN) dans lequel il est utilisé au lieu de la thymine en tant qu'une pyrimidine. Les groupements amines des bases azotées sont des donneurs d'hydrogène, tandis que l'oxygène des groupements carbonyles et les azotes de l'anneau sont des accepteurs d'hydrogène (Sinden, 1994).

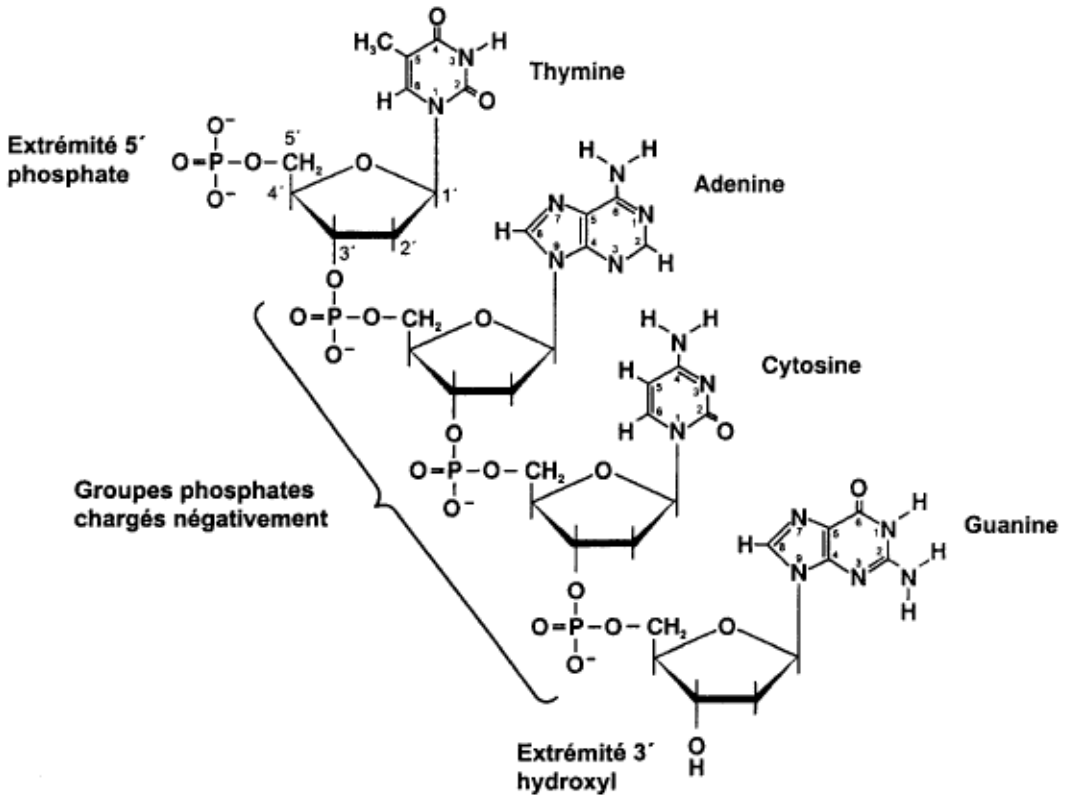


**FIGURE 2.1: Structure complète du tétranucléotide. Cette chaîne d'ADN est composée des bases thymine, adénine, cytosine et guanine. Notez que les nucléotides sont liés par les groupements phosphates qui sont reliés entre le carbone 5' et le carbone 3' des molécules adjacentes de sucre déoxyribose.**
**Tiré de Sinden, 1994.**

On rencontre deux types de pentoses dans les acides nucléiques. Ils assurent la distinction entre l'ADN et l'ARN et donnent leur nom aux deux types d'acides nucléiques. Le pentose de l'ADN est le 2-déoxyribose, alors que l'ARN contient du ribose. Cette différence réside dans l'absence/la présence d'un groupement hydroxyle en position 2' du cycle du sucre (Lewin, 1999). Dans l'ADN et l'ARN les nucléotides sont attachés par des liaisons 3'-5' phosphodiesters où le carbone 3' du sucre d'un nucléotide est lié à un carbone 5' du sucre d'un nucléotide adjacent (Sinden, 1994; Sarma et sarma, 1988). La liaison entre un sucre et une base est appelée lien glycosidique et est établi entre le carbone C1' de sucre et les atomes N1 et N9 des pyrimidines et des purines, respectivement (Sinden, 1994; Sarma et sarma, 1988). La base est en rotation libre

autour du lien glycosidique. Les deux conformations standards de la base autour du lien glycosidique sont *syn* et *anti*. La conformation *anti* reflète l'orientation spatiale relative de la base et du sucre comme trouvé dans la plupart des conformations de l'ADN, par exemple, ADN en conformation B, la conformation *syn* est trouvée dans l'ADN de forme Z (Sinden, 1994).

En 1953, Watson et Crick ont décrit pour la première fois la structure de la double hélice d'ADN. L'ADN est une hélice droite constituée par deux différentes spires d'ADN alignées d'une façon antiparallèle. Ceci signifie qu'une spire est orientée dans la direction 5'→ 3' et l'autre dans la direction 3'→ 5'. Les deux spires sont reliées par des liens hydrogènes (appariements de type Watson-Crick) établis entre les bases (figure 2.2). Ainsi la guanine d'une chaîne est toujours pariée à la cytosine de l'autre tout comme l'adénine d'une chaîne est liée à la thymine de l'autre. Dans la paire A-T il y a deux liaisons hydrogènes formées entre les atomes N6 et N1 de l'adénine et les atomes O4 et N3 de la cytosine, respectivement. Dans la paire G-C il y a trois liaisons hydrogènes formées entre les atomes O6, N1 et N2 de la guanine et les atomes N4, N3 et O2 de la cytosine, respectivement. Le sucre et les groupements phosphates sont situés à l'extérieur de la spirale et forment le squelette sucre-phosphate de l'hélice (Sinden, 1994; Sarma et sarma, 1988).

Les ARNs sont des molécules constituées d'un seul brin (monocaténaire). A l'exception de l'ARN messager qui possède une structure linéaire, les ARNr et ARNt sont faits d'un brin fréquemment replié sur lui-même par appariement local des bases. Ils adoptent ainsi une conformation faite de boucles et de tiges (dites en épingles à cheveux). Tous les ARNt partagent certaines caractéristiques, comme leur structure secondaire et tertiaire (figure 2.3).

La structure tertiaire de l'ARNt se présente sous forme de L où l'une des jambes du L est formée par la tige acceptrice (tige de l'acide aminé) et la tige TΨC qui forment une double hélice continue de conformation A. L'autre jambe étant pareillement

constituée des tiges D et de la tige de l'anticodon qui se termine par le triplet de l'anticodon. La tige de l'anticodon est sous forme d'une double hélice à conformation A (Lewin, 1999; Sarma et Sarma, 1988, Shi et Moore, 2000). L'une des caractéristiques les plus étonnantes des ARNt est la présence en proportion élevée de bases «inhabituelles» qui proviennent d'une modification des quatre bases standard après la synthèse de la chaîne polynucléotidique (Lewin, 1999).

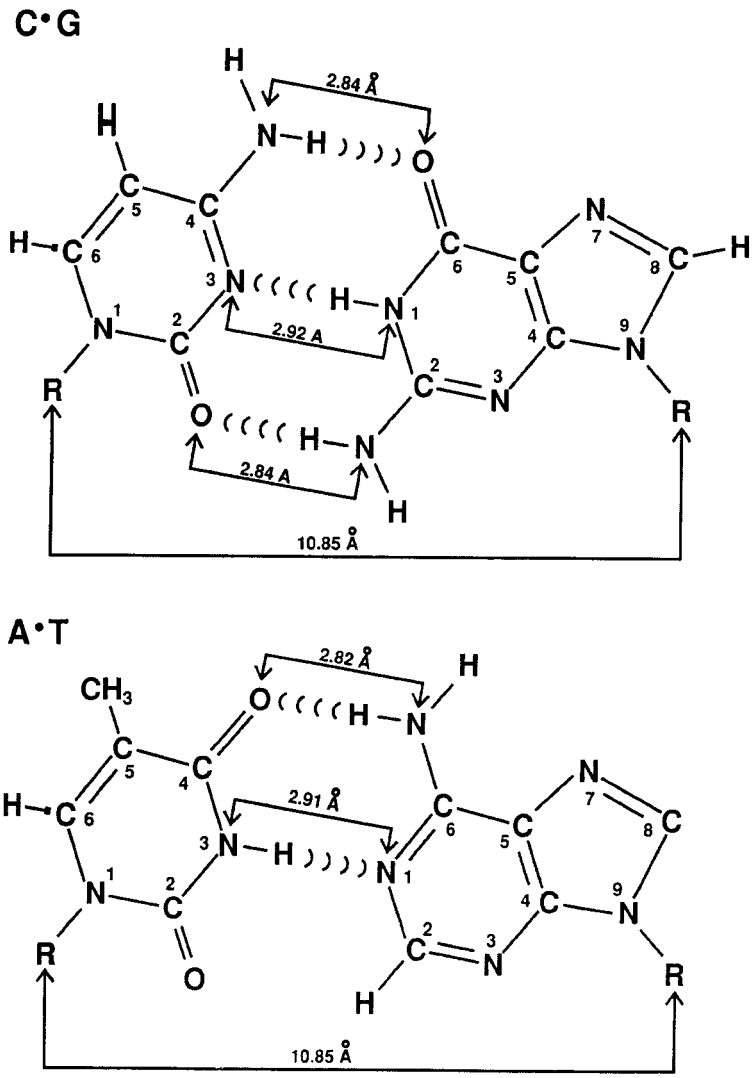


**FIGURE 2.2: Appariements de Watson-Crick. En haut la paire G-C, en bas la paire A-T. Les lignes incurvées représentent les ponts hydrogène. Tiré de Sinden, 1994.**

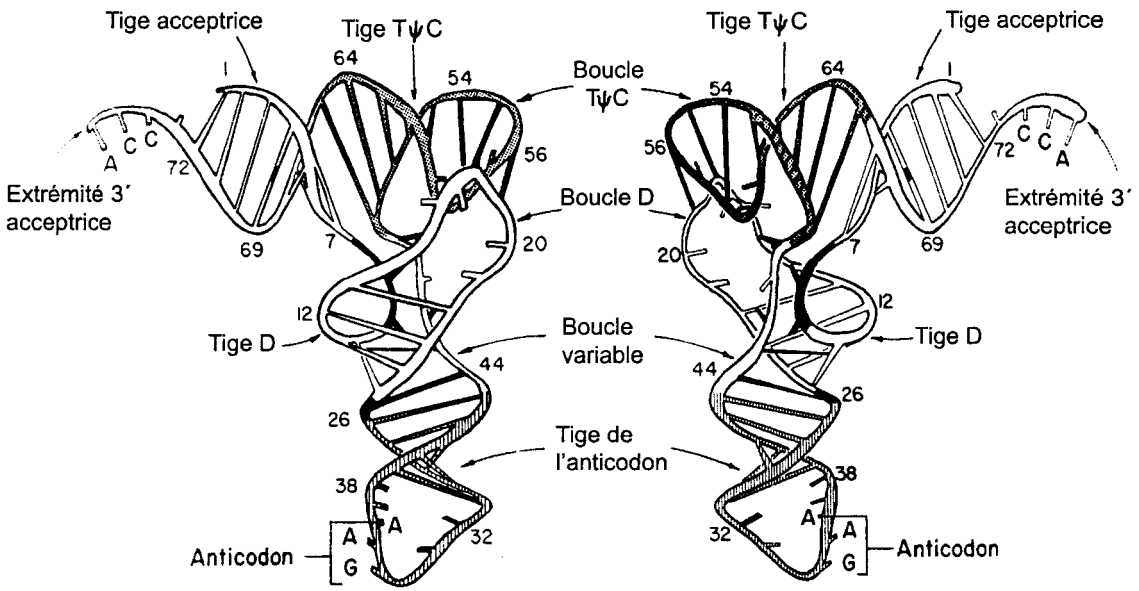


**FIGURE 2.3: Diagramme schématique montrant deux vues de côté du tRNA$^{phe}$ de la levure. Le squelette ribose-phosphate est montré sous forme d'un tube enroulé et les chiffres se rapportent à des résidus de nucléotide dans l'ordre. Les paires de bases dans la double région sont montrées comme des échelons. Les bases qui ne sont pas impliquées dans la liaison hydrogène avec les autres bases sont montrées en tant que tiges raccourcies fixées au tube enroulé.**
**Tiré de Sarma, 1988.**

### 2.1.2 Conformations des acides nucléiques

On sait depuis de nombreuses années que l'ADN peut exister sous forme de double hélice de structures différentes. La forme B représente la structure générale de l'ADN dans les conditions des cellules vivantes. Cependant la structure en double-brin est flexible, et sa capacité à changer d'organisation est un aspect essentiel de la fonction de l'ADN. Les formes les plus courantes d'acides nucléiques doubles brins sont ADN-B, ADN-A/ARN-A et l'ADN-Z. La structure et paramètres des trois formes d'ADN sont montrés dans la figure 2.4 et dans le tableau 2.1 (Sinden, 1994). Les différences entre ces structures résident dans le sens d'enroulement des hélices, le nombre de nucléotides par tour d'hélice, la mesure d'un tour d'hélice et la taille des petites et grandes gouttières. Ces différences sont dues à un changement du degré de rotation des

groupements autours des liaisons dont la rotation est libre ainsi que la conformation du sucre (Lewin, 1999; Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988).

La conformation de sucre indique quel atome de carbone du sucre, annoté par un symbole « ' », se trouve hors du plan d'où le terme " *endo* ". Une des différences majeures entre la forme A et B de l'ADN c'est la conformation C3' *endo* de sucre de l'ADN-A, comparativement à la conformation C2' de l'ADN-B. Dans l'ADN-Z la conformation de sucre reste C2' *endo* pour l'adenosine (dA), la thymidine (dT) et la cytidine (dC) mais la conformation change vers C3' *endo* dans la guanosine (Sinden, 1994). L'autre changement crucial se produisant dans la guanosine de l'ADN-Z est une rotation de 180° autour du lien glycosidique. La configuration est *anti* dans l'ADN-B (et ADN-A) et change vers la configuration *syn* dans l'ADN-Z (figure 2.5). Le terme "*anti*" s'applique à la fois à tous les nucléosides (dG, dA, dT, dC) des trois formes d'ADN et signifie que le lien glycosidique N9-C1' des purines (ou N1-C1' des pyrimidines) est tel que le lien C1'-O4' est en position trans par rapport au lien N9-C4 des purines (ou N1-C1' des pyrimidines). Le terme "*syn*" qui s'applique uniquement à la guanosine de l'ADN-Z signifie que ces mêmes liens (ceux impliquant la guanosine seulement) sont "*syn*" (Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988).

**TABLEAU 2.1**

**Paramètres structuraux des trois principales conformations de l'ADN. Tiré de Senden, 1994.**

| Pramètre | ADN-A | ADN-B | ADN-Z |
|---|---|---|---|
| Sens de l'hélice | droite | droite | gauche |
| Paires de bases par tour d'hélice | 11 | 10 | 12 |
| Hauteur d'hélice par paire de base (Å) | 2.55 | 3.4 | 3.7 |
| Longueur d'hélice (°) | 28 | 34 | 45 |
| Inclinaison des paires de bases (°) | 20 | −6 | 7 |
| Rotation de l'hélice par paire de base (°) | 33 | 36 | −30 |
| Diamètre de l'hélice (Å) | 23 | 20 | 18 |
| Configuration de la liaison glycosidique | | | |
| dA, dT, dC | anti | anti | anti |
| dG | anti | anti | syn |
| Pliage des sucres | | | |
| dA, dT, dC | C3′ endo | C2′ endo | C2′ endo |
| dG | C3′ endo | C2′ endo | C3′ endo |
| Distance phosphate-phosphate sur le même brin (Å) | | | |
| dA, dT, dC | 5.9 | 7.0 | 7.0 |
| dG | 5.9 | 7.0 | 5.9 |

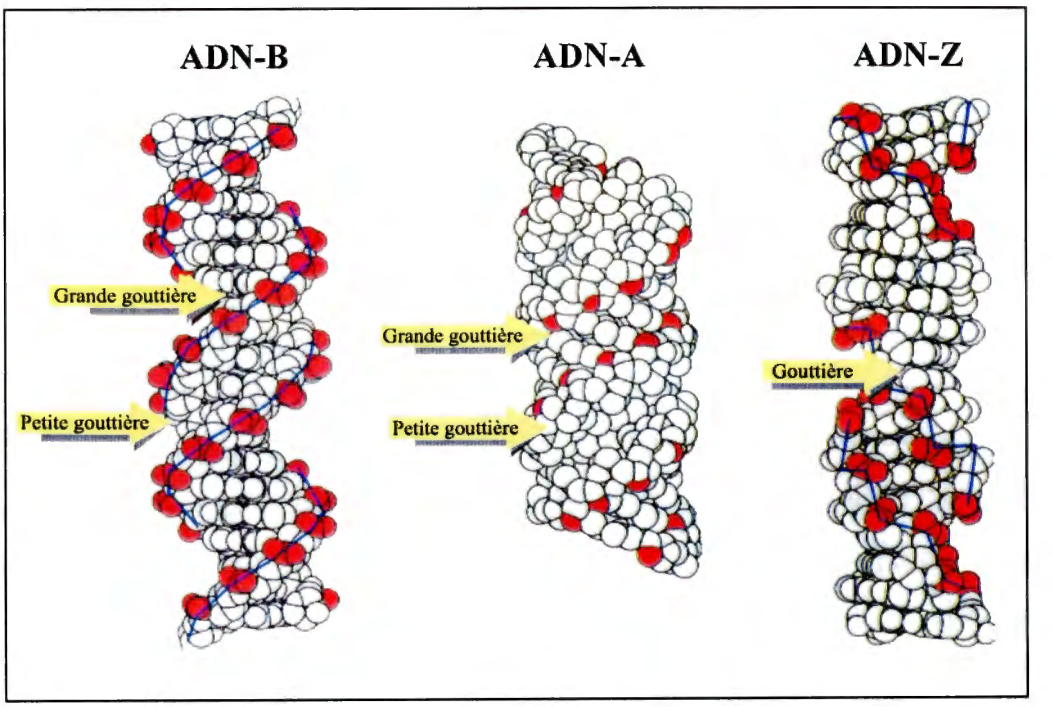


**FIGURE 2.4: Conformation B, A et Z de l'ADN. Le squelette sucre-phosphate est montré en couleurs rouge et bleu.**
**Tiré de Lewin, 1999.**

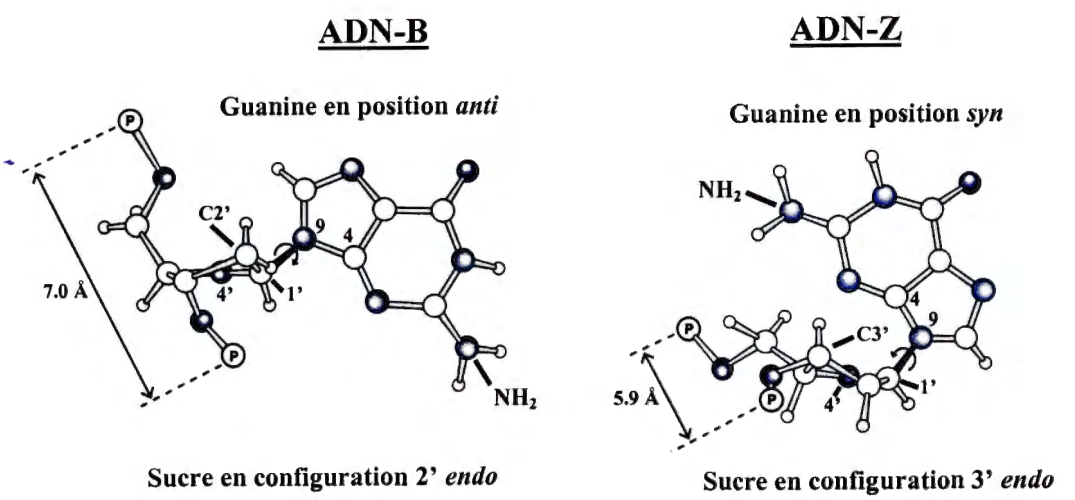


**FIGURE 2.5: La structure de la guanosine dans l'ADN-B et Z.**
**Tiré de Sinden, 1994**

La caractéristique qui domine l'ADN-B est la présence de deux gouttières distinctes, une grande et une petite gouttières, représentées sur la figure 2.4 (Lewin, 1999). Ces deux gouttières fournissent évidemment des surfaces très distinctes avec lesquelles les protéines peuvent interagir. Les diverses protéines pouvant lier l'ADN ont des domaines qui peuvent entrer en contact avec l'une ou l'autre des deux gouttières. Certains produits chimiques et drogues peuvent interagir spécifiquement avec la grande ou la petite gouttière. Les différents groupements fonctionnels des bases azotés sont accessibles à partir de la grande ou la petite gouttière. Les principaux sites de liaison dans la grande gouttière sont le N7 des purines, $-NH_2$ de l'adénine et la cytosine, et $-CH_3$ de la thymine (interaction hydrophobes). Pour la petite gouttière, on a N3 des purines, $-NH_2$ de la guanine et O2 de la thymine. Les surfaces de liaison hydrogène de Watson-Crick ne sont pas disponibles au solvant ou aux protéines puisque les groupements fonctionnels impliqués dans la liaison hydrogène interagissent entre eux (dans l'appariement des bases complémentaires) au centre de la double hélice. La formation des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires, les interactions hydrophobes qui résultent de l'empilement hydrophobe des bases adjacentes, et les forces de Van der Waals qui jouent également un rôle important dans les interactions base-base, contribuent à la stabilité thermodynamique de la double hélice (Lewin, 1999; Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988).

La présence de sucres ribose dans les ARNs est en grande partie responsable des propriétés conformationnelles différentes de celles des ADN. Le groupement hydroxyle sur le sucre en position 2' est à l'origine de nombreuses interactions supplémentaires qui tendent à déstabiliser les liaisons 5'→ 3' phosphodiester et empêchent l'adoption d'une conformation en double hélice de type B. Les ARNs adoptent donc une conformation de type A (Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988).

## 2.2 Polyamines endogènes

### 2.2.1 Structure et propriétés

L'importance biologique des amines telles que la putrescine, la spermidine et la spermine, communément appelées « polyamines », provient du fait qu'il s'agit d'ingrédients universels de toute cellule eucaryote (Seiler et Moulinoux, 1996).

Les polyamines sont des amines aliphatiques chargées positivement (figure 2.6) qui remplissent de nombreuses fonctions dans la cellule eucaryote. La putrescine $NH_2(CH_2)_4NH_2$ et la spermidine $NH_2(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$ se trouvent chez toute les espèces vivantes, tandis que la spermine $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$ est moins commune chez les procaryotes. Une des propriétés importantes de ces polyamines c'est qu'elles sont positivement chargés à pH physiologique, entrainant des interactions électrostatiques avec des sites anioniques présents au niveau des acides nucléiques (ADN, ARN), des protéines et des phospholipides. La caractéristique unique de ces polyamines, comparativement aux cations inorganiques tels que $Mg^{2+}$ ou $Ca^{2+}$, est qu'elles ont des charges positives le long de la chaîne hydrocarbonée, espacées par des groupements méthylènes qui peuvent participer à des interactions hydrophobes. Ainsi, les polyamines peuvent avoir une plus grande affinité envers des molécules ayant des sites anioniques et des groupements méthylène, en particulier les acides nucléiques (Kilpeläinen, 2002; Thomas et Thomas, 2001; Marton et Pegg, 1995).

### 2.2.2 Métabolisme des polyamines

#### 2.2.2.1 Biosynthèse des polyamines

Chez les cellules des mammifères (figure 2.6), la putrescine est formée par la décarboxylation de l'ornithine, une réaction catalysée par l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC). Plusieurs microorganismes et plantes supérieures sont capables

de produire la putrescine via l'agmatine (Tabor et Tabor, 1984; Pegg et McCann, 1982). L'agmatine est produite de la décarboxylation de l'arginine par l'arginine décarboxylase (ADC). Ainsi, ces organismes peuvent synthétiser la putrescine par au moins deux voies; soit directement à partir de l'ornithine par l'activité d'ODC, ou à partir d'arginine et d'agmatine par l'intermédiaire de l'ADC et de l'agmatinase, respectivement. Cependant, chez les cellules des mammifères, l'ornithine semble être le seul précurseur pour la synthèse *de novo* des polyamines. L'ornithine est fournie par le plasma et peut également être synthétisée dans la cellule à partir de l'arginine via l'arginase (Urdiales et *al.*, 2001; Pegg et McCann, 1982).

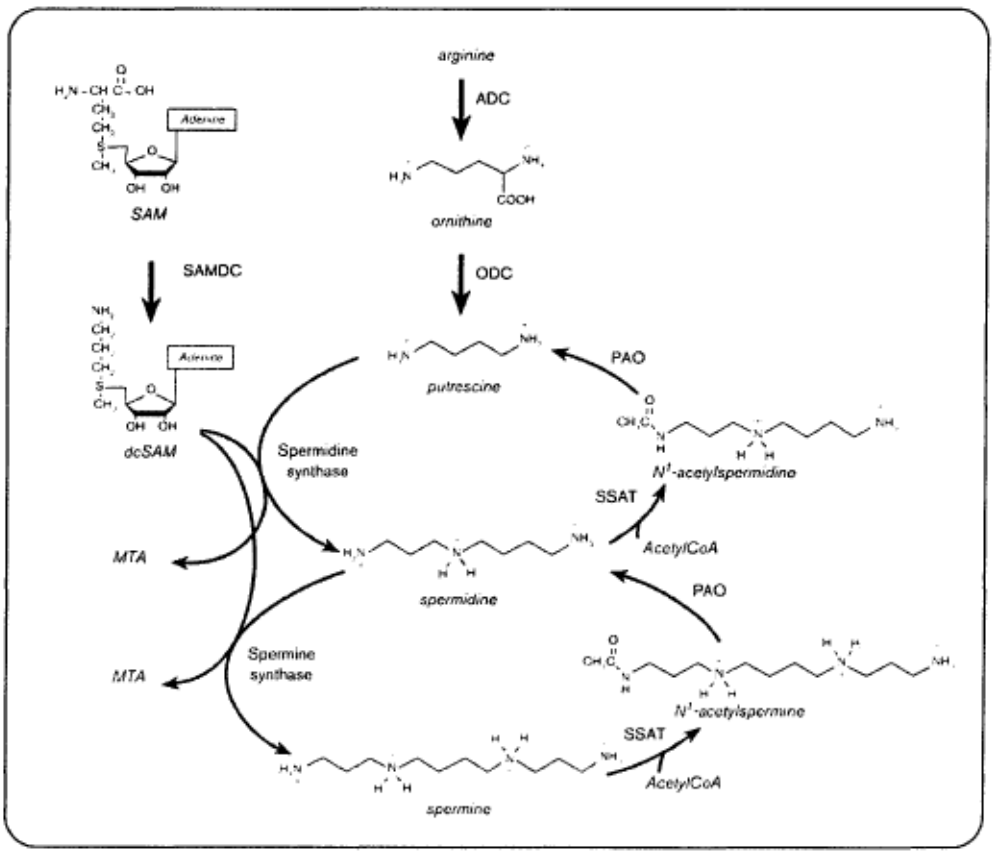


**FIGURE 2.6: Métabolisme des polyamines de l'arginine jusqu'à la spermine. Tiré de Urdiales et *al.*, 2001.**

La spermidine et la spermine sont synthétisées en ajoutant un groupement aminopropyl, qui provient de la décarboxylation de la *S*-adenosylmethionine, à la putrescine et la spermidine, respectivement. De ce fait, la synthèse de la spermidine et la spermine exige l'action de deux enzymes; d'abord, la *S*-adenosylmethionine décarboxylase (SAMDC) pour la synthèse du donateur d'aminopropyl et, en second lieu, la transférase (la spermidine synthase ou la spermine synthase) qui catalyse le transfert du groupe aminopropyl vers les groupes amines primaires de la putrescine ou de la spermidine, respectivement (Urdiales et *al.*, 2001; Pegg et McCann, 1982).

Ainsi, l'ODC et la SAMDC constituent les deux enzymes clés de l'anabolisme des polyamines. Ces deux enzymes ont des demi-vies courtes, et leurs activités basales sont basses et rapidement induites par différents stimulus (Urdiales et *al.*, 2001; Tabor et Tabor, 1984; Pegg et McCann, 1982).

#### 2.2.2.2 L'interconversion des polyamines

La voie d'interconversion constitue une étape importante dans la voie de biosynthèse des polyamines. Ce cycle métabolique est conçu pour fournir rapidement la putrescine, la spermidine ou la spermine une fois requis. La première partie du cycle est la formation de la spermidine et de la spermine par l'intermédiaire des enzymes mentionnées ci-dessus. Dans la deuxième partie, la spermidine et la putrescine sont formées à partir de la spermine et de la spermidine, respectivement. La réaction commence par une acétylation, catalysée par l'enzyme spermidine/spermine acétyltransférase (SSAT) formant la $N^1$-acetylspermine ou la $N^1$-acetylspermidine. Ces dérivés acétyl subissent une oxydation par la polyamine oxidase (PAO), une enzyme flavine adénine dinucléotide (FAD)-dépendante. Les produits de ces réactions tels que la spermidine ou la putrescine peuvent être utilisés encore pour la formation de nouvelles molécules de spermidine ou de spermine. L'autre produit, 3-acetamidopropanal, est transformé en $\beta$-alanine, et peut être encore métabolisé par la transamination (Urdiales et *al.*, 2001; Pegg et McCann, 1982).

#### 2.2.2.3 La dégradation terminale des polyamines

La dégradation terminale des polyamines constitue le troisième point de régulation dans le métabolisme des polyamines. Cela consiste par l'oxydation des groupes amines primaires (terminaux) produisant des dérivés de polyamines qui ne peuvent être recyclés en polyamine. La plupart des catabolites terminaux de polyamines sont des produits de la désamination oxydative des polyamines et de leurs dérivés acétyl. Tous les dérivés de polyamines provenant de la dégradation terminale sont les constituants urinaires (Urdiales et *al.*, 2001).

Bien que le métabolisme des polyamines est considéré comme une source de radicaux libres, des études récentes ont montrées que les polyamines sont capables de protéger l'ADN contre ces derniers (Ha et *al.*, 1998a,b).

Le métabolisme des polyamines étant anormalement amplifié dans les cellules cancéreuses et son inhibition s'accompagnant systématiquement d'un arrêt de croissance de ces cellules, ce métabolisme a été considéré comme indispensable à la prolifération cancéreuse et, à ce titre, est devenu une cible pour la synthèse de molécules à visée anticancéreuse (Thomas et Thomas, 2001; Catros-Quemener et *al.*, 1999; Marton et Pegg, 1995; Huang et *al.*, 2005). Parmi celles-ci, la 2-(difluorométhyl)ornithine (DFMO) s'est révélée être de loin la plus prometteuse.

## 2.3 Interaction entre polyamines et acides nucléiques

La découverte des niveaux élevés de l'ornithine décarboxylase et des polyamines dans les cellules cancéreuses a inspiré aux chercheurs l'idée que les polyamines pourraient directement agir sur les acides nucléiques (Tabor et Tabor, 1984; Heby et Persson, 1990). D'autres études ont même soutenu que l'interaction avec des acides nucléiques pourrait expliquer certaines des fonctions biologiques importantes des polyamines (Cohen, 1998). Cela encourageait les chercheurs à étudier de façon

approfondie les possibilités de liaison entre les polyamines endogènes et les acides nucléiques, en utilisant des techniques bien adaptées pour étudier les systèmes en interaction, telles que la spectroscopie vibrationnelle, la spectroscopie électronique, la spectroscopie à résonance magnétique, la diffraction par rayon X, études théoriques et études thermodynamiques.

### 2.3.1 Interaction entre les polyamines et l'ADN

Jusqu'ici, les études qui ont tenté de décrire les interactions polyamine-ADN ont été en grande partie réalisées *in vitro*. Cependant, les différents modèles de liaison proposés par ces études (basées sur les méthodes mentionnés ci-dessus) ne concordent pas d'un modèle à un autre, faisant l'objet d'une controverse. Les premiers travaux expérimentaux ont été liés à l'influence de la spermidine et de la spermine sur la précipitation de l'ADN et la dénaturation thermique (Tabor, 1962; Tabor et Tabor, 1984). La spermine et la spermidine se sont avérées être capables de précipiter et de stabiliser l'ADN. Ces effets ont été immédiatement attribués à la neutralisation de la charge électrique, incitant ainsi à proposer des modèles d'interactions basés sur l'interaction électrostatique de type amino-phosphate (Tsuboi, 1964; Liquori et *al.*, 1967).

Afin de déterminer la position exacte de la spermine sur l'ADN, plusieurs laboratoires se sont concentrés sur la cristallisation des complexes à analyser par diffraction de rayons X. Drew et Dickerson (1981) ont réussi à obtenir des cristaux du dodécamère d(CGCGAATTCGCG) en présence de la spermine. Les spectres de rayons X ont montré des molécules de spermine attachées aux phosphates à travers la grande gouttière de l'oligonucléotide, ce qui soutient les modèles électrostatiques. Cependant, les amines secondaires, situés à l'intérieur de la chaîne hydrocarbonée de polyamine, établissent des contacts avec les bases azotées, ce qui a mené à penser à l'existence de spécificités structurales.

Un fait exceptionnel est que le dodécamère a été cristallisé sous la forme B, qui est la conformation normale de l'ADN en solution. D'autres études cristallographiques ont aussi été faites sur différents oligonucléotides de conformations A et Z (Jain et *al.*, 1989; Egli et *al.*, 1991). Ces études ont montré que les molécules de spermine étaient liées aux bases dans la petite gouttière de l'octamère d(GTGTACAC) en conformation A. La formation des structures gauches de l'ADN-Z a été généralement liée à des séquences spécifiques de l'ADN, dans lesquelles l'alternation de la séquence GC était prédominante (Drew et *al.*, 1980; Wangs et *al.*, 1981). Dans ces cas, la spermine pouvait changer la structure secondaire de l'oligonucléotide de B en Z. D'autres études cristalographiques sur le complexe d(CGCGCG)-spermine ont démontré que la spermine établit des contacts avec les bases de guanine (Egli et *al.*, 1991). Quant à la spermidine et la putrescine, elles se sont avérées moins efficaces en induisant des changements structurels dans des séquences d'ADN (Schellman et Parthasarathy, 1984).

Ces études de diffraction de rayons X ont donc permis la confirmation de l'existence de sites spécifiques d'interaction des polyamines avec l'ADN. Cependant, les résultats n'ont pas été directement corroborés à l'interaction en conditions physiologiques. Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution ont montré que les molécules de spermine avaient toujours une mobilité élevées dans leurs complexes avec l'ADN (Wemmer et *al.*, 1985; Andreasson et *al.*, 1996). Néanmoins, on n'a pas exclu la possibilité de sites spécifiques de liaison. Un résultat intéressant obtenu à partir de la résonance paramagnétique électronique (EPR) a montré la capacité de la spermine à protéger l'ADN contre des dommages provoqués par les radicaux libres (Ha et *al.*, 1998 b).

