HAL
open science

INFLUENCE DE LA PRESSION SUR LA DYNAMIQUE DU LYSOZYME

Véronique Hamon

To cite this version:

Véronique Hamon. INFLUENCE DE LA PRESSION SUR LA DYNAMIQUE DU LYSOZYME. domain_other. Université d'Orléans, 2004. Français. NNT : . tel-00009316v2

HAL Id: tel-00009316

https://theses.hal.science/tel-00009316v2

Submitted on 9 Aug 2005

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.

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Biologie et Biophysique Moléculaires et Cellulaires

par

Véronique HAMON

Influence de la pression sur la dynamique du lysozyme en solution, par simulation numérique et diffusion de neutrons.

Soutenue le 12 novembre 2004 devant le jury constitué par :

M. G. KNELLER	Professeur à l'université d'Orléans	directeur de thèse
M. M. BÉE	Professeur à l'université Joseph Fourier	rapporteur
M. G. BÜLDT	Professeur au Forschungszentrum, Jülich	rapporteur
Mme M.-C. BELLISSENT-FUNEL	Directeur de recherche, LLB, CEA-Saclay	examinateur
Mme M.-L. SABOUNGI	Professeur à l'université d'Orléans	examinateur
Mme F. VOVELLE	Professeur à l' université d'Orléans	examinateur

Ce travail de thèse a été effectué au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans sous la direction du professeur Gerald KNELLER à qui s'adressent mes premiers remerciements pour m'avoir accueillie dans son équipe.

Je tiens ensuite à remercier son collaborateur Konrad HINSEN pour tout ce qu'il m'a appris et son aide précieuse dans mon travail avec (contre...) les machines !

J'exprime ma gratitude envers les membres de mon jury, Marc BÉE et Georg BÜLDT qui ont accepté d'être rapporteurs de mon mémoire, Françoise VOVELLE qui en était la présidente, Marie-Claire BELLISSENT-FUNEL et Marie-Louise SABOUNGI.

Je suis particulièrement reconnaissante envers Marie-Claire BELLISSENT-FUNEL de m'avoir donné accès aux équipements de son laboratoire au LLB, et pour son appui et ses conseils lors des expériences de diffusion de neutrons.

Mes remerciements s'adressent également à Jean-Marc ZANOTTI qui m'a patiemment guidée dans mes premiers contacts avec un spectromètre de diffusion de neutrons (Mibemol), à José TEIXEIRA pour les mesures aux petits angles, et je pense aux membres du LLB qui m'ont aidée ou que j'ai simplement côtoyés lors de mes différents séjours.

Mes remerciements s'adressent également à Marc BÉE avec qui nous avons pu effectuer des mesures sur IN13, à Marie PLAZANET pour son patient appui et sa disponibilité pendant et après les expériences sur IN5, et enfin Isabelle GRILLO pour les mesures aux petits angles.

Je remercie Bertrand CASTAING et Jean-Claude MAURIZOT pour leur appui, leurs conseils et le matériel qu'ils m'ont donnés.

Mes derniers (mais non les moindres) remerciements vont tout d'abord à ma mère qui m'a toujours fait confiance et encouragée, à Éric Arnoult dont l'amitié m'a été précieuse pour partager les bons moments et supporter les plus difficiles, ainsi qu'à l'ensemble des personnes qui ont compté ces dernières années, en particulier : Monique et Daniel Genest, Nicolas Humbert, Samia Aci, Nathalie Gillard, Édouard Sèche, Karine Pereira-Tran, Laure Gangneux, Guillaume De Vuyst, Pierre Aller, Audrey Thomas ...

Table des matières

1 Introduction générale **7**

1.1 Des organismes adaptés à la pression 7

1.2 Des effets de la pression sur les molécules et leurs interactions 8

1.2.1 Une loi générale commune à tous les systèmes comprimés 9

1.2.2 La compressibilité des protéines 9

1.2.3 La pression : de la stabilisation à la dénaturation 11

1.3 Les applications de la pression 15

1.3.1 Les avantages de la pression comme paramètre d'étude 15

1.3.2 Applications en recherche fondamentale 16

1.3.3 Apports en Biotechnologies 21

1.4 La dynamique des protéines 23

1.5 Le lysozyme 25

1.5.1 Présentation 25

1.5.2 Le lysozyme sous pression 27

1.6 L'étude de la dynamique des biomolécules par les neutrons 28

1.6.1 Historique des simulations numériques de biomolécules sous pression 29

1.7 Présentation du projet 32

2 Matériels et méthodes **34**

2.1 Simulations de dynamique moléculaire 34

2.1.1 Quelques éléments théoriques 34

2.1.2 Méthode d'analyse des trajectoires 38

2.2 La diffusion de neutrons 43

2.2.1 Propriétés du neutron 43

2.2.2 L'expérience de diffusion 43

2.2.3 La diffusion incohérente 46

2.2.4 Densité d'états 48

2.2.5 Facteur de structure élastique incohérent (EISF) 48

2.3 Protocole des simulations et des expériences de diffusion de neutrons menées sous pression 51

2.3.1 Simulation de dynamique moléculaire 51

2.3.2 Expériences de diffusion des neutrons 53

3 Modèles dynamiques **63**

3.1 Dynamique de Langevin 64

3.1.1 Particule libre 64

3.1.2 Dynamique de Langevin avec force extérieure 66

3.2 Modèle fractionnaire 68

3.3 Equation généralisée de Langevin 71

4 Résultats **75**

4.1 Effets de la pression 75

4.1.1 Simulations 75

4.2 Fonctions de diffusion 85

4.2.1 Expériences de diffusion de neutrons sous pression 86

4.3 Comparaison des profils des fonctions de diffusion expérimentales et théoriques 95

4.3.1 Comparaison directe 95

4.3.2 Convolution des données simulées et comparaison avec les résultats expérimentaux 97

4.4 Rapprochement des résultats avec les modèles 100

4.4.1 Modèle fractionnaire 100

4.4.2 Equation généralisée de Langevin 102

5 Discussion **104**

5.1 Résultats expérimentaux 104

5.1.1 Résultats des expériences menées sur Mibemol 104

5.1.2 Résultats des expériences sur IN5 107

5.2 Comparaison avec d'autres travaux en diffusion de neutrons 109

5.3 Résultats obtenus en dynamique moléculaire 110

5.3.1 Coefficient de diffusion globale 110

5.3.2 Effets de la pression sur la dynamique interne 110

5.4 Comparaison et combinaison des données expérimentales et simulées . 112

6 Conclusion **116**

7 Annexes **119**

7.1 Programme de calcul pour la convolution des données simulées 119

7.2 Programme de calcul de la viscosité de l'eau à partir des données de densité en fonction de la température et de la pression 121

7.3 Tableaux descriptifs des détecteurs des spectromètres Mibemol et IN5 . 123

7.3.1 Mibemol 123

7.3.2 IN5 124

References **125**

1 Introduction générale

Bien que l'on connaisse l'existence d'organismes adaptés à la pression des fonds océaniques depuis plus d'un siècle et malgré quelques travaux pionniers sur le sujet, l'intérêt porté à la pression comme paramètre variable dans les études en biochimie est relativement récent, d'une part pour des raisons matérielles de génération et de maintien de la pression sur un système, d'autre part du fait de l'absence de bases théoriques solides pour l'interprétation des effets de la pression. Depuis une trentaine d'années pourtant se sont développés des travaux sur les effets de la pression sur le vivant, motivés par les possibilités d'application en biotechnologie, la compréhension de la réaction des organismes adaptés ou non à la pression et l'utilisation de l'outil pression dans l'étude thermodynamique des systèmes biochimiques. Ce renouveau n'a été possible que grâce à une approche pluridisciplinaire où des physiciens ont pu fournir aux biochimistes les solutions techniques pour construire les appareils adaptés aux mesures précises qu'exigent de tels travaux.

1.1 Des organismes adaptés à la pression

La pression est un paramètre environnemental auquel ont su s'adapter certains organismes, allant du plus simple au plus sophistiqué. Les cas les plus connus de milieu de vie sous haute pression sont les fonds marins à près de 12000 mètres de profondeur, au niveau des 'cheminées' hydrothermiques où des bactéries se développent sous des pressions allant jusqu'à 1200 bar, utilisant une source géochimique d'énergie. Des poissons tels que les requins vivent entre la surface de la mer et des profondeurs extrêmes, supportant des pressions allant de 1 à 1000 bar. Les premières expéditions sous-marines relatant l'existence de vie sous haute pression dans les abysses remontent aux années 1870 [1]. Après plusieurs décennies sans avancées, diverses recherches ont mis en évidence d'autres milieux terrestres soumis à de fortes pressions et décrits comme siège d'une vie microbienne : les réservoirs de pétrole, les aquifères terrestres profonds, les sédiments océaniques, les roches terrestres sédimentaires, le granite, le basalte. Il est

difficile de savoir jusqu'à quelle pression la vie peut se développer mais des travaux récents montrent que le métabolisme de certaines bactéries résiste à plus de 10 kbar [2].

La réaction à la pression est variable [3] : certains micro-organismes ont un comportement barotolérant (ils survivent à la haute pression mais leur métabolisme est ralenti), ils sont capables d'induire la synthèse de protéines de 'choc', dont certaines sont aussi produites lors de chocs thermiques. D'autres micro-organismes sont barophiles : la pression favorise leur métabolisme et est essentielle pour leur viabilité. Ils possèdent des enzymes particulières appelées extrêmozymes. Peu de travaux existent sur les mécanismes précis d'activation des gènes induits par la pression, mais on pense que la pression pourrait provoquer des changements conformationnels dans les protéines requises pour l'activation transcriptionnelle des promoteurs de ces gènes. Les protéines ainsi modifiées seraient alors capables de se lier à ces promoteurs et enclencher la transcription.

Les changements de température peuvent moduler ces réponses, et la plupart du temps l'adaptation moléculaire de ces organismes aux conditions extrêmes est le résultat d'un ensemble complexe de paramètres qui se superposent (température très chaude ou très froide, nature et quantité de nutriments, courants marins, tectonique des plaques...).

1.2 Des effets de la pression sur les molécules et leurs interactions

Pendant longtemps, la température a été la variable physique privilégiée pour l'étude des propriétés thermodynamiques des protéines, du fait surtout de la difficulté matérielle que présente la mise en place des expériences sous hautes pressions. Les premiers travaux significatifs sur les effets de la pression en biologie sont ceux de Regnard en 1891 [4] qui observe la réversibilité de l'action de pressions inférieures à 1kbar sur les réactions enzymatiques de bactéries. En 1914, Bridgman, pionnier dans la recherche sur les hautes pressions, observe que plusieurs kbar donnent au blanc d'oeuf un aspect proche de l'oeuf cuit [5]. Des progrès en matière d'équipements ont permis

depuis une trentaine d'années de faire émerger des études de biochimie sous pression, portant principalement sur des protéines, des nucléoprotéines et des membranes [3]. On a ainsi pu commencer à explorer le comportement structural et dynamique des protéines sous pression, et de façon plus générale analyser la relation structure/fonction.

1.2.1 Une loi générale commune à tous les systèmes comprimés

Le Chatelier a énoncé en 1884 le principe selon lequel toute perturbation sur un système à l'équilibre provoque une réaction contraire de façon à diminuer l'effet de cette perturbation [6]. Ainsi, l'application de la pression à un système biologique favorise des processus qui s'accompagnent d'une variation négative de volume. Autrement dit, la pression déplace l'équilibre vers un état occupant un volume plus petit et accélère les processus pour lesquels l'état de transition a un volume plus petit que celui de l'état initial. Elle peut donc, selon les systèmes, accélérer ou ralentir une réaction.

La dissociation d'une espèce chimique en ses ions contribue à une réduction de volume du système du fait de l'électrostriction [7]. Ainsi, les transitions structurales accompagnées par la formation de résidus chargés sont favorisées par la pression.

En outre, il ne faut pas perdre de vue que l'environnement de la protéine est lui aussi influencé par la pression et modifiera alors également le comportement de l'enzyme.

1.2.2 La compressibilité des protéines

Plusieurs techniques ont été utilisées afin de mesurer la compressibilité, définie comme le changement relatif de volume avec la pression :

- la technique de vélocimétrie ultrasonique basée sur la relation entre la compressibilité et la vitesse des ultrasons et qui prend en compte les effets sur la molécule et l'eau d'hydratation [8],

- la spectroscopie de luminescence (fluorescence [9], phosphorescence [10]) qui mesure les changements de distances interatomiques liés à la compression du vide à l'intérieur de la molécule. Ces techniques, contrairement à celle des ultrasons, sont sensibles à des changements locaux dans la structure du système et ne prennent pas en compte l'eau d'hydratation,
- la spectroscopie UV/visible donne elle aussi des compressibilités locales de l'intérieur de la protéine [11],
- la spectroscopie vibrationnelle (Raman [12] et IR [13]) basée sur les vibrations des liaisons amide venant principalement de l'énergie de stretching de C=O. L'oxygène étant impliqué dans une liaison hydrogène avec une autre partie de la chaîne, la bande spectrale apporte une information sur la conformation,
- la RMN [14],
- la cristallographie aux rayons X [15],
- la diffusion de neutrons aux petits angles [16].

Bien que les valeurs de compressibilité obtenues dépendent de la méthode utilisée et de l'état de l'échantillon (cristal ou liquide moléculaire), d'une manière générale, les protéines sont peu compressibles. Une étude sur plusieurs protéines globulaires en vélocimétrie ultrasonique montre que plus la protéine est hydrophobe, plus elle est compressible [8]. Les changements de volume observés sont petits, typiquement autour de 1% du volume total de la protéine [17]. Les structures d'une protéine native sont relativement incompressibles du fait des contraintes du squelette covalent [18]. On peut distinguer 2 composantes principales dans cette compressibilité : les cavités et espaces vides à l'intérieur de la protéine qui donnent une composante positive, et la compressibilité de l'eau d'hydratation qui est plutôt négative du fait de la pénétration d'eau à la surface de la protéine. Les cavités à l'intérieur d'une protéine peuvent être comprimées de façon réversible sans rompre l'équilibre énergétique de l'état replié.

Il n'existe cependant pas de règles simples sur la manière dont une structure protéique répond à la pression. En effet, Kundrot et al. [15] montrent sur le lysozyme que les chaînes latérales internes réagissent légèrement plus que la chaîne principale, et que dans l'ordre de rigidité décroissante on trouve la chaîne principale des hélices et

des feuillets, la chaîne principale dans son entier, les chaînes latérales internes puis les chaînes latérales externes. Pourtant, 3 hélices réagissent différemment : le volume de l'une augmente, l'autre diminue et la troisième ne change pas.

L'eau d'hydratation est quant à elle environ 20% moins compressible que l'eau libre.

1.2.3 La pression : de la stabilisation à la dénaturation

La pression semble jouer un rôle important dans la stabilité et la conformation de certaines biomolécules et sur leurs structures macromoléculaires.

L'étude de réactions de synthèse organique sous pression en conditions hydrothermales montre que la pression augmente la stabilité thermique des phases aqueuses et améliore le rendement de certaines réactions. Ces observations amènent d'ailleurs certains auteurs à supposer un rôle déterminant de la pression dans l'origine de la vie [2].

Son effet stabilisant dans certains cas est corrélé à la propriété d'ordonnancement liée au principe de Le Chatelier qui postule qu'une élévation de la pression augmente le degré d'organisation des molécules. Elle peut dans certains cas aider au repliement partiel d'une protéine ayant subi une dénaturation [19]. De même, elle diminue en général la fluidité des membranes biologiques par une augmentation de l'ordre des lipides, impliquant un ralentissement de l'activité des protéines membranaires. Les micro-organismes adaptés répondent à l'augmentation de la pression par l'activation de gènes conduisant à la production d'acides gras polyinsaturés ce qui a pour effet d'espacer les phospholipides dans la membrane et de réduire leur compaction.

Bien que leurs structures soient relativement rigides, les protéines sont les molécules biologiques les plus sensibles à la pression. On peut distinguer 2 'domaines' de réaction à la pression [20] : aux pressions modérées les effets sont élastiques, réversibles, où la structure secondaire est préservée. Les changements concernent la longueur des liaisons, l'hydratation, et les cavités qui résultent de l'empilement impar-

fait à l'intérieur de la protéine. Dans certains cas, il apparait que des pressions modérées induisent des transitions conformationnelles vers des états compacts partiellement dépliés appelés 'molten globules' (ou pelotes statistiques) [7], qui conservent tout ou presque des structures secondaires de l'état natif mais sans structure tertiaire bien définie.

A des pressions élevées, en général au-delà de 5kbar, des changements plastiques ou conformationnels apparaissent et sont pour la plupart irréversibles. Weber et Drickamer [18] ont effectué une étude par fluorescence pour suivre le dépliement induit par la pression de protéines à chaînes simples. Ils mettent en evidence une pénétration d'eau dans la protéine parallèlement au dépliement. Ces effets sont irréversibles quand on augmente la concentration en protéine, ce qui favorise les interactions intermoléculaires et donc l'aggrégation. Le processus de gonflement par pénétration d'eau conduit à des structures de compaction réduite mais dont l'ordre est beaucoup mieux conservé que dans le cas des protéines dénaturées par la chaleur.

Il existe cependant des exceptions à ces 'domaines de sensibilité' : certaines petites protéines montrent une grande stabilité à la pression, comme la ribonucléase P2 qui ne subit aucun changement conformationnel jusqu'à 14 kbar, mais il suffit de la mutation F31A dans le coeur hydrophobe de cette protéine pour la déstabiliser et observer un dépliement réversible dès 4 kbar [21]. De même, des oligomères résistent à la dénaturation jusqu'à des pressions de 7 kbar [22], alors qu'en général une pression de 3 kbar est suffisante pour dissocier les protéines oligomériques. Dans l'autre sens, certaines protéines monomériques se dénaturent à des pressions inférieures à 3 kbar [23].

Pour comprendre cet effet nuancé de la pression sur les molécules, il faut examiner la manière dont elle affecte les divers types d'interactions. La structure électronique des atomes et les longueurs des liaisons covalentes ne sont modifiées directement qu'au-delà de 30 kbar [24]. Par contre, les interactions non-covalentes sont altérées à partir de quelques centaines de bar et ceci de façon différentielle : la forme native d'une protéine en solution aqueuse est stabilisée par un équilibre subtil entre interactions hydrophobes et liaisons hydrogène. Ces dernières se voient renforcées par la pression qui

favorise leur formation (ce qui explique par ailleurs la bonne résistance des acides nucléiques et des polysaccharides car leur structure secondaire est principalement stabilisée par des liaisons H), alors que la pression peut altérer les interactions hydrophobes. Ce renforcement des liaisons hydrogène a été mis en évidence dans plusieurs études en spectroscopie vibrationnelle qui montrent une augmentation de fréquence avec la pression [12]. Les liaisons hydrogène sont fortement impliquées dans le maintien des structures secondaires.

Dans le modèle hydrophobe [25], les interactions hydrophobes sont présentées comme les interactions faibles les plus importantes impliquées dans la stabilité des protéines, des membranes et autres assemblages multimoléculaires. Elles sont le résultat de l'effet qui cherche à minimiser le contact du polypeptide avec le solvent. Contrairement à ce qui se passe pour les liaisons H, la pression est défavorable aux interactions hydrophobes. Des protéines oligomériques peuvent ainsi être dissociées à des pressions relativement peu élevées de 1 à 2 kbar. De même avec de telles pressions, des agrégats de protéines peuvent être séparés [26]. Au-dessus de 1500 bar, des interactions hydrophobes internes sont à leur tour affaiblies, des molécules d'eau pénètrent dans la protéine et se restructurent autour des groupements apolaires enfouis alors exposés au solvent (ressemble en cela à la dénaturation par le froid qui provoque l'ordonnancement de l'eau autour des groupements hydrophobes et déstabilise ainsi l'état natif). L'hydratation des groupements hydrophobes est une des forces dominantes liées à la pression. De plus, la compressibilité beaucoup plus forte de l'eau comparée à celle de la protéine résulte dans une augmentation de l'empilement des molécules d'eau et donc dans une densité plus forte de donneurs et d'accepteurs de liaisons H. Ceci provoque alors une hausse de l'hydrophilie du solvent aux hautes pressions et a pour conséquence qu'un groupe capable de former une liaison H trouve plus de compétiteurs constitués par les molécules d'eau. Ce changement dans l'équilibre d'interaction entre l'eau et la protéine est une force principale qui conduit aux changements conformationnels induits par la pression et provoquant le dépliement de la protéine [27]. L'augmentation de l'hydratation par la pression concerne en premier lieu les régions périphériques de la protéine, augmentant leur flexibilité, s'opposant en cela à la res-

triction de la mobilité des régions internes due à une réduction des cavités.

La pénétration d'eau lors du dépliement d'une protéine avec la pression est un modèle qui explique l'évolution particulière avec la pression de l'amplitude et du signe des changements de volume lors de l'augmentation de la pression : ce changement de volume est négatif au-dessus de 1-2 kbar [28], alors que le transfert des composants hydrophobes vers l'eau (cas de la dénaturation par la température), qui est le modèle communément avancé pour le dépliement des protéines, prévoit un comportement inverse (modèle hydrophobe [25]). Cette opposition avait été mise en évidence par Kauzmann en 1987 [29], et même si les modifications d'empilement et d'hydratation sont les principales causes des changements de volume dus à la pression, les contradictions avec certaines études et calculs théoriques soulèvent encore des questions sur les différentes contributions physico-chimiques dans ces variations de volume [30].

Les états de transition dits 'molten globules' sont des modifications réversibles de la structure. Au-delà de 5 kbar, la formation d'agrégats peut empêcher la réversibilité qu'entravent également des modifications covalentes intramoléculaires ou encore un recompactage très stable de la chaîne polypeptidique.

La pression tend à rompre les ponts salins car, en accord avec la loi de Le Chatelier, ceci induit une diminution du volume du système. Cette rupture favorise le dépliement, et l'augmentation de la charge qui résulte de cette rupture augmente la répulsion électrostatique entre les molécules, ce qui a tendance à empêcher leur association ou entraîner leur désagrégation [31].

La réaction d'une protéine à une pression donnée est donc le résultat d'une somme d'effets antagonistes et c'est un jeu de prévalence des uns et des autres en fonction de la pression qui gouverne l'état de la protéine. La dénaturation par la pression est un processus multiétape, dépendant de la gamme de pression, du taux de compression et du temps d'exposition.

En conséquence de la sensibilité importante des protéines vis-à-vis de la pression, il suffit de valeurs inférieures à 3 kbar pour que les enzymes subissent une modifi-

cation de leur activité (la plupart du temps elles sont inactivées). Pourtant, elles ne subissent pas de changements conformationnels de grande ampleur à ces pressions. Elle influence de manière différentielle les contacts entre une enzyme et son substrat, améliorant la complémentarité des sites ou au contraire la déstabilisant.

1.3 Les applications de la pression

1.3.1 Les avantages de la pression comme paramètre d'étude

Nous avons vu que la pression altère faiblement les liaisons chimiques covalentes. Elle rend possible, si on l'emploie dans une gamme modérée et contrôlée, la production de modifications conformationnelles réversibles. Elle peut donc constituer un moyen de moduler plus finement les effets que l'on veut induire sur une molécule. En comparaison de dénaturants comme la température et certains agents chimiques, la pression est considérée comme le moins agressif : les protéines dénaturées par la pression restent relativement compactes, conservent des éléments d'organisation structurale, contrairement aux protéines dénaturées par la température [17].

Les réponses sont variables selon les protéines : quand on la soumet à de fortes pressions, la sérum albumine bovine (BSA) subit un changement conformationnel plus ample que le lysozyme dans les mêmes conditions [32], sans doute du fait des différences structurales entre les 2 protéines. Même dans le cas de 2 protéines proches, le comportement face à la pression peut être différent, les phénomènes généraux sont parfois difficiles à distinguer des particularités de chaque protéine.

Pour de nombreuses protéines la dénaturation par la pression est réversible, alors que la température dénature de façon irréversible du fait de la rupture de liens covalents et/ou de l'agrégation de protéines dépliées [7].

L'avantage de l'utilisation de la pression repose aussi sur un meilleur contrôle des conditions environnementales imposées lorsqu'on cherche à déstabiliser les structures moléculaires d'un système biologique. La pression hydrostatique affecte seulement

les propriétés physiques du solvent, alors que les agents chimiques modifient également ses propriétés chimiques, et ces changements ne sont pas toujours bien définis ni contrôlables. La température quant à elle modifie à la fois le volume et l'énergie thermique du système.

1.3.2 Applications en recherche fondamentale

L'utilisation du paramètre pression pour l'étude des relations structure/fonction des systèmes biologiques a bénéficié depuis quelques années de l'adaptation de plusieurs méthodes biophysiques aux hautes pressions.

-Dénaturation/Repliement

La pression a surtout été utilisée pour étudier les modes de repliement des protéines, le nombre et la nature des étapes de transition de ce processus [33]. Elle peut être un moyen de simplifer des mécanismes complexes de repliement et de dépliement et/ou ralentir des cinétiques trop rapides pour les techniques de mesures conventionnelles [34].

De nombreux travaux en RMN associée à la haute pression ont porté sur l'étude de la dénaturation et du repliement des protéines. On peut citer les travaux de Jonas dans ce domaine (pour revue, [35]). Par exemple, une étude sur l'apomyoglobine montre que l'état de dénaturation qu'elle atteint à 2 kbar conserve des structures secondaires stables, celles présentes dans le coeur de la protéine.

La spectroscopie FTIR (Fourier Transform InfraRed) est également une technique de choix pour appréhender les changements structuraux induits par la pression [36].

Ces techniques ont permis de comparer les divers états intermédiaires de dénaturation et de mettre en évidence des points communs et des différences entre les divers types de dénaturation : par exemple, certains aspects de la dénaturation par la pression et par le froid sont similaires et divergent des caractéristiques de la dénaturation par la chaleur. On peut citer les travaux de Zhang et al. [37] sur la ribonucléase A par RMN.

La pression a été utilisée en combinaison avec d'autres facteurs expérimentaux et les effets obtenus semblent refléter les propriétés intrinsèques de repliement des protéines : on module la stabilité de la protéine par l'action de produits dénaturants, en variant le pH ou encore en modifiant sa structure primaire par clivage par exemple et on étude la variation de la réponse vis-à-vis de la pression de la protéine ainsi 'sensibilisée' par rapport à celle de la protéine native. La combinaison avec des produits dénaturants permet alors à la pression d'agir sur une gamme plus vaste de systèmes et apporter une vision nouvelle sur les mécanismes de repliement et leurs relations avec la fonction biologique.

Une solution de protéine gèle à des températures plus basses lorsqu'une pression est appliquée du fait des propriétés du diagramme de phase de l'eau, il est donc possible d'étudier la dénaturation par le froid des protéines en combinant pression et température.

En général, il semble que les actions des dénaturants chimiques et celles de la pression sont complémentaires et additifs. L'utilisation de protéines très bien caractérisées en ce qui concerne leur structure et leur repliement permet une interprétation détaillée des résultats expérimentaux de dénaturation par la pression. De plus, connaissant les effets de la pression au niveau des interactions intramoléculaires qui diffèrent en partie de ceux induits par les agents chimiques, les informations complémentaires ainsi apportées donnent une vision plus précise sur les étapes de repliement [33].

Concernant les protéines oligomériques, leur dénaturation à des pressions inférieures à 3 kbar [17] reflète sans doute que pour beaucoup de protéines dimériques la dissociation et le dépliement se passent en une seule étape concertée. Les conditions expérimentales où la pression perturbe l'équilibre de dissociation sont atteintes plus facilement que celles conduisant au dépliement d'une chaîne simple [18]. Pourtant, certains mécanismes de dépliement sont plus complexes et se produisent avant la dissociation [22]. Les pressions nécessaires sont alors aussi élevées ou supérieures à celles requises pour la dénaturation des protéines monochaînes.

La relaxation élastique d'un système en réponse à un saut de pression est une méthode expérimentale qui a montré son efficacité pour détecter et comprendre certains états intermédiaires de dépliement [38], et étudier la cinétique de dépliement/repliement.

La pression est utile également pour étudier l'assemblage des bactériophages et des virus, ainsi que les complexes protéines-ADN.

-Agrégation

La pression constitue un outil pour tenter de comprendre les mécanismes d'agrégation des protéines, dans l'objectif de trouver des méthodes pour mieux contrôler ce phénomène.

Il a été mis en évidence que la pression peut dissocier des agrégats non-spécifiques de protéines et faciliter le repliement correct, en particulier sur la rhodanèse [26]. A l'inverse, la pression peut dans certains cas favoriser l'agrégation (cas d'une étude sur l'interféron-γ, [39]). Si on parvient à contrôler correctement les conditions, la pression est un paramètre ajustable permettant d'atteindre des conditions optimales pour les études structurales et mécaniques des protéines, selon que l'objectif est de provoquer ou inhiber l'agrégation.

La méthode de dénaturation par la pression appliquée sur des complexes protéiques, des oligomères et des protéines ayant tendance à l'agrégation, avec l'aide de concentrations non-dénaturantes d'agent chimique, a mis en évidence certaines caractéristiques de l'interaction entre repliement, association/dissociation et fonction biologique.

La pression modifie la vitesse de cristallisation des protéines. Les premiers travaux en 1990 mettent en évidence que la glucose isomérase cristallise deux fois plus vite à 2 kbar qu'à pression atmosphérique [40]. Depuis, la plupart des études montrent que la pression ralentit plutôt le taux de cristallisation. Par exemple, sur le lysozyme [41], les auteurs expliquent le ralentissement de la cristallisation en partie par la solubilité plus

forte de cette protéine avec l'augmentation de la pression.

La pression est utilisée dans l'étude de protéines dont l'agrégation est associée à des maladies comme Alzheimer, Parkinson, ou encore la protéine du prion : on espère ainsi apporter des informations nouvelles pour tenter d'élucider la structure de la forme pathologique de cette protéine. Les tentatives pour obtenir cette forme infectieuse *in vivo* grâce à des agents chimiques ont échoué jusqu'à présent, et la pression pourrait être utilisée pour étudier les conditions de repliement de cette protéine. Ainsi ont été entrepris des travaux en RMN sous pression [42] et en spectroscopie UV [43].

-Mécanismes enzymatiques

L'effet de la pression sur l'activité des enzymes suit différents schémas, plus ou moins complexes [44] : entre 1 et 1000 bar, donc pour des pressions non dénaturantes, le lysozyme est inactivé alors que la thermolysine voit son activité accrue. La trypsine quant à elle suit une dépendance biphasique : aux pressions modérées elle est activée avant d'atteindre un plateau à partir de 430 bar. Un comportement plus complexe est observé pour l'octopine déhydrogénase : l'activité augmente jusqu'à 600 bar puis décroît au-delà. Il n'existe donc pas de modèle général de l'effet de la pression sur l'activité des enzymes.

Erijman et Clegg [45] ont soumis un processus de transcription à une forte pression hydrostatique. Le système transcriptionnel a suspendu son opération jusqu'au rétablissement de la pression normale, reprenant alors là où il s'était arrêté. Les auteurs ont conclu que la pression implique une réduction du volume spécifique partiel de l'ARN polymérase induisant ainsi dans cette protéine une rigidité qui l'empêche de fonctionner.

La mesure de la compressibilité renseigne sur la contribution de la dynamique interne d'une protéine sur sa fonction biologique. Une étude sur la formation du complexe lysozyme-inhibiteurs [46] montre que la compressibilité diminue avec le nombre d'inhibiteurs liés au site enzymatique du lysozyme, mettant en évidence une diminution des fluctuations de la protéine lors de l'amarrage des ligands. L'ajustement induit

par l'interaction se propagerait dans toute la molécule et augmenterait l'empilement des atomes diminuant la flexibilité de l'enzyme requise pour la plupart des activités biologiques.

Les mesures de compressibilité aident également à déterminer l'impact de la substitution d'un résidu sur la flexibilité, donc la fonction, d'une enzyme. Dans le cas de l'enzyme aspartate aminotransférase d'*E. Coli*, la substitution de la valine en position 39 par un résidu à chaîne latérale encombrante accentue sa flexibilité, la rendant plus active [47].

La pression peut également nous renseigner sur l'implication du solvent dans le travail de catalyse des protéines [48]. Lors d'une réaction enzymatique, l'enzyme ne se comporte pas comme un système à l'équilibre face à la pression : s'il existe une étape qui implique une augmentation du nombre de molécules d'eau associées à l'enzyme, alors il doit exister une étape ultérieure où ces molécules sont perdues par la protéine. Ainsi, le cycle catalytique inclut des étapes susceptibles d'être soit activées soit inhibées par la pression hydrostatique.

-Dynamique interne

La technique du saut de pression consiste à imposer à un système à l'équilibre un changement rapide de pression et de mesurer sa réaction en fonction du temps. Le système subit dans un premier temps une relaxation élastique rapide suivie d'une relaxation dite conformationnelle plus lente vers un nouvel état d'équilibre. Une ou plusieurs observables sont mesurées par une technique spectroscopique : on peut citer l'exemple de la myoglobine dont les processus de relaxation après perturbation par la pression à différentes températures ont été suivis via 3 observables relatives aux bandes C=0 en FTIR, le nombre d'onde des pics, les aires relatives et leurs largeurs. Des fonctions de relaxation sont définies et appliquées à ces observables, puis ajustées à des lois de puissance par exemple [49].

Une étude sur le BPTI (inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine) à 2 kbar en RMN [50] met en évidence un ralentissement des mouvements de 'flip-flop' des rési-

dus aromatiques avec la pression.

1.3.3 Apports en Biotechnologies

On connaît les bases conceptuelles et technologiques de l'utilisation de la pression pour des applications industrielles [51]. Dans la gamme de pression d'intérêt biotechnologique, la pression n'a en général pas d'effet sur les liaisons covalentes donc les composants naturels ne sont pas détruits par le traitement à haute pression. Il existe donc un ensemble d'applications potentielles dans divers domaines comme l'agroalimentaire où elle est utilisée pour la stérilisation des aliments, avec l'avantage, au degré où elle est appliquée, de ne pas modifier leur goût ou leur parfum. Certaines vitamines et provitamines (bêta-carotène, riboflavine, thiamine, acide folique, rétinol, ascorbate) résistent à des pressions de 6-8 kbar. C'est grâce à son action sur les structures membranaires, l'inactivation de certaines enzymes et l'inhibition de la biosynthèse protéique qu'elle peut être utilisée pour inactiver les micro-organismes et leurs formes végétatives. Elle constitue donc une possible alternative au traitement par la chaleur de certains produits alimentaires. La croissance des micro-organismes mésophiles (non adaptés) est inhibée à partir de 400-500 bar. De plus, dans la gamme 2-6 kbar, des brêches apparaissent dans la membrane provoquant la fuite du contenu cytoplasmique et l'entrée de matériel extracellulaire [52].

Pourtant, certaines souches de bactéries ainsi que leurs spores sont résistantes jusqu'à 8 kbar. On peut alors associer un chauffage à un traitement chimique et une pressurisation. Les virus quant à eux sont sensibles à des pressions modérées entre 1 et 3 kbar.

Une recherche active est apparue au Japon au début des années 90 sur la biotechnologie haute pression pour la conservation des aliments. La pression est aussi utilisée pour modifier chimiquement des protéines, comme lier des groupes aromatiques (produit des protéines facilement émulsifiables). La gélification par la pression a été appliquée par exemple sur la β-lactoglobuline qui s'agrège pour former des gels après

montée puis relâchement de la pression. On utilise aussi sa capacité à moduler l'activité enzymatique (comme la spécificité des protéases). Le traitement par la pression est également efficace pour réduire l'activité allergène de la nourriture.

En dehors du domaine des sciences de l'aliment, les études ont montré l'étendue des applications potentielles médicales et pharmaceutiques [53] : elle peut être utilisée en association avec un chauffage modéré pour la stérilisation de produits sensibles à la chaleur comme certains matériaux biologiques, liposomes, cosmétiques et même des instruments chirurgicaux et endoscopiques. Il existe aussi des perspectives d'application dans le développement de l'immunodésorption, ou la mise au point de vaccins en inactivant des virus tout en conservant leurs propriétés immunogénétiques [54]. On espère aussi pouvoir utiliser le dépliement induit par la pression sur certaines protéines pour démasquer des sites antigéniques et ainsi pouvoir accroître les propriétés immunogéniques de protéines, virus tués et autres micro-organismes.

