HAL open science

Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques : études physico-chimiques et photobiologiques

Sergii Rudiuk

▶ To cite this version:

Sergii Rudiuk. Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques : études physico-chimiques et photobiologiques. Chimie théorique et/ou physique. Université de Toulouse, 2009. Français. NNT : . tel-02369097

HAL Id: tel-02369097
https://hal.science/tel-02369097v1

Submitted on 18 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Chimie moléculaire et supramoléculaire*

Présentée et soutenue par *Sergii RUDIUK*
Le *26 janvier 2009*

Titre :

COMPLEXATION ENTRE L'ADN ET DES TENSIOACTIFS CATIONIQUES: ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHOTOBIOLOGIQUES

JURY

Prof. Vania BERNARDES-GENISSON (Président)
Dr. Sylviane LESIEUR (Rapporteur)
Dr. Jean Luc RAVANAT (Rapporteur)
Dr. Isabelle RICO-LATTES (Examinateur)

Ecole doctorale : *Science de la matière*
Unité de recherche : *Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Isabelle RICO-LATTES*
Rapporteurs : *Dr. Sylviane LESIEUR (Rapporteur)*
Dr. Jean Luc RAVANAT (Rapporteur)

“Toute nouvelle vérité naît malgré l'évidence”

Gaston Bachelard

A ma famille

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique de l'Université Paul Sabatier à Toulouse, dirigé successivement par Mme Isabelle Rico-Lattes puis par Mme Monique Mauzac. Je tiens à les remercier toutes deux pour leur accueil chaleureux au sein du laboratoire.

En tant que directrice de thèse, Mme Isabelle Rico-Lattes m'a également accueilli au sein de son équipe. Je tiens à la remercier particulièrement de m'avoir donné la possibilité de réaliser cette étude dans les meilleures conditions et de m'avoir suivie tout au long de ce travail. J'ai découvert, à ces cotés, une thématique de recherche passionnante ce qui m'a permis de largement enrichir mes connaissances dans divers domaines de chimie colloïdale. Je suis vraiment impressionné par votre rigueur scientifique et votre dynamisme.

Je souhaite remercier très chaleureusement pour les conseils et le soutien pendant toutes ces trois années Emile Perez, Nadia Chouini-Lalanne et Sophie Francheschi qui ont encadré quotidiennement ces travaux de recherche. Ils m'ont beaucoup aidé au début du mon séjour en France à affronter les difficultés et les contraintes de vie et de travail à l'étranger. Les dizaines de réunions que nous avons partagé ensemble pendant ces années m'ont permis de progresser dans mon travail et d'acquérir de nombreuses connaissances. Emile m'a aidé à découvrir la chimie physique, tandis que Nadia – la photobiologie de l'ADN, un sujet qui était absolument inconnu pour moi au début de cette "aventure". Je tiens à vous remercier tous et, plus particulièrement, Emile pour toutes les heures que vous avez passé à corriger nos publications, ma thèse, mes rapports, et en m'aidant à préparer les présentations orales.

Merci beaucoup, Isabelle, Emile, Nadia et Sophie pour votre bonne humeur, votre disponibilité, votre gentillesse et, surtout, pour votre amitié.

Je tiens également à exprimer mon plus profond respect à M. Armand Lattes qui m'a connu encore en Ukraine et qui était le premier français à qui j'ai parlé en français. C'est grâce à lui que j'ai eu l'espoir de partir à Toulouse pour la thèse.

Je suis très reconnaissant à M. Stefan Egelhaaf, le directeur du Laboratoire de Physique de Matière Molle (Lehrstuhl für Physik der Weichen Materie) à l'Université Heinrich Heine à Düsseldorf (Allemagne) de m'avoir accueilli pendant 3 mois au sein de son laboratoire pour le stage Marie Curie en diffusion de la lumière. Je tiens également à remercier toute son équipe, notamment Kirill, Frederic, Dilek, Matthew, Marco, Helen… Merci pour votre amitié.

Je tiens à remercier M. Angelo Valleriani et le programme Marie Curie EST (Early-Stage Research Training) pour le support financier de ces travaux.

Je voudrais également remercier Mme Sylviane Lesieur (Directeur de Recherche à l'Université Paris-Sud) et M. Jean-Luc Ravanat (Ingénieur de Recherche à CEA de Grenoble) qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs et pour s'être déplacés de loin pour ma soutenance.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Vania Bernardes-Genisson (Professeur à l'Université Paul Sabatier à Toulouse) qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mme Zoia Voitenko (Professeur à l'Université Taras Shevchenko à Kiev) qui était directrice de mes recherches en M2 et qui a cru en mes qualités scientifiques et m'a aidé à trouver cette thèse en France. J'étais heureux de pouvoir partager le succès de ma soutenance avec vous.

J'exprime également ma gratitude aux personnes des services communs de RMN, de masse, d'analyse centésimale du LCC et d'Infrarouge, mais aussi de RPE au LCC qui par leurs conseils et leurs expériences ont permis à ce travail d'avancer. Un grand merci s'adresse à M. Jean Christophe Garrigues pour des analyses de spectroscopie de masse haute résolution.

Je tiens à remercier Mathieu Delample que m'a aidé beaucoup pendant son stage de master 2. Je voudrai remercier très chaleureusement toute l'équipe : Cristina, Lyuba, Romain, Muriel Blanzat, Stéphanie Cassel, Plamen, Elodie, Philippe, Clara, Roland, Roberto, Isabelle, Alex, Hugo, Cécile, Denis, … Merci pour votre bonne humeur, votre amitié et l'atmosphère que vous créez dans l'équipe.

Je remercie également toutes les personnes des IMRCP pour leur amabilité et leur gentillesse. Un grand merci s'adresse particulièrement à : Lacramioara, Sandra, Valérie Sartor, Mar'yana, Javier, Sheila, Ménana, Kamil, Stephanie, Yann, Fernanda, Arielle, Charles Louis, Florence Frechou, Fabienne, Christian, Sandrine, Richard...

Je tiens également à remercier Julie pour son soutien pendant les dernières années de mon travail de thèse et pour les corrections quasi-quotidiennes de mon français dans la vie ainsi que dans le manuscrit.

Je souhaite remercier également mes amis "toulousains" : Mathieu, Florian, Samir, John, Sylvie, Camille, Christelle, Marie, Johannes, Julia… et mes compatriotes Slavik, Sasha, Misha, Dima, Andrey… Merci infiniment pour les moments magnifiques passés ensemble.

Je voudrais remercier Nadia et sa famille pour l'aide moral et financière qu'ils m'ont apporté lors de mon départ en France. Vous aviez une confiance en moi, mais je n'étais pas à la hauteur avec vous. Excusez-moi.

Je tiens à remercier le personnel du FJT "San Francisco", notamment Marie-Sophie, Jean-Jacques et Bertrand pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et ma famille pour tout ce que vous m'avez appris et offert. Merci d'avoir toujours cru en moi. Ce travail en est le résultat. Je vous aime !

Merci à tous.

LISTE DES ABREVIATIONS

4-oxo-TEMP :	2,2,6,6-tetraméthyl-4-pipéridone
8-oxoGua :	8-oxo-7,8-dihydroguanine
A :	adénine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
BET :	bromure d'éthidium
BML :	bléomycine
Bol12 :	dibromure de 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane
C :	cytosine
CA^{ADN}_{TA} :	concentration d'agrégation d'un tensioactif sur l'ADN
CAC :	concentration d'agrégation critique
CAC^{ADN}_{TA} :	concentration d'agrégation critique d'un tensioactif sur l'ADN
CafAmm :	caféate d'ammonium
Caf12 :	caféate de dodécylammonium
Caf16 :	caféate d'hexadécylammonium
CMC :	concentration micellaire critique
CPD :	dimères de thymine de type cyclobutane (cyclobutapyrimidyl dimères)
CTAB :	bromure de cetyltriméthylammonium
CTAC :	chlorure de cetyltriméthylammonium
ctADN :	calf thymus ADN
DLS :	diffusion quasi-élastique de la lumière
DMPO :	5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide
DOTAP :	chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTAC :	bromure de dodécyltriméthylammonium
EAR :	espèces azotées réactives
EDTA :	acide éthylènediaminetétracétique
ENH :	électrode normale à hydrogène
EOR :	espèces oxygénées réactives
FapyGua :	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
G:	guanine
Ghyd1HCl :	N-dodécylamino-1-déoxyglucitol

HAC :	acide acétique
IR :	infrarouge
logP :	coefficient de partage octanol/eau
MET :	microscopie électronique à transmission
ODN :	acide oligodésoxyribonucléique
pb :	paire de bases
PEI :	polyéthylènimine
PNBHCl :	chlorhydrate de polynorbornèneméthylènamine
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RPE :	résonance paramagnétique électronique
T :	thymine
TA :	tensioactif
TBE :	tampon Tris-Borate-EDTA
Tris :	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TTAC :	bromure de tétradécyltriméthylammonium
UV :	ultraviolet

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

INTRODUCTION GENERALE 9

Chapitre I. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES MECANISMES DE FORMATION DE DOMMAGES DE L'ADN 15

I.1 Introduction 19
I.2 L'ADN: son rôle et sa structure 19
I.3 Types de dommages sur l'ADN 22
I.3.1 Les dommages photoinduits 22
I.3.1.1 Les photodommages directs 23
I.3.1.1.1 Dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPD) 23
I.3.1.1.2 Les pyrimidine-(6-4)-pyrimidones photoproduits et leurs isomères Dewar 25
I.3.1.1.3 Autres types de photodommages directs 27
I.3.1.2 Les photodommages indirects 28
I.3.1.2.1 Réactions de type I 29
I.3.1.2.1.1 Oxydation des guanines 29
I.3.1.2.1.2 Formation de radicaux hydroxyle 31
I.3.1.2.2 Réactions de type II 32
I.3.1.2.2.1 Transfert d'énergie sur le dioxygène 32
I.3.1.2.2.2 Transfert d'énergie sur les bases azotées 33
I.3.2 Les dommages chimiques 34
I.3.2.1 Mécanismes de coupures des brins d'ADN 34
I.3.2.1.1 Arrachement direct de l'atome d'hydrogène du désoxyribose 34
I.3.2.1.1.1 Accessibilité des atomes d'hydrogène du désoxyribose dans l'ADN 34
I.3.2.1.1.2 Mécanismes de coupures d'ADN à partir de radicaux de désoxyribose 36
I.3.2.1.1.2.1 Réactions du radical C(1') 36
I.3.2.1.1.2.2 Réactions du radical C(2') 39
I.3.2.1.1.2.3 Réactions du radical C(3') 40
I.3.2.1.1.2.4 Réactions du radical C(4') 41
I.3.2.1.1.2.5 Réactions du radical C(5') 46
I.3.2.1.2 Transfert de l'atome d'hydrogène du désoxyribose vers la base azotée 48
I.3.2.2 Autre voies de la coupure de l'ADN 49
I.4 Origines de la production des espèces oxygénées réactives 49
I.4.1 Le rayonnement ionisant 49
I.4.2 L'ultrasonication 51
I.4.3 La thermolyse 52
I.4.4 La photolyse 53
I.4.5 La photosensibilisation 54
I.4.6 Les réactions de type « Fenton » 57

I.4.7 L'ozonation 58
I.5 Conclusion **59**
Références **60**

Chapitre II. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA COMPLEXATION ENTRE L'ADN ET DES TENSIOACTIFS CATIONIQUES **67**

II.1 Introduction **71**
II.2 Les tensioactifs et leur mode d'agrégation **71**
II.3 Interactions tensioactifs-polyélectrolytes **75**
II.4 Complexation ADN-tensioactifs **76**
II.4.1. Méthodes les plus couramment utilisées pour l'étude de la complexation ADN-tensioactifs 77
II.4.1.1 La diffusion de la lumière 78
II.4.1.1.1 Intensité de la lumière diffusée 78
II.4.1.1.2 Diffusion dynamique de la lumière 79
II.4.1.2 Mesures de la température de fusion de l'ADN 80
II.4.1.3 Titration par fluorescence 83
II.4.1.4 Mesures de viscosité 84
II.4.1.5 Tension de surface 86
II.4.1.6 Etude potentiométrique 87
II.4.1.7 Microscopie de fluorescence 89
II.4.1.8 Calorimétrie isotherme 90
II.4.1.9 Electrophorèse sur gel d'agarose 92
II.4.2 Comportement de phases d'un système ADN-tensioactif 94
II.4.3 Influence de différents facteurs sur la complexation entre l'ADN et les tensioactifs 96
II.4.3.1 Force ionique 96
II.4.3.2 Longueur des chaînes hydrophobes 98
II.4.3.3 Tête polaire des tensioactifs 101
II.4.3.4 Concentration en ADN 103
II.4.3.5 Température 105
II.4.4. Structures et morphologies des complexes ADN-tensioactifs 106
II.5 Applications des complexes ADN-tensioactifs **107**
II.5.1 Purification et isolement de l'ADN par précipitation 107
II.5.2 La thérapie génique 108
II.5.3 Dosage de l'ADN 109
II.6. Conclusion **110**
Références **111**

Chapitre III. ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN AVEC DES TENSIOACTIFS ET DES SELS 115

III.1 Introduction 119
III.2 Etude de complexation ADN-tensioactifs 121
III.2.1 Méthodes utilisées pour les études de la complexation ADN - tensioactifs 121
III.2.1.1 Titration par fluorescence 121
III.2.1.2 Electrophorèse sur gel d'agarose 122
III.2.1.3 Intensité de la lumière diffusée 122
III.2.2 Influence de la concentration en ADN sur la complexation avec des tensioactifs 123
III.2.2.1 Cas de la complexation ADN-CTAB 125
III.2.2.2 Cas de la complexation ADN-DTAC 129
III.2.3 Effet de contre-ion dans le cas du cetyltriméthylammonium 131
III.2.4 Effet de la longueur de la chaîne de tensioactif 132
III.2.5 Comparaison de la micellisation et de l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN de type triméthylammonium 135
III.2.6 L'effet de la tête polaire 137
III.2.6.1 Synthèse et caractérisation physico-chimique de Ghyd12HCl l38
III.2.6.2 Comparaison de la complexation du DTAC et du Ghyd12HCl avec l'ADN 139
III.2.7 Complexation ADN-tensioactifs bolaformes 140
III.3 Etude de complexation ADN-sels 142
III.4 Conclusion 145
Références 147

Chapitre IV. INFLUENCE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN SUR SA COUPURE PHOTOINDUITE 149

IV.1 Introduction 153
IV.2 Etude par résonance paramagnétique électronique (RPE) des espèces formées au cours de la photolyse de la benzophénone 156
IV.2.1 Etude RPE en présence de DMPO 156
IV.2.2 Etude RPE en présence de 4-oxo-TEMP 157
IV.3 Influence des tensioactifs sélectionnés sur la photosensibilisation de coupures simple brin d'ADN 158
IV.3.1 Effet du contre-ion et de la longueur de la chaîne 159
IV.3.2 Effet de la tête polaire 164
IV.3.2.1 Mise en évidence d'un environnement hydrophobe lors de la complexation ADN-tensioactifs 165
IV.3.3 Influence du Bol12 sur la photosensibilisation de coupures simple brin 170
IV.4 Influence de NaCl et NMe4Br sur la photosensibilisation de coupures simple brin 171
IV.5 Etude mécanistique de la formation de coupure simple brin photosensibilisée par la benzophénone sur l'ADN seul et sur l'ADN complexé par le CTAB 174

IV.6 Généralisation de la méthode et possibles applications **176**
IV.7 Influence de la complexation ADN - polymères ou ADN - lipides cationiques sur la photosensibilisation de coupures simple brin **178**
IV.7.1. Complexation ADN-polymères cationiques et son influence sur la photosensibilisation de coupures simple brin 179
IV.7.1.1. Complexation ADN-PEI 180
IV.7.1.2. Complexation ADN-PNBHCl 180
IV.7.1.3. Comparaison de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et des polyélectrolytes 181
IV.7.1.4. Influence de la complexation de l'ADN avec le PEI et le PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin 183
IV.7.1.5. Comparaison de l'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et du PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin 184
IV.7.2. Influence d'un lipide cationique sur la photosensibilisation de coupures simple brin 185
IV.8. Conclusion **187**
Références **189**

Chapitre V. SYNTHESE ET CARACTERISATION DE TENSIOACTIFS PAIRES D'IONS A CONTRE-ION ANTIOXYDANT AINSI QUE LEUR UTILISATION POUR LA PROTECTION DE L'ADN **193**

V.1Introduction **197**
V.2 Synthèse et caractérisation spectrale des Caf12 et Caf 16 **200**
V.2.1 Synthèse des Caf12 et Caf16 200
V.2.2 Propriétés spectrales et caractérisation des Caf12 et Caf16 201
V.2.2.1 Spectroscopie RMN du ^{1}H 201
V.2.2.2 Spectroscopie RMN du ^{13}C 204
V.2.2.3 Spectroscopie infrarouge et UV visible 204
V.2.2.4 Spectroscopie de masse 205
V.3 Etude des propriétés tensioactives en solution aqueuse **206**
V.4 Evaluation des propriétés antioxydantes de Caf12 et Caf16 **209**
V.5 Etude de l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin d'ADN **212**
V.5.1 Effet de la complexation de l'ADN avec le Caf12 et le Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin 212
V.5.1.1 Complexation ADN-Caf12 et ADN-Caf16 213
V.5.1.2 Influence des Caf12 et Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN 215
V.5.2 Application des paires d'ions caféate pour la protection de l'ADN dans les complexes ADN-CTAB 216
V.5.2.1 Effet de la complexation de l'ADN avec le CTABCaf12-10% et le CTABCaf16-10% sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN par la benzophénone 217

V.5.2.1.1 Influence de la présence de 10% des tensioactifs caféate sur l'agrégation du CTAB 217
V.5.2.1.2 Influence des mélanges CTABCaf12-10% et CTABCaf1610% sur la photosensibilisation de coupures simple brin 220
V.5.2.2 Effet du Caf12 et du Caf16 sur la coupure photoinduite de l'ADN dans le complexe ADN-CTAB 224

V.6 Conclusion 227
Références 228

CONCLUSION GENERALE 231

PARTIE EXPERIMENTALE 237

A. Produits commerciaux utilisés 241
A.1 Réactifs 241
A.2 Solvants 242
A.3 Préparation des tampons 243
A.3.1 Tampon 30 mM Tris/HCl 243
A.3.2 Tampon pour l'électrophorèse TBE x10 (Tris/borate/EDTA) 243
B. Synthèses 243
B.1 Synthèse du chlorhydrate de N-dodécylamino-1-déoxyglucitol (Ghyd12HCl) 243
B.2 Synthèse du 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12) 245
B.3 Synthèse du Caféate de dodécylammonium (Caf12) 245
B.4 Synthèse du caféate d'hexadécylammonium (Caf16) 246
B.5 Synthèse du Caféate d'ammonium (CafAmm) 247
C. Etudes spectrales 248
C.1 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) 248
C.2 Spectrométrie infrarouge (IR) 248
C.3 Spectrophotométrie UV-visible 249
C.4 Spectrométrie de masse 249
C.5 Analyses élémentaires 249
C.6 Résonance paramagnétique électronique (RPE) 249
D. Etudes physico-chimiques 251
D.1 Titration par fluorescence 251
D.2 Electrophorèse sur gel d'agarose 252
D.3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) 253
D.4 Mesures de l'intensité de la lumière diffusée 254
D.5 Etudes tensiométriques 254
D.5.1 Méthode de la goutte pendante 254
D.5.2 Méthode de l'arrachement de l'étrier 254
D.6 Microscopie électronique 255
E. Etudes chimiques et photobiologiques 256

E.1 Test des activités antioxydants par le DPPH 256
E.2 Influence de la complexation sur la photocoupure de l'ADN 256
E.3 Etude de l'influence du DOTAP sur la photocoupure de l'ADN 257
E.3.1 Préparation des vésicules 257
E.3.2 Préparation et irradiation des complexes ADN-DOTAP 258

ANNEXES **259**

INTRODUCTION GENERALE

L’ADN est une des plus importantes molécules biologiques qui est présente dans le noyau de chacune des 100 trillions de cellules de notre corps, car elle en contient le plan de construction complet. L'information concernant toutes les caractéristiques d'une personne, de son aspect physique à la structure de ses organes internes, est stockée dans l'ADN au moyen d'un système de codage spécial. Cette information est codée par l'ordre d'enchaînement des quatre bases, qui constituent en quelque sorte les lettres de l'alphabet génétique.

De ce fait, une interférence au niveau des fonctions constitutives de l'ADN représente une sérieuse menace pour l'intégrité fonctionnelle des cellules ainsi que pour leur viabilité. En effet, une simple altération au niveau d'une des nucléobases peut entraîner, si le dommage n'est pas réparé, une mutation pouvant être à l'origine d'un processus de carcinogenèse. C’est pour cette raison que de nombreuses études concernant les types de dommages sur l’ADN et les facteurs capables de l’endommager ont été effectuées depuis la découverte de la structure et du rôle biologique de ce dernier.

Dans les cellules eucaryotes, l’ADN cellulaire se localise dans le noyau sous une forme compactée, appelée chromatine. Les principales unités de compaction de la chromatine sont les nucléosomes ou l’ADN change de conformation en s’enroulant autour de complexes de protéines appelés histones. L’influence de la compaction de l’ADN en nucléosomes a été étudiée et les résultats obtenus ont même été utilisés afin de déterminer les positions des bases azotées de l’ADN complexé. Toutefois, la formation de dommages de l’ADN complexé dans des conditions non biologiques n’a jamais été étudiée.

L’ADN étant un polyélectrolyte anionique, il peut interagir avec divers agents cationiques qui seront capables de modifier sa conformation grâce à la neutralisation de ses charges, mais également son environnement. D’où l’intérêt d’étudier l’influence de la complexation de l’ADN avec des agents cationiques comme des tensioactifs, des polymères, des lipides et des sels sur la formation de ses dommages. De plus, contrairement aux nucléosomes, cette approche permettra de moduler la compaction et l’environnement de l’ADN afin de mieux comprendre leurs influences sur la formation de lésions. Comme le rayonnement UV est une des principales sources de lésions au niveau de l’ADN, nous nous sommes tout particulièrement intéressés, dans ce travail, aux dommages oxydatifs photosensibilisés sous irradiation UVA. Réciproquement, l’analyse de ces derniers pourra aussi être utilisée comme un nouvel outil d’investigation afin de mieux comprendre les

mécanismes de complexation par les agents cationiques. Un tel outil pourra s'avérer précieux, en regard de l'importance de la thérapie génique et donc de la transfection de l'ADN grâce à des vecteurs cationiques.

Ce sujet interdisciplinaire inclura deux domaines d'études : l'étude physicochimique de la complexation ADN-agents cationiques, et l'étude photobiologique de l'influence de cette complexation sur la photosensibilisation de dommages oxydatifs. Ainsi, deux chapitres seront consacrés aux rappels bibliographiques.

Le premier chapitre portera sur les types de dommages subits par l'ADN ainsi que leurs sources, en se focalisant plus particulièrement sur les mécanismes de coupures de ses brins. Le second chapitre, quant à lui, présentera une mise au point bibliographique sur la complexation ADN-tensioactifs et comprendra les principes de complexation, ses applications, ainsi qu'une présentation des méthodes les plus couramment utilisées pour son étude.

Le troisième chapitre sera consacré aux études de la complexation entre l'ADN et divers agents cationiques dans les conditions expérimentales qui seront ensuite utilisées pour les études de l'influence de cette complexation sur la photosensibilisation de coupures simple brin. L'influence des caractéristiques structurales des tensioactifs telles que : longueur de chaîne, nature du contre-ion et de la tête polaire (une ou deux) sera également étudiée.

Le quatrième chapitre concernera l'influence de la complexation de l'ADN avec des agents cationiques sur la formation de photocoupures. La comparaison des effets de sels et des tensioactifs nous permettra d'évaluer le rôle de la compaction de l'ADN ou du changement environnemental sur ce processus. Ces résultats nous permettront d'identifier les facteurs qui protègent l'ADN vis-à-vis de l'irradiation UV ainsi que ceux qui augmentent sa photosensibilité. Dans ce chapitre, nous étudierons également la stabilité de l'ADN dans les complexes utilisés pour la transfection de gènes - polyplexes et lipoplexes. Cela nous permettra de mettre en évidence les facteurs structuraux qu'il faudra prendre en considération lors du choix de l'agent de transfection afin de diminuer les photodommages subits par l'ADN lors de sa complexation. L'étude de deux polymères cationiques utilisés en transfection de l'ADN, la polyéthylenimine (hydrophile) et le chlorhydrate de

polynorbornèneméthylèneammonium (amphiphile) nous permettra de déterminer l'influence de l'hydrophobie sur ce processus.

Ces différentes observations nous amèneront à considérer l'introduction de certains additifs afin de protéger l'ADN une fois complexé. C'est ainsi que le cinquième chapitre concernera la synthèse, la caractérisation physicochimique et la mise en évidence des propriétés antioxydantes d'une nouvelle famille de molécules tensioactives paires d'ions. Ces derniers, synthétisées par réaction acide-base entre l'acide caféique et des amines grasses (dodécyl- et hexadécylamine) seront utilisées pour protéger l'ADN déjà complexé avec des agents cationiques amphiphiles, et les conditions de protection efficace seront déterminées.

Enfin, le dernier chapitre décrira des modes opératoires, les techniques d'analyse employées ainsi que les caractéristiques des produits préparés au cours de ces travaux.

Chapitre I

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES MECANISMES DE FORMATION DE DOMMAGES DE L'ADN

Chapitre I. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES MECANISMES DE FORMATION DE DOMMAGES DE L'ADN

I.1 Introduction **19**

I.2 L'ADN: son rôle et sa structure **19**
I.3 Types de dommages sur l'ADN **22**
I.3.1 Les dommages photoinduits 22
I.3.1.1 Les photodommages directs 23
I.3.1.1.1 Dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPD) 23
I.3.1.1.2 Les pyrimidine-(6-4)-pyrimidones photoproduits et leurs isomères Dewar 25
I.3.1.1.3 Autres types de photodommages directs 27
I.3.1.2 Les photodommages indirects 28
I.3.1.2.1 Réactions de type I 29
I.3.1.2.1.1 Oxydation des guanines 29
I.3.1.2.1.2 Formation de radicaux hydroxyle 31
I.3.1.2.2 Réactions de type II 32
I.3.1.2.2.1 Transfert d'énergie sur le dioxygène 32
I.3.1.2.2.2 Transfert d'énergie sur les bases azotées 33
I.3.2 Les dommages chimiques 34
I.3.2.1 Mécanismes de coupures des brins d'ADN 34
I.3.2.1.1 Arrachement direct de l'atome d'hydrogène du désoxyribose 34
I.3.2.1.1.1 Accessibilité des atomes d'hydrogène du désoxyribose dans l'ADN 34
I.3.2.1.1.2 Mécanismes de coupures d'ADN à partir de radicaux de désoxyribose 36
I.3.2.1.1.2.1 Réactions du radical C(1') 36
I.3.2.1.1.2.2 Réactions du radical C(2') 39
I.3.2.1.1.2.3 Réactions du radical C(3') 40
I.3.2.1.1.2.4 Réactions du radical C(4') 41
I.3.2.1.1.2.5 Réactions du radical C(5') 46
I.3.2.1.2 Transfert de l'atome d'hydrogène du désoxyribose vers la base azotée 48
I.3.2.2 Autre voies de la coupure de l'ADN 49
I.4 Origines de la production des espèces oxygénées réactives **49**
I.4.1 Le rayonnement ionisant 49
I.4.2 L'ultrasonication 51
I.4.3 La thermolyse 52
I.4.4 La photolyse 53
I.4.5 La photosensibilisation 54
I.4.6 Les réactions de type « Fenton » 57
I.4.7 L'ozonation 58
I.5 Conclusion **59**
Références **60**

I.1 Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'hérédité, et contient sous forme codée toutes les informations relatives à la création et à la vie d'un organisme vivant, du plus simple au plus complexe : viral, bactérien, végétal ou animal. Toutefois, l'ADN peut aussi être la cible de divers agents délétères chimiques et/ou physiques. Ces agents peuvent provoquer différentes altérations de structure de cette molécule ce qui représente une sérieuse menace pour l'intégrité fonctionnelle des cellules et pour leur viabilité.

La connaissance des facteurs, capables de modifier la structure de l'ADN ainsi que des mécanismes de formation de ses dommages est donc d'une importance cruciale. C'est pour cette raison que de nombreuses études concernant les dommages sur l'ADN ont été effectuées depuis la découverte de la structure et du rôle biologique de ce dernier. Le chapitre qui suit sera consacré à une mise au point bibliographique sur les divers types et mécanismes de formation de dommages sur l'ADN ainsi que sur les facteurs pouvant les influencer.

I.2 L'ADN : son rôle et sa structure

L'ADN est formée par deux chaînes complémentaires qui s'enroulent l'une autour de l'autre en formant une double hélice. Sa structure hélicoïdale a été proposée par James Watson et Francis Crick en 1953. L'importance de cette découverte a été distinguée par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1962. En effet une telle conformation de l'ADN montre encore une fois le génie de la Nature. Chaque chaine est formée d'un enchaînement de nucléotides. Ces derniers sont constitués d'un phosphodiester, reliant deux nucléotides consécutifs entre eux, d'un sucre, le 2-désoxyribose, et d'une des quatre bases azotées (deux bases de type purique – l'adénine (A) et la guanine (G), et deux bases de type pyrimidique – la thymine (T) et la cytosine (C)). Chaque brin d'ADN est donc constitué d'un squelette sucre-phosphate hydrophile sur lequel sont branchées des bases azotées hydrophobes. (Figure I-1)

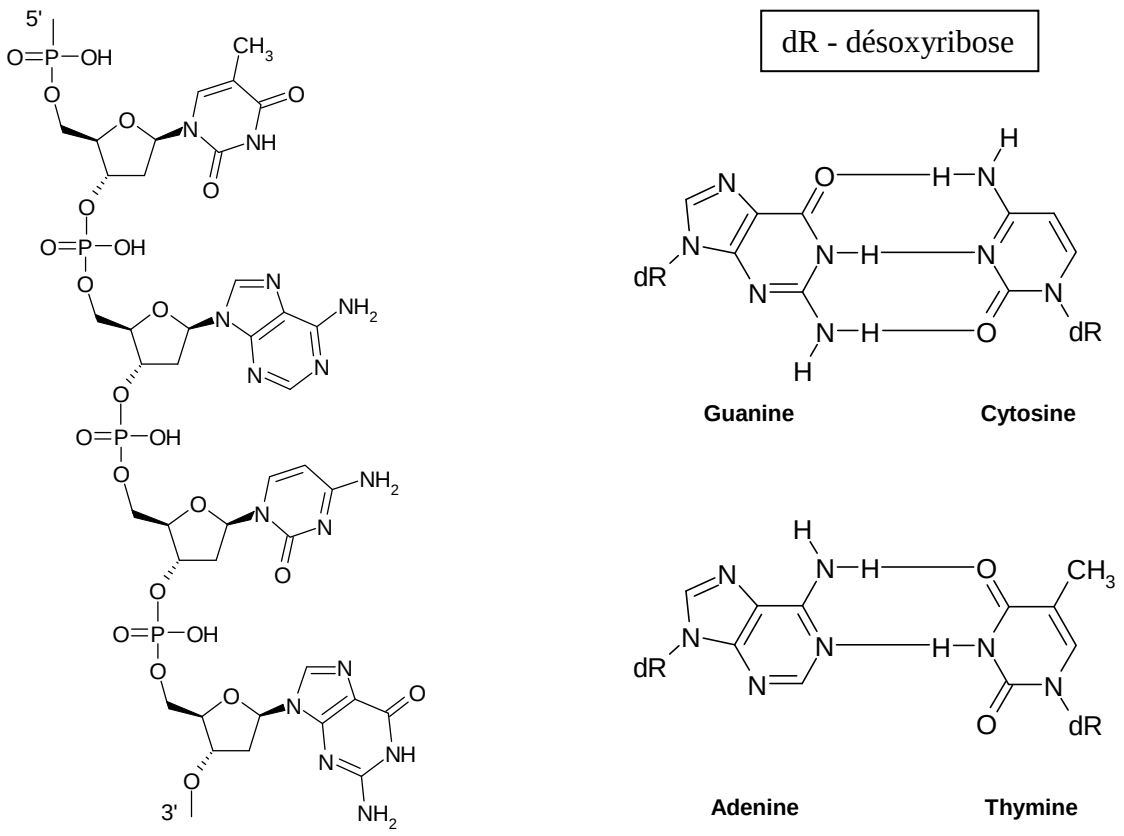


Figure II-1 : Structure de l'ADN et de ses paires de nucléotides

En trois étapes seulement, la Nature a diminué le contact entre les nucléobases hydrophobes et le milieu hydrophile (l'eau)[1] (Figure I-2). Pour cela elle a:

- relié deux chaînes désoxyribonucléiques par des liaisons hydrogènes entre des nucléobases selon une règle de complémentarité : la thymine se lie toujours à l'adénine et la cytosine à la guanine
- diminué l'espace libre entre les bases d'une même chaîne en inclinant le squelette par rapport au plan de paires de bases
- enroulé les deux brins incliné en hélice l'un autour de l'autre

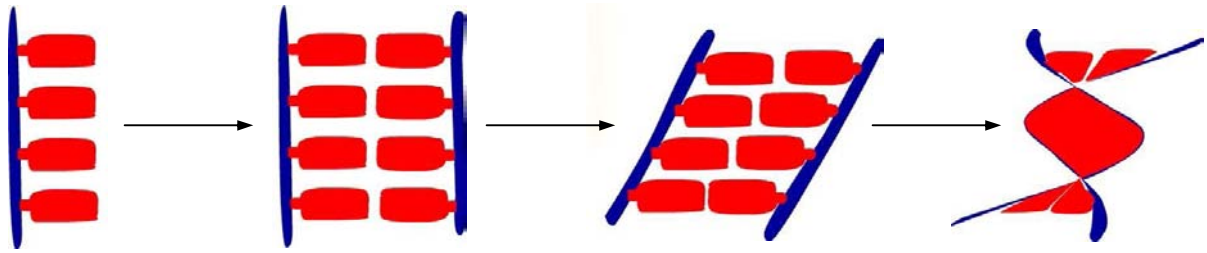


Figure I-2 : Schema de formation de double hélice à partir d'un brin

Dans cette structure hélicoïdale, les bases sont situées à l'intérieur tandis que le squelette sucre-phosphate est repoussé à l'extérieur faisant ainsi apparaître 2 sillons de taille différente : le petit sillon et le grand sillon[1] (Figure I-3).

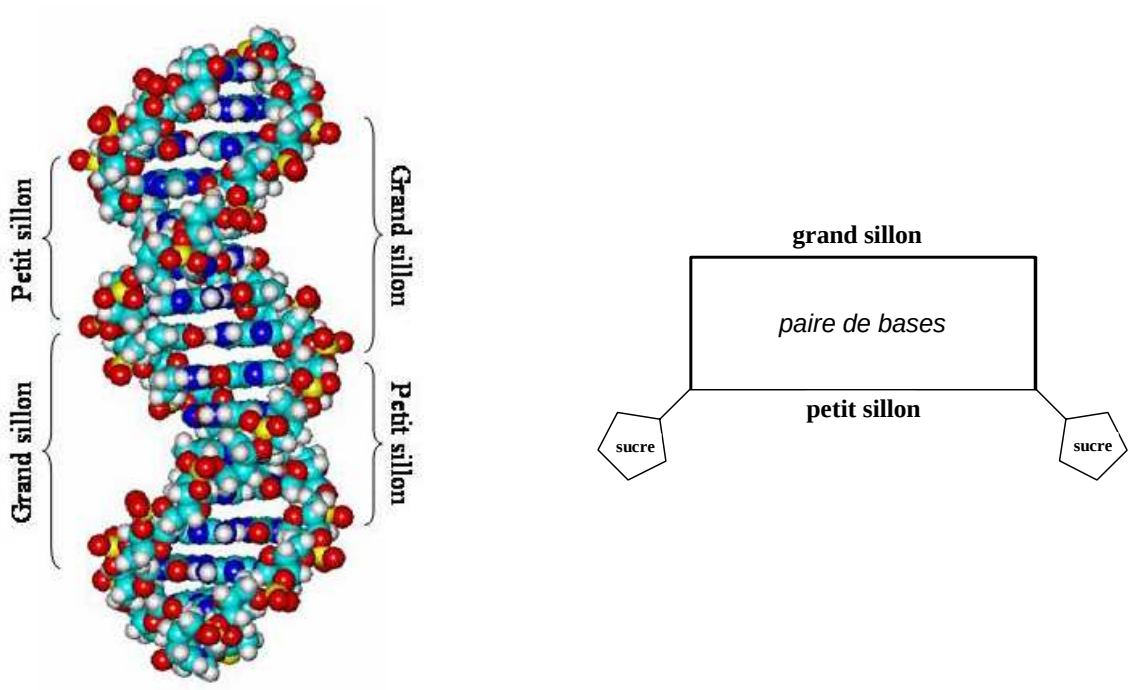


Figure I-3 : Formation de deux sillons d'ADN

Le rôle de l'ADN est de contenir l'information nécessaire à la production des protéines, constituant essentiel de la matière vivante. Cette information est codée par l'ordre d'enchaînement des quatre bases, qui constituent en quelque sorte les lettres de l'alphabet génétique. Ainsi chaque être vivant possède une batterie d'enzymes dont le rôle principal est de transcrire l'ADN en ARN (acide ribonucléique), qui sera ensuite traduit en protéines nécessaires à l'organisme. Les protéines ainsi formées ont diverses fonctions que l'on peut classer en deux essentielles : l'autonomie de l'organisme (croissance, défense) et sa reproduction. La fidélité de la réplication est assurée par des processus enzymatiques complexes, vérifiant la complémentarité des bases (A-T et G-C) et corrigeant les erreurs aléatoires. C'est pour cette raison qu'une simple altération au niveau d'une des nucléobases peut entraîner, si le dommage n'est pas réparé, une mutation pouvant être à l'origine d'un processus de carcinogenèse [2-5].

I.3 Types de dommages sur l'ADN

L'ADN est une molécule cible de nombreux agents délétères. Il existe deux sources principales de dommages au niveau de l'ADN : les dommages photoinduits et ceux dus à des agents ou systèmes chimiques actifs. Les coupures de brins d'ADN sont induites principalement par des espèces oxygénées réactives (EOR), notamment par les radicaux hydroxyle (Figure I-4). Ces espèces oxygénées réactives qui peuvent être formées par les deux mécanismes précédents, jouent un rôle majeur dans ce processus.

Les dommages chimiques sont des dommages induits par des agents ou des systèmes chimiques actifs, capables d'interagir avec l'ADN directement ou par le biais de radicaux (espèces oxygénées réactives (EOR), espèces azotées réactives (EAR), radicaux de type carbonés etc.). Dans ce type de dommages peuvent être également inclus les dommages induits par sonication non liés à l'absorption de photons.

Les dommages photoinduits sont provoqués par des photons de différentes énergies, et selon leur énergie, ils peuvent être classés en deux types de radiations: les radiations ionisantes (rayonnement γ) et les radiations non-ionisantes (l'ultraviolet et la lumière visible). La radiation ionisante est même capable d'ioniser ou d'exciter les molécules d'eau, en formant des radicaux qui endommagent l'ADN.

Il a été montré que ce sont principalement les dommages au niveau de l'ADN qui sont responsables de la mort des cellules. Les cellules eucaryotes, dont l'ADN est situé dans le noyau, ne meurent pas tant que la radiation ionisante pouvant endommager l'ADN est absorbée par la membrane et le cytoplasme. Mais dès que la radiation ionisante pénètre dans le noyau, une augmentation significative de la mort des cellules est observée [6].

I.3.1. <u>Les dommages photoinduits</u>

La nature des dommages engendrés sur l'ADN dépend de la longueur d'onde d'irradiation. Le rayonnement ultraviolet, dont l'énergie lumineuse peut être, selon la longueur d'onde, directement absorbée par les bases de l'ADN, constitue une source importante de dommages. Il est divisé en trois domaines (Figure I-4):

- les UVC, les plus énergétiques (190-280 nm), sont absorbés par l'ozone stratosphérique et n'atteignent généralement pas la surface de la Terre.

- les UVB de courte longueur d'onde (280-295 nm) sont également bloqués par l'atmosphère, les UVB de grande longueur d'onde (295-320 nm) représentent environ 5% des UV atteignant la surface de la Terre.

- les UVA (320-400 nm) représentent 95% des UV atteignant la surface de la Terre

I.3.1.1. *Les photodommages directs*

Le maximum d'absorption de l'ADN se situant à environ 260 nm, c'est pour cette raison que seuls les UVC et UVB sont capables de former des dommages directs sur cette molécule biologique. Lorsque l'ADN est irradié par ce type de rayonnement, une base de l'ADN peut absorber un photon et ainsi passer de son état fondamental à son état singulet excité. A partir de cet état singulet excité, plusieurs processus sont possibles : la base peut revenir à son état fondamental par conversion interne, accompagnée d'un dégagement de chaleur, ou par émission de fluorescence , elle peut subir une réaction photochimique ou bien subir un croisement intersystème qui la fait passer de son état singulet excité à un état triplet excité.

La majorité des photodommages directs est observée au niveau des bases pyrimidiques (thymine ou cytosine), principalement à cause du processus de dimérisation[7,8].

Les trois principaux photoproduits obtenus par irradiation UV sont les dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPDs) qui représentent 75% des photoproduits dimèriques, les pyrimidine-(6-4)-pyrimidones photoproduits – 25% et leurs isomères Dewar[9].

I.3.1.1.1. *Dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPD)*

Lorsqu'une pyrimidine à l'état excité est adjacente à une autre pyrimidine sur un même brin d'ADN, une réaction de cycloaddition [2+2] peut avoir lieu entre les doubles liaisons des carbones C5 et C6 des deux bases (Figure I-5).

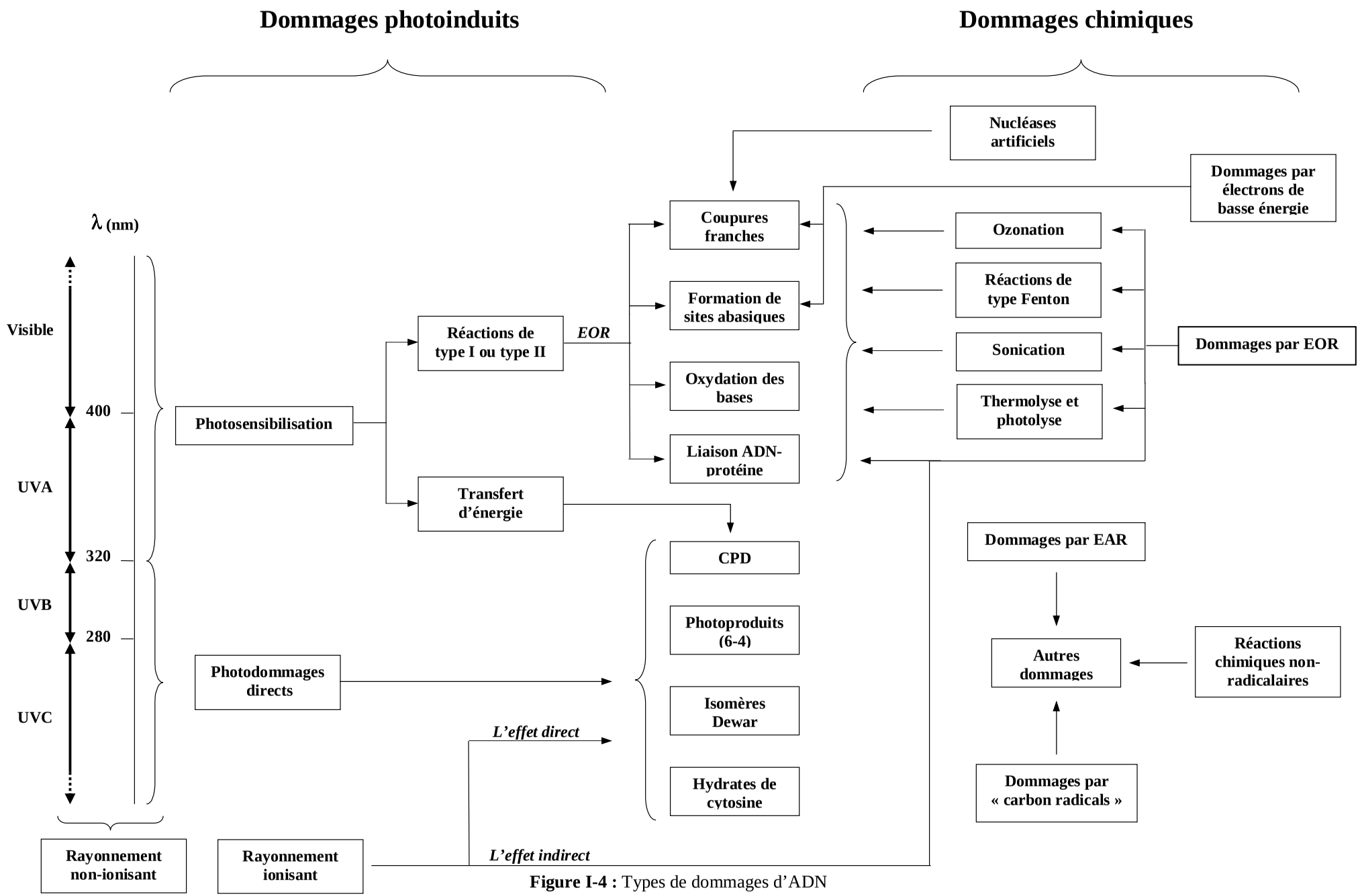


Figure I-4 : Types de dommages d'ADN

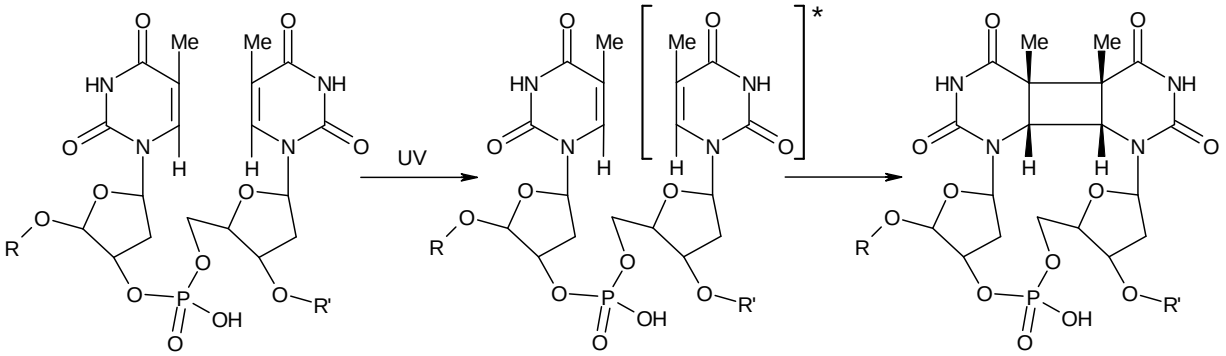


Figure I-5 : Formation de dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPDs).
Cas d'une dimérisation thymine-thymine

L'enchaînement des pyrimidines au sein de l'ADN influe sur la fréquence de formation des dimères. Ainsi, les CPD le plus souvent formés sous irradiation UVB sont les dimères (<>) de séquence T<>T, suivis par les dimères 5'-T<>C-3', 5'-C<>T-3', puis C<>C (avec un rapport molaire 60:24:11:5 sur ADN cellulaire) [9,10]

L'étude théorique, par la méthode DFT (density functional theory) de la formation de CPDs confirme cet ordre [11]. Il a été montré que dans le cas du système T + T, les barrières d'énergie à franchir, à partir de l'état singulet excité, pour parvenir au puits de potentiel à partir duquel a lieu la dimérisation sont beaucoup moins importantes que pour les systèmes comportant des cytosines.

I.3.1.1.2. *Les pyrimidine-(6-4)-pyrimidones photoproduits et leurs isomères Dewar*

Ces dommages se forment par cycloaddition [2+2] entre le groupe C4' carbonyle d'une thymine en position 3' et la double liaison C5-C6 d'une pyrimidine adjacente en 5'. Une telle cycloaddition induit la formation d'un intermédiaire oxétane. En revanche, dans le cas d'une cytosine en position 3', c'est la liaison 4'C=N de son tautomère imino qui interagit avec une pyrimidine en 5'. Il se forme un intermédiaire azétidine non stable qui se réarrange en photoproduit (6-4) [9]. (Figure I-6)

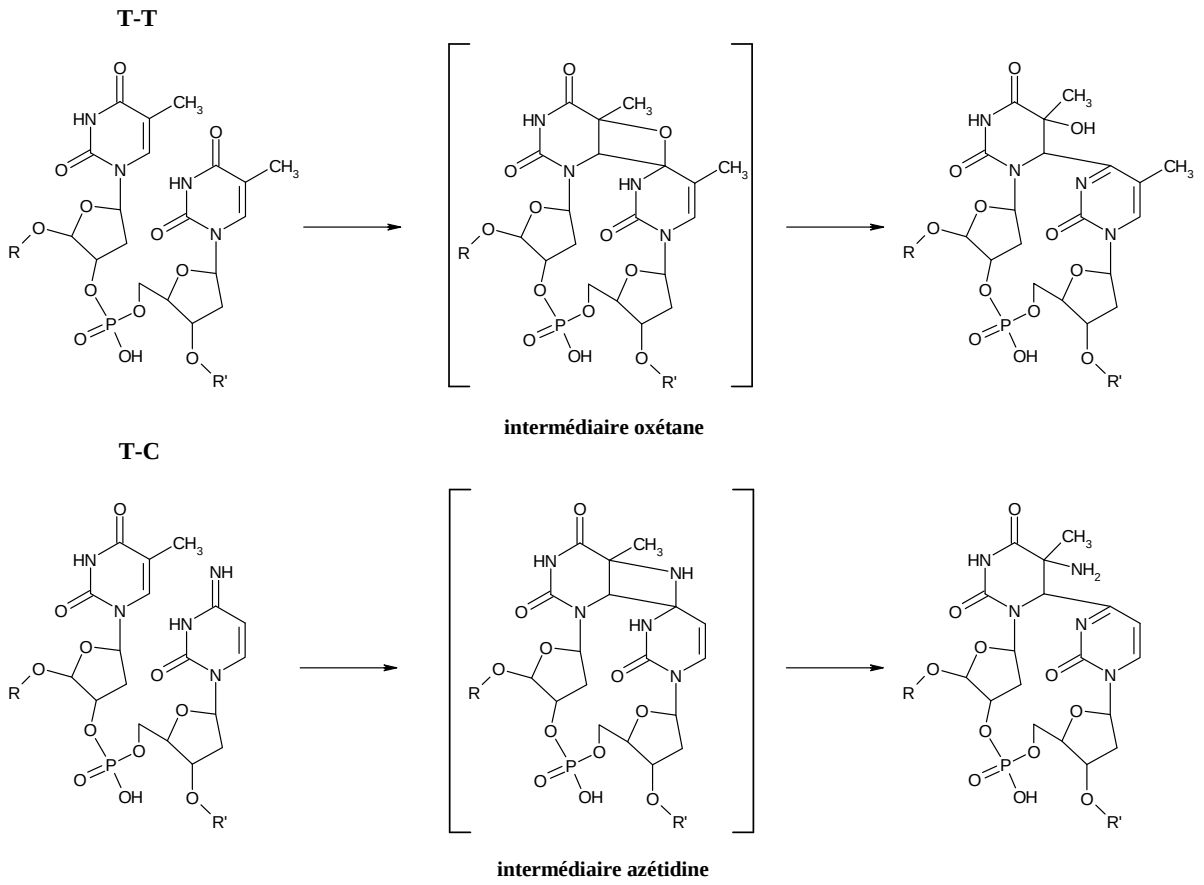


Figure I-6 : Photoproduction de pyrimidine-(6-4)-pyrimidones

Si l'irradiation UV se prolonge, les photoproduits (6-4) peuvent ultérieurement subir une transformation en leur isomère de valence, l'isomère Dewar [12]. (Figure I-7). Or, si les photoproduits (6-4) sont rapidement réparés par la cellule, leurs isomères Dewar le sont en revanche peu, d'où leur caractère hautement mutagènes. Des résultats récents suggèrent en outre que ce sont les UVA, plutôt que les UVB, qui sont responsables de cette isomérisation [13].

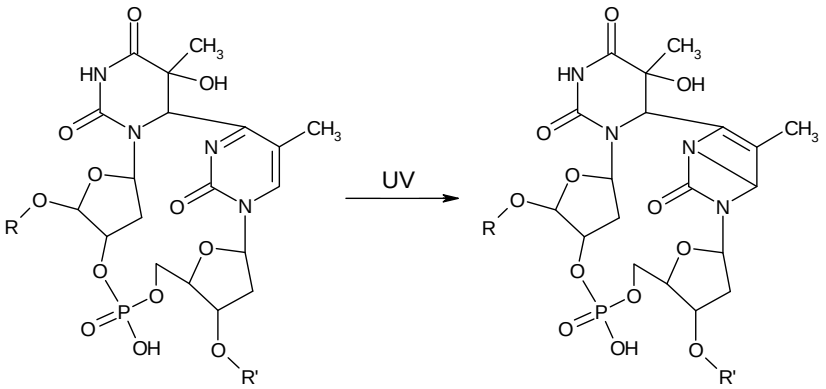


Figure I-7 : Formation d'une isomère Dewar

I.3.1.1.3. *Autres types de photodommages directs*

Lorsqu'ils sont irradiés par les UVC, les trois types de photoproduits dimériques de pyrimidines contenant la cytosine subissent une déamination qui conduit à la substitution hydrolytique du groupement NH_2 aminé en position C4 par un groupement OH [14]. Cette réaction est 100 fois plus présente chez les CPDs que chez les pyrimidine-(6-4)-pyrimidones photoproduits et leurs isomères Dewar. Ce processus a un rôle important dans la mutagénèse car le produit de cette désamination est un fragment d'uracile, qui se lie au sein de l'ADN non pas avec la guanine comme dans le cas de la cytosine, mais avec l'adénine [15].

Les autre types de dommages directs photoinduits sur l'ADN sont les produits d'hydratation de pyrimidines [16]. Ils se forment par addition d'une molécule d'eau sur la double liaison C5-C6. Cette lésion ne représente cependant qu'une très faible proportion des photoproduits formés (~2%). L'hydrate de cytosine formé peut subir une désamination et former des hydrates d'uracile plus stables. (Figure I-8)

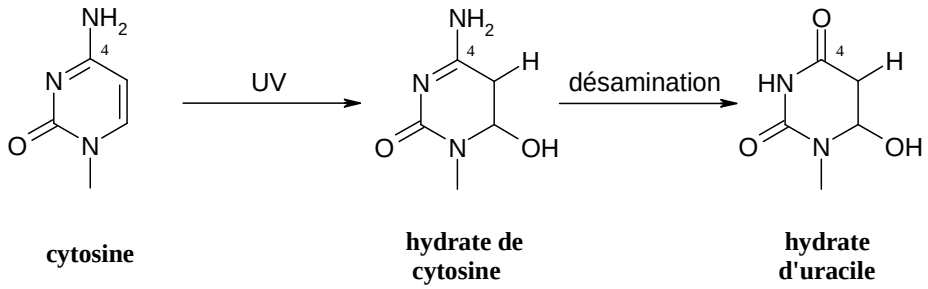
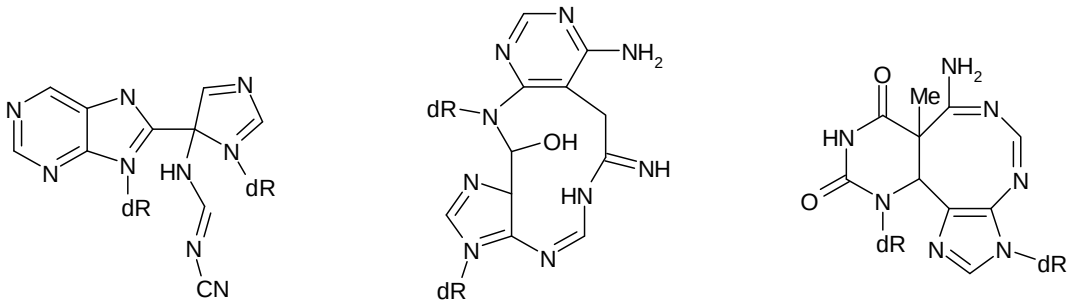


Figure I-8 : Formation de l'hydrate de cytosine et sa désamination

Ces photodommages directs de l'ADN peuvent également concerner les bases puriques en particulier l'adénine conduisant à des dimère d'adénine ou à des composés d'addition thymine-adénine [9] (Figure I-9).



Dimères d'adénine

composé d'addition thymine - adénine

Figure I-9 : Photodommages directs d'adénine

I.3.1.2. *Les photodommages indirects*

Les UVA, de par leur gamme de longueur d'onde, ne sont quasiment pas absorbés par l'ADN. Cependant, un effet mutagène de ce type de rayonnement est observé [17,18]. En effet, ce sont des photosensibilisateurs, chromophores endogènes ou exogènes qui vont absorber la lumière incidente et induire des dommages au niveau de l'ADN à partir de leur état excité.

Lorsqu'une molécule de photosensibilisateur est irradiée, elle peut absorber un photon et ainsi passer de son état fondamental à son état singulet excité avec un temps de vie très court. A partir de cet état excité, plusieurs processus sont possibles (Figure I-10) : la molécule peut perdre l'excès d'énergie et revenir à son état fondamental par conversion interne accompagnée d'un dégagement de chaleur, ou par émission de photon (fluorescence). Elle peut également subir un croisement intersystème qui la fait passer de son état singulet excité à un état triplet excité. Comme le temps de vie de l'état triplet est assez important, de nombreuses réactions chimiques sont possibles à partir de ce dernier.

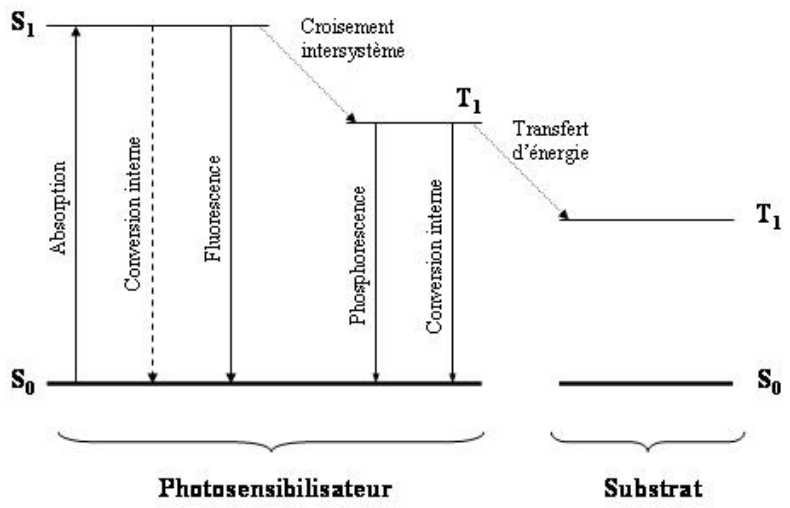


Figure I-10 : Diagramme de Jablonski. S_0 : état fondamental ; S_1 : état singulet excité ; T_1 : état triplet excité

Ces photosensibilisateurs vont agir ensuite sur l'ADN par des mécanismes dits de type I ou de type II.

I.3.1.2.1. *Réactions de type I*

Les mécanismes de type I impliquent le transfert d'un électron ou l'arrachement d'un atome d'hydrogène au substrat par le photosensibilisateur.

I.3.1.2.1.1. *Oxydation des guanines*

Si le potentiel de réduction du photosensibilisateur à l'état excité est plus élevé que le potentiel d'oxydation d'une des nucléobases, l'ADN peut être oxydé. Comme la guanine est la base qui a le plus faible potentiel d'oxydation au sein de l'ADN, c'est donc elle qui est la plus facilement oxydée. De plus, dans un ADN double brin, le potentiel d'oxydation de cette nucléobase varie selon la séquence dans laquelle elle se trouve (Tableau I- 1). Celui-ci, déterminé par calcul théorique par rapport à une électrode normale à hydrogène (ENH), varie de 1,29 V / ENH pour une guanine isolée à 0,82 V pour une guanine située en 5' d'une séquence -GG-, et jusqu'à 0,64 V lorsque cette base se trouve en 5' d'une séquence -GGG- [19].

Nucléoside*	E^0 (V / ENH)	Séquence d'ADN	E^0 (V / ENH)
rG	1,29	5'GT3'	1,16
rA	1,42	5'GC3'	1,15
dC	1,6	5'GA3'	1,00
dT	1,7	5'GG3'	0,82
		5'GGG3'	0,64

(r - ribonucléoside, d - désoxyribonucléoside, ENH - électrode normale à hydrogène)

Tableau I-1: Valeurs des potentiels d'oxydation des différents nucléosides en milieu aqueux neutre et de la guanine incluse dans différentes séquences [20].

Il a été montré que la charge positive formée lors de l'oxydation pouvait migrer le long du double brin d'ADN, et ce jusqu'au puits de potentiel le plus bas [21,22]. C'est pour cette raison que lors d'un mécanisme par transfert d'électron une très grande sélectivité des dommages est observée sur l'ADN au niveau d'une guanine située en 5'd'un site –GG- [23].

Le produit d'oxydation de la guanine, c'est à dire son radical cation, peut ensuite subir principalement deux réactions : l'hydratation ou la déprotonation. Le produit d'hydratation, le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl présente des propriétés réductrices. Il peut se réduire jusqu'à former la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua). Ce radical peut ainsi être oxydé par le dioxygène et former le 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) [20]**.** La déprotonation du radical cation de la guanine conduit quant à elle, après réaction avec l'oxygène moléculaire et une molécule d'eau, à la formation de l'imidazolon. Cette espèce peut ensuite s'hydrolyser spontanément en oxazolone (Figure I-11).

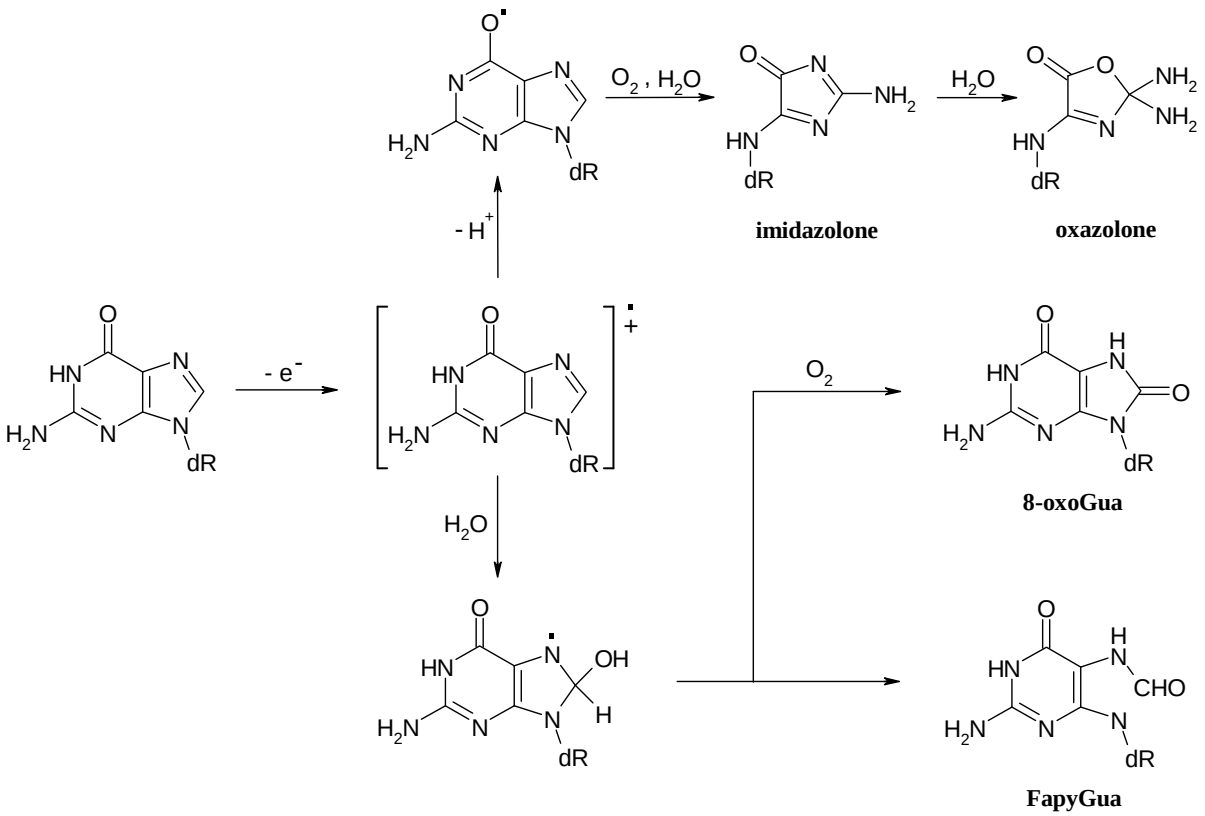


Figure I-11: Mécanismes de décomposition de la guanine suite à la perte d'un électron

I.3.1.2.1.2. *Formation de radicaux hydroxyle*

Le photosensibilisateur dans son état excité peut céder un électron à une molécule d'oxygène, et conduire à la formation d'anion superoxyde. Ce même produit peut être formé par la mise en œuvre d'un transfert électronique de la forme réduite du photosensibilisateur (l'anion radical) vers l'oxygène moléculaire. Comme il sera décrit dans le chapitre concernant les sources d'espèces oxygénées réactives, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ n'est pas lui-même réactif vis-à-vis de l'ADN. Cependant, il peut subir des réactions ultérieures conduisant à la formation de radicaux hydroxyle.

Les radicaux hydroxyle $^{\bullet}OH$ formés au cours de cette réaction constituent une espèce extrêmement réactive. En effet, ils peuvent agir par arrachement d'un atome d'hydrogène au 2-désoxyribose de l'ADN, conduisant généralement à la formation d'une coupure de brins d'ADN. Ils peuvent également s'additionner aux liaisons insaturées des bases, puriques ou pyrimidiques, initiant la transformation ultérieure de celles-ci et induisant ainsi la formation de lésions non spécifiques au sein de l'ADN [20,24].

In vivo l'ADN ne se situe pas à proximité de la surface des cellules. C'est pour cette raison que même des radicaux hydroxyle exogènes très actifs ne peuvent pas l'endommager. Seuls les radicaux endogènes, formés à proximité de l'ADN sont capables de former des lésions sur l'ADN in vivo [25].

I.3.1.2.2. *Réactions de type II*

Les mécanismes de type II impliquent le transfert d'énergie entre le photosensibilisateur à l'état excité et un substrat. Ce substrat peut être soit une base azotée de l'ADN soit l'oxygène moléculaire.

I.3.1.2.2.1. *Transfert d'énergie sur le dioxygène.*

Comme Il sera décrit dans le chapitre consacré aux mécanismes de formation d'espèces oxygénées réactives, le produit de transfert d'énergie sur l'oxygène moléculaire à l'état triplet fondamental est l'oxygène singulet $^1O_2$. C'est une espèce très réactive, capable d'oxyder l'ADN de manière très spécifique, puisque seules les guanines sont ciblées. Par réaction de type Diels-Alder [2+4], il peut s'additionner aux carbones C4 et C8 de la guanine pour former un 4,8-endoperoxyde. Cet intermédiaire instable peut ensuite se décomposer dans un ADN double brin en 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxo-Gua), ou se réarranger en spiroiminodihydatoïne (Figure I-12).

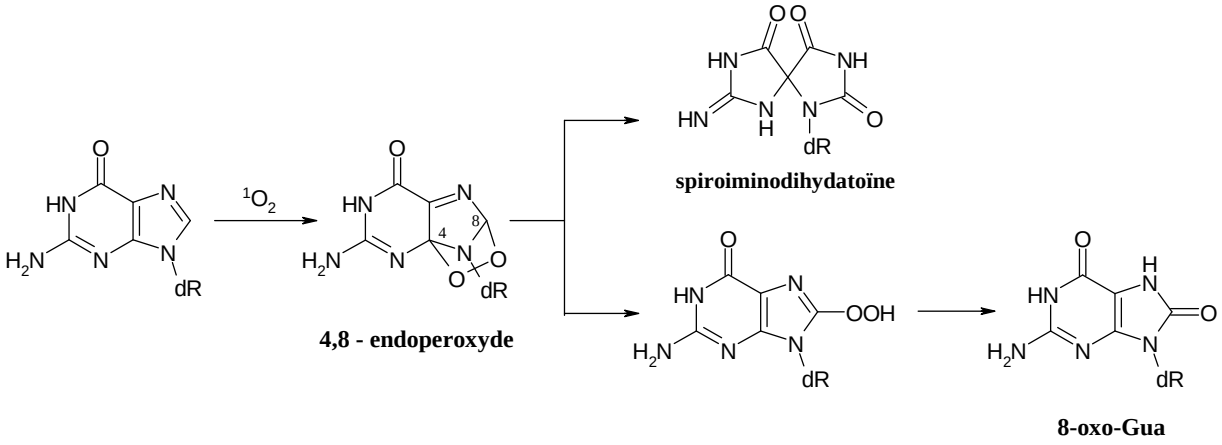


Figure I-12 : Mécanismes de décomposition de la guanine suite à la perte d'un électron

I.3.1.2.2.2. *Transfert d'énergie sur les bases azotées*

Il a été observé que les CPDs se forment également lorsque l'ADN cellulaire est soumis à un rayonnement UVA, bien que l'ADN n'absorbe pas les UVA directement. Les CPDs sont donc formés par le biais de photosensibilisateurs. Le chromophore de ce dernier dont le maximum d'absorption se situe à une longueur d'onde plus élevée que celle de l'ADN pourra absorber un photon UVA et passer à son état excité singulet puis à son état excité triplet par croisement intersystème. A partir de son état triplet, le photosensibilisateur peut ensuite réagir par transfert d'énergie avec les nucléobases. Ce transfert d'énergie a lieu principalement vers la thymine, la base possédant l'énergie d'état triplet la plus faible au sein de l'ADN (Tableau I-2). L'énergie d'état triplet de la thymidine-5'-monophosphate isolée est estimée à 310 $kJ.mol^{-1}$. Bien que la valeur de cette énergie ne soit pas connue avec précision au sein de l'ADN, elle est inférieure d'au moins 10 $kJ.mol^{-1}$ à celle du nucléoside isolé [26,27].

Si une thymine dans son état triplet excité est adjacente à une autre base pyrimidique au sein d'un même brin d'ADN, un CPD pourra être formé par cycloaddition [2+2] (Figure I-5) [28]. Les CPD ainsi formés par photosensibilisation, contiennent tous au moins un résidu thymine. Les dimères les plus fréquemment formés sont les T<>T. Les photoproduits (6-4), ainsi que leurs isomères Dewar ne sont pas les produits de ce processus car ils se forment à partir de l'état excité singulet de la thymine [29].

Nucléoside ou nucléotide	**E_T ($kJ.mol^{-1}$)**
Cytidine-5'-monophosphate	321
Guanosine-5'-monophosphate	317
Adénosine-5'-monophosphate	314
Thymidine-5'-monophosphate	310

Tableau I-2: Energies des états triplets excités T_1 (E_T) de différents nucléotides en solution aqueuse à 25ºC [26]

I.3.2. Les dommages chimiques

Des espèces oxygénées réactives, générées par différentes méthodes, ainsi que d'autres espèces radicalaires réactives (azotées, carbonées) sont capables d'induire divers dommages sur l'ADN. Elles provoquent en premier lieu la formation de radicaux de bases azotées et/ou de désoxyribose. Les radicaux formés subissent ensuite différentes réactions. Ils peuvent être oxydés (oxydation des bases), former des liaisons ADN-ADN ou ADN-protéine. L'ADN peut aussi perdre des bases azotées et entraîner la formation de sites abasiques ou subir des cassures sur ses brins (Figure I-4).

I.3.2.1. *Mécanismes de coupures des brins d'ADN*

Selon le site primaire de l'attaque radicalaire, on peut distinguer deux principaux mécanismes de formation des coupures des brins d'ADN :

- via l'arrachement direct d'un atome d'hydrogène sur le désoxyribose et la formation d'un radical sucre [30]
- via l'attaque radicalaire de bases azotées suivie par le transfert intramoléculaire d'atome d'hydrogène de désoxyribose vers la base azotée.

I.3.2.1.1. *Arrachement direct de l'atome d'hydrogène du désoxyribose*

I.3.2.1.1.1. *Accessibilité des atomes d'hydrogène du désoxyribose dans l'ADN*

Le résidu désoxyribose de l'ADN contient sept atomes d'hydrogène (Figure I-13). La conformation en double hélice module l'accessibilité des différentes liaisons C-H.

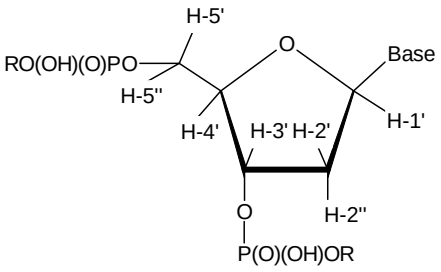


Figure I-13 : Les sept atomes d'hydrogène du résidu désoxiribose

Balasubramanian et al. [31], en utilisant de l'ADN avec des nucléotides deuterés sélectivement, ont étudié l'effet isotopique sur l'arrachement de différents atomes d'hydrogène du désoxyribose par les radicaux hydroxyle générés lors de la réaction de Fenton. Les auteurs ont observé une diminution des coupures dans le cas de l'ADN deuteré. De plus cet effet isotopique change avec la position du deutérium. La deutération sur les positions C1', C2' et C3' diminue faiblement l'intensité de coupures sur l'ADN. Un effet plus prononcé a été constaté sur la position C4'. De plus, la deuteration sur la position C5' du désoxyribose conduit à l'effet isotopique le plus important (une diminution des coupures d'environ 0.5 fois). Comme le radical hydroxyle est très réactif, il est peu probable qu'il interagisse à des vitesses différentes avec les différents atomes d'hydrogène. C'est pour cette raison que les auteurs ont attribué cet effet isotopique aux différences d'accessibilité des liaisons C-H.

L'ordre d'interaction des radicaux hydroxyle avec les différents atomes d'hydrogène du désoxyribose au sein de l'ADN est 5' > 4' > 3' ≈ 2' ≈ 1'. Cet ordre correspond bien à l'ordre de diminution de la surface effective des atomes d'hydrogène accessible au solvant (Tableau I-3). Ces résultats démontrent que c'est bien la conformation de l'ADN qui détermine la facilité d'arrachement des atomes d'hydrogène.

	5' et 5''	4'	3'	2' et 2''	1'
% de la contribution d'arrachement de n'ième hydrogène sur la coupure totale d'ADN	57 ± 10	22 ±6	17 ± 5	13 ± 3	11 ± 4
% de la surface accessible à l'eau de n'ième hydrogène	46	28	14	11	1

Tableau I-3: Comparaison de l'accessibilité d'un atome d'hydrogène de désoxyribose et sa contribution à la coupure totale d'ADN[31]

Une autre exemple de corrélation entre la coupure de l'ADN et sa structure a été montré par Spotheim-Maurizot et al. [32]. En utilisant un fragment d'ADN de 80 paires de bases, les auteurs ont étudié la probabilité de coupure franche par des radicaux hydroxyle au niveau de chaque nucléotide. Ils ont montré que tous les fragments de désoxyribose sont des sites potentiels d'attaque radicalaire, mais que tous ne sont pas attaqués avec la même probabilité. De plus, une excellente corrélation a été observée entre la probabilité de coupure franche et la largeur du petit sillon d'une part, et les accessibilités aux radicaux hydroxyle des

atomes H4' et H5' d'autre part (Figure I-14). Cette figure illustre un modèle de pénétration d'un radical hydroxyle à l'intérieur d'un petit sillon large (a), moyen (b) et étroit (c). Les courbes représentent les probabilités d'attaque mesurées expérimentalement (histogrammes) auxquelles sont superposées la largeur du petit sillon (partie médiane) et les accessibilités des atomes H4', H5'1 et H5'2 (partie basse). Les résultats observés confirment que c'est principalement l'arrachement des atomes H4' et H5' qui est responsable de la coupure de l'ADN par des radicaux hydroxyle.

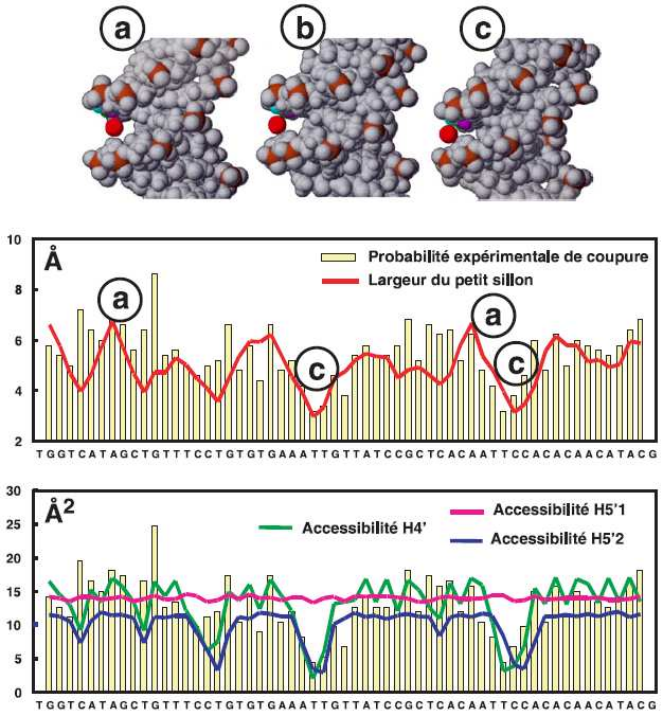


Figure I-14 : Largeur de petit sillon et accessibilité des atomes H4' et H5' de désoxyribose[32]

I.3.2.1.1.2. *Mécanismes de coupures d'ADN à partir de radicaux de désoxyribose*

I.3.2.1.1.2.1. Réactions du radical C(1')

Dans l'ADN, l'atome H-1' est le moins accessible à l'eau car il se situe profondément dans le petit sillon [31,33,34]. Cependant, l'arrachement de l'hydrogène en position C1' peut jouer un rôle important quand on utilise certaines molécules qui sont capables de se lier dans le petit sillon et de former un oxydant à proximité de 1'hydrogène. Un de ces produits est la bis(1,10-phénanthroline)cuivre(I) ($Cu(OP)_2$) [35] (Figure I-15). Cette nucléase artificielle se place dans le petit sillon d'ADN et, en présence d'eau oxygénée, induit une coupure d'ADN par arrachement d'hydrogène H-1'[36].

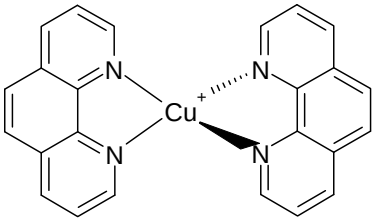


Figure I-15 : Structure de la bis(1,10-phénantroline)cuivre(I) ($Cu(OP)_2$).

Parmi les produits de coupure de l'ADN par ce composé, on trouve la base azotée libre, des concentrations égales de fragments 3'-phosphate et de 5'- phosphate terminaux d'ADN et la 5-méthylène-2-furanone [37-39].

Des études mécanistiques de cette réaction par marquage isotopique ont montré que l'oxygène du carbonyle vient de l'eau [40]. En tenant compte de cette observation, un mécanisme d'oxydation du radical-1' du désoxyribose par le Cu^{+1} jusqu'au carbocation a été proposé (Figure I-16). L'attaque nucléophile de ce carbocation par une molécule d'eau conduit à la formation d'un produit intermédiaire qui se décompose en formant le fragment 3'-phosphaté et de la furanone.

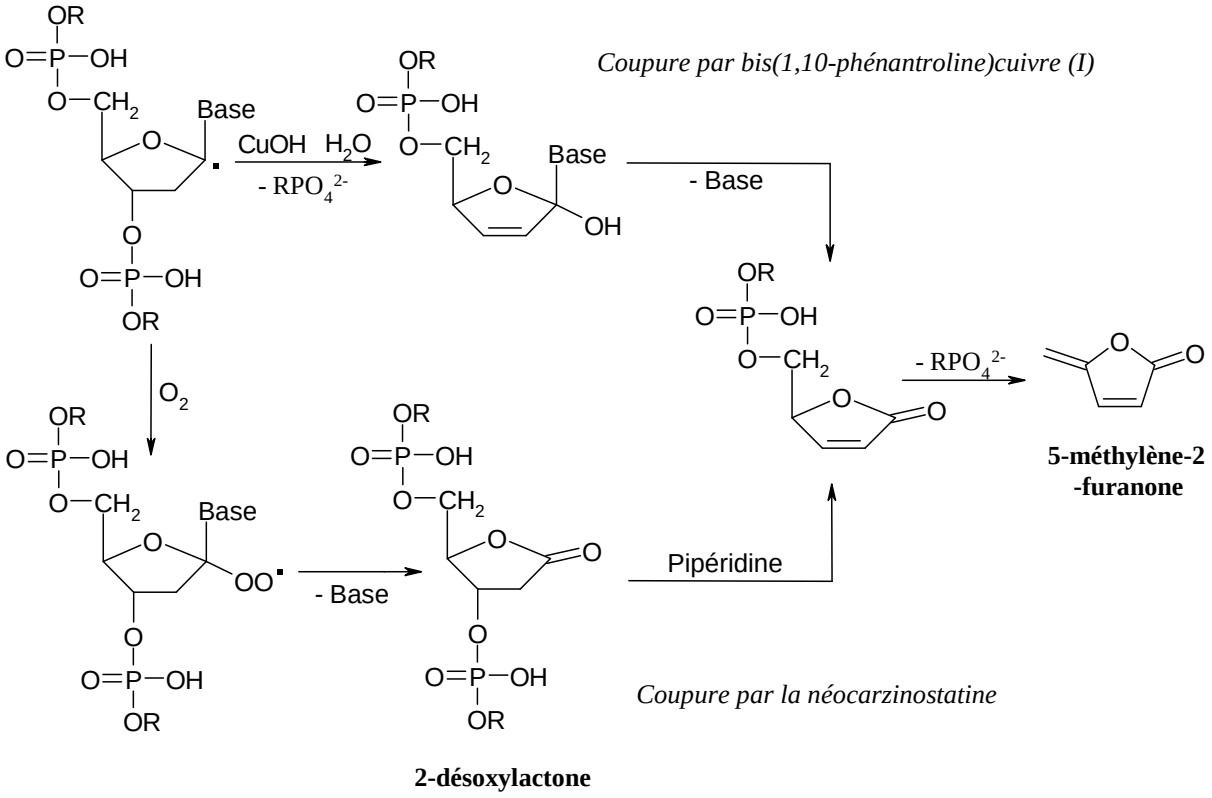


Figure I-16 : :Mécanismes de coupure de brins d'ADN à partir du C(1') radical de désoxyribose.

D'autres produits comme les antibiotiques de type enedyine sont capables d'induire une coupure de l'ADN par arrachement de l'atome H-1'. L'antibiotique de ce groupe le mieux étudié est la néocarzinostatine. Le chromophore non protéique de ce produit est présenté sur la Figure I-17. Les thiolates activent la partie chromophore et, après leur addition par la réaction de Michael, la néocarzinostatine subit un réarrangement et une aromatisation, suivis de la formation du biradical vinylique [41]. Les radicaux vinyliques sont très réactifs. Ce sont également de bons accepteurs d'hydrogène. Une fois le biradical formé, ce dernier est capable d'entourer le petit sillon de l'ADN et de réagir avec les deux brins, conduisant à une coupure double brin [42]. Ce produit arrache principalement l'hydrogène 5' mais, des études par effets isotopiques ont montré que l'arrachement des atomes d'hydrogène 1' et 4' peut aussi intervenir [43].

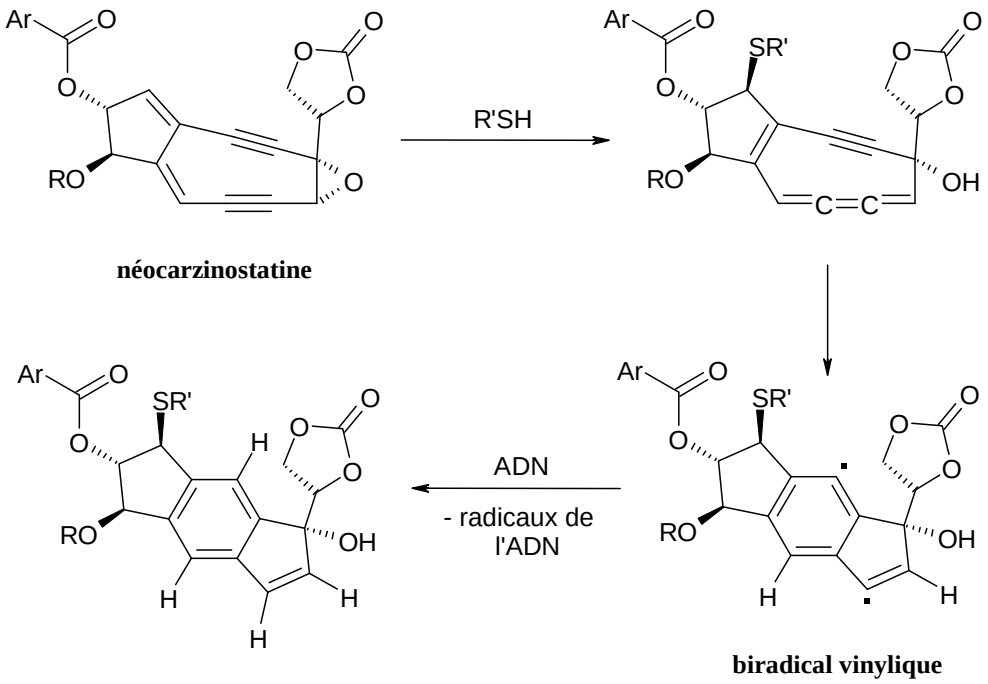


Figure I-17 : : Mécanisme d'activation et de coupure de l'ADN par la néocarzinostatine

Le mécanisme proposé pour la coupure de l'ADN par la néocarzinostatine est un peu différent de celui par $Cu(OP)_2$ (Figure I-16). La principale différence est que l'incubation d'ADN avec le $Cu(OP)_2$ provoque directement des coupures alors que dans la cas de l'arrachement de l'hydrogène 1'-H par la néocarzinostatine, les produits obtenus doivent subir une l'hydrolise basique pour engendrer la coupure. Selon le mécanisme proposé, le radical 1'-désoxyribosique formé interagit avec le dioxygène pour former le radical peroxydique. Après réduction de ce radical et perte d'eau, ils se forment la 2'-désoxylactone ainsi qu'une base

libre [44]. Le site abasique formé produit une coupure de brin après traitement pipéridique à chaud [40,43].

I.3.2.1.1.2.2. Réactions du radical C(2')

En raison de sa faible accessibilité ainsi que de sa faible réactivité, la contribution de l'arrachement de l'atome d'hydrogène 2'H à la coupure totale de l'ADN est assez insignifiante. Par ailleurs, des études d'effet isotopique confirment ce fait [31] (Tableau I-3). Cependant, des modifications chimiques sur l'ADN peuvent augmenter l'importance de ce processus. Ainsi, il a été montré que l'irradiation UV d'oligonucléotide $d(GCAXGC)_2$ contenant un site d'uracile halogéné (X), induit la coupure d'ADN par arrachement de l'atome d'hydrogène H-2' [45-47].