Ces dernières années, plusieurs travaux ont été menés sur le complexe ADN-polyamine, en utilisant la spectroscopie d'absorption électronique (UV) et le dichroïsme circulaire (CD). Bon nombre d'entre elles ont été effectuées sur des oligonucléotides sélectionnés. Ainsi, des études effectuées sur des séquences alternant les purines et les pyrimidines ont démontré que les polyamines interagissent différemment avec des séquence GC et AT (Marquet et Houssier, 1988). La spermine est capable d'induire la

transition conformationnele B→ Z sur des oligonucléotides riches en GC, alors qu'elle montrait une affinité inférieure pour des régions riches en AT (Thomas et Messner, 1986; Hasan et *al.*, 1995). L'affinité différentielle des polyamines pour les séquences riches en GC et en AT a été également démontrée par des études basées sur la spectroscopie Raman (Ruiz-Chica et *al.*, 2001a, 2000b). Ces effets différentiels sur la conformation des séquences riches en GC et en AT pourraient être liés, *in vivo*, au rôle observé des polyamines sur la régulation de l'expression de gènes et de la survie des cellules (Childs et *al.*, 2003). Un résultat intéressant a été obtenu à l'aide du dichroïsme circulaire (CD) et de la spectroscopie UV sur la liaison entre le récepteur des œstrogènes (ER) et l'élément de réponse d'oestrogène (ERE) en présence des polyamines naturelles (Thomas et *al.*, 1997, 1999). Ces études ont prouvé que les polyamines modulent la liaison ER-ERE. Il est possible que les polyamines puissent moduler d'autres éléments de liaison *cis/trans*, et ceci expliquerait leur rôle dans la régulation génique. D'autre part, on a observé une augmentation anormale de signal CD pour les chaînes d'ADN de taille moyenne en présence de la spermine et de la spermidine (Thomas et *al.*, 1996). Ces résultats signifient que les molécules d'ADN forment une autre organisation en solution, et il s'agit d'une nouvelle structure tertiaire appelée ADN-Ψ, causée par l'agrégation alternative de chaîne d'ADN et de polyamines.

Les interactions ADN-polyamine ont suscité relativement peu d'attention dans le passé du point de vue vibrationnel. De nos jours, la spectroscopie Raman est la plus utilisée dans l'étude des systèmes biologiques en conditions physiologiques. Les études récentes de la spectroscopie Raman ont soutenu le rôle des spécificités structurales dans la liaison des polyamines sur l'ADN (Ruiz-Chica et *al.*, 2001c). Ces résultats ont confirmé la préférence de la spermine pour interagir avec la grande gouttière de l'ADN, alors que la spermidine et la putrescine préféraient la petite gouttière. Les sites de liaison pouvant être impliqués dans l'interaction sont l'atome N7 des purines, l'atome O2 et le groupement $CH_3$ (contact hydrophobe) de la thymine pour la grande gouttière, et les atomes N3 et O2 des purines et pyrimidines pour la petite gouttière. Des attractions électrostatiques entre les phosphates de l'ADN et les groupes amines des polyamines ont été également proposées. D'autres auteurs ont suggéré, sur la base des mesures de

Raman, que les phosphates pourraient être les cibles primaires de l'interaction de l'ADN avec la spermine et la spermidine, bien qu'ils n'aient pas exclu l'interaction par les bases (Deng et *al.*, 2000).

Quelques laboratoires utilisaient des méthodes théoriques dans l'étude des interactions entre les polyamines et l'ADN. Feuerstein et coll. (1986, 1991) ont utilisé des calculs de modélisation moléculaire pour étudier le complexe ADN-spermine, et ont trouvé que la spermine interagit préférentiellement avec la grande gouttière de l'ADN. Ils ont également étudié la liaison de la spermine avec plusieurs chaînes d'oligonucléotide (Feuerstein et *al.*, 1990). Les résultats obtenus ont démontré que la spermine possédait des affinités différentes pour différentes séquences de base. D'autres travaux récents, basés sur des calculs de dynamique moléculaire ont suggéré que la liaison de la spermine par la grande gouttière de l'ADN est limitée aux régions riches en GC, suggérant ainsi une interaction préférentielle par la petite gouttière des séquences alternant des bases AT (Korolev et *al.*, 2001). D'autres modèles théoriques ont soutenu l'évidence expérimentale que la spermine peut agir en tant que protecteur d'ADN contre la cassure causée par l'irradiation (Oh and Kim, 1998; Douki and Bretonniere, 2000).

En dépit de la grande quantité de travaux expérimentaux et théoriques menés à bien jusqu'ici, nous ne pouvons pas donner une explication incontestable au sujet de la façon dont les polyamines se lient à l'ADN. De plus, il n'y a probablement pas qu'une seule façon pour les polyamines de se lier à l'ADN. Il serait alors préférable de parler de sites préférentiels de liaison, qui seront différents pour chacune des trois polyamines endogènes.

### 2.3.2 Interaction entre les polyamines et l'ARNt

Les interactions entre les polyamines et l'ARN de transfert (ARNt) sont moins étudiées que celles avec l'ADN, et donc des études théoriques et expérimentales plus spécifiques de la complexation polyamine-ARNt sont sollicitées. Il semble qu'une

grande part de polyamines intracellulaires est principalement associée aux molécules d'ARN (Igarashi et Kashiwagi, 2000).

Des études biochimiques initiales par Cohen et ses collègues (Cohen, 1971; Sakai et Cohen, 1973) ont indiqué que la liaison des polyamines à l'ARNt était spécifique. Ils ont montré que cette liaison stabilise la structure secondaire et tertiaire de l'ARNt. L'interaction de la spermine et la spermidine avec l'ARNt a été intensivement étudiée ces dernières années, et cela en utilisant différentes techniques de la spectroscopie RMN, à savoir NMR-$^{1}$H (Frydman et *al.*, 1996, 1999), NMR-$^{13}$C (Frydman et *al.*, 1990), et NMR-$^{15}$N (Fernandez et *al.*, 1994, Frydman et *al.*, 1992). Ces auteurs ont observé que dans tous les polyamines, les amines secondaires ($-NH_2^+-$) se lient à l'ARNt plus fortement que les amines terminaux ($-NH_3^+$). Leur hypothèse est que des facteurs, autre que les interactions électrostatiques, sont responsables de ce phénomène puisque les amines primaires ($-NH_3^+$) possèdent une densité plus élevée de charges positives que les amines secondaire ($-NH_2^+-$). Les expériences basées sur la NMR-$^{15}$N suggèrent que la spécificité avec laquelle les groupes amines des polyamines lient à l'ARNt est une conséquence des différents modes de liaison hydrogène qui peuvent être établis entre les deux molécules.

Le complexe spermine-tRNA$^{Phe}$ a été cristallisé et la structure a été déterminée à 2.5 Å de résolution (Quigley et *al.*, 1978). La molécule de polyamine se lie à deux sites principaux, la première molécule dans la grande gouttière, à l'extrémité de la tige d'anticodon, et la deuxième près de la boucle variable autour du phosphate 10 à un tour dans le squelette de l'ARNt (figure 2.7). Les études RMN mentionnées ci-dessus ont établis que la spermine se lie aux sites additionnels de l'ARNt, en particulier à la jointure des boucles T$\psi$C et D (Frydman et *al.*, 1990, 1992, 1996), ce qui n'a pas été observé dans les études cristallographiques. Il faut signaler que le rôle des polyamines dans la biosynthèse des protéines est bien documenté (Igarashi et Kashiwagi, 2000).

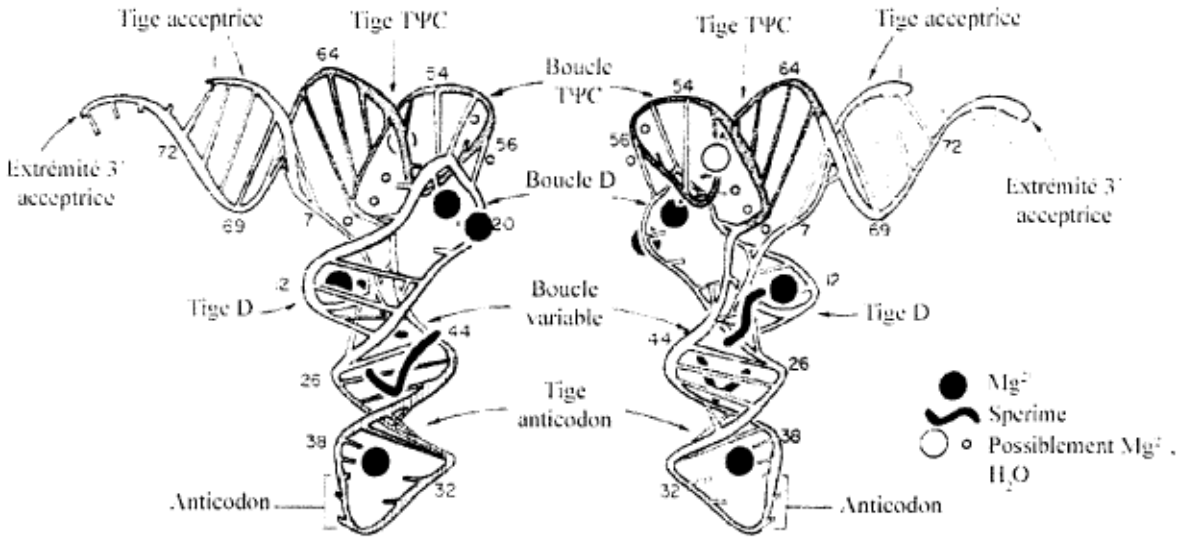


**FIGURE 2.7: Diagramme schématique montrant les sites de liaison des deux molécules de spermine et des ions de magnesium sur l'ARNt de levure.**
**Tiré de Quigley et *al.*, 1978.**

# CHAPITRE III

# PRINCIPALES MÉTHODOLOGIES

## 3.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

### 3.1.1 Introduction

La spectroscopie infrarouge est l'étude de l'interaction de la lumière infrarouge avec la matière. La lumière infrarouge (IR) est une radiation de nature électromagnétique située dans le domaine de nombres d'onde ($\bar{\nu}$) inférieurs à 12500 $cm^{-1}$. Ce domaine est sous divisé en trois catégories :

12500 $cm^{-1}$ – 4000 $cm^{-1}$ : Proche IR

4000 $cm^{-1}$ – 400 $cm^{-1}$ : IR Moyen

Inférieur à 400 $cm^{-1}$ : IR Lointain

Pour le domaine IR, les transitions d'énergie observées sont de type vibrationnel ou rotationnel. Le domaine infrarouge entre 4000 $cm^{-1}$ et 400 $cm^{-1}$ (2.5 – 25 µm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules (Günzler et Gremlich, 2002; Smith, 1996; Pavia, 1979). Dans le cadre de notre étude on s'intéressera davantage à cette région.

La relation entre la région de l'infrarouge et les autres régions incluses dans le spectre électromagnétique est illustrée sur la figure 3.8. Pour rappel, les relations entre les diverses grandeurs du spectre électromagnétique sont présentées par l'Équation 1.

$$\bar{\nu} = 1/\lambda = \nu/c \quad \text{.....(1)}$$

Où $\bar{\nu}$ est le nombre d'onde (exprimé en $cm^{-1}$)

$\lambda$ est la longueur d'onde (exprimée en $\mu$m)

$\nu$ est la fréquence (exprimée en Hz ou $s^{-1}$)

c est la vitesse de la lumière ($3 \times 10^8$ $ms^{-1}$)

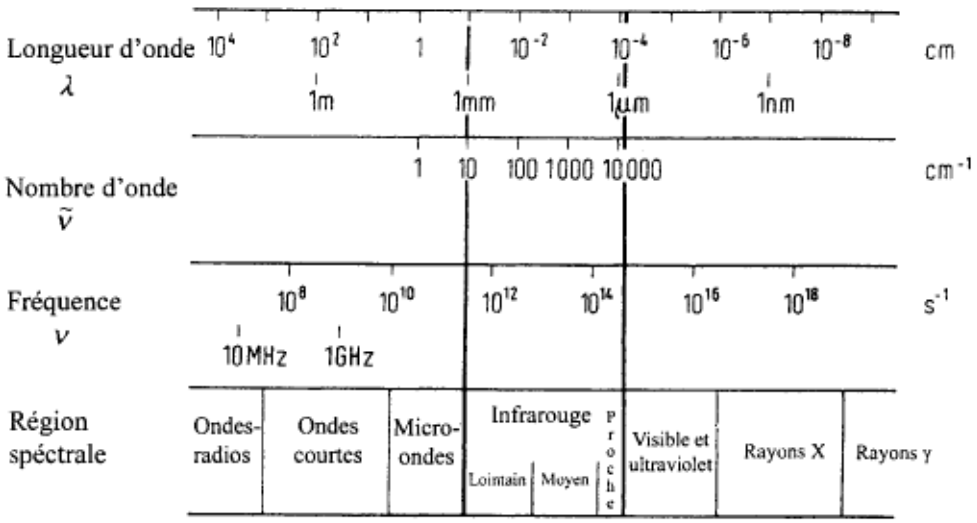


**FIGURE 3.8: Le spectre électromagnétique.**
**Tiré de Günzler et Gremlich, 2002.**

### 3.1.2 Interaction du rayonnement infrarouge et des molécules

Lorsqu'une molécule est soumise à un rayonnement infrarouge, elle peut l'absorber, ce qui entraîne la vibration de ses liaisons chimiques. La présence des liaisons chimiques dans une molécule est une condition nécessaire pour que l'absorbance infrarouge se produise. Les groupements fonctionnels des molécules tendent à absorber le rayonnement infrarouge dans la même gamme de nombre d'onde, indépendamment de la structure du reste de la molécule qui contient le groupement fonctionnel. Par exemple, l'étirement de la liaison C=O (groupement carbonyle) se produit vers 1700 $cm^{-1}$ dans les cétones, les aldéhydes, et les acides carboxyliques. Ceci signifie qu'il y a une corrélation entre les nombres d'ondes dans lesquels une molécule absorbe le rayonnement infrarouge et sa structure (Smith, 1996).

La vibration ou la rotation d'un groupe atomique peut être associé au mouvement d'une charge électrique, particulièrement quand les charges des atomes dans une molécule sont distribuées asymétriquement ou lorsque la distribution de la charge devient asymétrique par la vibration des atomes. En conséquence, le rayonnement électromagnétique de la fréquence correspondante peut seulement alors être absorbée par une molécule si un changement du moment dipolaire est associé à l'excitation vibratoire du groupement atomique concerné. Les molécules diatomiques avec les mêmes atomes, en principe, ne peuvent pas être excitées pour vibrer, parce qu'elles n'ont aucun moment dipolaire. Les molécules se composant de divers types d'atomes, cependant, peuvent toujours agir avec le rayonnement infrarouge (figure 3.9a). Quand un moment dipolaire est absent dès le début, il est néanmoins possible pour la molécule d'absorber le rayonnement infrarouge si les vibrations engendrées provoquent un déplacement antisymétrique du centre de la charge, créant ainsi un moment dipolaire (figure 3.9b). Les vibrations ne montrant aucun changement du moment dipolaire (figure 3.9c) sont caractérisées en tant que molécules inactives en infrarouge (Günzler et Gremlich, 2002).

La majorité des vibrations fondamentales des molécules organiques se trouve dans le moyen IR. Les deux principaux types de vibration sont l'élongation symbolisée par $\upsilon$ (stretching) et la déformation symbolisée par $\delta$ (bending). Généralement, les élongations sont situées dans une gamme de nombres d'onde supérieure à celle des déformations (Günzler et Gremlich, 2002; Pavia, 1979). La figure 3.10 donne un aperçu des fréquences d'absorption pour les principaux groupements fonctionnels (Günzler et Gremlich, 2002).

Les liaisons C-C du squelette carboné sont couplées. Les vibrations de la chaîne carbonée sont donc complexes et donnent naissance à une partie du spectre nommée "empreinte digitale" de la molécule (900-1500 $cm^{-1}$), caractéristique de la molécule mais difficilement interprétable. Les liaisons C-H d'un $CH_3$ ou d'un $CH_2$ sont couplées et vibrent simultanément. Par contre, la plupart des groupes de la chimie organique comportent des liaisons qui peuvent être excitées presque indépendamment du reste de

la molécule (C=O, C-O, O-H, C-N, N-H, etc...). Ces groupes donneront donc naissance à des fréquences d'absorption caractéristiques ne dépendant que peu de leur environnement. La présence dans le spectre d'une absorption à cette fréquence permettra donc d'identifier le groupement et dans certains cas, l'étude de l'écart entre la fréquence et la valeur typique permettra de préciser l'environnement du groupe (conjugaison, liaison hydrogène, tension de cycle, etc...) (Günzler et Gremlich, 2002; Pavia, 1979; Bellamy, 1968).

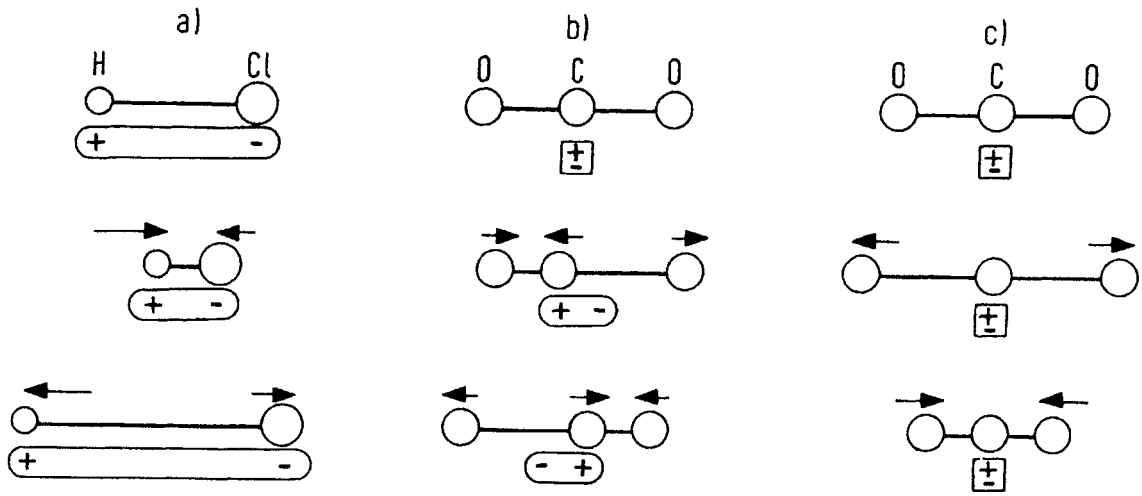


**FIGURE 3.9: Changement dans le moment dipolaire pendant les vibrations moléculaires. a) Chlorure d'hydrogène: le moment dipolaire est changé pendant la vibration. b) Dioxyde de carbone, vibration antisymétrique: contrairement à l'état d'équilibre dipôle-libre, les centres de charges négatives (O) et de charge positives (C) oscillent pendant la vibration. c) Dioxyde de carbone, vibration symétrique: les centres de gravité des charges négatives (O) et positives (C) sont confondus: aucun changement du moment dipolaire.**
**Tiré de Günzler et Gremlich, 2002.**

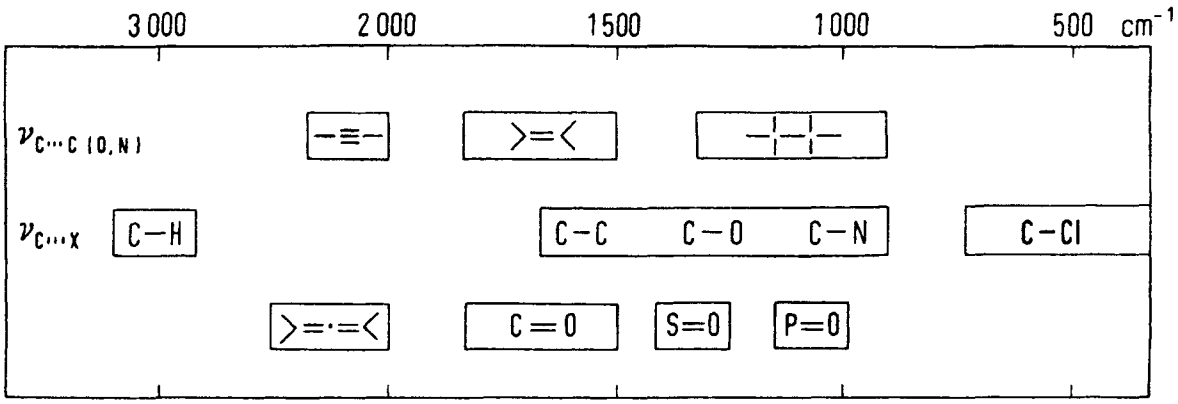


**FIGURE 3.10: Groupements fonctionnels et leur fréquence d'absorption (en $cm^{-1}$) caractéristique.**
**Tiré de Günzler et Gremlich, 2002.**

### 3.1.3 Instrumentation

Un spectre peut être défini comme étant la mesure de l'absorption lumineuse en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou de l'énergie de la lumière incidente. Les spectres sont obtenus à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier (FTIR). La spectrométrie FTIR est basée sur l'obtention dans le domaine temporel d'un interférogramme à l'aide d'un interféromètre de Michelson. Le spectre désiré est ensuite obtenu par transformée de Fourier de cet interférogramme (Günzler et Gremlich, 2002; Pavia, 1979).

#### 3.1.3.1 Description d'un spectromètre FTIR

Un spectromètre comporte quatre parties essentielles (Günzler et Gremlich, 2002) :

❖ Une source lumineuse : pour notre cas, le globar est utilisé pour le moyen IR. Il est constitué d'un bâtonnet en carbure de silicium (SiC) et fonctionne à des températures de l'ordre de 1500 K.

❖ Un dispositif permettant de générer les interférences : l'interféromètre de Michelson pour le FTIR.

❖ Un système de présentation de l'échantillon : ce système dépend de la technique spectroscopique employée. Pour l'étude, des accessoires d'absorption ont été utilisés. L'échantillon est étudié sous forme de filmes hydratés : en moyenne 100 µl d'échantillon est compressé entre deux fenêtres AgBr.

❖ Un ou plusieurs capteurs photosensibles : le spectromètre utilisé comporte un détecteur DTGS (deuterated triglycine sulfate). Ce détecteur est refroidi avec un système d'aération.

Dans le cadre de cette étude, tous les spectres FTIR ont été effectués sur un Impact 420.

#### 3.1.3.2 Interféromètre de Michelson

L'interférométrie est l'utilisation des phénomènes d'interférence pour la mesure. Ces interférences sont générées par l'interféromètre de Michelson. Son schéma est décrit sur la figure 3.11.

Le rayon lumineux provenant de la source frappe un miroir semi-transparent, appelé séparatrice (beamsplitter). Ce rayon est passé au préalable par un système de miroirs afin d'entrer dans l'interféromètre sous la forme d'un rayon parallèle. Sous l'action de la séparatrice, le rayon est scindé en deux parties d'intensité égale, une réfléchie et une transmise. Chacun de ces rayons effectue un aller retour miroir-séparatrice. La particularité réside dans la différence de parcours de ces deux rayons. Le rayon réfléchi frappe un miroir fixe (fixed mirror) et a donc un parcours optique fixe alors que le rayon transmis frappe un miroir mobile (movable mirror) qui peut se déplacer dans les directions indiquées sur le graphique ci-dessus et possède donc un parcours optique dépendant du déplacement de celui-ci. La fraction de la lumière redirigée de nouveau à la source n'est pas utilisée et elle sera perdue. Au niveau de la

séparatrice, les deux rayons se combinent à nouveau et sont focalisés vers le compartiment d'échantillon puis le détecteur. Le déplacement du miroir mobile change la longueur de parcours optique dans l'interféromètre, par lequel une différence de phase entre les deux faisceaux partiels résulte et, par conséquent, un changement de l'amplitude de l'interférence. Le signal d'intensité du détecteur en fonction du changement de la longueur de parcours optique corrigée par un composant constant, s'appelle un interférogramme (Günzler et Gremlich, 2002; Rouessac et Rouessac, 1998).

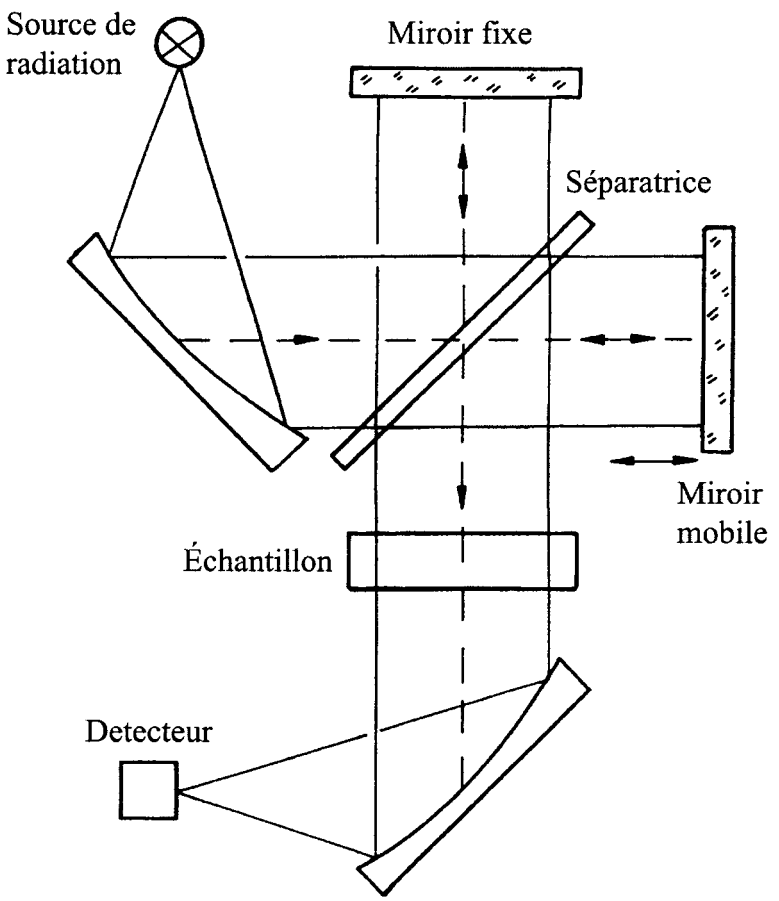


**FIGURE 3.11: Diagramme schématique d'un spectromètre de transformée de Fourier avec un interféromètre classique de Michelson Tiré de Günzler et Gremlich, 2002.**

Pour résumer, l'intensité du rayon lumineux en sortie de source dépend de la longueur d'onde et on ne peut mesurer qu'une intensité globale S(λ). En sortie de l'interféromètre, suite à la recombinaison en raison du déplacement du miroir mobile, on a artificiellement fait dépendre l'intensité globale du faisceau en fonction cette fois ci du déplacement de ce miroir. On l'exprime généralement I(x) où cette longueur x est définie comme le retard, c'est-à-dire de la différence des trajets optiques de la partie réfléchie et la partie transmise (Günzler et Gremlich, 2002).

Donc, avant d'atteindre l'échantillon, l'intensité du rayonnement émis par la source subit la transformation S(λ) → I(x) au travers de l'interféromètre. Mathématiquement, la relation entre S(λ) et I(x) est une transformée de Fourier (Günzler et Gremlich, 2002).

### 3.1.4 Interprétation des résultats

Les spectres en absorbance présentés dans ce travail ont été pris dans la région située entre 4000 $cm^{-1}$ et 400 $cm^{-1}$. L'analyse des spectres est faite sur les principales bandes de vibration situées dans la région 1800-600 $cm^{-1}$.

Le spectre infrarouge constitue une investigation au niveau moléculaire. Il apporte sur les complexes étudiés, i.e. polyamine-acide nucléique, des informations sur chacune des espèces présentes et sur les interactions qui existent dans ces complexes. Comme la complexation de ces molécules organiques entraîne des variations structurales observables sur ces spectres infrarouges, il est possible d'apporter des informations sur les groupements fonctionnels impliqués dans les interactions. La figure 3.12 donne un aperçu de la méthodologie générale utilisée dans ce projet de recherche.

La méthode privilégiée consistera en la technique de différence spectrale. Dans cette technique, le spectre de l'acide nucléique (ADN, ARNt) libre est retranché de celui du complexe [acide nucléique-polyamine]. Ainsi, presque tous les déplacements de

bandes de même que les variations d'intensité ainsi que les nouvelles bandes apparues sont automatiquement impliqués dans les interactions (Neault, 1999).

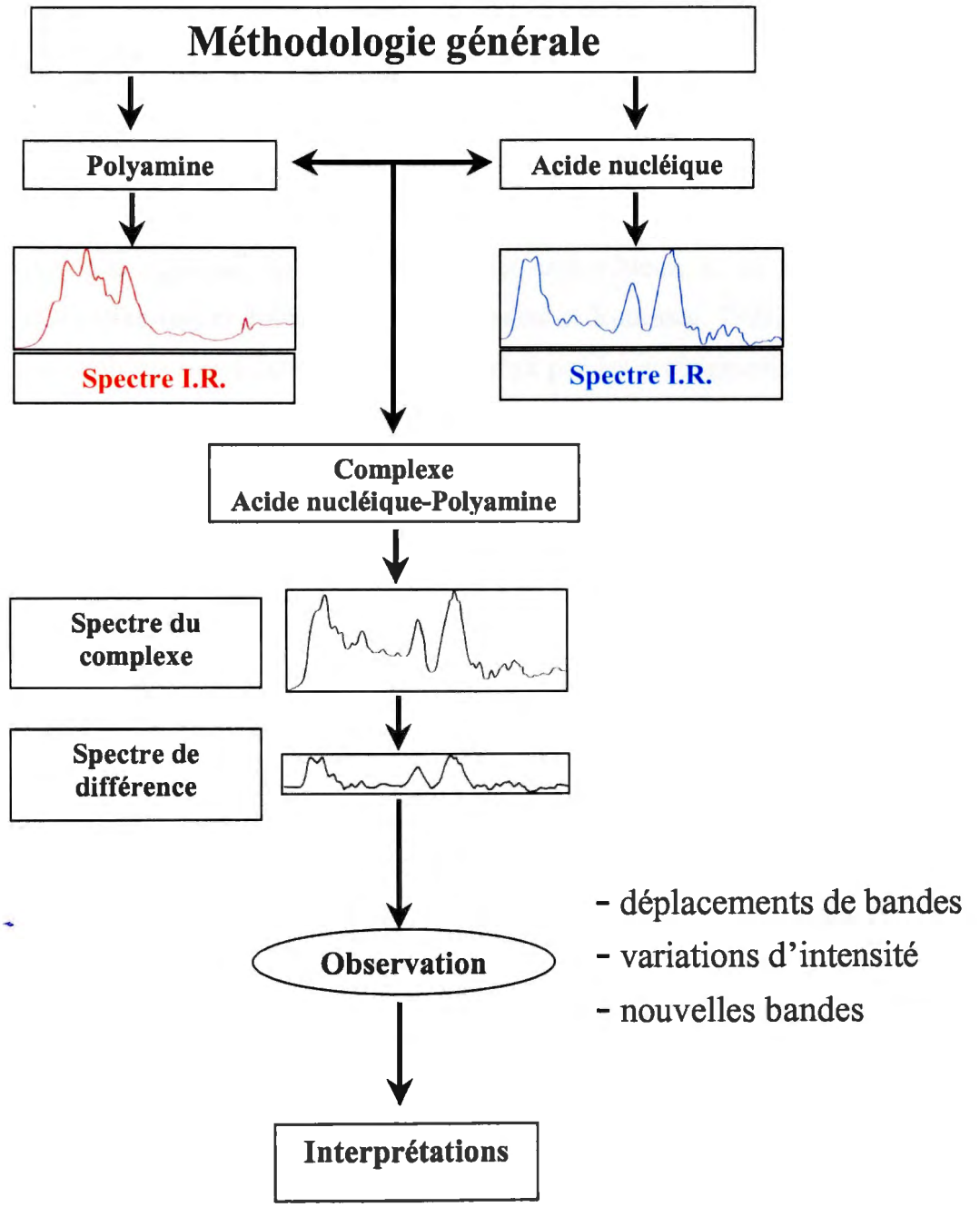


**FIGURE 3.12: Méthodologie générale d'obtention et d'interprétation des spectres des complexes polyamine-acide nucléique.**

## 3.2 Électrophorèse capillaire

### 3.2.1 Principe de base

L'électrophorèse est une méthode qui permet de séparer des molécules ou particules porteuses de charge électrique globale. Cette séparation est basée sur le ratio masse/charge des analytes. Les temps de migration de ces derniers dépendent du champ électrique appliqué, de leur mobilité électrophorétique, et du flux électro-osmotique (EOF) (Shintani et Polonský, 1997; Rouessac et Rouessac, 1998, 2000). Notre méthode tire profit du flux électro-osmotique produit par les groupements silanol, négativement chargés, sur le capillaire à pH > 6,0 (Mitchelson et Cheng, 2001). L'EOF est l'écoulement du tampon de migration qui permet à toutes les espèces, chargées et neutres, de migrer dans la même direction le long d'un capillaire en silice fondue (figure 3.13). L'application de l'électrophorèse capillaire à l'étude des complexes polyamines-acides nuléiques est possible lorsque les charges nettes portées par l'acide nucléique, le polyamine et le complexe ont des valeurs suffisamment différentes.

### 3.2.2 Mobilité éléctrophorétique et flux électro-osmotique

Les particules en suspension dans un liquide, de même que les molécules solvatées, peuvent porter une charge électrique résultante dont la grandeur et le signe dépendent à la fois de leur taille, de leur nature et de celle de l'électrolyte, en particulier de son pH. Cette charge provient de la fixation, à leur surface, d'ions contenus dans l'électrolyte tampon. Sous l'effet de divers phénomène ou actions agissant simultanément, température, viscosité, différence de potentiel, ces particules vont avoir des vitesses de migration d'autant plus grandes qu'elles seront plus petites et porteuse de charges plus importantes (Rouessac et Rouessac, 2000).

Les espèces présentes dans l'échantillon sont soumises à deux effets principaux qui se manifestent aussi bien pour les ions que pour les molécules ou les micelles. Il s'agit

d'une part de leur mobilité électrophorétique propre et d'autre part du flux ou écoulement électro-osmotique (figure 3.14).