En dehors des cibles directes constituées par les éléments des micro-organismes, le diagramme de phase de l'eau peut amener à plusieurs applications de l'effet de la pression sur les transitions de phase de l'eau, en développement actuellement dans la technologie de l'alimentaire et pour la conservation des produits pharmaceutiques, des dérivés sanguins des cellules et des organes pour la transplantation. De même, les produits réfrigérés en utilisant la pression subissent moins de dommages qu'avec un traitement à -30°C ou à l'azote liquide à pression normale.

D'autres stratégies pourraient naître de l'étude des enzymes des micro-organismes barophiles : elles pourraient aider à la mise au point de mutants stables d'enzymes mésophiles capables d'agir avec une efficacité catalytique accrue dans des conditions extrêmes de pression et de température [53].

Enfin, des pressions d'environ 2 kbar ont été appliquées pour inverser l'agrégation de protéines mal repliées et de corps d'inclusion [19] et pour obtenir un meilleur repliement (cette pratique est appliquée à des protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique).

1.4 La dynamique des protéines

Le choix d'un instrument spectroscopique et de ses caractéristiques comme sa résolution, la gamme en transfert de moment et en énergie, dépend de l'étendue dans l'espace et dans le temps des mouvements que l'on cherche à détecter. Du fait de la forte densité atomique des protéines, elles constituent des systèmes complexes où les échelles de temps de la dynamique interne s'étend de la sub-picoseconde jusqu'au-delà de la seconde, correspondant à une multitude de degrés de liberté couplés entre eux. Les basses fréquences correspondent aux mouvements collectifs alors que les hautes fréquences décrivent la dynamique locale. Les vibrations de liaison impliquant un atome d'hydrogène sont les plus rapides (100 THz), puis viennent les vibrations de liaisons entre deux atomes lourds, les vibrations d'angle de liaison, les déformations de résidus puis de structures secondaires, et enfin les mouvements d'ensemble d'un domaine souvent impliqué dans la fonction de la protéine, comme par exemple le déplacement relatif des domaines de la myoglobine qui permet d'ouvrir un passage pour l'oxygène. Il existe donc un large spectre de mouvements, résumés dans le tableau 1 [55]. La vaste étendue spectrale de la dynamique interne des protéines appelle l'utilisation de plusieurs techniques expérimentales qui explorent chacune une gamme particulière spacio-temporelle. Dans notre étude nous nous intéressons aux mouvements internes de type diffusif d'une protéine. L'analyse des spectres expérimentaux de diffusion de neutrons doit tenir compte du fait que ces mouvements diffusifs occupent une échelle de temps qui correspond aussi à celle des mouvements globaux de la protéine en solution. Une des difficultés est donc dans l'identification du type de mouvements accessibles par les techniques utilisées et de déterminer les limites des comparaisons possibles entre elles.

La multiplicité des échelles de la dynamique interne d'une protéine peut être reliée à la nature complexe de sa surface d'énergie potentielle : chaque état conformationnel d'une protéine est flexible et constitué d'un ensemble de sous-états d'énergie équivalente [56]. Les mouvements de la protéine peuvent être décrits comme des transitions

	Extension spatiale (Å)	Amplitude (Å)	Temps caractéristiques (s)
Vibrations atomiques	2 - 5	0.01 - 0.1	10^{-14} - 10^{-13}
Vibrations élastiques d'un domaine globulaire	10 - 20	0.05 - 0.5	10^{-12} - 10^{-11}
Rotation des chaînes latérales de surface	5 - 10	5 - 10	10^{-11} - 10^{-10}
Libration de groupes enfouis	5 - 10	0.5	10^{-11} - 10^{-9}
Déplacement relatif de différents domaines	10 - 20	1 - 5	10^{-11} - 10^{-7}
Rotation de chaînes enfouies de taille moyenne	5	5	10^{-4} - 1
Transition allostérique	5 - 40	1 - 5	10^{-4} - 10

TAB. 1 – Exemples de mouvements internes caractéristiques des protéines.

entre ces sous-états. Le profil d'énergie de ces états est donc une hypersurface multidimensionnelle constituée d'un très grand nombre de minima locaux (schéma 1).

Frauenfelder et al. [57] décrivent la hiérarchisation des différents sous-états conformationnels : ils distinguent les sous-états de premier niveau, peu nombreux mais assez hétérogènes dans leurs propriétés structurales et dynamiques pour pouvoir être caractérisés individuellement, contrairement aux sous-états occupant les niveaux inférieurs. Aux très basses températures, une protéine se fige dans un sous-état particulier. Une montée de la température permet à la protéine d'opérer des transitions parmi les sous-états des niveaux plus élevés, les mouvements sont essentiellement harmoniques. C'est seulement au-dessus de 200K que la protéine basculera entre les sous-états conformationnels du sommet de la hiérarchie, avec des fluctuations atomiques plus importantes qu'en dessous de 200K. Cette étape de transition vitreuse a été étudiée entre autres sur la myoglobine, en particulier par diffusion de neutrons [58].

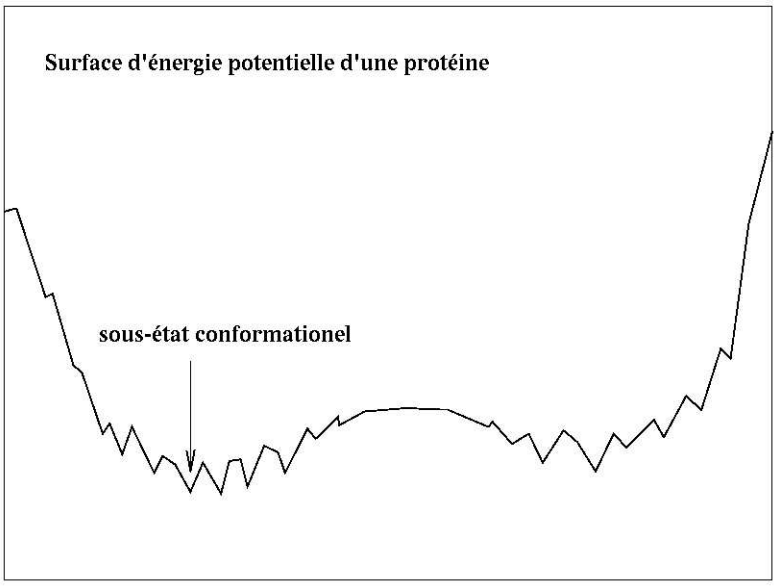

FIG. 1 – Représentation schématique de la surface d'énergie d'une protéine selon Frauenfelder [56].

Bryngelson et al [59] présentent la pression comme un moyen d'explorer la 'rugosité' de la surface d'énergie de repliement des protéines : la pression a pour effet de ralentir la cinétique de repliement et de dépliement, ce qui correspond à une surface de rugosité croissante.

1.5 Le lysozyme

1.5.1 Présentation

Le lysozyme est une enzyme à activité bactéricide présente dans tous les organismes vivants. Il existe plusieurs types de lysozyme dont les caractéristiques diffèrent selon leur origine. On le trouve dans le blanc d'oeuf, dans des sécrétions comme les larmes, dans les membranes des muqueuses, ainsi que chez des virus bactériens. Il constitue un membre atypique de la classe des hexosaminidases. Celui que nous utilisons est le lysozyme de poule. C'est une protéine globulaire monomérique de 129 résidus hautement structurée et de poids moléculaire 14.3 kDa (figure 2), [60].

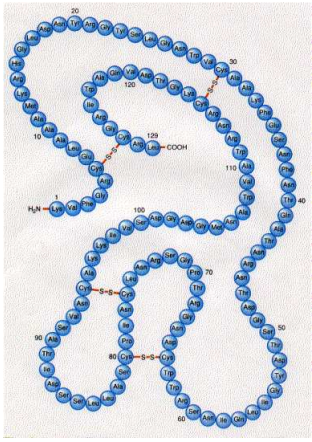

FIG. 2 – Structure primaire du lysozyme de poule.

Le lysozyme est la première enzyme dont la structure fut déterminée par cristallographie aux rayons X, en 1966 [61]. Elle est de forme ellipsoïdale, constituée de 5 hélices α et 3 feuillets β, et sa structure globale présente 2 domaines, α et β, séparés par un profond sillon dans lequel se passe la réaction enzymatique (figure 3).

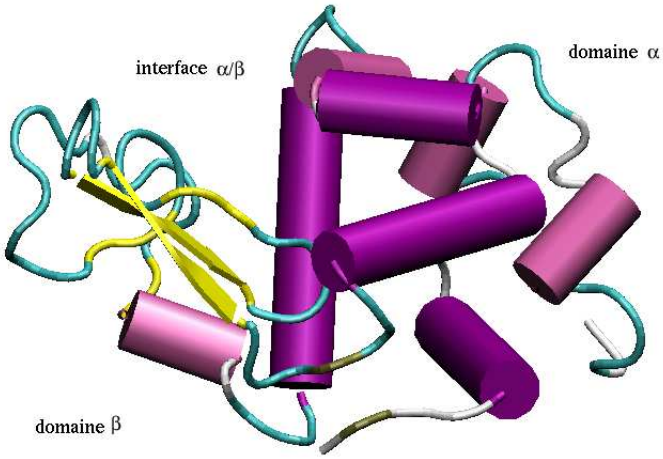

FIG. 3 – Structure tertiaire du lysozyme de poule.

Grâce à l'examen des structures cristallines de la protéine native et des complexes protéine-inhibiteur, son mécanisme enzymatique a été élucidé : le lysozyme catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique 1→4 des peptidoglycanes de la paroi bactérienne ainsi que de la chitine présente dans les parois des champignons.

C'est une protéine robuste : elle résiste à des changements de température et des pH extrêmes, et possède 4 ponts disulfure qui maintiennent la structure tertaire.

1.5.2 Le lysozyme sous pression

Plusieurs études structurales ont été menées sur le lysozyme soumis à la pression. Parmi les plus informatives, il faut citer le travail de Kundrot et al [15] qui a porté sur le cristal de lysozyme comprimé jusqu'à 1 kbar. Le domaine α possède un coeur hydrophobe entouré par 4 hélices-α et le domaine β est plus densément compacté et comporte une cavité contenant de l'eau. L'interface entre les 2 domaines contient d'autres cavités de ce genre. L'étude de Kundrot montre une réponse différentielle des 2 domaines, avec une compressibilité significative du domaine α ($\Delta V = -0.57\%$) alors que le domaine β reste relativement incompressible à cette pression. D'autres résultats en RMN du proton à haute résolution [14] montrent un compactage graduel des chaînes latérales dans le domaine α. Kamatari et al [62] ont étudié le lysozyme sous pression en RMN jusqu'à 2000 bar, et obtiennent un changement global de la géométrie des liaisons H de la chaîne principale avec un raccourcissement des distances entre l'azote de l'amide et le proton de l'amide ou l'oxygène du carbonyl. Cette contraction moyenne atteint environ 0.02 Å(à peu près 1% de la distance entre l'hydrogène de l'amide et l'oxygène du carbonyl) entre 30 et 2000 bar. Cette tendance est d'amplitude similaire dans les 2 domaines, alors que Kundrot et al [15] montraient que le domaine β est incompressible. Ces 2 résultats peuvent coexister si l'on considère que la compression nette du domaine β peut être nulle du fait que la compaction des liaisons H peut être compensée par l'extension d'autres parties de la molécule. Les travaux de Kundrot et al suggèrent en effet que le domaine β contient une cavité qui subit une expansion avec la pression. De plus, la réponse du domaine β à la pression n'est pas linéaire contrairement à celle de l'autre domaine. Ceci serait dû à la pénétration de molécules d'eau dans cette cavité avec l'augmentation de la pression. Par contre, les cavités du domaine α sont petites et ne contiennent pas de molécules d'eau, ce qui résulterait en une compression linéaire du coeur de ce domaine α. Une tendance générale remarquée

par Akasaka et al [14] est l'impact plus important de la pression sur la périphérie de la molécule. Plus précisément, les résidus dont la structure subit des changements importants par la pression sont situés près des cavités présentes dans la protéine et qui sont donc le siège des réarrangements les plus conséquents lors de la compression, et ce sont plus particulièrement celles situées à l'interface des 2 domaines et qui contiennent des molécules d'eau enfouies. Cet emplacement correspond au site de liaison du substrat, et tout changement touchant cette région pourrait être crucial dans la fonction de l'enzyme.

Des changements structuraux ont été observés par dichroïsme circulaire [63] : à 3kbar, aucune rupture dans les structures secondaires n'est observée, mais à 6kbar, le contenu en hélices α diminue de 65.9 %

Une étude par diffusion des rayons X sur le lysozyme en solution sous pression [64] a établi un rayon de gyration de 15.31 +/- 0.09 Å à 1atm et 14.8 +/- 0.15 Å à 4 kbar, c'est-à-dire une diminution significative de 0.51 Å. Kundrot et al. [15] obtenaient 13.72 Å à 1atm et 13.67 Å à 1000 bar. Cette différence entre les 2 techniques tient au fait que la première prend en compte la couche d'eau autour de la molécule. La différence correspond d'ailleurs à peu près au rayon de van der Waals d'une molécule d'eau.

1.6 L'étude de la dynamique des biomolécules par les neutrons

Les techniques de diffusion incohérente inélastique et quasi-élastique sont des outils particulièrement appropriés pour mesurer la dynamique des macromolécules sur les échelles de temps de la picoseconde et de la nanoseconde, mais ce n'est que récemment qu'elles ont commencé à prendre leur essor. Les premières expériences d'intérêt biologique furent menées sur des fibres d'ADN par Dahlborg et Rupprecht en 1971 [65], puis sur des membranes et des protéines [66]. Ceci est lié aux faibles flux de neutrons disponibles nécessitant des quantités importantes d'échantillon (souvent entre 300 et 600 mg) et des temps de comptage longs.

Des progrès techniques importants ont été réalisés dans la mise au point de spectromètres à neutrons, ce qui a permis depuis le début des années 1980 l'accélération des études en biochimie et biologie. Des études systématiques sur les mouvements intramoléculaires de petites protéines globulaires ont été accompagnées de nouveaux développements théoriques sur leur dynamique conjointement à des simulations de dynamique moléculaire [67]. L'amélioration récente des performances des ordinateurs et des méthodes de simulation de DM permettent désormais de calculer des trajectoires atomiques sur des temps assez longs, jusqu'à plusieurs ns, échelle de temps qui peut aussi être mesurée par diffusion quasiélastique de neutrons.

1.6.1 Historique des simulations numériques de biomolécules sous pression

Divers aspects de la simulation de dynamique moléculaire sous pression sont abordés dans la revue [68]. Les simulations de DM permettent d'apporter des informations plus détaillées des effets de la pression à un niveau microscopique. Les protéines simulées ne parviennent en général qu'à une relaxation élastique, même avec une pression suffisante pour déstabiliser l'état natif. Un état métastable est atteint, mais les échelles de temps accessibles actuellement par les simulations de DM sont trop courtes (de l'ordre de la nanoseconde) pour amener le système jusqu'à l'état dénaturé. Seule une partie de l'espace proche de la conformation initiale peut être exploré.

Les premières simulations sous haute pression ont porté sur le BPTI ([69], puis [27]) où les premiers changements de structure secondaire sont observés seulement à 10kbar avec une perte de structure β et continue à 15 kbar où le contenu en hélices α dimuninue. Une pénétration d'eau est également observée à ces hautes pressions avec rupture de liens hydrogène internes au profit de liaisons avec l'eau. Il existe cependant des différences entre les techniques expérimentales et les simulations : en FTIR (Fourier Transform InfraRed) on montre que le dépliement du BPTI commence à 8 kbar et continue jusqu'à 14 kbar [13]. Hünenberger et al. [70] ont conduit des simulations sur le dépliement du lysozyme qu'ils n'observent toujours pas après 210 ps à 10 kbar alors que la fluorescence [71], la spectroscopie Raman [12] et la RMN [72] indiquent que la protéine

se déplie à 5 kbar. Ceci vient du fait que les simulations sont encore trop courtes par rapport à la cinétique du dépliement. De plus des effets comme l'agrégation lors des expériences peuvent rendre difficiles les comparaisons avec les simulations.

Augmenter la pression n'est donc pas un moyen efficace pour diminuer les barrières énergétiques et permettre d'observer des transitions conformationnelles dans les temps d'une simulation, d'autant plus qu'elle ralentit la cinétique. Une étude a été menée sur la metmyoglobine jusqu'à 12 kbar dans l'eau non explicite traitée comme un continuum caractérisé par une constante dépendant de la pression [73]. La protéine passe par un état 'molten globule' à 7 kbar avant de se dénaturer complètement, sans que l'on puisse distinguer si ce résultat vient de l'approximation importante de la fonction d'énergie du solvent ou l'absence de viscosité du solvent, connue pour augmenter avec la pression ralentissant ainsi la cinétique de dépliement.

Les simulations de protéines en solution montrent dans leur ensemble que les longueurs et les angles des liaisons dans la protéine sont légèrement déformés par la pression ce qui rend les interactions protéine-protéine moins favorables du point de vue énergétique à haute pression qu'à pression normale, contrairement aux interactions protéine-solvent, ce qui s'accompagne par l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre la protéine et le solvent [69].

La compressibilité des protéines a été l'objet de plusieurs études par simulation de dynamique moléculaire. Différentes méthodes existent pour déterminer le volume (comme le volume de Voronoi, le volume de van der Waals, le volume moléculaire, le volume exclu), qui ne prennent pas en compte les mêmes paramètres (notamment la question de l'eau d'hydratation), ce qui donne lieu à des évaluations de compressibilité différentes. Des simulations ont mis en évidence que les distances courtes sont moins comprimées que les distances longues [74], ce qui pourrait expliquer pourquoi les diverses techniques expérimentales, qui prennent en compte des échelles de distances différentes, fournissent des compressibilités parfois divergentes. De plus, différentes protéines simulées sous pression [74] montrent des profils de compressibilité variés : dans le lysozyme, les hélices α sont plus compressibles que le feuillet β, alors que dans

la barnase ces éléments, ainsi que les boucles, sont de compressibilité similaire. Dans le cas de la SOD (superoxyde dismutase), les structures la plus et la moins compressibles sont les 2 boucles que comporte la protéine, la moins compressible comportant des résidus importants pour l'activité catalytique de l'enzyme, suggérant que le site actif est en quelque sorte écranté vis-à-vis des effets de la pression par la déformation des régions avoisinantes [49]. Ces variations de compressibilité des divers éléments structuraux des protéines semblent donc être liées à l'architecture globale de la protéine plutôt qu'au type des éléments structuraux qui la composent.

Du point de vue de la dynamique, les simulations montrent que les fluctuations atomiques diminuent avec la pression, de la même façon que ce qui se passe en diminuant la température. Des simulations menées sur le BPTI à 5 kbar par Brunne et van Gunsteren [75] mettent en évidence que cet effet est plus important au niveau des chaînes latérales que pour la chaîne principale. Ils suggèrent également que la diminution de la mobilité moyenne n'est pas due à une forte baisse de la mobilité de quelques domaines mais à une légère diminution sur l'ensemble de la molécule. De plus, les fluctuations des angles dièdres du squelette sont presque nulles, mais sont légèrement réduites au niveau des chaînes latérales.

Des simulations de DM sous pression ont également servi dans le calcul de perméabilité de protéine membranaire [76] : une différence de pression hydrostatique est imposée de part et d'autre d'une membrane comprenant une aquaporine, protéine connue pour permettre le passage d'eau à travers la membrane. Le faible nombre de molécules d'eau ne permettait pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, mais la méthode est envisagée comme une alternative aux mesures expérimentales.

L'impossibilité de dénaturer les protéines dans les temps d'une simulation de dynamique moléculaire est plutôt un avantage dans le cadre de notre projet puisque nous ne nous intéressons pas à la dénaturation par la pression mais à son effet sur la structure native de la protéine.

1.7 Présentation du projet

La plupart des études par diffusion de neutrons menées sur des biomolécules se déroulent sur des poudres ou des gels. Dans notre travail, nous avons voulu rester plus proche des conditions physiologiques en étudiant une protéine en solution.

Le lysozyme a été choisi car il a fait l'objet de nombreux travaux de recherche expérimentale et théorique. De plus, la robustesse de cette protéine permet de monter en pression en évitant une destructuration de la structure. Ces raisons, parmi d'autres, font de cette protéine un système de choix pour l'étude que nous avons entreprise.

Nous avons choisi les techniques de diffusion quasiélastique de neutrons et la dynamique moléculaire (DM) car elles accèdent à des échelles de temps et d'espace comparables. Il est important d'utiliser les 2 approches en parallèle car elles se 'valident' mutuellement : la DM peut aider à comprendre les spectres obtenus en diffusion de neutrons, à identifier et caractériser le comportement dynamique de l'échantillon, et réciproquement les expériences apportent une validation ou non des méthodes de simulation, une confirmation ou non des données simulées. La combinaison des 2 techniques permet d'améliorer les modèles proposés pour décrire la dynamique des biomolécules.

Cette étude se place dans le cadre plus général de l'utilisation du paramètre pression pour caractériser le comportement dynamique de biomolécules, afin de mieux comprendre, par exemple, certains mécanismes enzymatiques. Le lysozyme n'est pas une molécule spécifiquement adaptée à la pression mais ces résultats pourront servir de référence dans la perspective de travaux similaires qui porteraient sur une protéine barophile dans le but notamment d'identifier des particularités de molécules d'organismes adaptés aux hautes pressions.

Ce mémoire présente tout d'abord les résultats relatifs aux effets de la pression obtenus à partir des simulations et des expériences de diffusion quasiélastique de neutrons menées sur Mibemol au Laboratoire Léon Brillouin et sur IN5 à l'Institut Laue Langevin. Nous verrons ensuite dans quelle mesure nous avons pu reconstituer le profil

du facteur de structure dynamique expérimental obtenu sur IN5, à partir des données simulées, et nous terminerons par l'évocation de modèles adaptés pour décrire la dynamique multi-échelle.

2 Matériels et méthodes

2.1 Simulations de dynamique moléculaire

2.1.1 Quelques éléments théoriques

L'utilisation de la DM en parallèle avec la diffusion neutronique se justifie par le fait que les domaines temporel (de l'ordre de la picoseconde jusqu'à la nanoseconde) et spatial (de 1 à une centaine d'Å) accessibles par les deux techniques sont les mêmes. De plus les objets pris en compte dans les simulations sont les noyaux, et ce sont eux qui sont responsables de la diffusion des neutrons. La spectroscopie neutronique donne une image moyenne de l'ensemble des contributions atomiques. L'analyse des spectres simulés par dynamique moléculaire apporte une information plus détaillée et permet d'étudier spécifiquement la dynamique d'un groupe d'atomes, et ceci sans l'introduction de modèle analytique. En outre, la comparaison avec les expériences de diffusion permet une validation du potentiel utilisé pour la simulation et du mode de calcul des fonctions de diffusion.

La DM sert à explorer les fluctuations et la dynamique des molécules, les forces et les mécanismes en jeu. Elle consiste à décrire d'un point de vue microscopique un système de particules placées dans un champ de forces pour permettre de simuler le comportement macroscopique de la matière. La fonction d'énergie utilisée ici est le champ de forces empirique d'Amber [77] de la forme :

$$\begin{aligned} U_{E.pot.} = & \sum_{\text{liaisons } ij} k_{ij}\left(r_{ij} - r_{ij}^{(0)}\right)^2 \\ & + \sum_{\text{angles } ijk} k_{ijk}\left(\phi_{ijk} - \phi_{ijk}^{(0)}\right)^2 \\ & + \sum_{\text{dihèdres } ijkl} k_{ijkl}\cos\left(n_{ijkl}\theta_{ijkl} - \delta_{ijkl}\right) \\ & \left.\begin{aligned} & + \textstyle\sum_{\text{paires } ij} 4\epsilon_{ij}\left(\left[\frac{\sigma_{ij}}{r}\right]^{12} - \left[\frac{\sigma_{ij}}{r}\right]^{6}\right) \\ & + \textstyle\sum_{\text{paires } ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \end{aligned}\right\} \text{non-liés} \end{aligned} \tag{1}$$

Il dépend des positions des atomes et décrit toutes les interactions atomiques, comprenant les interactions covalentes (liaisons, angles et angles dihèdres) ainsi que les interactions entre paires non liées (dues aux effets de volume exclu, des forces de dispersion et des forces électrostatiques). Les coefficients k_{ij}, $r_{ij}^{(0)}$, k_{ijk}, $\phi_{ijk}^{(0)}$, k_{ijkl}, n_{ijkl}, δ_{ijkl}, ϵ_{ij}, σ_{ij}, and q_i sont des paramètres obtenus en fittant des quantités simulées à des données expérimentales ou par calcul *ab initio*.

Les atomes sont considérés comme des masses ponctuelles dont la dynamique est décrite par la loi de Newton en mécanique classique :

$$m_\alpha \ddot{\mathbf{r}}_\alpha = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_\alpha} \qquad \begin{array}{l} m_\alpha : \text{masse} \\ \mathbf{r}_\alpha : \text{position} \end{array}$$

Afin de générer les trajectoires des positions et des vitesses, cette équation du mouvement est discrétisée puis l'intégration peut être effectuée selon l'algorithme de Verlet [78] :

$$\mathbf{R}_\alpha(n+1) = 2\mathbf{R}_\alpha(n) - \mathbf{R}_\alpha(n-1) + \frac{\Delta t^2}{M}\frac{\partial U}{\partial \mathbf{R}_\alpha}, \tag{2}$$

où Δt est le pas d'intégration. Les vitesses sont obtenues en divisant la différence des positions à $n+1$ et $n-1$ par $2\Delta t$:

$$\dot{\mathbf{R}}_\alpha(n) \approx \frac{\mathbf{R}_\alpha(n+1) - \mathbf{R}_\alpha(n-1)}{2\Delta t}. \tag{3}$$

Cette formulation classique de Verlet n'est pas appliquée directement de cette façon dans le cas de nos conditions de simulation : en effet, les simulations sont effectuées dans les conditions de l'ensemble isotherme-isobare NpT, c'est-à-dire où le nombre de particules N est constant, la pression P et la température T sont constamment réajustées par des variables d'échelle. Ces variables, qui modifient les vitesses (ajustement de la température) et le volume (ajustement de la pression) introduisent des degrés de liberté supplémentaires dans les équations du mouvement.

La température macroscopique est maintenue constante par l'algorithme de Nosé [79], la pression macroscopique par l'algorithme d'Andersen [80] :

- la méthode la plus simple pour stabiliser la température est de recalibrer les vitesses atomiques à chaque pas d'intégration pour maintenir l'énergie cinétique totale à $\frac{3}{2}k_BT$. Toutefois, cette approche n'est pas correcte d'un point de vue physique : la température est une quantité statistique, elle ne peut donc se définir que par une moyenne. L'approche de Nosé consiste à permettre à la température instantanée de fluctuer autour d'une moyenne $< T >$ constante, ceci en couplant la température à un bain thermique externe (la température devient une variable dynamique du système). Il a montré que cette approche correspond à une simulation dans l'ensemble NVT.
- Pour la pression, la méthode d'Andersen est d'ajuster les positions et les moments des particules en fonction du volume de la boîte de simulation, ceci en introduisant un couplage du système à une variable externe caractérisant ce volume. Ce couplage symbolise l'action qu'exercerait un piston sur le système.

La combinaison des méthodes de Nosé et d'Andersen permet d'effectuer des simulations dans l'ensemble NpT.

Pour un système microcanonique (classiquement simulé en DM), les positions $\mathbf{R}_\alpha$ et les quantités de mouvement $\mathbf{P}_\alpha$ $(\alpha = 1, ..., N)$ vérifient :

$$\dot{\mathbf{R}}_\alpha = \frac{\mathbf{P}_\alpha}{m_\alpha} \tag{4}$$

$$\dot{\mathbf{P}}_\alpha = \mathbf{F}_\alpha \tag{5}$$

$\mathbf{F}_\alpha$ est le gradient négatif du potentiel U.

Dans l'ensemble NpT précédemment décrit, les équations du mouvement de-

viennent :

$$\dot{\mathbf{R}}_\alpha = \frac{\mathbf{P}_\alpha}{m_\alpha} + \frac{\dot{V}}{3V}\mathbf{R}_\alpha \tag{6}$$

$$\dot{\mathbf{P}}_\alpha = \mathbf{F}_\alpha - \frac{\dot{V}}{3V}\mathbf{P}_\alpha - \zeta\mathbf{P}_\alpha \tag{7}$$

$$\dot{V} = \frac{p_V}{W_V} \tag{8}$$

$$\dot{p}_V = \frac{1}{3V}\left\{\sum_{\alpha=1}^{N}\frac{\mathbf{P}_\alpha^2}{2m_\alpha} - \sum_{\alpha=1}^{N}\mathbf{R}_\alpha\cdot\mathbf{F}_\alpha\right\} - p - \zeta p_V \tag{9}$$

$$\dot{\zeta} = \frac{1}{W_S}\left\{\sum_{\alpha=1}^{N}\frac{\mathbf{P}_\alpha^2}{2m_\alpha} + \frac{p_V^2}{2W_V} - (3N+1)k_BT\right\} \tag{10}$$

$\dot{V}/3V$ est la fluctuation relative du volume de la boîte (qui est une variable dynamique), p_V est la quantité de mouvement de V, p la pression souhaitée, ζ est une sorte de 'friction' (ce terme peut devenir négatif), W_S et W_V sont des pseudo-masses qui décrivent l'inertie du thermostat et du barostat, respectivement. En fonction de ces pseudo-masses, le système va corriger plus ou moins vite les variations de sa température et sa pression instantanées par rapport aux valeurs macroscopiques de celles-ci.

Aucune contrainte n'est imposée au système afin de ne pas nuire à la réalité thermodynamique.

Les simulations sont menées en conditions périodiques (figure 4) qui permettent de simuler un nombre relativement limité de particules qui sont néanmoins soumises à des forces se rapprochant de celles qui existent dans une solution réelle. Les interactions électrostatiques sont calculées par la sommation d'Ewald modifiée [81] : ces interactions à longue distance décroissent selon une loi en r^{-1} (équation 1) et posent un problème de rapidité et de convergence dans les simulations du fait de la taille réduite de la boîte. Au lieu d'introduire une troncature sphérique des distances interatomiques (cut-off), l'approche classique d'Ewald consiste à décomposer la somme coulombienne $\left(\sum_{\text{paires } ij}\frac{q_iq_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}\right)$ qui converge très lentement en une somme dans l'espace direct et une somme dans l'espace réciproque. En entourant chaque charge ponctuelle dans l'espace direct d'une distribution de charge gaussienne, contre-balancée dans l'espace réciproque par une distribution gaussienne de signe contraire, les 2 sommes convergent

rapidement. Wolf et al. [81] ont développé une méthode pour la sommation des interactions Coulombiennes, basée sur la neutralisation des interactions individuelles : une sommation est effectuée sur les charges comprises dans un espace sphérique de rayon R_c (cut-off) (premier terme dans l'équation 11). On y ajoute une interaction neutralisante où, pour chaque charge q_i la charge totale de l'environnement est calculée dans la sphère de rayon R_c et une charge égale de signe opposé est placée sur la surface de cette sphère, afin de réduire les effets du cut-off (second terme de l'équation 11). Cette expression peut aussi s'écrire sous forme d'un potentiel dit 'shifté' (il est nul en R_c, équation 13) moins un terme constant de correction (somme des carrés des charges) (équation 12).

$$E_{tot}^{exact} \approx \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\left(\sum_{\substack{j\neq i\\ r_{ij}<R_c}}\frac{q_iq_j}{r_{ij}} - \frac{q_i\Delta q_i(R_c)}{R_c}\right) \tag{11}$$

$$= \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\sum_{\substack{j\neq i\\ r_{ij}<R_c}} V_{sh}^{C}(r_{ij}) - \frac{1}{2R_c}\sum_{i=1}^{N} q_i^2 \tag{12}$$

avec

$$V_{sh}^{C}(r_{ij}) = q_iq_j\left(\frac{1}{r_{ij}} - \frac{1}{R_c}\right) \tag{13}$$

Wolf et al. ont montré que cette énergie converge précisément vers l'énergie exacte du système. De plus, Wolf et al. utilisent la constatation selon laquelle la sommation dans l'espace réciproque peut être négligée du fait de la courte portée des interactions coulombiennes dans les systèmes condensés. Le calcul se fait uniquement dans l'espace direct.

2.1.2 Méthode d'analyse des trajectoires

Les mouvements de translation et de rotation globaux sont soustraits avant le calcul des fonctions de corrélation.

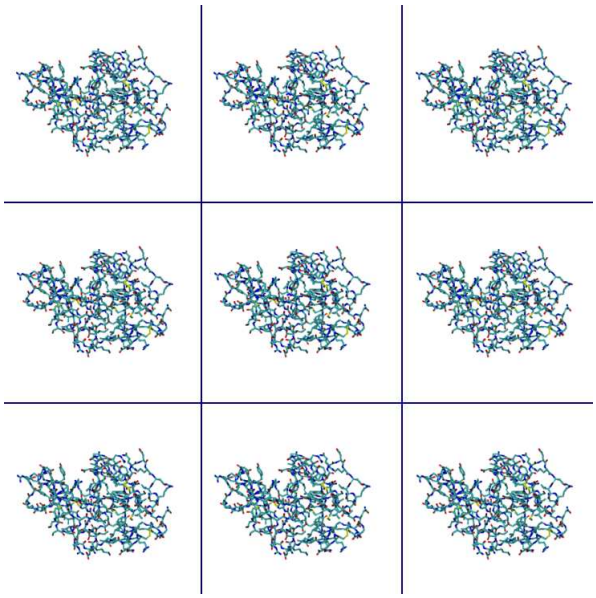

FIG. 4 – Schéma représentant une vue bidimensionnelle de la boîte de simulation. Quand une molécule quitte la cellule centrale, ses images dans les cellules voisines se déplacent de la même manière.

a/ Calcul classique - Les fonctions de corrélation à partir desquelles sont déduites les fonctions de diffusion théoriques sont calculées à partir des trajectoires grâce au programme d'analyse *n*Moldyn dont la toute dernière version est décrite dans [82]. Ce programme utilise des techniques efficaces basées sur l'algorithme de la transformée rapide de Fourier [83] pour le calcul des fonctions de corrélations temporelles. *n*Moldyn a été conçu principalement afin de pallier à l'absence d'outils spécifiquement dédiés à l'analyse des trajectoires de simulations numériques en relation avec la diffusion de neutrons. En outre, ce logiciel permet le calcul d'autres quantités comme le MSD (déplacement carré moyen), les densités d'état, les mouvements de corps rigides.

La fonction de corrélation de deux séries dans le temps $A(k)$ et $B(k)$ est évaluée selon :

$$C_{ab}(m) = \frac{1}{N_t - m} \sum_{k=0}^{N_t-m-1} A(k)B(k+m) \tag{14}$$

avec N_t le nombre total de configurations de la trajectoire. L'utilisation d'une FFT permet ici de calculer la fonction de corrélation avec un nombre d'opérations non plus

$\propto N^2$ mais $\propto Nlog_2(N)$.

Le facteur de structure dynamique est obtenu numériquement par une transformée de Fourier de la fonction de corrélation de la variable dynamique $\exp[-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{R}_i(t)]$ (pour simplifier on parle ici d'un seul atome i). Cette opération doit être combinée à un lissage par une fenêtre afin d'obtenir une meilleure estimation du spectre [84] :

$$\tilde{C}\left(\frac{n}{2N_t}\right) = \Delta t \cdot \sum_{m=-(N_t-1)}^{N_t-1} \exp\left[-2\pi i\left(\frac{nm}{2N_t}\right)\right] F(m)\,\frac{1}{N-|m|}\,C(m) \tag{15}$$

$\tilde{C}(n/2N_t)$ est le spectre de la fonction de corrélation $C(m)$ et $F(m)$ est la fenêtre de lissage. Plusieurs types de fenêtres peuvent être utilisés en fonction du cas étudié. Ici, nous avons utilisé une fenêtre gaussienne [82] :

$$F(m) = \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\alpha\,\frac{|m|}{N_t-1}\right)^2\right], m = -(N_t-1)...N_t-1 \tag{16}$$

Ce choix est assez arbitraire et est motivé par la facilité de manipulation de la Gaussienne (on peut imposer sa largeur d'après la résolution utilisée lors des expériences).

Si $T = (N_t - 1)\cdot\Delta t$ est la longueur de la simulation, la largeur de la fenêtre est $\sigma_t = T/\alpha$ en temps et $\sigma_\nu = 1/\sigma_t$ en fréquences.