Le mécanisme proposé est représenté sur la Figure I-18. Lorsqu'il est irradié, l'uracile halogéné est capable d'arracher l'atome d'hydrogène 2' du désoxyribose du nucléotide adjacent dans la direction 5'. Le radical 2' formé interagit avec le dioxygène en formant le peroxyde 2'. Ce dernier se décompose en donnant l'aldéhyde ouvert, lequel subit une réaction de retro-aldolisation en milieu basique. Cette suite de réactions conduit à la coupure de l'ADN et à la formation de l'érythrose ainsi qu'à celles des 3' et 5' – ADN-phosphoglycéraldéhydes.

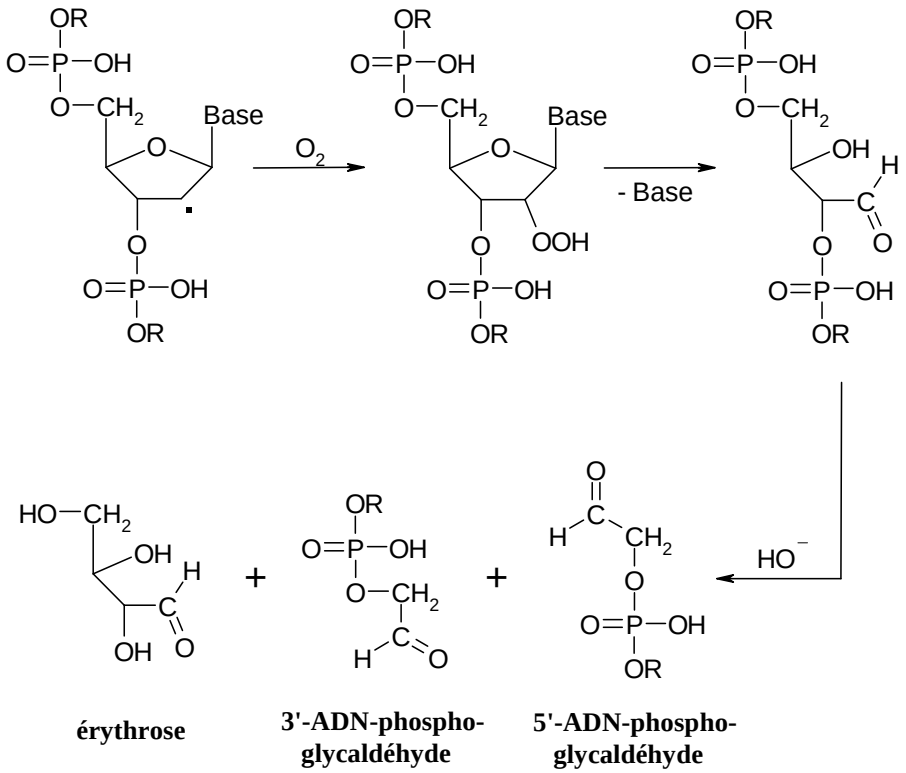
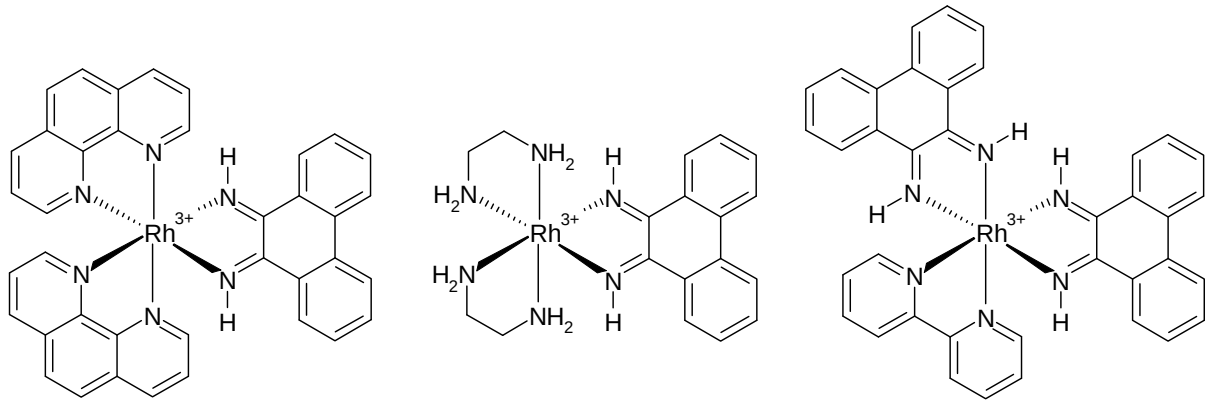


Figure I-18 : :Mécanisme de coupure de brins d'ADN à partir du radical C(2') de désoxyribose.

I.3.2.1.1.2.3. Réactions du radical C(3')

L'hydrogène 3' du désoxyribose se situe dans le grand sillon de l'ADN. Comme la majorité des agents de coupure de l'ADN se lient dans le petit sillon, il n'existe que très peu d'exemples de coupures d'ADN par arrachement de l'hydrogène 3'. Des études d'effet isotopique de coupure d'ADN par les radicaux hydroxyle ont montré que l'arrachement de l'atome d'hydrogène en position 3' a peu d'importance dans le rendement total de coupure [31].

Cependant, il existe des complexes de métaux capables d'induire la coupure d'ADN par l'arrachement de l'hydrogène 3'. Ce sont certains des complexes du rhodium(III) avec des ligands qui peuvent s'intercaler dans l'ADN. Ce groupe comprend le $[Rh(phen)_2phi]^{3+}$, le $[Rh(en)_2phi]^{3+}$ et le $[Rh(phi)_2bpy]^{3+}$ [48,49] (en = éthylènediamine, phen = 1,10-phénanthroline, bpy = 2,2'-bipyridyl et phi = diimine de 9,10-phénanthrènequinone) (Figure I-19). Lorsqu'ils sont irradiés, un radical-cation se forme par transfert de charge du ligand vers le métal.



$[Rh(phen)_2phi]^{3+}$ $[Rh(en)_2phi]^{3+}$ $[Rh(phi)_2bpy]^{3+}$

Figure I-19 : Complexes de rhodium(III) capable induire la coupure de l'ADN par l'arrachement de l'hydrogène 3' du désoxyribose

Les mécanismes de coupures sont différents en conditions aérobies et anaérobies (Figure I-20). Dans des conditions anaérobies l'oxydation du radical 3' et sa solvolyse conduisent à la formation du dérivé 3'-hydroxy. Cet alcool subit ensuite une β élimination du groupe phosphaté, suivie de la perte de la base. Cette suite de réactions conduit à la formation d'une lactone cyclique dérivé du sucre. Dans des conditions aérobies le dioxygène interagit avec le radical 3' pour former un hydroperoxyde. Ce dernier subit un réarrangement suivi de l'incorporation d'un atome d'oxygène dans le cycle du désoxyribose. Le dérivé dioxane

obtenu, se décompose en formant le fragment 5'- phosphate de l'ADN, le dérivé d'acide propènoïque contenant le fragment de base azotée, et le 3'-ADN-phosphoglycéraldéhyde.

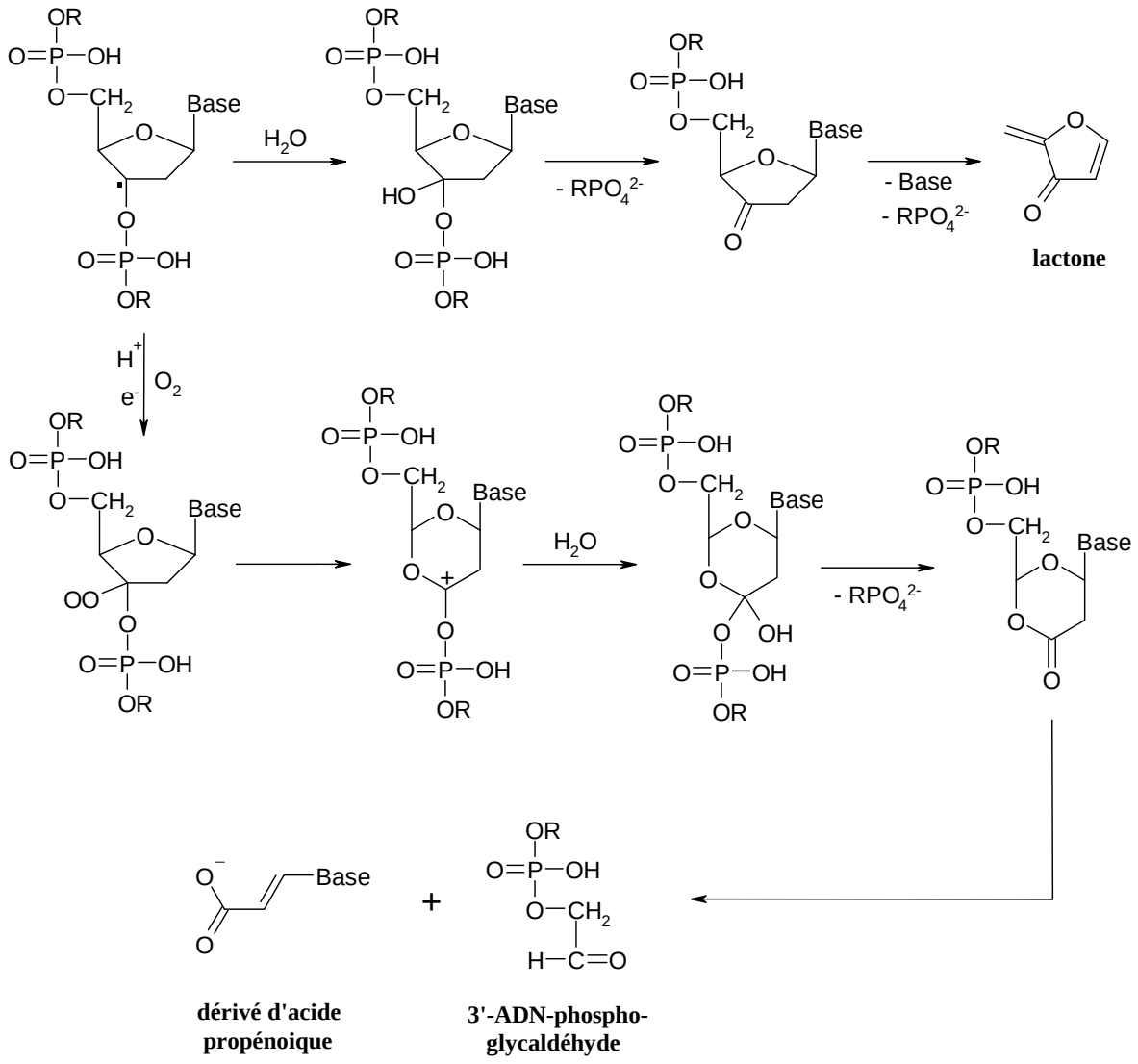


Figure I-20 : :Mécanismes de coupure de brins d'ADN à partir du radical C(3') du désoxyribose

I.3.2.1.1.2.4. Réactions du radical C(4')

Les atomes d'hydrogène en position 4' du désoxyribose sont bien accessibles au solvant [31,33,34]. C'est pour cette raison que beaucoup d'agents de coupure de l'ADN arrachent cet atome d'hydrogène situé en 4' : les radiations ionisantes [50], le méthidiumpropyl(EDTA)·Fe(II) [51,52], les radicaux hydroxyle générés par la réaction de Fenton [53], la bléomicine [51,54,55], la calicheamicine [56], la néocarzinostatine [42,57], l'elsamicine A [58] et le C1027 [59].

Cela explique également pourquoi le mécanisme de coupure de l'ADN à partir de radical C(4') du sucre est le mieux étudié [24,60]. A partir de ce radical, dans des conditions anaérobies la coupure de groupes phosphate adjacents a lieu (Figure I-21).

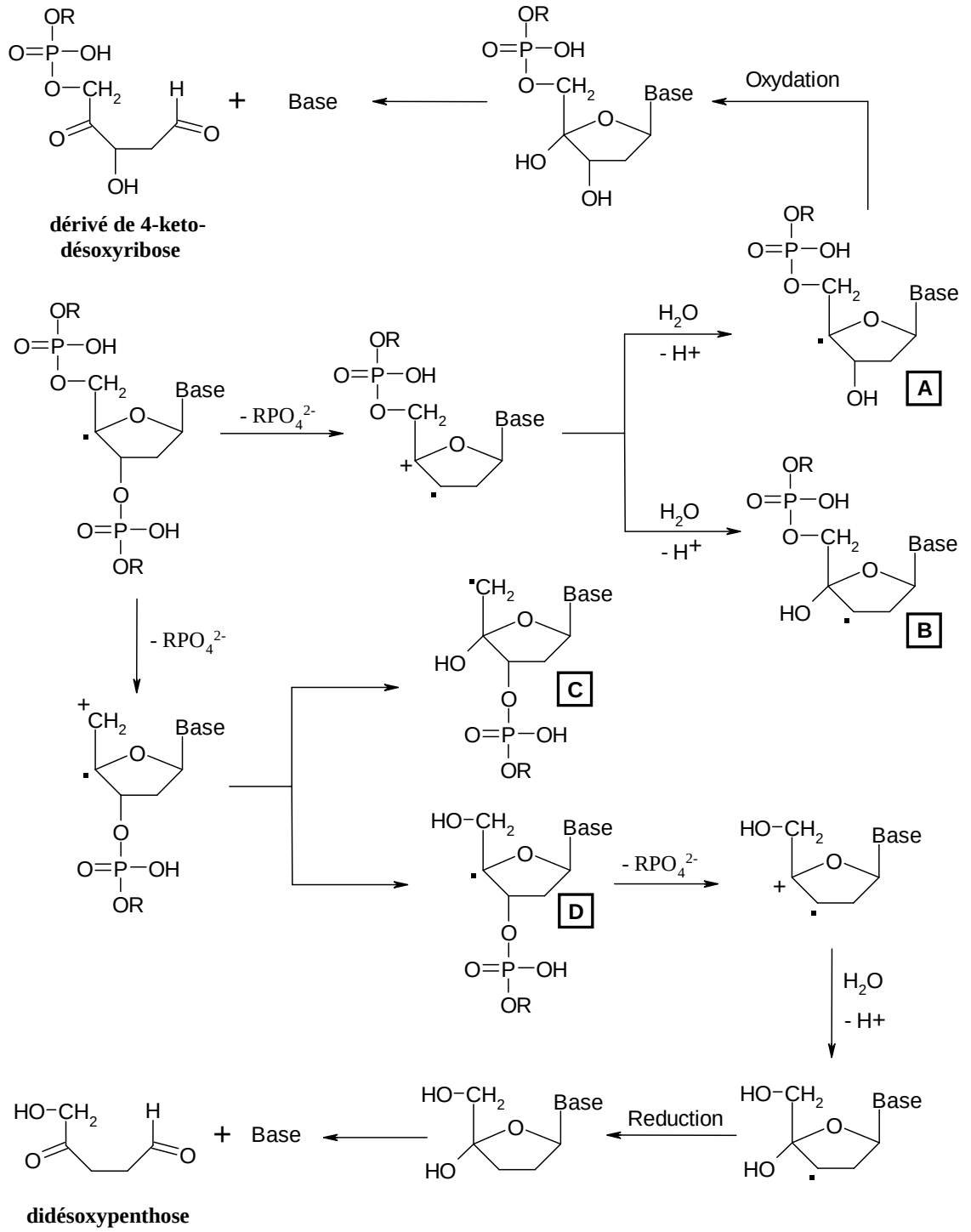


Figure I-21 : :Mécanismes de coupure de brins d'ADN à partir du radical C(4') du désoxyribose en conditions anaérobies

Grâce à une meilleure solvatation des ions formés, la coupure hétérolytique domine la coupure homolytique, et le cation radical se forme [61]. La coupure au niveau du groupe phosphate en position C(3') du désoxyribose est beaucoup plus prononcée que la coupure en C(5'). Les cation-radicaux formés interagissent avec l'eau en formant les radicaux **A**, **B**, **C** et **D**. L'oxydation du radical **A** et la libération d'une base azotée conduisent à la formation de dérivés de 4-cétodésoxyribose. Tandis que le radical **D** se réduit d'abord et libère ensuite la base pour former des dérivés de didésoxypentose.

Par radiolyse γ de la solution d'ADN, saturée par l'oxyde d'azote (N_2O), Beesk et al. [62] ont caractérisé 6 différents produits de dégradation de l'ADN ce qui montre la complexité de la chimie radicalaire de l'ADN. Les rendements de chaque produit ont été calculés. Ces résultats sont présentés dans le Tableau I-4.

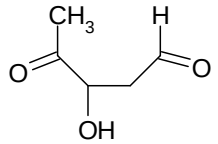
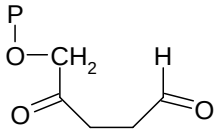
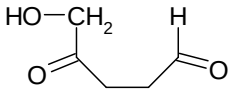
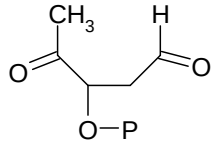
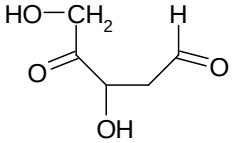
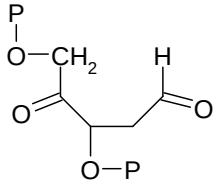
Produit de dégradation de l'ADN		Rendement	Décomposition résultante sur le radical 4'
2,5-Didésoxypentose		0,065	Coupure en C(3')
2,3-Didésoxypentose-5-phosphato		0,07	Coupure en C(3')
2,3-Didésoxypentose		0,01	Coupure en C(5')
2,5-Didésoxypentose-3-phosphato		0,025	Coupure en C(5')
2-Désoxypentos-4-ulose		0,06	Coupure en C(3') et/ou C(5')
2-Désoxypentos-4-ulose-3'/5'-phosphato		0,05	Coupure en C(3') et/ou C(5')

Tableau I-4 : Les produits obtenus par la radiolyse γ de la solution d'ADN, saturée par le N_2O

Dans des conditions aérobies, le principal produit de dégradation de la partie désoxyribose est l'ADN-3'-phosphoglycolate (Figure I-22). C'est le principal produit de dégradation de l'ADN par radiolyse γ ainsi que par incubation avec la néocarzinostatine. Un effet isotopique important [31] confirme que ce produit résulte de l'arrachement de l'hydrogène en position C(4').

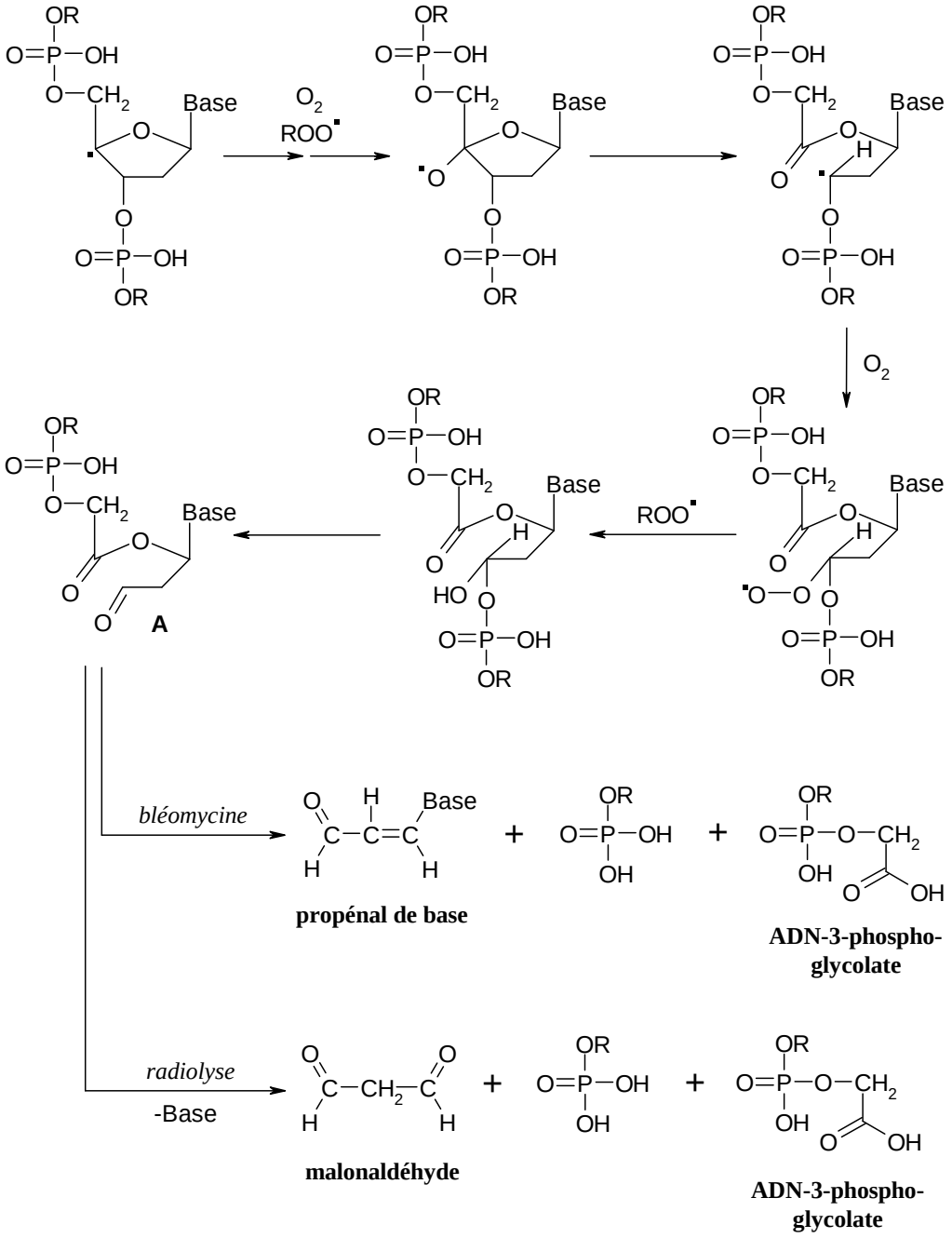


Figure I-22 : :Mécanismes de coupure de brins d'ADN à partir du radical C(4') du désoxyribose en conditions aérobie

A partir de l'intermédiaire **A** (Figure I-22) deux réactions sont possibles. Elles conduisent soit au propénal de base soit au malonaldehyde. Pendant la radiolyse γ de l'ADN dans l'eau le produit majeur est le malonaldéhyde. Tandis que l'ADN traité par la bléomycine (Figure I-23) (un produit anticancéreux capable de couper l'ADN en présence de fer et d'oxygène) se décompose en donnant principalement le propénal de base. Comme les deux produits ont le même précurseur, on considère que c'est la bléomycine, encore liée à l'ADN qui catalyse la formation de propénal.

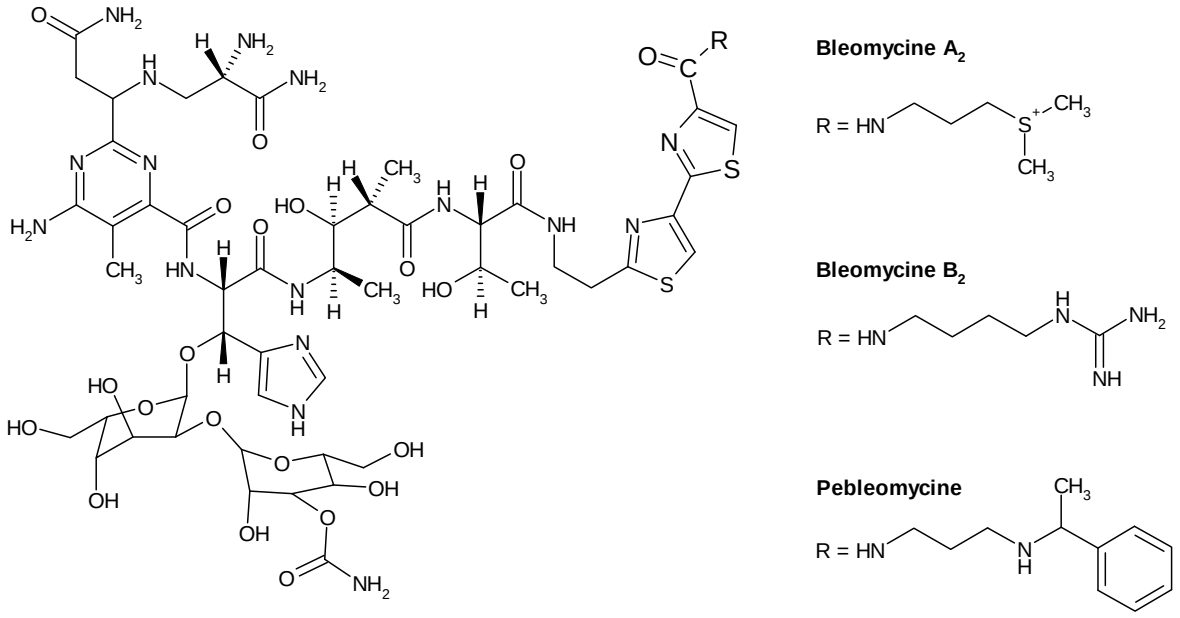


Figure I-23 : Structure des bléomycines

Les bléomicynes (BLMs) sont des nucléases artificielles qui sont capables, après activation, de couper les brins d'ADN en ne dégradant pas les bases azotées. La partie bithiazole des bléomicines s'intercale dans le petit sillon de l'ADN [63], et des métaux de transition se complexent aux parties aminées des bléomicynes [64]. Le principal mécanisme d'activation des bléomycines est la complexation avec le Fe(II). Ce complexe Fe(II)BLM interagit avec le dioxygène en formant la bléomycine activée Fe(III)BLMOOH [65]. Il a été montré que l'on peut former ce complexe également par interaction de Fe(III)BLM avec l'eau oxygénée [66]. Les autres types de bléomycines capables de couper l'ADN sont ses complexes de Mn (II), activé par H_2O_2 [67]. La position des bléomycines dans l'ADN est telle qu'elles arrachent sélectivement l'atome 4' d'hydrogène [68]. Il est admis que c'est bien le Fe(III)BLMOOH qui arrache l'hydrogène 4'H du désoxyribose et non pas des radicaux hydroxyle [69] (Figure I-24).

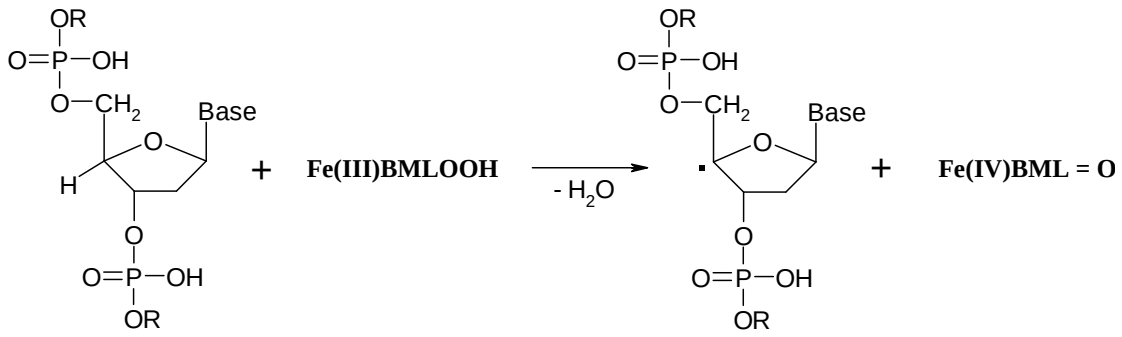


Figure I-24 : Arrachement de l'atome d'hydrogène en 4' du désoxyribose par la bléomycine

I.3.2.1.1.2.5. Réactions du radical C(5')

Les deux atomes d'hydrogène 5' de l'ADN sont bien accessibles à l'eau [31,34,70]. Ils se situent dans le petit sillon. Il existe plusieurs types d'agents capables de couper l'ADN par l'arrachement de l'atome d'hydrogène en 5': les antibiotiques de type enediyne [57,71,72], les radicaux hydroxyle générés par la réaction de Fenton [31], la radiolyse γ [50,73,74], les complexes de métaux de transition avec des porphyrines [75] et le radical perhydroxyl [76].

Le produit majeur de la coupure de brins d'ADN par la néocarzinostatine à partir du radical C(5') est l'ADN-5-aldéhyde [57] (Figure I-25). Il se forme par réaction du radical 5' avec le dioxygène et la réduction par le thiol du radical 5'-péroxyl précédemment formé.

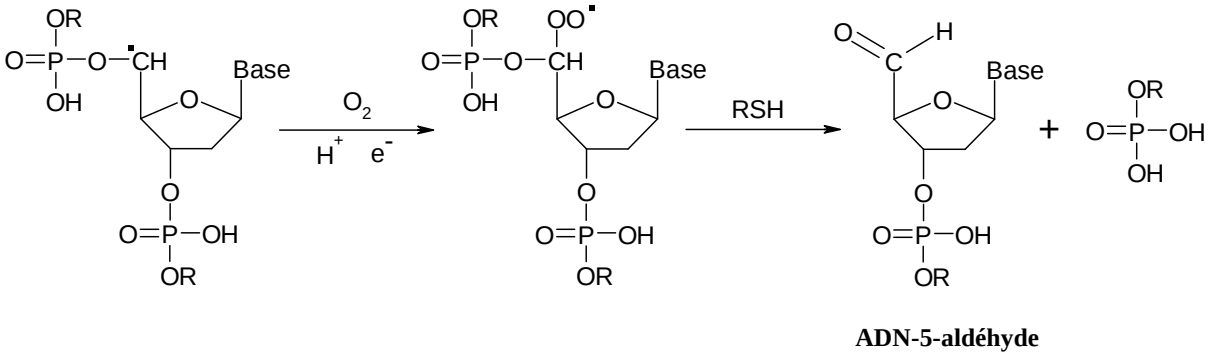


Figure I-25 : :Mécanisme de coupure de brins d'ADN à partir du radical C(5') du désoxyribose

Dans le cas de coupures d'ADN par des complexes de métaux de transition avec des porphyrines cationiques, un autre produit final de la dégradation du sucre à partir de la position 5' a été observé. En effet, le pentaacétate de méso-tetrakis(N-méthylpyridinium-4-yl)porphyrinatomanganèse(III) (Mn-TMPyP) (Figure I-26) en présence de donneurs d'atome d'oxygène, comme $KHSO_5$, coupe les brins d'ADN. Bien que ce complexe soit également

capable d'arracher les atomes H-1' et H-2', il est connu que l'arrachement de l'atome H5' est le principal mécanisme observé dans le cas de séquences poly(A)·poly(T). Dans des séquences plus hétérogènes, ce mécanisme est aussi présent mais en moindre proportion [75]. Ainsi, la position des atomes arrachés dépend de la séquence de l'ADN.

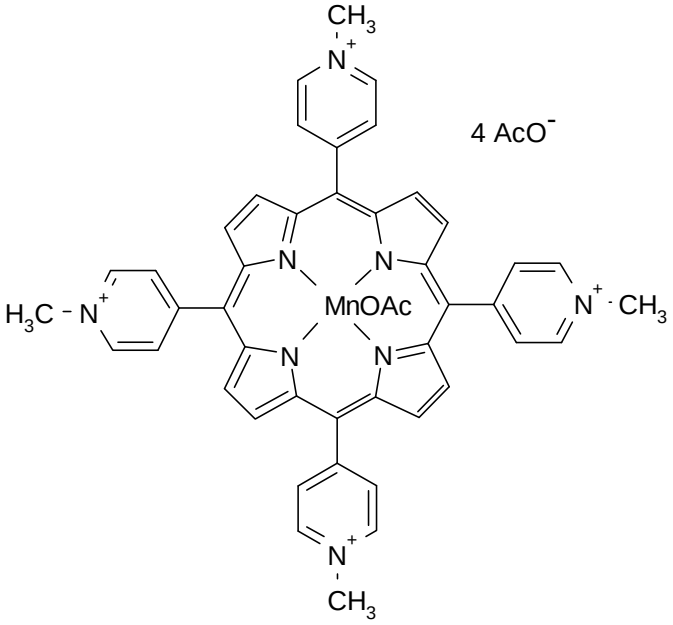


Figure I-26 : Structure du pentaacétate de méso-tetrakis(N-méthylpyridinium-4-yl)porphyrinatomanganèse(III) (Mn-TMPyP)

Le mécanisme de dégradation du sucre par le Mn-TMPyP ressemble beaucoup à celui de la néocarzinostatine à ceci près que l'aldéhyde 5' formé continue de se dégrader (Figure I-27). Ce dernier subit en effet deux β éliminations supplémentaires ayant pour conséquence la perte de l'ADN-5'-phosphate puis de la base suivie d'une aromatisation conduisant à la formation de l'unique produit de cette séquence, le furfurol. La non dégradation ultérieure de l'ADN 5'-aldéhyde comparée à celle de la néocarzinostatine est vraisemblablement due à une inhibition par les thiols [77].

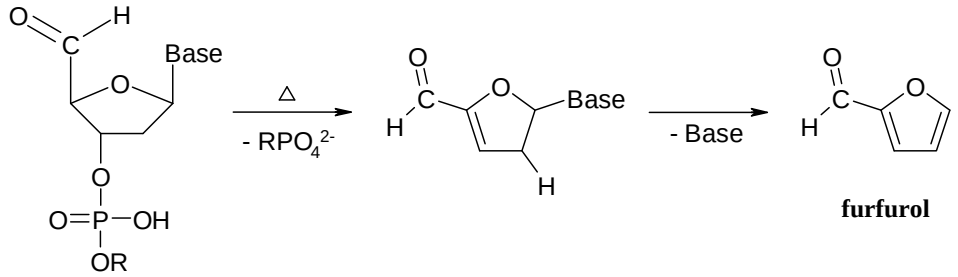


Figure I-27 : Dégradation de 5'-aldéhyde lors de la coupure de l'ADN par le Mn-TMPyP

I.3.2.1.2. *Transfert de l'atome d'hydrogène du désoxyribose vers la base azotée*

Un exemple d'un tel arrachement intramoléculaire d'atome d'hydrogène a été présenté comme mécanisme de formation du radical C(2') du désoxyribose.

Le mécanisme de déprotonation du désoxyribose par des radicaux de bases azotées n'est pas encore bien élucidé. Les études par résonance paramagnétique électronique (RPE) indiquent que ce processus est lent [78] et que l'étape limitant est l'arrachement direct de l'atome d'hydrogène d'une base adjacente (mécanisme A) [79] (Figure I-28). L'arrachement de l'atome d'hydrogène sur le même nucléotide (mécanisme B) est aussi possible. Selon un autre mécanisme proposé, c'est le produit après protonation et perte d'une molécule d'eau qui arrache le proton d'une base adjacente (mécanisme C) [80]. Toutefois, il est considéré que les mécanismes B et C sont les moins importants.

Le produit d'addition du radical hydroxyle à une base azotée peut ainsi être oxydé. Des calculs théoriques montrent que la barrière énergétique de transfert de proton entre la position C(2') du désoxyribose et le produit d'addition du radical hydroxyle à la base oxydée est beaucoup plus faible que celle du processus de transfert de l'atome d'hydrogène vers une base non oxydée [81].

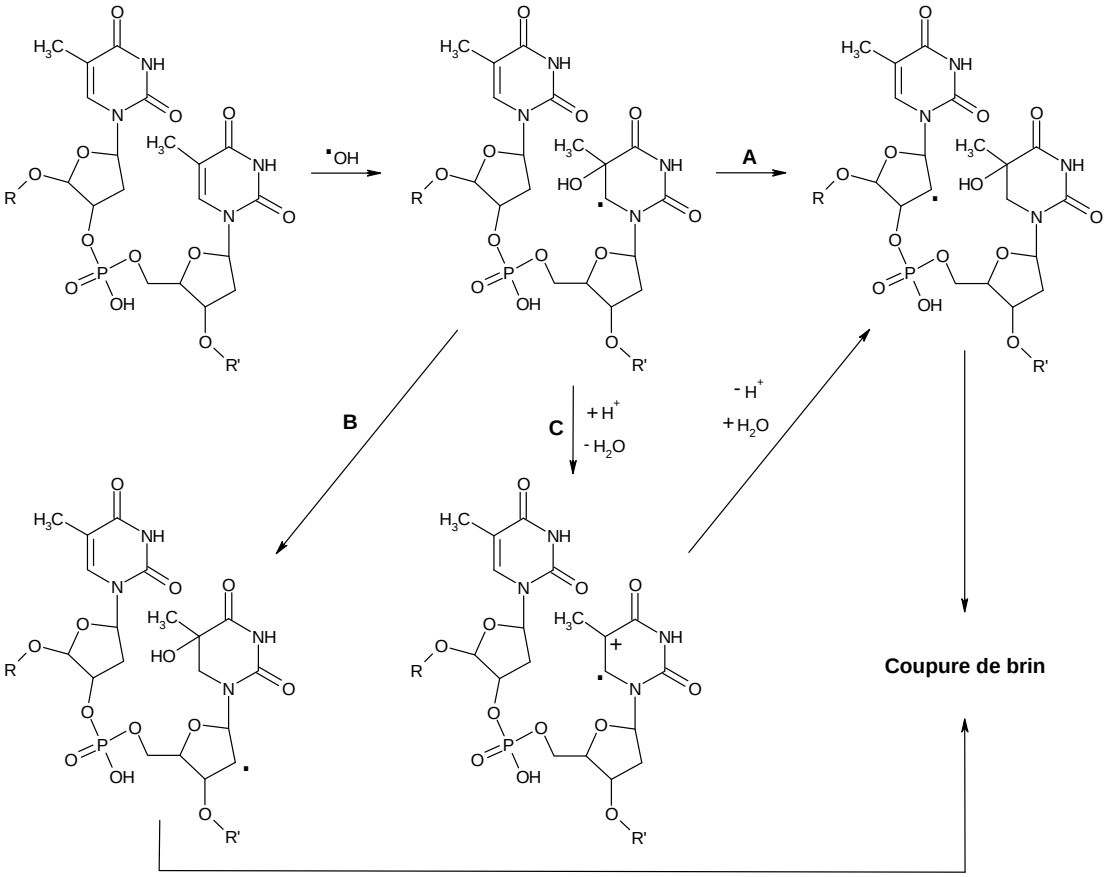


Figure I-28 : Mécanismes de coupure d'ADN par arrachement intramoléculaire de l'hydrogène du désoxyribose par le radical 5 de thymine

I.3.2.2. *Autre voies de la coupure de l'ADN*

Récemment il a été montré que contrairement aux électrons solvatés, les électrons de basse énergie, sont capables d'induire la formation de coupures d'ADN (Figure I-29). A partir d'un radical P la coupure d'une liaison C-O est beaucoup plus prononcée que la coupure de liaison P-O [82]. Il a été de plus observé que lors de l'irradiation de films d'oligonucléotides par des électrons de basse énergie les deux voies sont possibles : un électron peut être additionné au groupe phosphate soit directement soit par addition intermédiaire à une base azotée, avec cependant une préférence pour le processus direct [83]. Il a été montré que les électrons de basse énergie induisent également la perte de bases azotée par les oligonucléotides.

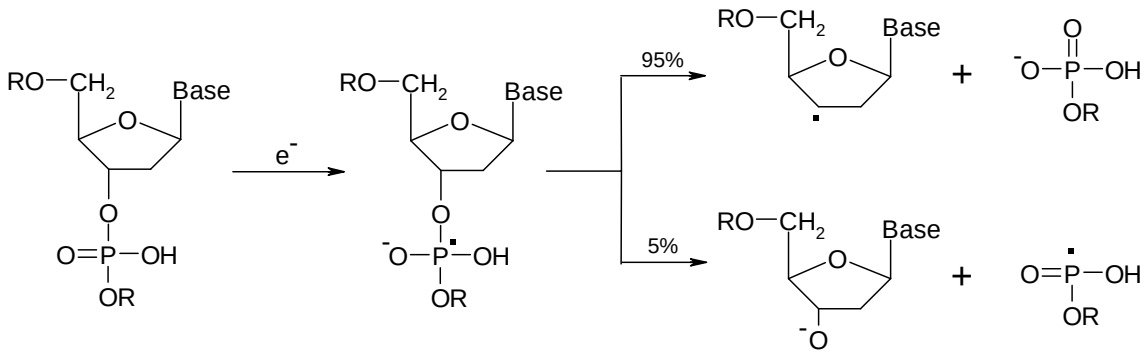


Figure I-29 : Formation de coupures d'ADN par des électrons de basse énergie

I.4 Origines de la production des espèces oxygénées réactives

I.4.1. <u>Le rayonnement ionisant</u>

Si l'énergie de photons est en dessous de la valeur d'1 MeV, elle est absorbée par effet Compton et effet photoélectrique. Tandis que si cette énergie est au dessus de 1 MeV (deux fois la masse de l'électron au repos) la formation de paires électron-positron commence à intervenir [24]. L'effet Compton et l'effet photoélectrique génèrent des électrons durs de haute énergie. Dans le cas ou l'énergie des électrons durs est absorbée par l'eau, il y a formation d'un cation-radical eau ($H_2O^{\bullet +}$) et d'un électron (~100 eV par ionisation). Ce dernier peut avoir assez d'énergie pour pouvoir ioniser une autre molécule d'eau se trouvant à proximité.

$$H_2O + \text{radiation ionisante} \rightarrow H_2O^{\bullet +} + e^-$$

Une autre possibilité est l'excitation électronique d'une molécule d'eau.

$$H_2O + \text{radiation ionisante} \rightarrow H_2O^*$$

Le radical cation eau est un acide très fort et il perd très rapidement son proton, ce qui conduit au radical hydroxyle. L'électron formé ne possède pas assez d'énergie pour ioniser, il s'hydrate. L'eau électroniquement excitée quand à elle se décompose en $^{\bullet}OH$ et $H^{\bullet}$.

$$H_2O^{\bullet +} \rightarrow {}^{\bullet}OH + H^+$$
$$e^- + nH_2O \rightarrow e_{aq}^-$$
$$H_2O^* \rightarrow {}^{\bullet}OH + H^{\bullet}$$

Ces radicaux qui se forment dans un très petit volume, se récombinent les uns avec les autres.

$${}^{\bullet}OH + e_{aq}^- \rightarrow HO^-$$
$${}^{\bullet}OH + H^{\bullet} \rightarrow H_2O$$
$$2\,{}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O_2$$
$$2\,H^{\bullet} \rightarrow H_2$$
$$2\,e_{aq}^- + 2H^+ \rightarrow H_2$$

Donc, les principales sources de dommages de l'ADN lors de la radiation ionisante sont $^{\bullet}OH$, $H^{\bullet}$ et e^-, les radicaux hydroxyle jouant le rôle le plus important dans la formation des dommages sur l'ADN. Lors de l'interaction de l'ADN avec des radiations ionisantes on distingue deux mécanismes de dommages sur l'ADN : directs et indirects.

Les dommages indirects interviennent par le biais de radicaux actifs qui se forment lors de l'ionisation de l'eau par la radiation ionisante. En raison de leur forte réactivité, la distance moyenne parcourue par ces espèces avant la désactivation est 2Å. C'est pour cette raison que seuls les radicaux hydroxyle formés à proximité de l'ADN peuvent l'endommager.

Les dommages directs sont les conséquences de l'absorption directe d'énergie par l'ADN. Cette absorption provoque soit l'ionisation de l'ADN, soit son excitation électronique. A partir de ces espèces, diverses transformations chimiques sont possibles.

$$\text{ADN} + \text{radiation ionisante} \rightarrow \text{ADN}^{\bullet +} + e^{-} + \text{ADN}^{*}$$

En effet, l'absorption de l'énergie de la radiation ionisante par un mélange est proportionnelle à la concentration massique de ces constituants. Par exemple lors de l'irradiation γ d'une solution d'ADN à 500mg/L, l'eau absorbe 99,5% et l'ADN n'absorbe que 0,5% de l'énergie de la radiation ionisante [24].

I.4.2. L'ultrasonication

Pendant la sonication, un phénomène de cavitation est observé. La surface liquide/gaz reflète l'onde ultrasonore. L'interférence des ondes formées conduit à la formation de régions de haute ou de basse pression. Dans les régions de haute pression, les bulles d'air qui se trouvent dans le liquide s'échauffent adiabatiquement jusqu'à atteindre des températures de plusieurs milliers de degrés [84,85]. Dans ces conditions de température il se forme des radicaux libres ainsi que d'autres types d'intermédiaires réactifs [86,87].

Dans les bulles, la vapeur d'eau se décompose soit en $^{\bullet}OH$ et $H^{\bullet}$, soit en hydrogène moléculaire et atome d'oxygène.

$$H_2O \rightarrow {}^{\bullet}OH + H^{\bullet}$$
$$H_2O \rightarrow H_2 + O$$

Les radicaux produits par ces réactions sont très énergétiques et à ces températures, le radical $H^{\bullet}$ a suffisamment d'énergie pour arracher un autre atome d'hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi le radical hydroxyle. Dans des conditions normales cette réaction est endothermique [88].

$$H^{\bullet} + H_2O \rightarrow H_2 + {}^{\bullet}OH$$

Si la solution est saturée en dioxygène, celui-ci se décompose en atomes. L'atome d'oxygène peut être à l'état fondamental (triplet) au à l'état excité (singulet). L'atome d'oxygène triplet forme l'ozone (O_3) en s'additionnant au dioxygène. De même, l'atome d'oxygène singulet conduit à la formation d'eau oxygénée (H_2O_2) en s'additionnant à l'eau.

$$O_2 \rightarrow 2\,O$$
$$O_2 + O \rightarrow O_3$$
$$H_2O + O \rightarrow H_2O_2$$

L'eau oxygénée portée à haute température se décompose dans la phase gazeuse en deux radicaux hydroxyle. Ces derniers sont responsables de la plupart des dommages sur l'ADN lors de la sonication [89-91].

$$H_2O_2 \rightarrow 2\,{}^{\bullet}OH$$

I.4.3. <u>La thermolyse</u>

Les liaisons chimiques de faible énergie peuvent être coupées même à température ambiante. En revanche, pour des liaisons de plus haute énergie, une température plus importante sera nécessaire pour scinder la liaison avec un bon rendement.

Considérons la liaison O-O, liaison la plus fréquente pour former des radicaux peroxyde et hydroperoxyde. Par exemple, le nitroperoxyde (ONOOH), se décompose à température ambiante tandis que le péroxodisulphate ($S_2O_8^{2-}$) ne se dégrade qu'à une température de 70°C. En revanche, l'eau oxygénée est assez stable dans ces conditions. La comparaison des énergies de liaisons O-O de ces produits est présentée dans le Tableau I-5 [92].

Peroxyde	Energie de liaison O-O / kJ•mol^{-1}
H_2O_2	210 ± 2,5
$S_2O_8^{2-}$	120 ± 11
ONOOH	92 ± 8,5

Tableau I-5 : Comparaison des énergies de liaisons O-O de quelques peroxydes

I.4.4. La photolyse

Dans le cas de la photolyse, l'énergie nécessaire à la coupure d'une liaison chimique est apportée par excitation électronique. Cette voie, très simple, peut conduire de façon contrôlée et sélective à la formation de radicaux.

Les peroxydes absorbent dans la région UV et se dissocient *via* un processus de photoexcitation en formant 2 radicaux oxygénés. Malgré l'état excité dissociatif, le rendement de formation des radicaux n'est jamais égal à l'unité du fait de l'effet de cage [93]. L'inconvénient majeur est que le chromophore peroxydique absorbe très faiblement (ε_{254} = 20 $dm^3 \bullet mol^{-1} \bullet cm^{-1}$, ε_{240} = 50 $dm^3 \bullet mol^{-1} \bullet cm^{-1}$) [94]. Il est de plus nécessaire d'avoir des concentrations en peroxyde importantes afin de pallier des problèmes de compétition pouvant exister en présence d'autres solutés chromophores. C'est pour cette raison qu'en présence de substances qui absorbent bien les UV (comme les bases azotées de l'ADN) la photolyse ne peut pas être utilisée pour générer les $^{\bullet}OH$.

Pour produire des radicaux hydroxyle par cette méthode en présence d'ADN, on utilise la photolyse des N-oxydes aromatiques, comme la 2- ou la 4-mercaptopyridine-N-oxyde [95], ou la N-hydroxy-4-(4-chlorophenyl)thiazole-2(3H)-thione [96], comme lors de la photolyse ces derniers se dissocient en formant des radicaux hydroxyle.

Dans le cas de la N-hydroxypyridine-2-thione, après consommation totale de cette substance par irradiation de la solution, la coupure d'ADN s'arrête car il n'y a plus de formation de radicaux hydroxyle. En revanche, l'oxydation de la guanine se poursuit avec formation de son produit d'oxydation (8-oxoGua) [97]. C'est donc un des photoproduits de la N-hydroxypyridine-2-thione qui est responsable de l'oxydation de la nucléobase. Il s'agit en effet de la bétaine, produit résultant de réactions de dimérisation, cyclisation et oxydation des radicaux thyil [97] (Figure I-30).

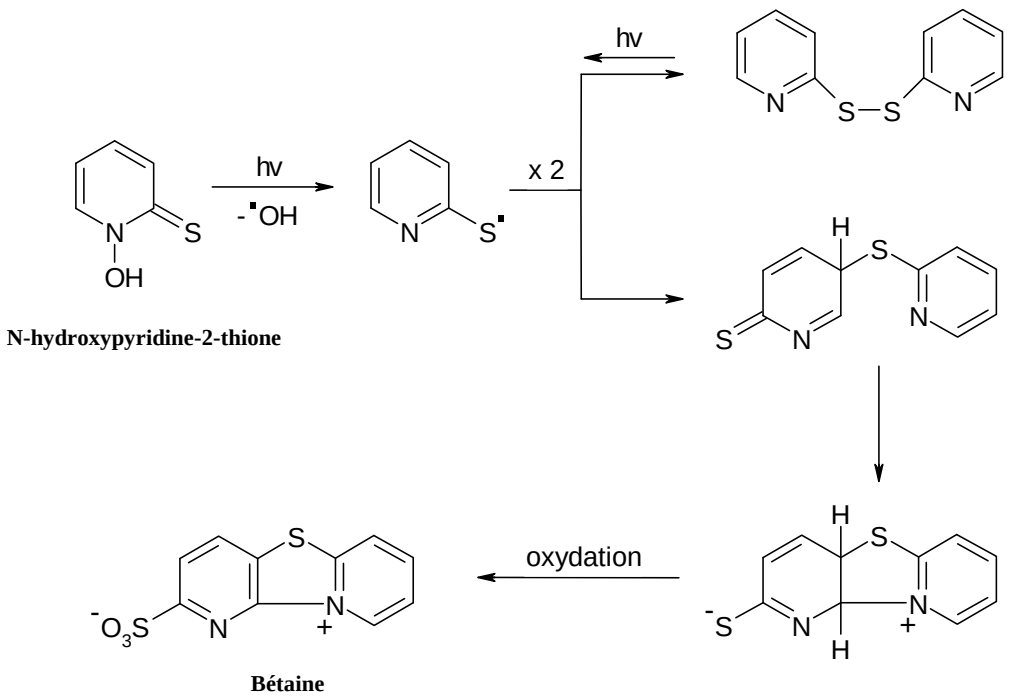


Figure I-30 : Réactions induites par l'irradiation de la N-hydroxypyridine-2-thione

I.4.5. La photosensibilisation

Lorsque l'on irradie un photosensibilisateur, celui-ci peut passer à son état triplet excité. Le mécanisme de ce processus a déjà été décrit dans le chapitre concernant les dommages photoinduits indirectes de l'ADN. Les photosensibilisateurs les plus utilisés sont la benzophénone et son 3-carboxylate (pour augmenter sa solubilité dans l'eau), la 2-methyl-1,4-naphtoquinone (ou ménadione), la riboflavine et les dérivées de l'anthraquinone comme AQSO (acide antraquinone-2-sulfonique) et l'antraquinone-2-sulfamide (AQS) [24] (Figure I-31).

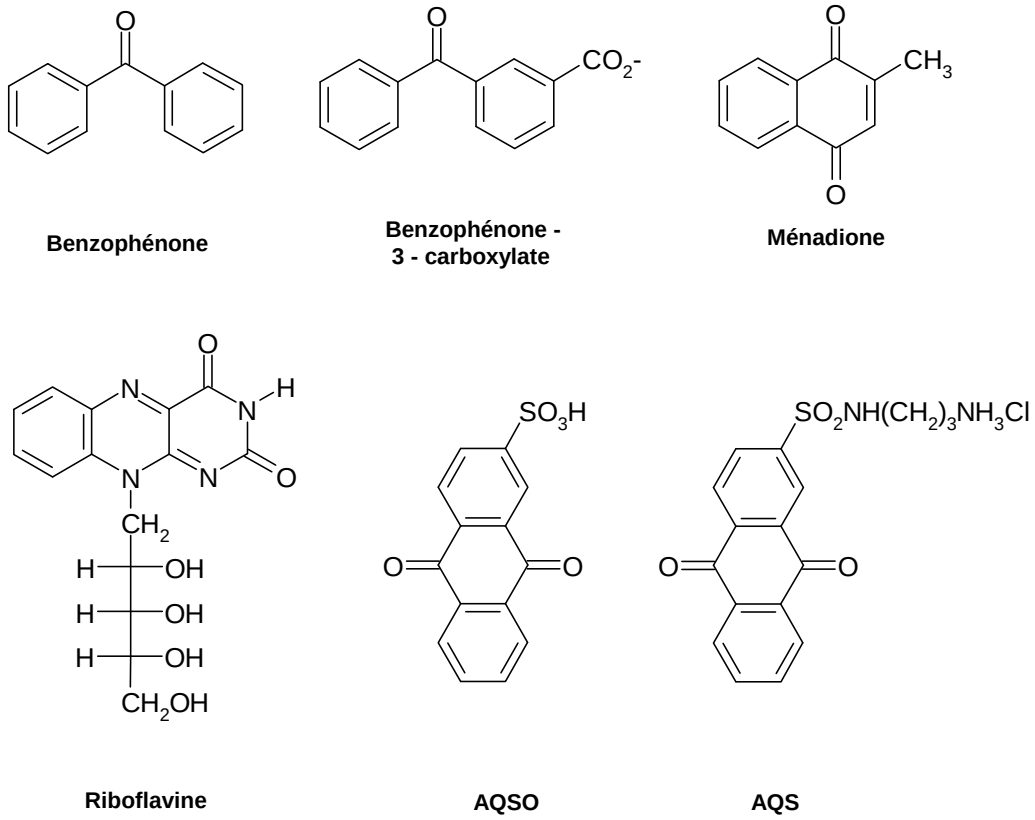


Figure I-31 : Photosensibilisateurs les plus utilisés

Les états excités peuvent être de bons accepteurs ainsi que de bons donneurs d'électrons. Le plus souvent, ils se comportent comme des accepteurs d'électrons. Certains composés comme la benzophénone et plusieurs quinones sont également de bons accepteurs de protons, grâce à la nature n-π*de l'état excité le plus bas [98] (Figure I-32).

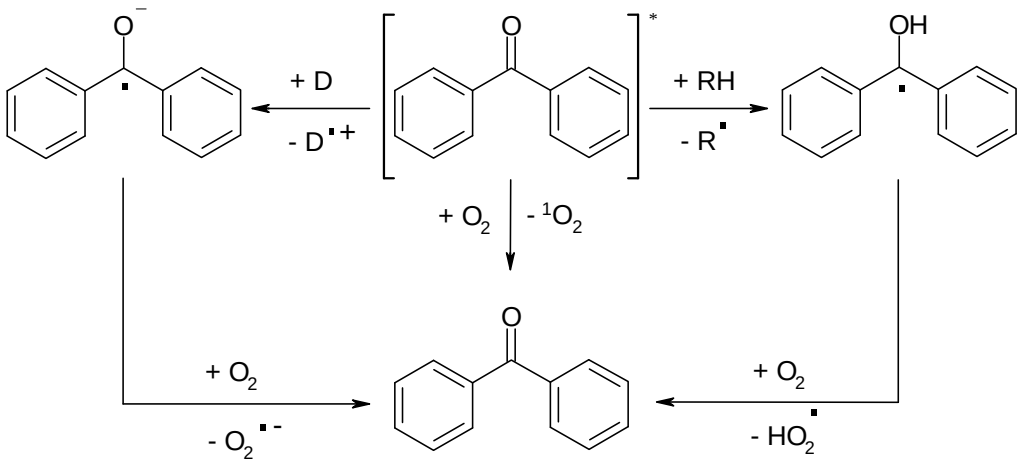


Figure I-32 : Réactions de la benzophénone à partir de l'état excité (D - donneur d'électron)

Les états triplets peuvent être "quenchés" par le dioxygène à des vitesses proches des vitesses de diffusion. Le transfert d'énergie entre le photosensibilisateur et l'oxygène est possible quand l'énergie de l'état triplet du photosensibilisateur s'approche de la différence d'énergies entre l'état fondamental triplet du dioxygène et son premier état excité singulet ($\Delta E = 96$ kJ mol^{-1}).

Dans l'eau le temps de vie de l'oxygène singulet est assez court ($k = 2{,}5 \times 10^{-5}$ s^{-1}), et son efficacité est faible. Il réagit assez vite uniquement avec certains substrats comme la guanine et ses dérivés [99]. Récemment il a été montré que l'oxygène singulet pouvait induire la formation de coupures de brins d'ADN [100,101]. Le temps de vie de l'oxygène singulet dans D_2O est presque 10 fois plus important (1.6×10^4 s^{-1}) que dans l'eau, et c'est pour cette raison que les rendements des réactions de l'oxygène singulet sont plus importants dans D_2O [24].

Le radical-anion de la benzophénone interagit facilement avec le dioxygène, et conduit à l'anion-radical oxygène, ou anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ (Figure I-32). Ce dernier n'est pas lui-même réactif vis-à-vis de l'ADN, mais il peut néanmoins subir des réactions ultérieures conduisant à la formation de radicaux hydroxyle. L'anion superoxyde peut ainsi se dismuter spontanément ou sous l'action d'une enzyme, la superoxyde dismutase, pour former de l'eau oxygénée :

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

En présence de Fe^{2+}, la réaction de Fenton, décrite dans le sous chapitre suivant, peut avoir lieu :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + {}^{\bullet}OH$$

L'anion superoxyde pourra ensuite réduire les ions ferriques en ion ferreux :

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Ces deux dernières étapes peuvent se résumer à la réaction suivante, appelée réaction d'Haber-Weiss [102] :

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^- + {}^{\bullet}OH$$

Les complexes de ruthénium(II) et d'osmium (II) constituent une autre famille de photosensibilisateurs. Ces complexes à l'état excité sont de très forts oxydants à un électron [103,104]. Comme tout les oxydants à un électron, ils oxydent principalement les guanines, bases de plus bas potentiel d'oxydation. Néanmoins dans ce cas, contrairement aux photosensibilisateurs classiques, les interactions existant entre les ligands du métal de transition et la guanine jouent un rôle important. Récemment il a été montré que des complexes d'oxovanadium(IV) de structure [VO(samlet)(B)] et [VO(saltrp)(B)] (où samlet = N-salicydène-L-méthionate, saltrp = N-salicydène-L-tryptophanate et B étant des diamines aromatiques, comme la 1,10-phénanthroline) sont capables de photosensibiliser des coupures d'ADN par le biais de l'oxygène singulet même par irradiation en lumière rouge ($\lambda > 750$nm) [105].

I.4.6. Les réactions de type « Fenton »

A la fin du dix-neuvième siècle, Fenton et Jackson se sont aperçus que le mélange de H_2O_2 avec le Fe^{2+} a des propriétés oxydantes plus fortes que l'eau oxygénée seule [106]. Plus tard Haber et Weiss ont démontré que ce sont les radicaux hydroxyle qui sont responsables d'un tel pouvoir oxydant [102].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + {}^{\bullet}OH$$

Au départ, découvert pour le système Fe^{2+} - H_2O_2, cette réaction est possible avec d'autres métaux de transition. Dans le Tableau I-6 sont présentés, pour quelques métaux, les potentiels électrochimiques, les pH et les constantes de vitesses de réactions de type Fenton.

La réaction avec l'ion libre de Fe^{2+} n'est possible que dans des conditions acides en raison de sa précipitation en milieu neutre. En revanche, sa complexation le stabilise par rapport au pH et change beaucoup la constante de vitesse de réaction (Tableau I-6).

Couple	E°/ V	pH	k / dm^3 mol^{-1} s^{-1}
$Fe^{II/III}$	0,77	1	65
$Fe(EDTA^*)^{II/III}$	0,12	7	$7x10^5$
$Cu^{I/II}$	0,16	1	$4x10^3$
$Cr^{II/III}$	-0,41	0	$7x10^4$
$Ti^{III/IV}$	0,1	0	540
$V^{II/III}$	-0,26	1	8,6
VO^{2+}/VO^{3+}	0,1	0	~1
$Ru(NH_3)^{II/III}$	0,067	7	~1,5

* EDTA - acide éthylènediaminetétracétique

Tableau I-6 : Potentiels électrochimiques, pH et vitesses de réactions de type Fenton pour quelques métaux de transition et leurs complexes [24]

De nos jours, il est acquis que les réactions de type Fenton jouent un rôle important dans l'oxydation de l'ADN *in vivo*. Les cellules vivantes contiennent de faibles concentrations en métaux de transition, en particulier des ions de fer et de cuivre. Par exemple, la concentration en ions libres de fer dans les cellules de mammifères est de l'ordre du micromolaire [107]. La concentration en ions libres de cuivre n'est pas détectable [108], mais il est connu que le « DNA scaffolding protein » contient du cuivre [109]. Le nombre de lésions beaucoup plus important au niveau des bases azotées de l'ADN mitochondrial par rapport à l'ADN nucléique a été attribué à la concentration plus élevée en fer dans les mitochondries.

I.4.7. L'ozonation

L'ozone a de faibles propriétés mutagènes [110]. Il a été montré que ce dernier est capable d'induire des dommages sur l'ADN de plantes [111] ainsi que dans des cellules humaines [112]. Il est connu que les radicaux hydroxyle sont partiellement responsables de dommages sur l'ADN induits par l'ozone [113]. D'autre part, l'ozone est très électrophile et peut réagir avec les doubles liaisons de bases azotées. L'interaction entre l'ozone et des composés aromatiques (comme les bases azotées) dépend beaucoup des propriétés donneur-accepteur de leurs substituants.

I.5 Conclusion

Cette mise au point bibliographique nous a montré la diversité des agents physiques et chimiques pouvant menacer l'intégrité de l'ADN. Ces agents peuvent induire la formation d'une multitude de dommages sur l'acide nucléique. Egalement, cette étude bibliographique a souligné une grande abondance de littérature concernant les dommages dans des conditions biologiques ou très proches, ou encore dans le cas d'ADN complexé par les nucléosomes.

Toutefois, comme notre objectif est d'étudier la formation de dommages sur l'ADN complexé avec différents agents cationiques, notamment des tensioactifs, le chapitre bibliographique suivant sera consacré aux principes et méthodes les plus couramment utilisées pour étudier la complexation ADN-tensioactifs.

Références

[1] Calladine, C.R., Drew, H.R. *Understanding DNA : The Molecule and how it Works (2nd Ed.)*, Academic, London, **1997**

[2] Tan, X., Grollman, A. P., Shibutani, S., *Carcinogenesis*, **1999**, *20*, 2287-2292.

[3] Thomas, D., Scot, A. D., Barbey, R., Padula, M., Boiteux, S., *Mol. Gen. Genet.*, **1997**, *254*, 171-178.

[4] Jiang, N., Taylor, J.-S., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 472-481.

[5] Gentil, A., Le Page, F., Sarasin, A., *Biological Chemistry*, **1997**, *378*, 1287-1292

[6] Munro, T.L., *Radiat Res*, **1970**, 42, 451-470

[7] Mitchell, D. L. In *CRC handbook of organic photochemistry and photobiology*, William M. Horspool, Pill-Soon Song, eds., CRC Press, **1995**, pp. 1326-1331.

[8] Mitchell, D. L., Jen, J., Cleaver, J. E., *Photochem Photobiol*, **1991**, *54*, 741-746.

[9] Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., *J Photochem Photobiol, B: Biology*, **2001**, *63*, 88-102

[10] Gordon, L. K., Haseltine, W. A., *Radiation Research*, **1982**, *89*, 99-112

[11] Durbeej, B., Eriksson, L. A., *Photochem Photobiol*, **2003**, *78*, 159-167.

[12] Taylor, J.-S., Cohrs, M.P., *J Am Chem Soc*, **1987**, *109*, 2834-2835

[13] McAteer, K., Jing, Y., Kao, J., Taylor, J.-S., Kennedy, M. A., *J Mol Biol*, **1998**, *282*, 1013-1032

[14] Douki, T., Cadet, J., *J Photochem Photobiol*, **1992**, *15*, 199-213

[15] Peng, W., Shaw, B.R., *Biochemistry*, **1996,** *35*, 10172-10181

[16] Mitchell, D. L., Jen, J., Cleaver, J. E., *Photochem Photobiol*, **1991**, *54*, 741-746

[17] Tyrrel, R. M., Keyse, S. M., *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **1990**, *4*, 349-361.

[18] Drobetsky, E. A., Turcotte, J., Châteauneuf, A., *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **1995**, *92*, 2350-2354

[19] Sugiyama, H., Saito, I., *J Am Chem Soc*, **1996**, *118*, 7063-7068

[20] Burrows, C. J., Muller, J. G., *Chemical Reviews*, **1998**, *98*, 1109-1151

[21] Kelley, S. O., Barton, J. K., *Science*, **1999**, *283*, 375-381.

[22] Ly, D., Sanii, S., Schuster, G. B., *J Am Chem Soc*, **1999**, *121*, 9400-9410.

[23] Saito, I., Takayama, M., Sugiyama, H., Nakamura, T. In *DNA and RNA cleavers and chemotherapy of cancer and viral diseases*, B. Meunier, ed., Kluwers Academic Publishers, **1996**

[24] von Sonntag, C. *Free-radical-induced DNA damage and its repair. A chemical perspective*, Springer, **2006**

[25] Jacobs, G.P., Samuni, A., Czapski, G., *Int J Radiat Biol*, **1985**, *47*, 621-627

[26] Wood, P. D., Redmond, R. W., *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*, 4256-4263.

[27] Gut, I. G., Wood, P. D., Redmond, R. W., *J Am Chem Soc*, **1996**, *118*, 2366-2373.

[28] Ruzsicska, B. P., Lemaire, D. G. E. In *CRC Handbook of photochemistry and photobiology*, Pill-Soon Song, ed., CRC Press, **1995**

[29] Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., Sage, E., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 9221-9226.

[30] Pogozelski, W.K., Tullius T.D., *Chem Rev*, **1998**, *98*, 1089-1107

[31] Balasubramanian, B., Pogozelski, W.K., Tullius, T.D., *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998,** *95*, 9738-9743

[32] Spotheim-Maurizot, M., Begusova, M., Charlier, M., *L'actualité Chim*, **2003**, 97-102

[33] Miaskievicz, K., Osman, R., *J Am Chem Soc*, **1994**,*116*, 232-238

[34] Alden, C. J., Kim, S., *J Mol Biol*, **1979**,*132*, 411-434

[35] Sigman, D.S., Graham, D.R., D'Aurora, V., Stern, A.M., *J Biol Chem*, **1979**, *254*, 12269-12272

[36] Marshall, L.E., Graham, D.R., Reich, K.A., Sigman, D.S., *Biochemistry*, **1981**, *20*, 244-250

[37] Kuwabara, M., Yoon, C., Goyne, T., Thederahn, T., Sigman, D.S., *Biochemistry*, **1986**, *25*, 7401-7408

[38] Pope, L.M., Reich, K.A., Graham, D.R., Sigman, D.S., *J Biol Chem*, **1982**, *257*, 12121-12128

[39] Goyne, T., Sigman, D.S., *J Am Chem Soc*, **1987**, *109*, 2846-2848

[40] Meijler, M.M., Zelenko, O., Sigman, D.S., *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 1135-1136

[41] Bergman, R.G., *Acc Chem Res*, **1973**, *6*, 25-31

[42] Goldberg, I.H., *Acc Chem Res*, **1991**, *24*, 191-198

[43] Zeng, X., Xi, Z., Kappen, L.S., Tan, W., Goldberg, I.H., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12435-12444

[44] Kappen, L.S., Goldberg, I.H., Wu, S.H., Stubbe, J., Worth, L.Z.Jr., Kozarich, J.W., *J Am Chem Soc*, **1990**, *112*, 2797-2798

[45] Goodman, B.K., Greenberg, M.M., *J Org Chem* **1996**, *61*, 2-3

[46] Cook, G.P., Greenberg, M.M., *J Am Chem Soc*, **1996**,*118*, 10025-10030

[47] Sugiyama, H., Fujimoto, K., Saito, I., Kawashima, E., Sekine, T., Ishido, Y., *Tetrahedron Lett*, **1996**, *37*, 1805-1808

[48] Sitlani, A., Long, E.C., Pyle, A.M., Barton, J.K., *J Am Chem Soc*, **1992**, *114*, 2302-2312

[49] Shields, T.P., Barton, J.K., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 15037-15048

[50] von Sonntag, C. *The chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor&Francis: London, **1987**

[51] Stubbe, J., Kozarich, J.Z., *Chem Rev*, **1987**, *87*, 1107-1136

[52] Hertzberg, R.P., Dervan, P.B., *Biochemistry*, **1984**, *23*, 3934-3945

[53] Balasubramanian B. Thèse, Université John Hopkins, Baltimore, MD, **1996**

[54] Hecht, S., *Acc Chem Res*, **1986,** *19*, 383-391

[55] Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C., Grollman, A., *J Biol Chem*, **1981**, *256(16)*, 8608-8615

[56] Hangeland, J.J., DeVoss, J.J., Heath, J., Townsend, C.A., *J Am Chem Soc*, **1992**, *114*, 9200-9202

[57] Frank, B.L., Worth, L.Jr., Christner, D.F., Kozarich, J.W., Stubbe, J., Kappen, L.S., Goldberg, I.H., *J Am Chem Soc*, **1991**, *113*, 2271-2275

[58] Uesugi, M., Sugiura, Y., *Biochem Biophys Res Commun*, **1992**,186, 580-587

[59] Konishi, M. , Ohkuma, H. , Matsumoto, K. , Tsuno, T. , Kame, H. , Miyaki, T. , Oki, T., Kawaguchi, H. , Van Duyne, G. , Clardy, J., *J Antibiot*, **1989**, *42*, 1449-1452

[60] Dizdaroglu, M., von Sonntag, C., Schulte-Frohlinde, D., *J Am Chem Soc*, **1975**, *97*, 2277-2278

[61] Glatthar, R., Spichty, M., Gugger, A., Batra, R., Damm, W., Mohr, M., Zipse, H., Giese, B., *Tetrtahedron*, **2000**, *56*, 4117-4128

[62] Beesk, F., Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., *Int J Radiat Biol*, **1979**, *36*, 565-576

[63] Povirk, L.F., Hogan, M., Dattagupta, N., *Biochemistry*, **1979**, *18*, 96-101

[64] Dabrowiak, J.C., *J Inorg Chem*, **1980**, *13*, 317-337

[65] Sam, J.W., Tang, X.-P., Peisach, J., *J Am Chem Soc*, **1994**,*116*, 5250-5256

[66] Burger, R.M., Kent, T.A., Horwitz, S.B., Műnck, E., Peisach, J., *J Biol Chem*, **1983**, *258*, 1559-1564

[67] Burger, R.M., Freedman, J.H., Horwitz, S.B., Peisach, J., *Inorg Chem*, **1984**, *23*, 2215-2217

[68] Absalon, M.J., Krishnamoorthy, C.R., McGall, G., Kozarich, J.W., Stubbe, J., *Nucleic Acids Res*, **1992**, *20*, 4179-4185

[69] Neese, F., Zaleski, J.M., Zaleski, K.L., Solomon, E.I., *J Am Chem Soc*, **2000**, *122*, 11703-11724

[70] Colson, A.O., Sevilla, M.D., *Int J Radiat Biol*, **1995**, *67*, 627-645

[71] Kappen, L.S., Goldberg, I.H., *Biochemistry*, **1983**, *22*, 4872-4878

[72] Kappen, L.S., Goldberg, I.H., Liesch, G.M., *Proc Natl Acad Sci USA*, **1982**, *79*, 744-748

[73] Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., *Z Naturforsch*, **1975**, *30c*, 826-828

[74] Isildar, M., Schuchmann, M.-N., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., *Int J Radiat Biol*, **1990**, *18*, 1217-1223

[75] Pratviel, G., Pitié, M., Bernadou, J., Meunier, B., *Angew Chem Int Ed Engl*, **1991**, 30, 702-

[76] Dix, T.A., Hess, K.M., Medina, M.A., Sullivan, R.W., Tilly, S.L., Webb, T.L.L., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 4578-4583

[77] Pratviel, G., Bernadou, J., Meunier, B., *Angew Chem Int Ed Engl*, **1995**, 34, 746-769

[78] Bothe, E., Qureshi, G.A,, Schulte-Frohlinde, D., *Z Naturforsch., C : Biosci.*, **1983**, *38*, 1030-1042

[79] Deeble, D.R., von Sonntag, C., *Int J Radiat Biol*, **1984**, *46*, 247-260

[80] Wagner, J.R., van Lier, J.E., Johnston, L.J., *Photochem Photobiol*, **1990**, *52*, 333-343

[81] bo Zhang, R., Eriksson, L.A., *J Phys Chem*, **2006**, *110*, 23583-23589

[82] Becker, D., Bryant-Friedrich, A., Trzasko, C.-A., Sevilla, M.D., *Radiat Res*, **2003**, 160, 174−185

[83] Zheng, Y., Cloutier, P., Hunting, D.J., Sanche, L., Wagner, J.W., *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 16592-16598

[84] Rae, J., Ashokumar, M., Eulaerts, O., von Sonntag, C., Reisse, J., Grieser, F., *Ultrasonic Sonochem.*, **2005**, *12*, 325-329

[85] Tauber, A., Mark, J., Schuchman, H.-P., von Sonntag, C., *J Chem Soc Perkin Trans 2*, **1999**, 1129-1135

[86] Suslick, K.S., *Science*, **1990**, *247*, 1439-1445

[87] Henglein, A., *Ultrasonics*, **1987**, *25*, 6-16

[88] Benson, S.W., *J Educ Chem*, **1965**, *42*, 502-518

[89] Fuciarelli, A.F., Sisk, E.C., Thomas, R.M., Miller, D.L., *Free Radical Biol Med*, **1995**, *18*, 231-238

[90] Kondo, T., Krishna, C.M., Riesz, P., *Int J Radiat Biol*, **1988**, *53*, 331-342

[91] Kondo, T., Krishna, C.M., Riesz, P., *Int J Radiat Biol*, **1990**, *57*, 23-33

[92] Brusa, M.A., Churio, M.S., Grela, M.A., Bertolotti, S.G., Previtali, C.M., *Phys Chem Chem Phys*, **2000**, *2*, 2383-2387

[93] Crowell, R.A., Lian, R., Sauer, M.C., Oulianov, D.A., Shkorob, I.A., *Chem Phys Lett*, **2004**, *383*, 481-485

[94] Mark, G., Schuchman, M.N., Schuchman, H.-P., von Sonntag, C., *J Photochem Photobiol A Chem*, **1990**, *55*, 157-168

[95] Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R., *Free Radic Biol Med*, **1998**, *24*, 234-238

[96] Adam, W., Hartung, J., Okamoto, H., Saha-Möller, CR., Spehar, K., *Photochem Photobiol*, **2000**, *72*, 619-624

[97] Adam, W., Grimm, G.N., Marquard, S., Saha-Möller, C.R., *J Am Chem Soc*, **1999**, *121*, 1179-1185

[98] Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., *Z Phys Chem N F*, **1965**, *45*, 314-327

[99] Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A.B., *J Phys Chem Data*, **1995**, *24*, 663-1021

[100] Suenaga, H., Nango, M., Sugiyama, T., Iwasaki, T., Takeuchi, Y., Shinkai, S., *Chem Lett*, **2000**, 306-307

[101] Aloisi, G.G., Amelia, M., Barbafina, A., Latterini, L., Elisei, F., dall'Acqua, F., Vedaldi, D., Faccio, A., Viola, G., *Photochem Photobiol*, **2007**, *83 (3)*, 664-674

[102] Haber, F., Weiss, J. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and physical sciences*, **1934**, *147*, 332-351

[103] Moucheron, C., Kirsch-De Mesmaeker, A., Kelly, J.M., *J Photochem Photobiol B Biol*, **1997**, *40*, 91-106

[104] Ortmans, I., Moucheron, C., Kirsch-De Mesmaeker, A., *Coord Chem Rev*, **1998**, *168*, 233-271

[105] Sasmal, P.K., Patra, A.K., Nethaji, M., Chakravarty, A.R., *Inorg Chem*, **2007**, *46*, 11112-11121

[106] Fenton, H.J.H., Jackson, H., *J Chem Soc Transact (London)*, **1899**, *75*, 1-11

[107] Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., Cabantchik, I., *Anal biochem*, **1997**, *248*, 31-40

[108] Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V., *Science*, **1999**, *284*, 805-808

[109] Lewis, C.D., Laemmli, U.K., *Cell*, **1982**, *29*, 171-181

[110] Rodrigues, G.S. , Madkour, S.A., Weinstein, L.H., *Environ Exp Bot*, **1996**, *36*, 45-50

[111] Floyd, R.A., West, M.S., Hogsett, W.E., Tingey, D.T., *Plant Physiol*, **1989**, *91*, 644-647

[112] Fetner, R.H., *Nature*, **1962**,*194*, 793-794

[113] Van der Zee, J., Dubbelman, T.M.A.R. , Van Steveninck, J., *Free Rad Res Commun*, **1987**, *2*, 279-284

Chapitre II

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA COMPLEXATION ENTRE L'ADN ET DES TENSIOACTIFS CATIONIQUES

Chapitre II. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA COMPLEXATION ENTRE L'ADN ET DES TENSIOACTIFS CATIONIQUES

II.1 Introduction **71**
II.2 Les tensioactifs et leur mode d'agrégation **71**
II.3 Interactions tensioactifs-polyélectrolytes **75**
II.4 Complexation ADN-tensioactifs **76**
II.4.1. Méthodes les plus couramment utilisées pour l'étude de la complexation ADN-tensioactifs 77
II.4.1.1 La diffusion de la lumière 78
II.4.1.1.1 Intensité de la lumière diffusée 78
II.4.1.1.2 Diffusion dynamique de la lumière 79
II.4.1.2 Mesures de la température de fusion de l'ADN 80
II.4.1.3 Titration par fluorescence 83
II.4.1.4 Mesures de viscosité 84
II.4.1.5 Tension de surface 86
II.4.1.6 Etude potentiométrique 87
II.4.1.7 Microscopie de fluorescence 89
II.4.1.8 Calorimétrie isotherme 90
II.4.1.9 Electrophorèse sur gel d'agarose 92
II.4.2 Comportement de phases d'un système ADN-tensioactif 94
II.4.3 Influence de différents facteurs sur la complexation entre l'ADN et les tensioactifs 96
II.4.3.1 Force ionique 96
II.4.3.2 Longueur des chaînes hydrophobes 98
II.4.3.3 Tête polaire des tensioactifs 101
II.4.3.4 Concentration en ADN 103
II.4.3.5 Température 105
II.4.4. Structures et morphologies des complexes ADN-tensioactifs 106
II.5 Applications des complexes ADN-tensioactifs **107**
II.5.1 Purification et isolement de l'ADN par précipitation 107
II.5.2 La thérapie génique 108
II.5.3 Dosage de l'ADN 109
II.6. Conclusion **110**
Références **111**

II.1 Introduction

Un tensioactif est une molécule amphiphile, c'est à dire ayant deux parties d'affinité différente. Une partie de la molécule, dite polaire, sera hydrophile, avec une affinité pour l'eau, et l'autre partie, dite apolaire, sera lipophile, ayant une affinité pour l'huile (au sens large). Cette dualité confère aux molécules tensioactives des propriétés uniques d'adsorption aux interfaces, ainsi que la capacité de former des agrégats en solutions, notamment dans l'eau. Grâces à ces propriétés les tensioactifs sont utilisés comme détergents, émulsifiants, lubrifiants dans divers domaines, comme le traitement des eaux, l'exploitation pétrolière et les formulations pharmaceutiques.

Certaines molécules tensioactives ont également montré qu'elles pouvaient interagir avec une des plus importante molécule biologique, l'ADN. Ce dernier est un polyélectrolyte anionique et peut donc être complexé de manière électrostatique avec divers agents cationiques, notamment les tensioactifs cationiques. Par ailleurs, la complexation ADN-tensioactifs cationiques est utilisée depuis les années soixantes pour la purification et l'isolement de l'ADN. Par contre, c'est seulement depuis 10-15 ans que cette complexation est étudiée de manière plus fondamentale, en raison de son intérêt pour la transfection de gènes.

Pour ces études, diverses méthodes physiques et physico-chimiques on été décrites. Ces travaux ont permis de mieux comprendre le rôle des tensioactifs, et d'élucider les principes de base de cette complexation. Les effets de la température, la nature de la force ionique et de la structure (la longueur de chaîne, du contre-ion, de la tête polaire) des tensioactifs sur la complexation ADN-tensioactifs cationiques ont été ainsi décrits, et feront l'objet de cette mise au point bibliographique.

II.2 Les tensioactifs et leur mode d'agrégation

Les tensioactifs sont des composés qui ont une structure chimique particulière qui combinent au sein d'une même molécule une partie polaire hydrophile et une partie apolaire hydrophobe. De part cette dualité en termes de solubilité, les tensioactifs présentent des propriétés remarquables en solution aqueuse. En effet, afin de diminuer le contact de leur

partie hydrophobe avec l'eau, ils ont la capacité de s'adsorber aux interfaces air/eau abaissant ainsi la tension de surface. Ils peuvent également s'auto-associer en solution aqueuse pour former des agrégats de formes et de tailles diverses [1].

Ainsi, l'accumulation de tensioactifs au niveau de l'interface eau/air constitue un moyen efficace pour réduire le contact entre les parties apolaires des molécules tensioactives et le milieu aqueux. Dans ce cas il y a expulsion des chaînes hydrophobes du milieu aqueux vers l'air. L'auto-organisation des tensioactifs permet également de transférer les parties apolaires de la molécule d'un milieu aqueux vers un domaine hydrophobe situé au sein de l'agrégat. Les deux phénomènes permettent au système d'atteindre un minimum d'énergie libre.

L'effet hydrophobe est caractérisé par un subtil équilibre entre le terme entropique et le terme enthalpique qui définissent l'énergie libre du système. La contribution du terme entropique est particulièrement importante lors des phénomènes d'auto-association. En effet, le rapprochement des parties apolaires qui conduit à l'établissement des interactions hydrophobes est généralement associé à une libération de molécules d'eau ainsi qu'à une perte de structure au niveau des molécules d'eau qui entouraient ces parties apolaires. L'augmentation de l'entropie consécutive à cette déstructuration du milieu aqueux conduit à une diminution de l'énergie libre du système. De plus, le transfert des chaînes hydrocarbonées au sein de l'agrégat s'accompagne d'une augmentation du degré de liberté et donc de l'entropie car le mouvement des chaînes n'est plus limité par les liaisons hydrogènes établies avec le solvant. L'effet hydrophobe est donc un processus favorisé d'un point de vue énergétique grâce à l'augmentation globale de l'entropie du système.

Plusieurs modèles fondés sur des considérations thermodynamiques, géométriques et physiques permettent d'expliquer la structure des agrégats. Pour décrire le phénomène d'agrégation, ces modèles doivent rendre compte du conflit qui résulte des exigences contradictoires des parties hydrophile et hydrophobe de la molécule amphiphile. Les interactions qui s'établissent entre molécules amphiphiles et avec l'eau jouent, par conséquent, un rôle important au niveau du potentiel chimique, paramètre thermodynamique qui permet de décrire l'état du système.

Pour la description des solutions micellaires, les interactions sont généralement séparées en deux types de contribution qui interviennent respectivement au niveau de la surface de la micelle et au niveau du cœur. Les contributions considérées au niveau de la surface résultent des répulsions électrostatiques entre les têtes polaires, de l'hydratation et des interactions entre les têtes polaires ioniques et les contre-ions. Au niveau du cœur, les interactions de Van der Waals qui s'établissent entre les chaînes hydrocarbonées imposent une densité particulière voisine d'un état liquide tandis que les contraintes géométriques conduisent à une réduction du nombre de configurations pouvant être adoptées par les chaines aliphatiques.

Dans le modèle d'Israelachvili et al. [2], un paramètre d'empilement moléculaire est décrit pour prédire la morphologie préférentielle des agrégats à partir de considérations géométriques. En effet, ce paramètre fait intervenir le volume moléculaire (V), la longueur critique de la chaîne (l_c) et l'aire optimale (a_0) occupée par la tête polaire au niveau de l'interface entre le milieu polaire et apolaire. La longueur critique représente la longueur maximale pour laquelle la chaîne alkyle peut être considérée comme fluide et non figée dans une structure cristalline.

$$P = \frac{V}{a_0 l_c}$$

Equation II-1

Ainsi, ce paramètre traduit les contraintes géométriques (V et l_c) qui interviennent au niveau du cœur hydrophobe, ce dernier étant considéré comme liquide. Par ailleurs, il prend en compte pour la surface de la tête polaire la valeur particulière (a_0) qui correspond à une contribution minimale des énergies d'interactions au niveau de la surface.

Selon ce modèle, la morphologie préférentielle de l'agrégat est obtenue lorsque les contraintes géométriques sont satisfaites et que le potentiel chimique du système est minimum (Figure II-1).

Amphiphile	Paramètre d'empilement	Organisation	Phase
Tensioactif bicaténaire à tête polaire petite	$V / a_0 l_c > 1$		Micelles inverses Phase hexagonale II
Tensioactif bicaténaire Tensioactif bolaforme ou bicaténaire à large tête polaire	$V / a_0 l_c \sim 1$ $½ < V / a_0 l_c < 1$		Phase cubique Q_{II} Phase lamellaire (si flexible - vésicules)
Tensioactif monocaténaire type non ionique Tensioactif monocaténaire à large tête polaire	$V / a_0 l_c \sim ½$ $V / a_0 l_c < ½$		Phase hexagonale I Micelles directes

Figure II-1: Morphologie préférentielle des agrégats en fonction du paramètre d'empilement moléculaire du tensioactif [3]

Lorsque la concentration en tensioactif augmente au sein de la solution et que l'adsorption à l'interface n'est plus possible, la réduction de l'énergie libre du système est assurée par la formation d'agrégats. Dans le cas de tensioactifs monocaténaires à large tête polaire, l'agrégation dans le milieu aqueux conduit à la formation de micelles directes. Cette agrégation commence à une concentration précise appelée concentration micellaire critique (CMC). La CMC dépend de plusieurs facteurs : la structure du tensioactif, la force ionique, la température, la présence d'une autre phase liquide et la présence d'additifs organiques dans la solution [4].

II.3 Interactions tensioactifs-polyélectrolytes

Il est reconnu qu'en présence de polyélectrolytes (PE) les tensioactifs forment des structures micellaires à des concentrations plus faibles que leurs concentrations micellaires critiques (CMC) [5]. La concentration en tensioactif à laquelle ils s'agrègent sur des polyélectrolytes s'appelle la concentration d'agrégation critique sur polyélectrolyte (CAC^{PE}). Un exemple de diagramme de micellisation de tensioactifs sur polyélectrolytes est présenté sur la Figure II-2.