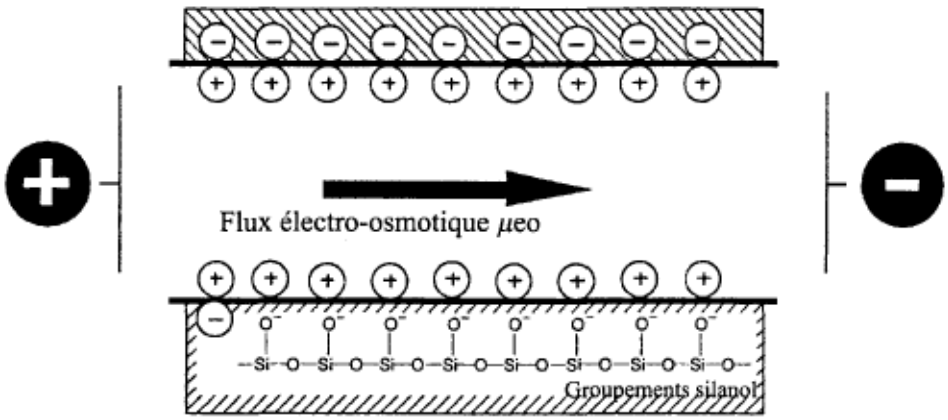


**FIGURE 3.13: Diagramme schématique de la surface du capillaire et la génération de flux électro-osmotique.**
**Tiré de Shintani et Polonský, 1997.**

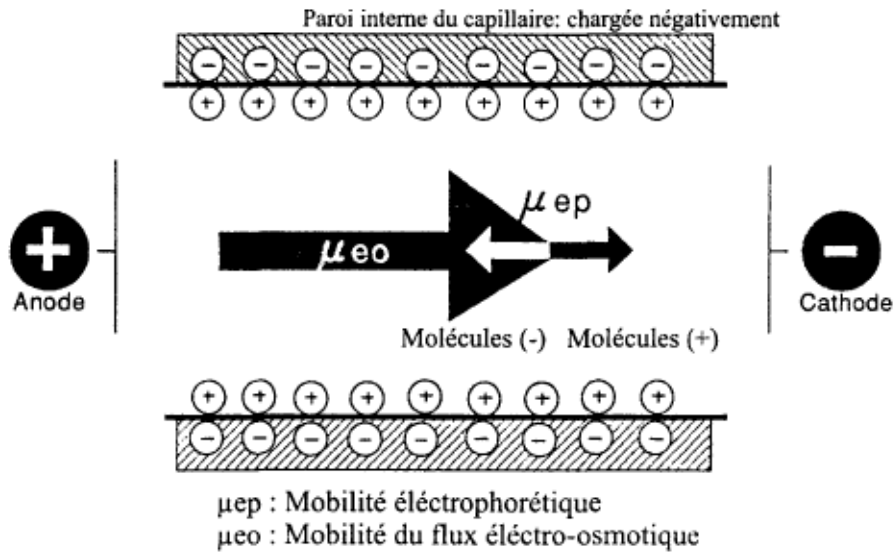


**FIGURE 3.14: Migration de l'analyte en présence de flux électro-osmotique.**
**Tiré de Shintani et Polonský, 1997.**

#### 3.2.2.1 Mobilité éléctrophorétique

Tout composé porteur d'une charge électrique se déplace dans l'électrolyte à une vitesse $v_{EP}$ qui dépend des conditions de l'expérience et de sa mobilité électrophorétique vraie $\mu_{EP}$. Ce paramètre (formule 1) est défini à partir de la vitesse de migration électrophorétique du composé et du champ électrique E.

$$\mu_{EP} = \frac{v_{EP}}{E} = v_{EP}\frac{L}{V} \qquad (1)$$

L désigne la longueur totale du capillaire et V la différence de potentiel (ddp) appliquée à ses extrémités. On peut obtenir $\mu_{EP}$ à partir d'un électrophorégramme, en calculant $v_{EP}$ du composé dans un champ E connu en tenant compte de la vitesse de l'électrolyte (Rouessac et Rouessac, 2000).

#### 3.2.2.2 Flux électro-osmotique

Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte, appelé flux électro-osmotique caractérisé par sa mobilité électro-osmotique, $\mu_{EOS}$. On définit $\mu_{EOS}$ par la formule 2 (les lettres ayant la même signification que pour la formule 1).

$$\mu_{EOS} = \frac{v_{EOS}}{E} = v_{EOS}\frac{L}{V} \qquad (2)$$

Pour calculer $\mu_{EOS}$ on doit déterminer $v_{EOS}$. Celle-ci correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge globale. On y accède à partir du temps de migration $t_{mn}$ que met un marqueur neutre à usage de traceur pour parcourir la distance effective $l$ du capillaire, $v_{EOS} = l/t_{mn}$. On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (ex. acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique).

Le flux électro-osmotique, à l'origine du déplacement de toutes les espèces présentes dans l'échantillon, dépend de la nature de la paroi interne du tube capillaire, très étroit. Cette paroi de silice est tapissée de groupements silanols qui s'ionisent si le pH est supérieur à 3, formant une surface avec des sites anioniques fixes qui crée un potentiel négatif (le « potentiel Zéta ») et, en vis-à-vis, une couche cationiques collée d'ions $H_3O$ (figure 3.13). Mais, plus au cœur de la solution, le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Ces ions sont solvatés et ils entraînent donc les molécules d'eau de l'électrolyte, en se dirigeant vers la cathode. Les anions suivent le mouvement général : ils progressent de manière « contre-électro-osmotique ». Si on ajoute un surfactant, tel un tétra alkylammonium, pour inverser la polarité de la paroi, on provoque l'inversion du flux électro-osmotique. Ainsi, en règle générale, une surface négative provoque un flux élecro-osmotique dirigé vers la cathode et inversement (Rouessac et Rouessac, 2000).

### 3.2.3 Instrumentation

Les différentes composantes de l'électrophorèse capillaire (CE) de type Beckman Pace/MDQ sont montrées dans les figures 3.15 et 3.16. L'instrumentation de base comprend un *générateur de tension* de haut voltage (0 à 60 kV), un *capillaire en silice fondue* de 70 µm de diamètre et de longeur totale L de 57 cm (longueur effective l de 50 cm), deux *réservoirs de tampon* adaptés au capillaire et aux électrodes, un *détecteur* et un *système de refroidissement*. Lors d'une analyse par électrophorèse capillaire, le capillaire est rempli avec le tampon de séparation approprié à pH désiré, et l'échantillon est introduit dans le réservoir d'échantillon. L'introduction de l'échantillon dans le système est ensuite effectuée en plaçant l'entrée du capillaire dans le réservoir de l'échantillon et en appliquant une pression ou un courant électrique pendant quelques secondes. Le capillaire est ensuite replacé dans le réservoir d'introduction (tampon) avant d'appliquer le courant électrique, lequel induit la migration de l'échantillon dans le capillaire. Le mouvement du tampon contenu dans le capillaire est appelé flux électro-osmotique. Les solutés migrant à différentes vitesses dans le capillaire sont détectés par un détecteur UV à barrette de diodes, lequel envoie le signal à l'ordinateur. Les données

traitées sont présentées sous la forme d'un électrophérogramme où les différents pics représentent les composés séparés à des temps de migration différents; le temps 0 correspondant au moment où le courant électrique est appliqué (Landers, 1994).

**FIGURE 3.15: Électrophorèse capillaire modèle Beckman Pace/MDQ.**

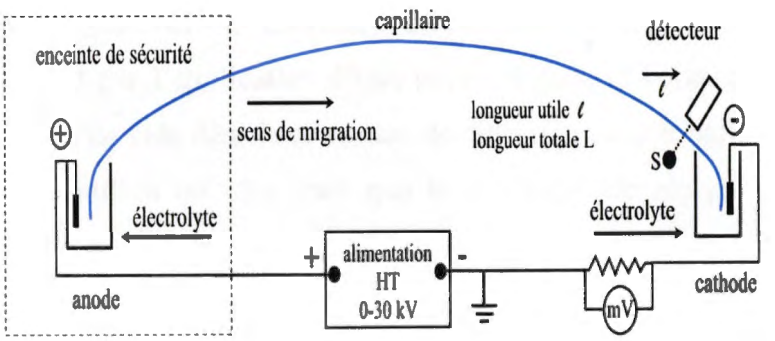


**FIGURE 3.16: Schéma d'une installation d'électrophorèse capillaire. Tiré de Rouessac et Rouessac, 2000.**

#### 3.2.3.1 Le capillaire

Le capillaire et son conditionnement représentent la clé de succès dans l'exécution d'une analyse CE, de façon efficace et reproductible. Donc, le traitement du capillaire avant, pendant et durant les séparations électrophorétiques est crucial. Ces capillaires peuvent être composés de différents matériaux et sont commercialisés dans plusieurs compagnies (Landers, 1994). Dans le laboratoire, le capillaire en silice fondue est à la base du succès dans les expériences d'électrophorèse capillaire. Les groupements silanols de la paroi interne du capillaire se dissocient et forment une couche de charges négatives, à l'origine de l'écoulement electro-osmotique.

#### 3.2.3.2 Mode d'injection de l'échantillon

Comme les diamètres des capillaires commercialisées sont généralement de l'ordre du µm et afin d'éviter le surchargement du capillaire, le volume requis pour une bonne séparation électrophorétique est de l'ordre de nanolitre (Landers, 1994). L'injection de l'échantillon dans le capillaire peut s'effectuer d'une manière hydrostatique ou par électromigration. Lors d'une introduction hydrostatique, l'extrémité "entrer" du capillaire est immergée dans le contenant d'échantillon dont l'introduction dans le capillaire se fait soit par l'application d'une pression dans le contenant d'échantillon, soit par la création d'un vide dans le contenant de réception ou soit par gravité lorsque le contenant de l'échantillon est plus haut que le contenant de réception. Le principal avantage de cette technique est que la concentration des molécules dans le capillaire est représentative de l'échantillon analysé (Landers, 1994).

Lors d'une introduction par électromigration, l'extrémité "injection" du capillaire est immergée dans le contenant d'échantillon. Ensuite, une tension, un courant ou une puissance électrique est appliqué pendant un temps donné, entraînant l'introduction de l'échantillon dans le capillaire. La concentration des molécules dans le capillaire dépend de leur mobilité électrophorétique. Les solutés introduits dans le capillaire ne sont donc pas toujours représentatifs de l'échantillon de départ. Cette technique est principalement

utilisée lorsque l'introduction hydrodynamique ne peut être appliquée en raison de la présence d'un gel ou d'une substance visqueuse sur la paroi interne du capillaire (Landers, 1994).

#### 3.2.3.3 Mode de détection

Les systèmes de détection employés sur le capillaire sont issus des technologies développées en chromatographie liquide à haute performance. Les détecteurs les plus utilisés en électrophorèse capillaire sont ceux utilisant les propriétés spécifiques des molécules comme l'absorption dans l'ultraviolet, la fluorescence, la spectrométrie de masse, l'électrochimie, la radiométrie et la spectroscopie Raman. Le système de détection le plus simple et le plus utilisé en électrophorèse capillaire est l'absorption en ultraviolet. La raison pour laquelle la détection en ultraviolet est la plus utilisée est que la majorité des composants a analyser absorbent dans la région UV (Landers, 1994). La limite de détection de l'absorption en ultraviolet est dans l'ordre de $10^{-6}$ M, et elle est généralement plus élevée que celle des autres détecteurs de propriétés spécifiques (Guijt-van Duijn *et al.*, 2000).

### 3.2.4 Calcul des paramètres d'affinité

Les paramètres décrivant des interactions entre les molécules biologiques sont essentiels pour comprendre comment fonctionnent les systèmes biologiques. Ces paramètres fondamentaux peuvent être estimés par l'utilisation de la technique d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE). Plusieurs techniques d'ACE ont été développées pour étudier l'interaction biomoléculaire et pour pouvoir distinguer entre les complexes de faibles et fortes affinités. Dans la technique d'ACE, les paramètres d'interaction sont estimés à partir du changement du temps de migration (Tanaka and Terabe, 2002; Guijt-van Duijn *et al.*, 2000 ; Heegaard *et al.*, 1998 ; Shimura and Kasai, 1997).

#### 3.2.4.1 Analyse de Scatchard (cas d'un seul site de liaison)

Dans des études d'interactions biomoléculaires, les constantes de liaison et de dissociation sont des paramètres importants. L'analyse de Scatchard est une manière traditionnelle de linéariser des données de liaison. La constante de liaison à l'équilibre peut être déterminée à partir des données de Scatchard (Guijt-van Duijn *et al.*, 2000 ; Jack, 1995).

$$K_b = \frac{[LM]}{[L][M]} \tag{1}$$

où [LM] représente la concentration du complexe ligand-récepteur tandis que [L] et [M] représentent les concentrations de ligand et de récepteur libres.

Pour une certaine valeur des concentrations de L et de M, la population moléculaire en solution va comprendre simultanément L, M et le complexe LM. Pour cette population on peut définir une fraction moyenne $R_f$ de molécules de L liées comme le rapport de la concentration du complexe LM à la concentration totale de M, soit M + LM.

$$R_f = \frac{[LM]}{([M]+[LM])} \tag{2}$$

En remplaçant [LM] par sa valeur tirée de (1) on obtient immédiatement :

$$R_f = \frac{K_b[L]}{(1+K_b[L])} \tag{3}$$

La relation (3) peut aussi s'écrire d'une autre manière.

$$\frac{R_f}{[L]} = K_b - K_b R_f \tag{4}$$

En remplaçant L par polyamine on obtient l'équation de Scatchard suivante :

$$\frac{R_f}{[\text{Polyamine}]} = K_b - K_b R_f \tag{5}$$

Pour une moyenne de n sites équivalent occupés sur le récepteur, on obtient (6) l'équation de Scatchard. En posant $R_f$/[polyamine] en fonction de $R_f$, on obtient une droite d'ordonnée à l'origine n$K_b$ et de pente $-K_b$ (figure 3.17). Cette équation peut donner lieu à deux constantes de liaisons qui reflètent l'existance de deux sites de liaison ayant une affinité differente pour la polyamine (Ahmed Ouameur et *al.*, 2005).

$$\frac{R_f}{[\text{Polyamine}]} = nK_b - K_b R_f \tag{6}$$

Dans l'ACE, $R_f$ peut être déterminé à partir du changement dans le temps de migration de l'acide nucléique en présence de différentes concentrations de polyamine (Ahmed Ouameur et *al.*, 2005).

$$R_f = \frac{m - m_o}{m_s - m_o} \tag{7}$$

où $m$ est le temps de migration de l'acide nucléique après l'addition de différentes concentrations de polyamine tandis que $m_o$ et $m_s$ correspondent aux temps de migration de l'acide nucléique libre et du complexe polyamine-acide nucléique après saturation, respectivement.

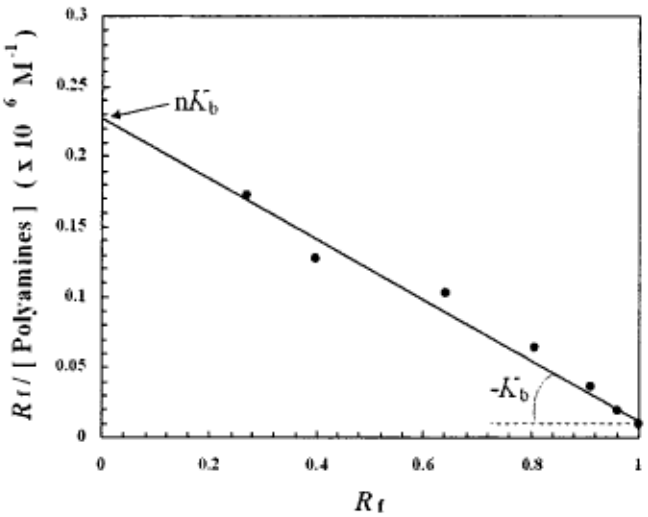


**FIGURE 3.17: Diagramme de Scatchard de l'équation (6).**

### 3.2.4.2 Le paramètre de coopérativité $n_H$

Le paramètre de coopérativité, $n_H$, mesure le degré d'interaction entre les molécules de polyamine en présence de l'acide nucléique. On parle de coopérativité positive ($n_H$ >1) ou negative ($n_H$ <1) lorsque la liaison de la premiere molécule de polyamine augmente ou diminue l'affinité de liaison de la deuxième molécule, respectivement. Lorsqu'aucune interaction n'est observée ($n_H$ =1), la coopérativité est nulle. Le paramètre $n_H$, aussi appelé coefficient de Hill, peut être obtenu à partir du diagramme de Hill de l'équation de coopérativité de liaison (8) (Jack, 1995).

$$\log\frac{R_f}{1-R_f} = n_H \log[\text{Polyamine}] + \log K_b \qquad (8)$$

En traçant $\log\{R_f/(1-R_f)\}$ en fonction de log[Polyamine], on aura une droite de pente $n_H$ et d'ordonnée à l'origine $\log K_b$ (figure 3.18).

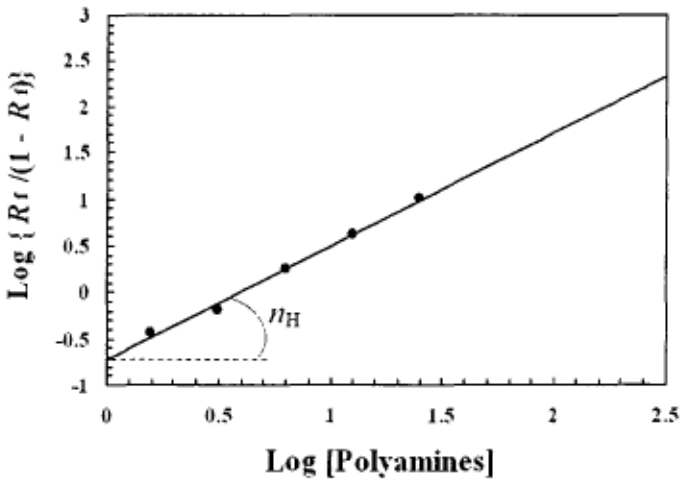


**FIGURE 3.18: Diagramme de Hill.**

# CHAPITRE IV

## STRUCTURAL ANALYSIS OF DNA INTERACTIONS WITH BIOGENIC POLYAMINES AND COBALT(III)-HEXAMINE STUDIED BY FOURIER TRANSFORM INFRARED AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2004 dans le journal *Journal of Biological Chemistry* : Ahmed Ouameur, A. and H. A. Tajmir-Riahi. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)-hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary clcctrophoresis, vol. 279, pp. 42041-42054.

## 4.1 Résumé

Les polyamines sont des molécules naturelles de faible poids moléculaire qui remplissent de nombreuses fonctions dans la cellule vivante. Les plus importantes sont la putrescine, la spermidine et la spermine. Ces molécules sont essentielles pour le bon fonctionnement des acides nucléiques (ADN, ARN), cibles primaires des polyamines. Il a été démontré que les polyamines organiques ainsi que le cobalt(III)hexamine sont capables de condenser et d'induire un changement dans la conformation des acides nucléiques. Jusqu'ici, la nature des interactions entre les polyamines et l'ADN à l'échelle moléculaire n'était pas clairement élucidée et était trés controversée. Nous avons étudié les effets des polyamines organiques et du cobalt(III)hexamine sur la structure de l'ADN de thymus de veau par la spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier, l'électrophorèse capillaire et le dichroïsme circulaire. À des concentrations plus faibles en polycations, la putrescine est liée préférentiellement par la petite et la grande gouttières de la double helice d'ADN, tandis que la spermidine, la spermine et le cobalt(III)hexamine se lient sur la grande gouttière. À de fortes concentrations en polycations, l'interaction entre la putrescine et le sucre est faible. La spermidine se lie plus fortement sur la petite et la grande gouttières, tandis que la spermine et le cobalt(III)hexamine se lient préférentiellement sur la grande gouttière. On a également observé des attractions électrostatiques entre les groupes amines des polycations et les groupements phosphates de l'ADN. En présence des polyamines organiques, la conformation de l'ADN est stabilisée sous la forme B, tandis que le cobalt(III)hexamine provoque la condensation de l'ADN et une transition partielle de sa conformation de B vers A. Les constantes de liaison calculées pour les polyamines organiques sont $K_{Spm}$ = 2.3 x $10^5$ $M^{-1}$, $K_{Spd}$ =1.4 x $10^5$ $M^{-1}$, et $K_{Put}$=1.02 x $10^5$ $M^{-1}$. On a détecté deux affinités pour le cobalt(III)hexamine; $K_1$= 1.8 x $10^5$ $M^{-1}$ et $K_2$= 9.2 x $10^4$ $M^{-1}$. L'analyse de Hill indique que les complexes polyamines organiques-ADN ont une coopérativité positive, tandis que le complexe cobalt(III)hexamine-ADN a une coopérativité negative.

# Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis

**Amin Ahmed Ouameur and Heidar-Ali Tajmir-Riahi***

Department of Chemistry-Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7 Canada

**Keywords :** DNA; polyamines; binding site; binding constant; condensation; helix stability; FTIR spectroscopy; affinity capillary electrophoresis; circular dichroïsm spectroscopy.

**Abbreviations :** Spm, spermine; Spd, spermidine; Put, putrescine; Co(III), cobalt(III)hexamine; CE, capillary electrophoresis; ACE, affinity capillary electrophoresis; FTIR, Fourier transform infrared; CD, circular dichroïsm; ctDNA, calf thymus DNA; A, adenine; G, guanine; C, cytosine; T, thymine; r, polyamine/DNA(P) molar ratio.

**Running title:** Polyamine–DNA interaction.

***Corresponding Author:** Tel: (819) 376-5052 (ext. 3310); Fax: (819) 376-5084; Email: tajmirri@uqtr.ca

## 4.2 Summary

Biogenic polyamines, such as putrescine, spermidine and spermine are small organic polycations involved in numerous diverse biological processes. These compounds play an important role in nucleic acid function due to their bindings to DNA and RNA. It has been shown that biogenic polyamines cause DNA condensation and aggregation similar to that of inorganic cobalt(III)hexamine cation with ability to induce DNA conformational changes. However, the nature of the polyamine-DNA binding at molecular level is not clearly established and being the subject of much controversy. In the present study the effects of spermine, spermidine, putrescine and cobalt(III)hexamine on the solution structure of calf-thymus DNA were investigated using affinity capillary electrophoresis, Fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopic methods. At low polycation concentrations, putrescine binds preferentially through the minor and major grooves of dsDNA, while spermine, spermidine and cobalt(III)hexamine bind to the major groove. At high polycation concentrations, putrescine interaction with the bases is weak, whereas strong base binding occurred for spermidine in the major and minor grooves of DNA duplex. However, major groove binding is preferred by spermine and cobalt(III)hexamine cations. Electrostatic attractions between polycation and the backbone phosphate group were also observed. No major alterations of B-DNA were observed for biogenic polyamines, while cobalt(III)hexamine induced a partial B→A transition. DNA condensation was also observed for cobalt(III)hexamine cation, whereas organic polyamines induced duplex stabilization. The binding constants calculated for biogenic polyamines are $K_{Spm} = 2.3 \times 10^5\ M^{-1}$, $K_{Spd} = 1.4 \times 10^5\ M^{-1}$, and $K_{Put} = 1.02 \times 10^5\ M^{-1}$. Two binding constants have been found for cobalt(III)hexamine with $K_1 = 1.8 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_2 = 9.2 \times 10^4\ M^{-1}$. The Hill coefficients indicate a positive cooperativity binding for biogenic polyamines and a negative cooperativity for cobalt(III)hexamine.

## 4.3 Introduction

The biogenic polyamines putrescine [$NH_2(CH_2)_4NH_2$], spermidine [$NH_2(CH_2)_4NH\text{-}(CH_2)_3NH_2$] and spermine [$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$] (Fig. 4.1) are the most prevalent polyamines in mammalian cells. They are small aliphatic polycations involved in numerous diverse biological processes, such as the ability to modulate gene expression and enzyme activities, activation of DNA synthesis, cell proliferation and differentiation, etc. (1-8). Other polyamines' functions have been related to DNA protection from external agents (9, 10) and against radiation damage (11, 12). In general, spermidine and spermine are present in millimolar concentrations *in vivo*, whereas putrescine levels are slightly lower (13-15). However, the most important characteristic of polyamines within the cells is to bind nucleic acids and DNA in particular (1, 6).

Polyamines have also the ability to induce DNA conformational transitions. Their bindings have been reported to promote the conversion of the right-handed B-DNA to a left-handed Z-DNA (16-19) or to an alternative form of right-handed helix, A-DNA (20-22). However, polyamines can also bind B-DNA inducing no major biopolymer conformational changes (23-25).

Another consequence of polyamine binding is the condensation of DNA occurring with both naked DNA (26-30) and chromatin (31, 32). Immunocytochemical studies of spermidine and spermine have shown that these polyamines are associated with highly compacted mitotic chromosomes (33, 34), inducing more stabilizing than regulating effect on the chromatin structure during the cell cycle (35). On the other hand, it has been shown that cobalt(III)hexamine cation is five times more efficient as a condensing agent than spermidine, having the same positive charges (36). These studies indicate that polyamine-induced DNA condensation is important to the cellular functions *in vivo*. However, the question of how they bind to DNA has not been clearly established.

One of the early discoveries about polyamine-DNA interactions was the observation that polycation could stabilize double-stranded DNA (37). Putrescine, spermidine and spermine can increase the melting temperature ($T_m$) of DNA in a concentration-dependent manner by as much as 40 °C in low salt buffer solution, compared with that in the absence of polyamines (37, 38). Investigating on the mechanisms of this effect provides support for both, electrostatic interaction between the polyamine amino protonated groups and the negatively charged backbone $PO_2^-$ group (38-40), as well as a direct interaction with DNA bases (21, 41).

Both experimental and theoretical methods have been used to determine the binding positions of polyamines on B-form DNA. These studies have concentrated mainly on spermine cation, while a few structural details about the binding of the other polyamines to DNA are known. Rather contradictory views concerning the binding sites of spermine and other polyamines have emerged. X-ray diffraction from crystals of B-form dodecamer revealed a spermine bound into the major groove of DNA duplex (42). In photoaffinity cleavage experiments (43), the binding position of spermine in solution appeared to be in the minor groove of B-DNA. From the NMR study of polyamine with DNA dodecamer, it has been proposed that the spermine cation appeared to be mobile (44). This study suggested a rapid diffusion of the spermine along the DNA duplex with specific tight binding sites or delocalised binding with no discrete sites. Feuerstein *et al.* (45) found that spermine prefers the major groove of B-DNA followed by minor groove interaction with phosphate binding being the least favorable. Different theoretical studies (46, 47) agreed with this hypothesis of spermine cation interacting with the dsDNA bases across the major groove. However, recent molecular mechanics simulation studies (48-50) found that spermine occupy more varied sites, including binding along the backbone and bridging both the major and minor grooves. On the other hand, recent Raman study (24) found that putrescine and spermidine prefer minor groove of B-DNA whereas spermine binds to the major groove.

Thus, the binding positions of spermine and other polyamine on B-DNA have not been firmly resolved and it is probable that both the base-sequence and the environment

have an important influence on polycation binding. In the present work, we have studied the interactions between calf-thymus DNA and biogenic polyamines as well as cobalt(III)hexamine cation using affinity capillary electrophoresis, Fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopic methods. Evidence for DNA condensation and helix stabilization is provided. Furthermore, the influence of polyamine charge and concentration on DNA structural changes has been discussed and the presence of specific base-polyamine bindings is reported.

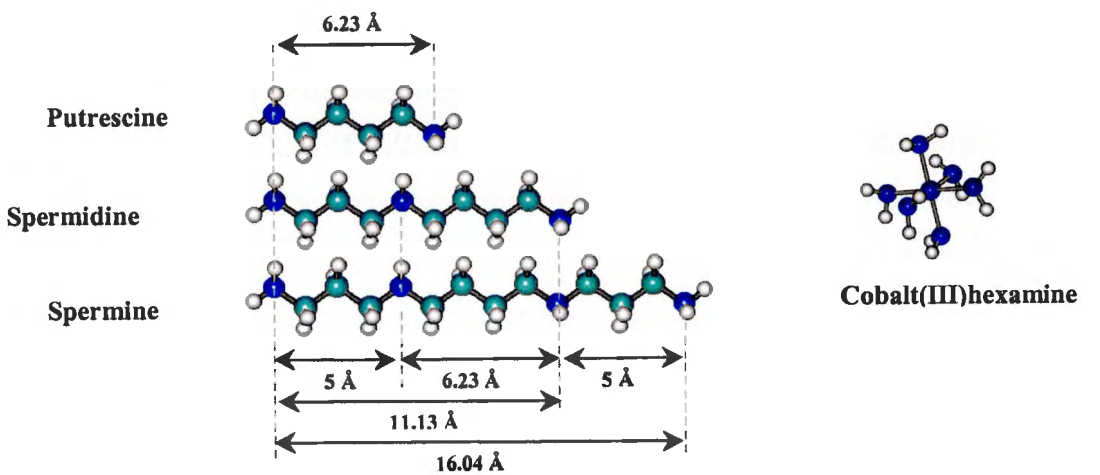


**FIGURE 4.1: Chemical structures of spermine, spermidine, putrescine and cobalt(III)hexamine. C, N and H atoms are shown in cyan, blue and white colours, respectively.**

## 4.4 Experimental procedures

### 4.4.1 Materials

Polyamines spermine, spermidine, putrescine and cobalt(III)hexamine were purchased from Sigma Chemical Company. Highly polymerised type I calf-thymus DNA sodium salt (7% Na content) was purchased from Sigma Chemical Co., and deproteinated by the addition of $CHCl_3$ and isoamyl alcohol in NaCl solution. To check the protein content of DNA solution, the absorbance at 260 and 280 nm was recorded.

The $A_{260}$ / $A_{280}$ ratio was 1.85, showing that the DNA was sufficiently free from protein (51). Other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

### 4.4.2 Preparation of stock solutions

Sodium-DNA (8.3 mg/ml) was dissolved in 50 mM NaCl (pH 7.20) at 5 °C for 24 h with occasional stirring to ensure the formation of a homogeneous solution. The final concentration of the stock calf-thymus DNA solution was determined spectrophotometrically at 260 nm using molar extinction coefficient $\varepsilon_{260}$ = 6600 $cm^{-1}$ $M^{-1}$ (expressed as molarity of phosphate groups) (52, 53). The UV absorbance at 260 nm of a diluted solution (1/250) of calf-thymus DNA used in our experiments was 0.661 (path length was 1 cm) and the final concentration of the stock DNA solution was 25 mM in DNA phosphate. The average length of the DNA molecules, estimated by gel electrophoresis was 9000 base pairs (molecular weight ~ 6 x $10^6$ Da). The appropriate amount of polyamines (0.3 to 25 mM) was prepared in distilled water and added dropwise to DNA solution, in order to attain the desired polyamine/DNA(P) molar ratios (r) of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4, 1/2, and 1 at a final DNA concentration of 12.5 mM (4.15 mg/ml) for infrared measurements. For capillary electrophoresis, the polyamine/DNA(P) ratios were 1/800, 1/400, 1/200, 1/100, 1/50, 1/25, 1/12.5 and 1/6.25 with a final DNA concentration of 1.25 mM. The pH of the solutions was adjusted at 7.0 ± 0.2 with pH meter ORION model 210A, using NaOH solution.

### 4.4.3 FTIR spectra

Infrared spectra were recorded with a FTIR spectrometer (Impact 420 model) equipped with DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. Spectra were recorded after 2 h incubation of polyamine with the polynucleotide solution and measured in triplicate (three individual samples of the same polynucleotide and polyamine concentrations). Interferograms were accumulated over the spectral range 400-4000 $cm^{-1}$ with a nominal resolution of 2 $cm^{-1}$ and a minimum of

100 scans. The water subtraction was carried out using 0.1 M NaCl solution at pH = 7.0 ± 0.2 as a reference (54). A good water subtraction is considered to be achieved if there is a flat baseline around 2200 $cm^{-1}$, where the water combination mode is located. This method yields a rough estimate of the subtraction scaling factor, but it removes the spectral features of water in a satisfactory way (54). The infrared spectra of polyamine-DNA complexes with molar ratios higher than 1/4 for spermine, spermidine and cobalt-hexamine and higher than 1 for putrescine could not be recorded as homogenous solution, due to DNA precipitation and solid gel formation.

The difference spectra [(DNA solution + polyamine) - (DNA solution)] were obtained using a sharp DNA band at 968 $cm^{-1}$ as an internal reference. This band, which is due to deoxyribose C-C and C-O stretching vibrations, exhibits no spectral changes (shifting or intensity variation) upon polyamine-DNA complexation and cancelled out upon spectral subtraction (55). The spectra presented here were smoothed with a Savitzky-Golay procedure (54).

The plots of the relative intensity (R) of several peaks of DNA in-plane vibrations related to A-T, G-C base pairs and the $PO_2^-$ stretching vibrations such as 1717 (guanine), 1663 (thymine), 1609 (adenine), 1492 (cytosine) and 1222 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$ groups), versus the polyamine concentrations were obtained after peak normalization using:

$$R_i = \frac{I_i}{I_{968}} \qquad [1]$$

where $I_i$ is the intensity of absorption peak for pure DNA and DNA in the complex with $i$ concentration of polyamine, and $I_{968}$ is the intensity of the 968 $cm^{-1}$ peak (internal reference).

### 4.4.4 Circular dichroism measurements

Spectra were recorded with a Jasco J-720 spectropolarimeter. For measurements in the Near-UV region, a quartz cell with a path length of 0.1 cm was used. Five scans were accumulated at a scan speed of 50 nm per minute, with data being collected at every nm from 200 to 320 nm. Sample temperature was maintained at 25°C using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvettes. The concentration of the calf-thymus DNA solutions was kept at 1.25 mM (0.4 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.0. CD spectra of DNA-cobalt(III)hexamine complexes were recorded with $Co(NH_3)_6^{3+}$/DNA(P) molar ratios rang of 0, 1/15, 1/10, 1/8, 1/6 and 1/4. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to the Molar Ellipticity [$\theta$] was performed with the Jasco Standard Analysis software.

### 4.4.5 Capillary electrophoresis (CE)

A PACE System MDQ (Beckman) with photodiode array detector was used to study polyamine-DNA interaction. An uncoated fused silica capillary of 75 μm i.d. (total length of 57 cm) and effective length of 50 cm (to the detector) was used. The capillary was conditioned each day by rinsing with 1 N sodium hydroxide for 30 min, followed by a 15 min wash with 0.1 N sodium hydroxide. Then it was rinsed with running buffer for 30 min at high pressure (50 psi), followed by a baseline run for 20 min at the voltage used for the experiments (25 kV). Between runs, the capillary was rinsed with NaOH 1N for 2 min, followed by rinsing with running buffer for 3 min at high pressure. The capillary was flushed with distilled deionized water for 30 min at the end for each day and filled with deionized water overnight. Samples were injected using a voltage injection at 10 kV for 5 s. Electrophoresis was carried out at a voltage of 25 kV for 10 min using normal polarity. All runs were carried out at 25 °C. High voltage gave fast separation and low current (the current in the capillary was typically 30 $\mu$A) gave less Joule heating, allowing the complex to stay intact during electrophoresis. The capillary inlet and outlet vials were replenished after every five runs. The polyamine binding experiments were performed in a sample buffer containing 20 mM Tris-HCl pH

7.0 ± 0.2, using constant concentration of calf-thymus DNA (1.25 mM) and variable concentrations of polyamines. The stock solutions of polyamines (2.5 mM) and DNA (2.5 mM) were prepared in the sample buffer. The solutions were mixed to attain polyamine/DNA(P) molar ratios of 1/800 to 1/6.25 in the presence of 1.25 mM of DNA. Each sample was allowed to equilibrate for 30 min and tested with two separate runs for the same stock solution. The electropherograms were monitored at 260 nm and were collected and analysed with the Beckman PACE Windows controller software.

#### 4.4.5.1 Data analysis

Affinity capillary electrophoresis (ACE) was used to detect a shift in mobility when polyamine binds to DNA. The binding constants for the polyamine-DNA complexes can be determined by Scatchard analysis using mobility shift of DNA complexes (56, 57). The extent of saturation ($R_f$) of the DNA was determined from the changes in the migration time of DNA in the presence of various concentrations of polyamine using the following equation:

$$R_f = \frac{m - m_0}{m_s - m_0} \qquad [2]$$

where $m$ is the migration time of DNA measured for any added polyamine concentration, while $m_0$ and $m_s$ correspond to the migration time of pure and polyamine-saturated DNA, respectively.