Un descripteur qui rend compte de la dynamique et des amplitudes des mouvements est le déplacement carré moyen $W(t)$ défini comme suit :

$$W(t) = \langle[\mathbf{R}(t) - \mathbf{R}(0)]^2\rangle \tag{17}$$

Le déplacement carré moyen du système simulé est calculé par nMoldyn selon l'expression suivante :

$$W(m) \simeq \frac{1}{N_t - m}\sum_{k=0}^{N_t-m-1}\Big(\mathbf{R}(k+m) - \mathbf{R}(k)\Big)^2 \tag{18}$$

Pour une particule en diffusion libre, le déplacement carré moyen est relié au coefficient de diffusion D par la relation :

$$\lim_{t\to\infty} W(t) = 6Dt \tag{19}$$

b/ Modèle autorégressif - Il est possible dans *n*Moldyn d'appliquer une autre méthode connue pour permettre une estimation de spectre à partir de données dynamiques, la méthode dite du maximum d'entropie [85]. Elle permet d'éviter le passage par une transformation de Fourier (calcul classique) qui suppose l'intervention du lissage par une fenêtre, opération ayant pour conséquence de diminuer la qualité et la précision du spectre final. Ce modèle donne en outre la possibilité de déterminer la fonction mémoire, en utilisant un algorithme numérique adapté au calcul de cette fonction dans le cadre des simulations de DM, récemment publié [86] : les fonctions de diffusion théoriques présentées dans la suite sont obtenues à partir de ce modèle autorégressif.

L'estimation spectrale est obtenue en ajustant des processus autorégressifs avec des données observées dans le temps. Prenons le cas général du signal discret d'une variable dynamique quelconque $u(t) \equiv u(n\Delta t)$. Le modèle pour le signal en question est le suivant :

$$u(t) = \sum_{n=1}^{P} a_n^{(P)} u(t - n\Delta t) + \epsilon_p(t) \tag{20}$$

où P est l'ordre du modèle (nombre de pôles), Δt est le pas d'échantillonnage, $a_n^{(P)}$ sont des coefficients réels à déterminer et $\epsilon_p(t)$ est le 'bruit blanc' gaussien de moyenne nulle et de variance σ_P^2.

Les coefficients $a_n^{(P)}$ sont ajustés aux données simulées en utilisant l'algorithme de Burg [87].

La variance est obtenue par l'opération suivante :

$$\sigma_P^2 = 1 - \sum_{n=1}^{P} a_n^{(P)} \, \psi(n\Delta t) \tag{21}$$

où $\psi(t)$ est la fonction d'autocorrélation de la variable dynamique normalisée :

$$\psi(t) := \frac{\langle u(t)u(0)\rangle}{\langle u^2(0)\rangle} \tag{22}$$

On utilise la transformée en z de la fonction $\psi(t)$ définie par $\Psi(z) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \psi(n) z^{-n}$ avec n entier. Le modèle autorégressif de cette fonction est de la forme (multipôle) :

$$\Psi^{AR}(z) = \frac{\sigma_P^2}{\left(1 - \sum_{k=1}^{P} a_k^{(P)} z^{-k}\right)\left(1 - \sum_{l=1}^{P} a_l^{(P)} z^{l}\right)} \tag{23}$$

Une caractéristique importante de la fonction d'autocorrélation estimée est sa forme multiexponentielle :

$$\psi(n\Delta t) = \sum_{k=0}^{P} \beta_k z_k^{|n|} \tag{24}$$

où $n \in \mathbb{N}$ et z_k sont les racines du polynôme caractéristique $p(z) = z^P - \sum_{k=1}^{P} a_k\, z^{p-k}$. Les constantes $\{\beta_k\}$ sont calculées à partir des racines du polynôme, $\{z_k\}$:

$$\beta_k = \frac{1}{a_p^{(P)}} \frac{-z_k^{P-1}\sigma_P^2}{\prod_{j=1, j\neq k}^{P}(z_k - z_j)\ \prod_{l=1}^{P}(z_k - z_l^{-1})} \tag{25}$$

Pour obtenir le modèle autorégressif du spectre $S_{AR}(\mathbf{q}, \omega)$, il suffit de poser dans l'équation 23 $z = \exp[i\omega\Delta t]$. Les coefficients $a^{(P)}$ et la variance σ sont des fonctions de $\mathbf{q}$.

On rappelle que cette méthode d'estimation de spectre est utilisée pour éviter le passage par la transformée de Fourier et la perte d'information du fait de l'application inévitable d'une fenêtre de lissage. Nous verrons que cette méthode du maximum d'entropie permet aussi d'obtenir la fonction mémoire de la fonction d'autocorrélation de la variable dynamique choisie [86].

Appliquer le modèle autorégressif revient à ajuster les données simulées avec une superposition d'exponentielles dont le nombre correspond au nombre de pôles du modèle (relation 24).

Le graphique 5 montre que la fonction d'autocorrélation des vitesses calculée à partir du modèle autorégressif est très semblable à celle déterminée par calcul direct d'après la relation 14.

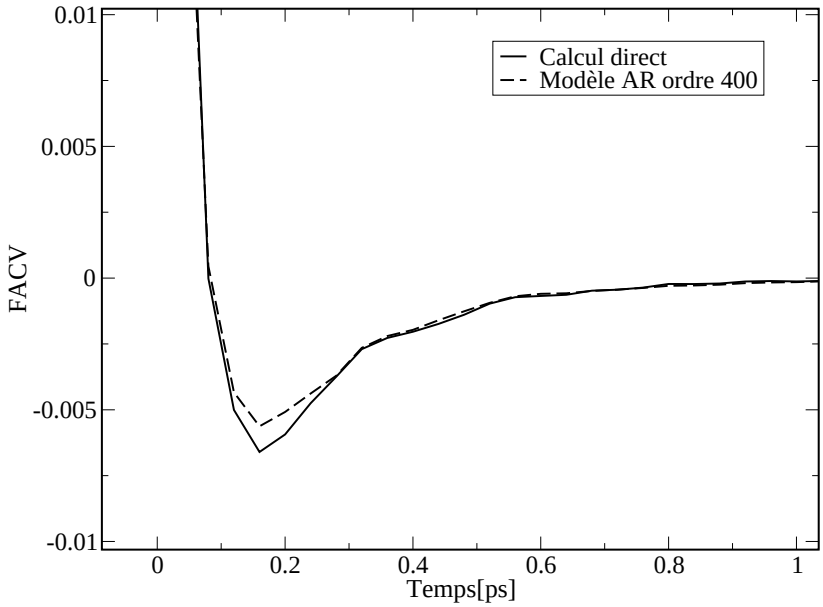

FIG. 5 – Fonction d'autocorrélation des vitesses à partir du calcul direct et du modèle autorégressif.

2.2 La diffusion de neutrons

2.2.1 Propriétés du neutron

La spectroscopie neutronique constitue un outil puissant dans l'étude des propriétés structurales et des processus dynamiques de la matière condensée. Les neutrons interagissent directement avec les noyaux via le potentiel de Fermi de très courte portée [88]. Leur énergie à 300K, de l'ordre de 25 meV, est comparable à celle des barrières rotationnelles et correspond à une longueur d'onde de $\lambda = 1.78\,\text{Å}$ qui est de l'ordre de grandeur des distances interatomiques typiques dans les solides et les liquides. La fenêtre de temps accessible est d'environ 100 femtosecondes à 1 nanoseconde, ce qui permet d'obtenir des informations sur certains processus diffusifs.

2.2.2 L'expérience de diffusion

Le schéma général d'une expérience de diffusion peut se représenter comme suit :

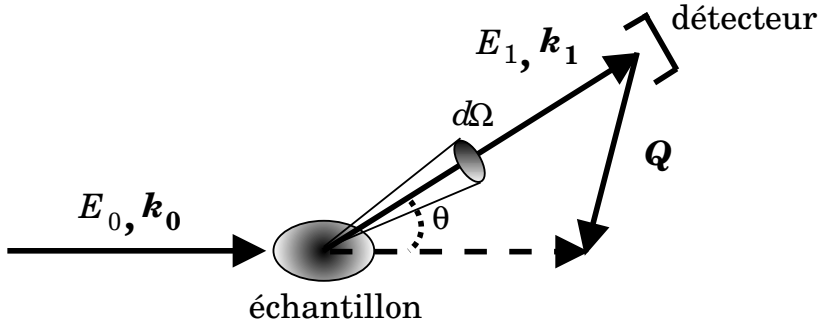

FIG. 6 – Schéma général d'une expérience de diffusion de neutrons.

Un faisceau de neutrons monochromatiques incident de vecteur d'onde $\mathbf{k_0}$ et d'énergie E_0 interagit avec l'échantillon. Les neutrons diffusés par celui-ci sont caractérisés par un vecteur d'onde $\mathbf{k_1}$ et une énergie E_1 [89, 88].

L'expérience de diffusion permet d'accéder à la section efficace différentielle de diffusion donnant la probabilité qu'un neutron incident de vecteur d'onde k_0 soit diffusé avec un vecteur d'onde k_1 dans un angle solide élémentaire $\mathrm{d}\Omega$ autour de la direction de k_1 et avec un transfert en énergie de $\mathrm{d}\omega$:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{|\mathbf{k_1}|}{|\mathbf{k_0}|}\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) \tag{26}$$

La fonction $\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega)$ est le facteur de structure dynamique qui contient les informations d'intérêt dans notre étude de la dynamique du système. Ici, $\mathbf{q}$ et ω sont, respectivement, le vecteur de diffusion, différence entre $\mathbf{k_0}$ et $\mathbf{k_1}$, correspondant au transfert de moment

$$\mathbf{q} = \mathbf{k_0} - \mathbf{k_1} \tag{27}$$

et le transfert d'énergie (en unité de $\hbar$)

$$\Delta E = E_0 - E_1 = \hbar\omega = \frac{\hbar^2}{2m_n}(\mathbf{k_0}^2 - \mathbf{k_1}^2) \tag{28}$$

La formulation choisie ici correspond à une perte d'énergie du neutron lors de l'interaction avec le système.

Pour accéder au facteur de structure dynamique, on l'écrit sous la forme de sa transformée de Fourier, la fonction intermédiaire de diffusion $\mathcal{F}(\mathbf{q},t)$:

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\ \exp(-i\omega t)\mathcal{F}(\mathbf{q},t) \tag{29}$$

$\mathcal{F}(\mathbf{q},t)$ peut se décomposer en une partie cohérente et une partie incohérente :

$$\mathcal{F}(\mathbf{q},t) = \mathcal{F}_{coh}(\mathbf{q},t) + \mathcal{F}_{inc}(\mathbf{q},t) \tag{30}$$

L'intensité de l'interaction noyau-neutron est définie par la longueur de diffusion b qui dépend de l'espèce chimique et de l'isotope de l'élément. La moyenne $< b_\alpha >$ pour une espèce chimique α sur tous les isotopes et états de spin présents dans le système diffuseur est la longueur de diffusion cohérente $b_{\alpha,coh}$. L'écart quadratique moyen de b_α à $< b_\alpha >$ définit la longueur de diffusion incohérente. La section efficace différentielle totale d'un atome α est reliée aux longueurs de diffusion cohérente et incohérente par la relation :

$$\sigma_{\alpha,tot} = 4\pi\left(b_{\alpha,coh}^2 + b_{\alpha,inc}^2\right) \tag{31}$$

Les parties cohérente et incohérente de la fonction intermédiaire de diffusion sont définies comme suit :

$$\mathcal{F}_{coh}(\mathbf{q},t) = \sum_{\alpha,\beta} b_{\alpha,coh}b_{\beta,coh}\left\langle \exp\Big(i\mathbf{q}^T\cdot\mathbf{R}_\beta(t)\Big)\exp\Big(-i\mathbf{q}^T\cdot\mathbf{R}_\alpha(0)\Big)\right\rangle \tag{32}$$

$$\mathcal{F}_{inc}(\mathbf{q},t) = \sum_{\alpha} b_{\alpha,inc}^2\left\langle \exp\Big(i\mathbf{q}^T\cdot\mathbf{R}_\alpha(t)\Big)\exp\Big(-i\mathbf{q}^T\cdot\mathbf{R}_\alpha(0)\Big)\right\rangle \tag{33}$$

Les crochets désignent une moyenne thermique. La diffusion cohérente dépend des corrélations au cours du temps entre les positions d'un même atome (auto-corrélations) d'une part et d'atomes différents d'autre part (corrélations croisées) 'révélant' les mouvements collectifs. Ces phénomènes d'interférence apportent donc une information à la fois structurale et dynamique. La diffusion incohérente décrit seulement les auto-corrélations entre les positions d'un atome, ce qui renseigne sur la dynamique du système uniquement.

Isotope	b_{coh}(fm)	b_{inc}(fm)	σ_{coh}(barn)	σ_{inc}(barn)
^{1}H	-3.74	25.22	1.76	**79.91**
^{2}H	6.67	4.03	5.6	**2.04**
^{12}C	6.65	0	5.56	0
^{14}N	9.37	1.98	11.03	0.49
^{16}O	5.08	0	4.23	0
^{32}S	2.80	0	0.99	0

TAB. 2 – Valeurs de diffusion cohérente et incohérente des principaux isotopes d'intérêt.

Le module $|\mathbf{q}|$ du vecteur transfert de moment est relié au transfert d'énergie $\hbar\omega$ par la relation :

$$|\mathbf{q}| = k_0\sqrt{2 - \frac{\hbar\omega}{E_0} - 2\sqrt{1 - \frac{\hbar\omega}{E_0}}\cos\theta} \tag{34}$$

Comme le montre le tableau 2, la section efficace incohérente de l'atome d'hydrogène est très supérieure à celles des autres éléments, c'est cette diffusion incohérente de l'hydrogène qui dominera dans le signal. Cette propriété est un avantage de deux points de vue : l'hydrogène constituant près de 50% des atomes des macromolécules biologiques, la diffusion observée nous renseigne sur la dynamique de l'ensemble de la molécule. D'autre part, il est possible de créer un contraste entre une macromolécule et son milieu en utilisant du tampon deutéré.

2.2.3 La diffusion incohérente

L'hydrogène constituant l'élément majoritaire des protéines, on peut faire l'approximation suivante :

$$\mathcal{F}(\mathbf{q}, t) \approx N\, b_{H,inc}^2\, \mathcal{F}_H(\mathbf{q}, t) \tag{35}$$

avec

$$\mathcal{F}_H(\mathbf{q}, t) = \frac{1}{N}\sum_{\alpha\in\{H\}} \langle \exp(i\mathbf{q}^T \cdot [\mathbf{R}_\alpha(t) - \mathbf{R}_\alpha(0)])\rangle \tag{36}$$

et le facteur de structure dynamique correspondant :

$$\mathcal{S}_H(\mathbf{q},\omega) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} dt\ \exp(-i\omega t)\,\mathcal{F}_H(\mathbf{q},t) \tag{37}$$

C'est cette quantité qui est mesurée dans les expériences de diffusion de neutrons en temps de vol et sur laquelle nous avons travaillé. A partir des simulations, elle est obtenue grâce au modèle autorégressif qui a été décrit précédemment.

Un spectre typique obtenu par un spectromètre de type temps de vol peut se représenter comme suit :

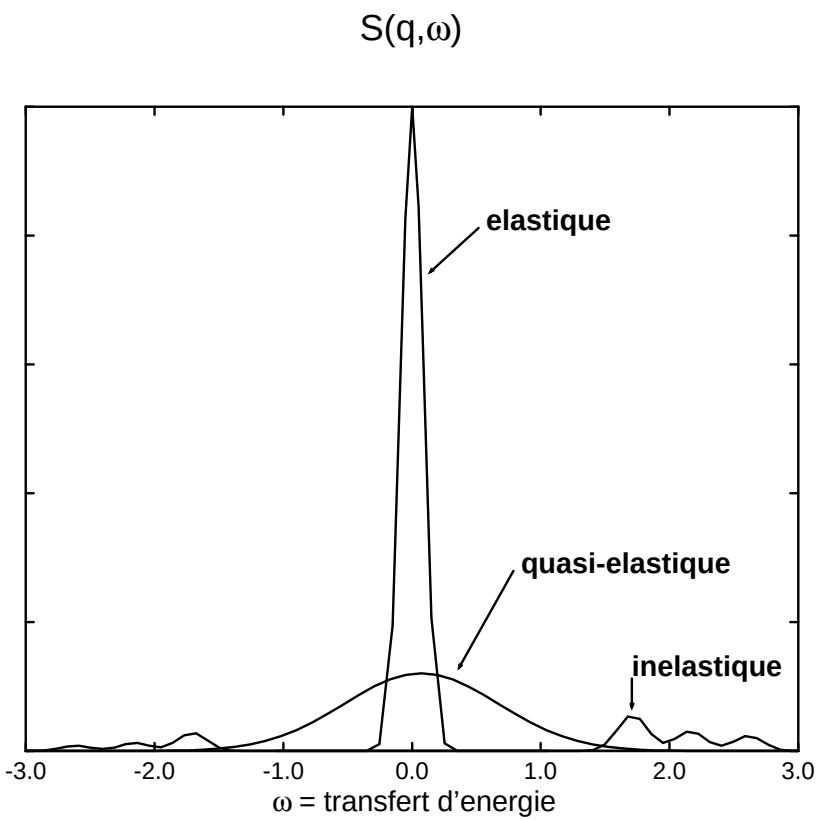

FIG. 7 – Représentation schématique d'un spectre de diffusion, source : [90].

On peut distinguer 3 régions dans un spectre de diffusion incohérente en fonction de l'énergie :

– le pic élastique : les neutrons n'ont pas échangé d'énergie avec le système,

– la diffusion quasiélastique : elle est centrée sur $\omega = 0$ et décrit des mouvements aléatoires (réorientations et translations),
– la diffusion inélastique : elle est due aux modes vibrationnels.

La diffusion quasiélastique se situe dans la région de la distribution en énergie des neutrons qui correspond à de faibles transferts d'énergie avec les atomes, de l'ordre de +/- $2\,meV$, caractéristiques de mouvements se déroulant sur une échelle de temps d'environ 10^{-10} à 10^{-12} s. Il en résulte un élargissement du pic élastique, dont la forme nous renseigne sur la nature des mouvements impliqués.

2.2.4 Densité d'états

La densité d'états $G(\omega)$ est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation des vitesses $C_{vv}(t)$:

$$G(\omega) = \int_0^\infty dt\ \cos(\omega t) C_{vv}(t) \tag{38}$$

avec $C_{vv}(t) =< v(0)v(t) >$.

Elle peut être obtenue à partir du facteur de structure dynamique par la relation :

$$G(\omega) = \lim_{q \to 0} \frac{\omega^2}{q^2} S(q, \omega) \tag{39}$$

Elle est reliée au déplacement carré moyen $W(t)$ par [91] :

$$W(t) = \frac{12}{\pi} \int_0^\infty d\omega\, \frac{(1 - \cos \omega t)}{\omega^2}\, G(\omega) \tag{40}$$

Nous verrons que l'analyse de la densité d'états des trajectoires apporte des informations importantes sur les effets de la pression sur la dynamique de la protéine.

2.2.5 Facteur de structure élastique incohérent (EISF)

La fonction de diffusion intermédiaire $\mathcal{F}_H(\mathbf{q}, t)$ peut se décomposer en un terme indépendant du temps et un terme temporel :

$$\mathcal{F}_H(\mathbf{q}, t) = \mathcal{F}'_H(\mathbf{q}, t) + \mathcal{F}_H(\mathbf{q}, \infty) \tag{41}$$

En effet, dans un système tel qu'une protéine, les mouvements diffusifs internes des atomes sont par définition confinés dans l'espace. Par conséquent, au temps infini, la corrélation de $\mathbf{R}_\alpha(0)$ et $\mathbf{R}_\alpha(t)$ devient indépendante du temps. La fonction de diffusion tend vers un plateau appelé facteur de structure élastique incohérent :

$$EISF(\mathbf{q}) = \lim_{t\to\infty} \mathcal{F}_H(\mathbf{q}, t) \tag{42}$$

Le facteur de structure dynamique s'écrit alors :

$$\mathcal{S}_H(\mathbf{q}, \omega) = EISF(\mathbf{q})\delta(\omega) + \mathcal{S}'_H(\mathbf{q}, \omega) \tag{43}$$

La première partie correspond à la partie purement élastique de $\mathcal{S}_H(\mathbf{q}, t)$, représentée par la distribution de Dirac $\delta(\omega)$, de largeur nulle et d'intégrale finie. Cette ligne élastique idéale n'est jamais atteinte du fait de la résolution finie de l'instrument de mesure, donc le pic élastique présente un profil (triangle, gaussienne ou lorentzienne) et une largeur caractéristiques de l'appareil. Le deuxième terme contient toute l'information dynamique, à savoir les spectres quasi-élastique et inélastique.

La définition de $\mathcal{S}_H(\mathbf{q}, \omega)$ permet d'écrire $\int_{-\infty}^{+\infty} d\omega\, \mathcal{S}(\mathbf{q}, \omega) = \mathcal{F}(\mathbf{q}, 0) = 1$, avec une normalisation des longueurs de diffusion b. D'après la relation (43) on peut écrire :

$$EISF(\mathbf{q}) + \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega\, \mathcal{S}'_H(\mathbf{q}, \omega) = 1 \tag{44}$$

Il apparaît que la création d'un mouvement, qui se traduit par une augmentation de $\mathcal{S}'_H(\mathbf{q}, \omega)$ est accompagnée par une diminution équivalente de l'EISF.

A partir des simulations, le calcul de l'EISF d'après sa définition décrite précédemment (limite à l'infini de la fonction intermédiaire de diffusion) est rendu difficile du fait d'une mauvaise statistique dans les fonctions de corrélation pour les temps longs (les simulations ont une longueur finie). L'EISF est donc obtenu d'après l'équation :

$$EISF(\mathbf{q}) = \frac{1}{N} \sum_\alpha {b^2}_{\alpha,inc} \langle |\exp[i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_\alpha]|^2 \rangle \tag{45}$$

L'EISF décrit l'ensemble des positions que peut atteindre l'atome diffuseur pendant un temps infini, donnant ainsi des informations sur le volume exploré dans l'espace des configurations. Ce terme disparait pour des liquides ou tous systèmes dans lesquels les mouvements atomiques ou moléculaires ne sont pas confinés.

Le facteur de structure dynamique théorique est purement quasi-élastique puisque son calcul est effectué indépendamment des contributions élastiques. Les mouvements internes seuls peuvent être pris en compte, ce qui permet de déterminer un EISF.

2.3 Protocole des simulations et des expériences de diffusion de neutrons menées sous pression

2.3.1 Simulation de dynamique moléculaire

a/ Préparation du système simulé en dynamique moléculaire - La conformation de départ est issue de la Protein Data Bank (193L). La boîte d'eau est construite de la manière suivante : on évalue la taille de la boîte que l'on souhaite obtenir par rapport à celle de la molécule à simuler. Cette longueur de côté est multipliée par un facteur 5. On place autour de la protéine les molécules d'eau de façon aléatoire (les éventuelles superpositions sont corrigées, mais elles sont peu probables du fait de la forte dilution du système). Les molécules étant réparties dans un très grand volume, la pression est faible. Les dimensions de la boîte sont ensuite petit à petit raccourcies jusqu'à l'obtention de la taille initiale. A chaque pas une minimisation d'énergie est effectuée ainsi qu'une courte simulation de DM. La taille de la boîte obtenue finalement est 6.16 x 4.19 x 4.61 nm^3.

Enfin, le système est équilibré par une simulation de DM à pression et température constantes afin d'obtenir l'état thermodynamique désiré le plus stable possible. La charge globale du système est nulle (le contraire amènerait l'ensemble à une instabilité). Il est bien évident que les conditions de simulation ne peuvent pas être identiques à celles qui existent dans l'expérience *in vivo* décrites plus loin (page 53). Par exemple, la notion de pH n'existe pas car le système est trop petit pour atteindre le nombre de molécules d'eau minimal pour définir un pH. Dans les expériences, le pH est de 4.6. A ce pH, le lysozyme possède environ 11 charges positives, ce qui n'est pas rendu dans les simulations du fait de la sommation d'Ewald qui rend le système implicitement neutre. Le tampon n'est pas simulé lui non plus mais le nombre de molécules de tampon dans l'échantillon est très petit par rapport à celui des molécules d'eau.

Le modèle de molécule d'eau est le TIP3P adapté à Amber ([77] et références citées) : pour les interactions électrostatiques, les atomes possèdent une charge partielle, avec

compensation des 2 charges positives des atomes d'hydrogène par la charge négative de l'oxygène. S'agissant des interactions de van der Waals entre 2 molécules d'eau, elles sont calculées par la fonction de Lennard-Jones en assimilant chaque molécule à un point centré sur l'atome d'oxygène. Les atomes d'hydrogène ne sont pas impliqués dans des interactions van der Waals dans ce modèle.

Le système est constitué d'une molécule de lysozyme (1960 atomes) et de sa boîte d'eau comprenant 3403 molécules, soit un total de 12169 atomes (figure 8).

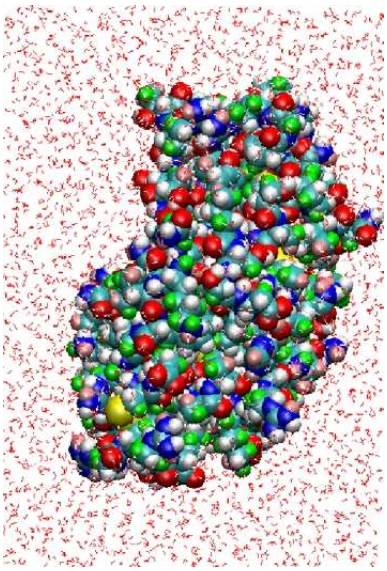

FIG. 8 – Représentation du lysozyme dans sa boîte d'eau.

b/ Expérience de dynamique moléculaire - Le pas d'intégration choisi est de 1 fs. La procédure, à partir de la conformation d'origine, se déroule de la manière suivante :

- minimisation d'énergie : à partir de la conformation cristallographique, les atomes d'hydrogène sont ajoutés d'après des critères géométriques simples. La structure contient des points de gêne stérique et de tension structurale qu'il faut éliminer par une étape de minimisation d'énergie.
- équilibration : après la minimisation, les atomes ne possèdent aucune énergie cinétique, le système est gelé. Durant l'équilibration, la température est augmentée par palier. Des vitesses sont attribuées aux atomes de telle sorte que l'ensemble

soit à la température du palier courant, puis le système s'équilibre grâce, au besoin, à des réajustements des vitesses atomiques, avant de passer au palier suivant.

– production : une fois le système ainsi stabilisé la simulation peut alors commencer. On stocke les coordonnées toutes les 40 fs et la longueur des trajectoires générées est de 1 ns.

2.3.2 Expériences de diffusion des neutrons

a/ Préparation des échantillons - Des études sur la solubilité du lysozyme en fonction de la température, de la concentration, du pH et de la force ionique du tampon montrent que, en milieu hydrogéné, la solubilité est maximale à pH 4.5 et à une température comprise entre 20 et 25 °C, et elle diminue avec l'augmentation de la force ionique [92]. De plus, des expériences par diffusion des rayons X aux petits angles sur le lysozyme en solution [93] montrent qu'à pH 4.5, en présence de 50 mM de tampon acétate et à 300K le lysozyme est sous forme monomérique à faible concentration. L'augmentation de celle-ci (dans l'étude, elle est poussée jusqu'à 100 mg/ml) la solution reste monomérique tant que la teneur en sels est assez basse pour maintenir des interactions lysozyme-lysozyme répulsives (les particules ont tendance à se séparer les unes des autres). A ce pH, le lysozyme, dont le point isoélectrique est situé à pH 11.5, possède à sa surface un excédent de 11 charges positives qui rendent compte des effets intermoléculaires répulsifs, écrantées par l'ajout de sels. Il est observé par diffusion de neutrons aux petits angles que les interactions sont d'autant plus répulsives que la température est haute et la concentration en sels est réduite [94]. En outre, il faut tenir compte du fait que nous sommes en tampon deutéré, donc la solubilité de la protéine est moindre : la température de solubilité en eau lourde est supérieure de 7°C à celle en eau légère. La solubilité de la protéine est donc moins importante dans un environnement deutéré. Ceci est en accord avec l'observation que les interactions lysozyme-lysozyme sont plus attractives dans D2O [94].

Toutefois, il a fallu trouver un compromis entre la solubilité de la protéine et la quantité de matière nécessaire pour détecter la contribution des hydrogène de la protéine dans le signal spectral. En effet, le flux des appareils utilisés, le nombre de mesures à effectuer (solution, tampon, cellule seule, vanadium) et les temps de faisceau à disposition, en ajoutant la faible intensité supposée des effets attendus, nous contraignaient à utiliser des concentrations élevées.

Les conditions de concentration, pH, température et force ionique sont choisies à partir d'une étude par diffusion de la lumière menée sur le lysozyme en solution sous pression [32]. Le lysozyme est initialement sous forme de poudre lyophilisée achetée dans le commerce avec une pureté de 95%. Afin de ne pas risquer d'abimer la protéine, nous avons choisi de ne pas la purifier davantage ni d'ajouter des étapes intermédiaires trop nombreuses. La poudre est dissoute dans du tampon acétate deutéré 50 mM, pH 4.6 (cette valeur prend en compte la correction de la valeur affichée par le pHmètre à laquelle on doit ajouter 0.41 pour obtenir l'acidité réelle de la solution). La solution est ensuite dialysée contre un grand volume de tampon deutéré, pendant 3 jours afin d'échanger les atomes d'hydrogène labiles de la protéine, essentiellement situés en surface. Une centrifugation à 25000g pendant 2 heures est pratiquée afin d'éliminer les éventuels agrégats (aucun culot ne s'est formé à l'issue de ce traitement). La solution ainsi obtenue est conservée à température ambiante afin d'éviter une déstabilisation de l'état soluble de la protéine. La concentration finale est de 75 mg/ml pour l'expérience sur Mibemol, et de 60 mg/ml pour IN5.

Les données de la littérature nous donnent à penser que ces conditions sont correctes : d'une part l'expérience en DLS [32] a été conduite avec une concentration de 80 mg/ml et aucune agrégation n'a été décelée par cette mesure. Cette étude se passe en tampon hydrogéné mais notre concentration est inférieure. D'autre part, nous avons pu soumettre le premier échantillon, à 75 mg/ml, à des mesures qualitatives en DLS avant l'expérience sous pression et ces mesures ont montré une bonne qualité de la dispersion. D'autre part, une brève montée en pression préalable au début de l'acquisition a été effectuée, donc s'il existait des agrégats dans la solution ils ont été dispersés : en

effet, il a été montré que la pression, en-dessous du seuil de dénaturation comme dans notre cas, a pour effet de séparer les protéines agglomérées.

b/ Spectromètres à temps de vol - Par ce type d'instruments, on mesure la fonction de diffusion $S(\mathbf{q}, \omega)$. Ces spectromètres sont typiquement utilisés pour l'étude de la diffusion quasi-élastique dans les solides, les liquides, les cristaux moléculaires et la diffusion inélastique pour des petits transferts d'énergie. Le choix de l'appareil utilisé et de sa configuration se base sur les temps et les distances caractéristiques des phénomènes dynamiques étudiés. Notre système est une protéine en solution et nous nous intéressons aux effets de la pression sur ses mouvements internes. Il nous fallait donc un spectromètre de résolution assez réduite pour éviter la contribution dans le signal des mouvements diffusifs des molécules entières. En effet, plus la résolution de l'appareil utilisé est mauvaise, moins les mouvements lents sont détectés. Ils seront noyés dans le pic élastique. Toutefois, la résolution devait permettre de couvrir une gamme d'énergie assez grande pour prendre en compte au maximum le large panel de temps de relaxation des mouvements internes de la protéine.

-MIBEMOL

Mibemol est installé à l'extrêmité du guide G6 du réacteur Orphée au Laboratoire Léon Brillouin à Saclay. Une représentation schématique de l'appareil est présentée fig. 9.

Pour accéder à la fonction de diffusion, il est nécessaire de connaître l'énergie incidente et l'énergie après diffusion par l'échantillon. Pour les déterminer, le principe de la spectrométrie à temps de vol consiste à mesurer le temps mis par les neutrons pour parcourir une distance donnée. Pour ce faire, 6 disques à fente en rotation, les choppers représentés sur la figure 11, sont placés juste en amont de l'échantillon sur le parcours des neutrons. En ajustant leurs vitesses de rotation, il est possible de sélectionner à partir du faisceau monochromatique des bouffées de neutrons de la longueur d'onde, donc de l'énergie, souhaitée. L'échantillon se trouve dans une enceinte où circule de

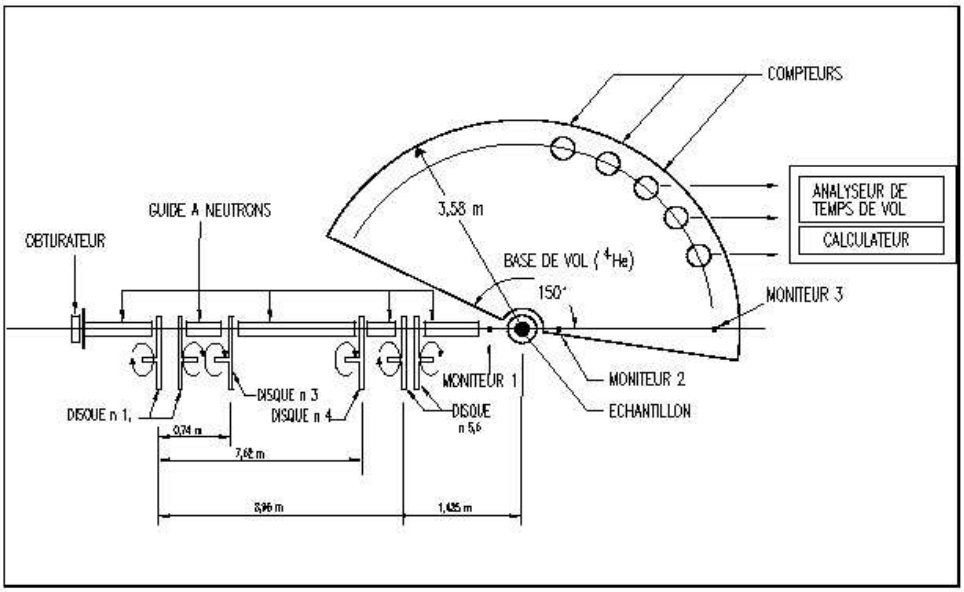

FIG. 9 – Schéma du spectromètre Mibemol.

l'hélium afin d'éliminer la diffusion par l'air et la vapeur d'eau. Des détecteurs contenant de l'hélium 3 sont placés à une distance d de l'échantillon dans une pièce remplie d'hélium, à un angle compris entre 23.5° et 142.7° par rapport au faisceau incident (un descriptif de ces angles est placé en annexe).

Sont ainsi connus l'instant d'origine du parcours des neutrons, leur énergie incidente, et les distances chopper-échantillon-détecteurs. En mesurant le temps mis par les neutrons pour atteindre les détecteurs, on accède à l'énergie finale des neutrons diffusés par l'échantillon. La connaissance des angles et des temps de vol permet d'analyser les transferts de moment $\mathbf{q}$ et d'énergie $\hbar\omega$ des neutrons.

La résolution de ce spectromètre permet d'accéder à des transferts d'énergie compris entre 0.01 et 10 meV, elle ne permet pas de détecter des temps de corrélations très longs. Les mouvements que l'appareil peut 'voir' sont relativement rapides (entre 0.1 et 100 ps), ce sont notamment les mouvements de type diffusif que nous voulons étudier.

-IN5

Le spectromètre à temps de vol est installé sur le guide H16 à l'Institut Laue Langevin de Grenoble, dont la résolution en énergie va de 0.01 à quelques meV. La figure 10 est une représentation schématique de l'instrument.

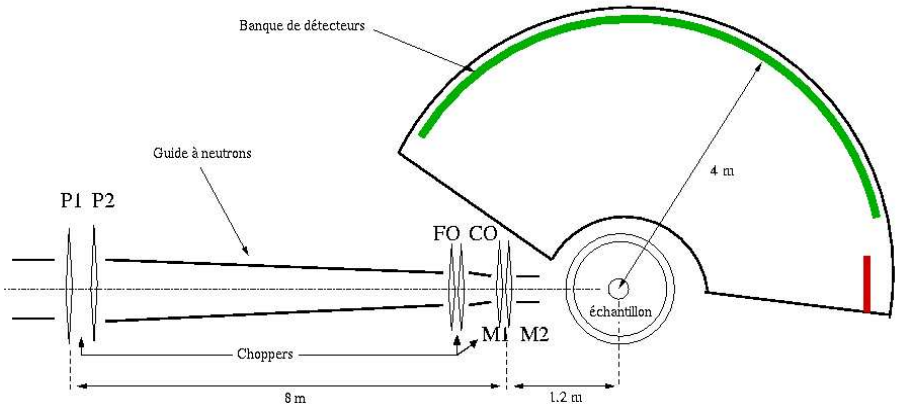

FIG. 10 – Schéma du spectromètre IN5.