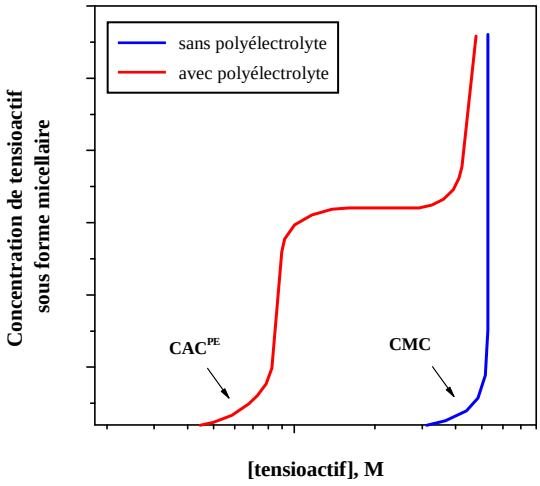


Figure II-2 : Allure générale d'un diagramme d'agrégation d'un tensioactif avec est sans polyélectrolyte

Ce diagramme montre qu'en absence de polyélectrolytes les tensioactifs n'existent sous forme micellaire qu'à partir des concentrations au-dessus de leur CMC. Par contre en présence de polyélectrolytes, ils forment des micelles à la CAC^{PE}. Lorsqu'il n'y a plus d'interactions possibles entre les tensioactifs et le polyélectrolyte il n'y a plus d'agrégation et le tensioactif reste libre en solution jusqu'à sa CMC normale. Il existe deux types d'interactions lors de la complexation ADN-tensioactifs :

- des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyle des tensioactifs

- des interactions électrostatiques entre les phosphates de l'ADN et les têtes polaires des tensioactifs.

On définit la complexation comme l'état correspondant à un maximum d'interactions entre l'ADN et les tensioactifs.

II.4 Complexation ADN-tensioactifs

L'ADN étant un polyélectrolyte anionique, il est également capable de favoriser l'agrégation des tensioactifs [3]. Les tensioactifs monocaténaires cationiques les plus couramment utilisés pour les études de complexation avec l'ADN sont présentés sur la Figure II-3.

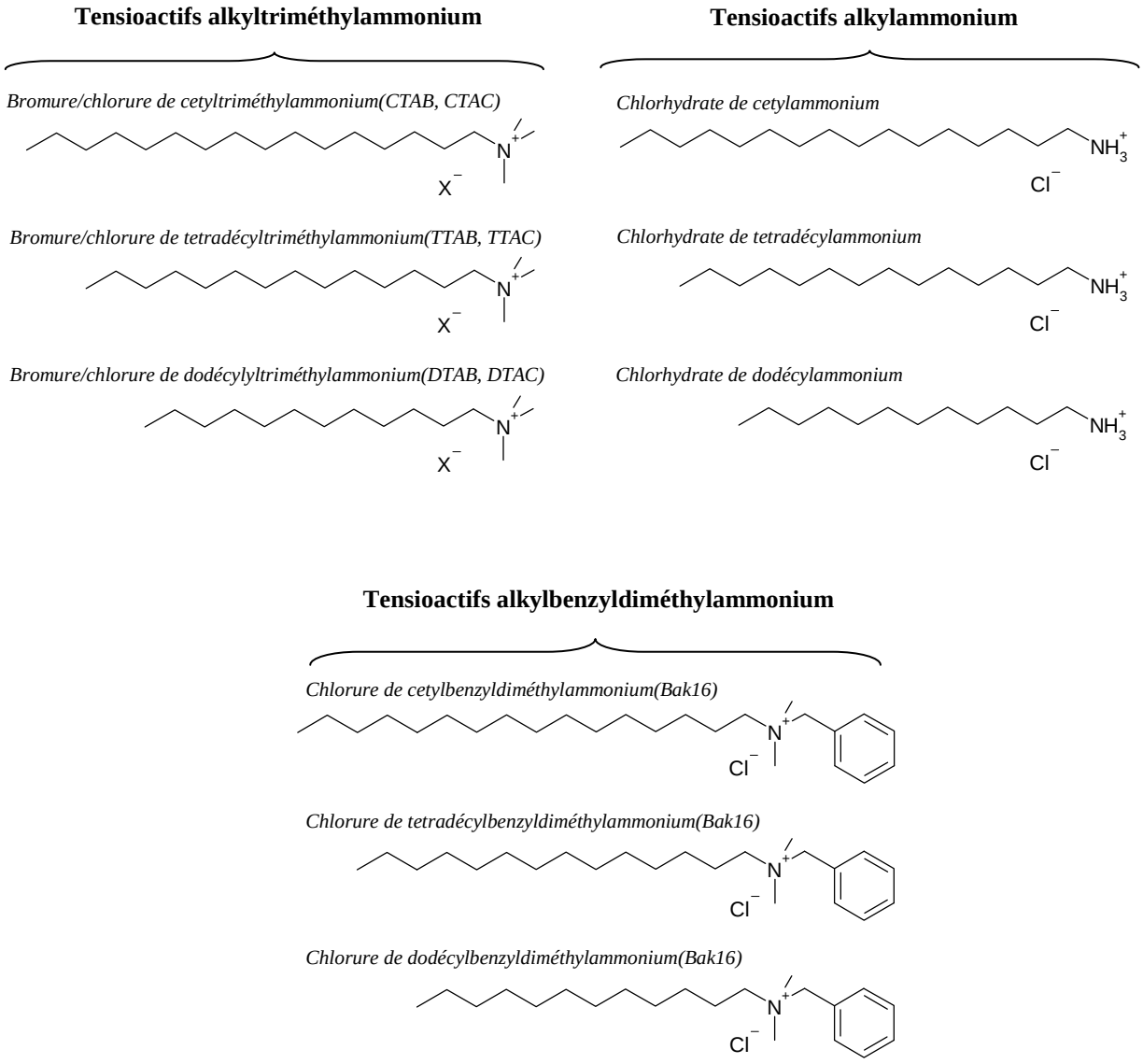


Figure II-3 : Tensioactifs les plus couramment utilisés pour les études de complexation avec l'ADN

I.4.1. <u>Méthodes les plus couramment utilisées pour l'étude de la complexation ADN-tensioactifs</u>

La complexation de l'ADN par des tensioactifs cationiques change les propriétés physiques ainsi que la morphologie de l'acide nucléique. Ces changements permettent l'utilisation de nombreuses techniques physiques et physico-chimiques afin d'étudier cette complexation. Grâce à ces différentes techniques, on peut mettre en évidence les effets des tensioactifs sur l'ADN et en déduire les principes de base de sa complexation par ces derniers.

Par ailleurs, il n'existe pas de méthodes purement chimiques pour étudier la complexation entre l'ADN et les tensioactifs.

On peut différencier les méthodes d'étude de la complexation de l'ADN par des tensioactifs cationiques en deux classes, selon l'origine de l'effet physico-chimique. La première classe peut être attribuée aux effets liés aux propriétés macromoléculaires de l'ADN (changement de la conformation) et la deuxième classe aux méthodes liées aux propriétés structurales de l'ADN (propriétés de la double hélice).

Nous appliquerons le terme "gros ADN " pour une molécule capable de se replier lors de la neutralisation de ses charges. Une telle molécule sera plusieurs fois plus longue que sa longueur de persistance, laquelle est de 150 paires de bases pour l'ADN. Par contre on doit également tenir compte du fait que la neutralisation des charges diminue la longueur de persistance normale d'un polyélectrolyte (jusqu'à 32 pb lors de la complexation d'un ADN sur une surface couverte par des polyamines). [6,7]

II.4.1.1. *La diffusion de la lumière*

II.4.1.1.1. *Intensité de la lumière diffusée*

L'effet de la complexation sur la diffusion de la lumière dépend de la taille de l'ADN utilisé. La complexation de gros ADN avec des tensioactifs cationiques provoque la compaction de l'acide nucléique grâce à la neutralisation de ses charges [8]. Par contre, dans le cas d'oligodésoxyribonucléotides (ODN) déjà petit, la neutralisation des charges ne provoque pas de compaction, donc de diminution de taille. Dans ce cas, les complexes formés ont généralement une taille qui augmente. Il a été montré que l'augmentation de la concentration d'un tensioactif dans ce cas, provoque l'accroissement de l'intensité de la lumière diffusée (Figure II-4). Cette intensité atteint un maximum lors de la complexation [9]. Le même effet a été observé lors de l'étude de la complexation entre des tensioactifs et l'ADN de 200 paires de bases [10].

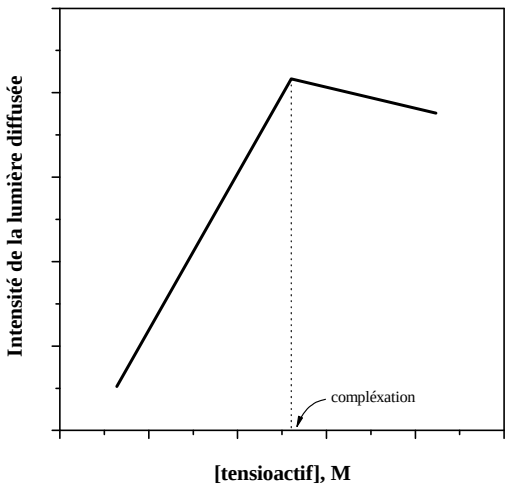


Figure II-4 : Exemple de courbe de complexation suivie par diffusion de la lumière

II.4.1.1.2. *Diffusion dynamique de la lumière*

L'étude par la diffusion dynamique de la lumière de la compaction de gros ADN par des tensioactifs [8,11,12] a montré qu'il n'existe que deux conformations possibles d'acide nucléique: la conformation dépliée et la conformation compactée, avec une zone de coexistence des deux types de conformations (Figure II-5).

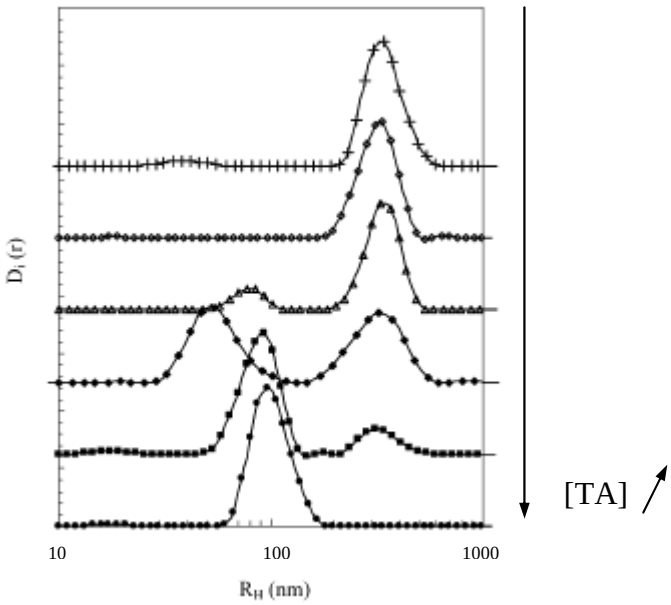


Figure II-5 : Exemple de transition discrète entre l'ADN déplié et compacté lors de sa complexation par des tensioactifs (D_i(r) - distribution des tailles) [8]

En revanche, l'étude de la complexation d'ADN plasmidiques a montré l'augmentation de la taille des complexes [13]. Le niveau de compaction de l'ADN plasmidique natif peut être assez important en raison de sa structure circulaire superenroulée. C'est pour cette raison que lors de l'agrégation de tensioactifs sur un ADN plasmidique, la taille des complexes augmente. De plus il a été observé que la taille des agrégats augmente encore lors de l'addition de tensioactifs au delà de la complexation, et cet effet a été attribué à l'agrégation des complexes formés (Figure II-6).

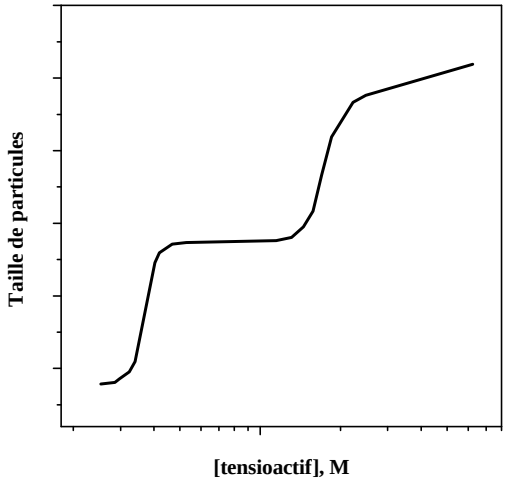


Figure II-6 : Influence de la concentration en tensioactifs sur la taille des complexes lors la complexation avec un ADN plasmidique

II.4.1.2. *Mesures de la température de fusion de l'ADN*

La température de fusion moléculaire (ou dénaturation) de l'ADN est la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont désappariées (*i.e.* sous forme simple brin). Au cours de la dénaturation un effet hyperchrome (augmentation de la densité optique) est observé. Ainsi, l'absorbance de l'ADN simple brin est 1,6 fois plus importante que celle de l'ADN double brin. Grâce à ce phénomène, on peut déterminer la température de fusion par mesure de la densité optique à 260 nm de la solution d'ADN. L'énergie thermique apportée devient alors suffisante pour dénaturer l'ADN, c'est à dire pour rompre les liaisons hydrogène inter-brins. La température de fusion d'un gros ADN dépend de sa concentration, de la teneur en bases, de la force ionique, du pH et de la teneur en CO_2.

Selon la longueur des chaînes de tensioactifs utilisés, des effets différents sur la température de fusion de l'ADN ont été observés. Ainsi, il a été observé que des tensioactifs de type alkyltriméthylammonium à longues chaînes hydrophobes (n>14) augmentent la

température de fusion de l'ADN car ils interagissent mieux avec l'ADN double brin qu'avec l'ADN simple brin (dénaturé) [14]. Par ailleurs, des tensioactifs possédant des chaînes plus courtes abaissent la température de fusion de l'acide nucléique, et stabilisent donc mieux l'ADN simple brin. Dans le cas des tensioactifs à longues chaînes ces derniers interagissent préférentiellement avec l'ADN sous forme micellaire. Les micelles chargées se comportent comme des poly-ions, et interagissent mieux avec l'ADN double brin grâce à l'importante densité de charge de cette conformation. De plus, cette interaction est renforcée par l'inaccessibilité des bases nucléiques hydrophobes. Inversement, les tensioactifs de chaînes plus courtes se lient préférentiellement à l'ADN sous leur forme monomérique. Dans ce cas, les forces hydrophobes jouent un rôle plus important car ces tensioactifs interagissent mieux avec l'ADN simple brin grâce aux interactions hydrophobes entre les chaînes de tensioactifs et les bases azotées désappariées de l'ADN simple brin.

Par exemple, l'effet de la complexation entre l'ADN et le CTAB sur sa température de fusion à été étudié pour des oligonucléotides (ODN) de 16 pb [9,15]. La température de fusion trouvée pour l'ODN utilisé était approximativement de 40°C. Ainsi, les auteurs ont montré que la complexation d'ODN avec ce tensioactif n'augmente que de quelques degrés la température de fusion de la double hélice. Toutefois, lors de la complexation il apparaît une deuxième transition beaucoup plus sensible à la concentration en tensioactifs (Figure II-7).

Il a été proposé que grâce aux interactions hydrophobes entre les chaînes de tensioactifs on est en présence de deux types d'ADN dans la solution – les ADN libres et les ADN complexés avec les tensioactifs. En effet la complexation entre l'ADN et les tensioactifs est coopérative et lorsque l'on augmente la concentration en tensioactifs, les nouvelles molécules préféreront s'agréger aux ODN qui sont déjà liés à d'autres molécules de tensioactifs. On constate ainsi qu'une telle complexation augmente la stabilité de la double hélice dans le cas des ODN.

Les mêmes résultats ont été obtenus en étudiant l'effet du CTAB sur la fusion d'un ADN de 200 paires de bases [10,16]. Dans ce cas la température de fusion de l'ADN natif était de 73ºC en absence de tensioactif. Lors de l'addition du tensioactif, une deuxième température de fusion a été observée à 88ºC. En se basant sur le modèle de fusion de l'ADN de McGhee [17] les auteurs ont analysé les résultats obtenus. La valeur du paramètre de coopérativité (différence de constante de liaison d'une molécule de tensioactif à un site libre

d'ADN et à un site adjacent à un site déjà occupé) obtenue par cette analyse pour le CTAB (u = 63) correspondait bien à la valeur obtenue par la calorimétrie isotherme (u =53).

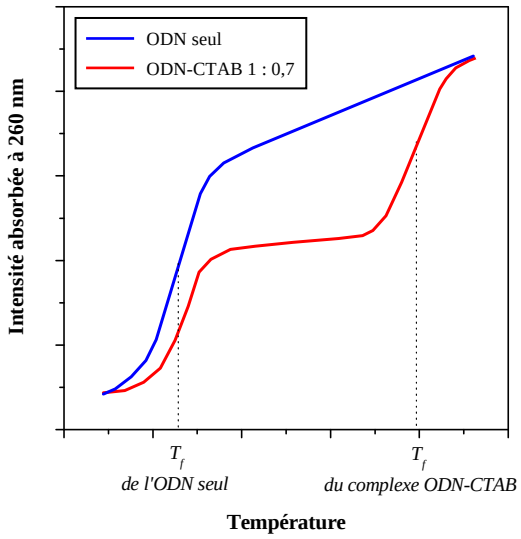


Figure II-7 : Influence du CTAB sur la température de fusion de l'ADN

Une faible augmentation de la température de fusion a également été observée dans le cas de plus gros ADN (>500pb) [12,14,18]. De plus, dans ce cas l'apparition de la deuxième température de fusion n'était pas observée. Marchetti et al. [12] ont étudié la dénaturation de l'ADN par analyse enthalpique différentielle, et ont observé une diminution importante d'enthalpie calorimétrique de fusion de l'ADN lors de l'augmentation de la concentration en tensioactifs (Figure II-8). Les auteurs ont proposé la formation d'une deuxième espèce avec une température de fusion non détectable dans l'eau (>100ºC).

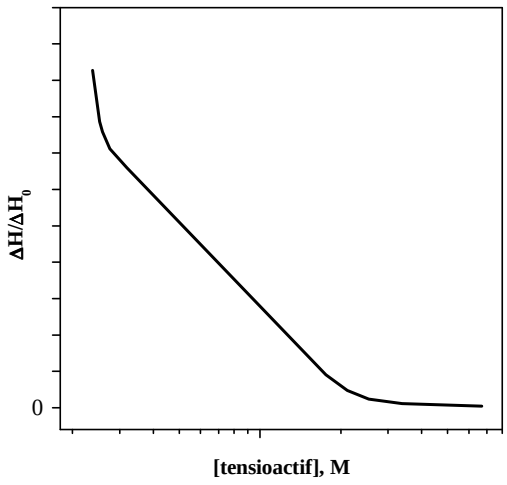
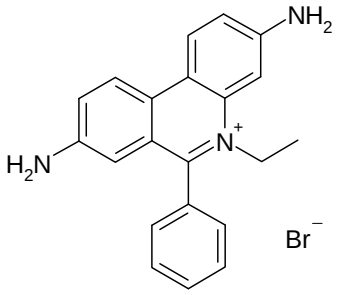


Figure II-8 : Influence de la concentration en tensioactifs sur l'enthalpie de fusion de l'ADN

II.4.1.3. *Titration par fluorescence*

Certaines molécules sont capables de s'intercaler entre les paires de bases d'ADN, principalement des molécules planes, aromatiques et souvent fluorescentes. Ces produits sont utilisés pour visualiser l'ADN mais également pour étudier sa complexation. L'intercalant le plus souvent utilisé est le bromure d'éthidium (BET) et, lorsqu'il s'intercale dans l'ADN, l'intensité de sa fluorescence augmente significativement. En effet, en solution, le BET libre dans l'état excité peut perdre son énergie par la voie non-radiative en donnant un proton de son groupe aminée à une molécule d'eau. Par contre, lorsqu'il est intercalé dans l'ADN, l'ion d'éthidium est isolé de l'eau est perd l'énergie de son état excité plutôt par la voie radiative, c'est à dire par la fluorescence.



Bromure d'éthidium

Lorsque l'on ajoute des tensioactifs à des mélanges de bromure d'éthidium et d'ADN, une décroissance rapide de la fluorescence est observée (Figure II-9) [9,15,16,18-20]. Cette perte de fluorescence est due au déplacement du bromure d'éthidium intercalé dans les brins d'ADN, provoqué d'une part par la neutralisation des phosphates de l'ADN par les tensioactifs cationiques et d'autre part par le changement de conformation de l'acide nucléique. Ce même effet est observé pour des gros ADN ainsi que pour des ODN. Ce phénomène permet de suivre la complexation de l'ADN par titration par fluorescence

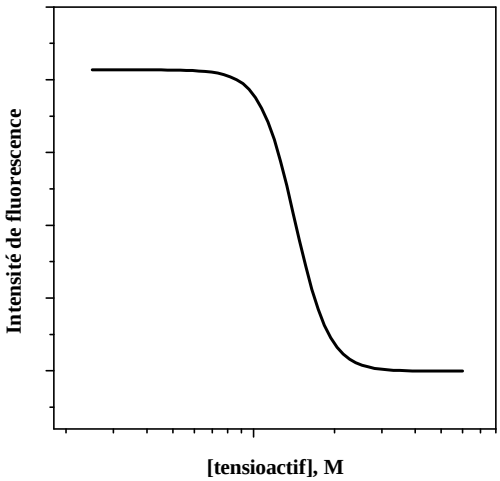


Figure II-9 : Influence de la concentration en tensioactifs sur la fluorescence des complexes ADN-BET

II.4.1.4. *Mesures de viscosité*

La viscosité est un coefficient dans l'équation de Newton, expliquant l'écoulement laminaire du fluide.

$$P = \eta \frac{du}{dx}$$

Equation II-2

Où :

η - le coefficient de viscosité

P - effort tranchant qui fait bouger le fluide

$\frac{du}{dx}$ - gradient de vitesses de mouvement de fluide

Donc, la viscosité apparaît comme une caractéristique de la capacité du fluide à résister à l'effort tranchant.

Il est connu que la présence de particules de taille colloïdale, ainsi que celle de macromolécules augmente significativement la viscosité des solutions. Cet effet est la conséquence de la taille importante de ces particules.

Einstein a établi une relation entre la viscosité de la solution et la fraction volumique de la phase dispersée.

$$\eta = \eta_0 (1 + \alpha\varphi)$$

Equation II-3

Où

η_0 - viscosité de solvant seul

φ - fraction volumique de la phase dispersée

α - paramètre dépendant de la forme des particules

A partir de l'équation d'Einstein on peut exprimer le changement relatif de la viscosité d'une solution, comme :

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} = \alpha\varphi = \alpha \frac{nv}{V}$$

Equation II-4

Où

η_{sp} - la viscosité spécifique

n - nombre de particules

v - volume de particules

V - volume du système

Le rapport de la viscosité spécifique sur la concentration en soluté défini la viscosité réduite, et la viscosité intrinsèque $[\eta]$ peut être déterminée par l'extrapolation de la valeur de la viscosité réduite à concentration égale à zéro.

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) = \frac{\alpha NV}{M}$$

Equation II-5

Où

$\frac{\eta_{sp}}{c}$ - la viscosité réduite

N – nombre d'Avogadro

M – masse moléculaire

V – volume du système

Pouvant avoir une masse moléculaire importante, l'ADN augmente significativement la viscosité de l'eau. Les études de l'effet des tensioactifs sur la viscosité intrinsèque des solutions d'ADN ont montré que la complexation de l'acide nucléique induit tout d'abord une

diminution de la viscosité suivie par un palier. Par le début de ce palier on peut déterminer la complexation de l'ADN (Figure II-10) [11,21,22]. Cet effet est du à la compaction de gros ADN par des tensioactifs, c'est à dire à la diminution de la taille effective de l'ADN (diminution du paramètre α).

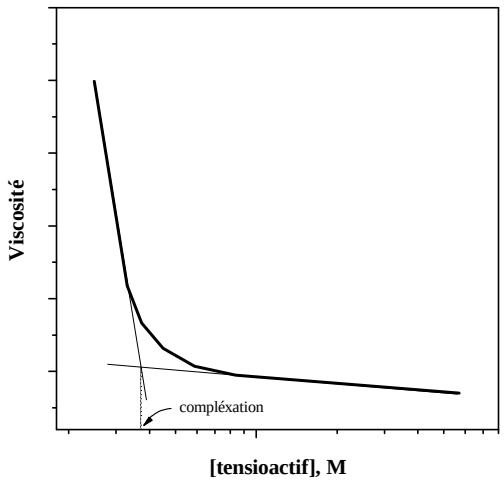


Figure II-10 : Influence de la concentration en tensioactifs sur la viscosité d'une solution d'ADN

Il a également été montré que l'addition d'un électrolyte tel que NaBr au complexe ADN-tensioactif provoque une augmentation de la viscosité de la solution [23]. Cela peut être expliqué par une décomplexation de ces systèmes. Par contre cet effet ne commence à intervenir que lorsque la concentration en électrolyte devient relativement importante (0,3 M).

II.4.1.5. *Tension de surface*

L'abaissement de la tension de surface est une des principales propriétés des tensioactifs. En solution, chaque molécule d'eau est entourée par d'autres molécules, et elles s'attirent l'une l'autre. Pour les molécules d'eau qui se situent à l'interface, elles ont d'un coté d'autres molécules d'eau, mais de l'autre coté un gaz (air). Du fait que les molécules d'eau en surface sont plus attirées par les molécules d'eau dans le liquide, que par des molécules présentant dans l'air, il se crée une force orientée perpendiculairement à l'interface en direction du liquide. Cette force tire les molécules de surface en induisant une tension appelée tension de surface.

Les tensioactifs, ayant une partie hydrophobe et une partie hydrophile, s'orientent tout naturellement à la surface de l'eau. Dans ce cas leur partie hydrophile se place dans l'eau et la

partie hydrophobe s'oriente vers l'air. Cette orientation provoque la diminution de la tension de surface de l'eau. La tension de surface diminue dans un premier temps avec l'augmentation de la concentration en tensioactif jusqu'à atteindre un palier. Le début de ce palier correspond à la concentration micellaire critique (CMC) du tensioactif. En présence d'ADN, la courbe de tensiométrie présente une déviation correspondant à la compléxation avec l'acide nucléique (Figure II-11) [13,24].

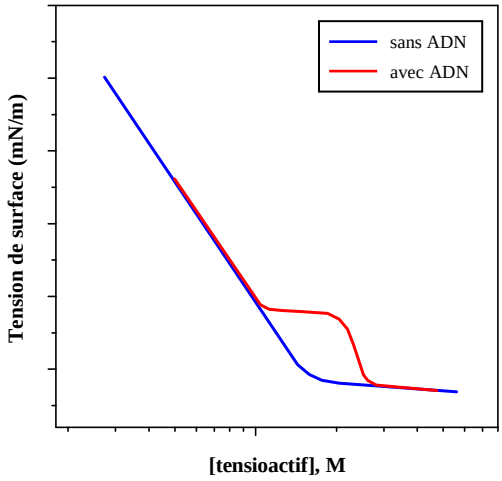


Figure II-11 : Tension de surface en fonction de la concentration en tensioactifs sans et avec ADN

A une certaine concentration en tensioactif (CAC^{PE}), des complexes avec l'ADN commencent à se former, et un plateau, correspondant à la complexation de l'ADN apparait avant la CMC du tensioactif. Sur ce plateau, le tensioactif se place sur l'ADN et non à la surface de l'eau. La longueur de ce plateau dépend de la concentration en ADN [13]. Quand l'acide nucléique est totalement complexé, le tensioactif recommence à se placer à l'interface liquide-gaz en diminuant la tension de surface.

II.4.1.6. *Etude potentiométrique*

La potentiométrie avec des électrodes sélectives aux ions tensioactifs a été utilisée pour étudier la concentration d'ions libres (non-complexés) dans la solution pendant la complexation avec l'ADN [25,26]. Il a été observé que la concentration en tensioactif libre est plus faible en présence d'ADN (Figure II-12A), ce qui montre bien qu'une partie des ions tensioactifs sont liés à l'ADN.

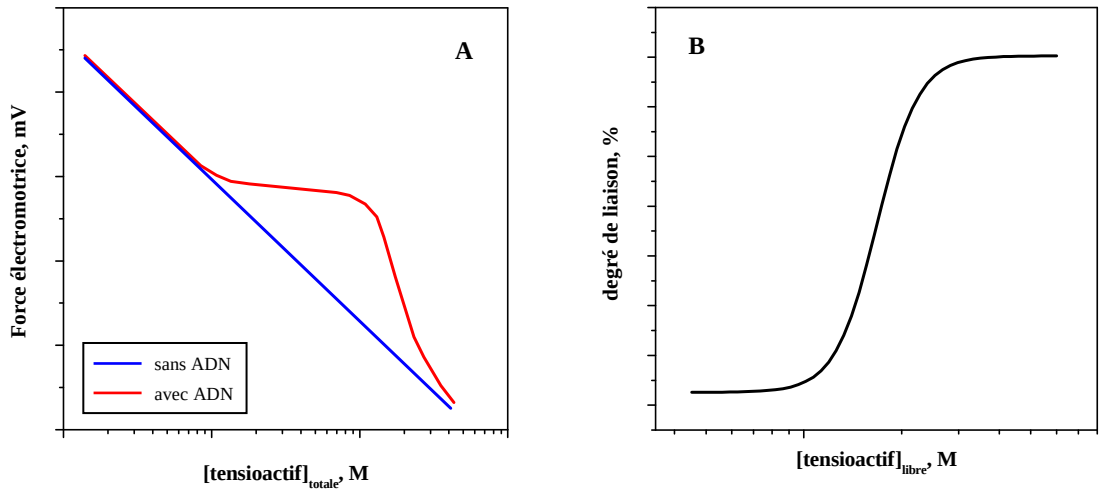


Figure II-12 : Complexation ADN-tensioactifs par potentiométrie ; A - courbe potentiométrique, B - isotherme de liaison

A partir des résultats obtenus par potentiométrie, l'isotherme de liaison du tensioactif à l'ADN peut être obtenue (Figure II-12B). Le degré de liaison (β) est calculé à partir des équations suivantes :

$$\beta = \frac{\Delta C}{C_a}$$

Equation II-6

Où :

$\Delta C = C_t - C_l$ - quantité de tensioactif lié à l'ADN

C_t - concentration totale de tensioactif dans la solution

C_l - concentration de tensioactif libre

C_a - concentration en phosphates de l'ADN

Les mesures conduisent à une variation sigmoïdale du degré de couplage du tensioactif à l'ADN, mettant en évidence la nature coopérative de la complexation ADN-tensioactifs.

Par ailleurs, l'allure de la courbe potentiométrique ressemble beaucoup à l'allure de la courbe de tensiométrie en présence d'ADN. En effet, les deux phénomènes sont les conséquences des mêmes effets. Pendant la compléxation, l'ADN diminue la concentration en tensioactifs libres, et il existe un équilibre de molécules tensioactives entre la solution et la surface. En fait, ces deux méthodes détectent la diminution de concentration en tensioactifs libres (non-complexés), soit dans la solution (potentiométrie), soit à la surface (tensiométrie).

II.4.1.7. *Microscopie de fluorescence*

La microscopie de fluorescence est une méthode qui permet l'observation directe de la conformation de l'ADN, à condition que ce dernier soit d'abord complexé avec une sonde fluorescente. En excitant le colorant on observe sa fluorescence au microscope optique. Melnikov et al. [25,27] ont étudié l'effet du CTAB sur la conformation de l'ADN par cette méthode. En utilisant le 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) comme sonde fluorescente ils ont observé que l'augmentation de la concentration en tensioactif induit un changement de conformation de l'ADN (164 kpb), qui passe d'une conformation dépliée à une conformation compactée (Figure II-13).

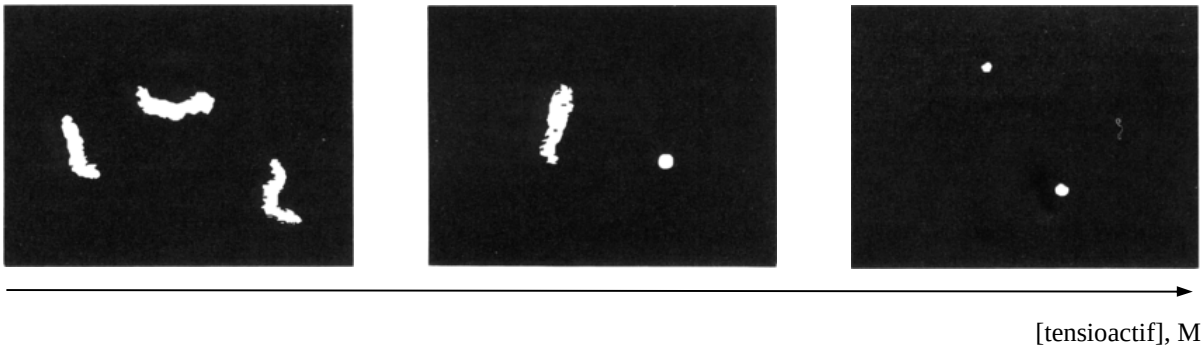


Figure II-13 : Images de microscopie de fluorescence montrant la transition conformation dépliée - conformation compactée lors la complexation entre l'ADN et des tensioactifs

Les auteurs ont montré que ce changement de conformation est un processus discret. Il a été observé uniquement ces deux conformations d'ADN. De plus, pour des concentrations intermédiaires en tensioactif, on observe une zone de coexistence de molécules d'ADN dépliés et compactés (Figure II-14).

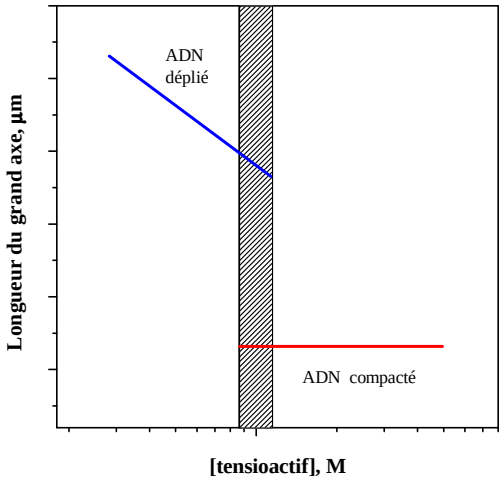


Figure II-14 : Influence de la concentration en tensioactifs sur les conformations de l'ADN

Ces résultats prouvent qu'il s'agit bien d'un processus coopératif dû aux interactions hydrophobes entre les chaines de tensioactifs et que lorsque l'on augmente la concentration en tensioactif, les nouvelles molécules préfèrent s'agréger aux molécules d'ADN qui sont déjà liées à d'autres molécules tensioactives. De plus il a été montré par cette méthode que la compaction de l'ADN est réversible [25]. En effet, en diluant 50 fois l'ADN compacté, une décompaction a été observée et la taille initiale de l'ADN enroulé a été retrouvée.

Par ailleurs, il a été montré que l'addition d'électrolytes induit la décomplexation des complexes ADN-tensioactif [23]. Cette transition est également discrète, et seules les deux populations d'ADN décrites précédemment ont été observées, sans aucune conformation intermédiaire.

II.4.1.8. *Calorimétrie isotherme*

La calorimétrie isotherme est une technique d'étude des effets thermiques lors de processus chimiques et physico-chimiques. Chaque système calorimétrique peut être généralement décrit par l'équation d'équilibre thermique suivante:

$$\frac{dQ_\tau}{d\tau} = C\frac{d(\Delta T)}{d\tau} + f(\Delta T)$$

Equation II-7

Où

$\frac{dQ_\tau}{d\tau}$ - la vitesse de génération ou d'absorption de chaleur à l'instant τ

$\Delta T = T - T_0$ - la différence de température entre le calorimètre et le milieu extérieur

C - la capacité thermique du calorimètre

$f(\Delta T)$ - le terme qui prend en considération l'échange calorifique avec le milieu extérieur

Dans le cas de calorimétrie isotherme, la température du calorimètre doit rester constante. Dans ce cas, l'équation d'équilibre thermique est décrite seulement par le deuxième terme :

$$Q_\tau = \int_0^\tau f(\Delta T)d\tau$$

Equation II-8

La calorimétrie isotherme a été utilisée pour étudier la thermodynamique de complexation entre l'ADN et des tensioactifs [28]. Lors de la titration de solutions d'ADN par des tensioactifs une variation d'enthalpie (ΔH) positive a été mesurée (Figure II-15), traduisant le fait que la complexation ADN-tensioactifs est un processus endothermique.

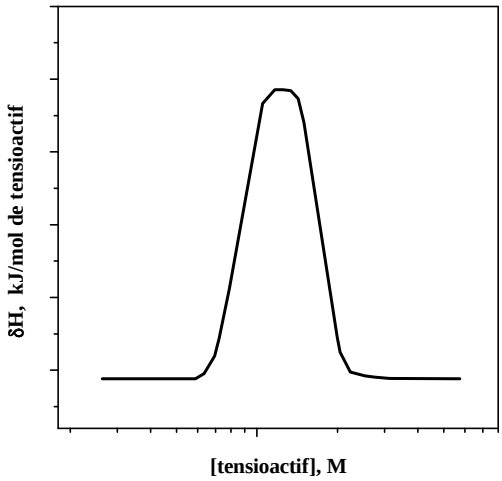


Figure II-15 : Signal calorimétrique de complexation entre l'ADN et des tensioactifs

Selon les lois de thermodynamique, la principale condition pour qu'un processus puisse avoir lieu, est que la variation d'énergie de Gibbs (l'énergie libre) soit négative ($\Delta G < 0$). Cette énergie dépend de deux facteurs : enthalpique (ΔH) et entropique ($T\Delta S$). L'enthalpie est une caractéristique énergétique, tandis que l'entropie est une caractéristique du désordre induit lors d'un processus.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Equation II-9

Selon cette équation, si la variation d'enthalpie d'un processus est positive, son entropie doit aussi augmenter. En se basant sur le modèle de Zimm-Bragg [29], il a été calculé [28] la variation d'entropie lors de la complexation entre l'ADN et les tensioactifs. Il a été ainsi montré que le moteur de cette complexation est entropique ($|T\Delta S| > |\Delta H|$). Cela signifie que l'augmentation d'enthalpie pendant la complexation est compensée par l'augmentation du désordre du système. Cette augmentation d'entropie est due à l'agrégation des chaînes hydrophobes ainsi qu'à la libération des contre-ions de l'ADN (Na^+). Comme l'enthalpie de complexation est positive, il a été proposé que la couche de tensioactif autour de l'ADN présente un état fluide. Cette constatation montre une fois de plus que la complexation entre

des tensioactifs et l'ADN est contrôlée par l'agrégation des tensioactifs, comme il est également reconnu que la micellisation est dirigée par le terme entropique.

Spink et Chaires [10] ont tout d'abord observé un effet exothermique lors de l'addition de très faibles concentrations en tensioactifs, suivi par un effet endothermique normal. Les auteurs ont attribué cet effet à la liaison de tensioactifs aux sites isolés de l'ADN, c'est à dire aux sites ne présentant pas de sites déjà occupés à proximité. En utilisant une concentration importante en ADN il a été déterminé que l'effet exothermique était observé jusqu'à un rapport de charge tensioactif-ADN égale à 0,12. A partir de ces résultats et en utilisant le modèle de Zimm-Bragg, les caractéristiques thermodynamiques de liaison du tensioactif (le CTAB dans ce cas) aux sites isolés et aux sites contigus ont été obtenues (Tableau II-1).

Processus	ΔG , kJ/mol	ΔH , kJ/mol	$T\Delta S$, kJ/mol
Liaison aux sites isolés	-18,2	-20	-1,8
Liaison aux sites contigus	-28,2	+3,3	+31,5
Micellisation du CTAB	-32,2	+1,8	+34,6

Tableau II-1: Propriétés thermodynamiques de liaison du CTAB à l'ADN et de sa micellisation à T = 25ºC

Ces résultats montrent qu'aux faibles rapports de charges, une interaction purement électrostatique a lieu entre l'ADN et les tensioactifs, caractéristique d'un important effet exothermique et d'une diminution d'entropie.

Un second signal a également été observé juste après le signal calorimétrique principal lors de la complexation [10,13]. Ce signal a été attribué soit à l'agrégation des complexes formés [13], soit à la micellisation des tensioactifs libres dans la solution [10].

II.4.1.9. *Electrophorèse sur gel d'agarose*

L'électrophorèse consiste en la migration de molécules chargées sous un champ électromagnétique, avec les molécules les plus chargées présentant la mobilité électrophorètique la plus importante. Un gel d'agarose étant poreux, les molécules plus petites migrent plus facilement dans ses pores. L'électrophorèse sur gel d'agarose constitue donc une technique qui permet une séparation des molécules en se basant à la fois sur leurs tailles et leurs charges.

La complexation de l'ADN avec des tensioactifs conduit à la neutralisation de ses charges ainsi qu'à sa compaction, de ce fait l'électrophorèse sur gel d'agarose constitue une technique de choix pour étudier cette complexation [15,18,30]. On observe que l'addition de tensioactifs diminue légèrement la mobilité électrophorétique (Figure II-16) et élargit les taches de l'ADN.

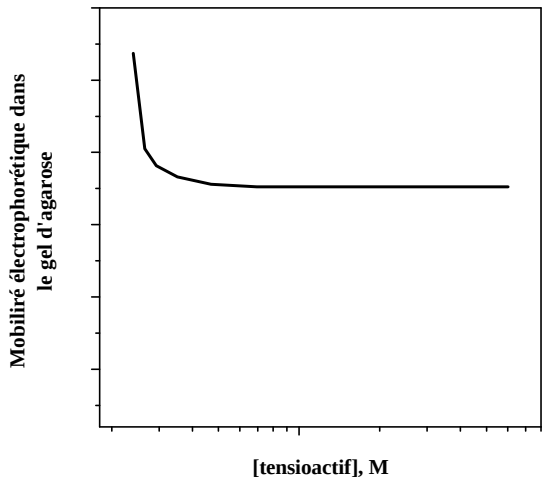


Figure II-16 : Influence de la concentration en tensioactifs sur la mobilité électrophorétique de l'ADN sur le gel d'agarose

Cette diminution de la mobilité électrophorétique de l'ADN peut être expliquée par la réduction de sa charge effective. Toutefois il a été montré que même en présence d'un large excès de tensioactifs (R = [TA]/[ADN] = 200), les complexes migrent toujours vers l'anode. [30]. Ce phénomène a été expliqué par les auteurs par une décomplexation partielle des complexes formés lors de leur entrée dans le gel. Toutefois, la possibilité de décomplexation des complexes ADN-tensioactif sous champ électromagnétique a été réfutée par ces mêmes auteurs, car leur mobilité électrophorétique restait inchangée pendant l'électrophorèse [30]. Il a également été montré que ces complexes ne se décomplexent pas lors de la dilution consécutive à leur dépôt dans les puits du gel [30].

Par contre, dans le cas d'une complexation de l'ADN avec des tensioactifs bicationiques, la compaction est si importante que le complexe formé migre même mieux dans le gel d'agarose que l'ADN natif [31].

Enfin, il faut aussi mentionner que les complexes entre l'ADN et les lipides cationiques ainsi que les polymères cationiques, ne migrent pas dans le gel d'agarose [32,33].

Ce comportement prouve que les complexes ADN- tensioactifs sont plus faibles que les complexes ADN-lipides cationiques.

D'autres méthodes sont également utilisés pour les études de la complexation ADN-tensioactifs, mais moins courantes : titration par absorption [18], spectroscopie diélectrique [21], dichroïsme circulaire [34], électrophorèse capillaire [35].

II.4.2. Comportement de phases d'un système ADN-tensioactif

Il a été observé que lors de la complexation entre l'ADN et des tensioactifs, une séparation de phases et une précipitation des complexes pouvaient avoir lieu [36]. Ce phénomène est d'ailleurs utilisé pour isoler et purifier l'ADN [37].

Dans le cas d'interactions polymères/tensioactifs, deux types de diagrammes de phase peuvent se rencontrer, et sont présentés sur la Figure II-17. Si pour le système l'interaction attractive est prépondérante, deux phases se forment : l'une est concentrée, l'autre diluée en deux composants en équilibre. Un tel comportement consiste en une séparation de phases associative. Par contre s'il n'y a pas d'interactions attractives entre le polymère et le tensioactif, une séparation de phases ségrégative est observée. Dans ce cas une phase est concentrée en tensioactifs, et l'autre en polymères.

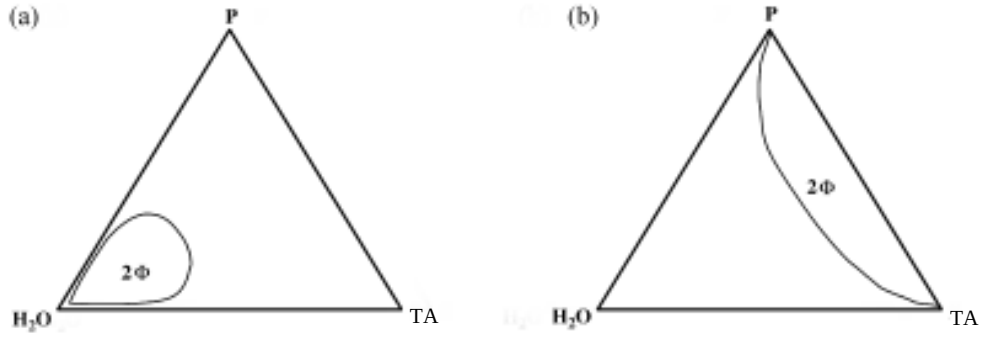


Figure II-17 : Deux types de séparation de phases dans les systèmes polymère-tensioactifs :
a) associative, b) ségrégative (TA-tensioactif, P-polymère, 2Φ - état à deux phases) [3]

En raison des interactions électrostatiques dans le système polyélectrolyte-tensioactifs de charges opposées, il apparaît une forte association entre les constituants. Récemment le comportement de phase de complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques a été étudié d'une manière fondamentale par turbidimétrie [38]. Les résultats obtenus confirment la

nature associative de la précipitation des complexes ADN-tensioactifs. En raison de l'importante densité de charge de l'ADN, la séparation de phases a lieu à des très faibles concentrations en constituants. De plus, il a été observé que le précipité ne se redissout pas lors de l'addition d'un excès de tensioactif.

En utilisant une concentration en ADN très importante (3 % massique), les auteurs ont mesuré la masse de précipité et déterminé la composition de la phase aqueuse. Les résultats de ces études sont présentées sur la Figure II-18.

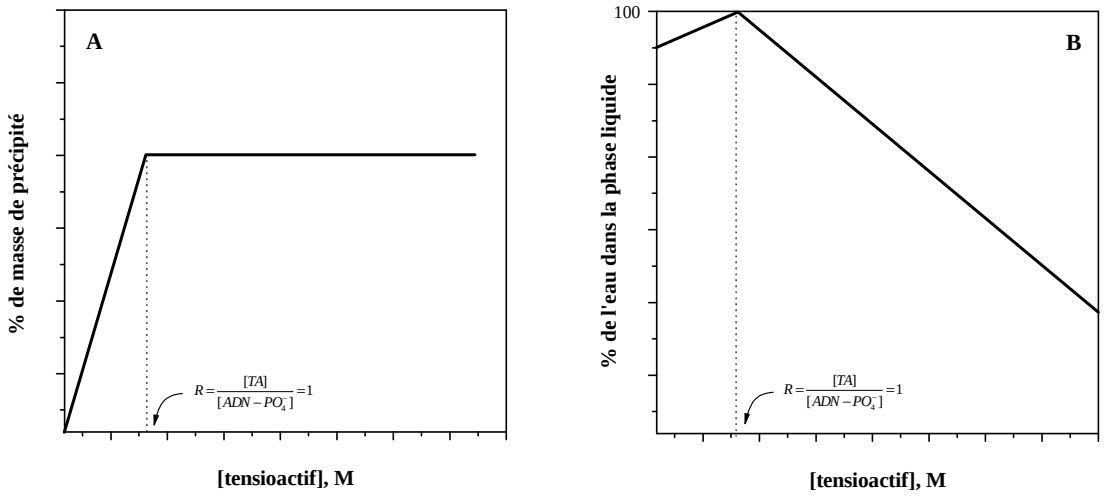


Figure II-18 : Evolution de la proportion de précipité (A) ou d'eau (surnageant) (B) en fonction de la concentration en tensioactif lors de la complexation de l'ADN

Ces résultats montrent que pour une concentration donnée en ADN, le précipité commence à se former à partir de très faibles rapports de charges. Dans la Figure II-18A on constate que lors de l'addition de tensioactifs, la masse de précipité augmente jusqu'à un rapport de charge R=1, pour ensuite rester constante. La courbe, représentée dans la Figure II-18B**,** confirme ces résultats. En effet, on voit, que pour un rapport de charge R=1 tout le tensioactif et l'ADN précipitent et la phase liquide ne contient plus que de l'eau. La baisse du pourcentage d'eau après neutralisation de l'ADN correspond exactement à l'augmentation de la proportion de tensioactif dans la phase aqueuse.

L'effet de la présence de NaCl sur la précipitation de l'ADN a également été étudié [14]. Une différence en terme de précipitation de l'ADN a été trouvée dans les solutions avec ou sans NaCl. A titre d'exemple, le diagramme de phase du système ADN-DTAB avec et sans sel est présenté sur la Figure II-19.

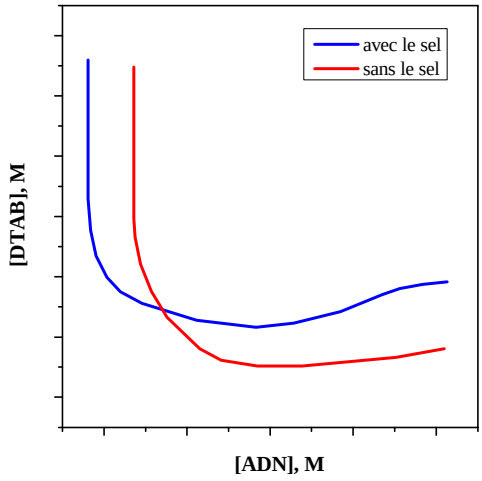


Figure II-19 : Exemple de diagramme de phase d'un système ADN-tensioactif avec et sans NaCl

Cette différence a été attribuée au changement de conformation de l'ADN. Il est connu qu'en absence de tampon stabilisant la double hélice d'ADN, l'addition de sel joue un rôle important sur la conformation de l'acide nucléique. Il a été montré qu'à partir d'une certaine concentration en sel, celui-ci est capable de stabiliser la conformation de l'ADN double brin [14]. A partir d'une certaine concentration en ADN, la force ionique créée par les contre-ions est suffisante pour stabiliser la conformation en double hélice.

II.4.3. <u>Influence de différents facteurs sur la complexation entre l'ADN et les tensioactifs</u>

II.4.3.1. *Force ionique*

Il a été montré par microscopie de fluorescence que les complexes ADN-tensioactifs se décomplexent lorsqu'on ajoute un électrolyte dans la solution [23]. Cet ajout induit le dépliement de l'ADN, et l'acide nucléique retrouve sa taille d'origine (Figure II-20).

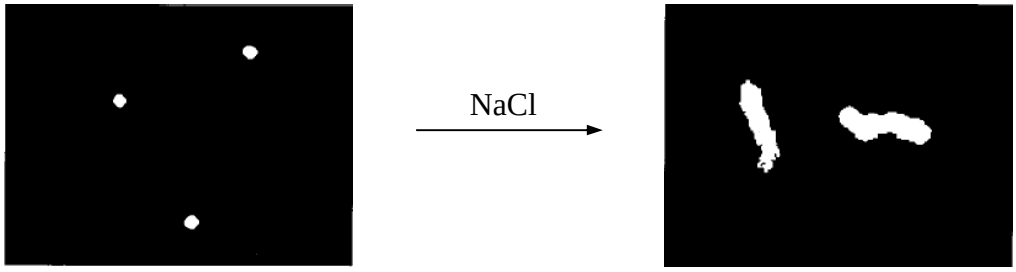


Figure II-20 : Images de microscopie de fluorescence de décomplexation de complexe ADN-tensioactif lors de l'addition de sel [23]

Le même phénomène a été observé lors d'études de la taille des complexes ADN-tensioactif par diffusion dynamique de la lumière [8].

L'influence de la force ionique a été récemment étudiée de manière plus fondamentale par Zhu et Evans [13]. Ces auteurs on étudié la complexation ADN-tensioactifs en mesurant l'intensité de lumière diffusée, et ont montré qu'avec une force ionique plus importante, un nombre plus important de molécules de tensioactifs est nécessaire pour complexer l'ADN. Ainsi, la CAC des tensioactifs sur l'ADN augmente lorsque l'on accroît la force ionique de la solution. Ceci tient au fait qu'en raison du blindage électrostatique de la tête polaire d'un tensioactif, sa concentration micellaire critique diminue avec l'augmentation de la force ionique. On peut ainsi construire un diagramme représentant l'influence de la force ionique sur l'agrégation-micellisation du tensioactif (Figure II-21).

On constate que pour une certaine force ionique, la CAC sur ADN d'un tensioactif est égale à sa CMC; il s'agit de la valeur de force ionique critique (I_c). Par exemple, dans le cas du chlorure de benzyldiméthyldodécylammonium (Bak12), la force ionique critique a été déterminée comme égale à 400mM [13]. Quand la force ionique de la solution est plus faible que la force ionique critique ($I < I_c$), les tensioactifs forment des agrégats sur l'ADN à une concentration beaucoup plus faible que la CMC. Tandis que quand $I > I_c$ les tensioactifs forment seulement des micelles. Par ailleurs, des études d'intensité de la lumière diffusée ont montré qu'aux forces ioniques importantes, les tensioactifs ne forment pas de complexes avec l'ADN [13].

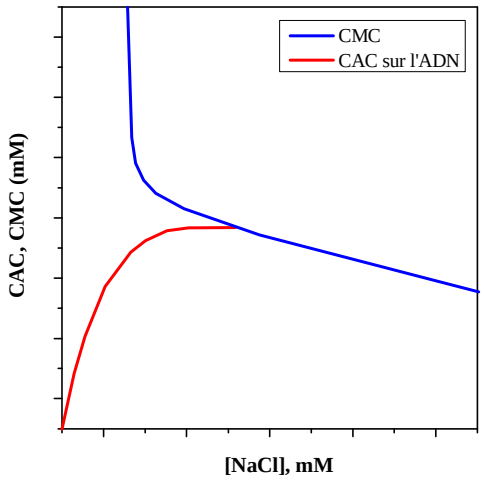


Figure II-21 : Diagramme répresentant l'influence de la concentration en sel sur l'agrégation-micellisation du tensioactif

De même, l'étude de la complexation ADN-tensioactifs par calorimétrie isotherme a montrée que l'augmentation de la concentration en électrolyte (NaCl) conduit à un élargissement et à un déplacement du signal calorimétrique vers des concentrations en tensioactif plus importantes. Par ailleurs, il a été démontré que l'enthalpie de complexation ne change pratiquement pas avec l'augmentation de la force ionique [28], et la diminution de la constante de complexation résulte d'une diminution d'entropie (Tableau II-2).

[NaCl], mM	K*	ΔG , kJ/mol	ΔH , kJ/mol	$T\Delta S$, kJ/mol
10	10100	- 22,9	5,4	28,3
20	5040	- 21,1	4,7	25,8
30	3360	- 20, 1	4,2	24,3
60	1700	- 18,5	4,0	22,4
100	1100	- 17,3	5,4	22,7
200	630	- 16,0	4,0	20,0

* K - *constante d'équilibre de liaison ADN- tensioactif*

Tableau II-2 : Données thermodynamiques de complexation ADN-chlorhydrate de dodécylammonium à différentes concentrations en NaCl à T = 25ºC [28]

Des études par électrophorèse capillaire [35] ont aussi montré qu'aux forces ioniques plus importantes, l'électrolyte écrante la charge de l'ADN. Ceci conduit à la diminution de la mobilité électrophorétique de l'ADN non complexé, ainsi qu'à l'annihilation de l'effet des tensioactifs sur les propriétés électrophorétiques de l'acide nucléique.

L'effet de la force ionique sur la complexation ADN-tensioactifs a été également corroboré par le dichroïsme circulaire induit [34] et la titration par fluorescence de complexe ADN-BET [19].

II.4.3.2. *Longueur des chaînes hydrophobes*

La longueur de la chaîne d'un tensioactif influe fortement sur son processus de complexation avec l'ADN car comme nous l'avons déjà vu, les interactions hydrophobes présentes jouent un rôle très important. En effet, plus la chaîne hydrocarbonée d'un tensioactif est longue, plus il complexera facilement l'ADN. De plus, en considérant cette complexation comme une micellisation des tensioactifs sur l'ADN, l'évaluation de l'efficacité des tensioactifs à complexer l'ADN peut être corrélée à la valeur de leur CMC.

L'effet de la longueur des chaînes hydrophobes sur la complexation avec l'ADN a été étudié pour la première fois en 1979 [39]. Selon l'interprétation des auteurs, pour une concentration donnée d'ADN, plus la chaîne d'un tensioactif est longue, plus il y a d'agrégation sur ADN. Des expériences plus précises, en utilisant des électrodes sélectives aux tensioactifs ont montré que de plus faibles concentrations en tensioactifs de chaîne C14 qu'en chaînes C12 sont nécessaires pour commencer à se lier à l'ADN [40].

L'influence de la longueur de chaîne des tensioactifs a été aussi déterminée par des études sur la séparation de phases lors de la complexation avec l'ADN. Il a été ainsi montré qu'un tensioactif à longue chaine est capable de précipiter l'ADN à de plus faibles concentrations qu'un tensioactif à courte chaîne [38].

Des observations par microscopie de fluorescence ont été utilisées pour visualiser l'effet des chaines hydrophobes sur la complexation de l'ADN [38,41]. Ces résultats sont présentés sur la Figure II-22. On y constate que d'avantage de tensioactifs à chaînes courtes ont été nécessaires pour provoquer la compaction de l'ADN.

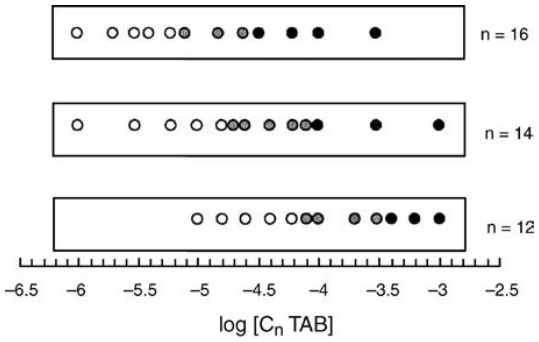


Figure II-22 : Comportement conformationnel de gros ADN en présence de C_{16}TAB, C_{14}TAB et C_{12}TAB. Les ronds blancs correspondent à la conformation dépliée ; les ronds noirs à la conformation compactée, et les ronds gris à la coexistence des deux conformations [41]

Dans le Tableau II-3 sont présentées les caractéristiques de complexation entre l'ADN et les bromures d'alkyltriméthylammonium : les concentrations en tensioactif correspondant au début et à la fin de la région de coexistence (C_0 et respectivement C_1), et sa largeur ΔC. On voit que la région de coexistence de molécules d'ADN dépliées et compactées est plus étroite dans le cas d'un tensioactif à chaîne plus longue. Par contre le rapport C_1/C_0 est très proche

pour tous les tensioactifs étudiés. Ce résultat indique que la différence entre les systèmes étudiés est due aux différences d'hydrophobie des molécules amphiphiles.

longueur de chaine	C_0 (μM)	C_1 (μM)	ΔC (μM)	C_1/C_0
12	8,0	24,0	16,0	3,0
14	20,0	80,0	60,0	4,0
16	80,0	300,0	220,0	3,8

Tableau II-3 : Caractéristiques de complexation entre l'ADN et des bromures d'alkyltriméthylammonium à T = 25ºC [38]

L'influence de la longueur des chaînes hydrophobes des tensioactifs sur la décomplexation des complexes avec l'ADN a été notamment étudiée par titration par fluorescence [19]. La décomplexation a été induite par l'addition de NaCl dans les solutions de complexes, et les auteurs ont observé que d'avantage de sel est nécessaire pour décomplexer l'ADN à mesure que la chaîne du tensioactif s'allonge. Ce comportement confirme l'importance de la longueur de la chaîne hydrophobe du tensioactif et son influence sur la stabilité des complexes.

L'effet thermodynamique de la longueur des chaînes hydrophobes sur la complexation entre l'ADN et des hydrochlorures de différents alkylammoniums a été étudié par la calorimétrie isotherme [28]. Dans le Tableau II-4 sont présentés les paramètres thermodynamiques de cette complexation. Ainsi, on constate que lorsque l'on augmente la longueur de la chaîne, l'énergie libre de ce processus diminue et la constante d'équilibre (K) augmente. En effet, la diminution de l'énergie libre par ajout d'un groupe méthylène dans la chaîne hydrophobe est constante et égale à -3,58 kJ/mol. Il a été montré que l'enthalpie de complexation ne varie pas avec l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrophobe et que c'est l'augmentation d'entropie du système qui est responsable de la diminution de l'énergie libre. L'effet de longueur de chaîne est clairement visible lorsque l'on compare les paramètres de coopérativités (u). On voit que le paramètre de coopérativité de complexation entre l'ADN et des cations d'alkylammonium est multiplié par un facteur 4,2 lorsque l'on rajoute un groupe méthylène dans la chaîne du tensioactif.

longueur de la chaine	*u*	K	ΔG , kJ/mol	ΔH , kJ/mol	$T\Delta S$, kJ/mol
9	47,2	132	- 12,1	6,0	18,1
10	200	560	- 15,7	6,44	22,1
11	848	2370	- 19,3	6,42	25,7
12	3600	10100	- 22,9	5,4	28,3
13	15260	42700	- 26,4	5,65	32,1

Tableau II-4 : Paramètres thermodynamiques de complexation ADN-chlorhydrate d'alkylammonium en fonction des longueurs de chaînes à T = 25ºC [28]

Le fait que les tensioactifs à chaîne plus longue complexent plus facilement l'ADN a été également prouvé par la titration par fluorescence de complexes ADN-BET [15,19], par dichroïsme circulaire [15], par électrophorèse sur gel d'agarose [15] et par la mesure de la température de fusion de l'ADN [15].

II.4.3.3.*Tête polaire des tensioactifs*

La charge de la tête polaire du tensioactif joue un rôle primordial dans la complexation avec l'ADN. L'ADN étant un polyélectrolyte anionique, il ne peut être complexé électrostatiquement avec des tensioactifs anioniques ou neutres, en revanche des tensioactifs cationiques montrent un comportement fortement attractif envers l'ADN. Il a été de plus montré que l'augmentation de la charge positive de la tête polaire d'un tensioactif facilite d'autant sa complexation avec l'acide nucléique [42,43].

Dans la littérature il existe peu d'études sur l'effet de la structure de la tête polaire des tensioactifs cationiques sur la complexation avec l'ADN [20]. Il a été montré que l'addition d'un motif aromatique entre la tête du tensioactif et la chaîne diminue la CMC ainsi que la CAC sur ADN. Toutefois cet effet pourrait aussi être dû à l'augmentation des propriétés hydrophobes de la chaîne du tensioactif.

Récemment, l'effet des propriétés hydrophiles de la tête polaire a été étudié grâce à l'addition de groupes hydroxyle au niveau des groupements N-méthyle de bromure de cetyltriméthylammonium [16] (Figure II-23).

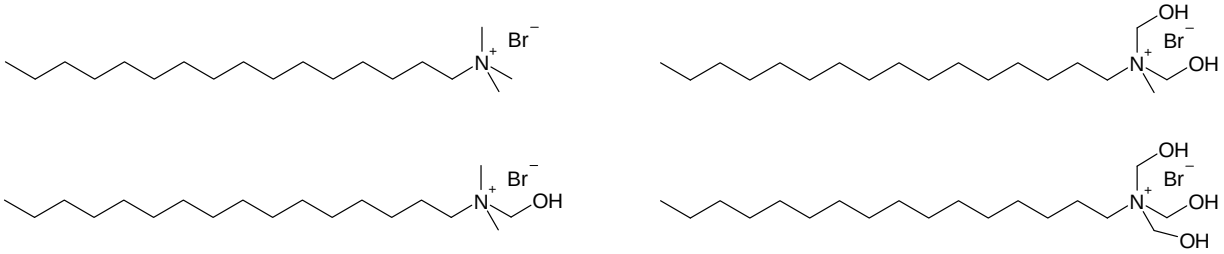


Figure II-23 : Le CTAB et ces dérivés hydroxy

Par la microscopie de fluorescence et l'étude de la température de fusion de l'ADN, les auteurs ont montré que la transition entre la conformation dépliée de l'ADN et la conformation compactée ne dépendait pratiquement pas du nombre de groupes OH au niveau de la tête polaire.

Par contre ils ont montré que l'accessibilité de l'ADN au bromure d'éthidium était plus importante dans le cas de complexes formés avec les tensioactifs à tête polaire plus hydrophile. Cet effet a été expliqué par un empilement des tensioactifs. En effet, la substitution de groupes méthyle par des groupes hydroxyméthylène dans le CTAB provoque l'augmentation de la taille de la tête polaire selon des considérations géométriques (le groupe OH a une taille plus importante que l'hydrogène), ainsi que par solvatation (les groupes plus hydrophiles sont mieux solvatés). Selon le modèle d'Israelachvili, l'augmentation de la taille de la tête polaire d'un tensioactif conduit à l'augmentation du rayon de courbure des agrégats. Par exemple, les micelles de ces tensioactifs seront plus petites. Le recouvrement de l'ADN par ce type de micelles est moins efficace et on trouve plus de sections d'ADN non couvertes et donc plus accessibles au bromure d'éthidium.

Des résultats similaires ont été récemment obtenus par Jadhav et al. [44]. Les auteurs ont étudié la complexation entre l'acide nucléique et des tensioactifs contenants des fragments d'acides aminés (Figure II-24).

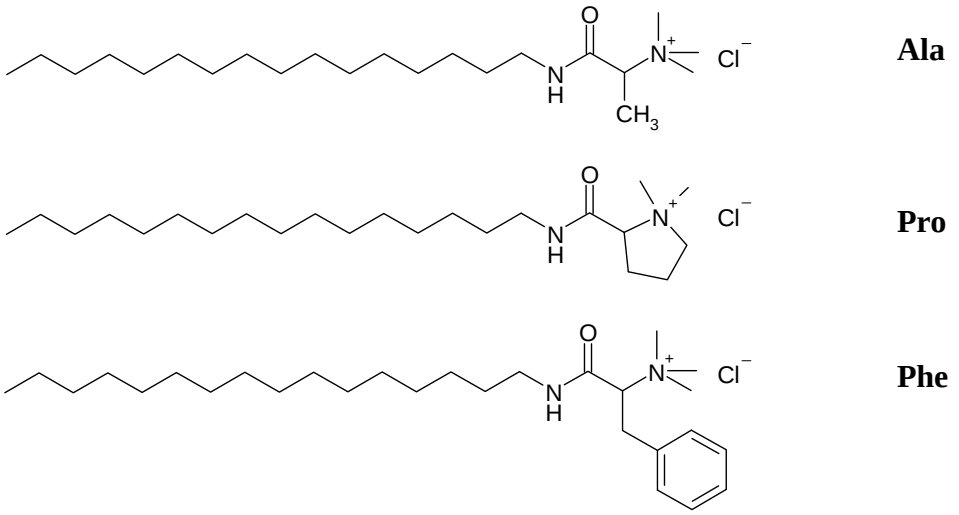


Figure II-24 : Exemple de tensioactifs contenants les fragments d'acides aminés

Dans la séquence Ala-Pro-Phe la taille de la tête polaire augmente, et il a été montré que dans la même séquence, la capacité des tensioactifs à déplacer la BET de l'ADN diminue.

II.4.3.4. *Concentration en ADN*

Les donnés de la littérature à propos de l'effet de la concentration en ADN sur sa complexation avec des tensioactifs sont contradictoires. Il existe de nombreuses publications mettant en évidence l'existence d'une concentration critique de tensioactifs sur ADN (CAC^{ADN}). C'est à dire, que le processus d'agrégation des tensioactifs ne dépend pas de la concentration en ADN. Par contre d'autres résultats montrent que cette complexation est contrôlée par la neutralisation des charges de l'acide nucléique. Dans ce cas, la complexation entre l'ADN et les tensioactifs a lieu au rapport de charge [TA]/[ADN-phosphate] = 1 et donc dépend de la concentration en acide nucléique.

Le bromure et le chlorure de cétyltriméthylammonium sont les tensioactifs qui ont été les plus utilisés pour les études de complexation avec l'ADN. De plus, l'échange du contre-ion chlorure à bromure n'influe pas la complexation. C'est pour cela que nous avons essayé de compiler les données de la littérature sur la complexation entre le cation CTA^+ et l'ADN. Les résultats sont présentés dans le tableau en Annexe I. Dans ce tableau les valeurs de concentrations en tensioactif qui correspondent à la formation des complexes sont présentées, ainsi que les concentrations en ADN correspondantes.

A partir des toutes ces valeurs de concentrations d'ADN et de cation CTA^+ un diagramme de complexation ADN-CTA^+ a pu être construit (Figure II-25). On observe qu'aux faibles concentrations en ADN, son interaction avec le CTA^+ ne dépend pas de la concentration en acide nucléique. Dans ce cas le tensioactif ne forme des complexes avec l'ADN qu'à partir d'une concentration bien précise : la concentration critique d'agrégation sur ADN (CAC^{ADN}).

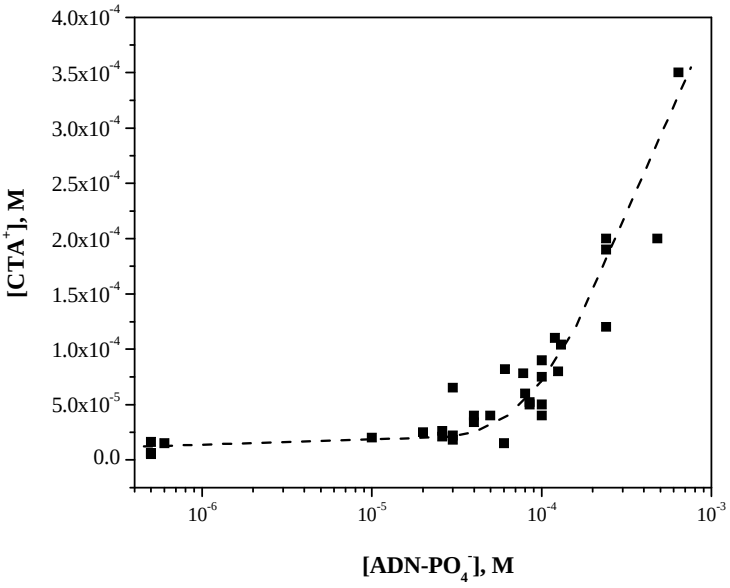


Figure II-25 : Diagramme de complexation ADN - cation CTA^+ obtenu après compilation des données de la littérature (Annexe I)

Sur la Figure II-26 la dépendance du rapport de charge R = $[CTA^+]/[ADN\text{-}PO_4^-]$ nécessaire pour la complexation en fonction de la concentration en ADN est présentée. On observe qu'aux faibles concentrations en ADN la complexation a lieu en présence de tensioactifs en grand excès. Cette région correspond à la formation d'agrégats de tensioactifs sur l'ADN, appelés prémicelles. Aux concentrations importantes en ADN, sa complexation avec le CTA^+ a lieu pour un rapport de charge proche de l'unité.

Ce modèle a été confirmé par des études en calorimétrie isotherme [28]. Les auteurs ont ainsi calculé les paramètres thermodynamiques de complexation ADN-dodécylammonium à différentes concentrations en ADN, et ces données ont montré l'augmentation de la variation de l'énergie libre ainsi que de la constante d'équilibre lors de l'augmentation de la concentration en ADN. Il a été également trouvé que seuls les termes électrostatiques de

l'énergie de Gibbs et d'entropie variaient avec la concentration en acide nucléique, tandis que les termes hydrophobes restaient constants.

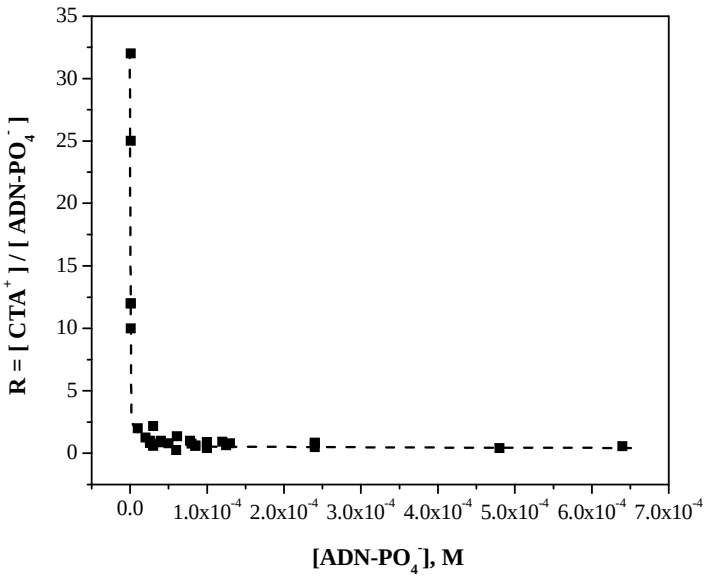


Figure II-26 : Influence de la concentration en ADN sur le rapport de charge $R = [CTA^+]/[ADN\text{-}PO_4^-]$ lors de la complexation de l'ADN après compilation des données de la littérature (Annexe I)

II.4.3.5. *Température*

L'effet de la température sur les caractéristiques thermodynamiques de la complexation entre l'ADN et le chlorhydrate de dodécylammonium a été étudié par la calorimétrie isotherme [28]. Il a été montré que lors de l'augmentation de la température, l'enthalpie de la complexation diminue et le processus devient exothermique à 43ºC. Dans le Tableau II-5 sont présentés les paramètres thermodynamiques de cette complexation à différentes températures.

Température, ºC	*u*	K	ΔG , kJ/mol	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/mol
25	3600	10100	- 22,9	5,4	95
37	3000	8400	- 22,4	2,1	79
50	2700	7600	- 22,1	-2,5	61
58	~2500	~6900	~ - 21,9	-4,3	~53

Tableau II-5 : Paramètres thermodynamiques de complexation entre l'ADN et le chlorhydrate de dodécylammonium à différentes températures [28]

On constate que lors de l'augmentation de la température, le paramètre de coopérativité et la constante d'équilibre de ce processus diminuent. Par contre l'énergie de Gibbs ne change quasiment pas lors de l'augmentation de la température de 25 à 58ºC. En effet, l'importante diminution d'enthalpie de cette complexation est compensée par la diminution du terme entropique.

II.4.4. Structures et morphologies des complexes ADN-tensioactifs

La structure de complexes formés lors de la complexation entre l'ADN et les tensioactifs dépend des propriétés du tensioactif utilisé [3]. Généralement, si le polyélectrolyte est suffisamment flexible, la morphologie de ses complexes avec des tensioactifs de charge opposée correspond aux structures que les tensioactifs adoptent en absence de polyélectrolyte. L'ADN est un polyélectrolyte rigide, et il est donc capable de modifier la structure des agrégats de tensioactifs cationiques.

Par exemple, il a été montré que des complexes entre l'ADN et des tensioactifs monocaténaires possédant une chaîne hydrophobe assez longue peuvent présenter une structure hexagonale [23,45-47]. Dans la littérature ces complexes sont souvent considérés comme des systèmes inverses c'est à dire que les têtes des tensioactifs sont liées à l'ADN, tandis que leurs chaînes hydrocarbonées sont orientées vers le solvant. Toutefois, des calculs de dynamique moléculaire ont montré que dans ce cas l'exposition des chaînes hydrophobes à l'eau n'est pas favorable [48].

Comme il a déjà été présenté, d'après le modèle d'Israelachvili, la morphologie préférentielle d'agrégats qu'un tensioactif peut former dépend du paramètre d'empilement moléculaire. Ainsi, il a été montré qu'un complexe équimolaire ADN-CTAB présente une structure hexagonale normale (H_I) avec des micelles directes de tensioactif légèrement déformées pour que les têtes du tensioactif puissent mieux interagir avec les phosphates de l'ADN [47,49] (Figure II-27A). Les mêmes structures ont été récemment trouvées pour des complexes d'ADN avec des lipides cationiques possédant de très larges têtes polaires [50].

Selon le modèle d'Israelachvili, quand le volume de la partie hydrophobe du tensioactif est élevé (par exemple des amphiphiles bicaténaires), il formera préférentiellement une bicouche. Dans ce cas, les complexes avec l'ADN adoptent une structure lamellaire (L) (Figure II-27B). Dans ce type de complexes, l'ADN forme une phase bidimensionnelle entre les bicouches de tensioactif. Ce type de morphologie a été observé avec des lipides

cationiques[51], des tensioactifs catanioniques [43,52] et des mélanges de tensioactifs cationiques monocaténaires avec le décanol [53].

Quand la taille de la partie hydrophobe du tensioactif est encore plus importante, cela conduit à la formation d'une structure hexagonale inverse (H_{II}) (Figure II-27C). Une telle structure a été notamment observée dans le cas de lipides bicaténaires, avec de petites têtes polaires [54,55]. Cette structure inverse a également été obtenue par l'addition d'hexanol au complexe ADN-CTAB. Dans ce cas, lors de l'addition d'hexanol, on observe consécutivement trois structures différentes : les agrégats passent de la structure hexagonale directe à la structure hexagonale inverse en passant par la structure lamellaire (H_I - L - H_{II}).

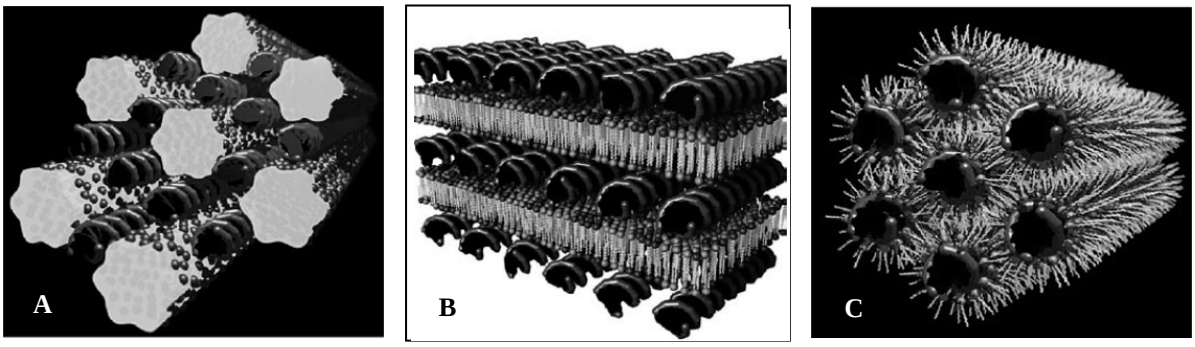


Figure II-27 : Exemples de structures de complexes ADN-tensioactif, A – hexagonale directe ; B – lamellaire ; C – hexagonale inverse [3]

II.5. Applications des complexes ADN-tensioactifs

II.5.1. <u>Purification et isolement de l'ADN par précipitation</u>

Les tensioactifs sont couramment utilisés pour isoler et purifier l'ADN [37]. La première utilisation du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) à cet effet a été décrite en 1951 par Jones [56]. Le CTAB a été utilisé avec succès pour isoler de l'ADN de bactéries [57] et de plantes [58]. L'avantage de cette méthode est que l'on peut même l'utiliser pour isoler des oligonucléotides [58,59]. D'autres méthodes, notamment la précipitation par l'éthanol, peuvent être utilisé dans ce but, mais restent inefficaces pour isoler de petites molécules d'ADN.

Récemment il a été montré qu'avec le chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC) il était plus facile de précipiter l'ADN simple brin que l'ADN double brin [14], d'où une utilisation possible de ce composé pour réaliser une séparation. La possibilité de la séparation de la forme superenroulée et de la forme circulaire de l'ADN par précipitation avec le bromure de tetradécyltriméthylammonium (TTAB) a également été montrée [60].

II.5.2. La thérapie génique

Plus de 4500 maladies génétiques peuvent affecter l'homme [61]. Il s'agit de maladies dues au dysfonctionnement d'un ou plusieurs gènes. La thérapie génique est l'ensemble des approches permettant de transférer une nouvelle information génétique dans les cellules d'un malade afin de soigner sa pathologie [62]. Elle consiste à utiliser l'insertion d'un nouveau gène comme un médicament, qu'il s'agisse de remplacer un gène défectueux ou de commander la synthèse d'une protéine thérapeutique.

L'ADN est un polyélectrolyte anionique de haute masse moléculaire. Sous la forme déployée, un ADN de 10 kb avoisine la taille d'une cellule. Pour effectuer la transfection de l'ADN dans les cellules il faut franchir la membrane plasmique qui est elle aussi chargée négativement. Donc, pour faire pénétrer l'ADN dans les cellules il faut le compacter en agrégats de plus petite taille ainsi que neutraliser ou blinder ses charges négatives [63]. Des produits ou des systèmes capables de transférer l'ADN dans les cellules sont nommés vecteurs de gènes.

Les tensioactifs seuls ne peuvent pas être utilisés comme vecteurs de gènes en raison de leur cytotoxicité ainsi que de la faible stabilité des complexes formés lors du changement d'environnement pendant la transfection in vivo [64]. Mais de faibles quantités de tensioactifs cationiques peuvent être utilisées dans les formulations de liposomes à base de lipides neutres (qui sont moins chers) pour leurs apporter une charge positive et ainsi augmenter le rendement de transfection [64,65]. Une autre approche est de pré-compacter l'ADN par des tensioactifs avant son interaction avec les vecteurs liposomiques. Cette approche à été utilisée récemment avec un tensioactif dérivé d'acide aminé : l'arginine-N-lauroyl amide (ALA) [66]. Une efficacité beaucoup plus importante de transfection a alors été observée en utilisant la pré-compaction de l'ADN par le ALA que sans pré-compaction.

II.5.1. Dosage de l'ADN

La complexation entre l'ADN et le CTAB a été aussi utilisée pour le dosage par fluorescence de l'acide nucléique [67]. En effet, lors de l'interaction électrostatique du CTAB avec l'acide 9-anthracènecarboxylique, l'intensité de fluorescence de ce dernier diminue. La libération de l'acide 9-anthracènecarboxylique lors de l'addition d'ADN conduit à l'augmentation de sa fluorescence. Cette augmentation de fluorescence est proportionnelle à la concentration en acide nucléique. Cette technique permet de doser de faibles quantités d'ADN seuls ou en présence de cations, de métaux, ou d'acides aminés.

II.6. Conclusion

Cette mise au point bibliographique a montré une partie des connaissances acquises dans le domaine de la complexation ADN-tensioactifs cationiques, ainsi que la diversité des méthodes les plus couramment utilisées pour cette étude. Nous avons pu déduire de cette recherche bibliographique, que si beaucoup de facteurs (comme l'effet de la température, la force ionique et la structure du tensioactif) ont été considérés, l'influence de la concentration en ADN a finalement été très peu étudiée.

Deux effets différents de la concentration en ADN sur sa complexation avec des tensioactifs ont été décrits dans la littérature. Soit cette complexation ne dépend pas de la concentration en ADN, soit elle suit la neutralisation de l'acide nucléique. Par ailleurs, l'analyse des données de la littérature nous a permis de distinguer ces deux mécanismes de complexation. Nous avons observé qu'aux faibles concentrations en ADN, la complexation ne dépend pas de la concentration en acide nucléique, tandis qu'à concentration plus élevée en ADN, la complexation suit la neutralisation des charges négatives.

C'est pour cette raison que dans le chapitre suivant, consacré à l'étude de la complexation ADN-tensioactifs dans les conditions utilisées ensuite pour les études de l'influence de cette complexation sur la formation de dommages de l'ADN, nous avons d'abord étudié l'effet de la concentration en ADN sur la complexation ADN-tensioactifs.

Références

[1] Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*, Wiley, New-York, **1980**

[2] Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W., *J Chem Soc Far Trans 2*, **1976**, *72*, 1525-1568

[3] Dias, R.S., Lindman, B., *DNA interactions with polymers and surfactants*, Wiley-Interscience, **2008**

[4] Rosen, M.J., *Surfactants and interfacial phenomena*, Wiley, **1989**

[5] Kwak, J.C.T. (ed.), *Polymer-Surfactant systems*, surfactant science series, vol. 77, Marcel Decker, **1998**

[6] Podestà, A., Indrieri, M., Brogioli, D., Manning, G.S., Milani, P., Guerra, R., Finzi, L., Dunlap, D., *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2558–2563.

