



HAL
open science

Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une investigation par dynamique moléculaire et spectroscopie Raman

Adrien Lerbret

► **To cite this version:**

Adrien Lerbret. Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une investigation par dynamique moléculaire et spectroscopie Raman. Biophysique [physics.bio-ph]. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2005. Français. NNT : . tel-00011225

HAL Id: tel-00011225

<https://theses.hal.science/tel-00011225>

Submitted on 16 Dec 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.

THÈSE

de

L'Université des Sciences et Technologies de Lille

présentée par

Adrien LERBRET

pour obtenir

le diplôme de DOCTORAT

Mention: Sciences des Matériaux

sujet de la thèse:

Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une
investigation par dynamique moléculaire et
spectroscopie Raman

Soutenue le 05 Décembre 2005

devant le jury composé de:

M.-C. Bellissent-Funel	Directeur de Recherches CNRS au CEA Saclay	Rapporteur
M.-L. Saboungi	Professeur à l'Université d'Orléans	Rapporteur
G. Kneller	Professeur à l'Université d'Orléans	Président
F. Affouard	Chargé de Recherches CNRS à l'Université de Lille 1	Examineur
M. Descamps	Professeur à l'Université de Lille 1	Directeur de thèse
A. Hédoux	Professeur à l'Université de Lille 1	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Dynamique et Structure des Matériaux Moléculaires de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1, sous la direction de Marc Descamps et d'Alain Hédoux, envers lesquels je suis particulièrement reconnaissant.

J'adresse également mes sincères remerciements à Marie-Claire Bellissent-Funel et Marie-Louise Saboungi pour avoir accepté d'être rapporteurs, et à Gerald Kneller pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

J'exprime ma gratitude envers Frédéric Affouard pour avoir dirigé l'ensemble de mon travail, pour m'avoir permis d'utiliser une grande partie des ressources de calculs disponibles, pour ses encouragements dans les moments difficiles et pour ses conseils avisés.

Je tiens également à associer à ces remerciements Patrice Bordat avec lequel travailler a été une expérience enrichissante.

Je suis reconnaissant envers Laurent Paccou pour l'assistance technique qu'il m'a apporté et Dominique Prévost pour avoir préparé l'ensemble des solutions étudiées par spectroscopie Raman.

Je remercie Natalia Correia d'avoir effectué avec le plus grand soin la tâche ingrate de relecture du mémoire.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à tous mes collègues de laboratoire pour avoir contribué au bon déroulement de cette thèse.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour l'ensemble de ceux qui me sont proches qui m'ont permis de surmonter les nombreuses périodes de doutes par leurs encouragements permanents.

Table des matières

Introduction	1
1 Présentation du problème	5
1.1 L'eau	5
1.1.1 Distribution électronique	5
1.1.2 Liaisons hydrogène (LHs)	6
1.1.3 Structure tétraédrique de l'eau	7
1.1.4 Modèles de l'eau	9
1.2 Protéines	10
1.2.1 Structure	10
1.2.2 Interface protéine-eau	12
1.2.3 Dynamique	14
1.2.4 Repliement des protéines	17
1.2.5 Stabilité des protéines et thermodynamique	17
1.3 Bioprotection	21
1.3.1 Phénoménologie	21
1.3.2 Sucres	23
1.3.3 Mécanismes	24
Annexe	40
Problématique de la vitrification	40
Liquides forts/fragiles	41
Découplage des dynamiques	43
2 Méthodes et systèmes étudiés	47
2.1 Dynamique moléculaire	47
2.1.1 Champs de forces	47
2.1.2 Conditions aux limites périodiques	50
2.1.3 Traitement des interactions électrostatiques	52
2.1.4 Equations du mouvement	54
2.1.5 Limites de la technique de la dynamique moléculaire	56
2.1.6 Analyse des trajectoires	56
2.1.7 Systèmes étudiés par dynamique moléculaire	61
2.2 Spectroscopie Raman	74
2.2.1 Effet Raman conventionnel	74
2.2.2 Le spectromètre Raman	78
2.2.3 Spectres Raman aux basses fréquences	79
2.2.4 Systèmes étudiés par spectroscopie Raman	80

3	Solutions sucre/eau	83
3.1	Structure	84
3.1.1	Facteurs de structure expérimentaux et simulés	84
3.1.2	Cristallinité des solutions binaires	85
3.1.3	Nombres d'hydratation	87
3.1.4	Tessellation de Voronoi	89
3.1.5	Paramètre d'ordre orientationnel	91
3.1.6	Probabilité de LH	92
3.1.7	Agrégats de molécules d'eau	94
3.1.8	Cycles dans les agrégats	97
3.1.9	Conformations moléculaires	100
3.1.10	Flexibilité moléculaire	102
3.1.11	Agrégats de sucres et homogénéité	105
3.2	Propriétés vibrationnelles	109
3.2.1	Région des vibrations intermoléculaires ($[5-300] \text{ cm}^{-1}$)	109
3.2.2	Région de la bande de flexion de l'eau ($[1400-1900] \text{ cm}^{-1}$)	112
3.2.3	Région des bandes d'élongation O-H ($[2800-4000] \text{ cm}^{-1}$)	113
3.3	Propriétés dynamiques	116
3.3.1	Fonctions de diffusion intermédiaires	116
3.3.2	Coefficients de diffusion	119
3.3.3	Temps de vie des LHs	121
4	Solutions lysozyme/sucre/eau	123
4.1	Structure du lysozyme	123
4.1.1	Ecart par rapport à la structure cristallographique	123
4.1.2	Fluctuations quadratiques moyennes du lysozyme	124
4.1.3	Interactions protéine-solvant	127
4.2	Propriétés vibrationnelles	140
4.2.1	Spectroscopie Raman	140
4.2.2	Dynamique moléculaire	143
4.3	Propriétés dynamiques	146
4.3.1	Dynamique du réseau de LHs	151
4.4	Transition dynamique	153
4.5	Dénaturation thermique du lysozyme étudiée par diffusion Raman	156
	Conclusion et perspectives	163
	Bibliographie	167

Introduction

Les progrès de la médecine et des biotechnologies conduisent à l'utilisation de nouvelles méthodes thérapeutiques telles que la thérapie génique, la transplantation de cellules, l'utilisation de principes actifs à base de protéines. Mais les protéines, les cellules ou les tissus des organes sont intrinsèquement instables lors de leur conservation à température ambiante ou après leur injection dans le corps humain. Par exemple, les protéines sont très sensibles à des changements de température, de pH, etc. La demande de la stabilisation efficace de ces composés biologiques est donc accrue.

A l'heure actuelle, les cellules des mammifères sont pour la plupart préservées à des températures cryogéniques (cryopreservation). D'autre part, le procédé de lyophilisation (ou refroidissement-séchage) est couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la stabilisation et la conservation des composés biologiques à température ambiante. Mais ceux-ci, sensibles aux changements de température et/ou à la déshydratation, sont susceptibles de se dégrader au cours de ce procédé. En outre, leur stabilité peut être affectée à l'état solide par des réactions de déamidation ou d'oxydation.

C'est la raison pour laquelle des composés stabilisateurs sont généralement ajoutés aux formulations initiales. Parmi ces composés, des disaccharides tels que le sucrose ou le tréhalose sont particulièrement efficaces. Ceux-ci sont synthétisés en grande quantité dans certaines plantes, insectes, et microorganismes tels que des levures, des nématodes (tardigrade) vivant dans des milieux hostiles (pôles, déserts arides, etc.). Ces organismes sont capables de survivre à des périodes prolongées lorsqu'ils sont soumis aux très sévères contraintes environnementales de température et de sécheresse rencontrées. Pour cela, ils entrent dans un état où leur métabolisme semble suspendu. Une fois les circonstances redevenues plus favorables, ils retrouvent une activité normale. Il s'agit du phénomène de l'*anhydrobiose*, et l'on désigne de manière plus générale par *bioprotection* (ou *biopréservation*) le procédé permettant de maintenir la fonction d'un composé biologique après une exposition prolongée à des conditions normalement létales.

De nombreuses études ont été menées afin de comprendre l'origine de ce phénomène et ont montré que le tréhalose est l'un des meilleurs bioprotecteurs. Néanmoins, celles-ci ne sont pas parvenues à expliquer de manière satisfaisante (i) l'origine moléculaire de l'efficacité du tréhalose par rapport à d'autres carbohydrates ou excipients et (ii) le phénomène de la bioprotection en lui-même, et aucune n'est unanimement acceptée :

- l'hypothèse de Green et Angell porte sur la vitrification du solvant (sucre et eau) dans lequel se trouvent les molécules biologiques. L'efficacité du tréhalose serait liée à sa température de transition vitreuse, T_g , particulièrement élevée ($T_g \sim 393$ K). Certaines matrices dont la T_g est plus faible telles que le mélange glycérol/tréhalose de composition massique 0.05/0.95 présentent cependant une plus grande efficacité de bioprotection, alors que d'autres dont la T_g est plus élevée (Dextran ou PVP)

sont moins efficaces. Des interactions spécifiques (liaisons hydrogène) entre le bioprotecteur et la molécule biologique semblent donc nécessaires.

- l’hypothèse de remplacement de l’eau proposée par Crowe *et al.* suggère que les molécules de sucre se substituent aux molécules d’eau autour de la molécule biologique lors de la déshydratation, afin de préserver un réseau de liaisons H avec la biomolécule capable de stabiliser sa structure tridimensionnelle. Cependant, les molécules d’eau situées au sein de certaines protéines ne peuvent pas être remplacées.
- l’hypothèse de Magazù *et al.* insiste sur la déstructuration du réseau tétraédrique de liaisons H de l’eau par les sucres, qui empêcherait la formation de la structure cristalline de l’eau (glace) au profit d’une structure amorphe d’un liquide sous-refroidi. Ce modèle ne fournit cependant qu’une explication partielle car il ne considère que les situations où la concentration en eau est importante et où l’eau est susceptible de cristalliser.
- le modèle d’hydratation préférentielle des protéines de Timasheff *et al.* suggère que la proportion de molécules d’eau à la surface des protéines est plus élevée que la composition globale, alors que les sucres seraient exclus du voisinage immédiat des protéines. Cette exclusion résulterait de l’effet de volume exclu et de l’augmentation de la tension de surface de l’eau par les sucres. Ce modèle ne s’applique que si la concentration en sucres est suffisamment faible pour qu’ils ne soient pas contraints d’interagir avec la protéine.
- l’hypothèse de Belton et Gil supporte l’idée que les protéines resteraient hydratées, même lors de forts degrés de déshydratation. Le tréhalose concentrerait davantage l’eau résiduelle à proximité de la protéine. Celle-ci deviendrait confinée par la vitrification du tréhalose. A un degré de déshydratation suffisamment élevé, quelques liaisons H se formeraient entre les sucres et les protéines.
- l’hypothèse de Cesarò souligne le rôle important de la transformation réversible entre les phases cristallines T_α et dihydrate T_{2H_2O} du tréhalose, dont les structures sont proches. Le tréhalose cristalliserait en solution dans sa phase cristalline dihydrate de manière épitaxiale à la surface des membranes des cellules, jusqu’à ce qu’il ne reste que très peu d’eau. La forme T_α serait ensuite formée par déshydratation lente de la phase T_{2H_2O} . De nombreuses études ont cependant montré que la formation d’un verre conduit à une meilleure interaction entre la matrice et les molécules biologiques préservées.

Ces hypothèses ne décrivent le phénomène de bioprotection que dans des domaines de température et/ou de concentration en eau limités. Les hypothèses de l’effet destructurant et de l’hydratation préférentielle s’appliquent aux systèmes contenant de l’eau volumique, alors que les hypothèses de vitrification, de substitution de l’eau, de la couche d’hydratation et de la formation des cristaux T_α et T_{2H_2O} concernent les systèmes relativement déshydratés.

Ces hypothèses mettent en évidence le rôle central de l'eau, qui stabilise les molécules biologiques en solution en formant de nombreuses liaisons H. Il est donc clair que le phénomène de bioprotection et la plus grande efficacité du tréhalose ne peuvent être compris que si les effets sur l'eau du tréhalose par rapport à ceux d'autres composés stabilisateurs sont connus à différentes températures et concentrations. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'influence du tréhalose et de deux de ses stéréoisomères, le maltose et le sucrose, sur la structure et la dynamique de l'eau et d'une protéine globulaire modèle, le lysozyme. Afin de comprendre l'origine moléculaire de la bioprotection, nous avons mené des simulations numériques de dynamique moléculaire. Celles-ci constituent un outil efficace pour étudier les interactions des sucres avec l'eau et la protéine. Nous avons également entrepris des expériences de spectroscopie Raman qui est parfaitement adaptée à l'étude des associations moléculaires via liaisons H et qui permet de sonder indirectement la structure de l'eau et du lysozyme. Cette étude comparative de l'effet des trois sucres, dont la formule chimique commune est $C_{12}H_{22}O_{11}$, vise à expliquer pourquoi la conformation et la topologie du tréhalose lui permet d'être plus efficace.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous rappelons quelques propriétés importantes de l'eau, en particulier sa capacité à former un réseau de liaisons H tétraédrique. Nous exposons ensuite quelques caractéristiques de la structure, de la dynamique et de la stabilité des protéines, et soulignons le rôle essentiel de l'eau et plus généralement du solvant. Nous décrivons alors la topologie des sucres étudiés, puis détaillons enfin les différentes hypothèses de la bioprotection.

Le second chapitre est dévolu à quelques rappels théoriques sur les simulations de dynamique moléculaire et sur la spectroscopie Raman. Il décrit également la composition des solutions étudiées.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des mélanges binaires disaccharide/eau. Nous rapportons les principaux résultats obtenus sur l'interaction entre les sucres et l'eau, sur l'influence des sucres sur la structure et la dynamique de l'eau. Nous étudions également la flexibilité conformationnelle et les interactions entre molécules de sucres.

Le quatrième chapitre indique les résultats sur l'influence des sucres sur les propriétés structurales, vibrationnelles et dynamiques du lysozyme. Une section est consacrée à l'étude de la dénaturation thermique du lysozyme par spectroscopie Raman.

Chapitre 1

Présentation du problème

Ce chapitre rappelle tout d'abord quelques particularités d'un composé fondamental dans le phénomène de bioprotection, l'eau, qui est primordiale pour la stabilité et l'activité des molécules biologiques en raison des nombreuses liaisons H qu'elle forme avec celles-ci, et qui peut modifier les propriétés physico-chimiques de leur environnement (solvant ou matrice). Dans un second temps, nous décrivons quelques caractéristiques des protéines, auxquelles sont consacrées la majorité des études sur la bioprotection. Enfin, nous détaillons le phénomène de bioprotection lui-même, en nous intéressant plus particulièrement aux disaccharides, et notamment au tréhalose qui passe pour l'un des meilleurs bioprotecteurs, et analysons les principaux mécanismes proposés.

1.1 L'eau

Malgré son apparente simplicité, l'eau est de loin la substance qui suscite le plus d'intérêt, tant du point de vue scientifique que technologique. Elle recouvre environ 70 % de la surface terrestre, est indispensable à la vie, car elle permet les réactions biologiques, et possède des propriétés singulières, pure ou en tant que solvant [1, 2].

Le comportement de l'eau liquide diffère sensiblement de celui des liquides simples, à de nombreux points de vue. Les anomalies les plus connues sont le maximum de densité de la phase liquide à 277 K à pression atmosphérique et l'augmentation du volume de l'eau lorsqu'elle cristallise. En outre, les propriétés dynamiques de l'eau se distinguent notablement de celles des liquides simples. Par exemple, la constante de diffusion D à température constante (273 K) augmente lorsque la pression augmente jusqu'à environ 200 MPa, puis diminue, comme c'est le cas pour la plupart des liquides. Les propriétés structurales et dynamiques des liquides tels que l'eau résultent de la formation de nombreuses *liaisons hydrogène* (LHs), qui jouent un rôle primordial dans la structure et la dynamique des molécules biologiques.

1.1.1 Distribution électronique

La distribution électronique de la molécule d'eau est composée de (i) deux régions qui présentent un excès de charges positives et qui sont associées aux atomes d'hydrogène dont les électrons sont attirés par la forte électronégativité de l'atome d'oxygène, et (ii) de deux lobes à proximité de l'atome d'oxygène qui présentent un excès de charges négatives et qui correspondent aux doublets non-liants (cf figure 1.1). L'ensemble de ces quatre

régions à excès de charges adopte une organisation tétraédrique [1]. En phase condensée, les valeurs d'équilibre de l'angle de liaison (HOH) est de $104,5^\circ$ et le moment dipolaire de 1,85 Debye (D).

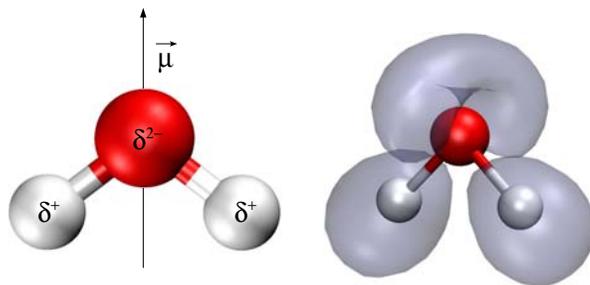


FIG. 1.1 – Représentations schématiques d'une molécule d'eau. A gauche : les charges partielles positives δ^+ des atomes d'hydrogène et la charge partielle négative δ^{2-} de l'atome d'oxygène induisent un moment dipolaire $\vec{\mu}$ selon l'axe bissecteur des deux liaisons OH. A droite : fonction de localisation tridimensionnelle des électrons, dont la géométrie est tétraédrique.

1.1.2 Liaisons hydrogène (LHs)

Définition

En phase condensée, une LH $\text{O-H}\cdots\text{O}$ est susceptible de se former entre un atome d'hydrogène lié à un atome d'oxygène (appelé *donneur*, D) d'une molécule d'eau donnée et l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau voisine (nommé *accepteur*, A)¹ (cf figure 1.2). La délocalisation des électrons de la liaison O-H est induite par la propension qu'a l'hydrogène à se polariser positivement et par la forte électronégativité de l'oxygène donneur. Il en résulte un fort moment dipolaire selon O-H dont le champ polarise les électrons du doublet non liant de l'atome d'oxygène accepteur [3].

Energie

L'énergie d'une LH (≈ 5 kcal/mol) est comparable à celle mise en jeu dans les fluctuations thermiques à température ambiante ($RT \approx 0,60$ kcal/mol à 300 K, où R est la constante des gaz parfaits). Ceci explique son rôle essentiel dans les processus biologiques dont la réactivité est souvent conditionnée par l'évolution dynamique du réseau de LHs. La principale contribution attractive de l'énergie de liaison est d'origine électrostatique et est d'autant plus importante que les dipôles de molécules d'eau voisines sont alignés. Les autres contributions proviennent i) de la polarisation d'une molécule sous l'influence du

1. A et D sont l'oxygène O (électronégativité, selon l'échelle de Pauling $\chi_P = 3,5$) dans l'eau. Mais, de manière plus générale, A et D peuvent être également l'azote N ($\chi_P = 3,0$), le fluor F ($\chi_P = 4,0$), et plus rarement, le soufre S ($\chi_P = 2,6$) et le chlore Cl ($\chi_P = 3,2$).

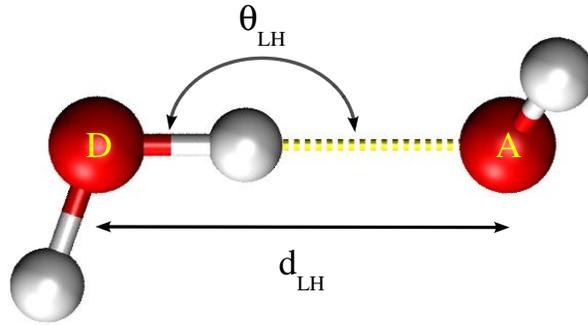


FIG. 1.2 – Représentation schématique d'une LH entre deux molécules d'eau, décrite de manière géométrique par la distance d_{LH} entre les atomes d'oxygène donneur (D) et accepteur (A) et un angle $O-H \cdots O$ valant θ_{LH} .

champ créé par sa voisine ii) du transfert de charge dû à la délocalisation intermoléculaire des électrons, et iii) de la corrélation de phase entre les déplacements instantanés des électrons. La contribution répulsive résulte du principe d'exclusion [3].

Géométrie

La distance entre l'atome d'hydrogène et l'atome d'oxygène accepteur est plus petite que pour une liaison de van der Waals, et la distance entre les atomes d'oxygène donneur et accepteur est proche de la somme de leur rayon de van der Waals. La distance $O \cdots O$ est d'environ $2,8 \text{ \AA}$ [3]. L'angle de liaison $O-H \cdots O$ d'une LH parfaite est de 180° . Cette directivité est liée aux deux contributions attractives majeures (électrostatique et transfert de charge), toutes deux fortement directionnelles. Cependant, cette parfaite linéarité est relativement peu respectée dans l'eau liquide, compte-tenu des réorganisations permanentes des molécules les unes par rapport aux autres. L'angle $O-H \cdots O$ peut dévier de plusieurs dizaines de degrés de 180° , et il est alors possible de distinguer différents types de LHs :

- LH quasi-linéaire ($O-H \cdots O \approx 180^\circ$).
- LH *bifurquées* [4] ($O-H \cdots O \neq 180^\circ$).

Ces différents types de LHs sont représentés dans la figure 1.3.

1.1.3 Structure tétraédrique de l'eau

Les molécules d'eau sont coordonnées de manière tétraédrique en accord avec la distribution électronique des charges. En effet, une molécule d'eau forme quatre LHs avec ses quatre molécules d'eau voisines : l'atome d'oxygène en forme deux en tant qu'accepteur, via les doublets non-liants, et deux en tant que donneur, via les atomes d'hydrogène. Cet ensemble de cinq molécules d'eau est parfois appelé « pentamère de Walrafen » [1] et est représenté dans la figure 1.4.

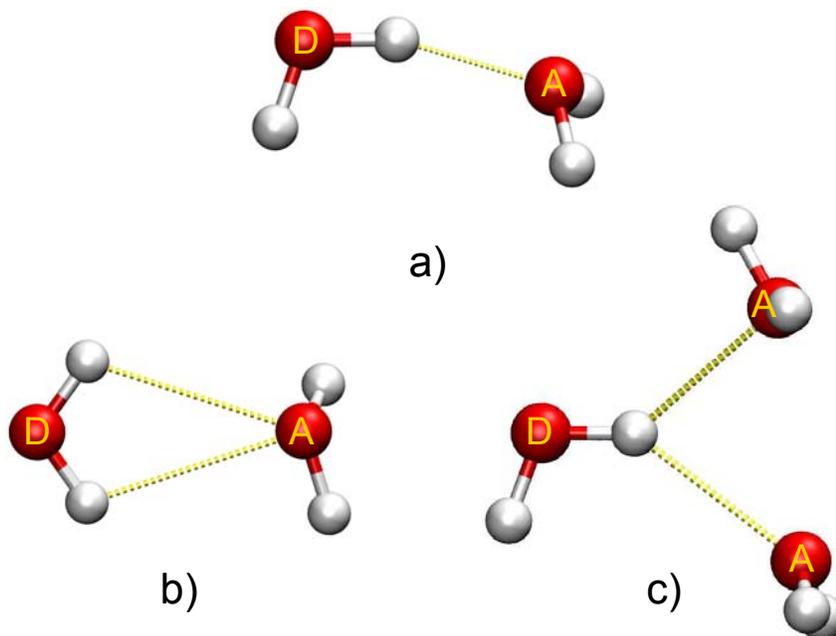


FIG. 1.3 – *Différents types de LHs : a) LH quasi-linéaire, b) et c) LHs bifurquées.*

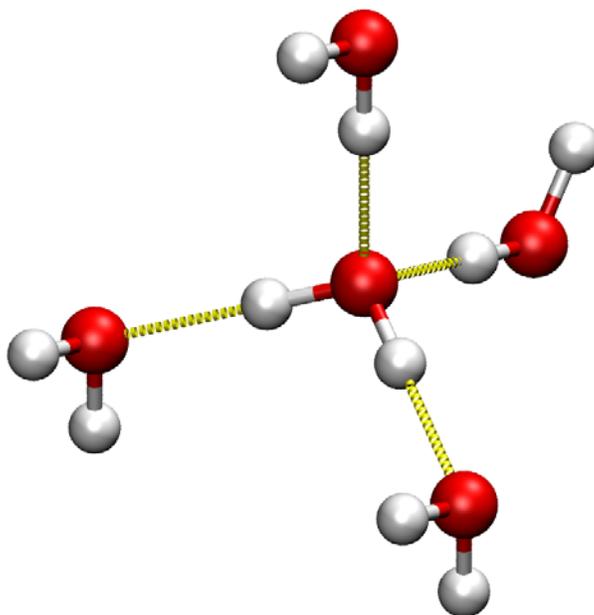


FIG. 1.4 – *En raison de l'organisation tétraédrique de son nuage électronique (cf fig. 1.1), une molécule d'eau peut se lier par LH avec ses quatre molécules d'eau plus proches voisines, formant un tétraèdre régulier appelé « pentamère de Walrafen ».*

L'espace tridimensionnel peut être pavé par des unités formées à partir de ces pentamères, et l'on pense que toutes les propriétés microscopiques et macroscopiques de l'eau proviennent du fait qu'elle forme ce type de réseau de LHs. Par exemple, la capacité des molécules d'eau à former une grande variété de réseaux tétracoordonnés conduit à un grand polymorphisme de la glace, dont treize formes cristallines ont été répertoriées jusqu'à présent [2]. Plusieurs phases amorphes distinctes de basse (LDA), de haute (HDA) ou de très haute densité (vHDA) sont également connues [2].

En outre, l'eau adopte une orientation préférentielle dans la sphère d'hydratation des solutés non polaires ou des chaînes latérales hydrophobes des biopolymères à la base des théories sur l'hydratation ou sur les effets hydrophobes (cf section 1.2.5, p. 17). A proximité d'un soluté apolaire, le réseau de LHs de l'eau se réorganise de manière à se renforcer en adoptant des géométries qui réduisent l'entropie de la solution [1]. Les molécules d'eau sont alignées suivant trois directions tangentielles à la surface de manière à préserver le maximum de LHs. A titre d'illustration, le réseau de LHs autour du méthane est représenté dans la figure 1.5.

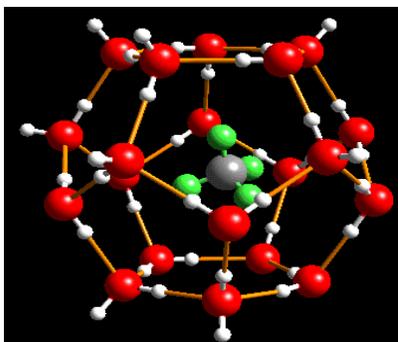


FIG. 1.5 – *Hydratation d'un soluté hydrophobe, le méthane. Le réseau de LHs de l'eau se réorganise de manière à préserver le maximum de LHs, en formant des cycles pentagone, selon une structure de type clathrate [5]. Les atomes d'hydrogène du méthane sont représentés par des sphères vertes, dont la taille est augmentée par rapport à celle des atomes d'hydrogène des molécules d'eau, afin de mieux le distinguer.*

1.1.4 Modèles de l'eau

De nombreux modèles conceptuels ont été développés afin de décrire le comportement de l'eau liquide. Ces modèles se classent en deux grandes catégories : les modèles dits de « mélange » et les modèles dits de « continuum » [1, 6].

Les modèles de mélange distinguent deux types de molécules d'eau : i) celles qui forment des LHs et qui appartiennent donc à des agrégats (« intact HBs » ou « hydrogen-bonded » HB) et ii) celles qui n'en forment pas (« broken HBs » ou « non hydrogen-bonded » NHB). L'eau liquide serait composée d'un mélange de structures ordonnées (« ice-like ») et désordonnées (« liquid-like »), respectivement moins denses et plus denses que la densité moyenne de l'eau. Expérimentalement, de nombreuses études en température de la vibration d'élongation $O - H$ de l'eau obtenue par diffusion Raman révèlent l'existence d'un point isobestique, dont l'intensité reste constante lorsque la température varie (cf figure 1.6). A partir de cette observation, certains auteurs ont proposé la décomposition arbitraire en deux classes de molécules d'eau, « open » et « closed », qui ne

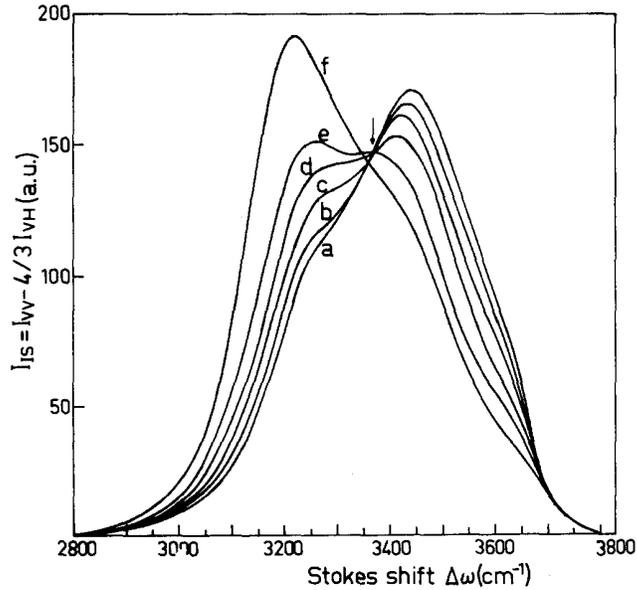


FIG. 1.6 – Spectre Raman isotropique de la bande d'élongation OH de l'eau à différentes températures. a) $T = 368$ K, b) $T = 353$ K, c) $T = 333$ K, d) $T = 313$ K, e) $T = 293$ K, f) $T = 259$ K. La flèche indique le point isobestique (situé à environ 3370 cm^{-1}). Cette bande peut être décomposée en deux contributions « open » et « closed » centrées respectivement sur 3210 et 3420 cm^{-1} environ (voir également figure 1.21, p. 31). Lorsque la température diminue, la proportion de molécules d'eau « closed » décroît au profit de la contribution « open », i.e. le réseau de LHs de l'eau devient de plus en plus tétraédrique (d'après réf. [7]).

dépendent pas de la température et qui correspondent aux deux classes des modèles de mélange [7].

Dans les modèles de *continuum*, toutes les molécules d'eau font partie du réseau de LHs : elles ne sont jamais rompues dans l'eau liquide, mais simplement plus ou moins déformées. Ainsi, la topologie du réseau de LHs est maintenue, même si sa structure tridimensionnelle est contrainte. Ce type de modèles suppose donc l'existence de LHs bifurquées [4] (voir figure 1.3b,c).

Chaque type de modèles ne décrit que certains aspects des liquides formant des LHs. Il n'existe pas réellement de frontière entre ces deux classes de modèles et il est donc possible de passer de l'une à l'autre assez aisément. Par exemple, l'introduction d'un seuil d'énergie de formation d'une LH, V_{HB} , dans un modèle continu conduit de fait à un modèle de mélange. Le modèle de Stanley et Teixeira [8], qui est un modèle de mélange, peut également être considéré comme un modèle de continuum [1].

1.2 Protéines

1.2.1 Structure

Les protéines sont des polymères linéaires dont les unités monomériques sont les acides aminés de formule générale $\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RHCOOH}$, où NH_2 est le groupe amine, COOH le groupe acide, et R la chaîne latérale (voir figure 1.7).