The binding constant $K_b$, given by

$$K_b = \frac{[\text{polyamine - DNA adduct}]}{[\text{DNA}][\text{polyamine}]} \qquad [3]$$

was determined by fitting the experimental values of $R_f$ and polyamine concentration to the equation :

$$R_f = \frac{K_b[\text{polyamine}]}{1 + K_b[\text{polyamine}]} \qquad [4]$$

Rearrangement of this gives a convenient form for Scatchard analysis:

$$\frac{R_f}{[\text{polyamine}]} = K_b - K_b R_f \qquad [5]$$

Using affinity capillary electrophoresis (ACE) method, many DNA–protein and metal-DNA complexes have been successfully identified (57-61). Since the charge-to-mass ratio of DNA-ligand complex is generally different from that of the unbound DNA and ligand separately, the complex migrates separately from the free ligand (59). ACE provides both qualitative and quantitative information on molecular interaction. Its scope includes the detection of complex formation, the identification of an active component for binding in a multi-component mixture, the identification of structural requirements for recognition, the analysis of the equilibrium constant and stoichiometry for binding reactions and concentration measurement, based on immunochemical recognition (62).

The cooperativity of the binding can be analyzed using a Hill plot. Assuming one binding site for polyamine (equation 5), the equation below (Hill equation) can be established:

$$\log\frac{R_f}{1 - R_f} = \text{n}\log[\text{polyamine}] + \log K_d \qquad [6]$$

where, n (Hill coefficient) measures the degree of cooperativity and $K_d$ is the dissociation constant. The linear plot of $\log\left(R_f / 1 - R_f\right)$ versus log[polyamine] has a slope of n and an intercept on the log[polyamine] axis of $\log K_d / n$ (63). The quantity n increases with the degree of cooperativity of a reaction and thereby provides a convenient and simplistic characterization of a ligand-binding reaction (63).

## 4.5 Results

### 4.5.1 Polyamines-DNA complexes studied by FTIR spectroscopy

The FTIR spectral features of DNA-polyamine complexes between 1800 and 600 $cm^{-1}$ are presented in Fig. 4.2 and 4.3. In order to avoid precipitation, different polycation concentrations were selected for the biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine (26). Molar ratios of 1/80 to 1/4 were studied for spermine (+4), spermidine (+3) and cobalt(III)hexamine (+3) due to their high positive charges. However, molar ratios of 1/80 to 1 were used for putrescine (+2) with no precipitation under our experimental conditions. These ranges are physiologically justified, since millimolar concentrations of polyamines have been found in the nucleous of eucaryotic cells (1, 6). The relevant wavenumbers and assignment of the main infrared bands of the calf thymus DNA are listed in Table 4.1.

At low polyamine concentrations (r=1/80), these four polyamines bind preferably to DNA bases. Evidence for this comes from the changes in the intensity and shifting of the absorption bands in the region 1800-1550 $cm^{-1}$, due to the in-plane DNA vibrational frequencies (54, 55, 64-66). Major increase in the intensity was observed mainly for guanine band at 1717 $cm^{-1}$ (30-15 %), thymine band at 1663 $cm^{-1}$ (40-20 %) and adenine band at 1609 $cm^{-1}$ (40-15 %), (Fig. 4.4). These intensity changes observed in the region 1800-1500 $cm^{-1}$ were associated also with bands shift upon polycation interaction. In the spectra of Spm-DNA complexes, the bands at 1717 and 1609 $cm^{-1}$ shifted downwards by

4 $cm^{-1}$, while the band at 1663 $cm^{-1}$ shifted by 1 $cm^{-1}$ (Fig. 4.2A). Similarly, the bands at 1663 and 1609 $cm^{-1}$ were shifted by 1-2 $cm^{-1}$ in the spectra of Spd-, Put-, and Co(III)-DNA adducts (Fig. 4.2B, Fig. 4.3). Similar trend was observed for the DNA band at 1717 $cm^{-1}$, in-plane stretching vibrations of double bond of guanine (C7=N) located at the major groove (64, 66). This band shifted downwards by 4 $cm^{-1}$ in the spectra of Spd-, and Co(III)-DNA complexes, while in the Put-DNA adducts it was displaced by 2 $cm^{-1}$ (Fig. 4.2B, Fig. 4.3). These spectral changes are supported by the difference spectra presented in Fig. 4.2 and 4.3. The positive features observed at 1715, 1665 and 1600 $cm^{-1}$ in the difference spectra of Spm-DNA adduct (Fig. 4.2A) are related to an increase in the intensity of the guanine, thymine and adenine bands upon polycation interaction as a result of cation bindings to the guanine-N7, thymine-O2 and adenine-N7 reactive sites. With respect to both intensity increase and shifting of the bands, we suggest that spermine interacts mainly with the guanine-N7 and adenine-N7 reactive sites located in the major groove of dsDNA. In the difference spectrum of spermidine (Fig. 4.2B), the positive features at 1705 and 1666 $cm^{-1}$ are due to cation bindings to the guanine-N7 and the thymine-O2 reactive sites. With respect to the shifting of the guanine band at 1717 $cm^{-1}$ (4 $cm^{-1}$), spermidine interaction is mainly with the guanine-N7 site followed by a weak interaction with A-T base pair.

In the spectra of Put-DNA complexes, the bands at 1717 (G), 1663 (T) and 1609 $cm^{-1}$ (A) were shifted downward by 2 $cm^{-1}$ (Fig. 4.3A). These spectral changes together with the presence of positive features at 1710, 1662 and 1607 $cm^{-1}$ in the difference spectra of Put-DNA complexes have been assigned to putrescine interactions with the guanine-N7, thymine-O2 and adenine-N7 reactive sites. In the case of Co(III)-DNA complexes, the difference spectra showed three positive bands at 1710, 1663 and 1602 $cm^{-1}$ (Fig. 4.3B). Since a major displacement was observed for the band at 1717 $cm^{-1}$ (4 $cm^{-1}$) followed by 2 $cm^{-1}$ for the band at 1609 $cm^{-1}$ (A), we conclude that the cobalt(III)hexamine binds strongly to the guanine-N7 atom and to a lesser extent with the adenine-N7 reactive site. In addition, the shifting of the band at 1578 $cm^{-1}$, which involves in-plane C8=N7 stretching vibration of the purine ring (mainly guanine

residues) (64, 65) is indicative of a major cobalt(III)hexamine complexation with the guanine-N7 atom.

Other DNA vibrational frequencies in the region 1550-1250 $cm^{-1}$ showed minor spectral changes upon polyamine complexation. The band at 1492 $cm^{-1}$ which is related largely to the cytosine residues (65, 66) exhibited no major shifting (1 $cm^{-1}$) and its relative intensity did not change significantly at different polycation concentrations (Fig. 4.2, 4.3 and 4.4). Thus, the possibility of an interaction between cytosine and the polyamines cannot be included. It is worth mentioning that the weak positive features centered at 1482 $cm^{-1}$ in the difference spectra of Spm- and Spd-DNA complexes originating from polyamine methylene scissoring vibrations (67, 68) are not attributable to DNA vibrations (Fig. 4.2). Therefore, our results support the existence of hydrophobic interactions between the polyamine cations and DNA duplex.

To establish a possible interaction of polycation with the backbone phosphate group, the infrared spectra of dsDNA in the region 1250-1000 $cm^{-1}$ were examined. The two strong absorption bands located at 1222 and 1088 $cm^{-1}$ are assigned mainly to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the $PO_2^-$ groups, respectively (64-66, 69, 70). An increase (10-15 %) in the relative intensity of the $\nu_{as}PO_2^-$ absorption band (1222 $cm^{-1}$) was observed with the shift of this vibration to 1225 $cm^{-1}$ in all four polyamine-DNA complexes (Fig. 4.2 and 4.3, r=1/80). The difference spectra of the polyamines provide clear evidence for an interaction between the $PO_2^-$ groups of DNA and the polyamines, as deduced from the positive features appearing at 1230 and 1080 $cm^{-1}$ (spermine), 1240 and 1099 $cm^{-1}$ (spermidine), 1225 and 1088 $cm^{-1}$ (putrescine) and 1243 and 1098 $cm^{-1}$ (cobalt-hexamine) (Fig. 4.2 and 4.3, r=1/80). These spectral changes reflect the interaction of polyamines with the oxygen atoms of the backbone phosphate groups.

At r = 1/40, a minor interaction of cobalt(III)hexamine with A-T base pair was observed. Evidence for this comes from the further increase in the intensity of the thymine band at 1663 $cm^{-1}$ and adenine band at 1609 $cm^{-1}$ (Fig. 4.4D). However, these

two bands did not appreciably shift (1 $cm^{-1}$) upon cobalt cation complexation (r=1/40-1/10). This indicates a weak interaction of cobalt(III)hexamine with AT bases. However, the guanine band at 1717 $cm^{-1}$ and the phosphate band at 1222 $cm^{-1}$ were shifted by 3-4 $cm^{-1}$ (spectra not shown). This evidences the preferential binding to the guanine-N7 and oxygen atom of $PO_2^-$ groups by cobalt(III)hexamine cation. As the cobalt(III)hexamine concentration increased (r=1/20), the intensities of the DNA vibrations at 1717 and 1222 $cm^{-1}$ were also enhanced (Fig. 4.4D). These changes were accompanied by the shift of the two bands by 4 and 3 $cm^{-1}$, respectively (spectra not shown), supporting a continued cation interaction with guanine-N7 site and the backbone $PO_2^-$ group. Our findings are further supported by the X-ray study of B-DNA decamer d(AGGCATGCCT) (71), which identified two different binding sites for $Co(NH_3)_6^{3+}$; one with the guanine-N7 site in the major groove of 5′-AGG bases and another with the oxygen atom of the phosphate group. Similarly, the capillary electrophoresis results showed two major bindings for cobalt(III)hexamine-DNA complexes with $K_1 = 1.8 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_2 = 9.2 \times 10^4\ M^{-1}$, that can be assigned to the cation interactions with N7 of AG bases located in the major groove and the backbone $PO_2^-$ groups, respectively.

Spermine strongly interacts with the guanine and adenine-N7 reactive sites as supported by the shifts of the bands at 1717 and 1609 $cm^{-1}$ by 4 $cm^{-1}$ together with a major increase of their relative intensities (Fig. 4.4A, r=1/40-1/10). This is an evidence towards the preferential binding of spermine to the major groove *via* guanine and adenine bases, which continued until r = 1/20 for the guanine and adenine bases and until r = 1/10 for the guanine bases. As for the spermidine, similar behaviours were observed for the bands at 1717 and 1609 $cm^{-1}$. In the spectra of spermidine-DNA complexes (r=1/40), these two bands shifted by 4 and 2 $cm^{-1}$, respectively. The above indicates the preferential bindings to the guanine and adenine-N7 reactive sites, located in the major groove, at low spermidine concentrations (r=1/80 to 1/40). The thymine-O2 atom is the favoured reactive site at the minor groove because it is not involved in the Watson-Crick network of base pairing. At r=1/20 to 1/4, the band at 1663 $cm^{-1}$ (T) shifted downward by several wavenumbers (3 $cm^{-1}$) upon spermidine addition (Fig.

4.2B, r=1/4), which supports preferential binding with the minor groove in addition to its binding to the major groove at higher concentrations.

In the case of putrescine, the three major bands at 1717 (G), 1663 (T) and 1609 $cm^{-1}$ (A) were shifted downward by 2 $cm^{-1}$ (r=1/40 to 1/10). Similarly, the relative intensities of these bands increased significantly (Fig. 4.4C) and this gives rise to the putrescine preferential bindings to the major and minor groove of DNA duplex. As the concentration of putrescine increased further (r=1/4 to 1), a decrease in the intensity of DNA vibrations at 1717, 1663 and 1609 $cm^{-1}$ was observed (Fig. 4.4C). This decline in the intensity is the consequence of helix stabilization caused by partial putrescine-phosphate interaction. Such decrease in infrared intensities of DNA vibrations is also observed when cation-phosphate binding resulted in partial helix stabilization (66). In our opinion, putrescine is more fluid than other polyamines at low and high concentrations and seems to bind at different sites, including the bindings to the major and minor grooves, as well as the backbone phosphate group stabilizing the DNA duplex at high cation content. These findings are consistent with our capillary electrophoresis results that showed higher Hill coefficient (n) for putrescine compared to other polyamines as a result of a high cooperativity binding of putrescine to duplex DNA.

### 4.5.2 DNA structural changes at high polycation concentrations

At high spermine, spermidine and cobalt(III)hexamine content (r = 1/4), several spectral changes were observed for the base and phosphate vibrations. Indeed, we observed a decrease in intensity of the absorption bands at 1717 (guanine-N7), 1663 (thymine-O2), 1609 (adenine-N7) and 1222 (phosphate) $cm^{-1}$ (Fig. 4.4, A, B and D). The term that has been adopted for this decrease is infrared hypochromism (67) and can be provoked by the base staking and base pairing as a consequence of the cation interaction (19, 24). In the case of the spermine and spermidine, this hypochromism is not arising from DNA condensation. In our opinion, this is due to DNA stabilisation, which occurs at high polyamine concentrations just before the precipitation threshold. Similarly, the bands at 1717 and 1609 $cm^{-1}$ in Spm- and Spd-DNA spectra were shifted by several $cm^{-1}$

(Fig. 4.2, A and B). The band at 1663 $cm^{-1}$, which is assigned mainly to the C2=O2 stretching modes of the thymine residues was shifted to the lower wavenumbres (1660 $cm^{-1}$) in the spectra of Spd-DNA adducts (Fig. 4.2B, r=1/4), while no major shifting was observed for this band in the spectra of Spm-DNA complexes (Fig. 4.2A).

These results are supported by the infrared difference spectra (Fig. 4.2). For spermine, the positive bands at 1715 and 1697 $cm^{-1}$ have been assigned to the interaction with guanine-N7 atom, while the positive band at 1600 $cm^{-1}$ was assigned to its interaction with adenine-N7 atom. The interaction of Spm with thymine residues is not considered since the corresponding band (1663 $cm^{-1}$) exhibited no shifting. In the difference spectra of Spd-DNA complexes, the bands at 1660 and 1600 $cm^{-1}$ have been assigned to the polycation interaction with thymine-O2 and adenine-N7 reactive sites. The interaction of putrescine at high concentration (r=1) with DNA bases is evidenced by the positive difference features at 1715, 1660 and 1612 $cm^{-1}$, that have been assigned to the guanine-N7, thymine-O2 and adenine-N7 reactive sites, respectively (Fig. 4.3A, r=1). However, the infrared spectra of putrescine-DNA complex showed small wavenumber shifts (1 $cm^{-1}$) for the three base bands (Fig. 4.3A). This indicates a weaker interaction of putrescine with these bases as the result of duplex stabilization.

The hypochromism effect observed for the base and phosphate vibrations at high cobalt(III)hexamine concentration (Fig. 4.3B) can be attributed to the formation of an aggregated state in solution in which polyanions (dsDNA) and polycations (cobalt(III)hexamine) dispose alternatively in a highly packaged structure similarly to a liquid crystal (27). This result is supported by the infrared difference spectra of Co(III)-DNA complexes (Fig. 4.3B, r=1/4). As a general trend, the spectra exhibited negative features for the bases and the phosphate vibrations. The negative features at 1710 (base) 1200 ($PO_2^-$) and 1075 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$) emerged in the difference spectra are assigned to a reduced intensity caused by the DNA condensation. Similarly, the infrared spectra of Co(III)-DNA complex exhibited wavenumber shifts for the purine bands at 1717 $cm^{-1}$ (guanine-N7) and 1609 $cm^{-1}$ (adenine-N7) by 5 and 3 $cm^{-1}$, respectively. This result gives rise to the preferential binding of the cobalt(III)hexamine with the major groove of

the AG bases and the $PO_2^-$ groups, in agreement with the precedent discussion for the stretching modes of the bases and phosphate groups.

The interpretation of the absorption bands shift in the region between 1550 and 1250 $cm^{-1}$ of DNA complexed with biogenic polyamines is informative at high polycation concentrations. In this region, the IR spectra of spermine, spermidine and putrescine show a pair of bands around 1480 and 1319 $cm^{-1}$. In the spectra of Spm- and Spm-DNA complexes, the former band is overlapped by the band at 1491 $cm^{-1}$ involving in-plane ring vibration of cytosine residues (65, 66). These two bands are assigned to the polyamine methylene scissoring vibrations and symmetric bending mode of methyl groups, respectively (67, 68). The spectral changes observed for these vibrations support the existence of a hydrophobic interaction between the polyamine cation and DNA duplex. Similarly, positive features at 1480 and 1334 $cm^{-1}$ in the difference spectra of spermine and spermidine indicate hydrophobic contact with the methyl groups of dsDNA. The IR spectrum of putrescine showed a maximum band at 1570 $cm^{-1}$ related to the N-H bending vibration of the $NH_3^+$ groups (67, 68). At higher putrescine concentration, this $NH_3^+$ band shifted to a lower frequency (1565 $cm^{-1}$) with a positive feature at 1561 $cm^{-1}$ in the difference spectra of the polycation-DNA adducts (Fig. 4.3A), indicating an active participation of these groups in polyamine complexation (Fig. 4.3A). The two positive peaks at 1492 and 1329 $cm^{-1}$ are originating from methylene and methyl vibrations of putrescine, which support the existence of polycation hydrophobic interaction with DNA duplex. Further evidence of Co(III)-DNA interaction with DNA bases can be obtained from the shift of the bands in the region 1550-1250 $cm^{-1}$. In the pure DNA, the band at 1529 $cm^{-1}$ is assigned to the in-plane vibrations of cytosine and guanine residues (65, 72). This band disappeared in the spectra of the complex at high cobalt(III)hexamine concentration and was replaced by two weak bands at 1560 and 1450 $cm^{-1}$ (Fig. 4.3B). These observed spectral changes reflect the interaction of cobalt cation with the G-C base pair.

The IR difference spectra of polyamine-DNA complexes at high polycation concentrations (r=1/4) provide clear evidence for further cation interaction with the

negatively charged $PO_2^-$ groups, as deduced from the positive features appearing at 1230 and 1081 $cm^{-1}$ (spermine), 1240 and 1099 $cm^{-1}$ (spermidine), 1225 and 1087 $cm^{-1}$ (putrescine) and 1245 $cm^{-1}$ (cobalt-hexamine) (Fig. 4.2 and 4.3). The negative features observed at 1200 and 1075 $cm^{-1}$ in the difference spectra of cobalt(III)hexamine are due to DNA condensation at high cobalt(III)hexamine concentrations. Similarly, the $PO_2^-$ band at 1222 $cm^{-1}$ was shifted by 2-3 $cm^{-1}$ in the spectra of all polycation-DNA complexes (Fig. 4.2 and 4.3). The IR spectrum of the pure DNA in the region 1050-700 $cm^{-1}$ is dominated by two intense bands, namely at 1053 and 968 $cm^{-1}$, assigned to the C-O and C-C stretching vibrations of deoxyribose (65, 69, 70, 73). The band at 1050 $cm^{-1}$ exhibited no major shifting (1 $cm^{-1}$), while the band at 968 $cm^{-1}$ was observed at the same frequency, suggesting that no direct polycation-sugar interaction occurred in these polyamine-DNA complexes (Fig. 4.2 and 4.3).

### 4.5.3 DNA conformation

The region 1000-700 $cm^{-1}$ is of particular interest for DNA conformation. The DNA B-form exhibits an absorption band with medium intensity at 836 $cm^{-1}$, which disappears at lower humidities (74). The 836 $cm^{-1}$ band which involves sugar-phosphodiester mode is considered as a major marker band for the B-DNA conformation (64, 65, 74). Minor spectral changes were observed for the marker bands in the spectra of the biogenic polyamine-DNA complexes. However, these minor changes do not lead to conformational transitions such as B↔A↔Z. The observed spectral changes are due to minor alterations of the sugar-phosphate geometry upon polycation-DNA interactions. However, at high cobalt(III)hexamine content a new weak band emerged at 861 $cm^{-1}$ (Fig. 4.3B, r=1/4), which is related to A-form DNA (65, 69, 74). The presence of this band can be due to the progressive dehydration of the B-DNA and a partial B→ A transition (74) upon addition of cobalt(III)hexamine cation.

To verify whether cobalt(III)hexamine cations induce DNA conformational changes, circular dichorism analysis were performed using constant DNA concentration (1.25 mM) and various Co(III)/DNA(P) molar ratios. The CD spectrum of pure DNA

(Fig. 4.5, a) shows two positive bands at 275 nm (large band) and 221 nm (weak band) and negative one at 245 nm, typical of B-DNA conformation (75, 76). The DNA bands at 275 and 245 nm were not changed upon the addition of cobalt(III)hexamine suggesting that DNA remains as B-conformation. On the other hand, the intensity of the weak positive band at 221 nm decreased and shifted to a higher wavelength (224 $cm^{-1}$) upon addition of cobalt(III)hexamine cation. This followed by an increase in the molar ellipticity of the negative band around 212 nm (Fig. 4.5, b to f), characteristic of A-DNA conformation (76). Hence, the conformation of the DNA may be an intermediate between B-DNA and A-DNA. These findings suggest that the new weak band appeared at 861 $cm^{-1}$ in the infrared spectra of the Co(III)-DNA complexes at higher cobalt(III)hexamine content (r= 1/10 to 1/4) is due to the partial B→ A transition.

When a complete B→ A transition occurs the DNA marker bands such as 836 $cm^{-1}$ appears at about 820-810 $cm^{-1}$, the $PO_2^-$ stretching vibration at 1222 $cm^{-1}$ shifts towards a higher frequency at 1230-1240 $cm^{-1}$ and the guanine band at 1717 $cm^{-1}$ appears at 1710-1700 $cm^{-1}$ (64, 77). In the B→ Z transition, the guanine band at 1717 $cm^{-1}$ shifts to 1690 $cm^{-1}$ and the phosphate vibration at 1222 $cm^{-1}$ appears at 1216 $cm^{-1}$, while the sugar-phosphate band at 836 $cm^{-1}$ displaces towards a lower frequency at 800-790 $cm^{-1}$ (64). Since no such spectral changes occurred in biogenic polyamine-DNA adducts, DNA remains in B-conformation in these complexes.

### 4.5.4 Stability of polyamines–DNA adducts by capillary electrophoresis

The binding of the polyamine-DNA complexes was also studied by capillary electrophoresis. Mixtures containing constant amount of dsDNA (1.25 mM) and various amounts of polyamine in molar ratios of 1/800, 1/400, 1/200, 1/100, 1/50, 1/25, 1/12.5 and 1/6.25 were prepared and subjected to electrophoresis using an uncoated fused silica capillary of 75 μm i.d. (effective length of 50 cm) at 25 kV. The electropherograms were monitored at 260 nm and at 25 °C in a run buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0 ± 0.2). The experimental data related to the migration times of pure

DNA and its complexes with different concentrations of biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine are shown in Table 4.2.

The saturated curve is shown in Figure 4.6A. The migration time of polyamine-DNA adducts gradually increased as the polyamine concentration increased and nearly reached a plateau at low polyamine concentration (around 50 $\mu$M), (Fig. 4.6A). Based on these results, binding constants of the polycation-DNA complexes were determined by Scatchard analysis as described in *Experimental Procedures*. Quantitative determination of binding constant for polyamine-DNA complexes will help to clarify the molecular mechanism of DNA stabilization and condensation by polyamines. Scatchard analysis for the biogenic polyamine-DNA adducts showed one overall binding constant for each polyamine with $K_{Spm} = 2.3 \times 10^5\ M^{-1}$, $K_{Spd} = 1.4 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_{Put} = 1.02 \times 10^5\ M^{-1}$ (Fig. 4.6B). However, no significant differences were detected in their binding affinities that could explain that spermine, spermidine and putrescine may have a common molecular mechanism for DNA binding. Similar Scatchard analysis for the cobalt(III)hexamine-DNA complexes showed two binding constants with $K_1 = 1.8 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_2 = 9.2 \times 10^4\ M^{-1}$ (Fig. 4.6C). These results suggest a high- and a low-affinity for DNA upon cobalt(III)hexamine complexation. Furthermore, it may be speculated that the stronger interaction is due to major groove binding involving purine-N7 atom, while the weaker is due to its binding with the backbone $PO_2^-$ group, in agreement with the infrared data. Direct contacts between cobalt(III)hexamine and nucleic acids were observed by X-ray study (71) in which one of the cobalt(III)hexamine cations was located in DNA major groove binding *via* hydrogen-bonding to the guanine residue (N7 and O6 atoms). The second cobalt(III)hexamine cation was positioned between DNA molecules forming hydrogen bonds to the phosphate oxygen atoms from different strands.

The cooperativity of the binding was analyzed using a Hill plot (Fig. 4.6D). For biogenic polyamines spermine, spermidine and putrescine, the Hill coefficients, n, were 1.24, 1.47, and 1.74, respectively. These Hill coefficients were all greater than unity, indicating a positive cooperativity binding of these three polyamines with the dsDNA

(63). In our opinion, this positive cooperativity reflects the biological importance of the biogenic polyamines within the cell. Indeed, depletion of polyamines was shown to cause a minor destabilization of the chromatin structure (35). In contrast, the Co(III)-DNA interaction was characterized by a negative cooperativity with Hill coefficient (n) less than 1 (Fig. 4.6D). This may be due to the non-specific interaction between cobalt(III)hexamine and DNA.

## 4.6 Discussion

### 4.6.1 Effect of biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine on conformation and stability of calf-thymus DNA

The purpose of this study was to examine the effects of different polyamines on DNA structure and to determine their preferential binding sites at various polycation concentrations. The physiological functions of the polyamines are gradually clarified at the molecular level (6, 15). Among the biological functions of polyamines, one notable feature is their ability to condense DNA (27). In our experiments, we found no evidence to suggest calf-thymus DNA condensation by biogenic polyamines. It was previously suggested that the polyamines do not regulate the chromatin condensation state during the cell cycle although they might have some stabilizing effect on the chromatin structure (35). It seems that the polyamines alone can not induce DNA condensation in cellular systems and that several other factors are involved in the stabilization of the compact forms of DNA such as specific proteins (histones in eukaryotes or histone-like proteins in prokaryotes), macromolecular crowding or DNA supercoiling. It appears that these different factors contribute to the stabilization of the compact forms of DNA (78). On the other hand, high concentrations of polyamines are generally found in the G1 phase of the cell cycle (1). It has been suggested that these high concentrations are required in the cell preparation for DNA synthesis. In our experimental setting, DNA stabilization occurs at molar ratios of 1/4 for spermine and spermidine, and between 1/4 and 1 for putrescine, corresponding to 6.25 mM for spermine and spermidine and 6.25 to

25 mM for putrescine, that are close to physiological concentrations (the polyamines intracellular concentrations are in the millimolar range).

In contrast, the infrared results showed DNA condensation by cobalt(III)hexamine as exhibited by negative features in the infrared difference spectra of Co(III)-DNA complexes at high Co(III)/DNA ratio (r = 1/4). Our findings agree with those of Widom and Baldwin, who showed that $Co(NH_3)_6^{3+}$ efficiently aggregates random sequence natural DNA without any CD changes (36). The condensation process would be consistent with the formation of two direct hydrogen bonds between the punine-N7 of the major groove and the phosphate group of DNA.

The infrared spectra also provided the evidence that biogenic polyamine-DNA interaction leads to no major biopolymer conformational changes with DNA remaining in the B-family structure. This finding agrees with recent Raman studies of different genomic DNA including calf-thymus DNA (23, 24) that find no conformational changes upon polyamines complexation. Indeed, polyamine-bound genomic DNA maintains the B-form structure even upon precipitation (23). The capability of biogenic polyamines to bind and condense genomic DNA while conserving the native B-form secondary structure may have important biological implications. Of particular interest is the present finding that cobalt(III)hexamine induced a partial B→ A transition. Infrared spectrum of pure DNA (Fig. 4.2 and 4.3, top spectra) shows a clear band at 836 $cm^{-1}$ and no band at 860 $cm^{-1}$, which is the pattern for pure B-family structures (74). Co(III)-DNA complexes at high cobalt(III)hexamine concentration (r=1/4) gives a very similar spectrum (Fig. 4.3B, r = 1/4) although a small band is observed near 860 $cm^{-1}$ and a weak band near 836 $cm^{-1}$ is reduced, which indicate some degree of A-DNA formation. We believe that the incomplete transition from B to A form is due to a partial dehydration of DNA upon cobalt(III)hexamine complexation. Indeed, pure DNA when hydrated at 75 % r.h. exhibits the same behavior with a major band at 860 $cm^{-1}$ and a weak band at 836 $cm^{-1}$ (74). From ultrasonic and densimetric measurements, it has been found that cobalt(III)hexamine reduce the hydration of the atomic group of DNA (79).

To clarify the conformational changes of B-DNA upon cobat(III)hexamine complexation, circular dichroïsm results are helpful. No noticeable variation in the molar ellipticity of the bands in the region 240-300 nm were observed (Fig. 4.5, a to f) suggesting that DNA remains in B-form. However, minor spectral changes observed in the region 200-240 nm (reduced intensity and shifting of the band 221nm, followed by intensity increase of the band around 212 nm) are characteristics of A-conformation (76). It is possible that some sequences of DNA undergo A-transition, while the rest still remain in B-form. The contrasting differences between cobalt(III)hexamine and biogenic polyamine bindings might relate to the different molecular mechanism for DNA binding. Thus, cobalt(III)hexamine cations bind to nitrogen base sites (including N7) and the backbone $PO_2^-$ groups. Conversely, biogenic polyamines bind primarily to the phosphates of the DNA backbone increasing the base pairing and stacking of B-DNA. In fact, this is consistent with our infrared hypochromism effect observed at high biogenic polyamine concentrations.

### 4.6.2 Preferrial binding models for polyamine-DNA complexes and their biological implication

Our spectroscopic data are used to build models for each biogenic polyamine-DNA adducts. It should be noted that several models are proposed for polyamine-DNA complexes in recent theoretical and spectroscopic studies (22, 24, 25, 48). To present some interaction models, the intramolecular distances should be taken into account. It was seen that polyamines attached to B-DNA are in trans torsion angles (22, 48). As predicted by theoretical calculations (80), this is the lowest-energy conformation for these polyamines. Intramolecular distances for dsDNA and polyamines can be approximately calculated using HyperChem software (81). Thus, the distances between the outer primary amino group in the all-trans conformation are 6.23, 11.13 and 16.04 Å for putrescine, spermidine and spermine, respectively. The distance between a primary amino group and a secondary amino group separated by a trimethylene chain is around 5 Å (figure 4.1). In addition, spermine contains two inner secondary amino groups that are separated by 6.23 Å. The double-stranded DNA in B-form was constructed using

HyperChem Nucleic acids Databases. A model for the polyamine cation was built manually using drawing tools of the HyperChem Model Builder and was subjected to geometrical optimization.

#### 4.6.2.1 Putrescine

Our infrared spectra of putrescine-DNA complexes showed that putrescine binds to the major and minor grooves of DNA duplex at both low and high polycation concentrations. In addition, electrostatic interaction with negatively charged backbone phosphate groups occurs for putrescine–DNA complexes.

In the major groove of double strand DNA, the guanine- and adenine-N7 atoms are the more reactive sites since they are free from strong steric hindrances and are not involved in the Watson-Crick hydrogen bonds. The distance between these atoms and the oxygen atom of the nearest phosphate group is around 6.36 and 6.47 Å, respectively, which correlates well with the putrescine N-N distance (6.23 Å). The primary amino groups of putrescine could make two hydrogen bonds with the oxygen atom of the $PO_2^-$ group and either the guanine-N7 or adenine-N7 atoms of the same strand at the major groove (Fig. 4.7A). Intragroove interaction by two adjacent $PO_2^-$ groups (6.34 Å) was also proposed (Fig. 4.7A). However, the molecular size of putrescine could not allow the interstrand binding. In a minor groove model, estimated lengths of 6.02 Å can be obtained for thymine-O2 atom and $PO_2^-$ group of the same strand, which also correlates with the putrescine N-N distance. We therefore propose putrescine-DNA model where the polyamine $NH_3^+$ groups are in contact with a phosphate group and a thymine-O2 atom in the minor groove as shown in Fig. 4.7B.

#### 4.6.2.2 Spermidine

Infrared data for spermidine-DNA complexes indicate preferential binding by the major groove at low cation concentration and by both major and minor grooves at higher

concentration. The smaller molecular size of putrescine allowed its interact with both minor and major grooves. The presence of a secondary amino group extends the binding possibility of spermidine (N-N distance in an all-trans spermidine ~ 11.2 Å), which allows binding with two reactive sites located at different DNA strands. Considering the interatomic distances in the major groove, there are suitable values for the spermidine interaction involving three adjacent phosphate groups (~11.9 Å) from the same strand (Fig. 4.7A). The distances between the oxygen atoms of these phosphate groups are O2P1-O2P2 ~ 6.3 Å and O2P2-O1P3 ~ 5.7 Å correlate well with the distances between the amino groups of spermidine (~ 6.23 Å and ~ 5 Å, respectively) (Fig. 4.8A). In the model of the Figure 4.8B, two contacts with DNA bases are shown in the major groove of dsDNA. In this model, the two outer $NH_3^+$ groups are near the N7 atom of adenine and oxygen of phosphate group (11 Å), while the inner $NH_2^+$ group is in contact with the N7 atom of the guanine. The relevant interatomic lengths for this model are ~ 7 Å (O2P-N7(G)) and ~ 4 Å (N7(G)-N7(A)) that correlate slightly to the N-N distance of spermidine (~ 6.23 Å and ~ 5 Å).

Several models involving the binding of spermidine in the minor groove of dsDNA were proposed recently (24, 25). In these models, the authors showed an interstrand contact between polyamine amino groups and T(O2), A(N3) and $PO_2^-$ groups. In our model (Fig. 4.8C), we propose an intrastrand binding possibility in which the outer amino groups are near thymine-O2 and O4 of sugar (~ 11.3 Å). In addition, this model allows for interaction between an adenine-N3 atom and the inner spermidine-$NH_2^+$ group. Hydrophobic contacts with the methylene-C5' can also occur (Fig. 4.8C). It should be noted that some phosphate-phosphate interstrand distances at the dsDNA minor grooves could favour the attachment of spermidine molecules (model not showed), while it is not possible at the major groove.

#### 4.6.2.3 Spermine

Based on infrared data, the major groove is the most favourable binding site on dsDNA for spermine. Spermine interaction with the bases at the major groove was

demonstrated by X-ray studies performed on spermine–oligonucleotide complexes (21, 42). In addition, the interactions between spermine and DNA have been widely studied using theoretical calculations (45, 47). These studies indicated that the interaction at the major groove of alternating purine/pyrimidine sequences appears to be the most favorable of all models presented, and are associated with significant bending of DNA. The influence of base composition (and sequence) on the process of interaction between spermine and synthetic polynucleotides has shown significant differences between A-T and G-C base pairs (31). Thus, diverse binding models could be considered for spermine, since the interactions with the bases are sequence dependent. Recent Raman studies (24, 25) propose the interactions along and across the major grooves involving contacts between the inner amino groups and purine-N7 and thymine-O4 atoms, that also permit hydrophobic contact between $CH_2$ group of thymine and methylene group of spermine. These models correlate well with our infrared data, since interactions with the purine-N7 atoms and hydrophobic contacts are observed. In our major groove model, the outer primary amino groups of spermine could bind with $PO_2^-$ groups from different strands (~ 16.4 Å), which correlate well with the distances between the outer primary amino groups of spermine (~ 16.04 Å). This model allows for inner interactions with N7 atoms of guanine and adenine bases (Fig. 4.9). As mentioned above, spermidine molecules favour the phosphate-phosphate interstrand attachment in the minor groove, while spermine could favour the interstrand attachment at both the minor and major grooves. In our opinion this might justify DNA protection against radiation, oxidation and thermal denaturation.