[7] Manning, G.S., *Biophys J.*, **2006**, *91(10)*, 3607–3616

[8] Dias, R.S., Innerlohinger, J., Glatter, O., Miguel, M.G., Lindman, B., *J Phys Chem B.*, **2005**, *109*, 10458-10463

[9] Pattarkine, M.V., Ganesh, K.N., *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**, *263*, 41-46

[10] Spink, C.H., Chaires, J.B., *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 10920-10928

[11] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2005**, *109*, 3676-3680

[12] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2006**, *110*, 24761-24765

[13] Zhu, D.-M., Evans, R.K., *Langmuir*, **2006**, *27*, 3735-3743

[14] Rosa, M., Dias, R., Miguel, M.D., Lindman, B., *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 2164-2171

[15] Jadhav, V.M., Valaske, R., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2008**, *112(29)*, 8824-8831

[16] Dasgupta, A., Das, A.P., Dias, R.S., Miguel, M.G., Lindman, B., Jadhav, V.M., Gnanamani, M., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2007**, *111*, 8502-8508

[17] McGhee, J.D., *Biopolymers*, **1976**, *15*, 1345-1375

[18] Bhattacharya, S., Mandal, S.S., *Biochim Biophys A*, **1997**, *1323*, 29-44

[19] Izumrudov, V.A., Zhyryakova, M.V., Goulko, A.A., *Langmuir*, **2002**, *18*, 10348-10356

[20] Goracci, L., Germani, R., Savelli, G., Bassani, D.M., *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 197-203

[21] Bonincontro, A., Marchetti, S., Onori, G., Rosati, A., *Chem. Phys.* **2005**, *312*, 55-60

[22] Grueso, E., Sanchez, F., *J Phys Chem B*, **2008**, *112*, 698-702

[23] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., Takahashi, H., Hatta, I., *J Chem Phys*, **1997**, *107*, 6917-6924

[24] McLoughlin, D., Langevin, D., *Coll and Surf A :Physicochem Eng Asp*, **2004**, *250*, 79-87

[25] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 9951-9956

[26] Jain, N., Trabelsi, S., Guillot, S., McLoughlin, D., Langevin, D., Tetellier, P., Turmine, M., *Langmuir*, **2004**, *20*, 8496-8503

[27] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 2401-2408

[28] Matulis, D., Rouzina, I., Boomfield, V.A., *J Am Chem Soc*, **2001**, *124*, 7331-7342

[29] Zimm, B.H., Bragg, I.K., *J Chem Phys*, **1959**, *31*, 526-535

[30] Dias, R.S., Svingen, R., Gustavsson, B., Lindman, B., Miguel, M.G., Åkerman, B., *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2908-2917

[31] Dauty, E., Behr, J.P., *Polym Int*, **2003**, *52*, 459-464

[32] Gopal, V., Prasad, T.K., Rao, N.M., Takafuji, M., Rahman, M.M., Ihara, H., *Bioconj Chem*, **2006**, *17*, 1530-1536

[33] Choi, J.S., Lee, E.J., Jang, H.S., Park, J.S., *Bioconj Chem*, **2001**, *12*, 108-113

[34] Wang, Z., Liu, D., Dong, S., *Biophys Chem*, **2000**, *87*, 179-184

[35] Jacquier, J.-C., Gorelov, A.V., McLoughlin, D.M., Dawson, K.A., *J Chromatogr A*, **1998**, *817*, 263-271

[36] Dutta, S., Jones, A., Stacey, M., *Biochim Biophys A*, **1953**, *10*, 613-622

[37] Lander, R.J., Winters, M.A., Meacle, F.J., Buckland, B.C., Lee, A.L., *Biotechnol Bioeng*, **2002**, *79*, 776-784

[38] Dias, R., Mel'nikov, S., Lindman, B., Miguel, M.G., *Langmuir*, **2000**, *16*, 9577-9583

[39] Chatterjee, R., Chattoraj, D.K., *Biopolymers*, **1979**, *18*, 147-166

[40] Hayakawa, K., Santerre, J.P., Kwak, J.C.T., *Biophys Chem*, **1983**, *17*, 175-181

[41] Dias, R.S., Pais, A.A.C.C., Miguel, M.G., Lindman, B., *Coll Surf A*, **2004**, *250*, 115-131

[42] Karlsson, L., van Eijk, M.C.P., Soderman, O., *J Coll Int Sci*, **2002**, *252*, 290-296

[43] Rosa, M., Moràn, M.C., Miguel, M.G., Lindman, B., *Coll Surf A*, **2007**, *301*, 361-375

[44] Jadhav, V., Maiti, S., Dasgupta, A., Das, P.K., Dias, R., Miguel, M.G., Lindman, B., Biomacromolecules, **2008**, *9*, 1852-1859

[45] Dias, R.S., Lindman, B., Miguel, M.G., *Prog Coll Polym Sci*, **2001**, *118*, 163-167

[46] Zhou, S.Q., Liang, D.H., Burger, C., Yeh, F.J., Chu, B., *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 1256-1261

[47] Leal, C., Topgaard, D., Martin, R.W., Wennerström, H., *J Phys Chem B*, **2004**, *108*, 15392-15397

[48] Smith, P., Lynden-Bell, R.M., Smith, W., *Phys Chem Chem Phys*, **2000**, *2*, 1305-1310

[49] Leal, C., Wadsö, L., Oloffson, G., Miguel, M., Wennerström, H., *J Phys Chem B*, **2004**, *108*, 3044-3050

[50] Ewert, K.K., Evans, H.M., Zidovska, A., Bouxsein, N.F., Ahmad, A., Safinya, C.R., *J Am Chem Soc*, **2006**, *128*, 3998-4006

[51] Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T., Safinya, C.R., *Science*, **1997**, *275*, 810-814

[52] Dias, R.S., Lindman, B.Miguel, M.G., *J Phys Chem B*, **2002**, *106*, 12600-12607

[53] Bilalov, A., Leal, C., Lindman, B., *J Phys Chem B*, **2004**, *108*, 15408-15414

[54] Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J.O., Safinya, C.R., *Science*, **1998**, *281*, 78-81

[55] Hsu, W.L., Chen, H.L., Liou, W., Lin, H.K., Liu, W.L., *Langmuir*, **2005**, *21*, 9426-9431

[56] Jones, A.S., *Chem Indus*, **1951**, 1067-1067

[57] Dutta, S.K., Jones, A.S., Stacey, M., *J Gen Microbiol*, **1956**, *14*, 160-166

[58] Murray, M.G., Thompson, W.F., *Nucl Acids Res*, **1980**, *8*, 4321-4325

[59] Jost, J.P., Jiricny, J., Saluz, H., *Nucl Acids Res*, **1989**, *17*, 2143-2143

[60] Tomanee, P., Hsu, J.T., *J Liq Chromatogr Rel Technol*, **2006**, *29*, 1531-1540

[61] Eisen, A.A., *Adv Nevrol*, **1995**, *68*, 121-134

[62] Roemer, K., Friedmann, T., *Eur J Biochem*, **1992**, *208*, 211-225

[63] Yoshikawa, K., *Adv Drug Deliv Rev*, **2001**, *52*, 235-244

[64] Lasic, D. *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**

[65] Pinnaduwage, P., Schmitt, L., Huang, L., *Biochim Biophys Acta*, **1989**, *985*, 33-37

[66] Rosa, M., Pereira, N.P., Simões, S., Lima, M.C.P., Lindman, B. Miguel, M., *Mol Memb Biol*, **2007**, *25*, 23-34

[67] Liu, J., Wang, X., Wang, L., *Spectrochim Acta Part A*, **2006**, *63*, 32-35

Chapitre III

ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN AVEC DES TENSIOACTIFS ET DES SELS

Chapitre III. ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN AVEC DES TENSIOACTIFS ET DES SELS

III.1 Introduction **119**
III.2 Etude de complexation ADN-tensioactifs **121**
III.2.1 Méthodes utilisées pour les études de la complexation ADN - tensioactifs 121
III.2.1.1 Titration par fluorescence 121
III.2.1.2 Electrophorèse sur gel d'agarose 122
III.2.1.3 Intensité de la lumière diffusée 122
III.2.2 Influence de la concentration en ADN sur la complexation avec des tensioactifs 123
III.2.2.1 Cas de la complexation ADN-CTAB 125
III.2.2.2 Cas de la complexation ADN-DTAC 129
III.2.3 Effet de contre-ion dans le cas du cetyltriméthylammonium 131
III.2.4 Effet de la longueur de la chaîne de tensioactif 132
III.2.5 Comparaison de la micellisation et de l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN de type triméthylammonium 135
III.2.6 L'effet de la tête polaire 137
III.2.6.1 Synthèse et caractérisation physico-chimique de Ghyd12HCl l38
III.2.6.2 Comparaison de la complexation du DTAC et du Ghyd12HCl avec l'ADN 139
III.2.7 Complexation ADN-tensioactifs bolaformes 140
III.3 Etude de complexation ADN-sels **142**
III.4 Conclusion **145**
Références **147**

III.1 Introduction

En préliminaire à l'étude concernant l'effet des tensioactifs sur la formation des dommages oxydatifs photoinduits sur l'ADN, il a été nécessaire d'étudier la complexation entre l'ADN et les tensioactifs sélectionnés afin de déterminer les valeurs des CAC sur ADN ($CAC^{ADN}{}_{TA}$) dans des conditions expérimentales identiques à celles qui seront utilisées lors de la génération de dommages oxydatifs (tampon, température, pH). En effet, ces conditions étant généralement très différentes de celles utilisées lors des études de complexation, l'examen de l'influence de la concentration en ADN sur sa complexation avec les tensioactifs a donc été entrepris et comparé aux résultats de la littérature.

Le choix des tensioactifs et de l'ADN pour ces études a été dicté par les conditions expérimentales nécessaires à la formation de photodommages ainsi qu'à leur visualisation. Ces derniers seront engendrés *via* un processus de photosensibilisation dans l'UVA. Dans ces conditions, il est donc nécessaire d'utiliser des tensioactifs qui n'absorbent pas dans ce domaine de longueurs d'onde. D'autre part ces dommages étant détectés par électrophorèse sur gel d'agarose, il est donc impératif que les tensioactifs retenus ne fluorescent pas afin de ne pas interférer avec la sonde fluorescente BET utilisée pour visualiser les fragments d'ADN. Les tensioactifs cationiques de type triméthylammonium s'avèrent être de bons candidats.

L'outil utilisé pour mettre en évidence la formation de ces dommages est un ADN plasmidique : pBR322. Ce dernier, lorsqu'il est intact se présente sous une forme superenroulée (forme I) (FigureIII-1). S'il subit une coupure simple brin, il y a relaxation de la superhélicité, l'ADN passe à en forme circulaire relaxée (forme II). Si le brin complémentaire est soumis à une autre coupure, proche de la précédente, la forme linéaire de l'ADN (forme III) est alors obtenue. Une coupure double brin peut également être à l'origine de la forme III.

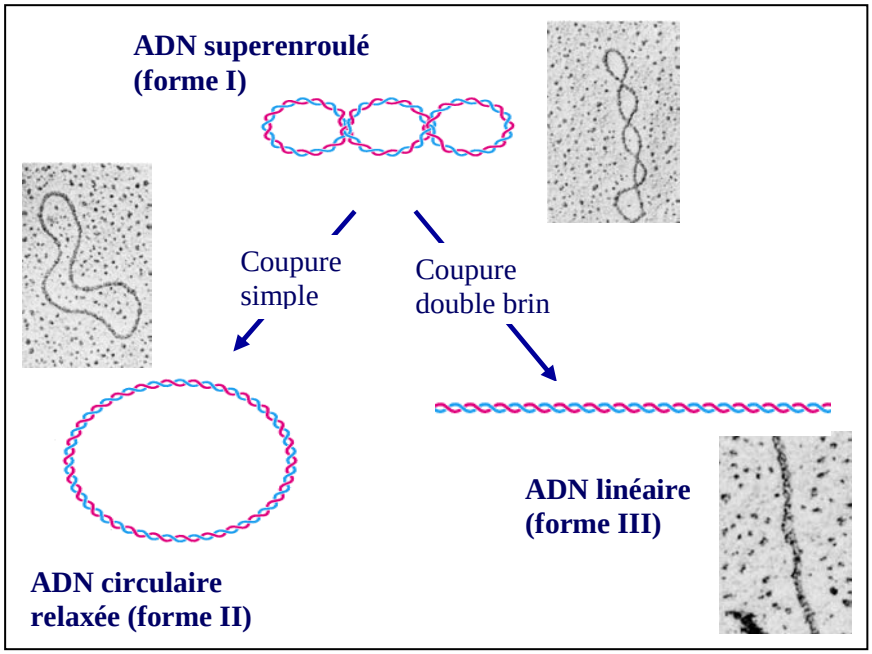


Figure III-1 : Formes d'ADN plasmidique avant et après coupures

Sur gel d'agarose, ces trois formes présentent une mobilité électrophorétique différente ce qui permettra de les distinguer (**Figure III-2**).Ainsi, la forme circulaire relaxée présente une vitesse de migration plus faible que celle de la forme superenroulée.

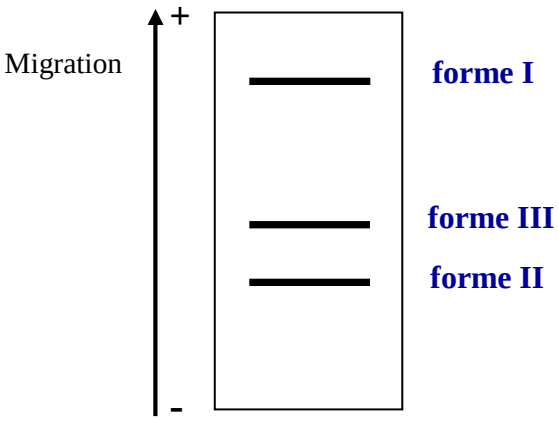


Figure III-2 : Exemple de séparation des différentes formes d'ADN par l'électrophorèse sur gel d'agarose

Les agents cationiques peuvent avoir deux effets principaux sur l'ADN lors de la complexation. Ils peuvent le compacter et/ou modifier l'environnement autour de l'ADN. Ces deux effets peuvent influer sur la formation des dommages. C'est pour cette raison que nous avons également étudié la complexation de l'ADN avec des agents cationiques non-hydropbobes, tels que des sels de cations mono- et divalents (le chlorure de sodium, le

bromure de tétraméthylammonium et le chlorure de calcium). De plus, nous avons testé des tensioactifs de type bolaformes (Figure III-3) qui présentent une hydrophobie plus masquée que des tensioactifs comportant une seule tête polaire. Ces bolaformes sont constitués de deux têtes polaires cationiques, ce qui leur permet une meilleure compaction de l'ADN.

Figure III-3 : Représentation schématique de tensioactifs de type bolaforme

III.2. Etude de complexation ADN-tensioactifs

III.2.1. <u>Méthodes utilisées pour les études de la complexation ADN - tensioactifs</u>

Trois méthodes ont été utilisées pour ces études de complexation ADN - tensioactifs :

- la titration par fluorescence,
- l'électrophorèse sur gel d'agarose
- la titration par mesure de l'intensité de la lumière diffusée.

III.2.1.1. *Titration par fluorescence*

Pour cette étude le bromure d'éthidium (BET) a été utilisé comme sonde fluorescente. Lorsqu'il s'intercale dans l'ADN, l'intensité de sa fluorescence augmente significativement. La neutralisation de l'ADN par des tensioactifs mène à sa compaction et au déplacement de l'intercalant dans la solution, ce qui provoque une décroissance rapide de la fluorescence, permettant de suivre la complexation de l'ADN [1-5].

Un exemple de courbes de fluorescence obtenues par titration du complexe ADN-BET par un tensioactif est présenté sur la Figure III-4A. On y constate que l'addition de tensioactifs induit la diminution de l'intensité de fluorescence du BET. En portant les valeurs des maxima des bandes de fluorescence en fonction des concentrations en tensioactif, on obtient la courbe sigmoïdale de titration (Figure III-4B). La concentration en tensioactif correspondant à la complexation de l'ADN a été déterminée comme celle qui correspond au point d'inflexion de la courbe sigmoïdale.

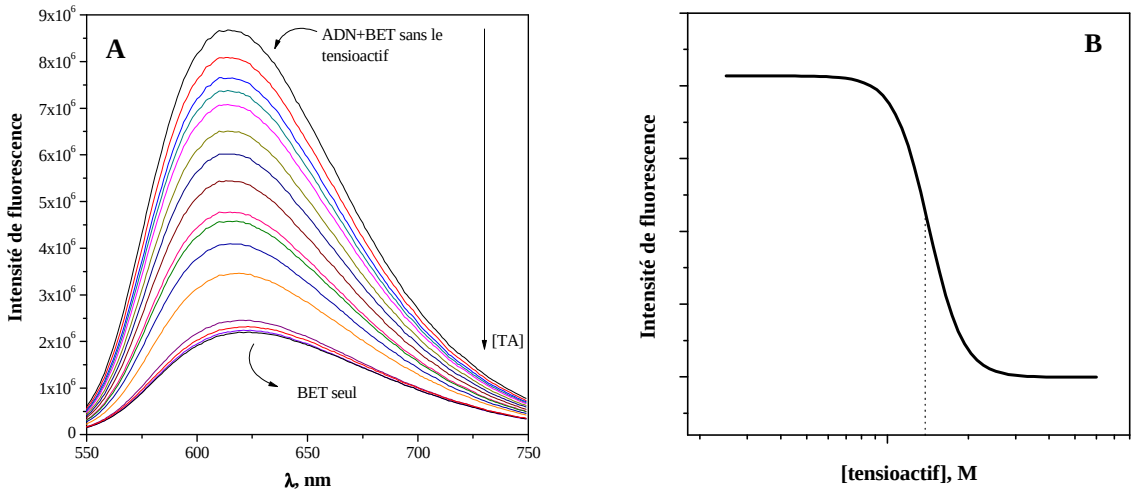


Figure III-4 : Exemple de résultats obtenus par la titration par fluorescence ; A - courbes de fluorescence, B - courbe de titration

III.2.1.2. *Electrophorèse sur gel d'agarose*

Cette technique permet une séparation des molécules en se basant principalement sur leur taille et leur charge. Lors de l'électrophorèse, l'ADN non-complexé migre vers l'anode. Sa complexation avec des tensioactifs diminue sa mobilité électrophorétique, ce qui se traduit par une traînée des taches sur le gel [2,4,6]. La concentration en tensioactif correspondant au début du changement des propriétés électrophorétiques de l'ADN a été attribuée à la complexation de l'acide nucléique (Figure III-5).

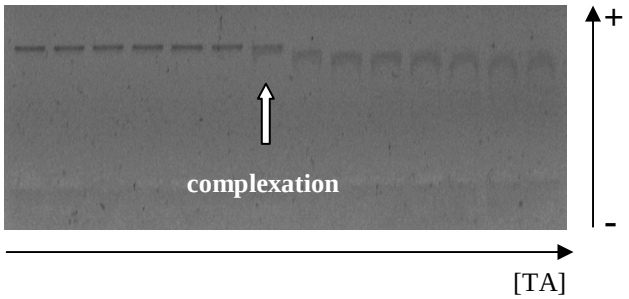


Figure III-5 : Exemple d'étude de la complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

III.2.1.3. *Intensité de la lumière diffusée*

Les produits issus de la complexation entre des tensioactifs et des ADN plasmidiques ainsi que des ODN présentent un rayon hydrodynamique plus important que celui de l'acide nucléique seul, ce qui conduit à une augmentation importante de l'intensité de la lumière

diffusée lors de la complexation. Ce phénomène atteint un palier au moment de la complexation [1,7].

Nous avons suivi les variations d'intensité de la lumière diffusée lors de la titration de l'ADN par les tensioactifs. Un exemple de mesure de l'intensité de la lumière diffusée est présenté sur la Figure III-6. Comme nous pouvons le constater sur cette figure, la présence de poussière peut augmenter significativement l'intensité moyenne de la lumière diffusée. Comme la précipitation des complexes ADN-tensioactif est toujours possible, les solutions n'ont pas été centrifugées avant les mesures. De plus, afin d'éviter l'influence des poussières, seule l'intensité de la ligne de base a été mesurée (voire Figure III-6).

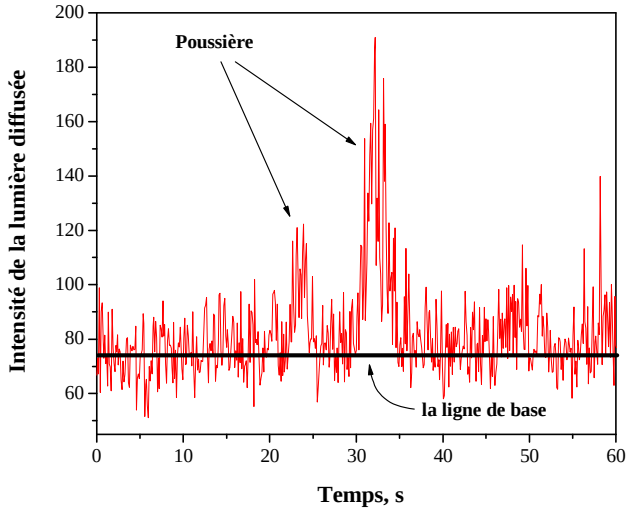


Figure III-6 : Exemple de mesures de l'intensité de la lumière diffusée (Θ = 90°, λ = 632,8 nm)

En utilisant ces méthodes nous avons ainsi étudié l'influence de différents facteurs (comme la longueur de la chaîne du tensioactif, la nature de sa tête polaire, du contre ion ainsi que la concentration en ADN) sur la complexation de l'ADN.

III.2.2. Influence de la concentration en ADN sur sa complexation avec des tensioactifs

L'étude bibliographique de l'influence de la concentration en ADN sur l'interaction ADN-tensioactifs que nous avons menée a mis en évidence l'existence de deux régions bien distinctes. Dans la première région, aux faibles concentrations en ADN, la complexation ne dépend pas de la concentration en acide nucléique [5,8-10]. Ici l'acide nucléique facilite simplement l'agrégation de tensioactifs et la complexation a lieu à une certaine concentration

en tensioactif - la concentration d'agrégation critique de tensioactif sur l'ADN (CAC^{ADN}_{TA}). Tandis qu'aux concentrations plus importantes en ADN cette interaction suit la neutralisation de charges de l'ADN et dépend donc de sa concentration [1,2,7,11-17]. Ces deux mécanismes étaient décrits dans la littérature, mais les limites de leur existence n'étaient pas clairement définies.

Les résultats de l'étude bibliographique nous ont permis de proposer un modèle expliquant les deux mécanismes d'interaction entre l'ADN et les tensioactifs. Si en simplifiant, on admet que la CAC^{ADN}_{TA} ne dépend pas de la concentration en acide nucléique, nous supposons que lorsque la concentration en phosphates de l'ADN est plus faible que la valeur de la CAC^{ADN}_{TA} ($[ADN\text{-}PO_4^-] < CAC^{ADN}_{TA}$), la complexation a lieu à la concentration d'agrégation critique de tensioactif sur l'ADN et ne dépend donc pas de la concentration en acide nucléique. Dans ce cas, la complexation ADN-tensioactifs se présente comme la formation d'agrégats de tensioactifs, appelés prémicelles, sur l'acide nucléique chargé négativement. Ce processus est principalement contrôlé par les interactions hydrophobes entre les chaînes de tensioactifs.

Dans la deuxième région, quand dans la solution les phosphates de l'ADN sont présents en excès par rapport à la valeur de la CAC^{ADN}_{TA} ($[ADN\text{-}PO_4^-] > CAC^{ADN}_{TA}$), la formation de prémicelles de tensioactifs sur l'ADN est très défavorisée. Dans ce cas, quand la concentration en tensioactif est égale à sa $CAC^{ADN}_{TA,}$ il reste un excès de phosphates sur l'ADN, et lors de l'augmentation de la concentration en tensioactif, ce dernier préfère neutraliser ces phosphates. La complexation entre l'ADN et les tensioactifs se termine à la neutralisation des phosphates de l'ADN. Au delà, elle dépend de la concentration en acide nucléique et est contrôlée majoritairement par les interactions électrostatiques. Bien entendu, les interactions hydrophobes continuent à stabiliser les complexes, mais leur taux par rapport aux interactions électrostatiques diminue. Dans ces conditions la complexation a lieu non pas à la concentration en tensioactif égale à sa CAC sur ADN, mais à la concentration correspondant à la neutralisation des charges portées par l'acide nucléique (au rapport de charges $R = [TA]/[ADN\text{-}PO_4^-] = 1$).

On peut affirmer que les structures des complexes ADN-tensioactifs sont différentes dans les deux régions d'interaction. Lors du mécanisme d'association hydrophobe (région I) la structure des complexes est pseudo-micellaire. Dans la deuxième région, lorsqu'il y a un excès de phosphates par rapport à la CAC^{ADN}_{TA} les interactions électrostatiques prédominent et empêchent la formation de structure prémicellaire. Le diagramme théorique de la

complexation ADN-tensioactifs ainsi que les structures proposées des complexes sont présentés sur la Figure III-7.

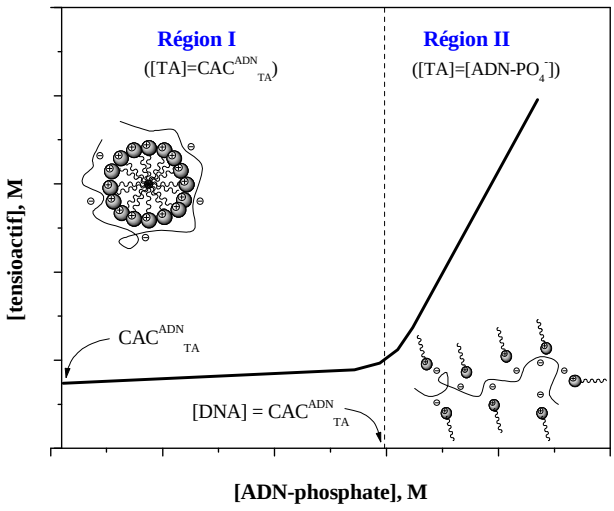


Figure III-7 : Diagramme théorique de la complexation ADN-tensioactifs

La compilation des donnés bibliographiques confirme ce modèle (Figure II-25), mais en raison des disparités de conditions d'études (Annexe I) il est très difficile d'évaluer la concentration en ADN correspondant au début du mécanisme électrostatique. De plus, afin de valider ce modèle nous avons étudié la complexation entre l'ADN et le bromure de cetyltriméthylammonium et le bromure de dodécylammonium à différentes concentrations en acide nucléique. Pour cette étude, nous avons utilisé la titration par fluorescence et l'électrophorèse sur gel d'agarose.

III.2.2.1. *Cas de la complexation ADN-CTAB*

Pour cette expérience nous avons choisi le CTAB comme tensioactif car ce dernier est le plus souvent utilisé pour les études de la complexation ADN-tensioactifs. Les résultats obtenus par titration par fluorescence sont présentés sur la Figure III-8. Des courbes sigmoïdales classiques ont été obtenues, et nous pouvons observer qu'aux concentrations élevées en ADN les courbes de titration sont moins sigmoïdales qu'aux faibles concentrations. Cela prouve qu'aux concentrations élevées en ADN la complexation avec les tensioactifs est moins coopérative. L'influence des forces hydrophobes lors du mécanisme électrostatique (région II) de complexation est moindre que dans la région I.

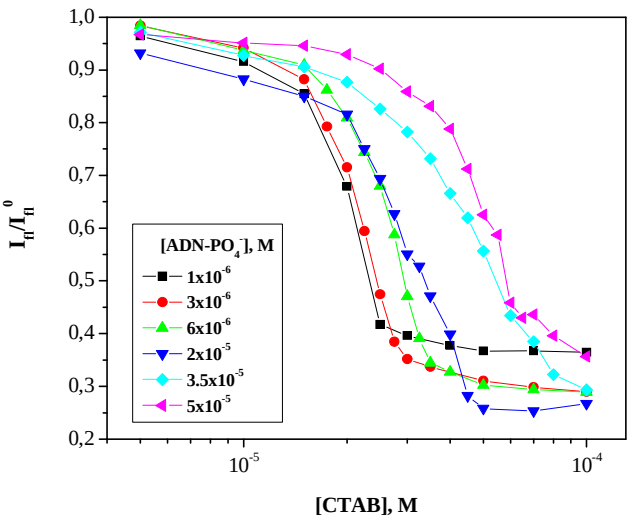


Figure III-8 : Les courbes de titration par fluorescence de complexation ADN-CTAB dans 30mM Tris/HCl à 25ºC

Les concentrations en CTAB correspondant à la complexation avec l'ADN ont été déterminées au point d'inflexion de chacune des courbes de titration. En utilisant les valeurs moyennes obtenues après trois titrations pour chaque concentration en ADN le diagramme expérimental de complexation ADN-CTAB a été construit en portant ces valeurs en fonction des concentrations en ADN correspondantes (Figure III-9).

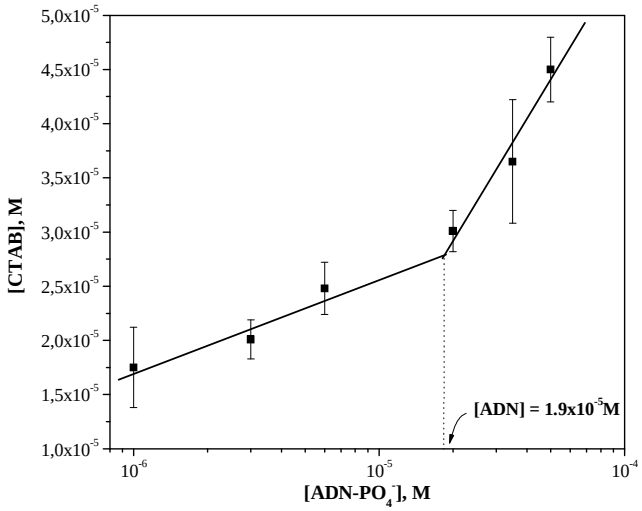


Figure III-9 : Diagramme expérimental de complexation ADN-CTAB obtenu par titration par fluorescence; 30mM Tris/HCl T = 25ºC

Le diagramme obtenu confirme bien notre modèle de complexation ADN-tensioactifs extrait de la littérature. Nous observons en effet que la CAC^{ADN}_{CTAB} s'accroît faiblement lors de l'augmentation de la concentration d'ADN. Dans cette première région, lorsque la

concentration en ADN augmente de 6 fois, la valeur de la CAC^{ADN}_{CTAB} ne s'accroît seulement que de 1,4 fois (de $1{,}75 \times 10^{-5}$ à $2{,}45 \times 10^{-5}$M). En revanche, dans la deuxième région une dépendance beaucoup plus importante de la complexation vis à vis de la concentration en ADN est observée. Comme prévu, la deuxième région de complexation commence à la concentration en acide nucléique égale à la CAC du CTAB sur ADN ($1{,}9 \times 10^{-5}$M).

Le fait que la CAC^{ADN}_{CTAB} augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en ADN nous a conduit à redéfinir le terme de concentration d'agrégation critique d'un tensioactif sur ADN. En effet, on ne peut nommer concentration critique, la concentration en tensioactif correspondant à la complexation de l'ADN aux faibles concentrations de ce dernier. Nous avons choisi de la nommer: la concentration d'agrégation du tensioactif sur l'ADN (CA^{ADN}). La CA^{ADN} correspond aussi à la concentration en tensioactif à laquelle ce dernier forme des prémicelles sur l'ADN. Par contre nous avons nommé la valeur maximale CA^{ADN} (avant le mécanisme électrostatique), la concentration critique du tensioactif sur ADN (CAC^{ADN}_{TA}). Cette concentration correspond également à la concentration en acide nucléique au début du mécanisme électrostatique. Ces termes sont explicités graphiquement sur la Figure III-10.

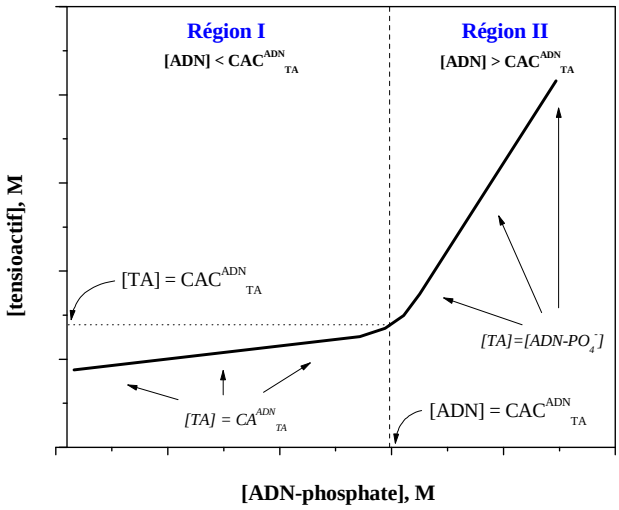


Figure III-10 : Définition des termes concentration d'agrégation (CA^{ADN}_{TA}) et concentration critique d'agrégation (CAC^{ADN}_{TA}) du tensioactif sur ADN

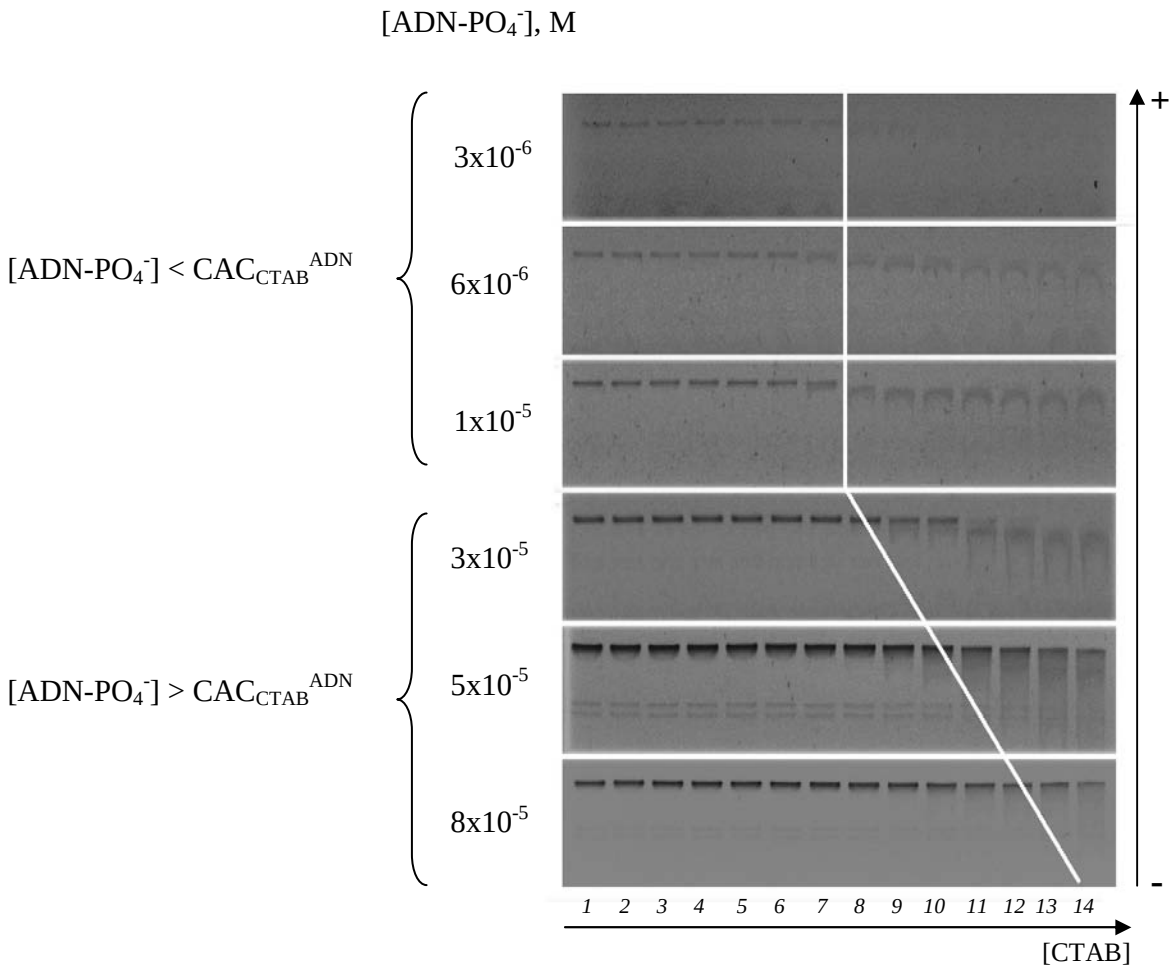
La détermination de la CAC^{ADN}_{TA} nécessite plusieurs expériences à différentes concentrations en ADN (avant et après la valeur ou [ADN] = CAC^{ADN}_{TA}). Pour les tensioactifs qui ont une valeur importante de CAC sur ADN une telle expérience devient très difficile en raison de la nécessité d'utiliser des concentrations beaucoup trop élevées d'ADN.

En nous appuyant sur l'allure du diagramme dans la région I (faible pente), nous pouvons approximer les valeurs de CAC^{ADN}_{TA} en déterminant les CA^{ADN}_{TA} à faibles concentrations en ADN.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons effectué une étude par électrophorèse sur gel d'agarose. Six expériences ont été réalisées en utilisant six concentrations différentes d'ADN : trois concentrations dans la première région ($3x10^{-6}$, $6x10^{-6}$, $1x10^{-5}$M) et trois concentrations dans la deuxième région ($3x10^{-5}$, $5x10^{-5}$, $8x10^{-5}$ M). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III-11. Ces derniers sont en accord avec les expériences réalisées par titration par fluorescence. On observe que dans la première région, le CTAB complexe l'ADN à la CA^{ADN}_{CTAB}, et celle-ci, à cette échelle, ne dépend pas de la concentration en acide nucléique. Par contre dans la deuxième région, la complexation entre l'ADN et le CTAB dépend de la concentration en acide nucléique et suit la neutralisation de charge de ce dernier.

Ces différences sont également visibles au niveau des taches formées sur le gel d'agarose par l'ADN complexé. On voit que dans la première région la complexation entre l'ADN et le CTAB provoque seulement une faible décroissance de mobilité électrophorétique de l'acide nucléique ainsi qu'un faible traînée des taches. En revanche, aux concentrations plus importantes en acide nucléique (deuxième région) la traînée des taches est beaucoup plus marquée, mais la complexation ne modifie pas la mobilité électrophorétique de l'ADN. Lorsque la concentration en ADN est proche de la CAC^{ADN}_{CTAB}, une situation intermédiaire est observée : la traînée des taches d'ADN s'allonge, mais la mobilité électrophorétique diminue comme dans la première région. La transition entre les deux mécanismes apparaît donc comme graduelle.

Ces résultats prouvent que les structures des complexes formés selon les deux mécanismes sont différentes. La migration de l'ADN vers l'anode même à des rapports de charge $R = [TA]/[ADN\text{-}PO_4^-]$ très importants, confirme le modèle [6] de décomplexation partielle ADN-CTAB lors de l'entrée dans le gel. Le fait qu'en région II, la complexation de l'ADN ne change pas sa mobilité électrophorétique confirme que lors du mécanisme électrostatique l'effet des interactions hydrophobes est moins intense. Dans cette région, la complexation entre l'ADN est le CTAB est contrôlée par les interactions électrostatiques qui sont bien plus sensibles au champ électromagnétique.



puits	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*
[CTAB], M	0	$5x10^{-6}$	$7.5x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1.5x10^{-5}$	$2x10^{-5}$	$3x10^{-5}$	$4x10^{-5}$	$5x10^{-5}$	$6x10^{-5}$	$7x10^{-5}$	$8x10^{-5}$	$9x10^{-5}$	$1x10^{-4}$

Figure III-11 : Etude par électrophorèse sur gel d'agarose de la complexation ADN-CTAB à différentes concentrations en acide nucléique; 30mM Tris/HCl, T = 25ºC

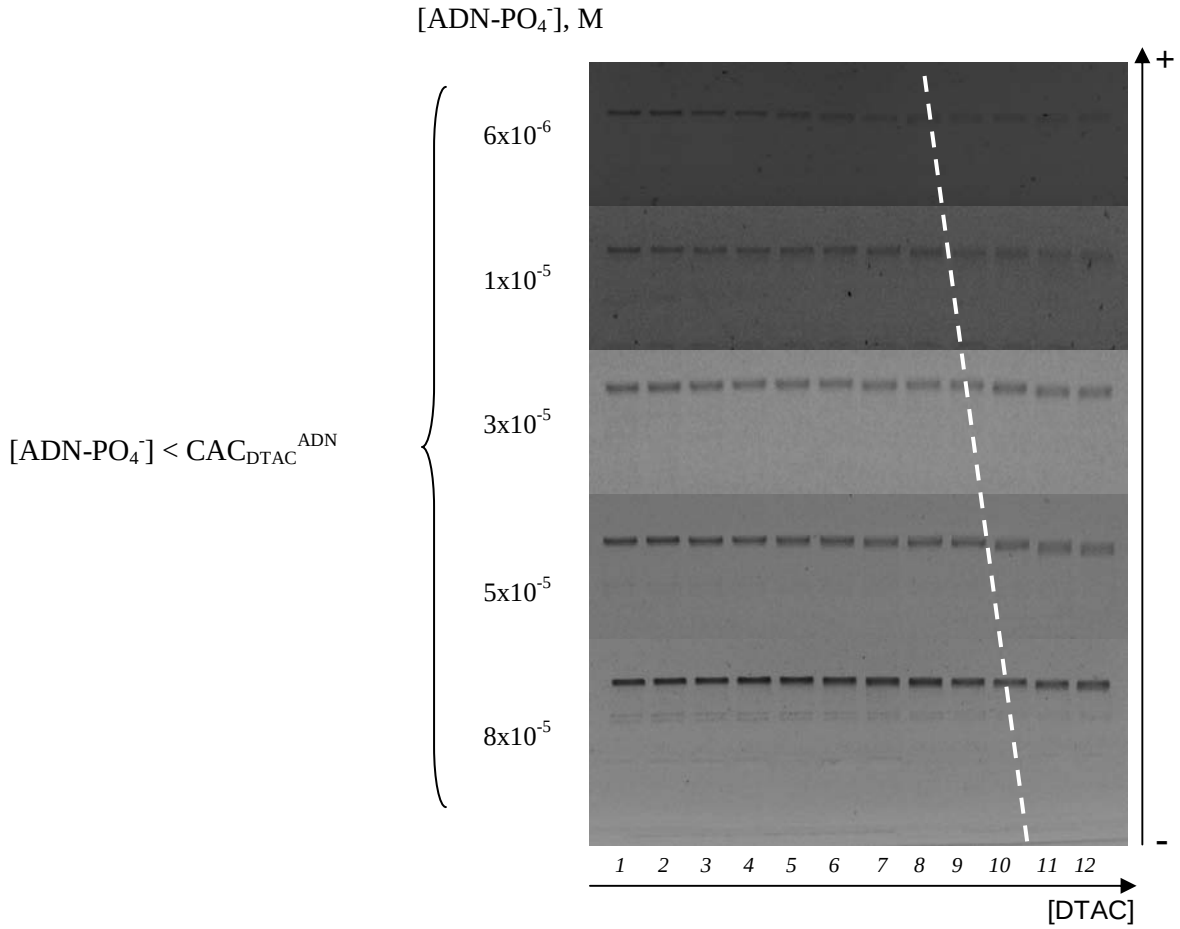
Après avoir analysé l'influence de la concentration d'ADN sur sa complexation avec le CTAB, nous avons étudié l'influence de ce paramètre sur la complexation entre l'ADN et un tensioactif présentant une chaîne hydrophobe plus courte, le DTAC. Ce dernier possède la même tête polaire que le CTAB, mais il a une chaîne à 12 atomes de carbone.

III.2.2.2. *Cas de complexation ADN-DTAC*

Parmi les techniques utilisées, l'électrophorèse sur gel d'agarose permet l'utilisation de concentrations plus élevées en ADN. Ainsi, cette technique nous a permis d'étudier

l'influence de la concentration en ADN sur sa complexation avec un tensioactif à courte chaîne hydrophobe, tel que le DTAC (Figure III-12).

L'effet du DTAC sur les propriétés électrophorétiques de l'ADN est plus faible que celui du CTAB. La complexation induit une très légère diminution de la mobilité électrophorétique ainsi qu'une plus faible traînée des taches. On observe également que lors de l'augmentation de la concentration en ADN, la CA^{ADN} du DTAC s'accroît faiblement. L'augmentation de la concentration en ADN 13,3 fois (de $6x10^{-6}$ à $8x10^{-5}$ M) provoque un accroissement de la CA^{ADN}_{DTAC} de 1,67 fois (de $1,5x10^{-3}$ à $2,5x10^{-3}$ M). Ces résultats sont en accord avec une complexation par le mécanisme hydrophobe, ce qui est normal lorsque l'on utilise des concentrations en ADN plus faibles que la CAC^{ADN}_{DTAC}.



puits	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
[DTAC], M	0	$1x10^{-5}$	$1x10^{-4}$	$5x10^{-4}$	$8x10^{-4}$	$1x10^{-3}$	$1,5x10^{-3}$	$1,75x10^{-3}$	$2x10^{-3}$	$2,5x10^{-3}$	$4x10^{-3}$	$5,8x10^{-3}$

Figure III-12 : Etude par électrophorèse sur gel d'agarose de la complexation ADN-DTAC à différentes concentrations en acide nucléique ; 30mM Tris/HCl, T = 25ºC

Après l'étude de l'influence de la concentration d'ADN sur sa complexation avec les tensioactifs, nous avons regardé l'influence de la structure des tensioactifs sur ce processus (longueur de chaîne hydrophobe, nature de tête polaire et du contre-ion).

III.2.3. Effet de contre-ion dans le cas du cetyltriméthylammonium

Pour étudier l'effet de la nature du contre-ion du tensioactif sur la complexation avec l'ADN nous avons comparé les valeurs de CA^{ADN} pour le bromure et le chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAB et CTAC respectivement). Les valeurs de CA sur ADN ont été obtenues en utilisant une faible concentration en ADN ($3x10^{-6}$M).

Les résultats de l'étude comparative de la complexation du CTAB et du CTAC avec l'ADN par titration par fluorescence et mesures de l'intensité de la lumière diffusée sont présentés respectivement sur la Figures III-13 **A** et **B**.

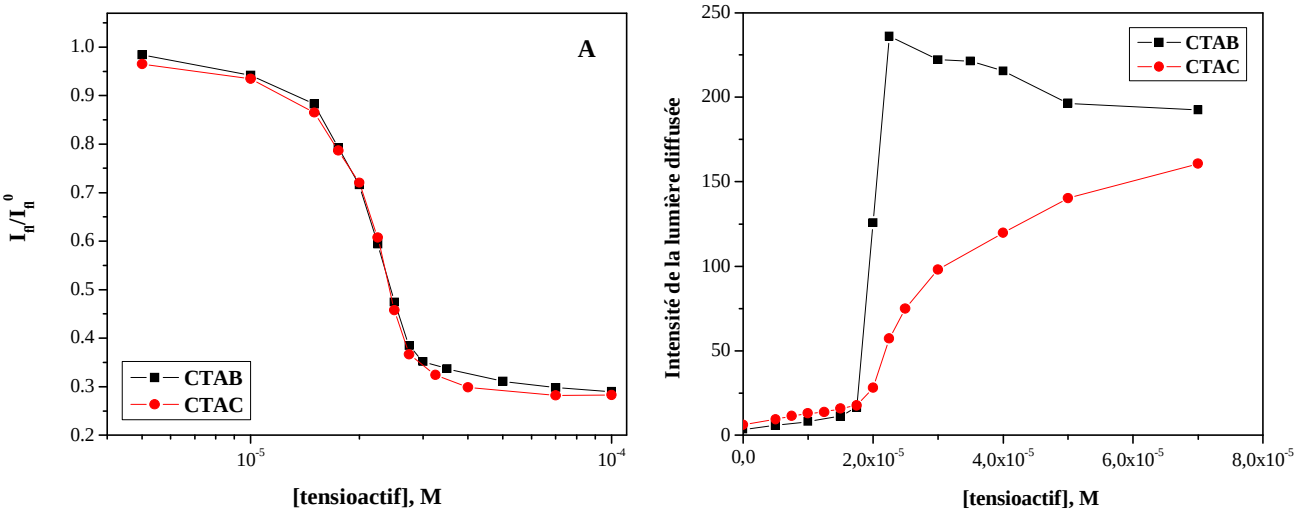


Figure III-13 : Comparaison de l'interaction de l'ADN avec le chlorure et bromure de céthyltriméthylammonium (CTAB et CTAC) par titration par fluorescence (**A**) et mesures de l'intensité de la lumière diffusée (**B**) dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC ; (Θ = 90˚, λ = 632,8 nm)

Les résultats obtenus montrent que l'échange du contre-ion de bromure à chlorure, ne modifie pas la CA du tensioactif sur ADN. Ces observations ont été confirmées par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure III-14).

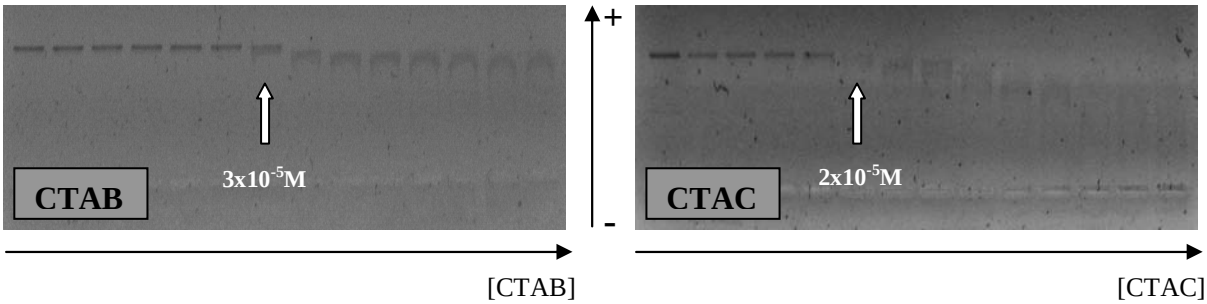


Figure III-14 : Comparaison de l'interaction de l'ADN avec le CTAB et le CTAC par l'électrophorèse sur gel d'agarose dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC

Les valeurs de CA sur ADN du CTAB et du CTAC obtenues par les trois méthodes utilisées sont rassemblés dans le Tableau III-1. Ces valeurs sont bien en accord avec les valeurs des concentrations d'agrégation de cations tensioactifs de type cetyltriméthylammonium décrites dans la littérature [1,2,18-20].

Méthode	[CTAB], M	[CTAC], M
Titration par fluorescence	$2{,}01 \times 10^{-5}$	$2{,}15 \times 10^{-5}$
Mesures de l'intensité de la lumière diffusée	$2{,}05 \times 10^{-5}$	$2{,}2 \times 10^{-5}$
Electrophorèse sur gel d'agarose	3×10^{-5}	2×10^{-5}
Valeur moyenne	*$2{,}3 \times 10^{-5}$*	*$2{,}1 \times 10^{-5}$*

Tableau III-1 : Comparaison des valeurs de CA sur ADN du CTAB et CTAC obtenues par différentes méthodes dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC

Le changement du contre-ion chlorure à bromure n'influe donc pas sur l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN. Nous avons ensuite étudié l'influence d'un facteur plus important sur l'agrégation des tensioactifs - la longueur de la chaîne hydrophobe.

III.2.4. Effet de la longueur de la chaîne de tensioactif

De manière générale, de plus faibles concentrations en tensioactifs sont nécessaires pour complexer l'ADN à mesure qu'augmente la longueur de la chaîne hydrophobe. Cette observation confirme l'importance des interactions hydrophobes dans la complexation entre des tensioactifs et l'ADN. Nous avons étudié l'effet de la longueur de chaîne hydrophobe en

comparant les CA sur ADN de chlorures de tensioactifs de type triméthylammonium : le chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAC), le chlorure de tétradécyltriméthylammonium (TTAC) et le chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC). En utilisant une faible concentration en ADN ($3x10^{-6}$M) nous avons déterminé les CA^{ADN} de ces tensioactifs par les trois méthodes : la titration par fluorescence, l'électrophorèse sur gel d'agarose et la titration par mesures de l'intensité de la lumière diffusée.

Les résultats de titrations par fluorescence et mesures de l'intensité de la lumière diffusée sont présentés sur la Figure III-15. Les deux méthodes ont montré que les CA sur ADN d'un tensioactif à chaîne plus longue est plus faible. Cela confirme l'importance des interactions hydrophobes dans la complexation de l'ADN aux faibles concentrations en acide nucléique.

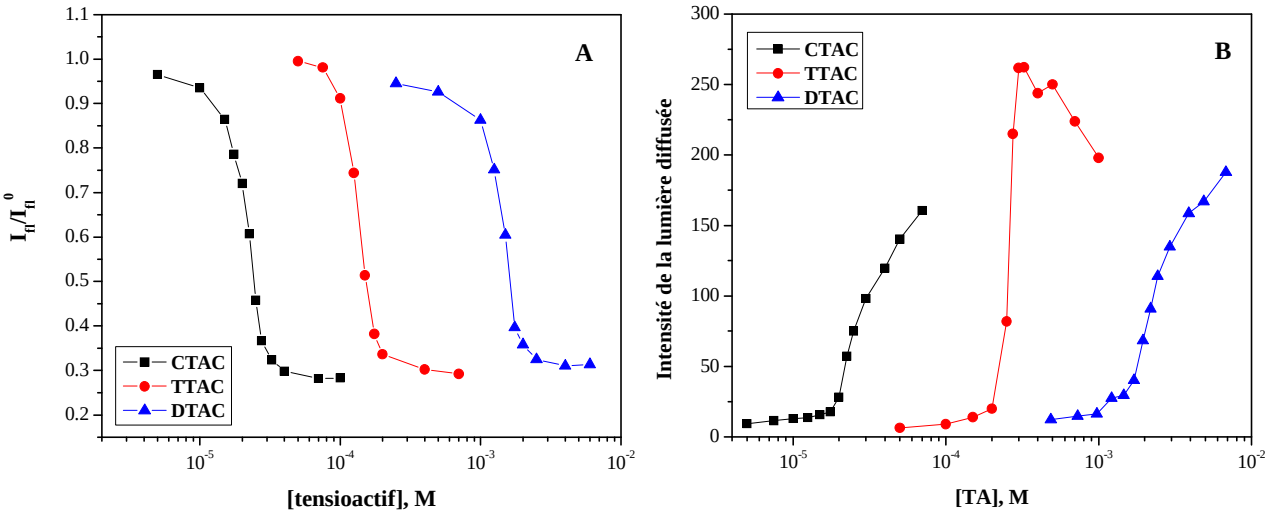


Figure III-15 : Comparaison de l'interaction d'ADN avec le CTAC, le TTAC et le DTAC par titration par fluorescence (**A**) et mesures de l'intensité de la lumière diffusée (Θ = 90°, λ = 632,8 nm) (**B**) dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC

L'étude par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure III-16) confirme bien ces résultats.

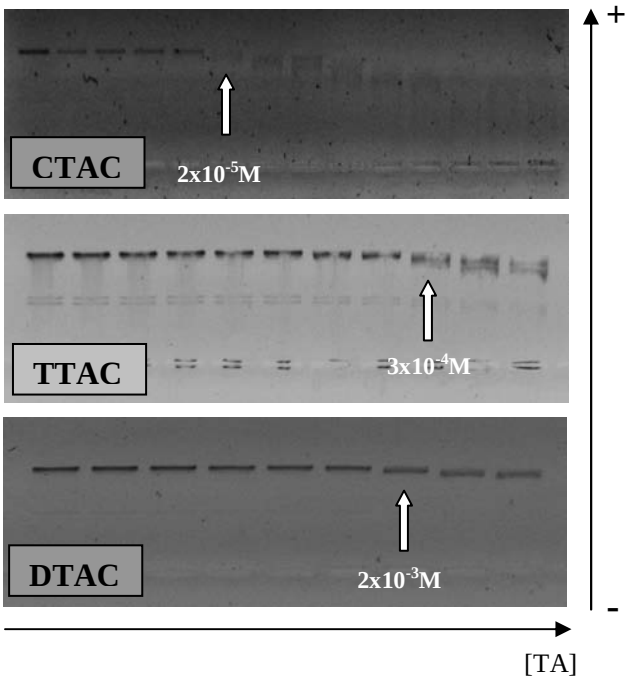


Figure III-16 : Comparaison de l'interaction de l'ADN avec le CTAC, le TTAC et le DTAC par l'électrophorèse sur gel d'agarose dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC

Les valeurs de CA sur ADN obtenues par les trois méthodes ainsi que les valeurs moyennes sont présentées dans le Tableau III-2. La comparaison des valeurs moyennes montre que l'addition de 2 groupes méthylène à une chaîne hydrocarbonée d'un tensioactif conduit à la diminution de la CA^{ADN} d'approximativement 10 fois.

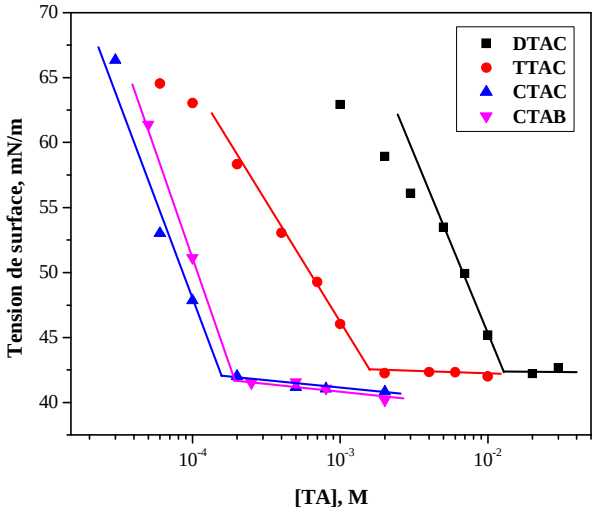
Méthode	[CTAC], M	[TTAC], M	[DTAC], M
Titration par fluorescence	$2,15x10^{-5}$	$1,5x10^{-4}$	$1,5x10^{-3}$
Intensité de la lumière diffusée	$2,2x10^{-5}$	$2,5x10^{-4}$	$1,9x10^{-3}$
Electrophorèse sur gel d'agarose	$2x10^{-5}$	$3x10^{-4}$	$2x10^{-3}$
Valeur moyenne	*$2,1x10^{-5}$*	*$2,3x10^{-4}$*	*$1,8x10^{-3}$*

Tableau III-2 : Comparaison des valeurs de CA sur ADN du CTAC, TTAC et DTAC obtenues par les différentes méthodes

Après cette étude, il était intéressant de comparer l'influence de chaîne hydrophobe sur la micellisation et sur l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN. Une telle comparaison pourra montrer des différences ou des similitudes entre ces deux processus.

III.2.5. Comparaison de la micellisation et de l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN de type triméthylammonium

Toutes les études de complexation entre l'ADN et les tensioactifs ont été réalisées dans un tampon 30 mM Tris/HCl. Pour comparer les processus de micellisation et d'agrégation sur l'ADN des tensioactifs de type triméthylammonium, nous avons déterminé et comparé les CMC du CTAB, CTAC, TTAC et du DTAC dans ce tampon par la méthode de goutte pendante. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la Figure III-17.



FigureIII-17. Mesures de CMC de CTAB, CTAC, TTAC et DTAC dans le tampon 30 mM Tris/HCl à 25ºC

Les valeurs de CMC des tensioactifs mesurées dans le tampon et les valeurs de CA sur ADN sont rassemblées dans le Tableau III-3. On peut observer que les tensioactifs s'agrègent sur l'ADN à des concentrations environ 10 fois plus faibles que leur CMC.

Tensioactif	CMC ds le Tris/HCl, M	$CAC^*_{TA}{}^{ADN}$ ds Tris/HCl , M
CTAB	$2x10^{-4}$	$2,3x10^{-5}$
CTAC	$1,3x10^{-4}$	$2,1x10^{-5}$
TTAC	$1,4x10^{-3}$	$2,3x10^{-4}$
DTAC	$1,1x10^{-2}$	$1,8x10^{-3}$

* $CAC_{TA}{}^{ADN}$ – valeur moyenne (DLS, gel, fluorescence)

Tableau III-3 : La comparaison de CMC avec les CA sur ADN (à $[ADN\text{-}PO_4^-] = 3x10^{-6}$ M) de CTAB, CTAC, TTAC et DTAC dans le tampon 30mM Tris/HCl à 25ºC

La micellisation des tensioactifs dépend de la longueur de leurs chaînes, et son influence sur la micellisation peut être décrite par l'équation de Klevens (Equation III-1). Cette équation montre que le logarithme de la CMC diminue linéairement avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne hydrophobe [21,22].

$$\log CMC = A - Bn_c$$

Equation III-1

Où

n_c - nombre d'atomes de carbone dans la chaîne hydrophobe C_nH_{n+1}

A - constante qui dépend de la nature de la tête polaire du tensioactif, de la température et de la présence d'électrolytes inertes

B - constante représentant la contribution de chaque groupe méthylène dans l'abaissement de la CMC

Nous avons porté les valeurs de la CMC ainsi que de la CA^{ADN} des tensioactifs étudiés en fonction de leur longueur de chaîne selon l'équation de Klevens (Figure III-18).

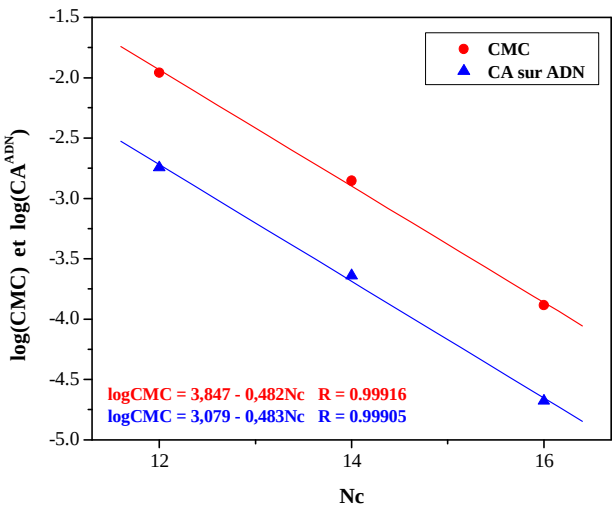


Figure III-18 : Les courbes de Klevens de micellisation et d'agrégation sur ADN de chlorures d'alkyltriméthylammonium dans 30 mM Tris/HCl à 25ºC

On constate que les deux processus montrent une dépendance linéaire du logarithme de la concentration d'agrégation en fonction de la longueur de la chaîne, ce qui est en accord

avec l'équation de Klevens. Ceci nous permet de calculer les valeurs du paramètre B de micellisation (0,482 ± 0,020) et d'agrégation sur l'ADN (0,483 ± 0,021). Dans les deux cas ce paramètre est pratiquement le même. Ce résultat confirme bien un mécanisme hydrophobe d'agrégation prémicellaire de tensioactifs sur l'ADN dans la région I.

Après les études de l'effet de la nature du contre-ion et de la longueur de la chaîne de ces tensioactifs sur leurs interactions avec l'ADN, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de la nature de la tête polaire sur ce processus. Dans la littérature il existe peu d'exemple d'une telle étude [23,24].

III.2.6. L'effet de la tête polaire

Pour examiner l'effet de la tête polaire des tensioactifs sur la complexation avec l'ADN nous avons comparé les CA^{ADN} de deux tensioactifs : le chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC) et le chlorhydrate de N-dodécylamino-1-déoxyglucitol (Ghyd12HCl). Ces deux tensioactifs contiennent 12 atomes de carbone dans les chaînes hydrophobes et le chlorure comme contre-ion. Ils ne diffèrent que par la structure des têtes polaires : le DTAC a une tête triméthylammonium, tandis que le Ghyd12HCl présente un fragment glucose au niveau de la tête ammonium (Figure III-19).

Le choix d'un tensioactif avec une tête polaire sucre a été guidé par l'éventuelle possibilité d'interactions par liaisons hydrogènes supplémentaires entre les groupes hydroxyles des glucoses et entre le glucose et les phosphates de l'ADN.

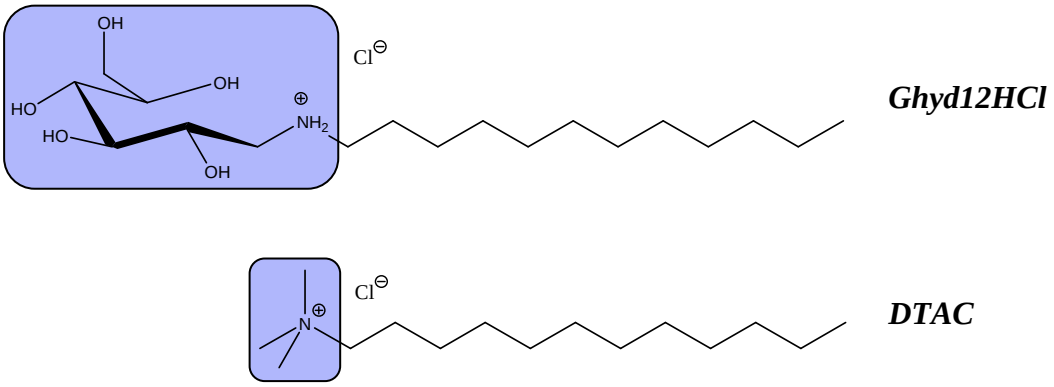


Figure III-19 : Structures de chlorhydrate du N-dodecylamino-1-deoxyglucitol (Ghyd12HCl) et du chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC)

III.2.6.1. *Synthèse et caractérisation physico-chimique de Ghyd12HCl*

La première étape de la synthèse du Ghyd12HCl consiste en une interaction entre le glucose et la dodécylamine (Figure III-20). Le glucose existe en deux formes tautomériques : la forme pyrannosique fermée et la forme aldolique ouverte. La dodécylamine interagit avec la forme ouverte du glucose pour former une base de Schiff. Ce dernier existe aussi sous deux formes tautomériques : ouverte et fermée. La réduction de la forme ouverte par la tétrahydroborate de sodium conduit à la formation du N-dodécylamino-1-deoxyglucitol (Ghyd12). Le chlorhydrate du N-dodécylamino-1-deoxyglucitol se forme à la suite de la neutralisation de Ghyd12 par l'acide chlorhydrique.

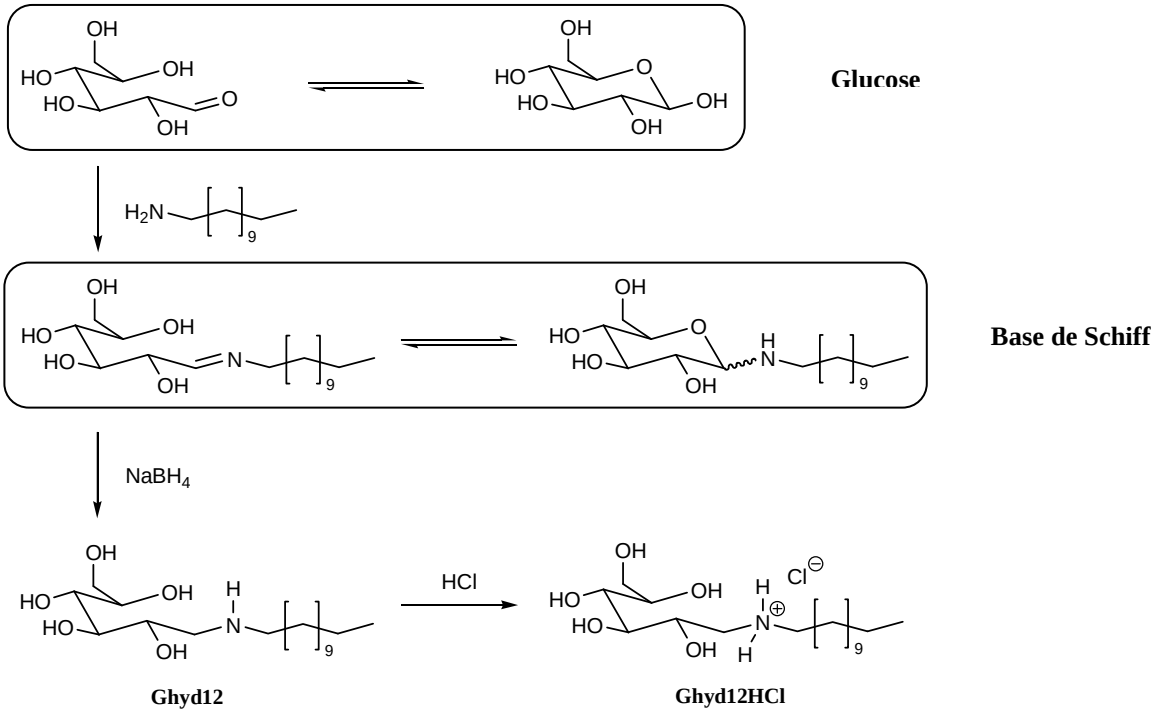


Figure III-20 : Synthèse du chlorhydrate de N-dodecylamino-1-deoxyglucitol (Ghyd12HCl)

En raison de la faible solubilité du produit, nous n'avons pas réussi à déterminer la CMC de Ghyd12HCl. L'étude tensiométrique a montré que la tension de surface de ce tensioactif n'atteint pas le palier de micellisation avant la limite de solubilité (Figure III-21).

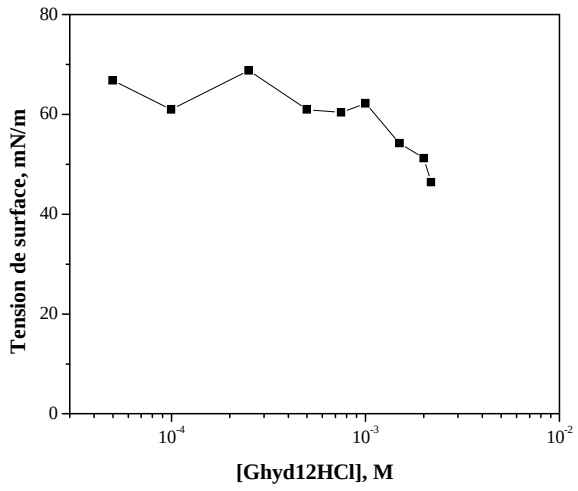
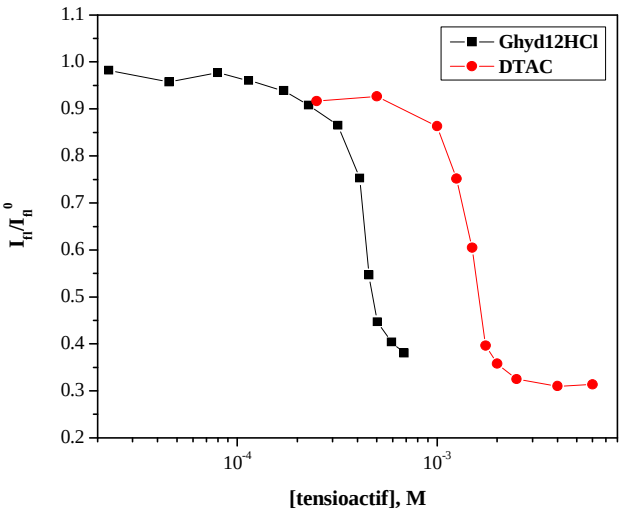


Figure III-21 : Comportement en tensiométrie du Ghyd12HCl dans l'eau à 25ºC

III.2.6.2. *Comparaison de la complexation du DTAC et du Ghyd12HCl avec l'ADN*

Les CA^{ADN} de Ghyd12HCl et de DTAC ont été comparées par la titration par fluorescence. Ces résultats sont représentés sur la Figure III-22. On voit que la CA sur ADN de Ghyd12HCl (4,4 $x10^{-4}$M) est 4 fois plus faible que celle de DTAC (1,8$x10^{-3}$M).



FigureIII-22 : Comparaison de l'interaction de l'ADN avec le chlorhydrate de N-dodecylamino-1-deoxyglucitol (Ghyd12HCl) et le chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC) par titration par fluorescence dans 30mM Tris/HCl à 25ºC

Comme les longueurs de chaîne des tensioactifs étudiés sont ici identiques, on peut expliquer cette différence de complexation par la possible participation de liaisons hydrogène

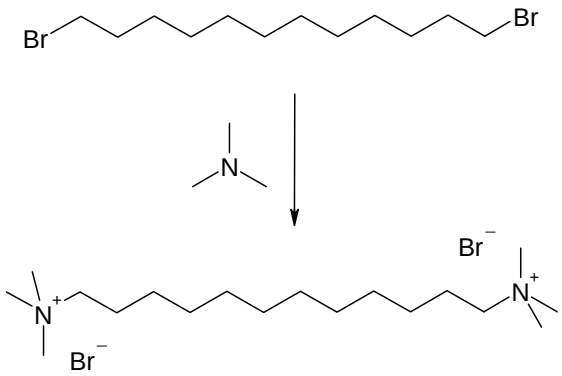
de la partie sucre du Ghyd12HCl. De telles liaisons peuvent diminuer les répulsions électrostatiques entre les têtes et ainsi faciliter une agrégation en prémicelles. L'existence de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle du glucose et les phosphates de l'ADN peut aussi être envisagée.

A partir de ces résultats une conclusion importante peut en découler : même si ce tensioactif ne forme pas de micelles à 25°C, il est capable de conduire à une agrégation prémicellaire sur un polyélectrolyte, tel que l'ADN.

Les tensioactifs monocaténaires à une tête polaire sont capables de modifier à la fois la conformation de l'ADN (compaction), et le milieu autour de l'acide nucléique (formation d'une couche hydrophobe). Comme nous voulions évaluer l'influence de ces deux effets sur la formation de dommages, nous avons également étudié la complexation entre l'ADN et un bolaforme. Grâce à la présence de deux têtes polaires, les bolaformes pourront être plus efficaces en termes de compaction, tout en apportant moins d'hydrophobie au complexe.

III.2.7. Complexation ADN-tensioactifs bolaformes

Pour cette étude nous avons synthétisé le dibromure de 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12) par action du 1,12-dibromododécane sur un excès de triméthylamine (Figure III-23) [25,26]. Ce produit est un tensioactif bolaforme cationique avec une chaîne de 12 atomes de carbone, deux groupes triméthylammonium polaires et un bromure comme contre-ion.



Bol12

Figure III-23. Synthèse et structure du dibromure de 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12)

La complexation entre l'ADN et le Bol12 a été étudiée par titration par fluorescence. Les résultats sont présentés sur la Figure III-24. On constate que le Bol12 complexe l'ADN mais sur une très large gamme de concentration en tensioactif (de $1{,}5x10^{-3}$ à $2x10^{-2}$M). La complexation ADN-Bol12 est donc moins coopérative que celle ADN-tensioactifs monocaténaires à une tête polaire.

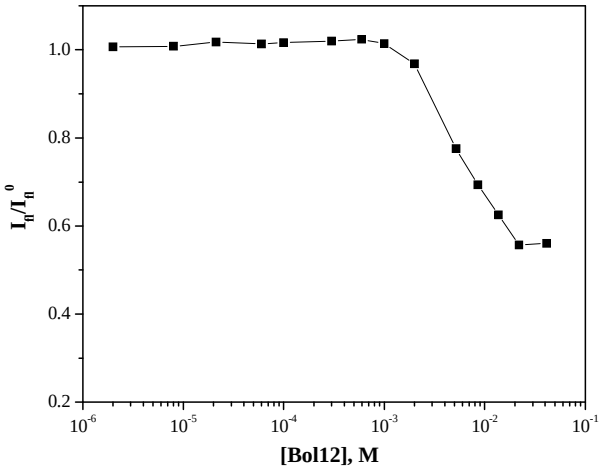


Figure III-24 : Etude de la complexation entre l'ADN et le Bol12 par titration par fluorescence dans 30mM Tris/HCl à 25ºC

Nous avons également étudié la complexation entre l'ADN et le Bol12 par les mesures de l'intensité de la lumière diffusée (Figure III-25). Les résultats correspondent bien aux résultats de titration par fluorescence. On observe une faible augmentation de l'intensité de la lumière diffusée autour d'une concentration en Bol12 de $1x10^{-3}$M, et une augmentation plus importante à $3x10^{-2}$M. Ce résultat montre que le Bol12 complexe l'ADN, mais le mécanisme semble différent de celui de la complexation entre l'ADN et les tensioactifs présentant une seule tête polaire. Nous pouvons supposer que l'augmentation brutale de l'intensité de la lumière diffusée aux concentrations les plus importantes en Bol12 correspond à l'agrégation des complexes formés. En raison de la présence de deux têtes polaires terminales, le Bol12 est capable de ponter deux molécules d'ADN par des liaisons électrostatiques, ce qui peut conduire à une augmentation importante de la taille des complexes ADN-Bol12.

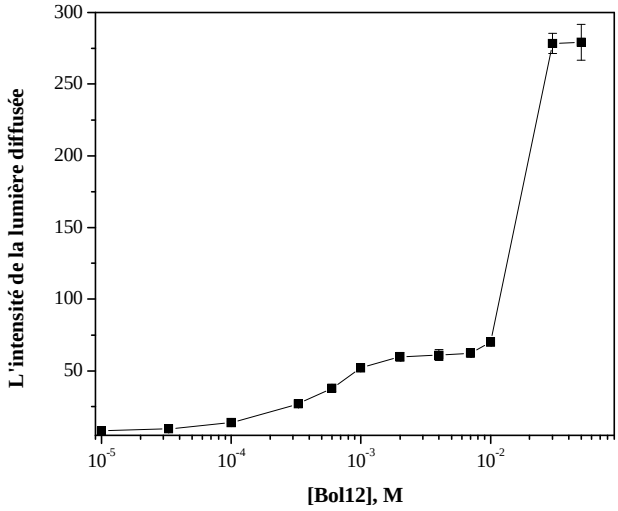


Figure III-25 : L'étude de la complexation entre l'ADN et le Bol12 par mesure de l'intensité de la lumière diffusée dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC; Θ = 90˚, λ = 632,8 nm

Après les études de la complexation avec des agents cationiques qui sont capables d'apporter de l'hydrophobie aux complexes avec l'ADN, nous avons étudié la complexation entre l'ADN et des sels. Ces derniers ne sont pas amphiphiles, ils ne modifieront donc pas la nature du milieu environnant l'acide nucléique.

III.3. Complexation ADN-sels

Nous avons étudié l'influence de sels organiques et inorganiques sur le déplacement du bromure d'éthidium lors de la titration par fluorescence. Il est connu que pour des concentrations importantes en sels, ces derniers induisent la compaction de l'ADN en raison de l'écrantage des charges des groupes phosphates de l'acide nucléique [27,28]. Il a également été observé que les ions métalliques mono- et divalents participent à la neutralisation des charges de l'ADN dans les nucléosomes car les histones neutralisent seulement 57% des phosphates de l'ADN [29].

Pour cette étude, nous avons choisi de comparer la compaction de l'ADN par deux sels de cations monovalents : le chlorure de sodium (NaCl) et le bromure de tétraméthylammonium (NMe_4Br). Le NaCl a été choisi car c'est électrolyte le plus courant dans les fluides biologiques. Le choix du NMe_4Br a été guidé par le fait qu'il s'agit d'un sel d'ammonium ne présentant pas d'hydrophobie et de comportement tensioactif, mais comparable aux tensioactifs de type triméthylammonium utilisés précedemment. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III-26.

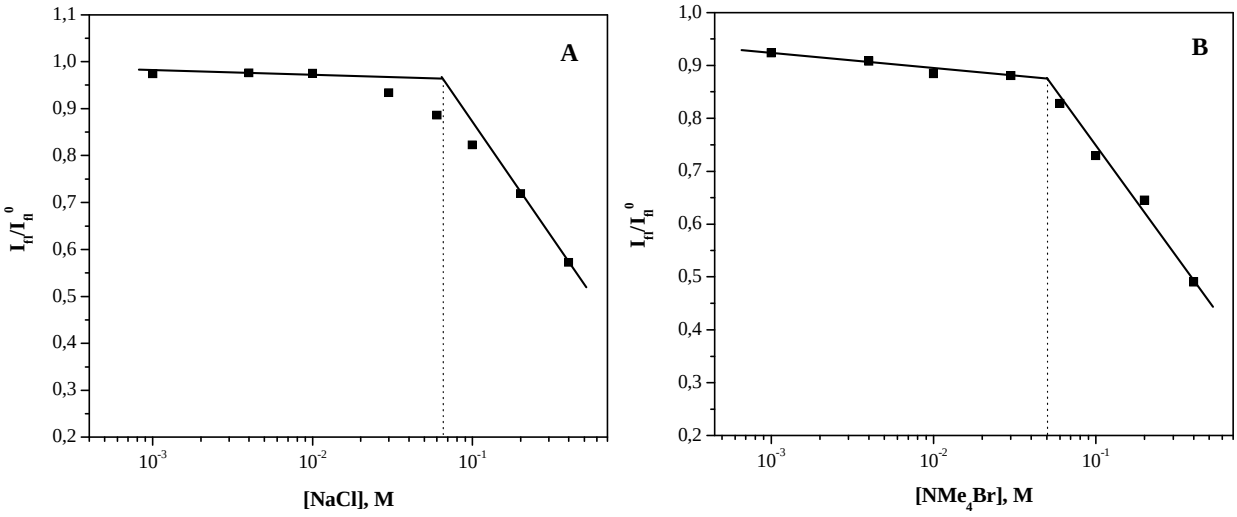
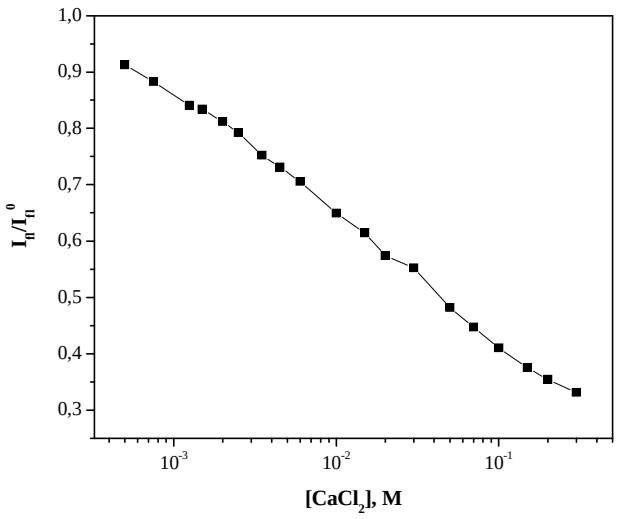


Figure III-26 : Comparaison par titration par fluorescence de la compaction de l'ADN avec des sels de cations monovalents : A - le chlorure de sodium (NaCl), B - le bromure de tétraméthylammonium (NMe_4Br) ; 30mM Tris/HCl, T = 25ºC

Les résultats montrent que de très importantes concentrations en sel sont nécessaires pour interagir avec l'ADN. Ces concentrations sont beaucoup plus importantes que dans le cas des tensioactifs, montrant une fois de plus l'importance de l'effet hydrophobe lors de l'interaction avec l'ADN. Ces résultats concordent également avec les données de la littérature [4]. Les concentrations en sels correspondant au début du déplacement du bromure d'éthidium sont très proches : (0,065M pour le NaCl et 0,05M pour le NMe_4Br). La neutralisation et la compaction de l'ADN n'est donc pas sensible à la nature du cation, mais dépend plutôt de la force ionique de la solution.

Nous avons également étudié l'effet de sel d'un cation bivalent : le chlorure de calcium ($CaCl_2$). Ce dernier est capable de complexer les bases de l'ADN ainsi que ces groupes phosphatées [30]. Les cations calcium sont connus pour compacter efficacement l'ADN [30-34] grâce à son affinité pour les ions phosphates. Le phosphate de calcium a même été utilisé pour la transfection des gènes [35].

Le résultat de la titration par fluorescence d'un complexe ADN-BET par le $CaCl_2$ est présenté sur la Figure III-27. On y voit que l'effet du $CaCl_2$ diffère beaucoup des effets des sels de cations monovalents. L'addition de chlorure de calcium conduit à une diminution linéaire sur une échelle logarithmique de la fluorescence de BET. Cet effet commence même aux faibles concentrations en $CaCl_2$.



FigureIII-27 : Etude de l'interaction entre l'ADN et le $CaCl_2$ par titration par fluorescence dans le 30mM Tris/HCl à 25ºC

Ce résultat confirme l'efficacité d'un cation bivalent tel que le calcium sur un cation monovalent en terme de compaction de l'ADN

III.4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié la complexation entre l'ADN et différents agents cationiques (tensioactifs monocaténaires à une tête polaire, tensioactif bolaforme, sels) dans le milieu qui servira ensuite à l'étude des dommages photoinduits. Les agents cationiques utilisés ont été choisis en tenant compte de leurs effets sur la conformation de l'ADN et sur l'environnement qu'ils apportent autour de ce dernier.

Les tensioactifs monocaténaires à une tête polaire sont capables de complexer l'ADN à de faibles concentrations grâce aux interactions hydrophobes entre les chaînes hydrocarbonées. L'influence de différents facteurs sur leur complexation avec l'ADN a été étudiée:

- *la concentration en ADN*

  Nous avons confirmé expérimentalement l'existence de deux domaines de complexation ADN-tensioactifs selon la concentration en ADN. Aux faibles concentrations en ADN (région I : $[ADN\text{-}PO_4^-] < CAC^{ADN}_{TA}$) le mécanisme de complexation est majoritairement d'origine hydrophobe. Le tensioactif forme des structures prémicellaires à la concentration critique d'agrégation sur ADN (CAC^{ADN}_{TA}). Par contre aux concentrations en ADN plus élevées (région II : $[ADN\text{-}PO_4^-] > CAC^{ADN}_{TA}$) la présence d'un excès des charges négatives d'ADN par rapport à la CAC^{ADN}_{TA} oblige leur neutralisation. Dans ce cas le mécanisme de complexation est principalement d'origine électrostatique et ce processus se termine après totale neutralisation des charges de l'ADN ($[TA] = [ADN\text{-}PO_4^-]$).

- *la longueur de chaîne*

  Tout comme la longueur de chaîne est primordiale pour l'agrégation des tensioactifs dans l'eau, elle joue aussi un rôle important dans la complexation ADN-tensioactifs lors du mécanisme hydophobe (région I). L'accroissement de la longueur de chaîne de deux groupes méthylene conduit à une diminution de 10 fois la valeur de la CAC^{ADN}_{TA}. La comparaison de la micellisation avec l'agrégation sur l'ADN (région I) des tensioactifs a montré que ce dernier processus est contrôlé par les interactions hydrophobes.

- *la nature de la tête polaire*

  L'étude comparative de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs à tête triméthylammonium et 1-déoxyglucitolammonium a montré que la possibilité d'établir des liaisons hydrogène chez ce dernier diminue la valeur de la CAC^{ADN}_{TA}. Il a été

également montré que même si un tensioactif à la température choisie ne forme pas de micelles (trop faible solubilité), il peut être capable de former des structures prémicellaires sur un polyélectrolyte, tel que l'ADN.

L'étude de la complexation de l'ADN avec le tensioactif bolaforme (Bol12) a montré que ce dernier est capable de provoquer l'agrégation des complexes formés avec l'acide nucléique. Cette aptitude rend aussi ces tensioactifs plus efficaces pour la compaction de l'ADN. Le fait que la concentration en Bol12 nécessaire pour la complexation de l'ADN soit plus importante que celle d'un tensioactif à une tête polaire de longueur de chaîne identique (DTAC) montre que le Bol12 est moins hydrophobe que le DTAC.

Il a été également montré que les sels étudiés interagissent avec l'ADN à des concentrations beaucoup plus importantes que les tensioactifs. Cette observation souligne l'importance de la chaîne hydrophobe pour la complexation de l'ADN. Les cations métalliques divalents sont plus efficaces que les cations monovalents. Ces sels ne présentent pas d'hydrophobie, et donc ne forment pas d'environnement hydrophobe autour de l'ADN.

La détermination des concentrations auxquelles tous les agents cationiques choisis interagissent avec l'ADN va nous permettre d'étudier l'influence de la complexation de l'ADN sur la formation de dommages photoinduits, influence examinée dans le chapitre suivant. L'effet de la compaction de l'acide nucléique et l'effet de la modification de son environnement par ces agents cationiques seront également soulignés.