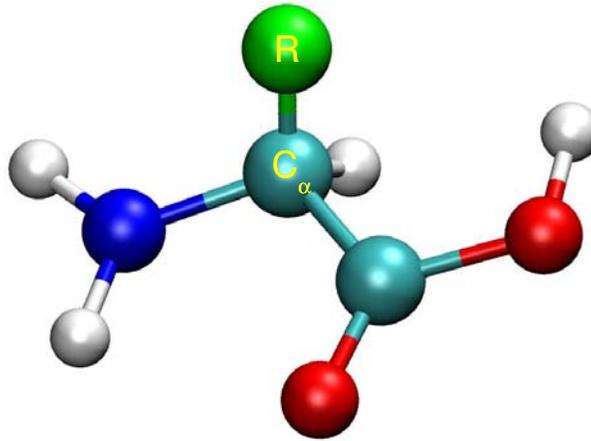


FIG. 1.7 – Représentation schématique d'un acide aminé (énantiomère *L*). La chaîne latérale est symbolisée par le groupe *R* en vert. Les atomes d'hydrogène sont en blanc, les atomes de carbone en cyan, l'atome d'azote en bleu foncé et les atomes d'oxygène en rouge.

Les acides aminés se distinguent par la nature de leur chaîne latérale *R*, qu'il est pratique de classifier comme étant [9] :

- hydrophobe (ou non polaire) : alanine, glycine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, proline, tryptophane, valine
- polaire neutre : asparagine, cystéine, glutamine, histidine (cas particulier), sérine, thréonine, tyrosine
- chargée :
 - positivement : arginine, lysine
 - négativement : acide aspartique, acide glutamique

La structure des protéines présente différents degrés d'organisation (voir figure 1.8). La structure *primaire* est définie comme la séquence des acides aminés constituant la protéine, dans le sens du N-terminal au C-terminal (par convention). La structure *secondaire* désigne des motifs dans lesquels les groupes NH et CO de la chaîne principale (ou squelette) forment des LHs entre eux. On trouve ces éléments dans la plupart des protéines, bien qu'ils diffèrent en taille et en composition en acides aminés. Dans les *hélices* α , la chaîne polypeptidique adopte une configuration hélicoïdale à l'extérieur de laquelle se situent les chaînes latérales. Chaque groupe CO d'un acide aminé i forme une LH avec le groupe NH du résidu - ou acide aminé - $i+4$. Dans les *feuilletts* β , les groupes CO et NH d'acides aminés éloignés dans la structure primaire, mais alignés dans l'espace, peuvent former des LHs. Les acides aminés peuvent être alignés de manière parallèle ou antiparallèle. Les acides aminés des feuilletts β parallèles sont alignés dans le même sens que la numérotation de la chaîne polypeptidique, alors que c'est le contraire pour les feuilletts β antiparallèles. Il est possible de décrire la plupart des protéines en termes d'hélices α et de feuilletts β connectés entre eux par des *boucles*, dont la longueur et la forme varient. Les boucles se trouvent généralement en contact avec le solvant, et sont souvent constituées de résidus polaires et chargés qui ne parviennent pas à former des LHs avec d'autres résidus de la protéine. Les éléments de structure secondaire peuvent se combiner pour former des *motifs*. La

structure *tertiaire* correspond à la structure tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique, qui résulte de l'organisation spatiale des motifs et des éléments de structure secondaire. Enfin, la structure *quaternaire* définit l'arrangement de plusieurs protéines.

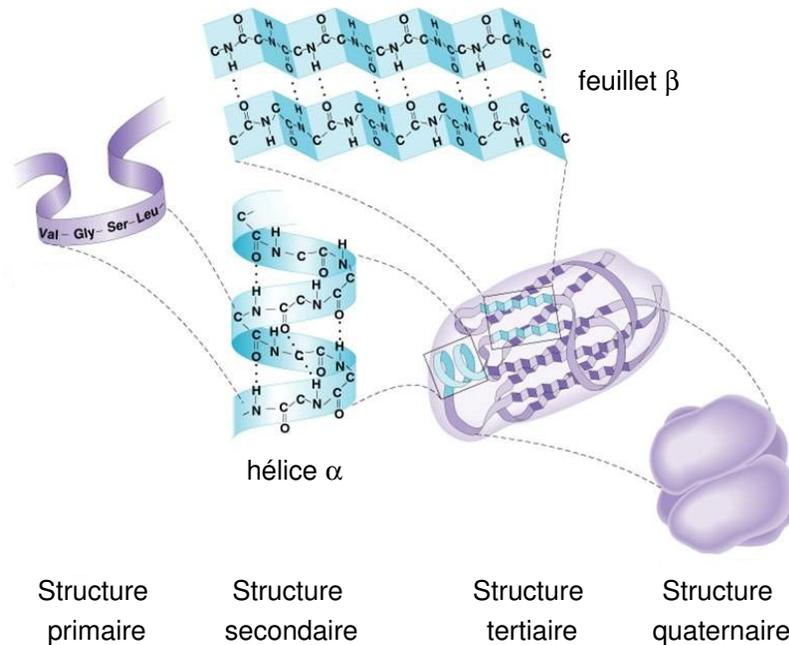


FIG. 1.8 – Organisation hiérarchique de la structure des protéines.

La plupart des protéines, et notamment les enzymes tels que le lysozyme, sont *globulaires*, mais il existe également des protéines *fibreuse*s ou structurales dont les configurations sont allongées.

1.2.2 Interface protéine-eau

Les molécules d'eau jouent un rôle déterminant sur la structure, la dynamique, et par conséquent sur l'activité biologique des protéines globulaires. En effet, elles forment de nombreuses LHs avec les atomes polaires des protéines qui sont accessibles au solvant. Réciproquement, la protéine modifie la structure et la dynamique de son eau d'hydratation. L'interaction entre les molécules d'eau et la surface de la protéine dépend de nombreux facteurs tels que la nature du résidu (hydrophobe, polaire, chargé) ou la rugosité locale de la surface accessible. Schématiquement, les molécules d'eau peuvent se classer en trois grandes catégories [10] :

- les molécules d'eau internes, qui sont liées par plusieurs LHs à la protéine. Elles représentent l'*eau de constitution*. Elles jouent un rôle structural, car elles stabilisent les ions métalliques, les groupes chargés et les dipôles libres.
- les molécules d'eau qui interagissent avec la surface de la protéine. Il s'agit de l'*eau d'hydratation*. Elle possède un comportement dynamique très hétérogène résultant à la fois de la diversité de la nature chimique des résidus de la surface de la protéine et de la rugosité locale. Les molécules d'eau peuvent former des LHs avec les groupes

$C = O$ et $N - H$ de la chaîne polypeptidique ainsi qu'avec les groupes polaires neutres ou chargés des chaînes latérales des résidus hydrophiles.

- les molécules d'eau dont la structure et la dynamique est peu ou pas affectée par la présence de la protéine. Elles correspondent à l'*eau volumique*. Ces molécules d'eau ont un comportement dynamique qui s'approche d'autant plus de l'eau pure qu'elles sont loin de la surface de la protéine. Il existe un échange permanent entre les molécules d'eau d'hydratation et les molécules d'eau volumique dont la cinétique est directement liée à la réorganisation du réseau de LHs eau-protéine.

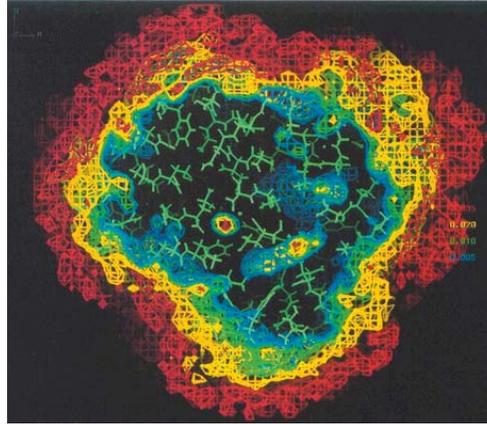


FIG. 1.9 – Coupe de la densité tridimensionnelle de l'eau autour de la myoglobine obtenue par une simulation de dynamique moléculaire (bleu : $0,005 \text{ \AA}^{-3}$, vert : $0,01 \text{ \AA}^{-3}$, jaune : $0,02 \text{ \AA}^{-3}$, rouge : $0,035 \text{ \AA}^{-3}$, la densité de l'eau volumique est de $0,33 \text{ \AA}^{-3}$). La structure de la myoglobine est moyennée sur la trajectoire et est représentée en traits verts. L'eau de constitution et d'hydratation correspondraient respectivement aux zones de densité d'eau internes et à la surface de la myoglobine. L'eau volumique n'est pas représentée et se situerait dans la partie noire de la figure (d'après réf. [11]).

Les résultats de nombreuses études obtenus par diverses techniques expérimentales (cristallographie, spectroscopie optique, RMN, calorimétrie) ont montré qu'un seuil d'hydratation h d'environ 0,3-0,4g d'eau/g de protéine est nécessaire à l'activation de la dynamique et de l'activité biologique des protéines globulaires (*e.g.* $h = 0.39$ pour la myoglobine, $h = 0.38$ pour le lysozyme). C'est la raison pour laquelle les propriétés de la couche d'hydratation jouent un rôle fondamental et ont été analysées aussi bien expérimentalement par diffraction des rayons X ou diffusion neutronique que numériquement par des simulations de dynamique moléculaire. La densité de la première couche d'hydratation peut être plus élevée de 10 % par rapport à l'eau volumique (cf zones rouges de la figure 1.9). D'autre part, l'orientation des molécules d'eau est très corrélée à la topologie locale de la surface de la protéine et au champ électrostatique à la surface. Smolin *et al.* ont étudié la staphylococcal nucléase (SNase) par dynamique moléculaire et ont observé un profil bimodal de la densité de l'eau à la surface de la protéine [12]. Le premier pic de ce profil de densité provient des molécules d'eau liées par LHs aux atomes polaires (O et N) de la surface, alors que le second correspond à la localisation des molécules d'eau à proximité des atomes apolaires (C). Une analyse détaillée des agrégats des molécules d'eau

de la première couche d’hydratation révèle la présence de cycles autour des atomes de carbone des chaînes latérales. Les fonctions de distribution radiales pentagone-pentagone et pentagone-hexagone des cycles montrent que les molécules d’eau à proximité de la surface adoptent une structure réminiscente de la structure des cages de type clathrate (cf section 1.1.3). D’autre part, Smolin *et al.* ont montré la formation d’un réseau de LHs bidimensionnel à la surface de sphères hydrophiles et du lysozyme dont la transition de percolation activerait l’activité biologique des protéines.

Diverses études expérimentales et numériques ont également montré que l’eau d’hydratation des protéines a un caractère amorphe, dont le comportement est réminiscent de celui de l’eau volumique sous-refroidie. Ainsi, la cristallisation de l’eau qui se trouve à la surface de la protéine peut être évitée, même à basse température. La dynamique de solvatation peut être étudiée par des expériences *pompe-sonde* de spectroscopie femtosecondes dans lesquelles l’acide aminé tryptophane est utilisé comme sonde locale. Des expériences menées sur la Subtilisine Carlsberg (SC) et sur la monelline montrent deux types de dynamique, l’une rapide, proche de celle de l’eau volumique, l’autre lente, typique de l’eau d’hydratation, qui reflète la distribution des temps de résidence à la surface de la protéine [13]. Des composantes lentes de 38 et 16 ps ont été obtenues, alors que la composante rapide est de l’ordre de 1 ps. De même, Marchi *et al.* ont montré par des simulations de dynamique moléculaire que le temps de relaxation rotationnelle de l’eau à proximité du lysozyme est de 3 à 7 fois plus long que celui de l’eau volumique, en fonction de la manière dont est définie la sphère d’hydratation, et que la diffusion des molécules d’eau d’hydratation est sub-diffusive [14].

1.2.3 Dynamique

La dynamique interne des protéines est d’une grande complexité étant donné la diversité des mouvements moléculaires [15, 16] : vibrations moléculaires de faible amplitude, rotations locales des chaînes latérales des acides aminés, mouvements collectifs de grande amplitude d’éléments de structure secondaire. La distribution des temps caractéristiques associés est donc très large et s’étale de 10^{-15} à 10^4 s, reflétant la grande hétérogénéité des barrières d’activation. Le tableau 1.1 décrit les principaux mouvements des protéines, ainsi que les amplitudes et les temps associés.

La dynamique des protéines peut être étudiée par diverses techniques expérimentales : la diffraction de rayons X permet de connaître la distribution des fluctuations atomiques à partir du facteur de Debye-Waller (ou facteur de température) [17]; la résonance magnétique nucléaire permet d’étudier la structure et la dynamique rapide ou lente des protéines; les cinétiques d’échange de l’hydrogène avec le deutérium permet également de sonder les fluctuations conformationnelles au sein des protéines; les études de diffusion neutronique sondent aussi bien les mouvements collectifs (*e.g.* pic boson) que les fluctuations atomiques individuelles, et sont largement utilisées pour l’étude de la *transition dynamique* des protéines.

Transition dynamique

Lorsque la température croît au-delà de la température de transition dynamique $T_d \approx 200K$, la dynamique des protéines hydratées connaît une transition [18], où les mouvements principalement vibrationnels (*glass-like*) en-dessous de T_d deviennent anharmoni-

Mouvements locaux (0,01-5 Å, 10^{-15} - 10^{-1} s) Fluctuations atomiques Mouvements des chaînes latérales Mouvements des boucles Mouvement du bras terminal
Mouvements de corps rigides (1-10 Å, 10^{-9} -1 s) Mouvement d'hélice Mouvements des domaines Mouvements des sous-unités
Mouvements à large échelle (> 5 Å, 10^{-7} - 10^4 s) Transition hélice-pelote Dissociation/Association et changements structuraux couplés Ouverture et fluctuations de distortion Transition de repliement et de dépliement

TAB. 1.1 – *Mouvements caractéristiques des protéines globulaires (d'après réf. [16]). Les amplitudes et les temps caractéristiques de ces mouvements sont indiqués entre parenthèses.*

riques (*liquid-like*) au-dessus. Cette transition dynamique se manifeste par un brusque changement de pente de l'évolution en température des fluctuations quadratiques moyennes des protéines MSF (ou du déplacement carré moyen $MSD = \langle \Delta r^2 \rangle$) à T_d (cf figure 1.10).

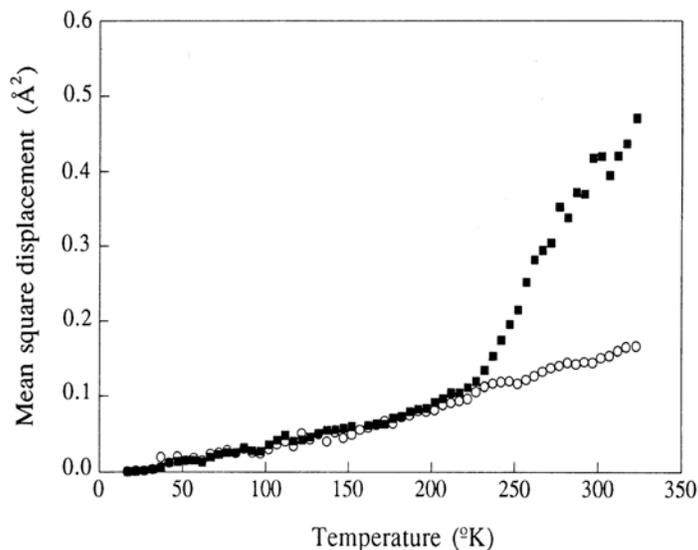


FIG. 1.10 – *Déplacement carré moyen (« Mean square displacement ») des atomes d'hydrogène de la membrane pourpre sèche ($h=0.02$, ○) et hydratée ($h=0.55$, ■) en fonction de la température (d'après réf. [19]).*

Par analogie avec le modèle de l'oscillateur harmonique, le comportement linéaire à basse température est appelé *régime harmonique*, et la forte augmentation des fluctuations atomiques est considérée comme étant l'apparition de fluctuations anharmoniques.

Si l'on se réfère au concept de paysage énergétique, ce comportement peut être décrit qualitativement de la manière suivante : en-dessous de T_d , les protéines restent confinées dans un sous-état conformationnel donné, alors qu'au-dessus de T_d , les protéines explorent d'autres minima du paysage énergétique. Ces transitions entre sous-états conformationnels peuvent être décrites par un modèle de potentiel asymétrique à deux puits [18, 20] représenté dans la figure 1.11, et dans lequel chaque puit désigne un sous-état conformationnel. Dans ce modèle, les états 1 et 2 sont séparés par une barrière d'énergie d'activation E_A , et l'état 1 est plus stable de ΔG_{12} que l'état 2. E_A définit une constante de vitesse de transition κ entre les deux sous-états, selon la relation $\kappa = A \exp(-E_A/(RT))$, où A est le facteur pré-exponentiel et R la constante des gaz parfaits. Le temps pour franchir la barrière d'énergie est supposé court par rapport au temps de résidence dans les sous-états 1 et 2. ΔG_{12} détermine les populations respectives des états 1 et 2, p_1 et p_2 , selon la relation : $p_1/p_2 = \exp(\Delta G_{12}/(RT))$. Le déplacement carré moyen de la protéine vaut alors $\langle \Delta x^2 \rangle = \langle \Delta x^2 \rangle_{vib} + p_1 p_2 d^2 / 3$, où $\langle \Delta x^2 \rangle_{vib}$ représente la contribution purement vibrationnelle ($\langle \Delta x^2 \rangle = \langle \Delta x^2 \rangle_{vib}$ en-dessous de T_d) et d est la distance entre 1 et 2 dans l'espace conformationnel. Le changement de pente de $\langle \Delta x^2 \rangle$ intervient à la température T_d telle que $RT_d \sim \Delta G_{12}$.

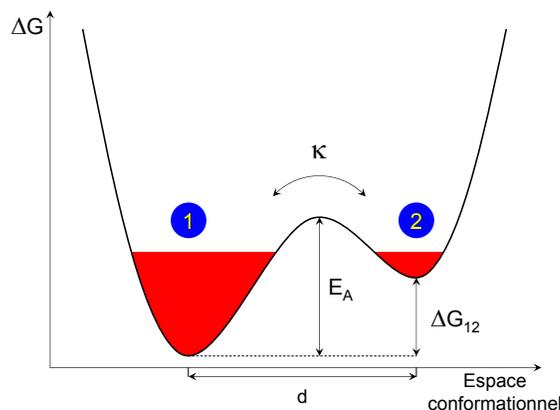


FIG. 1.11 – Potentiel asymétrique à deux puits d'une protéine. Le sous-état conformationnel 1 est plus stable que le 2 de ΔG_{12} . De plus, ces deux états sont séparés par une barrière d'énergie d'activation E_A , et diffèrent d'une distance d dans l'espace conformationnel. ΔG_{12} permet de déterminer les populations respectives de 1 et 2, E_A la constante de vitesse de transition κ entre les deux sous-états, et d le déplacement carré moyen de la protéine (voir texte). La température de transition dynamique T_d vérifie $RT_d \sim \Delta G_{12}$.

La transition dynamique a été observée par différentes techniques expérimentales sondant une large gamme temporelle : spectroscopie Mössbauer [21, 22], cristallographie par rayons X [23, 24], diffusion neutronique [19, 25–30], diffusion de la lumière [31, 32], spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) [33] ou encore par des simulations de dynamique moléculaire [30, 34–42]. Ces études montrent le rôle fondamental du solvant. Les fluctuations atomiques des protéines diminuent significativement avec le degré d'hydratation h [19, 43, 44] et des études par diffusion neutronique suggèrent que la transition dynamique est supprimée dans les poudres de protéines sèches (cf figure 1.10). La transition vitreuse du solvant pourrait également régir la dynamique interne de la protéine, qui serait donc « esclave » du solvant. Tournier *et al.* ont montré que la diffusion translation-

nelle des molécules d'eau à la surface de la protéine est nécessaire pour que la transition dynamique ait lieu [39]. De manière similaire, la transition dynamique est limitée dans des solvants très visqueux tels que le tréhalose [26, 45]. Néanmoins, une transition dynamique peut être observée dans les protéines déshydratées ou isolées [29, 46, 47], de telle sorte que le lien entre la dynamique du solvant et de la protéine est toujours largement débattu, car l'origine de la transition dynamique n'est pas clairement établie.

1.2.4 Repliement des protéines

Lorsqu'elle est synthétisée, la chaîne polypeptidique est dépliée. Elle se replie ensuite relativement rapidement pour former une structure tridimensionnelle compacte, biologiquement active. Il s'agit de l'état natif des protéines globulaires. La prédiction de la conformation de cet état à partir de la séquence des acides aminés et la manière dont les protéines se replient à partir de l'état déplié sont des problèmes délicats qui font l'objet de nombreuses études. En effet, la diversité et le nombre des acides aminés présents dans les protéines fait qu'un très grand nombre de conformations sont en principe possibles. Explorer de manière aléatoire ces conformations prendrait donc un temps infiniment long par rapport à ceux des processus biologiques. Le repliement protéique a été décrit à partir du paysage énergétique de la protéine, qui représente l'espace de configuration de l'énergie et de l'entropie accessibles à la protéine. Il est couramment admis que le paysage énergétique des protéines a la forme d'un entonnoir rugueux, aux extrémités duquel se situent les états natif et déplié (cf figure 1.12). La profondeur d'un puits de potentiel représente l'énergie libre d'interaction de la chaîne d'une configuration donnée et plus l'énergie d'un minimum local est proche de celle de l'état natif, plus les conformations associées sont similaires et moins de conformations sont accessibles. La forme en entonnoir permet donc d'expliquer le biais énergétique favorisant le repliement vers l'état natif en un temps pertinent pour les processus biologiques : différents chemins de repliement, qui ne passent pas forcément par des états intermédiaires déterminés, sont possibles. La rugosité du paysage proviendrait du fait qu'une configuration donnée ne peut contenir l'ensemble des interactions favorables. Le système serait donc frustré, *i.e.* piégé de manière transitoire dans un minimum local [48].

1.2.5 Stabilité des protéines et thermodynamique

Les protéines sont marginalement stables, car l'état natif N n'est que d'environ 5-15 kcal/mol plus stable que l'état déplié U (pour « Unfolded »), ce qui correspond à seulement quelques LHs. Les principales contributions responsables de cette stabilité sont représentées de manière schématique dans la figure 1.13. L'état natif est favorisé par la formation de LHs intramoléculaires présentes dans les éléments de structure secondaire (hélices α , feuilletts β , etc.), les interactions de van der Waals (ou de dispersion) entre les résidus hydrophobes situés principalement au coeur des protéines, et par l'*effet hydrophobe*. Cet effet provient de la diminution de l'entropie des molécules d'eau se trouvant au voisinage des résidus hydrophobes exposés au solvant dans l'état déplié. Ces molécules s'organisent selon des configurations de type clathrate de sorte à maximiser les LHs avec les molécules d'eau voisine, ce qui limite leurs degrés de liberté. L'état natif est déstabilisé par rapport à l'état déplié par les LHs formées entre les molécules d'eau du solvant et les groupes polaires $C = 0$ et $N - H$ de la chaîne polypeptidique dépliée, et par l'entropie conforma-

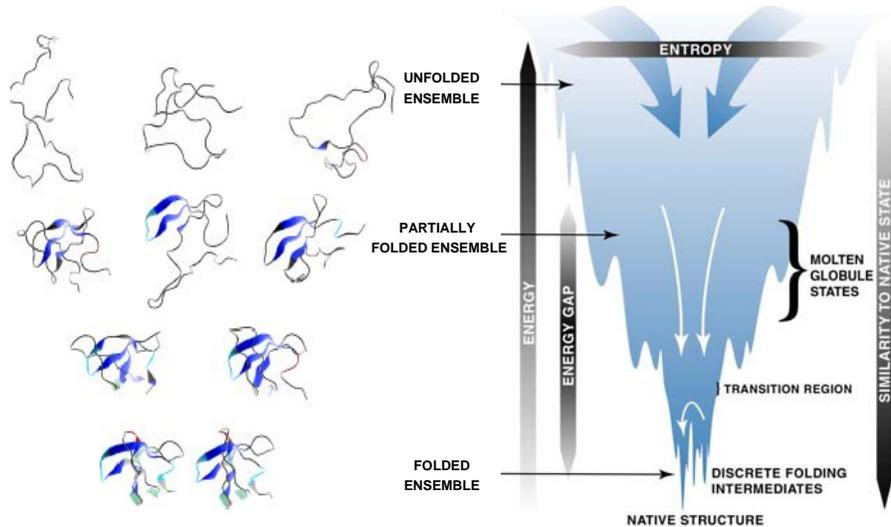


FIG. 1.12 – *Paysage énergétique de repliement d'une protéine. La profondeur représente l'énergie libre d'un état, la largeur est une mesure de l'entropie de chaque configuration. L'entropie conformationnelle perdue lors du repliement est compensée par le gain d'énergie libre au fur et à mesure que les LHs et les contacts de van der Waals de l'état natif se forment (d'après réf. [48]).*

tionnelle beaucoup plus élevée dans l'état déplié. La protéine dépliée est beaucoup plus flexible en raison de la diminution des contraintes stériques entre résidus et du nombre de LHs intramoléculaires.

L'état dénaturé D désigne l'ensemble des conformations adoptées par la protéine dans des conditions expérimentales de dénaturation, telles qu'une température et/ou une pression élevées, un pH extrême, des agents chimiques dénaturants - urée ou l'hydrochlorure de guanidine GdmHCl. En fonction des conditions de dénaturation, une partie de la structure compacte ainsi que des éléments de la structure secondaire de l'état natif peuvent être conservés dans l'état D. En général, les états déplié U et dénaturé D sont très proches en présence d'un agent dénaturant tel que GdmHCl.

Le modèle de repliement à deux états décrit simplement le processus de dépliement/repliement selon l'équilibre thermodynamique :



où N, U, et D désignent respectivement les états natif, déplié et dénaturé de la protéine. Il convient de souligner que cette réaction est susceptible de s'effectuer via un grand nombre d'états intermédiaires, qui peuvent être négligés de l'analyse thermodynamique s'ils sont très instables et donc leur durée de vie très brève. Ce processus est coopératif, si bien qu'il s'effectue rapidement lorsque les conditions environnementales changent. Le paramètre thermodynamique le plus important décrivant l'équilibre (1.1) entre N et U est

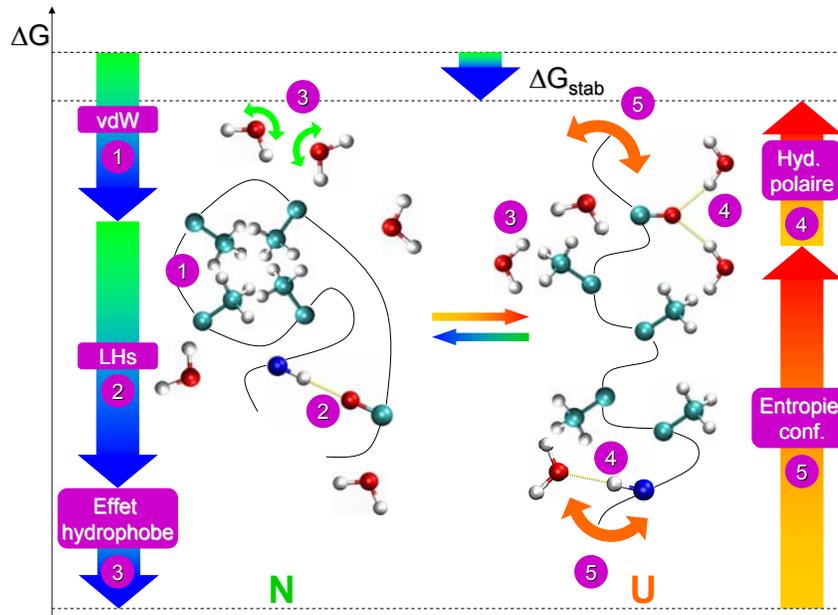


FIG. 1.13 – Représentation schématique des principales contributions à la stabilité de l'état natif N d'une petite chaîne polypeptidique (symbolisant une protéine). Dans cette figure, $\Delta G_{stab} = G_N - G_U < 0$. Les contributions favorables à N sont composées : (1) des interactions de van der Waals entre les résidus hydrophobes du coeur de la chaîne, (2) des LHs intramoléculeaires de la chaîne, et (3) de l'effet hydrophobe. Les contributions défavorables comportent : (4) les LHs entre les molécules d'eau et les groupes polaires $C=O$ et $N-H$ de la chaîne et (5) l'entropie configurationnelle beaucoup plus importante de l'état déplié.

ΔG_U , le changement d'énergie libre du dépliement. En prenant N comme état de référence par convention, $\Delta G_U = G_U - G_N > 0$, car N est thermodynamiquement plus stable que U , dans les conditions de repliement (ΔG_{stab} dans la figure 1.13 vaut $G_N - G_U < 0$). Expérimentalement, ΔG_U s'obtient à partir de la constante d'équilibre de la réaction (1.1) K_U :

$$K_U = \frac{[U]}{[N]}, \text{ et } : \Delta G_U = -R.T.\ln(K_U) \quad (1.2)$$

Si l'on note f_N et f_U les fractions molaires respectives des états N et U ($f_N + f_U = 1$), l'équation (1.2) s'écrit :

$$\Delta G_U = -R.T.\ln\left(\frac{f_U}{1 - f_U}\right) \quad (1.3)$$

Cette équation n'est valable que si les protéines ne s'associent pas entre elles.

On appelle *courbe de stabilité* de la protéine la courbe de ΔG_U en fonction de T . Cette courbe présente une allure parabolique inversée qui implique que la protéine est instable à la fois aux hautes et aux basses températures. La figure 1.14 montre un exemple d'une telle courbe.

On appelle *dénaturation chaude (ou thermique)* le processus de dénaturation à haute température et *dénaturation froide* celui à basse température. Les températures de dé-

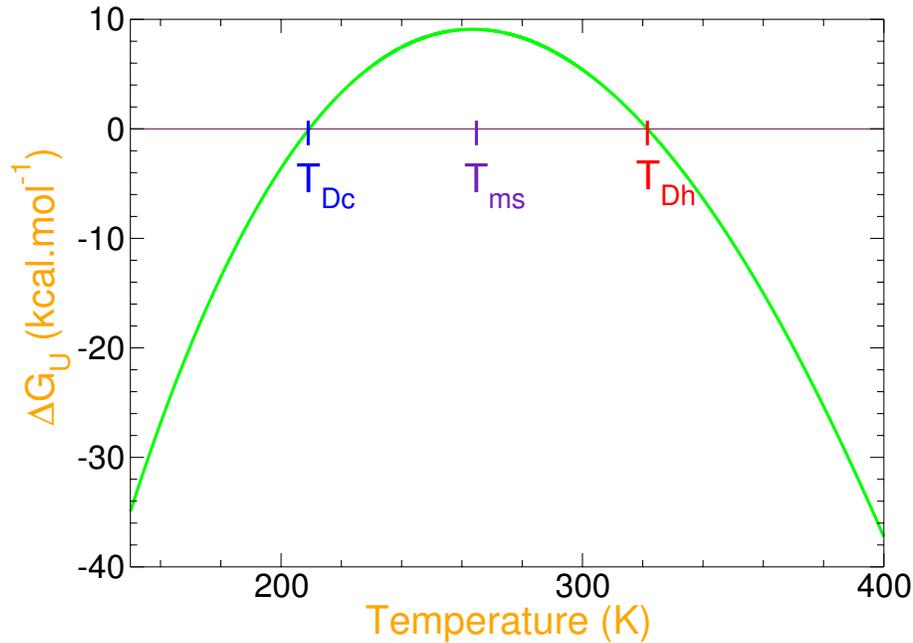


FIG. 1.14 – Courbe de stabilité d’une protéine. L’intervalle de stabilité est déterminé par la température de dénaturation froide T_{Dc} et la température de dénaturation chaude T_{Dh} . Cette courbe passe par un maximum à la température de stabilité maximale T_{ms} .

naturation associées T_{Dh} et T_{Dc} correspondent au cas où : $\Delta G_U = 0$ i.e. $f_U = f_N = 0,5$ (autrement dit, $K_U = 1$). Pour la plupart des protéines, il est délicat d’observer la dénaturation froide, car elle intervient à une température inférieure à 273 K à laquelle l’eau de la solution cristallise. L’origine de la dénaturation froide n’est pas clairement établie. Elle pourrait provenir de la diminution de l’effet solvophile (*e.g.* hydrophobe) lorsque la température diminue, suite à l’augmentation de la solubilité des groupes apolaires dans l’eau [49]. La dénaturation froide peut être mise en évidence plus aisément par l’ajout de dénaturants chimiques dont l’effet est de réduire l’intervalle de stabilité des protéines, et donc, dans certains cas, d’augmenter suffisamment T_{Dc} pour qu’elle excède 273K. La courbure de la courbe de stabilité provient du fait que la capacité calorifique à pression constante C_P de la protéine dépliée est plus grande que celle de la protéine repliée. En faisant l’hypothèse que ΔC_P ne dépend pas de la température, ce qui est raisonnable entre 273 et 353 K, la courbe de stabilité s’écrit selon l’équation de *Gibbs-Helmholtz* :

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_{Dh}) \left(1 - \frac{T}{T_{Dh}} \right) + \Delta C_P \left[T - T_{Dh} - T \ln \left(\frac{T}{T_{Dh}} \right) \right] \quad (1.4)$$

Cette équation est définie par rapport à T_{Dh} , car la dénaturation thermique est toujours observée, alors que la dénaturation froide a généralement lieu sous des conditions particulières et uniquement pour certaines protéines.