Polyamines play an essential role in cell growth and differentiation, and interaction with nucleic acids could explain some of their important biological functions (1, 6, 8). Several studies indicate that polyamines play a critical role in protecting DNA strand breaks induced by radiation and oxidative stress (9-12). In fact, such DNA damage decreases the survivability of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant cells (11). However, the mechanisms by which this occurs are unknown. Our proposed models involve both intra- and interstrand interactions between polyamines and DNA. In our opinion, the intrastrand interactions would justify the ability of these polyamines to

protect DNA against strand breaks. However, DNA strand breaks were not prevented as much by putrescine as by spermidine and spermine (putrescine afforded a lower protection), (9-12). This difference could be explained by the difference in the charges and sizes of polyamines. On the other hand, the interstrand interactions would explain the ability of spermine and spermidine to offer higher protection.

## 4.7 Acknowledgments

We highly appreciate the financial supports of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) for this work.

## 4.8 References

1. Tabor, H., and Tabor, C. W. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.

2. Pegg, A. E. (1988) *Cancer Res.* **48,** 759-774.

3. Heby, O. (1981) *Differentiation* **19**, 1-20.

4. Tkachenko, A., Nesterova, L., and Pshenichnov, M. (2001) *Arch. Microbiol.* **176,** 155–157.

5. Marton, L. J, and Pegg, A. E. (1995) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 55-91.

6. Cohen, S.S. (1998) A Guide to the polyamines, Oxford Uni. Press, New York.

7. Casero, R.A., and Woster, P.M. (2001) *J. Med. Chem.* **44**, 1-26.

8. Thomas, T., and Thomas, T. J. (2001) *Cell. and Mol. Life Sci.* **58**, 244-258.

9. Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., and Casero Jr., R. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**,11140 –11145.

10. Ha, H. C., Yager, J. D., Woster, P. A., and Casero Jr., R. A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**,298 –303.

11. Oh, T. J., and Kim, I. G. (1998) *Biotech. Techniques* **12**, 755-758.

12. Douki, T., and Bretonniere, Y. (2000) *J. Cadet. Radiat. Res.* **153**, 29-35.

13. Morgan, D. M. L. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1080-1084.

14. Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., and Igarashi, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **226**, 20803-20809.

15. Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 559-564.

16. Thomas, T. J., Gunnia, U. B., and Thomas, T. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6137-6141.

17. Bancroft, D., Williams, L. D., Rich, A., and Egli., M. (1994) *Biochemistry* **33**, 1073-1086.

18. Hasan, R., Alam, M. K., and Ali, R. (1995) *FEBS Lett.* **368**, 27-30.

19. Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sanchez-Jiménez, F., and Ramírez, F. J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 437–446.

20. Minyat, E. E., Ivanov, V. I., Kritzyn, A. M., Minchenkova, L. E., and Schyolkina, A. K. (1978) *J. Mol. Biol.* **128**, 379-409.

21. Jain, S., Zon, G., and Sundaralingam, M. (1989) *Biochemistry* **28**, 2360-2364.

22. Real, A. N., and Greenall, R. J. (2004) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **21**, 469-488

23. Deng, H., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., and Thomas Jr., G. J. (2000) *Nucl. Acids Res.* **28**, 3379-3385.

24. Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sanchez-Jiménez, F., and Ramírez, F. J. (2001) *Biophy. J.* **80**, 443-454.

25. Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sanchez-Jiménez, F., and Ramírez, F. J. (2003) *Biochim. Biophys. Acta.* **1628**, 11-21.

26. Gosule, L. C., and Schellman, J. A. (1976) *Nature* **259**, 333-335.

27. Pelta, J., Livolant, F., and Sikorav, J.-L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5656-5662.

28. Bloomfield, V. A. (1997) *Biopolymers* **44**, 269-282.

29. Lin, Z., Wang, C., Feng, X., Liu, M., Li, J., and Bai, C. (1998) *Nucl. Acids Res.* **26**, 3228-3234.

30. D'Agostino, L., and Di Luccia, A. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 4317-4325.

31. Marquet, R., Colson, P., and Houssier, C. (1986) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 205-218.

32. Sen, D., and Crothers, D. M. (1986) *Biochemistry* **25**, 1495-1503.

33. Hougaard, D. M., Fujiwara, K., and Larsson, L. I. (1987) *Histochem. J.* **19**, 643-650.

34. Sauve, D. M., Anderson, H. J., Ray, J. M., James, W. M., and Roberge, M. (1999) *J. Cell. Biol.* **145**, 225-235.

35. Laitinen, J., Stenius, K., Eloranta, T. O., and Hölttä, E. (1998) *J. Cell. Biochem.* **68**, 200-212.

36. Widom, J., and Baldwin, R. L. (1980) *J. Mol. Biol.* **144**, 431–453.

37. Tabor, H. (1962) *Biochemistry* **1**, 496-501.

38. Thomas, T. J., and Bloomfield, V. A. (1984) *Biopolymers* **23**, 1295-1306.

39. Tsuboi, M. (1964) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **37**,1514–1522.

40. Liquori, A. M., Constantino, L.. Crescenzi, V., Elia, V., Giglio, E., Puliti, R., De Santis-Savino, M. and Vitagliano, V. (1967) *J. Mol. Biol.* **24**,113–122.

41. Williams, L. D., Frederick, C. A., Ughetto, G., and Rich, A. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**,5533–5541.

42. Drew, H. R., and Dickerson, R. E. (1981) *J. Mol. Biol.* **151**, 535-556.

43. Schmid, N., and Behr, J.-P. (1991) *Biochemistry* **30**, 4357-4361.

44. Wemmer, D. E., Srivenugopol, K. S., Reid, B. R., and Morris, D. R. (1985) *J. Mol. Biol.* **185**, 457-459.

45. Feuerstein, B. G., Pattabiraman, N., and Marton, L. J. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 1271-1282.

46. Pattabiraman, N., Langridge, R., and Kollman, P. A. (1984) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**,1525–1533.

47. Feuerstein, B. G., Pattabiraman, N., and Marton, L. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5948–5992.

48. Bryson, K., and Greenall, R. J. (2000) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**, 393-412.

49. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Nordenskiöld, L., and Laaksonen, A. (2001) *J. Mol. Biol.* **308**, 907-917.

50. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Laaksonen, A., and Nordenskiöld, L. (2002) *Biophys. J.* **82**, 2860-2875.

51. Marmur, J. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.

52. Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A., and Doty, P. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3047-3053.

53. Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., and Subramanian, V. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **271**, 731-734.

54. Alex, S., and Dupuis, P. (1989) *Inorg. Chim. Acta* **157**, 271-281.

55. Ahmed Ouameur, A., Nafisi, Sh., Mohajerani, N., and Tajmir-Riahi, H.A. (2003) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 561-565.

56. Klotz, M.I. (1982) *Science* **217**, 1247-1249.

57. Guszcynski, T., and Copeland, T. D. (1998) *Anal. Biochem.* **260**, 212-217.

58. Foulds, G. J., and Etzkorn, F. A. (1998) *Nucl. Acids Res.* **26**, 4304-4305.

59. Li, G., and Martin, M. L. (1998) *Anal. Biochem.* **263**, 72-78.

60. Xian, J., Harrington, M. G., and Davidson, E. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 86-90.

61. Marty, R., Ahmed Ouameur, A., Neault, J.-F., Nafisi, Sh., and Tajmir-Riahi, H. A (2004) *DNA and Cell Biology* **23**, 135-140.

62. Shimura, K., and Kasai, K.-I. (1997) *Anal. Biochem.* **251**, 1-16.

63. Jack, R. C. (1995) Basic Biochemical laboratory procedures and computing. Oxford University Press, oxford, New Work, 362 p.

64. Taillandier, E., and Liquier, J. (1992) *Methods Enzymol.* **211**, 307-335.

65. Taillandier, E., Liquier, J. and Taboury, J. A. (1985) *Advances infrared and Raman spectroscopy* **12**, 65-113.

66. Arakawa, H., Ahmed, R., Naoui, M., and Tajmir-Riahi, H. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10150-10153.

67. Pavia, D. L., Lampman, G. M., and Kriz, G. S. (1979) Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry. Saunders Golden Sunburst Series, Toronto, Canada.

68. Günzler, H., and Gremlich, H.-U. (2002) IR Spectroscopy. An Introduction. Wiley-vch, Germany.

69. Taillandier, E., Liquier, J., Taboury, J. A., and Ghomi, M. (1984) Structural transitions in DNA (A, B, Z) studied by IF spectroscopy. In Spectroscopy of Biological Molecules, C. Sandorfy and T. Theophanides (eds.), Amsterdam, 171-189.

70. Taillandier, E., Taboury, J. A., Adam, S., and Liquier, J. (1984) *Biochemistry* **23**, 5703-5706.

71. Nunn, C. M., and Neidle, S. (1996) *J. Mol. Biol.* **256**, 340-351.

72. Tsuboi, M. (1969) *Applied spectroscopy reviews* **3**, 45-90.

73. Theophanides, T., and Tajmir-Riahi, H. A. (1985) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 995-1004.

74. DiRico, D. E., Jr., Keller, P. B., and Hartman, K. A. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 251-260.

75. Hou, M.-H., Lin, S.-B., Yuann, J.-M. P., Lin, W.-C., Wang, A. H.-J., and Kan, L.-S. (2001) *Nucl. Acids Res.* **29**, 5121-5128.

76. Kypr, J., and Vorlíčková, M. (2002) *Biopolymers (Biospectroscopy)* **67**, 275-277.

77. Loprete, D. M., and Hartman, K. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 4077-4082.

78. Zimmerman, S. B., and Murphy, L. D. (1996) *FEBS Lett.* **390**, 245-248.

79. Kankia, B. I., Buckin, V., and Bloomfield, V. A. (2001) *Nucl. Acids Res.* **29**, 2795-2801.

80. Marques, M. P. M., and Batista de Carvalho, L. A. E. (2000) Theoretical approach to the conformational preferences of putrescine. *In* Biologically Active Amines in Food, Vol. 4. D.M.L. Morgan, A. White, F. Sánchez-Jiménez, and S. Bardócz, editors. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 122–129.

81. Hyperchem 7.0, 2002. Hypercube, Alberta, Canada.

## TABLE 4.1

**Measured wavenumbers, relative intensities and assignments for the main infrared bands of calf-thymus DNA in aqueous solution at pH 7.0 ± 0.2**

| Wavenumber ($cm^{-1}$) | Intensity[a] | Assignment[b] |
|---|---|---|
| 1717 | vs | Guanine (C=N, C=O stretching) |
| 1663 | vs | Thymine (C=O stretching) |
| 1609 | s | Adenine (C=N stretching) |
| 1578 | sh | Purine stretching (N7) |
| 1529 | w | In plane vibration of cytosine and guanine |
| 1492 | m | In plane vibration of cytosine |
| 1222 | vs | Asymmetric $PO_2^-$ stretch |
| 1088 | vs | Symmetric $PO_2^-$ stretch |
| 1053 | s | C-O deoxyribose stretch |
| 968 | s | C-C deoxyribose stretch |
| 893 | m | Deoxyribose, B-marker |
| 836 | m | Deoxyribose, B-marker |

[a]Relative intensities : s = strong, sh = shoulder, vs = very strong, m= medium, w= weak
[b]Assignments have been taken from the literature and relevant references are given in the results section.

**TABLE 4.2**

**Experimental values of the migration time of pure DNA and polyamine-DNA adducts following incubation of a constant concentration of DNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. Incubations were carried out in the run buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ± 0.2) at 25 °C for 30 min prior to capillary electrophoresis.**

| Spermine | | Spermidine | | Putrescine | | Cobalt(III)hexamine | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration ($\mu$M) | Migration time (min) | Concentration ($\mu$M) | Migration time (min) | Concentration ($\mu$M) | Migration time (min) | Concentration ($\mu$M) | Migration time (min) |
| 0 | 4.06 | 0 | 4.06 | 0 | 4.06 | 0 | 3.57 |
| 1.563 | 4.081 | 1.563 | 4.087 | 1.563 | 4.068 | 1.563 | 3.593 |
| 3.125 | 4.091 | 3.125 | 4.113 | 3.125 | 4.098 | 3.125 | 3.608 |
| 6.25 | 4.11 | 6.25 | 4.139 | 6.25 | 4.128 | 6.25 | 3.626 |
| 12.5 | 4.123 | 12.5 | 4.166 | 12.5 | 4.166 | 25 | 3.649 |
| 25 | 4.131 | 25 | 4.19 | 25 | 4.188 | 50 | 3.667 |
| 50 | 4.135 | 50 | 4.208 | 50 | 4.21 | 100 | 3.675 |
| 100 | 4.138 | 100 | 4.215 | 100 | 4.22 | 200 | 3.679 |
| 200 | 4.135 | 200 | 4.216 | 200 | 4.221 | / | / |

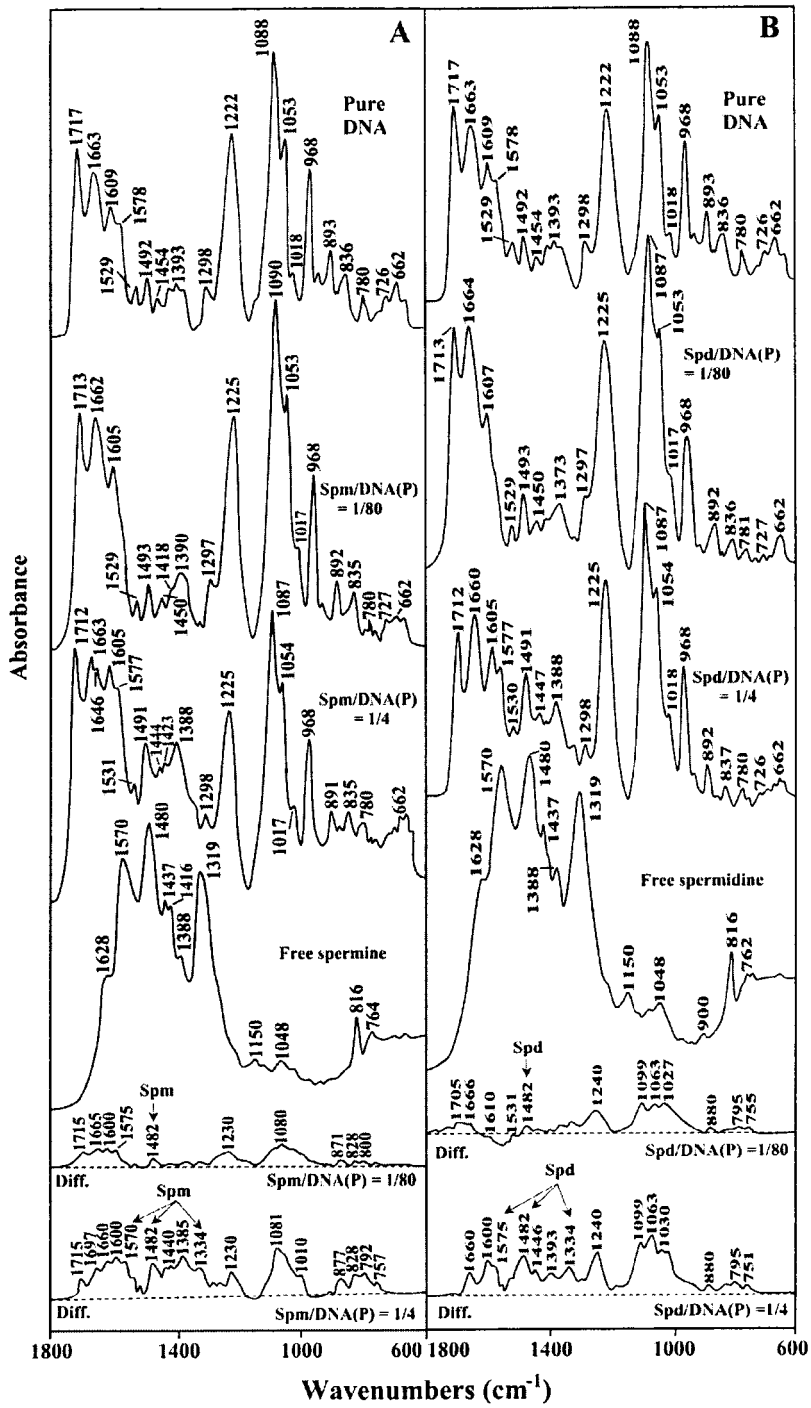


**FIGURE 4.2 : FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure DNA, free polyamine, and (A) Spermine-, (B) Spermidine-DNA adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra), and difference spectra for polyamine-DNA adducts obtained at various polyamine/DNA(P) molar ratios (bottom two spectra).**

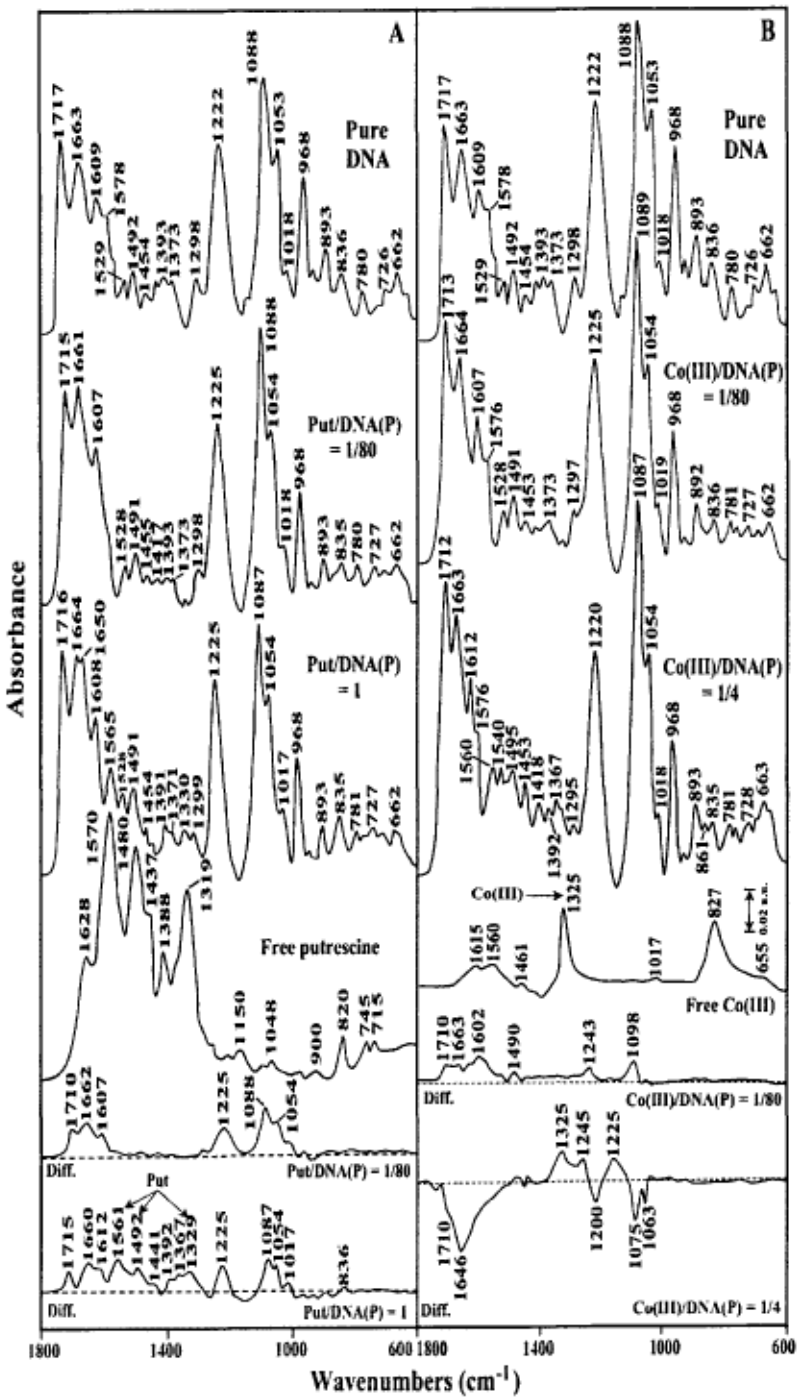


**FIGURE 4.3 : FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure DNA, free polyamine, and (A) Putrescine-, (B) Cobalt(III)hexamine-DNA adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra), and difference spectra for polyamine-DNA adducts obtained at various polyamine/DNA(P) molar ratios (bottom two spectra).**

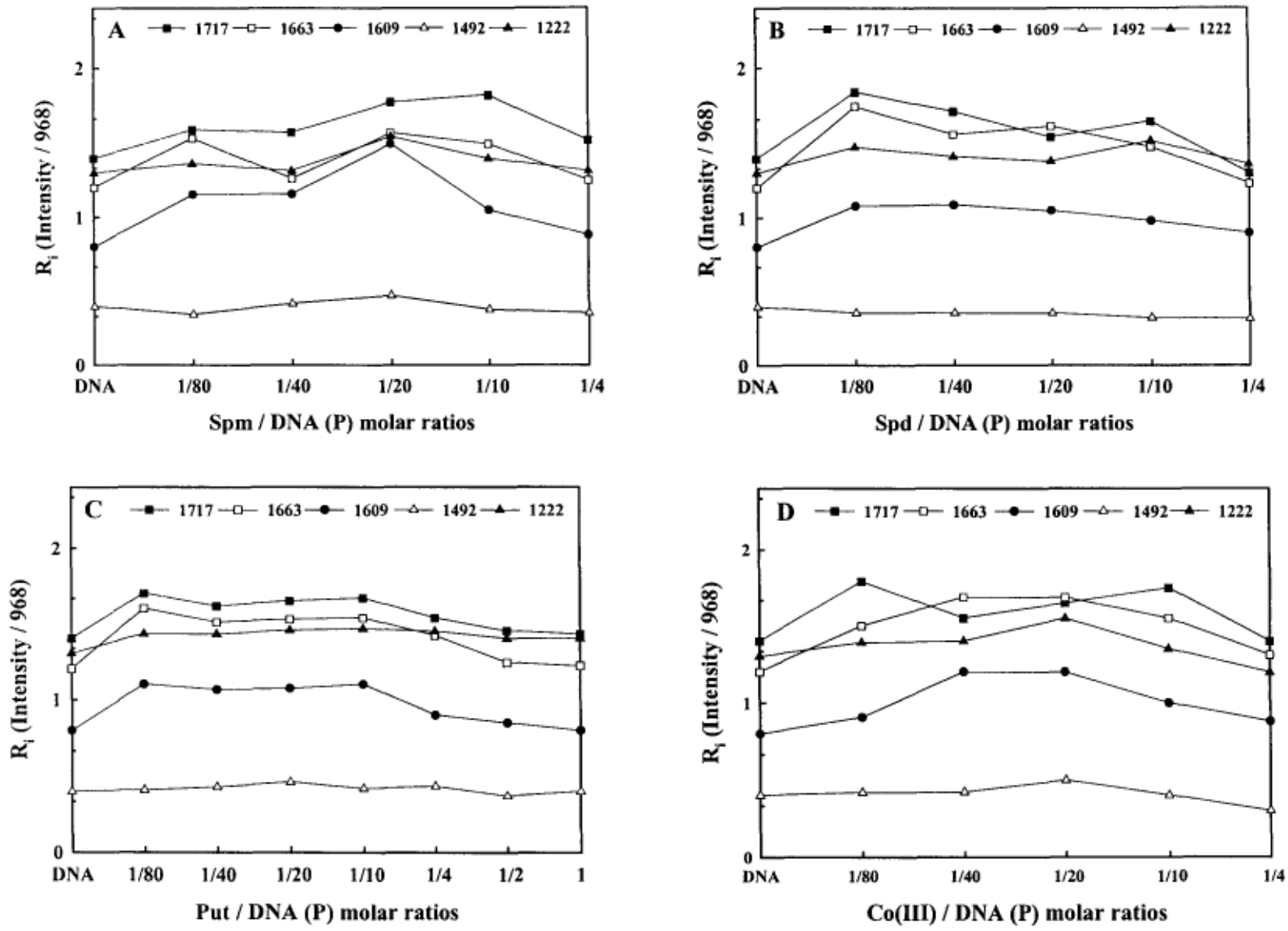


**FIGURE 4.4 :** **Intensity ratio variations for several DNA in-plane vibrations as a function of polyamine concentration. (A, B, C and D) Intensity ratios for the DNA bands at 1717 (guanine), 1663 (thymine), 1609 (adenine), 1492 (cytosine) and 1222 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$ vib.) for spermine, spermidine, putrescine and cobalt(II)hexamine, respectively.**

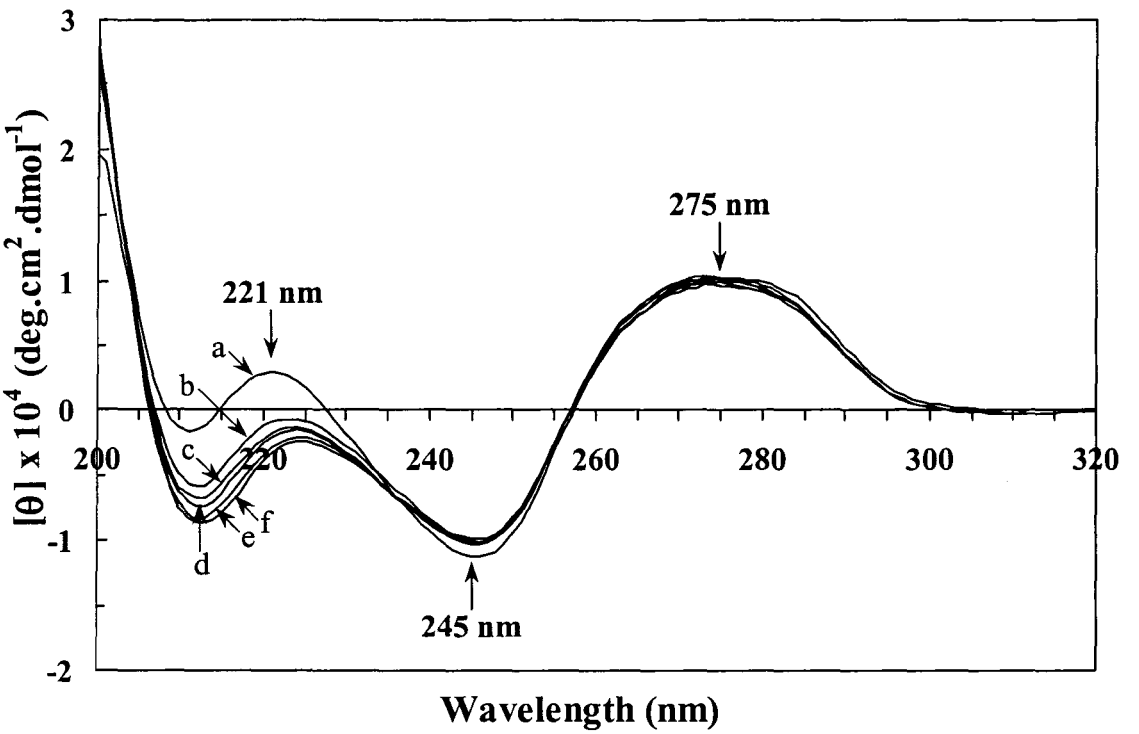


**FIGURE 4.5 :** **CD spectra of highly polymerised calf thymus DNA in 25 mM NaCl (pH ~ 7) at 25 °C and at various concentrations of cobalt(III)hexamine: (a) pure DNA (1.25 mM); (b) Co(III)/DNA(P) = 1/15; (c) Co(III)/DNA(P) = 1/10; (d) Co(III)/DNA(P) = 1/8; (e) Co(III)/DNA(P) = 1/6; (f) Co(III)/DNA(P) = 1/4.**

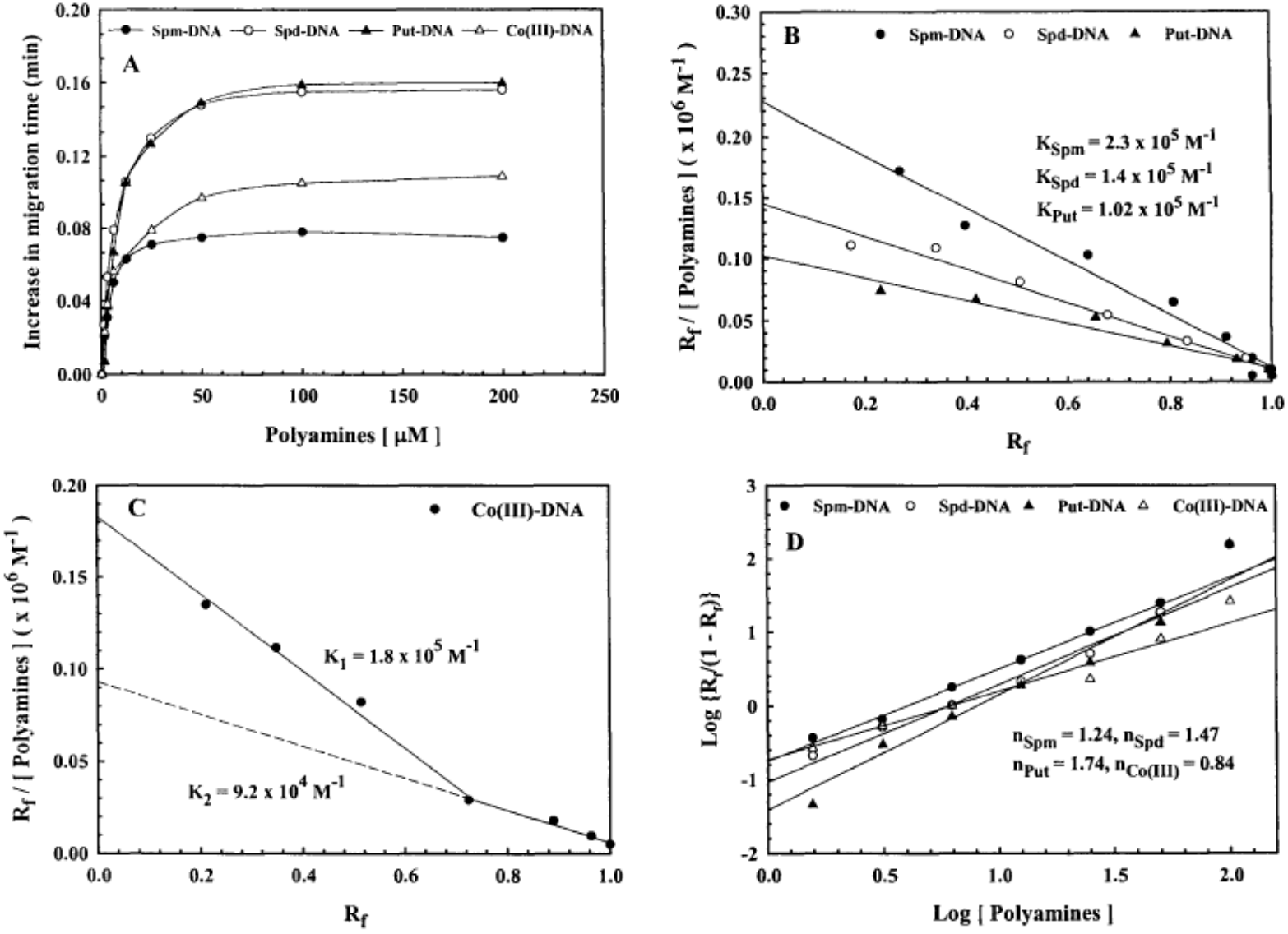


**FIGURE 4.6 :** **(A) Plot of increase in migration time (in minutes) of polyamine-DNA complexes from capillary electrophoresis following incubation of a constant concentration of DNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. The increase in migration time of the polyamine-DNA complexes was determined by subtracting the migration time of pure DNA from that of each polyamine-DNA adducts. (B and C) Scatchard plots for biogenic polyamine-, and cobalt(III)hexamine-DNA complexes, respectively. (D) Hill plots for polyamine-DNA complexes.**

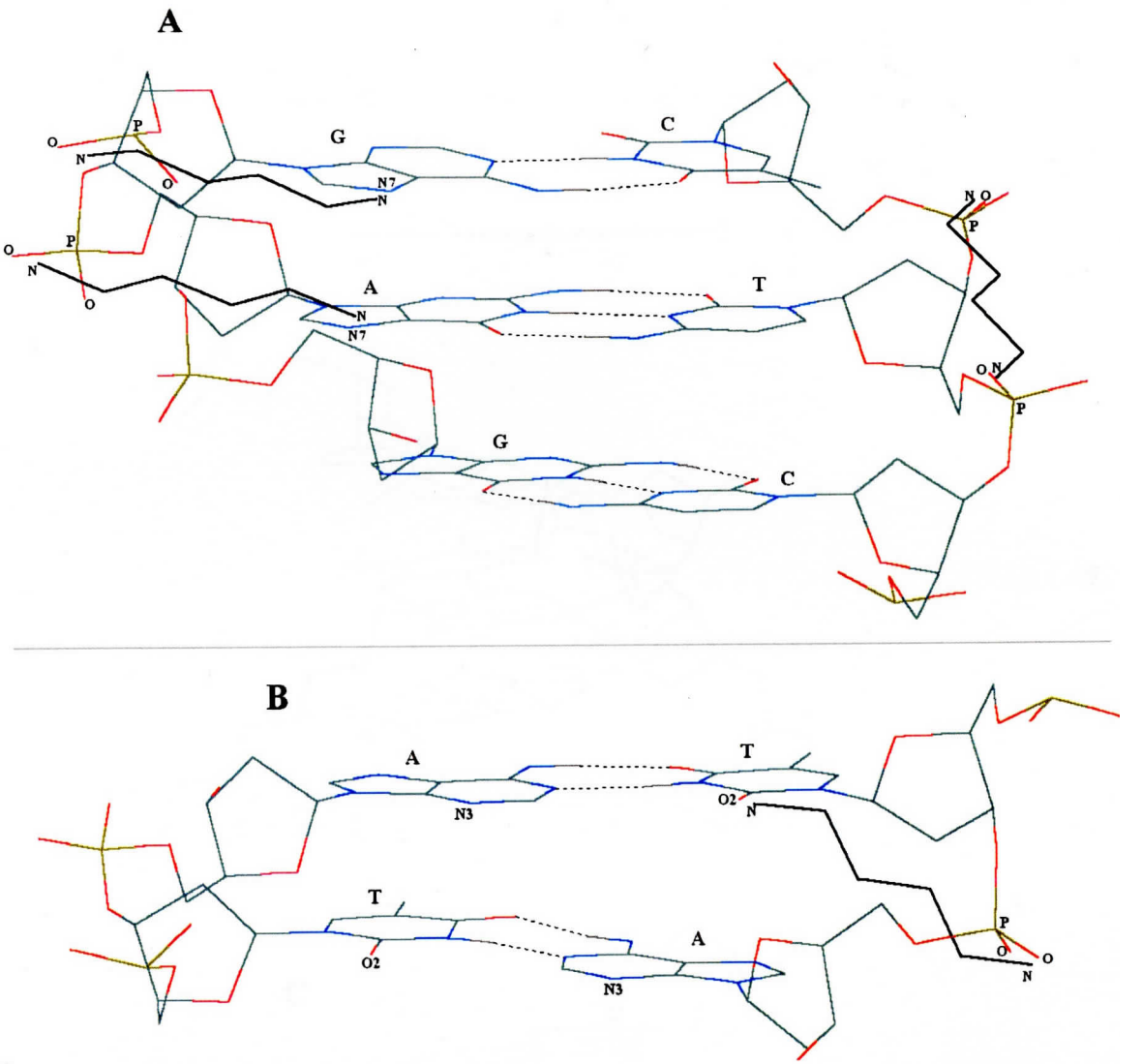


**FIGURE 4.7 : Preferential binding models proposed for putrescine-DNA complexes. (A) Phosphate and purine-N7, and phosphate-phosphate intra-groove from the same strand of the major groove. (B) Phosphate and thymine-O2 from the same strand of the minor groove.**