Références

[1] Pattarkine, M.V., Ganesh, K.N., *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**, *263*, 41-46

[2] Jadhav, V.M., Valaske, R., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2008**, *112(29)*, 8824-8831

[3] Dasgupta, A., Das, A.P., Dias, R.S., Miguel, M.G., Lindman, B., Jadhav, V.M., Gnanamani, M., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2007**, *111*, 8502-8508

[4] Bhattacharya, S., Mandal, S.S., *Biochim Biophys A*, **1997**, *1323*, 29-44

[5] Izumrudov, V.A., Zhyryakova, M.V., Goulko, A.A., *Langmuir*, **2002**, *18*, 10348-10356

[6] Dias, R.S., Svingen, R., Gustavsson, B., Lindman, B., Miguel, M.G., Åkerman, B., *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2908-2917

[7] Spink, C.H., Chaires, J.B., *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 10920-10928

[8] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 9951-9956

[9] Zhu, D.-M., Evans, R.K., *Langmuir*, **2006**, *27*, 3735-3743

[10] McLoughlin, D., Delsanti, D., Tribet, C., Langevin, D., *Europhys Lett*, **2005**, *69(3)*, 461- 467

[11] Bonincontro, A., Marchetti, S., Onori, G., Rosati, A., *Chem. Phys.* **2004**, *312*, 55-60

[12] McLoughlin, D., Langevin, D., *Coll and Surf A :Physicochem Eng Asp*, **2004**, *250*, 79-87

[13] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2005**, *109*, 3676-3680

[14] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2006**, *110*, 24761-24765

[15] Goracci, L., Germani, R., Savelli, G., Bassani, D.M., *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 197-203

[16] Matulis, D., Rouzina, I., Boomfield, V.A., *J Am Chem Soc*, **2001**, *124*, 7331-7342

[17] Bathaie, S.Z., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., *Nucl Acids Res*, **1999**, *27(4)*, 1001-1005

[18] Grueso, E., Sanchez, F., *J Phys Chem B*, **2008**, *112*, 698-702

[19] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 2401-2408

[20] Dias, R.S., Pais, A.A.C.C., Miguel, M.G., Lindman, B., *Coll Surf A*, **2004**, *250*, 115-131

[21] Klevens, H., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1953**, *30*, 74-80

[22] López-Díaz, D., Velázquez, M.M., *The Chemical Educator*, **2007**, *12(5)*, 327-330

[23] Jadhav, V., Maiti, S., Dasgupta, A., Das, P.K., Dias, R., Miguel, M.G., Lindman, B., Biomacromolecules, **2008**, *9*, 1852-1859

[24] Rosa, M., Moràn, M.C., Miguel, M.G., Lindman, B., *Coll Surf A*, **2007**, *301*, 361-375

[25] Calas, M., Cordina, G., Bompart, J., Ben Bari, M., Jei, T., Ancelin, M.L., Vial, H., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 3557-3566

[26] Calas, M., Ancelin, M.L., Cordina, G., Portefaix, P., Piquet, G., Vidal-Sailhan, V., Vial, H., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 505-515

[27] Zinchenko, A.A., Yoshikawa, K., *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 4118-4123

[28] Bugs, M.R., Cornélio, M.L., *Photochem. Photobiol.*, **2001**, *74(4)*, 512-520

[29] Morgan, J.E., Blankenship, J.W., Mattheus, H.R., *Biochemistry*, **1987**, *26*, 3643-3649

[30] Hackl, E.V., Kornilova, S.V., Blogoi, Y.P., *Int. J. of Biol. Macromol.*, **2005**, *35*, 175-191

[31] Ahmad, R., Arakawa, H., Tajmir-Riahi, H.A. *Biophys. J.*, **2003**, *84*, 2460-2466

[32] Polyanichenko, A.M., Chikhirzhina, E.V., Andrushchenko, V.V., Kostyleva, E.I., Wieser, H., Vorov'ev, V.I., *Mol Biol (Mosk).*, **2004**, *38(4)*, 701-712

[33] Wieser, H., Vorov'ev, V.I., *Mol Biol (Mosk).*, **2004**, *38(4)*, 590-599

[34] Hackl, E.V., Blagoi, Y.P., *Biopolymers*, **2005**, *77*, 315-324

[35] Spear, D.H., Edwards, P.A., brevet US 5330904, 19 Juillet **1994**

Chapitre IV

INFLUENCE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN SUR SA COUPURE PHOTOINDUITE

Chapitre IV. INFLUENCE DE LA COMPLEXATION DE L'ADN SUR SA COUPURE PHOTOINDUITE

IV.1 Introduction **153**

IV.2 Etude par résonance paramagnétique électronique (RPE) des espèces formées au cours de la photolyse de la benzophénone **156**

IV.2.1 Etude RPE en présence de DMPO 156

IV.2.2 Etude RPE en présence de 4-oxo-TEMP 157

IV.3 Influence des tensioactifs sélectionnés sur la photosensibilisation de coupures simple brin d'ADN **158**

IV.3.1 Effet du contre-ion et de la longueur de la chaîne 159

IV.3.2 Effet de la tête polaire 164

IV.3.2.1 Mise en évidence d'un environnement hydrophobe lors de la complexation ADN-tensioactifs 165

IV.3.3 Influence du Bol12 sur la photosensibilisation de coupures simple brin 170

IV.4 Influence de NaCl et NMe4Br sur la photosensibilisation de coupures simple brin **171**

IV.5 Etude mécanistique de la formation de coupure simple brin photosensibilisée par la benzophénone sur l'ADN seul et sur l'ADN complexé par le CTAB **174**

IV.6 Généralisation de la méthode et possibles applications **176**

IV.7 Influence de la complexation ADN - polymères ou ADN - lipides cationiques sur la photosensibilisation de coupures simple brin **178**

IV.7.1. Complexation ADN-polymères cationiques et son influence sur la photosensibilisation de coupures simple brin 179

IV.7.1.1. Complexation ADN-PEI 180

IV.7.1.2. Complexation ADN-PNBHCl 180

IV.7.1.3. Comparaison de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et des polyélectrolytes 181

IV.7.1.4. Influence de la complexation de l'ADN avec le PEI et le PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin 183

IV.7.1.5. Comparaison de l'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et du PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin 184

IV.7.2. Influence d'un lipide cationique sur la photosensibilisation de coupures simple brin 185

IV.8. Conclusion **187**

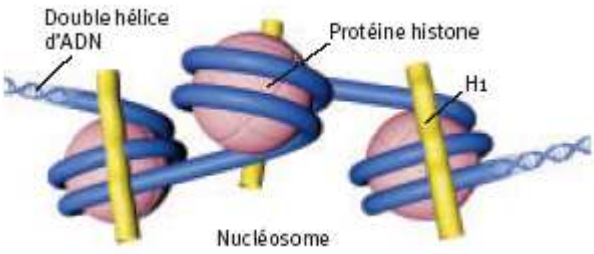
Références **189**

IV.1. Introduction

L'ADN est le support de l'hérédité et de l'information génétique, car il constitue le génome des êtres vivants et se transmet en totalité ou en partie lors des processus de reproduction. Son rôle est de conserver l'information nécessaire à la production des protéines dont les cellules vivantes ont besoin.

Dans les cellules, l'ADN est soumis continuellement à des activités métaboliques normales et à des facteurs environnementaux pouvant porter atteinte à son intégrité. Ces facteurs environnementaux sont le plus souvent de nature chimique comme les radicaux libres de l'oxygène et les agents alkylants, ou physique, comme les radiations ultraviolettes et les rayonnements ionisants. On estime entre mille et plus d'un million le nombre de lésions par cellule et par jour [1]. L'importance de ces lésions est telle que la cellule elle-même ne pourrait se reproduire ou donnerait naissance à des cellules-filles non viables si n'intervenaient pas différents processus de réparation [2-5].

L'ADN cellulaire est une très longue molécule qui se localise dans les noyaux cellulaires sous une forme compactée, appelée chromatine. Suite à l'empaquetage de l'ADN, les 2 mètres du filament génétique peuvent être contenus dans le noyau d'une seule cellule. Les principales unités de compaction de la chromatine sont des nucléosomes (Figure IV-1), ou l'ADN change de conformation en s'enroulant autour de complexes de protéines appelés histones.



FigureIV-1 : Niveau nucléosomique de la compaction de l'ADN

Par ailleurs, il a été observé que les polyélectrolytes peuvent changer de conformation par complexation avec divers agents cationiques [6,7]. L'ADN étant un polyélectrolyte anionique, sa conformation nucléosomique pourrait être mimée par complexation avec des agents cationiques. Une telle démarche permettrait de disposer d'un outil original pour étudier

l'influence de la conformation de l'ADN et de son environnement sur la formation de ses dommages.

L'étude de l'influence de la complexation de l'ADN par des agents cationiques sur la formation de dommages de l'acide nucléique constitue un sujet innovant riche en perspectives interdisciplinaires. Il n'y a que très récemment qu'un article sur ce sujet a été publié en 2008 par Yoshikawa et al. [8] Les auteurs ont comparé les intensités de coupures double brin d'un acide nucléique provoquées par l'irradiation γ de l'ADN libre et de l'ADN complexé par une polyamine (spermidine). Les résultats ont montré qu'en état compacté l'ADN était plus stable vis-à-vis de l'irradiation γ. Cet effet a été expliqué par la diminution de l'aire effective de molécules d'ADN lors de sa compaction par la spermidine.

Pour notre part, nous avons étudié l'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs cationiques et des sels sur la formation de coupures simple brin. Nous avons également étudié l'influence de polymères et de lipides sur ce processus, car ces derniers sont utilisés pour la transfection de gènes.

Pour ces études nous avons choisi un ADN plasmidique pBR322, car une coupure simple brin de la forme superenroulée (Forme I) de cet ADN conduit à sa forme circulaire relaxée (Forme II). Ces deux formes sont facilement séparables par électrophorèse sur gel d'agarose.

Pour visualiser l'ADN sur le gel d'agarose le bromure d'éthidium a été utilisé comme marqueur car l'intensité de sa fluorescence augmente significativement lorsqu'il est intercalé dans l'ADN. Par comparaison de l'intensité photodensitométrique des bandes correspondant à la forme I et la forme II de l'ADN, on peut déterminer le pourcentage de la forme coupée (forme II) de l'ADN. Pour cela nous avons utilisé l'équation suivante :

$$\%\,forme\ \ II = \%\,forme\ \ II^{0} - \frac{I_{forme\ II}}{1{,}66 I_{forme\ I} + I_{forme\ II}}$$

Equation IV-1

Où $\%\,forme\ \ II^{0}$ correspond à la teneur de la forme II dans l'ADN utilisé non-irradié, $I_{forme\ I}$ et $I_{forme\ II}$ sont respectivement les intensités des bandes de la forme I et de la forme II de l'ADN sur le gel d'agarose, et le coefficient 1,66 tient compte de la plus faible intercalation du bromure d'éthidium dans la forme superenroulée de l'ADN par rapport à la forme circulaire relaxée [9]. Les valeurs obtenues représentent ainsi le pourcentage de la forme

II de l'ADN dans l'échantillon. Une seule coupure de l'ADN superenroulé est suffisante pour la formation de la forme relaxée, mais la majorité des coupures postérieures à la forme II sont invisibles car ils ne conduisent pas à la formation de la forme linéaire de l'ADN. C'est pour cette raison que le pourcentage obtenu de la forme II ne correspond pas au pourcentage de coupures de l'ADN. Seules les coupures sur l'autre brin et à proximité d'une coupure simple brin peuvent conduire à la formation de la forme linéaire de l'ADN, ce qui reste peu probable sur un ADN de 4361 paires de bases.

Comme déjà présenté dans le chapitre I, la région UV de la lumière solaire est une des principales sources de dommages de l'ADN chez tous les organismes vivants. Cette région est divisée en trois domaines : UVC, UVB et UVA. Le maximum d'absorption de l'ADN est à 260 nm, et seuls les UVC et UVB sont responsables des dommages directs de l'ADN. Les UVA sont responsables de dommages indirects par le biais de photosensibilisateurs. Pendant l'irradiation, ces photosensibilisateurs sont capables de former des espèces oxygénées réactives comme les radicaux hydroxyle ou l'oxygène singulet. Ces derniers peuvent oxyder les bases azotées ou même couper les brins d'ADN.

Nous avons choisi d'utiliser la benzophénone comme photosensibilisateur. En effet, lorsque ce composé est irradié en présence d'ADN , il conduit à la formation de nombreux dommages *via* la mise en œuvre de différents mécanismes : le transfert d'énergie, le transfert d'électron et la formation d'EOR [10-12]. La benzophénone est donc un photosensibilisateur de choix pour étudier différents types de lésions sur l'ADN. Pour notre part, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la formation de coupures simple brin induites par les EOR. Lors de ce phénomène d'autres dommages de l'ADN peuvent également se former, mais seules les coupures sont détectables sur gel d'agarose.

Au préalable, nous avons analysé la nature des EOR générés par la benzophénone lors de sa photolyse en utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE) en présence de piégeurs de radicaux (DMPO et TEMP). Les conditions opératoires utilisées sont identiques à celles qui seront par la suite employées lors de l'étude en présence d'ADN.

IV.2. Etude par résonance paramagnétique électronique (RPE) des espèces formées au cours de la photolyse de la benzophénone

Ces expériences ont été réalisées en présence de deux piégeurs de spin, la 2,2,6,6-tetraméthyl-4-pipéridone (4-oxo-TEMP) et le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO).

IV.2.1. Etude RPE en présence de DMPO

Le DMPO peut former plusieurs types d'adduits, selon les espèces avec lesquelles il réagit [13,14] (Figure IV-2). Le piègeage du radical hydroxyle par le DMPO conduit à la formation d'un radical assez stable, le DMPO-OH, tandis que le piègeage de l'anion superoxyde mêne à la formation du radical DMPO-OOH, lequel se décompose rapidement en formant le DMPO-OH [15]. Ces adduits, radicalaires, sont détectables en RPE et présentent chacun un signal spécifique.

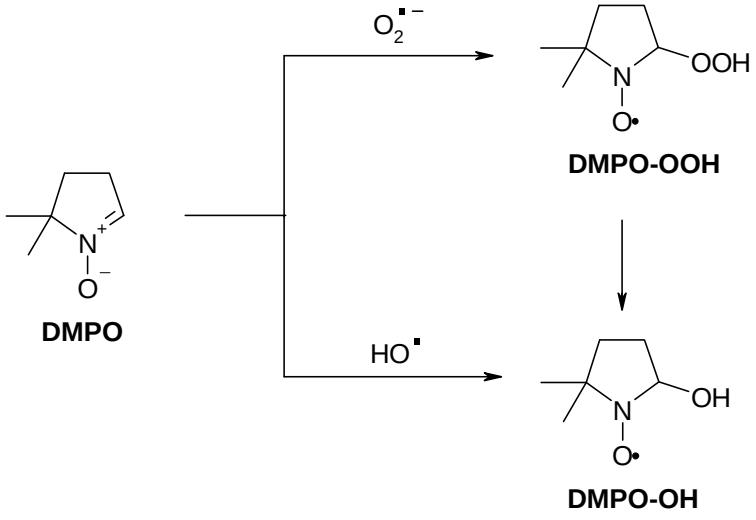


Figure IV-2 : Formation des adduits DMPO-OOH et DMPO-OH.

Nous avons réalisé l'irradiation de solutions de la benzophénone ($4{,}5 \times 10^{-5}$ M) dans du tampon Tris/HCl en présence de DMPO. Le spectre RPE obtenu (Figure IV-3) correspond bien au signal caractéristique du produit de piégeage de radical hydroxyl DMPO-OH (constantes de couplage : $A_N = A_H = 14{,}9$ G).

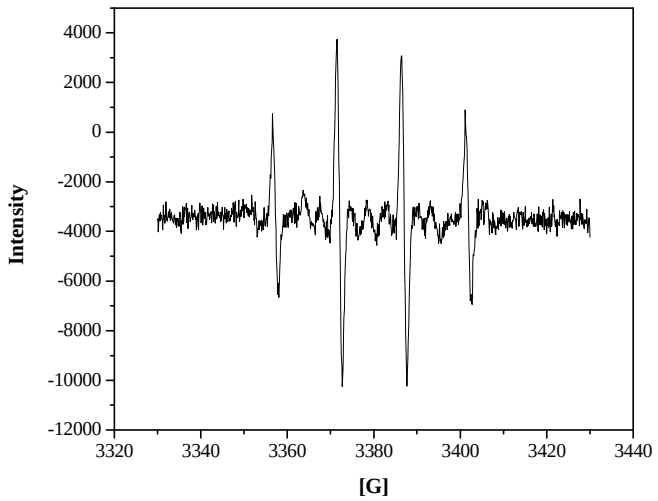


Figure IV-3 : Spectre RPE enregistré après 3 min d'irradiation (>320nm) de la benzophénone en présence de DMPO dans le tampon Tris/HCl à 25ºC, [benzophénone] = $4{,}5 \times 10^{-5}$ M, [DMPO] = 150 mM

Cette analyse confirme bien la génération de radicaux hydroxyle lors de l'irradiation de la benzophénone. Après cette étude, nous avons analysé si dans les mêmes conditions, la benzophénone pouvait aussi former de l'oxygène singulet ($^1O_2$).

IV.2.2. <u>Etude RPE en présence de 4-oxo-TEMP</u>

Le 4-oxo-TEMP est une molécule qui réagit avec l'oxygène singulet ($^1O_2$) pour donner une espèce radicalaire détectable en RPE, le 4-oxo-TEMPO [16], selon la réaction décrite sur la Figure IV-4.

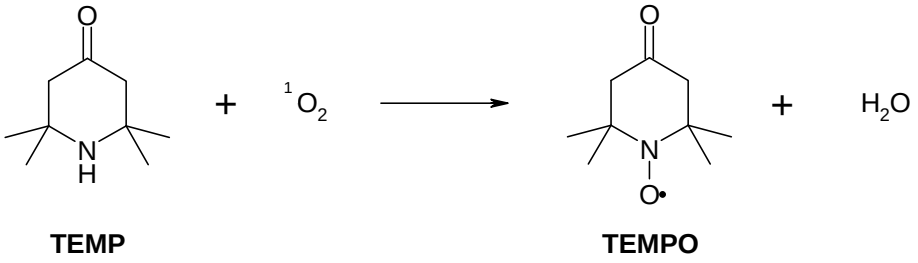


Figure IV-4 : Formation du radical TEMPO.

L'irradiation de la solution de benzophénone ($4{,}5 \times 10^{-5}$ M) dans du tampon 30mM Tris/HCl en présence de TEMP pendant 3 minutes conduit à la détection du signal

caractéristique du TEMPO (constante de couplage : A_N = 16,3 G), confirmant la production d'oxygène singulet lors de la photolyse de la benzophénone (Figure IV-5).

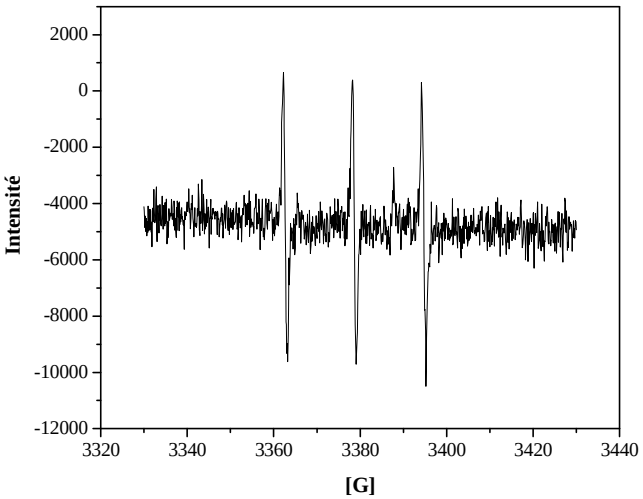


Figure IV-5 : Spectre RPE enregistré après 3 min d'irradiation (>320nm) de la benzophénone en présence de TEMP dans le tampon Tris/HCl à 25ºC, [benzophénone] = $4{,}5 \times 10^{-5}$ M, [TEMP] = 150 mM

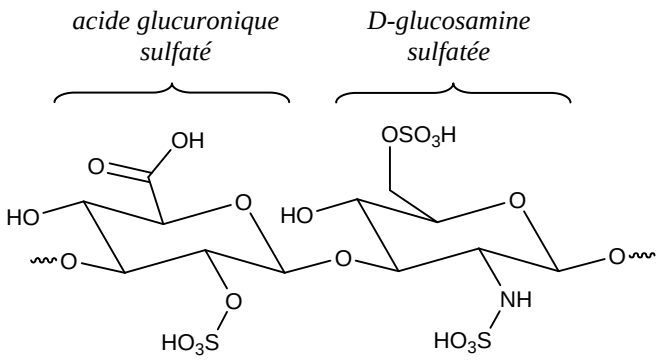
Ainsi conformément à la littérature, la benzophénone génère la production de ces deux types d'EOR.[11,17] Ces entités très réactives pourront interagir sur l'ADN et être à l'origine de la formation de photolésions.

Après ces analyses, nous avons étudié l'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs sur la formation de coupures simple brin photonduite lors de l'irradiation des complexes en présence de benzophénone. L'influence de la structure des tensioactifs sur ce processus (longueur de chaîne, nature du contre-ion et de la tête polaire) a également été appréciée .

IV.3. Influence des tensioactifs sélectionnée sur la photosensibilisation des coupures simple brin d'ADN

Pour cette étude, nous avons irradié l'ADN pBR322 plasmidique superenroulé en présence de benzophénone et à des concentrations croissantes en tensioactifs. Cette irradiation a conduit à la formation de coupures simple brin sur l'ADN *via* un mécanisme de type radicalaire. Le domaine d'irradiation utilisé étant située dans l'UVA (λ> 320nm), il permet d'éviter la formation de dommages directes. Au cours du chapitre précédent nous avions observé que la complexation entre l'ADN et des tensioactifs pouvait changer les propriétés migratoires de l'ADN sur le gel d'agarose. Ce phénomène peut masquer la séparation des

formes I et II de l'ADN et par conséquent, gêner la détection de coupures sur l'acide nucléique par cette méthode. Pour cette raison, après l'irradiation, le complexe ADN-tensioactif est désassemblé par une complexation compétitive avec un autre polyanion, soit une solution de sel de sodium de l'héparine (FigureIV-6). Ce dernier est un polysaccharide anionique composé de fragments sulfatés de D-glucosamine et d'acide glucuronique. Ce polyanion est d'ailleurs largement utilisé pour la décomplexation des complexes de l'ADN lors d'études de transfection [18].

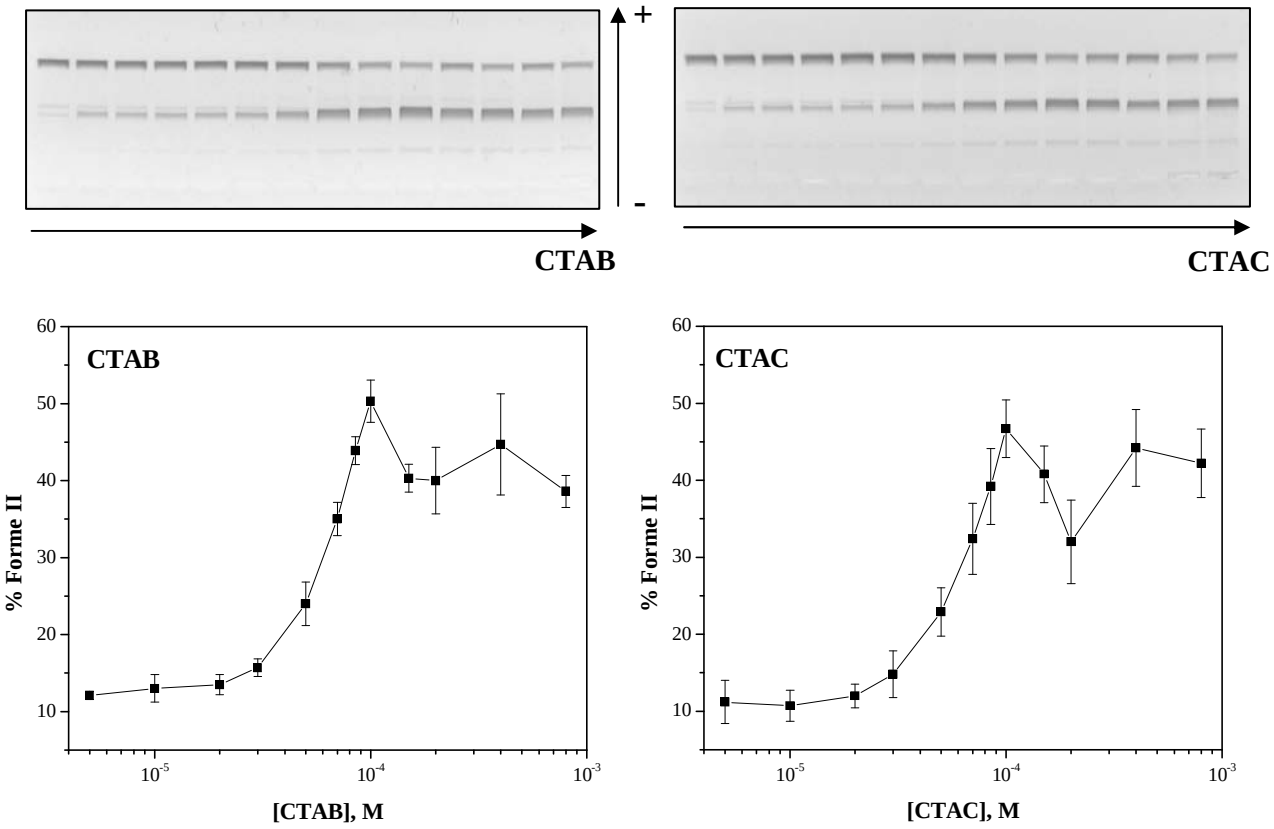


FigureIV-6 : Structure de l'héparine

Dans en premier temps, nous avons étudié les effets de la longueur de chaîne, de la nature du contre-ion et de la tête polaire des tensioactifs sur la formation de coupure photoinduite sur l'ADN.

IV.3.1. <u>Effet du contre-ion et de la longueur de la chaîne</u>

Nous avons comparé les effets du bromure et du chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAB et CTAC) sur la formation de coupures photoinduites sur l'ADN. Les résultats des expériences réalisées sont présentés sur la Figure IV-7. On constate que les effets de ces tensioactifs sur le pourcentage de forme II se ressemblent beaucoup. Dans les deux cas un maximum de coupures sur l'ADN à une certaine concentration en tensioactifs peut être observé. Les positions de ces maxima correspondent aux concentrations en tensioactifs égales à la concentration en phosphates de l'ADN, donc à la neutralisation de l'acide nucléique.



FigureIV-7 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du CTAB et du CTAC sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par la photosensibilisation de benzophénone; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Les études de l'influence du TTAC et du DTAC (respectivement C14 et C12) ont montré que pour ces tensioactifs la coupure de l'ADN passe également par un maximum (FigureIV-8). Toutefois, contrairement aux CTAB et CTAC, les positions de ces maxima ne correspondent pas à la neutralisation des charges de l'ADN mais à la valeur de la CA^{ADN}.

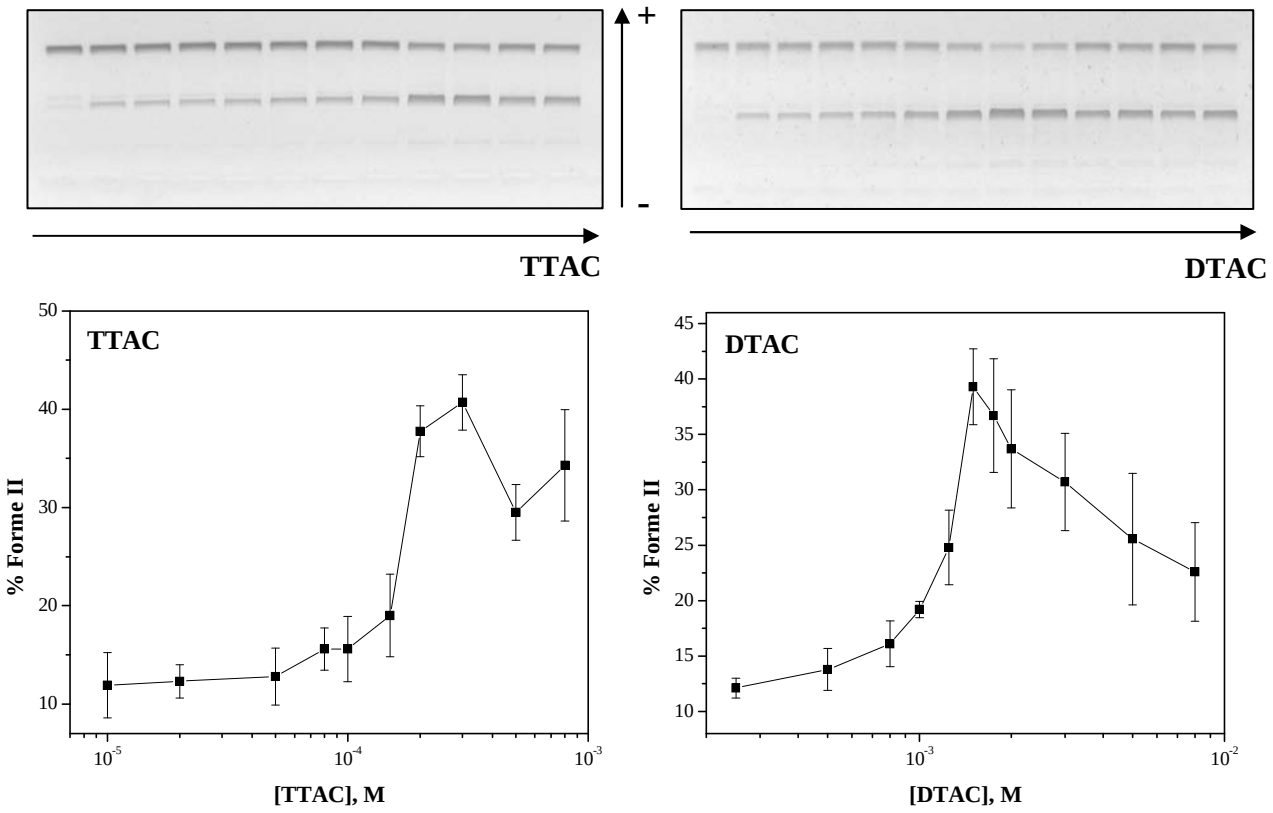


Figure IV-8 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du TTAC et du DTAC sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induits par la photosensibilisation de benzophénone; [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

La comparaison de la CA^{ADN} de ces tensioactifs avec la position de maxima de coupures est présentée dans le Tableau IV-1.

tensioactif	$[TA]_{max}$, M	CA_{TA}^{ADN}	résultats
CTAB	1x10^{-4}	2,3x10^{-5}	max = neutralisation
CTAC	1x10^{-4}	2,1x10^{-5}	max = neutralisation
TTAC	3x10^{-4}	2,3x10^{-4}	max = CA^{ADN}
DTAC	1,5x10^{-3}	1,8x10^{-3}	max = CA^{ADN}

Tableau IV-1 : Comparaison des CA^{ADN} et des concentrations en tensioactif correspondant à la position des maxima de coupures pour CTAB, CTAC, TTAC et DTAC ; [ADN-PO_4^-]=9x10^{-5}M, Tris/HCl, T = 25ºC

Ces résultats traduisent l'existence de deux régions de complexation entre l'ADN et les tensioactifs, ce qui est présenté graphiquement sur la Figure IV-9.

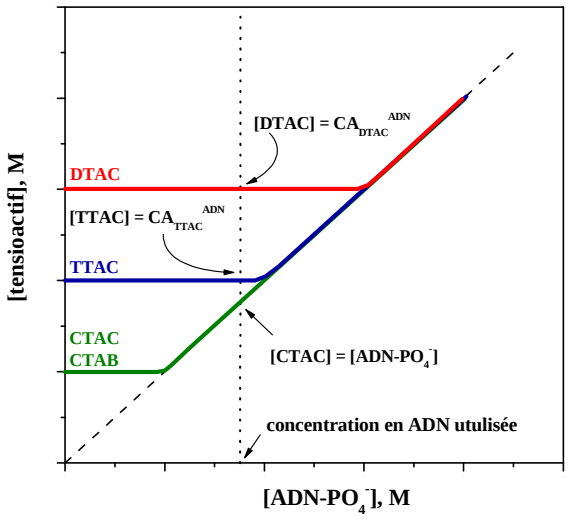


Figure IV-9 : Interprétation graphique des résultats de l'influence de CTAB, CTAC, TTAC et DTAC sur la coupure de l'ADN en fonction de la concentration en tensioactifs et en ADN

La concentration en ADN utilisée pour ces manipulations ($9x10^{-5}$M) se situe au-dessus de la CAC sur ADN du CTAB et CTAC mais en-dessous des CAC sur ADN du TTAC et du DTAC. C'est pour cette raison qu'avec cette concentration en ADN, pour le CTAC et le CTAB le complexe se forme suivant un mécanisme électrostatique (deuxième région), tandis que pour le TTAC et le DTAC le complexe se forme suivant un mécanisme hydrophobe jusqu'à la CAC sur ADN (première région). Dans tous les cas, la position des maxima de coupures de l'ADN semble bien correspondre à la complexation de ce dernier par ces tensioactifs.

Afin de confirmer cette observation, nous avons réalisé une expérience avec le CTAB, mais à une concentration en ADN de $1x10^{-5}$M PO_4^-, plus faible que la CA^{ADN}_{CTAB} ($2,3x10^{-5}$M). Nous avons gardé le même rapport [ADN]/[benzophénone] comme dans les expériences précédentes. Selon le diagramme de complexation entre l'ADN et des tensioactifs établi (chapitre III), le maximum de dommages à cette concentration en ADN doit correspondre à la CA^{ADN}_{CTAB} (Figure IV-10).

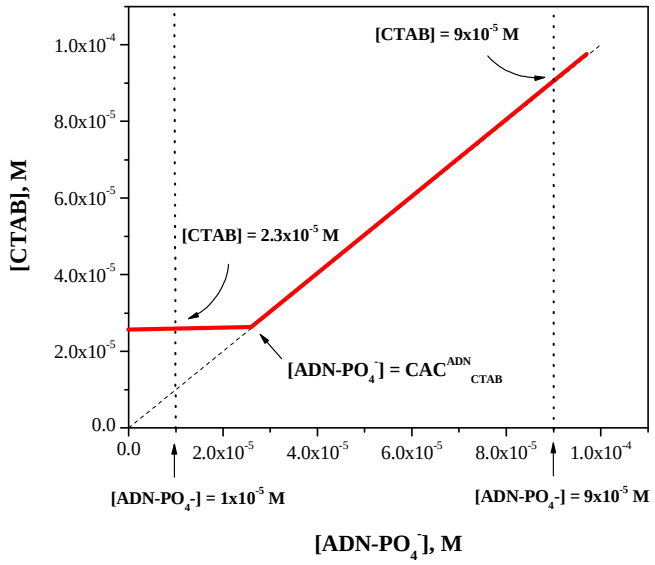


Figure IV-10 : Diagramme de complexation ADN-CTAB

A une telle concentration en acide nucléique, l'intensité des tâches sur gel d'agarose est trop faible pour déterminer avec précision le pourcentage de la forme II de l'ADN par photodensitométrie. Mais visuellement sur le cliché du gel d'agarose (FigureIV-11) on peut observer que l'augmentation du rendement de photocoupures sur l'ADN correspond à une concentration en CTAB égale à $3x10^{-5}$M. Cette valeur est très proche à la CA^{ADN}_{CTAB} ($2,3x10^{-5}$M) si l'on tient compte que cette dernière a été déterminée pour une concentration en ADN égale à $3x10^{-6}$ M PO_4^-.

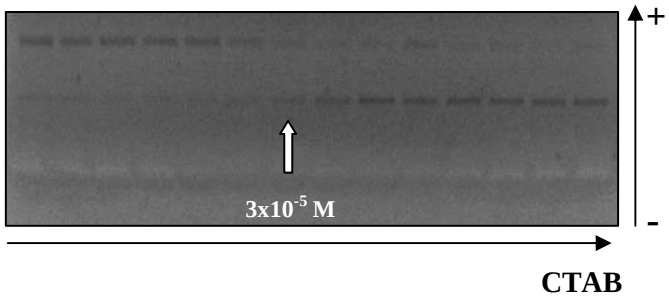


Figure IV-11 : Gel d'agarose montrant l'influence du CTAB sur la coupure photoinduite de l'ADN (en région I de la complexation); [ADN-PO_4^-] = $1x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Ce résultat confirme que la position des maxima de photocoupures sur l'ADN correspond bien à la complexation ADN-tensioactif. Les effets du contre-ion et de la longueur de chaîne des tensioactifs sur la formation des dommages sont directement liés aux effets de ces facteurs sur la complexation ADN-tensioactif. La substitution d'un contre-ion bromure

par un chlorure n'a pas d'effet sur la coupure de l'ADN et l'augmentation de la longueur de chaîne du tensioactif diminue sa concentration correspondant au maximum de photocoupures.

A la suite de ces premiers observations, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de la tête polaire du tensioactif sur la photosensibilisation de coupures simple brin.

IV.3.2. Effet de la tête polaire

Pour étudier l'influence de la nature de la tête polaire du tensioactif sur la formation de coupures photoinduites, nous avons comparé les effets du chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC) et du chlorhydrate de N-dodécylamino-1-désoxyglucitol (Ghyd12HCl). Ces deux tensioactifs ne diffèrent que par la structure et la polarité de leurs têtes polaires : le DTAC présente une tête triméthylammonium tandis que le Ghyd12HCl possède un fragment glucose à tête ammonium (Figure III-19).

Comme pour les autres tensioactifs, nous avons étudié l'effet du Ghyd12HCl sur la photosensibilisation de cette lésion. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-12.

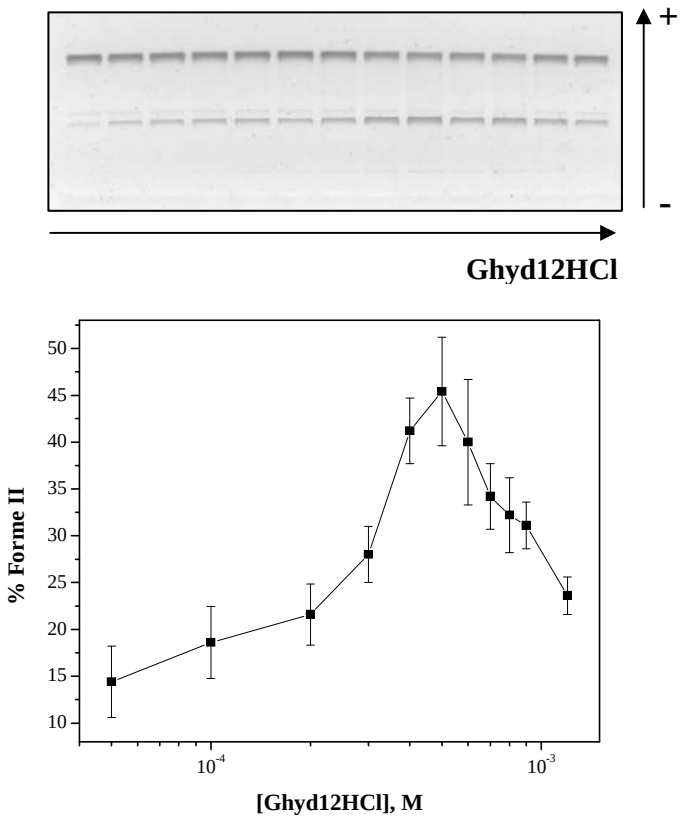


Figure IV-12 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du Ghyd12HCl sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induits par la photosensibilisation de la benzophénone; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Les résultats montrent que l'effet du Ghyd12HCl sur les coupures ressemble à l'effet du DTAC (Figure IV-8). On observe un maximum de même intensité que dans le cas du DTAC ce qui indique également que le Ghyd12HCl ne possède pas de propriétés protectrices vis à vis de l'ADN.

La concentration en ADN utilisé ($9x10^{-5}$ M) pour cette expérience était en-dessous de la CAC du Ghyd12HCL sur ADN ($4,4x10^{-4}$ M). C'est pour cette raison qu'à une telle concentration en ADN, le Ghyd12HCl complexe le duplex à la $CA^{ADN}_{Ghyd12HCl}$. La position de maximum de coupure de l'ADN ($5x10^{-4}$ M) correspond donc bien à la complexation ADN-Ghyd12HCl.

En règle générale, la complexation de l'ADN avec des agents cationiques provoque sa compaction, [19,20] ce qui diminue son aire effective. De plus des résultats récents ont montré que l'ADN compacté était plus stable envers l'irradiation γ [8]. De ce fait nous nous attendions à trouver une protection de l'ADN lors de sa complexation car la diminution de l'aire effective diminue la probabilité de l'attaque radicalaire sur l'acide nucléique. En fait nous avons obtenu des résultats totalement opposés. Une augmentation des coupures de l'ADN en présence des tensioactifs a été observée pour tous les tensioactifs utilisés.

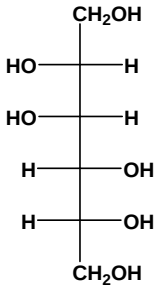
Après la mise en évidence de l'augmentation des coupures sur l'ADN induites par photosensibilisation par la benzophénone, nous avons essayé de comprendre pourquoi cette complexation a conduit à une augmentation des dommages.

IV.3.2.1. *Mise en évidence d'un environnement hydrophobe lors de la complexation ADN-tensioactifs*

Comme nous l'avons déjà vu, lors de la complexation de l'ADN, les agents cationiques peuvent compacter la molécule biologique, mais aussi modifier son environnement immédiat. Il a été récemment montré que la compaction de l'ADN diminue la probabilité de formation de photocoupures lors d'irradiation γ [8]. A partir de là, on peut supposer que dans notre cas l'augmentation des coupures des brins de l'ADN pendant sa complexation avec les tensioactifs étudiés serait plutôt liée à la formation de domaines hydrophobes au plus près de l'acide nucléique. La benzophénone étant une molécule hydrophobe très peu soluble dans l'eau, et elle se localisera préférentiellement dans les domaines hydrophobes crées par l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN. C'est pour cette raison que lors de l'irradiation, un maximum de radicaux se forme au plus près de l'ADN,

provoquant des photodommages proportionnels à l'hydrophobie apportée lors de la complexation.

Afin de confirmer l'incorporation de la benzophénone dans les domaines hydrophobes créées par l'agrégation des tensioactifs sur l'ADN, nous avons étudié la formation des dommages en présence d'un piégeur hydrophile de radicaux hydroxyle. L'idée était la suivante : si la benzophénone se situe dans les régions hydrophobes autour de l'ADN, le piégeur hydrophile de radicaux restera dans la phase aqueuse et il ne piègera pas les radicaux formés dans les domaines hydrophobes et, par conséquent, ne diminuera pas le rendement de coupures de l'ADN par les EOR. Pour piéger les radicaux hydroxyle notre choix s'est porté sur le mannitol [21,22]. Ce dernier est un sucre très soluble dans l'eau ne contenant pas de groupes chargés et donc neutre vis à vis de la complexation entre l'ADN et les tensioactifs.



mannitol

Toutefois, le mannitol n'est capable de piéger efficacement des radicaux hydroxyle qu'à partir de concentrations assez importantes. C'est pour cette raison qu'avant d'effectuer cette étude il nous a paru nécessaire de vérifier si la présence de mannitol à ces concentrations pouvait modifier la structuration de l'eau, cette dernière jouant un rôle crucial dans les processus d'agrégation des tensioactifs [23]. Il existe deux groupes de produits capables de modifier la structuration de l'eau : les agents kosmotropiques (saccharose, bétaïne) qui renforcent la structure de l'eau et favorisent l'agrégation hydrophobe des tensioactifs (diminution de leur solubilité), et les agents chaotropiques (urée) qui diminuent le niveau de structuration de l'eau et donc défavorisent l'agrégation hydrophobe (augmentation de la solubilité des tensioactifs).

Afin de vérifier si la présence d'une telle concentration en mannitol (200 mM) influe sur l'agrégation des tensioactifs nous avons étudié par tensiométrie la micellisation de CTAB

avec et sans mannitol. Les résultats de ces expériences dans l'eau et dans le tampon Tris/HCl sont présentés sur la Figure IV-13.

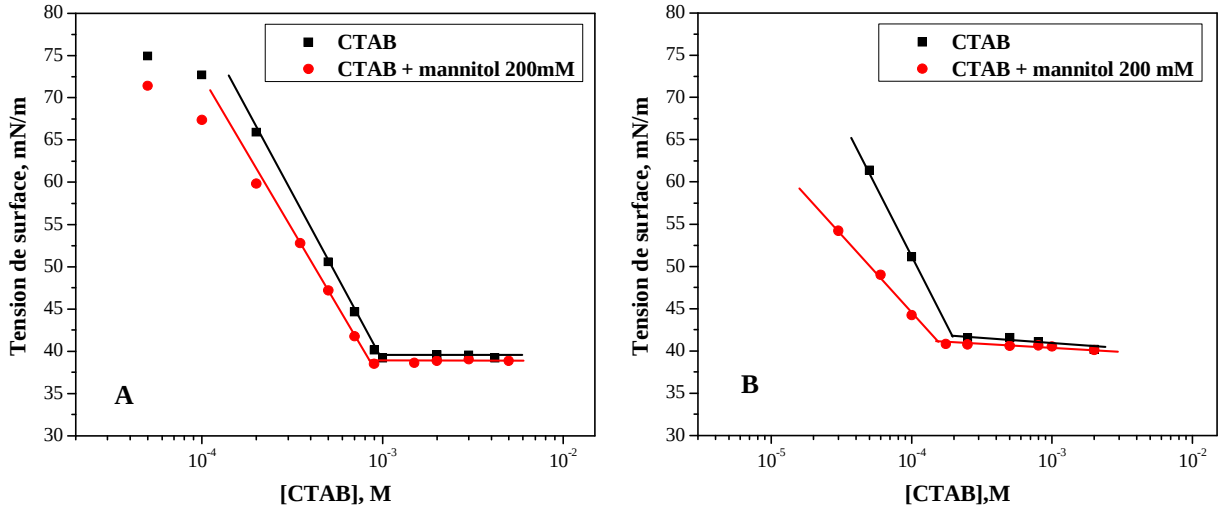


Figure IV-13 : Influence du mannitol sur la micellisation de CTAB dans l'eau (**A**) et dans le tampon Tris/HCl (**B**) à 25ºC

Les résultats obtenus montrent que le mannitol ne change pas l'agrégation du CTAB ni dans l'eau ni dans le tampon (mêmes CMC). Pour confirmer que le mannitol n'influe pas sur la complexation entre l'ADN et le CTAB nous avons également étudié ce processus avec et sans mannitol (200mM) par titration par fluorescence. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-14.

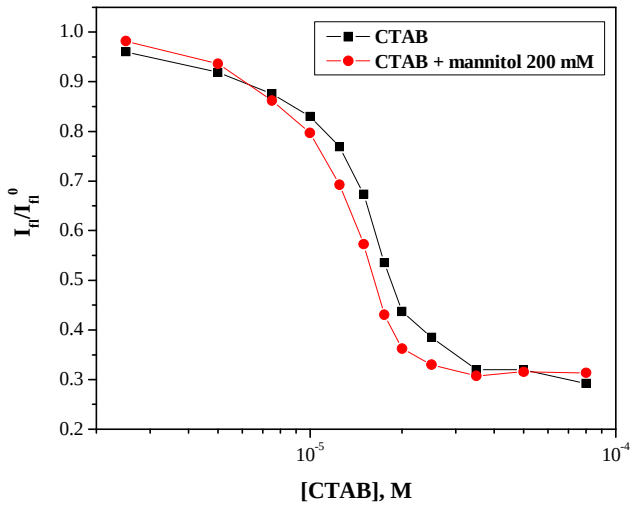


Figure IV-14 : Etude de l'influence du mannitol sur la complexation ADN-CTAB par titration par fluorescence ; [ADN-PO_4^-] = 3x10^{-6}M, [BET] = 1,5x10^{-6} M, Tris/HCl, T = 25ºC

On constate que la présence de 200mM de mannitol ne modifie pas la CA du CTAB sur l'ADN. Cette observation confirme le fait que le mannitol n'interfère pas sur le processus d'agrégation des tensioactifs. De ce fait, on peut l'utiliser comme un piégeur hydrophile de radicaux hydroxyle lors de nos expériences.

Ces précautions étant prises, nous avons comparé la proportion de coupures simple brin générées sur l'ADN (% forme II) par photosensibilisation par la benzophénone en présence et en absence de mannitol. Cette comparaison a été effectuée pour deux systèmes : l'ADN seul et l'ADN complexé avec le CTAB à la concentration en tensioactif correspondant au maximum de coupure de l'acide nucléique. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la Figure IV-15.

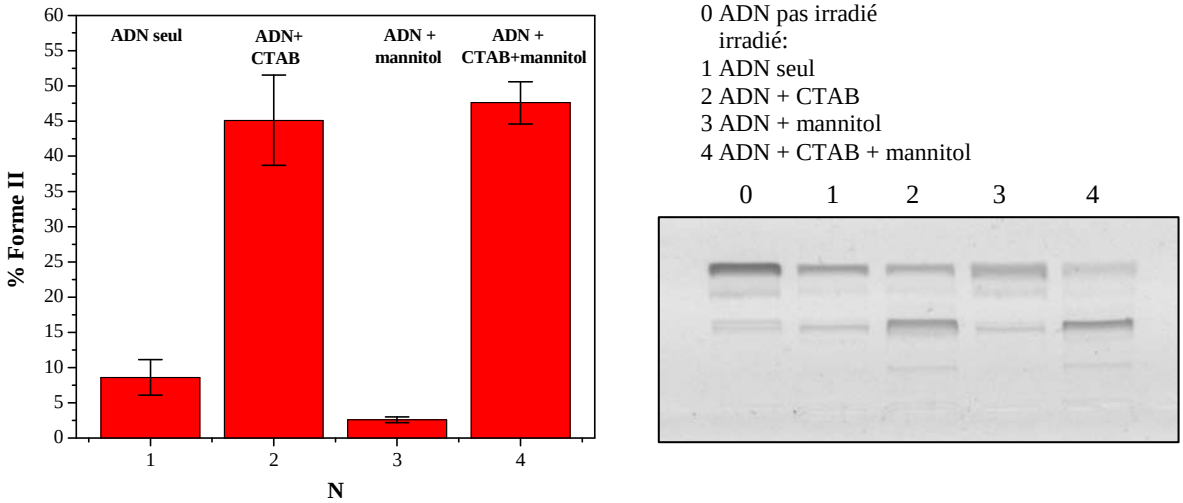


Figure IV-15 : Gel d'agarose et photodensitométrie des coupures de l'ADN en présence du CTAB et du mannitol [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; [mannitol] = 200mM; λ > 320 nm; Tris/HCl, T = 25ºC

On constate que dans le cas de l'ADN non-complexé, la présence du mannitol diminue 3-4 fois la proportion de coupures sur l'acide nucléique. Le fait que dans ce cas, le mannitol n'inhibe pas totalement la formation de coupures sur l'ADN peut être dû à l'intervention d'une autre EOR formée lors de l'irradiation de la benzophénone et en particulier l'oxygène singulet. En fait il a été récemment montré que ce dernier était capable de provoquer la formation de coupure simple brin sur un ADN plasmidique [24]. En revanche, dans le cas de l'ADN complexé, le mannitol n'inhibe pas la formation de photocoupures. Cette expérience confirme que dans ce cas, la benzophénone se localise dans les domaines hydrophobes au plus près de l'ADN, et de ce fait, les radicaux hydroxyle qui coupent l'ADN ne sont plus accessibles au mannitol.

Toutefois, il est plus difficile d'expliquer pourquoi après complexation, l'addition de tensioactif diminue le rendement de photocoupures sur l'ADN. Pour cela nous pouvons proposer plusieurs explications :

- l'addition de tensioactifs au-delà de la complexation peut provoquer l'agrégation voire la précipitation des complexes formés [25,26]. Dans ce cas, l'addition de tensioactifs et leur incorporation dans les complexes déjà formés pourrait diluer la benzophénone dans ces domaines hydrophobes plus nombreux, ce qui aurait pour conséquence de diminuer le rendement de photocoupures sur l'ADN.
- comme nous l'avons déjà dit, il a été récemment montré lors de l'étude de l'influence de la compaction de l'ADN sur la formation de coupures double brin provoquée par l'irradiation γ [8], que l'ADN compacté est moins sensible à l'attaque radicalaire. On peut présenter l'irradiation γ comme une source de radicaux hydroxyle purs, car dans les solutions aqueuses diluées c'est principalement l'eau qui absorbe les radiations ionisantes. De ce fait les résultats de Yoshikawa et al. présentent uniquement l'effet de la conformation de l'ADN (compaction) sur sa stabilité vis à vis les EOR. Dans nos études l'effet hydrophobe d'incorporation de la benzophénone dans le complexe ADN-tensioactif est prédominant. Est-ce pour cette raison que les résultats de Yoshikawa et al. sont différents des nôtres ? Toutefois, la superposition de l'effet hydrophobe à l'effet de compaction de l'ADN peut provoquer l'apparition d'un maximum de dommages à une concentration précise en tensioactif, suivie d'une diminution.
- il est décrit dans la littérature que des amines ainsi que des sels d'ammonium sont capables de désactiver l'état triplet excité des photosensibilisateurs par voie non-radiative (quenching) [27-29] ce qui aurait pour conséquence de diminuer la production des EOR par le photosensibilisateur. Si l'on tient compte de cette observation, il se pourrait que l'augmentation de la concentration en tensioactifs triméthylammonium puisse conduire à une diminution des dommages. Toutefois, cette hypothèse explique difficilement le passage par un maximum.

Nos études concernant l'influence de la complexation entre l'ADN et des tensioactifs monocaténaires à une tête polaire ont montré que ces tensioactifs sont suffisamment hydrophobes pour former des domaines hydrophobes autour de l'ADN dans lesquels la benzophénone peut se localiser. Ce phénomène a eu pour conséquence de pratiquement masquer l'influence d'une éventuelle compaction sur les dommages subits par l'ADN. Aussi,

est-ce pour cette raison qu'il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de la complexation entre l'ADN et des tensioactifs bolaformes, car ces derniers présentant une hydrophobie moins marquée et sont généralement plus efficaces en terme de compaction de l'ADN.

IV.3.3. Influence du Bol12 sur la photosensibilisation de coupures simple brin

Le Bol12 est un tensioactif bolaforme contenant une chaîne de 12 atomes de carbone et deux groupes triméthylammonium polaires terminaux. Son influence sur la formation de photocoupures a donc été étudié. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-16.

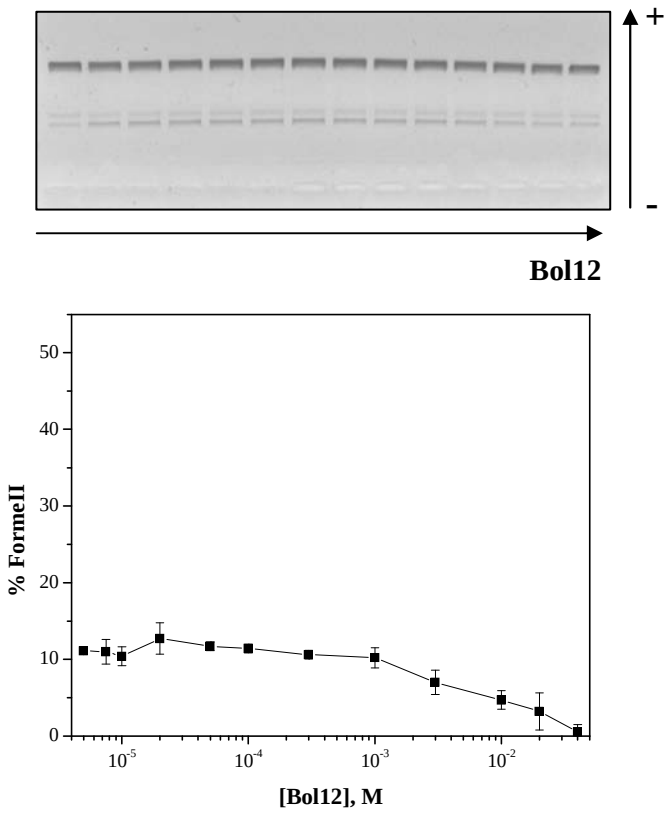


Figure IV-16 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du Bol12 sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par la photosensibilisation de benzophénone; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, T = 25ºC

On constate que le l'effet du Bol12 sur la formation de coupures simple brin est très différent de l'effet des tensioactifs monocaténaires étudiés précédemment. Jusqu'à la concentration en Bol12 égale à $1x10^{-3}$M (début de la complexation) ce dernier ne montre aucun effet sur la formation de photocoupures sur l'ADN. Au delà de cette concentration en

Bol12, le pourcentage de la forme II après irradiation diminue et atteint la valeur correspondant à celle de l'ADN non-irradié. Un tel comportement lors de la complexation de l'ADN avec le Bol12 peut être expliqué par trois effets :

- hydrophobie insuffisante pour conduire à une incorporation de la benzophénone dans les complexes ADN-Bol12
- effet sensible de compaction pouvant diminuer la probabilité de l'attaque radicalaire sur l'ADN [8]
- effet possible du quenching de l'état triplet de la benzophénone par des groupements ammonium de Bol12

Le fait que l'on n'observe pas d'augmentation des dommages sur l'ADN lors de sa complexation avec le Bol12 indique bien que ce tensioactif ne crée pratiquement pas de domaines hydrophobes au plus près de l'ADN. La structure bolaforme, ainsi que la faible longueur de la chaîne n'apporte pas une hydrophobie suffisante pour conduire à l'incorporation de la benzophénone dans le complexe ADN-Bol12.

Pour le reste, seule l'utilisation d'autres sels cationiques de référence pourra nous aider à déterminer si la diminution des dommages est due à une légère compaction de l'ADN ou à un quenching de l'état triplet de la benzophénone. Comme sels de références, nous avons choisi NaCl et NMe_4Br. Ces sels ne présentent aucune hydrophobie, et la comparaison de leur effet sur la formation de photocoupures sur l'ADN pourra nous aider à mieux comprendre la diminution des coupures sur l'ADN lors sa complexation avec le Bol12. Comme nous l'avions montré dans le chapitre III, l'interaction de ces deux sels avec l'ADN est pratiquement la même. De plus, la structure du cation tétraméthylammonium est identique à la structure des têtes polaires du Bol12, ce qui pourra mettre en évidence un effet de quenching.

IV.4. Influence de NaCl et NMe_4Br sur la photosensibilisation de coupures simple brin

Nous avons étudié l'influence de la concentration en sels sur la formation de photocoupures sur l'ADN, et ce jusqu'à des concentrations élevées où ces derniers sont capables d'induire de la compaction par écrantage des charges de l'ADN. Les effets de deux sels de cations monovalents (le chlorure de sodium NaCl et le bromure de tétraméthylammonium NMe_4Br) sont comparés sur la Figure IV-17.

Les résultats montrent que les effets des deux sels sont différents. Même en présence de 0,9M de NaCl, ce dernier ne modifie pas le rendement de photocoupures sur l'ADN. Le sel NMe_4Br, quant à lui, dans les mêmes conditions protège l'ADN contre les EOR produites lors de la photolyse de la benzophénone. Les résultats obtenus avec NaCl montrent que sa force ionique n'affecte pas la stabilité de l'ADN vis à vis de ce type de dommages, ce qui signifie que l'effet de NMe_4Br ne correspond pas à un effet de force ionique. On peut donc en déduire que la protection de l'ADN par le bromure de tétraméthylammonium est due à une désactivation de l'état triplet excité de la benzophénone. Cette constatation serait la preuve que la diminution des coupures de l'ADN lors de sa complexation avec le Bol12 serait également due à cette désactivation de l'état triplet de la benzophénone.

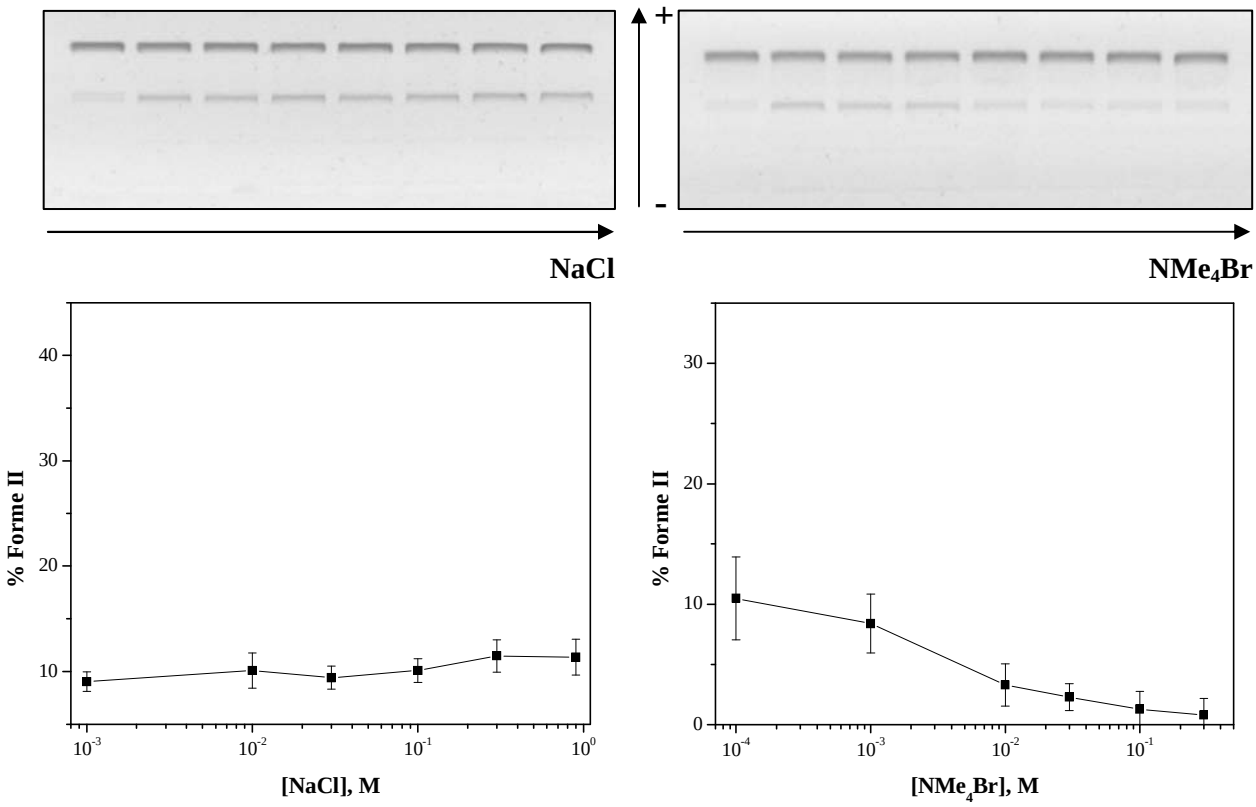


Figure IV-17 : Gel d'agarose et photodensitométrie l'influence de NaCl et de NMe_4Br sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par la photosensibilisation de la benzophénone; $[ADN\text{-}PO_4^-] = 9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, T = 25º

A titre de comparaison, nous avons également étudié l'effet du sel d'un cation divalent, le chlorure de calcium ($CaCl_2$) sur la formation de coupures simple brin de l'ADN. Pour ce sel nous observons une augmentation du nombre de photocoupures lors de l'augmentation de la concentration en sel (FigureIV-18).

Sur ce graphe nous voyons que l'augmentation du nombre de photocoupures sur l'ADN n'est notable qu'à partir de la concentration de 0,01M en sel. A partir de là, leur formation augmente faiblement et de façon linéaire. Puis, aux concentrations élevées en $CaCl_2$ (1M), un accroissement important du nombre de photocoupures est observé. Ce phénomène peut être expliqué par un effet de sel. Le chlorure de calcium est un sel divalent induisant une force ionique très importante ce qui par un effet de sel va significativement diminuer la solubilité de la benzophénone dans l'eau qui est déjà très faible. Cet effet va renforcer la localisation de la benzophénone au niveau des bases azotées faiblement hydrophobes de l'ADN et conduire à un accroissement du taux de photocoupures lors de l'irradiation.

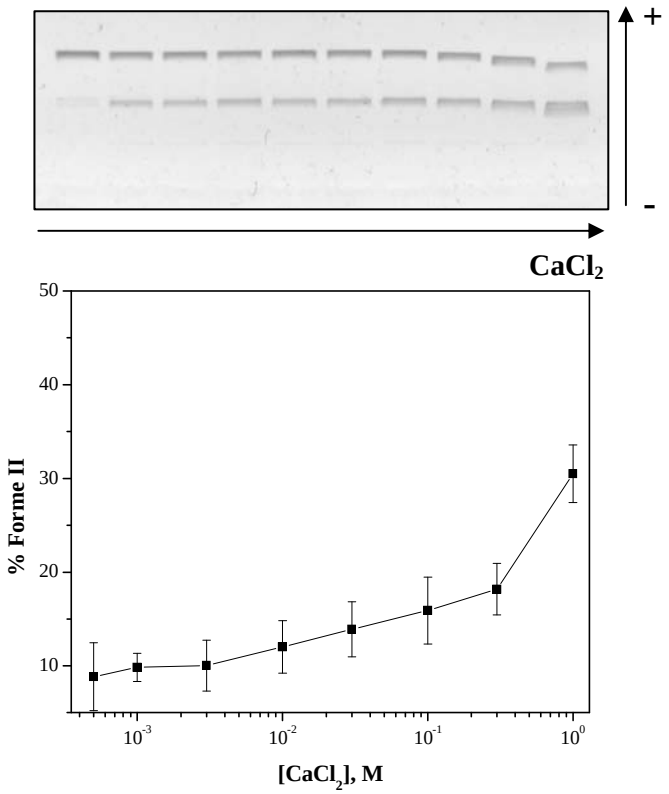


Figure IV-18 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du $CaCl_2$ sur la formation de coupures sur le pBR322 ADN induits par la photosensibilisation de benzophénone; $[ADN\text{-}PO_4^-] = 9x10^{-5}$ M; $\lambda > 320$ nm; Tris/HCl, 25ºC

Après l'analyse de l'influence de la complexation de l'ADN sur la formation de photodommages, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans ces processus dans les complexes avec les tensioactifs.

IV.5. Etude mécanistique de la formation de coupure simple brin photosensibilisée par la benzophénone sur l'ADN seul et sur l'ADN complexé par le CTAB

En complément du mannitol utilisé comme piégeur de radicaux hydroxyle, nous nous sommes intéressés à l'azoture de sodium (NaN_3) qui est un quencheur d'oxygène singulet. Il s'agit de plus d'un sel qui à faible concentration ne présente pas d'effet de force ionique (la concentration en NaN_3 utilisée pour ces études est de 200mM) [30,31]. Par ailleurs, nous avons déjà montré que le chlorure de sodium (NaCl) n'influe pas sur la formation de photocoupures même à la concentration de 900mM.

Comme dans cette étude il s'agit de comparer la formation de dommage en présence de benzophénone avec et sans NaN_3 pour l'ADN seul et l'ADN complexé avec le CTAB, nous avons tout d'abord vérifié si la présence de 200mM de NaN_3 pouvait influer sur la complexation ADN-CTAB. Nous avons suivie cette complexation par électrophorèse sur gel d'agarose avec et sans le NaN_3, et comparé les résultats à ceux obtenus avec NaCl. Cette comparaison est présenté sur la Figure IV-19.

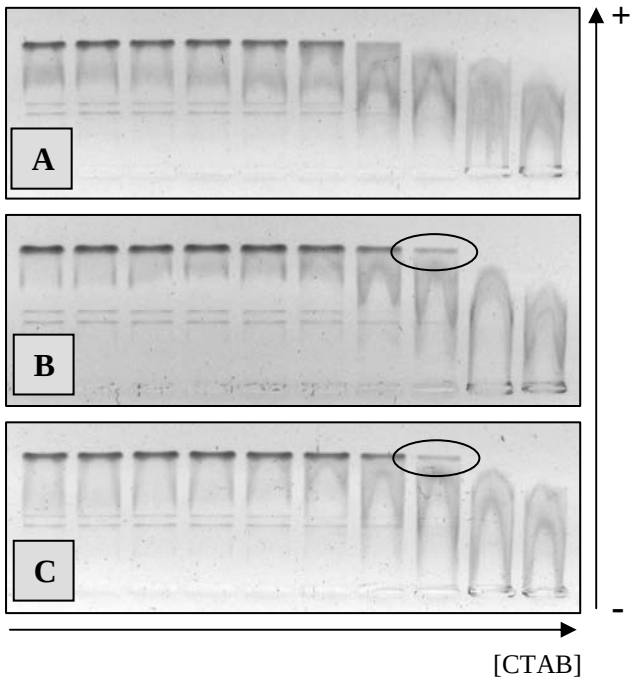


Figure IV-19 : Gel d'agarose de la comparaison de la complexation ADN-CTAB sans (**A**) et avec 200mM d'azoture de sodium (**B**) ou chlorure de sodium (**C**) par électrophorèse sur gel d'agarose ; $[ADN\text{-}PO_4^-] = 9x10^{-5}$M, Tris/HCl, T = 25ºC. Les ovales montrent la différence entre l'ADN seul et en présence des sels

Les résultats montrent qu'à la concentration choisie, ces sels retardent légèrement la complexation ADN-CTAB. L'effet est notable par le fait qu'en présence de ces sels, une faible bande d'ADN non-complexé (marqué par l'ovale) est présente à la concentration en CTAB égale à $2x10^{-4}$M.

Ce léger décalage n'étant pas gênant, nous avons ensuite étudié l'influence de la présence de NaN_3 (200mM) sur la formation de photocoupures sur l'ADN seul et sur le complexe ADN-CTAB. L'effet de NaN_3 a été comparé avec celui de NaCl, et les résultats sont présentés sur la Figure IV-20.

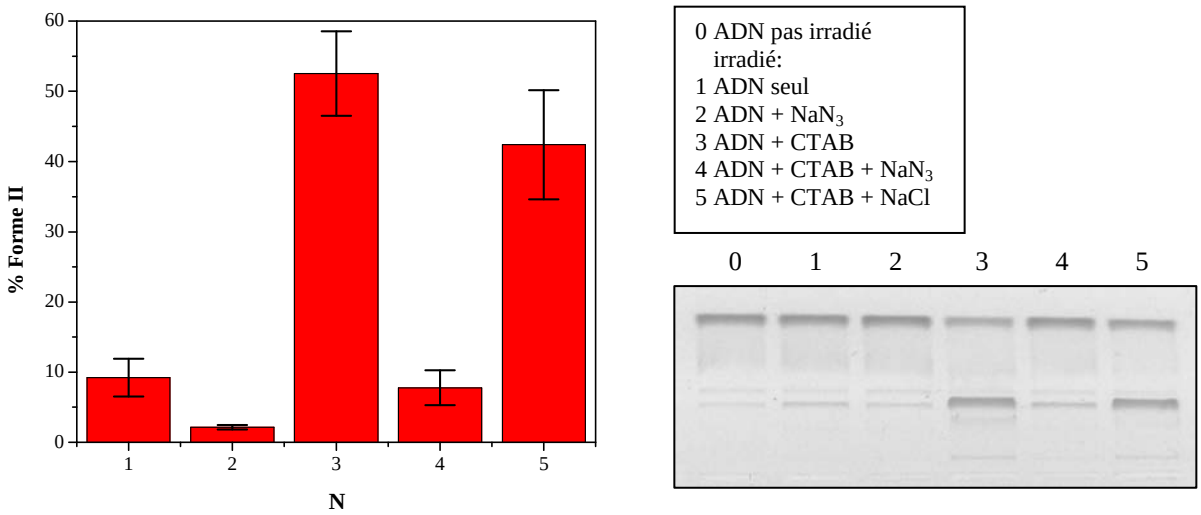


Figure IV-20 : Gel d'agarose et photodensitométrie des coupures de l'ADN pBR322 en présence du CTAB, de NaN_3 et de NaCl ; $[ADN\text{-}PO_4^-] = 9x10^{-5}$ M, [sel] = 200mM, $\lambda > 320$ nm; Tris/HCl, T = 25ºC

Les résultats montrent que l'azoture de sodium diminue significativement le taux de coupures sur l'ADN seul et sur l'ADN complexé, ce qui signifie que l'oxygène singulet participe également à la formations de ces dommages. La diminution des coupures de l'ADN complexé avec le CTAB n'est pas seulement due à une décomplexation partielle, en raison de la force ionique, car NaCl à la même concentration conduit encore à une proportion importante de coupures simple brin.

La question que l'on peut se poser, c'est pourquoi le mannitol n'empêche pas les dommages par les radicaux hydroxyle sur l'ADN complexé par le CTAB, alors que NaN_3 protège des coupures par l'oxygène singulet? Cet effet peut simplement être attribué au fait que les anions azoture peuvent se substituer aux contre-ions bromure des tensioactifs agrégés sur l'ADN, et ainsi piéger l'oxygène singulet formé par la benzophénone se trouvant dans les

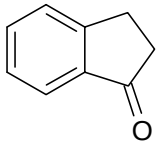
sites hydrophobes. Les dommages résiduels observés peuvent être attribués aux radicaux hydroxyle ne pouvant pas être piégés par NaN_3.

Ces résultats sont en accord avec l'analyse RPE des EOR formées par la benzophénone lors de son irradiation. Les deux espèces principales formées sont les radicaux hydroxyle et l'oxygène singulet, et c'est surtout ce dernier qui est responsable de la formation de coupures simple brin lorsque l'ADN est complexé par le CTAB.

Après l'étude de l'effet des agents cationiques sur la formation de photocoupure sur l'ADN, et la découverte d'un maximum de coupures correspondant à la complexation ADN-tensioactifs nous allons présenter quelques possibilités d'application de ces résultats.

IV.6. Généralisation de la méthode et possibles applications

Pour généraliser l'effet de l'augmentation du taux de photocoupures sur l'ADN lors de son irradiation en présence des photosensibilisateurs hydrophobes nous avons effectué la même expérience avec un autre photosensibilisateur un peu moins hydrophobe que la benzophénone (logP = 3,29), la 1-indanone (logP = 1,57).



1-indanone

Nous avons ainsi étudié l'influence de la complexation de l'ADN avec le CTAB sur la formation de coupures induites lors de l'irradiation de l'ADN en présence d'indanone en gardant la même concentration en photosensibilisateur et le même temps d'irradiation que lors des études précédentes avec la benzophénone (Figure IV-21).

Les résultats obtenus lors des expériences avec la 1-indanone montrent un effet identique à celui observé lors de la photosensibilisation par la benzophénone. En effet, lorsque l'on augmente la concentration en CTAB, on observe un maximum de dommages, et sa position correspond bien à la complexation ADN-CTAB. L'intensité des dommages est par contre ~3 fois moins importante que dans le cas de la photosensibilisation par benzophénone. Ceci suggère d'une part une plus faible efficacité de production des EOR lors de l'irradiation de l'indanone, et d'autre part sa plus faible hydrophobie. Ces résultats montrent que l'incorporation de molécules hydrophobes dans un complexe ADN-tensioactifs peut effectivement être généralisée.

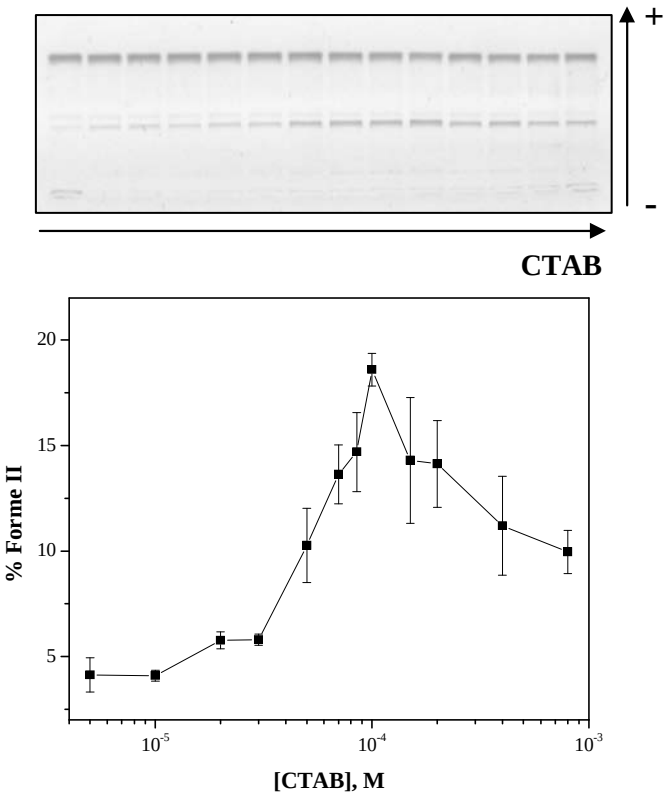


Figure IV-21 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du CTAB sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induits par la photosensibilisation de la 1-indanone; [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Comme nous l'avons vue précédemment, la position du maximum de coupures de l'ADN correspond à la complexation entre l'acide nucléique et les tensioactifs. C'est grâce à cette correspondance que l'on pourrait envisager d'utiliser ce phénomène comme un nouvel outil pour étudier la complexation ADN-tensioactifs. De plus, cet outil analytique peut donner d'importantes informations concernant l'environnement de l'acide nucléique. C'est ainsi, que l'étude de la formation de coupures sure l'ADN induites par photosensibilisation par la benzophénone permet de suivre le caractère progressif de la complexation de l'acide nucléique avec des agents cationiques amphiphiles.

L'effet hydrophobe de l'incorporation de photosensibilisateurs hydrophobes dans l'ADN pourrait être également utilisé pour augmenter le rendement des dommages sur l'acide nucléique. Par exemple, pour éviter une très longue irradiation, la complexation de l'ADN avec des tensioactifs cationiques pourrait être utilisée pour augmenter significativement l'efficacité de cette irradiation.

Nos observations ont souligné un point très important concernant la photosensibilité exacerbée des acides nucléiques (ADN ou ARN) lorsqu'ils sont complexés. Ce phénomène peut être d'une importance cruciale lors de l'utilisation thérapeutique de complexes à base de lipides ou de polymères. C'est pour cette raison que nous avons ensuite étudié l'influence de la complexation de l'ADN avec des lipides et des polymères utilisés en transfection sur la photosensibilisation de coupures simple brin.

IV.7. Influence de la complexation ADN - polymères ou ADN - lipides cationiques sur la photosensibilisation de coupures simple brin

La complexation de l'ADN est utilisée pour la transfection de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes. La transfection de gènes est une étape cruciale du concept de thérapie génique. Ce concept est l'ensemble des approches permettant de transférer une nouvelle information génétique dans les cellules d'un malade afin de soigner sa pathologie [32]. Elle consiste à utiliser l'insertion d'un nouveau gène comme un médicament, qu'il s'agisse de remplacer un gène défectueux ou de commander la synthèse d'une protéine thérapeutique.

L'ADN est un polyélectrolyte anionique de haute masse moléculaire. Sous la forme déployée, un ADN de 10 kb avoisine la taille d'une cellule. Pour effectuer la transfection de l'ADN dans les cellules il faut franchir la membrane plasmique qui est elle aussi chargée négativement. Une transfection efficace de l'ADN dans la cellule exige donc en premier lieu la neutralisation des charges négatives de l'ADN ainsi que sa compaction. [33] Divers agents cationiques ont été utilisés dans ce but, mais les tensioactifs ont montré un faible pouvoir de transfection ainsi qu'une cytotoxicité importante [34]. Par contre, des complexes d'ADN avec des lipides cationiques (lipoplexes) [35] ou des polymères cationiques (polyplexes) [36] se sont révélés être des agents de transfection beaucoup plus efficaces. Toutefois, de faibles quantités de tensioactifs cationiques peuvent être utilisées dans les formulations de liposomes à base de lipides neutres (peu onéreux) pour leurs apporter une charge positive et augmenter le rendement de transfection [34,37].

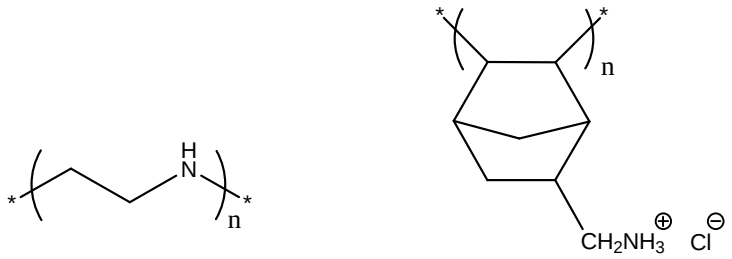
En présence de photosensibilisateurs (endo- et/ou exogènes), l'ADN dans les polyplexes et les lipoplexes pourrait aussi être beaucoup plus sensibles aux dommages photoinduits. Ce risque n'a jamais été pris en considération dans le cas d'une transfection in-vivo. C'est pour cette raison que nous avons décidé de confirmer la possible existence d'un

effet hydrophobe lors de la complexation de l'ADN avec des polyélectrolytes et lipides cationiques utilisés pour la transfection de gènes.

Nous avons, dans un premier temps, étudié l'influence de la complexation de l'ADN avec des polymères cationiques sur photosensibilisation de coupures simple brin sur la molécule biologique par la benzophénone.

IV.7.1. Complexation ADN-polymères cationiques et son influence sur la photosensibilisation de coupures simple brin

Pour étudier la complexation de l'ADN avec des polymères cationiques ainsi que son influence sur la formation de coupures simple brin, nous avons comparé les effets de deux polyélectrolytes : la polyéthylènimine (PEI) et le chlorhydrate de polynorbornèneméthylèneammonium (PNBHCl). Les structures de ces polymères sont présentées sur la Figure IV- 22. Ces deux polyélectrolytes ont été utilisés pour la transfection de gènes [18, 38-40].



PEI **PNBHCl**

Figures IV-22 : Structures du polyéthylènimine (PEI) et du chlorhydrate de polynorbornèneméthylèneammonium (PNBHCl)

Le PEI est un polyélectrolyte hydrophile, tandis que le PNBHCl présente une structure amphiphile en peigne. Par comparaison des effets de ces deux polyélectrolytes sur la formation de photocoupure sur l'ADN on pourrait évaluer l'effet hydrophobe de l'incorporation de la benzophénone dans les complexes de l'ADN avec ces agents cationiques.

Avant toute irradiation, nous avons étudié la complexation du PEI et du PNBHCl avec l'ADN.

IV.7.1.1. *Complexation ADN-PEI*

Cette étude a été réalisé par titration par fluorescence et électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats sont présenté sur la Figure IV-23 **A**,**B**.

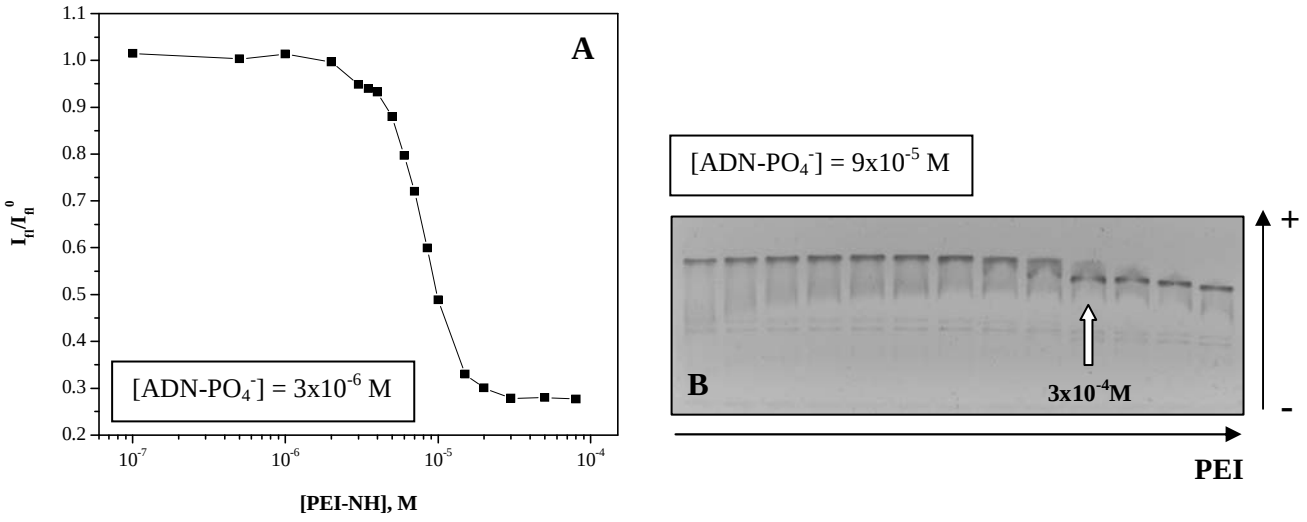


Figure IV-23 : L'étude de la complexation entre l'ADN et le polyéthylènimine (PEI) par titration par fluorescence (**A**) et électrophorèse sur gel d'agarose (**B**); Tris/HCl, 25ºC

En raison des techniques employées, nous avons utilisé deux concentrations en ADN différentes : $3x10^{-6}$M pour la titration par fluorescence et $9x10^{-5}$M pour l'électrophorèse sur gel d'agarose. Dans les deux cas les résultats indiquent que la complexation ADN-PEI correspond au rapport de charge R = [PEI]/[ADN-PO_4^-] = 3. Cette valeur concorde avec les données de la littérature [40] et correspond à la neutralisation de l'ADN en tenant compte du niveau d'ionisation du PEI.

Nous avons ensuite étudié la complexation entre l'ADN et le PNBHCl.

IV.7.1.2. *Complexation ADN-PNBHCl*

Les deux méthodes ayant montré le même résultat dans le cas de la complexation ADN-PEI, nous avons étudié la complexation entre l'ADN et le chlorhydrate de

polynorbornèneméthylèneammonium (PNBHCl) uniquement par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats de cette étude sont présentés sur la Figure IV-24.

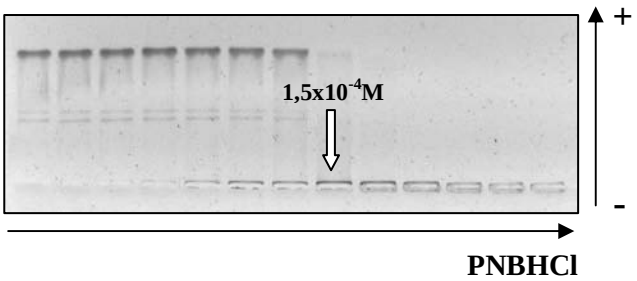


Figure IV-24 : L'étude de la complexation entre l'ADN et l'hydrochlorure de polynorbornène-méthylèneammonium (PNBHCl) par électrophorèse sur gel d'agarose ; Tris/HCl, [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M

On observe que la complexation entre l'ADN et le PNBHCl a lieu à une concentration en polyélectrolyte qui se situe entre $9x10^{-5}$ et $1,5x10^{-4}$M, ce qui correspond à la neutralisation de l'ADN. Les données de la littérature confirment que des polyélectrolytes cationiques chargés (PEC) interagissent avec l'ADN par neutralisation de charges (R = [PEC]/[ADN-PO_4^-] = 1) [18]. Contrairement aux tensioactifs, l'ADN complexé avec le PNBHCl ne migre pas vers l'anode. L'explication de ce phénomène tient au fait que le PNBHCl est un polyélectrolyte chargé, son interaction avec l'ADN est très coopérative et le complexe formé est très stable. On peut également expliquer la différence entre le PNBHCl et le PEI par le fait que chez ce dernier, dans les conditions utilisées, seule un groupe aminé sur trois est chargé. Son interaction avec l'ADN est donc moins forte et l'ADN se décomplexe au niveau de l'entrée dans le gel, comme c'était le cas pour les complexes ADN-tensioactifs [41].

Après l'étude de la complexation de l'ADN avec ces polyélectrolytes, il nous a semblé intéressant de comparer ces résultats avec la complexation ADN-tensioactifs décrite dans le chapitre III.

IV.7.1.3. *Comparaison de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et des polyélectrolytes*

Nos résultats indiquent que les polyélectrolytes n'interagissent avec l'ADN que par la neutralisation de ces charges, tandis que dans le cas de la complexation ADN-tensioactifs deux mécanismes sont mis en œuvre selon la concentration en acide nucléique (électrostatique ou hydrophobe).

Dans le cas des polyélectrolytes, les groupes chargés sont liés l'un à l'autre par des liaisons covalentes. Une fois qu'un groupe cationique d'un polyélectrolyte se lie à l'ADN, ses groupes adjacents se retrouvent à proximité de l'acide nucléique prêt à complexer un autre phosphate. C'est pour cette raison que les polyélectrolytes cationiques (PEC) complexent l'ADN au rapport de charge R = [PEC]/[ADN-PO_4^-] = 1. La complexation entre l'ADN et les tensioactifs cationiques, quand à elle, est moins coopérative car les interactions hydrophobes entre les chaînes des tensioactifs sont beaucoup plus faibles que les liaisons covalentes des polymères. De plus, comme il a été montré dans le chapitre III, les interactions hydrophobes entre les chaînes de tensioactifs dans les complexes ADN-TA dépendent du mécanisme de complexation.