Les paramètres thermodynamiques peuvent être calculés à partir d’études :

- de dénaturation thermique
- de dénaturation par agents chimiques dénaturants
- de calorimétrie à balayage différentielle

Dans le cas de la dénaturation par agents chimiques dénaturants, il est possible en faisant varier la concentration en dénaturant $c_{den.}$ d’obtenir ΔG_U en absence de dénaturant

par une simple extrapolation linéaire, selon la relation :

$$\Delta G_U = \Delta G_{U,water} + m_{eq}c_{den}. \quad (1.5)$$

La pente m_{eq} (kJ/(mol.M)) donne une mesure approximative de la surface de la protéine accessible à l'eau par unité de concentration en dénaturant.

Aucune de ces méthodes n'est suffisante en elle-même, mais la combinaison d'au moins deux d'entre elles conduit à de bons résultats car elles sont complémentaires.

1.3 Bioprotection

1.3.1 Phénoménologie

Anhydrobiose

Certains organismes sont capables de survivre à des contraintes environnementales très sévères, en suspendant leur activité métabolique de manière réversible, si bien que lorsque les conditions redeviennent plus favorables, ces organismes retrouvent une activité normale. Keilin a utilisé le terme de *cryptobiose* (ou « vie cachée ») pour désigner ce phénomène [50]. La cryptobiose comprend la résistance à la désiccation (anhydrobiose), aux faibles températures (cryobiose), au manque d'oxygène (anoxybiose) ou aux changements de salinité (osmobiose).

Le phénomène de l'anhydrobiose a été décrit pour la première fois par van Leeuwenhoek en 1702 sur une espèce de rotifère [51]. Depuis, de nombreux organismes dits *anhydrobiotiques* tels que des bactéries, des levures, des champignons, des nématodes, des tardigrades, ou encore des plantes (de résurrection, *Selaginella lepidophylla*) ont été découverts [52] (la figure 1.15 donnent en deux exemples). En réponse aux contraintes environnementales responsables de la déshydratation (sécheresse, congélation, choc osmotique, ...), ces organismes accumulent en grande quantité des composés dits *solutés compatibles*, parmi lesquels figurent la proline, la sérine, la glycine-bétaine, le mannitol, le sorbitol, les polyols, le tréhalose, le sucrose et des oligosaccharides. Ainsi, on trouve de grandes quantités de proline et de sucrose dans le pollen, de di- et d'oligosaccharides dans les graines, et de proline, glycine-bétaine et de tréhalose dans les microorganismes et levures. Ces composés protègent la structure et l'activité des protéines contre la dénaturation et empêchent la fusion des vésicules.

Deux types de tolérance sont définis en fonction du degré de déshydratation [53] : (i) la résistance à la déshydratation modérée, où il n'y a plus d'eau volumique dans le cytoplasme (0,3 g H_2O /g de masse sèche) et (ii) la résistance à la désiccation, où il n'y a plus d'eau d'hydratation. Lors de la déshydratation, la perte de l'eau conduit à la diminution du volume cellulaire, et donc, à l'augmentation de la concentration des composants du cytoplasme. Les interactions moléculaires susceptibles de se produire peuvent alors entraîner la dénaturation des protéines et la fusion des membranes [53]. En plus des solutés tels que les sucres et les polyols, des protéines de type LEA (pour « Late Embryogenesis Abundant ») ou HSP (pour « Heat Shock Protein ») semblent jouer un rôle sur la résistance à la désiccation des plantes.



FIG. 1.15 – Exemples d’organismes anhydrobiotiques : à gauche, un tardigrade, et à droite, une plante de résurrection.

Lyophilisation

La *lyophilisation* (ou *séchage à froid*) est un procédé communément employé dans les industries pharmaceutique et agro-alimentaire qui consiste à retirer l’eau contenue dans un aliment ou une solution aqueuse, afin de le rendre stable à température ambiante et faciliter ainsi sa conservation. Ce procédé comporte deux étapes principales : (i) la congélation du produit et (ii) le séchage sous vide du produit congelé. L’étape de séchage se décompose elle-même en deux phases : les séchages primaire et secondaire. Le séchage primaire repose sur la sublimation des cristaux de glace, alors que le séchage secondaire évacue l’eau liée aux molécules biologiques, qui n’a pas cristallisé, et qui fait partie de l’eau d’hydratation.

La lyophilisation est de plus en plus utilisée pour la conservation de protéines thérapeutiques à l’état solide. Cependant, elle engendre diverses contraintes sur les protéines, susceptibles de les dénaturer. Ces contraintes peuvent se classer en trois catégories principales [54] : (i) les contraintes liées aux faibles températures (dénaturation froide), (ii) les contraintes liées à la congélation (formation de cristaux de glace, augmentation de la force ionique, changement de pH, séparation de phase), et (iii) les contraintes liées au séchage (perte de l’eau d’hydratation).

Des composés stabilisateurs de taille et de nature chimique très différentes sont utilisés afin de protéger les protéines contre la dénaturation induite par la congélation (*cryoprotection*) et/ou la déshydratation (*lyoprotection*). Quelques exemples de ces composés sont indiqués dans le tableau 1.2. Les composés *cryoprotecteurs* ne sont pas nécessairement *lyoprotecteurs* et *vice versa*, car les contraintes exercées sur les protéines lors d’une congélation ou d’une déshydratation ne sont pas les mêmes [54]. Les composés stabilisateurs sont désignés de diverses manières dans la littérature : additifs chimiques [55], co-solutés [56], co-solvants [57] ou excipients [58].

Dans de nombreux cas, les disaccharides, notamment le tréhalose, paraissent être les stabilisants les plus efficaces et universels parmi les sucres et polyols [56, 63]. C’est la raison pour laquelle nous avons choisi d’étudier ces sucres, et plus particulièrement le tréhalose et deux de ses stéréoisomères, le maltose et le sucrose.

Bioprotecteur	Exemples
Sucres	glucose, sucrose, maltose, tréhalose, lactose, raffinose
Polyols	glycérol, xylitol, sorbitol, mannitol, inositol
Solvants non-aqueux	PEG (polyéthylèneglycol), éthylène glycol, DMSO (diméthylsulfoxyde), DMF (diméthylformamide) [59]
Acides aminés	glycine, alanine, proline, L-sérine [60]
Surfactants	Tween 80 [61]
Polymères	dextran, PVA (PolyVinylAlcohol) [62]
Divers	bétaine, triméthylamine N-oxide, sulfate de sodium et de magnésium [60]

TAB. 1.2 – Exemples de différents types de bioprotecteurs utilisés.

1.3.2 Sucres

Les carbohydrates sont les composés organiques les plus abondants dans les organismes vivants, car ils résultent de la photosynthèse². Ils sont composés uniquement d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène et ont pour formule générale $C_x(H_2O)_y$. Les formes les plus simples des carbohydrates ne comportent qu'un seul cycle et sont appelés *monosaccharides* (e.g. glucose, fructose, galactose). Les monosaccharides existent sous deux formes anomériques α et β , dans lesquelles les groupes hydroxyles OH liés au carbone anomère se situent respectivement en-dessous et au-dessus du cycle. Ces deux formes existent en équilibre selon la réaction de mutarotation indiquée dans la figure 1.16.

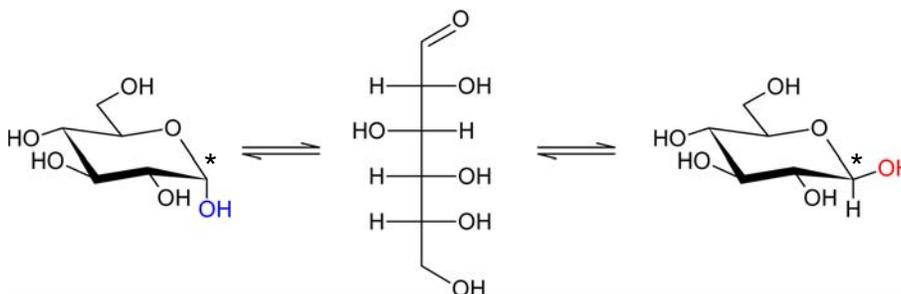


FIG. 1.16 – Réaction de mutarotation du glucose. Il existe un équilibre entre les deux formes anomères α et β du glucose. Ces deux formes se distinguent par la position axiale (en bleu) dans la forme α du glucose ou équatoriale dans sa forme β (en rouge) du groupe hydroxyle OH lié au carbone anomère (indiqué par une étoile).

Les *disaccharides* sont des carbohydrates comportant deux cycles liés par une liaison covalente appelée *liaison glycosidique* (l'oxygène de cette liaison est appelé oxygène glycosidique). Le tréhalose α,α (α -D-glucopyranosile- α -D-glucopyranoside) est un disaccharide du glucose. Il est composé de deux cycles pyranose à six atomes dans la même conformation α liés par une liaison glycosidique entre les atomes de carbone anomères de chaque cycle. Il est synthétisé en grande quantité dans de nombreux organismes anhydrobiotiques. Le maltose β (4-O- α -D-glucopyranosile-D-glucopyranoside) est également constitué de deux cycles pyranose, l'un en conformation α , l'autre en conformation β reliés respectivement

2. La réaction de photosynthèse correspond à la réaction endothermique réductrice de condensation du dioxyde de carbone et de l'eau: $nCO_2 + nH_2O + h.\nu \rightleftharpoons C_nH_{2n}O_n + nO_2$.

par le carbone anomère du premier cycle et le carbone opposé au carbone anomère du second. Il est le produit de la digestion de l'amidon et on le trouve dans les graines de céréales et dans la bière (le malte). Le sucrose (ou saccharose) (β -D-fructofuranosile- α -D-glucopyranoside) est composé d'un cycle glucose et d'un cycle fructose. Similairement au tréhalose, il est synthétisé par de nombreuses plantes anhydrobiotiques. On le trouve également dans le sucre de table sous sa forme cristalline et dans la canne à sucre, le sirop d'érable ou encore les ananas. Ces trois sucres sont représentés sous forme schématique dans la figure 1.17.

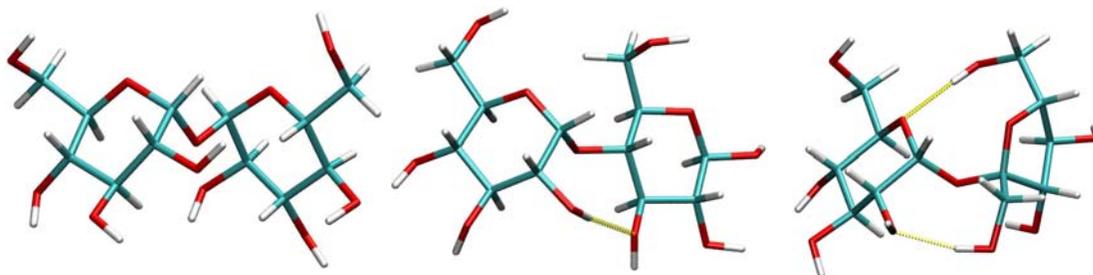


FIG. 1.17 – Représentation schématique des sucres étudiés : le tréhalose (à gauche), le maltose (au centre), et le sucrose (à droite). Le sucrose forme deux LHs intramoléculeaires dans sa phase anhydre, le maltose une dans sa phase monohydrate, et le tréhalose aucune dans sa phase dihydrate.

L'une des particularités du maltose par rapport au tréhalose et au sucrose est qu'il subit la réaction de mutarotation et donc qu'il existe sous deux formes anomères α et β , la forme β étant la plus stable. Il est dit *réducteur*, alors que le tréhalose et le sucrose sont *non-réducteurs*. Cette propriété implique qu'il est un bioprotecteur moins stable chimiquement car il peut réagir avec les résidus lysine et arginine des protéines selon la réaction de Maillard, également dénommée « brunissement non-enzymatique » [64], dont la vitesse augmente avec la température.

Ces trois sucres se distinguent également par le nombre de LHs intramoléculeaires qu'ils forment dans leurs phases cristallines. Le sucrose forme deux LHs intramoléculeaires dans sa phase anhydre, le maltose une dans sa phase monohydrate, et le tréhalose aucune dans sa phase dihydrate. Ces LHs peuvent gêner les mouvements relatifs des cycles. Crowe *et al.* [65] ont observé que la flexibilité des cycles du tréhalose est supérieure à celle des cycles du sucrose et du maltose. Cette propriété permettrait au tréhalose d'interagir davantage avec les têtes polaires des molécules phospholipidiques (cf section 1.3.3, p. 34).

1.3.3 Mécanismes

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'efficacité supérieure du tréhalose à préserver les molécules biologiques lors de l'anhydrobiose ou de la lyophilisation, et plus généralement le phénomène de bioprotection en lui-même, ne sont toujours pas élucidés, malgré un nombre important d'études expérimentales et théoriques. Dans ce qui suit, nous présentons les différentes hypothèses proposées dans l'ordre de déshydratation croissante du milieu cellulaire.

Hydratation préférentielle

Depuis des dizaines d'années, les protéines sont conservées en solution avec des additifs tels que le sucrose, le glycérol, et d'autres polyols en assez grande quantité (1-4 M). Ce besoin de grandes quantités suggère que les cosolvants n'interagissent pas directement avec les protéines. Timasheff *et al.* ont utilisé une méthode d'équilibre de dialyse afin de déterminer les affinités relatives d'une protéine vis-à-vis d'un ligand ou de l'eau [66]. Si on considère une solution ternaire composée d'eau, d'une protéine, et de cosolvant (respectivement composés 1, 2, et 3, selon la notation de Scatchard [67] et Stockmayer [68]), alors la relation de Wyman qui décrit l'effet d'un ligand sur l'équilibre chimique à une concentration donnée du ligand s'écrit :

$$\left(-\frac{\partial \Delta G^0}{\partial \mu_3}\right)_{T,P,m_2} = \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,\mu_3} \quad (1.6)$$

où ΔG^0 est le changement d'énergie libre standard de la réaction, μ_i est le potentiel chimique et m_i est la molalité du composé i , avec $\mu_i = \mu_0 + RT \cdot \ln(a_i)$ où a_i est l'activité du composé i , et $a_i = m_i \gamma_i$ où γ_i est le coefficient d'activité du composé i . Le paramètre ν_3 mesuré par les expériences d'équilibre de dialyse est :

$$\nu_3 = \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \approx \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,\mu_3} \quad (1.7)$$

ν_3 correspond à la variation de concentration du ligand pour rétablir l'équilibre chimique. Si $\nu_3 < 0$, alors le ligand est *préférentiellement exclu* de la surface de la protéine. Si $\nu_3 > 0$, alors le ligand est *préférentiellement lié* à la surface de la protéine. Timasheff *et al.* ont notamment montré que les stoechiométries de liaison des cosolvants avec les protéines ν_3 sont négatives. Ainsi, bien que de nature chimique différente, ces composés présentent tous la particularité d'être préférentiellement exclus de la surface des protéines en solution aqueuse. Autrement dit, les protéines sont *hydratées*. *Préférentiellement* signifie que la proportion d'osmolytes est plus faible à la surface des protéines que la composition volumique (voir figure 1.18). Au contraire de ces composés stabilisateurs, des dénaturants chimiques tels que l'urée ou la guanidine-HCl se lient préférentiellement aux protéines en solution et les déstabilisent.

L'exclusion d'un cosolvant de la surface d'une protéine est généralement induite par l'augmentation du potentiel chimique de la protéine, ce qui rend l'interaction défavorable d'un point de vue thermodynamique (cf figure 1.19). Cette augmentation est directement proportionnelle à la concentration du cosolvant et à l'aire de la surface de la protéine accessible au solvant. Or, comme nous l'avons vu précédemment (cf section 1.2.5), la surface de la protéine accessible au solvant est plus importante dans l'état dénaturé ou déplié que dans l'état natif ou replié (plus compact). Ainsi, l'exclusion du cosolvant dans l'état dénaturé est plus défavorable que celle dans l'état natif, qui est stabilisé par rapport à l'état dénaturé car il possède le volume d'exclusion le plus petit.

Ce raisonnement suppose que l'affinité relative du cosolvant avec la protéine est la même dans l'état dénaturé que celle dans l'état natif. Or, nous avons vu (cf section 1.2.5) que les résidus hydrophobes sont davantage exposés au solvant dans l'état déplié. Dès lors, l'interaction protéine-solvant est susceptible d'être modifiée. L'effet des cosolvants sur la réaction de dénaturation résulte alors d'une subtile balance entre les interactions qui se produisent dans les états natif et dénaturé, et il est possible que ν_3 change de signe en

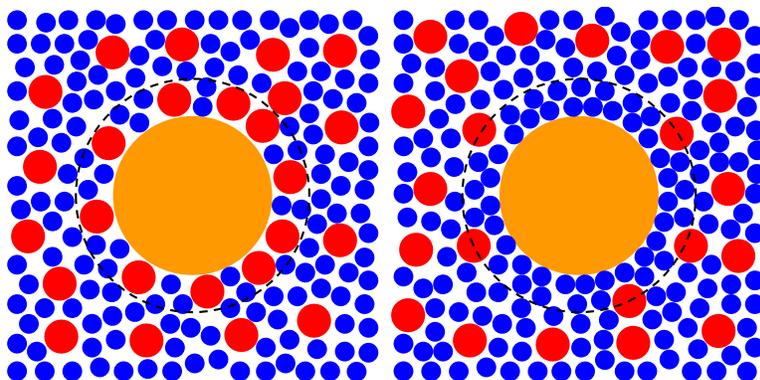


FIG. 1.18 – Représentations schématiques de l'interaction préférentielle (à gauche) et de l'exclusion préférentielle (à droite) de solutés à la surface d'une protéine en solution aqueuse. Les disques bleus représentent les molécules d'eau, ceux en rouge les molécules de solutés. Le grand cercle en orange symbolise une protéine globulaire et le cercle en tirets autour la membrane d'équilibre de dialyse. Dans le cas de l'interaction préférentielle, les solutés sont en concentration supérieure à la concentration volumique à la surface de la protéine, alors que c'est le contraire dans le cas de l'exclusion préférentielle.

passant de l'un à l'autre. Il est donc nécessaire de connaître les interactions dans les deux états.

Timasheff *et al.* distinguent quatre cas généraux [66] :

- cas I : le cosolvant est préférentiellement exclu de la surface des protéines de manière totalement non spécifique. La conformation étendue de la protéine dans l'état dénaturé augmente l'aire de l'interface protéine/solvant, ce qui fait croître l'exclusion préférentielle. L'équilibre est donc déplacé vers l'état natif. Ce cas concerne les sucres.
- cas II : le cosolvant est préférentiellement exclu de la surface des protéines dans l'état natif, mais préférentiellement lié dans l'état déplié : ν_3 est négatif puis devient positif au cours de la réaction.
- cas III : le cosolvant se lie peu ou pas du tout à la protéine dans l'état natif, mais se lie fortement dans l'état dénaturé. La dénaturation se produit alors en raison des interactions favorables entre le dénaturant et la protéine dans l'état dénaturé. Ce cas concerne les dénaturants forts tels que l'urée ou la guanidine-HCl.
- cas IV : le cosolvant est indifférent à la protéine dans l'état dénaturé, mais est préférentiellement exclu lorsqu'elle se trouve dans son état natif. C'est donc la déstabilisation de l'état natif qui est responsable de la dénaturation. C'est le cas de la Ribonucléase A (RNase A) en solution avec la guanidine-HCl.

Les mécanismes susceptibles de contribuer à l'exclusion du cosolvant peuvent être *non-spécifiques*, *i.e* indépendants de la surface de la protéine ou *spécifiques*, *i.e* liés à la reconnaissance de groupes ou de caractéristiques chimiques de la surface.

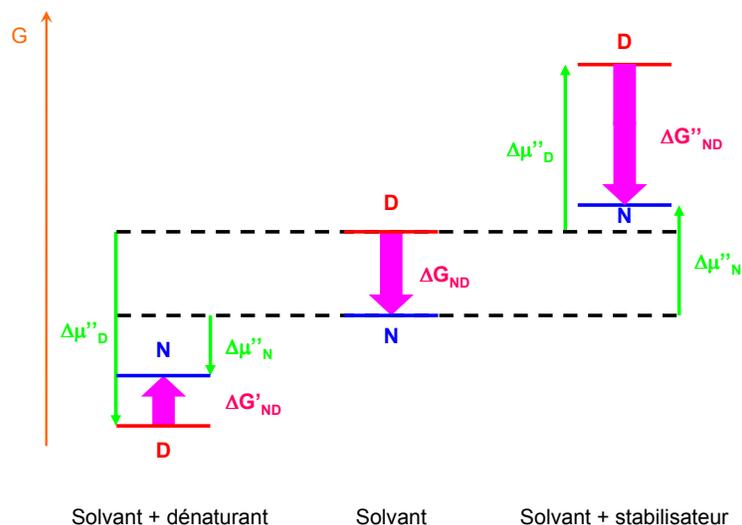


FIG. 1.19 – Diagrammes de changement d'énergie libre G d'une protéine en solution aqueuse en présence : (i) d'un dénaturant (à gauche) et (ii) d'un composé stabilisateur (à droite). L'état natif N est plus stable de ΔG_{ND} que l'état dénaturé D . Le composé dénaturant forme des LHs avec la protéine, et stabilise les états natif N et dénaturé D . L'état dénaturé est cependant davantage favorisé par la plus grande aire de la surface de la protéine accessible au solvant, qui permet la formation de davantage de LHs que dans l'état natif, plus compact. De manière opposée, l'exclusion du composé stabilisateur de la surface de la protéine est thermodynamiquement défavorable. Mais, la plus grande aire de la surface de la protéine accessible au solvant dans son état dénaturé le rend davantage défavorable que l'état natif. L'effet global de l'exclusion préférentielle du composé stabilisateur est donc la stabilisation de l'état natif par rapport à l'état dénaturé.

■ Mécanismes non-spécifiques d'exclusion

Le premier mécanisme non-spécifique d'exclusion est l'*effet de volume exclu*, qui intervient lorsque la taille du cosolvant est significativement plus grande que celle de l'eau. Il existe alors un volume autour de la protéine auquel le cosolvant ne peut accéder étant donné sa taille. Au contraire, l'eau, plus petite, est capable de pénétrer ce volume d'exclusion du cosolvant. Il en résulte un enrichissement de ce volume en molécules d'eau. Cet effet a notamment été observé dans le cas du polyéthylène glycol (PEG) [69].

Le second mécanisme non-spécifique d'exclusion provient de la modification de la tension de surface par le cosolvant et donc de l'énergie libre de surface. Cet effet est observé dans le cas des sucres, des acides aminés ou encore de certains sels. Ces additifs modifient la force de cohésion de l'eau et donc sa tension de surface. Il en résulte un excès ou un défaut de cosolvant à l'interface avec la protéine. Il est clair que si un osmolyte augmente la tension de surface de l'eau, il fera défaut à la surface de la protéine, qui sera donc préférentiellement hydratée. Il s'agit du mécanisme le plus courant.

■ Mécanismes spécifiques d'exclusion

Le premier mécanisme spécifique d'exclusion résulte de la répulsion de charges. En effet, la surface d'une protéine globulaire à pH neutre est composée d'une grande variété de charges, dont la densité peut être élevée, bien que la charge nette totale avoisine généralement 0. C'est le cas du 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD), qui est fortement repoussé par les charges de la protéine dans son état natif, conduisant à son hydratation préférentielle.

Le second mécanisme spécifique d'exclusion provient de l'*effet solvophobe*. Le contact entre les régions apolaires (ou hydrophobes) des protéines et le mélange glycérol/eau est plus défavorable d'un point de vue entropique que l'interaction entre ces régions apolaires et l'eau et l'affinité d'un site de la protéine est plus grande pour l'eau que pour le cosolvant. L'activité de l'eau croît donc davantage en présence du cosolvant. Au contraire, les régions polaires de la protéine ont des affinités pour le glycérol. Par conséquent, l'effet global dépend de ces deux types d'interactions, qui conduit généralement à l'exclusion préférentielle. Cet effet concerne le glycérol et d'autres polyols tels que le sorbitol ou le mannitol.

Dans le cadre de l'hypothèse d'hydratation préférentielle, le tréhalose stabiliserait les protéines davantage que les autres sucres, car il serait davantage exclu de leur surface, en raison du plus grand nombre de LHs qu'il forme avec l'eau. Ceci se vérifie pour la RNase A, dont le seuil d'hydratation h nécessaire à son fonctionnement vaut 0,33-0,36 g(eau)/g(protéine), ce qui correspond à 250-275 molécules d'eau par protéine. En présence de glucose, de lactose, de sucrose ou de tréhalose, le nombre de molécules d'eau liées à la RNase A déduit de mesures d'équilibre de dialyse est respectivement de 130, 170, 350, et 400, selon le modèle thermodynamique de Timasheff [70]. Les faibles nombres obtenus pour le glucose et le lactose s'expliqueraient par leur « pénétration » au sein de la protéine, cas qui n'est pas considéré dans le modèle. A l'opposé, le sucrose et le tréhalose seraient réellement préférentiellement exclus.

Pour conclure, il convient de souligner que le mécanisme d'hydratation préférentielle ne peut intervenir que si l'hydratation des protéines est totale (*i.e.* au-delà de 0,3-0,4 g d'eau/g de masse sèche), car en dessous de ce seuil, il ne reste plus d'eau volumique pouvant hydrater de manière préférentielle la protéine. En effet, la plupart de ces osmolytes ne protègent pas les protéines et les membranes contre le *séchage à l'air libre ou résultant de la congélation*. Cependant, les sucres peuvent former des LHs avec les biomolécules et/ou vitrifier le milieu cellulaire lorsqu'il n'y a plus d'eau volumique (voir mécanismes suivants).

Effet déstructurant

La formation de glace intracellulaire est souvent responsable de la mort des cellules [71], même si des exceptions existent [72]. L'une des causes possibles de dommages sur les cellules est la concentration des solutés de la solution aqueuse qui n'a pas gelé, car la glace cristallisée est pure. Ces hautes concentrations peuvent être toxiques. De plus, l'eau et la glace interagissent différemment avec les surfaces hydrophiles, ce qui peut modifier l'effet hydrophobe. Enfin, les cristaux de glace peuvent entraîner des contraintes mécaniques excessives sur les cellules. Il est possible de gêner voire d'éviter la cristallisation de l'eau en ajoutant des solutés ou des cosolvants qui modifient significativement ses propriétés (structure, réseau de LHs, viscosité, tension de surface, réponse diélectrique, constante de diffusion translationnelles et rotationnelles), comme l'illustre la figure 1.20.

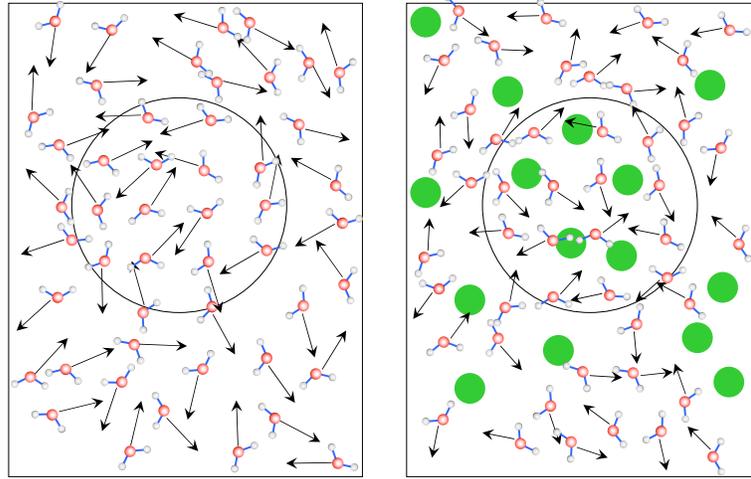


FIG. 1.20 – Schéma indiquant l'effet de solutés (disques verts) en concentration 1:4 sur le processus de nucléation de l'eau. Les flèches représentent la direction de diffusion des molécules d'eau et leur longueur indique la vitesse de diffusion. Etant donné que des solutés tels que les disaccharides diffusent beaucoup moins rapidement que l'eau, ils sont considérés immobiles sur ce schéma (aucune flèche n'est dessinée pour les solutés). Les cercles représentent le rayon critique de nucléation r_{nuc} . Dans l'eau pure, à gauche, les centres de nucléation correspondent aux régions de structure tétraédrique. Si ce réseau est de taille supérieure à r_{nuc} , alors le cristal de glace croît. Les solutés augmentent la viscosité, de telle sorte que la diffusion de l'eau diminue (représentée par les plus petites flèches, à droite). De plus, une sphère de rayon r_{nuc} doit être exempte de molécules de soluté pour que le noyau critique de glace se forme. Par conséquent, plus la concentration en soluté augmente, plus la probabilité de nucléation est faible (d'après réf. [73]).

De nombreuses études ont été dédiées à la perturbation par le cosolvant de la structure de l'eau, *i.e.* le réseau de LHs de l'eau. Les cosolvants sont souvent classés selon qu'ils renforcent le réseau de LHs de l'eau liquide (*fabricant de structure*) ou qu'ils le perturbent (*briseur de structure*). Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les cosolvants modifient également les propriétés des molécules biologiques en solution. Les cosolvants sont alors classés selon leur capacité à stabiliser la structure de l'état natif et de diminuer la solubilité des protéines en solution. Les *chaotropes* désignent les dénaturants et les *kosmotropes* les stabilisateurs de l'état natif des protéines. Les solutés agiraient donc de manière indirecte sur la stabilité des protéines, en affectant la structure de l'eau. Il est devenu courant d'assimiler la capacité d'un cosolvant à améliorer la structure de l'eau et son efficacité à stabiliser l'état natif des protéines, et *vice versa*. C'est pourquoi les *fabricants de structure* sont souvent confondus avec les *kosmotropes* et les *briseurs de structure* avec les *chaotropes* [74]. La liaison ou l'exclusion d'un cosolvant joue cependant un rôle important, de telle sorte qu'il n'existe aucune corrélation entre les effets des cosolvants sur les protéines et leurs effets sur l'activité de l'eau [74].