La figure 11 donne une représentation de la disposition des 4 choppers et des détecteurs.

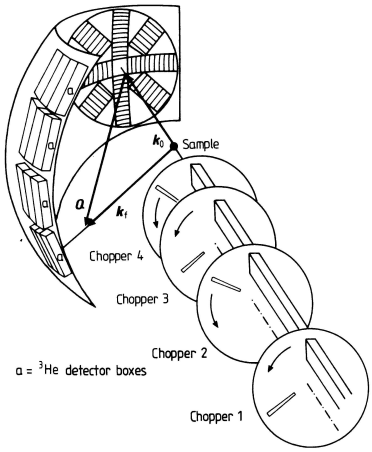

FIG. 11 – Représentation schématique des choppers et des détecteurs du spectromètre IN5 [89].

c/ La cellule de pression - Le container utilisé pour ces expériences sous pression est une cellule cylindrique de diamètre interne 5.7 mm et d'épaisseur de paroi de 5.2 mm. Elle est constituée d'un alliage de 1/3 de titane et 2/3 de zirconium (fig. 12).

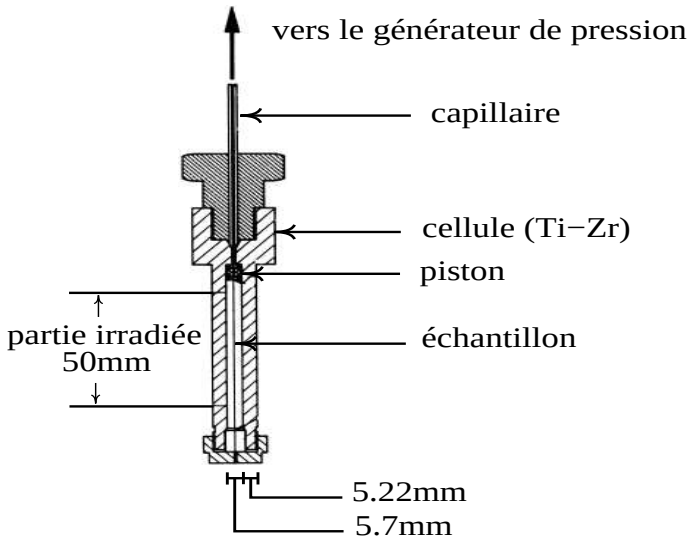

FIG. 12 – Schéma de la cellule de pression TiZr.

Le choix de cette proportion des composants de l'alliage est motivé par les valeurs des longueurs de diffusion : une telle répartition donne une composante cohérente moyenne nulle dans la diffusion due à la cellule. Les caractéristiques de cette cellule lui permettent de supporter jusqu'à 7 kbar. Elle a été développée au laboratoire Léon Brillouin et a notamment été utilisée dans le cadre d'une étude sur l'eau liquide sous pression [95].

d/ Choix de la résolution instrumentale - Les mesures de diffusion quasi-élastique de lumière, dans des conditions proches de celle de nos expériences (une concentration de 80 mg/ml dans un tampon acétate 50 mM, pH 4.6), donnent une valeur du coefficient de diffusion translationnelle de l'ordre de $D_{dif} = 12.10^{-5} nm^2.ps^{-1}$, ce qui donne en énergie $D_{dif} = 50\mu$eV pour une valeur de $q_{el} = 1\text{Å}^{-1}$ exprimée en HWHM (mi-largeur à mi-hauteur). On doit cependant corriger cette valeur obtenue dans un tampon non deutéré. Sachant que la viscosité de l'eau lourde est environ 20% plus élevée que celle de l'eau légère à 20°C, 1 bar, on peut estimer le coefficient de diffusion

globale du lysozyme dans le tampon deutéré à $10^{-4} nm^2.ps^{-1}$. En terme d'élargissement de pic élastique, cela correspond à 40 μeV en demi-largeur (propriété décrite page 66, formule (60)) pour une valeur de $q_{el} = 1\text{Å}^{-1}$. Avec la résolution choisie sur Mibemol, 37 μeV, et la première résolution employée sur IN5, 50 μeV, on se trouve à la limite de la visibilité de ces mouvements diffusifs globaux. On peut considérer que le signal quasi-élastique correspond aux seuls mouvements diffusifs internes. La seconde résolution, à 7.5 μeV, permet de voir des mouvements diffusifs plus lents dans la partie quasi-élastique, comprenant à la fois des mouvements internes mais aussi une certaine contribution de la diffusion globale.

Les mouvements trop rapides contribueront au bruit de fond dans le signal obtenu, et les mouvements trop lents seront noyés dans le pic élastique.

e/ Traitement des données issues des expériences de diffusion de neutrons - Pour les deux séries d'expérience menées sur Mibemol et IN5, nous avons mesuré les spectres du vanadium, de la cellule vide, de la solution et du tampon seul. La solution et le tampon seul ont été soumis chacun à une série de mises sous pression : 1, 1000, 2000, 3000 et 4000 bar. Concernant Mibemol, le temps d'acquisition pour chaque condition est entre 15 et 20 heures, et la résolution choisie est de 37 μeV en demi-largeur à mi-hauteur avec une longueur d'onde incidente de 6.5Å. Les expériences sur IN5 ont été menées en imposant deux résolutions différentes : 50 μeV, à une longueur d'onde de 5Å, et 8 μeV, à 9Å, exprimées en demi-largeur à mi-hauteur. A 50 μeV, les pressions imposées étaient de 1, 1000, 2000, 3000 et 4000 bar. A 8 μeV, pour des raisons de temps nous nous sommes limités à 1 et 3000 bar.

Les données sont traitées de la manière suivante :

- sur Mibemol :

Afin d'obtenir au mieux le signal dû à la protéine, nous avons effectué quelques corrections avant l'analyse :

– Normalisation au moniteur : le nombre de neutrons incidents arrivant sur

l'échantillon pendant le temps de mesure est évalué par le moniteur situé juste après l'échantillon. Cette normalisation est nécessaire car les temps d'acquisition varient d'une expérience à l'autre, ainsi que le flux de neutrons arrivant sur l'échantillon.

- Normalisation au vanadium : le spectre du vanadium permet de s'affranchir de l'efficacité des détecteurs : le vanadium est un diffuseur parfaitement incohérent dans la gamme de $\mathbf{q}$ qui nous concerne, sa diffusion ne dépend donc pas de l'angle. Il est également utilisé pour rendre compte de la résolution de l'appareil car c'est un diffuseur purement élastique.
- Groupement des spectres : dans le but d'améliorer la statistique, en ce qui concerne l'expérience sur Mibemol, les 71 détecteurs sont regroupés en 10 sous-groupes, associé chacun à la moyenne des angles correspondant aux détecteurs constitutifs. Cette opération est effectuée à l'aide du programme GROUP du LLB.
- Soustractions : pour obtenir la fonction de diffusion de la protéine seule, la contribution du tampon est soustraite au signal de la solution en lui attribuant un coefficient α relatif à la différence de volume de tampon due à la présence de la protéine dans la solution. Ce volume est calculé à partir de la concentration et du volume spécifique de la protéine, estimé à 0.732 cm^3/g à partir des volumes des acides aminés [96]. Pour une concentration de 75 mg/ml sa valeur est de 0.94.

Concernant l'étape de soustraction, nous avons soustrait au préalable le spectre de la cellule seule au signal de la solution et à celui du tampon. L'opération peut se résumer par :

$$S_{proteine}(\mathbf{q},\omega) = (S_{solution}(\mathbf{q},\omega) - S_{cellule}(\mathbf{q},\omega)) - \alpha * (S_{tampon}(\mathbf{q},\omega) - S_{cellule}(\mathbf{q},\omega)) \quad (46)$$

La prise en compte de la géométrie du système ainsi que des coefficients d'absorption et de diffusion est très délicate, d'autant plus lorsque les effets attendus sont à peine détectables. Afin d'introduire le moins d'erreur possible, nous avons choisi d'apporter le minimum de corrections aux données brutes : la géométrie de la cellule n'a pas été prise en compte et aucune correction d'auto-écrantage n'a été apportée faute de

programme disponible pouvant traiter le cas de la géométrie cylindrique de la cellule.

- sur IN5 :

Comme pour les données de Mibemol, nous avons choisi d'apporter le minimum de corrections aux données brutes : les mêmes étapes de groupement et de normalisation par rapport au moniteur et au vanadium ont été effectuées. Puis seules les valeurs correspondant aux transferts d'énergie négatifs (pour le neutron) ont été gardées puis symétrisées en tenant compte du bilan détaillé : les effets quantiques impliquent que le facteur de structure dynamique n'est pas symétrique en ω, avec une probabilité plus grande pour le neutron de perdre de l'énergie que d'en gagner ([89], [88]) :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = exp\left(\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right)\mathcal{S}(-\mathbf{q},-\omega) \tag{47}$$

avec $\hbar\omega > 0$ le gain d'énergie de l'échantillon.

Le signal de la cellule a ensuite été soustrait à celui du buffer et de la solution. Enfin, le signal du buffer ainsi obtenu, corrigé du coefficient correspondant au volume occupé par la protéine dans la solution, est soustrait du signal de la solution. Une normalisation à 1 est effectuée à la fin.

f/ Procédure d'ajustement des données - Concernant Mibemol, compte tenu de la résolution utilisée, 37 μeV en demi-largeur à mi-hauteur, nous avons vu précédemment que l'on peut s'attendre à ce que les mouvements diffusifs globaux soient noyés dans le pic élastique. Il n'est pas possible d'en être absolument sûr car on estime en général que des mouvements d'énergie équivalente aux 2/3 de la résolution instrumentale ont encore une contribution dans la partie quasiélastique.

Le programme Fitmib du LLB a été employé pour l'ajustement des données et propose un ensemble de combinaisons possibles. Nous avons utilisé un modèle constitué d'un pic de Dirac pour l'élastique, une Lorentzienne pour le quasiélastique, et un bruit de fond.

Concernant les données d'IN5, nous n'avons pas utilisé de programme d'ajustement particulier, nous les avons comparées à un modèle fractionnaire (décrit plus loin) dans la région quasi-élastique.

3 Modèles dynamiques

L'analyse des données relatives à la diffusion de neutrons nécessite l'utilisation de modèles décrivant des mouvements de nature distincte. Il est donc nécessaire de décomposer la dynamique des atomes en plusieurs types de mouvements différents en faisant l'hypothèse qu'ils sont décorrélés et que les atomes sont considérés comme équivalents. Le vecteur $\mathbf{R}_\alpha$ repérant la position d'un atome diffuseur α s'écrit :

$$\mathbf{R}_\alpha = \mathbf{R}_{CM} + \mathbf{r}_\alpha + \mathbf{u}_\alpha \tag{48}$$

avec $\mathbf{R}_{CM}$ la position du centre de masse de la protéine, $\mathbf{r}_\alpha$ la position de l'atome α relativement au centre de masse, avec $|\mathbf{r}_\alpha| = constante$, et $\mathbf{u}_\alpha$ les mouvements autour de la position d'équilibre $\mathbf{R}_{CM} + \mathbf{r}_\alpha$.

L'hypothèse de la décorrélation des mouvements et de l'équivalence des atomes entre eux est valable pour de petites molécules symétriques comme CH_4, mais dans le cas de systèmes plus complexes qui n'ont pas ces caractéristiques, cette hypothèse devient une approximation où l'atome α possède les propriétés moyennes de tous les atomes diffuseurs.

En utilisant cette approximation, la fonction intermédiaire de diffusion est donc le résultat de 3 contributions :

$$\mathcal{F}_H(\mathbf{q},t) = \mathcal{F}_{CM}(\mathbf{q},t)\,\mathcal{F}_{rot}(\mathbf{q},t)\,\mathcal{F}_{int}(\mathbf{q},t) \tag{49}$$

où

$$\mathcal{F}_{CM}(\mathbf{q},t) = \langle \exp(-i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{R}_{CM}(0)) \exp(i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{R}_{CM}(t))\rangle, \tag{50}$$

$$\mathcal{F}_{rot}(\mathbf{q},t) = \langle \exp(-i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{r}_\alpha(0)) \exp(i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{r}_\alpha(t))\rangle, \tag{51}$$

$$\mathcal{F}_{int}(\mathbf{q},t) = \langle \exp(-i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{u}_\alpha(0)) \exp(i\mathbf{q}^T \cdot \mathbf{u}_\alpha(t))\rangle. \tag{52}$$

Les indices "rot" et "int" indiquent respectivement les mouvements rotationnels et internes. La transformée de Fourier de la relation 49 permet d'écrire $S_H(\mathbf{q},\omega)$ comme

le produit de convolution dans l'espace des fréquences de la forme :

$$S_H(\mathbf{q},\omega) = S_{CM}(\mathbf{q},\omega) \otimes S_{rot}(\mathbf{q},\omega) \otimes S_{int}(\mathbf{q},\omega) \tag{53}$$

L'analyse de la dynamique d'une molécule nécessite une exploration théorique approfondie. Plusieurs modèles théoriques ont été développés pour expliquer le comportement dynamique de particules dans différentes conditions de leur environnement. La complexité attendue des processus diffusifs que subissent les atomes qui constituent les molécules de lysozyme oblige à supposer qu'un modèle simple ne peut pas rendre compte au mieux de cette complexité. L'utilisation de modèle simple est donc assortie de l'hypothèse qu'on obtient une vision moyenne des mouvements diffusifs en présence. En voici quelques-uns.

3.1 Dynamique de Langevin

3.1.1 Particule libre

Le mouvement d'une particule en diffusion libre est décrit par le modèle simple de la particule brownienne ([97], [98]). Sa taille est très supérieure à celle des particules de solvent (partie gauche de la figure 13) et son accélération dv/dt vérifie la relation suivante :

$$\frac{dv(t)}{dt} = -\gamma v + \frac{F_S}{M} \tag{54}$$

Elle se décompose en une force de friction et un terme faisant intervenir une force aléatoire F_S variant rapidement due aux fluctuations thermiques des vitesses des particules de solvent. Cette force ne dépend pas de la vitesse de la particule, elle vérifie $< v(0).F_S(t) >= 0, \forall t$. Elle suit les propriétés suivantes :

$$\langle F_s(t) \rangle = 0, \qquad \langle F_s(t) F_s(t') \rangle = 2\gamma M k_B T \delta(t - t'). \tag{55}$$

Nous nous sommes servi de ce modèle pour déterminer la diffusion globale du lysozyme dans les simulations puisque les molécules de solvent sont très petites par

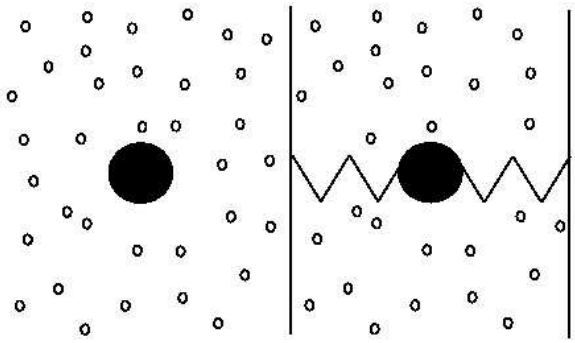

FIG. 13 – Schéma d'une particule brownienne en diffusion libre (gauche) et soumise à une force extérieure (droite).

rapport à la protéine, leur mouvement diffusif occupe une échelle de temps beaucoup plus courte.

La dynamique d'une particule est un processus Gaussien lorsque la distribution de probabilité pour le déplacement de cette particule possède une forme Gaussienne. Par conséquent, la fonction de diffusion intermédiaire a une forme Gaussienne en q [99] :

$$\mathcal{F}(q,t) = \exp\left(-\frac{q^2}{2}W_x(t)\right) \tag{56}$$

pour une dimension spatiale d'un atome, avec $W_x(t)$ le déplacement carré moyen dans cette dimension et $t \gg \frac{1}{\gamma}$. Le déplacement carré moyen peut s'exprimer sous la forme suivante [99] :

$$W_x(t) = \frac{2k_BT}{M}\left(\frac{e^{-\gamma t} - 1 + \gamma t}{\gamma^2}\right) \tag{57}$$

Cette approximation Gaussienne est valable dans le cas de la diffusion d'une particule libre, qui est le processus dynamique le plus simple donnant une diffusion quasiélastique, et l'expression (56) devient ([89], [88]) :

$$\mathcal{F}(\mathbf{q},t) = \exp(-Dq^2t) \tag{58}$$

Le facteur de structure dynamique présente la forme d'une Lorentzienne en ω :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = \frac{1}{\pi}\frac{Dq^2}{(Dq^2)^2 + \omega^2} \tag{59}$$

La demi-largeur à mi-hauteur Γ vérifie la relation :

$$\Gamma = Dq^2 \tag{60}$$

ce qui correspond à la loi de diffusion libre d'Einstein. Dans un tel cas, la particule peut diffuser loin de son point d'origine, conduisant à un EISF nul.

Le déplacement carré moyen de la particule en diffusion libre suit une évolution linéaire en fonction du temps déjà énoncée précédemment (relation 19 : $\lim_{t\to\infty} W(t) = 6Dt$).

Nous verrons que ce modèle de Lorentzienne a été utilisé pour ajuster la partie quasiélastique des spectres obtenus sur Mibemol car c'est le seul qui a pu produire des résultats exploitables, mais ce modèle est beaucoup trop simpliste pour rendre compte de la complexité des mouvements de la protéine comme nous avons pu le voir précédemment. Les informations tirées d'un tel traitement ne peuvent être que qualitatives sur les effets de la pression sur la dynamique et conduire à une vue moyenne de ce qui se passe, et on ne peut envisager de caractériser avec précision les mouvements qui contribuent au signal.

La diffusion rotationnelle, plus complexe à formuler, n'est pas abordée ici. L'échelle de temps de ces mouvements est en effet de l'ordre de 10 ns qui est au-delà des temps caractéristiques qui nous intéressent ici.

3.1.2 Dynamique de Langevin avec force extérieure

Par définition, les mouvements des atomes d'une protéine sont confinés dans l'espace. La fonction de diffusion incohérente a également dans ce cas une forme Gaussienne (expression 56). Différents modèles ont été développés pour décrire cette diffusion confinée, parmi lesquels nous citerons le modèle de diffusion dans une sphère développé par Volino et Dianoux [100]. Ce modèle prévoit que la fonction intermédiaire de diffusion obtenue dans ce cas présente une forme multi-exponentielle dont la

résolution analytique est difficile. $S_{inc}(\mathbf{q}, \omega)$ est représentée par une somme infinie de Lorentziennes qu'il n'est expérimentalement pas possible de décomposer. Le modèle est donc simplifié à une seule Lorentzienne 'moyenne' et ne peut donc pas représenter la multiplicité des atomes. Ce modèle a été appliqué pour décrire la dynamique interne d'une protéine dans plusieurs travaux ([101], [102]).

L'oscillateur de Langevin, par contre, est un modèle qui permet de décrire plusieurs types de mouvements internes d'une protéine [103] : c'est un modèle harmonique avec friction qui introduit une certaine 'flexibilité' dans le modèle harmonique plus adapté au cas des solides, et permet de prendre en compte la rugosité du potentiel effectif d'énergie des macromolécules. En faisant varier la valeur de la constante de friction, il est possible de produire des mouvements vibrationnels (donnant la partie inélastique des spectres de diffusion) ainsi que des mouvements purement diffusifs (partie quasiélastique). Nous avons vu précédemment l'équation de Langevin pour une particule libre qui subit une force de friction dépendant de sa vitesse et une force aléatoire due aux collisions avec les molécules de solvent. Ici, il s'agit de décrire l'oscillation harmonique d'un atome autour de sa position d'équilibre sous l'influence supplémentaire des atomes voisins auxquels il est lié (partie droite de la figure 13).

L'oscillation est décrite par l'équation de mouvement stochastique :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \gamma\frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{1}{M}F_s \tag{61}$$

où γ est la constante de friction et F_s est une force stochastique qui vérifie les propriétés (55) énoncées précédemment.

La force extérieure exercée par les atomes liés est représentée par $\omega_0^2 x$.

L'aspect 'rugueux' de la surface d'énergie d'une protéine est caractéristique des collisions fréquentes entre résidus [104]. Ceux-ci ont donc un mouvement de type Brownien, fortement suramorti, avec $\gamma \gg \omega_0$, et un temps d'observation vérifiant $t \gg 1/\gamma$. La fonction intermédiaire de diffusion s'écrit alors ([105],[104]) :

$$\mathcal{F}(q,t) = \exp\left[-q^2\frac{k_BT}{M\omega_0^2}\left(1 - \exp\left(-\gamma^{-1}\omega_0^2 t\right)\right)\right] = \exp\left[-\frac{q^2}{2}W_x(t)\right] \tag{62}$$

La limite à $t \to \infty$ de cette expression produit un EISF qui s'écrit :

$$EISF(q) = \exp\left[-q^2 \frac{k_B T}{M\omega_0^2}\right] \tag{63}$$

Pour un mouvement confiné, le déplacement carré moyen tend vers un plateau, et pour une dimension spatiale d'un atome il vérifie :

$$\lim_{t\to\infty} W_x(t) = \frac{2k_B T}{M\omega_0^2} = 2\langle x^2\rangle \tag{64}$$

avec $\langle x^2\rangle$ les fluctuations atomiques. Cette relation rend possible l'extraction d'une constante de force effective à partir de la diffusion de neutrons, $K = M\omega_0^2$ qui quantifie la résistance plus ou moins forte de l'environnement influençant la dynamique de l'atome [106].

Le facteur de structure dynamique de l'oscillateur de Langevin n'a pas de forme analytique générale. Dans le cas du mouvement fortement suramorti, $\mathcal{S}'(q,\omega)$ prend la forme analytique d'une Lorentzienne, on se retrouve alors à nouveau dans le cas d'un ajustement trop simpliste et moyenné des spectres de diffusion.

La dynamique interne d'une protéine est en fait caractérisée par un *large spectre de temps de relaxation.* On peut étendre les expressions précédentes obtenues pour un atome de la protéine possédant un régime Brownien et subissant la force extérieure exercée par les atomes voisins qui lui sont liés, à un ensemble d'oscillateurs couplés. La fonction intermédiaire obtenue est alors de la forme de l'équation (62) sommée sur l'ensemble des atomes du système [105].

3.2 Modèle fractionnaire

Du fait de leur complexité, les protéines ont une relaxation dynamique caractérisée par une gamme étendue de temps de relaxation. Cette propriété a été souvent décrite par des fonctions de corrélation du type 'exponentielle étirée' [107] :

$$\phi(t) = \phi_0 \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta}\right] \tag{65}$$

Ce modèle fut à l'origine développé pour la description empirique de la relaxation des matériaux diélectriques [108].

Un modèle non-exponentiel capable de rendre compte de la multiplicité des temps de relaxation d'une protéine est le modèle fractal développé par Glöckle et Nonnenmacher pour décrire des cinétiques réactionnelles [109]. C'est un modèle purement mathématique qui peut s'appliquer dans des domaines très différents. Du fait de la nature complexe des systèmes biologiques, de nombreux phénomènes en biophysique moléculaire peuvent être caractérisés par des méthodes fractales, allant des structures de biopolymères à la diffusion et aux cinétiques réactionnelles. Les protéines présentent un comportement 'auto-similaire' et obéissent à des lois d'échelle : un exemple souvent cité est celui des canaux ioniques membranaires dont le rythme d'ouverture et de fermeture a des propriétés fractales, suggérant que les processus opérant sur des échelles de temps différentes sont interdépendants [110]. De même, Lopez-Quintela et Casado [111] ont développé un modèle fractal de cinétique enzymatique basé sur l'observation que cette cinétique est une fonction de la concentration en substrat.

L'utilisation d'une analyse fractale est inspirée par le caractère 'rugueux' de la topologie du profil énergétique d'une protéine, et peut servir à 'quantifier' le degré de cette rugosité [112]. L'exemple du comportement réactionnel de la myoglobine illustre cela : la myoglobine existe dans un état lié et un état non lié à l'oxygène. La transition entre ces 2 états dévie du comportement exponentiel des relaxations habituelles [113]. Cette différence peut s'expliquer d'un point de vue microscopique par l'existence d'un très grand nombre de sous-états conformationnels qui séparent ces 2 états lié et non lié et qui représentent autant de barrières énergétiques à franchir.

L'article décrivant le modèle fractionnaire de la dynamique Brownienne dans les protéines est actuellement soumis (article soumis, [114]). Dans le modèle dynamique auto-similaire proposé par Glöckle et Nonnenmacher, le principe de renormalisation est appliqué aux processus dynamiques dans les protéines : si l'on considère une relaxation exponentielle unique $\phi(t) = \phi_0 \exp(-t/\tau)$, il existe une seule échelle de temps τ. Du fait de la multitude de sous-états conformationnels accessibles à la protéine, celle-

ci se relaxe selon de nombreuses constantes de temps τ_n, donnant :

$$\phi(t) = \sum_n w_n \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \tag{66}$$

Les facteurs de pondération w_n et les constantes τ_n sont corrélés du fait du caractère auto-similaire de la dynamique. Le principe de renormalisation prévoit que le changement d'échelle de temps ne modifie pas le comportement dynamique en dehors d'une renormalisation des constantes de couplage. Le modèle fractal proposé [109] prévoit la progression de ces constantes de la façon suivante :

$$\tau_n = \gamma^n \tau_0 \tag{67}$$

$$w_n = p_0 \frac{p^n \sin(\pi\beta)}{p^{2n} + 2p^n \cos(\pi\beta) + 1} \tag{68}$$

avec $\gamma > 1$, $p = \gamma^{-\beta} < 1$, $\beta > 0$. β est en quelque sorte la dimension fractale dans le domaine des temps des processus de relaxation. $\phi(t)$ peut s'exprimer sous une forme où intervient la fonction de Mittag-Leffler E_β [115] :

$$\phi(t) = E_\beta(-(t/\tau)^\beta) \tag{69}$$

A partir de cette expression, on aboutit à une forme non-exponentielle de $\phi(t)$ pour $t \geq 0$:

$$\phi(t) = \phi(0) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{\Gamma(1+\beta k)} \left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta k} \quad , \qquad 0 < \beta < 1 \tag{70}$$

avec $\Gamma(z)$ la fonction Gamma [116]. Lorsque $\beta \to 1$ on retrouve une fonction exponentielle (systèmes simples).

Cette description permet de rendre compte de la décroissance algébrique (et non une relaxation exponentielle comme le cas le plus simple où n'existe qu'une seule échelle de temps), pour des temps longs, que suit la fonction de corrélation $\phi(t)$ des processus lents de relaxation dans les systèmes complexes :

$$\phi(t) \propto \left(\frac{t}{\tau}\right)^{-\beta} \quad \text{pour} \quad t \to \infty, \qquad 0 < \beta < 1 \tag{71}$$

Plusieurs modèles existent pour décrire le comportement auto-similaire des processus lents de relaxation, mais le modèle fractal s'avère être en bon accord avec plusieurs résultats expérimentaux. Il paraît pertinent pour refléter les caractéristiques principales des processus dynamiques présents dans des systèmes complexes comme les protéines.

C'est à partir de ces travaux qu'a été développé le modèle fractionnaire qui servira à ajuster les données simulées (article soumis, [114]). La forme analytique de la transformée de Fourier de la fonction de corrélation du modèle fractal (équation 70) est la suivante :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = \frac{2\tau\ \sin(\beta\pi/2)\ \phi(0)}{|\omega\tau|\ \left[|\omega\tau|^{\beta} + 2\cos(\beta\pi/2) + |\omega\tau|^{-\beta}\right]} \tag{72}$$

On peut remarquer que $\lim_{\beta\to 1}\mathcal{S}(\omega) = 2\tau/(1+(\omega\tau)^2)$, ce qui signifie que $\mathcal{S}(\omega)$ prend la forme d'une Lorentzienne quand β tend vers 1.

En outre, on obtient à partir de l'expression (72) la propriété suivante :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) \sim \frac{1}{\omega^{1+\beta}}\ ;\ \omega\tau \gg 1 \tag{73}$$

3.3 Equation généralisée de Langevin

Une approche générale pour rendre compte de la relaxation multi-échelle d'une protéine est l'équation généralisée de Langevin ou encore équation dite de fonction mémoire. Cette approche est formelle mais elle a l'avantage d'être exacte.

Les fonctions mémoire sont un concept introduit par Zwanzig dans les années 1960 pour décrire la dynamique des liquides sur des bases théoriques rigoureuses [117][118]. C'est à partir de travaux sur l'argon liquide [119] par simulation et spectroscopie que se sont développés les premiers modèles de cette fonction qui donne une vision d'un niveau supérieur du comportement d'un système : les corrélations dynamiques sont déjà un moyen de caractériser l'évolution de la variable qu'elles décrivent, mais elles ont elles-mêmes une mémoire et on a cherché à déterminer cette mémoire au

cours du temps. Elle permet de faire ressortir de façon plus nette des comportements que ne fait pas apparaître distinctement une simple analyse des corrélations. Berne et al. [120] montrent qu'en donnant à la fonction mémoire une forme exponentielle il est possible d'expliquer que la FACV de l'argon liquide ne décroît pas de manière exponentielle comme un système sans mémoire mais se rapproche plus de celle d'un oscillateur harmonique amorti [119]. C'est une constatation assez empirique et une démonstration plutôt qualitative mais qui ouvre sur des descriptions plus riches des systèmes.

Afin de mieux comprendre l'utilité de cette fonction mémoire, il faut partir de la forme conventionnelle de l'équation de Langevin que nous avons déjà présentée, équation (54). Pour pouvoir décrire précisément le mouvement d'entraînement au cours du temps de cette particule qui oscille dans le solvent, il est nécessaire de généraliser cette équation, ce qui donne :

$$\frac{dv(t)}{dt} = -\int_0^t d\tau\, \xi(t-\tau)\, v(\tau) + f_S \tag{74}$$

$\xi(\tau)$ est la fonction mémoire, qui peut être interprétée comme une généralisation d'un coefficient de friction. Le mouvement de la particule n'est plus simplement linéairement proportionnel à sa vitesse instantanée mais il est linéairement proportionnel aux vitesses de tous les temps passés.

On retrouve l'équation de Langevin (54) si l'on pose :

$$\xi(t) = \gamma\delta(t) \tag{75}$$

avec $\delta(t)$ la distribution de Dirac.

D'une manière générale, le concept de fonction mémoire s'applique à une fonction d'autocorrélation temporelle de toute variable dynamique d'un système Hamiltonien. L'équation de fonction mémoire est une équation de mouvement, et lorsque la variable temporelle est la fonction intermédiaire de diffusion, elle s'écrit :

$$\partial_t \mathcal{F}(\mathbf{q}, t) = -\int_0^t d\tau\, \xi(\mathbf{q}, t-\tau)\, \mathcal{F}(\mathbf{q}, \tau) \tag{76}$$

La fonction mémoire est calculée à partir du modèle autorégressif, présenté précédemment, ajusté aux données des simulations. L'utilisation du modèle autorégressif vient du fait que la résolution de l'équation (76) se heurte à une perte progressive de précision du calcul due aux valeurs numériques prises par $\mathcal{F}(\mathbf{q}, t)$, d'où une instabilité de l'algorithme. L'idée est donc de fitter les données avec un modèle autorégressif puis de déterminer la fonction mémoire non plus par les valeurs de $\mathcal{F}(\mathbf{q}, t)$ obtenues par calcul direct à partir des données, mais par les coefficients du modèle ce qui permet une résolution numérique plus stable pour obtenir la fonction mémoire du système.

Grâce à la modélisation par un processus autorégressif stochastique, la discrétisation de l'expression de la fonction mémoire (74) est possible et s'écrit dans le cas de la FACV :

$$\frac{\psi(n+1) - \psi(n)}{\Delta t} = -\sum_{k=0}^{n-1} \Delta t \xi(n-k)\psi(k) \tag{77}$$

A partir de cette expression et de celle de la fonction d'autocorrelation estimée par le modèle autorégressif (24), on accède à la série $\xi^{(AR)}(t)$ (*via* une transformation en z) [82].

La fonction mémoire de la fonction intermédiaire de diffusion (76) est calculée de la même façon que dans le cas des vitesses, avec la variable dynamique :

$$u(t) = \sum_{\alpha=1}^{N} b_{\alpha,incoh} \exp[-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_\alpha(t)] \tag{78}$$

Dans le cas le plus simple d'une particule en diffusion libre, la fonction intermédiaire de diffusion est une exponentielle simple :

$$\mathcal{F}(\mathbf{q}, t) = \exp(-Dq^2 t) \tag{79}$$

Cette expression est la solution de l'équation :

$$\partial_t \mathcal{F}(\mathbf{q}, t) = -Dq^2 \mathcal{F}(\mathbf{q}, t) \tag{80}$$

qui correspond à l'équation (76) en prenant :

$$\xi(\mathbf{q}, t) = Dq^2 \delta(t) \tag{81}$$

A nouveau, nous appuyons sur le fait que ce type de modèle simple de mouvement aléatoire, caractérisé par une 'mémoire courte' (par rapport à l'échelle de temps caratéristique de la fonction d'autocorrélation exponentielle à laquelle elle correspond) peut décrire la diffusion globale d'une protéine, mais certainement pas sa dynamique interne caractérisée par une très grande variété de temps de relaxation. Il n'y a donc pas une échelle de temps unique caractérisant $\mathcal{F}'(\mathbf{q}, t)$ (fonction intermédiaire de diffusion sans l'EISF, tendant vers 0).

4 Résultats

4.1 Effets de la pression

4.1.1 Simulations

a/ Compaction - La compaction du lysozyme a été observée par l'intermédiaire du raccourcissement des liaisons hydrogène des structures secondaires et la diminution du volume de la molécule.

- Liaisons hydrogène - Des travaux en RMN effectués sur le lysozyme natif et dénaturé ([62], [121]) montrent entre autres un raccourcissement par la pression des liaisons H formées par les amides du squelette dans les structures secondaires. Ils observent une diminution de la longueur de ces liaisons d'environ **0.02** Å entre 30 bar et 2 kbar.

Pour déterminer l'existence d'une liaison H à partir des simulations, les critères pris en compte sont ceux employés dans des logiciels de DM comme Gromos : la longueur H-accepteur doit être inférieure ou égale à 2.5 Å, et l'angle donneur-H-accepteur inférieur à 135°.

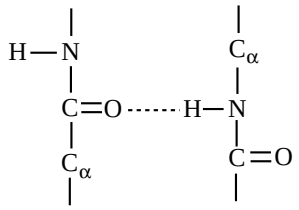

FIG. 14 – Schéma représentatif d'une liaison hydrogène de la chaîne principale.

Les structures prises en compte sont moyennées sur l'ensemble des configurations de chaque simulation (1 bar et 2 kbar). Un programme écrit en Fortran77 détermine la présence et la longueur des liaisons H au niveau des structures secondaires du lysozyme, d'après les critères énoncés précédemment.

Nous obtenons qu'entre 1 et 2 kbar, les liaisons hydrogène amide-carbonyl intra-chaînes du lysozyme simulé se raccourcissent de **0.030** Å. Malgré l'absence d'information sur la barre d'erreur pour l'expérience de RMN, cet accord est satisfaisant et tend à montrer que nos conditions de simulations sont justes.

- Volume - L'augmentation de la pression dans la cellule de simulation provoque une diminution du volume du lysozyme d'environ 2% de la molécule entre 1 atm et 3 kbar, comme le montre le graphique 15.