Aux faibles concentrations en ADN (par rapport à la CAC^{ADN}_{TA}), lors du mécanisme hydrophobe, les tensioactifs forment des structures micellaires sur l'ADN. Dans ce cas, les interactions hydrophobes sont fortes et, comme il a été montré dans le chapitre III, correspondent aux interactions hydrophobes lors de la micellisation normale des tensioactifs. Dans ce cas, selon les résultats de la titration par fluorescence, la coopérativité de la complexation de l'ADN avec le PEI et avec les tensioactifs sont identiques. Mais, aux faibles concentrations en ADN, beaucoup plus de tensioactif est nécessaire pour le complexer que de polyélectrolyte cationique.

Lors de la complexation ADN-tensioactifs par le mécanisme électrostatique, les tensioactifs, comme les polymères, complexent l'acide nucléique à un rapport de charge R = 1. Dans ce cas, l'excès de charges de l'ADN par rapport à la CAC normale des tensioactifs sur l'ADN altère l'organisation de pré-micelles et augmente le nombre de molécules de tensioactifs dans le complexe avec l'ADN. Ce phénomène a pour effet de diminuer l'efficacité des interactions hydrophobes entre les molécules de tensioactif, et par conséquent, diminue la coopérativité de la complexation de tensioactif à l'ADN. La complexation ADN-polyélectrolytes, quand à elle, ne change pas avec la concentration de l'ADN, ceci est due aux liaisons covalentes entre les groupes chargés qui induisent une grande coopérativité.

Après les études de la complexation de l'ADN avec le PEI et le PNBHCl, nous avons analysé l'influence de cette complexation sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN.

IV.7.1.4. *Influence de la complexation de l'ADN avec le PEI et le PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin*

Comme précédemment, pour étudier l'influence de la complexation ADN-PEC sur la formation de photocoupures sur l'ADN, nous avons irradié des échantillons contenant de l'ADN plasmidique superenroulé en présence d'un photosensibilisateur, la benzophénone, pour des concentrations croissantes en polyélectrolytes. Les résultats de ces études sont présentés sur la Figure IV-25.

Les résultats montrent que ces deux polyélectrolytes ont des effets opposés sur la photosensibilisation de coupures sur l'ADN par la benzophénone. L'augmentation de la concentration en PEI provoque la diminution de coupures, tandis que la complexation de l'ADN avec le PNBHCl induit une importante augmentation de leur rendement de formation.

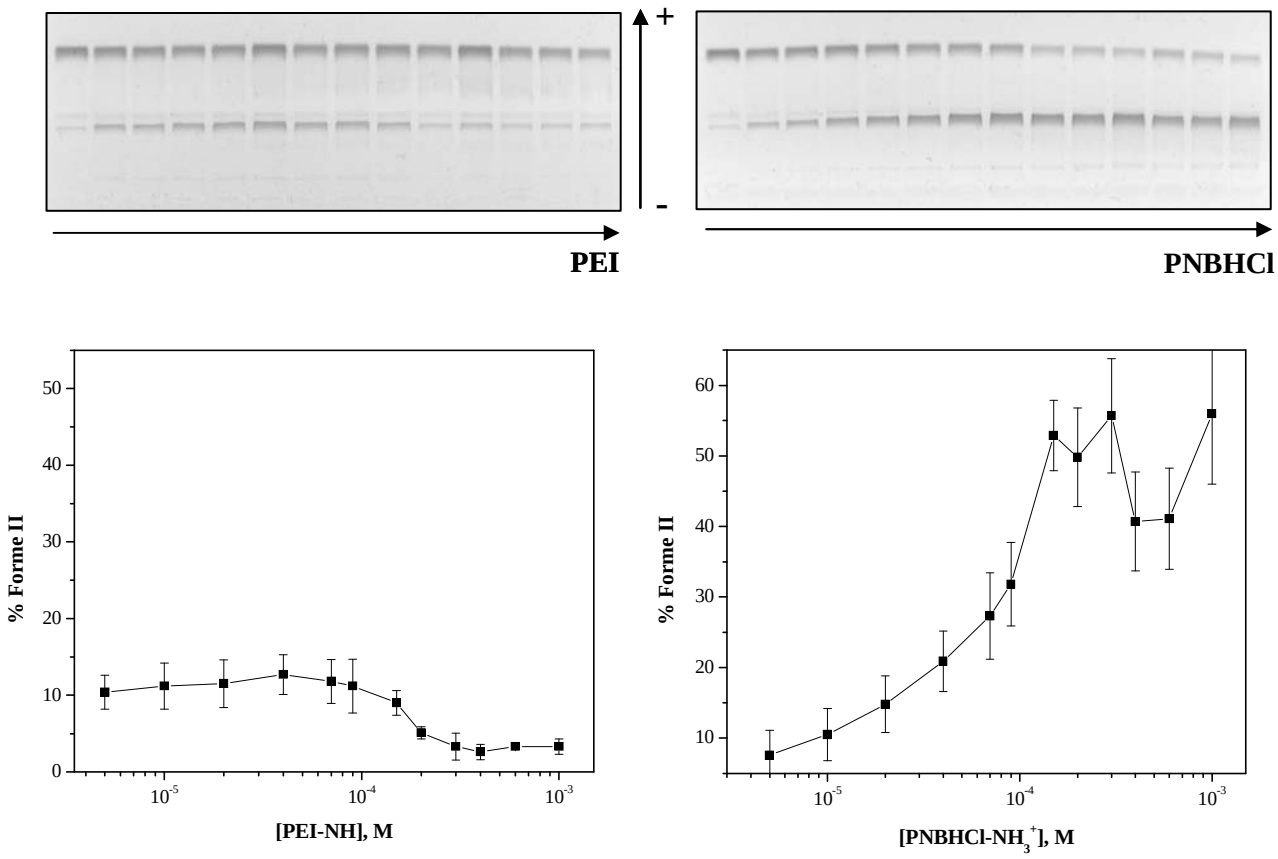


Figure IV-25 : Influence du PEI et du PNBHCl sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induits par la photosensibilisation de benzophénone; [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Ces observations concordent avec les résultats obtenus précédemment lors de l'étude de l'influence des tensioactifs et des sels sur la formation de ce dommage photoinduit. Le

PNBHCl est un polyélectrolyte amphiphile. Lorsqu'il complexe l'ADN, il peut créer un environnement hydrophobe autour de ce dernier et de ce fait, l'incorporation de la benzophénone dans le complexe provoque l'augmentation des coupures photoinduites sur l'ADN. Le PEI, quant à lui, est un polyélectrolyte simple et n'a pas la possibilité d'apporter un milieu hydrophobe autour de l'ADN. De ce fait la benzophénone ne s'accumule pas dans les complexes ADN-PEI. De plus, le PEI contient beaucoup de groupes aminés, et comme nous l'avons vu auparavant, les groupements ammonium peuvent inhiber la formation de ce dommage sur l'ADN grâce à la désactivation de l'état triplet excité de la benzophénone.

L'augmentation du taux de photocoupures sur l'ADN lors de sa complexation avec le PNBHCl correspond bien à la complexation entre ces deux substrats. Ces résultats montrent que la photosensibilisation de cette lésion par benzophénone peut être également utilisée comme outil pour les études de la complexation entre l'ADN et des polyélectrolytes cationiques amphiphiles.

Ces résultats nous apportent des informations importantes concernant le choix du vecteur de gènes afin d'éviter d'endommager l'ADN par photosensibilisation, du fait de la présence dans les organismes vivants, de photosensibilisateurs endogènes capables de générer la formation d'EOR. L'utilisation de vecteurs amphiphiles peut diminuer significativement la stabilité de l'ADN. Par contre, dans les mêmes conditions, lors de l'utilisation des vecteurs hydrophiles contenants des groupes aminés, l'ADN complexé ne sera pas endommagé.

Finalement, il nous a paru intéressant de comparer plus finement l'influence de la complexation de l'ADN avec les tensioactifs et un polyélectrolyte amphiphile comme le PNBHCl sur la coupure de l'ADN.

IV.7.1.5. *Comparaison de l'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et du PNBHCl sur la photosensibilisation de coupures simple brin*

Lorsque l'on compare les différents résultats, on constate que contrairement à l'effet des tensioactifs, l'augmentation de la formation de coupures simple brin sur l'ADN lors de l'addition de PNBHCl est plus progressive. Elle démarre pour des concentrations plus faibles en PNBHCl, ce qui montre que les polyélectrolytes amphiphiles peuvent complexer l'ADN dès les faibles concentrations et former un environnement hydrophobe autour de ce dernier. Par contre, les tensioactifs ne commencent à former un milieu suffisamment hydrophobe pour incorporer la benzophénone que juste avant la complexation. Ces résultats mettent en lumière la différence de complexation de l'ADN avec des polyélectrolytes amphiphiles et des

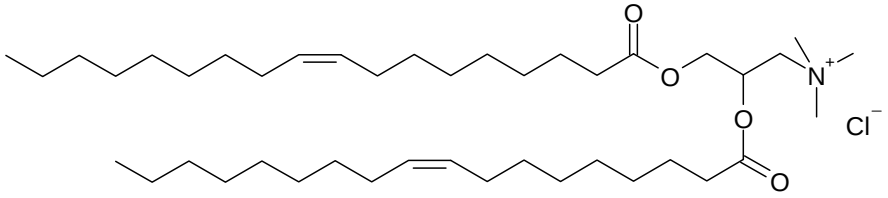
tensioactifs cationiques. Ces observations soulignent également l'intérêt de notre nouvel outil d'investigation même dans le cas de l'utilisation de polymères amphiphiles.

Après l'analyse de l'influence des polyéléctrolytes sur la formation de photocoupures sur l'ADN, nous avons étudié l'influence d'un lipide cationique sur ce processus.

IV.7.2. Influence d'un lipide cationique sur la photosensibilisation de coupures simple brin

Les lipides sont aussi des vecteurs efficaces de transfection de gènes [42,43]. Ce sont des tensioactifs principalement bicaténaires qui présentent deux chaînes hydrophobes, et qui sont capables de former des vésicules en solution aqueuse. Les complexes de vésicules lipidiques avec l'ADN appelés lipoplexes sont des agents efficaces et non-toxiques de la transfection de l'ADN dans les cellules. Tous les lipides cationiques utilisés présentent des domaines hydrophobes ce qui pourra augmenter la sensibilité de l'ADN dans les lipoplexes par rapport à l'ADN seul lors de l'irradiation en présence de photosensibilisateurs hydrophobes.

Le chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium (DOTAP) est un lipide fréquemment utilisé dans les formulations pour la transfection de gènes. C'est pour cette raison que nous l'avons utilisé pour tester la possibilité de l'existence de l'effet hydrophobe de l'incorporation de la benzophénone dans les lipoplexes.



DOTAP

Nous avons préparé des vésicules de DOTAP et comparé le taux de coupures par photosensibilisation sur l'ADN par benzophénone seul et complexé par le DOTAP. Nous avons choisi le même rapport de charges entre le lipide et l'ADN que celui généralement utilisé dans la littérature pour les formulations de lipoplexes R=[DOTAP]/[ADN-PO_4^-]=4 [44,45]. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-26.

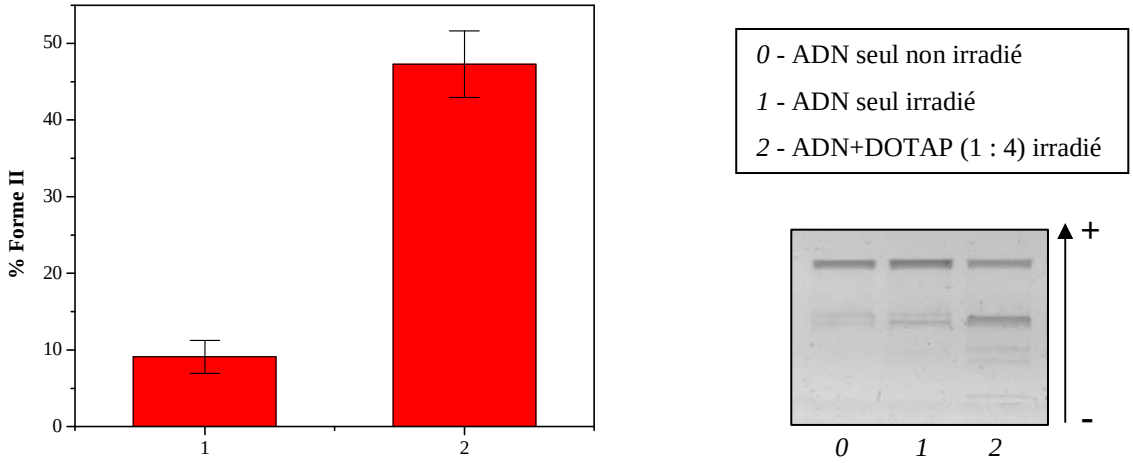


Figure IV-26 : Comparaison des efficacités de coupures de l'ADN induites par la photosensibilisation par la benzophénone de l'ADN seul et du complexe ADN-DOTAP ; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Les résultats obtenus montrent une augmentation importante du nombre de photocoupures dans le cas de l'ADN complexé avec des vésicules de DOTAP. L'effet hydrophobe est donc également présent dans le cas d'un ADN complexé avec des vésicules lipidiques. Cela confirme qu'en raison de leur partie hydrophobe, les lipides cationiques ne peuvent être utilisés comme vecteurs de l'ADN dans des conditions susceptibles d'engendrer la formation de cassures simple brin.

IV.8. Conclusion

L'influence de la complexation de l'ADN avec certains tensioactifs cationiques et certains sels sur la photosensibilisation de coupures simple brin par la benzophénone a été étudiée. Il a été démontré que la complexation ADN-tensioactifs provoque l'augmentation du taux de photocoupures sur l'ADN en raison d'un changement de l'environnement autour de ce dernier. Lors de la complexation, les tensioactifs cationiques monocaténaires à une tête polaire forment des agrégats hydrophobes sur l'ADN. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, ces photosensibilisateurs hydrophobes s'accumulent au plus près de l'ADN, ce qui conduit à une importante augmentation du nombre de photolésions. De manière intéressante, un maximum de coupures a été déterminé à des concentrations en tensioactifs correspondant à la complexation avec l'ADN. Cette dépendance permet l'utilisation de la formation de coupures simple brin comme le premier exemple de méthode chimique pour l'étude de la complexation ADN-tensioactifs.

Il ressort de cette étude que des photosensibilisateurs hydrophobes peuvent être utilisés de manière judicieuse pour évaluer l'environnement créé par des molécules cationiques amphiphiles autour de l'ADN. Par ailleurs, en utilisant la benzophénone, nous avons également montré qu'un tensioactif de type bolaforme avec une chaîne hydrocarbonée à 12 carbones (Bol12), ne forme pas de domaines suffisamment hydrophobes pour permettre une bonne incorporation de la benzophénone dans le complexe ADN-Bol12.

Par contre, il a été montré que le Bol12 ainsi que le bromure de tétraméthylammonium à des concentrations importantes peuvent protéger l'ADN grâce à une désactivation par les groupements ammonium de l'état triplet excité de la benzophénone, état impliqué dans ces processus.

En ce qui concerne l'influence des sels, même à des concentrations importantes en chlorure de sodium (NaCl), ce dernier n'influe pas sur la photosensibilisation de coupures simple brin. En revanche, en présence de chlorure de calcium l'augmentation des photocoupures sur l'ADN serait due à la force ionique très importante de ce sel.

Par l'étude du mécanisme de la formation de ces dommages en utilisant des piégeurs de radicaux hydroxyle (mannitol) et d'oxygène singulet (azoture du sodium) nous avons montré que c'est bien ces deux espèces qui sont responsables de la formation de coupures simple brin sur l'ADN complexé avec des tensioactifs.

Nous avons également étudié l'influence des polymères et lipides utilisés pour la transfection de gènes sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN par la benzophénone. Les résultats obtenus confirment que la complexation de l'ADN avec des agents cationiques amphiphiles exacerbe sa sensibilité à l'irradiation UVA en présence des photosensibilisateurs hydrophobes.

Par ailleurs, nous avons confirmé que dans le cas d'un agent cationique non amphiphile, sa complexation avec l'ADN augmente sa stabilité en raison de la désactivation de l'état triplet excité du photosensibilisateur par des groupements cationiques de triméthylammonium. Ces effets sont notables si on compare ceux des deux polyélectrolytes : amphiphile (chlorhydrate de polynorbornèneméthylèneammonium) et hydrophile (polyéthylènimine). On peut également conclure que tous les lipoplexes (ils présentent tous des domaines hydrophobes) et les polyplexes formés de polymères amphiphiles doivent être utilisés avec précaution en présence conjointement de photosensibilisateurs hydrophobes et de lumière.

L'ensemble de ces résultats met en évidence pour la première fois que la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN par benzophénone est très sensible à l'environnement autour de l'acide nucléique, notamment à l'hydrophobie que ces agents cationiques peuvent apporter à l'ADN.

Après avoir mis en évidence une diminution de la stabilité de l'ADN en présence de photosensibilisateur hydrophobe, nous avons décidé d'élaborer une protection de l'ADN dans ce type de situations. Pour cela, nous avons choisi de synthétiser de nouvelles molécules antioxydantes amphiphiles. Comme il existe peu d'antioxydants amphiphiles, nous avons utilisé un nouveau concept de synthèse de tensioactifs élaboré au laboratoire des IMRCP. Ce concept consiste à associer par une interaction acide/base, une amine à longue chaîne avec une molécule ayant une fonction acide carboxylique portant les propriétés que l'on veut faire aquérir au tensioactif.

Références

[1] Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J.. Molecular Biology of the Cell, WH Freeman: New York, NY. 5th ed., **2004**, p963.

[2] Tan, X., Grollman, A. P., Shibutani, S., *Carcinogenesis*, **1999**, *20*, 2287-2292.

[3] Thomas, D., Scot, A. D., Barbey, R., Padula, M., Boiteux, S., *Mol. Gen. Genet.*, **1997**, *254*, 171-178

[4] Jiang, N., Taylor, J.-S., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 472-481.

[5] Gentil, A., Le Page, F., Sarasin, A., *Biological Chemistry*, **1997**, *378*, 1287-1292

[6] Kwak, J.C.T. (ed.), *Polymer-Surfactant Systems*, surfactant science series, vol. 77, Marcel Decker, **1998**

[7] Radeva, T. (ed.), *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, surfactant science series, vol. 99, Marcel Decker, **2001**

[8] Yoshikawa, Y., Mori, T., Magome, N., Hibino, K., Yoshikawa, K. *Chem Phys Lett*, **2008**, *456(1-3)*, 80-83

[9] Ciulla, T.A., Van Camp, J.R., Rosenfeld, E., Kochevar, I., *Photochem Photobiol*, **1986**, *49*, 293-298

[10] Charlier, M., Helene, C., *Photochem.Photobiol.*, **1972**, *15*, 71-78

[11] Lhiaubet, V., Paillous, N., Chouini-Lalanne, N., *Photochem Photobiol*, **2001**, *74*, 670-678

[12] Chouini-Lalanne, N., Defais, M., Paillous, N., *Biochem Pharmacol*, **1998**, *55*, 441-446

[13] Masaki, H., Okano, Y., Sakurai, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1428*, 45-56

[14] Mojović, M., Spasojević, I., Vuletić, M, Vučinić, Z., Bačić, G., *J. Serb. Chem. Soc.*, **2005**, *70 (2*), 177–186

[15] Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Martasek, P., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A. Jr., Kalyanaraman, B., *Free. Rad. Res.* ,**1999**, *31*, 607-617

[16] Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T. *J Am Chem Soc*. (2003) **125:** 12803-12809

[17] Charlier, M., Helene, C., Carrier, W. L., *Photochem. Photobiol.*, **1972**, *15*, 527–536

[18] Asgatay, S., Franceschi-Messant, S., Perez, E., Vicendo, P., Rico-Lattes, I., Phez, E., Rols, M.P., *Int J Pharm*, **2004**, *285(1-2)*, 121-133

[19] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K. *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 2401-2408

[20] Dias, R.S., Pais, A.A.C.C., Miguel, M.G., Lindman, B. *Coll Surf A*, **2004**, *250*, 115-131

[21] Desesso J.M., Scialli A.R., Goeringer G.C., *Teratology*, **2005**, *49(4)*, 248-259

[22] Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J., *Plant physiology*, **1997**, *115(2)*, 527-532

[23] Moelbert, S., Normand, B., De Los Rios, P., *Biophysical Chemistry*, **2004**, *112*, 45-57

[24] Aloisi, G.G., Amelia, M., Barbafina, A., Latterini, L., Elisei, F., dall'Acqua, F., Vedaldi, D., Faccio, A., Viola, G., *Photochem Photobiol*, **2007**, *83 (3)*, 664-674

[25] Zhu, D.-M., Evans, R.K. *Langmuir*, **2006**, *27*, 3735-3743

[26] Spink, C.H., Chaires, J.B. *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 10920-10928

[27] Yip R. W., Loutfy R.O., Chow Y. L., Magdzinski L. K. *Canadian Journal of Chemistry*, **1972**, *50(21)*, 3426-3431

[28] Young R.H., Brewer D., Kayser R., Martin R., Feriozi D., Keller R.A. *Canadian Journal of Chemistry*, **1974**, *52(16)*, 2889-2893

[29] Beecroft, R.A., Davidson, R. S., Goodwin, D., Pratt, J.E., Luo X.J., *Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **1986**, *82*, 2393 -2399

[30] Li, M.Y., Cline, C.S., Koker, E.B., Carmichael, H.H., Chignell, C. F., Bilski, P., *Photochem. Photobiol.*, **2001**, *74 (6)*, 760 -764

[31] Bordin, F., Conconi, M.T., Capozzi, A., *Photochem. Photobiol.*, **1987**, *46(2)*, 301 - 304

[32] Roemer, K., Friedmann, T., *Eur J Biochem*, **1992**, *208*, 211-225

[33] Yoshikawa, K. *Adv Drug Deliv Rev*, **2001**, *52*, 235-244

[34] Lasic, D. *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**

[35] Zhdanov, R.I., Podobed, O.V., Vlasov, V.V., *Bioelectrochemistry*, **2002**, *58(1)*, 53-64

[36] Gebhart, C.L., Kabanov, A.V., *Journal of Controlled Release*, **2001**, *73(2-3)*, 401-416

[37] Pinnaduwage, P., Schmitt, L., Huang, L., *Biochim Biophys Acta*, **1989**, *985*, 33-37

[38] Godbey, W.T., Wu, K.K., Hirasaki, G.J., Mikos, A.G., *Gene Ther.*, **1999**, *6(9)*, 1380-1388

[39] Werth, S., Urban-Klein, B., Lige, D. Hobel, S., Grzelinski, M., Bakowsky, U., Czubayko, F., Aigner, A., *Journal of controlled release*, **2006**, *112(2)*, 257-270

[40] Asgatay, S., Thèse de l'Université Paul Sabatier**,** *Complexation d'ADN par des polynorbomènes polycationiques : application au transfert de gènes*, ***2005***

[41] Dias, R.S., Svingen, R., Gustavsson, B., Lindman, B., Miguel, M.G., Åkerman, B., *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2908-2917

[42] Audouy, S., Hoekstra, D., *Molecular Membrane Biology*, **2001**, *18(2)*, 129 -143

[43] Pedroso de Lima, M.C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H., Düzgüne, N., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *47*, 277-294

[44] Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S.B., and Minsky, A. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 7143-7151

[45] Xu, Y., Hui, S.W., Szoka, F.C., *Biophys. J.* **1995**, *68*, A432

Chapitre V

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE TENSIOACTIFS PAIRES D'IONS A CONTRE-ION ANTIOXYDANT AINSI QUE LEUR UTILISATION POUR LA PROTECTION DE L'ADN

Chapitre V. SYNTHESE ET CARACTERISATION DE TENSIOACTIFS PAIRES D'IONS A CONTRE-ION ANTIOXYDANT AINSI QUE LEUR UTILISATION POUR LA PROTECTION DE L'ADN

V.1 Introduction **197**
V.2 Synthèse et caractérisation spectrale des Caf12 et Caf 16 **200**
V.2.1 Synthèse des Caf12 et Caf16 200
V.2.2 Propriétés spectrales et caractérisation des Caf12 et Caf16 201
V.2.2.1 Spectroscopie RMN du ^{1}H 201
V.2.2.2 Spectroscopie RMN du ^{13}C 204
V.2.2.3 Spectroscopie infrarouge et UV visible 204
V.2.2.4 Spectroscopie de masse 205
V.3 Etude des propriétés tensioactives en solution aqueuse **206**
V.4 Evaluation des propriétés antioxydantes de Caf12 et Caf16 **209**
V.5 Etude de l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin d'ADN **212**
V.5.1 Effet de la complexation de l'ADN avec le Caf12 et le Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin 212
V.5.1.1 Complexation ADN-Caf12 et ADN-Caf16 213
V.5.1.2 Influence des Caf12 et Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN 215
V.5.2 Application des paires d'ions caféate pour la protection de l'ADN dans les complexes ADN-CTAB 216
V.5.2.1 Effet de la complexation de l'ADN avec le CTABCaf12-10% et le CTABCaf16-10% sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN par la benzophénone 217
V.5.2.1.1 Influence de la présence de 10% des tensioactifs caféate sur l'agrégation du CTAB 217
V.5.2.1.2 Influence des mélanges CTABCaf12-10% et CTABCaf1610% sur la photosensibilisation de coupures simple brin 220
V.5.2.2 Effet du Caf12 et du Caf16 sur la coupure photoinduite de l'ADN dans le complexe ADN-CTAB 224
V.6 Conclusion **227**
Références **228**

V.1 Introduction

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut générer la production de radicaux libres à l'origine de réactions en chaîne dévastatrices. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en s'oxydant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action.

Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi être destructrices : les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels, l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le glutathion, les carotènes, l'acide lipoïque, les gallates (Figure V-1) ou des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases.

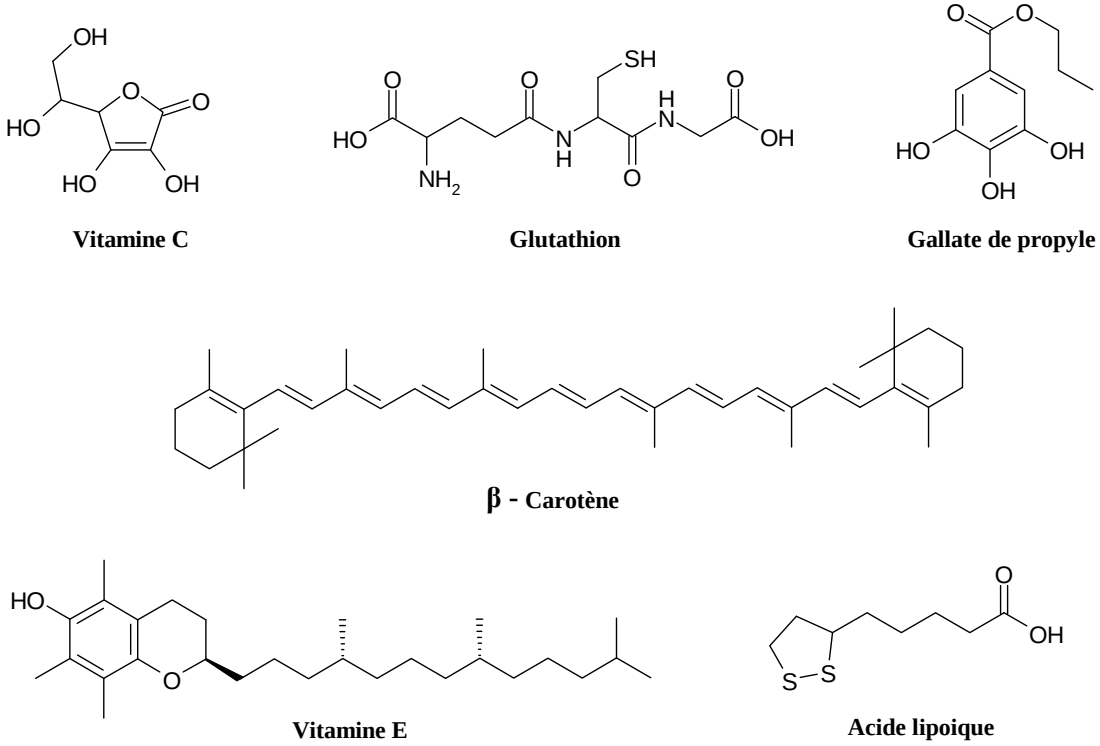


Figure V-1 : Structures de plusieurs antioxydants naturels

Dans notre quotidien, les antioxydants sont présents à tous les niveaux, que ce soit dans la préservation des aliments, dans certains procédés industriels, notamment afin de réduire la corrosion des métaux, ou dans les formulations cosmétiques ou pharmaceutiques. Ces éléments protecteurs bien qu'indispensables restent toujours très difficiles à formuler,

notamment lorsqu'il s'agit de protéger de l'oxydation une phase lipidique (acides gras insaturés) ou un principe actif se trouvant dans une telle phase [1].

Nous avons montré dans le chapitre IV que la complexation de l'ADN par des agents cationiques amphiphiles conduit à la diminution de sa stabilité vis-à-vis de photosensibilisateurs hydrophobes. Il nous a donc paru intéressant de développer des molécules antioxydantes capables d'agir dans la phase lipidique. De tels antioxydants devront être suffisamment hydrophobes afin de s'incorporer dans les complexes formés avec l'ADN.

Il existe peu d'antioxydants hydrophobes. De plus, il a été démontré que l'activité protectrice est exacerbée lorsque l'agent antioxydant se positionne à l'interface eau/huile [1]. Le moyen le plus simple pour atteindre un tel objectif consiste à rendre tensioactive une petite molécule antioxydante. Toutefois, le procédé de transformation devra rester le plus simple possible afin de ne pas altérer les propriétés antioxydantes.

Récemment dans notre laboratoire, il a été introduit un concept innovant de transport actif de médicaments et notamment des anti-inflammatoires non stéroïdiens [2]. Il s'agit d'associer par une interaction acide/base, une amine à longue chaîne avec une molécule portant une fonction acide carboxylique, ainsi que la propriété thérapeutique recherchée. Une telle association va conduire à des tensioactifs paires d'ions ou catanioniques suivant la nature de l'acide carboxylique, qui pourront former spontanément des micelles et/ou des vésicules dans l'eau.

Pour la synthèse de ces molécules tensioactives antioxydantes, nous avons repris le même concept en associant une molécule antioxydante portant une fonction acide carboxylique avec différentes amines grasses. L'hydrophobie et la polarité de la molécule antioxydante joueront un rôle déterminant sur les propriétés amphiphiles de l'association, et selon son positionnement vis-à-vis de la longue chaîne, différents types d'association tensioactive seront obtenus :

- *Tensioactifs à contre ion organique :*

  Si la molécule antioxydante est très polaire, elle sera peu associée avec la chaîne grasse et se comportera comme un simple contre ion [3]

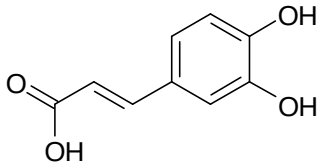
- *Tensioactifs paires d'ions :*

  Dans ce cas, la molécule antioxydante est moins polaire ce qui permettra une plus grande interaction avec la longue chaîne [4]

- *Tensioactifs catanioniques :*

Il s'agit cette fois d'une situation limite ou la molécule antioxydante serait déjà elle même une molécule tensioactive (présentant une longue chaîne) et formerait une molécule tensioactive bicaténaire par association électrostatique avec l'amine grasse [5]

Des tensioactifs à contre-ion organique ne conviendront pas à notre objectif car leur contre-ion n'est pas suffisamment hydrophobe pour se placer dans la phase lipidique. Il fallait donc trouver un acide antioxydant d'hydrophobie intermédiaire. Notre choix s'est porté sur l'acide caféique. Ce dernier est un antioxydant [6,7] naturel présent dans beaucoup de fruits, de légumes et de végétaux, notamment dans le café. De plus, des dérivés de l'acide caféique présentent d'intéressantes propriétés thérapeutiques et sont utilisés comme antimétastatiques [8], anticarcinogènes [9], anti-inflammatoires [10] et immunomodulateurs.[11]



Acide caféique

L'acide caféique est un dérivé dihydroxy de l'acide cinnamique, et ce sont ses deux groupes orto-phénoliques qui sont à l'origine des propriétés antioxydantes. Le cycle aromatique conjugué avec une double liaison le rend suffisamment hydrophobe (log P = 1,15) pour interagir avec les chaînes hydrocarbonées des tensioactifs. De plus, l'oxydation de l'acide caféique conduit à la formation de la caféoquinone [12] (Figure V-2), laquelle conserve la fonction acide carboxylique. De ce fait, la réduction de l'anion caféate ne provoquera pas la dissociation du tensioactif paire d'ions, et donc de l'objet formé (micelle ou vésicule). De plus, l'acide caféique ainsi que l'anion caféate absorbe dans la région UVA-UVB. Il peut donc également jouer un rôle de filtre UV [13].

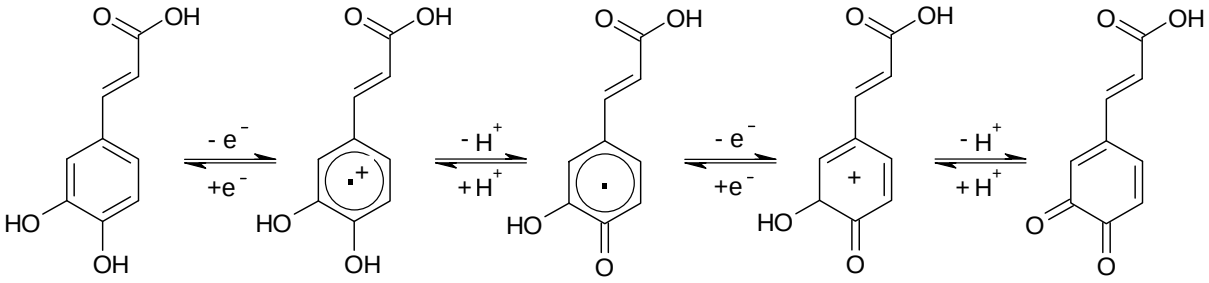


Figure V-2 : Mécanisme d'électro-oxydation de l'acide caféique conduisant à la caféoquinone

Ainsi, nous avons synthétisé par association acide/base entre l'acide caféique et deux amines grasses (dodécylamine et hexadécylamine) une nouvelle famille de molécules tensioactives antioxydantes, dérivés de l'acide caféique (Caf12 et Caf16 respectivement). Les molécules ainsi formées ont été caractérisées et leur propriétés d'auto-association dans l'eau, étudiées par diverses méthodes physico-chimiques. Nous avons ensuite étudié leurs propriétés antioxydantes, notamment leur effet sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur un ADN duplex. Afin d'avoir une molécule de référence non-amphiphile, nous avons également synthétisé le caféate d'ammonium (CafAmm).

V.2 Synthèse et caractérisation spectrale des Caf12 et Caf16

V.2.1 Synthèse des Caf12 et Caf16

Le principal avantage des tensioactifs paires d'ions et catanioniques, mis au point au laboratoire, tient à la facilité de leur synthèse. Pour le Caf12 ou Caf16, cette dernière consiste en une association électrostatique par une réaction acide/base de l'acide caféique avec une amine à longue chaîne (respectivement dodécylamine et hexadécylamine) (Figure V-3).

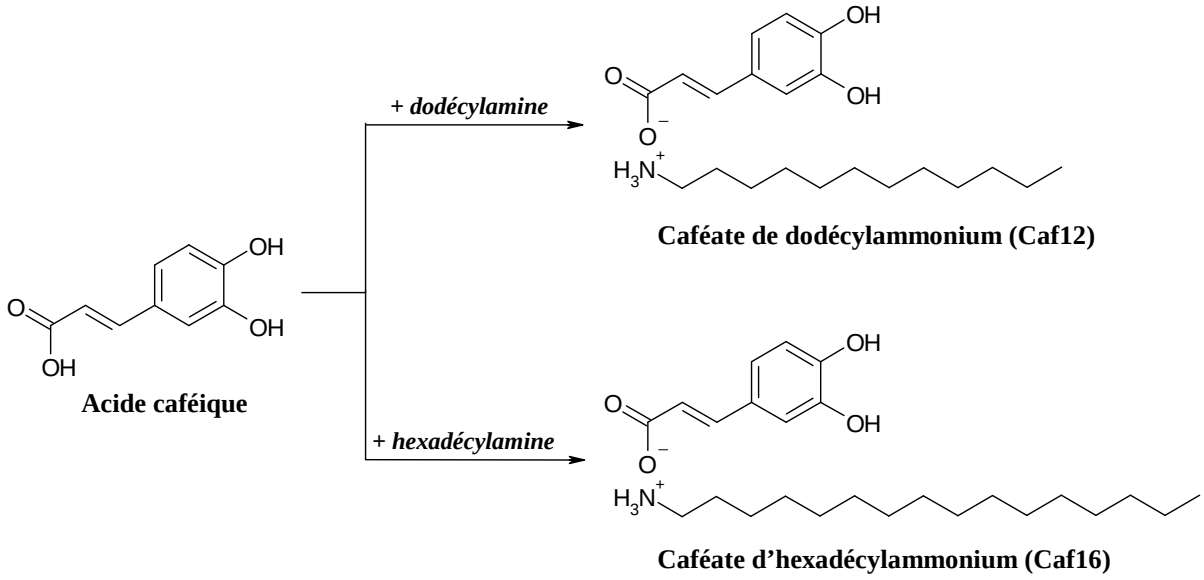


Figure V-3 : Synthèse du caféate de dodécylammonium (Caf12) et du caféate d'hexadécylammonium (Caf16)

Le solvant utilisé pour cette synthèse doit satisfaire deux critères :

- l'acide caféique ainsi que les amines grasses doivent y être solubles au départ de la réaction

- la paire d'ions formée doit y être insoluble au final, afin de déplacer l'équilibre et favoriser la réaction

Nous avons contrôlé les solubilités des produits de départ et effectué des tests de synthèses afin de trouver un solvant qui puisse satisfaire à ces critères. Finalement l'éthanol a été choisi comme meilleur solvant pour ces réactions.

Ainsi, pour synthétiser ces produits, nous avons mélangé à température ambiante, dans un minimum d'éthanol des quantités équimolaires d'acide caféique et d'amine grasse. Après réaction, il se forme un précipité soit directement dans le cas du Caf16 soit après évaporation partielle du solvant dans le cas du Caf12.

Le caféate d'ammonium (CafAmm) a été obtenu par neutralisation de l'acide caféique par une solution d'ammoniaque. Les structures des trois produits obtenus ont été contrôlées et confirmées par différentes méthodes spectrales.

V.2.2 Propriétés spectrales et caractérisation des Caf12 et Caf16

V.2.2.1 *Spectroscopie RMN du ^1H*

Les produits obtenus ont tout d'abord été caractérisés par RMN^{1}H. Pour confirmer la structure des Caf12 et Caf16 nous avons comparé leurs spectres RMN^{1}H avec ceux des produits de départ pris comme références. Les spectres du dodécylammonium et de l'hexadécylammonium ont été obtenus en rajoutant de l'acide acétique deutéré à une solution des amines correspondantes dans le méthanol deutéré. Les principales caractéristiques des spectres RMN^{1}H (déplacements chimiques et constantes de couplages) des Caf12 et Caf16 ainsi que des produits de références sont présentés dans le Tableau V-1.

Il apparaît que la formation de l'anion caféate conduit à un faible déplacement des signaux des protons aromatiques vers les champs forts en raison de l'effet mésomère positif (+M, l'augmentation de la densité électronique des électrons π) du groupement carboxylate anionique par rapport à sa forme acide (pour laquelle l'effet -M est caractéristique) (Figure V-4). En ce qui concerne les deux protons de la double liaison de la partie caféate, la formation de l'anion présente des effets différents sur ses déplacements chimiques. Comme les protons aromatiques, le signal du proton en position β se déplace significativement vers les champs forts grâce à l'effet +M du groupement carboxylate anionique, tandis que le proton en

position α se déplace vers les champs faibles. On peut expliquer ce phénomène par l'effet inductif négatif (-I) du groupement carboxylate (déplacement des électrons σ).

De plus, la constante de couplage de ces protons (J_3 = 15Hz) montre que la double liaison du caféate est toujours présente sous sa forme trans.

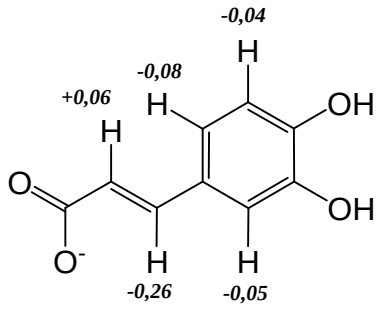
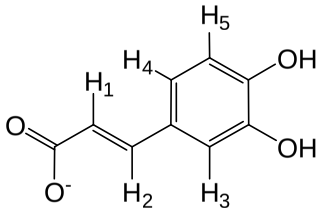
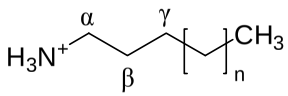


Figure V-4 : Effet de la formation de l'anion caféate sur le déplacement chimique (en ppm) des différents protons, métanol-D_4, T = 25ºC

En ce qui concerne la partie amine grasse, la formation du cation ammonium ($R\text{-}NH_3^+$) provoque un déplacement des signaux des protons vers les champs faibles en raison de l'effet inductif négatif du groupement ammonium par rapport au groupement amine. L'augmentation de l'effet -I, lors de la formation du cation, conduit également à une séparation du signal des protons en γ. La différence des déplacements chimiques des signaux des protons entre les paires d'ions caféate et les cations des amines grasses peut correspondre à un changement de la polarité du milieu en raison de la présence d'acide acétique deutéré.

Ces résultats confirment la formation de la paire d'ions (cation de l'amine à longue chaîne et anion caféate). L'obtention des paires d'ions a aussi été confirmée par spectroscopie $RMN^{13}C$.





Produit	Partie caféate, δ ppm					Partie amine grasse, δ ppm				
	$1H_1$	$1H_2$	$1H_3$	$1H_4$	$1H_5$	$2H_\alpha$	$2H_\beta$	$2H_\gamma$	16/24H	$3H,CH_3$
Acide caféique	d.; 6,16 J_3 = 15Hz	d.; 7,48 J_3 = 15Hz	d.; 6,98 $J_4 \leq$ 3Hz	d.d.; 6,87 J_3 = 9Hz $J_4 \leq$ 3Hz	d.; 6,72 J_3 = 9Hz	x	x	x	x	x
CafAmm	d.; 6,22 J_3 = 15Hz	d.; 7,23 J_3 = 15Hz	d.; 6,94 $J_4 \leq$ 3Hz	d.d.; 6,80 J_3 = 9Hz $J_4 \leq$ 3Hz	d.; 6,69 J_3 = 9Hz	x	x	x	x	x
Caf12	d.; 6,22 J_3 = 15Hz	d.; 7,22 J_3 = 15Hz	d.; 6,93 $J_4 \leq$ 3Hz	d.d.; 6,79 J_3 = 9Hz $J_4 \leq$ 3Hz	d.; 6,67 J_3 = 9Hz	t.; 2,83 J_3 = 7,5Hz	m.; 1,58	m.; 1,29	m.; 1,22 (16H)	t.; 0,83 J_3 = 7,5Hz
Dodécylamine	x	x	x	x	x	t.; 2,55 J_3 = 6Hz	m.; 1,40	x	m.; 1,24 (18H)	t.; 0,86 J_3 = 7,5Hz
Dodécylammonium	x	x	x	x	x	t.; 2,97 J_3 = 7,5Hz	m.; 1,68	m.; 1,37	m.; 1,31 (16H)	t.; 0,91 J_3 = 7,5Hz
Caf16	d.; 6,22 J_3 = 15Hz	d.; 7,22 J_3 = 15Hz	d.; 6,93 $J_4 \leq$ 3Hz	d.d.; 6,79 J_3 = 9Hz $J_4 \leq$ 3Hz	d.; 6,68 J_3 = 9Hz	t.; 2,83 J_3 = 7,5Hz	m.; 1,58	m.; 1,29	m.; 1,22 (24H)	t.; 0,84 J_3 = 7,5Hz
Hexadécylamine	x	x	x	x	x	t.; 2,65 J_3 = 7,5Hz	m.; 1,5	x	m.; 1,33 (26H)	t.; 0,95 J_3 = 7,5Hz
Hexadécylammonium	x	x	x	x	x	t.; 2,97 J_3 = 7,5Hz	m.; 1,68	m.; 1,37	m.; 1,30 (24H)	t.; 0,91 J_3 = 7,5Hz

d. - doublet, d.d. - doublet dédoublé, t - triplet, m. - multiplet ; J - constante de couplage

Tableau V-1 : Déplacements chimiques (en ppm) et constantes de couplages en RMN de protons des Caf12, Caf16 et leurs références, métanol-D_4, T = 25ºC

V.2.2.2 *Spectroscopie RMN^{13}C*

Les spectres en RMN^{13}C confirment également la formation des paires d'ions. La comparaison des déplacements chimiques des carbones des groupements carboxyles et du carbone en α de l'amine grasse des Caf12, Caf16 et les références sont présentées dans le Tableau V-2.

Produit	Déplacement chimique du carbone carboxyle, δ ppm	Produit	Déplacement chimique du carbone en position α de l'amine grasse, δ ppm
Acide caféique	169,69	Dodécylamine	41,25
CafAmm	174,84	Caf12	39,37
Caf12	174,87	Hexadécylamine	41,29
Caf16	174,95	Caf16	39,37

Tableau V-2 : Déplacements chimiques (en ppm) RMN ^{13}C du carbone carboxyle et de carbone en position α de l'amine grasse des Caf12, Caf16 et leurs références; métanol-D_4, T = 25ºC

Il apparaît que la formation de l'anion caféate conduit à un déplacement de ~5,2 ppm du signal du carbone carboxyle vers les champs faibles. La formation de l'ammonium de l'amine grasse conduit, quant à elle, au déplacement de ~1,9 ppm du signal du carbone en position α vers les champs forts.

V.2.2.3 *Spectroscopie infrarouge et UV visible*

Les deux méthodes spectroscopiques précédentes ont confirmé pour Caf12 et Caf16 la présence de la forme anionique caféate. En complément, la spectroscopie infrarouge a montré la présence d'une bande de vibration C=O correspondant à la forme carboxylate, au détriment de celle de l'acide carboxylique.

Les résultats de la spectroscopie UV Visible ont montré que les spectres d'absorbance des Caf12, Caf16 et CafAmm sont identiques. A titre d'exemple, le spectre d'absorbance du Caf16 est présenté sur la Figure V-5. L'allure des spectres nous a permis de confirmer, en s'appuyant sur les données de la littérature [14], que la partie caféique du tensioactif se trouvait bien sous sa forme monoanionique carboxylate.

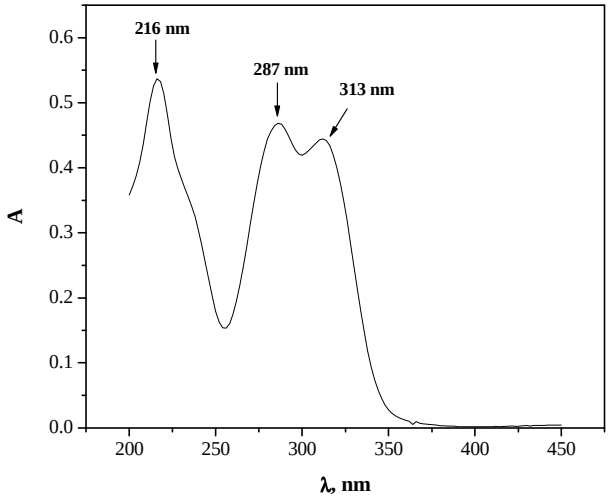


Figure V-5 : Spectre d'absorbance du Caf16 ; [Caf16] = $1x10^{-4}$M, T = 25ºC, H_2O

Après ces analyses nous avons également confirmé la formation des paires d'ions par spectroscopie de masse.

V.2.2.4 *Spectroscopie de masse*

Seule la spectrométrie de masse par électrospray (FigureV-6) nous a permis de conclure quant à l'existence de la paire d'ions en tant que molécule à part entière. Les spectres de masse des deux caféates présentent des pics correspondant à la masse des paires d'ions associées.

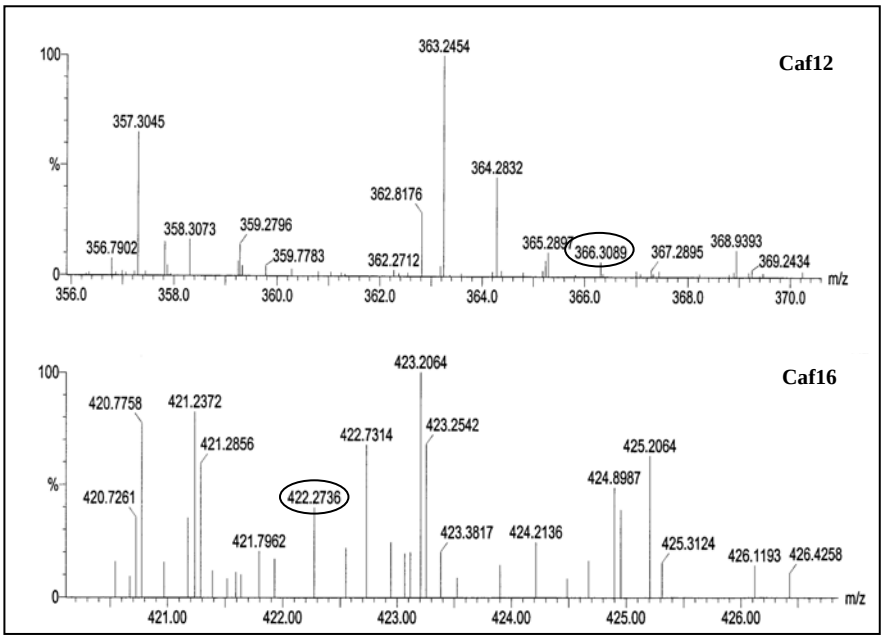


Figure V-6 : Spectres de masse haute résolution du Caf12 et du Caf16

De plus, les valeurs des masses de pics exactes correspondent bien aux formules brutes duCaf12-H (366,3089) et du Caf16-H (422,2736).

Après d'avoir synthétisé et confirmé la structure des Caf12 et Caf16 nous avons étudié le comportement en solution aqueuse de ces molécules.

V.3 Etude des propriétés tensioactives en solution aqueuse

La capacité d'abaisser la tension de surface est une des principales propriétés des molécules tensioactives. Aussi, avons nous étudié par tensiométrie le comportement de Caf12 et Caf16 en solution aqueuse. Les résultats sont présentés sur la Figure V-7**A**,**B**.

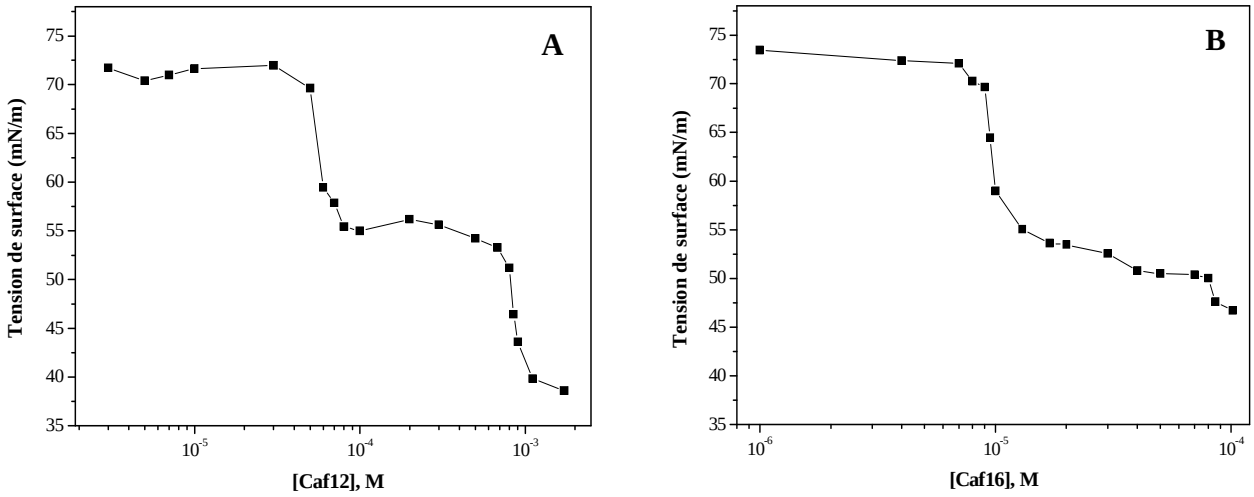


Figure V-7 : Courbes de tensiométrie de Caf12 (A) et de Caf16 (B) obtenues dans l'eau par arrachement à l'étrier à 25°C

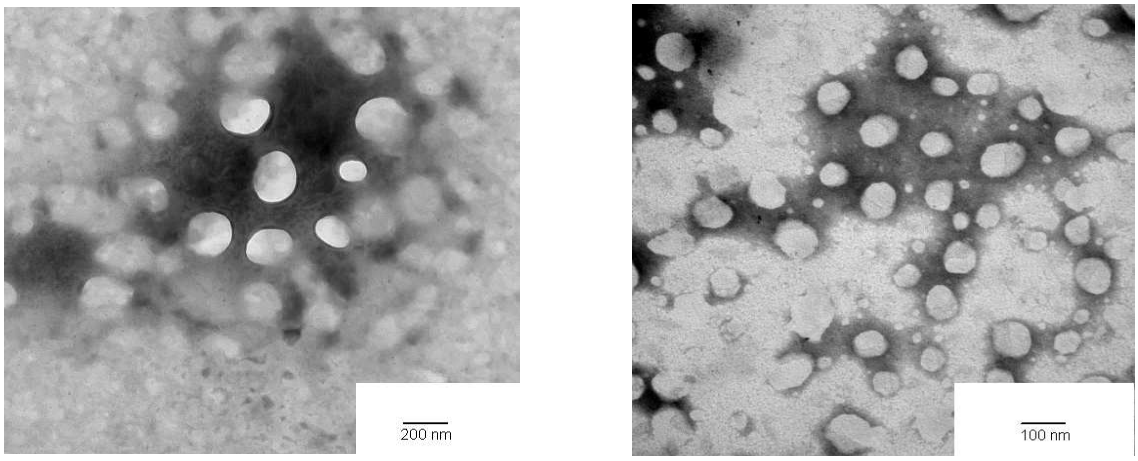
On constate qu'à de faibles concentrations en tensioactif, un premier palier caractéristique apparaît alors qu'à plus forte concentration l'amorce d'un second palier est observée.

Ce type de courbes de tensiométrie a déjà été observé dans le cas de tensioactifs paires d'ions et peut correspondre à une transition micelles-vésicules [15]. Les auteurs ont montré que le premier plateau observé correspondait à une transition monomère-micelles et l'autre à une transition micelles-vésicules.

Afin de vérifier si ces caféates à longue chaîne présentent les mêmes types de transitions, nous avons étudié leurs solutions par DLS. Les mesures réalisés sur le premier palier dans le cas du Caf12 ou du Caf16 n'ont montré aucune diffusion, ce qui est en accord avec la formation de micelles. Ces objets étant trop petits et trop dynamiques pour être

détectés avec l'appareil de DLS dont nous disposons. Par contre cette technique permet de détecter et de déterminer la taille de vésicules. Des objets pouvant correspondre à des vésicules (217 nm pour le Caf12 et 250 nm pour le Caf16) ont été détectés au début du deuxième plateau, pour les solutions les plus concentrées en tensioactifs caféates. Les valeurs d'indices de polydispersité (0,32 et 0,46 respectivement) pourraient être en accord avec la formation spontanée de vésicules [15]

Toutefois, afin de vérifier qu'il s'agit bien de vésicules, nous avons étudié leurs solutions aqueuses par microscopie électronique à transmission (MET). Ces études ont été effectuées pour des concentrations en paires d'ions caféates correspondant aux limites de solubilité ($1,5x10^{-3}$M pour le Caf12 et $1x10^{-4}$M pour le Caf16). Des vésicules de diamètres compris entre 100 et 250 nm pour le Caf12 et entre 60 et 150 nm pour le Caf16 ont été confirmées (Figure V-8).



Caf12 **Caf16**

Figure V-8 : Clichés de microscopie électronique à transmission

La comparaison des diamètres des vésicules observées par DLS et microscopie électronique est présentée Tableau V-3.

tensioacif	Diamètre moyen (nm)	
	DLS	MET
Caf12	270±27	100-250
Caf16	231±14	60-150

Tableau V-3 : Comparaison des diamètres des vésicules du Caf12 ($1,5x10^{-3}$M) et du Caf16 (1x10-4M) par microscopie électronique et diffusion dynamique de la lumière

Les écarts avec des résultats obtenus par diffusion de la lumière et par microscopie électronique peuvent provenir de la nature de l'échantillon et de la technique d'observation (agent de contraste). Par diffusion de la lumière, les agrégats sont en solution, en revanche, dans le cas de la microscopie électronique à transmission, les échantillons sont soumis à un vide poussé.

Les résultats de DLS et microscopie électronique confirment que les tensioactifs caféates synthétisés présentent bien une transition micelle-vésicule. Les cations du dodécylammonium ainsi que ceux de l'hexadécylammonium seuls ne forment que des micelles dans l'eau et ne sont pas capables de former des vésicules. La formation spontanée de vésicules dans le cas des paires d'ions caféates montre que la partie caféate est suffisamment hydrophobe pour s'associer aux chaînes hydrocarbonées. La formation d'une telle interaction entre la chaîne de l'amine grasse et le contre-ion caféate change le paramètre d'empilement [16] du tensioactif (Figure V-9) ce qui lui donne la capacité de former des vésicules.

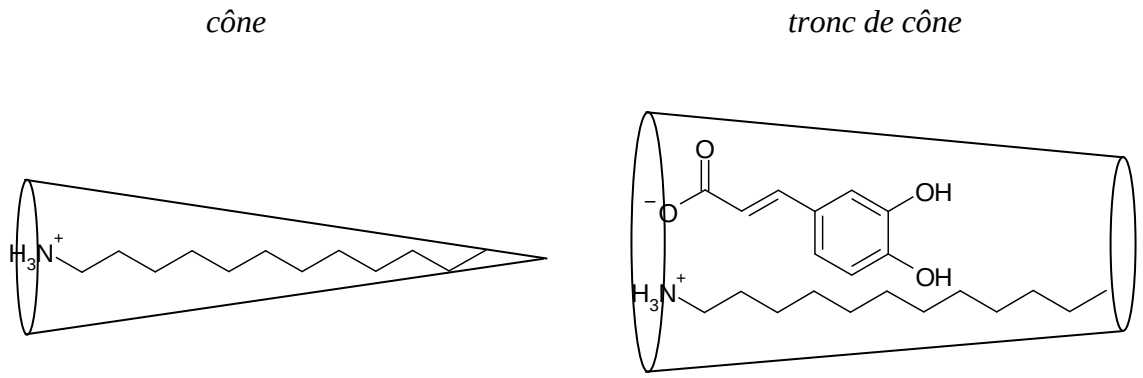


Figure V-9 : Changement du paramètre d'empilement de l'amine grasse lors de l'incorporation du contre-ion caféate

Le premier palier de tension de surface peut correspondre à la formation des micelles. Dans ce cas le contre-ion du tensioactif paire d'ions est libre et l'ammonium à longue chaîne se comporte comme n'étant pas associé par contribution hydrophobe à son contre-ion. Le deuxième palier peut correspondre à l'association hydrophobe du contre-ion au tensioactif (comme sur Figure V-9) ce qui conduit spontanément à la formation de vésicules**.** Dans ce cas le tensioactif paire d'ions se comporte comme un tensioactif catanionique [2,17].

Après l'étude physico-chimique des tensioactifs caféates nous avons vérifié si la partie caféate conservait ses propriétés antioxydantes dans les paires d'ions Caf12 et Caf16.

V.4 Evaluation des propriétés antioxydantes de Caf12 et Caf16

Afin d'analyser les propriétés antioxydantes (antiradicalaires) des Caf12 et Caf16 nous avons employé la méthode de Blois [18]. Cette méthode consiste en utilisation du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Figure V-10). Ce dernier est un radical stable grâce à la délocalisation de l'électron libre sur le cycle aromatique et nitriles picrique. Il est fréquemment utilisé pour la recherche de produits antioxydants extraits de plantes [19-21]. La méthode de Blois consiste en la réduction du DPPH par des molécules antioxydantes. La réduction du radical DPPH correspond à un transfert du radical hydrogène ($H^{\bullet}$) de la molécule antioxydante (AH) vers le DPPH. Les réactions chimiques postérieures du radical formé ($A^{\bullet}$) déterminent ensuite le nombre de molécules de DPPH réduites par une molécule antioxydante.

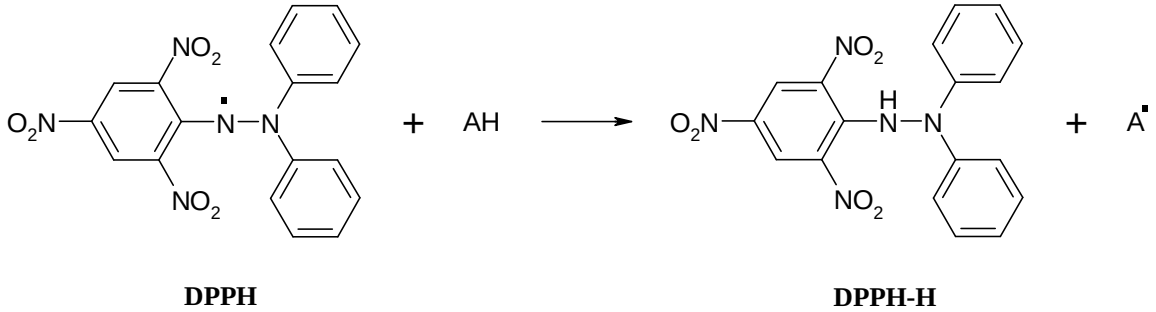


Figure V-10 : Mécanisme de réduction du DPPH

Grâce à la délocalisation de l'électron libre du DPPH, son spectre d'absorbance présente une bande dans le visible (λ_{max} = 515nm). Lors de la réduction de ce radical l'intensité de cette bande diminue, ce qui permet de suivre la réduction du DPPH par l'antioxydant. En déterminant le rapport entre les concentrations en DPPH et en antioxydant correspondant à la réduction totale du radical libre, on peut déterminer combien de molécules de DPPH sont réduites par une molécule antioxydante. Un autre paramètre permettant de comparer les intensités de pouvoir antioxydant de différents produits est la concentration en antioxydant correspondant à la réduction de 50% du DPPH (EC_{50}). Le seul inconvénient de cette méthode est l'impossibilité de l'utiliser dans l'eau, car le DPPH est instable en milieu aqueux.

Nous avons ainsi comparé les effets antioxydants des Caf12, Caf16 et le caféate d'ammonium (CafAmm) par la méthode de Blois. Le CafAmm a été utilisé comme référence afin de comparer les propriétés antioxydantes. Le but de cette étude était de vérifier si la

formation des paires d'ions Caf12 et Caf16 pouvait modifier les propriétés antioxydantes de l'anion caféate.

Un exemple de résultats obtenus par titration de la solution de DPPH par le Caf12 est présenté sur la Figure V-11.

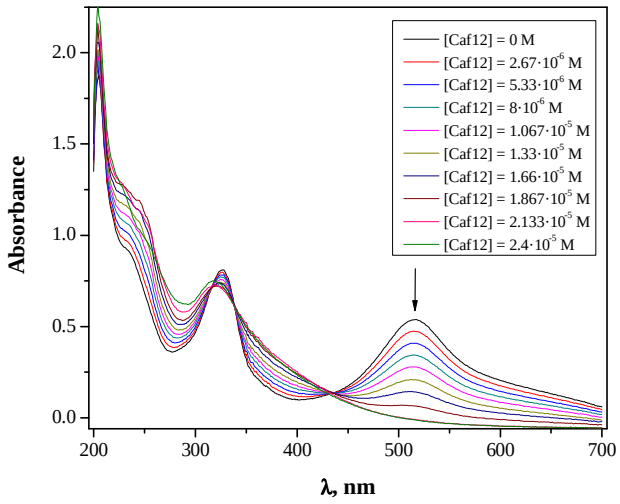


Figure V-11 : Exemple de résultats de titration du DPPH par le Caf12 ; [DPPH] = 4,3x10^{-5}M, MeOH, 25ºC

Il apparaît que le Caf12 réduit effectivement le DPPH. Cela se manifeste par une diminution et une disparition totale de la bande d'absorbance à 515nm du DPPH. Seulement plusieurs minutes ont été nécessaires pour atteindre l'équilibre après chaque addition de Caf12. Ces titrations ont été effectuées pour les trois produits (Caf12, Caf16 et CafAmm). En portant les valeurs de l'absorbance à 515nm en fonction de la concentration en antioxydant les courbes de réduction du DPPH par les différents caféates ont été tracées (Figure V-12).

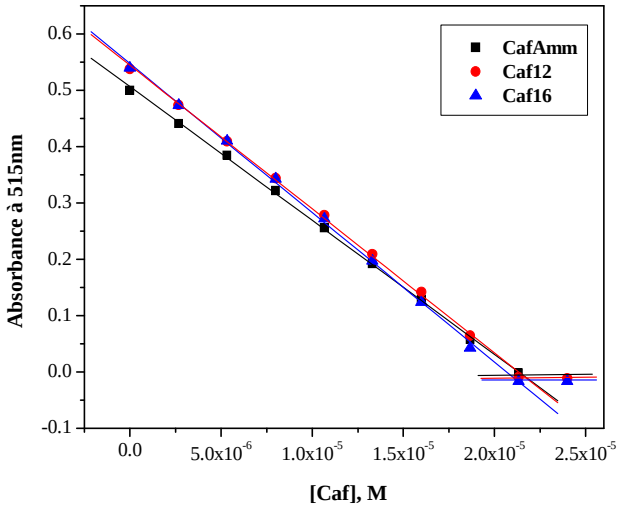


Figure V-12 : Comparaison de la réduction du DPPH par le caféate d'ammonium (CafAmm), le caféate de dodécylammonium (Caf12) et le caféate d'hexadécylammonium (Caf16); [DPPH] = 4,3x10^{-5}M, MeOH, 25ºC

Il apparaît que les effets sur la réduction du DPPH sont identiques pour les trois caféates. Les valeurs des concentrations en antioxydant correspondant à la réduction de 50% du DPPH (EC_{50}) pour ces trois produits sont très proches (Tableau V-4). La nature du contre-ions de l'anion caféate (ammonium, dodécylammonium ou héxadécylammonium) n'influe donc pas ces propriétés antioxydantes.

produit	EC_{50}, µM
CafAmm	10,8
Caf12	10,3
Caf16	9,9

Tableau V-4 : Les valeurs de EC50 pour la réduction du DPPH par des CafAmm, Caf12 et Caf16

De plus, la neutralisation totale du DPPH (soit la disparition du maximum d'absorption à 515nm) est observée aux mêmes concentrations. Cette concentration ($2{,}13 \times 10^{-4}$M) correspond bien à la réduction de deux molécules du DPPH par une molécule de caféate ([DPPH] = $4{,}3 \times 10^{-5}$M).

Ces résultats montrent que le mécanisme de la réduction du DPPH par l'anion caféate correspond à un double transfert du radical hydrogène, conduisant à la caféoquinone (Figure V-13).

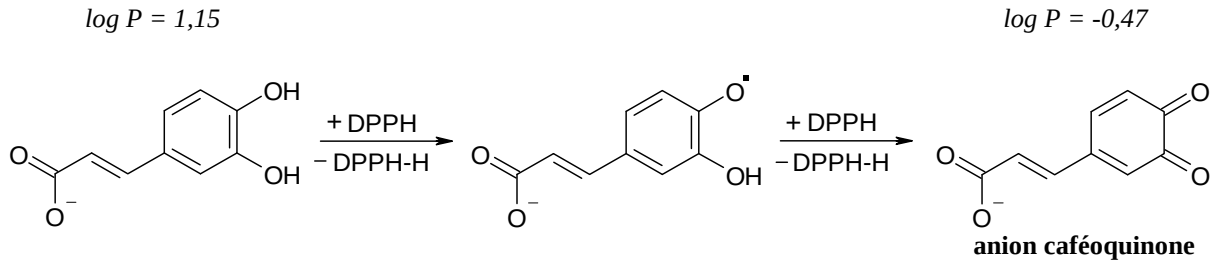


Figure V-13 : Mécanisme de la réduction du DPPH par l'anion caféate

Le produit d'oxydation de l'acide caféique conserve la fonction acide d'où le possible maintien de la paire d'ions. C'est pour cette raison que nous avons vérifié la possibilité de conserver les vésicules de Caf12 ou de Caf16 même après l'oxydation. Pour cela, les solutions de Caf12 ($1{,}3 \times 10^{-3}$M) et Caf16 (1×10^{-4}M) ont été laissées pendant 3 semaines sans protection vis-à-vis de la lumière et de l'oxygène de l'air. Au bout de ces 3 semaines les

solutions se sont oxydées et ont significativement jauni. L'analyse de ces solutions par diffusion dynamique de la lumière montre dans le cas de Caf12 la présence de vésicules stables vis-à-vis de l'oxydation. Dans le cas de Caf16 en revanche il n'y a plus de vésicules détectables déjà 3 jours après la préparation de la solution (Tableau V-5).

Caféate	0 jours	3 jours	21 jours
Caf12	270,0±28,4	218,8±12,2	172,6±6,4
Caf16	230,8±15,0	∞	∞

Tableau V-5 : Stabilité de vésicules de Caf12 et Caf16

Ces résultats peuvent s'interpréter par le fait que la transformation du contre-ion caféate en caféoquinone augmente sa polarité (log P de 1,15 à -0,47) et diminue d'autant ses interactions hydrophobes, notamment avec une chaîne déjà très hydrophobe comme C16. Cette transformation affecte le positionnement du contre-ion (paramètre d'empilement) et donc le type d'objet formé (micelle ou vésicule).

Après la confirmation du fait que ces tensioactifs paires d'ions conservent des propriétés antioxydantes nous avons étudié leur capacité à protéger l'ADN dans une phase lipidique, notamment dans des complexes ADN-tensioactifs.

V.5 Etude de l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin d'ADN

V.5.1 Effet de la complexation de l'ADN avec le Caf12 et le Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin

Après synthèse et caractérisation de ces nouveaux tensioactifs antioxydants, nous avons étudié leur influence sur la formation photoinduite de coupures simple brin sur l'ADN. L'augmentation du taux de photocoupures sur un ADN complexé avec des tensioactifs en présence de photosensibilisateurs hydrophobes peut être considérée comme une réaction se produisant dans une phase lipidique, où à l'interface lipide/eau. C'est pour cette raison que l'étude de l'influence du Caf12 ou du Caf16 sur ce processus peut mettre en évidence les avantages de ces nouveaux tensioactifs antioxydants. Nous avons tout d'abord étudié la

complexation de l'ADN par ces tensioactifs et ensuite l'influence de cette complexation sur la photosensibilisation de coupures simple brin. Enfin, nous avons étudié la protection de l'acide nucléique dans le complexe ADN-CTAB en présence de Caf12 ou Caf16.

V.5.1.1 *Complexation ADN-Caf12 et ADN-Caf16*

Nous avons étudié la complexation de l'ADN avec le Caf12 et le Caf16 par titration par fluorescence. Les résultats de cette étude sont présentés sur la Figure V-14.

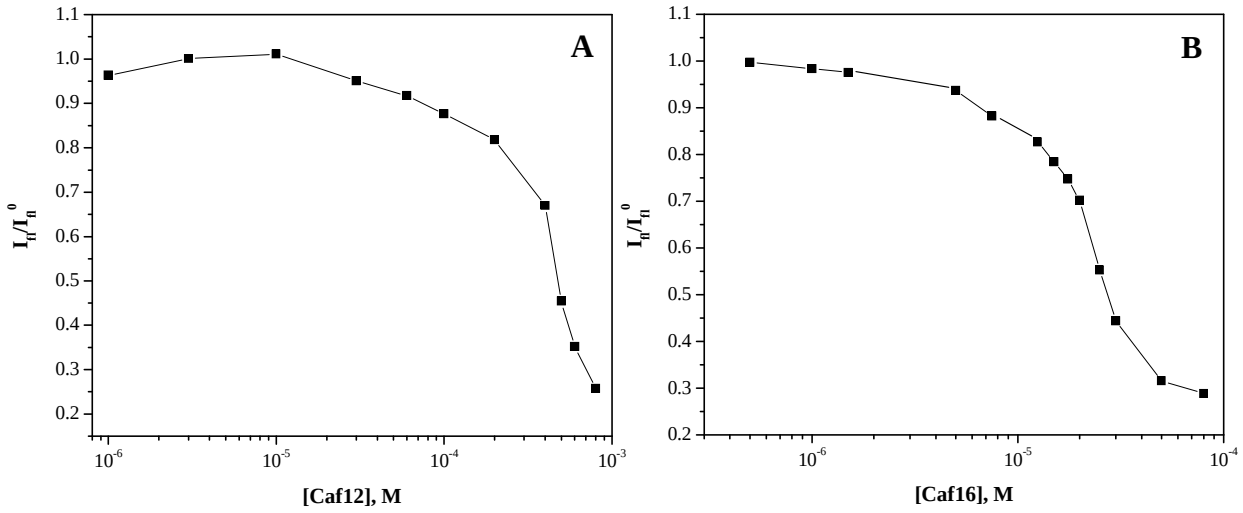


Figure V-14 : Etude par titration par fluorescence de la complexation de l'ADN avec le Caf12 et le Caf16, dans Tris/HCl à 25ºC, [ADN-PO_4^-] = $3x10^{-6}$ M

Des vésicules de lipides cationiques peuvent complexer l'ADN par neutralisation de charge. Dans ce cas le processus ressemble beaucoup à une complexation ADN-polymères, car très coopérative grâce aux fortes interactions hydrophobes entre les chaînes de lipides. Les résultats de l'étude de la complexation entre l'ADN et les paires d'ions caféate sous forme de vésicules montrent que ces tensioactifs complexent l'ADN, mais non à la neutralisation de l'acide nucléique, comme on pourrait l'attendre pour des lipides cationiques. Cela signifie que la complexation ADN-caféates détruit les vésicules et les structures lamellaires. On peut expliquer ce phénomène par la dissociation des paires d'ions caféate lors de leur complexation avec l'ADN. Les parties caféates ne sont pas liées de manière covalente aux chaînes des amines grasses, et la complexation de l'ADN conduit à l'échange des contre-ions sodium de l'ADN pour les cations ammonium. Ainsi, la complexation ADN-caféates provoque la dissociation de la paire d'ions caféate (Figure V-15).

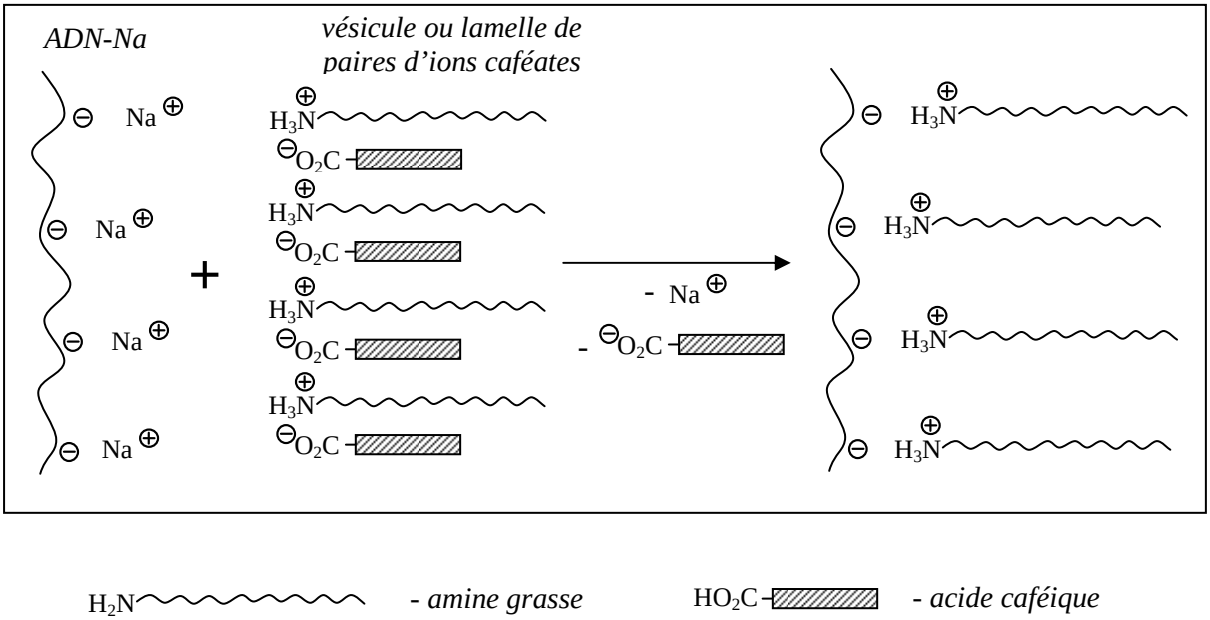


Figure V-15 : Schéma de complexation des paires d'ions caféate avec l'ADN

En effet, la complexation entre l'ADN et les paires d'ions caféate correspond bien à la CA de ces tensioactifs sur l'ADN. La comparaison des valeurs de CA^{ADN} du Caf12 et du Caf16 avec celles des tensioactifs ammoniums monocaténaires de mêmes longueurs de chaînes étudiés précédemment confirme cette dissociation (Tableau V-6).

Tensioactifs à chaîne de 12 atomes du carbone			
tensioactif	DTAC	Ghyd12HCl	Caf12
CA^{ADN}, M	$1{,}8 \times 10^{-3}$	$4{,}4 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}
Tensioactifs à chaîne de 16 atomes du carbone			
tensioactif	CTAB	CTAC	Caf16
CA^{ADN}, M	$2{,}3 \times 10^{-5}$	$2{,}1 \times 10^{-5}$	$2{,}5 \times 10^{-5}$

Tableau V-6 : Comparaison des CA sur ADN des tensioactifs monocaténaires (CTAB, CTAC, DTAC et Ghyd12HCl) et des tensioactifs paires d'ions (Caf12 et Caf16)

Après l'étude de la complexation de l'ADN avec des paires d'ions caféates nous nous sommes intéressés à l'effet de cette complexation sur la photosensibilisation de coupures simple brin.

V.5.1.2 *Influence des Caf12 et Caf16 sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN*

Pour les études de l'influence de la complexation de l'ADN avec les paires d'ions caféate sur la formation de photocoupures, nous avons utilisé la même méthodologie que pour les études précédentes. Les résultats sont présentés sur la Figure V-16.

Il apparaît que lors de l'augmentation de la concentration en Caf12, le taux de coupures photoinduites augmente. On n'observe aucun effet antioxydant de ce tensioactif ce qui confirme bien que la complexation entre l'ADN et les caféates provoque la libération du contre-ion antioxydant. En fuyant dans la phase aqueuse, l'anion de l'acide caféique n'est plus capable de capter les EOR formés par la benzophénone dans la phase lipidique à proximité de l'ADN. Ce résultat est identique à l'effet du mannitol sur la coupure de l'ADN complexé par le CTAB.

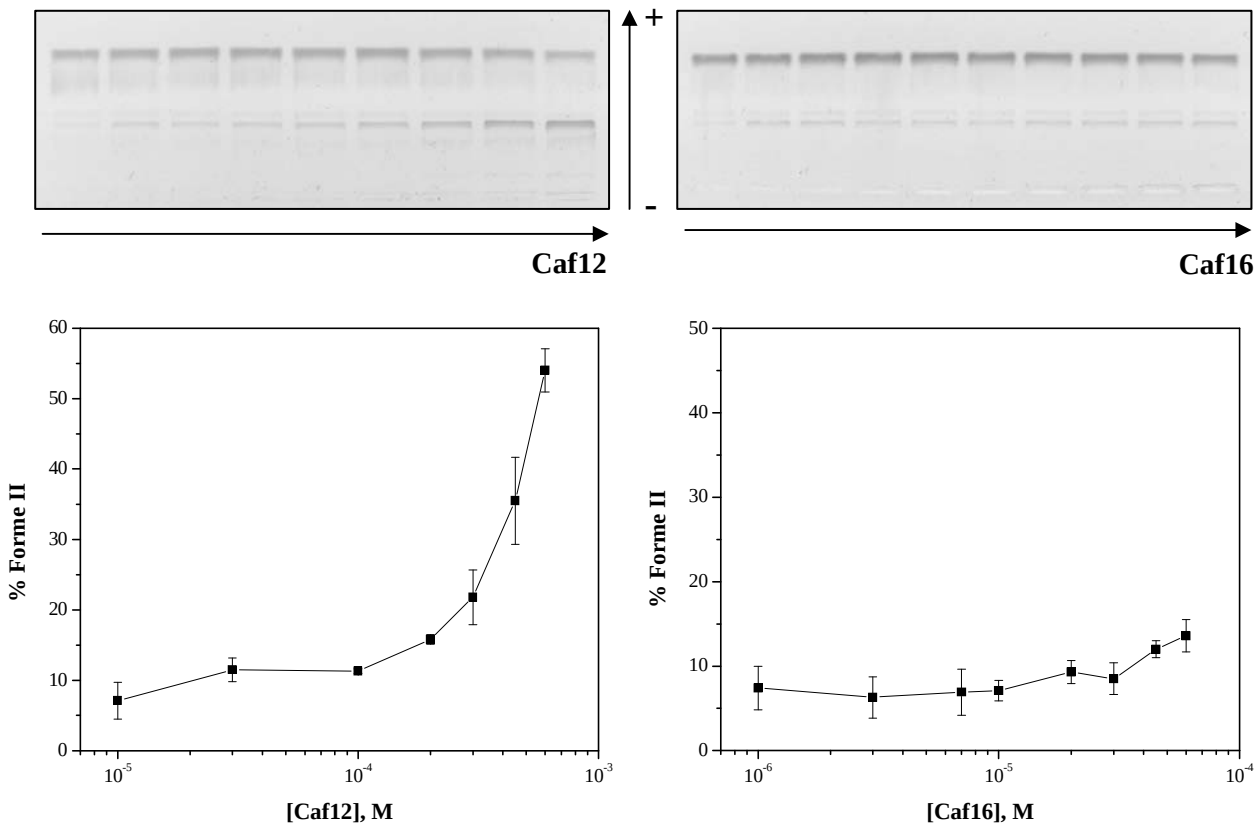


Figure V-16 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induits par la photosensibilisation de benzophénone; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

En raison de la faible solubilité de Caf12, la concentration maximale utilisée pour cette étude était de $6x10^{-4}$M. Toutefois, la correspondance entre la valeur du pourcentage maximal de la forme II après l'irradiation (55%) correspond bien à celles des maxima obtenus avec les tensioactifs cationiques monocaténaires (45-55%). Cela nous permet de considérer la concentration maximale en Caf12 utilisée comme correspondant au maximum de dommages. Cette concentration ($6x10^{-4}$M) est très proche de la CA^{ADN}_{Caf12} ($5x10^{-4}$ M) obtenue par titration par fluorescence. Comme la concentration en ADN ($9x10^{-5}$M PO_4^-) utilisée pour cette étude est plus faible que la valeur de CAC^{ADN}_{Caf12}, le Caf12 complexe l'ADN par le mécanisme hydrophobe. L'augmentation de coupures de l'ADN correspond donc à la complexation ADN-Caf12.

Dans le cas du Caf16, la concentration en ADN utilisé ($9x10^{-5}$M PO_4^-) est plus importante que la CAC^{ADN}_{Caf16} ($2,5x10^{-5}$M), aussi, dans ce cas, le Caf16 doit complexer l'ADN par neutralisation de charges. En raison de la faible solubilité du Caf16, nous n'avons pas réussi à atteindre la totale neutralisation de l'ADN. Par contre à la concentration maximale en Caf16 utilisée pour cette étude ($6x10^{-5}$ M), on observe le début de l'augmentation du nombre de photocoupures sur l'ADN.

Bien qu'en raison des faibles solubilités des tensioactifs caféate dans l'eau nous n'ayons pas réussi à atteindre les maxima de dommages, les résultats obtenus ne sont pas en contradiction avec le fait que les contre-ions caféate se dissocient de la paire d'ions lors de leur complexation. Dans ce cas, la complexation entre l'ADN et les tensioactifs caféate obéit aux même règles que la complexation de l'ADN avec des tensioactifs cationiques monocaténaires du type CTAB ou DTAC.

Après l'analyse de l'influence des paires d'ions caféates sur la formation de photocoupure sur l'ADN seul, nous avons étudié leur influence sur l'ADN déjà complexé avec le CTAB.

V.5.2 Application des paires d'ions caféate pour la protection de l'ADN dans les complexes ADN-CTAB

Nous venons de montrer que dans la structure paire d'ions, les tensioactifs caféates perdent leur contre-ion antioxydant lors de la complexation avec l'ADN. Que se passet-il

lorsque l'ADN est déjà complexé avec le CTAB? Pour cela deux systèmes ont été testés : un mélange avec un rapport constant CTAB:caféate 9 : 1 (CTABCaf10%) et un mélange d'une concentration précise en CTAB avec des concentrations croissantes en Caf12 ou Caf16 (CTAB+nCaf).

V.5.2.1 *Effet de la complexation de l'ADN avec le CTABCaf12-10% et le CTABCaf16-10% sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN par la benzophénone*

Afin de vérifier si les paires d'ions caféate sont capables de protéger l'ADN vis-à-vis des processus oxydatifs, nous avons décidé de comparer l'influence du CTAB et du mélange CTAB-caféate 9:1 sur la formation de coupures simple brin. Nous appellerons le mélange de CTAB avec 10% de Caf12 « CTABCaf12-10% » et le mélange de CTAB avec 10% de Caf16 « CTABCaf16-10% ». Cette valeur de 10% molaire a été choisie de manière à être suffisamment faible pour ne pas interférer avec la complexation ADN-CTAB, mais suffisamment élevée pour apporter un effet antioxydant.

V.5.2.1.1 *Influence de la présence de 10% des tensioactifs caféate sur l'agrégation du CTAB*

Avant d'étudier l'effet de ces systèmes sur la formation de dommages sur l'ADN, nous avons vérifié si la présence de 10% de tensioactifs caféate pouvait influer sur la micellisation et sur l'agrégation du CTAB sur l'ADN.

Pour cela, nous avons comparé par tensiométrie la CMC du CTAB seul avec la CMC des mélanges CTABCaf12-10% et CTABCaf16-10%. Cette comparaison a été effectuée dans l'eau (Figure V-17) et dans le tampon 30mM Tris/HCl (Figure V-18).