La classification fabriquant/briseur de structure peut être déterminée à partir du signe de $(\partial\overline{C}_p/\partial P)_T$ où \overline{C}_p représente la capacité calorifique molaire partielle, P la pression et T la température. $(\partial\overline{C}_p/\partial P)_T$ est respectivement négatif ou positif, selon que le soluté est fabriquant ou briseur de structure de l'eau. A partir de l'analyse des solutions aqueuses de 17 solutés (dont le tréhalose, le maltose, le sucrose, le glycérol ou l'urée), Batchelor *et al.* [75] ont montré qu'il n'existe aucune corrélation entre les effets sur la stabilité des protéines et le signe de $(\partial\overline{C}_p/\partial P)_T$. Ainsi, le chaotrope stabilisateur de protéines $(NH_4)_2-SO_4$ et le kosmotrope déstabilisateur de protéines guanidinium SCN sont des briseurs de structure de l'eau. De plus, le tréhalose paraît avoir quasiment le même effet sur l'eau que le sucrose. C'est la raison pour laquelle Batchelor *et al.* [75] concluent que l'effet des solutés sur la structure de l'eau n'est pas déterminant de l'effet sur la stabilité des protéines. Par contre, l'effet du soluté proviendrait de l'effet de volume exclu, de l'affinité du soluté avec la surface de la protéine, et de l'atténuation (ou de l'accentuation) de l'effet hydrophobe (cf section 1.3.3, p. 25). C'est la raison pour laquelle nous n'utiliserons pas cette terminologie qui peut être trompeuse car ces propriétés peuvent dépendre du système étudié, de la concentration, de la méthode de détermination, et de la couche d'hydratation considérée.

L'efficacité relative des différents disaccharides à préserver les membranes biologiques semble cependant liée à l'importance de l'effet de déstructuration du réseau tétraédrique de l'eau, ainsi qu'à la réduction de la quantité d'eau susceptible de cristalliser (*freezable water*) [76]. Ceux-ci peuvent former de nombreuses LHs avec l'eau par l'intermédiaire de leurs groupes hydroxyles OH. Ce nombre dépend de la conformation, de la forme anomère et de la topologie des sucres. Les caractéristiques de la couche d'hydratation peuvent être définies à partir de la compressibilité molaire partielle $K_{S,2}^0$ des solutions sucre/eau. En effet, si le soluté perturbe ou détruit le réseau de LHs de l'eau dans son voisinage, l'eau d'hydratation est plus dense et moins compressible que l'eau volumique. $K_{S,2}^0$ est alors négative. A partir de mesures de $K_{S,2}^0$, Galema *et al.* [77] ont proposé un modèle d'*hydratation stéréospécifique* qui suggère que les caractéristiques des sucres dépendent de leurs compatibilités avec le réseau tétraédrique de LHs de l'eau. Roberts *et al.* [78] ont également souligné l'effet de la stéréochimie des sucres sur la structure du réseau de LHs de l'eau à travers leur étude de trois monosaccharides homologues (le $\beta - D$ -glucose, le $\beta - D$ -mannose, et le D -fructose) par simulation numérique. En outre, Furuki [79] a corrélé la compressibilité $K_{S,2}^0$ de solutions aqueuses de disaccharides avec la quantité d'eau qui ne gèle pas U_W (*unfrozen water*). Il a notamment constaté que U_W dépend de la position et du type (α ou β) de la liaison glycosidique entre les deux cycles. Furuki a observé que la solution aqueuse de tréhalose a une plus grande quantité d'eau non-gelée que celle de maltose, en accord avec la $K_{S,2}^0$ plus négative pour la solution tréhalose/eau que celle de la solution maltose/eau. Miller *et al.* [80, 81] ont également constaté que l'efficacité de bioprotection suit l'ordre des chaleurs des solutions des composés cristallins et amorphes, en bon accord avec les propriétés cryoprotectrices supérieures du tréhalose par rapport au maltose et au sucrose. Ils ont obtenu les chaleurs des solutions $\Delta H^{sol,\infty}$ des composés cristallins³ du tréhalose, du maltose, et du sucrose qui sont respectivement de $19,1\pm 0,1$, $15,6\pm 0,1$ et $5,95\pm 0,1$ kJ/mol et celles des composés amorphes sont de $-27,2\pm 0,4$, $-19,4\pm 0,3$ et $16,3\pm 0,5$ kJ/mol. Cette variation d'enthalpie constituerait une mesure de la capacité de formation de LHs entre l'eau et le saccharide (en supposant que les interactions moléculaires dans l'état amorphe sont comparables pour les différents saccharides). Ces

3. Les phases cristallines dihydrate [82] du tréhalose et monohydrate [83] du maltose sont considérées dans la référence [81].

valeurs des chaleurs des solutions suggèrent que le tréhalose perturbe davantage le réseau de LHs de l'eau. Par conséquent, il aurait des propriétés cryoprotectrices supérieures au maltose et au sucrose.

D'autres études ont montré que le tréhalose se lie à davantage de molécules d'eau que le maltose et le sucrose. Par exemple, Magazù *et al.* ont montré, à partir de mesures de viscosité et de compressibilité que le tréhalose se lie davantage à l'eau à travers tout l'intervalle de température étudié (298-333 K) [84]. Ainsi, le volume molaire partiel du tréhalose est plus petit que ceux du maltose et du sucrose. Ces résultats ont été confirmés par des études de dynamique moléculaire [85–87].

La perturbation de la structure du réseau de LHs de l'eau a été étudiée par spectroscopie Raman [88] et par diffusion neutronique inélastique [89]. Branca *et al.* ont étudié l'effet des sucres sur la bande d'élongation de l'eau en décomposant la bande d'élongation de l'eau en deux contributions *open* et *closed* représentant respectivement les molécules d'eau qui forment des LHs intacts et déformés (cf section 1.1). L'effet destructurant se manifeste par une contribution *open* qui diminue lors de l'ajout des sucres, à une température donnée. Cet effet est davantage marqué en présence du tréhalose que du maltose ou du sucrose, comme indiqué dans la figure 1.21.

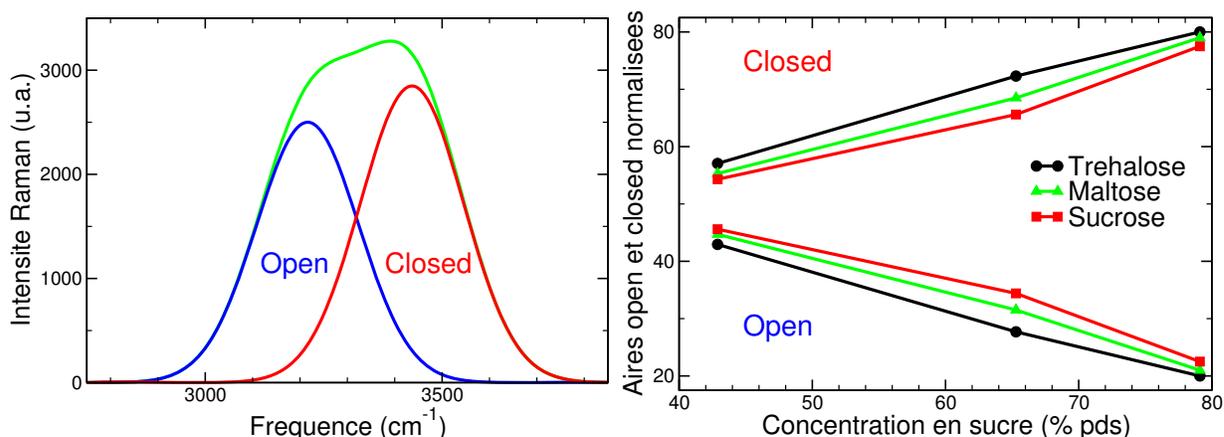


FIG. 1.21 – A gauche : Décomposition *open/closed* de la bande d'élongation OH de l'eau liquide. A droite : Dépendances en concentration des contributions *open* et *closed* normalisées par l'aire totale de la bande d'élongation OH (courbe verte dans la figure de gauche) pour des solutions aqueuses de tréhalose, de maltose et de sucrose. A une concentration donnée, la plus faible contribution *open* des solutions de tréhalose suggère qu'il déstructure davantage le réseau de LHs de l'eau que le maltose et le sucrose (d'après réf. [88]).

Les groupes hydroxyles des sucres adoptent des positions et orientations incompatibles avec la structure de la glace. Ces résultats ont récemment été confirmés par l'étude de la bande d'élongation de l'eau par des expériences de diffusion neutronique inélastique du tréhalose et du sucrose [89]. Le tréhalose serait un bon cryoprotecteur car il déstructure davantage le réseau de LHs de l'eau et limite la cristallisation de l'eau intracellulaire.

Pour conclure, l'effet destructurant concerne les solutions relativement diluées. Il permet donc d'expliquer certains aspects de la cryoprotection (protection contre les basses températures) tels que le sous-refroidissement des solutions comportant les osmolytes. Cependant, il ne décrit pas l'anhydrobiose ou la lyoprotection où le degré de déshydratation est important.

Vitrification

Lorsque l'hydratation et/ou la température du cytoplasme diminuent, celui-ci est susceptible de vitrifier. Les propriétés principales des verres et des liquides sous-refroidis sont décrites en annexe (cf page 40).

La formation du verre permet (i) de maintenir la structure et la fonction des macromolécules [90], en empêchant notamment les changements de conformation des protéines [91], (ii) de limiter les réactions pouvant conduire à la dénaturation des protéines telles que les réactions de brunissement, et (iii) d'éviter la fusion des membranes phospholipidiques et donc la fuite de composés du cytoplasme (leakage) qui en résulte. Green et Angell [92] ont suggéré que la température de transition vitreuse du tréhalose, plus élevée que celle de la plupart des sucres, permet d'expliquer sa plus grande efficacité de biopréservation des membranes biologiques ou des protéines. Le tableau 1.3 donne les valeurs de T_g pour quelques bioprotecteurs.

Bioprotecteur	m	$T_g(K)$
Dextran	> 120	~ 500
Tréhalose	107 [93]	350-391 [81, 90, 94-97]
Maltose	~ 100	346-374 [81, 94-96, 98, 99]
Sucrose	~ 100	330-348 [81, 94, 95, 98, 100, 101]
Glycérol	53	181 [102]
PEG	52	167

TAB. 1.3 – *Indice de fragilité m selon la classification d'Angell (eq. 1.8, p. 42) et température de transition vitreuse T_g de quelques composés stabilisateurs.*

A partir de la différence de la viscosité des solutions de tréhalose par rapport à celle de sucrose, maltose, glucose ou fructose, Sola-Penna et Meyer-Fernandes ont suggéré que le tréhalose est apparemment plus efficace pour stabiliser la pyrophosphatase et la G6DPH (glucose-6-phosphate déhydrogénase) à l'état liquide [103]. Ekdawi-Sever *et al.* ont également montré par dynamique moléculaire qu'à une concentration en sucre donnée, le coefficient de diffusion de l'eau en présence de tréhalose est plus petit que celui de l'eau en présence du sucrose [87]. De même, le coefficient de diffusion obtenu pour le tréhalose est plus petit que celui du sucrose. Ekdawi-Sever *et al.* ont attribué la plus grande mobilité du sucrose à son nombre d'hydratation plus faible, ainsi qu'à sa forme plus compacte par rapport au tréhalose. Ainsi, le tréhalose parviendrait davantage à réduire la mobilité de l'eau (d'autant qu'il forme un cristal dihydrate, cf page 38), ce qui le rendrait plus efficace dans la protection des molécules biologiques lors de leur conservation pendant de longues périodes.

Crowe *et al.* [104] suggèrent que la vitrification en elle-même n'est pas suffisante pour protéger les membranes. Et, il est bien établi que l'efficacité de biopréservation n'est pas nécessairement proportionnelle à la T_g de la matrice, comme il a été montré pour la maltodextrine [105], le glycérol [32], les mélanges glycérol/tréhalose [106] ou pour des polymères tels que le dextran ou le PVP [107, 108]. Ainsi, Cicerone et Soles [106] ont montré que l'ajout d'une petite quantité de glycérol (5 % en poids) dans une matrice de tréhalose réduit l'amplitude de la dynamique rapide (> 200 MHz), bien que la T_g du mélange soit inférieure à la T_g du tréhalose pur. De même, le temps de désactivation enzymatique de la HRP (Horseadish peroxidase) et de la YADH (Yeast Alcohol Dehydrogenase) est plus

élevé en présence de ce mélange à 5 % en poids de glycérol, comme indiqué dans la figure 1.22.

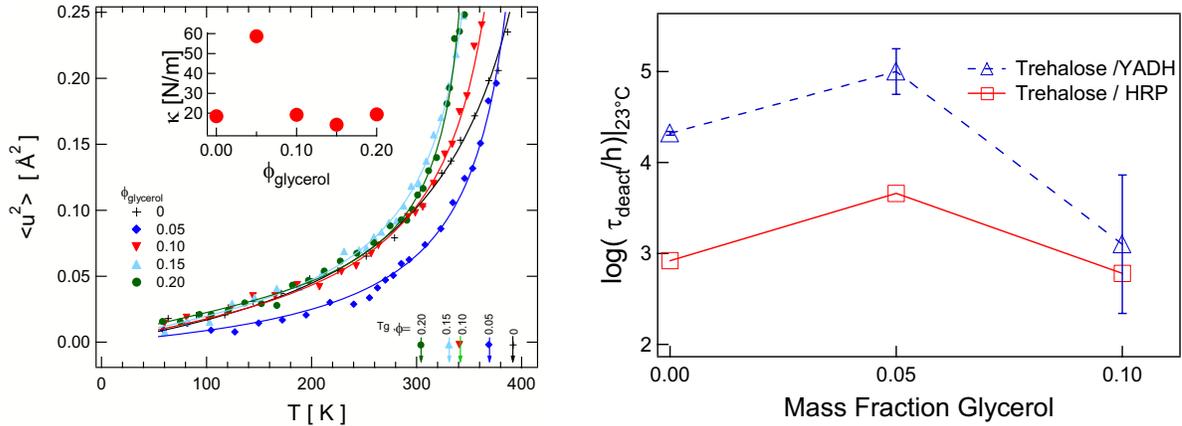


FIG. 1.22 – *A gauche* : Dépendance en température des facteurs de Debye-Waller $\langle u^2 \rangle$ des verres de tréhalose à différentes fractions massiques de glycérol ϕ_{glycerol} . Les résiliences κ des verres à basse température sont représentées en insert. La température de transition vitreuse T_g des différents mélanges est indiquée en bas à droite de la figure. *A droite* : Temps de désactivation enzymatique τ_{deact} /heures extrapolés à température ambiante pour les verres bioprotecteurs plastifiés par différentes fractions massiques de glycérol ($\phi=0.00$, 0.05 , et 0.10) (d'après réf. [106]).

Selon l'hypothèse de Green et Angell [92], le tréhalose serait un meilleur bioprotecteur que le maltose et le sucrose en raison de sa plus haute T_g . D'autres propriétés des liquides sous-refroidis semblent cependant également susceptibles de jouer un rôle important dans le phénomène de bioprotection. Caliskan *et al.* [109] suggèrent que la *fragilité* (cf Annexe p. 42) du système considéré est susceptible de jouer un rôle important dans la suppression de la dynamique et de l'activité des protéines. Le tableau 1.3 donne les valeurs de l'indice de fragilité m selon la classification d'Angell pour quelques bioprotecteurs. Caliskan *et al.* ont montré que les fluctuations conformationnelles rapides du lysozyme en dessous de $T \approx 270$ K sont plus importantes en présence de tréhalose solide que de glycérol liquide. L'argument de la T_g élevée du tréhalose présuppose que c'est la relaxation structurale du solvant α qui influence le plus la dynamique de la protéine. Cependant, la dynamique des liquides formateurs de verre se caractérise par des processus de relaxation variés - dont les fluctuations conformationnelles rapides (≈ 1 ps) - qui peuvent également influencer la dynamique des protéines, et que la valeur de T_g ne peut caractériser. Ainsi, selon la classification d'Angell, le glycérol est un système formateur de verre relativement fort, alors que le tréhalose est fragile. Par conséquent, les solvants plus forts pourraient avoir des propriétés bioprotectrices plus importantes, car ils réduisent davantage les fluctuations conformationnelles rapides [32]. La plus grande fragilité du raffinose par rapport au sucrose permettrait d'expliquer pourquoi il est moins bon bioprotecteur [110], malgré sa T_g plus élevée [111, 112], et sa plus grande capacité à former des LHs [113]. Magazù *et al.* ont également suggéré que la plus faible fragilité du tréhalose pur ou en solution aqueuse lui permet d'encapsuler les molécules biologiques dans des structures plus rigides et donc d'avoir des propriétés cryptobiotiques plus importantes que celles du maltose ou du sucrose [114, 115]. La plus faible fragilité du tréhalose implique en effet une résistance plus

importante aux changements de la structure locale lorsque la température décroît vers T_g . Elle proviendrait du fait qu'en plus de modifier les propriétés structurales et dynamiques de l'eau, le tréhalose formerait avec l'eau une entité relativement rigide ayant un caractère cristallin [114].

D'autres auteurs évoquent également l'importance de la température critique T_c (voir Annexe) prédite par la théorie de couplage de mode (MCT) [116, 117]. Ainsi, Buitink *et al.* [118] ont comparé la mobilité moléculaire autour de T_g dans les sucres, la poly-L-lysine, et dans des systèmes biologiques secs tolérants à la dessiccation, par les spectroscopies de ST-EPR (spin probe saturation transfer electron paramagnetic resonance), de RMN du proton ^1H et par FTIR. Ils ont observés deux changements distincts des temps de corrélation rotationnelle τ_R de la molécule sonde (3-carboxy-proxyl) ou du second moment M_2 . Le premier changement est attribué à la transition vitreuse à T_g lors du chauffage. Le second correspondrait à la température critique T_c , où la dynamique passe de celle d'un liquide visqueux à celle d'un liquide simple (ou normal). La meilleure stabilisation du tréhalose par rapport à celle du sucrose pourrait être reliée au fait que T_c soit observée à une température substantiellement plus élevée dans le tréhalose que dans le sucrose, ce qui impliquerait que la phase amorphe du tréhalose est plus stable au-dessus de T_g que celle du sucrose. Ainsi, des systèmes contenant du tréhalose peuvent être chauffés 8 K de plus au-dessus de T_g que ceux contenant du sucrose pour une efficacité de biopréservation comparable [105]. Ils ont également remarqué que l'intervalle $T_c - T_g$ suit l'ordre Sucrose < Tréhalose < Raffinose \leq Stachyose < poly-L-lysine < tissus biologiques. Ainsi, ce seraient les protéines plutôt que les sucres qui joueraient un rôle important dans la vitrification du milieu intracellulaire.

Substitution de l'eau d'hydratation

Les mécanismes de bioprotection sont susceptibles d'être différents selon qu'il reste ou non de l'eau volumique dans le milieu cellulaire. L'*hydratation préférentielle* des macromolécules est essentielle lorsqu'il reste encore de l'eau volumique, mais ce mécanisme n'est plus valable pour des degrés d'hydratation plus faibles. Lorsqu'il n'y a plus d'eau volumique dans le cytoplasme, l'effet hydrophobe responsable de la structure et la fonction des protéines est réduit. Le retrait de l'eau des groupes des têtes polaires conduit à l'augmentation significative de la température de transition cristal liquide/gel T_m (≈ 333 K). Ceci résulte de la réduction de l'espace entre les têtes polaires et de l'augmentation de la densité d'empilement des chaînes acyles (hydrocarbonées). Par conséquent, les lipides secs seraient dans la phase gel à température ambiante, au lieu d'être dans la phase cristal liquide, sous hydratation normale. Ces membranes séchées en l'absence de tréhalose sont alors soumises à la fusion des vésicules, au changement de morphologie, et à la perte du transport de calcium lors de la réhydratation [119]. Dès lors, la fréquence de la bande d'élongation P=O du phospholipide augmente d'environ 30 cm^{-1} , alors qu'elle est proche de celle des membranes hydratées en présence de tréhalose.

Crowe *et al.* ont proposé l'*hypothèse de substitution de l'eau* afin de décrire la manière dont le tréhalose protège les cellules, les membranes, les protéines et les acides nucléiques lorsqu'ils sont séchés. Ils ont suggéré que le tréhalose se substitue aux molécules d'eau d'hydratation pour former des LHs avec les molécules biologiques, par l'intermédiaire de leurs groupes hydroxyles. Les LHs seraient formées avec les groupes phosphates des têtes polaires des phospholipides des membranes phospholipidiques [120] et avec les groupes po-

lares accessibles au solvant des protéines globulaires. Le tréhalose maintiendrait donc les membranes et les protéines dans un état similaire à celui de l'état d'hydratation complète. L'effet du tréhalose sur les membranes lipidiques est représenté dans la figure 1.23.

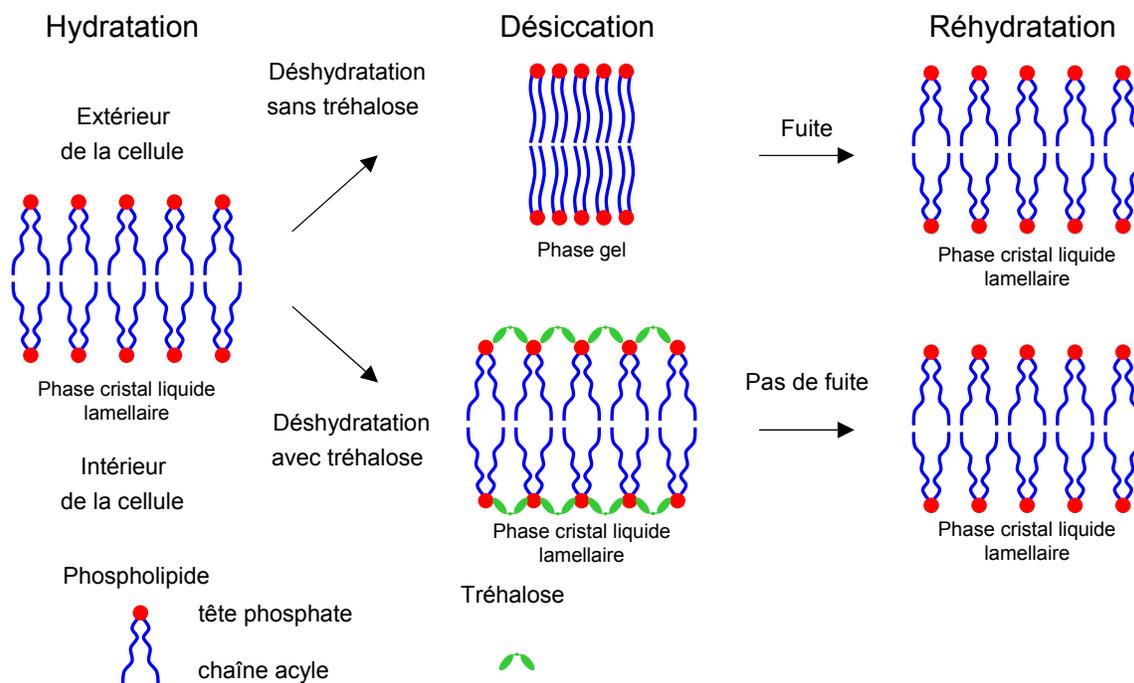


FIG. 1.23 – Représentation schématique de la déssiccation d'une membrane lipidique avec et sans tréhalose. La déshydratation provoque un changement de la phase liquide cristalline de la membrane en une phase gel. Lors de la réhydratation et le nouveau changement de phase de la membrane qui s'ensuit, la membrane devient temporairement perméable, ce qui peut causer une perte fatale du contenu de la cellule. Le tréhalose préserverait la structure des membranes durant la déssiccation en s'intercalant entre les têtes polaires des phospholipides. Il remplacerait les molécules d'eau d'hydratation de la membrane et empêcherait ainsi son changement de phase.

Diverses expériences [121] semblent confirmer la validité de l'hypothèse de *remplacement de l'eau*. L'étude du comportement de monocouches phospholipidiques à l'interface air/eau en présence et en l'absence de tréhalose montre que l'aire moyenne des phospholipides sous pression est significativement plus importante en présence de tréhalose. Ceci semblerait indiquer que le tréhalose participe à la structure de la monocouche, sans en être expulsé, même aux pressions de surface élevées. Par conséquent, le tréhalose formerait des LHs entre les têtes polaires des phospholipides. L'effet du glucose serait beaucoup moins prononcé. En outre, des mesures de RMN de mélanges secs de tréhalose et de la 1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidylcholine (DPPC) indiquent que le sucre se trouve à proximité de la tête polaire phosphate des lipides. Les huit groupes hydroxyyles du tréhalose sont disponibles pour former des LHs avec les groupes phosphates et carbonyles des lipides.

L'abaissement de la température de transition T_m de la DPPC impliquerait l'espacement des chaînes acyles pour permettre leur désordre. Finalement, de nombreuses études par spectroscopie infrarouge confirment la formation de LHs entre les carbohydrates et les protéines lyophilisées, telles que le lysozyme, la BSA, la PFK [108, 122], la α -lactalbumine bovine [91].

La différence de stabilisation des membranes et des protéines entre les différents sucres pourrait résulter d'un nombre et d'une *intimité* différents de LHs. L'efficacité du tréhalose pourrait provenir de sa plus grande capacité à former des LHs en tant que donneur, par rapport aux autres disaccharides. Crowe *et al.* [65] ont observé une plus grande flexibilité entre les deux monomères du tréhalose qu'entre ceux du maltose ou du sucrose. Cette propriété permettrait au tréhalose de s'adapter davantage à la topologie irrégulière des groupes polaires des macromolécules et donc d'interagir davantage avec les têtes polaires des phospholipides. D'ailleurs, Allison *et al.* ont montré que le degré de protection structurale apporté par le sucrose et le tréhalose est corrélé au degré d'interaction par LH entre le sucre et la protéine. C'est pourquoi l'incapacité du dextran à inhiber le dépliement du lysozyme induit par déshydratation résulterait de son incapacité à former des LHs adéquates avec la protéine. Allison *et al.* suggèrent cependant que la formation de LHs entre les carbohydrates et la protéine est nécessaire, mais pas suffisant, car le glucose forme de nombreuses LHs avec le lysozyme à l'état sec mais ne parvient pas à inhiber le dépliement du lysozyme lors de la déshydratation.

López-Díez et Bone [123] ont montré que le tréhalose serait plus efficace que le sucrose pour préserver une protéine modèle, la trypsine, car il formerait avec elle davantage de LHs. Cette différence d'interaction entre les deux sucres proviendrait de la formation de cristaux de tréhalose sans LHs intramoléculaires (T_{2H_2O} et T_α) d'un côté, et de cristaux de sucrose anhydre stabilisés par des LHs intramoléculaires de l'autre. Le tréhalose chercherait donc davantage que le sucrose à maximiser ses LHs avec la protéine afin de former une structure d'énergie libre plus petite. López-Díez et Bone [123] soulignent que les différences observées entre le tréhalose et le sucrose peuvent provenir de l'énergie des LHs. Celle-ci dépend de l'encombrement stérique, mais également de la mobilité moléculaire de la protéine et du sucre. Or, les sucres les moins mobiles seraient susceptibles de former des LHs plus stables. C'est pourquoi il existe une corrélation entre la préservation des protéines et la valeur de la T_g .

Confinement de l'eau d'hydratation

Belton et Gil [124] ont étudié des mélanges tréhalose/lysozyme à différents rapports en poids (1/1, 1/3, 1/10) par spectroscopie infrarouge et raman. Ils ont déterminé les changements de conformation des sucres et du lysozyme, respectivement à partir de l'analyse des régions $800-1000\text{ cm}^{-1}$ et $1500-1700\text{ cm}^{-1}$. Ils ont observé (i) un rétrécissement de la bande amide I de la protéine en présence de tréhalose par rapport au lysozyme séché seul, mettant ainsi en évidence une certaine structuration induite par le tréhalose, et (ii) des différences entre les bandes de la région $800-1000\text{ cm}^{-1}$ du tréhalose séché seul et dans les mélanges tréhalose/lysozyme, indiquant un changement de conformation du sucre. Ceci va à l'encontre de la proposition de Carpenter et Crowe, c'est-à-dire que le réseau de LHs protéine-eau et protéine-tréhalose dans les mélanges lysozyme/tréhalose est comparable à celui du lysozyme en solution dans l'eau pure. Les spectres obtenus par Belton et Gil suggèrent que le changement de conformation des sucres n'est pas principalement induit

par la présence de la protéine, mais par celle de l'eau. Les mélanges tréhalose/eau ne seraient en réalité pas complètement secs, et selon Timasheff *et al.*, les sucres sont exclus de la surface de la protéine, en solution. Belton et Gil émettent l'hypothèse que ceci reste vrai à l'état « sec » et que l'effet du tréhalose serait de concentrer l'eau résiduelle à proximité de la protéine, de sorte que son spectre ressemble davantage à celui de la protéine hydratée qu'à celui de la protéine déshydratée. Au fur et à mesure du séchage des mélanges, l'eau se concentrerait à l'interface protéine/sucre et deviendrait confinée par la vitrification du tréhalose. A un degré de déshydratation suffisamment élevé, il se formerait quelques contacts entre les sucres et la protéine, qui affecteraient la conformation - et donc le spectre - des sucres. Les différences observées entre les résultats de Belton et Gil et ceux d'autres auteurs proviendraient des historiques différents des échantillons analysés, conduisant à différents degrés d'hydratation de la protéine.

Bien que controversée, l'hypothèse de Belton et Gil semble être confortée par des calculs de simulation numérique de dynamique moléculaire réalisés par Lins *et al* [125] pour un mélange ternaire lysozyme/tréhalose/eau à environ 18 % en poids (0,5 M), et à température ambiante. Ils observent que durant toute la durée de leurs simulations (2,5 ns), les molécules de tréhalose n'expulsent pas les molécules d'eau à la surface du lysozyme et que le tréhalose induit une réduction des fluctuations atomiques des chaînes latérales, mais pas du squelette. A partir des résultats de leur simulations, Lins *et al.* ont proposé qu'à l'échelle de la nanoseconde, les molécules de tréhalose s'agrègent entre elles à la surface de la protéine, confinant ainsi une fine couche d'hydratation (cf figure 1.24).



FIG. 1.24 – *Modèle de l'interaction du tréhalose (à ~ 18 % en poids) avec le lysozyme (représenté de manière schématique en orange) proposé par Lins et al. [125] à partir de résultats de simulation numérique de dynamique moléculaire. Le tréhalose initialement réparti de manière homogène s'agrège à proximité de la surface de la protéine, et piège son eau d'hydratation (d'après réf. [125]).*

Ces molécules de tréhalose seraient en compétition avec la protéine pour former des LHs avec les molécules d'eau piégées, possédant des propriétés de solvation électrostatiques réduites. Ces propriétés pourraient expliquer les vitesses réduites d'échange des protons amide dans la région où la rubredoxine *desulfovibrio gigas* interagit avec le 1,1-diglycerol phosphate à 0,1 M, obtenues expérimentalement [126]. Ces résultats sont confortés par les simulations de Cottone *et al.* de la myoglobine-carboxy (MbCO) placée dans des matrices trehalose/eau [127] et sucre/eau [128] à 89 % en poids. Ils ont mis en évi-

dence un excès de molécules d'eau à la surface de la protéine par rapport à la composition volumique et également un nombre relativement faible de molécules de sucres se liant à la protéine, le plus souvent par une seule LH. Ceci signifierait que même à une concentration aussi élevée en sucre, la protéine reste préférentiellement hydratée et que les sucres sont préférentiellement exclus de sa surface. L'hypothèse de Belton et Gil étend donc le modèle de l'hydratation préférentielle de Timasheff *et al.* aux matrices de cosolvant dans lesquelles il ne reste plus que de l'eau résiduelle.

Tréhalose dihydrate

Certains travaux [129–132] ont montré que les différentes formes polymorphiques cristallines des sucres jouent un rôle dans la bioprotection, et en particulier, celles du tréhalose : phase dihydrate [82], phases anhydres α [133] et β [134]. En déshydratant sous des conditions thermodynamiques particulières la phase cristalline T_{2H_2O} , il est possible de former de manière réversible la phase cristalline T_α . L'efficacité de biopréservation du tréhalose pourrait venir de la formation de la phase cristalline T_α , et de la transformation réversible de cristal dihydrate T_{2H_2O} , lors d'une réhumidification de l'environnement [130].