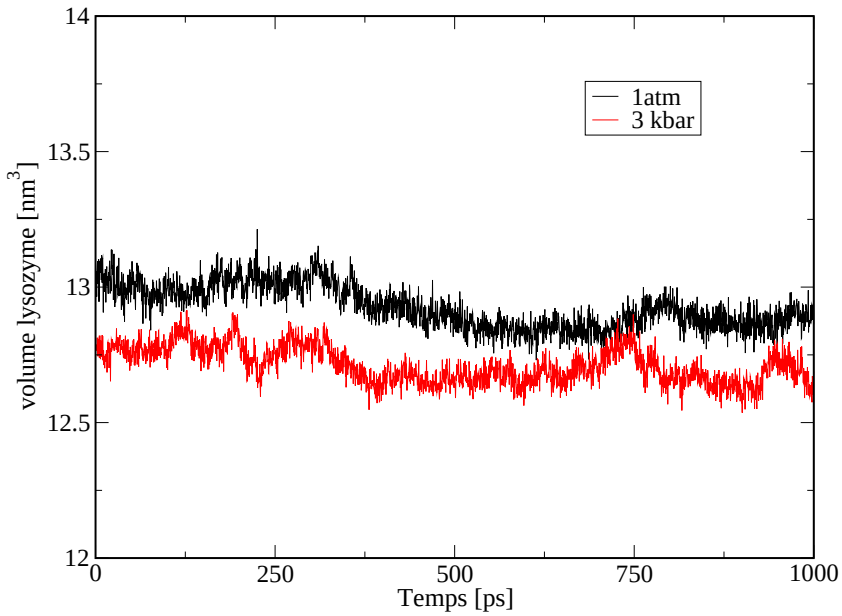

FIG. 15 – Volume de la molécule de lysozyme simulée à 1 atm et 3 kbar.

b/ Diffusion globale - Nous avons précédemment présenté la diffusion libre d'une particule brownienne et nous avons vu que ce modèle pouvait être appliqué dans le cas du lysozyme simulé puisque les molécules de solvent sont très petites par rapport à la protéine, leur mouvement diffusif occupe une échelle de temps beaucoup plus courte. De plus, on peut considérer comme peu influent l'impact des interactions hydrodynamiques entre molécules de lysozyme pour une concentration inférieure à 10% en fraction volumique [122], ce qui est notre cas (de l'ordre de 6%). La molécule peut

donc être prise en compte isolément, et sa position repérée par celle de son centre de masse $\mathbf{r}_{CM}$.

Une méthode pour obtenir le coefficient de diffusion est de se servir du déplacement carré moyen du centre de masse $W(t)$, défini par :

$$W(t) = \langle [\mathbf{r}_{CM}(t) - \mathbf{r}_{CM}(0)]^2 \rangle \tag{82}$$

Il vérifie la relation déjà décrite précédemment $\lim_{t\to\infty} W(t) = 6Dt$. Il est donc possible de déterminer la pente de la partie linéaire de cette courbe et d'en déduire le coefficient de diffusion globale. Il s'avère que les courbes de $W(t)$ sont trop bruitées pour que l'on puisse évaluer cette pente, le coefficient de diffusion obtenu est trop imprécis. La solution est d'utiliser l'expression donnant la fonction d'autocorrélation des vitesses d'après l'équation de Langevin :

$$\big\langle v(t)v(0) \big\rangle = \langle v^2 \rangle \exp(-\gamma t) \tag{83}$$

avec γ la constante de friction. La fonction d'autocorrélation des vitesses du centre de masse est donc ajustée avec une exponentielle.

Puis le coefficient de diffusion pour chaque pression est déduit grâce à la relation :

$$D = \frac{kT}{M\gamma} \tag{84}$$

M représente la masse réduite du système.

La figure 16 représente l'ajustement par une exponentielle de la fonction d'autocorrélation des vitesses à 1 atm.

Comme l'indique la figure 17, le coefficient de diffusion du centre de masse ainsi calculé décroît avec l'augmentation de la pression.

Ce résultat a pu être comparé avec ceux d'une étude sur le lysozyme en solution sous pression utilisant la diffusion quasiélastique de lumière (DLS), technique qui permet de mesurer le comportement diffusif et contrôler la taille moyenne de particules

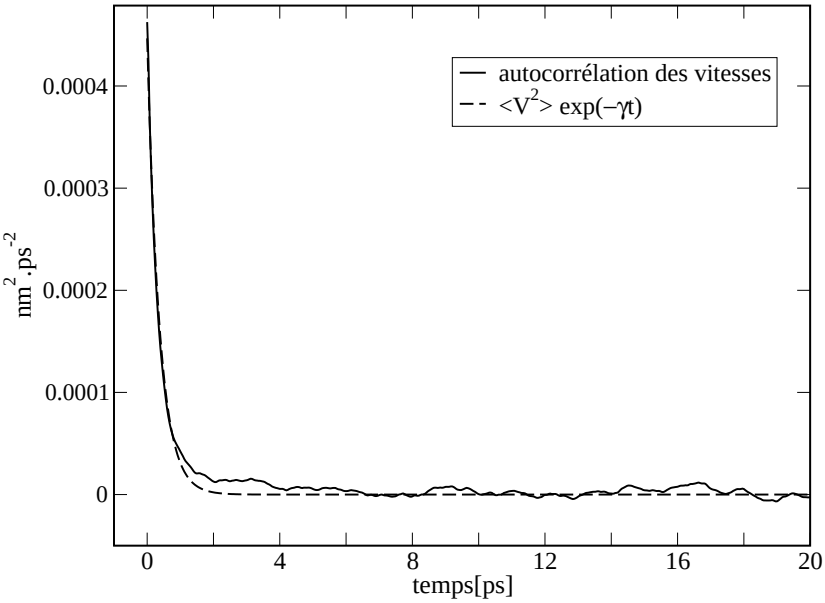

FIG. 16 – Fonction d'autocorrélation des vitesses du centre de masse superposée à l'exponentielle d'ajustement.

en solution [32]. A la concentration la plus forte utilisée (80 mg/ml), le coefficient de diffusion globale diminue avec la pression, cette baisse s'affirmant nettement à partir de 1200 bar.

En outre, nous avons voulu connaître l'impact de la viscosité de l'eau sur la diffusion translationnelle des molécules de lysozyme en fonction de la pression. L'application de l'équation de diffusion de Stokes-Einstein permet d'obtenir le coefficient de diffusion extrapolé à une concentration nulle d'une sphère de rayon a à une température T pour une viscosité de l'eau η :

$$D_{SE} = \frac{kT}{6\pi\eta a} \tag{85}$$

La viscosité est une fonction de la température et de la pression. Des données de densité de l'eau en fonction de la pression et de la température sont disponibles dans la littérature [123]. A partir de ces valeurs il est possible de calculer la viscosité en appliquant une équation d'interpolation donnée dans [124]. Elle exprime la viscosité η en fonction de 3 facteurs :

$$\eta = \eta_0(T) * \eta_1(T, \rho) * \eta_2(T, \rho) \tag{86}$$

η_0, η_1 et η_2 dépendent de T et/ou ρ, ainsi que de coefficients dont les tables sont fournies [124].

A l'aide d'un programme Mathematica [125], les données de densité et les coefficients nécessaires au calcul de η sont utilisés pour générer, à la température 293 K, la viscosité de l'eau en fonction de la pression. Ce calcul est suivi de l'application de l'équation de Stokes-Einstein pour aboutir aux valeurs du coefficient de diffusion en fonction de la pression (on choisit finalement celles qui se situent dans la gamme de pression correspondant aux pressions de nos conditions d'expérience et de simulation). Le rayon de la sphère correspondant à la taille du lysozyme est 14.5 Å.

Sur la figure 17 sont représentées les 3 courbes décrivant le coefficient de diffusion moléculaire en fonction de la pression, correspondant à l'expérience en DLS, aux trajectoires de DM et à l'application de l'équation de Stokes-Einstein.

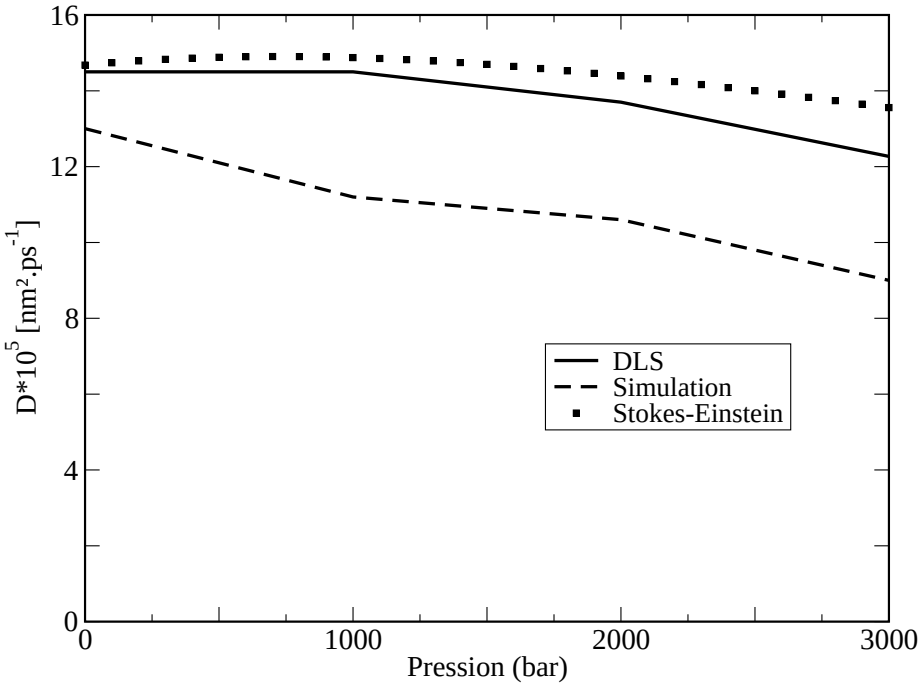

FIG. 17 – Evolution du coefficient de diffusion moléculaire en fonction de la pression, à partir de données expérimentales en DLS [32], des simulations de DM et de l'équation de Stokes-Einstein.

Le profil obtenu à partir de l'application de la loi de Stokes-Einstein en prenant en

compte la viscosité de l'eau montre que celle-ci modifie à elle seule la diffusion d'une sphère dont le rayon correspond à celui du lysozyme en diminuant ses mouvements à partir de 800 bar environ.

Il apparaît que le coefficient de diffusion obtenu à partir des simulations est relativement proche de celui déterminé par DLS et suit un comportement similaire avec l'augmentation de la pression. Bien que les conditions du système simulé sont assez éloignées de celles de l'expérience (concentration, périodicité, etc) il est intéressant de constater que les résultats sont très proches quantitativement et qualitativement. Ceci apporte un certain degré de confiance quant à la justesse de la méthode de simulation.

En ce qui concerne la diffusion rotationnelle, on peut montrer qu'elle est négligeable dans notre étude. Le temps de relaxation rotationnel peut être calculé à partir de la constante de diffusion rotationnelle donnée par la relation de Stokes-Einstein [122] :

$$\gamma_r = \frac{k_B T}{4\pi\eta a^3} \tag{87}$$

η est la viscosité du solvant et a est le rayon du soluté, 14.5 Åpour le lysozyme. A $T = 293K$, $\gamma_r = 1.06{\cdot}10^8 s^{-1}$ ce qui correspond à un temps de relaxation $\tau_r = 9.4ns$. C'est un processus trop lent pour l'échelle de temps en diffusion de neutron : à la résolution maximale que nous avons utilisée, $7\mu eV$, les mouvements les plus lents pouvant être détectés ont un temps de relaxation de $0.59ns$. La diffusion rotationnelle peut donc être négligée par rapport à la diffusion translationnelle dont le temps de relaxation est d'environ $80ps$.

c/ Déplacements carrés moyens - Pour les mouvements internes, nous avons tout d'abord cherché les effets dynamiques dus à la pression en calculant directement les déplacements carrés moyens. Les résultats sont présentés sur les figures 18, 19, et 20.

Les résultats montrent que les atomes du squelette subissent moins de changement dans leur dynamique que ceux des chaînes latérales. Cette observation est en accord

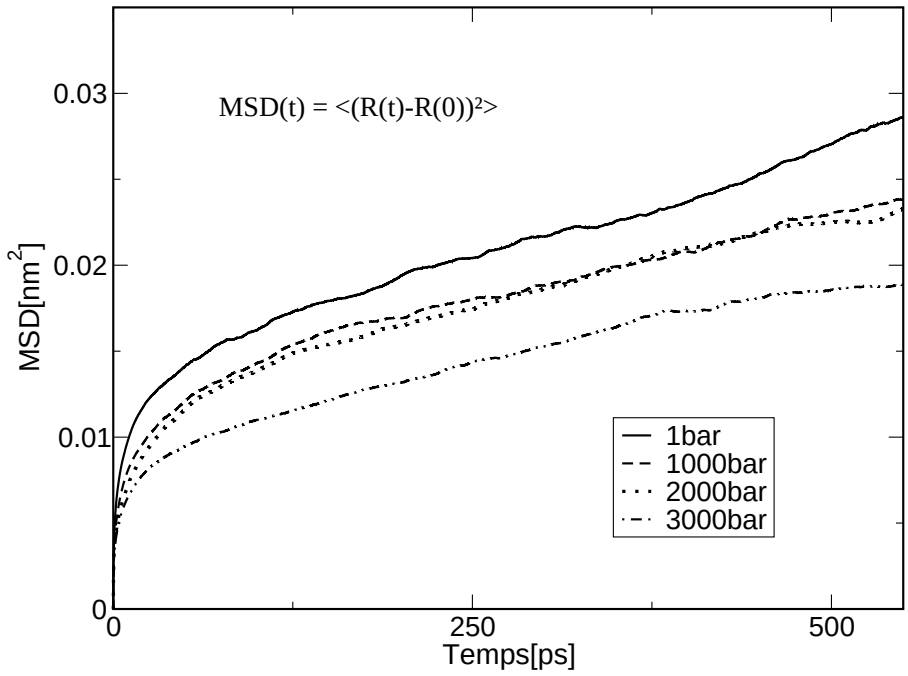

FIG. 18 – Evolution du déplacement carré moyen des atomes de l'ensemble du lysozyme avec la pression, à partir des simulations de DM.

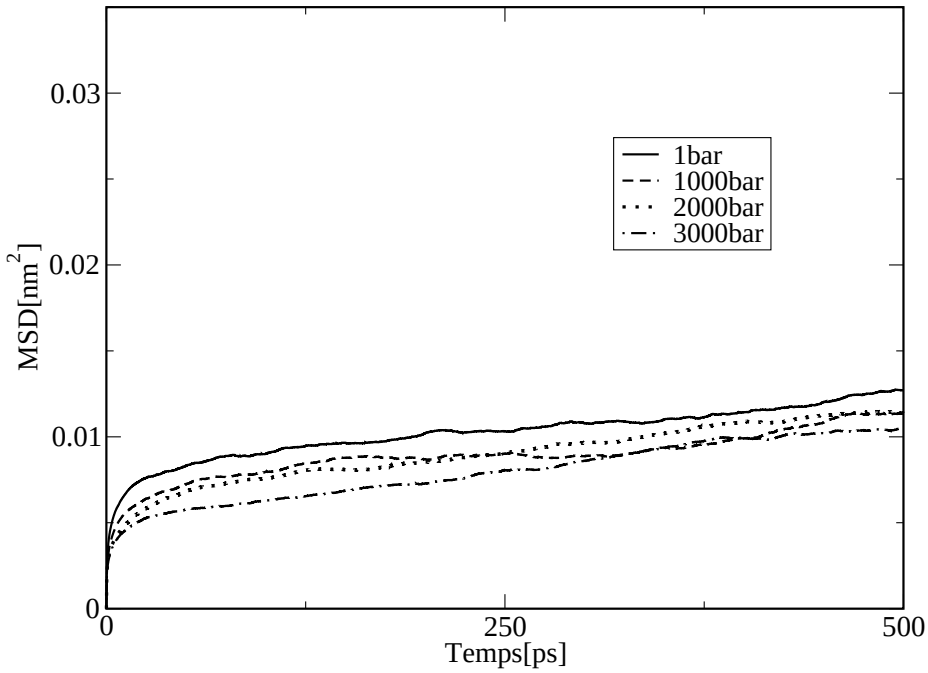

FIG. 19 – Evolution du déplacement carré moyen des atomes du squelette avec la pression, à partir des simulations de DM.

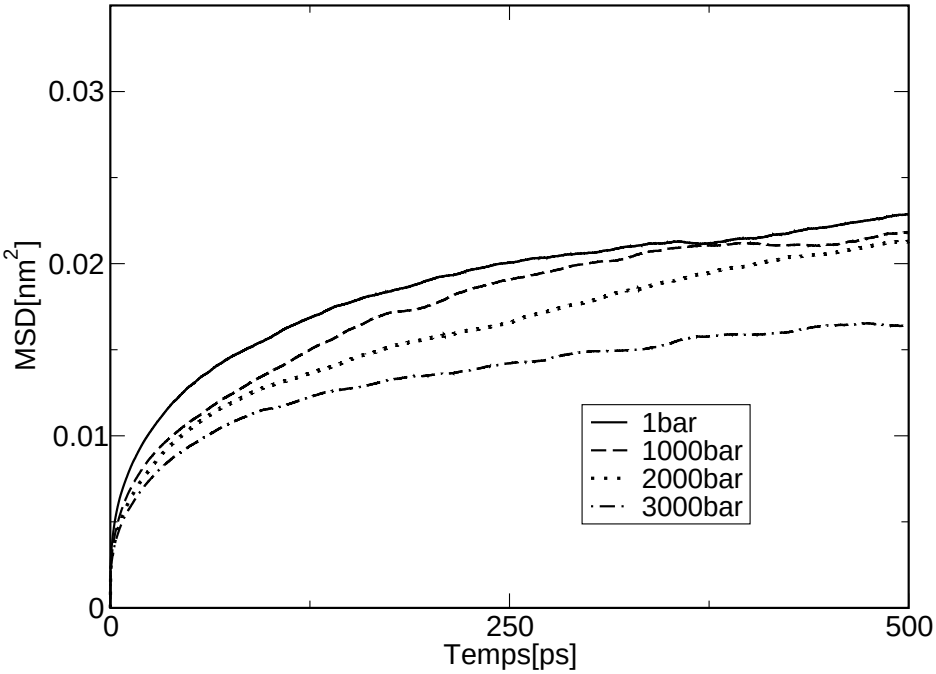

FIG. 20 – Evolution du déplacement carré moyen des atomes des chaînes latérales avec la pression, à partir des simulations de DM.

avec le fait que le squelette constitue un réseau assez rigide qui procure à ses atomes moins de degrés de liberté que dans le cas des chaînes latérales.

On constate que les déplacements carrés moyens de ces mouvements confinés dans l'espace n'atteignent pas un plateau, comme il avait été énoncé dans la relation (64). Ceci est lié à la longueur insuffisante des simulations pour observer ce phénomène.

d/ Densité d'états - La figure 21 présente la fonction de densité d'états à 1 atm et 3 kbar. D'une manière générale, les effets de la pression sont très faibles sur la distribution des fréquences mais on peut distinguer un effet de décalage des basses fréquences vers les hautes fréquences. L'encart présente un agrandissement de la première partie des courbes du graphique principal, et permet de rendre compte de la diminution de l'intensité des basses fréquences, du 'transfert' des mouvements de basse fréquence et de grande amplitude vers des mouvements plus rapides et localisés.

Ce résultat est cohérent avec l'observation que la pression diminue l'amplitude

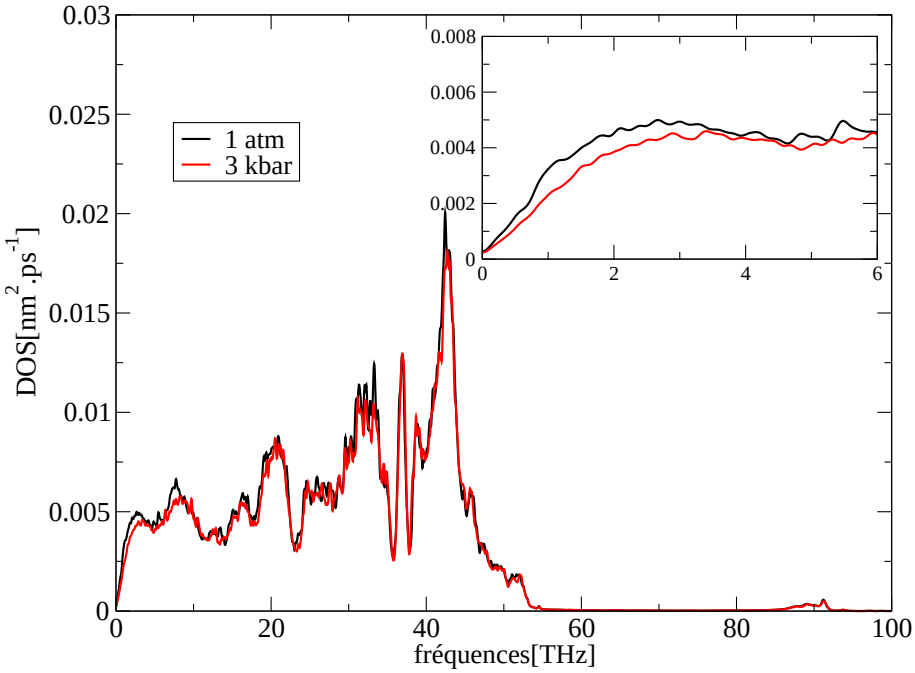

FIG. 21 – Densité d'états aux pressions 1 atm et 3 kbar. En encart : agrandissement de la partie des basses fréquences.

des déplacements carrés moyens. Ces derniers sont reliés à la densité d'états par la relation (40). Dans le cas de mouvements confinés comme c'est le cas des atomes d'une protéine, nous avons vu que les déplacements carrés moyens vérifient la relation $\lim_{t\to\infty} W(t) = 2\langle x^2\rangle$, avec $\langle x^2\rangle$ les fluctuations atomiques (modèle unidimensionnel). A partir de cette propriété et de la relation (40), on peut écrire [126] :

$$\langle x^2\rangle = \lim_{t\to\infty} \frac{6}{\pi} \int_0^\infty d\omega \, \frac{1-\cos\omega t}{\omega^2} \, G(\omega) \tag{88}$$

Pour ce calcul, la limite à l'infini est assimilée à la longueur des trajectoires. Le graphique 22 représente les fluctuations atomiques cumulées :

$$\langle x^2\rangle(\omega_c) = \lim_{t\to\infty} \frac{6}{\pi} \int_0^{\omega_c} d\omega \, \frac{1-\cos\omega t}{\omega^2} \, G(\omega) \tag{89}$$

Cette forme permet de mettre davantage en évidence l'effet de la pression sur les basses fréquences, remarqué au niveau de la densité d'états (encart de la figure 21), et qui est révélé ici encore plus nettement par l'existence d'une différence importante

entre les plateaux atteints par la somme cumulée des fluctuations atomiques aux 2 pressions. Il convient de remarquer que l'ordre de grandeur des plateaux atteints par les courbes de ce graphique 22 est inférieur à celui des valeurs obtenues pour les densités d'états, graphique 21 : en effet, les sommes cumulées des fluctuations atomiques ont été calculées à partir d'une trajectoire plus courte que dans le cas de la densité d'états, l'espace conformationnel exploré est donc moins étendu, induisant par conséquent cette différence.

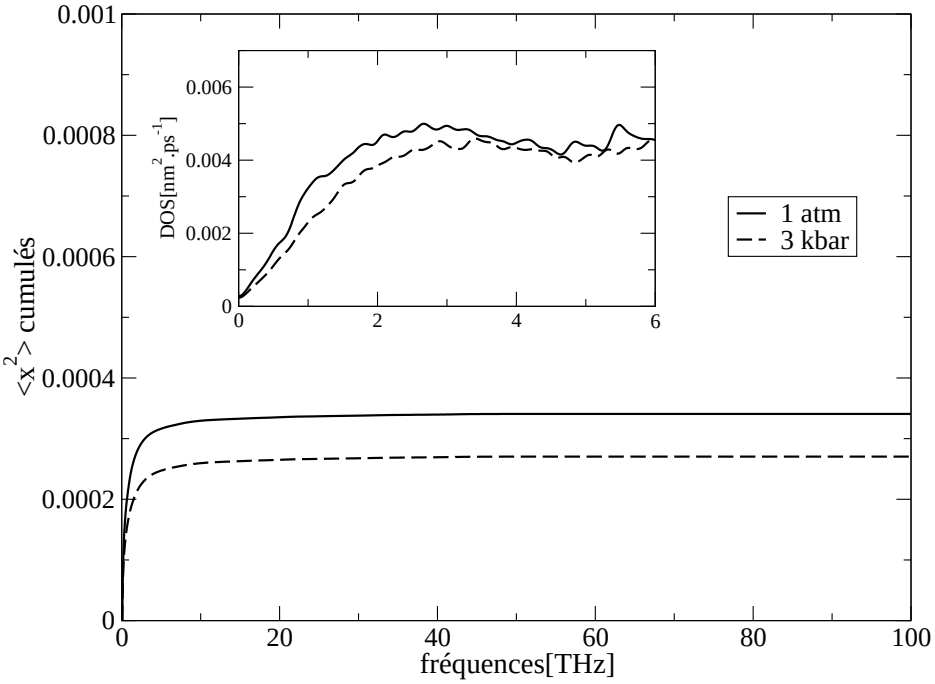

FIG. 22 – Fluctuations atomiques cumulées aux pressions 1 atm et 3 kbar. En encart : agrandissement de la partie des basses fréquences de la densité d'états.

4.2 Fonctions de diffusion

L'évolution en fonction de la pression du facteur de structure dynamique issu des trajectoires de DM est marquée par une légère diminution de la ligne quasi-élastique. La contribution élastique, exclue du calcul de la fonction de diffusion est déterminée par le calcul de l'EISF. La figure 23 présente la partie quasi-élastique du spectre du facteur de structure dynamique théorique aux pressions 1 atm et 3 kbar à différentes valeurs de q, exprimé en échelle logarithmique. Il a été calculé grâce au modèle autorégressif déterminé avec 400 pôles et un pas de 0.4 ps (on obtient une mémoire de 160ps). La figure 24 représente l'EISF théorique exprimé en fonction de q^2.

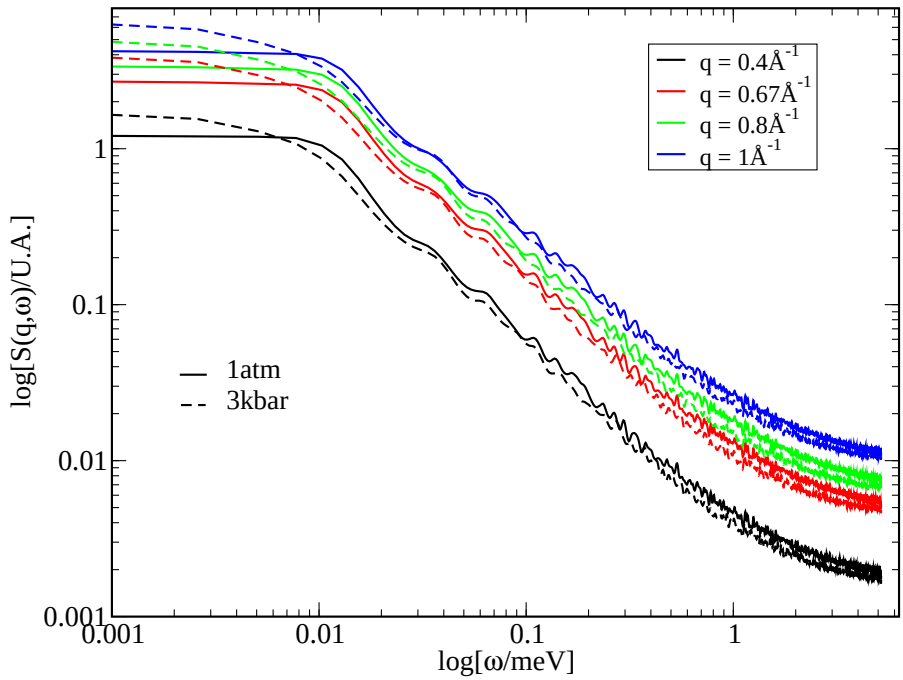

FIG. 23 – Facteur de structure dynamique issu des simulations, à 1 atm et 3 kbar, en échelle logarithmique et à différentes valeurs de q.

Le graphique 23 met en évidence un effet modéré de la pression sur le profil de $S(\mathbf{q}, \omega)$: au-dessus de 0.01 meV environ, la pression entraîne une diminution du signal, et ceci pour chacune des valeurs de q choisies. De plus, l'évolution de la courbe en fonction de q est semblable à celle observée sur les résultats expérimentaux : l'intensité croît avec l'augmentation de q.

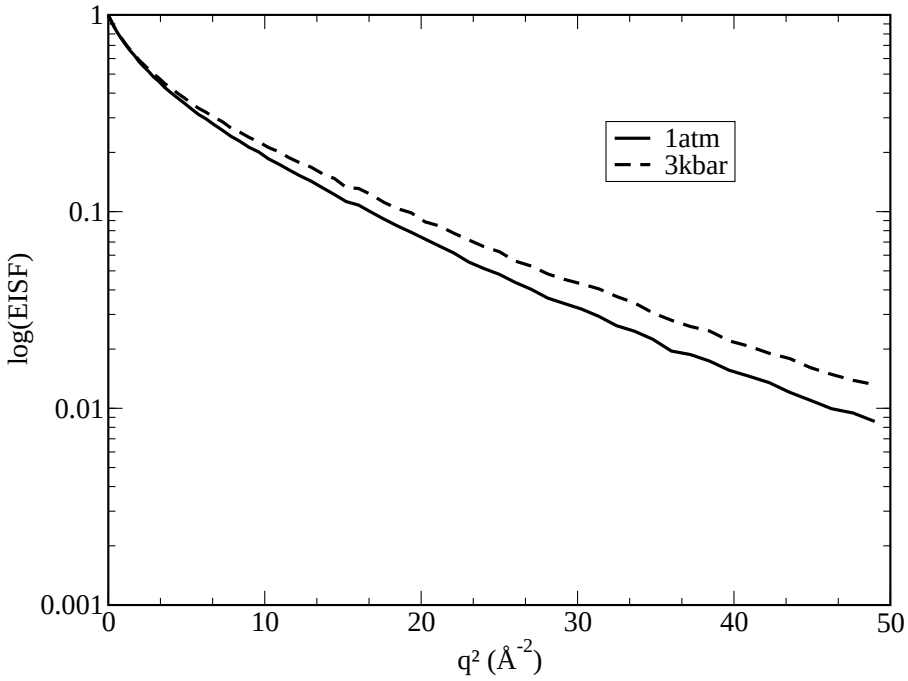

FIG. 24 – Représentation de log(EISF) en fonction de q^2.

4.2.1 Expériences de diffusion de neutrons sous pression

a/ Résultats expérimentaux issus de Mibemol - Les valeurs de $\mathbf{q}_{el}$ correspondant aux angles moyens des groupements des détecteurs sont compris entre 0.42 Å^{-1} et 1.80 Å^{-1}. De manière générale, sur l'ensemble de ces groupes, les effets dûs à la pression sont assez faibles, et l'on observe des changements significatifs au niveau des ailes quasi-élastiques au-dessus de 1 Å^{-1}.

Un exemple de spectre de diffusion est présenté figure 25 où sont représentés les données brutes et le résultat de l'ajustement.

Le graphique 26 représente pour chaque pression la demi-largeur à mi-hauteur de la Lorentzienne utilisée pour ajuster les données, en fonction de $\mathbf{q}^2$. Pour des raisons de clarté, les barres d'erreurs n'ont pas été figurées. On peut globalement observer pour chaque pression un plateau jusqu'à $q = 1.36$ Å^{-1} suivi d'une partie croissante que l'on peut ajuster avec une droite (en pointillés).

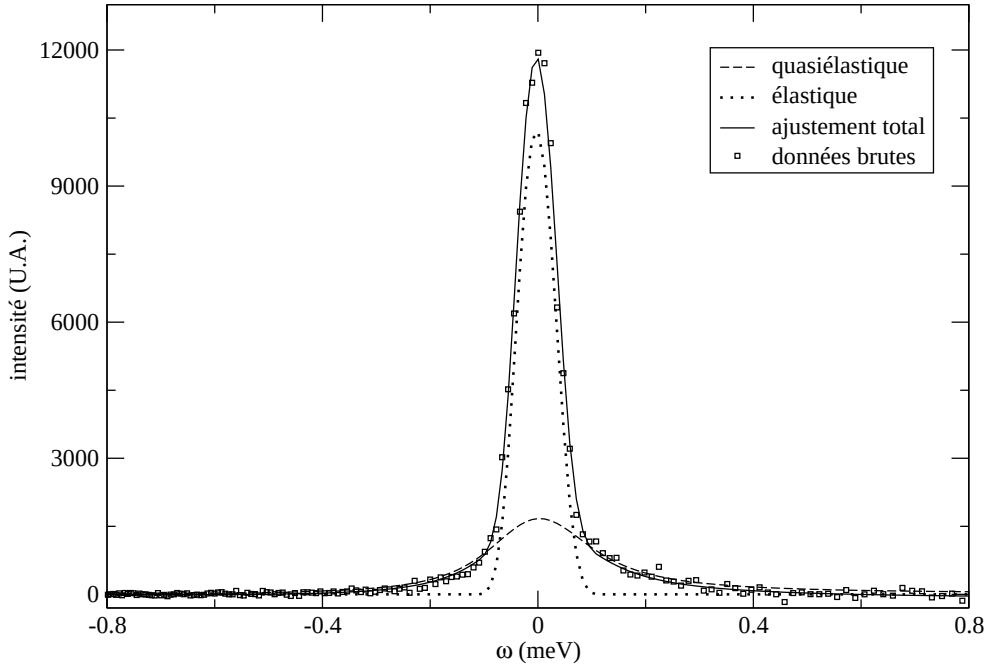

FIG. 25 – Exemple de spectre de diffusion du lysozyme en solution ajusté dans sa région quasiélastique, à $\mathbf{q} = 1.7$ Å^{-1} pour une pression de 1 atm.

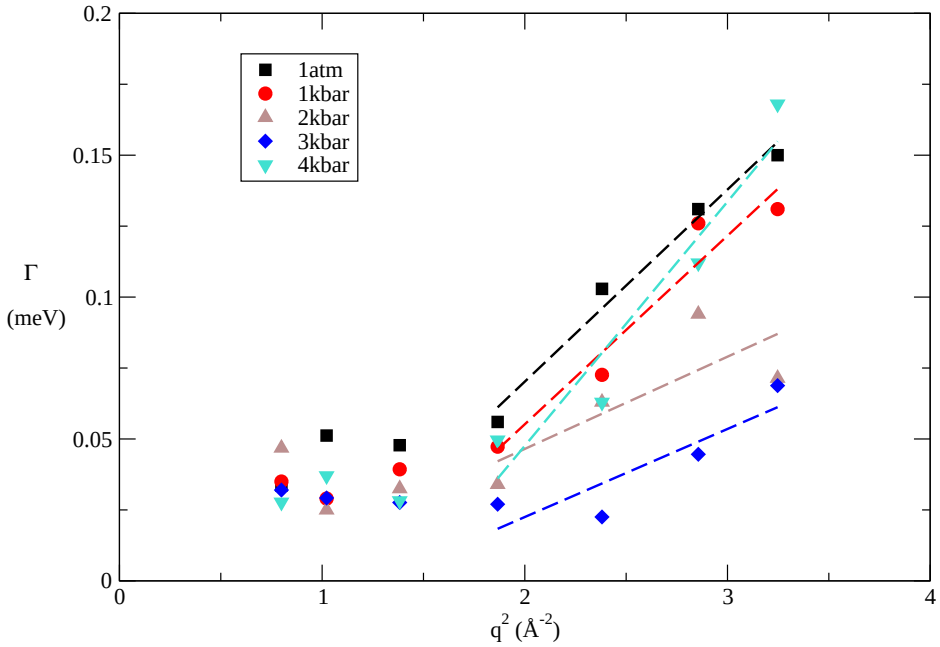

FIG. 26 – Demi-largeur à mi-hauteur de la Lorentzienne d'ajustement en fonction de q^2, aux 5 pressions de l'expérience.

Il est difficile d'expliquer clairement l'allure de ces courbes et on doit garder à l'esprit que l'ajustement avec une Lorentzienne, le seul modèle qui a permis d'exploiter les données parmi ceux disponibles dans le programme utilisé, décrit une diffusion globale et n'est donc pas adapté lorsqu'il s'agit, comme ici, d'un ensemble plus complexe de comportements dynamiques (diffusion globale et interne, cette dernière étant celle qui nous intéresse).

Le graphique 27 donne l'évolution en fonction de la pression de la pente de la partie croissante de ces courbes, d'après l'équation (60). Compte tenu de toutes les restrictions évoquées précédemment concernant l'utilisation de ce modèle à une seule Lorentzienne, cette pente ne peut pas représenter un coefficient de diffusion proprement dit et ne constitue qu'une information qualitative moyenne montrant un effet de la pression sur la largeur du pic quasiélastique du signal. L'ordre de grandeur de cette pente est d'ailleurs environ 3 fois plus élevé que celui du coefficient obtenu par diffusion de lumière (figure 17), ce qui montre qu'elle ne correspond pas au coefficient de diffusion globale mais comprend sans doute la contribution d'autres mouvements. Si l'on observe l'évolution de ce 'pseudo-coefficient' avec la pression, on constate une diminution avec l'augmentation de la pression jusqu'à 3 kbar, puis une brusque remontée à 4 kbar témoignant d'un changement possible dans l'échantillon au-delà de 3 kbar.