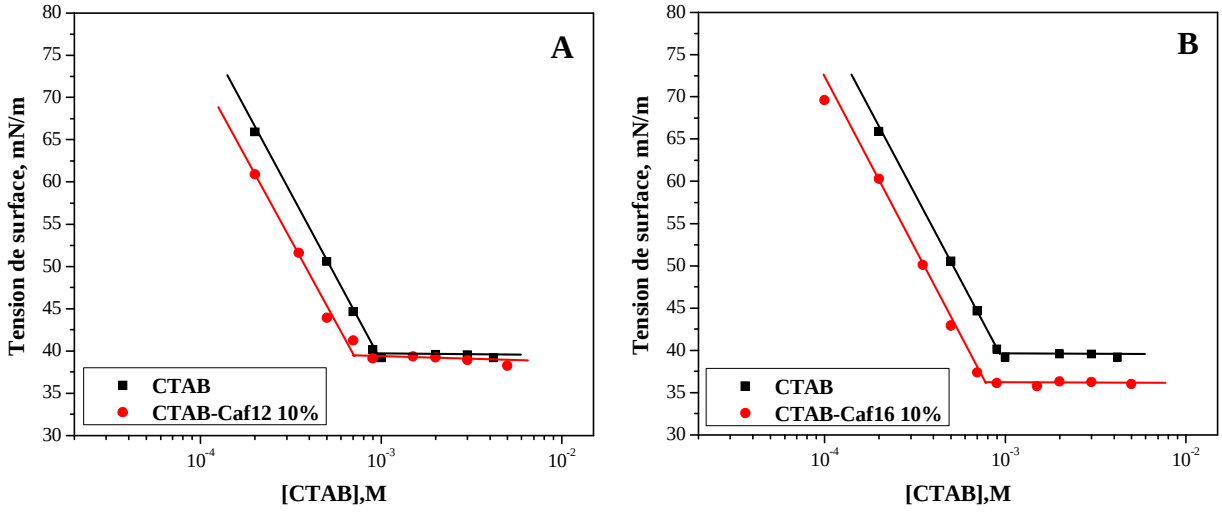


Figure V-17 : Comparaison des micellisation du CTAB et des mélanges CTABCaf12-10% (**A**) et CTABCaf16-10% (**B**) dans l'eau à 25ºC

Les résultats de la Figure V-17 montrent que la présence de 10% de Caf12 et de Caf16 diminue très peu la CMC du CTAB. Cet effet s'atténue encore lorsque l'on fait cette comparaison dans le tampon 30mM Tris/HCl. Dans ce cas, l'effet des paires d'ions caféate est insignifiant ce qui rend possible la comparaison directe de l'influence du CTAB et des mélanges CTABCafs-10% sur la formation de photodommages.

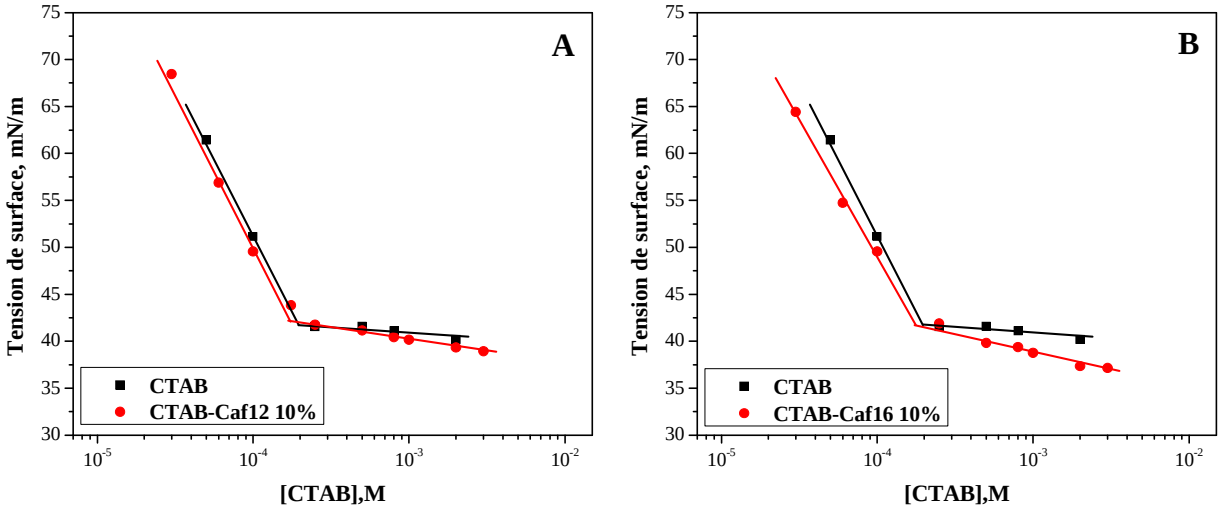


Figure V-18 : Comparaison des micellisation du CTAB et des mélanges CTABCaf12-10% (**A**) et CTABCaf16-10% (**B**) dans Tris/HCl à 25ºC

Nous avons également vérifié si la présence des paires d'ions caféate pouvait influer sur la complexation ADN-CTAB. Pour cela nous avons comparé l'agrégation sur ADN du

CTAB et des mélanges CTABCafs-10% par titration par fluorescence et électrophorèse sur gel d'agarose.

Les résultats de cette comparaison par titration par fluorescence sont présentés sur la Figure V-19.

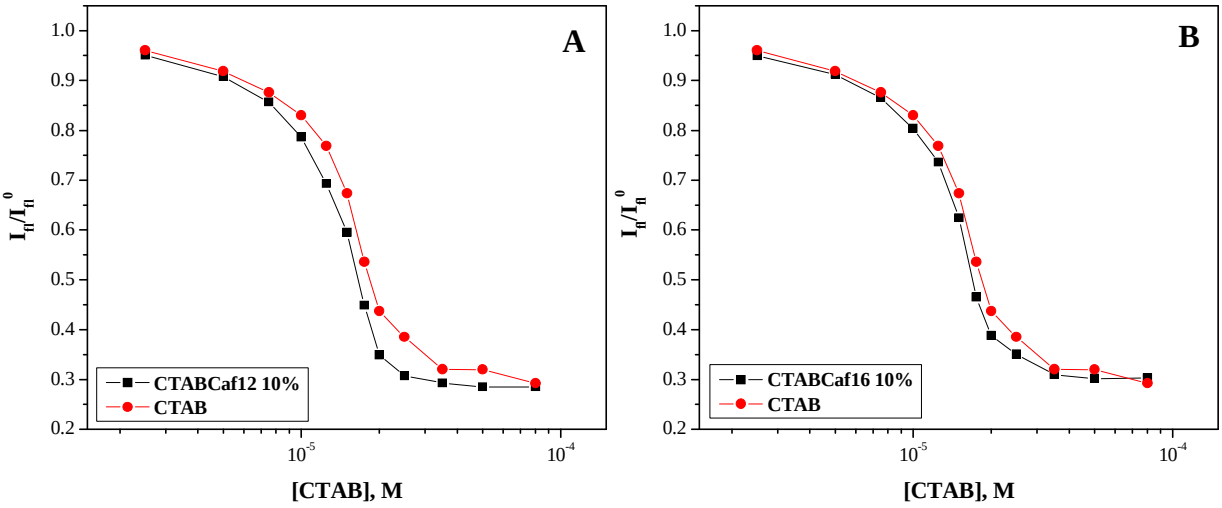


Figure V-19 : Etude par titration par fluorescence de l'influence de la présence de 10% de Caf12 (**A**) ou de Caf16 (**B**) sur la complexation ADN-CTAB; dans Tris/HCl à 25ºC

Les résultats obtenus montrent que la présence des paires d'ions caféates ne change pas la CA du CTAB sur l'ADN. Ces résultats ont aussi été confirmés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure V-20).

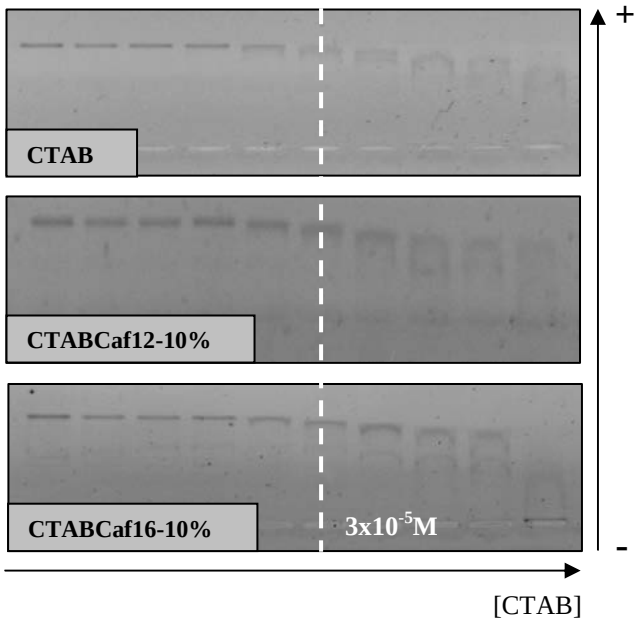


Figure V-20 : Etude par électrophorèse sur gel d'agarose de l'influence de la présence de 10% de Caf12 (A) ou de Caf16 (B) sur la complexation ADN-CTAB; dans Tris/HCl à 25ºC

V.5.2.1.2 *Influence des mélanges CTABCaf12-10% et CTABCaf1610% sur la photosensibilisation de coupures simple brin*

Après avoir vérifié que la présence de 10% de Caf12 ou de Caf16 n'influe pas sur le processus de complexation ADN-CTAB, nous avons étudié les effets du mélange CTABCaf12-10% et du mélange CTABCaf16-10% sur la formation de photocoupures.

La comparaison des influences du CTABCaf12-10% et du CTAB est présentée sur la Figure V-21. Il apparaît qu'avant d'atteindre le maximum de photocoupures sur l'ADN, la présence de 10% de Caf12 dans la formulation n'affecte pas la formation de dommages. En revanche, après le maximum, une forte protection de l'ADN par le Caf12 est observée.

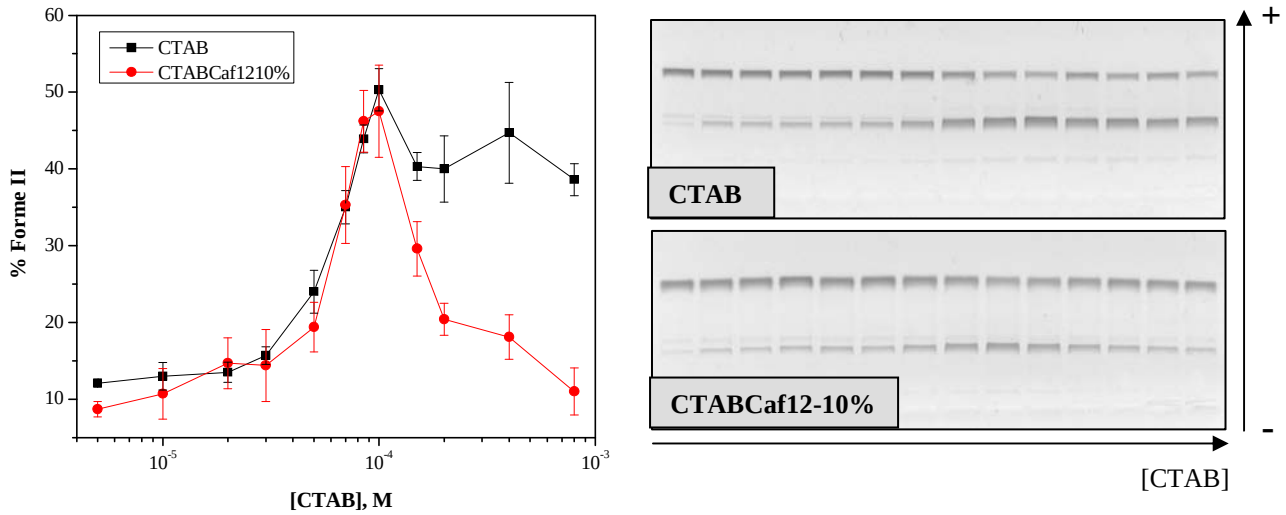


Figure V-21 : Comparaison par gel d'agarose et photodensitométrie, de l'influence du CTAB et du CTABCaf12-10% sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par photosensibilisation par la benzophénone; [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Le même phénomène a été observé lors de l'étude de l'influence du CTABCaf16-10% (Figure V-22).

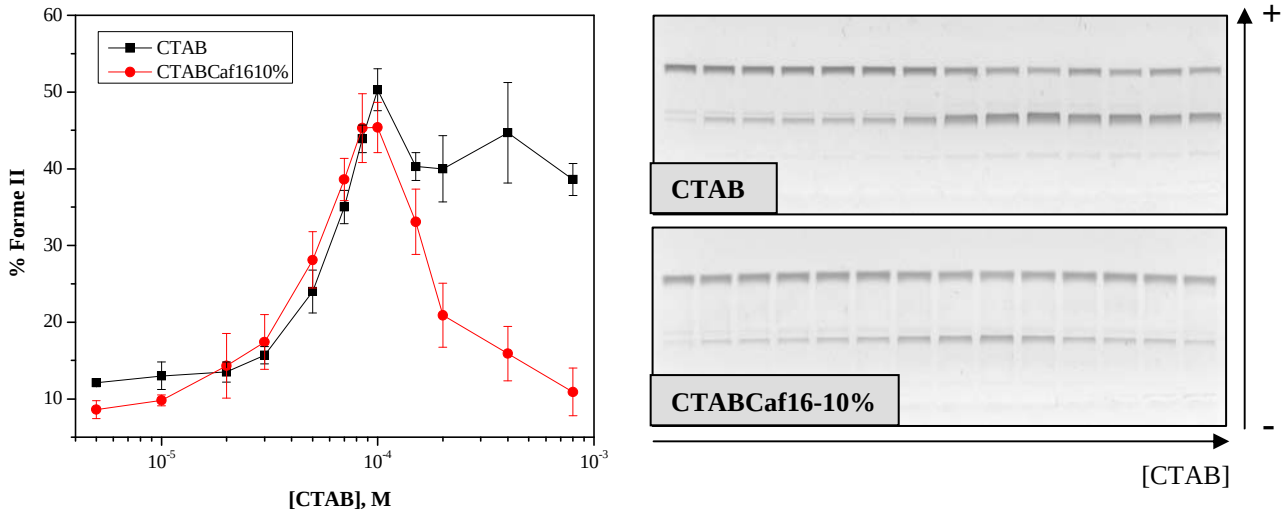


Figure V-22 : Comparaison par gel d'agarose et photodensitométrie, de l'influence du CTAB et du CTABCaf16-10% sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par photosensibilisation par la benzophénone; [ADN-PO_4^-] = 9x10^{-5} M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

La brusque diminution du taux de photocoupures après atteinte d'un maximum montre que cet effet n'est pas simplement lié à l'absorbance compétitive des UV par les caféates (l'effet de filtre UV).

Afin d'expliquer ce comportement, notre hypothèse est la suivante. La concentration en ADN utilisée pour ces études était plus importante que la CAC^{ADN}_{CTAB}, et dans ce cas, le CTAB complexe l'acide nucléique par le mécanisme électrostatique jusqu'à neutralisation de l'ADN. Avant le maximum de coupures sur l'ADN, l'acide nucléique n'est pas neutralisé et la complexation des paires d'ions caféate sur l'ADN même en présence de CTAB conduit à la libération du contre-ion caféate. Une telle dissociation des paires d'ions ne permet pas le maintien de l'antioxydant dans la phase lipidique.

En revanche, après le maximum de coupures, toutes les charges de l'ADN sont neutralisées et l'intégration des paires d'ions caféate et donc du contre-ion antioxydant dans les régions hydrophobes fait que ce dernier devient capable de protéger l'ADN contre les EOR (Figure V-23).

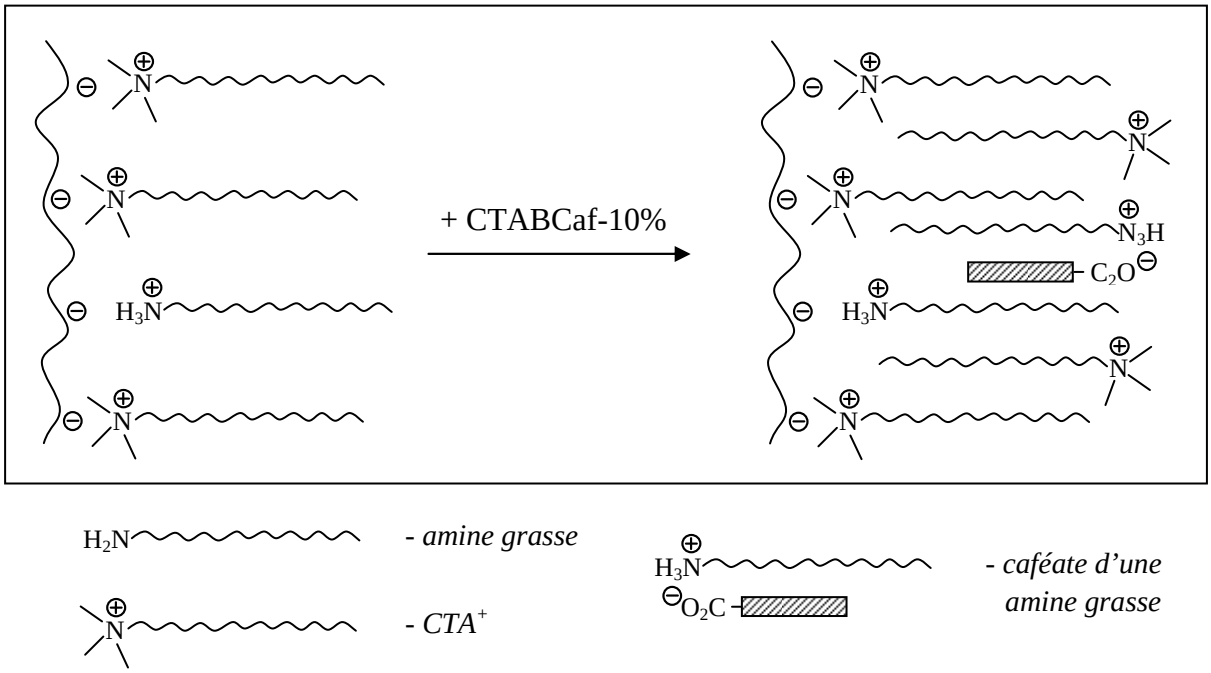


Figure V-23 : Schéma de l'incorporation des paires d'ions caféate dans l'ADN complexé après sa neutralisation

Les résultats obtenus montrent que les tensioactifs paires d'ions à base d'acide caféique sont capables d'agir comme antioxydants et de protéger une phase lipidique. A partir de ces résultats on peut également évaluer les limites d'utilisation de cette nouvelle classe de tensioactifs antioxydants. Comme la partie antioxydante n'est reliée à la chaîne hydrophobe que par des interactions électrostatiques et hydrophobes, la complexation par des polyanions peut dissocier les paires d'ions caféates et inhiber leur effet antioxydant dans la phase lipidique. Toutefois, la simplicité de leur synthèse reste un atout pour leur utilisation comme antioxydants amphiphiles (si les conditions le permettent).

Nous avons également comparé ces résultats avec l'effet de la présence de 10% molaire de caféate d'ammonium (CTABCafAmm-10%). Les résultats obtenus montrent qu'en présence de CafAmm on a le même effet qu'avec le Caf12 ou le Caf16 (Figure V-24). On observe également une diminution importante des coupures de l'ADN après passage par un maximum de dommages.

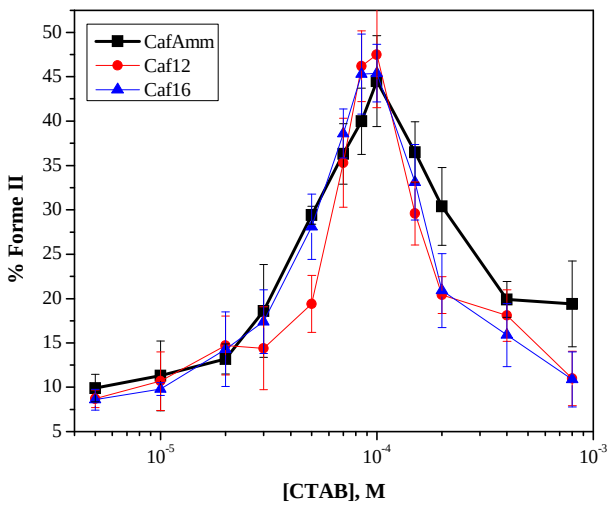


Figure V-24 : Comparaison des effets des mélanges CTABCafAmm-10%, CTABCaf12-10% et CTABCaf16-10% sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322 induites par photosensibilisation par la benzophénone; $[ADN\text{-}PO_4^-] = 9x10^{-5}$ M; $\lambda > 320$ nm; Tris/HCl, 25ºC

Nous ne nous attendions pas un tel effet antioxydant de la part du caféate d'ammonium sur la photosensibilisation de coupures simple brin sur l'ADN. Cependant, on peut émettre une hypothèse. Après complexation de l'ADN, lorsque tous ses phosphates sont neutralisés, le CTAB s'incorpore dans les complexes formés grâce aux interactions hydrophobes. L'anion caféate peut alors se substituer à un contre-ion bromure au niveau des têtes cationiques du céthyltriméthylamonium et ensuite s'incorporer dans les complexes par des interactions hydrophobes (Figure V-25).

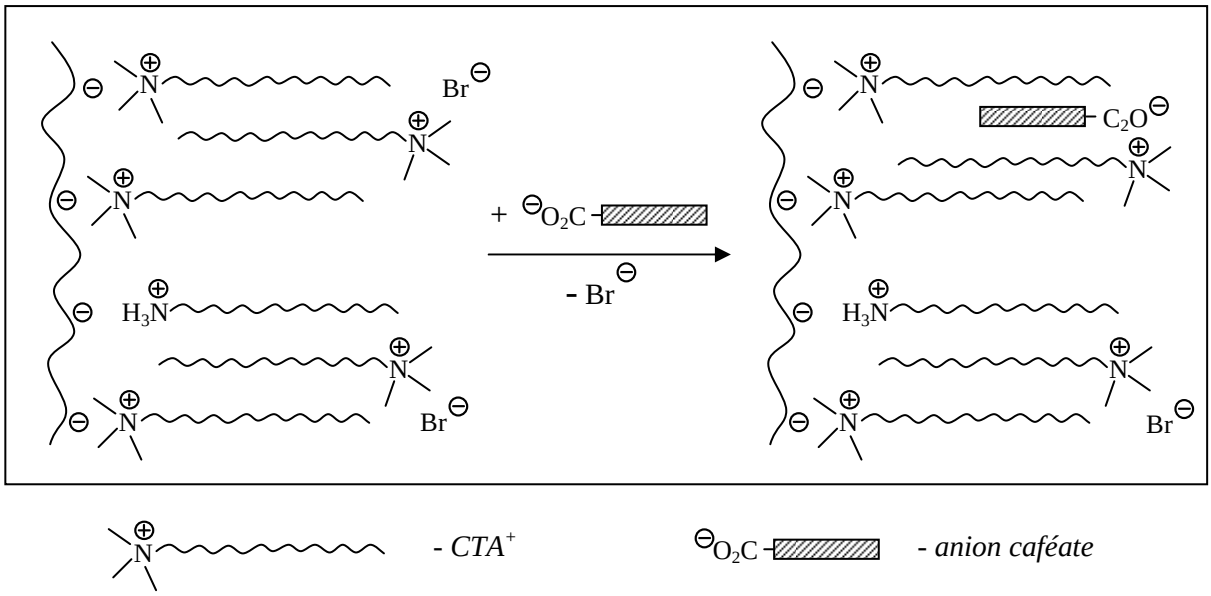


Figure V-25 : Schéma de l'incorporation de l'anion caféate dans le complexe ADN-CTAB après neutralisation

Bien que les effets soient proches, on peut cependant constater que dans le cas des paires d'ions caféates le taux de protection au final est plus important, ce qui traduit une meilleure incorporation de l'antioxydant grâce à leur propriété amphiphile.

V.5.2.2 *Effet du Caf12 et du Caf16 sur la coupure photoinduite de l'ADN dans le complexe ADN-CTAB*

Afin de déterminer les conditions optimales de protection de l'ADN par les paires d'ions caféates, nous avons étudié l'influence de leur concentration sur la formation de coupures simple brin sur les complexes ADN-CTAB déjà formés. Nous avons fixé une concentration en CTAB correspondant à la neutralisation de l'ADN ($1x10^{-4}$M) et étudié l'influence de concentrations croissantes en paires d'ions caféates sur la formation de photodommages. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure V-26.

Les résultats obtenus montrent que l'addition des tensioactifs caféates diminue de 20 à 25% le taux de photocoupures. Cet effet correspond à l'incorporation du Caf12 et du Caf16 dans le complexe ADN-CTAB. Toutefois, on constate que cette protection des complexes ADN-CTAB n'est pas linéaire. La diminution du taux de photocoupures est beaucoup plus significative lors de l'addition des premiers $2x10^{-5}$M de Caf12 et des $1x10^{-5}$M de Caf16 que lors des ajouts suivants. Ceci peut correspondre à une saturation progressive des sites d'incorporation.

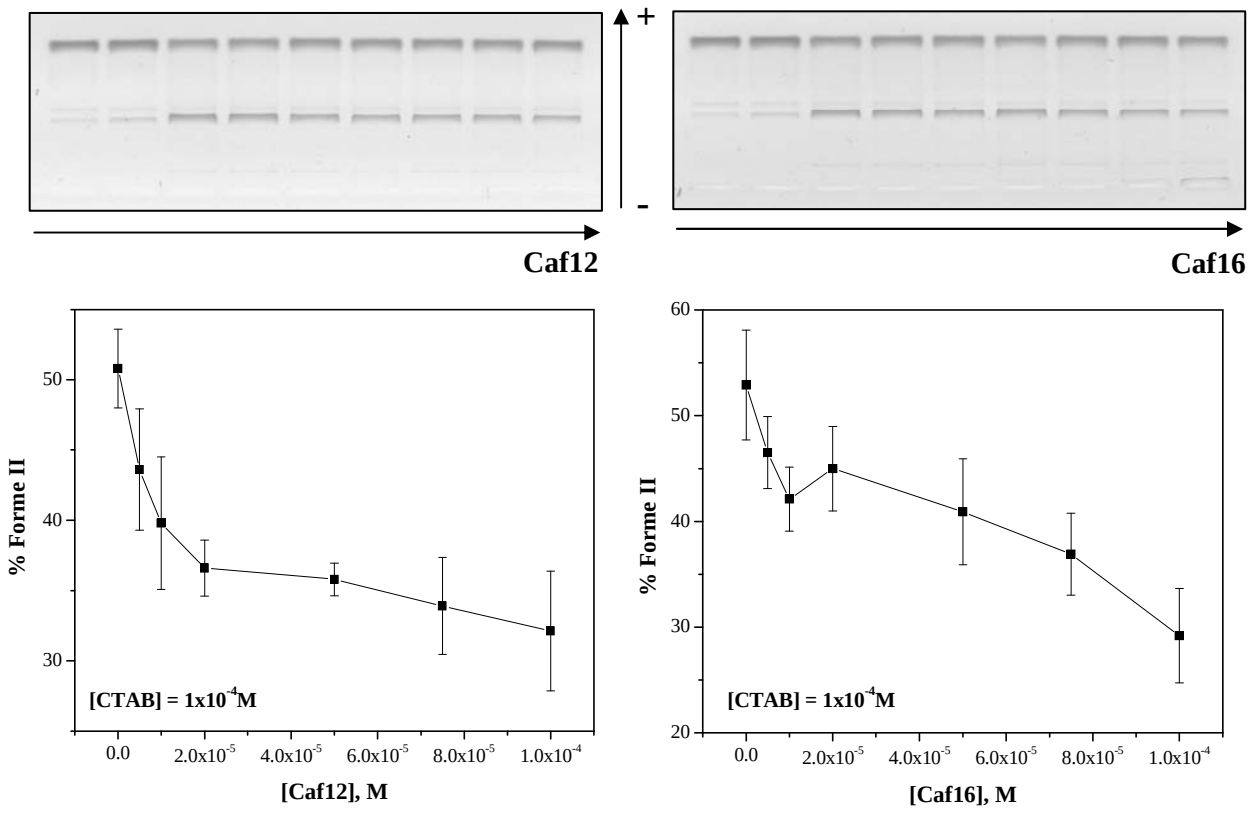


Figure V-26 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322induits par photosensibilisation par la benzophénone en présence de $1x10^{-4}$M CTAB; [ADN-PO_4^-] = $9x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25ºC

Toutefois, afin de mieux comprendre le mécanisme, une même étude a été effectuée mais à partir d'une concentration en CTAB correspondant à l'augmentation des coupures sur l'ADN ($6x10^{-5}$M). Les résultats sont présentés sur la Figure V-27.

Dans cette situation, l'ADN n'est pas complètement complexé et les deux effets sont observés: l'effet hydrophobe grâce à l'augmentation de l'hydrophobie autour de l'ADN et l'effet antioxydant grâce à la partie caféate. Dans les deux cas l'addition des tensioactifs caféates provoque d'abord la diminution de coupures de l'ADN (~10% pour le Caf12 et ~5% pour le Caf16) suivi par l'augmentation du taux de photocoupures. Cette augmentation est beaucoup plus importante pour le Caf16 que pour le Caf12, suggérant que c'est bien l'hydrophobie apportée par le tensioactif autour de l'ADN qui est responsable de cet effet.

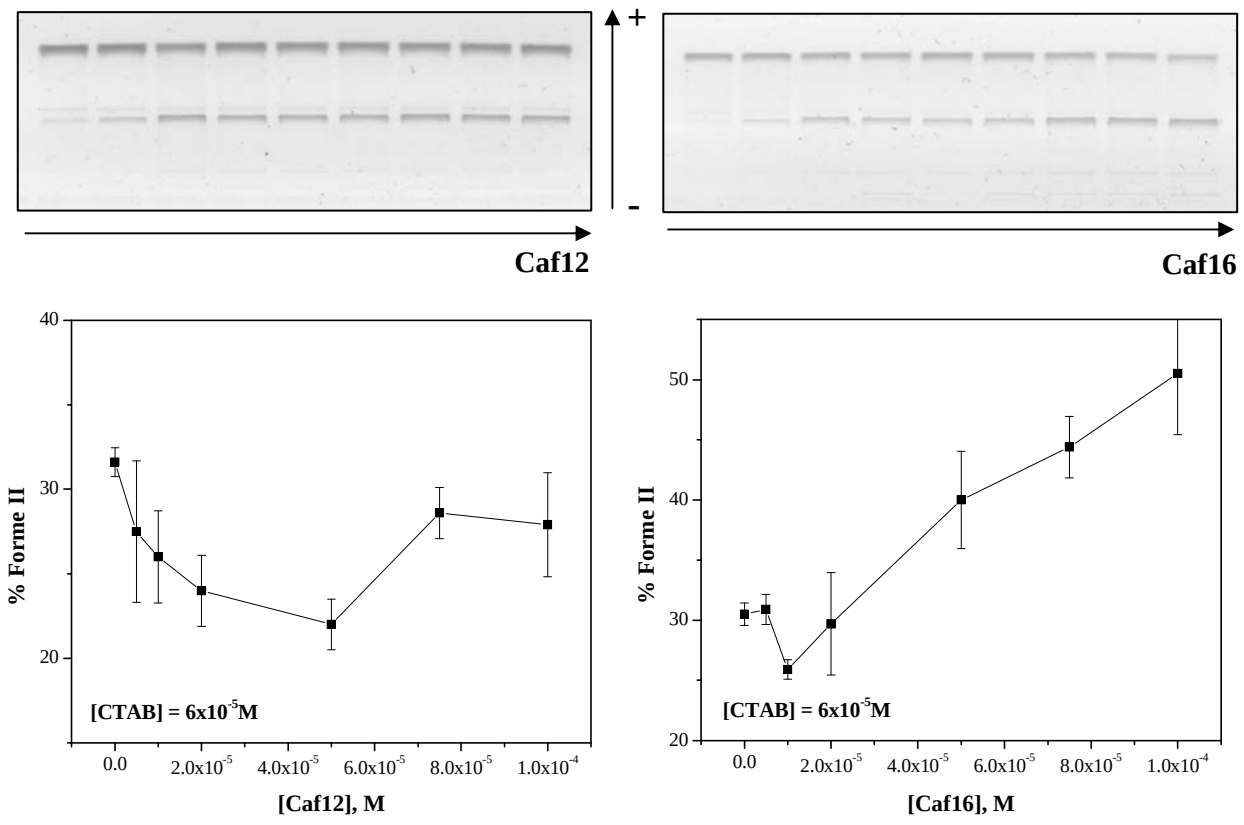


Figure V-27 : Gel d'agarose et photodensitométrie montrant l'influence du Caf12 et du Caf16 sur la formation de coupures sur l'ADN pBR322induits par photosensibilisation par la benzophénone en présence de $6x10^{-5}$M CTAB; [ADN-PO_4^-] = $6x10^{-5}$ M; λ > 320 nm; Tris/HCl, 25º

Ainsi, les paires d'ions caféates s'incorporent tout d'abord dans le complexe ADN-CTAB par des interactions hydrophobes, en se comportant comme des tensioactifs non-chargés. Puis, l'augmentation de l'hydrophobie autour de l'ADN et sa neutralisation (avec libération des contre-ions caféates) entraînent un accroissement des dommages.

V.6 Conclusion

Une nouvelle famille de tensioactifs antioxydants à contre ion caféate a été synthétisée par association acido-basique d'une amine à longue chaîne (dodécylamine et hexadécylamine) avec l'acide caféique (respectivement Caf12 et Caf16). Leur structure paire d'ions à été confirmé par RMN, IR, UV-visible et spectrométrie de masse. Par le test de DPPH nous avons montré que la partie caféate maintient ces propriétés antioxydantes.

Grâce à la structure paires d'ions, les caféates obtenus sont capables de former spontanément des vésicules en milieu aqueux. De plus, l'étude tensiométrique a montré l'existence de transition micelles-vésicules. Comme le produit d'oxydation de l'acide caféique maintient sa fonction acide, il a été montré que les vésicules de Caf12 sont stables vis-à-vis de l'oxydation.

Ces tensioactifs ont été utilisés pour protéger l'ADN complexé avec le CTAB. Il a été montré que lorsque l'ADN est neutralisé, les tensioactifs caféate s'incorporent dans le complexe ADN-CTAB et le protègent vis-à-vis de la photosensibilisation par la benzophénone de coupure simple brin. Toutefois, en raison de la structure paires d'ions des caféates, ces derniers se dissocient lorsque l'ADN n'est pas neutralisé, ce qui se traduit par la perte de l'effet protecteur antioxydant apporté par la partie caféate.

Références

[1] Ruben, C., Larsson, K. *Journal dispersion science and technology*, **1985**, 6 (2), 213-221

[2] Consola, S., Blanzat, M., Perez, E., Garrigues, J.-C., Bordat, R., Rico-Lattes, I. *Chem.Eur.J*, **2007**, 13, 3039-3047

[3] Karlsson, S., Friman, R., Lindstroem, B., Backlund, S., *J. Colloid Interface Sci.*, **2001**, *243*, 241-247

[4] Menger, F.M., Binder, W.H., Keiper J.S., *Langmuir*, **1997**, *13*, 3247-3250.

[5] Backlund, S., Friman, R., Karlsson S., *Colloids Surf. A*, **1997**, *123–124*, 125-133.

[6] Cadenas, E., and Packer, L. *In Handbook of Antioxidants*; ed. Marcel Dekker, Inc. New York, **2002**

[7] Hermann, K. J., *Food Technol.*, **1996**, *11*, 433–438

[8] Chung, T., Moon, S., Chang, Y., Ko, J., Lee, Y., Cho, G., Kim, S., Kim, C., *FASEB J.*, **2004**, *18*, 1670–1681

[9] Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., Mori, H., *Carcinogenesis*, **1993**, *14*, 1321–1325

[10] Michulart, P., Masferrer, J.L., Carothers, A.M., Subbramaiah, K., Zweifel, B.S., Koboldt, C., Mestre, J.R., Grunberger, D., Sacks, P.G., Tanabe, T., *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 2347–2352.

[11] Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1335*, 335–342

[12] John, M., Gerd Grumbinger, H., Winterhoff, H., *Planta medica*, **1990**, *56*, 14-18

[13] Saija, A., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Trombetta, D., Proteggente, A., De Pasquale, A., Uccella, N., Bonina, F., *J. Sci. Food Agric*. **1999**, *79*, 476-480

[14] Cornard, J.P., Caudron, A., Merlin, J.C., *Polyhedron*, **2005**, *25*, 2215-2222

[15] Bordes, R., Verdenne, M., Coppel, Y., Franceschi, S., Perez, E., Rico-Lattes, I., *ChemPhysChem*, **2007**, *8(13)*, 2013-2018

[16] Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. *J Chem Soc Far Trans 2*, **1976**, *72*, 1525-1568

[17] Blanzat, M., Perez, E., Rico-Lattes, I., Lattes, A. Gulik, A., *Chem Commun*, **2003**, *2*, 244-245

[18] Blois, M.S., *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200

[19] Molyneux, P., *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **2004**, *26(2)*, 211-219

[20] Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 6929-6934

[21] Kim, J.-K., Noh, J.H., Lee, S., Choi, J.S., Suh, H., Chung, H.Y., Song, Y.-O., Choi, W.C., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, *23(5)*, 661-662

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail a consisté à étudier la stabilité de l'ADN complexé par des agents cationiques dans des conditions non biologiques afin de déterminer les facteurs qui peuvent dans ces conditions influer sur la formation de dommages induits par le rayonnement UV. Pour cela divers agents cationiques comme des tensioactifs, des polymères, des lipides et des sels ont été utilisés pour complexer l'ADN. Afin d'atteindre cet objectif, deux domaines ont été étudiés : la physicochimie de la complexation ADN-agents cationiques, puis l'influence de cette complexation sur la formation coupures simple brin induites par photosensibilisation en présence de benzophénone.

L'étude physico-chimique de la complexation ADN-tensioactifs a révélé l'existence de deux mécanismes à l'origine de ce processus : un mécanisme principalement hydrophobe aux faibles concentrations en ADN (par rapport à la CAC^{ADN}_{TA}), et un mécanisme principalement électrostatique aux concentrations plus élevées. L'importance de la chaîne hydrophobe a été soulignée par comparaison de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs et des sels. De plus, contrairement aux tensioactifs et en raison d'une complexation plus coopérative, nous avons observé que les polymères cationiques n'interagissent avec l'ADN que par neutralisation de charges.

L'influence de la complexation de l'ADN avec des tensioactifs, polymères, lipides et sels cationiques sur la photosensibilisation par de benzophénone de coupures simple brin a ensuite été étudiée. Ainsi, il a été démontré pour la première fois, que la complexation de l'ADN avec des agents amphiphiles cationiques provoque l'augmentation du nombre de photocoupures sur l'acide nucléique en raison de l'apport d'un nouvel environnement autour de ce dernier. Lors de la complexation, ces agents forment des agrégats qui apportent des sites hydrophobes sur l'ADN. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, les photosensibilisateurs hydrophobes comme la benzophénone s'accumulent au plus près de l'ADN, ce qui conduit à une importante augmentation du taux de photolésions lors de l'irradiation. Par ailleurs, ce phénomène n'avait jamais été pris en compte lors de l'utilisation d'agents cationiques amphiphiles pour la transfection de l'ADN ou d'ARN. Inversement, nous avons démontré que dans le cas d'agents cationiques non amphiphiles, leur complexation avec l'ADN peut même augmenter la stabilité de celui-ci, en raison du quenching de l'état triplet du photosensibilisateur par les groupements ammoniums.

De manière très intéressante, un maximum de photocoupures a été observé à des concentrations en tensioactifs et polymères amphiphiles correspondant à la complexation avec

l'ADN. De manière originale, cette dépendance permet l'utilisation de la photosensibilisation de coupures simple brin comme le premier exemple d'outil basé sur une méthode chimique pour étudier la complexation ADN-agents amphiphiles.

Après avoir mis en évidence la sensibilité exacerbée de l'ADN complexé par des agents amphiphiles vis-à-vis de l'irradiation UV en présence de photosensibilisateurs hydrophobes, nous avons élaboré une nouvelle famille de tensioactifs antioxydants capables de le protéger. Ces tensioactifs ont été synthétisés par réaction acide-base entre l'acide caféique antioxydant et une amine grasse (dodécyl- et hexadécylamine). Grâce à leur structure paire d'ions, ces tensioactifs sont capables de former spontanément des vésicules stables en solution aqueuse. Par le test de la DPPH nous avons montré que la partie caféate maintient ses propriétés antioxydantes même après la formation de la paire d'ions. De plus, comme le produit d'oxydation de l'anion caféate conserve sa partie carboxylate, les vésicules persistent, même après oxydation en caféoquinone.

Ces tensioactifs ont été évalués pour la protection de l'ADN complexé avec le CTAB. Les expériences ont montré que lorsque l'ADN est neutralisé, les tensioactifs paires d'ions caféates s'incorporent dans le complexe ADN-CTAB et le protègent vis-à-vis de la photosensibilisation par la benzophénone de coupures simple brin. Par contre en raison de leur structure paire d'ions, ils se dissocient lorsque l'ADN n'est pas neutralisé, et la libération du contre-ion antioxydant désactive la protection de l'ADN.

L'ensemble de ces résultats ouvre de très nombreuses perspectives :

- nous avons uniquement étudié l'influence de la complexation de l'ADN sur la formation de coupures photooxydatives. Toutefois, lors de l'irradiation UV, la benzophénone est capables de provoquer la formation d'autres types de dommages (par transfert d'énergie ou par transfert d'électron). Il se peut que la proportion des divers types de dommages sur l'ADN induits par photosensibilisation de la benzophénone situé dans une phase hydrophobe soit différente de celui, obtenu dans le milieu aqueux. Des études par séquençage de l'ADN pourraient mettre en évidence ces différences. De plus, une telle analyse pourrait, par le biais de dommages, permettre

d'obtenir une véritable cartographie de l'ADN complexé par des agents cationiques amphiphiles.

- on peut également essayer d'appliquer l'effet de l'augmentation du nombre de photocoupures de l'ADN pour étudier l'environnement des bases azotées dans les nucléosomes. En effet, certains acides aminés, dont sont constituées les histones (protéines nucléosomiques), sont hydrophobes (comme la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la valine ou la méthionine). Dans ce cas, si plusieurs de ces acides aminés se succèdent dans une séquence peptidique, ils pourraient former des zones suffisamment hydrophobes pour conduire à l'incorporation de la benzophénone et provoquer l'augmentation locale des dommages sur les bases azotés de l'ADN qui sont dans ces zones.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

A. Produits commerciaux utilisés **241**
A.1 Réactifs 241
A.2 Solvants 242
A.3 Préparation des tampons 243
A.3.1 Tampon 30 mM Tris/HCl 243
A.3.2 Tampon pour l'électrophorèse TBE x10 (Tris/borate/EDTA) 243
B. Synthèses **243**
B.1 Synthèse du chlorhydrate de N-dodécylamino-1-déoxyglucitol (Ghyd12HCl) 243
B.2 Synthèse du 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12) 245
B.3 Synthèse du Caféate de dodécylammonium (Caf12) 245
B.4 Synthèse du caféate d'hexadécylammonium (Caf16) 246
B.5 Synthèse du Caféate d'ammonium (CafAmm) 247
C. Etudes spectrales **248**
C.1 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) 248
C.2 Spectrométrie infrarouge (IR) 248
C.3 Spectrophotométrie UV-visible 249
C.4 Spectrométrie de masse 249
C.5 Analyses élémentaires 249
C.6 Résonance paramagnétique électronique (RPE) 249
D. Etudes physico-chimiques **251**
D.1 Titration par fluorescence 251
D.2 Electrophorèse sur gel d'agarose 252
D.3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS) 253
D.4 Mesures de l'intensité de la lumière diffusée 254
D.5 Etudes tensiométriques 254
D.5.1 Méthode de la goutte pendante 254
D.5.2 Méthode de l'arrachement de l'étrier 254
D.6 Microscopie électronique 255
E. Etudes chimiques et photobiologiques **256**
E.1 Test des activités antioxydants par le DPPH 256
E.2 Influence de la complexation sur la photocoupure de l'ADN 256
E.3 Etude de l'influence du DOTAP sur la photocoupure de l'ADN 257
E.3.1 Préparation des vésicules 257
E.3.2 Préparation et irradiation des complexes ADN-DOTAP 258

A. Produits commerciaux utilisés

A.1 Réactifs

Nom du produit	**CAS**	**Fournisseur**	**pureté**
Bleu de bromophénol	115-39-9	Sigma-Aldrich	95%
α-D-glucose	492-62-6	Sigma	-
Dodécylamine	124-22-1	Aldrich	≥99%
Borohydrure de sodium ($NaBH_4$)	16940-66-2	Sigma-Aldrich	>98%
Acide chlorhydrique	7647-01-0	SDS	Solution dans l'eau (37% massique)
1,12-dibromododécane	3344-70-5	Aldrich	98%
Triméthylamine	75-50-3	Aldrich	Solution dans éthanol (31-35 % massique)
Acide caféique	331-39-5	Sigma	≥98%
Hexadécylamine	143-27-1	Aldrich	99%
Ammoniaque	1336-21-6	Carlo Erba Reagenti	Solution dans l'eau (30% massique)
Bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB)	57-09-0	Acros organics	≥99%
Chlorure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAC)	112-02-7	Aldrich	Solution dans l'eau (25% massique)
Chlorure de tetradécyltriméthylammonium (TTAC)	4574-04-3	Fluka	≥98%
Chlorure de dodécyltriméthylammonium (DTAC)	112-00-5	Fluka	≥99%
Chlorure de sodium (NaCl)	7647-14-5	Carlo Erba Reagenti	99,5%
Chlorure de calcium ($CaCl_2$• $2H_2O$)	10043-52-4	Gen-apex	≥98%
Bromure de tétraméthylammonium	64-20-0	Sigma-Aldrich	≥98%
Bromure d'éthidium (BET)	1239-45-8	Amersham Pharmacia Biotech Plusone	Solution dans l'eau (10mg/mL)
Benzophénone	119-61-9	Merck	>99%
1-Indanone	83-33-0	Aldrich	≥99%
Agarose	9012-36-6	Sigma	99%

Trizma base	77-86-1	Sigma	99.9%
Acide borique	10043-35-3	Sigma	99%
EDTA	6381-92-6	Acros organics	≥99%
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	7791-18-6	Sigma	99%
ADN pBR322 (4361 pb)	93384-17-9	Fermentas	Solution dans 10 mM Tris/HCl et 1 mM EDTA (0.5 µg/µl)
Héparine-Na	9141-08-1	Avocado Research Chemical Ltd.	-
polyéthylènimine PEI (600-800 Da)	25987-06-8	Aldrich	-
DOTAP	132172-61-3	Sigma-Aldrich	≥99%
Azoture de sodium (NaN_3)	26628-22-8	Sigma-Aldrich	≥99%
DPPH	1898-66-4	Aldrich	-
2,2,6,6-tetraméthyl-4-pipéridone (4-oxo-TEMP)	826-36-8	Aldrich	95%
5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)	3317-61-1	Aldrich	97%
D-mannitol	69-65-8	Sigma	-

A.2 Solvants

Nom du solvant	**CAS**	**Fournisseur**	**pureté**
Méthanol	67-56-1	SDS	≥99.8%
Ethanol absolu normapur	64-17-5	Prolabo	≥99.8%
Acétone	67-64-1	SDS	≥99.8%
Ether	60-29-7	SDS	≥99.7%
Chloroforme	67-66-3	SDS	≥99.9%
Méthanol deutéré	811-98-3	Euriso-top	99.8%D

A.3 Préparation des tampons

A.3.1 *Tampon 30 mM Tris/HCl*

Solution A : 6,05 g de Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) sont solubilisés dans 250 mL d'eau ultrapure
Solution B : 5 mL d'acide chlorhydrique concentré (37%) sont dilués 10 fois, et 41,5 mL de la solution obtenue sont complétés à 250 mL.

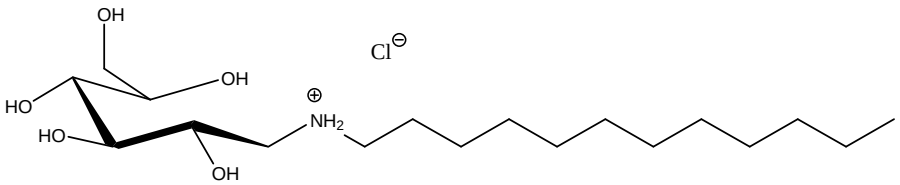
1,86 g d'EDTA (acide éthylènediaminetétracétique) et 1,016 g de $MgCl_2$ sont solubilisés dans un mélange de 250 mL de la solution A et de 180 mL de la solution B, puis le mélange obtenu est complétée à 1000 mL avec de l'eau ultrapure. Le tampon 50 mM Tris/HCl obtenu est dilué ensuite 1,67 fois afin d'obtenir le tampon 30mM Tris/HCl.

A.3.2 *Tampon pour l'électrophorèse TBE x10 (Tris/borate/EDTA)*

108 g de Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane), 55 d'acide borique et 9,3 g d'EDTA sont solubilisés dans 1L d'eau ultrapure. Cette solution (TBE x10) est diluée 10 fois avant chaque utilisation (pour la préparation du gel d'agarose ou pour utilisation comme électrolyte pour l'électrophorèse).

B. Synthèses

B.1 Synthèse du chlorhydrate de N-dodécylamino-1-déoxyglucitol (Ghyd12HCl)



Une solution de 3 g (16,2 mmol) de dodécylamine solubilisés dans 35 mL de méthanol est ajoutée à une solution de 1,82 g (10,12 mmol) de D-glucose solubilisés dans 20 mL d'eau distillée. Après 18 heures d'agitation magnétique à température ambiante, le mélange

réactionnel est chauffé à 60ºC pendant 30 minutes. Les solvants sont évaporés sous pression réduite (40ºC, 10 mmHg).

Le solide blanc obtenu (la base de Schiff, Figure III-20) est repris dans 200 mL de méthanol et 0,604 g (15,9 mmol) de $NaBH_4$ sont rajoutés par petites fractions à la solution à température ambiante. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 22 heures, puis il est chauffé à 60ºC pendant 10 heures. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est à nouveau laissé sous agitation pendant 15 heures. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite (40ºC, 10 mmHg) pour conduire à un solide blanc. Pour éliminer l'excès de dodécylamine le solide a été lavé 5 fois avec 150mL d'acétone à 40ºC.

Le solide obtenu est le Ghyd12 propre, mais il contient encore des borates complexés avec la partie sucre. Le solide est alors repris dans un minimum d'eau (20mL), et la solution aqueuse est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique (1M) jusqu'à pH = 2 afin d'hydrolyser les complexes formés entre le sucre et les sels de bore. Ensuite, les borates vont être éliminés du système sous forme d'esters d'éthyle par évaporation. 400 mL d'éthanol absolu sont ajoutés par petites fractions et la solution de tensioactif est évaporée à sec sous pression réduite (40ºC, 10 mmHg). Cette procédure a été répété deux fois afin d'éliminer tous les borates complexés. Le solide blanc obtenu a été recristallisé dans un minimum d'eau distillée (0,8 g de produit dans 170 mL d'eau à 60ºC) et lyophilisé. Rendement : 75%

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ ppm : 0,84 (t, 3H, C$\underline{H}_3$), 1,24 (m, 18H, 9C$\underline{H}_2$), 1,65 (m, 2H, -$^+NH_2$-CH_2-C$\underline{H}_2$), 2,95 (t., 2H, -$^+NH_2$-C$\underline{H}_2$-CH_2), 3,12 (-CH(OH)-C$\underline{H}_2$-$^+NH_2$-), 3,68 + 4,00 (2m, 6H, $H_{glucose}$)

RMN ^{13}C-{^{1}H} (75 MHz, MeOD) : 13,87 (s, 1C, CH_3); 22,62; 25,74; 26,52; 29,10; 29,41; 29,58; 29,67; 29,74; 29,81; 31,93 (10s, 10C, $\underline{C}$H2); 48,16 (s, 1C, -$^+NH_2$-$\underline{C}H_2$-CH_2) ; 49,61 (s, 1C, CH(OH)-$\underline{C}H_2$-$^+NH_2$-); 63,25 (s, 1$C_{glucose}$, -$\underline{C}H_2$OH); 68,34; 70,66; 70,82; 71,57 (4s, 4 $C_{glucose}$, $\underline{C}$HOH)

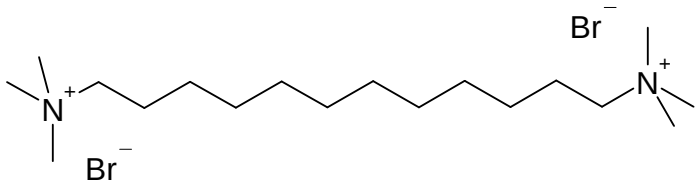
Electrospray : m/z : 350,4 [M-H$^+$] ; 372,4 [M-Na$^+$]

Analyse élémentaire $C_{18}H_{40}ClNO_5$:

Calculé (%) : C, 56,01 ; H, 10,45 ; N, 3,63

Expérimental (%) : C, 55,98 ; H, 10,76 ; N, 3,51

B.2 Synthèse du 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12)



3,28 g (10mmol) de 1,12-dibromododécane est ajoutée à 25 mL d'une solution de triméthylamine dans l'éthanol (33%). Le mélange réactionnel a été porté à reflux pendant 10 heures, puis laissé revenir à température ambiante et évaporé sous pression réduite (10 mmHg) pour conduire à un solide blanc. Le produit est solubilisé dans 10 mL de méthanol à 40°C et le solide blanc est précipité par addition de11 mL de l'éther. Rendement : 79%.

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ ppm : 2,11 (m., 16H, 8C$\underline{H}_2$), 2,53 (m., 4H, 2 $(CH_3)_3N^+$-CH_2-C$\underline{H}_2$), 3,90 (s., 18H, 2 -$^+N(C\underline{H}_3)_3$), 4,12 (m., 4H, 2 $(CH_3)_3N^+$-C$\underline{H}_2$-CH_2)

RMN ^{13}C-{^{1}H} (75 MHz, MeOD) : δ,. ppm : 22,62; 25,98; 28,84; 29,15; 29,18 (5s, 10C, $\underline{C}$H2), 52,27 (t., 6C, 2 -$^+N(\underline{C}H_3)_3$), 66,49 (t., 2C, 2 $(CH_3)_3N^+$-$\underline{C}H_2$-CH_2)

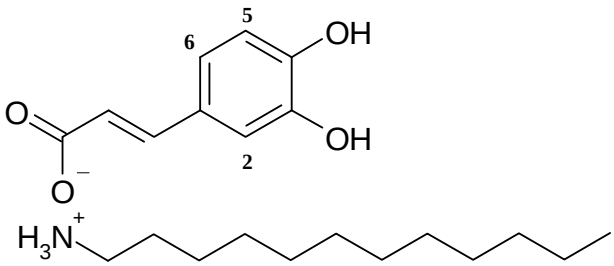
Electrospray : m/z : 143 [M^{2+}]

Analyse élémentaire $C_{18}H_{42}Br_2N_2$:

Calculé (%) : C, 48,44 ; H, 9,48 ; N, 6,28

Expérimental (%) : C, 48,13 ; H, 9,07 ; N, 6,11

B.3 Synthèse du caféate de dodécylammonium (Caf12)



Pour éviter tout phénomène d'oxydation par l'oxygène de l'air, les solvants ainsi que les solutions ont été dégazées au préalable à l'argon.

Dans un ballon de 100 mL protégé de la lumière, 501,3 mg (2,78 mmol) d'acide caféique en solution dans 20 mL d'éthanol dégazé sont mélangés, à température ambiante, à

523,8 mg (2,80 mmol) de dodécylamine en solution dans 10 mL d'éthanol dégazé. Le milieu réactionnel est alors agité une douzaine d'heures. Le mélange résultant se présente sous l'aspect d'une solution limpide, qui, est ensuite évaporée à l'évaporateur rotatif (15 mm d'Hg). Après évaporation sous pression réduite, un solide blanc est alors repris à l'éther anhydre, filtré et lavé. Le solide est repris dans un minimum d'eau, lyophilisé, puis enfin stocké sous argon à l'abri de la lumière. Rendement : 95 %.

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) : δ ppm : 0,83 (t, 3H, C$\underline{H}_3$) ; 1,22 (m, 18H, 9C$\underline{H}_2$) ; 1,58 (m, 2H, $^{+}NH_3$-CH_2-C$\underline{H}_2$) ; 2,83 (t, 2H, $^{+}NH_3$-C$\underline{H}_2$) ; 6,22 (d, 1H, CH=C$\underline{H}$-COO^{-}, 15 Hz) ; 6,67 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom5}$) ; 6,79 (dd, 1H, C$\underline{H}_{arom6}$) ; 6,93 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom2}$) ; 7,22 (d, 1H, C$\underline{H}$=CH-COO^{-}, 15 Hz)

RMN ^{13}C-{^{1}H} (75 MHz, CD_3OD) : δ, ppm : 13,08 (s, $\underline{C}H_3$) ; 22,34-29,36 (m, CH_2 chaîne) ; 31,67 (s, $^{+}NH_3$-CH_2-$\underline{C}H_2$) ; 39,37 (s, $^{+}NH_3$-$\underline{C}H_2$) ; 113,30-127,80 (m, $\underline{C}$H=CH-COO^{-} et 4$\underline{C}_{arom}$) ; 140,37 (CH=$\underline{C}$H-COO^{-}) ; 145,24-146,71 (2s, 2$\underline{C}_{arom}$OH) ; 174,87 (s, $\underline{C}$OO^{-})

Infrarouge (KBr) : ν, cm^{-1} : 3365 et 3225 (N-H) ; 2918 et 2850 (C_{sp3}-H) ; 1644 (COO^{-}, asymétrique) ; 1600 (COO^{-}, symétrique) ; 1529 et 1491 (C=C)

UV Visible (eau) : λ ,nm (ε, L.mol^{-1}.cm^{-1}) : 216 (14751); 290 (11547); 316 (11351)

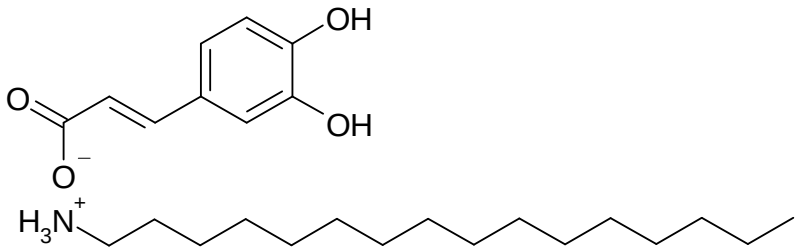
Analyse élémentaire $C_{21}H_{35}O_4N$:

Calculé (%) : C, 69,01 ; H, 9,65 ; N, 3,83

Expérimental (%) : C, 68,84 ; H, 9,21 ; N, 3,62

Electrospray : m/z : 366,3089 [M-H^{+}] ; 388,2920 [M-Na^{+}]

B.4 Synthèse du caféate d'hexadécylammonium (Caf16)

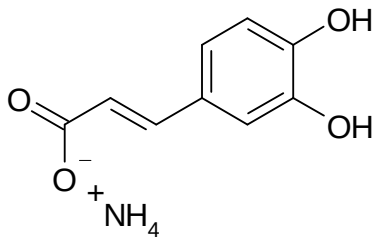


Le même protocole que le Caf12 a été suivi. Les masses engagées ont été 499,4 mg (2,77 mmol) d'acide caféique et 669,9 mg (2.77 mmol) d'hexadécylamine. Le mélange résultant donne un solide de couleur blanche qui est alors filtré et lavé avec de l'éthanol froid.

Le solide est repris dans un minimum d'eau, lyophilisé, puis enfin stocké sous argon à l'abri de la lumière. Rendement : 70 %.

RMN^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ ppm : 0,84 (t, 3H, C$\underline{H}_3$) ; 1,25 (m, 18H, 9C$\underline{H}_2$) ; 1,57 (m, 2H, $^+NH_3$-CH_2-C$\underline{H}_2$) ; 2,83 (t, 2H, $^+NH_3$-C$\underline{H}_2$) ; 6,21 (d, 1H, CH=C$\underline{H}$-COO$^-$, 15 Hz) ; 6,67 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom5}$) ; 6,78 (dd, 1H, C$\underline{H}_{arom6}$) ; 6,92 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom2}$) ; 7,21 (d, 1H, C$\underline{H}$=CH-COO$^-$, 15 Hz)
RMN^{13}C-{^{1}H} (75 MHz, MeOD) : δ, ppm : 13,18 (s, $\underline{C}H_3$) ; 22,44-29,50 (m, CH_2 chaîne) ; 31,76 (s, $^+NH_3$-CH_2-$\underline{C}H_2$) ; 39,30 (s, $^+NH_3$-$\underline{C}H_2$) ; 113,08-127,64 (m, $\underline{C}$H=CH-COO$^-$ et 4$\underline{C}_{arom}$) ; 140,45 (CH=$\underline{C}$H-COO$^-$) ; 145,24-146,75 (2s, 2$\underline{C}_{arom}$OH) ; 174,95 (s, $\underline{C}$OO$^-$)
Infrarouge (KBr) : ν cm^{-1} : 3350 et 3225 (N-H) ; 2919 et 2849 (C_{sp3}-H) ; 1644 (COO$^-$, asymétrique) ; 1600 (COO$^-$, symétrique) ; 1529 et 1471 (C=C)
UV Visible (eau) : λ ,nm (ε, L.mol^{-1}.cm^{-1}) : 216 (14705); 288 (13113); 312 (12875)
Analyse élémentaire $C_{25}H_{43}O_4N$:
Calculé (%) : C, 71,22 ; H, 10,28 ; N, 3,32
Expérimental (%) : C, 71,09 ; H, 9,60 ; N, 3,16
Electrospray : m/z : 422,2736 [M-H$^+$] ; 444,2978 [M-Na$^+$]

B.5 Synthèse du Caféate d'ammonium (CafAmm)



Dans un ballon de 50 mL, 0,2 mL (39,2 mmol) d'une solution d'ammoniaque à 30% est ajoutée goutte à goutte à une suspension constituée de 498,1 mg (2,77 mmol) d'acide caféique dans 11 mL d'eau ultra pure. Le solide se dissout petit à petit pour laisser place à une solution homogène jaune puis marron clair. Lorsqu'il ne reste plus de solide, le milieu réactionnel est lyophilisé. Le solide recueilli est de couleur jaune pale puis est stocké sous argon à l'abri de la lumière. Rendement : 80%.

RMN^{1}H (300 MHz, MeOD) : δ ppm : 6,22 (d, 1H, CH=C$\underline{H}$-COO$^-$, 15 Hz) ; 6,68 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom5}$) ; 6,79 (dd, 1H, C$\underline{H}_{arom6}$) ; 6,93 (d, 1H, C$\underline{H}_{arom2}$) ; 7,23 (d, 1H, C$\underline{H}$=CH-COO$^-$, 15 Hz)

RMN^{13}C-{^{1}H} (75 MHz, MeOD) : δ ppm : 113,17-145.21 (m, CH=CH-COO$^-$ et 6C$_{arom}$) ; 146,75 (CH=CH-COO$^-$) ; 174,84 (s, COO$^-$)

Infrarouge (KBr) : ν cm^{-1} : 3126 (N-H) ; 3025 (C$_{sp2}$-H) ; 1643 (COO$^-$, asymétrique) ; 1599 (COO$^-$, symétrique) ; 1528 et 1528 (C=C)

UV Visible (eau) : λ ,nm (ε, L.mol^{-1}.cm^{-1}) : 226 (13821); 296 (12499); 322 (11739)

Analyse élémentaire $C_9H_{11}O_4N$:

Calculé (%) : C, 54,87 ; H, 5,63 ; N, 7,11

Expérimental : C, 51,22 ; H, 5,39 ; N, 6,38

Electrospray : m/z : 179,1 [ion caféate]

C. Etudes spectrales

C.1 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur le spectromètre Brüker Avance 300 dont les fréquences de précession du proton et du carbone sont respectivement de 300 MHz et 75MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au déplacement chimique de référence du tétraméthylsilane (TMS). Les fréquences des constantes de couplages sont exprimées en Hz. Les spectres RMN du ^{13}C ont été enregistrés grâce à une séquence J modulée. Les paramètres d'impulsions sont ceux fournis par Brüker.

Pour indiquer la multiplicité du signal en RMN du proton, les abréviations suivantes ont été utilisées : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), m (multiplet). Les spectres ont été réalisés pour des concentrations de 10-15 mg/mL pour la RMN du proton et de 30-50 mg/mL pour la RMN du carbone.

C.2 Spectrométrie infrarouge (IR)

Les spectres de vibration infrarouge ont été obtenus sur un spectromètre Perkin-Elmer IR FT 1760-X. Les spectres ont été réalisés sur des pastilles de bromure de potassium (KBr) à une concentration de 0,5% en masse de produit.

C.3 Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV ont été enregistrés dans une cuve en quartz de 10 mm sur un spectrophotomètre à barrette de diodes HP 8452A. Dans le cas du teste DPPH des propriétés antioxydantes, les spectres d'absorbance ont été enregistrés sur un spectrophotomètre *Varian Cary 100 Bio UV-visible.*

C.4 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse « Electrospray » ont été enregistrés sur un appareil *Perkin Elmer Sciex API-365* ou sur un appareil *Applied Biosystems Q Trap* pour le N-dodécylamino-1-deoxyglucitol et son chlorhydrate (Ghyd12 et Ghyd12HCl respectivement), et pour le 1,12-bis(triméthylammonium)dodécane (Bol12). Ces produits ont été analysés dans un mélange eau/méthanol à une concentration de 10 µg/mL. Le voltage du capillaire est de 5 kV, le potentiel de dissociation est optimisé pour chaque échantillon pour une valeur comprise entre 0 et 150 V.

Les tensioactifs paires d'ions (Caf12 et Caf16) ont été analysés sur un appareil Waters Qtof Ultima API. 50 µL d'une solution aqueuse de la paire d'ions à 1 mg/mL et 50 µL d'une solution aqueuse de NaI à 1 mg/mL sont mélangés à 900 µL d'eau. L'échantillon est injecté dans l'appareil à un débit de 10 µL/min. Le voltage du capillaire est de 3 kV, la tension de cône est réglée à 100 V et l'énergie de collision est de 10 eV.

C.5 Analyses élémentaires

Ces analyses ont été effectuées par le Service d'analyse du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) pour le carbone, l'hydrogène et l'azote. Ces analyses ont été réalisées sur un appareil Perkin Elmer 2400 series II microanalyser.

C.6 Résonance paramagnétique électronique (RPE)

La résonance paramagnétique électronique est une méthode spectroscopique qui est considérée comme étant la technique de choix pour la mise en évidence la plus directe possible de radicaux libres comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle ou encore les radicaux de nature lipidique.

Le principe de la RPE repose sur l'effet Zeeman. Soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur intense H, les niveaux d'énergie d'un spin S se séparent en (2S + 1) états, chacun affecté d'un nombre quantique m_S (m_S = -S, -S+1, -S+2, ..., S). Ainsi, pour le cas d'un ion magnétique ne présentant qu'un seul électron célibataire (donc pour lequel S = 1/2), la présence du champ magnétique extérieur donne lieu à (2S + 1) = 2 états, correspondant à m_S = -1/2 et m_S = +1/2. L'énergie magnétique associée à chacun de ces états est donnée par $m_S g \mu_B H$, où g est le facteur de Landé lorsqu'il s'agit d'un électron libre mais qui est désigné, dans le cas général, par *le facteur g*, et μ_B est le magnéton de Bohr. Puis, sous l'action d'un second champ magnétique (champ hyperfréquence ou micro-onde) perpendiculaire au premier et d'amplitude beaucoup plus faible, ayant une fréquence ν, un photon d'énergie hν peut être absorbé (ou émis) si la séparation énergétique entre les 2 niveaux concernés, c'est-à-dire $g\mu_B H$, se trouve égale à hν. C'est à cette valeur particulière de H que le phénomène de résonance se produit. Ainsi, la condition de résonance se résume par :

$$h\nu = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g\mu_B H$$

Equation 1

Ou $E_{+1/2}$ et $E_{-1/2}$ sont les énergies des électrons ayant respectivement les spins égaux à +1/2 et -1/2.

La résonance prouve la présence des espèces magnétiques (radicaux, éléments de transition, défauts de structure) caractérisées par l'éxistence d'un électron non apparié.

Vu leur durée de vie très courte, la détection des EOR nécessite toutefois l'utilisation de molécules stabilisantes (piégeur de spin) qui étant ajoutées à l'échantillon, piègent des radicaux, ce qui conduit à la formation de radicaux stables détectables en RPE. Deux piégeurs de radicaux ont été utilisés lors de nos études : le DMPO (piègeur du radical hydroxyle et de l'anion superoxyde), et le 4-oxo-TEMP (piègeur d'oxygène singulet).

Les spectres de résonance paramagnétique électronique ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker EFP 300e (bande X à 9 GHz).

Pour les expériences avec le DMPO, la solution contient 150 mM de DMPO et de $4{,}5 \times 10^{-5}$ M en benzophénone. Le solvant utilisé est le tampon 30 mM Tris/HCl. Un tube capillaire en Pyrex contenant 50 µL de solution est irradié à l'aide d'une fibre optique reliée à une lampe à vapeur de mercure (Oriel, 200 W) et le signal RPE a été détecté juste après l'irradiation.

Pour les expériences en présence de TEMP, des concentrations de 150 mM en 4-oxo-TEMP et de $4{,}5 \times 10^{-5}$ M en benzophénone sont utilisées, dans du tampon 30 mM Tris/HCl. Les solutions sont irradiées dans des cuves en quartz, dans les mêmes conditions que pour les études de photosensibilisation de coupure simple brin de l'ADN. Les spectres RPE ont été détectés 2-3 heures après l'irradiation.

D. Etudes physico-chimiques

D.1 Titration par fluorescence

Pour cette étude le bromure d'éthidium (BET) a été utilisé comme sonde fluorescente. Lorsqu'il s'intercale dans l'ADN, l'intensité de sa fluorescence augmente significativement. La complexation de l'ADN avec des agents cationiques conduit à sa compaction et au déplacement de l'intercalant dans la solution ce qui provoque une décroissance rapide de la fluorescence, permettant de suivre la complexation de l'ADN.

Des solutions constituées d'un mélange ADN-BET (une molécule de BET pour une paire de base d'ADN) sont préparées dans le tampon 30mM Tris/HCl (pH = 7,1) dont le volume final est de 1500 µL. Elles sont titrées par une solution d'agents cationiques (tensioactifs, polymères, sels) à des concentrations calculées pour ajouter des aliquotes de 2 à 10 µL dans le même tampon. Pour les études de l'influence du mannitol et de l'azoture de sodium sur la complexation ADN-CTAB, la solution d'ADN et les aliquotes d'agents cationiques contenaient 200mM en mannitol ou 150 mM en NaN_3. Après chaque addition d'aliquotes, la solution est agitée pendant 5 minutes et les spectres de fluorescence sont enregistrés sur un spectromètre PTIQM (Photon Technology Instrument Quanta Master 1).

Les fentes des monochromateurs d'excitation et d'émission sont réglées à 4 nm de largeur. Les échantillons sont placés dans des cuves en quartz de 10 mm d'épaisseur thermostatées à 25°C. Tous les spectres ont été enregistrés en mode comptage de photons et corrigés grâce aux courbes fournies par le constructeur. Pour l'étude de l'influence de concentration en ADN sur sa complexation avec le CTAB, toutes les titrations ont été répétées trois fois. Les valeurs des déviations standard ont été ensuite calculées.

D.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet une séparation des molécules en se basant principalement sur leur charge électrique et leur taille. Le principe consiste à mettre la solution contenant les molécules à séparer sur un gel aqueux entre une anode et une cathode et à faire passer un courant. Les ions positifs migreront vers la cathode, alors que les négatifs iront vers l'anode, les molécules neutres quant à elles, ne migreront pas.

Comme la complexation de l'ADN avec différents agents cationiques provoque la neutralisation de ces charges et peut diminuer sa taille, l'électrophorèse sur gel d'agarose est un outil de choix pour étuder cette complexation. De plus, cette technique permet de traiter plusieurs échantillons en parallèle, ce qui est très intéressant car les conditions expérimentales sont strictement identiques et des comparaisons fiables pourront être réalisées par photodensitométrie.

Le gel utilisé est un gel d'agarose à 0,8% et la visualisation de l'ADN est rendue possible par coloration du gel au bromure d'éthidium. Ce dernier est un agent intercalant de l'ADN et il fluoresce sous irradiation UV. 35 µL de bromure d'éthidium (10mg/mL) sont ajoutés au 200 mL de gel d'agarose lors de sa préparation.

Différentes solutions dont le volume final est de 25 µL, sont préparées dans le tampon 30mM Tris/HCl (pH = 7,1). Elles sont constituées de 5 µL de solution mère d'ADN, de quantités variables d'agents cationiques (tensioactifs, polymères) et 15 µL du tampon 30mM Tris/HCl. Pour les études de l'influence de mannitol et azoture de sodium sur la complexation de l'ADN, 15 µL de solutions de ces agents sont rajoutés dans le Tris/HCl (30 mM) en place de tampon seul.

Avant son dépôt sur le gel d'agarose, 5 µL de bleu de dépôt (75% de glycérol, 24,95% de tampon tris, 0,05% de bleu de bromophénol), permettant de déposer les complexes au fond du puits, sont ajoutés à chaque échantillon. Ces solutions sont déposées sur un gel d'agarose qui est soumis à une différence de potentiel de 20 mV durant environ 18 heures. La solution d'électrolyte pour l'électrophorèse est constituée de tampon tris/borate/EDTA (TBE). Le gel est ensuite révélé sur une table UV émettant à 254 nm et photographié à l'aide d'un appareil photographique numérique.

D.3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La lumière émise par un laser, lors de son interaction avec des particules en mouvement (mouvement brownien), est diffusée dans toutes les directions. Pour des objets sphériques, la diffusion est maximale pour un angle de 90º avec la lumière incidente. Au cours de la diffusion, la lumière réémise par les objets subit une modification de sa fréquence en raison d'un effet Doppler, et donc en dépendance avec la vitesse de diffusion des particules. Le rayon hydrodynamique (R_H) des particules est relié à leurs coefficients de diffusion (D_T) par l'équation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{kT}{3\pi\eta D_T}$$

Equation 2

Ou

k - la constante de Boltzmann

T - la température absolue

η - la viscosité du milieu

Par ailleurs, l'intensité diffusée est dépendante du nombre de particules diffusantes. En tenant compte de cela, et en appliquant un modèle statistique, une distribution de la taille des particules peut être déterminée.

Les études de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées à l'aide d'un appareil Malvern Instrument Zetasizer 3000HSA à un angle de 90º et à 25ºC. L'appareil est muni d'un laser He-Ne qui émet une lumière monochromatique d'une longueur d'onde de 633 nm. La température est régulée par une plaque à effet Pelletier à ±0,1ºC. La gamme de tailles pouvant être étudiée par cet appareil est comprise entre 5 nm et 10µm. Afin d'obtenir la distribution en taille des agrégats, le modèle Contin a été employé. La précision des mesures est de ±5 nm.

Les échantillons sont préparés par solubilisation de Caf12 et de Caf16 dans l'eau ultrapure dégazée et à l'abri de la lumière afin d'obtenir des concentrations $1{,}5 \times 10^{-3}$ M et 1×10^{-4}M respectivement.

D.4 Mesures de l'intensité de la lumière diffusée

1500 µL de solutions d'ADN de concentration $3x10^{-6}$M dans le tampon 30mM Tris/HCl sont titrées par une solution de tensioactifs (CTAB, CTAC, TTAC ou DTAC) à des concentrations calculées pour ajouter des aliquotes de 2 à 10 µL dans le même tampon. Après chaque addition d'aliquotes, la solution est agitée pendant 5 minutes, thermostatée à 25ºC et l'intensité de la lumière diffusée (25mW He laser λ = 632.8nm) à un angle de 90° est mesuré sur un appareil LP Instruments (10 fois pour chaque solution). Afin d'éliminer l'influence d'éventuelles poussières, seule l'intensité de la ligne de base a été prise en compte.

D.5 Etudes tensiométriques

D.5.1 *Méthode de la goutte pendante*

Cette méthode est basée sur la forme d'une goutte pendante à l'équilibre. Les petites gouttes tendent à être sphériques car les effets de tension superficielle dépendent de la surface de la goutte (sphère = surface minimale). Les effets gravitationnels, qui dépendent du volume de la goutte, entraînent des distorsions. Lorsque les effets de tension superficielle et les effets gravitationnels sont à l'équilibre, on peut déterminer la tension superficielle d'une solution en fonction de la forme de la goutte obtenue.

La procédure générale consiste à former, au bout d'une aiguille, une goutte à l'équilibre, c'est-à-dire juste avant qu'elle ne tombe et à mesurer la tension superficielle.

Cette méthode a été utilisé pour les études tensiométrique de CTAB, CTAC, TTAC et DTAC afin de déterminer leurs CMC, ainsi que pour les études de l'influence de la présence de 200 mM de mannitol et 10% molaires en tensioactifs caféates sur la CMC du CTAB. Les solutions aqueuses des tensioactifs sont préparées par dilutions d'une solution mère. Les mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil DSA10 Mk2 Krüss GmbH à 25°C.

D.5.2 *Méthode de l'arrachement de l'étrier*

Les mesures de tension de surface par la méthode de l'arrachement de l'étrier ont été réalisées avec un tensiomètre VWR TD1 Lauda. Cette technique consiste à déformer l'interface air-eau à l'aide d'un étrier de Lenard et à mesurer la force nécessaire à la rupture du film de surface. Cette force représente la force capillaire F du liquide.

$$F = 2\gamma l$$

Equation 3

Où

γ est la tension superficielle

l - la longueur du fil de platine de l'étrier (Figure D.1)

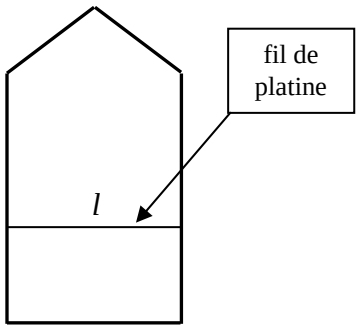


Figure D.1 : Schema de l'étrier

L'équation 3 permet à l'appareil de fournir la valeur de la tension superficielle, qui représente l'énergie interfaciale.

La verrerie servant à préparer les solutions de Caf12 et Caf16 est préalablement traitée à l'acide sulfochromique pendant 12 heures, puis rincée à l'eau ultrapure, et séchée.

Les solutions sont préparées par dilutions successives d'une solution mère avec de l'eau ultrapure dégazée à l'argon. Les solutions sont laissées à stabiliser 2 heures avant la prise de mesures à l'abri de la lumière. Les mesures sont réalisées dans des cristallisoirs ayant subi un protocole de nettoyage identique à celui nécessaire à la verrerie de précision.

Lors de la mesure (±0,2 mN/m), la solution est transférée dans un cristallisoir et est thermostatée à 25ºC pendant 10 minutes (maximum afin d'éviter l'évaporation). Entre deux mesures, l'étrier est nettoyé à la flamme.

D.6 Microscopie électronique

La Microscopie Electronique à Transmission (MET) à coloration négative a été utilisée pour observer des agrégats formés par des tensioactifs paires d'ions caféats (Caf12 et Caf16) en solution aqueuse. Cette technique consiste à placer l'échantillon sous un faisceau

d'électrons et à visualiser l'image fournie par la transmission des électrons. Les différences de densité électronique qui existent au sein de l'échantillon conduisent à une absorption plus ou moins importante des électrons et créent ainsi un contraste au niveau de l'image. Lorsque les différences de densité électronique ne sont pas suffisantes pour la visualisation de l'image, il est nécessaire d'utiliser un agent de contraste tels que des sels de métaux lourds. Ces derniers absorbent les électrons et créent ainsi un contraste artificiel.

Le microscope employé est de type JEOL JEM-1200EX qui opère à 80 kV. Les échantillons, de concentration $1x10^{-3}$ M en Caf12 et $1,5x10^{-4}$ M en Caf16, sont obtenus par dissolution des composés dans une solution aqueuse. Ils ont ensuite été déposés sur des grilles Formvar couvertes d'un film de carbone, puis traités par une solution de contrastant à 1,4% en masse de phosphotungstate de sodium ($HNa_2O_{40}PW_{12}$, pH=7).

E. Etudes chimiques et photobiologiques

E.1 Test des activités antioxydantes par le DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical organique stable présentant dans le méthanol une absorption caractéristique à λ=515 nm. Les antioxydants donneurs de proton, tels que les polyphénols, sont capables de réduire ce radical (DPPH + RH → DPPH-H) (Figure V-10), ce qui entraîne une diminution de son absorbance. La solution d'un produit antioxydant (Caf12, Caf16 et CafAmm) de $8x10^{-4}$ M dans le méthanol est ajoutée par aliquotes de 10 µL à 2mL d'une solution du DPPH de $4,3x10^{-5}$ M dans le même solvant. Après chaque addition d'aliquotes, la solution est agitée pendant 5 minutes à 25°C et les spectres d'absorbance sont enregistrés en utilisant le spectrophotomètre *Varian Cary 100 Bio UV-visible*. La titration est arrêtée quand l'absorbance de la bande à 515 nm disparaît.

E.2 Influence de la complexation sur la photocoupure de l'ADN

Les échantillons sont préparés en mélangeant 5 µL de $4,5x10^{-4}$ M PO_4^- de l'ADN pBR322, 5 µL de concentrations croissantes en agents cationiques (tensioactifs : CTAB, CTAC, TTAC, DTAC, Ghyd12HCl, Bol12; polymères : PEI, PNBHCl; sels : NaCl, NMe_4Br, $CaCl_2$) et 15 µL de $7,5x10^{-5}$ M de bénzophenone dans le tampon 30 mM Tris/HCl. Les

concentrations finales en phosphates d'ADN et en benzophénone sont respectivement de $9x10^{-5}$ et $4,5x10^{-5}$ M. Pour les études des effets des quenchers des EOR (mannitol et NaN_3), les solutions de CTAB contiennent 1M en quencher (ou en NaCl pour la comparaison), ce qui donne une concentration finale en quencher égale à 200mM.

Ces solutions sont irradiées dans des tubes en borosilicate de diamètre de 3 mm à l'aide d'une lampe au xénon (Muller 450 W) équipée d'un filtre passe-haut (λ > 320 nm) pendant 1 minute à 25ºC. Après l'irradiation, 5 µL d'une solution d'héparine-Na à 20% massiques dans le tampon 30 mM Tris/HCl sont rajoutés dans chaque éprouvette afin de décomplexer les complexes formés avec l'ADN.

5 µL de bleu de dépôt (75% de glycérol, 24,95% de tampon tris, 0,05% de bleu de bromophénol), permettant de déposer les complexes au fond du puits de gel d'agarose, sont ensuite ajoutés à chaque échantillon. Le gel utilisé est un gel d'agarose à 0,8% et la visualisation de l'ADN est possible par coloration du gel au bromure d'éthidium. Ce dernier est un agent intercalant de l'ADN et fluoresce sous irradiation UV. 35 µL de bromure d'éthidium (10mg/mL) sont ajoutés au 200 mL de gel d'agarose lors de sa préparation.

Ces solutions sont déposées sur un gel d'agarose qui est soumis à une différence de potentiel de 20 mV durant environ 18 heures. La solution d'électrolyte pour l'électrophorèse est constituée de tampon tris/borate/EDTA (TBE). Le gel est ensuite révélé sur une table UV émettant à 254 nm et photographié à l'aide d'un appareil photographique numérique. Le rapport de taux de la forme II (circulaire) d'ADN et de sa forme I (superenroulée) dans les échantillons irradiés est calculé par photodensitométrie des images du gel grâce au logiciel "Mesurim", en tenant compte de la plus faible intercalation (1,66 fois) du bromure d'éthidium dans la forme superenroulée de l'ADN par rapport à la forme circulaire relaxée. Toutes les études de photocoupures de l'ADN ont été répétées au moins trois fois. Les valeurs de déviations standard sont ensuite calculées.

E.3 Etude de l'influence du DOTAP sur la photocoupure de l'ADN

E.3.1 *Préparation des vésicules*

750 µL de la solution de DOTAP de 1mM dans chloroforme est évaporée avec un évaporateur rotatif dans un tube de 5mL sous pression réduite (40ºC, 10 mmHg) à rotation intense afin de former un film du lipide sur la paroi du tube. Les restes du solvant sont ensuite éliminés sous vide. 750 mL du tampon Tris/HCl est ensuite rajouté et la solution est fortement

agitée à 55 ºC pendant 2 heures afin de solubiliser le DOTAP dans la phase aqueuse et former les vésicules.

E.3.2 *Préparation et irradiation des complexes ADN-DOTAP*

9 µL de la solution vésiculaire du DOTAP de 1mM sont ensuite mélangés avec 5 µL de $4{,}5 \times 10^{-4}$ M PO_4^- d'ADN pBR322 et 11 µL de $7{,}5 \times 10^{-5}$ M de benzophénone dans le tampon 30 mM Tris/HCl. Les concentrations finales en phosphates d'ADN et en benzophénone sont respectivement de 9×10^{-5} et $3{,}3 \times 10^{-5}$ M. La concentration finale en DOTAP ($3{,}6 \times 10^{-4}$ M) correspond au rapport de charge R = [DOTAP]/[ADN- PO_4^-] = 4. La solution du complexe ADN-DOTAP formé est ensuite irradiée pendant 90 secondes à 25ºC dans des mini-éprouvettes en quartz de diamètre de 3 mm à l'aide d'une lampe au xénon (Muller 450 W) équipée d'un filtre passe-haut (λ > 320 nm). et analysée comme lors de l'étude de l'influence de complexation sur la formation de photocoupure de l'ADN.