Cesàro *et al.* ont analysé la position relative des molécules d'eau du cristal dihydrate et ont proposé que l'évacuation de l'eau s'effectue par un processus de sauts le long de canaux menant à la surface du cristal [130]. La structure serait maintenue lors de la déshydratation par les nombreuses liaisons H intermoléculaires entre molécules de sucre. En outre, Ahlqvist *et al.* ont exposés la phase T_{2H_2O} à de la vapeur de D_2O et ont caractérisé l'échange des hydrogènes de l'eau et des groupes OH du tréhalose par spectroscopie Raman [135]. Ils ont souligné que l'eau ne peut diffuser librement dans toutes les directions dans la phase T_{2H_2O} , et que les deux molécules d'eau $Ow1$ et $Ow2$ (voire figure 1.25) sont isolées l'une de l'autre et forment des LHs avec la molécule de tréhalose. $Ow2$ peut diffuser selon l'axe c avec moins de gêne stérique de la part des molécules de tréhalose que $Ow1$, qui est davantage « prisonnière » des sucres.

Aldous *et al.* ont suggéré que la phase cristalline dihydrate T_{2H_2O} peut piéger les molécules d'eau. En effet, la phase T_{2H_2O} peut se former de manière réversible à partir de l'exposition de la phase amorphe exposée à de la vapeur d'eau, ce qui fait croître la T_g de la matrice de sucre [129]. Au contraire, une petite quantité d'eau est susceptible de plastifier une matrice de sucrose, qui ne forme pas de phase cristalline hydrate. Selon cette suggestion, l'efficacité de biopréservation du maltose serait intermédiaire, car il peut exister dans une phase cristalline monohydrate. La particularité du tréhalose de former de manière réversible un cristal dihydrate pourrait alors expliquer en partie ses propriétés bioprotectrices singulières. Mais, la formation d'une phase cristalline hydrate ne coïncide pas nécessairement avec l'efficacité de biopréservation. En effet, le raffinose forme un cristal pentahydrate [135], et est pourtant un moins bon bioprotecteur que le tréhalose.

De surcroît, la formation des phases cristallines ne doit pas être trop rapide afin de limiter les effets délétères résultant d'un changement de volume et/ou de pression interne. Une estimation du temps de transformation peut être établie à partir de la courbe de viscosité du tréhalose plastifié. Miller *et al.* ont montré que la cristallisation du tréhalose dans les solutions tréhalose/NaCl/eau est plus aisée que celle du tréhalose dans les solutions tréhalose/eau [136]. La présence de solutés ioniques de faible poids moléculaires et des macromolécules dans les cellules biologiques favoriserait donc la nucléation du tréhalose.

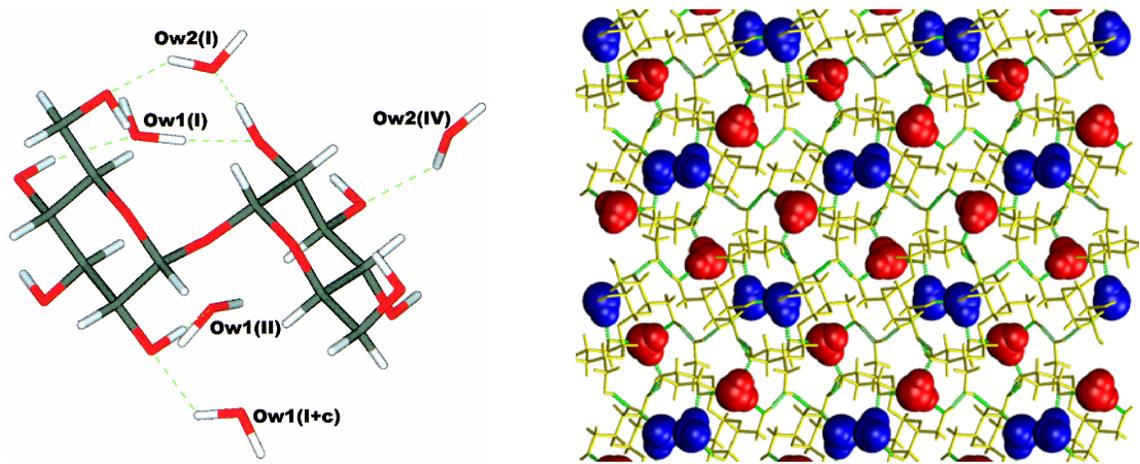


FIG. 1.25 – Représentation schématique du cristal tréhalose dihydrate T_2H_2O . A gauche : la molécule de tréhalose est représentée avec les molécules d'eau Ow1 et Ow2 de son voisinage (en incluant les molécules d'eau obtenue par les différentes symétries du cristal, qui seront détaillées ultérieurement). A droite : les molécules d'eau Ow1 (bleu) et Ow2 (rouge) apparaissent en représentation de van der Waals. Les molécules de tréhalose sont représentées de manière filaire, pour des raisons de clarté. Les molécules d'eau Ow2 peuvent diffuser selon l'axe c (normal au plan de la page) au sein de la structure formée par les molécules de tréhalose. Au contraire, les molécules de tréhalose forment une cage autour des molécules d'eau Ow1. Les LHs tréhalose-eau sont indiquées en tirets verts dans les deux figures.

Les différentes hypothèses proposées afin d'expliquer l'efficacité supérieure du tréhalose à préserver les molécules biologiques ne sont pas pleinement satisfaisantes, car elles ne permettent pas de décrire dans leur intégralité les mécanismes moléculaires en jeu dans le phénomène de l'anhydrobiose ou de la lyophilisation. En particulier, elles ne s'appliquent chacune que dans des domaines de température T et de degré d'hydratation h donnés : le modèle de l'hydratation préférentielle des molécules biologiques et l'effet destructurant ne s'appliquent que dans le cas où il reste de l'eau volumique (déshydratation modérée), alors que les hypothèses de substitution de l'eau, de la vitrification, de la couche d'hydratation et de la formation du cristal dihydrate supposent que la proportion d'eau dans le système est faible. L'hypothèse de l'effet destructurant des sucres ne considère que les températures où l'eau est susceptible de geler. C'est la raison pour laquelle le phénomène de bioprotection pourrait être décomposé en différentes étapes successives (en fonction du degré d'hydratation et de la température), auxquelles correspondraient une ou plusieurs des hypothèses proposées. Afin de déterminer les domaines $[T, h]$ de validité des hypothèses, il convient de connaître précisément l'effet du tréhalose par rapport aux autres sucres sur l'eau et sur les molécules biologiques.

Annexe

Annexe : Problématique de la vitrification

Lorsqu'un liquide est refroidi, il cristallise généralement au voisinage de la température de fusion T_m . Sous certaines conditions, il peut être refroidi en-dessous de T_m sans cristalliser, on parle alors de liquide *sous-refroidi*. Les phénomènes intervenant dans le liquide sous-refroidi résultent de la compétition entre la cristallisation et la vitrification du liquide, qui peuvent être décrites par deux temps caractéristiques τ_1 et τ_2 . Le temps τ_1 correspond au temps nécessaire pour qu'une fraction volumique donnée de l'échantillon cristallise et τ_2 représente le temps caractéristique de relaxation structurale. τ_2 croît rapidement lorsque la température diminue, alors que τ_1 possède une dépendance non-monotone en température, car il existe une compétition entre la force d'entraînement thermodynamique de nucléation et la cinétique de croissance du cristal (cf figure 1.26).

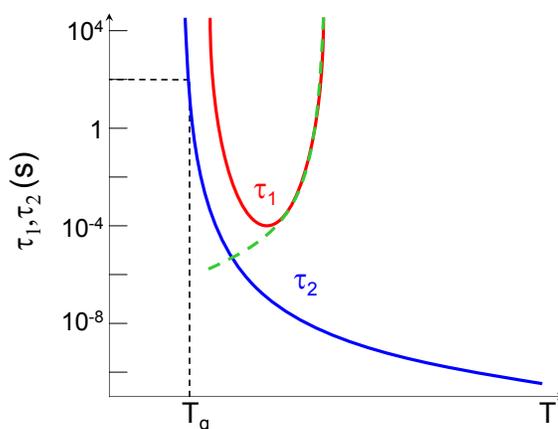


FIG. 1.26 – Représentation schématisée des temps caractéristiques pour la cristallisation d'une fraction volumique de l'échantillon τ_1 et de relaxation structurale τ_2 d'un liquide sous-refroidi. L'éventuel croisement des courbes de τ_1 avec τ_2 représenté en tirets n'a pas lieu car la cristallisation est contrôlée par la viscosité dans le liquide très sous-refroidi. T_g correspond à la température pour laquelle $\tau_2 \approx 10^2$ s (d'après réf. [137]).

La vitrification de la plupart des liquides est possible s'ils sont refroidis suffisamment rapidement pour éviter la cristallisation. Ainsi, l'eau peut former un verre si elle est refroidie à des vitesses supérieures à $10^7 K.s^{-1}$ [137]. Dans le cas échéant, le temps de relaxation structurale devient comparable à la durée de l'expérience (*e.g.* 100 s), et l'on parle de *verre* [137–139]. La transition du liquide sous-refroidi au verre est appelée *transition vitreuse* et la température à laquelle elle se produit température de transition vitreuse T_g . Elle est définie arbitrairement comme la température à laquelle le temps caractéristique de relaxation structurale est de l'ordre de 100 secondes ou à laquelle la viscosité de cisaillement atteint 10^{13} Poise. La température T_g de quelques composés stabilisateurs de nature et de taille différentes sont indiquées dans le tableau 1.3. La transition vitreuse se manifeste notamment par une diminution de la pente de la dépendance en température du volume spécifique et de l'enthalpie du liquide, qui devient comparable à celle du cristal (cf figure 1.27).

En outre, la transition vitreuse est observée expérimentalement par un saut de la capacité calorifique à pression constante $c_p = (\partial h / \partial T)_p$, qui suggère que certains degrés

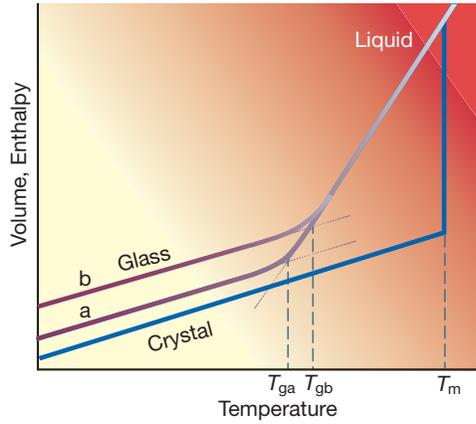


FIG. 1.27 – Dépendance en température du volume ou de l'enthalpie d'un liquide à pression constante. En-dessous de sa température de fusion T_m , un liquide est susceptible de cristalliser. Cependant, s'il est refroidi à une vitesse de refroidissement ($\dot{q}_a = |\frac{dT}{dt}|$) suffisamment élevée, alors un verre est obtenu à la température de transition vitreuse $T_{ga} < T_m$, fonction de \dot{q}_a . Pour une vitesse de refroidissement \dot{q}_b supérieure à \dot{q}_a , le verre est obtenu à la température $T_{gb} > T_{ga}$ (d'après réf. [139]).

de liberté présents dans le liquide deviennent gelés à T_g . La transition vitreuse n'est pas une transition de phase du premier ordre, étant donné que les propriétés physiques du matériau varient de manière continue à la transition. D'autre part, T_g dépend de la vitesse de refroidissement, car elle est d'origine cinétique. Il en résulte qu'il n'existe pas un état vitreux unique (cf figure 1.27).

De nombreuses théories ont été développées afin de décrire la transition vitreuse et les liquides sous-refroidis (*e.g.* théorie du volume libre [140], théorie des modes couplés (MCT pour Mode Coupling Theory) [116], modèle de Adam et Gibbs de l'entropie configurationnelle [141]). Celles-ci se classent en deux catégories principales : la première considère que la transition vitreuse résulte de fluctuations de densité, sans singularité thermodynamique, alors que la seconde suppose que certaines fluctuations thermodynamiques disparaissent lorsque $T \rightarrow T_g$.

L'approche du *paysage énergétique* offre un cadre intéressant pour relier la dynamique et la thermodynamique d'un système. En effet, l'hypersurface d'énergie potentielle d'un système est très complexe (de dimension $3N$, où N est le nombre de coordonnées de configuration). Cependant, elle peut être décrite de manière statistique par la distribution des minima d'énergie potentielle (appelés *structures inhérentes*) et des *points de selle*. Cette description peut être aussi bien appliquée à l'étude des liquides sous-refroidis qu'à celle du repliement des protéines. La théorie des modes couplés (MCT) et l'approche du paysage énergétique ont fait l'objet de nombreuses études par simulation numérique.

Liquides forts/fragiles

Lorsque la température est proche de T_g , la viscosité η est très sensible à la température. A partir de la dépendance en température de η , les liquides sous-refroidis peuvent être classés comme *forts* ou *fragiles*. Les processus de relaxation des liquides forts ont une dépendance en température de type Arrhénienne *i.e.* $\eta = A.exp(E/(k_B T))$. La structure des liquides forts est typiquement un réseau tétraédrique de liaisons covalentes (*e.g.*

SiO_2 , GeO_2). Le ralentissement dynamique à l'approche de T_g des liquides dits fragiles (*e.g.* orthoterphényle) est beaucoup plus marqué. La figure 1.28 montre la dépendance en température de la viscosité de quelques systèmes vitrifiables forts et fragiles représentatifs. Celle-ci est relativement bien décrite sur 2-4 ordres de grandeur par l'équation empirique de Vogel-Tammann-Fulcher (VTF)⁴ : $\eta = A.exp(B/(T - T_0))$, où A et B sont des constantes indépendantes de la température.

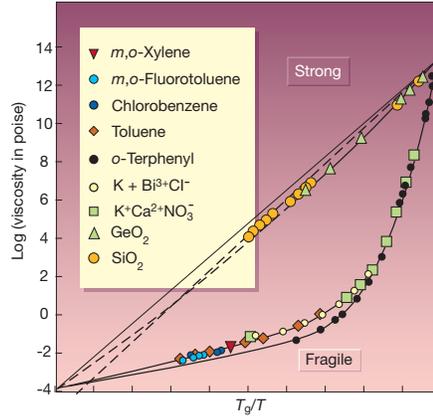


FIG. 1.28 – Dépendance en température de la viscosité de différents liquides formateurs de verre en représentation Arrhénienne réduite ($\log(\eta) = f(T_g/T)$). Selon la classification d'Angell, la viscosité des liquides forts a une dépendance en température quasi-Arrhénienne, *i.e.* une énergie d'activation indépendante de la température. Au contraire, la viscosité des liquides fragiles adopte un comportement super-Arrhénien, *i.e.* l'énergie d'activation croît lorsque la température diminue (d'après réf. [139]).

Les liquides *forts* ont une faible densité de minima d'énergie potentielle en raison des contraintes configurationnelles imposées par leur structure (*e.g.* liaisons covalentes dans SiO_2). Au contraire, les liquides *fragiles* devraient avoir une densité de minima beaucoup plus élevée, étant donné qu'ils ne disposent d'une structure rigide sous-jacente. Les liquides formant des LHs tels que les alcools seraient thermodynamiquement fragiles, mais cinétiquement forts, c'est-à-dire que leurs paysages énergétiques seraient composés de bassins contenant de grandes densités de minima et séparés par des barrières d'énergie élevées. Cette *force* cinétique proviendrait de l'énergie nécessaire à la rupture des LHs afin d'échantillonner les différentes configurations [137].

La sensibilité de la viscosité d'un liquide au voisinage de T_g est caractérisée par un indice de fragilité m qui s'écrit selon la classification d'Angell :

$$m = \left. \frac{d \log(\eta)}{d(T_g/T)} \right|_{T=T_g^+} \quad (1.8)$$

L'indice de fragilité m est proportionnel au rapport de la densité des minima $\sim \Delta C_p(T_g)$ et de la distribution des barrières de potentiel $\Delta\mu$ du paysage énergétique. Pour un liquide fort tel que SiO_2 $m = 20$, alors que pour un liquide fragile tel que l'orthoterphényle $m = 81$. Le tableau 1.3 p. 32 donne les valeurs de m pour quelques bioprotecteurs.

4. L'équation de Williams-Landel-Ferry (WLF) est également mathématiquement équivalente.

Découplage des dynamiques

Nous avons jusqu'à présent principalement décrit les systèmes vitrifiables par la viscosité, qui est une grandeur macroscopique. Nous allons désormais considérer la dépendance temporelle de fonctions de corrélations microscopiques, qui peuvent être obtenues par diverses expériences (diffusion Raman, diffusion neutronique, etc.) et simulations (dynamique moléculaire). Deux de ces fonctions, $\phi(t)$ et $\chi''(\omega)$ sont représentées de manière schématique dans la figure 1.29.

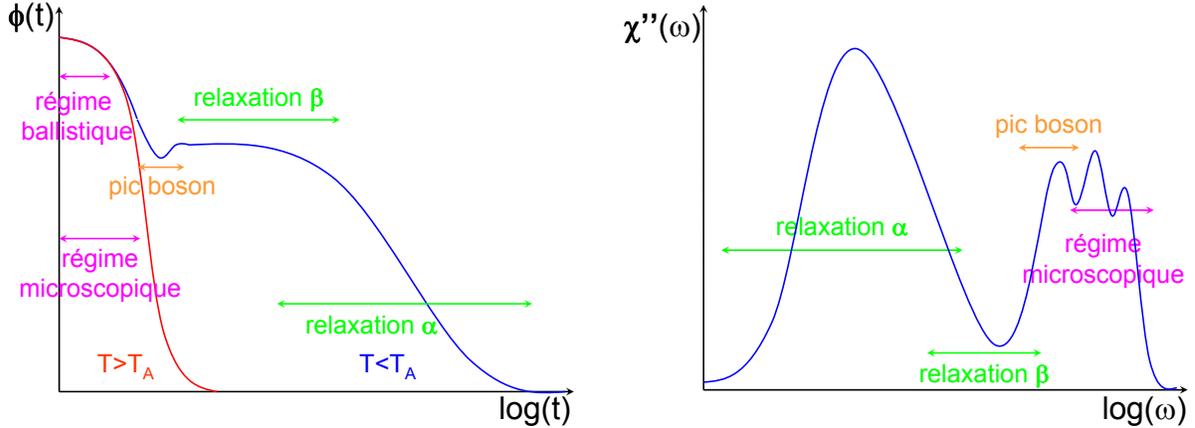


FIG. 1.29 – *A gauche : Représentation schématique de l'évolution temporelle d'une fonction de corrélation $\phi(t)$. Les deux courbes correspondent à deux températures : l'une à laquelle le liquide se comporte comme un liquide simple (rouge) et l'autre à laquelle il relaxe lentement (bleue). A droite : Représentation schématique de la susceptibilité dynamique $\chi''(\omega)$ d'un système qui relaxe lentement.*

Aux températures élevées, une fonction de relaxation microscopique du liquide $\phi(t)$ (e.g. la fonction de diffusion intermédiaire $F(q,t)$) a un comportement relativement simple. Aux temps courts, sa dépendance est en t^2 . Il s'agit du régime balistique. Pour les temps plus longs, la dépendance temporelle de $\phi(t)$ dépend des interactions entre particules. Il s'agit du régime microscopique. Enfin, pour les temps encore plus longs, la relaxation est simplement exponentielle (dite relaxation de Debye). Aux températures plus basses, le comportement de $\phi(t)$ se complexifie. Pour les temps intermédiaires, un plateau apparaît. La fenêtre temporelle durant laquelle le corrélateur est proche du plateau est appelée relaxation β . $\phi(t)$ ne décroît ensuite vers 0 que pour des temps bien plus longs. La fenêtre temporelle durant laquelle $\phi(t)$ décroît en-dessous du plateau est appelée relaxation α . L'interprétation physique du plateau correspond à l'*effet de cage* : une particule donnée se trouve piégée aux temps intermédiaires par les particules voisines, qui forment une cage transitoire. C'est pourquoi $\phi(t)$ est quasi-constante. Pour les temps plus longs, la particule peut quitter cette cage et $\phi(t)$ recommence à décroître vers 0. Lors du refroidissement, le plateau apparaît à une température notée T_A . En-dessous de cette température, le système ne possède pas suffisamment d'énergie cinétique pour échantillonner la totalité de son paysage énergétique. La dynamique du système devient influencée par la rugosité du paysage énergétique.

La théorie MCT fournit une bonne description du comportement de $\phi(t)$ et prédit l'arrêt de la relaxation structurale à une température $T_c > T_g$. Afin de restaurer l'ergodicité du système dans l'intervalle $[T_g, T_c]$, des processus de sauts thermiquement activés

ont été introduit dans la théorie. La MCT décrit précisément la dynamique de relaxation des liquides au-dessus de T_c , notamment l'effet de cage (observé dans les fonctions intermédiaires de diffusion) et de découplage des dynamiques (relaxations α et β). Le plateau de la relaxation β correspond au temps nécessaire à une particule pour rompre la cage formée par ses voisines.

Contrairement au cas des hautes températures, la décroissance post-plateau de $\phi(t)$ n'est pas simplement exponentielle. Le caractère non-exponentiel de $\phi(t)$ peut s'expliquer schématiquement de deux manières différentes : soit le liquide est considéré comme un ensemble d'environnements locaux hétérogènes, qui relaxent chacun de manière exponentielle, soit le liquide est homogène, mais constitué de particules (ou molécules) qui relaxent chacune de manière non-exponentielle [138, 139]. La relaxation d'un système est liée à sa dynamique, qui correspond à l'exploration des différents minima de sa surface d'énergie potentielle ou *paysage énergétique*. Si l'on considère deux minima du paysage énergétique séparés par une barrière d'énergie H , alors la fonction de relaxation $f(t)$ d'une grandeur du système dépend de manière exponentielle de H : $f(t) \sim \exp(-t/\tau(H))$. Etant donné que le paysage énergétique des systèmes réels est très complexe, il existe une distribution très large des barrières d'énergie dont chacune conduit à un processus de relaxation différent. La fonction de relaxation est donc donnée par : $f(t) \sim \int_0^\infty g(H)\exp(-t/\tau(H))dH$, où $g(H)$ désigne la distribution des barrières d'énergie [41]. La forme exacte de $f(t)$ dépend de la distribution $g(H)$, mais il est possible de représenter le comportement relaxational de beaucoup de systèmes complexes par une exponentielle étirée ou fonction de Kolrausch-William-Watts (KWW)⁵ : $\phi(t) = \exp(-(t/\tau)^\beta)$. Par conséquent, la complexité des systèmes est représentée par seulement deux paramètres : un temps caractéristique τ et un facteur d'étirement β compris entre 0 et 1. Lorsque $\beta = 1$, la réponse est exponentielle et plus β est petit, moins la réponse est exponentielle. Bien qu'elle parvienne à reproduire les caractéristiques dynamiques des processus de relaxation, la fonction KWW est empirique. Aucune réelle relation théorique entre β et la distribution des barrières d'énergie n'existe jusqu'à présent. La figure 1.30 illustre le comportement en exponentielle étirée des fonctions de diffusion intermédiaires normalisées $I(Q,t)/I(Q,0)$ d'une solution aqueuse tréhalose/ D_2O à 50 % en poids à différentes températures pour $Q = 1,7 \text{ \AA}$. La faible valeur du facteur d'étirement $\beta = 0,38 \pm 0,02$ témoigne de l'hétérogénéité des temps de relaxation du tréhalose.

5. D'autres fonctions telles que celles de Cole-Cole et Cole-Davidson sont également des fonctions non-exponentielles souvent utilisées.

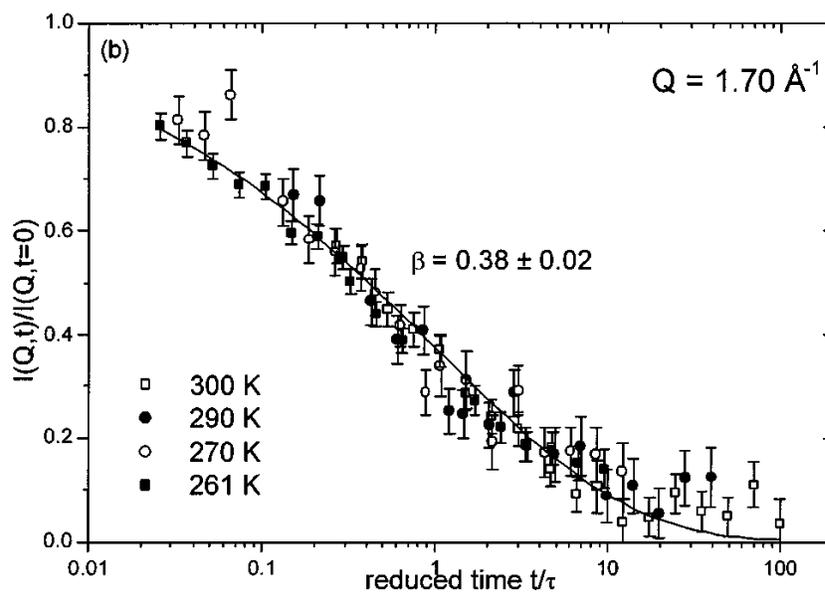


FIG. 1.30 – Fonctions de diffusion intermédiaires normalisées $I(Q,t)/I(Q,0)$ d'une solution aqueuse tréhalose/ D_2O à 50 % en poids à différentes températures pour $Q = 1,7 \text{ \AA}$. En utilisant une échelle de temps réduite t/τ , les données expérimentales peuvent être décrites sous la forme d'une courbe maîtresse ajustée par une seule fonction exponentielle étirée avec $\beta = 0,38 \pm 0,02$ (d'après réf. [142]).

Chapitre 2

Méthodes et systèmes étudiés

2.1 Dynamique moléculaire

Cette partie décrit succinctement les principes des simulations de dynamique moléculaire classique (DM)¹. Une description beaucoup plus complète de la technique est donnée dans des livres tels que ceux d'Allen et Tildesley [143], de Leach [144] ou de Rapaport [145].

Différents éléments sont nécessaires pour mener des simulations de dynamique moléculaire. Il faut dans un premier temps se doter d'un potentiel d'interaction interatomique. Ensuite, il convient d'intégrer numériquement la relation fondamentale de la dynamique.

La description la plus précise des interactions entre atomes est fournie par la théorie de la *Mécanique Quantique*. Néanmoins, la simulation des systèmes complexes de grande taille (plusieurs milliers d'atomes) nécessite des approximations plus importantes, afin d'atteindre des temps de calculs raisonnables. L'une des approximations effectuée est celle dite de *Born-Oppenheimer*, qui considère que les mouvements des électrons sont beaucoup plus rapides que ceux des noyaux atomiques, de telle sorte que leurs mouvements respectifs peuvent être découplés. Dès lors, les interactions interatomiques peuvent être représentées par des fonctions empiriques des positions des noyaux atomiques. Le *champ de forces* décrit de manière analytique les forces agissant sur les atomes. De nombreux champs de forces, commerciaux ou non, sont disponibles (CHARMM [146], AMBER [147], GROMOS [148], etc.).

2.1.1 Champs de forces

Le rôle du *champ de forces* est de reproduire le mieux possible les interactions intra- et intermoléculaires réelles du système. En principe, le potentiel d'interaction $V(\mathbf{r}^N)$ d'un système à N particules s'écrit comme une somme de N potentiels à i corps ($i = 1, \dots, N$):

$$V(\mathbf{r}^N) = \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) + \dots \quad (2.1)$$

où $\{r_i\}$ correspondent aux coordonnées cartésiennes des particules. $v_1(\mathbf{r}_i)$, $v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$, \dots représentent le potentiel intramoléculaire (à 1 corps), le potentiel d'interaction de paires (à 2 corps), etc. Afin de parvenir à des temps de calculs raisonnables, la plupart des champs de forces considèrent l'*approximation de paires*, où le développement de la fonctionnelle se

1. Par la suite, nous désignerons la dynamique moléculaire classique par dynamique moléculaire.

limite aux interactions de paires, les termes d'ordre supérieur étant partiellement inclus dans un potentiel de paires effectif $v_2^{effectif}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$:

$$V(\mathbf{r}^N) \approx \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2^{effectif}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) = V_{lies} + V_{non-lies} \quad (2.2)$$

Les termes du potentiel V_{lies} comportent les liaisons covalentes, les effets des hybridations et des orbitales π , inclus dans des termes angulaires et diédraux. Les termes du potentiel $V_{non-lies}$ sont composés des interactions de van der Waals et électrostatiques. Ces différents termes sont représentés de manière schématique dans la figure 2.1.

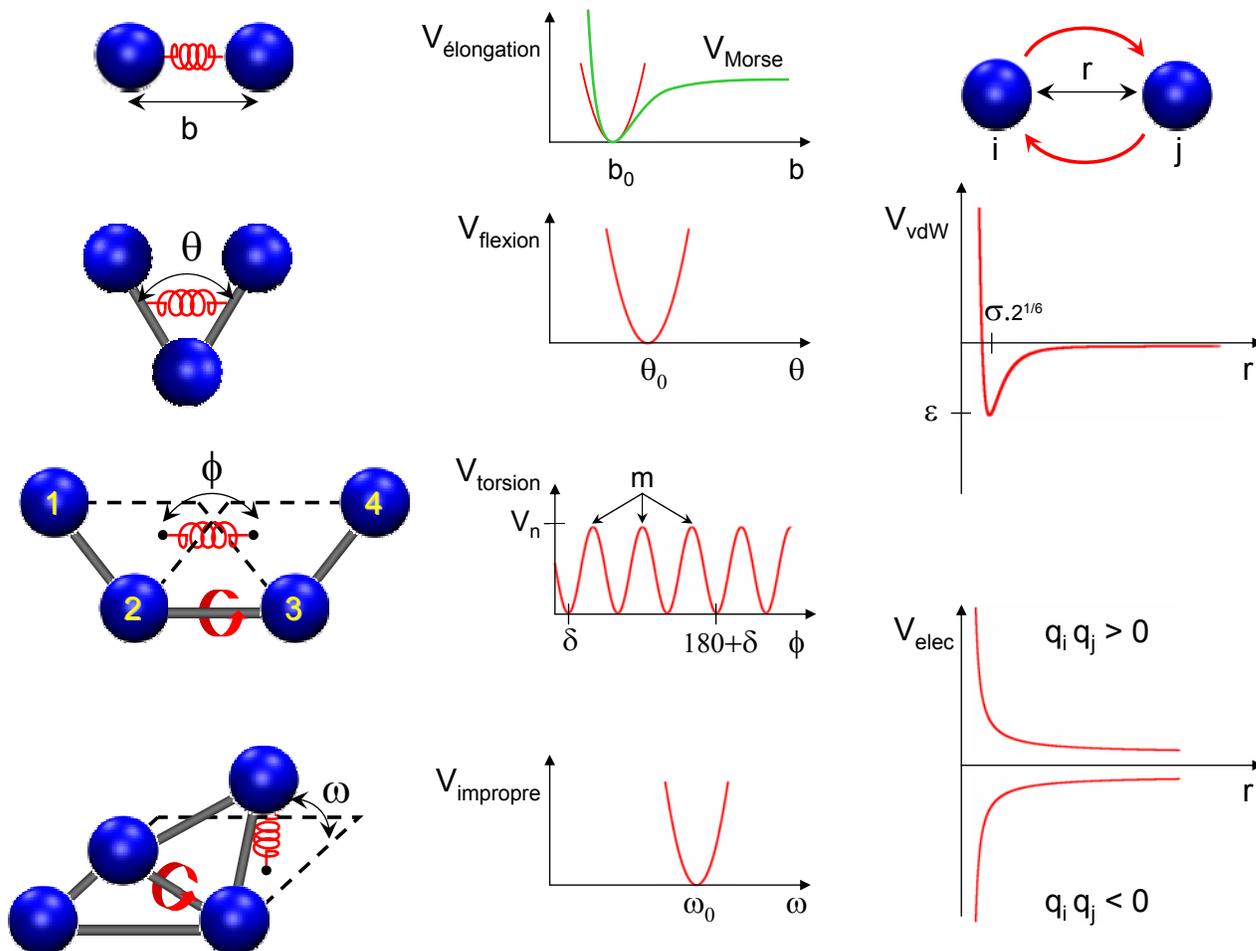


FIG. 2.1 – Représentation schématique des différentes composantes liées (à gauche) et non-liées (à droite) d'un champ de forces classique. Ces composantes sont détaillées dans le texte ci-après.