Afin de montrer l'aspect non-exponentiel de la relaxation des mouvements internes de la molécule et de mettre en évidence les limites de l'utilisation d'un modèle simple comme la Lorentzienne, le facteur de structure dynamique incohérent issu des simulations est ajusté avec une Lorentzienne par la méthode des moindres carrés. Le graphique 28 met en évidence que la forme de ce spectre ne correspond plus à une Lorentzienne dès que l'on s'éloigne des très basses fréquences, la Lorentzienne décroissant proportionnellement à $\frac{1}{\omega^2}$ vers les hautes fréquences (équation 59). Nous verrons que le comportement du facteur de structure dynamique simulé et expérimental se rapproche plutôt d'une décroissance selon $\frac{1}{\omega^{1+\beta}}$ avec $\beta \simeq 0.5$.

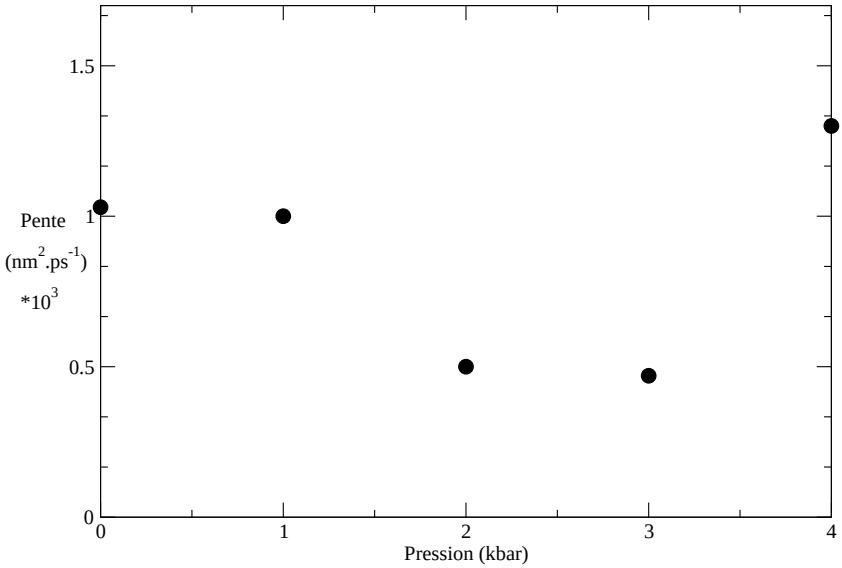

FIG. 27 – Evolution en fonction de la pression de la pente obtenue par l'ajustement avec une droite de la partie croissante des courbes donnant Γ en fonction de q^2.

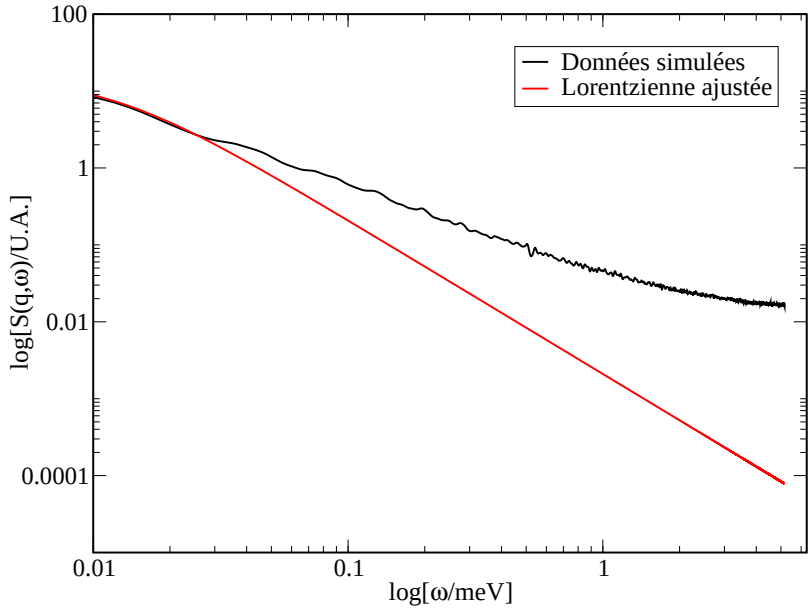

FIG. 28 – Facteur de structure dynamique incohérent à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$ issu des simulations, ajusté avec une Lorentzienne.

b/ Résultats expérimentaux obtenus sur IN5 -

- Basse résolution - Les résultats obtenus à basse résolution n'ont pas pu être exploités et interprétés correctement du fait d'une fuite de l'échantillon vers le capillaire survenue au cours de l'expérience qui a fait chuter la concentration de 10%. Un exemple des spectres obtenus est présenté figure 29.

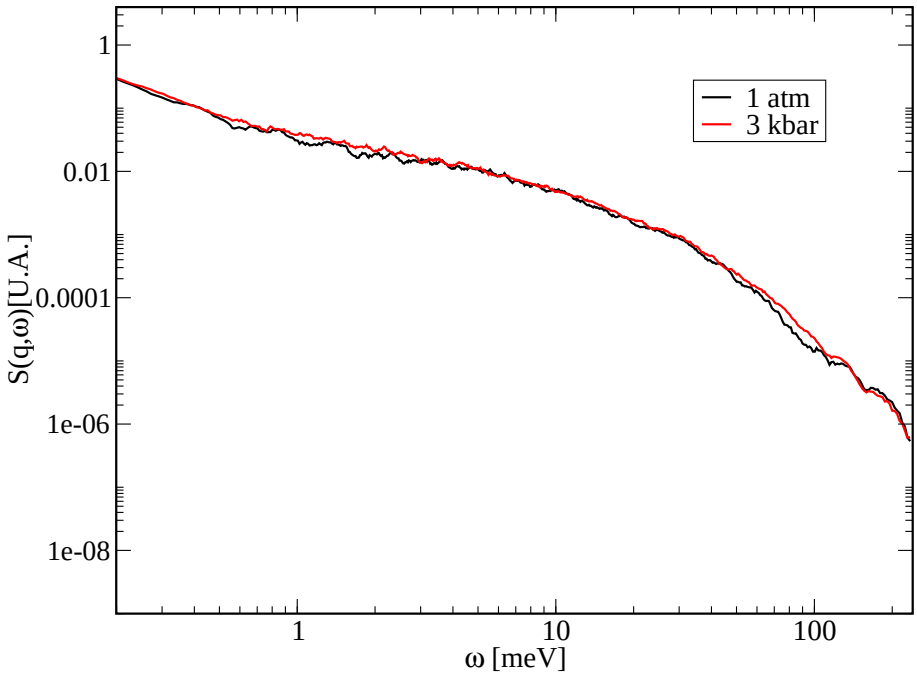

FIG. 29 – Facteur de structure dynamique à 1 atm et 3 kbar issu des expériences menées sur IN5 à basse résolution et pour $q_{el} = 2.16\text{Å}^{-1}$.

- Haute résolution - D'une manière générale, on ne peut pas discerner d'effet notable de la pression sur le profil des fonctions de diffusion. Selon le groupement de détecteurs considéré et selon la taille et l'angle moyen de ces groupements, l'éventuelle tendance détectée est faible et susceptible d'être différente si l'on modifie légèrement la façon de grouper les détecteurs. Deux exemples des profils obtenus sont présentés figures 30 et 31.

Dans les figures 32 et 33 sont représentés les facteurs de structure aux 2 pressions de l'expérience, pour plusieurs valeurs de q, en valeurs logarithmiques.

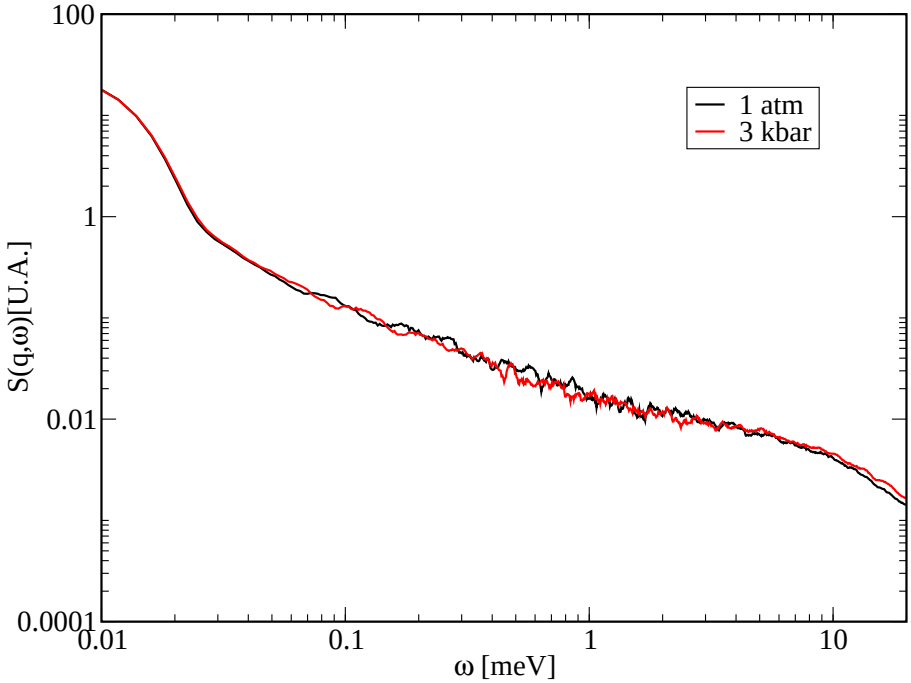

FIG. 30 – Facteur de structure dynamique à 1 atm et 3 kbar issu des expériences menées sur IN5 à haute résolution, à $q_{el} = 0.25\text{Å}^{-1}$.

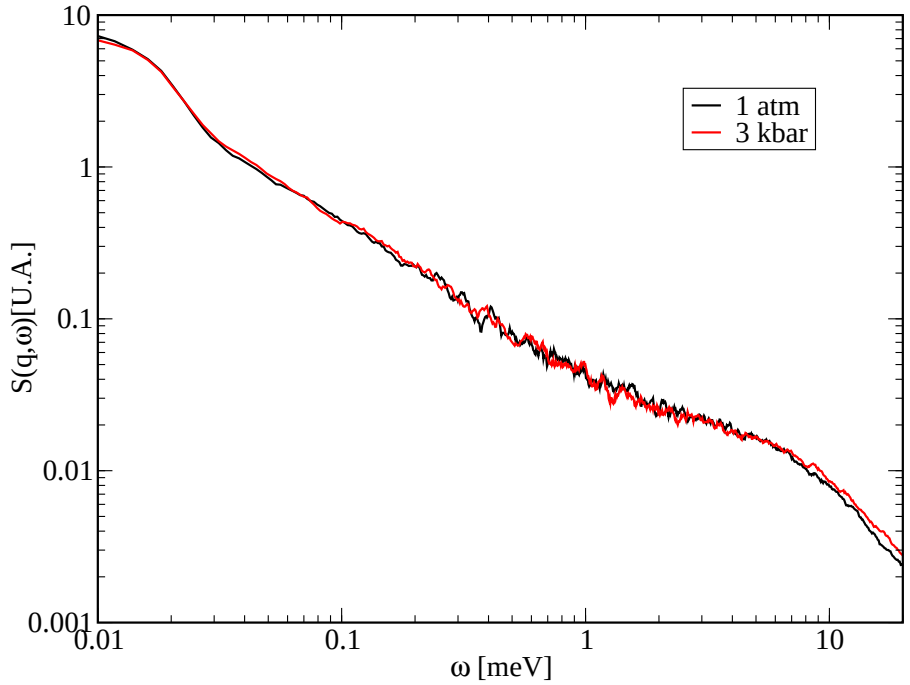

FIG. 31 – Facteur de structure dynamique à 1 atm et 3 kbar issu des expériences menées sur IN5 à haute résolution, à $q_{el} = 0.81\text{Å}^{-1}$.

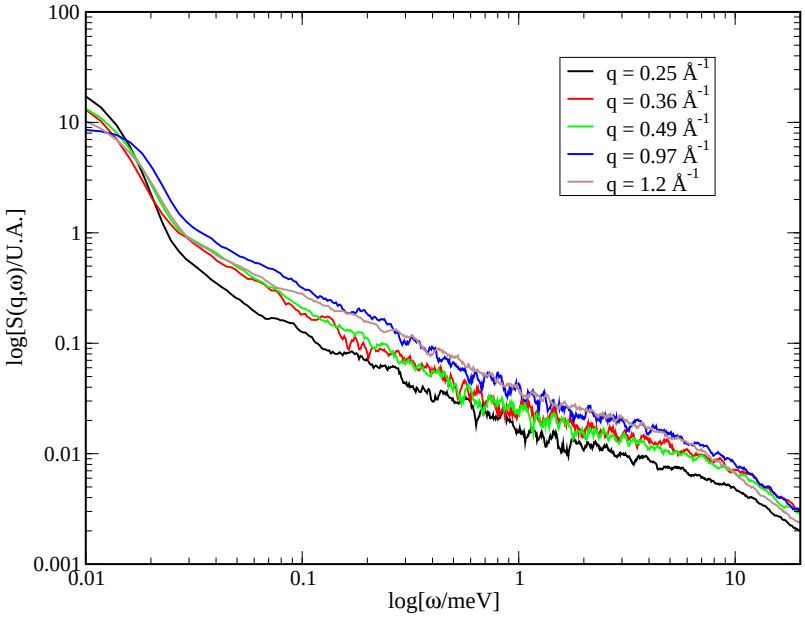

FIG. 32 – Facteur de structure dynamique à 1 atm issu des expériences menées sur IN5 à haute résolution, pour plusieurs valeurs de q.

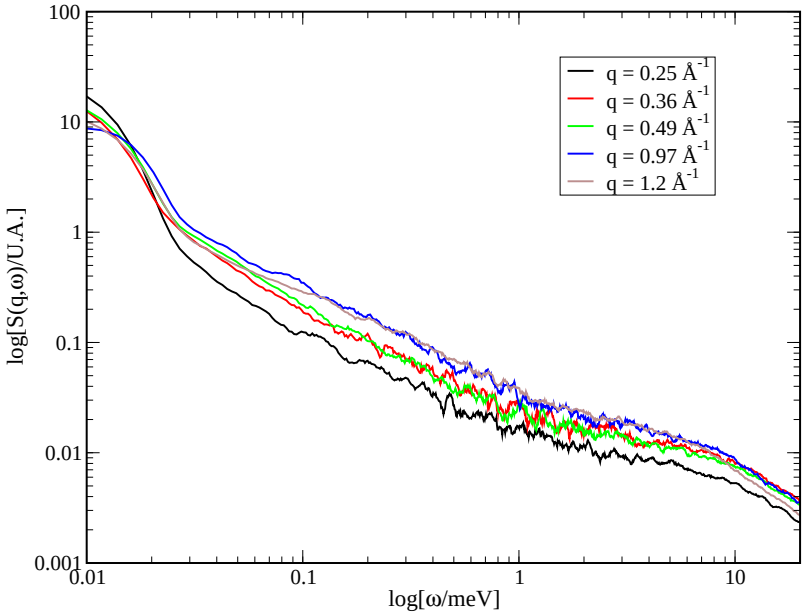

FIG. 33 – Facteur de structure dynamique à 3 kbar issu des expériences menées sur IN5 à haute résolution, pour plusieurs valeurs de q.

On constate globalement une augmentation de l'intensité de cette partie du signal avec q.

Nous avons estimé l'EISF expérimental en calculant la surface séparant les courbes expérimentale et théorique dans la partie en-deça de la limite en pointillé figurée sur le graphique 37. Il faut garder à l'esprit que la grandeur ainsi déterminée ne représente pas le véritable EISF des molécules de lysozyme car sont incluses dans cette partie du spectre expérimental les composantes liées à la résolution de l'appareil et à la diffusion globale de la molécule. Toutefois, nous avons essayé, par cette méthode, d'évaluer qualitativement l'impact de la pression sur l'EISF expérimental. Il découle de ce calcul que l'EISF ainsi déterminé (avec toutes les limites évoquées précédemment) a tendance à suivre la même évolution en fonction de la pression que celle de l'EISF théorique : il augmente légèrement avec la pression, comme le suggère le graphique 34.

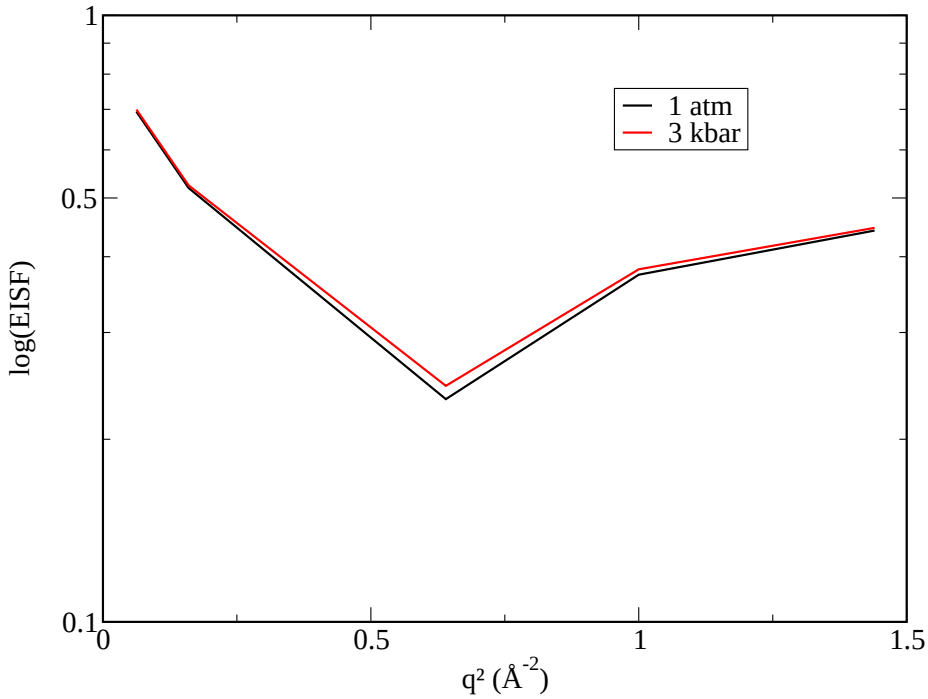

FIG. 34 – EISF calculé à partir de la surface comprise entre la courbe théorique et la courbe expérimentale dans la région élastique, en fonction de q^2, à 1 atm et 3 kbar.

L'échantillon a été soumis à une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles afin de nous renseigner sur son état après son passage sous une pression de 3 kbar. Pour ce faire, il a été dilué jusqu'à une concentration de 15 mg/ml (sa concentration initiale était trop élevée pour exploiter correctement les résultats) et du sel a été ajouté afin d'écranter les interactions intermoléculaires. Les graphiques 35 et 36 montrent, pour l'échantillon natif et l'échantillon pressurisé à 3kbar respectivement, le facteur de forme $P(q)$ en fonction de q et son ajustement par une exponentielle qui permet d'accéder au rayon de giration R_g de la molécule (approximation de Guinier [127]) :

$$P(q) \propto \exp\left(-\frac{q^2 {R_g}^2}{3}\right) \; ; qR_g < 1 \tag{90}$$

L'ajustement est de bonne qualité et le rayon de giration obtenu correspond aux valeurs connues pour le lysozyme ce qui met en évidence que l'échantillon est plutôt monodisperse et que le lysozyme est resté monomérique.

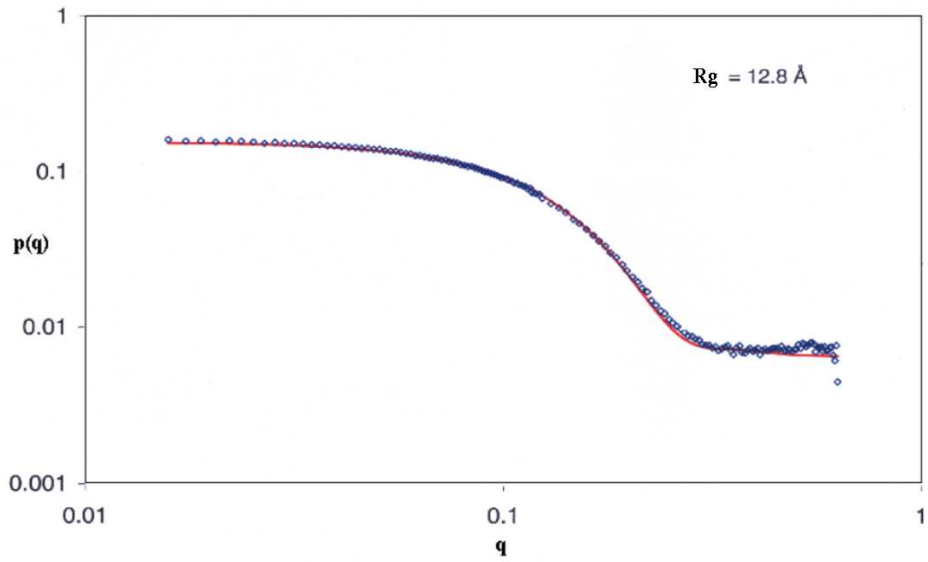

FIG. 35 – Facteur de forme de l'échantillon natif en fonction de q (bleu) et résultat de l'ajustement par l'approximation de Guinier (rouge).

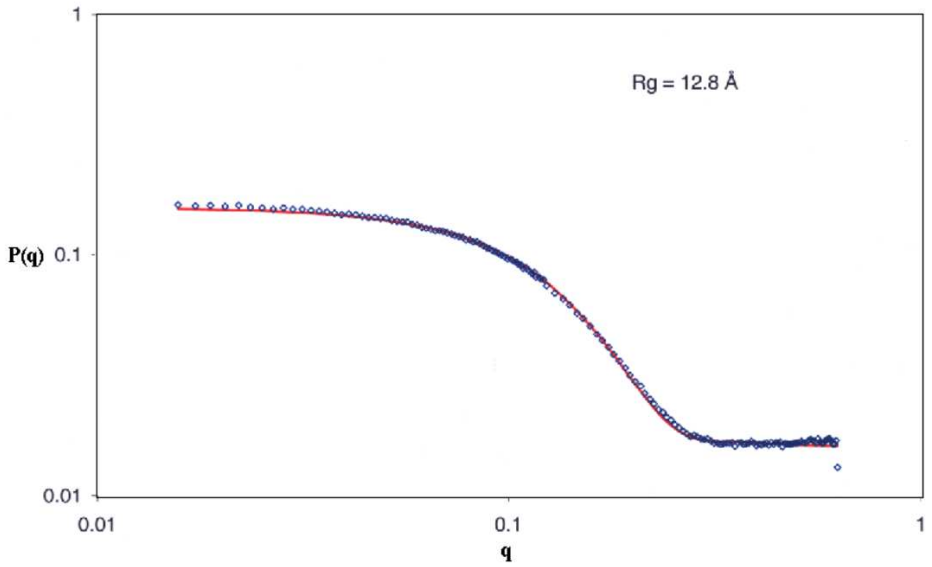

FIG. 36 – Facteur de forme de l'échantillon pressurisé à 3 kbar en fonction de q (bleu) et résultat de l'ajustement par l'approximation de Guinier (rouge).

4.3 Comparaison des profils des fonctions de diffusion expérimentales et théoriques

4.3.1 Comparaison directe

Dans un premier temps, nous avons comparé les résultats obtenus sur IN5 à haute résolution avec ceux issus de l'application du modèle autorégressif aux trajectoires simulées, sans convoluer ceux-ci avec la diffusion globale et la résolution de l'appareil, et sans ajouter l'EISF. La figure 37 représente le facteur de structure dynamique expérimental superposé à celui calculé à partir des simulations (modèle autorégressif). Les courbes sont rapprochées l'une de l'autre afin de superposer au mieux les parties correspondant à la région quasi-élastique. La ligne pointillée matérialise la limite au-dessous de laquelle il manque la composante élastique au facteur de structure dynamique théorique.

On constate que dans la région quasi-élastique les 2 courbes se superposent bien. Le

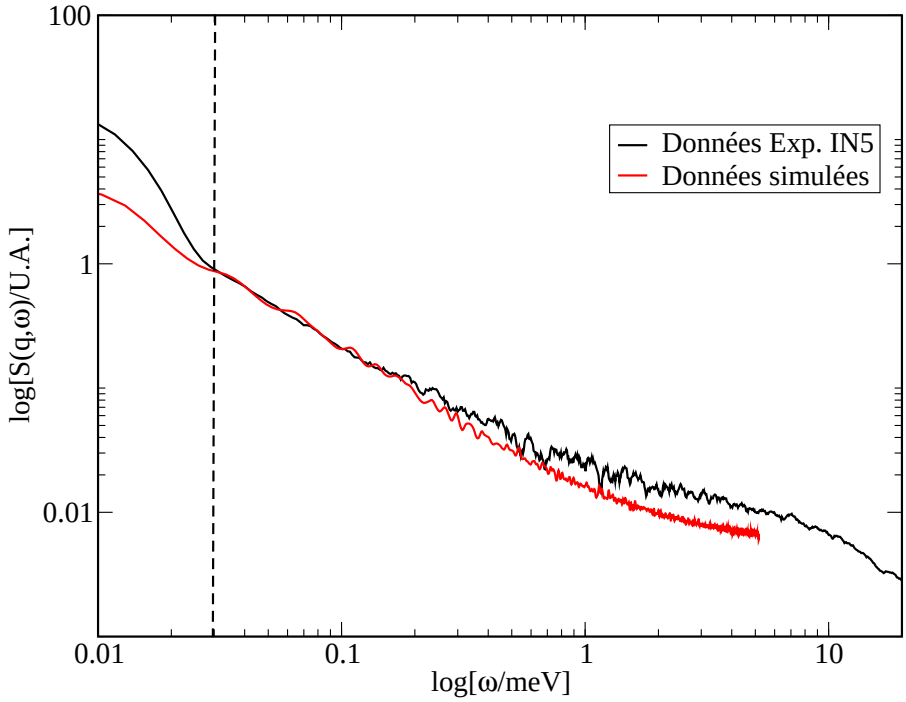

FIG. 37 – Superposition des facteurs de structure dynamiques obtenus expérimentalement et par simulation, à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$, exprimées en valeurs logarithmiques.

graphique 38 présente, toujours à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$, les données expérimentales et les courbes obtenues à partir du modèle autorégressif généré en imposant un pas de temps de 0.4 ps ou 0.04 ps, ceci afin de couvrir entièrement la gamme de fréquence atteinte lors de l'expérience. Les courbes simulées sont volontairement rapprochées de la courbe expérimentale afin de comparer leurs profils.

On observe une bonne complémentarité entre les 2 courbes issues du modèle autorégressif : la courbe obtenue à partir du modèle AR avec un pas de temps de 0.4 ps reproduit correctement les fréquences moyennes puis dans les hautes fréquences le calcul effectué avec un pas de temps plus fin permet de prolonger le profil, avec un comportement qui se rapproche de celui des données expérimentales.

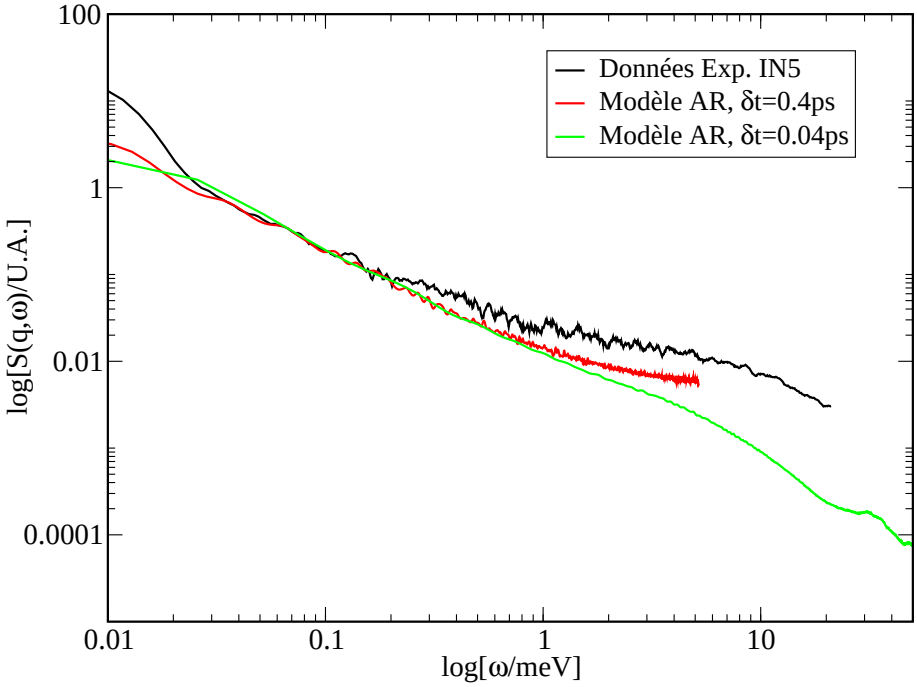

FIG. 38 – Superposition des facteurs de structure dynamiques obtenus expérimentalement et à partir du modèle AR avec 2 pas de temps différents, pour $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

4.3.2 Convolution des données simulées et comparaison avec les résultats expérimentaux

Dans cette étape, nous avons voulu voir dans quelle mesure nous pouvions retrouver le profil de $S(\mathbf{q}, \omega)$ expérimental à partir des données simulées qui proviennent uniquement de la dynamique interne.

Le signal obtenu à partir des expériences de diffusion de neutrons résulte d'une convolution de plusieurs contributions liées à l'échantillon elles-mêmes convoluées par la résolution de l'appareil. Dans le cas idéal où seuls les mouvements atomiques internes seraient à l'origine du signal, on pourrait écrire :

$$\mathcal{S}_{int}(\mathbf{q}, \omega) = EISF(\mathbf{q})\delta(\omega) + \mathcal{S}'_{int}(\mathbf{q}, \omega) \tag{91}$$

L'EISF représente la partie élastique qui serait infiniment étroite et haute, et le reste du signal (quasi-élastique et inélastique) est inclus dans $\mathcal{S}'_{int}(\mathbf{q}, \omega)$.

En réalité, les molécules en solution diffusent induisant une convolution de $\mathcal{S}'_{int}(\mathbf{q},\omega)$ avec une composante de diffusion globale décrite par une Lorentzienne (relation 59) et que l'on suppose non corrélée à la dynamique interne. Le facteur de structure dynamique résulte de la convolution suivante :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = \mathcal{S}_{glob}(\mathbf{q},\omega) \otimes \mathcal{S}_{int}(\mathbf{q},\omega) \tag{92}$$

D'autre part, la résolution de l'appareil est finie et implique donc une convolution du signal avec une fonction caractéristique de l'appareil, en l'occurence une Gaussienne. D'après les relations précédentes, l'expression finale du facteur de structure dynamique s'écrit de la manière suivante :

$$\mathcal{S}(\mathbf{q},\omega) = EISF(\mathbf{q})\mathcal{R}(\omega) \otimes \mathcal{S}_{glob}(\mathbf{q},\omega) + \mathcal{S}'_{int}(\mathbf{q},\omega) \otimes \mathcal{R}(\omega) \otimes \mathcal{S}_{glob}(\mathbf{q},\omega) \tag{93}$$

Un programme Mathematica [125] a été écrit pour effectuer les opérations présentes dans cette équation par une méthode semi-analytique. Tout d'abord, une fenêtre Lorentzienne et une fenêtre Gaussienne sont convoluées analytiquement. Ensuite, la forme numérique de la fenêtre résultante est générée à partir des valeurs d'énergie des données simulées. Puis cette fenêtre est convoluée numériquement aux valeurs du $S(\mathbf{q},\omega)$ simulé. Enfin, l'EISF issu des simulations est intégré pour donner une estimation finale de $S(\mathbf{q},\omega)$.

La résolution de l'appareil est facilement obtenue grâce au spectre du vanadium. Pour le coefficient de diffusion, on possède une évaluation grâce à l'étude par diffusion de lumière citée précédemment et qui donne un coefficient très proche de celui que nous avons calculé à partir des simulations.

Le graphique 39 représente à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$ le facteur de structure dynamique théorique convolué à une Gaussienne et une Lorentzienne, en ajoutant l'EISF. Le facteur de structure dynamique expérimental est également figuré.

Il apparaît que cette convolution permet, d'un point de vue qualitatif, de reproduire le profil caractéristique du facteur de structure dynamique expérimental. Nous

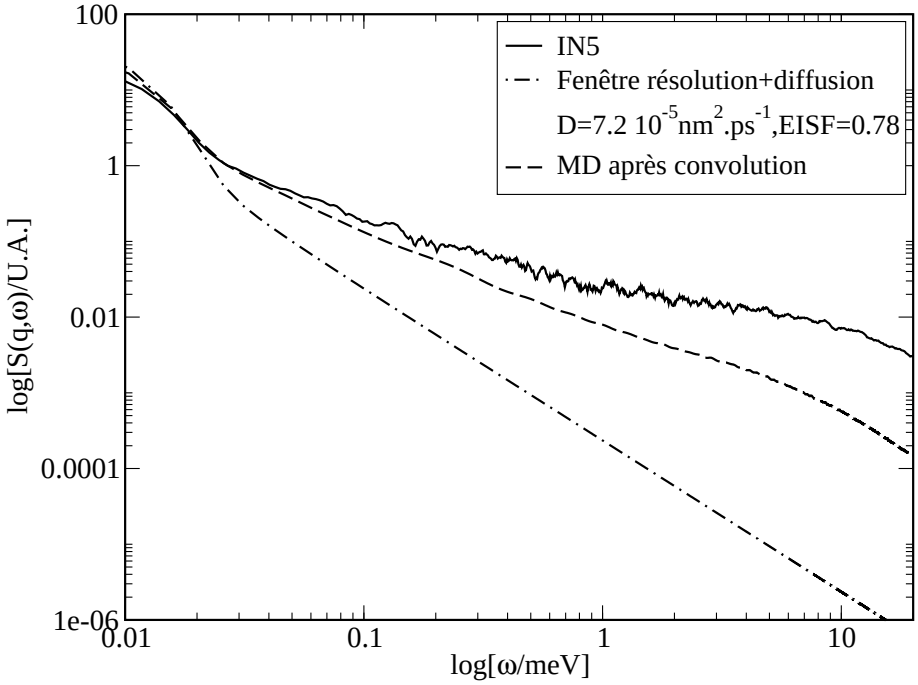

FIG. 39 – Facteur de structure expérimental (à haute résolution) et issu de la convolution des données simulées avec une Gaussienne et une Lorentzienne, en ajoutant EISF=0.78, à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

avons modulé les paramètres coefficient de diffusion et EISF pour tenter d'améliorer la ressemblance. Il apparaît, comme le montre le graphique 40 que la superposition est meilleure lorsque l'EISF est choisi entre 0.8 et 0.75 au lieu de 0.9 comme ce qui est calculé à partir des simulations.

Nous verrons dans la discussion les raisons probables de cette différence entre l'EISF calculé et la valeur qui permet un bon ajustement avec les données expérimentales. De même, la superposition est d'autant plus satisfaisante que le coefficient de diffusion diminue, dans une gamme entre 5 et 9 $.10^{-5} nm^2.ps^{-1}$ qui reste raisonnable compte tenu des données que l'on possède sur ce coefficient à partir de données expérimentales et simulées. Cependant cette influence n'est pas très marquée : la diminution de cette valeur permet d'obtenir un épaulement qui épouse mieux la forme des données expérimentales, mais son importance s'atténue vers des fréquences plus grandes. Ceci sera démontré à l'aide du modèle fractionnaire.

