

ETUDE DE L'ADSORPTION ET DE L'ASSOCIATION DE DIFFERENTS DERIVES METHYLES DE LA GUANOSINE PAR A.C. POLAROGRAPHIE

JEAN-MARIE SEQUARIS et JEAN-ANTOINE REYNAUD

*Centre de Biophysique Moléculaire,
45 045 Orleans Cedex, France*

Manuscrit reçu le 17. février 1978

Guanosine and its different methylated compounds react differently at the mercury/solution interface. A study of these phenomena was made by a.c. polarography with sensitive phase detection. Adsorption and association depend on pH, position, and number of methylated groups. In an alkaline medium, negative ionization of purine ring of 7 Me Guo and Guo inhibits the association phenomenon. The same reaction occurs in an acidic medium when the N₁ and N₇ atoms are either protonated or methylated (Guo and 1—7 Guo). On the other hand, this phenomenon is not inhibited when one of these functions is protonated and the other methylated. The association seems then to be related to the asymmetry of the N₁ and N₇ substituents.

Parmi les nombreux facteurs qui interviennent dans le maintien de la structure tridimensionnelle des acides nucléiques, le champ électrique développé à l'intérieur de ceux-ci, joue un rôle non négligeable. Ainsi, dans le cas des acides nucléiques, chaque composant (sucres, phosphates, bases) est soumis à l'action de forces électriques dont la mesure directe est malheureusement très difficile. Cependant, il est possible de simuler certains de ces effets en utilisant des modèles électrochimiques, comme par exemple l'interface constituée par une électrode chargée, dont on pourra contrôler à volonté le potentiel, au contact de composants nucléiques en solution (bases, nucléosides, nucléotides).

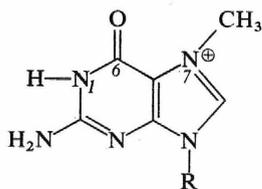
En utilisant ce type de modèle, à partir de techniques tensométriques^{1,2}, différents auteurs³⁻⁸ principalement Vetterl, ont pu montrer, pour certaines valeurs du potentiel de l'électrode, que les constituants nucléiques pouvaient adopter en s'adsorbant à l'interface, une conformation comparable à celle rencontrée dans un brin d'acide nucléique ou de polynucléotide: association horizontale des bases perpendiculairement à la surface de l'électrode; dans ce dernier cas, à partir de travaux théoriques de Frumkin⁹ et Lorenz¹⁰, Vetterl a même pu calculer les différents coefficients d'interactions existant entre les bases.

Dans le travail que nous présentons ici, qui s'insère dans une étude plus générale sur les propriétés électrochimiques des bases méthylées et des acides nucléiques méthylés^{11,12}, nous étudions l'influence exercée par la méthylation de la guanosine sur les phénomènes d'association et de stacking à l'électrode à goutte de mercure.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

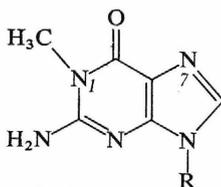
Réactifs biochimiques et chimiques

La 7-méthylguanosine(I), la 1-méthylguanosine(II), ainsi que la guanosine proviennent des établissements SIGMA. La 1-7-diméthylguanosine(III) a été préparée d'après Leng et collaborateurs¹³ par méthylation de la k-méthylguanosine, par le diméthylsulfate.

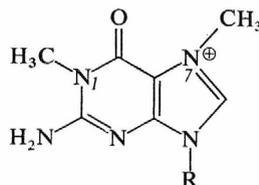


I

R = ribose



II



III

Nous avons utilisé pour la préparation des solutions des réactifs chimiques MERCK et de l'eau bidistillée. Avant chaque mesure, les solutions étaient saturées en argon, afin d'éliminer l'oxygène en solution.

Polarographie en courant alternatif

Les enregistrements ont été réalisés avec un appareil SOLEA PRG III à détection de phase. Les caractéristiques électriques étaient les suivantes: $F = 78 \text{ Hz}$, $\Delta E = 20 \text{ mV}$. Les polarogrammes sont enregistrés avec un angle de déphasage de 90° par rapport à la tension surimposée¹. Le temps de goutte utilisé était de 3 s.