Termes liés

Le potentiel d'élongation $V_{elongation}$ des liaisons covalentes est généralement représenté par un simple potentiel harmonique, proche des potentiels plus complexes (Morse, Buckingham, etc.) au voisinage du minimum :

$$V_{elongation} = k_{elongation} \cdot (b - b_0)^2 \quad (2.3)$$

où b est la distance entre les deux atomes, b_0 la distance d'équilibre, et $k_{elongation}$ la constante de raideur (ou de rappel) du potentiel harmonique. En plus de l'interaction covalente directe entre deux atomes, divers termes tiennent compte des interactions avec les autres atomes plus proches voisins. Ainsi, le terme de flexion décrit la force résultant de la déformation des angles de valence entre trois atomes liés par liaisons covalentes :

$$V_{flexion} = k_{flexion} \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.4)$$

où θ est l'angle de valence entre les 3 atomes, θ_0 l'angle de référence, et $k_{flexion}$ la constante de force. Les constantes de force de flexion sont nettement plus faibles que celles d'élongation, car moins d'énergie est nécessaire pour déformer les angles de valence que pour modifier la longueur des liaisons covalentes.

Les termes de torsion (ou diédraux propres) sont plus faibles que ceux d'élongation et de flexion. Ils décrivent les barrières de rotation existant entre 4 atomes liés et sont décrits par une fonction cosinus :

$$V_{torsion} = k_{torsion} \cdot [1 + \cos(m\phi - \delta)], \quad m = 1,2,3,4,5,6 \quad (2.5)$$

où ϕ est l'angle entre les plans formés par les atomes 1-2-3 et 2-3-4 (voir figure 2.1). Trois paramètres caractérisent ce potentiel : δ , l'angle de phase, $k_{torsion}$, la constante d'interaction, et m , la multiplicité du potentiel de torsion. D'autres termes diédraux dits *impropres* sont parfois utilisés afin de maintenir la chiralité ou la planarité autour de certains atomes (*e.g.* planarité des carbones hybridés sp^2). Ces termes diédraux impropres sont représentés par un potentiel harmonique :

$$V_{impropre} = k_{impropre} \cdot (\omega - \omega_0)^2 \quad (2.6)$$

où ω est l'angle entre le plan formé par l'atome central et deux atomes périphériques et le plan formé par les atomes périphériques (cf fig. 2.1).

Bien que les barrières d'énergie de torsion soient significativement plus faibles que les termes d'élongation et de flexion, la description des angles dièdres est primordiale car la structure tridimensionnelle et la dynamique lente à grande échelle des protéines dépend fortement de la balance entre les termes d'énergie de torsion et les interactions non-liées.

Termes non-liés

Les interactions de van der Waals et électrostatiques agissent entre des atomes qui ne sont pas liés entre eux de manière covalente. Les interactions de van der Waals (ou de London) agissent entre atomes très proches. Elles sont fortement répulsives à courte portée et faiblement attractives à moyenne portée. Le terme attractif provient des dipôles instantanés, induisant eux-mêmes des dipôles opposés dans les atomes voisins. Le champ électrique \mathbf{E} d'un dipôle varie en r^{-3} , et crée un moment dipolaire $\mu = \alpha \mathbf{E}$, où α est la polarisabilité. La contribution au potentiel d'interaction du dipôle induit varie donc comme $\mu E \sim r^{-6}$. Une telle justification physique n'existe pas pour le terme répulsif, dont l'origine résulte du principe d'exclusion de Pauli. Un traitement quantique suggère une forme en r^{-1} aux très petites distances et en $\exp(-2r/a_0)$ pour les plus grandes

distances, a_0 étant le rayon de Bohr. En fait, il est plus pratique de calculer le terme de répulsion en r^{-12} , à partir du terme en r^{-6} . C'est la raison pour laquelle les interactions de van der Waals sont généralement représentées par un potentiel de Lennard-Jones [149] :

$$V_{vdW} = 4\epsilon \cdot \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.7)$$

où r est la distance entre les deux atomes. Les deux paramètres sont ϵ , la profondeur du puits de potentiel, et σ , le paramètre de collision ($\sigma \cdot \sqrt[6]{2}$ correspond à la position du minimum du potentiel).

Les interactions électrostatiques entre deux atomes i et j sont décrites par la loi de Coulomb :

$$V_{elec} = \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.8)$$

où q_i et q_j sont les charges des atomes i et j , et ϵ_0 est la constante diélectrique du vide.

Ainsi, la fonction d'énergie potentielle d'un champ de forces ne contenant pas de termes d'interaction intramoléculaire croisés s'écrit :

$$V_{total} = \sum_{elongation} k_b \cdot (b - b_0)^2 + \sum_{flexion} k_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{diedres\ propres} k_\phi \cdot [1 + \cos(m\phi - \delta)] + \sum_{diedres\ impropres} k_\omega \cdot (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \cdot \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j} \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.9)$$

2.1.2 Conditions aux limites périodiques

Bien que les ressources de calculs augmentent sans cesse, la taille des systèmes simulés par dynamique moléculaire reste limitée (jusqu'à quelques 10^6 particules) par le calcul des interactions intermoléculaires de paires, dont le nombre pour un système de N atomes varie comme N^2 . Le nombre d'atomes simulés est donc très faible par rapport au nombre d'atomes des expériences réelles (de l'ordre de 10^{23}). Afin de remédier aux effets de surface qui seraient bien trop élevés par rapport aux effets de surface réels, les simulations numériques emploient généralement les *conditions aux limites périodiques*. Celles-ci consistent à répliquer dans les trois directions de l'espace la boîte de simulation originale à l'infini afin de paver complètement l'espace (cf figure 2.2). Chaque particule i de la boîte interagit avec les autres particules j , mais également avec leurs images qui se situent dans les boîtes répliquées. De cette manière, le problème des effets de surface est corrigé, et il est possible de corrélérer les propriétés du système microscopique étudié avec celles du système réel. Il s'est avéré que la reproduction fiable de grandeurs thermodynamiques à partir d'échantillons de tailles réduites justifie *a posteriori* cette approche. Le caractère pseudo-infini du système ainsi généré nécessite d'effectuer certaines approximations pour traiter les interactions entre particules. En particulier, l'approximation dite de l'« image minimale » suppose que chaque particule i de la cellule centrale interagit avec l'image la plus proche de toutes les autres particules j . Par ailleurs, l'introduction d'une sphère de troncature ou « cut-off » permet de supprimer les interactions au-delà d'une distance arbitraire, généralement définie comme étant inférieure ou égale à la moitié du plus petit côté de la cellule de simulation (cf figure 2.2). Ces approximations sont d'autant plus valables que la portée des interactions est réduite. Ainsi, les interactions de van der Waals ne soulèvent en général aucune difficulté. Par contre, le traitement des interactions électrostatiques est souvent plus problématique.

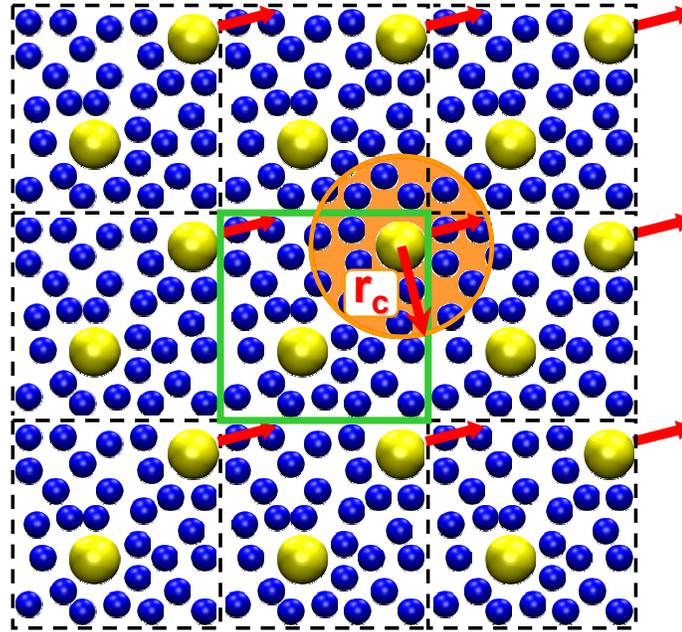


FIG. 2.2 – Représentation schématique bidimensionnelle des conditions aux limites périodiques d'un système cubique. La boîte de simulation centrale (encadrée en vert) est répliquée dans les trois dimensions de l'espace (les boîtes images sont encadrées par des tirets). Si une particule (comme la particule jaune de la figure) sort par une des faces de la boîte centrale, alors son image entre dans celle-ci par la face opposée. De plus, selon l'approximation de « l'image minimale », chaque particule interagit avec l'image la plus proche de toutes les autres particules, situées dans la sphère de troncature de rayon r_c .

2.1.3 Traitement des interactions électrostatiques

L'effet des différentes méthodes de calcul des interactions électrostatiques sur les résultats des simulations fait régulièrement l'objet d'études, notamment pour les simulations de systèmes biologiques (protéines chargées, membranes lipidiques, ARN, ADN, etc.) dans lesquelles figurent des ions [150–156]. Par exemple, il s'avère que les artéfacts liés à la troncature simple des interactions électrostatiques peuvent se manifester par des minima ou maxima prononcés au rayon de coupure r_c dans les fonctions de distributions radiales [156]. Nous allons décrire deux méthodes utilisées pour traiter les interactions électrostatiques : la sommation d'Ewald [157] et la méthode du champ de réaction [158].

Sommation d'Ewald

La sommation d'Ewald [157] permet de calculer précisément les interactions électrostatiques pour les systèmes périodiques ou pseudo-périodiques, mais elle introduit une périodicité artificielle dans les systèmes non-périodiques. Elle consiste à évaluer les interactions entre une particule et les autres particules de la boîte de simulation, ainsi que toutes leurs images dans une matrice infinie de cellules périodiques. Le potentiel électrostatique s'écrit alors :

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i < j}^N \frac{q_i \cdot q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \quad (2.10)$$

où N est le nombre de particules de la boîte de simulation, n est la distance à la boîte centrale, $n = n_x L_x + n_y L_y + n_z L_z$, L_x , L_y , L_z étant les dimensions de la boîte, r_{ij} la distance entre les particules i et j de charges respectives q_i et q_j . Cette somme converge lentement et conditionnellement. Elle peut être décomposée en une somme de deux termes :

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i < j}^N \frac{q_i \cdot q_j S(\alpha|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i < j}^N \frac{q_i \cdot q_j (1 - S(\alpha|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|))}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \quad (2.11)$$

où S est une fonction qui décroît rapidement (*e.g.* $S(x) = \operatorname{erfc}(x) = 2/\sqrt{\pi} \int_x^\infty \exp(-u^2) du$) et α un paramètre d'écrantage choisit de sorte que la première somme converge dans un rayon $r \leq \min(L_x, L_y, L_z)/2$. Ainsi, le premier terme est de courte portée, et converge rapidement, au sein de la boîte de simulation centrale, et est donc sommé dans l'espace direct. Le second contient les contributions à longue portée, convergeant lentement, mais sa transformée de Fourier converge rapidement. C'est la raison pour laquelle il est sommé dans l'espace réciproque. Dans le cas où $S(x) = \operatorname{erfc}(x)$, $V_{Coulomb}$ s'écrit :

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i < j}^N \frac{q_i \cdot q_j \operatorname{erfc}(\alpha|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} + \frac{1}{\pi\epsilon_0} \frac{1}{L^3} \sum_{i < j} \sum_{\mathbf{k} \neq \mathbf{0}} \frac{e^{-k^2/4\alpha^2}}{k^2} \left| \sum_{i=1}^N q_i e^{-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i} \right|^2 - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2 \quad (2.12)$$

Le dernier terme de l'équation (2.12) est constant et correspond au terme d'auto-couplage.

Le défaut majeur de la sommation d'Ewald est son coût de calcul prohibitif $\sim O(N^2)$. Mais, des méthodes moins onéreuses telles que *particle-mesh Ewald* (PME) [159] ou *particle-particle particle mesh* (P3M) [160] ont été développées. Leur coût est diminué

et varie en $\sim O(N \log(N))$, grâce à l'évaluation de la somme dans l'espace réciproque par une transformée de Fourier rapide (FFT). Les charges des particules du système sont interpolées sur une grille tridimensionnelle. La procédure de ce type de méthode est décrite schématiquement dans la figure 2.3.

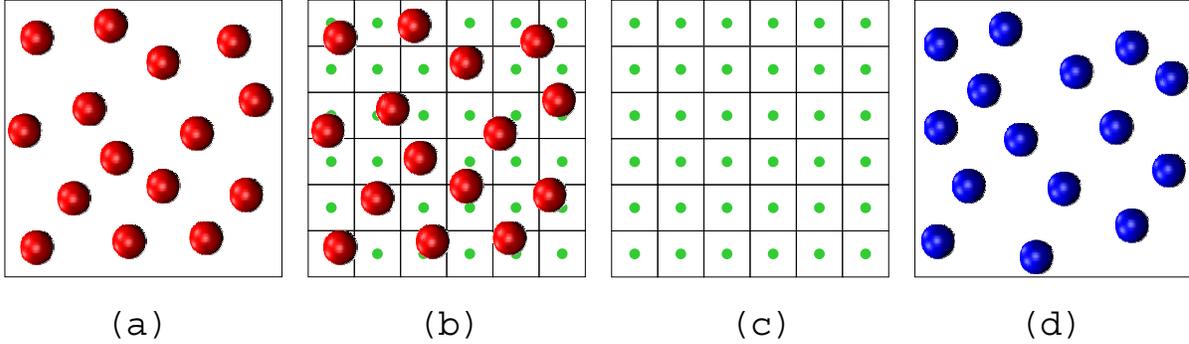


FIG. 2.3 – Représentation schématique bidimensionnelle des méthodes de type « particle-mesh ». On considère un système contenant des particules chargées (a). Une grille pavant la cellule est construite (b). Les charges sont alors interpolées à chaque noeud de la grille. Par transformée de Fourier rapide (FFT), le potentiel et les forces sont ensuite évalués à ces noeuds (c). Enfin, les forces sont interpolées en retour vers les particules, dont la position est ensuite actualisée (d) (d'après réf. [161]).

Méthode du champ de réaction

L'idée physique de cette méthode est que les charges au-delà du rayon de coupure r_c forment un milieu homogène (ou « continuum ») polarisable de constante diélectrique ϵ_{RF} [158]. A l'intérieur de la sphère de rayon r_c , les interactions électrostatiques sont calculées de manière explicite (premier terme de l'équation 2.13). L'ensemble des dipôles μ_i au sein de la sphère induisent une polarisation du milieu diélectrique, qui, en retour, crée un champ de réaction \mathbf{E}_{RF} (« reaction field »). Le potentiel de Coulomb s'écrit [162] :

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i<j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_i \mu_i \cdot \mathbf{E}_{RF} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i<j} q_i q_j \left[\frac{1}{r_{ij}} + \frac{B_0 r_{ij}^2}{2r_c^3} \right] \quad (2.13)$$

où la constante B_0 vaut :

$$B_0 = \frac{2(\epsilon_{RF} - 1)}{(2\epsilon_{RF} + 1)} \quad (2.14)$$

Gargallo *et al.* [155] ont montré que les méthodes champ de réaction et *particle-particle particle-mesh* (P3M) conduisent à des résultats très comparables pour la simulation de protéines très chargées. Parmi ces deux méthodes, la méthode du champ de réaction étant moins coûteuse, elle a un avantage certain sur P3M.

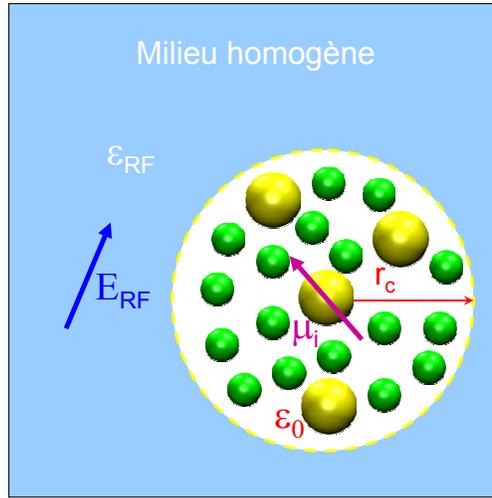


FIG. 2.4 – Représentation schématique de la méthode du champ de réaction. Pour chaque particule du système, les interactions électrostatiques avec les particules voisines situées à l'intérieur de la sphère de rayon r_c sont calculées de manière explicite. Au contraire, les interactions électrostatiques avec les particules plus éloignées sont considérées comme résultant de la polarisation d'un milieu homogène de constante diélectrique ϵ_{RF} par l'ensemble des dipôles μ_i des particules au sein de la sphère, qui en retour crée un champ de réaction \mathbf{E}_{RF} .

2.1.4 Equations du mouvement

En dynamique moléculaire classique, la trajectoire de chaque atome i du système est obtenue à partir de l'intégration des équations du mouvement de Newton qui s'écrivent :

$$\begin{cases} m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) = -\frac{\partial V(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{cases} \quad (2.15)$$

où m_i , \mathbf{r}_i et \mathbf{f}_i sont respectivement la masse, la position et la force agissant sur l'atome i . $V(\mathbf{r}^N)$ est la fonctionnelle d'énergie potentielle ou champ de forces du système.

L'intégration numérique s'effectue à partir des méthodes des différences finies. La modification de la position de l'ensemble des particules i est obtenue à partir d'un développement en série de Taylor de la position au temps $t + \Delta t$, *i.e.* au pas $n + 1$ d'intégration :

$$\mathbf{r}_i(n+1) = \mathbf{r}_i(n) + \Delta t \mathbf{v}_i(n) + \frac{\Delta t^2}{2} \mathbf{a}_i(n) + \dots = \mathbf{r}_i(n) + \Delta t \mathbf{v}_i(n) + \frac{\Delta t^2}{2} \frac{\mathbf{F}_i(n)}{2m_i} + \dots \quad (2.16)$$

où \mathbf{r}_i , \mathbf{v}_i , et \mathbf{a}_i sont respectivement les vecteurs position, vitesse et accélération de la particule i . Divers algorithmes d'intégration (Verlet simple [163], Verlet *leap-frog* *i.e.* « saute-mouton » [164], Verlet *velocity* [165], etc.) existent et diffèrent par la manière dont l'expansion de Taylor est implémentée. L'algorithme d'intégration le plus simple est l'algorithme de Verlet :

$$\begin{cases} \mathbf{r}_i(n+1) = \mathbf{r}_i(n) + \Delta t \mathbf{v}_i(n) + \frac{\Delta t^2}{2} \frac{\mathbf{F}_i(n)}{2m_i} + \dots \\ \mathbf{r}_i(n-1) = \mathbf{r}_i(n) - \Delta t \mathbf{v}_i(n) + \frac{\Delta t^2}{2} \frac{\mathbf{F}_i(n)}{2m_i} - \dots \end{cases} \quad (2.17)$$

L'addition de ces deux développements limités au second ordre conduit à :

$$\mathbf{r}_i(n+1) = 2\mathbf{r}_i(n) - \mathbf{r}_i(n-1) + \Delta t^2 \frac{\mathbf{F}_i(n)}{2m_i} + O(\Delta t^4) \quad (2.18)$$

Cet algorithme présente l'avantage de ne pas nécessiter les vitesses et ne requiert que le calcul d'une force par cycle. Il génère cependant d'assez larges erreurs [161]. L'algorithme de Verlet *leap-frog* [164] est une variante de l'algorithme de Verlet simple conçue afin d'améliorer le calcul des vitesses. Le nom vient du fait que les vitesses sont évaluées d'un demi-pas avant et après celui du calcul des positions :

$$\begin{cases} \mathbf{v}_i(n-1/2) = \frac{\mathbf{r}_i(n) - \mathbf{r}_i(n-1)}{\Delta t} \\ \mathbf{v}_i(n+1/2) = \frac{\mathbf{r}_i(n+1) - \mathbf{r}_i(n)}{\Delta t} \end{cases} \quad (2.19)$$

$$\begin{cases} \mathbf{v}_i(n+1/2) = \mathbf{v}_i(n-1/2) + \Delta t \frac{\mathbf{F}_i(n)}{m_i} \\ \mathbf{r}_i(n+1) = \mathbf{r}_i(n) + \Delta t \mathbf{v}_i(n+1/2) \end{cases} \quad (2.20)$$

Ce schéma d'intégration présente l'avantage du calcul direct des vitesses, ce qui peut être utile pour les simulations à température constante [161], ainsi que d'une plus grande stabilité.

Les simulations de dynamique moléculaire produisent naturellement des trajectoires dans l'ensemble statistique microcanonique (N,V,E), où le nombre de particules N, le volume V et l'énergie totale E sont constantes. Cependant, les expériences sont souvent réalisées dans les ensembles isobare-isotherme (N,P,T) ou canonique (N,V,T) où la température T et/ou la pression P sont constantes au cours du temps. Diverses méthodes plus ou moins sophistiquées ont été développées à cet effet (Nosé-Hoover [166, 167], Berendsen [168],...). Nous ne détaillerons que les méthodes de Berendsen [168], utilisées dans notre étude.

Thermostat de Berendsen

La méthode de *couplage faible* ou méthode de Berendsen [168] consiste à placer le système en équilibre avec un bain thermique. La vitesse des atomes est alors modifiée de sorte à relaxer la température cinétique instantanée $T(t)$ vers la température T_0 désirée :

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau_T} \quad (2.21)$$

où τ_T désigne le temps de relaxation associé aux fluctuations de température. Durant un pas d'intégration δt , l'énergie cinétique est modifiée d'une quantité ΔI donnée par :

$$\Delta I = \frac{1}{2}(\chi^2 - 1)Nk_B T(t) \quad (2.22)$$

où χ est le facteur de réajustement des vitesses tel que :

$$\chi = \left[1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (2.23)$$

Ce couplage aperiodique à un « réservoir de chaleur », grâce à un processus de premier ordre, ne conduit pas à des réponses oscillantes aux changements de température.

En revanche, il a été prouvé que cet algorithme n’aboutit pas rigoureusement à une distribution canonique [161], contrairement à d’autres types de thermostats (*e.g.* celui de Nosé-Hoover [166, 167]).

Barostat de Berendsen

De manière analogue à la méthode de couplage faible pour la température, Berendsen *et al.* [168] ont proposé une extension de la méthode à la pression, où cette fois la position des atomes est corrigée. Les équations de mouvement sont modifiées en fonction de la relaxation de la pression instantanée $P(t)$ vers la pression P_0 désirée :

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{P_0 - P(t)}{\tau_P} \quad (2.24)$$

où τ_P est le temps de relaxation associé aux fluctuations de pression. En réajustant les coordonnées atomiques et la taille de la cellule périodique par un facteur ς , le volume total se voit modifié de $\Delta V = (\varsigma^3 - 1)V$, et entraîne une variation de pression :

$$\Delta P = \frac{\Delta V}{\beta_I V} \quad (2.25)$$

où β_I est la compressibilité isotherme. ς s’écrit :

$$\varsigma = \left[1 - \beta_I \delta t \frac{P_0 - P(t)}{\tau_P} \right]^{1/3} \quad (2.26)$$

2.1.5 Limites de la technique de la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire possède un certain nombre de limitations significatives. La première concerne la forme simplifiée de la fonctionnelle d’énergie potentielle, dans laquelle la polarisabilité atomique est généralement omise et dont les paramètres en considèrent les effets moyens. D’ailleurs, la détermination de certains paramètres tels que les barrières de potentiel des angles dièdres s’avère délicate. La seconde limitation sévère est le pas de temps maximal pour que l’intégration des équations du mouvement reste stable. Il est généralement de quelques femtosecondes tout au plus, de sorte que les temps des simulations ne dépassent pas quelques centaines de ns. La taille des systèmes est aussi généralement limitée à quelques dizaines de milliers d’atomes. La troisième limitation majeure des simulations de dynamique moléculaire standard se situe dans le traitement classique des interactions du système, car il n’est pas possible d’étudier les réactions chimiques sans décrire de manière quantique au moins une partie du système par les méthodes *ab initio*.

2.1.6 Analyse des trajectoires

L’analyse des trajectoires de dynamique moléculaire permet de calculer un grand nombre de propriétés structurales (fonctions de distribution radiale, facteurs de structure, etc.), dynamiques (coefficients de diffusion, fonctions de corrélation de van Hove, fonctions intermédiaires de diffusion, etc.), et thermodynamiques (énergies libres, entropies, capacités calorifiques, etc.). Tous ces calculs sont désormais courants et sont décrits

dans les références [143–145]. Nous ne détaillerons dans cette partie que l’analyse de propriétés moins traditionnelles.

Agrégats de molécules

De plus en plus d’études par simulations de dynamique moléculaire s’intéressent aux phénomènes d’agrégation de molécules dans les mélanges [169, 170], et de nombreuses études expérimentales et numériques ont notamment montré que les molécules d’eau peuvent former des agrégats statiques ou dynamiques de taille et de topologie diverses [171, 172].

Nous nous sommes intéressés aux agrégats dans les mélanges sucre/eau (cf section 2.1.7, p. 61). Afin de déterminer les molécules qui appartiennent à un agrégat donné, il est nécessaire d’établir un critère. Aux vues des nombreuses LHs présentes dans les systèmes étudiés, il est naturel d’utiliser la formation d’au moins une LH entre deux molécules d’une même espèce comme critère d’appartenance à un agrégat donné. Les molécules isolées sont considérées comme des agrégats de taille 1. La détermination des agrégats s’effectue alors de la manière suivante : pour chaque configuration de la trajectoire de simulation, l’ensemble $\{P_{ij}\}$ des paires de molécules liées par LH est déterminé. Ces LHs sont définies par un critère géométrique de distance entre les atomes accepteur A et donneur D et d’angle entre D-H... A (voir la section 3.1.3 du chapitre 3 pour la définition des critères géométriques utilisés). La première paire de molécules liées par LH forme alors le premier agrégat A_1 . Si une autre paire P_{ij} a une molécule faisant partie de A_1 , alors la taille de A_1 est incrémentée d’une unité, sinon P_{ij} forme l’agrégat A_2 , et ainsi de suite. Au cours de la détermination de la liste $\{A_i\}$ des agrégats, il est possible que la molécule i de la paire P_{ij} appartienne à l’agrégat A_k et la molécule j à l’agrégat A_l . Dans ce cas, les agrégats A_k et A_l doivent être « fusionnés » en un seul agrégat A'_k , et la liste $\{A_i\}$ des agrégats actualisée. Lorsque l’ensemble des paires $\{P_{ij}\}$ a été analysé, la liste définitive $\{A_i\}$ des agrégats de taille supérieure ou égale à deux est connue. La figure 2.5 présente deux exemples d’agrégats obtenus dans les simulations des solutions binaires maltose/eau. Ces agrégats peuvent alors être soumis à une analyse statistique et topologique.

L’analyse topologique des agrégats de molécules d’eau, *i.e.* la détermination des cycles présents dans les solutions (voir figure 2.5), est menée de la manière suivante : l’ensemble des molécules d’eau ayant au moins deux molécules d’eau voisines en termes de LHs $\{M_i\}$ est déterminé à partir de la liste des paires de molécules d’eau liées par LH $\{P_{ij}\}$. En effet, les molécules d’eau appartenant à un cycle ont nécessairement au minimum deux voisines. Un algorithme similaire à celui de Belch et Rice [173] est employé afin de déterminer les cycles parmi les molécules de l’ensemble $\{M_i\}$. Celui-ci est représenté de manière schématique dans la figure 2.6. Pour des raisons de temps de calcul, la taille maximale des cycles a été fixée à 11.

Une fois que les polygones de molécules d’eau de différentes tailles sont déterminés, seuls ceux qui ne sont pas *court-circuités* sont considérés. Rahman et Stillinger les définissent comme étant les polygones de taille supérieure ou égale à 3 dont aucune paire de noeuds n’est reliée par un chemin de LHs plus court que le plus court des chemins au sein du polygone [174]. La figure 2.7a décrit un exemple de polygone court-circuité. Speedy *et al.* ont utilisé une autre définition [175], car ils soulignent que la définition de Rahman et Stillinger conduit à des cycles de grande taille. Par exemple, en appliquant cette définition aux réseaux tétraédriques des formes 1h, 1c ou II de la glace, de nombreux cycles de

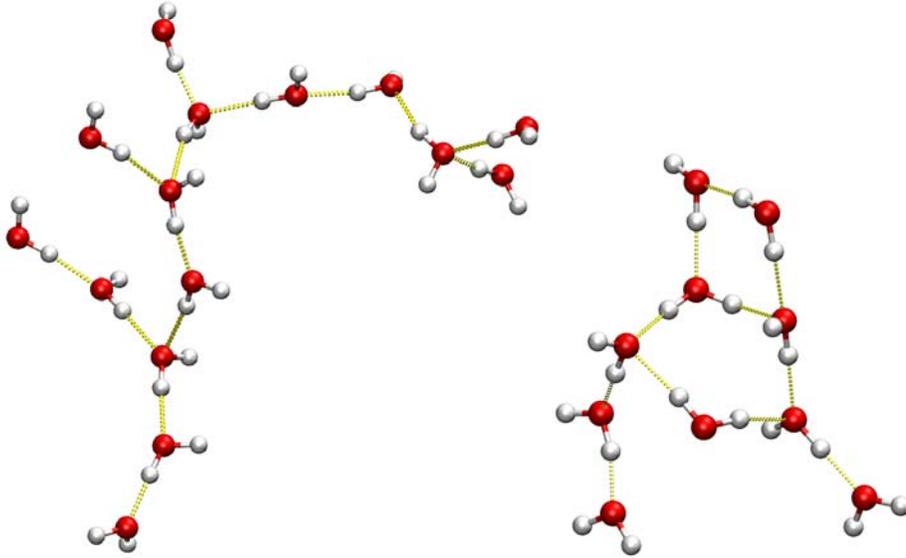


FIG. 2.5 – Exemples d’agrégats de molécules d’eau liées par au moins une LH entre elles, obtenus dans les solutions binaires maltose/eau. A gauche : Agrégat linéaire branché de 15 molécules d’eau. A droite : Agrégat de 10 molécules d’eau contenant deux cycles (un tétragone et un pentagone) adjacents.

taille 8 ou plus seraient obtenus, alors que des hexagones devraient être déterminés. C’est la raison pour laquelle Speedy *et al.* [175] définissent comme *primitif* un polygone dont aucune paire de vertex non-adjacents n’est reliée par un chemin de LHs plus court que l’un ou l’autre des chemins au sein du polygone (cf figure 2.7b,c).