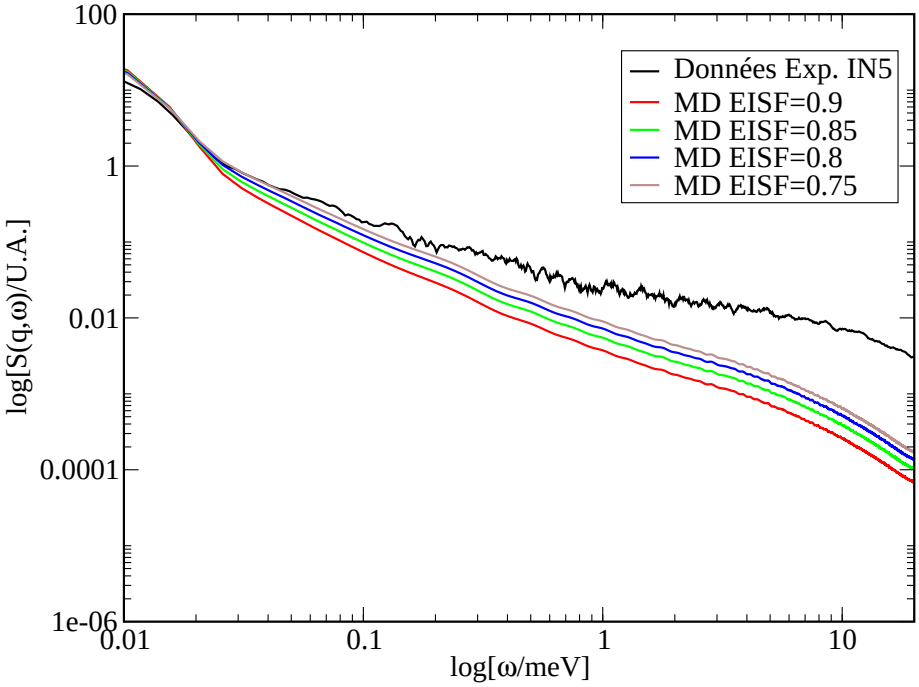

FIG. 40 – Facteur de structure expérimental (à haute résolution) et issu de la convolution des données simulées avec une Gaussienne et une Lorentzienne, en ajoutant un EISF de valeur variable, à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

4.4 Rapprochement des résultats avec les modèles

4.4.1 Modèle fractionnaire

Le modèle fractionnaire est ajusté au facteur de structure dynamique issu des simulations, ses paramètres τ et β sont dépendants de $\mathbf{q}$. Il est comparé aux données expérimentales obtenues à haute résolution. Le graphique 41 montre le $S(\mathbf{q}, \omega)$ expérimental à $q = 0.4\text{Å}^{-1}$ et celui obtenu à partir du modèle fractionnaire dans lequel on a inclus le coefficient de diffusion globale.

Les paramètres obtenus par l'ajustement de ce modèle pour cette valeur de q sont $\tau = 4.2$ et $\beta = 0.4$. La valeur de ce paramètre β apporte une information importante sur la dynamique : la figure 41 montre que la décroissance de $S(\mathbf{q}, \omega)$ expérimental dans la région quasi-élastique se superpose bien à celle de $S(\mathbf{q}, \omega)$ issu du modèle fractionnaire. Or celle-ci est proportionnelle à $\frac{1}{\omega^{1+\beta}}$ avec $\beta \simeq 0.5$ (cette valeur varie légèrement

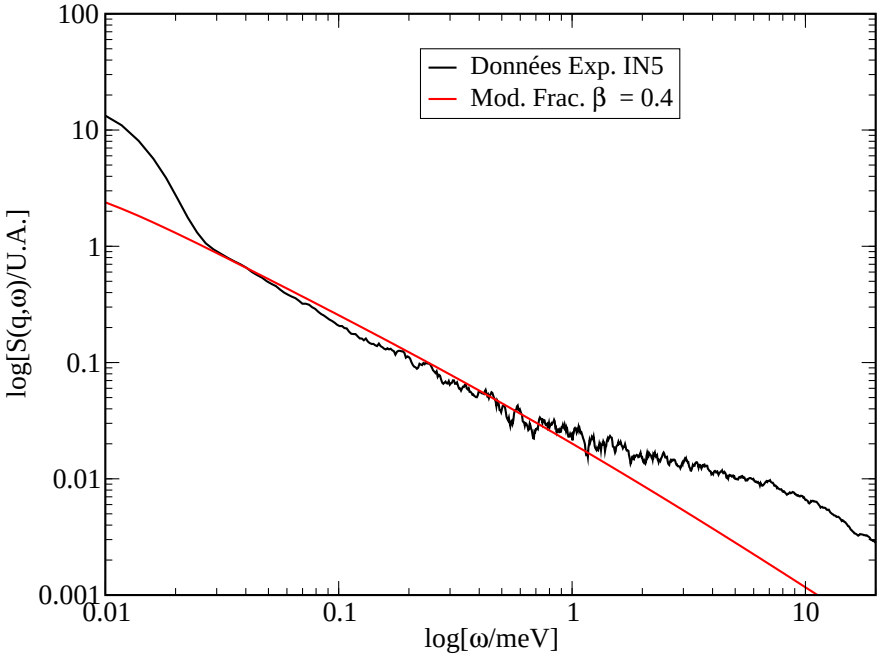

FIG. 41 – Facteur de structure dynamique expérimental (à haute résolution) et issu du modèle fractionnaire ($D_{diff} = 10 \cdot 10^{-5} nm^2 ps^{-1}$), $q = 0.4$Å^{-1}.

selon q), et non à $\frac{1}{\omega^2}$ comme c'est le cas pour une Lorentzienne qui n'est pertinente que pour décrire la diffusion globale. Cette différence met en évidence que l'on peut distinguer les mouvements internes de la diffusion globale dans les données issues de l'expérience.

Le coefficient de diffusion globale obtenu par simulation est en accord avec celui trouvé en DLS (graphique 17). Pourtant, d'autres études donnent une valeur un peu différente : Perez et al. [128] obtiennent un coefficient de diffusion de l'ordre de $9.10^{-5} nm^2 ps^{-1}$. Grâce au modèle fractionnaire, on peut montrer que la valeur exacte de ce coefficient n'est pas déterminante dans l'allure du spectre. Le graphique 42 montre le $S(\mathbf{q}, \omega)$ expérimental et celui obtenu à partir du modèle fractionnaire en utilisant 3 valeurs différentes pour la diffusion globale.

On observe qu'en faisant varier le coefficient d'un facteur 3 (en restant dans une gamme réaliste) le profil de $S(\mathbf{q}, \omega)$ du modèle fractionnaire n'est presque pas modifié.

Le modèle fractionnaire a aussi l'avantage de pouvoir être caractérisé par une fonc-

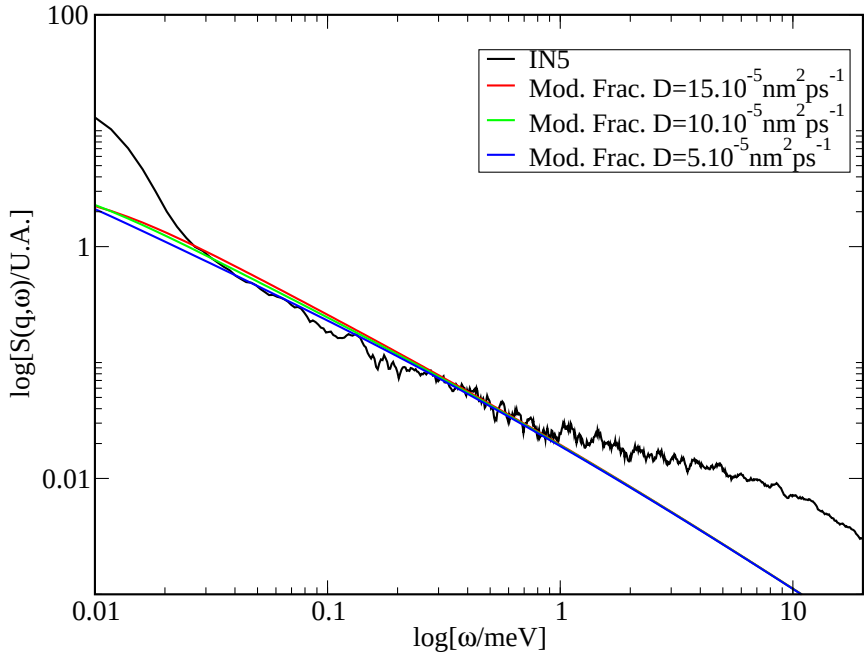

FIG. 42 – Facteur de structure dynamique expérimental (à haute résolution) et issu du modèle fractionnaire pour 3 valeurs de $D_{dif\ glob}$, $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

tion mémoire de la forme (76), contrairement à d'autres modèles comme l'exponentielle étirée, ce qui joue en faveur de la pertinence de ce modèle pour décrire les processus dynamiques complexes d'un système comme une protéine.

4.4.2 Equation généralisée de Langevin

La fonction mémoire du modèle fractionnaire peut être déterminée et elle possède la forme suivante (article soumis, [114]) :

$$\xi(t) \propto (\beta - 1) \left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta-2}, \ t > 0 \tag{94}$$

avec $\tau > 0$ et $0 < \beta < 1$.

Il apparaît que cette mémoire est à longue portée, elle décroît lentement de façon non exponentielle, c'est-à-dire selon une loi de puissance en temps.

Cette fonction mémoire a la propriété $\int_0^\infty \xi(t) = 0$ et peut être construite comme

le montre le graphique 43 représentant la fonction mémoire de $\mathcal{F}'(\mathbf{q}, t)$ du modèle fractionnaire obtenu à partir des simulations du lysozyme à 1 atm et 3 kbar, pour $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

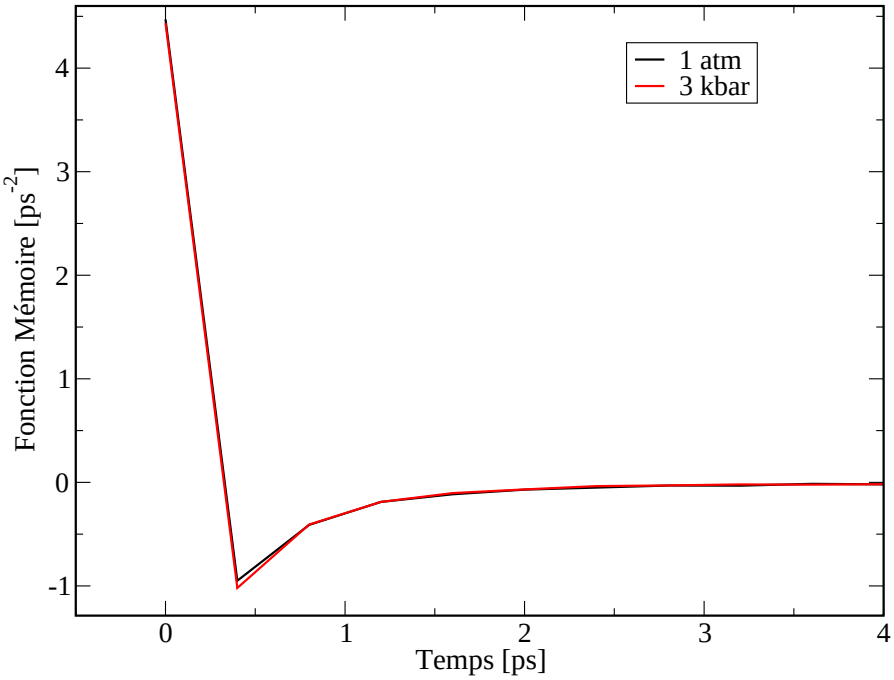

FIG. 43 – Fonction mémoire de la fonction intermédiaire de diffusion incohérente du modèle fractionnaire calculé à partir des données simulées, à 1 atm et 3 kbar, pour $q = 0.4\text{Å}^{-1}$.

Les processus caractérisés par une mémoire à longue portée présentent cette forme algébrique. Nous avons d'ailleurs pu constater que la relaxation de ce genre de processus aux multiples échelles de temps, comme ici la dynamique d'une protéine, ne peut être décrite par une exponentielle simple (ajustement de $S(\mathbf{q}, \omega)$ simulé avec une Lorentzienne, graphique 28).

On remarque également un effet modéré de la pression sur l'allure de la fonction mémoire, confirmant ainsi l'existence d'une influence apparemment faible de la pression sur la dynamique de la protéine déjà observée au niveau des courbes du facteur de structure dynamique.

5 Discussion

5.1 Résultats expérimentaux

La difficulté pour extraire des informations valables à partir des données de diffusion de neutrons réside dans 2 points de vue : le premier concerne le facteur technique, à savoir ce qui relève des limites dues au matériel et à l'appareil utilisé. Il faut prendre en compte la résolution de l'instrument, qui est déduite du spectre du vanadium. La valeur de cette résolution nous donne la limite des temps de relaxation alors observables. Le deuxième est lié au comportement dynamique de l'échantillon : il existe tout un spectre de temps de relaxation dans un système aussi complexe qu'une protéine, d'autant plus qu'elle se trouve en solution ce qui ajoute une dynamique globale. Il faut ajouter à ces points l'existence probable de la diffusion multiple qui n'a pas été prise en compte dans le traitement des données. Cependant, compte tenu du fait que la pression imposée dans cette étude ne modifie que très peu la densité du système et que seule cette dernière est susceptible ici d'influencer la diffusion multiple, on peut supposer qu'elle ne change pas avec la pression. Même si la qualité des données ne semble pas permettre une analyse fine pouvant révéler ce spectre des mouvements en présence, on peut néanmoins obtenir des informations intéressantes sur l'effet de la pression sur la dynamique interne, en utilisant des modèles très simples comme la Lorentzienne. Il faut cependant préciser que les simulations de DM montrent que l'ajustement avec une Lorentzienne, ou même deux, ne donne qu'une estimation assez grossière de la ligne quasi-élastique. Ce genre de modèle simpliste ne peut rendre compte de la dynamique complexe des atomes.

5.1.1 Résultats des expériences menées sur Mibemol

Concernant les données obtenues sur Mibemol, la soustraction de la cellule préalablement à la soustraction Solution-Tampon nous donnait des graphiques inexploitables pour l'ajustement. Cette opération n'a donc pas été effectuée. Lorsqu'on ne sous-

trait pas la cellule vide avant la soustraction, le coefficient 0.94 que l'on applique au signal du tampon (avec la cellule) a pour conséquence qu'il reste 6% de la contribution de la cellule dans le résultat final. La difficulté vient du fait que le signal de la cellule vide n'est pas strictement équivalent à la contribution de la cellule quand elle est remplie du fait de la présence de la solution qui absorbe une partie des neutrons. Le signal mesuré sur la cellule seule est donc plus élevé que la contribution due à la cellule quand celle-ci contient une solution. Les coefficients de transmission sont répertoriés dans le tableau 3.

	Coefficient d'absorption (5Å) [cm^{-1}]	Coefficient de diffusion [cm^{-1}]	Coefficient de transmission [cm^{-1}]
Cellule	0.637	0.254	0.63
Solution	0.004	0.770	0.64
Tampon	0.006	0.646	0.69

TAB. 3 – Coefficients d'absorption, de diffusion et de transmission des éléments du système irradié, à 5Å.

Compte tenu de l'absence de corrections liées aux caractéristiques de la cellule (géométrie, absorption) une erreur de 6% lors de la soustraction de sa contribution n'est pas jugée conséquente dans l'allure du spectre final.

Avec le modèle d'ajustement à disposition donnant le meilleur résultat, à savoir un pic de Dirac et une Lorentzienne, on observe un rétrécissement de la partie quasiélastique du pic central jusqu'à 3 kbar puis une brusque remontée à 4kbar. On peut faire l'hypothèse qu'une modification de la structure s'est opérée entre 3 et 4 kbar et a entrainé une modification assez radicale de la dynamique du système. Il semble que la part de mouvements diffusifs ait fortement augmenté dans cette dernière partie de la progression en pression, probablement due à une dénaturation partielle du lysozyme.

Un test en diffusion de neutrons aux petits angles a été mené sur le lysozyme natif et sur celui ayant subi la mise sous pression, au laboratoire Léon Brillouin. Même si

aucune valeur précise n'a été déterminée à partir de ces expériences, il en est ressorti que la pression montée à 4 kbar a provoqué un changement modéré de structure, les profils de diffusion montrant une tendance à se rapprocher d'un comportement de polymère gaussien. Il a été montré dans l'étude de Nyström et Roots [32] que le lysozyme soumis à une pression de 2500 bar subissait une augmentation réversible de son rayon hydrodynamique de 3%, mais à 4000 bar, cette hausse, de 9%, perd sa réversibilité totale puisque le retour à la pression atmosphérique conduit à un rayon 4% plus élevé que celui de la protéine native. La molécule ne retrouve donc pas rigoureusement sa structure de départ. Les auteurs déduisaient de ce résultat l'existence d'un état métastable. On peut mettre en parallèle leurs observations avec l'augmentation brusque entre 3000 et 4000 bar du coefficient de diffusion obtenu à partir de l'ajustement de nos données expérimentales.

On peut donc penser que jusqu'à 3 kbar les molécules de lysozyme subissent une diminution de leurs mouvements diffusifs sans changement notable dans leur structure, et qu'au-delà de 3 kbar elles connaissent une déstructuration sans doute partielle et en partie ou totalement irréversible.

Un ajustement avec 2 Lorentziennes a été tenté mais a donné de moins bons résultats. La diffusion globale n'a pas pu être mise en évidence séparément des mouvements diffusifs internes grâce à cette seconde Lorentzienne.

Cette expérience a permis de mettre en évidence un effet de la pression sur la dynamique des protéines en solution, à savoir une diminution des mouvements diffusifs avec l'augmentation de la pression. En revanche, la caractérisation de ces mouvements et leur séparation est restée très imprécise : ajuster les données avec une Lorentzienne suppose que l'on considère qu'il n'existe qu'un seul temps de relaxation à l'échelle où nous nous trouvons. Or un système aussi complexe qu'une protéine ne peut pas être résumé à un seul type de mouvement mais à un ensemble complexe de processus dynamiques. L'ajustement avec une Lorentzienne donne une vue moyenne de cet ensemble. Nous avons choisi de traiter les données obtenues sur IN5 d'une autre manière et nous verrons qu'un modèle fractionnaire est plus adapté pour décrire la multiplicité

des processus en présence.

5.1.2 Résultats des expériences sur IN5

Les expériences à basse résolution n'ont pu être correctement exploitées et interprétées du fait d'un problème de fuite entre la cellule et le capillaire qui a abouti à une diminution de la concentration de 10%. On observe une légère augmentation de la ligne quasi-élastique et une diminution du pic élastique. Il est sans doute plus correct d'y voir un effet de la perte en protéine au cours du temps qu'un effet dû à la pression.

En ce qui concerne la haute résolution, la différence entre les profils de diffusion à 1 atm et 3 kbar de la protéine seule est trop faible pour être significative. Plusieurs facteurs peuvent rendre compte de l'absence d'effet significatif : il faut d'abord rappeler que les effets attendus sont très faibles, comme le suggèrent les simulations. Les conditions expérimentales n'étaient sans doute pas adéquates pour détecter de si faibles événements comme la résolution instrumentale. D'autre part, le traitement des données n'a pas été optimal du fait de l'absence de programmes adaptés pour effectuer les corrections requises pour ce genre de matériel : par exemple la diffusion multiple a été négligée. De plus, la soustraction de la cellule aux signaux de la solution et du tampon avant leur soustraction a donné des courbes exploitables mais aucune correction liée à la géométrie et l'absorption de la cellule n'a été opérée. Le tableau 4 montre que l'absorption de la cellule à 9 Å est très forte. Le flux de l'appareil permet néanmoins d'obtenir une bonne statistique, suffisante pour détecter un signal provenant de la protéine.

Concernant la présence éventuelle de signal cohérent, on évite le pic du facteur de structure cohérent de la solution puisque l'on se place, à haute résolution, à des valeurs de $q < 1.5$ Å^{-1} [129].

Des mesures aux petits angles ont pu être effectuées sur l'échantillon natif et pressurisé, à l'Institut Laue Langevin. Il apparaît que la valeur du rayon de giration obtenue,

	Coefficient d'absorption (9Å) [cm^{-1}]	Coefficient de diffusion [cm^{-1}]	Coefficient de transmission [cm^{-1}]
Cellule	1.147	0.254	0.48
Solution	0.0071	0.770	0.64
Tampon	0.006	0.646	0.69

TAB. 4 – Coefficients d'absorption, de diffusion et de transmission des éléments du système irradié, à 9Å.

environ 13 Å, par un ajustement adéquat (figures 35 et 36) est de l'ordre de grandeur des valeurs que fournissent les diverses techniques permettant d'accéder au rayon de la molécule de lysozyme. La différence entre les mesures sur l'échantillon natif et celles effectuées sur l'échantillon pressurisé ne permet pas de mettre en évidence une augmentation de ce rayon, c'est-à-dire une dénaturation éventuelle de la protéine. Ces mesures permettent aussi d'écarter l'hypothèse d'agrégats de taille importante.

Nous avons cherché à superposer les spectres de $S(\mathbf{q}, \omega)$ avec un modèle susceptible de rendre compte de la dynamique interne de la protéine. Le modèle fractionnaire montre un accord satisfaisant avec le facteur de structure dynamique expérimental dans la région quasi-élastique. Ce résultat vient confirmer le caractère 'multi-échelle' des temps de relaxation des mouvements internes d'une protéine, avec des propriétés de couplage entre ces échelles. Cette dynamique ne peut donc pas être décrite par des fonctions de corrélations exponentielles. L'ajustement des données en énergie avec une Lorentzienne pour décrire les mouvements internes n'est pas suffisamment précis pour rendre compte de la multiplicité et l'interdépendance de ces mouvements. Ceci est confirmé par l'ajustement médiocre du $S(q, \omega)$ simulé avec une Lorentzienne.

La validité de ce modèle fractionnaire est renforcée par le fait qu'une fonction mémoire peut être déterminée pour ce modèle, contrairement à d'autres modèles comme l'exponentielle étirée. C'est une fonction mémoire à longue portée qui décroît de manière algébrique (article soumis [114]).

Les spectres de $S(\mathbf{q}, \omega)$ obtenus sur IN5 à basse résolution ne sont pas bien repro-

duits par le modèle fractionnaire car ce modèle suppose que l'on considère de nombreux temps de relaxation de la dynamique de la molécule. Or plus la résolution est faible et moins l'étendue des mouvements détectés est large, donc on s'éloigne des conditions d'application du modèle.

5.2 Comparaison avec d'autres travaux en diffusion de neutrons

Les résultats que nous avons obtenus sur Mibemol ainsi que par simulation, à savoir un effet léger de rigidification par la pression sur la dynamique interne du lysozyme, sont corroborés par plusieurs études en diffusion quasiélastique de neutrons menées sur des protéines sous pression.

Une étude en diffusion de neutrons a été réalisée sur la trypsine soumise à une pression allant jusqu'à 900 bar [130]. La protéine est en solution très concentrée à 10% (g protéine/g tampon), c'est-à-dire environ 100 mg/ml. Les résultats de cette étude montrent une augmentation de l'EISF suggérant une diminution du volume parcouru par les protons, et une légère diminution de l'élargissement dû à la contribution quasiélastique.

Dans une étude sur la myoglobine sous pression réalisée en conditions très concentrées (0.7g d'eau par gramme de protéine) et allant jusqu'à 8 kbar, Doster et al. [131] observent une augmentation de la partie centrale du spectre, indiquant une rigidification du système avec la pression. Les auteurs en concluent que l'état moins ordonné, voire dénaturé au-dessus de 4 kbar, possède une flexibilité moins grande que la structure native et compacte de la protéine. Une diminution de la contribution quasi-élastique reflète que les fluctuations structurales se produisent moins fréquemment aux hautes pressions.

Ces résultats sont en accord avec ce que nous observons en simulation puisque l'EISF augmente et la densité d'états montre une diminution des mouvements de basses fréquences au profit des mouvements plus rapides et localisés.

5.3 Résultats obtenus en dynamique moléculaire

5.3.1 Coefficient de diffusion globale

Le coefficient de diffusion globale calculé à partir des simulations est comparé à celui obtenu par diffusion de lumière dynamique [32]. On aurait donc pu s'attendre à une divergence marquée entre les résultats des 2 approches. Or nous trouvons au contraire un bon accord. Ceci apporte un degré supplémentaire dans la confiance que l'on peut accorder au champ de force utilisé. De plus, on sait qu'il faut des pressions supérieures à 300 kbar pour altérer la structure électronique d'une molécule [24]. Les paramètres d'un champ de forces normal comme celui utilisé dans notre étude sont donc encore valable de ce point de vue.

Notre système se compose d'une seule molécule dans une boîte d'eau, ce qui ne permet pas une bonne statistique pour caractériser les mouvements globaux. De plus, les interactions hydrodynamiques qui existent en solution dues aux nombreuses frictions ne sont pas rendues de façon réaliste dans nos conditions. Dans notre système, le problème réside dans la similitude des mouvements relatifs protéine/eau d'une boîte à l'autre. Il en résulte que la friction est moins grande dans notre système de boîtes périodiques que dans une solution où règne une entropie plus importante. Un calcul des interactions hydrodynamiques a été tenté, avec un modèle constitué d'une boule dans une boîte périodique, mais les interactions entre 2 boules de 2 boîtes voisines sont différentes de celles qui existent entre 2 molécules de lysozyme qui, dans le système simulé en DM, ne sont pas strictement contraintes de rester dans leurs boîtes respectives. Le calcul des interactions hydrodynamiques avec ce modèle de boule n'est donc pas vraiment pertinent pour la comparaison avec le système simulé.

5.3.2 Effets de la pression sur la dynamique interne

Les simulations de DM mettent en évidence un effet de la pression sur la dynamique interne du lysozyme, marquée par une diminution sensible de la ligne quasi-

élastique et d'une augmentation de la hauteur de la région des très basses fréquences. Cela correspond à une baisse de la contribution des mouvements diffusifs et une rigidification de la molécule. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus en calculant les MSD et mettent en évidence que les effets induits par une pression non dénaturante sont peu marqués et risquent *a priori* de passer inaperçus dans les résultats expérimentaux. L'effet de la pression n'est donc apparemment pas spectaculaire sur le profil global du facteur de structure dynamique, mais la somme cumulée des déplacements carrés moyens a permis de mettre en évidence qu'il existe cependant une influence prépondérante de la pression sur les mouvements de basses fréquences. Ceci n'a pas été vu dans les expériences effectuées sur IN5 mais ceci ne signifie pas l'absence de cet effet dont la détection est d'autant plus difficile que les mesures se font à θ constant et non à $\mathbf{q}$ constant.

L'utilisation du modèle auto-régressif pour calculer les fonctions de diffusion permet d'améliorer la qualité et la précision du spectre grâce à l'algorithme de Burg. Les effets de la pression sur la dynamique interne et l'EISF du système simulé n'aurait pas été aussi bien mis en évidence du fait de leur faible intensité.

L'interprétation des courbes issues des simulations doit être faite avec prudence en tenant compte des limites de la technique : en effet, les hautes fréquences calculées à partir des simulations risquent d'être mal évaluées puisque le potentiel utilisé ne prend pas en compte l'aspect quantique des interactions et il se peut qu'il n'évalue pas correctement ces interactions. La sous-estimation de l'intensité des hautes fréquences est évoquée dans [132].

5.4 Comparaison et combinaison des données expérimentales et simulées

Les résultats de simulation ont été comparés aux données tirées de l'expérience à haute résolution qui permet de sonder un domaine plus large de temps de relaxation. Les résolutions plus basses ne couvrent pas une gamme suffisante pour rendre la comparaison efficace.

Les effets de la pression n'ont pas été détectés à haute résolution. Les simulations montrent quant à elles des effets minimes sur la dynamique interne qui sont peut-être masqués par d'autres effets dans cette expérience. Une influence de la pression a pourtant été observée sur Mibemol à basse résolution. Cette divergence doit être resituée dans le contexte technique et méthodologique : non seulement les appareils sont différents mais les modes et les outils de traitement le sont aussi, ce qui peut influencer la détection d'effets aussi minimes que ceux induits par une pression de 3 kbar sur la dynamique interne de la protéine (vus en simulation).

- EISF

Nous avons tenté d'estimer le comportement de l'EISF expérimental avec la pression en faisant la différence des intégrales des courbes du facteur de structure dynamique expérimental et simulé, et non en prenant la valeur à $\omega = 0meV$: en effet, une seule valeur est trop dépendante des fluctuations diverses liées aux conditions expérimentales et aux appareils, contrairement à une intégration. Cette façon de faire n'a évidemment pas la prétention de caractériser avec précision l'EISF expérimental mais cela nous donne une idée de ce qui se passe dans cette partie du spectre expérimental avec la pression.

- Domaines d'énergie comparables

La superposition des courbes issues des expériences et des simulations doit être considérée dans les limites des techniques utilisées pour les évaluer : comme nous l'avons vu, les hautes fréquences sont sous-évaluées dans les simulations. D'autre part,

les plus basses fréquences que l'on peut prendre en compte ont pour limite la longueur de la trajectoire qui sert de base au calcul. Ainsi, le modèle auto-régressif utilisé est calculé sur 160 ps. On peut considérer que le temps de relaxation maximal atteint est 380 ps, ce qui donne une fréquence minimale de 11 μeV. En-dessous de cette limite, c'est une extrapolation. La résolution utilisée dans l'expérience dont nous comparons les données avec les résultats de simulation permet de détecter des temps de relaxation allant jusqu'à 590 ps. Les données expérimentales vont donc plus loin dans les basses fréquences que le modèle auto-régressif calculé.

Un autre point important à considérer pour la comparaison entre expérience et simulation est la nature du paramètre q : les données de simulations sont obtenues à q constant alors que les expériences se font à angle constant (on prend la valeur élastique de q qui correspond à cet angle, alors que q varie aussi en fonction de l'énergie). Cette approximation peut aussi diminuer l'accord entre l'expérience et la simulation, en particulier dans la gamme des hautes énergies.

- Convolution

Nous avons tenté d'introduire dans le facteur de structure dynamique théorique la contribution due à la résolution de l'appareil, représentée par une Gaussienne, et celle de la diffusion globale qui suit une Lorentzienne dont la largeur est obtenue grâce au coefficient de diffusion donné par les mesures en DLS. L'EISF calculé à partir des simulations est également introduit.

On obtient un accord assez remarquable des données ainsi convoluées avec les observations expérimentales. Ce résultat, obtenu par la méthode semi-analytique présentée en annexe, est identique lorsque la convolution est purement numérique.

L'EISF est un élément limitant dans cette concordance d'une part du fait de sa surévaluation du point de vue théorique puisque la longueur des trajectoires est loin d'être suffisamment grande pour l'évaluer correctement, et d'autre part du fait de l'imprécision de la soustraction de la contribution de la cellule. En effet celle-ci a sans doute un signal plus fort lorsqu'elle est vide (l'échantillon absorbe), ce qui peut entraîner une

soustraction trop importante dans la région élastique provoquant la sous-évaluation de l'EISF expérimental.

De plus, l'imprécision quant à la valeur du coefficient de diffusion est aussi à prendre en considération : cette valeur est de 14.5 $10^{-5} nm^2 ps^{-1}$ lorsqu'elle est déterminée par diffusion de la lumière à une concentration de 80 g/L. Notre échantillon était moins concentré mais en milieu deutéré. Une concentration moindre augmente la mobilité mais la viscosité de l'eau lourde étant d'environ 20% supérieure à celle de l'eau légère, ce facteur diminue notablement la diffusion globale. En outre, d'autres données existent sur ce coefficient, notamment dans un travail de Pérez et al [128] en diffusion de neutrons où ils obtiennent D = 7.2 $10^{-5} nm^2 ps^{-1}$ pour une solution de lysozyme à 60 mg/ml. Ces désaccords peuvent avoir plusieurs origines : il y a tout d'abord les différences liées aux techniques expérimentales utilisées qui ne mesurent pas les mêmes propriétés physiques des molécules et supposent donc des traitements différents pour faire le lien entre les mesures et le coefficient de diffusion. Les propriétés physico-chimiques de l'échantillon peuvent varier, en particulier au niveau de l'hydratation des molécules de lysozyme, qui ne peut toutefois pas expliquer à elle seule une telle différence. En outre, les forces électrostatiques intermoléculaires ont une influence importante sur la diffusion des molécules de soluté et dépendent des sels présents dans la solution. La raison de cette différence n'est sans doute pas unique et on ne peut pas exclure l'une ou l'autre de ces valeurs.

Le modèle fractionnaire permet de montrer que lorsqu'elle est choisie dans la gamme comprise entre les 2 valeurs extrêmes mentionnées précédemment, la valeur exacte du coefficient de diffusion n'a pas une influence importante sur l'allure du spectre issu du modèle, dès que l'on s'éloigne de la région élastique c'est-à-dire sur les mouvements internes.

Le problème de la diffusion globale, que l'on peut éliminer dans les calculs théoriques mais qui existe dans les expériences, peut être appréhendé de la façon suivante : si l'on considère la multiplicité des mouvements diffusifs ceux-ci ne peuvent pas être représentés par une ou deux Lorentziennes mais par autant de Lorentziennes qu'il y

a de mouvements différents. Par contre, la diffusion globale des molécules de lysozyme dans la solution, si l'on suppose que celle-ci est monodisperse, peut être représentée par une Lorentzienne. Chaque Lorentzienne caractérisant un mouvement diffusif interne est donc convoluée par cette Lorentzienne décrivant la diffusion globale. Il s'ensuit que l'impact de la diffusion globale n'aura que peu d'effet sur le profil de la fonction de diffusion ainsi constituée d'une multitude de Lorentziennes.

6 Conclusion

Un des objectifs de l'étude entreprise était d'étudier les effets d'une pression modérée non-dénaturante sur la dynamique d'une protéine en solution en utilisant deux techniques accédant à des échelles de temps et de distance comparables, la diffusion quasi-élastique de neutrons et la simulation de dynamique moléculaire. Les simulations ont montré qu'une pression de 3 kbar a une influence faible mais visible qui consiste en une diminution des mouvements internes de la protéine, effet qui peut être mis en évidence grâce aux fluctuations atomiques cumulées (figure 22) qui révèlent une diminution marquée de façon prépondérante au niveau de l'inélastique à basse fréquence. Les expériences de diffusion n'ont pas clairement fait apparaître une influence de la pression sur la région quasi-élastique du signal mais cela ne signifie pas pour autant l'absence de l'influence de la pression mise en évidence par les simulations, à savoir une diminution des mouvements de basses fréquences : sa détection est difficile du fait de sa faible amplitude attendue conjuguée à un traitement des données expérimentales délicat (par exemple, les programmes existants ne proposaient pas les corrections liées aux propriétés d'absorption et de diffusion dans le cas de la géométrie cylindrique de la cellule utilisée). Il peut également exister d'autres effets dans la solution provoqués par la pression et qui masqueraient l'influence de celle-ci sur la dynamique interne. Ceci montre que la faible amplitude de ces effets exige une prise en compte rigoureuse des divers événements et paramètres existant lors de l'expérience pour parvenir à faire ressortir ces effets sur la dynamique interne, et cette exploration des données expérimentales nécessite des modèles adéquats capables de rendre compte de ces éléments.

L'utilisation d'une solution et non d'une poudre hydratée de protéine implique la présence de la diffusion libre des molécules qui contribue au signal, en particulier à haute résolution. Les simulations ainsi que le modèle fractionnaire ont mis en évidence qu'il est possible de distinguer les mouvements internes des mouvements de diffusion globale dans les données obtenues sur IN5 : le facteur de structure dynamique incohérent issu de la dynamique interne du lysozyme simulé a été convolué

avec une Gaussienne correspondant à la fonction de résolution de l'appareil, et à une Lorentzienne caractérisant la diffusion globale des molécules en solution (coefficient obtenu à partir des simulations et d'une étude en diffusion de lumière), et l'EISF est introduit également. Le facteur de structure dynamique ainsi généré présente un profil très proche de celui issu de l'expérience sur IN5 et se démarque nettement de celui produit uniquement par la diffusion globale convoluée à la résolution de l'appareil, et cette différence est la marque de la contribution de la dynamique interne de la protéine. Ceci montre qu'il est possible d'extraire la contribution des mouvements internes à partir du signal issu d'une protéine en solution, et pour y parvenir les simulations de dynamique moléculaire s'avèrent indispensables pour comprendre et identifier les diverses contributions qui produisent le signal expérimental.

Ces simulations ont d'ailleurs permis également de montrer que les mouvements internes d'une protéine ne peuvent pas être résumés par une Lorentzienne qui est un modèle couramment utilisé : leurs corrélations sont caractérisées par une décroissance moins rapide que celle de la Lorentzienne qui suit une loi en $\frac{1}{\omega^2}$. Or le modèle fractionnaire, dont l'ajustement au facteur de structure dynamique simulé reproduit de façon très satisfaisante la région inélastique de basses fréquences du facteur expérimental, suit une décroissance selon $\frac{1}{\omega^{1+\beta}}$ avec $0 < \beta < 1$, montrant ainsi qu'un modèle simpliste n'est pas pertinent pour décrire la dynamique interne d'une protéine. Ce résultat est d'autant plus crédible que l'on sait que la dynamique d'une protéine n'a pas une seule échelle de temps caractéristique mais possède une relaxation multi-échelle qui va de la picoseconde jusqu'à la seconde, liée au couplage des mouvements se produisant dans une structure à forte densité atomique [56]. Le modèle fractionnaire a par ailleurs été utilisé pour l'interprétation de mesures de temps de fluorescence de la flavine réductase afin d'étudier la dynamique des changements conformationnels liés aux fluctuations de la réactivité catalytique de l'enzyme [133], [134]. Les auteurs soulignent que la dynamique d'un système complexe ne peut être correctement décrite qu'en utilisant des modèles qui prennent en compte une large gamme d'échelles de temps.