Les caractéristiques du capillaire utilisé (solution molaire de NaCl, circuit ouvert, la hauteur de la colonne de Hg étant de 50 cm) étaient les suivants: $m = 1,2 \text{ mg s}^{-1}$, temps de goutte = 9,7 s.

Les mesures étaient faites à la température constante de $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, la thermostation de la cellule polarographique étant assurée par un Ultra thermostat LAUDA. Les potentiels d'électrodes étaient mesurés par rapport à une électrode de référence au calomel (saturée en KCl) et les mesures de pH étaient effectuées avec un pH mètre Radiometer pH M4.

RESULTATS

7-METHYLGUANOSINE

Dans le cas de la 7-MeGuo, trois domaines distincts peuvent être mis en évidence suivant la valeur du pH du milieu.

En milieu basique à pH 8,5 (courbe e, figure 1 et courbe h, figure 3). La 7-MeGuo est totalement sous forme basique, l'oxygène sur le C₆ porte une charge négative. La molécule possède un moment dipolaire dirigé des atomes N₁ et C₆ vers la charge positive localisée sur le cycle imidazole. Les polarogrammes, ne présentant pas de variation brutale en fonction du potentiel, indiquent que sur la totalité de la zone

d'adsorption il n'y a pas de phénomène visible d'association ou de réorientation. L'absence de pic dans la région du maximum électrocapillaire ($\approx -0,5$ V) peut laisser supposer une adsorption à plat de la molécule fortement polarisée à la surface de l'électrode.

FIG. 1

Courbes tensioampérométriques de la 7-MeGuo en solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris 10^{-2} M.
pH: a 3; b 6; c 7; d 8; e 9.

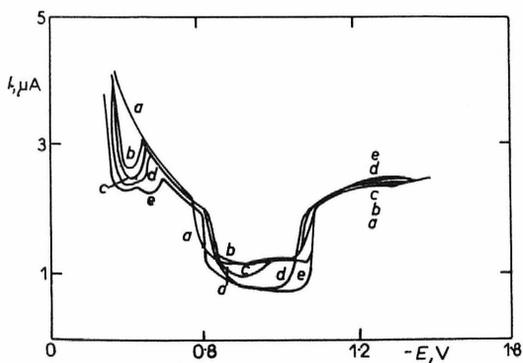
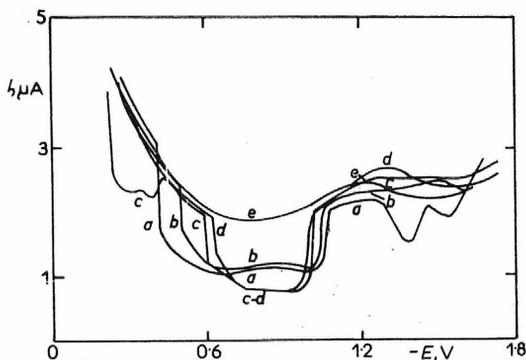
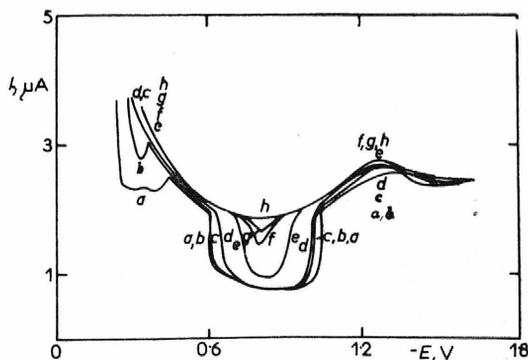


FIG. 2

Courbes tensioampérométriques de la 7-MeGuo en solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris 10^{-2} M.
pH: a 6; b 6,52; c 6,58; d 6,79; e 7,07.

FIG. 3

Courbes tensioampérométriques de la 7-MeGuo en solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris 10^{-2} M.
pH: a 7,18; b 7,60; c 7,71; d 8; e 8,50; f 8,55; g 8,60; h 8,70.