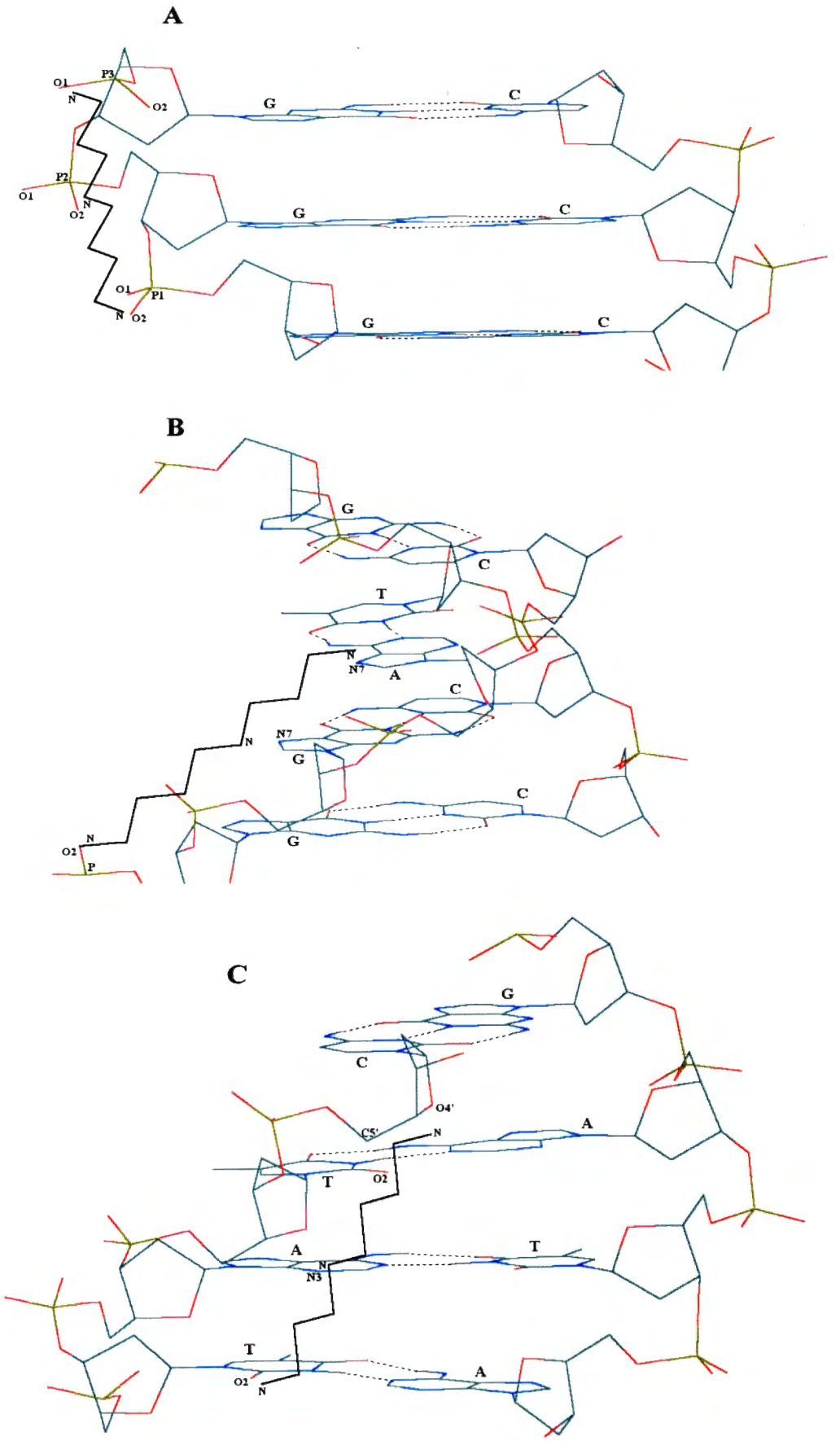


**FIGURE 4.8 :** **Preferential binding models proposed for spermidine-DNA complexes. (A) Three phosphates adjacent from the same strand of the major groove. (B) Intrastrand across the major groove. (C) Intrastrand across the minor groove.**

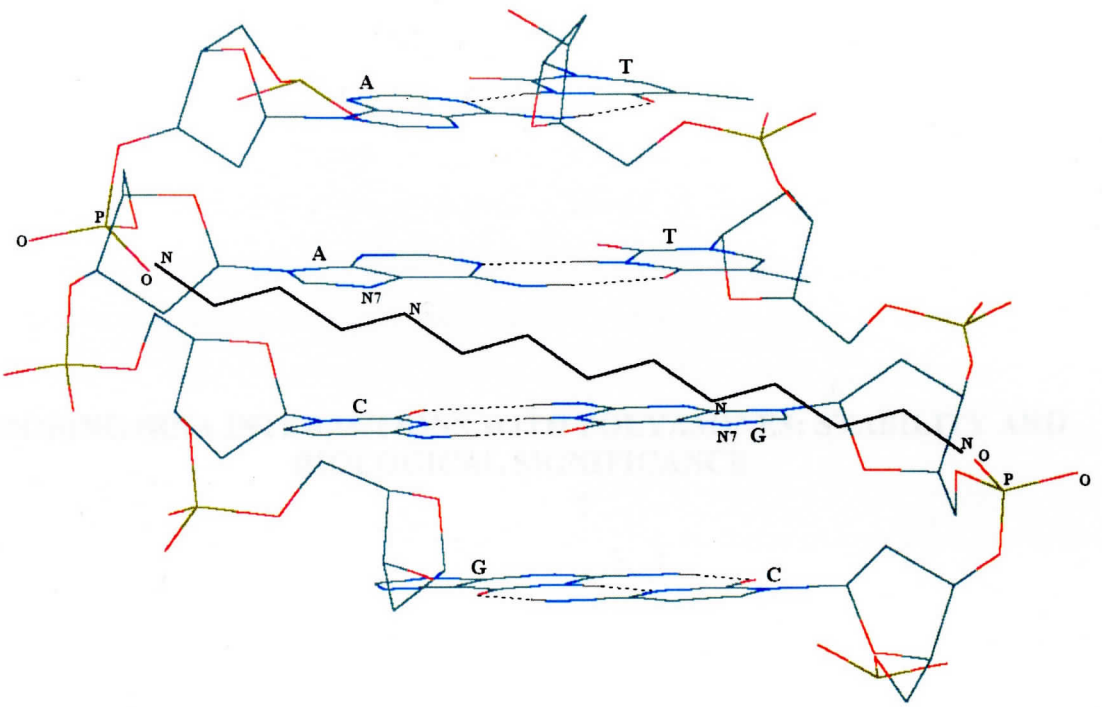


**FIGURE 4.9 : Preferential binding model proposed for spermine-DNA complexes.**

# CHAPITRE V

## PROBING tRNA INTERACTIONS WITH POLYAMINES: STABILITY AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Le contenu de ce chapitre a été soumis pour fin de publication dans le journal Biochimica et Biophysica Acta: Ahmed Ouameur, A. and H. A. Tajmir-Riahi. Probing tRNA interactions with polyamines: stability and biological significance.

## 5.1 Résumé

Il a été démontré que les polyamines endogènes peuvent moduler la synthèse protéique à différents niveaux. Cet effet peut être expliqué par la capacité des polyamines à se lier et influencer la structure secondaire de l'ARNt, l'ARNm et l'ARNr. Dans cette étude, nous rapportons l'interaction entre l'ARNt et les polyamines endogènes (putrescine, spermidine et spermine) et le cobalt(III)hexamine, à pH physiologique, en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et l'éléctrophorèse capillaire. Les résultats ont montré que l'ARNt a été stabilisée à basses concentrations en polyamines endogènes suite aux interactions avec les bases et le sucre de l'ARNt. À des concentrations élevées en polyamines, on a constaté un effect hyperchromique avec la putrescine, ce qui lui a permis de se lier avec les régions simple brin de l'ARNt. Les sites préférentiels de liaison des polyamines sur l'ARNt sont légèrement différents de ceux proposés pour les complexes polyamine-ADN. À basses concentrations en polyamines, les principaux sites de liaison sont N7/O6 de la guanine, O2/O4 de l'uracile, N3 de l'adénine et 2'OH du ribose. Pour le cobalt(III)hexamine, les sites préférentiels de liaison sont N7 de guanine, O2 de l'uracile, O2/N4 de cytosine et les groupements phosphates. Aux concentrations élevées des polycations, les sites imliqués dans les interactions sont N7/O6 de la guanine, N7 de l'adénine, O2 de l'uracile et les groupements phosphates. Nous avons aussi démontré la participation des groupes amines primaires des polycations dans l'interaction et la présence des contacts hydrophobes. L'affinité des polyamines endogènes pour l'ARNt est dans l'ordre spermine > spermidine > putrescine, ce qui est en corrélation avec leur contenu en groupes amines chargés positivement. L'analyse de Hill a montré une cooperativité positive pour les polyamines endogènes et négative pour le cobalt(III)hexamine. Le cobalt(III)hexamine possède deux affinités pour l'ARNt qui ont été attribuées aux interactions avec l'atome N7 de la guanine et les groupements phosphates. Ce mécanisme de liaison du cobalt(III)hexamine à l'ARNt pourait expliquer le phénomène de condensation observé à concentration elevée du Co(III), comme déjà démontré dans les complexes de Co(III)-ADN.

# Probing tRNA Interactions with Polyamines: Stability and Biological Significance

**Amin Ahmed Ouameur and Heidar-Ali Tajmir-Riahi***

Department of Chemistry-Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7 Canada

**Keywords:** tRNA; polyamines; preferential binding site; binding constant; hyperchromism; hypochromism; condensation; tRNA stability; FTIR spectroscopy; affinity capillary electrophoresis (ACE).

**Abbreviations:** Spm, spermine; Spd, spermidine; Put, putrescine; Co(III), cobalt(III)hexamine; CE, capillary electrophoresis; ACE, affinity capillary electrophoresis; FTIR, Fourier transform infrared; tRNA, transfer RNA; A, adenine; G, guanine; C, cytosine; U, uracil; r, polyamine/tRNA(P) molar ratio.

**Running title:** Probing tRNA interactions with biogenic polyamines

***Corresponding Author:** Tel: (819) 376-5052 (ext. 3310); Fax: (819) 376-5084;

Email: tajmirri@uqtr.ca

## 5.2 Summary

Biogenic polyamines were found to modulate protein synthesis at several differents levels. This effect may be explained by the ability of polyamines to binds and influence secondary structure of tRNA, mRNA and rRNA. We report the interaction between tRNA and the three biogenic polyamines putrescine, spermidine and spermine as well as cobalt(III)hexamine at physiological conditions using FTIR spectroscopy and capillary electrophoresis. The results indicated that tRNA was stabilised at low biogenic polyamines concentration, as a consequence of the interaction with the base and sugar residues. At high polyamine concentration, putrescine interaction gives rise to the hyperchomic effect, which allows polycation binding to single stranded region of tRNA molecules. The polyamine preferential binding sites are slightly different from those proposed for polyamine-DNA adducts. The main reactive sites for biogenic polyamine were guanine-N7/O6, uracil-O2/O4, adenine-N3 and 2'OH of the ribose at low polycation concentrations. The cobalt(III)hexamine preferential binding sites are guanine-N7, uracil-O2, cytosine-O2/N4 reactive sites and the backbone phosphate group. At high polycation content the interaction involves guanine-N7/O6, adenine-N7, and uracil-O2 reactive sites, as well as phosphate group. The participation of the primary amino group of the polycation in the interaction and the presence of hydrophobic contact are also shown. The binding affinity of biogenic polyamine to tRNA molecule was in order spermine > spermidine > putrescine, which correlate with their positively charged amino group content. Hill analysis showed positive cooperativity for biogenic polyamines and negative cooperativity for cobalt-hexamine. Cobalt(III)hexamine contain high- and low-affinity sites in tRNA, that have been attributed to the interactions with guanine-N7 sites and phosphodioxy groups. The mechanism of tRNA binding could explain the condensation phenomenon observed at high Co(III) content, as previously shown in the Co(III)-DNA complexes.

## 5.3 Introduction

The biogenic polyamines putrescine, spermidine and spermine (figure 5.1) are small aliphatic polycationic compounds present in almost all living organisms. They are essential for normal cell growth and their concentrations increase with cell proliferation [1-5]. In mammalian cells, they are found in millimolar concentrations [1-3]. Of the many hypotheses advanced to explain their biological effects, the most important one concerns their interaction with nucleic acids [1, 2, 6, 7]. However, it seems that a large fraction of polyamines exist in a polyamine–RNA adducts, and the major part of their cellular function may be explained through structural changes of RNA by polyamines [2, 3, 8]. On the other hand, the potential effectiveness of polyamines analogs as antiprolifirative agents against many tumor cell lines and infectious diseases provides evidence for nucleic acids interaction with biogenic polyamines [9-13].

Interactions of polyamines with RNA are less understood than with DNA, and thus more specific theoretical and experimental studies of polyamine-RNA binding are required. The interactions of both spermine and spermidine with tRNA have been extensively studied using solution $^{1}$H-NMR [14, 15], $^{13}$C-NMR [16], and $^{15}$N-NMR [17, 18]. The authors observed that in all polyamines, internal $-NH_2^+-$ groups bind to tRNA more strongly than terminal $-NH_3^+$ groups. They suggest that factors other than the electrostatic interaction are responsible for this phenomenon since the primary amines ($-NH_3^+$) possess a higher density of positive charge than the secondary ones ($-NH_2^+-$). The $^{15}$N-NMR experiments suggest that the specificity by which the nitrogen atoms in polyamines bind to tRNA is a consequence of the various hydrogen bounds that can be established between both RNA and the polyamines. Interestingly, Bibillo *et al.* [19] found that biogenic polyamines are required for the non-enzymatic cleavage of tRNA and oligoribonucleotides at UA and CA phosphodiester bonds. This suggests that at least two linked protonated amino groups are necessary to mediate hydrolysis. They hypothesize that one ammonium group binds to the nucleotide while the second one participates in the activation of the labile phosphodiester bond (19). However, in spite of

these extensive studies, the binding sites of biogenic polyamines on tRNA are still not clearly established.

A spermine-$tRNA^{Phe}$ complex has been crystallized and its structure resolved at 2.5 Å resolution [20]. The polyamine binds at two major sites, the first in the major groove at the end of the anticodon stem and the second near the variable loop around phosphate 10 at a turn in the RNA backbone. However, NMR studies found that spermine and related polyamines bind to additional sites of tRNA, in particular at the juncture of the T$\psi$C and D loops, that were not seen in the crystal structure [14, 16, 18]. Binding of biogenic polyamines to tRNA has been shown to be relevant for optimal translational accuracy and efficiency [3]. They are found to modulate protein synthesis [21] and influence the binding of deacylated and acylated tRNA to the ribosomes [22, 23]. These effects may be explained by the ability of polyamines to bind and influence secondary structure of tRNA, mRNA and rRNA [3, 21-23].

Recently, we have published results of an infrared spectroscopy, capillary electrophoresis and molecular modeling studies on the interaction between DNA and biogenic polyamines, and cobalt(III)hexamine [24]. In this article, several binding models were proposed for biogenic polyamines and their biological significances have been reported. The aim of this work was to extend our knowledge pertaining the effects of the polyamines on nucleic acids by studying the interactions of biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine with tRNA using capillary electrophoresis as well as Fourier transform infrared spectroscopy, and to establish a correlation between our results and the significance of the polyamine-tRNA complex formation *in vivo*. Cobalt(III)hexamine was included in this study (as a control model) because it is an inorganic polyamine that is known to bind RNA at the guanine N7 and at the phosphate oxygen atoms in the major groove of GAAA tetraloop [25, 26]. It has been shown that cobalt(II)hexamine induced DNA condensation and conformational transitions (24).

In the present study, we report the interactions of tRNA with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine cations using Fourier transform infrared and affinity capillary

electrophoresis. The bindings of polyamines to tRNA major and minor grooves and the backbone phosphate group are determined and the effects of polyamines on the stability and conformation of tRNA is reported. Furthermore, comparisons were made between tRNA-polyamine complexes with those of the corresponding DNA-polyamine adduct and the major differences are discussed herein.

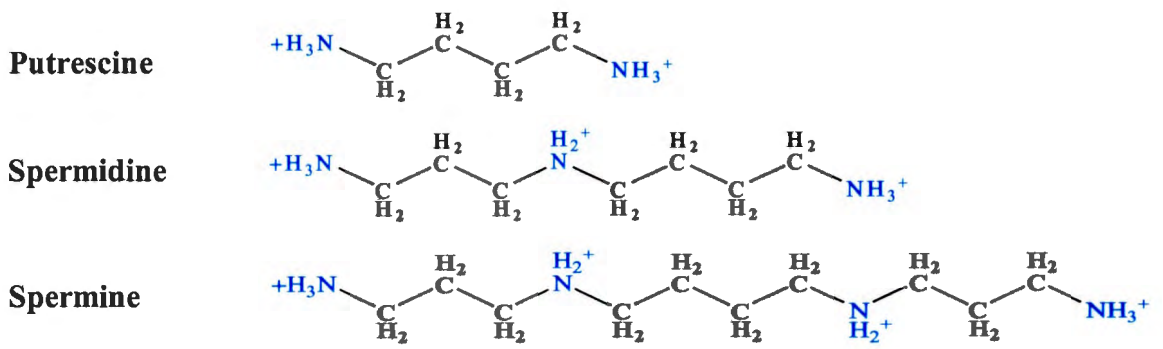


**FIGURE 5.1 : Chemical structures of biogenic polyamines putrescine, spermidine and spermine.**

## 5.4 Materials and methods

### 5.4.1 Materials

Biogenic polyamines (spermine, spermidine and putrescine) and cobalt(III)-hexamine were purchased from Sigma Chemical Company. Mixed tRNA from Baker's yeast was purchased from Sigma Chemical Co., and used as supplied [27]. To check the protein content of tRNA solution, the absorbance at 260 and 280 nm was used. The $A_{260}/A_{280}$ ratio was 2.2 showing that the tRNA was sufficiently free from protein [28]. Other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

### 5.4.2 Preparation of stock solutions

Stock tRNA solution was prepared by dissolving 10 mg of tRNA in 50 mM NaCl buffer (pH 7.0) at 5 °C for 24 h with occasional stirring to ensure the formation of a homogeneous solution. The final concentration of the stock tRNA solution was determined spectrophotometrically at 260 nm using molar extinction coefficient $\varepsilon_{260}$ = 9250 $cm^{-1}$ $M^{-1}$ (expressed as molarity of phosphate groups) [29]. The UV absorbance at 260 nm of a diluted solution (1/250) of tRNA used in our experiments was measured to be 0.925 (path length was 1 cm) and the final concentration of the stock tRNA solution was calculated to be 25 mM in RNA phosphate. The appropriate amount of polyamines (0.3 to 25 mM) was prepared in distilled water and added dropwise to tRNA solution in order to attain the desired polyamine/tRNA(P) molar ratios (r) of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4, 1/2, and 1 at a final tRNA concentration of 12.5 mM (5 mg/ml), for infrared measurements. For capillary electrophoresis, the polyamine/tRNA(P) ratios were 1/800, 1/400, 1/200, 1/100, 1/50, 1/25, 1/12.5 and 1/6.25 with a final tRNA concentration of 1.25 mM. The pH of the solutions was adjusted at 7.0 ± 0.2 with pH meter ORION model 210A, using NaOH solution.

### 5.4.3 FTIR spectra

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. Spectra were collected after 2 h incubation of polyamine with the polynucleotide solution and measured in triplicate (three individual samples with the same polynucleotide and polyamine concentrations). Interferograms were accumulated over the spectral range 400-4000 $cm^{-1}$ with a nominal resolution of 2 $cm^{-1}$ and a minimum of 100 scans. The difference spectra [(tRNA solution + polyamine) - (tRNA solution)] were obtained, using a sharp tRNA band at 913 $cm^{-1}$ as internal reference. This band, which is due to ribose C-C stretching vibrations, exhibits no spectral changes (shifting or intensity variation) upon polyamine-tRNA complexation, and cancelled out upon spectral subtraction [30, 31].

The plots of the relative intensity (R) in arbitrary units of several peaks of tRNA in-plane vibrations related to A-U, G-C base pairs and the $PO_2$ stretching vibrations such as 1698 (guanine), 1653 (uracil), 1608 (adenine), 1488 (cytosine) and 1244 $cm^{-1}$ ($PO_2$ groups), versus the polyamine concentrations were obtained after peak normalization using:

$$R_i = \frac{I_i}{I_{913}} \qquad [1]$$

where $I_i$ is the intensity of absorption peak for pure tRNA and tRNA in the complex with $i$ concentration of polyamine, and $I_{913}$ is the intensity of the 913 $cm^{-1}$ peak (internal reference).

### 5.4.4 Capillary electrophoresis (CE)

A PACE System MDQ (Beckman) with photodiode array detector was used to study polyamine-tRNA interaction. An uncoated fused silica capillary of 75 μm i.d. (total length of 57 cm) and effective length of 50 cm (to the detector) was used. The capillary was conditioned each day by rinsing with 1 N sodium hydroxide for 30 min, followed by a 15 min wash with 0.1 N sodium hydroxide. Then it was rinsed with running buffer for 30 min at high pressure (50 psi), followed by a baseline run for 20 min at the voltage to be used for the experiments (25 kV). Between runs, the capillary was rinsed with NaOH 1N for 2 min, followed by rinsing with running buffer for 3 min at high pressure. The capillary was flushed with distilled deionized water for 30 min at the end for each day and filled with deionized water overnight. Samples were injected using a voltage injection at 10 kV for 5 s. Electrophoresis was carried out at a voltage of 25 kV for 10 min using normal polarity. All runs were carried out at 25 °C. The capillary inlet and outlet vials were replenished after every five runs. The polyamine binding experiments were performed in a sample buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.0 ± 0.2, using constant concentration of tRNA (1.25 mM) and variable concentrations

of polyamines. The stock solutions of polyamines (2.5 mM) and tRNA (2.5 mM) were prepared in the sample buffer. The solutions were mixed to attain polyamine/tRNA(P) molar ratios of 1/800 to 1/6.25 in the presence of 1.25 mM of tRNA. Each sample was allowed to equilibrate for 30 min and tested with two separate runs for the same stock solution. The electropherograms were monitored at 260 nm and were collected and analysed with the Beckman P/ACE Windows controller software.

#### 5.4.4.1 Data analysis

Affinity capillary electrophoresis (ACE) was used to detect a shift in mobility when polyamine binds to tRNA. The binding constants for the polyamine-tRNA complexes can be determined by Scatchard analysis, using mobility shift of tRNA complexes [32, 33]. The extent of saturation ($R_f$) of the tRNA was determined from the change of the migration time of tRNA in the presence of various concentrations of polyamine by the following equation:

$$R_f = \frac{\Delta m}{\Delta m_s} \qquad [2]$$

where $\Delta m$ is the difference in migration time between pure tRNA and its complexes at different polyamine concentrations, while $\Delta m_s$ correspond to the difference in migration time between pure tRNA and tRNA-saturated complex.

The binding constant $K_b$, given by

$$K_b = \frac{[\text{polyamine - tRNA adduct}]}{[\text{tRNA}][\text{polyamine}]} \qquad [3]$$

was determined by fitting the experimental values of $R_f$ and polyamine concentration to the equation :

$$R_f = \frac{K_b[\text{polyamine}]}{1 + K_b[\text{polyamine}]} \qquad [4]$$

Rearrangement of this gives a convenient form for Scatchard analysis:

$$\frac{R_f}{[\text{polyamine}]} = K_b - K_b R_f \qquad [5]$$

Capillary electrophoresis has become a useful technique for measuring binding constants [34]. Using affinity capillary electrophoresis (ACE) method, many ligand-polynucleotide complexes have been successfully identified in our laboratory [24, 30, 35 -38].

The cooperativity of the binding can be analyzed using a Hill plot. Assuming one binding site for polyamine (equation 5), the equation below (Hill equation) can be established:

$$\log \frac{R_f}{1 - R_f} = \text{n} \log[\text{polyamine}] + \log K_d \qquad [6]$$

where, $n$ (Hill coefficient) measures the degree of cooperativity and $K_d$ is the dissociation constant. The linear plot of $\log\{R_f/(R_f - 1)\}$ versus log[polyamine] has a slope of n and an intercept on the log[polyamine] axis of $\log K_d/\text{n}$. The quantity n increases with the degree of cooperativity of a reaction and thereby provides a convenient and simplistic characterization of a ligand-binding reaction (39).

## 5.5 Results and discussion

### 5.5.1 Interaction of polyamines with tRNA studied by FTIR spectroscopy

#### 5.5.1.1 General features of infrared spectra of tRNA

The infrared spectra of tRNA solutions (Fig. 5.2 and 5.3, first spectrum) were found to be similar to that of double-stranded RNA and to that of double-stranded DNA in A-form [27, 30, 31, 35, 40-43]. Table 5.1 summarizes the relevant frequencies and assignments of the main infrared bands of tRNA. Bands appearing between 1700 and 1550 $cm^{-1}$ were assigned to in-plane vibration of double bonds of the bases. The intense infrared band at 1698 $cm^{-1}$ were mainly assigned to the C=O and C=N stretching vibration from guanine residues [27, 30, 31, 35]. Both the C6=O and C8=N7 bonds are located in the major groove of double stranded tRNA; the N7 atom is the main target for cation-RNA binding since it is not involved in the Watson-Crick hydrogen bond pairing. The second strong band at 1653 $cm^{-1}$, was mainly assigned to the C=O stretching vibration of uracil [27, 30, 31, 35]. This band contains both C2=O and C4=O modes and the major contribution to its intensity comes from the C2=O stretching vibration, which is not involved in the Watson-Crick hydrogen bond pairing. The C2=O bond is located in the minor groove, while the C4=O bond is positioned in the major groove of the double-stranded tRNA. The band at 1608 $cm^{-1}$ was assigned mainly to the adenine residues [27, 30, 31, 35]. Theoretical calculations for the adenine vibrational frequencies [44] demonstrated that the normal mode for the band at 1608 $cm^{-1}$ contained major contributions from N7, N9 and N3 atoms. The N7 and N3 atoms are the main sites for cation interaction and are located in the major and the minor grooves of tRNA duplex, respectively.

Other infrared bands related to RNA vibrations were examined in the region between 1550 and 1250 $cm^{-1}$. These absorptions were assigned to in-plane ring vibration of the bases and contain some marker of A-form RNA [27, 30, 31, 35, 40].

The most important absorption is located at 1488 $cm^{-1}$, which is attributed to cytosine in-plane ring vibration [27, 30, 31, 35, 40]. Other vibrationas at 1529 $cm^{-1}$ (cytosine), 1398 $cm^{-1}$ (guanine in anti conformation) and 1337 $cm^{-1}$ (adenine and uracil) are related to the G-C and A-U base pairs [27, 30, 31, 35, 40].

The backbone phosphate group vibrational frequencies appeared as strong bands in the region 1250–1080 $cm^{-1}$ of tRNA spectrum (Fig. 5.2 and 5.3). The two strong absorption bands located at 1244 and 1086 $cm^{-1}$ were assigned mainly to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the $PO_2^-$ groups, respectively [35, 42-46]. The spectral region 1080-800 $cm^{-1}$ contains several infrared marker bands of RNA in A-conformation corresponding to the phosphodiester chain coupled with the ribose vibrational modes [40, 41, 43, 45]. Finally, several absorption bands in the region 800-600 $cm^{-1}$ were attributed to the out-of-plane ring modes of the RNA bases; 782 $cm^{-1}$ (pyrimidine), 721 $cm^{-1}$ (adenine), 690 $cm^{-1}$ (guanine) and 642 $cm^{-1}$ (uracil) [40, 41, 46].

#### 5.5.1.2 Infrared spectra of tRNA–polyamine complexes at low polycation concentrations (r=1/80-1/20)

The FTIR spectral features of tRNA-polyamine complexes between 1800 and 600 $cm^{-1}$ are presented in Fig. 5.2 and 5.3. Molar ratios from 1/80 to 1/4 were studied for spermine, spermidine and cobalt(III)hexamine. Higher concentrations could not be investigated due to RNA precipitation. For putrescine, molar ratios up to 1 were studied without precipitation under our experimental settings. Similar concentrations were also used for polyamine-calf-thymus DNA complexes for comparative purposes. These ranges are physiologically justified since millimolar concentrations of polyamines have been found in the nucleus of eucaryotic cells [47].

Important shifting of the absorption bands of pure tRNA was observed in the region (1700-1550 $cm^{-1}$) upon polyamine complexation. The bands at 1698 $cm^{-1}$ (guanine C7=N, C6=O) and 1653 $cm^{-1}$ (uracil C=O) were shifted by several $cm^{-1}$ (3-6 $cm^{-1}$) upon the interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine (Fig. 5.2

and 5.3, r=1/80). The shifting was associated with increase in relative intensities. The most important increase in intensity was observed mainly for a guanine band at 1698 $cm^{-1}$ (10-17 %) and uracil band at 1653 $cm^{-1}$ (10-13 %), (Fig. 5.4, r=1/80-1/40). Concerning the adenine vibration, the band (1608 $cm^{-1}$) exhibited no shifting and no major intensity changes at low polyamines concentrations (Fig. 5.2, 5.3 and 5.4). The spectral features observed in the difference spectra of the polyamine-tRNA complexes are consistent with the mentioned spectral changes (Fig. 5.2 and 5.3). Positive bands at 1694 $cm^{-1}$ and 1656 $cm^{-1}$ (Spm-tRNA diff. spectra), 1705 $cm^{-1}$ and 1659 $cm^{-1}$ (Spd-tRNA diff. spectra), 1700 $cm^{-1}$ and 1668 $cm^{-1}$ (Put-tRNA diff. spectra), and 1720 $cm^{-1}$, 1689 $cm^{-1}$ and 1650 $cm^{-1}$ (Co(III)-tRNA diff. spectra) are attributed to the interaction of polycation with guanine (C6=O, C=N7) and uracil (C=O) reactive sites, respectively. No major spectral differences were observed for adenine band (1608 $cm^{-1}$) in the difference spectra of the polyamine-tRNA adducts, which indicates no participation of adenine in the polycation – tRNA binding (Fig 5.2 and 5.3).

Other DNA vibrational frequencies in the region 1550–1250 $cm^{-1}$ (in plane ring vibration of the bases) showed minor spectral changes upon polyamine interaction. No major spectral shifting was observed for the bands at 1529 $cm^{-1}$ (G and C), 1488 $cm^{-1}$ (mainly C), 1398 $cm^{-1}$ (G) and 1337 $cm^{-1}$ (C), (Fig. 5.2 and 5.3). In addition the relative intensity of the cytosine band (1488 $cm^{-1}$) did not change significantly at low biogenic polyamine concentrations (Fig. 5.4, A, B and C). In the case of cobalt(III)hexamine, the band 1488 $cm^{-1}$ was shifted upward by 2 $cm^{-1}$ (Fig. 5.3B), which is due to the effect of cobalt guanine N7 binding on the G-C vibrational modes. This finding was supported by the positive feature at 1470 $cm^{-1}$ observed in the difference spectra of cobalt(III)hexamine-RNA adducts (Fig. 5.3B).

In the phosphate region (1250–1080 $cm^{-1}$), only cobalt(III)hexamine induced appreciable shifting (3 $cm^{-1}$) for the band at 1244 $cm^{-1}$ (asymmetric $PO_2^-$ stretch), whereas the band at 1086 $cm^{-1}$ (symmetric $PO_2^-$ stretch) shifted by only 1 $cm^{-1}$. As for the biogenic polyamines, the phosphate bands did not show considerable shifting. However, three new bands, 1267 $cm^{-1}$, 1202 $cm^{-1}$ and 1178 $cm^{-1}$ appeared in the

difference spectra of cobalt(III)hexamine (Fig. 5.2 and 5.3). This indicates a weaker interaction of the biogenic polyamines with phosphate groups than that of cobalt(III)hexamine cation.

In our previous study on polyamine-DNA interactions, we found no evidence suggesting the interaction between the polyamines and deoxyribose [24]. However, by examining the spectral region 1100-800 $cm^{-1}$ of the polyamine-tRNA complexes, we observed some spectral perturbations upon polyamine complexation. In fact, the band 1063 $cm^{-1}$ (C-O ribose stretch) shifts by 2-3 $cm^{-1}$ in the all four polyamine-tRNA complexes. In addition, the bands 992 $cm^{-1}$ (C-C ribose stretch) and 862 $cm^{-1}$ (ribose-phosphodiester bound) shifted by 2-3 $cm^{-1}$ in the biogenic polyamine-tRNA and cobalt(III)hexamine-tRNA complexes, respectively (Fig. 5.2 and 5.3). The spectral changes observed can be attributed to a minor polycation interaction with the ribose moieties. It should be noted that the interaction of polyamine cation with ribose 2'-OH was previously reported (48). However, the polycation-ribose interaction is more pronounced at high biogenic polyamine concentrations (discussed furtheron).

Other tRNA vibrational frequencies in the region 800–600 $cm^{-1}$ showed minor spectral changes upon polyamine complexations. Bands appearing in this region were assigned to the out-of-plane vibration of the bases [40, 41, 46]. The band at 782 $cm^{-1}$ (pyrimidine) shifted by 2 $cm^{-1}$ after addition of spermine and spermidine, while changed only by 1 $cm^{-1}$ in the case of putrescine and cobalt(III)hexamine cations (Fig. 5.2 and 3.3). The band at 721 $cm^{-1}$ (adenine) shifted by 2-3 $cm^{-1}$ upon addition of biogenic polyamines, which is indicative of other sites than N7 participation in cation interaction. The adenine-N3 site, located in the minor groove of the double helix region, could be a good target since it is not involved in the Watson-Crick network of base pairing. Finally, the band 690 $cm^{-1}$ (guanine) shifted downward by several $cm^{-1}$ in all four polyamine-tRNA complexes (Fig. 5.2 and 5.3).

Interestingly, the infrared spectra of spermine and spermidine (Fig. 5.4, A and B) at molar ratios between 1/40 and 1/10 show a general decreasing (hypochromism) in

intensity of bands at 1698, 1653, 1608 and 1244 $cm^{-1}$. This fact has been attributed to increase base staking and base pairing as consequence of polycation interactions [24]. Since the hypochomism effect was observed at high molar ratio (1/4) in the polyamine-DNA complexes [24], we concluded that at low concentration, spermine and spermidine are more effective in binding tRNA than DNA. In this way, spermine and spermidine could stabilize tRNA structure at low cation content, while highly polymerised calf-thymus DNA was stabilized at high polyamine concentrations [24]. It has been shown that protein synthesis was stimulated at low polyamine (spermidine) concentration [21]. The results are consistent with our findings that tRNA duplex stabilized at low polyamine concentrations. This also suggests that polyamine increase the binding of Met-tRNA to the ribosome subunits [21], as a consequence of polyamine interactions with tRNA, which contributes to duplex stability.