A cet égard, notre étude montre que le modèle fractionnaire s'avère satisfaisant pour décrire la dynamique interne de la protéine puisqu'il reproduit bien le profil du facteur de structure dynamique expérimental dans sa partie quasi-élastique, d'autant plus qu'il est possible de déterminer une fonction mémoire, contrairement à d'autres modèles comme l'exponentielle étirée. Or l'existence d'une fonction mémoire est une propriété intrinsèque de tout système Hamiltonien comme c'est le cas d'une protéine, dans les limites de la mécanique classique. De plus, cette fonction mémoire déterminée à partir du modèle fractionnaire présente une forme algébrique, donc non-exponentielle, caractéristique des processus à mémoire longue tels que ceux présents dans une protéine. Ces éléments apportent un crédit important à la pertinence de ce modèle fractionnaire pour décrire la dynamique interne d'une protéine, mais il reste à éclaircir la signification physique des valeurs des paramètres de ce modèle et comprendre plus précisément les liens qui existent entre la dynamique interne d'une protéine et le principe d"auto-similarité' qui fonde ce modèle. Ce modèle pourrait servir à savoir dans quelle mesure les mouvements rapides et les mouvements lents sont liés entre eux et de mieux comprendre les interdépendances complexes entre les couplages propres à la dynamique interne des protéines.

Le présent travail tend à montrer que l'utilisation conjuguée des techniques de simulation de dynamique moléculaire et de diffusion de neutrons offre la possibilité d'explorer efficacement le comportement dynamique de molécules aussi complexes que les protéines, et la confrontation des résultats produits par ces deux techniques est le moyen d'affiner les modèles existants et d'en développer d'autres afin de mieux caractériser et comprendre les phénomènes dynamiques présents dans des molécules aussi complexes que des protéines. Il est possible également d'envisager l'étude de protéines extrêmophiles et de les comparer aux protéines non adaptées afin de mettre en évidence d'éventuelles 'signatures' dans le comportement dynamique de ces protéines, grâce aux paramètres des modèles en question qui seraient alors un critère pour distinguer les particularités liées à l'adaptation de ces protéines aux conditions extrêmes.

7 Annexes

Les détails de calcul présentés ici sont les équivalents des scripts Mathematica employés pour ces opérations.

7.1 Programme de calcul pour la convolution des données simulées

Paramètres des fenêtres Gaussienne et Lorentzienne :

Largeur de la Gaussienne : σ = 0.007 meV

Coefficient de diffusion translationnelle : $D = 10.10^{-5}\,\mathrm{nm}^2.\mathrm{ps}^{-1}$

Transfert de moment : $q = 4\mathrm{nm}^{-1}$

Largeur de la Lorentzienne : $\lambda(\mathrm{meV}) = D * q^2 * \frac{\hbar}{e}$, $e = 1.026.10^{-19}\mathrm{C}$

$\hbar = 1.054.10^{-34}\mathrm{J.s}$

Forme analytique des fenêtres :

Gaussienne : $g(\omega, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\,\pi}\,\sigma}\, e^{\frac{\omega^2}{2\,\sigma^2}}$

Lorentzienne : $l(\omega, \lambda) = \frac{\lambda}{\pi\,(\lambda^2+\omega^2)}$

Convolution des fenêtres :

La convolution des fenêtres dans l'espace des fréquences est obtenue en effectuant la transformation de Fourier du produit de ces fenêtres dans l'espace des temps :

$$g \otimes l\,(\omega) = 2\pi \int_{-\infty}^{\infty} dt \exp(-i\omega t)\, \tilde{g}(t)\, \tilde{l}(t) \tag{95}$$

avec $\tilde{g}(t) = \exp(-\frac{1}{2}\sigma^2 t^2)$ et $\tilde{l}(t) = \exp(-\lambda t)$.

Sachant que le produit $\tilde{g}(t)\tilde{l}(t)$ est une fonction paire, on peut utiliser la propriété suivante : pour une fonction paire $f\,(t) \in \mathbb{R}$, il existe avec la partie réelle de la transfor-

mée de Laplace de cette fonction la relation suivante :

$$\int_{-\infty}^{\infty} dt \exp(-i\omega t)\, f(t) = 2\Re\left\{\int_{0}^{\infty} dt \exp(-st)\, f(t)\right\} \tag{96}$$

avec $s = i\omega$.

Si on écrit $\exp(-i\omega t)\, \tilde{g}(t)\, \tilde{l}(t) = \exp(-i\omega - \lambda)\, \tilde{g}(t)$ dans l'expression (95), cela revient à calculer la partie réelle de la transformée de Laplace $\{TLg\}(s)$ de la Gaussienne $\tilde{g}(t)$ en prenant $s = i\omega + \lambda$, avec :

$$\{TLg\}(s) = -e^{\frac{s^2}{2}} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \left[-1 + \mathrm{Erf}(\frac{s}{\sqrt{2}})\right] \tag{97}$$

Finalement, la convolution de la Gaussienne et de la Lorentzienne s'obtient par l'opération suivante (expression générée par Mathematica) :

$$g \otimes l(\omega, \sigma, \lambda) = \frac{e^{\frac{(\lambda-\omega)\,(\lambda+\omega)}{2\,\sigma^2}} \left[\cos(\frac{\lambda\omega}{\sigma^2})\, \mathrm{Re}(\mathrm{Erfc}(\frac{\lambda+i\,\omega}{\sqrt{2}\,\sigma})) + \mathrm{Im}(\mathrm{Erf}(\frac{\lambda+i\,\omega}{\sqrt{2}\,\sigma}))\, \sin(\frac{\lambda\omega}{\sigma^2})\right]}{\sqrt{2\,\pi}\,\sigma} \tag{98}$$

Forme numérique de la fenêtre totale et convolution avec les données simulées :

La forme numérique est obtenue en appliquant l'équation précédente aux valeurs en énergie des données simulées : $gl(\omega_{sim})$

Enfin, on effectue la convolution numérique de cette fenêtre et du spectre simulé normalisé :

$S(q, \omega_{sim})_{gl-conv} = gl(\omega_{sim}, \sigma, \lambda) \otimes S(q, \omega_{sim})$

Introduction de l'EISF :

La dernière étape consiste à prendre en compte l'EISF pour obtenir l'estimation du facteur de structure dynamique expérimental :

$S_{estim}(q, \omega) = \mathrm{EISF} * gl(\omega_{sim}) + (1 - \mathrm{EISF}) * S(q, \omega_{sim})_{gl-conv}$

7.2 Programme de calcul de la viscosité de l'eau à partir des données de densité en fonction de la température et de la pression

Les valeurs de densité $\rho(P,T)$ de l'eau en fonction de P et T sont disponibles dans la littérature [123]. Les tables fournies correspondent à des températures de 290 K et 295 K et des pressions allant jusqu'à 8 kbar. Des opérations d'interpolation sont nécessaires afin d'obtenir les valeurs de densité à 293 K.

Le calcul de la viscosité η consiste à résoudre une équation d'interpolation [124] :

$$\eta = \eta_0(T) * \eta_1(T,\rho) * \eta_2(T,\rho) \tag{99}$$

Les variables utilisées dans les calculs sont sans dimension : $\bar{T} = T/T^*$, $\bar{\rho} = \rho/\rho^*$, $\bar{\eta} = \eta/\eta^*$, avec T^*, ρ^* et η^* les constantes de références.

Constantes de référence :

Température de référence : $T^* = 647.226\,\mathrm{K}$

Densité de référence : $\rho^* = 317.763\,\mathrm{kg/m^3}$

Viscosité de référence : $\eta^* = 55.071 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{Pa \cdot s}$

Terme $\bar{\eta}_0$

$$\bar{\eta}_0(\bar{T}) = \frac{\sqrt{\bar{T}}}{\sum_{i=0}^{3} \frac{H_i}{\bar{T}^i}} \tag{100}$$

Terme $\bar{\eta}_1$

$$\bar{\eta}_1(\bar{T},\bar{\rho}) = \exp\left[\bar{\rho} \sum_{i=0}^{5} \sum_{j=0}^{6} H_{ij} \left(\frac{1}{\bar{T}} - 1\right)^i (\bar{\rho} - 1)^j\right] \tag{101}$$

Les coefficients H_i et H_{ij} sont fournis [124]. Le terme $\bar{\eta}_2$ est fixé à l'unité.

La viscosité est donc obtenue à chaque température en fonction de P.

Interpolation des températures entre 290 et 295 K :

$$\bar{\eta}(\bar{T}, P) = \bar{\eta}_{290}(P) + \frac{\bar{T} - 290}{295 - 290} * [\bar{\eta}_{295}(P) - \bar{\eta}_{290}(P)] \tag{102}$$

Cette expression permet de déduire la courbe de la viscosité à 293 K, pour des pressions entre 1 atm et 3 kbar.

Calcul du coefficient de diffusion :

L'équation de Stokes-Einstein (85) est appliquée aux pressions choisies entre 1 atm et 3 kbar. Après application des valeurs numériques ($T = 293$K, $a = 14.5$Å), on obtient :

$$D_{SE} = 14.8 \cdot 10^{-7} \eta \tag{103}$$

7.3 Tableaux descriptifs des détecteurs des spectromètres Mibemol et IN5

7.3.1 Mibemol

Détecteur	Angle(°)	Angle moyen(°)	q_{el} 6.5Å ($Å^{-1}$)	Détecteur	Angle(°)	Angle moyen(°)	q_{el} 6.5Å ($Å^{-1}$)
1	Moniteur	0		36	84.5		
2	23.5			37	85.5		
3	24.8	25.5		38	86.7		
4	26.1			39	88.0		
5	27.5			40	89.2	90.0	
6	37.6			41	90.5		
7	39			42	91.7		
8	40.1	40.1		43	93.0		
9	41.3			44	94.3		
10	42.6			45	95.5		
11	44.6			46	100.5		
12	45.8			47	101.5		
13	47.1	47.1		48	102.8		
14	48.3			49	104.0		
15	49.6			50	105.2	106.0	
16	52.6			51	106.5		
17	53.8			52	107.8		
18	55.1	55.1		53	109.1		
19	56.3			54	110.5		
20	57.6			55	111.8		
21	60.6			56	117.0		
22	61.9			57	118.2		
23	63.1	63.1		58	119.4		
24	64.4			59	120.6		
25	65.6			60	121.8	122.0	
26	69.2			61	123.0		
27	70.5			62	124.3		
28	71.7			63	125.5		
29	73.0			64	126.9		
30	74.2	75.0		65	133.0		
31	75.5			66	134.3		
32	76.8			67	135.5		
33	78.1			68	136.7	137.0	
34	79.4			69	138.0		
35	80.6			70	139.3		
				71	140.5		
				72	141.8		

7.3.2 IN5

Dét.	Angle(°)	Angle moyen(°)	q_{el} 5Å (Å^{-1})	q_{el} 9Å (Å^{-1})	Dét.	Angle(°)	Angle moyen(°)	q_{el} 5Å (Å^{-1})	q_{el} 9Å (Å^{-1})
0	18				42	65.1			
1	19				43	66.2			
2	20				44	67.3			
3	21	21	0.46	0.25	45	68.4			
4	22				46	69.5			
5	23				47	70.6	70.6	1.45	0.81
6	24				48	71.7			
7	25				49	72.8			
8	26				50	73.9			
9	27				51	75			
10	28				52	76.1			
11	29				53	81.5			
12	30	30	0.65	0.36	54	82.7			
13	31				55	83.9			
14	32				56	85.1			
15	33				57	86.3			
16	34				58	87.5	87.5	1.73	0.965
17	35				59	88.7			
18	36				60	89.9			
19	37				61	91.1			
20	38				62	92.3			
21	39				63	93.5			
22	40				64	94.7			
23	41	41	0.88	0.49	65	95.9			
24	42				66	97.1			
25	43				67	98.3			
26	44				68	99.5			
27	45				69	100.7	100.7	1.93	1.075
28	46				70	101.9			
29	52				71	103.1			
30	53				72	104.3			
31	54				73	105.5			
32	55				74	106.7			
33	56				75	111.5			
34	57				76	113.6			
35	58	58	1.22	0.68	77	115.6			
36	59				78	117.7	118.7	2.16	1.2
37	60				79	119.8			
38	61				80	121.8			
39	62				81	123.9			
40	63				82	126			
41	64								

Références

[1] Certes A. De l'action des hautes pressions sur les phénomènes de la putréfaction et sur la vitalité des micro-organismes d'eau douce et d'eau de mer. *Compt. Rend.*, 99 :385–388, 1884.

[2] Hazen RM, Boctor N, Brandes JA, Cody GD, Hemley RJ, Sharma A, and Yoder HS. High pressure and the origin of life. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 2002.

[3] Groß M and Jaenicke R. Proteins under pressure. *Eur. J. Biochem.*, 221 :617–630, 1994.

[4] Regnard P. *La vie dans les eaux*. Paris, 1891.

[5] Bridgman PW. The coagulation of albumen by pressure. *J. Biol. Chem.*, 19 :511–512, 1914.

[6] Le Chatelier H. Sur un énoncé général des lois des équilibres chimiques. *Comptes Rendus, Académie des Sciences*, 99 :786–89, 1884.

[7] Mozhaev V, Heremans K, Frank J, Masson P, and Balny C. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins : Structures, Function and Genetics*, 24 :81–91, 1996.

[8] Gekko K and Hasegawa Y. Compressibilitystructure relationship of globular proteins. *Biochemistry*, 25 :6563–6571, 1986.

[9] Marden MC, Hui Bon Hoa G, and Stetzkowski-Marden F. Heme protein fluorescence versus pressure. *Biophys. J.*, 49(3) :619–27, 1986.

[10] Cioni P and Strambini GB. Pressure effects on protein flexibility monomeric proteins. *J Mol Biol*, 242(3) :291–301, 1994.

[11] Lange R, Frank J, Saldana JL, and Balny C. Fourth derivative uv-spectroscopy of proteins under high pressure. *Eur. Biophys. J.*, 24 :277–283, 1996.

[12] Heremans K and Wong PTT. Pressure effects on the raman spectrum of proteins : pressure-induced changes in the conformation of lysozyme in aqueous solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 118 :101–104, 1985.

[13] Goossens K, Smeller L, Franck J, and Heremans K. Pressure-tuning the conformation of bovine pancreatic trypsin inhibitor trypsin inhibitor studied by fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 236 :254–262, 1996.

[14] Akasaka K, Tezuka T, and Yamada H. Pressure-induced changes in the folded structure of lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 271 :671–678, 1997.

[15] Kundrot CE and Richards FM. Crystal structure of hen egg-white lysozyme at a hydrostatic pressure of 1000 atmospheres. *J. Mol. Biol.*, 193(1) :157–70, 1987.

[16] Loupiac C, Bonetti M, Pin S, and Calmettes P. High-pressure effects on horse heart metmyoglobin studied by small-angle neutron scattering. *Eur J Biochem.*, 269(19) :4731–7, 2002.

[17] Silva JL and Weber G. Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 44 :89–113, 1993.

[18] Weber G and Drickamer HG. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quaterly Reviews of Biophysics*, 16(1) :89–112, 1983.

[19] St John RJ, Carpenter JF, and Randolph TW. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :13029–13033, 1999.

[20] Heremans K and Smeller L. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochem. et Biophys. Acta*, 1386 :353–370, 1998.

[21] Mombelli E, Afshar M, Fusi P, Mariani M, Tortora P, Connelly JP, and Lange R. The role of phenylalanine 31 in maintaining the conformational stability of ribonuclease p2 from sulfolobus solfataricus under extreme conditions of temperature and pressure. *Biochem.*, 36(29) :8733–42, 1997.

[22] Zhou JM, Zhu L, Balny C, and Perrett S. Pressure denaturation of the yeast prion protein ure2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287 :147–152, 2001.

[23] Ruan K, Xu C, Yu Y, Li J, Lange R, Bec N, and Balny C. Pressure-exploration of the 33-kda protein from the spinach photosystem ii particule. *Eur. J. Biochem.*, 268 :2742–50, 2001.

[24] Drickamer HG and Franck CW. *Electronic transition and the high pressure chemistry and physics of solids*. London : Chapman and Hall, 1973.

[25] Baldwin RL. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *PNAS*, 83(21) :8069–72, 1986.

[26] Gorovits BM and Horowitz PM. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. *Biochemistry*, 37(17), 1998.

[27] Wroblowski B, Diaz JF, Heremans K, and Engelborghs Y. Molecular mechanisms of pressure induced conformational changes in bpti. *Proteins*, 25 :446–455, 1996.

[28] Hummer G, Garde S, Garcia AE, Paulaitis ME, and Pratt LR. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(4) :1552–5, 1998.

[29] Kauzmann W. Thermodynamics of unfolding. *Nature*, 325 :763–64, 1987.

[30] Royer C. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1595 :201–9, 2002.

[31] Randolph TW, Seefeldt M, and Carpenter JF. High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. *Biochim Biophys Acta*, 1595(1-2) :224–34, 2002.

[32] NystrÖm B and Roots J. Quasielastic light scattering studies of the pressure-induced denaturation of lysozyme. *Makromol. Chem.*, 185 :1441–1447, 1984.

[33] Perrett S and Zhou JM. Expanding the pressure technique : insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1595(1-2) :210–23, 2002.

[34] Hillson N, Onuchic JN, and Garcia AE. Pressure-induced protein-folding/unfolding kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(26) :14848–14853, 1999.

[35] Jonas J. High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins. *Biochim Biophys Acta.*, 1595(1-2) :145–59, 2002.

[36] Wong PTT and Heremans K. Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen : a fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochem. Biophys. Acta*, 956 :1–9, 1988.

[37] Zhang J, Peng X, Jonas A, and Jonas J. Nmr study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease a. *Biochemistry*, 34(27) :8631–41, 1995.

[38] Chalikian TV, Gindikin VS, and Breslauer KJ. Spectroscopic and volumetric investigation of cytochrome c unfolding at alkaline ph : characterization of the base-induced unfolded state at 25 degrees c. *FASEB J.*, 10(1) :164–70, 1996.

[39] Webb JN, Webb SD, Cleland JL, Carpenter JF, and Randolph TW. Partial molar volume, surface area, and hydration changes for equilibrium unfolding and formation of aggregation transition state : high pressure and cosolute studies on recombinant human ifn-α. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 :7259–7264, 2001.

[40] Visuri K, Kaipainen E, Kivimaki J, Niemi H, Leisola M, and Palosaari S. A new method for protein crystallization using high pressure. *Biotechnology*, 8(6) :547–9, 1990.

[41] Lorber B, Jenner G, and Giegé R. Effect of high hydrostatic pressure on nucleation and growth of protein crystals. *J. Crys. Growth*, 158 :103–17, 1996.

[42] Kuwata K, Li H, Yamada H, Legname G, Prusiner SB, Akasaka K, and James TL. Locally disordered conformer of the hamster prion protein : a crucial intermediate to prpsc ? *Biochemistry*, 41 :12277–83, 2002.

[43] Torrent J, Alvarez-Martinez MT, Heitz F, Liautard JP, Balny C, and Lange R. Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry*, 42(5) :1318–25, 2003.

[44] Groß M, Auerbach G, and Jaenicke R. The catalytic activities of monomeric enzymes show complex pressure dependence. *FEBS Letters*, 321(2, 3) :256–260, April 1993.

[45] Erijman L and Clegg RM. Reversible stalling of transcription elongation complexes by high pressure. *Biophys. J.*, 75(1) :453–62, 1998.

[46] Gekko K and Yamagami K. Compressibility and volume changes of lysozyme due to inhibitor binding. *Chem. Lett.*, pages 839–840, 1998.

[47] Gekko K, Tamura Y, Ohmae E, Hayashi H, Kagamiyama H, and Ueno H. A large compressibility change of protein induced by a single amino acid substitution. *Protein Sci.*, 5(3) :542–5, 1996.

[48] Kornblatt JA and Kornblatt MJ. The effects of osmotic and hydrostatic pressures on macromolecular systems. *Biochem. Biophys. Acta*, 1595 :30–47, 2002.

[49] Frauenfelder H, Alberding NA, Ansari A, Braunstein D, Cowen BR, Hong MK, Iben IET, Jonhson JB, Luck S, Marden MC, Mourant JR, Ormos P, Reinisch L, Scholl R, Schulte A, Shyamsunder E, Sorensen LB, Steinbach PJ, Xie A, Young RD, and Yue KT. Proteins and pressure. *Journal of Physical Chemistry*, 1990.

[50] Li H, Yamada H, and Akasaka K. Effect of pressure on the tertiary structure and dynamics of folded basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biophysical Journal*, 77 :2801–2812, 1999.

[51] Hayashi R. *Trends in high pressure bioscience and biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, 2002.

[52] Chilton P, Isaacs NS, Mackey B, and Stenning R. The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. In Heremans K, editor, *High pressure research in the biosciences and biotechnology*, pages 225–228. Leuven University Press, Leuven, Belgium, 1997.

[53] Masson P, Tonello C, and Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J. Biomed. Biotechnol.*, 1(2) :85–88, 2001.

[54] Tian SM, Ruan KC, Qian JF, Shao GQ, and Balny C. Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus. *Eur. J. Biochem.*, 267(14) :4486–94, 2000.

[55] J.A. McCammon and S.C. Harvey. *Dynamics of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

[56] H. Frauenfelder, F. Parak, and R.D. Young. Conformational substates in proteins. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 17 :451–479, 1988.

[57] Frauenfelder H, Sligar SG, and Wolynes PG. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254 :1598, 1991.

[58] W. Doster, S. Cusack, and W. Petry. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, 337 :754–756, 1989.

[59] Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND, and Wolynes PG. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding : a synthesis. *Proteins*, 21(3) :167–95, 1995.

[60] Stevens L. Egg white proteins. *Comparative Biochemistry Physiology*, 100B(1) :1–9, 1991.

[61] Phillips DC. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.*, 215(5) :78–90, 1966.

[62] Kamatari YO, Yamada H, Akasaka K, Jones JA, Dobson CM, and Smith LJ. Response of native and denatured hen lysozyme to high pressure studied by 15/1h nmr spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 268 :1782–1793, 2001.

[63] Tedford LA, Smith D, and Schaschke CJ. High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and beta-lactoglobulin. *Food Res. Inter.*, 32 :101–106, 1999.

[64] Kato M, Fujisawa T, Taniguchi Y, and Ueki T. Quantitative solution x-ray scattering study of globular proteins under pressure. In Heremans K, editor, *High pressure research in the biosciences and biotechnology*, pages 127–130. Leuven University Press, Leuven, Belgium, 1997.

[65] Dahlborg U and Rupprecht A. Hydration of dna, a neutron scattering study of oriented nadna. *Biopolymers*, 10 :849, 1971.

[66] Middendorf HD and Willis BTM. Fourth international liquid crystal conference - kent, ohio, 1972.

[67] Cusack S, Smith J, Finney J, Tidor B, and Karplus M. Inelastic neutron scattering analysis of picosecond internal protein dynamics. comparison of harmonic theory with experiment. *J. Mol. Biol.*, 202(4) :903–8, 1988.

[68] Paci E. High pressure simulations of biomolecules. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1595 :185–200, 2002.

[69] Kitchen DB, Reed LH, and Levy RM. Molecular dynamics simulation of solvated protein at high pressure. *Biochemistry*, 31(41) :10083–10093, 1992.

[70] Hünenberger PH, Mark AE, and van Gunsteren WF. Computational approaches to study protein unfolding : Hen egg white lysozyme as a case of study. *Proteins*, 21 :196–213, 1995.

[71] Chryssomallis GS, Torgerson PM, Drickamer HG, and Weber G. Effect of hydrostatic pressure on lysozyme and chymotrypsinogen detected by fluorescence polarization. *Biochemistry*, 20(14) :3933–3939, 1981.

[72] Samarasinghe SD, Campbell DM, Jonas A, and Jonas J. High-resolution nmr study of the pressure-induced unfolding of lysozyme. *Biochemistry*, 31 :7773–7778, 1992.

[73] Floriano WB, Nascimento MA, Domont GB, and Goddard WA. Effects of pressure on the structure of metmyoglobin : molecular dynamics predictions for pressure unfolding through a molten globule intermediate. *Protein Sci.*, 7(11) :2301–1, 1998.

[74] Paci E and Marchi M. Intrinsic compressibility and volume compression in solvated proteins by molecular dynamics simulation at high pressure. *PNAS*, 93(21) :11609–14, 1996.

[75] Brunne RM and van Gunsteren WF. Dynamical properties of bovine pancreatic trypsin inhibitor from a molecular dynamics simulation at 5000 atm. *FEBS Lett.*, 323(3) :215–17, 1993.

[76] Zhu F, Tajkhorshid E, and Schulten K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Biophys. J.*, 83(1) :154–60, 2002.

[77] Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM Jr, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW, and Kollman PA. A second generation force field for the simulation of proteins and nucleic acids. *JACS*, 117 :5179–5197, 1995.

[78] L. Verlet. Computer "experiments" on classical fluids. Thermodynamic properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, 159(1) :98–103, 1967.

[79] Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.*, 52 :255–268, 1984.

[80] Anderson HC. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.*, 72 :2384–93, 1980.

[81] D. Wolf, P. Keblinski, S.R. Philpot, and J. Eggebrecht. Exact method for the simulation of coulombic systems by spherically truncated, pairwise r-1 summation. *J. Chem. Phys.*, 110(17) :8254–82, 1999.

[82] Rog T, Murzyn K, Hinsen K, and Kneller GR. nmoldyn : A program package for a neutron scattering oriented analysis of molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.*, 24(5) :657–67, 2003.

[83] E.O. Brigham. *The Fast Fourier Transform*. Prentice Hall, 1974.

[84] A. Papoulis. *Signal Analysis*. McGraw Hill, 1984.

[85] A. Papoulis. *Probablity, Random Variables, and Stochastic Processes*. McGraw Hill, 3rd edition, 1991. CBM.

[86] G.R. Kneller and K. Hinsen. Computing memory functions from Molecular Dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 115(24) :11097–11105, 2001.

[87] J. Burg. *Maximum entropy spectral analysis*. PhD thesis, Stanford University, Stanford (CA), USA, May 1975.

[88] S.W. Lovesey. *Theory of Neutron Scattering from Condensed Matter*, volume I. Clarendon Press, Oxford, 1984.

[89] M. Bée. *Quasielastic Neutron Scattering : Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*. Adam Hilger, Bristol, 1988. CBM.

[90] Kneller G. http ://dirac.cnrs-orleans.fr/ kneller/hercules2004.pdf.

[91] K. Hinsen and G.R. Kneller. The influence of geometrical constraints on the dynamics of polypeptide chains. *Phys. Rev. E*, 52(6) :6868–6874, 1995.

[92] Howard SB, Twigg PJ, Baird JK, and Meehan EJ. The solubility of hen egg-white lysozyme. *J. Crystal Growth*, 90 :94–104, 1988.

[93] Ducruix A, Guilloteau JP, Riès-Kautt M, and Tardieu A. Protein interactions as seen by solution x-ray scattering prior to crystallogenesis. *J. Crystal Growth*, 168 :28–39, 1996.

[94] Gripon C, Legrand L, Rosenman I, Vidal O, Robert MC, and Boué F. Lysozyme-lysozyme interactions in under- and super-saturated solutions : a simple relation between the second virial coefficients in h20 and d2o. *J. Crystal Growth*, 178 :575–584, 1997.

[95] Bellissent-Funel M-C and Bosio L. A neutron scattering study of liquid d2o under pressure and at various temperatures. *J. Chem. Phys.*, 102(9) :3727–3735, March 1995.

[96] Jacrot B. The study of biological structures by neutron scattering from solution. *Rep. Prog. Phys.*, 39 :911–953, 1976.

[97] D.A. McQuarrie. *Statistical Mechanics*. Harper's Chemistry Series. Harper Collins Publishers, 1976. CBM.

[98] P. Langevin. Sur la théorie du mouvement brownien. *C. Rendus Acad. Sci. Paris*, 146 :530–533, 1908.

[99] H. Risken. *The Fokker-Planck Equation*. Springer Series in Synergetics. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2nd reprinted edition, 1996. CBM.

[100] F. Volino and A.J. Dianoux. Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry : General formalism and application to diffusion inside a sphere. *Mol. Phys.*, 41(2) :271–279, 1980.

[101] J.-M. Zanotti, M.-C. Bellissent-Funel, and J. Parello. Hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and NMR : The case of typical EF-hand calcium-binding parvalbumin. *Biophysical Journal*, 76 :2390–2411, 1999.

[102] J. Fitter, S.A.W. Verclas, R.E. Lechner, H. Seelert, and N.A. Dencher. Function and picosecond dynamics of bacteriorhodopsin in purple membrane and different lipidation and hydration. *FEBS Letters*, 433 :321–325, 1998. Habil.

[103] Lamm G and Szabo A. Langevin modes of macromolécules. *J. Chem. Phys.*, 85(12) :7334, 1986.

[104] K. Hinsen, A.-J. Petrescu, S. Dellerue, M.C. Bellissent-Funel, and G.R. Kneller. Harmonicity in slow protein dynamics. *Chem. Phys.*, 261(1+2) :25–38, 2000. Special Issue "Condensed Phase Structure and Dynamics : A combined neutron scattering and molecular modelling approach".

[105] G.R. Kneller. Inelastic neutron scattering from damped collective vibrations of macromolecules. *Chem. Phys.*, 261(1+2) :1–24, 2000. Special volume "Condensed Phase Structure and Dynamics : A combined neutron scattering and molecular modelling approach".

[106] G. Zaccai. How soft is a protein ? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, 288 :1604–1607, 2000.

[107] I. Köper and M.-C. Bellissent-Funel. Hindered protein dynamics in the presence of a cryprotecting agent. *App. Phys. A.*, 74(1) :1257–1259, 2002.

[108] Williams G and Watts DC. Non-symmetrical dielectric relaxation behaviour arising from a simple empirical function. *Trans. Faraday Soc.*, 66 :80–85, 1970.

[109] Glockle WG and Nonnenmacher TF. A fractional calculus approach to self-similar protein dynamics. *Biophys J.*, 68(1) :46–53, 1995.

[110] Liebovitch LS and Koniarek JP. Ion channel kinetics. protein switching between conformational states is fractal in time. *IEEE Eng. Med. Biol.*, 11 :53–56, 1992.

[111] Lopez MM and Makhatadze GI. Solvent isotope effect on thermodynamics of hydration. *Biophys. Chem.*, 74 :117–125, 1998.

[112] D.A. Lidar, D. Thirumalai, R. Elber, and R.B. Gerber. Fractal analysis of protein potential energy landscapes. *Phys. Rev. E*, 59(2) :2231–2243, 1999.

[113] Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, and Gunsalus IC. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, 14 :5355–5373, 1975.

[114] Kneller GR and Hinsen K. Fractional brownian dynamics in proteins. article soumis.

[115] P. Melchers, E.W. Knapp, F. Parak, L. Cordone, A. Cupane, and M. Leone. Structural fluctuations of myoglobin from normal-modes, Mössbauer spectroscopy, Raman, and absorption spectroscopy. *Biophys. J.*, 70 :2092–2099, 1996.

[116] R.M. Daniel, J.C. Smith, M. Ferrand, S. Héry, R. Dunn, and J. Finney. Enzyme activity below the dynamical transition at 220K. *Biophys. J.*, 75 :2504–2507, 2000.

[117] R. Zwanzig. *Statistical Mechanics of Irreversibility*, pages 106–141. Lectures in Theoretical Physics. Wiley-Interscience, New York, 1961.

[118] J.P. Boon and S. Yip. *Molecular Hydrodynamics*. McGraw Hill, 1980.

[119] A. Rahman. Correlations in the motion of liquid argon. *Phys. Rev.*, 136(2A) :405–411, 1964.

[120] B.J. Berne, J.P. Boon, and S.A. Rice. On the calculation of autocorrelation functions of dynamical variables. *J. Chem. Phys.*, 45 :1086–1096, 1966.

[121] Refaee M, Tezuka T, Akasaka K, and Williamson MP. Pressure-dependant changes in the solution structure of egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 327 :857–865, 2003.

[122] B. Cichocki, B.U. Felderhof, and R. Schmitz. Hydrodynamic interactions between two spherical particles. *PhysicoChemical Hydrodynamics*, 10 :383, 1988.

[123] Wagner W and Pruss A. The iapws formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use. *J. Chem. Ref. Data*, 31(2) :495–535, 2002.

[124] The International Association for the Properties of Water and Steam. *Revised Release on the IAPS Formulation 1985 for the Viscosity of Ordinary Water Substance*, Vejle, Denmark, 2003.

[125] Crandall RE. *Mathematica for the Sciences*. Addison-Wesley, 1991.

[126] G.R. Kneller and K. Hinsen. Generalized Euler equations for linked rigid bodies. *Phys. Rev. E*, 50(2) :1559–1564, 1994.

[127] Guinier A. Théorie et technique de la radiocristallographie. Dunod, Paris 1964.

[128] Perez J, Zanotti J-M, and Durand D. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophysical Journal*, 77 :454–469, July 1999.

[129] M.-C. Bellissent-Funel, A. Filabozzi, and S.H. Chen. Measurement of coherent Debye-Waller factor in in vivo deuterated C-Phycocyanin by inelastic neutron scattering. *Biophys. J.*, 72 :1792–1799, 1997.

[130] Di Bari M, Deriu A, Filabozzi A, Andreani C, Di Venere A, and Rosato N. Dynamics of trypsin under pressure. *Physica B*, 276-278 :510–511, 2000.

[131] W. Doster, M. Diehl, Schober H., Petry W., and J. Wiedersich. *Effect of pressure and pressure-denaturation on fast molecular motions of solvated myoglobin*, pages 107–110. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier Science B.V., 2002.

[132] G.R. Kneller and A. Geiger. Molecular dynamics studies and neutron scattering experiments on methylen chloride. II. Dynamics. *Mol. Phys.*, 70(3) :465–483, 1990.

[133] Yang H, Luo G, Karnchanaphanurach P, Louie TM, Rech I, Cova S, Xun L, and Xie XS. Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer. *Science*, 302 :262–266, 2003.

[134] Yang H and Xie XS. Probing single molecule dynamics photon by photon. *J. Chem. Phys.*, 117(24) :10965–10979, 2002.

Influence de la pression sur la dynamique du lysozyme en solution, par simulation numérique et diffusion de neutrons.

Les effets d'une pression hydrostatique non dénaturante (3kbar) sur les mouvements internes du lysozyme sont étudiés selon deux approches conjuguées : la dynamique moléculaire et la diffusion quasiélastique de neutrons qui couvrent les mêmes échelles de temps et de distance. Les simulations montrent une compaction du lysozyme avec la pression et une diminution des fluctuations atomiques surtout aux basses fréquences. La partie quasiélastique de la fonction de diffusion subit un léger abaissement, difficilement mis en évidence dans les résultats expérimentaux. Les simulations reproduisent correctement le profil des spectres expérimentaux et le modèle Brownien fractionnaire est pertinent pour rendre compte des multiples temps de relaxation caractérisant la dynamique interne d'une protéine.

Mots clés : Dynamique moléculaire, diffusion de neutrons, lysozyme, pression, modèle Brownien fractionnaire

Influence of pressure on the dynamics of lysozyme in solution, by numerical simulation and neutron scattering.

The influence of a non-denaturating hydrostatic pressure (3kbar) on the internal motions of lysozyme is studied by two conjugated approaches : molecular dynamics and quasielastic neutron scattering which cover the same time and space scales. Simulations show a compaction of lysozyme with pressure and a decrease of atomic fluctuations, mainly for low frequencies. A slight decrease is observed on the quasielastic part of the scattering function, that does not clearly appear from experiments. Simulations reproduce correctly the experimental profile and the fractional Brownian model is relevant to account for the multiple relaxation times that characterize the internal dynamics of a protein.

Key words : Molecular dynamics, neutrons scattering, lysozyme, pressure, fractional Brownian model

Discipline : Biologie et biophysique moléculaires et cellulaires

Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301
CNRS
Rue Charles Sadron
45071 Orléans cédex 2