En milieu acide, entre pH 3 et pH 6 (courbes *a* et *b*, figure 1 et courbe *a*, figure 2). La 7-MeGuo est sous forme acide, elle est chargée positivement sur le cycle imidazole: Les polarogrammes présentent un effondrement important du courant capacitif centré sensiblement vers $-0,750$ V. Cette zone d'association débute dans la région du potentiel du maximum électrocapillaire, elle est d'autant plus étendue que la concentration en forme acide de la 7-MeGuo augmente, c'est-à-dire lorsque le pH décroît. Lorsque l'électrode est chargée positivement, c'est-à-dire entre 0 et $-0,400$ V, les courbes obtenues en milieux basique et très acide sont presque confondues. Les deux phénomènes sont comparables, et l'on peut admettre que l'adsorption se fait à plat. Au niveau du maximum électrocapillaire, les molécules subissent une réorientation (variation ducourant I_c). Ainsi sur l'électrode chargée positivement, l'adsorption des molécules à plat est remplacée par une adsorption verticale dès que l'électrode change de signe. Il est très vraisemblable que sous l'effet du champ électrique, c'est la partie imidazole du cycle purique qui est en contact avec la surface chargée, le cyclo pyrimidique étant du côté de la solution.

En milieu neutre entre pH 6 et pH 8 (courbes *c* figures 1, 2 et 3). Les formes acide et basique de la 7-MeGuo sont dans un rapport variable suivant le pH. Au $pK = 7,1$, nous sommes en présence d'une solution équimolaire des deux formes. L'association au pK est maximale aussi bien du côté de l'électrode chargée positivement ($-0,300$ V) que de l'électrode chargée négativement ($-0,750$ V). Entre $-0,200$ V et $-0,400$ V, l'adsorption est suivie d'association. Le mode d'association sur l'électrode chargée négativement est différent de celui en milieu acide (fig. 1, courbes *a* et *c*), comme le montre la comparaison de la profondeur et de l'étendue des domaines d'association. Au potentiel du maximum électrocapillaire, les molécules sont le siège d'une réorientation entre les deux modes d'association et sont très probablement adsorbées à plat. Dans chacune des deux zones où il y a association, il est très vraisemblable que les molécules sont adsorbées verticalement, et que forme basique ne peut s'adsorber verticalement qu'en présence de la forme acide de la 7-MeGuo, comme le montrent l'adsorption et l'association maximale des deux formes au pK . Cette étude qualitative de l'association de la 7-MeGuo en présence d'une surface chargée nous permet donc de mettre en évidence trois modes d'association possibles en milieux acide et neutre. La forme basique ne s'autoassocie pas alors que la forme acide de la 7-MeGuo est indispensable aux trois types d'association.

1-METHYLGUANOSINE

Dans le cas de la 1-MeGuo (figures 4 et 5), l'azote N_1 est bloqué par un groupe méthyle et seul l'azote N_7 est protonable en milieu très acide ($pK \approx 2,4$). Les différentes formes acide et basique s'associent suivant quatre modes, selon la valeur du pH.

En milieu très acide. Aux pH inférieurs au pK , les formes acides protonées en N_7 s'associent sur l'électrode chargée négativement. Comme dans le cas de la 7-MeGuo, en milieu acide, la forme acide de la 1-MeGuo chargée positivement s'adsorberait perpendiculairement à l'électrode chargée négativement, dans un domaine de potentiel allant de $-0,46$ V à $-1,35$ V, le cycle imidazole protoné au contact du mercure. A des potentiels plus positifs que $-0,46$ V, les molécules s'adsorberaient à plat (courbe *a*, fig. 4).

Au voisinage du pK = 2,4. Tout comme dans le cas de la 7-MeGuo, il y a deux modes d'association, l'un sur l'électrode chargée négativement ($-0,500$ V à $-1,050$ V) et l'autre sur l'électrode chargée positivement ($-0,180$ V à $-0,400$ V). Ces deux domaines sont séparés par un maximum dû à la réorientation des formes acides chargées. Dans les deux domaines, les molécules seraient adsorbées perpendiculairement à l'électrode (courbe *b*, fig. 4).