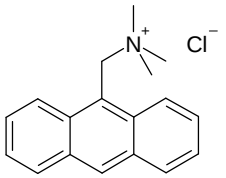
ANNEXES

Données de la littérature de complexation entre l'ADN et le cation cétyltriméthylammonium

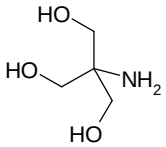
Source	Méthode	[ADN], M	[CTA^+], M	Conditions		R
				Milieu tampon	Type et taille de l'ADN	
[1]	Diffusion de la lumière	$3x10^{-5}$	$2,2x10^{-5}$	10 mM NaCl	ODN, 16 pb	0,75
	Température de fusion	$3x10^{-5}$	$1,8x10^{-5}$	10 mM NaCl	ODN, 16pb	0,6
	Titration par fluorescence BET	$3x10^{-5}$	$6,5x10^{-5}$	10 mM NaCl, 1,26 µM BET	ODN, 16 pb	2,17
[2]	Viscosité	$5x10^{-5}$	$4x10^{-5}$	-	ctADN, 0,5-1 kpb	0,8
	Spectroscopie diélectrique	$6,4x10^{-4}$	$3,5x10^{-4}$	0,5 mM NaCl	ctADN, 0,5-1 kpb	0,55
[3]	Microscopie par fluorescence	$5x10^{-7}$	$1,6x10^{-5}$	10 mM NaBr	T2 ADN, 164 kpb	32
	Diffusion dynamique de la lumière	$5x10^{-7}$	$6x10^{-6}$	10 mM NaBr	T2 ADN, 164 kpb	12
[4]	Titration par fluoréscence de **1**[a)]	$8,5x10^{-5}$	$5x10^{-5}$	10 mM Tris [b)] 1 mM EDTA[c)]	ctADN	0,59
	Titration par fluorescence BET	$8,5x10^{-5}$	$5,2x10^{-5}$	10 mM Tris [b)] 1 mM EDTA [c)]	ctADN	0,61
[5]	Microscopie par fluorescence	$6x10^{-7}$	$1,5x10^{-5}$	0,5 TBE 0,6 µM DAPI [d)]	T4 ADN, 166 kpb	25
[6]	Titration poténtiométrique	$6x10^{-5}$	$1,5x10^{-5}$	0,5 TBE	T4 ADN, 166 kpb	0,25
[7]	Viscosité	$1x10^{-4}$	$4x10^{-5}$	-	ctADN fragmenté	0,4
	Diffusion dynamique de la lumière	$1x10^{-4}$	$5x10^{-5}$	-	ctADN fragmenté	0,5
[8]	Diffusion dynamique de la lumière	$5x10^{-7}$	$6x10^{-6}$	10 mM Tris-Cl	T2 ADN, 164 kpb	12
	Diffusion dynamique de la lumière	$5x10^{-7}$	$5x10^{-6}$	10 mM Tris-Cl	λADN, 48,5 kpb	10
[9]	Electrophorèse sur gel d'agarose	$6,1x10^{-5}$	$8,2x10^{-5}$	50 mM TBE	ΦX174 ADN, 5386 pb	1,34

[10]	Diffusion de la lumière	$1,2x10^{-4}$	$1,1x10^{-4}$	tampon BPE 16 mM Na^+	λADN, 48,5 kpb	0,9
	Diffusion de la lumière	$2,4x10^{-4}$	$1,9x10^{-4}$	tampon BPE 16 mM Na^+	λADN, 48,5 kpb	0,78
	Diffusion de la lumière	$2,4x10^{-4}$	$2x10^{-4}$	tampon BPE 16 mM Na^+	*E. coli* ADN, 0,2 kpb	0,85
	Température de fusion isothermique	$2,4x10^{-4}$	$1,2x10^{-4}$	tampon BPE 16 mM Na^+	*E. coli* ADN ou λADN	0,5
	Température de fusion isothermique	$4,8x10^{-4}$	$2x10^{-4}$	tampon BPE 16 mM Na^+	*E. coli* ADN or λADN	0,42
[11]	Titration par fluorescence BET	$4x10^{-5}$	$3,4x10^{-5}$	0,02 M CHES [e)] [EB]/[P]=0,25	ctADN 10kpb	0,85
[12]	Viscosité	$2x10^{-5}$	$2,5x10^{-5}$	eau + 8%EtOH	ctADN , 3000 pb	1,25
[13]	Analyse enthalpique différentielle	$1x10^{-4}$	$7,5x10^{-5}$	10 mM NaCl	ct ADN, 500-1000 pb	0,75
	Dichroïsme circulaire	$1x10^{-4}$	$9x10^{-5}$	10 mM NaCl	ctADN, 500-1000 pb	0,9
[14]	Température de fusion	$8x10^{-5}$	$6x10^{-5}$	10mM tampon phosphate	ct ADN 2-2,5 kpb	0,75
	Titration par fluorescence BET	$1x10^{-5}$	$2x10^{-5}$	10mM tampon phosphate	ct ADN 2-2,5 kpb	2
[15]	Dichroïsme circulaire induit	$1,25x10^{-4}$	$8x10^{-5}$	0,05M HAC-AC^- tampon	ct ADN	0,64
[16]	Titration par fluorescence BET	$2,6x10^{-5}$	$2,6x10^{-5}$	10mM tampon phosphate	ODN, 14 pb	1
	Titration par fluorescence BET	$7,8x10^{-5}$	$7,8x10^{-5}$	10mM tampon phosphate	ODN, 14 pb	1
	Titration par fluorescence BET	$1,3x10^{-4}$	$1,04x10^{-4}$	10mM tampon phosphate	ODN, 14 pb	0,8
	Dichroïsme circulaire	$1,3x10^{-4}$	$1,04x10^{-4}$	10mM tampon phosphate	ODN, 14 pb	0,8
	Température de fusion	$2,6x10^{-5}$	$2,1x10^{-5}$	10mM tampon phosphate	ODN, 14 pb	0,8
[17]	Absorption de complexe ADN-BET	$4x10^{-5}$	$\approx 4x10^{-5}$	Tris/HCl	CT-ADN, ≈10000pb	≈1
	Absorption de complexe ADN-Hoechst33258[f)]	$4x10^{-5}$	$\approx 4x10^{-5}$	Tris/HCl	CT-ADN, ≈10000pb	≈1

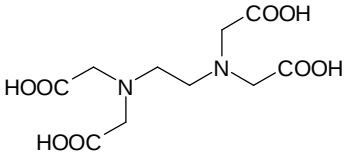
a) 1 - chlorure de triméthylaminométhylantracène



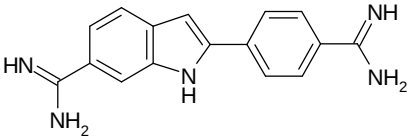
b) Tris - trishydroxyméthylaminométhane



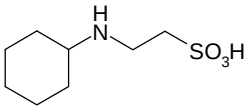
c) EDTA - acide éthylènediaminetétracétique



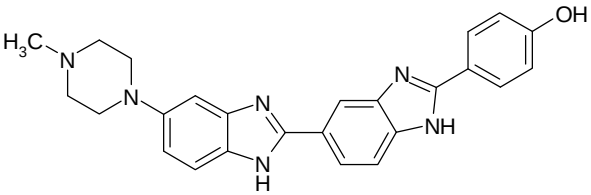
d) DAPI - 4',6,- diamidino-2-phénylindole



e) CHES - acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonique



f) Hoest 33258



Références

[1] Pattarkine, M.V., Ganesh, K.N., *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**, *263*, 41-46

[2] Bonincontro, A., Marchetti, S., Onori, G., Rosati, A., *Chem. Phys.* **2004**, *312*, 55-60

[3] Dias, R.S., Pais, A.A.C.C., Miguel, M.G., Lindman, B., *Coll Surf A*, **2004**, *250*, 115-131

[4] Bhattacharya, S., Mandal, S.S., *Biochim Biophys A*, **1997**, *1323*, 29-44

[5] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 2401-2408

[6] Melnikov, S.M., Sergeyev, V.G., Yoshikawa, K., *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 9951-9956

[7] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2005**, *109*, 3676-3680

[8] Dias, R.S., Innerlohinger, J., Glatter, O., Miguel, M.G., Lindman, B., *J Phys Chem B.*, **2005**, *109*, 10458-10463

[9] Dias, R.S., Svingen, R., Gustavsson, B., Lindman, B., Miguel, M.G., Åkerman, B., *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2908-2917

[10] Spink, C.H., Chaires, J.B., *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 10920-10928

[11] Izumrudov, V.A., Zhyryakova, M.V., Goulko, A.A., *Langmuir*, **2002**, *18*, 10348-10356

[12] Grueso, E., Sanchez, F., *J Phys Chem B*, **2008**, *112*, 698-702

[13] Marchetti, S., Onori, G., Cametti, C., *J Phys Chem B*, **2006**, *110*, 24761-24765

[14] Dasgupta, A., Das, A.P., Dias, R.S., Miguel, M.G., Lindman, B., Jadhav, V.M., Gnanamani, M., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2007**, *111*, 8502-8508

[15] Wang, Z., Liu, D., Dong, S., *Biophys Chem*, **2000**, *87*, 179-184

[16] Jadhav, V.M., Valaske, R., Maiti, S., *J Phys Chem B*, **2008**, *112(29)*, 8824-8831

[17] Goracci, L., Germani, R., Savelli, G., Bassani, D.M., *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 197-203

COPIES DES PUBLICATIONS SE REFERANT AU TRAVAIL EXPOSE

Langmuir

Subscriber access provided by UNIV PAUL SABATIER

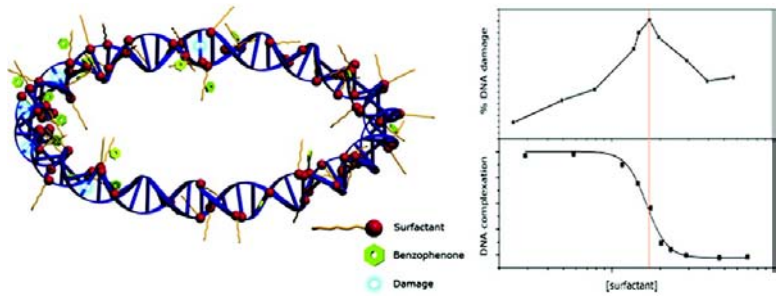
Research Article

Modulation of Photo-oxidative DNA Damage by Cationic Surfactant Complexation

Sergii Rudiuk, Sophie Franceschi-Messant, Nadia Chouini-Lalanne, Emile Perez, and Isabelle Rico-Lattes

Langmuir, **2008**, 24 (16), 8452-8457 • DOI: 10.1021/la800751k • Publication Date (Web): 19 July 2008

Downloaded from http://pubs.acs.org on December 10, 2008



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

View the Full Text HTML

ACS Publications
High quality. High impact.

Langmuir is published by the American Chemical Society. 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

Articles

Modulation of Photo-oxidative DNA Damage by Cationic Surfactant Complexation

Sergii Rudiuk, Sophie Franceschi-Messant, Nadia Chouini-Lalanne, Emile Perez,* and Isabelle Rico-Lattes

Laboratoire des I.M.R.C.P. UMR 5623 CNRS, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

Received March 10, 2008. Revised Manuscript Received May 16, 2008

The natural packaging of DNA in the cell by histones provides a particular environment affecting its sensitivity to oxidative damage. In this work, we used the complexation of DNA by cationic surfactants to modulate the conformation, the dynamics, and the environment of the double helix. Photo-oxidative damage initiated by benzophenone as the photosensitizer on a plasmid DNA complexed by dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC), tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC), cetyltrimethyammonium chloride (CTAC) and bromide (CTAB) was detected by agarose gel electrophoresis. By fluorescent titration in the presence of ethidium bromide (EB) and agarose gel electrophoresis, we experimentally confirmed the complexation diagrams with a critical aggregation concentration on DNA matrix (CAC^{DNA}) delimiting two regions of complexation, according to the DNA−phosphate concentration. The study of the photo-oxidative damage shows, for the first time, a direct correlation between the DNA complexation by these surfactants and the efficiency of DNA cleavage, with a maximum corresponding to the CAC^{DNA} for DTAC and CTAC, and to DNA neutralization for CTAC and CTAB. The localization of a photosensitizer having low water solubility, such as benzophenone, inside the hydrophobic domains formed by the surfactant aggregated on DNA, locally increases the photoinduced cleavage by the free radical oxygen species generated. The inefficiency of a water-soluble quencher of hydroxyl radicals, such as mannitol, confirmed this phenomenon. The detection of photo-oxidative damage constitutes a new tool for investigating DNA complexation by cationic surfactants. Moreover, highlighting the drastically increased sensitivity of a complexed DNA to photo-oxidative damage is of crucial importance for the biological use of surfactants as nonviral gene delivery systems.

Introduction

The structural integrity of DNA is continuously challenged by a number of exogenous and endogenous agents, including ionizing and ultraviolet radiation and reactive chemical species. If the resulting lesions are not repaired, they may lead to damage that is the origin of mutagenic and lethal effects. The type of DNA damage produced depends on the type of mutagen. Generally, the two major routes of DNA damage are via DNA adducts and oxidative or photo-oxidative damage. Oxidation of DNA, involving reactive oxygen species such as singlet oxygen, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide, or a one-electron process, is a major source of damage.[1] It has been demonstrated that the well-ordered array of π-stacked base pairs promotes long-range oxidation in duplex DNA.[2,3] This observation implies that the amount of oxidative damage could also be sensitive to disturbances in the stacking generated by conformational changes or modulation of the dynamics of the helix. In eukaryotic cells, DNA is packaged in nucleosomes, and the interactions with the histones change the bending and the mobility of the DNA. Barton et al.,[4] demonstrated that the histone binding did not affect the long-range oxidation in the assembly, and the packaging was mainly protected from damage by molecules diffusing from the solution. To overcome this natural packaging, and to better investigate the oxidative damage, it would be useful to identify a new approach that could modulate the conformation, the dynamics, and the environment of the DNA. One such approach would be complexation by cationic surfactants associated with a well-suited photosensitizer to induce photo-oxidative damage on DNA.

Materials and Methods

Materials. Heparin sodium salt was purchased from Avocado Research Chemical, Ltd., and D-mannitol was purchased from Sigma. Ethidium bromide (EB) as a 10 mg/mL water solution was purchased from Pharmacia Biotech Plusone. Benzophenone was purchased from Merck. The benzophenone solutions were prepared by heating (50 °C) and sonicating the solid in 30 mM Tris/HCl buffer. After filtration, the concentration of the stock solution obtained was determined by UV absorption at 258 nm using an extinction coefficient of 18 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.[5]

Supercoiled plasmid DNA (Form I) pBR322 (4361 base pairs) was purchased from Fermentas. The absorbance ratio at 260 and 280 nm was 1.9, indicating a sample free from protein contamination. The amount of contaminant relaxed circular DNA (Form II) was checked by agarose gel electrophoresis followed photodensitometry and was less than 10%. No linear DNA (Form III) was detected in the starting material. The DNA was used after dilution in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.1) from a stock solution at 4.5×10^{-4} M PO_4^-.

* Corresponding author. Fax: 33(0)561558155, E-mail: perez@chimie.ups-tlse.fr.

(1) Schärer, O. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946.
(2) Nunez, M. E.; Hall, D. B.; Barton, J. K. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85.
(3) Boon, E. B.; Barton, J. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320.
(4) Nunez, M. E.; Noyez, K. T.; Barton, J. K. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 403.
(5) Charlier, M.; Helene, C. *Photochem. Photobiol.* **1972**, *15*, 71.

10.1021/la800751k CCC: $40.75 © 2008 American Chemical Society
Published on Web 07/19/2008

Surfactants. Dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC; >99%) and tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC; >98%) were purchased from Fluka. The 25 wt % water solution of cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) was purchased from Aldrich, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB; 99+%) was purchased from Acros Organics.

Fluorescence Measurements. Fluorescence intensity of the solutions was measured at 25 °C using a PTI QM1 Photon Technology Instrument Quanta Master 1 spectrofluorimeter with a water-thermostatic stirred cell holder. The applied excitation wavelength was 530 nm. The emission spectrum was measured in the region from 540 to 750 nm. The DNA solution in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.1) was directly mixed with EB in the fluorescence cell, at a ratio corresponding to one intercalated EB-molecule per nucleotide base pair. The final volume of the mixture in the cell was 1500 μL. To this solution, the surfactant stock-solution of different concentrations (in order to titrate by 2−10 μL aliquots) in the same buffer was added step by step. After each addition, the mixtures were carefully stirred. The time interval between the additions of CTAB aliquots was 5 min for low DNA concentrations (1×10^{-6} to 2×10^{-5}M PO_4^-), and 10−20 min for high DNA concentrations (3.5×10^{-5} to 5×10^{-5}M PO_4^-). The changes in the intensity of the fluorescence emission peak (∼590 nm) were plotted against the surfactant concentration. The titration was finished when a pronounced decrease in the fluorescence was observed. Each experiment was performed in triplicate.

Agarose Gel Electrophoresis. Six experiments were performed to study the effect of DNA concentration on the CTAB complexation. For each experiment the samples of 25 μL final volume containing 15 μL of Tris/HCl buffer (30 mM, pH 7.1), 5 μL of DNA (concentration fixed at 1.5×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1.5×10^{-4} M, 2.5×10^{-4} M, or 4×10^{-4} M in phosphate diester (PO_4^-) units), and 5 μL of CTAB solutions at concentrations varying from 0 to 5×10^{-4} M were prepared. The final DNA concentrations for six experiments were 3×10^{-6} M, 6×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, and 8×10^{-5} M phosphate diester (PO_4^-) units. The final CTAB concentrations for each experiment were 0, 5×10^{-6} M, 7.5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1.5×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 4×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 6×10^{-5} M, 7×10^{-5} M, 8×10^{-5} M, 9×10^{-5} M, and 1×10^{-4} M. After stirring and 30 min of incubation at room temperature, 5 μL of loading buffer (250 mM Hepes, pH 7.45, 75% glycerol, and 0.005% bromophenol blue) was added. An aliquot of 20 μL of each solution was directly loaded into 0.8% agarose gel, containing EB, and electrophoresis was conducted under a constant electric field of 85 mV for 2 h.

DNA Cleavage by Benzophenone Photosensitization. Samples were prepared by mixing 5 μL of 4.5×10^{-4} M phosphate diester units in DNA: [DNA−PO_4^-], 5 μL of increasing concentrations of surfactant (starting from no surfactant) and 15 μL of 7.5×10^{-5} M benzophenone solution in 30 mM Tris/HCl buffer solution. The final concentration of DNA was 9×10^{-5} M PO_4^-. For the mannitol quenching experiments, the mixed surfactant and mannitol solution was prepared to obtain a 200 mM final concentration of mannitol after mixing with DNA and benzophenone solutions. The final concentration of DNA was 9×10^{-5} M PO_4^-, and the final benzophenone concentration was 4.5×10^{-5} M. The mixtures were placed in glass tubes (3 mm diameter), incubated for 20 min in the dark, and irradiated for 1 min at 25 °C, using a xenon lamp (Muller 450W) equipped with a long pass filter (λ > 320 nm). After irradiation, 5 μL of 20% solution of heparin sodium salt in 30 mM Tris/HCl buffer was added to each tube to dissociate the DNA−surfactant complexes. The samples were then analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose horizontal slab gel in Tris borate buffer, and the percentage of the circular form of DNA (Form II) in the irradiated samples was calculated by photodensitometry. A coefficient of 1.66 was used to correct the lower efficiency of EB binding to DNA to Form I with respect to Form II.[6] All the damage experiments were carried out at least three times.

Results and Discussion

DNA−Surfactant Interaction. Complexation between DNA and cationic surfactants has attracted much attention in the past few years, particularly in the field of gene delivery vectors.[7–9] DNA is a negatively charged polyelectrolyte, and it interacts readily with a variety of cationic molecules such as metal ions,[10,11] polyamines,[12,13] polymers,[14–16] and surfactants.[17–36] Cationic surfactants neutralize the negative charge of the DNA, and their aggregation induces changes in its conformation and provides a particular environment around the DNA. An analysis of the literature[18–25,33,36] indicates the existence of two mechanisms of DNA−surfactant complexation according to the DNA concentration. Figure 1 gives a theoretical illustration of a two-region diagram of DNA−surfactant complexation. At low DNA−phosphate diester concentration [DNA−PO_4^-], the binding of the surfactant is highly cooperative and is just slightly dependent on the [DNA−PO_4^-][24,25,36] (Region I of Figure 1). In this case, far below the critical micelle concentration (CMC), the DNA electrostatically facilitates the formation of aggregates of surfactants stabilized by hydrophobic interactions. In the second region, the binding is driven only by electrostatic neutralization of the negatively charged phosphates[18–23,33] (Region II of Figure 1). We can define a critical aggregation concentration of surfactant

(6) Ciulla, T. A.; Van Camp, J. R.; Rosenfeld, E.; Kochevar, I. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *49*, 293.

(7) Lasic, D. D. *Liposome in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
(8) Huang, L.; Hung, M. C.; Wagner, E. *Non-viral Vectors for Gene Therapy*; Academic Press: New York, 1999.
(9) Felgner, P. L.; Ringold, G. M. *Nature* **1989**, *337*, 387.
(10) Kankia, B. I.; Buckin, V.; Bloomfield, V. A. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*(13), 2795.
(11) Hackl, E. V.; Kornilova, S. V.; Blagoi, Y. P. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35*, 175.
(12) Deng, H. ; Bloomfield, V. A.; Benevides, J. M.; Thomas, G. J., Jr. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*(17), 3379.
(13) Raspaud, E.; Olvera de la Cruz, M.; Sirokav, J.-L.; Livolant, F. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 381.
(14) DeRouchey, J.; Netz, R. R.; Rädler, J. O. *Eur. Phys. J. E* **2005**, *16*, 17.
(15) Asgatay, S.; Bololoi, C.; Franceschi-Messant, S.; Vicendo, P.; Perez, E.; Rico-Lattes, I. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284*(6), 668.
(16) Franceschi-Messant, S.; Bordeau, O.; Millerioux, C.; Perez, E.; Vicendo, P.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2002**, *18*, 1743.
(17) Dias, R. S.; Pais, A. A. C. C.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Colloids Surf., A* **2004**, *250*, 115.
(18) Pattarkine, M. V.; Ganesh, K. N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 41.
(19) Bonincontro, A.; Marchetti, S.; Onori, G.; Rosati, A. *Chem. Phys.* **2004**, *312*, 55.
(20) McLoughlin, D.; Delsanti, D.; Tribet, C.; Langevin, D. *Europhys. Lett.* **2005**, *69*(3), 461.
(21) McLoughlin, D.; Langevin, D. *Colloids Surf., A* **2004**, *250*, 79.
(22) Marchetti, S.; Onori, G.; Cametti, C. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3676.
(23) Goracci, L.; Germani, R.; Savelli, G.; Bassani, D. M. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 197.
(24) Mel'nikov, S. M.; Sergeyev, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9951.
(25) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V.; Goulko, A. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 10348.
(26) Matulis, D.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7331.
(27) Jacquier, J.-C.; Gorelov, A. V.; McLoughlin, D. M.; Dawson, K. A. *J. Chromatogr., A* **1998**, *817*, 263.
(28) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochim. Biophys. A* **1997**, *1323*, 29.
(29) Mel'nikov, S. M.; Sergeyev, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2401.
(30) Mel'nikov, S. M.; Sergeyev, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9951.
(31) Rosa, M.; Dias, R.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2164.
(32) Dias, R. S.; Innerlohinger, J.; Glatter, O.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 10458.
(33) Spink, C. H.; Chaires, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10920.
(34) Dias, R.; Mel'nikov, S.; Lindman, B.; Miguel, M. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 9577.
(35) Dias, R. S.; Svingen, R.; Gustavsson, B.; Lindman, B.; Miguel, M. G.; Åkerman, B. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2908.
(36) Zhu, D.-M.; Evans, R. K. *Langmuir* **2006**, *22*, 3735.

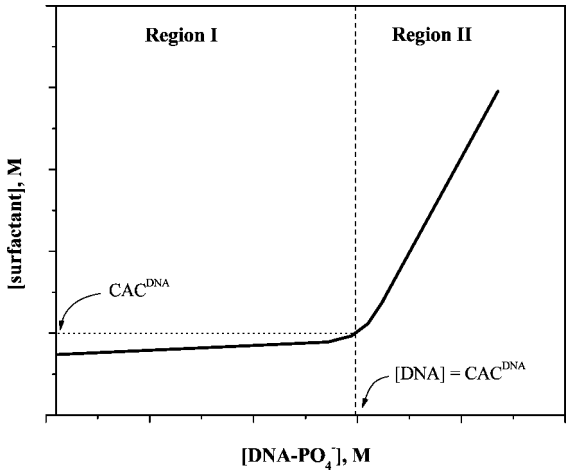


Figure 1. Proposed theoretical diagram of DNA−surfactant complexation.

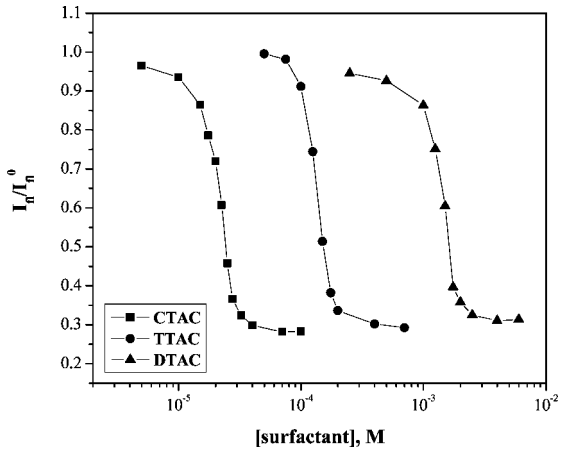


Figure 2. Fluorimetric titration of DNA (3×10^{-6} M PO_4^-) by CTAC, TTAC, and DTAC at 25 °C in 30 mM Tris/HCl.

Table 1. AC^{DNA} and CMC Determined in 30 mM Tris/HCl Buffer at 25 °C

surfactant	AC^{DNA}, M	CMC, M
CTAB	2.0×10^{-5}	2.0×10^{-4}
CTAC	2.1×10^{-5}	1.3×10^{-4}
TTAC	1.5×10^{-4}	1.4×10^{-3}
DTAC	1.5×10^{-3}	1.1×10^{-2}

on DNA matrix (CAC^{DNA}) corresponding to the break before the start of electrostatically driven complexation.

For this study, we selected widely used cationic surfactants: DTAC, TTAC, CTAC, and CTAB. These surfactants differ by their alkyl chain length (C12, C14, and C16) or, for the same chain (C16), by their counterion (chloride or bromide). Before investigating the photo-oxidative damage, it was necessary to precisely define the concentration range of the study and the complexation of the selected plasmid DNA according to the chain length and the nature of the counterion. We selected a plasmid DNA in a natural supercoiled form as the model system, so that the damage could be detected easily by agarose gel electrophoresis. By fluorescent titration and agarose gel electrophoresis we studied the interactions of DNA with these surfactants, and experimentally confirmed the complexation diagram in the case of CTAB by studying the DNA−CTAB interactions at [DNA−PO_4^-] varying from 10^{-6} M to 10^{-4} M.

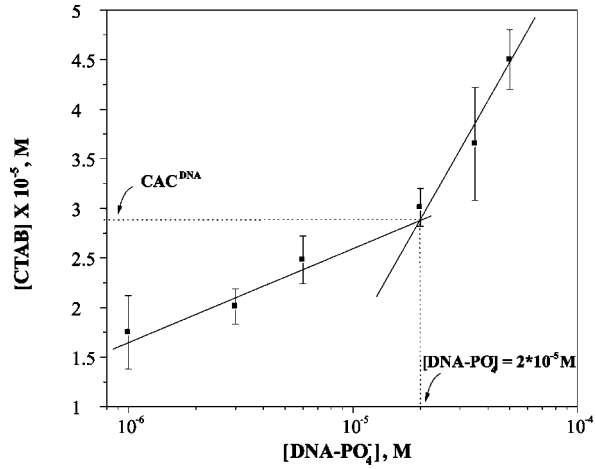


Figure 3. Experimental diagram of DNA−CTAB complexation at 25 °C in 30 mM Tris/HCl.

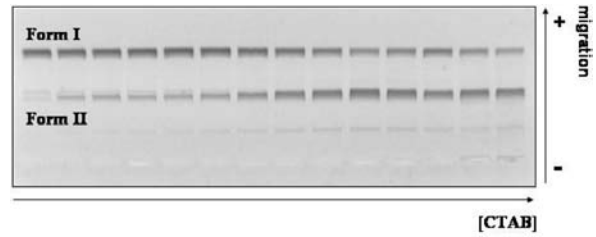


Figure 4. CTAB example of photo-oxidative damage detected by agarose gel electrophoresis.

Fluorescent Titration of DNA−EB Complex. EB is a widely used DNA intercalate.[37] The ethidium ion displays a dramatic increase in fluorescence efficiency when it intercalates into DNA. It is well-known that the addition of cationic surfactants leads to structural changes in DNA, which induce the dissociation of EB from DNA−EB complexes and decrease the EB fluorescence signal.[25,28,38] By observing the decrease in the fluorescence intensity of EB, it is possible to follow the DNA−surfactant interaction.

According to Region I of the proposed complexation diagram (Figure 1), it is possible to evaluate an aggregation concentration of surfactants on DNA (AC^{DNA}) close to the CAC^{DNA} by using a very low DNA concentration. By this method, for a low fixed concentration of DNA (3×10^{-6} M PO_4^-), we studied the influence of the chain length on the complexation. The results are presented in Figure 2 and show a classic sigmoid shape[25] with the AC^{DNA} corresponding to the midpoint of the curves. As described in the literature for other DNAs,[17,25] we observed easier complexation as the chain length increased, indicating the importance of the hydrophobic effect on the phenomenon. Moreover, the curve of CTAB (not shown here) was similar to that for CTAC, in agreement with a negligible effect of the bromide or chloride counterion.

From these fluorimetric titration curves, we determined the AC^{DNA}. In Table 1, these values are compared with the CMC for all the surfactants in Tris/HCl buffer. As can be observed, the AC^{DNA} are, in general, 10 times smaller than the CMC, with the same dependence on the chain length, reflecting the hydrophobic and cooperative effect on the aggregation.

(37) Pasternack, R. F.; Caccam, M.; Keogh, B.; Stephenson, T. A.; Williams, A. P.; Gibbs, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6835.
(38) Llères, D.; Clamme, J.-P.; Dauty, E.; Blessing, T.; Krishnamoorthy, G.; Duportail, G.; Mély, Y. *Langmuir* **2002**, *18*, 10340.

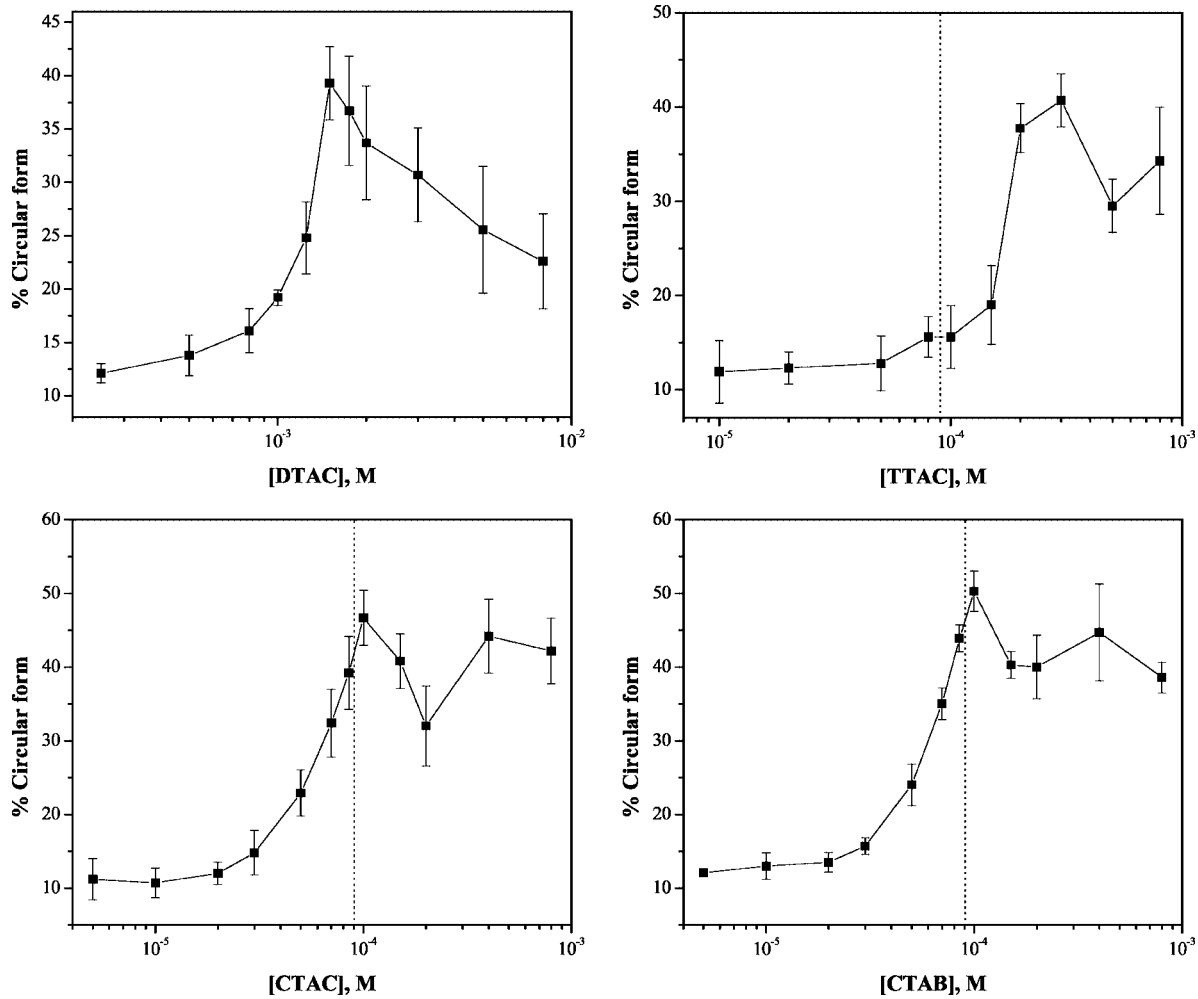


Figure 5. Percentage of circular (damaged) form after UV irradiation versus surfactant concentration in 30 mM Tris/HCl buffer at 25 °C. The surfactant concentration corresponding to DNA neutralization is shown by a dotted line. [DNA−PO_4^-] = 9 × 10^{-5}M; [benzophenone] = 4.5 × 10^{-5}M.

Table 2. Concentration of the Surfactant at the Maximum of Cleavage and AC^{DNA}

surfactant	concentration at the maximum of cleavage, M	AC^{DNA}, M
DTAC	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-3}
TTAC	2.5×10^{-4}	1.5×10^{-4}
CTAC	1×10^{-4}	2.1×10^{-5}
CTAB	1×10^{-4}	2.0×10^{-5}

In the case of CTAB, from the curves of titration obtained at different [DNA−PO_4^-], it was then possible to plot the corresponding experimental diagram (Figure 3). This complexation diagram confirms the existence of two regions of DNA−surfactant interaction and is very similar to the proposed theoretical diagram. Below [DNA−PO_4^-] = CAC^{DNA}, the surfactant concentration necessary for DNA complexation (AC^{DNA}) increases slightly. For example, in the case of CTAB (Figure 3), when [DNA−PO_4^-] changes 20 times, the concentration of CTAB aggregation (AC^{DNA}) increases only 1.7 times (from 1.75×10^{-5} M to 3.01×10^{-5} M). These values are in agreement with the literature data[18,29,30] and justify the approximation of CAC^{DNA} by AC^{DNA} at low concentrations of DNA. On the other hand, at higher DNA concentrations, when [DNA−PO_4^-] > CAC^{DNA}, a much more obvious dependence of nucleic acid concentration on DNA−CTAB complexation is observed. The DNA−CTAB complexation follows the DNA charge neutralization here. Moreover, the complexation diagram of CTAB was also confirmed by agarose gel electrophoresis.

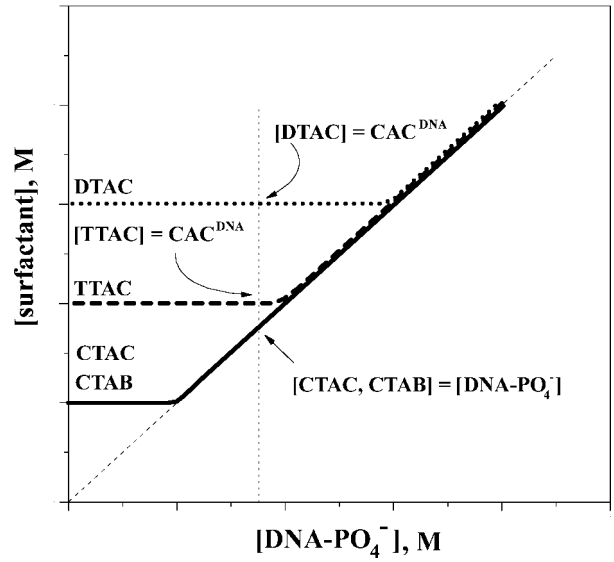


Figure 6. Simplified diagrams of DNA−complexation by DTAC, TTAC, CTAC, and CTAB.

Agarose Gel Electrophoresis. Agarose gel electrophoresis is widely used to study the compaction of DNA by different cationic

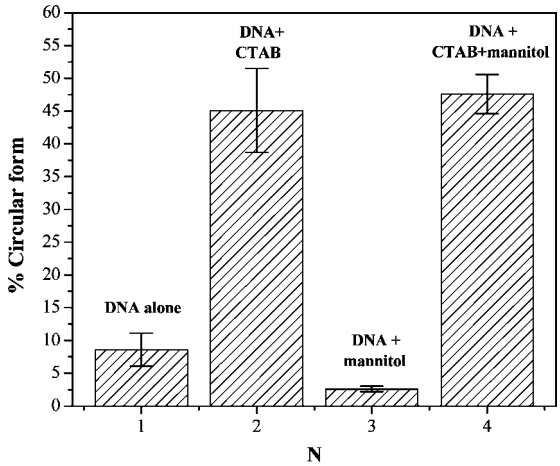


Figure 7. Effect of mannitol on photo-oxidative damage. [DNA−PO_4^-] = 9×10^{-5}M; [benzophenone] = 4.5×10^{-5}M; [mannitol] = 200 mM. 25 °C in 30 mM Tris/HCl buffer.

agents such as surfactants,[35,39] lipids,[39–41] and polymers.[42] This method permits one to distinguish macromolecules by both their charge and their size. It has been reported that the complexation of DNA with cationic surfactants leads to a decrease in its electrophoretic mobility.[35,39] Recently it has been proposed that a reduction in the electrophoretic mobility on the agarose gel with increasing surfactant concentration is not due to the migration of partially neutralized DNA, but rather to the dissociation of the complex when it enters the gel.[35]

Agarose gel electrophoresis was performed to study DNA−surfactant interactions in a range of DNA concentrations from 3×10^{-6} to 8×10^{-5} M PO_4^-. The results for CTAB are presented in the Supporting Information. At low DNA concentrations (3×10^{-6} to 1×10^{-5} M PO_4^-), when [DNA−PO_4^-] < CAC^{DNA}, the influence of the surfactant on the electrophoretic mobility of DNA does not depend on DNA concentration.

The AC^{DNA} is in the range 2×10^{-5}M to 3×10^{-5}M, which is in agreement with fluorescent titration experiments. Beyond the point where [DNA−PO_4^-] = CAC^{DNA}, the interaction of DNA with surfactants shifts to the highest surfactant concentration, approximately equal to the charge ratio $R = 1$. For higher [DNA−PO_4^-], the surfactants interact mainly with DNA by charge neutralization, rather than by the formation of aggregates on the DNA. This concentration effect on the DNA complexation is clearly observable on the agarose gel electrophoresis (Supporting Information). Below [DNA−PO_4^-] = CAC^{DNA}, the electrophoretic mobility of DNA is weakly modified. Above this concentration, a broadening of the band of DNA and changes of electrophoretic mobility appear. When the [DNA−PO_4^-] > CAC^{DNA}, the electrostatic interactions between the surfactant and DNA are prevalent, and there is also the possibility of forming multiaggregates,[21,24,36] thus decreasing the electrophoretic mobility. These results obtained by agarose gel electrophoresis are in accordance with fluorescent titration, and are related to the structures of the complexes formed. Both the fluorescence study and the agarose gel electrophoresis confirm that, for the selected DNA and surfactants, two regions of complexation exist, according to the [DNA−PO_4^-]. Once the concentration range for each surfactant had been determined, we studied the influence of the surfactants on the photo-oxidative damage.

Study of the Photo-oxidative Damage on the DNA−Surfactant Complexes. UV irradiation is the best way to induce photo-oxidative damage on DNA. It is well-known that benzophenone, a widely used photosensitizer, is able to induce DNA photo-oxidative damage via hydroxyl radicals, singlet oxygen, or one-electron processes.[5,43,44] The experiments were carried out on plasmidic DNA. In its natural state, this duplex DNA is supercoiled (Form I). Photo-oxidative damage leads to the cleavage of various bonds. Breaking a single bond in one strand will result in a relaxed circular DNA (Form II). Breaking both strands at the same position will result in the formation of a linear molecule (Form III).

Circular supercoiled DNA was separated from the relaxed circular form by agarose gel electrophoresis. Thus, we could use this technique to detect and quantify the photo-oxidative damage. Figure 4 shows an example of the detection of the photo-oxidative damage in the case of CTAB.

The influence of DTAC, TTAC, CTAC, and CTAB on DNA cleavage photosensitized by benzophenone was studied. A fixed and easily detectable (by EB dying) concentration of plasmid DNA was irradiated in presence of benzophenone and increasing amounts of surfactants. After UV irradiation, DNA−surfactant complexes were decomplexed by a solution of heparin sodium salt,[42] a competitive anionic polyelectrolyte, and analyzed by gel agarose electrophosesis. Figure 5 shows the cleavage percentage based on the amount of relaxed circular DNA against the surfactant concentration.

As we can observe, at low surfactant concentration, the DNA cleavage is weakly dependent on this parameter. Then, the formation of damage increases abruptly and reaches a maximum, followed by a slight decrease in photo-oxidative damage. In the case of CTAB and CTAC, the position of the maximum of DNA cleavage corresponds to neutralization [surfactant]/[DNA−PO_4^-] = 1, whereas, in the cases of DTAC and TTAC, the maxima are close to the AC^{DNA} (Table 2).

The concentration of DNA used for the study of the cleavages (9×10^{-5} M PO_4^-) was higher than the CAC^{DNA} of CTAC and CTAB, but lower than that of DTAC and TTAC. At this [DNA−PO_4^-], complexation of nucleic acid with DTAC and TTAC (AC^{DNA}) occurred at a surfactant concentration near their CAC^{DNA} (Region I). But, in the case of CTAC and CTAB, it occurred at a surfactant concentration equal to [DNA−PO_4^-], corresponding to charge neutralization (Region II).

Interestingly, we observe that these results follow the experimental diagrams of DNA−surfactant interactions, and may be better understood with the help of Figure 6. It illustrates the position of the selected DNA−PO_4^- concentration relative to the position of the CAC^{DNA} for each of the surfactants, and confirms the experimental observations.

The decrease in cleavages after the maximum is probably related to the formation of multiaggregates,[21,24,36] leading in some cases to a partial precipitation of the complexes. At first glance, this increase in photo-oxidative DNA damage by these cationic surfactants is surprising. However, to understand this effect, it is important to consider the hydrophobicity and the low solubility of the benzophenone in the buffer. The aggregation of these cationic surfactants on the DNA creates hydrophobic domains, increasing the solubility of the photosensitizer around

(39) Bhattacharya, S.; Mandal, S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7764.
(40) Reimer, D. L.; Zhang, Y.; Kong, S.; Wheeler, J. J.; Graham, R. W.; Bally, M. B. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12877.
(41) Eastman, S. J.; Siegel, C.; Tousignant, J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H.; Scheule, R. K. *Biochim. Biophys. A* **1997**, *1325*, 41.
(42) Asgatay, S.; Franceschi-Messant, S.; Perez, E.; Vicendo, P.; Rico-Lattes, I.; Phez, E.; Rols, M. P. *Int. J. Pharm.* **2004**, *285*, 121.
(43) Lhiaubet, V.; Paillous, N.; Chouini-Lalanne, N. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 670.
(44) Chouini-Lalanne, N.; Defais, M.; Paillous, N. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 441.

the DNA. This closer positioning on the DNA drastically increases the photo-oxidative damage. In order to confirm this hypothesis, we used mannitol, a hydrophilic specific scavenger of hydroxyl radicals. So, if the photosensitizer was no longer in the water but in the hydrophobic domains along the DNA, the mannitol could not inhibit the photoinduced DNA cleavage by hydroxyl radicals.

Influence of Mannitol on Photo-oxidative Damage. For this study, four experiments were performed under UV irradiation with benzophenone. Two experiments were carried out with the DNA not complexed, with and without mannitol, and two experiments were carried out in the presence of CTAB at the concentration corresponding to the maximum of cleavages (1×10^{-4}), with and without mannitol. We had previously checked by fluorescent titration that mannitol had no influence on the DNA complexation with CTAB. The results are presented in Figure 7.

As can be seen on this histogram, without the surfactant, the mannitol significantly reduced the photo-oxidative damage. On the other hand, in the presence of CTAB, we found the same amount of DNA cleavages. These results confirm the positioning of the photosensitizer in the hydrophobic domains of the aggregated surfactant, screening the benzophenone from the mannitol localized in the aqueous phase. The difference in terms of damage between DNA alone and DNA in the presence of mannitol may be due to singlet oxygen since it has been reported that this can lead to single strand breaks detectable by gel agarose electrophoresis.[45]

Conclusions

This study is the first demonstration of a direct correlation between DNA complexation by cationic surfactants and photo-oxidative damage. The positioning of a photosensitizer with low water solubility, such as benzophenone, inside the hydrophobic domains formed by the surfactants aggregated on DNA increased the cleavages, and their detection constitutes a new tool for investigating DNA complexation by cationic surfactants. Also, in this study we only detected the damage, but an identification of its nature and localization on the DNA strand (by gel sequencing experiments) could provide a unique tool for the topological analysis of complexation. Moreover, because of the growing interest in the use of cationic surfactants for the construction of nonviral gene delivery systems, pointing out a drastic increase in the sensitivity of a complexed DNA to photo-oxidative damage is of crucial importance.

Acknowledgment. This research was supported by the Program Marie Curie-EST on Biomimetic Systems MEST-CT-2004-504465.

Supporting Information Available: Influence of CTAB on the electrophoretic properties of DNA on agarose gel at different [DNA−PO_4^-]. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

LA800751K

(45) Aloisi, G. G.; Amelia, M.; Barbafina, A.; Latterini, L.; Elisei, F.; dall'Acqua, F.; Vedaldi, D.; Faccio, A.; Viola, G. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*(3), 664.

Spontaneous Vesicle Formation by Caffeate Ion-pair Surfactants: Antioxidant Properties and Application to DNA protection.

Sergii Rudiuk, Mathieu Delample, Sophie Franceschi-Messant, Nadia Chouini-Lalanne, Emile Perez, Jean-Christophe Garrigues, Isabelle Rico-Lattes*

Submitted to **Journal of Dispersion Science and Technology**

Université de Toulouse; UPS; IMRCP; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France CNRS; IMRCP; F-31062 Toulouse, France

Abstract : A new family of antioxidant ion-pair surfactants was developed by acid-base association of a fatty amine (C12 or C16) with caffeic acid, a natural antioxidant molecule. The amphiphilic molecules obtained, spontaneously formed stable vesicles in water with hydrodynamic diameters around 230 nm. Moreover, as shown by a surface tension study, they presented a phase transition from micelles to vesicles. The maintenance of the antioxidant properties of both caffeate ion-pair surfactants was confirmed by the DPPH test. The amphiphilic properties associated with the antioxidant ability of these new caffeates were used to protect complexed DNA by cationic surfactant (CTAB) from photooxidative cleavage induced by benzophenone photosensitization.

Keywords Caffeic acid, ion-pair surfactant, micelle-vesicle transition, spontaneous vesicles, antioxidant, DNA protection.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are implicated in food or cosmetic formulation degradation, but also in the development of health problems.[1] Consequently, antioxidant molecules are very important as preservatives or drugs. Among the antioxidants, we find natural molecules like vitamin E (α-tocopherol), vitamin C (ascorbic acid), carotenoids, polyphenols and flavonoids or synthetic molecules like butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) still largely used as preservative in food or cosmetic formulations.[2]

Most of the natural antioxidants are highly hydrophilic and cannot efficiently prevent oxidative damage of lipids in food [3] or in biological applications [4]; all the more latter case as they cannot cross barriers such as cell membranes. An important approach to the design of synthetic inhibitors of lipid peroxidation (LPO) based on natural antioxidants was to introduce hydrophobic aliphatic substituents into their structure, generally by covalent grafting, as in the example of alkanoyl-6-O-ascorbic acid esters.[5] It has also been demonstrated that the protective effect of the lipid phase can be greatly improved by an amphiphilic antioxidant located at the interface.[6]

Among the synthetic amphiphilic molecules derived from natural antioxidants described in the literature [7], there is no example of caffeic-acid-based molecules. Moreover there are very few examples of amphiphilic antioxidant molecules leading to vesicles[8]. Caffeic acid is a phenolic compound that is biosynthetically derived from phenylalanine in plants.[2] It is related to cinnamic acid but it has two hydroxyl groups which are not found in the latter. Caffeic acid is known to be an antioxidant[9] and its derivatives are also used as components of antimetastatic[10], anticarcinogenic[11], anti-inflammatory[12], and immunomodulator drugs.[13] Caffeates can also act as optical filters and could be used as sunscreen agents to reduce skin damage by blocking UV-A, B irradiation.[14]

In our group, we have developed a versatile way to synthesize original amphiphilic molecules with a variety of properties.[15] By an acid-base association, a mixture of alkylcarboxylic acids and alkylamines have been transformed into new amphiphilic species.[16] Depending on the lengths of the alkyl chains, the resulting associations are considered as catanionic surfactants[17], ion-paired surfactants[18] or surfactants with an organic counterion.[19] These associations could lead to the spontaneous appearance of vesicles or rodlike micelles depending on the contribution of the counterion to the architecture.[20, 21] Recently we used this method to synthesize novel polymerizable surfactants from 1:1 mixtures of alkylcarboxylic acids and norbornene methyleneamine.[22]

In the present work, we synthesized caffeate ion-pair surfactants by caffeic acid neutralization with dodecylamine or hexadecylamine. We studied their aggregation in water, their antioxidant properties and applied them to DNA protection.

EXPERIMENTAL

Materials

Caffeic acid (≥98%) was purchased from Sigma (France). Dodecylamine (≥99%) and hexadecylamine (99%) were from Aldrich (France). Ammonia water solution (30%±2%) was from Carlo Erba Reagenti (Italy). Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 99+% was from Acros organics (France). Heparin sodium salt was from Avocado Research Chemical Ltd. (UK) Ethidium bromide (EB) was purchased as a 10 mg/ml water solution from Pharmacia Biotech (France). Benzophenone was from Merck (Germany). The benzophenone solutions were prepared by heating (50°C) and sonicating the solid in 30mM Tris/HCl buffer. After filtration, the concentration of the stock solution obtained was determined by UV absorption at 258 nm using an extinction coefficient of 18000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.[23] Supercoiled plasmid DNA (form I) pBR322 (4361 base pairs) was purchased from Fermentas (USA). The absorbance ratio at 260 and 280 nm was 1.9, indicating a sample free from protein contamination. The amount of contaminant relaxed circular DNA (form II) was checked by agarose gel electrophoresis followed by photodensitometry and was less than 10%. No linear DNA (form III) was detected in the starting material. The DNA was used after dilution in 30 mM Tris/HCl buffer (pH 7.1) from a stock solution at 4.5×10^{-4} M.

Synthesis

All solvents for the synthesis of caffeate based antioxidants were degassed and the reaction mixtures were protected from light. The products were stored under argon.

Dodecylammonium caffeate (Caf12)

Caf12 was obtained by adding under rapid stirring 501.3 mg (2.78 mmol) of caffeic acid, in 20 mL of methanol, into 523.8 mg (2.80 mmol) of the dodecylamine, solubilized in a minimum of methanol (10mL). After 12 hours of stirring at room temperature, the reaction mixture was evaporated, washed with ether and filtered. A white powder was obtained with a 95% yield.

^{1}H NMR (CD_3OD): 0.83 (t, 3H, CH_3); 1.22 (m, 18H, $9CH_2$); 1.58 (m, 2H, $^+NH_3$-CH_2-C**H$_2$**); 2.83 (t, 2H, $^+NH_3$-C**H$_2$**); 6.22 (d, 1H, CH=C**H**-COO^-); 6.67 (d, 1H, CH arom. 5); 6.79 (d.d., 1H, CH arom. 6) ; 6.93 (d, 1H, CH arom. 2); 7.22 (d, 1H, C**H**=CH-COO^-).

Anal. Calcd. for $C_{21}H_{35}NO_4$: C, 69.01; H, 9.65; N, 3.83. Found (%): C, 68.84; H, 9.21; N, 3.62

IR (KBr), ν cm^{-1}: 3365 and 3225 (N-H); 2918 and 2850 (C_{sp3}-H); 1644 (C=O); 1600 (C=C); 1529 and 1491 (C=C aromatic); 1110 (C-O)

Hexadecylammonium caffeate (Caf16)

Caf16 was obtained by adding, under rapid stirring at room temperature, 499.4 mg (2.77 mmol) of caffeic acid in 20 mL of methanol to 669.9 mg (2.77 mmol) of the hexadecylamine, solubilized in a minimum of methanol (10mL). The product precipitated in the medium was washed with cold ethanol and filtered. A white powder was obtained with a 70% yield.

^{1}H NMR (CD_3OD): 0.84 (t, 3H, CH_3); 1.22 (m, 18H, $9CH_2$); 1.58 (m, 2H, $^+NH_3$-CH_2-C**H**$_2$); 2.83 (t, 2H, $^+NH_3$-C**H**$_2$); 6.21 (d, 1H, CH=C**H**-COO^-); 6.68 (d, 1H, CH arom. 5); 6.79 (d.d., 1H, CH arom. 6); 6.93 (d, 1H, CH arom. 2); 7.22 (d, 1H, C**H**=CH-COO^-).

Anal. Calcd. for $C_{25}H_{43}NO_4$: C, 72.22; H, 10.28; N, 3.32. Found (%): C, 71.09; H, 9.60; N, 3.16

IR (KBr), ν cm^{-1}: 3350 and 3225 (N-H) ; 2919 and 2849 (C_{sp3}-H); 1644 (C=O); 1600 (C=C); 1529 and 1471 (C=C aromatic); 1109 (C-O)

Ammonium caffeate (CafAmm)

CafAmm was obtained by adding 200 μL (39.2 mmol) of ammonia water solution (30%) drop by drop to the suspension of 498.1 mg (2.77 mmol) of caffeic acid in 11 mL of water, under rapid stirring at room temperature. After the solubilization of caffeic acid, the reaction mixture was freeze-dried to give a straw-coloured powder. Yield 80%.

^{1}H NMR (CD_3OD): 6.22 (d, 1H, CH=C**H**-COO^-); 6.69 (d, 1H, CH arom. 5); 6.80 (d.d., 1H, CH arom. 6); 6.94 (d, 1H, CH arom. 2); 7.23 (d, 1H, C**H**=CH-COO^-).

Anal. Calcd. for $C_9H_{11}NO_4$: C, 54.87; H, 5.63; N, 7.11. Found (%): C, 51.22; H, 5.39; N, 6.38

IR (KBr), ν cm^{-1}: 3126 (N-H) ; 3025 (C_{sp2}-H); 2767 (C_{sp3}-H); 1643 (C=O); 1599 (C=C); 1528 and 1528 (C=C aromatic); 1109 (C-O)

Apparatus and methods

^{1}H NMR

^{1}H NMR spectra were recorded on a Brucker 300 spectrometer at a nominal frequency of 300 MHz. All spectra were recorded in MeOD. Chemical shifts were reported in ppm with respect to tetramethylsilane.

IR

IR spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-1760-X spectrometer (0.5% KBr) and the wavenumbers were expressed in cm^{-1}.

High-resolution electrospray mass spectrometry (HRMS)

Electrospray mass spectra were recorded on a Waters Qtof Ultima API. An aliquot of a $1mg.mL^{-1}$ aqueous solution of the ion-pair surfactants (50µL) was mixed with an aqueous solution of NaI (50µL; $1mg.mL^{-1}$) and distilled water (900 µL). The injection was performed with a flow of 10 $\mu L.min^{-1}$. The capillarity voltage was 3kV, the cone-to-skimmer voltage was set at 100V and collision energy of 10eV was used.

Surface tension measurements

Surface tension measurements at the liquid-gas interface were made by a VWR TD Lauda tensiometer. Temperature was kept constant (25ºC) with a thermostated bath. Glassware was cleaned with chromosulphuric acid. Measurements were repeated until the surface tension remained constant.

Dynamic light scattering

The solutions of Caf12 ($1.5x10^{-3}$M) and Caf16 ($1x10^{-4}$M) were analyzed by Dynamic Light Scattering (DLS) on a Malvern Zeta Sizer 3000 HSA at a scattering angle of 90° at 25°C. The hydrodynamic mean diameter of vesicles was determined using the software provided by Malvern, and the Contin model was applied to obtain size data. All the auto-correlation function fits were checked and found to be in accordance with experimental data.

Transmission electron microscopy

Aliquots of solutions of Caf12 ($1.5x10^{-3}$M) and Caf16 ($1x10^{-4}$M) were applied to carbon-coated Formvar grids. Then there was negatively stained with a sodium phosphotungstate solution (1%, w/w, pH 7.0). Observations were performed on a JEOL JEM-1200EX electron microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV.

DPPH scavenging assay

The antioxidant activities of the novel antioxidant surfactants (Caf12 and Caf16) and the reference (ammonium caffeate) were measured in terms of hydrogen donating or radical

scavenging ability using the stable radical DPPH. The stock-solution of antioxidants (Caf12, Caf16 and CafAmm) of $8x10^{-4}$ M (in order to titrate by 10 μL aliquots) in methanol was added step by step to the 2mL of methanol solution of DPPH ($4.3x10^{-5}$ M). After each aliquot addition, the reaction mixture was shaken vigorously, incubated at 25ºC for 5 min and the absorbance of the reaction mixtures was measured at 515 nm using a Varian Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer. The absorbance values were then plotted against the antioxidant concentration and the IC_{50} values were calculated as the concentration required to scavenge 50% of the DPPH free radicals.

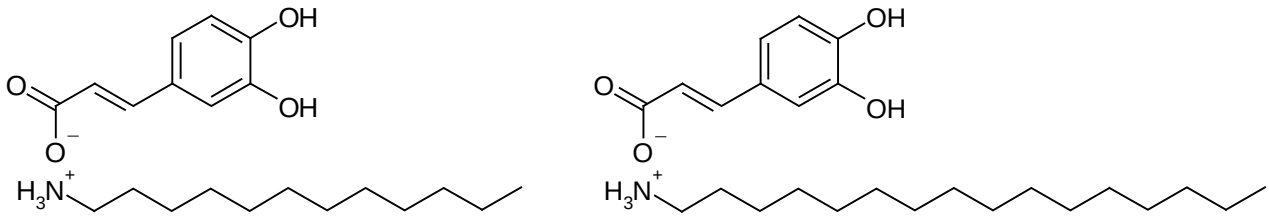
DNA cleavage by benzophenone photosensitization.

Samples were prepared by mixing 5 μL of $4.5x10^{-4}$ M phosphate diester units of DNA: [DNA-PO_4^-], 5 μL of increasing concentrations of CTAB alone or in the presence of 10% of Caf12 or Caf16 (starting from no surfactant), and 15 μL of $7.5x10^{-5}$ M benzophenone solution in 30 mM Tris/HCl buffer solution. The final concentration of DNA was $9x10^{-5}$ M PO_4^-, and the final benzophenone concentration was $4.5x10^{-5}$ M. The mixtures were placed in glass tubes (3 mm diameter), incubated for 20 min in the dark and irradiated for 1 min at 25°C, using a xenon lamp (Muller 450W) equipped with a long pass filter (λ > 320 nm). After irradiation, 5 μL of 20% weight solution of heparin sodium salt (a competitive anionic polyelectrolyte) in the same buffer was added to each tube to dissociate the DNA-surfactant complexes. The samples were then analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose horizontal slab gel in Tris borate buffer and the percentage of the circular form of DNA (form II) in the irradiated samples was calculated by photodensitometry. A coefficient of 1.66 was used to correct the lower efficiency of ethidium bromide binding to Form I DNA with respect to Form II.[24] All the damage experiments were carried out at least three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis

We associated caffeic acid in a 1:1 ratio with two fatty amines (dodecylamine and hexadecylamine) in ethanol solvent to form an insoluble ion pair product at the end of the reaction. This synthesis method led to good yields of pure products. As a result of this reaction, two single tailed surfactants with a caffeate as a counterion were synthesized: dodecylammonium caffeate and hexadecylammonium caffeate, noted respectively Caf12 and Caf16 (scheme 1).



Caf12 **Caf16**

Scheme 1. Dodecylammonium caffeate of (Caf12) and hexadecylammonium caféate (Caf16).

The ion-pair structure of both products was confirmed by ^{1}H NMR, IR and high-resolution electrospray mass spectrometry (HRMS). For both products, the ^{1}H NMR spectra showed the presence of the caffeate moiety in anionic form and the fatty amine moiety in cationic form. The results of the IR analysis confirmed the structure of the products. The ion-pair entities were also detected and confirmed by electrospray HRMS. Figure 1 illustrates the electrospray mass spectra obtained for Caf12 and Caf16. The peaks observed at m/z=366.3089 and 422.2736 correspond to the protonated molecular ion mass [M-H^{+}] of Caf12 and Caf16 respectively.

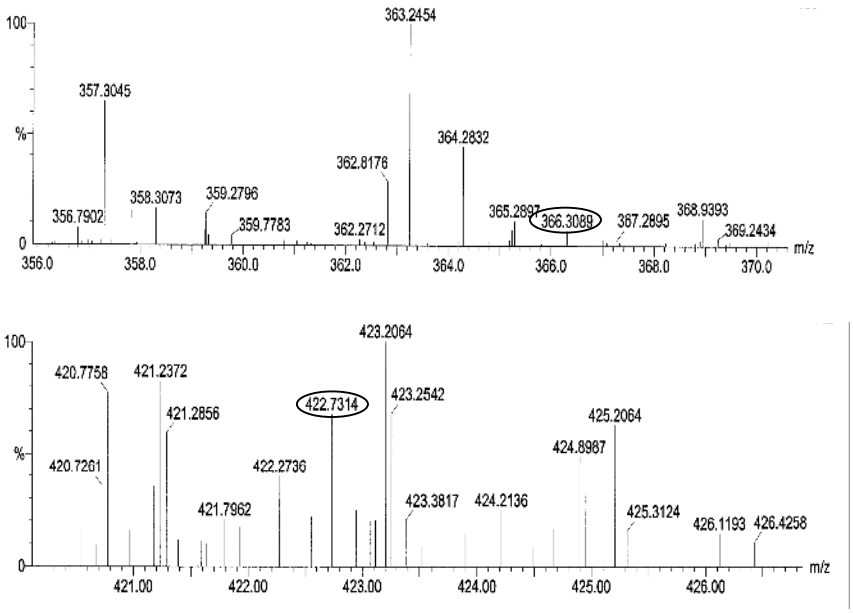


Figure 1. Electrospray mass spectra of Caf12 and Caf16

Self-assembly properties

Surface tension measurements

The surfactant properties of Caf12 and Caf16 were investigated in water at 25ºC and the evolution of the surface tension versus the concentration is shown in figure 2. The graphs indicate that the both compounds exhibit surface-active properties, shown by the lowering of the water surface tension. In the first part of the curve, Caf12 shows the classical adsorption behaviour at the air-water interface leading to a rapid decrease of the surface tension until a break occurs in the curve at $8x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$. After this point, the surface tension remains constant up to $7x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ and the second plateau seems to appear at $1.1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$, just before the limit of solubility.

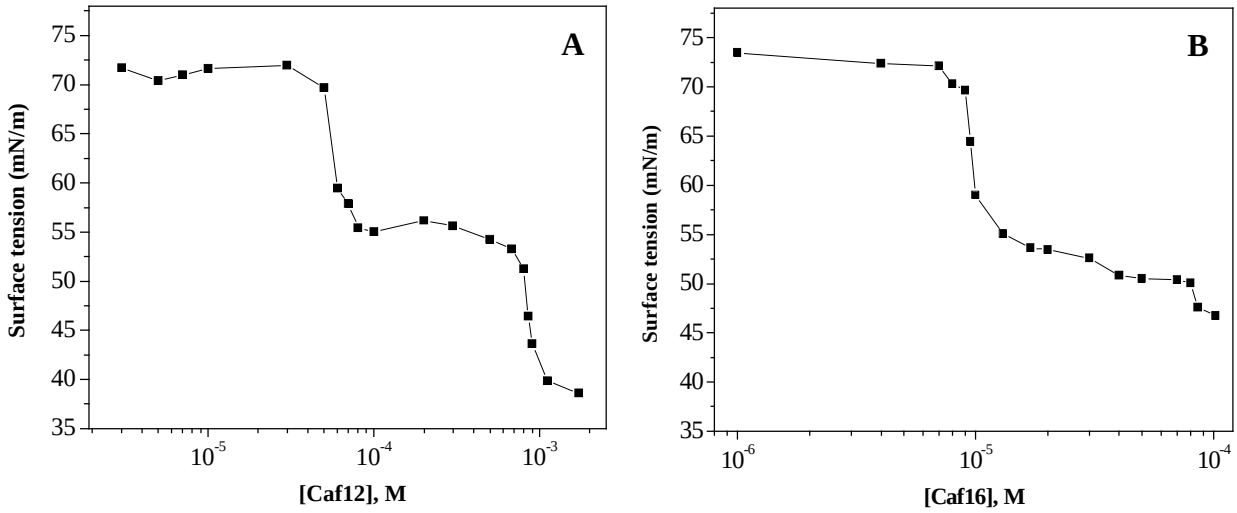


Figure 2. Surface tension curves of Caf12 (A) and Caf16 (B) in water at 25°C

In the case of Caf16 we also observe a rapid decrease of the surface tension followed by a marked change of slope after $1x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$, but not a real plateau as in the case of Caf12. At $8x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$, a second break seems to appear but, in this case, we are also at the limit of solubility. As we have recently observed for other ion-pair surfactants[25], the surface tension profile in the case of Caf12 could be interpreted as a phase transition between micelles and vesicles. The intermediate plateau could be attributed to the micelles and the beginning of the second plateau to the vesicles. In both cases, it was difficult to confirm the second plateau because the limit of solubility was reached. The CMC and the critical aggregation concentrations leading to possible vesicles (CAC) for the compounds studied are listed in the Table 1.

Association	CMC, mol/L	CAC, mol/L
Caf12	$8x10^{-5}$	$1.1x10^{-3}$
Caf16	$1x10^{-5}$	$8x10^{-5}$

Table 1. CMC and CAC values in water at 25°C.

Dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM)

To achieve a better understanding of the aggregation behaviour, we studied the water solutions of Caf12 and Caf16 by dynamic light scattering at different concentrations. For both surfactants, the measurements performed on the first plateau indicated no light scattering, in accordance with the presence of micelles, too small to be detected by the DLS technique used for these experiments. Furthermore, at concentrations of Caf12 and Caf16, corresponding to the beginning of the second plateau ($1.5x10^{-3}$M and $1x10^{-4}$M respectively), we detected large objects by DLS, with hydrodynamic diameters around 230nm in accordance with the formation of vesicles (Table 2). Moreover, the polydispersity indexes showed a broad distribution of objects, as is generally observed for spontaneous vesicles.[26]

Association	Concentration, mol/L	Mean hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index
Caf12	$1.5x10^{-3}$	217	0.32
Caf16	$1x10^{-4}$	250	0.46

Table 2. Mean hydrodynamic diameters and polydispersity for objects spontaneously formed in aqueous solutions of Caf12 and Caf16 at 25°C.

In order to confirm the formation of vesicles and to analyze their morphology, we observed the solutions of Caf12 and Caf16 in the same conditions by transmission electron microscopy (TEM). These observations (Figure 3) clearly indicate the formation of vesicles with diameters in the 60-250 nm range.

Both DLS and TEM results indicate the spontaneous formation of vesicles and confirm a micelle-vesicle transition for the ion-pair surfactants studied. To explain this transition, as we have already observed for other ion-pair surfactants [25], we have to consider the positioning of the caffeate ion according to the fatty alkylammonium chain. There is either a strong

association and a positioning of the caffeate counterion along the chain, leading to vesicles, or a less strong association leading to its external positioning and the formation of micelles. In both cases, the packing parameter [27] is affected and drives the aggregation to micelles or vesicles.

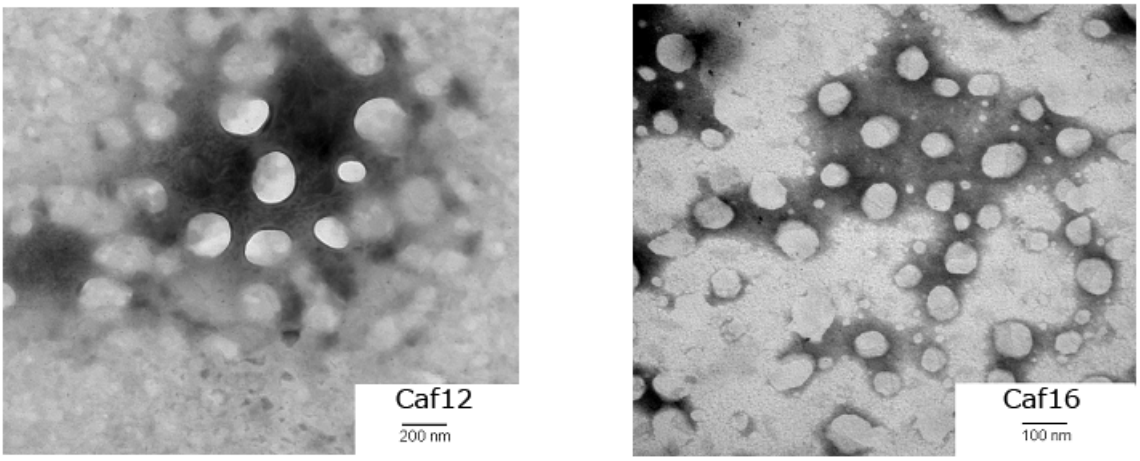
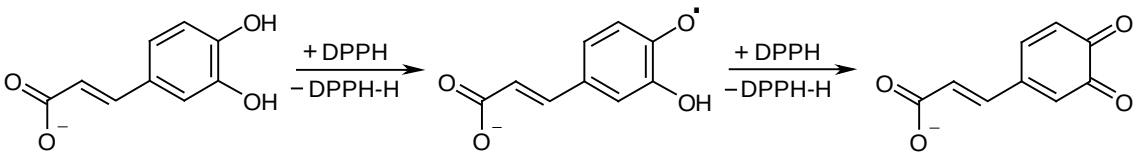


Figure 3. Negatively stained electron micrographs of Caf12 ($1.5x10^{-3}$) and Caf16 ($1x10^{-4}$) vesicles.

Evaluation of antioxidant and radical scavenging ability of the caffeate ion-pairs

After the synthesis and study of self-assembly of the caffeate ion-pair surfactants obtained, it was essential to confirm that their antioxidant properties were maintained. The antioxidant activities of Caf12 and Caf16 were measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability, using the stable radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH).[28] Antioxidants react with DPPH and convert it to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H). In our case, this process included two hydrogen atom transfer events leading to the formation of caffeoquinone (scheme 2).



Scheme 2. DPPH reaction with a caffeate anion.

During this process, the absorbance of the DPPH decreased, resulting in a colour change from purple to yellow. The degree of discoloration was directly related to the scavenging

ability of the antioxidant compounds. The DPPH methanolic solutions were titrated by the methanolic solutions of Caf12 and Caf16, and by measuring the absorption at 515 nm. The ammonium caffeate (CafAmm) was used as a reference to compare the antioxidant activities. The decrease of the absorption against the antioxidant concentration is presented in Figure 4.

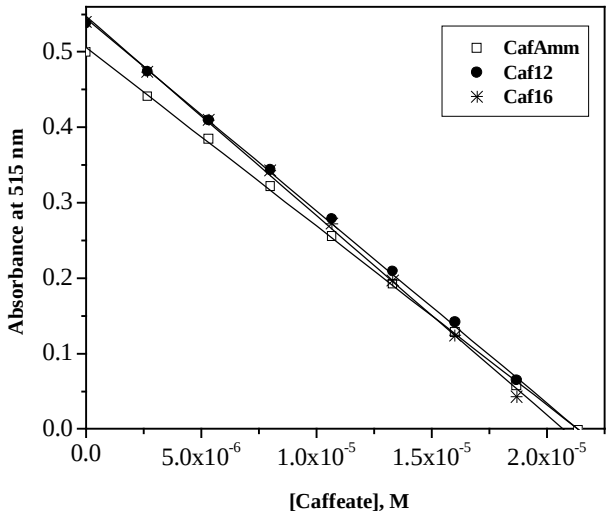


Figure 4. DPPH scavenging at 515 nm by Caf12, Caf16 and CafAmm in methanol at 25°C, [DPPH] = 4.3×10^{-5} M.

The results indicate the same DPPH scavenging activity for Caf12 and Caf16 and non-amphiphilic ammonium caffeate. The values of parameter IC_{50}, corresponding to the concentration required for a sample to scavenge 50% of the DPPH free radicals, were also calculated (Table 3) and confirmed the maintenance of the antioxidant properties of the caffeate moiety in Caf12 and Caf16.

Compound	**IC_{50}, µM**
CafAmm	10.8
Caf12	10.3
Caf16	9.9

Table 3. IC50 values of DPPH radical scavenging by CafAmm, Caf12 and Caf16 in methanol at 25°C, [DPPH] = 4.3×10^{-5} M.

Moreover, as indicated in scheme 2, even in the oxidized form (caffeoquinone), the carboxylate part is not affected, keeping the ion-pair structure and consequently the vesicles,

even after oxidation. Considering the amphiphilic and antioxidant properties of these caffeate ion-pair surfactants, we applied these products to protect a complexed DNA molecule

Application to DNA protection complexed by CTAB

DNA is one of the most important biological molecules. In a living cell, the information is stored as a base sequence along the DNA chain, and different kinds of damage of DNA may lead to blockage of transcription, mutations, cell death and cancer. Recently, we highlighted the drastically increased sensitivity of a DNA complexed by cationic surfactants to photo-oxidative damage.[29] This observation was of crucial importance for the biological use of surfactants as non-viral gene delivery systems. In the cited work, we demonstrated that the complexation of DNA with cationic surfactants noticeably increased the yield of its photoinduced scission because of the localization of the benzophenone (hydrophobic photosensitizer) inside the hydrophobic domains formed by the aggregated surfactant on DNA. Benzophenone is a widely used photosensitizer, able to induce DNA photo-oxidative damage via hydroxyl radicals, singlet oxygen or one-electron process,[23,30] and this is a reason why the incorporation of benzophenone in the DNA-cationic surfactant complexes leads to a considerable increase in DNA strand scission. As this process corresponds to an oxidation in hydrophobic domains, we tested the protection of DNA complexed with a cationic surfactant like cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) mixed with our antioxidant ion-pair surfactants Caf12 and Caf16. To detect oxidative damage photosensitized by benzophenone, the experiments were carried out on pBR 322 plasmidic DNA. Conversion of the supercoiled form (form I) into circular form (form II) indicates single-strand scission, which can be observed by agarose gel electrophoresis and quantified by photodensitometry. We compared the influence of increasing amounts of CTAB alone and in the presence of 10% weight of Caf12 (CTAB/Caf12-10%) and Caf16 (CTAB/Caf16-10%) on DNA cleavage photosensitized by benzophenone. This percentage was high enough to show an antioxidant effect but not sufficient to modify the interactions between DNA and CTAB. This was confirmed by two methods, fluorescent titration and agarose gel electrophoresis (data not shown). So, we evaluated the ability of Caf12 and Caf16 to protect DNA complexed with CTAB. At a fixed and easily detectable concentration of DNA, it was irradiated in presence of benzophenone and increasing amounts of surfactant mixtures. After UV irradiation, DNA-surfactant complexes were decomplexed by a solution of heparin sodium salt, analyzed by gel agarose electrophoresis and quantified by photodensitometry[31]. Figures 5A,B show the cleavage

percentage based on the amount of relaxed circular DNA (form II) against the CTAB concentration in absence and in presence of Caf12 and Caf16.

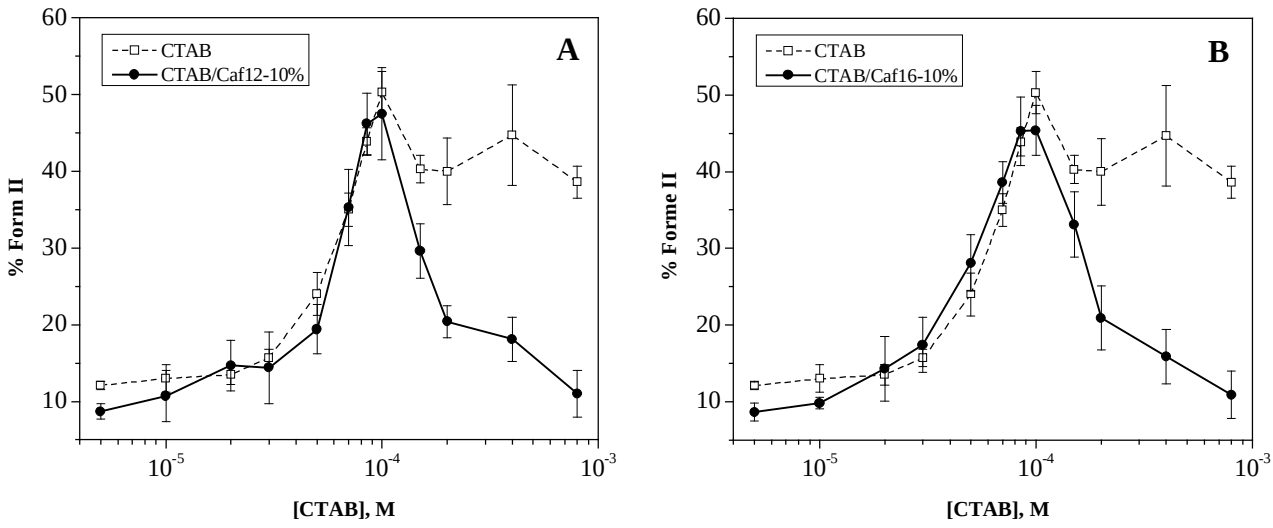


Figure 5. Influence of CTAB on the photooxidative DNA cleavage by benzophenone photosensitization in presence of 10% of Caf12 (A) and Caf16 (B); [DNA-PO_4^-] = 9x10^{-5}M; [benzophenone] = 4.5x10^{-5}M, 30mM Tris/HCl buffer, T = 25ºC

The results show that, before the neutralization of DNA, the caffeate antioxidants do not influence the damage to DNA. But, after the neutralization in the presence of Caf12 and Caf16, an abrupt decrease of DNA scission is observed. The fact that this decrease is not linear indicates that this effect is not simply related to a competition in UV absorption between the photosensitizer and the caffeate anion. Before the neutralization, the caffeate ion-pairs are in competition with the CTAB for the electrostatic binding with the anionic phosphates of DNA. This binding dissociates the caffeate anion from the long chain ammonium, and expels the antioxidant caffeate into the bulk far away from the DNA. After neutralization of all the phosphates, there is no dissociation of the ion-pair surfactant, and it could be co-aggregated by hydrophobic interactions with the CTAB complexed on the DNA, leaving the antioxidant on the double helix for optimal protection. At the end of this experiment, we can conclude that the decrease in damage is due to the antioxidant protection of DNA by the caffeate ion-pair surfactants.

CONCLUSION

This work presents a new family of antioxidant surfactants based on caffeic acid. The ion-pair surfactants were easily obtained by an acid-base reaction between the caffeic acid and dodecylamine or hexadecylamine in ethanol. The ion-pair association was confirmed by NMR, IR and high-resolution electrospray mass spectrometry. The two caffeate ion-pair molecules, Caf12 and Caf16 exhibited surface active properties, and presented a phase transition from micelles to vesicles related to the positioning of the caffeate anion with respect to the long chain. Interestingly, these surfactants led to the spontaneous formation of stable vesicles in water, with diameters around 230 nm. Moreover, a radical scavenging test with DPPH revealed that both caffeate ion-pair surfactants maintained their antioxidant properties. Finally, we have presented an original application of these new antioxidant surfactants to protect DNA complexed by surfactants. The results indicate a marked protection of DNA complexed by CTAB against the oxidative photodamage initiated by the benzophenone, resulting from the co-aggregation of Caf12 or Caf16 with the CTAB on DNA.

Acknowledgments

This research was supported by the Marie Curie-EST Programme on Biomimetic Systems (CT 2004 504465). We gratefully thank Nacer Benmeradi (IBCG, UPS, Toulouse, France) for the TEM images.

REFERENCES

[1] Halliwell, B. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, 49: 1341-1348.

[2] Cadenas, E., and Packer, L. (2002) In Handbook of Antioxidants; edited by Marcel Dekker, Inc. New York.

[3] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., and Aruoma, O. (1995) *Food Chem. Toxicol.*, 33: 601–617.

[4] Prior, R.L., and Cao, G. (1999) *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 1173-1178.

[5] a) Palma, S., Hilario Manzo, R., Allemandi, D., Fratoni, L., and Lo Nostro, P. (2003) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 212: 163-173.

b) Lo Nostro, P., Ramsch, R., Fratini, E., Lagi, M., Ridi, F., Carretti, E., Ambrosi, M., Ninham, B.W., and Baglioni, P. (2007), *J. Phys. Chem. B*, 111: 11714-11721.

[6] Ruben, C., and Larsson, K. (1985) *Journal dispersion science and technology*, 6: 213-221.

[7] Mounanga, T.K., Gérardin, P., Poaty, B., Perrin, D., and Gérardin, C. (2008) *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects,* 318: 134–140.

[8] Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B.R., Apte, S.S., Renuka, D., and Rambhaua, D. (2004) *Int. J. of Pharmaceutics,* 271: 95–113.

[9] Hermann, K. (1996) *J. Food Technol.,* 11: 433–438.

[10] Chung, T., Moon, S., Chang, Y., Ko, J., Lee, Y., Cho, G., Kim, S., and Kim, C. (2004) *FASEB J.,* 18: 1670–1681.

[11] Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., and Mori, H. (1993) *Carcinogenesis,* 14: 1321–1325.

[12] Michulart, P., Masferrer, J.L., Carothers, A.M., Subbramaiah, K., Zweifel, B.S., Koboldt, C., Mestre, J.R., Grunberger, D., Sacks, P.G., and Tanabe, T. (1999) *Cancer Res.,* 59: 2347–2352.

[13] Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., and Shibata, H. (1997) *Biochim. Biophys. Acta,* 1335: 335–342.

[14] Saija, A., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Trombetta, D., Proteggente, A., De Pasquale, A., Uccella, N., and Bonina, F. (1999) *J. Sci. Food Agric.,* 79: 476-480.

[15] a) Rico-Lattes I., and Lattes A. (1997) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 123-124: 37-48.

b) Rico-Lattes I., Blanzat M., Franceschi-Messant S., Perez E., and Lattes A. (2005) *C.R. Acad. Sci.,* 5: 807-814.

[16] Consola, S., Blanzat, M., Perez, E., Garrigues, J.C., Bordat, P., and Rico-Lattes, I. (2007) *Chem. Eur.,* 13: 3039-3047.

[17] Backlund, S., Friman, R., and Karlsson S. (1997) *Colloids Surf. A,* 123–124: 125-133.

[18] Menger, F.M., Binder, W.H., and Keiper J.S. (1997) *Langmuir,* 13: 3247-3250.

[19] Karlsson, S., Friman, R., Lindstroem, B., and Backlund, S. (2001) *J. Colloid Interface Sci.,* 243: 241-247.

[20] Hirano, K., and Fukuda H. (1991) *Langmuir,* 7 : 1045-1047.

[21] Kline, S. R. (1999) *Langmuir,* 15: 2726-2732.

[22] Bordes, R., Rbii, K., Gonzalez-Pérez, A., Franceschi-Messant, S., Perez, E., and Rico-Lattes, I. (2007) *Langmuir,* 23 : 7526-7532.

[23] Charlier, M., and Helene, C. (1972) *Photochem. Photobiol.,* 15: 71-87

[24] Ciulla, T.A., Van Camp, J.R., Rosenfeld, E., and Kochevar, I. (1986) *Photochem Photobiol,* 49 : 293-298

[25] Bordes, R., Vedrenne, M., Coppel, Y., Franceschi-Messant, S., Perez, E., and Rico-Lattes, I. (2007) *ChemPhysChem,* 8: 2013-2018.

[26] a) Blanzat, M., Perez, E., Rico-Lattes, I., Prome, D., Prome, J.C., and Lattes, A. (1999) *Langmuir,* 15: 6163-6169.

b) Soussan E., Mille C., Blanzat M, Bordat P., and Rico-lattes I. (2008) *Langmuir,* 24: 2326-2330

[27] Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., and Ninham, B.W. (1976) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2,* 72: 1525-1568.

[28] a) Blois, M.S. (1958) *Nature,* 181: 1199-1200.

b) Molyneux, P., and Songklanakarin J. (2004) *Sci. Technol.,* 26(2): 211-219.

[29] Rudiuk, S., Franceschi-Messant, S., Chouini-Lalanne, N., Perez, E., and Rico-Lattes, I. (2008) *Langmuir,* 24: 8452-8457.

[30] a) Chouini-Lalanne, N., Defais, M., and Paillous, N. (1998) *Biochem Pharmacol,* 55: 441- 446

b) Lhiaubet, V., Paillous, N., and Chouini-Lalanne, N. (2001) *Photochem Photobiol,* 74: 670-678

[31] Asgatay, S., Franceschi-Messant, S., Perez, E., Vicendo, P., Rico-Lattes, I., Phez, E., and Rols, M. P. (2004) *Int. J. Pharm.,* 285: 121- 133

Sergii RUDIUK

Complexation of DNA with cationic surfactants : physico-chemical and photobiological study

Abstract

DNA is an anionic macromolecule which stores the heredity information. It is well known that the formation of different damages of DNA may lead to blockage of transcription, mutations, cell death and cancer. The aim of this thesis was to determine the influence of DNA complexation with various cationic agents (surfactants, lipids, polymers) on its photooxidative damage. This study needed a double investigation: firstly, the physico-chemical study of DNA-surfactant complexation, then, the photobiological study of the influence of this complexation on the formation of photodamages. The study of DNA-surfactant complexation showed the existence of two mechanisms: a hydrophobic mechanism at low DNA concentrations, and an electrostatic one at higher concentrations. The study of the formation of DNA damages photoinduced by benzophenone photosensitization showed for the first time that DNA is very sensitive to the changes of its environment around the molecule during the complexation. The complexation of DNA with amphiphilic cationic agents leads to an increase of damages due to the incorporation of a hydrophobic photosensitizer, like benzophenone, into the complexes. Whereas, the complexation of DNA with hydrophilic cationic agents, having amino groups, can lead to a protection of nucleic acid. Also, to protect DNA complexed with cationic amphiphilic agents we have synthesized two novel ion-paired antioxidant surfactants by acid-base reaction between caffeic acid and a fatty amine (C12 or C16). It was shown that these surfactants are able to protect it only if the charges of DNA are neutralized.

Keywords: DNA, surfactant, photodamage, photosensibilisation, benzophenone, caffeic acid.

Auteur : Sergii RUDIUK

Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques : études physico-chimiques et photobiologiques

Directeur de thèse : Isabelle RICO-LATTES
Lieu et date de soutenance : Université Paul Sabatier, Toulouse le 26 janvier 2009

Résumé

L'ADN, molécule polyanionique, est le support de l'hérédité. Tout dommage au niveau de l'ADN peut être à l'origine de mutations pouvant entraîner des processus de carcinogénèse. L'objectif de ces travaux de thèse a tout d'abord été de déterminer les facteurs influençant la formation de dommages photoinduits sur l'ADN complexé par des agents cationiques (tensioactifs, lipides ou polymères). Cette étude a nécessité une double investigation: l'étude physicochimique de la complexation ADN-agents cationiques et l'étude photobiologique de l'influence de cette complexation sur la formation de photodommages. L'étude de la complexation ADN-tensioactifs a révélé l'existence de deux mécanismes: un mécanisme hydrophobe aux faibles concentrations en ADN et un mécanisme électrostatique aux concentrations plus élevées. L'étude de la formation de dommages photoinduites par la benzophénone a mis en évidence l'importance de l'environnement généré par la complexation dans ces processus. Dans le cas d'un agent cationique amphiphile, la complexation conduit à une augmentation du taux de photodommages du fait de l'incorporation du photosensibilisateur dans les zones hydrophobes des complexes. En revanche, dans le cas d'un composé hydrophile possédant des fonctions amines, elle peut être à l'origine d'une diminution du taux de photocoupures. Parallèlement, afin de protéger l'ADN dans ce type de situation, de nouveaux tensioactifs paire d'ions antioxydants ont été synthétisés par réaction acide-base entre l'acide caféique et une amine grasse (C12 ou C16). Il a ainsi été montré que ces composés étaient capables de protéger l'ADN complexé lors de sa neutralisation par un agent cationique.

Mots clés: ADN, tensioactif, photodommages, photosensibilisation, benzophénone, acide caféique.
Discipline : Chimie macromoléculaire et supramoléculaire

Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique,
Université Paul Sabatier – Bât. 2R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04