#### 5.5.1.3 Infrared spectra of tRNA–polyamine complexes at high polycation concentration (r=1/4)

Major spectral changes were observed at high polyamine concentrations. As polycation concentration increased (r=1/4), larger frequency shifting was observed in double bond region. The strong band at 1698 $cm^{-1}$ (guanine, C=O6/N7) shifted downward by several $cm^{-1}$ in the spectra of all four polycations (Fig. 5.2 and 5.3). This showed the preferential binding site for the polycations is the N7-guanine site, since the O6 is involved in the Watson-Crick network of base pairing. Other bands at 1653 $cm^{-1}$ (U, C=O2/O4) and 1608 $cm^{-1}$ (A, C=N7) also shifted appreciably (2-5 $cm^{-1}$) at high polycation concentration (Fig. 5.2 and 5.3). These results are supported by the infrared difference spectra showed in the bottom of the Fig. 5.2 and 5.3. The positive features at 1700, 1651 and 1607 $cm^{-1}$ (for spermine), 1707, 1651 and 1600 $cm^{-1}$ (for spermine), 1693, 1651 and 1605 $cm^{-1}$ (for putrescine), 1688, 1650 and 1592 $cm^{-1}$ (for cobalt(III)hexamine) are attributed to the polycation interactions with guanine-N7, uracil-O2 and adenine-N7 reactive sites, respectively (Fig. 5.2 and 5.3).

Fig. 5.4C, shows the relative intensity changes of the IR marker bands in the presence of putrescine at various polycation concentrations. An important increase in intensity of the marker bands appears when the polyamine concentration increased to a maximum at high putrescine concentration (r = 1). This increase in intensity is called the hyperchromic effect [49] and it is provoked by the base unstaking and unpairing as a consequence of the helix destabilization [50]. The helix opening contributed to putrescine binding to the single-strand region, such as the loop regions of tRNA molecules at high putrescine content. It has been demonstrated that higher concentrations of polyamine are inhibitory for the protein synthesis [21]. Hyperchromic effect observed at high putrescine concentrations (Fig. 5.4 C, r = 1/2 to 1) could explain the inhibition of protein synthesis by high polyamine concentrations. For spermine and spermidine, the hyperchromic effect was not observed since the maximum concentration used is at molar ratio r = 1/4 (to ovoid precipitation).

The infrared spectra at the higher concentrations studied in each case allowed us to detect new bands between 1600 and 1300 $cm^{-1}$ for the biogenic polyamine-tRNA complexes. In fact, the bands measured at 1572, 1483, 1332 $cm^{-1}$ for spermine, 1577, 1485, 1333 $cm^{-1}$ for spermidine, 1577, 1491, 1348 $cm^{-1}$ for putrescine (Fig. 5.2 and 5.3) were assigned to the N-H bending vibration of the $NH_3^+$ groups, methylene scissoring vibrations and symmetric bending mode of methyl groups, respectively [49, 51]. These bands shifted by 3-11 $cm^{-1}$ with respect to the infrared spectra of the free polyamines (Fig. 5.2 and 5.3), supporting an active participation of the primary amino groups in the interaction and the existence of the hydrophobic contact with the methyl groups of tRNA. The positive features measured in the difference spectra of each biogenic polyamine, namely 1579, 1480, 1320 $cm^{-1}$ (spermine), 1485, 1324 $cm^{-1}$ (spermidine), 1574, 1494, 1351 $cm^{-1}$ (putrescine) support the polycation interactions (hydrogen binding, hydrophobic contact) with the polynucleotide. In the infrared spectra of the Co(III)-tRNA complexe at high cobalt(III)hexamine content (Fig. 5.4B), the new band measured at 1327 $cm^{-1}$ is assigned to the $NH_3^+$ symmetric deformation mode of cobalt(III)hexamine [52] and is not arising from tRNA vibration, which suggest that cobalt might bind tRNA by hydrogen bonding.

The interaction between the polyamines and the backbone phosphate groups is evidenced by the shifting of the bands at 1244 $cm^{-1}$ ($\nu_{as}PO_2^-$) and 1088 $cm^{-1}$ ($\nu_sPO_2^-$) by several $cm^{-1}$ at higher polyamine concentrations. The positive features in the difference spectra, namely at 1242 and 1084 $cm^{-1}$ for spermine and spermidine, and at 1238 and 1073 $cm^{-1}$ for putrescine, and 1224 and 1071 $cm^{-1}$ for cobalt(III)hexamine (Fig. 5.2 and 5.3) are due to polycation-phosphate interactions. The negative bands observed in the phosphate (1256 $cm^{-1}$) and ribose (1133, 992 and 918 $cm^{-1}$) regions of the difference spectra of cobalt(III)hexamine indicate negligible amount of tRNA condensation. Major DNA condensation was observed upon cobalt(III)hexamine-DNA complexation at high polycation content [24].

The spectral change observed in the region 1080-800 $cm^{-1}$ exhibit polycation interaction with the ribose moiety of tRNA. The bands at 1100, 1066, 995, 968 $cm^{-1}$ assigned to the ribose C-O and C-C ribose modes showed major spectral shifting upon biogenic polyamine complexations. At high polycation content the band at 1105 $cm^{-1}$ lost its intensity and shifted towards a lower frequency at 1097 $cm^{-1}$ (Fig 5.2 and 5.3). Similarly the band at 1063 $cm^{-1}$ was observed at 1066 $cm^{-1}$ in the spectra of polyamine-tRNA adducts (Fig. 5.2). The spectral changes were less pronounced for the cobalt(III)hexamine-tRNA complexes. This indicates some degree of polycation-ribose interactions (H-bonding) upon polyamine complexations. Polyamine interactions with ribose 2'-OH was previously noted in a series of polycation-tRNA complexes (48). However, the bindings of the polycations to biopolymer did not induce RNA conformational changes. In fact, there was no major shifting of the A-form RNA marker bands such as 810 and 862 $cm^{-1}$ (ribose-phosphodiester) upon polycation adduct formation. This indicated that tRNA remains in the A-family structure in these polyamine-RNA complexes.

### 5.5.2 Interaction of polyamines with tRNA studied by capillary electrophoresis

RNA is considered to be more accessible target than DNA for biogenic polyamines [3]. To examine further the interaction of polycations with RNA, binding

parameters of polycation-tRNA complexes were determined by capillary electrophoresis. The experimental data related to the migration times of pure tRNA and its complexes with different concentrations of biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine are shown in Table 5.2.

The saturation curve (Fig. 5.5A) shows a change in the migration time of tRNA after addition of different concentration of polycation. As polycation concentration reached 12.5 μM for spermine, 25 μM spermidine and cobalt(III)hexamine, and 50 μM for putrescine (Table 5.2), no appreciable changes were measured for the polycation-tRNA complexes. Based on these results, binding constants of the polycation-tRNA complexes were determined by Scatchard analysis as described in *Materials and Methods*. Scatchard analysis for the biogenic polyamine-tRNA adducts showed one overall binding constant for each polyamine, namely $K_{Spm} = 8.7 \times 10^5\ M^{-1}$, $K_{Spd} = 6.1 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_{Put} = 1.0 \times 10^5\ M^{-1}$ (Fig. 5.5B). The stability was in order spermine > spermidine > putrescine. This finding is in agreement with NMR studies [14-18] which found that the secondary amino groups ($-NH_2^+-$) of polyamine bind more strongly than the primary amino groups ($-NH_3^+$). In fact, spermine contains two $-NH_2^+-$ groups, spermidine one, while putrescine doesn't contain secondary amino group. Scatchard analysis of the data for the cobalt(III)hexamine-tRNA complexes showed high- and low-affinity sites with binding constant of $K_1 = 3.2 \times 10^5\ M^{-1}$ and $K_2 = 1.7 \times 10^5\ M^{-1}$, respectively (Fig. 5.5C). These results suggest that cobalt(III)hexamine binds at two distinct binding sites on tRNA molecule. Furthermore, it may be speculated that the stronger interaction is due to binding at guanine-N7 atom, while the weaker is due to its binding with phosphate oxygen atom in the major groove of RNA duplex, in agreement with our infrared data and other studies [25, 26].

The analysis of the cooperativity of the binding process between the polyamines and tRNA has been done (Fig. 5.5D). The Hill coefficients, n, calculated for the biogenic polyamineswere 1.42, 1.14, and 1.12, for spermine, spermidine and putrescine, respectively. Since the value obtained were all greater than one, this mean a positive cooperativity binding of biogenic polyamines with tRNA (39). In contrast, the Co(III)-

tRNA interaction was characterized by a negative cooperativity (n<1) (Fig. 5.5D). Our data on the binding parameters of the four polycations to tRNA are comparable to that measured for polyamine-DNA complexes [24]. This finding may reflect some common molecular mechanism for DNA and tRNA binding. Undoubtedly, one of the most important roles of these polyamines *in vivo* is to stabilize the nucleic acids.

In conclusion, our results demonstrate that biogenic polyamines are capable to stabilise the structure of tRNA at low concentration. This is evidenced by a decrease in intensity of several infrared bands (hypochromic effect), which is observed at higher concentrations in their interactions with calf-thymus DNA [24]. At high polyamine concentrations the hyperchromic effect were observed only in the complex putrescine-tRNA as a consequence of helix destabilization. These are in accordance with the finding that the polyamines modulate protein synthesis (stimulation at low concentration and inhibition at high concentrations) [3, 21]. In addition, the data from infrared spectra have allowed us to analyze the polyamine–tRNA interactions at a molecular level. The preferential binding sites are slightly different to those proposed for their interactions with calf-thymus DNA [24]. At low biogenic polyamine concentrations the interaction involves both the base and ribose moities. The preferential binding sites are guanine-N7/O6, uracil-O2/O4 and adenine-N3 reactive sites. The 2'-OH of the ribose might be involved in the interactions. The cobalt(III)hexamine preferential binding sites are guanine-N7, uracil-O2 and cytosine-O2/N4 reactive sites and the phosphate groups. At high polycation concentrations the interaction involves guanine-N7/O6, adenine-N7, and uracil-O2 reactive sites, as well as the phosphate and the ribose backbone. In addition, the participation of the primary amino group of the polycations in the interaction and the presence of hydrophobic contact have been demonstrated. Capillary electrophoresis study reveals that long chain polyamines (spermine and spermidine) bind more strongly than a small one (putrescine). This finding is in agreement with the NMR studies which suggested that secondary amino groups bind more strongly than primary amino groups [14-18]. The high binding affinity of biogenic polyamines to tRNA molecule was in order spermine > spermidine > putrescine, which correlate with their charged amino group content. Cobalt(III)hexamine contain high- and low-affinity sites in tRNA, which

have been attributed to the interactions with guanine-N7 sites and the phosphate backbone. This mechanism of tRNA binding could explain the condensation phenomenon observed at high Co(III) content as evidenced in the Co(III)-DNA complexes [24].

## 5.6 Acknowledgments

We thank Dr. Sridhren (UQTR) for critically reading of this manuscript. We highly appreciate the financial supports of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) to achieve this work.

## 5.7 References

[1] H. Tabor, C. W. Tabor, Polyamines, Annu. Rev. Biochem. 53 (1984) 749-790.

[2] S.S. Cohen, A Guide to the polyamines, Oxford Uni. Press, New York, 1998, pp. 1-543.

[3] K. Igarashi, K. Kashiwagi, Polyamines: mysterious modulators of cellular functions, Biochem. Biophys. Res. Commun. 271 (2000) 559-564.

[4] T. Thomas, T. J. Thomas, Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications, Cell. Mol. Life Sci. 58 (2001) 244–258.

[5] A. C. Childs, D. J. Mehta, E.W. Gerner, Polyamine-dependent gene expression, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 1394–1406.

[6] B.G. Feuerstein, L.D. Williams, H.S. Basu, L.J. Marton, Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions, J. Cell. Biochem. 46 (1991) 37-47.

[7] L.J. Marton, A. E. Pegg, Polyamines as targets for therapeutic intervention, Ann. Rev. Pharm. Toxic. 35 (1995) 55-91.

[8] S.Watanabe, K. Kusama-Eguchi, H. Kobayashi, K. Igarashi, Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver, J. Biol. Chem. 266 (1991) 20803-20809.

[9] Y. Li, J. L. Eiseman, D. L. Sentz, F. A. Rogers, S. S. Pan, L.-T. Hu, M. J. Egorin, P. S. Callery, Synthesis and antitumor evaluation of a highly potent cytotoxic DNA cross-linking polyamine analogue, 1,12-diaziridinyl-4,9-diazadodecane, J. Med. Chem. 39 (1996) 339–341.

[10] B. Frydman, A. Valasinas, Polyamine-based chemotherapy of cancer, Exp. Opin. Ther. Patents 9 (1999) 1055–1068.

[11] C.J. Bacchi, L.M. Weiss, S. Lane, B. Frydman, A. Valasinas, V. Reddy, J.S. Sun, L.J. Marton, I.A. Khan, M. Moretto, N. Yarlett, M. Wittner, Novel synthetic polyamines are effective in the treatment of experimental microsporidiosis, an opportunistic AIDS-associated infection, Antimicro. Agents Chemother. 46 (2002) 55–61.

[12] B. Frydman, C.W. Porter, Y. Maxuitenko, A. Sarkar, S. Bhattacharya, A. Valasinas, V.K. Reddy, N. Kisiel, L.J. Marton, H.S. Basu, A novel polyamine analog (SL-11093) inhibits growth of human prostate tumor xenografts in nude mice, Cancer Chemother. Pharmacol. 51 (2003) 488–492.

[13] C.O. Fernández, G. Buldain, K. Samejima, Probing the interaction between $N^1$,$N^4$-dibenzylputrescine and tRNA through $^{15}N$ NMR: biological implications, Biochim. Biophys. Acta 1476 (2000) 324-330.

[14] B. Frydman, W.M. Westler, K. Samejima, Spermine binds in solution to the T$\psi$C loop of $tRNA^{Phe}$: Evidence from a 750 MHz $^{1}$H-NMR Analysis, J. Org. Chem. 61 (1996) 2588-2589.

[15] B. Frydman, W.M. Westler, A. Valasinas, D.L. Kramer, C.W. Porter, Regioselective binding of spermine, $N^{1}$,$N^{12}$-bismethylspermine, and $N^{1}$,$N^{12}$-bisethylspermine to $tRNA^{Phe}$ as revealed by 750 MHz $^{1}$H-NMR and its possible correlation with cell cycling and cytotoxicity, J. Braz. Chem. Soc. 10 (1999) 334-340.

[16] B. Frydman, C. de los Santos, R.B. Frydman, A $^{13}$C NMR study of [5,8-$^{13}C_2$]spermidine binding to tRNA and to *Escherichia coli* macromolecules, J. Biol. Chem. 265 (1990) 20874-20878.

[17] C.O. Fernandez, B. Frydman, K. Samejima, Interactions between polyamine analogs with antiproliferative effects and tRNA: a $^{15}$N NMR analysis, Cell. Mol. Biol. 40 (1994) 933-944.

[18] L. Frydman, P.C. Rossomando, V. Frydman, C.O. Fernandez, B. Frydman, K. Samejima, Interactions between natural polyamines and tRNA: An $^{15}$N-NMR analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 9186-9190.

[19] A. Bibillo, M. Figlerowicz, R. Kierzek, The non-enzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides VI. The role of biogenic polyamines, Nucleic Acids Res. 27 (1999) 3931-3937.

[20] G.J. Quigley, M.M. Teeter, A. Rich, Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 64-68.

[21] T. Shimogori, K. Kashiwagi, K. Igarashi, Spermidine regulation of protein synthesis at the level of initiation complex formation of Met-tRNA, mRNA and ribosomes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 223 (1996) 544-548.

[22] R.K. Agrawal, P. Penczelk, R.A. Grassucci, N. Burkhardt, K.H. Nierhaus, J. Frank, Effect of buffer conditions on the position of tRNA on the 70 S ribosome as visualized by cryoelectron microscopy, J. Biol. Chem. 274 (1999) 8723-8729.

[23] M. Yoshida, D. Meksuriyen, K. Kashiwagi, G. Kawai, K. Igarashi, Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon AUG in oppa mRNA, J. Biol. Chem. 274 (1999) 22723-22728.

[24] A. Ahmed Ouameur, H.A. Tajmir-Riahi, Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis, J. Biol. Chem. 279 (2004) 42041-42054.

[25] J.S. Kieft, I. Tinoco Jr, Solution structure of a metal-binding site in the major groove of RNA complexed with cobalt(III)hexamine, Structure 5 (1997) 713-721.

[26] S. Rüdisser, I. Tinoco Jr, Solution structure of cobalt(III)hexammine complexed to the GAAA tetraloop, and metal-ion binding to G·A mismatches, J. Mol. Biol. 295 (1999) 1211-1223.

[27] J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, RNA-diethylstilbestrol interaction studied by Fourier transform infrared difference spectroscopy, J. Biol. Chem. 272 (1997) 8901-8904.

[28] J. Marmur, A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms, J. Mol. Biol. 3 (1961) 208-218.

[29] C.R. Cantor, M.M. Warshaw, H. Shapiro, Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides, Biopolymers 9 (1970) 1059-1077.

[30] A. Ahmed Ouameur, H. Malonga, J.-F. Neault, S. Diamantoglou, H.A. Tajmir-Riahi, Taxol interaction with DNA and RNA—Stability and structural features, Can. J. Chem. 82 (2004) 1112-1118.

[31] R. Marty, A. Ahmed Ouameur, J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, RNA Adducts with chlorophyll and chlorophyllin: stability and structural features, J. Biomol. Struct. Dyn. 22 (2004) 45-50.

[32] T. Guszcynski, T. D. Copeland, A binding shift assay for the zinc-bound and zinc-free HIV-1 nucleocapsid protein by capillary electrophoresis, Anal. Biochem. 260 (1998) 212-217.

[33] M.I. Klotz, Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies, Science 217 (1982) 1247-1249.

[34] R.M. Guijt-van Duijn, J. Frank, G.W.K. van dedem, E. Baltussen, Recent advances in affinity capillary electrophoresis, Electrophoresis 21 (2000) 3905-3918.

[35] H. Arakawa, J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis, Biophys. J. 81 (2001) 1580-1587.

[36] A. Ahmed Ouameur, R. Marty, J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, AZT binds RNA at multiple sites, DNA and Cell Biology 23 (2004) 783-788.

[37] R. Marty, A. Ahmed Ouameur, J.-F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, AZT-DNA interaction, DNA and Cell Biology 23 (2004) 135-140.

[38] H. Arakawa, R. Ahmad, M. Naoui, H.A. Tajmir-Riahi, A comparative study of calf-thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions: evidence for the guanine N-7 chromium-phosphate chelate formation, J. Biol. Chem., 275 (2000) 10150 –10153.

[39] R.C. Jack, Basic Biochemical laboratory procedures and computing. Oxford University Press, oxford, New Work, (1995) pp. 1-362.

[40] M. Tsuboi, Application of infrared spectroscopy to structure studies of nucleic acids, Applied Spectroscopy Rev. 3 (1969) 45-90.

[41] T. Theophanides, H.A. Tajmir-Riahi, Flexibility of DNA and RNA upon binding to different metal cations. An investigation of the B to A to Z conformational transition by Fourier transform infrared spectroscopy, J. Biomol. Struct. Dyn. 2 (1985) 995-1004.

[42] E. Taillandier, J. Liquier, Infrared spectroscopy of DNA, Methods Enzymol. 211 (1992) 307-335.

[43] E. Taillandier, J. Liquier, J.A. Taboury, Infrared spectral studies of DNA conformations, Advances in infrared and Raman spectroscopy 12 (1985) 65-113.

[44] Z. Dhaouadi, M. Ghomi, J.C. Austin, R.B. Girling, R.E. Hester, P. Mojzes, L. Chinsky, P.Y. Turpin, C. Coulombeau, H. Jobic, J. Tomkinson, Vibrational motions of bases of nucleic acids as revealed by neutron inelastic scattering and resonance Raman spectroscopy: 1. Adenine and its deuterated species, J. Phys. Chem. 97 (1993) 1074–1084.

[45] E. Taillandier, J. Liquier, J. A. Taboury, M. Ghomi. Structural transitions in DNA (A, B, Z) studied by IR spectroscopy. In Spectroscopy of Biological Molecules, C. Sandorfy and T. Theophanides (eds.), 1984, pp .171-189.

[46] E. Taillandier, J.A. Taboury, S. Adam, J. Liquier, Left-handed helical structure of poly[d(A-C).poly[d(G-T)] studied by infrared spectroscopy, Biochemistry 23 (1984) 5703-5706.

[47] L.C. Gosule, J.A. Schellman, Compact form of DNA induced by spermidine, Nature 259 (1976) 333-335.

[48] P.H. Bolton, D.R. Kearns, Hydrogen bonding interactions of polyamines with the 2' OH of RNA, Nucleic Acids Res. 5 (1978) 1315-1324.

[49] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry, Saunders Golden Sunburst Series, Toronto, Canada, 1979, pp. 1-367.

[50] M. Fichera, L. Gregoli, G. Musumarra, 2,6-Di(heteroarylvinyl)-pyridines as new potential antitumor agents, J. Phys. Org. Chem. 13 (2000) 344-346

[51] H. Günzler, H.-U. Gremlich, IR spectroscopy, an introduction, Wiley-vch, Germany, 2002, pp. 1-361.

[52] K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds (Part B: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry), John Wiley & Sons, Inc. New york, USA, 1997, pp. 1-384.

**TABLE 5.1**

**Measured wavenumbers, relative intensities and assignments for the main infrared bands of Baker's yeast tRNA in aqueous solution at pH 7.0 ± 0.2**

| Wavenumber ($cm^{-1}$) | Intensity[a] | Assignment[b] |
|---|---|---|
| 1698 | vs | Guanine (C=O, C=N stretching) |
| 1653 | vs | Uracil (C=O stretching) |
| 1608 | s | Adenine (C=N stretching) |
| 1529 | w | In plane ring vibration of cytosine and guanine |
| 1488 | m | In plane ring vibration of cytosine |
| 1398 | s | In plane ring vibration of guanine in *anti* conformation |
| 1244 | vs | Asymmetric $PO_2^-$ stretch |
| 1086 | vs | Symmetric $PO_2^-$ stretch |
| 1063 | s | C-O ribose stretch |
| 966 | m | C-C ribose stretch |
| 913 | m | C-C ribose stretch |
| 862 | m | Ribose-phosphodiester, A-marker |
| 810 | m | Ribose-phosphodiester, A-marker |

[a]Relative intensities : s = strong, sh = shoulder, vs = very strong, m= medium, w= weak

[b]Assignments have been taken from the literature and relevant references are given in the results section.

**TABLE 5.2**

**Experimental values of the migration time of pure tRNA and polyamine-tRNA adducts following incubation of a constant concentration of tRNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. Incubations were carried out in the run buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ± 0.2) at 25 °C for 30 min prior to capillary electrophoresis.**

| Spermine | | Spermidine | | Putrescine | | Cobalt(III)hexamine | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration (μM) | Migration time (min) | Concentration (μM) | Migration time (min) | Concentration (μM) | Migration time (min) | Concentration (μM) | Migration time (min) |
| 0 | 3.28 | 0 | 3.48 | 0 | 3.615 | 0 | 3.483 |
| 1.563 | 3.212 | 1.563 | 3.365 | 1.563 | 3.636 | 1.563 | 3.546 |
| 3.125 | 3.193 | 3.125 | 3.315 | 3.125 | 3.652 | 3.125 | 3.579 |
| 6.25 | 3.177 | 6.25 | 3.29 | 6.25 | 3.67 | 6.25 | 3.6 |
| 12.5 | 3.167 | 12.5 | 3.273 | 12.5 | 3.7 | 12.5 | 3.625 |
| 25 | 3.164 | 25 | 3.248 | 25 | 3.725 | 25 | 3.65 |
| 50 | 3.164 | 50 | 3.245 | 50 | 3.75 | 50 | 3.667 |
| 100 | 3.165 | 100 | 3.24 | 100 | 3.761 | 100 | 3.685 |
| 200 | 3.163 | 200 | 3.25 | 200 | 3.765 | 200 | 3.677 |

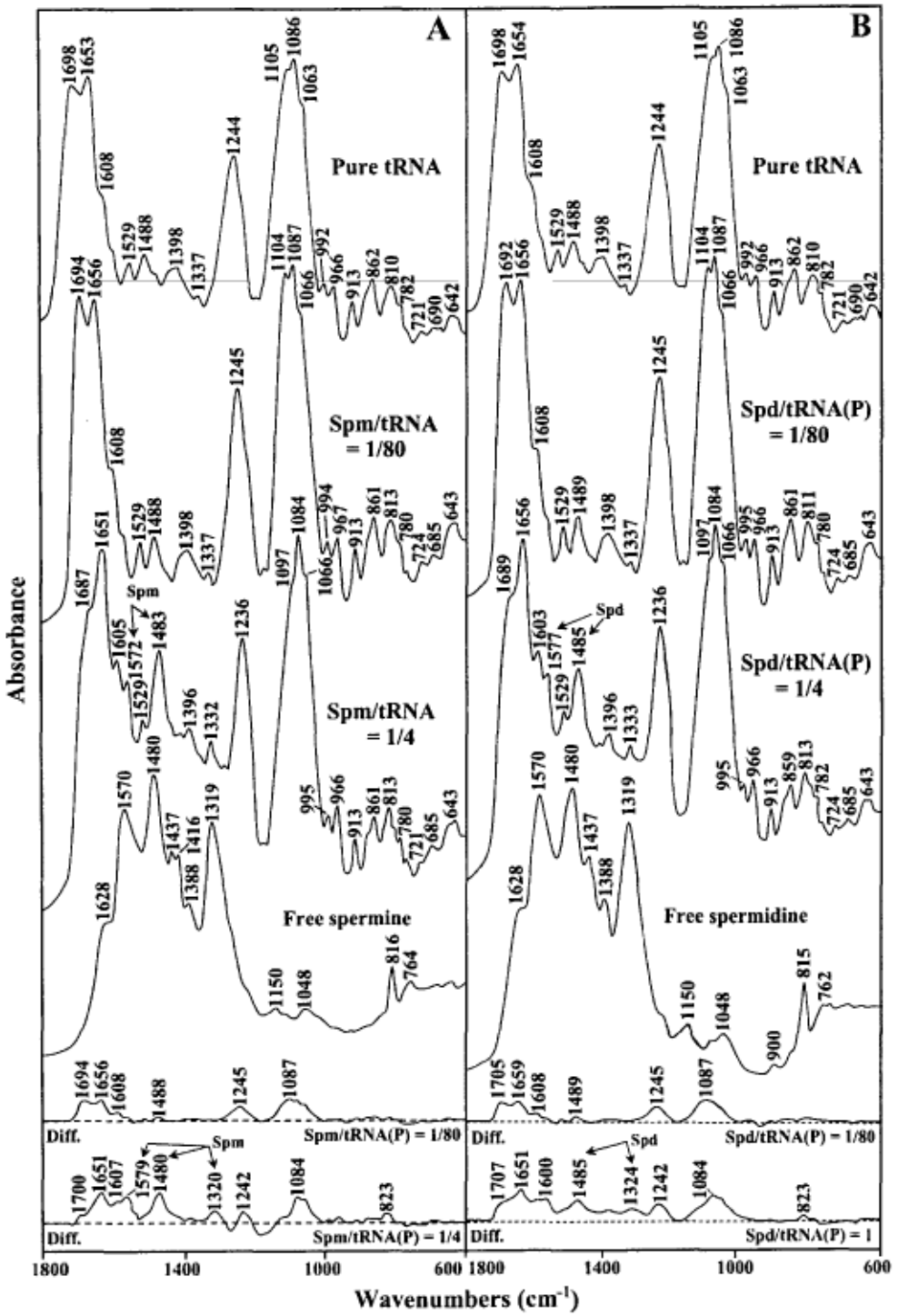


**FIGURE 5.2 :** FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure tRNA, free polyamine, and spermine-tRNA (A) and spermidine-tRNA (B) adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra) and difference spectra for polyamine-tRNA adducts obtained at various polyamine/tRNA(P) molar ratios (bottom two spectra).

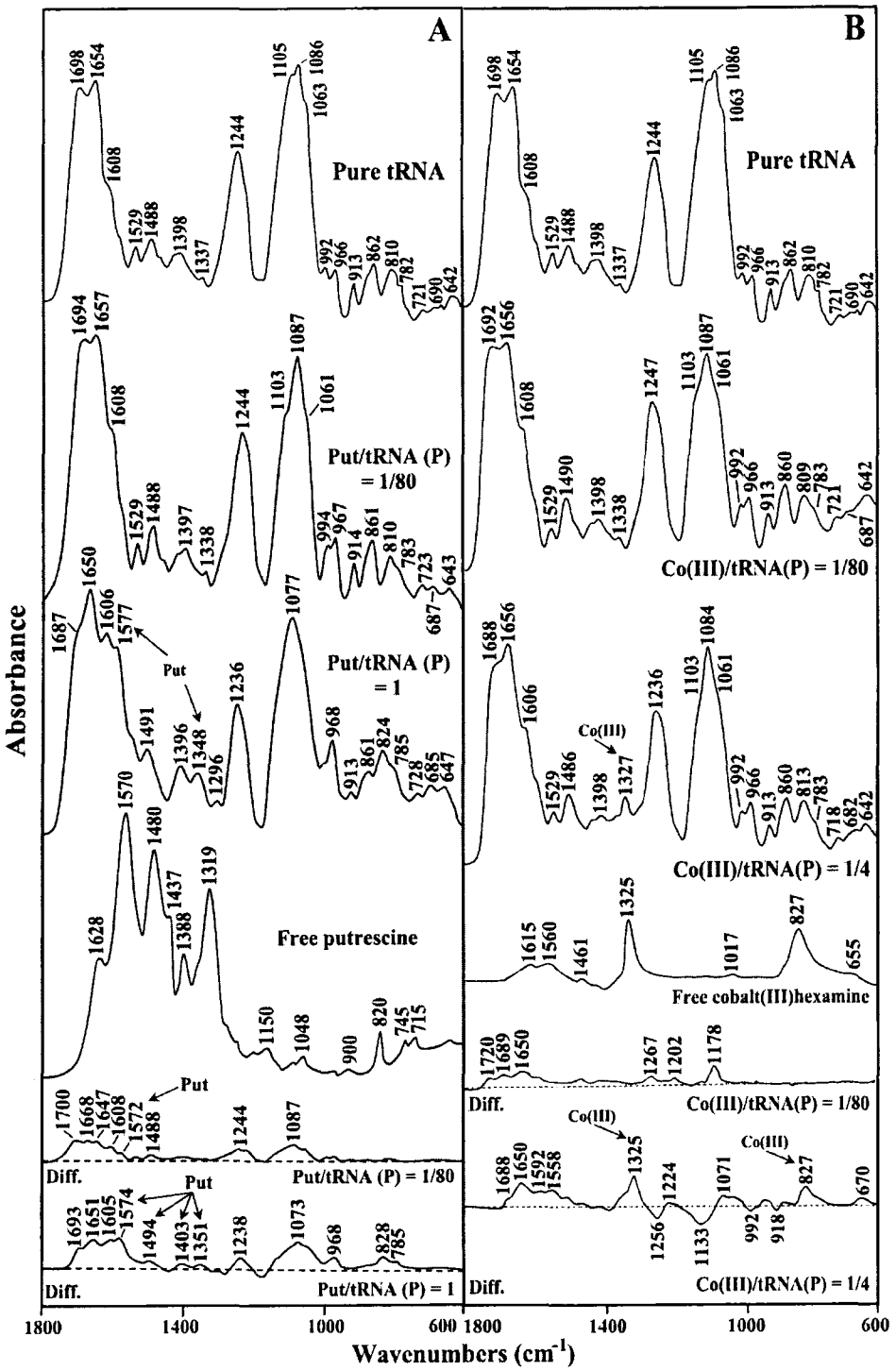


FIGURE 5.3 : FTIR spectra in the region of 1800-600 $cm^{-1}$ for pure tRNA, free polyamine, and putrescine-tRNA (A) and cobalt(III)hexamine-tRNA (B) adducts in aqueous solution at pH = 7.0 ± 0.2 (top three spectra) and difference spectra for polyamine-tRNA adducts obtained at various polyamine/tRNA(P) molar ratios (bottom two spectra).

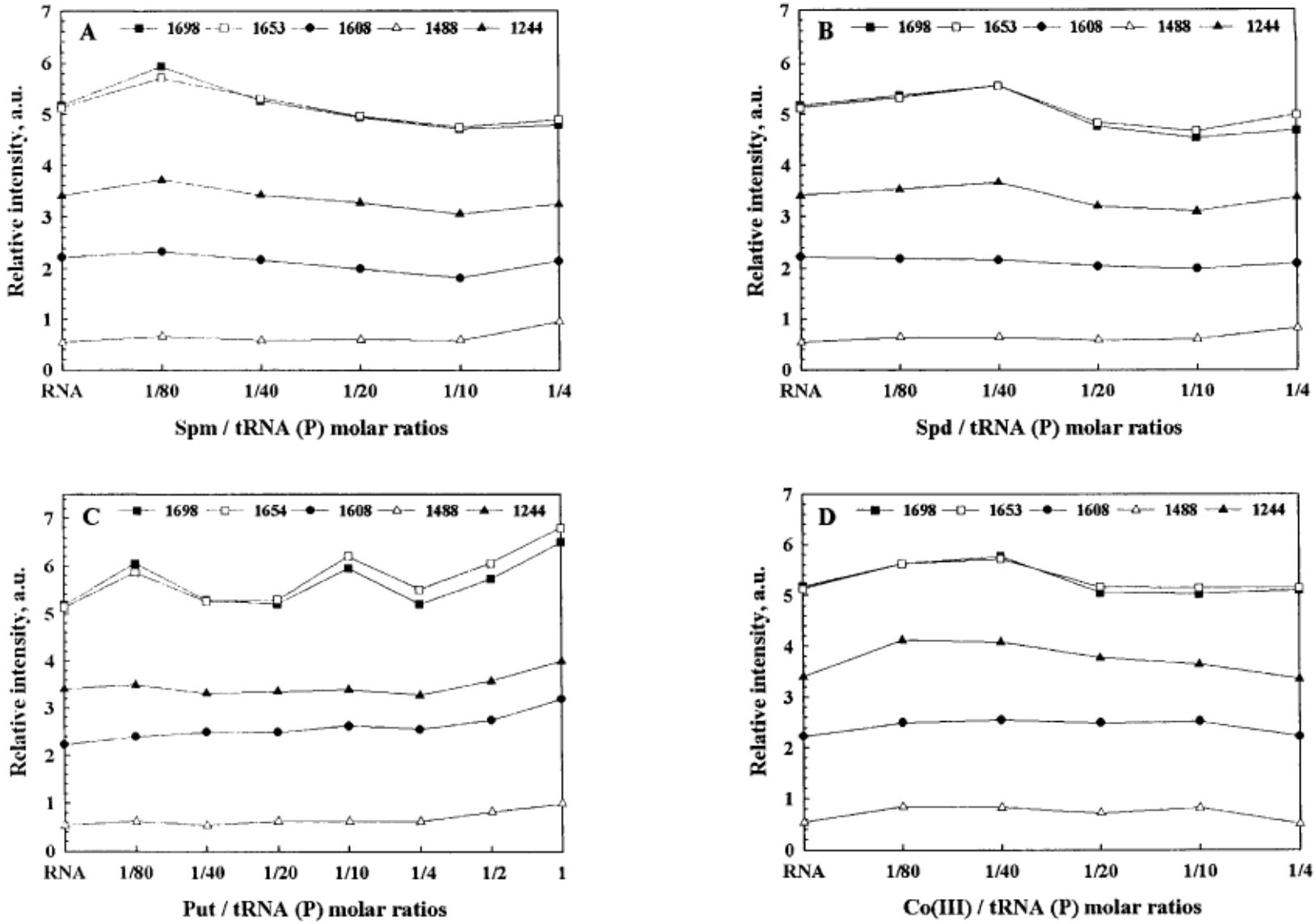


**FIGURE 5.4 :** Relative intensity variations in arbitrary units for several tRNA in-plane vibrations as a function of polyamine concentration. A–D, relative intensity for the tRNA bands at 1698 (guanine), 1653 (uracil), 1608 (adenine), 1488 (cytosine) and 1244 $cm^{-1}$ ($PO_2^-$ vib.) for spermine, spermidine, putrescine and cobalt(II)hexamine, respectively.