Fonctions de distribution bidimensionnelles

Afin d’analyser la structure de l’eau autour des sucres, nous avons calculé des fonctions de distribution radiale bidimensionnelles $g(r_1, r_2)$ définies comme suit [176] :

$$g(r_1, r_2) = \frac{N(r_1, r_2)}{\rho_W V_{intersection}(r_1, r_2, \Delta r)} \quad (2.27)$$

Dans notre étude, $g(r_1, r_2)$ donne la probabilité de trouver l’atome d’oxygène d’une molécule d’eau à une distance r_1 et r_2 de deux atomes d’oxygène donnés d’une molécule de sucre, normalisée par rapport à la probabilité obtenue pour une distribution aléatoire. $N(r_1, r_2)$ désigne le nombre d’oxygènes de l’eau situés à des distances r_1 et r_2 de deux oxygènes donnés des sucres, moyenné sur toutes les molécules de sucres et sur toutes les configurations de la trajectoire considérée. $\rho_W = N_W/V$ représente la densité moyenne de l’eau du système et $V_{intersection}(r_1, r_2, \Delta r)$ désigne le volume d’intersection entre les deux coques de rayons intérieurs r_1 et r_2 et d’épaisseur Δr . Le calcul des distributions bidimensionnelles est analogue à celui des fonctions de distribution radiale unidimensionnelles, mise à part le fait que la normalisation soit plus complexe. La figure 2.8 décrit de manière schématique les principaux paramètres nécessaires pour le calcul de $g(r_1, r_2)$.

Les fonctions $g(r_1, r_2)$ ont été développées par Engelsen *et al.* [176, 177] pour l’étude de solutions diluées de disaccharides (sucrose, tréhalose, etc.). Elles sont susceptibles d’être

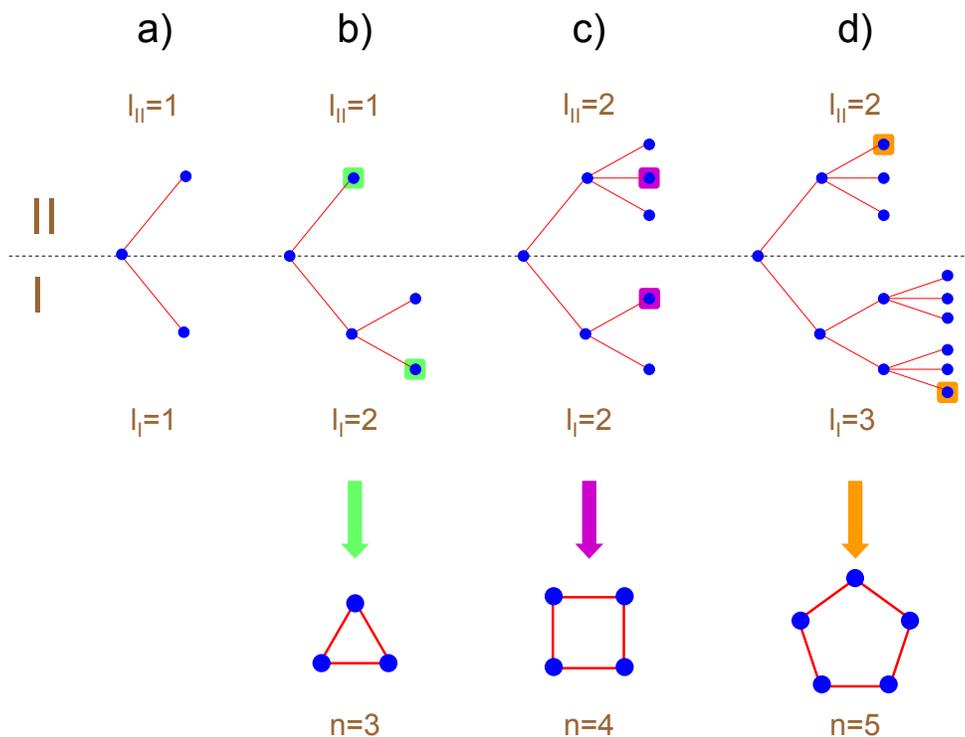


FIG. 2.6 – Représentation schématique de l'algorithme de détermination des cycles de molécules d'eau. Dans un premier temps (a), deux des molécules voisines d'une molécule donnée sont considérées. Elles permettent de définir deux branches (I et II) d'un arbre de connectivité. Les branches I et II sont alors alternativement allongées en déterminant les voisines des molécules des extrémités de la branche (b, c, et d). A chaque étape, un test est effectué afin de déterminer si les branches I et II ont une molécule commune. Dans le cas échéant, un cycle dont la longueur n correspond à la somme des longueurs des branches I et II (l_I et l_{II}) est trouvé.

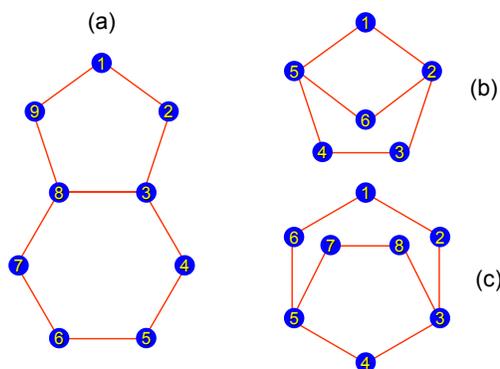


FIG. 2.7 – Représentation schématique de différents cycles de molécules d'eau liées par LH. (a) Les molécules 1 à 9 forment un pentagone (1-2-3-8-9), un hexagone (3-4-5-6-7-8) et un nonagone (1-2-3-4-5-6-7-8-9). Selon la définition de Rahman et Stillinger [174], le nonagone est court-circuité, car le chemin le plus court entre les vertex (ou noeuds) 3 et 8 est de longueur 1 et ne fait pas partie du nonagone. (b) Les trois polygones (1-2-6-5, 1-2-3-4-5, et 2-3-4-5-6) sont non-court-circuités. Cependant, seul le quadrilatère (1-2-6-5) est primitif selon la définition de Speedy et al. [175], car seul ce polygone inclus les chemins les plus courts entre les vertex 2 et 5 (de longueur 2). (c) L'hexagone (1-2-3-4-5-6) et l'heptagone (1-2-3-8-7-5-6) sont non-court-circuités, mais seul le pentagone (3-4-5-7-8) est primitif.

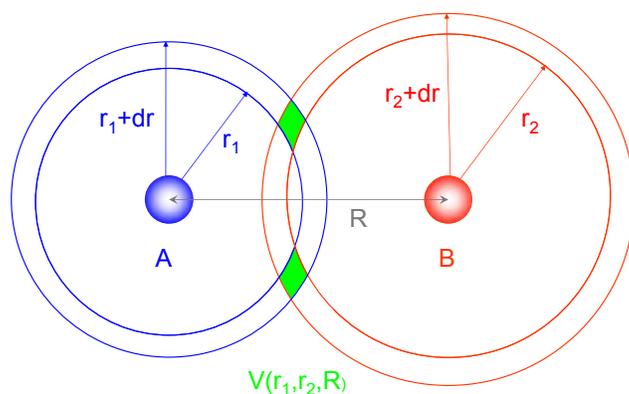


FIG. 2.8 – Schéma des sphères d'hydratation autour des atomes A et B, indiquant les principaux paramètres nécessaires pour le calcul des fonctions de distribution radiale bidimensionnelles $g(r_1, r_2)$. Les atomes A et B sont distants de R . Les couronnes sphériques autour de A et B ont des rayons intérieurs valant respectivement r_1 et r_2 , sont d'épaisseur dr et ont un volume d'intersection égal à $V(r_1, r_2, R)$.

plus adaptées à l'étude de la structuration de l'eau autour des sucres que les contours de densité tridimensionnels (voir figure 2.9 pour le tréhalose), car elles prennent en considération la flexibilité des sucres. La raison principale est que le calcul est réalisé par rapport à la position relative des molécules d'eau avec les atomes d'oxygène du sucre, alors que le calcul des contours de densité tridimensionnels s'effectue dans le repère local du sucre (cf figure 2.9).

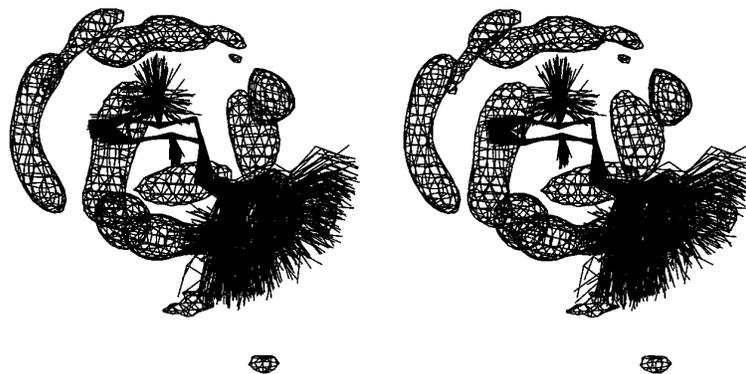


FIG. 2.9 – Contours 3D de l'excès de densité de l'eau par rapport à l'eau volumique autour du tréhalose calculés en utilisant comme systèmes d'axe de références l'un des cycles de glucose. 130 conformations instantanées issues de la trajectoire sont représentées afin d'illustrer la vaste région de l'espace explorée par l'un des cycles par rapport à l'autre, qui a pour conséquence un lissage de la densité du solvant autour du cycle mobile dans le repère local. Autour de ce cycle, les contours ont quasiment disparu (d'après réf. [178]).

2.1.7 Systèmes étudiés par dynamique moléculaire

Solutions binaires

Les simulations de dynamique moléculaires ont été conduites à l'aide du logiciel DL_POLY_2 [162]. Les différents disaccharides étudiés sont le α - α -tréhalose (T), le β -maltose (M), et le sucrose (S) représentés de manière schématique dans la figure 2.10.

Les sucres ont été considérés entièrement flexibles. Le champ de force utilisé est celui développé par Ha *et al.*[179], dont les paramètres des termes liés, de van der Waals et électrostatique sont respectivement indiqués dans les tableaux 2.1, 2.2 et 2.3.

Ce champ de forces a été initialement développé pour un monosaccharide, le glucose. Nous l'avons utilisé pour les disaccharides en considérant que les paramètres de l'atome glycosidique OA (O_1 dans la figure 2.10) sont identiques à ceux des oxygènes des cycles OE.

De nombreux modèles ont été développés afin de représenter les propriétés structurales, dynamiques, et thermodynamiques de l'eau [180, 181]. Nous avons choisi d'utiliser le modèle SPC/E [180] pour représenter les molécules d'eau, car d'une part, il décrit de

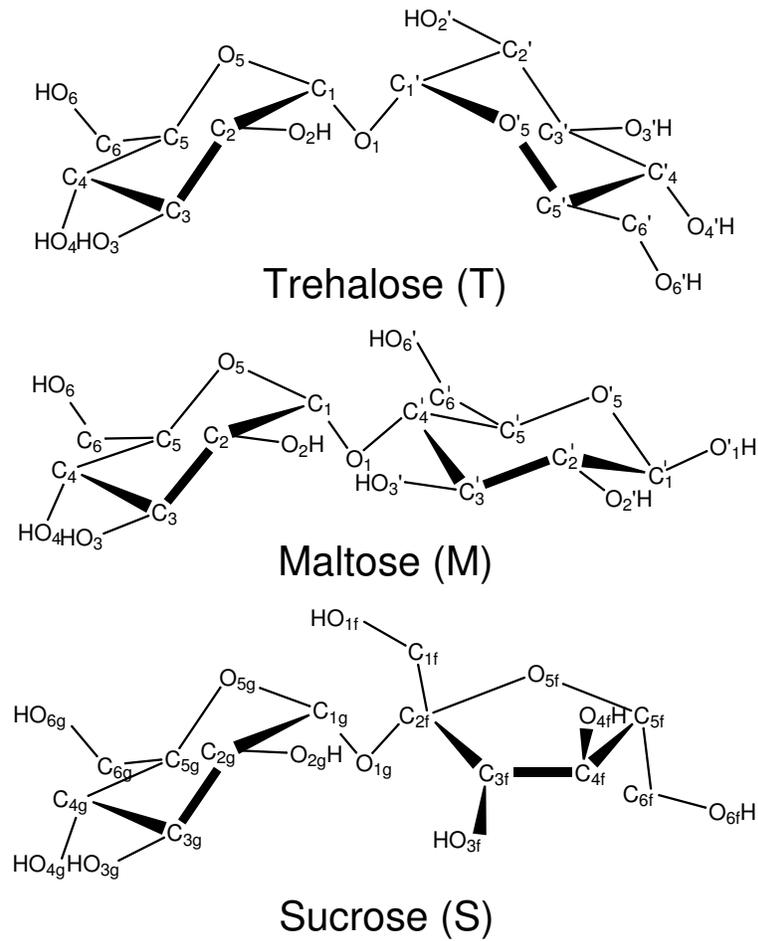


FIG. 2.10 – Représentation schématique des disaccharides étudiés : le tréhalose (*T*), le maltose (*M*) et le sucrose (*S*). Seuls les hydrogènes appartenant aux groupes hydroxyyles ont été représentés pour des raisons de clarté. En outre, les cycles de glucose et de fructose sont respectivement identifiés par les indices *g* et *f*.

Termes d'élongation		
Type de liaison	k_b (kcal/mol/Å ²)	b_0 (Å)
O-H	460,5	0,972
C-H	337,3	1,099
C-C	214,8	1,523
C-O	334,3	1,411
C-OE	296,7	1,427
Termes de flexion		
Type d'angle de valence	k_θ (kcal/rad ²)	θ_0 (degré)
C-O-H	53,6	109,35
H-C-H	33,6	107,85
H-C-C	43,0	109,72
H-C-O	45,9	109,89
H-C-OE	45,2	107,24
C-C-C	38,0	110,70
C-C-O	75,7	110,10
C-C-OE	81,0	109,40
C-OE-C	90,7	113,80
OE-C-O	92,6	111,55
Termes de torsion		
Type d'angle dièdre	k_ϕ (kcal/mol)	n
X-C-C-X	1,021	3
X-C-O-X	0,443	3
X-C-OE-X	0,928	3

TAB. 2.1 – Paramètres des interactions intramoléculaires du champ de force des sucres. Les atomes OE correspondent aux oxygènes des cycles de glucose O5/O5' et à l'oxygène glycosidique O1 (voir figure 2.10, d'après réf. [179]). k_b , k_θ , et k_ϕ désignent respectivement les constantes de raideur des potentiels d'élongation, de flexion, et de torsion. b_0 et θ_0 représentent respectivement la longueur et l'angle de référence des potentiels d'élongation et de flexion, et n la multiplicité du potentiel de torsion.

Type d'atome	ϵ (kcal/mol) (Å)	σ (Å)
C	-0,0903	3,2072
O	-0,1591	2,8509
OE	-0,1591	2,8509
H hydroxyle	-0,0498	1,4254
H aliphatique	-0,0045	2,6157

TAB. 2.2 – Paramètres des interactions de van der Waals du champ de force des sucres. Les atomes OE correspondent aux oxygènes des cycles de glucose O5/O5' et à l'oxygène glycosidique O1 (d'après réf. [179]). ϵ et σ désignent respectivement la profondeur du puits de potentiel et le paramètre de collision des interactions de van der Waals.

Type d'atome	charge
C1/C1'	0,20
C2-4/C2'-4'	0,15
C5/5'	0,20
C6/C6'	0,05
OE/OA	-0,40
O hydroxyle	-0,65
H hydroxyle	0,40
H aliphatique	0,10

TAB. 2.3 – Charges atomiques du champ de force des sucres. Les atomes OE correspondent aux oxygènes des cycles de glucose O5/O5' et OA désigne l'oxygène glycosidique O1 (d'après réf. [179]).

manière satisfaisante le coefficient de diffusion de l'eau à température ambiante, et d'autre part, il est moins coûteux en temps de calcul que les modèles à 4 ou 5 sites d'interactions et/ou polarisables. La géométrie a été contrainte en employant l'algorithme SHAKE [182]. Les paramètres du modèle SPC/E sont récapitulés dans le tableau 2.4.

Géométrie	van der Waals	charges
$d_{OH} = 1 \text{ \AA}$	$\epsilon = -0,1583 \text{ kcal/mol}$	$q_O = -0,8476$
$a_{H-O-H} = 109,47 \text{ deg}$	$\sigma = 3,166 \text{ \AA}$	$q_H = 0,4238$

TAB. 2.4 – Paramètres du modèle SPC/E (d'après réf. [180]). d_{OH} et a_{H-O-H} sont la longueur des liaisons O-H et l'angle de liaison H-O-H. ϵ et σ désignent respectivement la profondeur du puits de potentiel et le paramètre de collision des interactions de van der Waals. q_O et q_H désignent les charges atomiques partielles des atomes d'oxygène et d'hydrogène.

Afin de vérifier l'influence du modèle de l'eau sur nos résultats, nous avons effectué des simulations avec le modèle TIP3P [181], qui est un autre modèle de l'eau populaire, largement adopté dans les simulations de systèmes biologiques notamment, et dont les paramètres sont indiqués dans le tableau 2.5.

Géométrie	van der Waals	charges
$d_{OH} = 0,9572 \text{ \AA}$	$\epsilon = -0,15207 \text{ kcal/mol}$	$q_O = -0,834$
$a_{H-O-H} = 104,52 \text{ deg}$	$\sigma = 3,15066 \text{ \AA}$	$q_H = 0,417$

TAB. 2.5 – Paramètres du modèle TIP3P (d'après réf. [181]). d_{OH} et a_{H-O-H} sont la longueur des liaisons O-H et l'angle de liaison H-O-H. ϵ et σ désignent respectivement la profondeur du puits de potentiel et le paramètre de collision des interactions de van der Waals. q_O et q_H désignent les charges atomiques partielles des atomes d'oxygène et d'hydrogène.

Le tableau 2.6 présente les nombres d'hydratation n_H (cf section 3.1.3, p. 87 du chapitre 3) des trois sucres étudiés en utilisant les deux critères géométriques de LH I et II, à $T = 293 \text{ K}$. n_H semble indépendant du choix du modèle de l'eau considéré, car l'accord entre les résultats obtenus avec ces deux modèles est bon. Les nombres d'hydratation $n_H(I)$

n_H	SPC/E	TIP3P
T	6,5 (I)	6,1 (I)
	16,4 (II)	16,8 (II)
M	6,5 (I)	5,7 (I)
	16,1 (II)	16,1 (II)
S	6,2 (I)	5,6 (I)
	14,8 (II)	15,1 (II)

TAB. 2.6 – Comparaison des nombres d’hydratation n_H des sucres étudiés (tréhalose T, maltose M, et sucrose S) dans les simulations à 4 % pds à $T = 293$ K avec les modèles SPC/E et TIP3P, et en utilisant les critères géométriques I et II pour la description des LHs (voir section 3.1.3).

du modèle SPC/E sont légèrement plus élevés que ceux obtenus avec le modèle TIP3P. Ceci pourrait être interprété comme des LHs eau-disaccharide plus fortes avec le modèle SPC/E en raison des charges partielles de l’eau plus élevées (voir tableaux 2.4 et 2.5).

En outre, nous avons utilisé le modèle SPC flexible développé par Teleman *et al.* [183] afin d’étudier la bande de flexion de l’eau, observée par spectroscopie Raman. Les paramètres sont indiqués dans le tableau 2.7.

Géométrie	Constantes de raideur	van der Waals	charges
$d_{OH} = 1 \text{ \AA}$	$k_{OH} = 1109,33 \text{ kcal/\AA}^2/\text{mol}$	$\epsilon = -0,1555 \text{ kcal/mol}$	$q_O = -0,82$
$a_{H-O-H} = 109,47 \text{ deg}$	$k_{HOH} = 91,63/\text{rad}^2/\text{mol}$	$\sigma = 3,166 \text{ \AA}$	$q_H = 0,41$

TAB. 2.7 – Paramètres du modèle SPC flexible (d’après réf. [183]). d_{OH} et a_{H-O-H} sont la longueur des liaisons O-H et l’angle de liaison H – O – H. k_{OH} et k_{HOH} sont respectivement les constantes de raideur des potentiels d’élongation et de flexion. ϵ et σ désignent respectivement la profondeur du puits de potentiel et le paramètre de collision des interactions de van der Waals. q_O et q_H désignent les charges atomiques partielles des atomes d’oxygène et d’hydrogène.

Un rayon de coupure de 10 \AA a été utilisé pour calculer les interactions non-liées. La méthode du champ de réaction avec une constante diélectrique $\epsilon = 72$ a été utilisée afin de prendre en compte les interactions électrostatiques. Etant donné que la constante diélectrique des sucres purs est relativement faible² ($\epsilon(\text{sucrose}) = 3,3$), et que nous avons étudié des solutions disaccharide/eau relativement concentrées, nous avons vérifié la validité de la méthode du champ de réaction [158] en effectuant la simulation d’une solution aqueuse de sucrose à 66 % en poids à 373 K, où les interactions électrostatiques sont calculées par la méthode de sommation d’Ewald [157] (la plus rigoureuse pour calculer les interactions électrostatiques, cf section 2.1.3, p. 52). Le tableau 2.8 présente la comparaison de quelques paramètres calculés et montre que ces deux méthodes de calcul des interactions électrostatiques conduisent à des résultats similaires.

La compressibilité des solutions a été fixée à celle de l’eau car il s’agit d’un paramètre interne du logiciel DL_POLY [162]. Les règles de mélange de Lorentz-Berthelot³ ont été utilisées afin de calculer les termes croisés des interactions non-liées.

2. site web : www.clippercontrols.com/info/dielectric_constants.html

3. Les règles de mélange de Lorentz-Berthelot permettent de calculer les paramètres de van der Waals

Solution sucrose/eau à 66 % pds		Sommation d'Ewald	Champ de réaction
$D(cm^2/s)$	Eau	$1,24 \cdot 10^{-5}$	$1,11 \cdot 10^{-5}$
	Sucrose	$9,45 \cdot 10^{-7}$	$8,41 \cdot 10^{-7}$
n_H	crit. I	3,049	3,066
	crit. II	6,747	6,864
f_j (crit. I)	f_0	0,266	0,269
	f_1	0,427	0,425
	f_2	0,243	0,241
	f_3	0,059	0,059
	f_4	0,006	0,006
f_j (crit. II)	f_0	0,019	0,021
	f_1	0,135	0,137
	f_2	0,329	0,325
	f_3	0,340	0,336
	f_4	0,152	0,152
	f_5	0,025	0,026
$p_{HB}(Teixeira)$	(crit. I)	0,280	0,278
$n_{HB}(intra)$	crit. II	2,737	2,286
$n_{HB}(inter)$	crit. II	2,007	2,372

TAB. 2.8 – Comparaison de différents paramètres calculés pour deux simulations d'une solution sucrose/eau à 66 % pds à $T = 373$ K, utilisant respectivement les méthodes de la sommation d'Ewald et du champ de réaction. Ces paramètres sont le coefficient de diffusion D , le nombre d'hydratation n_H , les fractions f_j de molécules d'eau formant j LHs avec leurs voisines, la probabilité de formation d'une LH eau-eau p_{HB} et les nombres de LHs respectivement intra- et intermoléculaires du sucrose $n_{HB}(intra)$ et $n_{HB}(inter)$. Les LHs sont calculées suivant les critères géométriques I et II. Tous ces paramètres sont définis dans les chapitres 3 et 4.

Les simulations ont été effectuées dans l'ensemble thermodynamique isobare-isotherme (N,P,T), où le nombre de molécules N, la pression P, et la température T sont fixés. La pression a été définie à 1,0 bar, en utilisant la méthode de Berendsen (couplage à un barostat) [168] avec un temps de relaxation de 1,0 ps. Les températures étudiées sont comprises entre 273 et 373 K, par pas de 20 K. Elles ont été maintenues constantes par la méthode de Berendsen (couplage à un thermostat) [168]. Les équations de Newton ont été résolues par l'algorithme de Verlet « saute-mouton » [164].

Les temps de simulations varient en fonction des températures et des concentrations étudiées. Le pas de temps d'intégration Δt est de 0,5 fs, en raison de la flexibilité des liaisons OH des sucres, dont les temps caractéristiques de vibration sont très courts (quelques fs). Les conformations des phases cristallines du tréhalose dihydrate T_{2H_2O} [82], du maltose β monohydrate [83] et du sucrose anhydre [184] ont été considérées pour construire les configurations initiales. Les sucres et les molécules d'eau ont été placées sur un réseau cubique. Afin d'éliminer les contacts entre molécules résultant de cette procédure, des simulations préalables à 0 K et avec un très petit pas de temps ($\sim 10^{-4} - 10^{-3}$ fs) ont été menées. Le tableau 2.9 indiquent quelques données des simulations à $T = 293$ K.

ϕ (% pds)	nb _D /nb _E	ρ (g.cm ⁻³)			temps éq./sim. (ns)		
		T	M	S	T	M	S
0	0/512	1,005	1,005	1,005	0,1/0,3	0,1/0,3	0,1/0,3
4	1/512	1,020	1,020	1,020	0,1/0,4	0,1/0,4	0,1/0,4
16	5/512	1,076	1,078	1,076	0,1/0,4	0,1/0,2	0,05/0,15
33	13/512	1,167	1,168	1,168	0,1/0,4	0,15/0,35	0,125/0,375
49	26/512	1,269	1,276	1,273	0,2/0,8	0,3/0,7	0,125/0,375
66	52/512	1,379	1,392	1,377	0,25/1,75	0,5/1,0	0,25/1,75

TAB. 2.9 – *Compositions des systèmes simulés, masse volumique ρ , et temps d'équilibration/simulation à 293 K pour les différentes concentrations ϕ . Les données correspondant à $\phi = 0$ % en poids résultent d'une unique simulation de l'eau pure. nb_D et nb_E désignent respectivement les nombres de molécules de disaccharide et d'eau.*

Solutions ternaires

Les simulations des solutions aqueuses de sucre permettent d'étudier les propriétés intrinsèques des sucres (conformation, interactions intermoléculaires), ainsi que leur influence sur l'eau. Cependant, elles ne permettent pas d'étudier l'effet des sucres sur les molécules biologiques. C'est la raison pour laquelle nous avons simulé des systèmes ternaires comportant une protéine globulaire modèle, le lysozyme de blanc de poulet.

Le lysozyme de blanc de poulet⁴ sert à protéger les protéines et les graisses nécessaires à la croissance du poussin. Il diffère sensiblement (par 51 acides aminés) du lysozyme

entre deux atomes i et j de types différents. Les paramètres d'interaction sont donnés par :

$$\sigma_{i,j} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}, \quad \epsilon_{i,j} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (2.28)$$

où (σ_i, ϵ_i) et (σ_j, ϵ_j) sont respectivement les paramètres de van der Waals des atomes i et j .

4. Nous le désignerons simplement lysozyme dans la suite.

humain, bien que leurs rôles respectifs soient analogues⁵.

La séquence des 129 acides aminés constituant le lysozyme est la suivante :

LYS	VAL	PHE	GLY	ARG	CYS	GLU	LEU	ALA	ALA	ALA	MET	LYS	ARG	HSD
GLY	LEU	ASP	ASN	TYR	ARG	GLY	TYR	SER	LEU	GLY	ASN	TRP	VAL	CYS
ALA	ALA	LYS	PHE	GLU	SER	ASN	PHE	ASN	THR	GLN	ALA	THR	ASN	ARG
ASN	THR	ASP	GLY	SER	THR	ASP	TYR	GLY	ILE	LEU	GLN	ILE	ASN	SER
ARG	TRP	TRP	CYS	ASN	ASP	GLY	ARG	THR	PRO	GLY	SER	ARG	ASN	LEU
CYS	ASN	ILE	PRO	CYS	SER	ALA	LEU	LEU	SER	SER	ASP	ILE	THR	ALA
SER	VAL	ASN	CYS	ALA	LYS	LYS	ILE	VAL	SER	ASP	GLY	ASN	GLY	MET
ASN	ALA	TRP	VAL	ALA	TRP	ARG	ASN	ARG	CYS	LYS	GLY	THR	ASP	VAL
GLN	ALA	TRP	ILE	ARG	GLY	CYS	ARG	LEU						

La structure secondaire, obtenue à partir de la structure cristallographique 193L [185] de la banque PDB (Protein Data Bank)⁶ est représentée dans la figure 2.11.

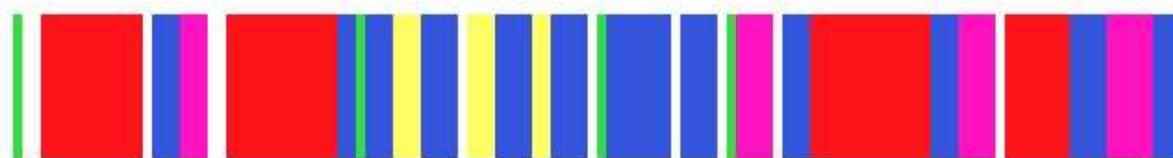


FIG. 2.11 – Structure secondaire du lysozyme obtenue à partir de la structure 193L [185] de la banque PDB, selon la classification du logiciel VMD. (vert : pont isolé, rouge : hélice α , rose : hélice 3-10, jaune : feuillet β , bleu : boucle. Les résidus dont la structure n'est pas identifiée sont représentés en blanc).

La structure secondaire du lysozyme est composée en assez grande proportion d'hélices (environ 30 % en nombre de résidus), alors que les résidus formant le feuillet β sont peu nombreux. Il est également important de signaler la présence de quatre ponts disulfure entre les résidus cystéines 6-127, 30-115, 64-80, et 76-94, permettant de renforcer la stabilité conformationnelle de la protéine.

La structure tertiaire, obtenue à partir de la structure cristallographique 193L [185] (résolue à 1.33 Å) de la banque PDB est représentée de différentes manières dans la figure 2.12.

Les simulations des systèmes ternaires, dont les compositions sont données dans le tableau 2.10, ont été effectuées à l'aide du logiciel CHARMM [146], version 29b1. Le champ de forces CHARMM22 [186] a été utilisé pour représenter le lysozyme et les sucres. Bien que le champ de force CHARMM22 ait été optimisé avec le modèle d'eau TIP3P [181], nous avons utilisé le modèle SPC/E [180] pour l'eau, afin de faciliter la comparaison avec les simulations des systèmes binaires. Nous suggérons que ce choix ne modifie pas qualitativement la nature de nos résultats, étant donné que ces deux modèles d'eau sont proches l'un de l'autre. D'autre part, nous avons diminué uniformément les charges du lysozyme de 8/1960⁷ afin qu'il soit de charge nulle, comme l'ont fait Sterpone *et al.* [187]. Cette procédure permet d'éviter d'ajouter des ions aux systèmes et simplifie leur analyse.

Les systèmes étudiés ont été construits de la manière suivante : tout d'abord, le lysozyme est placé dans une boîte orthorhombique de dimensions 65 Å x 45 Å x 45 Å . La dimension de cette boîte a été choisie de sorte à limiter les interactions du lysozyme

5. Le lysozyme humain a des propriétés antiseptiques, il contribue à défendre l'organisme contre les bactéries. On le trouve dans les larmes, les sécrétions respiratoires, et dans le sang. Il est cependant moins performant que notre système immunitaire, car sa taille ne lui permet pas de diffuser entre les différentes cellules de l'organisme.