Au-dessus du pK . A pH 5, la 1-MeGuo n'est plus protonée. La forme basique non ionisée s'autoassocie dans la région du potentiel du maximum électrocapillaire (la charge de l'électrode est nulle). Cette autoassociation à partir de pH 5 ne varie plus sur toute l'échelle des pH neutres et basiques ($-0,360$ V à $-0,615$ V).

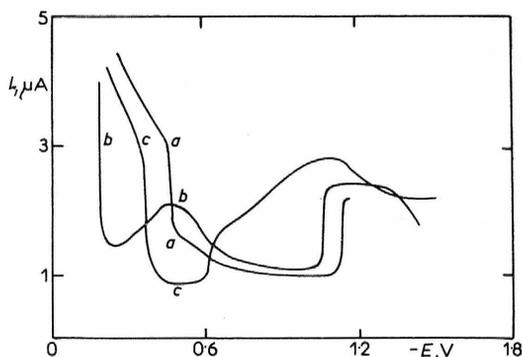


FIG. 4

Courbes tensioampérométriques de la 1-MeGuo en solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris 10^{-2} M
pH: *a* 0,55; *b* 2,50; *c* 5 et au-dessus.

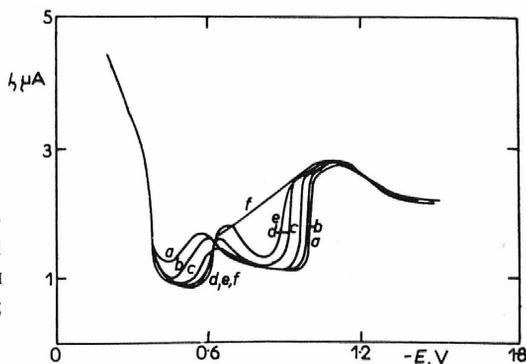


FIG. 5

Courbes tensioampérométriques de la 1-MeGuo en solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris 10^{-2} M
pH: *a* 4; *b* 4,15; *c* 4,30; *d* 4,48; *e* 4,59; *f* 4,80.

1-7-DIMÉTHYLGUANOSINE

La 1-7-diméthylguanosine s'adsorbe, mais ne s'associe pas, quelle que soit la valeur du pH (fig. 6). L'adsorption est indépendante du pH. Ce phénomène est à rapprocher de l'absence de pK de la molécule, car les différentes fonctions acido-basiques essentielles de la guanosine sont bloquées par des groupes méthyles. Le cycle imidazole est néanmoins chargé positivement par suite de la méthylation de l'azote en N₇, et l'adsorption à plat sur l'électrode chargée négativement est ainsi facilitée.

GUANOSINE

La présence de deux fonctions acides de pK 1,90 et 9,25 respectivement en N₁ et N₇ rend l'étude de la guanosine plus complexe. En milieu très basique, à un pH supérieur à 10, l'adsorption de la guanosine diminue et il n'y a plus aucune association. L'ionisation négative de N₁ ou de l'oxygène sur C₆ provoque une répulsion de la molécule au niveau de l'électrode chargée négativement. De même, en milieu très acide, c'est-à-dire à un pH inférieur à 1,90, aucune association n'est mise en évidence. Dans le cas de la guanosine, il semblerait donc que seule la forme non ionisée s'autoassocie à l'interface d'une électrode chargée (fig. 6).

CONCLUSIONS

La guanosine et ses différents dérivés méthylés se comportent différemment à l'interface électrode de mercure chargée/solution (fig. 6). L'adsorption et l'association dépendent du pH, de la position et du nombre de groupes méthyles fixés. En milieu basique, on note que l'ionisation négative du cycle purique de la 7-MeGuo et de la Guo interdit tout phénomène d'autoassociation. Il en est de même en milieu acide, lorsque les fonctions N₁ et N₇ sont protonées ou méthylées (Guo et 1-7 Me₂Guo). Par contre, la méthylation d'une fonction et la protonation de l'autre n'interdisent pas