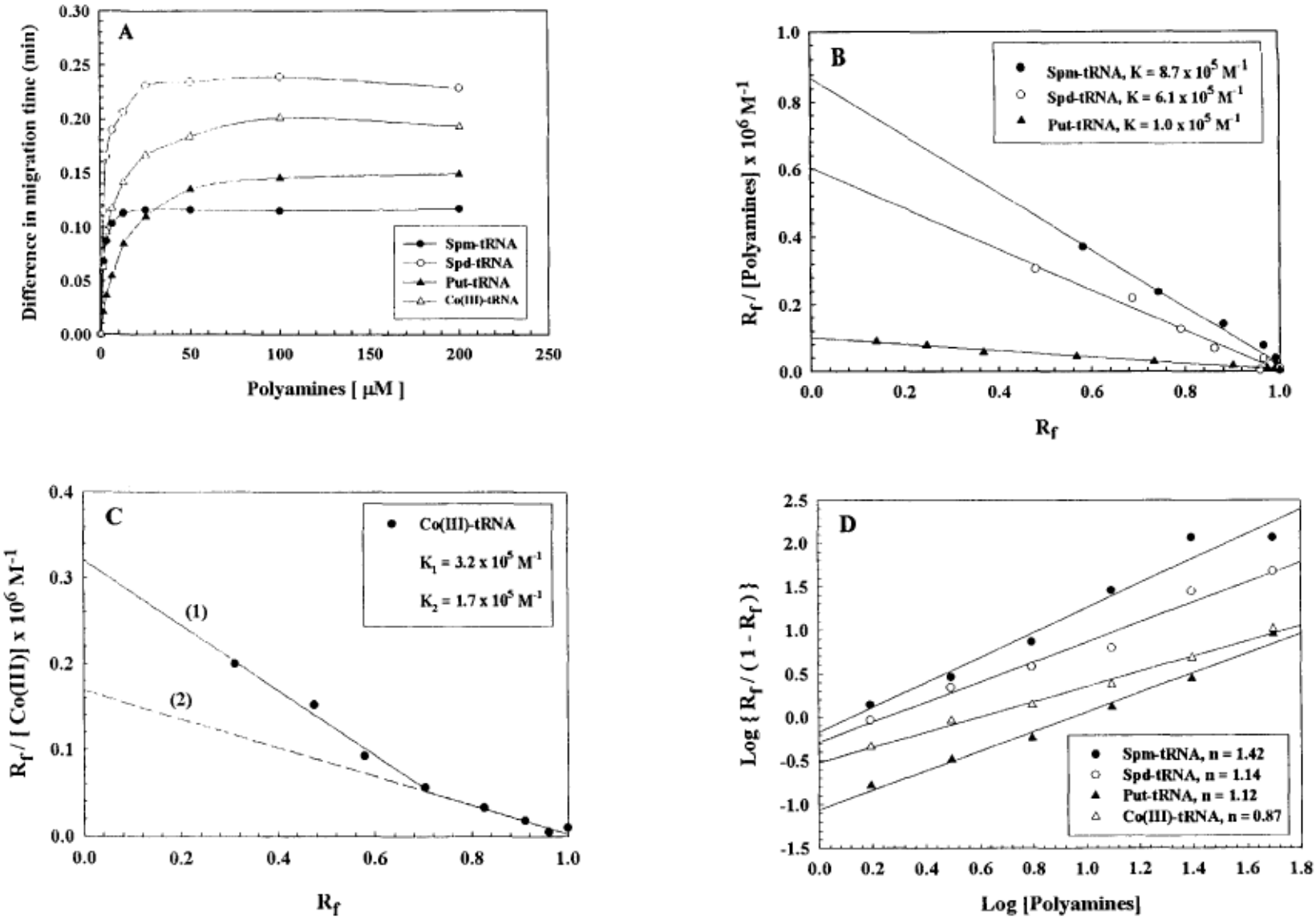


**FIGURE 5.5 :** A, plot of the difference in migration time (in minutes) of polyamine-tRNA complexes from capillary electrophoresis following incubation of a constant concentration of tRNA (1.25 mM) with various concentrations of polyamines. The difference in migration time of the polyamine-tRNA complexes was determined by subtracting the migration time of pure tRNA from that of each polyamine-tRNA adducts. B and C, Scatchard plots for biogenic polyamine-tRNA, and cobalt(III)hexamine-tRNA complexes, respectively. D, Hill plots for polyamine-tRNA complexes.

# CHAPITRE VI

# CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

## 6.1 Conclusions

Dans ce projet nous avons élucidé les effets des polyamines naturelles telles que la spermine, la spermidine et la putrescine, ainsi le polyamine inorganique, le cobalt(III)hexamine, sur la structure de l'ADN du thymus de veau et l'ARNt de levure. Le but de ce travail été de déterminer les sites préférentiels de liaison de ces polycations sur l'ADN et l'ARNt en présence de différentes concentrations de polycations, d'étudier l'effet des polyamines sur la conformation des acides nucléiques, et de déterminer les paramètres d'interactions tels que les constantes de liaison et la coopérativité des interactions PA-ADN/ARNt. Il est important de noter que les concentrations des polyamines naturelles utilisées dans cette étude sont proches de ce que l'on retrouve *in vivo*. En effet, les concentrations physiologiques des polyamines dans les cellules sont de l'ordre du millimolaire (Cohen, 1998, Tabor et Tabor, 1984).

Le but du projet a été atteint puisque les connaissances fondamentales sur les interactions entre les polyamines et les acides nucléiques ont été acquises à l'aide du système modèle PA-ADN de thymus de veau et PA-ARNt de levure. L'utilisation des méthodes de caractérisation adéquates telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et l'électrophorèse capillaire a permis de dresser un portrait global des complexes PA-acide nucléique.

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour étudier les interactions entre les polyamines et les acides nucléiques à l'échelle atomique. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques qui sont : le déplacement des bandes caractéristiques des groupements fonctionnels des acides nucléiques et des polyamines, et la différence spectrale qui nous a permis d'observer le changement de l'intensité des bandes

indicatrices et l'apparition de nouvelles bandes. Nous avons aussi mis sous forme de graphique les changements d'intensité des bandes indicatrices en fonction du ratio molaire PA/acide nucléique afin d'obtenir des résultats plus probants. L'ampleur du déplacement des bandes et le changement de leur intensité nous a permis de tirer des conclusions sur les atomes des groupements fonctionnels impliqués dans la complexation PA-acide nucléique. L'étude des changements dans la conformation des acides nucléiques et leur condensation en présence des polyamines a été effectué en observant le déplacement des bandes indicatrices du changement de conformation (voir les tableaux 4.1 et 5.1) et l'apparition de bandes négatives sur les spectres de différence, respectivement. La méthode de dichroïsme circulaire a été utilisée seulement pour les complexe cobalt(III)hexamine-ADN afin de confirmer un changement de conformation observé sur le spectre infrarouge.

Les paramètres d'interaction tels que les constantes de liaison et la coopérativité décrivant des interactions entre les polyamines et les acides nucléiques ont été estimés par l'électrophorèse capillaire. La technique d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) dont le principe est basé sur le changement dans le temps de migration des complexes PA-ADN/ARNt en fonction de différentes concentrations en polycations est la technique de choix pour étudier l'interaction biomoléculaire et pour pouvoir distinguer entre les complexes d'affinité faible et forte.

L'analyse spectrale des complexes PA-ADN et PA-ARNt a été faite de façon complète et nous a mené à proposer des modèles de liaison des polyamines naturelles sur l'ADN (Ahmed Ouameur et *al.*, 2004). Ainsi, nous avons constaté que la putrescine se lie préférentiellement sur la petite et la grande gouttières de l'ADN, et cela indépendamment du ratio molaire, r (de 1/80 jusqu'à 1). Par contre, la spermine et le cobalt(III)hexamine établissent des interactions beaucoup plus importantes sur la grande gouttière. La liaison de la spermidine sur les deux gouttières de l'ADN dépend du ratio ; à faibles concentrations (r = 1/80 – 1/20), la spermidine est liée par les deux gouttières, tandis qu'à concentrations plus élevées (r = 1/10 – 1/4) elle est beaucoup plus liée par la grande gouttière (Ahmed Ouameur et *al.*, 2004). Il est important de noter que les sites

potentiels de liaison sur l'ADN sont principalement ceux qui ne sont pas impliqués dans l'appariement des bases. Ainsi, les principaux sites de liaison dans la grande gouttière sont le N7 des purines, $-NH_2$ de l'adenine et la cytosine, et $-CH_3$ de la thymine (interaction hydrophobe). Pour la petite gouttière ont a N3 des purines, $-NH_2$ de la guanine et O2 de la thymine (Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988).

Les sites préférentiels de liaison des polyamines sur l'ARNt sont légèrement différents de ceux proposés pour les complexes polyamine-ADN. Nous avons constaté qu'à basses concentrations (r =1/80 – 1/20), les interactions entre les polyamines naturelles et les groupements phosphates sont beaucoup plus prononcées dans les complexes PA-ADN que dans les complexes PA-ARNt. Cette différence pourrait être due à la structure tertiaire de l'ARNt et à la présence de sucre ribose qui est en grande partie responsable des propriétés conformationnelles différentes de celles de l'ADN (Sinden, 1994; Sarma et Sarma, 1988). De plus, la présence d'un groupement hydroxyle sur le sucre en position 2' de l'ARNt est à l'origine des interactions supplémentaires avec les polycations. À basse concentrations en polyamines, les principaux sites de liaison sont N7/O6 de la guanine, O2/O4 de l'uracile, N3 de l'adenine et 2'OH du ribose. Pour le cobalt(III)hexamine, les sites préférentiels de liaison sont N7 de guanine, O2 de l'uracile, O2/N4 de cytosine et les groupements phosphates. Aux concentrations élevées de polycations, les sites impliqués dans les interactions sont N7 des purines, O2 de l'uracile et les groupements phosphates. Nous avons aussi démontré la participation des groupes animes primaires des polycations dans les interactions PA-ADN et PA-ARNt et la présence des contacts hydrophobes avec les groupements méthylènes des acides nucléiques (Ahmed Ouameur, 2004, 2005 en presse).

Nous n'avons constaté aucun changement de conformation de l'ADN et l'ARNt en présence de différentes concentrations des polyamines naturelles. D'autres travaux, utilisant la spectroscopie Raman, ont constaté la même chose en étudiant les interactions entre ces polyamines et différents ADN génomiques, y compris l'ADN de thymus de veau (Deng et *al.*, 2000; Ruiz-Chica et *al.*, 2001c). On pense que cette particularité des

polyamines naturelles à stabiliser l'ADN et l'ARNt sous leur conformation native est essentielle pour le bon fonctionnement de ces acides nucléiques.

Un des résultats importants de cette étude est d'avoir démontré que le cobalt(III)hexamine, à forte concentration (r=1/4), induit un changement partiel de la conformation de l'ADN de la forme B vers la forme A, alors que l'ARNt reste sous sa conformation native (forme A). On a aussi constaté la condensation de l'ADN et l'ARNt au même ratio. On pourrait croire que le cobalt(III)hexamine stabilise mieux les acides nucléiques sous la conformation A. Ce changement de conformation n'a pas été observé auparavant sur l'ADN génomique (de grande taille) mais a été observé sur l'ADN de petite taille (oligonucléotides) (Jain et Sundaralingam, 1989; Real et Greenall, 2004). Par contre, le phénomène de condensation a été observé par Widom et Baldwin (1980) et par Hud et Downing (2001) à l'aide du dichroïsme circulaire et la microscopie cryoélectronique, respectivement. Nous pensons que le changement de conformation de l'ADN serai dû à une déshydratation progressive des groupements atomiques de l'ADN par le cobalt(III)hexamine (Kankia et *al.*, 2001). Cette découverte pourrait avoir une application thérapeutique intéressante; des analogues de polyamines formés des molécules de polyamines cycliques ou complexées avec des atomes de $Co^{III}$ pourraient être de bons agents anticancéreux qui ont pour cible l'ADN. Le squelette polyamine de ces analogues faciliterait le transport de ces médicaments dans la cellule et le cobalt(III)hexamine causerait la condensation et/ou un changement de la conformation de l'ADN empêchant ainsi l'ADN de se répliquer ou d'exprimer certains gènes dans les cellules cancéreuses (Karigiannis et Papaioannou, 2000).

Deux phénomènes intéressants ont été observés sur les complexes PA-ADN et PA-ARNt; à des ratios situés entre 1/40 et 1/10, la spermine et la spermidine causent un effet hypochromique sur l'ARNt (Fig. 5.4, A et B). Cet effet, qui se traduit par une baisse dans l'intensité des bandes indicatrices, a été aussi observé dans le cas de l'ADN à une concentration élevée (r=1/4) de la spermine, la spermidine et le cobalt(III)hexamine (Fig. 4.4, A, B et D). On a attribué ce phénomène à un renforcement de l'appariement et de l'empilement des bases suite aux interactions avec

les polyamines (Ruiz-Chica et *al.*, 2001c). Ce phénomène témoigne de la stabilité de la structure de l'ADN et de l'ARNt en présence des polyamines. Un deuxième phénomène a été observé uniquement sur le complexe putrescine-ARNt à un ratio Put/ARNt=1 (Fig. 5.4C); il s'agit d'un effet hyperchromique qui se traduit donc par une augmentation dans l'intensité des bandes indicatrices. Cet effet est du à une déstabilisation de la structure de l'ARNt ce qui provoque l'ouverture des régions en double-hélice de l'ARNt (Fichera et *al.*, 2000). On peut faire une corrélation entre les effets hypo- et hyperchromiques observés dans le cas de l'ARNt et la synthèse protéique. Il a été démontré qu'une basse concentration en polyamines a un effet stimulant sur la synthèse protéique. Par contre une concentration élevée en polyamines inhibe la synthèse protéique (Shimogori et *al.*, 2000).

Les constantes de liaison et de coopérativité des complexes PA-ADN/ARNt ont été déterminées par l'analyse de Scatchard (Fig. 4.6 et 5.6, A, B et C) et de Hill (Fig. 4.6D et 5.6D) des données de l'électrophorèse capillaire. Les interactions entre les polyamines naturelles et l'ADN/ARNt ont démontré une coopérativité positive ($n_H > 1$), ce qui signifie que la fixation de la premiere molécule de polyamine augmente l'affinité de l'acide nucléique pour la deuxième molécule de polyamine. Pour ces polyamines, la valeur $n_H$ la plus élevée est d'environ 1.8 (putrescine-ADN), ce qui signifie que la liaison de la putrescine à l'ADN est faiblement coopérative, mais si on tient en compte que cette valeur est exprimée sur la base de concenration de phosphate, il se peut alors qu'elle indique une coopérativité forte. Quant aux interactions entre le cobalt(III)hexamine et les acides nucléiques, elles ont une coopérativité negative ($n_H < 1$). Les constantes de liaison des polyamines naturelles sont de l'ordre de $10^5$ $M^{-1}$. L'analyse de Scatchard pour les complexes cobalt(III)hexamine-ADN/ARNt a révélé deux constantes de liaison ce qui témoigne de l'existence de complexes de faibles et fortes affinités. Nous avons attribué les deux affinités aux liaisons avec l'atome N7 de la guanine (forte affinité) et les groupements phosphates (faible affinité), ce qui est en accord avec nos résultats spectroscopiques sur les complexes cobalt(III)hexamine-ADN/ARNt ainsi qu'avec les résultats des autres études (Nunn et Neidle, 1996; Kieft et Tinoco, 1997; Rüdisser et Tinoco, 1999).

Les polyamines étant essentielles pour la croissance et la différentiation des cellules, leurs interactions avec des acides nucléiques sont considérées comme l'une de leurs fonctions biologiques importantes (Tabor et Tabor, 1984; Cohen, 1998; Thomas et Thomas, 2001). Plusieurs études indiquaient que les polyamines jouent un rôle critique dans la protection des brins d'ADN contre la cassure provoquée par les radiations et les radicaux libres (Ha et *al.*, 1998ab; Oh et Kim, 1998; Douki et Bretonniere, 2000). En effet, il a été démontré qu'un tel dommage sur l'ADN diminuait la viabilité des cellules déficientes en polyamines (Oh et Kim, 1998). Cependant, les mécanismes par lesquels cela se produisait sont inconnus. Les modèles d'interactions proposés dans cette étude indiquaient que les polyamines établissent des contacts sur un seul brin d'ADN ("intrastrand") et sur les deux brins ("interstrand"). À notre avis, l'interaction de type "intrastrand" pourrait justifier la capacité de ces polyamines de protéger l'ADN contre la cassure du brin, de plus, l'interaction de type "interstrand" expliquerait la capacité de la spermine et de la spermidine de procurer une protection plus élevée que la putrescine (Ha et *al.*, 1998ab; Oh et Kim, 1998; Douki et Bretonniere, 2000) car la différence dans le nombre de charges positives et la taille des trois polyamines naturelles fait que la putrescine (plus courte) ne peut pas établir des contacts entre les deux brins d'ADN.

En plus des résultats obtenus, notre recherche a permis de mettre en lumière l'utilisation de techniques bien adaptées pour l'étude des interactions biomoléculaires. La spectroscopie infrarouge et l'électrophorèse capillaire sont des techniques qui pourront être appliquées à d'autres études d'interactions impliquant des molécules de poids moléculaire hétérogène tels que les interactions protéine-protéine, protéine-ADN, protéine-médicament, ADN-médicament…etc.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) s'avère une excellente méthode de caractérisation des composés biologiques. Elle permet d'accéder directement à l'information moléculaire, à la nature chimique et à l'organisation conformationnelle et structurale des matériaux analysés. C'est la raison pour laquelle la spectroscopie IR a été une technique majeure dans le cadre de cette étude. Cette méthode d'analyse vibrationnelle est non destructrice, qualitative et peut être

quantitative. De plus, elle ne nécessite qu'une très petite quantité de produits. Par sa facilité de mise en œuvre tant au niveau du temps requis que du nombre d'opérations, la spectroscopie FTIR représente un moyen rapide et relativement complet d'obtention de données biophysiques. En fait, peu de méthodes peuvent donner à la fois des informations sur les groupements fonctionnels impliqués dans les interactions biologiques de même que sur les changements de conformation des biomolécules.

De nos jours, l'électrophorèse capillaire est devenu un outil très performant pour l'estimation des constantes de liaison. La mesure de la constante d'affinité entre les acides nucléiques et les polyamines est essentielle pour le développement des analogues capables de ce lier sur leur cibles (ADN ou ARN) de façon spécifique. Récemment, plusieurs techniques ont été développées pour mesurer les constantes de liaison. La plupart d'entre elles sont basées sur l'utilisation des techniques de séparation dans des conditions d'équilibre. Ces techniques ont été regroupées sous le nom «d'électrophorèse capillaire d'affinité». L'électrophorèse capillaire a été prouvée comme un nouvel outil analytique attrayant en raison de sa vitesse d'analyse, de son rendement élevé, une basse consommation de réactif et de sa grande résolution. La polyvalence de cette technologie la rend appropriée à la séparation des substances chimiquement diverses, y compris des ions, des métabolites de drogues, des peptides, des protéines, des oligonucléotides, et l'ADN. Jusqu'ici, diverses interactions d'affinité, telles que drogue-protéine, protéine-protéine, protéine-ADN, protéine-polysacharide, peptide-antibiotique, enzyme-cofacteurs et antigène-anticorps ont été étudiées par CE (Tanaka et Terabe, 2002). Plusieurs articles de recherche ont décrit les équations mathématiques de chaque interaction d'affinité.

## 6.2 Perspectives de recherche

Les résultats présentés dans ce mémoire pourront être complétés par l'étude des effets des polyamines naturelles sur des oligonucléotides sélectionnés riches en GC et/ou en AT. En effet, la liaison des polyamines *in vivo* sur des séquences d'ADN riches en GC ou en AT peut se faire de manière différente et peut avoir un effet différentiel sur

la conformation de ces séquences. Ces effets différentiels sur la conformation des séquences riches en GC et en AT pourraient être liés, *in vivo*, au rôle observé des polyamines sur la régulation de l'expression de gènes et de la survie de cellules (Childs et *al.*, 2003).

Plusieurs laboratoires tentent actuellement de tirer profit de l'affinité des acides nucléiques pour les polyamines en synthétisant des analogues de polyamines, capables d'interagir avec les acides nucléiques et d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses (Thomas et Thomas, 2001; Marton et Pegg, 1995). D'autres analogues ont suscité beaucoup d'attention dans le domaine de la thérapie génique en tant que véhicule de gène (Saminathan et *al.*, 2002). Le mode d'action de ces analogues n'est pas très connu et il sera primordial d'étudier les effets de ces médicaments sur les acides nucléiques en utilisant des méthodes mieux adaptées pour la caractérisation des interactions biomoléculaires afin de connaître le mode d'action de ces médicaments et les rendre plus sélectifs et moins toxiques pour l'organisme.

# BIBLIOGRAPHIE

Ahmed Ouameur, A., Tajmir-Riahi, H. A. (2004) "Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis", J. Biol. Chem. 279: 42041-42041.

Ahmed Ouameur, A., Tajmir-Riahi, H. A. (2005) " Probing tRNA interaction with polyamines: stability and biological significance ", soumi pour publication dans le journal BBA.

Andreasson, B., Nordenskiöld, L., Schultz, J. (1996) "Interactions of spermidine and methylspermidine with DNA studied by nuclear magnetic resonance self-diffusion measurements" Biophys. J. 70:2847–2856.

Bellamy, L.J. (1968) "The infrared spectra of complex molecules", Chapman and Hall, London.

Catros-Quemener, V., Chamaillard, L., Bouet, F. (1999) "Les polyamines : rôle diagnostique et cible thérapeutique en cancérologie", Médecine/Sciences 15: 1078-85.

Childs, A. C., Mehta, D. J., Gerner, E. W. (2003) "Polyamine-dependent gene expression", Cell. Mol. Life Sci. 60: 1394-1406.

Cohen, S.S. (1998) "A guide to the polyamines", Oxford Univ. Press, New York.

Cohen, S. S. (1971) "Introduction to the polyamines", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

Deng, H., Bloomfield, V.A., Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr. (2000) "Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectrocopy", Nucl. Acids Res. 28: 3379–3385.

Douki, T., Bretonniere, Y. (2000) "Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines", J. Cadet. Radiat. Res. 153: 29–35.

Drew, H. R., Dickerson, R. E. (1981) "Structure of a B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration", J. Mol Biol 151:535–556.

Drew, H.R., Takano, T., Tanaka, S., Itakura, K., Dickerson, R. E. (1980) "High-salt d(CpGpCpG), a left-handed Z' DNA double helix", Nature 286:567–573.

Egli, M., Williams, L.D., Gao, Q., Rich, A. (1991) "Structure of the pure-spermine form of Z-DNA (magnesium free) at 1–Å resolution", Biochemistry 30:11388–11402.

Fernandez, C.O., Frydman, B., Samejima, K. (1994) "Interactions between polyamine analogs with antiproliferative effects and tRNA: a $^{15}N$ NMR analysis", Cell. Mol. Biol. 40: 933-944.

Feuerstein, B.G., Williams, L.D., Basu, H.S., Marton, L.J., (1991) "Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions", J. Cell. Biochem. 46:37–47.

Feuerstein, B. G., Pattabiraman, N., Marton, L. J. (1990) "Molecular mechanics of the interactions of spermine with DNA:DNA bending as a result of ligand binding", Nucleic Acid Res. 18:1271–1282.

Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N., Marton, L.J. (1986) "Spermine-DNA interactions: a theoretical study", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5948–5992.

Fichera, M., Gregoli, L., Musumarra, G. (2000) "2,6-Di(heteroarylvinyl)-pyridines as new potential antitumor agents", J. Phys. Org. Chem. 13: 344-346.

Frydman, B., Westler, W. M., Valasinas, A., Kramer, D. L., Porter, C. W. (1999) "Regioselective binding of spermine, $N^1$,$N^{12}$-bismethylspermine, and $N^1$,$N^{12}$-bisethylspermine to $tRNA^{Phe}$ as revealed by 750 MHz $^1$H-NMR and its possible correlation with cell cycling and cytotoxicity", J. Braz. Chem. Soc. 10: 334-340.

Frydman, B., Westler, W. M., Samejima, K. (1996) "Spermine binds in solution to the T$\psi$C loop of $tRNA^{Phe}$: evidence from a 750 MHz $^1$H-NMR analysis", J. Org. Chem. 61: 2588-2589.

Frydman, L., Rossomando, P. C., Frydman, V., Fernandez, C. O., Frydman, B., Samejima, K. (1992) "Interactions between natural polyamines and tRNA: An $^{15}$N-NMR analysis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9186-9190.

Frydman, B., de los Santos, C., Frydman, R. B. (1990) "A $^{13}$C NMR study of [5,8-$^{13}C_2$]spermidine binding to tRNA and to *Escherichia coli* macromolecules", J. Biol. Chem. 265: 20874-20878.

Guijt-van Duijn, R. M., Frank, J., van Dedem, G.W.K., Baltussen, E. (2000) "Recent advances in affinity capillary electrophoresis", Electrophoresis 21: 3905-3918.

Günzler, H., Gremlich, H.-U. (2002) "IR Spectroscopy. An Introduction", Wiley-vch, Germany.

Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., Casero, R. A. Jr. (1998a) "The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 11140 –11145.

Ha, H. C., Yager, J. D., Woster, P. A., Casero, R. A. Jr. (1998b) "Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species", Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 298 –303.

Hasan, R., Alam, K., Ali, R., (1995) "Polyamine induced Z-conformation of native calf-thymus DNA", FEBS Lett. 368:27–30.

Heby, O., Persson, L. (1990) "Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells", Trends Biochem. Sci. 15: 153-158.

Heegaard, N. H.H., S., Nilson, Guzman, N. A. (1998) "Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments", J. Chrom. B 715: 29-54.

Huang Y, Pledgie A, Casero RA Jr, Davidson NE. (2005) "Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells", Anticancer Drugs 16:229-241.

Hud, N. V., Downing, K. H. (2001) "Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the structure of DNA toroids", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 14925-14930.

Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000) "Polyamines: mysterious modulators of cellular functions", Biochem. Biophys. Res. Commun. 271:559–564.

Jack, R. C. (1995) "Basic Biochemical laboratory procedures and computing", Oxford University Press, oxford, New Work, pp. 147-198.

Jain, S., Zon, G., Sundaralingam, M. (1989) "Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTACAC)", Biochemistry 28:2360–2364.

Kankia, B. I., Buckin, V., and Bloomfield, V. A. (2001) "Hexamminecobalt(III)-induced condensation of calf thymus DNA: circular dichroism and hydration measurements", Nucl. Acids Res. 29: 2795-2801.

Karigiannis, G., Papaioannou, D. (2000) "Structure, biological activity and synthesis of polyamine analogues and conjugates", Eur. J. Org. Chem. 1: 1841-1863.

Kieft, J. S., Tinoco Jr, I. (1997) "Solution structure of a metal-binding site in the major groove of RNA complexed with cobalt(III)hexamine", Structure 5: 713-721.

Kilpeläinen, P. (2002) "Ornithine decarboxylase", Thèse de doctorat, Université de Oulu.

Korolev, N., Lyubartsev, A.P., Nordenskiöld, L., Laaksonen, A. (2001) "Spermine:an "invisible" component in the crystals of B-DNA. A gran canonical Monte Carlo and molecular dynamics simulation study", J. Mol. Biol. 308: 907–917.

Landers, J. P. (1994) "Handbook of capillary electroporesis", CRC Press, USA, pp. 9-41.

Lewin, B. (1999) "Gènes VI", 2e éd., De Boeck Université, Paris.

Liquori, A. M., Constantino, L., Crescenzi, V., Elia, V., Giglio, E., Puliti, R., De Santis-Savino, M., Vitagliano, V. (1967) "Complexes between DNA and polyamines: a molecular model", J. Mol. Biol. 24:113–122.

Marquet, R., Houssier, C. (1988) "Different binding modes of spermine to A-T and G-C base pairs modulate the bending and stiffening of the DNA double helix" J. Biomol. Struct. Dynamics 6:235–246.

Marton, L. J., Pegg, A. E. (1995) "Polyamines as targets for therapeutic intervention", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35: 55-91.

Mitchelson, K. R., Cheng J. (2001) "Capillary electrophoresis of nucleic acids", Chapman & Hall, London, pp. 1-14.

Neault, J.-F., (1999) "Synthèse et caractérisation structurale des complexes médicament-ADN et médicament-ARN", Mémoire de maîtrise, Universit du Quévec à Trois-Rivières.

Nunn, C.M., Neidle, S. (1996) "The High Resolution Crystal Structure of the DNA Decamer d(AGGCATGCCT)", J. Mol. Biol. 256: 340-351.

Oh, S. J., Ha, H. J., Chi, D. Y., Lee, H. K. (2001) "Serotonin receptor and transporter ligands— current status", Curr. Med. Chem. 8:999–1034.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., and Kriz, G. S. (1979) "Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry", Saunders Golden Sunburst Series, Toronto, Canada.

Pegg, A. E., McCann, P. P. (1982) "Polyamine metabolism and function", Am. J. Physiol. 243: 212-221.

Quigley, G. J., Teeter, M. M., Rich, A. (1978) "Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 64-68.

Real, A. N., Greenall, R. J. (2004) "Influence of spermine on DNA conformation in a molecular dynamics trajectory of d(CGCGAATTCGCG)2: major groove binding by

one spermine molecule delays the A→ B transition", J. Biomol. Struct. Dyn. 21, 469-488

Rouessac, F., Rouessac, A. (2000) "Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes", Ed. DUNOD, Paris, pp. 117-129.

Rouessac, F., Rouessac, A. (1998) "Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes", Ed. DUNOD, Paris, pp. 101-111.

Rouessac, F., Rouessac, A. (1998) "Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes", Ed. DUNOD, Paris, pp. 147-172.

Rüdisser, S., Tinoco Jr, I. (1999) "Solution structure of cobalt(III)hexammine complexed to the GAAA tetraloop, and metal-ion binding to G·A mismatches", J. Mol. Biol. 295: 1211-1223.

Ruiz-Chica, J., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F. J. (2001a) "Characterization of polyamine-induced aggregates of oligodeoxyribonucleotides by Raman spectroscopy", J. Mol. Struct. 565–566:141–146.

Ruiz-Chica, J., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F.J. (2001b) "Raman study of the interaction between polyamines and a GC oligonucleotide", Biochem. Biophys. Res. Commun. 285:437–446.

Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F. J. (2001c) "Fourier transform Raman study of the structural specificities on the interaction between DNA and biogenic polyamines", Biophys. J. 80:443–454.

Sakai, T. T., Cohen, S. S. (1973) "Polyamines in normal and neoplastic growth", Raven Press, New York, pp. 41-54.

Saminathan, M., Thomas, T., Shirahata, A., Pillai, C.K.S., Thomas, T.J. (2002) "Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics", Nucl. Acid Res. 30: 3722-3731.

Sarma, R. H., Sarma, M. H. (1988) "DNA double helix & the chemistry of cancer", Adenine Press, New York, U.S.A.

Schellman, J. A., Parthasarathy, N. (1984) "X-ray diffraction studies on cation-collapsed DNA" J. Mol. Biol. 175:313–329.

Seiler, N., Moulinoux, J.-P. (1996) "Les polyamines présentent-elles un intérêt dans le traitement du cancer ?", Médecine/sciences 12: 745-755.

Shi, H., Moore, P. B. (2000) "The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: A classic structure revisited", RNA 6:1091–1105

Shimogori, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (1996) "Spermidine regulation of protein synthesis at the level of initiation complex formation of Met-tRNA, mRNA and ribosomes", Biochem. Biophys. Res. Commun. 223: 544-548.

Shimura, K., Kasai, K.-I. (1997) "Affinity capillary electrophoresis: A sensitive tool for the study of molecular interactions and its use in microscale analyses", Analytical Biochemistry 251: 1-16.

Shintani, H., Polonský, J. (1997) "Handbook of capillary electrophoresis applications", Vol II Humana Press, Totowa, New Jersey.

Sinden, R. R. (1994) "DNA structure and function", Academic Press, California, U.S.A.

Smith, B. C. (1996) "Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy", CRC Press, New York, U.S.A.

Tabor, C. W., Tabor, H. (1984) "Polyamines", Ann. Rev. Biochem. 53: 749-790.

Tabor, H. (1962) "The protective effect of spermine and polyamines against heat denaturation of deoxyribonuclei acid", Biochemistry 1:496–501.

Tanaka, Y., Terabe, S. (2002) "Estimation of binding constant by capillary electrophoresis", J. Chrom. B 768: 81-92.

Thomas, T., Thomas, T. J. (2001) "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications", Cell. Mol. Life Sci. 58: 244-258.

Thomas, T., Shah, N., Klinge, C.M., Faaland, C.A., Adihkarakunnathu, S., Gallo, M.A., Thomas, T. J. (1999) "Polyamine biosynthesis inhibitors alter protein-protein interactions involving estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells", J. Mol. End. 22: 131–139.

Thomas,T., Kulkarni, G.D., Gallo, M.A., Greenfield, N., Lewis, J.S., Shirahata, A., Thomas, T. J. (1997). "Effects of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response element", Nucl. Acids Res. 25: 2396–2402.

Thomas, T.J., Kulkarni, G.D., Greenfield, N., Shirahata, A., Thomas, T. (1996) "Structural specificity effects of trivalent polyamine analogues on the stabilization and conformational plasticity of triplex DNA", Biochem. J. 319:591–599.

Thomas, T. J., Messner, R. P. (1986) "A lefthanded (Z) conformation of poly(dAdC).poly(dG-dT) induced by polyamines" Nucl. Acids Res. 14:6721–6733.

Tsuboi, M. (1964) "On the melting temperature of nucleic acid in solution", Bull. Chem. Soc. Jpn. 37:1514–1522.

Urdiales, J. L., Medina, M. A., Sanchez-Jimenez, F. (2001) "Polyamine metabolism revisited", Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 1011-1014.

Wang, A.H.-J., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., van Boom, J.H., van der Marel, G., Rich, A. (1981) "Left-handed double helical DNA: variations in the backbone conformation", Science 211:171–176.

Wemmer, D. E., Srivenugopal, K. S., Reid, B. R., Morris, D. R. (1985) "Nuclear magnetic resonance studies of polyamine binding to a defined DNA sequence", J. Mol. Biol. 185:457–459.

Widom, J., Baldwin, R. L. (1980) "Cation-induced Toroidal Condensation of DNA", J. Mol. Biol. 144: 431-453.