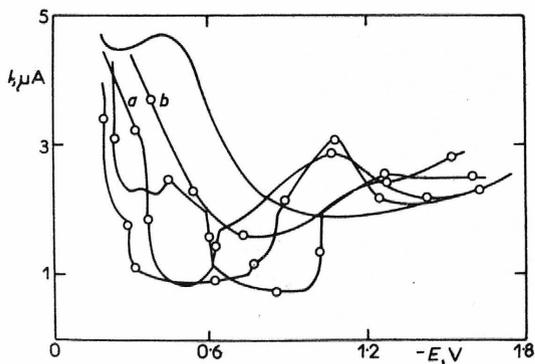


FIG. 6

Courbes tensioampérométriques des dérivés méthylés de la Guo en solution à $5 \cdot 10^{-4} M$ dans NaCl 1M, tampons acétate, phosphate, Tris $10^{-2} M$ à pH 7.

(c) 7-MeGuo, (a) 1-MeGuo, (b) 1-7-Me₂Guo, (d) Guo, (—) sel de fond.

ces phénomènes d'association à l'électrode (1-MeGuo et 7-MeGuo). L'autoassociation semblerait donc liée à l'asymétrie des substituants sur les fonctions N₁ et N₇.

Au cours de cette étude, les effets dus aux sucres ont été négligés bien que leur intervention dans les processus d'adsorption soit certaine⁴. On doit aussi noter que l'influence du pH sur les positions *syn* et *anti* du sucre par rapport à la base n'intervient pas dans la conformation de la 7-MeGuo et de la 1-7-MeGuo, dont la position reste fixée par la méthylation du N₇ de la guanosine^{14,15}.

L'orientation verticale des bases nucléiques à la surface de l'électrode chargée dans le cas des phénomènes d'association, et déjà proposée par Vetterl^{5,6} permet une interaction verticale du type „stacking“ entre les différents résidus puriques comme le montrent d'autres techniques en solution aqueuse¹⁶. Dans le cas d'une interface chargée, on peut aussi considérer que la faible constante diélectrique de la surface ainsi que la déshydratation de la double couche (adsorption des molécules organiques)¹⁷ facilitent plus les interactions des molécules polarisées qu'en solution aqueuse¹⁰.

BIBLIOGRAPHIE

1. Breyer B., Bauer H. H.: *Alternative Current and Tensammetry*. Interscience, New-York 1963.
2. Jehring H.: *Elektrosorptionsanalyse mit der Wechselstrompolarographie*. Akademie-Verlag, Berlin 1974.
3. Vetterl V.: *Ce Journal* 31, 2105 (1966).
4. Vetterl V.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 19, 169 (1968).
5. Retter V., Jehring H., Vetterl V.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 57, 391 (1974).
6. Vetterl V.: *Bioelectrochem., Bioenerg.* 3, 338 (1976).
7. Krznaric D., Valenta P., Nürnberg H. W.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 65, 863 (1975).
8. Valenta P., Nürnberg H. W., Krznaric D.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 3, 418 (1976).
9. Frumkin A., Damaskin B. B. en livre: *Modern Aspect of Electrochemistry* (J. O'M. Bockris, B. E. Conway, Eds), III. Vol., p. 149. Butterworths, London 1974.
10. Lorenz W.: *Z. Elektrochem.* 62, 192 (1958).
11. Sequaris J. M., Reynaud J. A.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 63, 277 (1975).
12. Sequaris J. M., Reynaud J. A., Malfroy B.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 77, 67 (1977).
13. Leng M., Pochon F., Michelson A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 169, 339 (1968).
14. Watanabe Y., Inoue Y., FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) *Lett.* 35, 344 (1973).
15. Shefter E., Singh S., Sackman P.: *J. C. S. Chem. Commun.* 261 (1974).
16. P. O. P. Ts' O en livre: *Biological Macromolecules* (D. Fasman, S. N. Timasheff, Eds), Vol. 4, p. 49. Marcel Dekker, New-York 1970.
17. Bockris O'M., Devanathan M. A. V., Müller K.: *Proc. Roy. Soc. Ser. A* 274, 55 (1963).