6. www.rcsb.org/pdb/

7. Le lysozyme comporte 1960 atomes et sa charge initiale vaut + 8 e, à pH neutre.

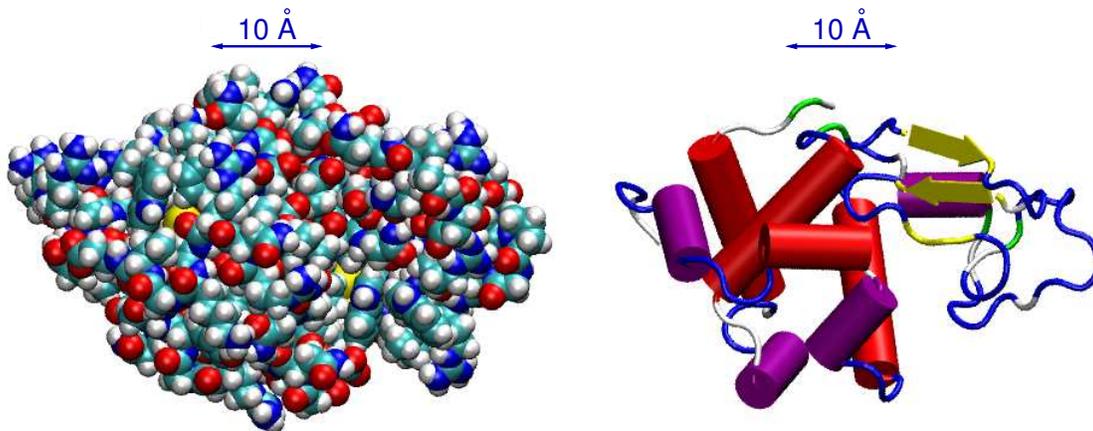


FIG. 2.12 – Structure tertiaire du lysozyme obtenue à partir de la structure 193L [185] de la banque PDB. A gauche : les atomes sont représentés par des boules dont le rayon est leur rayon de van der Waals. A droite : le lysozyme est dessiné sous forme schématique, en respectant le code des couleurs de la structure secondaire de la figure 2.11. Les cylindres correspondent aux hélices et les flèches antiparallèles au feuillet β . Par raison de clarté, les 142 molécules d'eau qui constituent les cristaux de lysozyme ne sont pas représentées.

Composition	ϕ (% pds)	% pds L	h (g_E/g_L)	Masse volumique (g/cm^3)		
1L/3800E	0	21	4,8	1,037		
1L/85D/2800E	37	18	3,5	1,155	1,158	1,149
1L/125D/2400E	50	17	3,0	1,204	1,209	1,196
1L/165D/2100E	60	15	2,6	1,240	1,250	1,236

TAB. 2.10 – Composition des systèmes ternaires. L , D et E désignent respectivement le lysozyme, les disaccharides et les molécules d'eau. ϕ est le pourcentage en poids des sucres dans le solvant (sucre et eau). La troisième colonne indique le pourcentage en poids du lysozyme dans les systèmes étudiés. h représente le degré d'hydratation du lysozyme, en grammes d'eau g_E par gramme de lysozyme g_L .

avec lui-même en raison des conditions aux limites périodiques. La forme de la boîte présente l'avantage par rapport à une boîte cubique de réduire le nombre de molécules d'eau nécessaires pour solvater le lysozyme, car elle tient compte de la forme ellipsoïdale du lysozyme. Ensuite, nous avons superposé à la boîte un réseau cubique de molécules de sucres en respectant un critère de distance minimale entre les sucres et le lysozyme et entre les sucres entre eux (voir figure 2.13).

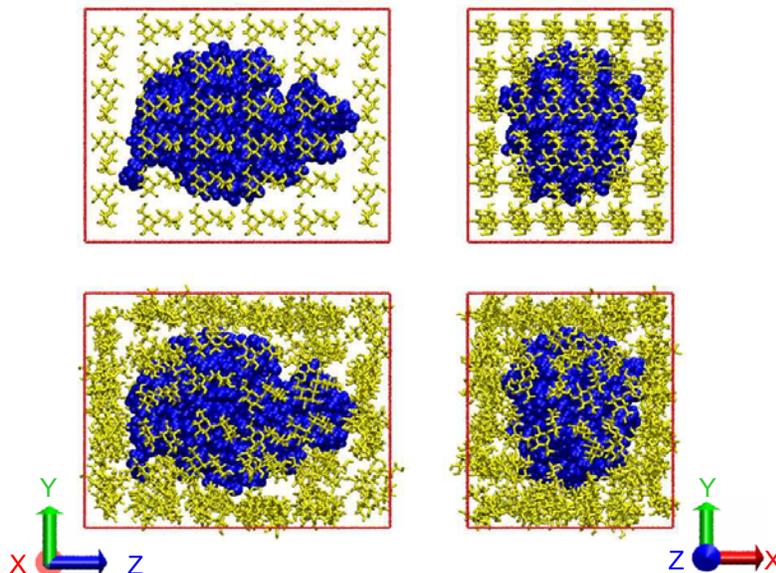


FIG. 2.13 – Configurations de la protéine et des sucres du système ternaire 1/125/2400 (Lysozyme/Tréhalose/Eau) dans lequel les molécules de tréhalose sont placées suivant un réseau cubique. En haut : configuration initiale (début de l'étape 1 du tableau 2.11). En bas : configuration à la fin de la phase d'équilibration (fin de l'étape 6 du tableau 2.11).

Dans les configurations de départ, certains sucres forment des LHs avec le lysozyme, car il n'est pas possible de placer les molécules de sucres de manière isotrope autour du lysozyme si le critère de distance sucre-lysozyme est supérieur à 2-3 Å environ, notamment dans les directions transverses au grand axe du lysozyme. C'est la raison pour laquelle nous ne pouvons pas réellement étudier l'agrégation des sucres à la surface de la protéine comme dans l'étude de Lins *et al.* [125], car les sucres sont déjà proches de la surface du lysozyme dans la configuration initiale.

Enfin, les molécules d'eau sont placées avec des positions et des orientations aléatoires dans la boîte de simulation, en respectant des critères de distance eau-protéine, eau-sucre, et eau-eau. Les liaisons X-H, où X désigne un atome lourd, ont été contraintes à l'aide de l'algorithme SHAKE [182]. Ceci nous a permis d'utiliser un pas d'intégration de 1 fs. Un rayon de coupure de 10 Å a été utilisé pour calculer les interactions non-liées. La procédure utilisée lors des simulations des configurations cubiques est indiquée dans le tableau 2.11.

Nous avons constaté que les sucres diffusent très peu durant les simulations de 2 ns, de sorte que la configuration finale ressemble toujours à la configuration initiale. D'autres simulations ont donc été effectuées afin d'étudier l'effet des conditions initiales sur les

Etape	Type	T (K)	Ens.	Temps	Description
1	Min.		(N,V,T)		(i) L + D : fixes, E : libre
2					(ii) L : fixe, D : CPL, E : libre
3					(iii) L : CPL, D + E : libres
4	Therm.	0 \rightarrow 300		100 ps	
5	Eq.	300	(N,P,T)	60 ps	(i) réassignation des vitesses
6					(ii) ajustement des vitesses
7	Prod.			2 ns	Dynamique

TAB. 2.11 – Procédure des simulations courtes (2 ns) des solutions à 37 et 50 % en poids. L : Lysozyme, D : Disaccharide, E : Eau, Ens. : Ensemble thermodynamique, CPL : contraintes progressivement libérées, Min. : Minimisation, Therm. : Thermalisation, Eq. : Equilibration, Prod. : Production

résultats. Dans les nouvelles configurations de départ, la position et l'orientation des sucres est *aléatoire* (voir figure 2.14).

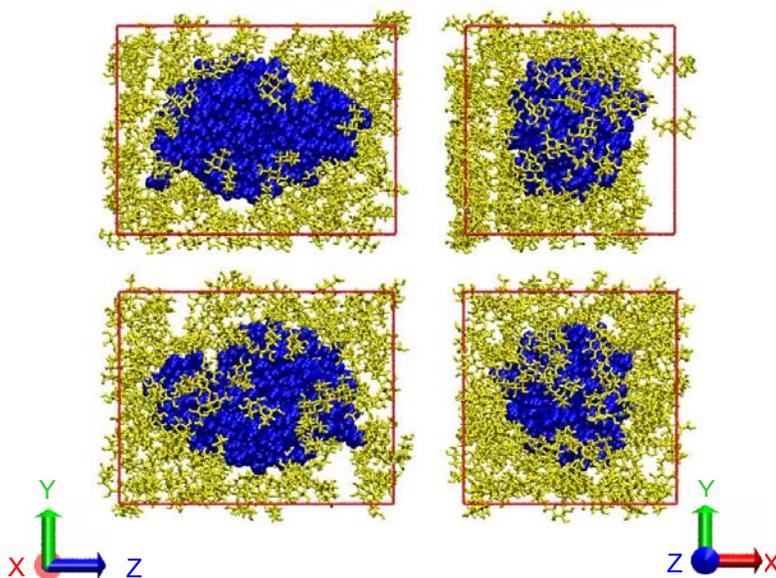


FIG. 2.14 – Configurations de la protéine et des sucres du système ternaire 1/125/2400 (Lysozyme/Tréhalose/Eau) dans lequel les molécules de tréhalose sont placées suivant des positions et des orientations aléatoires. En haut : configuration initiale (début de l'étape 1 du tableau 2.12). En bas : configuration à la fin de la phase d'équilibration (fin de l'étape 17 du tableau 2.12).

Les orientations des sucres dépendent cependant des contraintes stériques imposées par la présence de la protéine et des sucres voisins. Ces configurations ont ensuite été chauffées à 473 K afin de mélanger le solvant (étapes 4-7 du tableau 2.12), et notamment les sucres dont la diffusion est limitée à température ambiante et à l'échelle de la ns. Compte tenu de la température élevée, la position des atomes lourds de la protéine a été fixée, de sorte à maintenir fixe la conformation cristallographique de la protéine. La boîte a ensuite été équilibrée à 300 K (étapes 9-12 du tableau 2.12). Une simulation à pression

Etape	Type	T (K)	Ens.	Temps	Description	
1	Min.		(N,V,T)		(i) L fixe, D+E libres (SD)	
2					(ii) L+D+E libres (SD)	
3					(iii) L+D+E libres (CONJ)	
4	Therm.	0 → 473		20 ps		
5	Eq.	473		10 ps	(i) RV	
6				10 ps	(ii) AV	
7	Mélange			~ 1 ns	dyn.	
8	Therm.	473 → 300		10 ps		
9	Eq.	300		(N,P,T)	10 ps	(i) RV
10					250 ps	(ii) L fixe
11			100 ps	(iii) CPL		
12			~ 1 ns	(iv) dyn.		
13	Ajustement de la densité à partir de l'étape 12.					
14	Min.		(N,V,T)		1000 it, L : CPL	
15	Therm.	0 → 300		36 ps		
16	Eq.	300		24 ps	(i) RV	
17				60 ps	(ii) AV	
18	Prod.			10 ns	dyn.	

TAB. 2.12 – Procédure des simulations longues des solutions ternaires (au moins 10 ns à 300 K). Min. : Minimisation, Therm. : Thermalisation, Eq. : Equilibration, Prod. : Production, SD : minimisation par « descente abrupte » (Steepest Descent), CONJ : minimisation par gradient conjugué., L : Lysozyme, D : Disaccharide, E : Eau, dyn. : dynamique, RV : Réassignation des vitesses, AV : Ajustement des vitesses, CPL : contraintes progressivement libérées, Ens. : Ensemble thermodynamique.

constante de 1 ns a été effectuée afin d'ajuster au mieux la densité du système (étape 12 du tableau 2.12). Finalement, une simulation d'au moins 10 ns a été effectuée dans l'ensemble canonique, à la densité constante correspondant à la densité moyenne de la simulation dans l'ensemble (N,P,T) qui précède. Un pas de temps de 2fs a été utilisé, afin de réduire le nombre d'itérations, tout en vérifiant la conservation de l'énergie du système. De plus, la méthode *particle-mesh Ewald* (PME) [159] a été utilisée, afin de décrire plus précisément les interactions électrostatiques. Le détail de ces simulations est indiqué dans le tableau 2.12.

Nous avons étudié l'effet des conditions initiales en comparant quelques paramètres structuraux et dynamiques des deux types de simulations dont les valeurs sont reportées dans le tableau 2.13. Nous constatons que l'hydratation du lysozyme est sensiblement la même dans les deux cas, bien que le nombre de LHs sucrose-lysozyme soit plus faible dans les simulations longues. Le nombre de LHs entre les sucres et le lysozyme diffèrent notablement entre les deux types de simulations. Ceci provient à la fois de l'étape de mélange à 473 K (étape 7 du tableau 2.12) et de la durée des simulations longues (10 ns contre 2 ns) qui permettent aux sucres de se réorganiser à la surface du lysozyme, comme nous le verrons dans le chapitre 4. Cette augmentation des $n_{HB}(L-D)$ a comme conséquence la diminution des nombres de LHs entre l'eau et les sucres. Les fluctuations quadratiques moyennes $\langle u^2 \rangle$ des atomes d'hydrogène du lysozyme sont sensiblement les mêmes dans les deux types de simulations, ce qui semblerait montrer que les $\langle u^2 \rangle$ ne sont pas

Paramètre	Config.	Lyso/T	Lyso/M	Lyso/S
$n_{HB}(L-E)$	C	300	287	295
	R	293	286	277
$n_{HB}(L-D)$	C	20	26	19
	R	34	47	35
$n_{HB}(D-E)$	C	1322	1293	1207
	R	1245	1225	1150
$\langle u^2 \rangle$ (\AA^2)	C	1,1	1,2	1,1
	R	1,2	1,2	1,3
τ_{tot} (ps)	C	78	71	85
	R	49	52	46
τ_{SC} (ps)	C	52	47	51
	R	32	35	32
τ_{HB} (ps)	C	91	99	96
	R	63	86	84

TAB. 2.13 – Comparaison de quelques paramètres calculés pour les simulations des solutions ternaires à 37 % pds à 300K dans lesquelles les sucres sont placés dans la configuration de départ selon un réseau cubique (C) ou bien aléatoirement (R). $n_{HB}(L-E)$, $n_{HB}(L-D)$ et $n_{HB}(D-E)$ sont respectivement les nombres de LHs Lysoyme-Eau, Lysozyme-Disaccharide et Disaccharide-Eau. $\langle u^2 \rangle$ correspond aux fluctuations quadratiques moyennes des atomes d'hydrogène du lysozyme. τ_{tot} et τ_{SC} sont les temps caractéristiques de décroissance en 1/e des fonctions de diffusion intermédiaires respectivement de l'ensemble des hydrogènes du lysozyme et uniquement des chaînes latérales. τ_{HB} représente le temps de vie des LHs Lysoyme-Eau.

fortement dépendants du nombre de LHs sucre-protéine. Nous constatons cependant que les temps de relaxation du lysozyme et du réseau de LHs lysozyme-eau sont plus petits dans les simulations longues. Ceci s'explique par le fait que nous avons arbitrairement contraint les sucres à entourer le lysozyme de manière homogène dans les simulations courtes. Le lysozyme est donc piégé dans une « cage » de sucres plus rigide que dans les simulations longues, où les sucres sont susceptibles de se réorganiser autour du lysozyme. Nous en déduisons que la position et l'orientation des sucres dans les configurations initiales influencent significativement les interactions sucre-lysozyme, la dynamique de l'eau d'hydratation et celle du lysozyme. Par la suite, nous ne discuterons que des simulations longues, compte-tenu du plus grand soin apporté lors de la phase d'équilibration ainsi que de la plus longue durée des simulations, qui suggèrent des résultats plus fiables.

Nous avons vu que la nature du solvant affecte significativement la transition dynamique observée dans les protéines. Afin d'étudier cet effet, nous avons effectué une trempe des solutions à 0 et 50 % en poids jusqu'à 90 K. Les temps de relaxation structurale augmentent rapidement lorsque la température diminue, si bien qu'il n'est pas possible de relaxer le système durant la longueur de simulation. C'est pourquoi les systèmes sont rapidement hors-équilibre. Cependant, il est possible de sonder les aspects vibrationnels des molécules à une température donnée par des simulations courtes (250 ps). Les procédures de ces trempes sont indiquées dans le tableau 2.14.

Etape	Type	T (K)	Ensemble	Temps
1	Equilibration	300	(N,P,T)	1 ns
$3(i-1)+2$	Thermalisation	$300 - 30(i-1) \rightarrow 300 - 30i$		25 ps
$3(i-1)+3$	Equilibration	$300 - 30i$		50 ps
$3(i-1)+4$	Production	$300 - 30i$		250 ps

TAB. 2.14 – Procédure de trempe des configurations résultant des simulations longues à 0 et 50 % en poids. i désigne le numéro du cycle de refroidissement et est compris entre 1 ($T = 270$ K) et 7 ($T = 90$ K).

2.2 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est notamment utilisée en physique de la matière condensée et en chimie pour l'étude des modes vibrationnels, rotationnels et basses-fréquences d'un système. En physique de l'état solide, la spectroscopie Raman permet de sonder les propriétés électroniques des matériaux (par spectroscopie de résonance) et d'étudier les transitions de phase, car elle est très sensible aux changements de symétrie de la maille élémentaire d'un cristal. Elle permet également d'identifier une molécule, dont les modes de vibration sont très dépendants de la nature des liaisons chimiques. La spectroscopie Raman Basses Fréquences est une sonde structurale indirecte très sensible et rend parfaitement possible l'étude des associations moléculaires via LHs mêmes très faibles. La longueur d'onde de la lumière incidente utilisée s'étend des micro-ondes à l'UltraViolet (UV). Elle est donc une méthode importante pour l'étude des échantillons biologiques, car ceux-ci peuvent être analysés à des longueurs d'onde où l'absorption de l'eau est plus faible que dans l'InfraRouge (IR), *i.e.* dans le visible ou l'UV. En outre, certains modes inactifs en spectroscopie IR sont actifs en Raman. La spectroscopie Raman est donc complémentaire de la spectroscopie IR. L'un de ses inconvénients majeurs provient des phénomènes de fluorescence, qui peuvent interférer et limiter ses domaines d'applications.

2.2.1 Effet Raman conventionnel

Lorsque les photons de fréquence ν_0 d'une lumière monochromatique sont diffusés par une molécule, une petite fraction d'entre eux (10^{-7} - 10^{-6}) est diffusée de manière inélastique, en raison des vibrations inter- et intramoléculaires des molécules. Le processus de diffusion des photons dont la fréquence ν_d est inférieure (respectivement supérieure) à ν_0 est appelée *diffusion Stokes* (respectivement *diffusion anti-Stokes*).

Les règles de sélection de la spectroscopie Raman sont différentes de celle de la spectroscopie infrarouge. En effet, les vibrations moléculaires sont actives par InfraRouge (IR) si elles entraînent un changement de dipôle, alors qu'elles sont actives en Raman si elles impliquent un changement de la polarisabilité de la molécule. C'est la raison pour laquelle les spectroscopies IR et Raman sont complémentaires. Les mouvements vibrationnels des molécules peuvent être des élongations ou flexions de liaisons covalentes, etc. En milieu condensé, les modes de vibrations intermoléculaires donnent également lieu à des bandes dans le spectre Raman.

Un traitement classique est suffisant pour expliquer les principales caractéristiques des spectres Raman. Mais, le traitement quantique est nécessaire pour reproduire les intensités relatives des raies Stokes et anti-Stokes.

Traitement classique

Lorsqu'une molécule est soumise à un champ électrique externe \mathbf{E} , un moment dipolaire induit \mathbf{P} apparaît [188] :

$$\mathbf{P} = \tilde{\alpha}\mathbf{E}, \quad \tilde{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{xy} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{xz} & \alpha_{yz} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.29)$$

où $\tilde{\alpha}$ est le tenseur de polarisabilité de la molécule. Celui-ci dépend des coordonnées des atomes de la molécule, que l'on peut exprimer en *coordonnées normales* de vibration Q_k . Le développement de Taylor de $\tilde{\alpha}$ autour de sa valeur d'équilibre s'écrit :

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (2.30)$$

En limitant le développement de Taylor au premier ordre (approximation *harmonique électrique*), on obtient pour un mode de vibration k donné :

$$(\alpha_{ij})_k = (\alpha_{ij})_0 + (\alpha'_{ij})_k Q_k, \text{ avec } : (\alpha'_{ij})_k = \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 \quad (2.31)$$

Dans le cas où les vibrations de la molécule sont purement harmoniques (hypothèse d'*harmonicité mécanique*), *i.e.* $Q_k = Q_{k0} \cos(2\pi(\nu_k t + \delta_k))$, ν_k et δ_k étant respectivement la fréquence et le facteur de phase du mode k , nous obtenons :

$$\tilde{\alpha}_k = \tilde{\alpha}_0 + \tilde{\alpha}'_k Q_{k0} \cos(2\pi(\nu_k t + \delta_k)) \quad (2.32)$$

où $\tilde{\alpha}'_k$ est le tenseur de composantes $(\alpha'_{ij})_k$.

Si le champ \mathbf{E} oscille à la fréquence ν_0 , $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$

$$\mathbf{P} = \tilde{\alpha}_k \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) = \tilde{\alpha}_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \tilde{\alpha}'_k \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi(\nu_k t + \delta_k)) \quad (2.33)$$

Le moment dipolaire peut être décomposé en trois termes qui varient en : i) $\cos(2\pi\nu_0 t)$, ii) $\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_k)t - \delta_k]$, et iii) $\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_k)t + \delta_k]$.

Le rayonnement incident de fréquence ν_0 induit donc : (i) une radiation à la même fréquence ν_0 que le rayonnement incident, il s'agit d'une diffusion élastique ou *diffusion Rayleigh*, (ii) une radiation à $(2\pi(\nu_0 - \nu_k))$, c'est la *diffusion Raman Stokes* et (iii) une radiation à $(2\pi(\nu_0 + \nu_k))$, c'est la *diffusion Raman anti-Stokes*. Ces différents types de diffusion sont représentés dans la figure 2.15.

Si l'on ne considère pas l'hypothèse de l'harmonicité électrique, alors le développement de Taylor de α_{ij} doit être poussé plus loin et il apparaît des termes en $Q_k Q_l$ qui donnent des raies de combinaison ou des harmoniques (*e.g.* $\nu_0 - \nu_k - \nu_l$, $\nu_0 - 2\nu_k$). De même, si l'hypothèse d'harmonicité mécanique n'est pas valable, on obtient également des harmoniques et des raies de combinaison, c'est-à-dire que les coordonnées normales Q_k ne dépendent pas seulement de $\cos(2\pi\nu_k t)$, mais également de termes en $\cos(4\pi\nu_k t)$, etc. (harmoniques) et en $\cos(2\pi\nu_k t)\cos(2\pi\nu_l t)$, etc. (combinaisons). Ces raies d'ordre supérieur ont souvent des intensités très faibles dans les spectres Raman.

A titre d'exemple, la figure 2.16 indique les modes normaux de vibration d'une molécule d'eau isolée et les fréquences associées.

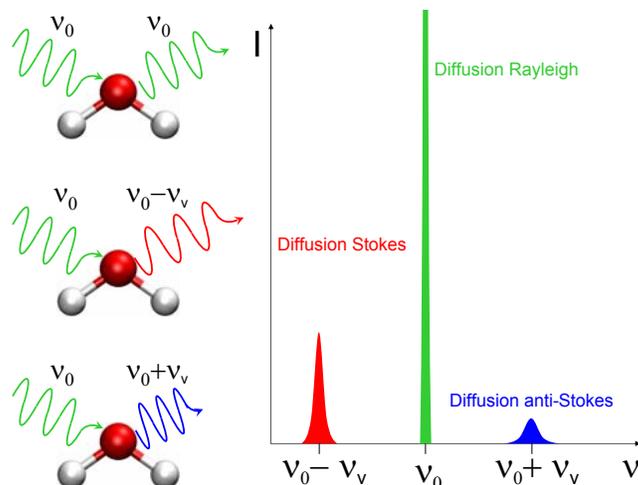


FIG. 2.15 – Représentation schématique de la diffusion d'un photon incident de fréquence ν_0 par une molécule d'eau. Dans la plupart des cas, le photon diffusé conserve une fréquence ν_0 identique à celle du photon incident (diffusion élastique ou Rayleigh). Cependant, en raison des mouvements de vibration intra- ou intermoléculaire, une petite fraction des photons incidents est diffusée à une fréquence $\nu_0 - \nu_v$ inférieure à ν_0 (diffusion Stokes) ou à une fréquence $\nu_0 + \nu_v$ supérieure à ν_0 (diffusion anti-Stokes). L'intensité de la diffusion Rayleigh est donc beaucoup plus élevée que celle des diffusions Stokes et anti-Stokes.

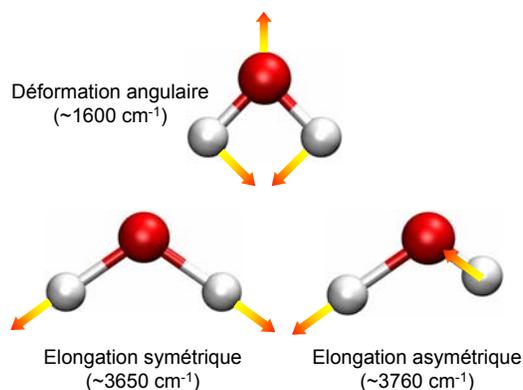


FIG. 2.16 – Modes normaux de vibration de l'eau isolée. Ces modes résultent de (i) la déformation angulaire de l'angle de valence H-O-H, (ii) l'élongation symétrique des liaisons OH, et (iii) l'élongation asymétrique des liaisons OH. Ces modes sont modifiés par la présence de LHs en phase condensée.

Traitement quantique

Le traitement classique ne permet pas de reproduire les intensités relatives des raies Stokes et anti-Stokes. Pour cela, il faut décrire l'effet Raman dans le formalisme quantique. Dans celui-ci, l'énergie vibrationnelle E_v d'une molécule est discrétisée en niveaux d'énergie et vaut, dans l'approximation harmonique [188] :

$$E_v = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (2.34)$$

où h est la constante de Planck, v le nombre quantique de vibration de la molécule. L'interaction entre un photon d'énergie $h\nu$ et une molécule dans un niveau d'énergie donné engendre des transitions qui conduisent à des phénomènes dont [188] :

- l'absorption infrarouge (figure 2.17a)
- la diffusion Rayleigh (figure 2.17b)
- la diffusion Raman Stokes (figure 2.17c)
- la diffusion Raman anti-Stokes (figure 2.17d)
- la fluorescence (figure 2.17e)

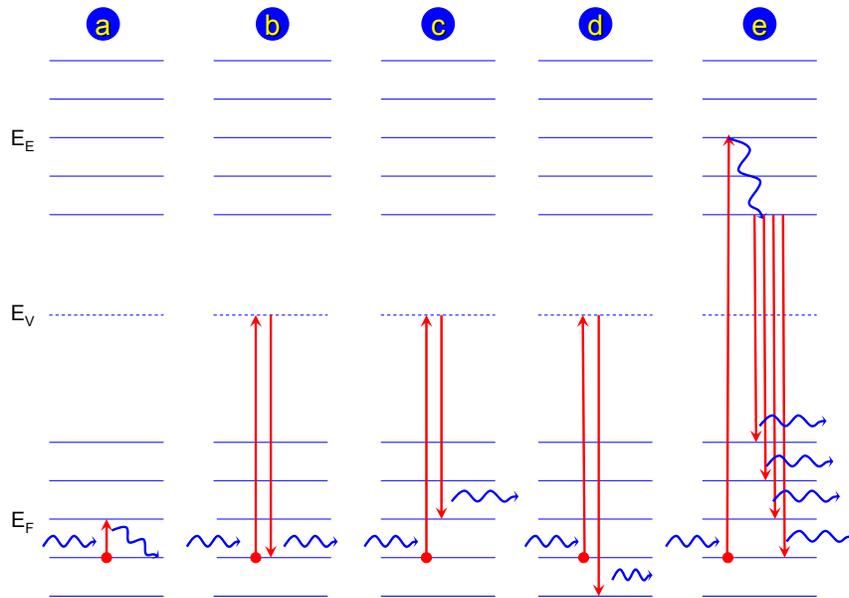


FIG. 2.17 – Représentation schématique de différentes transitions entre niveaux d'énergie d'une molécule donnée. Les états fondamental, virtuel et excité sont désignés respectivement par E_F , E_V , et E_E . (a) Absorption infrarouge, (b) Diffusion Rayleigh, (c) Diffusion Stokes, (d) Diffusion anti-Stokes, (e) Fluorescence.

Si la fréquence d'énergie du photon incident ν_0 est de l'ordre de ν_v , alors celui-ci induit des transitions vibrationnelles (et/ou rotationnelles) $v \rightarrow v + 1$. Il s'agit de l'absorption infrarouge (figure 2.17a). La molécule revient ensuite dans son état fondamental par relaxation vibrationnelle, sans émettre de photon. Si la fréquence d'énergie du photon incident ν_0 est très supérieure à ν_v , la molécule est excitée transitoirement dans un

état virtuel et revient dans l'état réel (ou fondamental). On montre que seuls les niveaux $v - 1$ et $v + 1$ sont possibles. La diffusion Rayleigh correspond à la diffusion de photons d'énergie $h\nu_0$ (figure 2.17b), la diffusion Stokes à des photons d'énergie $h(\nu_0 - \nu_v)$ (figure 2.17c) et la diffusion anti-Stokes à des photons d'énergie $h(\nu_0 + \nu_v)$ (figure 2.17d). Enfin, si la fréquence ν_0 est suffisamment élevée, la molécule est susceptible d'être dans son premier état excité. En revenant dans son état fondamental, elle émet un photon. Il s'agit du processus d'émission par fluorescence auquel de nombreux échantillons donnent lieu (figure 2.17e). Le spectre de ce processus est composé de bandes intenses et très larges, qui gênent l'observation du spectre Raman auquel il se superpose. Il est possible de limiter la fluorescence d'un échantillon en diminuant la fréquence du photon incident [188].

L'intensité de la diffusion Stokes I_S est bien plus intense que celle de la diffusion anti-Stokes I_A . Le rapport d'intensité est donné par la relation [188] :

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(\frac{-h\nu_v}{k_B T} \right) \quad (2.35)$$

où k_B et T désignent respectivement la constante de Boltzmann et la température de l'échantillon. I_A décroît donc rapidement par rapport à I_S , dès que $|\nu_0 - \nu_v|$ croît. C'est la raison pour laquelle c'est généralement la partie Stokes du spectre qui est analysée, car elle est plus intense.

Hormis l'effet Raman décrit ci-dessus (dit effet Raman classique ou conventionnel), d'autres effets Raman sont également observés (effets Raman de résonance, exalté de surface, et non-linéaires) [188].

2.2.2 Le spectromètre Raman

Le spectromètre Raman utilisé lors des expériences est le modèle Dilor XY 1800 (voir figure 2.18). Il est équipé d'un laser à mélange de gaz Argon-Krypton ionisé qui permet de travailler avec des longueurs d'ondes incidentes λ comprises entre 488 et 647,1 nm. Le spectromètre comprend des systèmes d'analyse spectrale, de détection, et d'acquisition. L'échantillon peut être analysé soit en mode macroscopique, soit en mode microscopique, modes qui diffèrent par le volume de l'échantillon analysé ($\sim \text{cm}^3$ et $\sim \mu\text{m}^3$ respectivement). La distance focale du spectromètre est de 800 mm et le système de dispersion de la lumière est constitué de trois réseaux de diffraction (spectromètre + prémonochromateur) de 1800 traits/mm autorisant une analyse très basse fréquence, et donc l'étude des mouvements intermoléculaires, avec une résolution fonction de la longueur d'onde et de la gamme de fréquences considérées. La détection du signal Raman s'effectue par un Dispositif à transfert de Charges (CCD, pour « Charge Coupled Device ») constituée d'une barrette de 1024 photodiodes, refroidie en permanence par de l'azote liquide. L'acquisition est assurée par le logiciel LABSPEC. Un dispositif de régulation en température permet d'analyser les échantillons à des températures comprises entre 100 et 500 K environ avec une grande précision ($\sim 0,1$ K). La vitesse de chauffe ou de refroidissement maximale est de l'ordre de 10 K/min [189, 190].



FIG. 2.18 – Spectromètre Dilor XY du laboratoire LDSMM.

2.2.3 Spectres Raman aux basses fréquences

Les spectres Raman sont généralement présentés en fonction du nombre d'onde de vibration de la molécule $\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$ du rayonnement, plutôt que de sa fréquence ν . Cette grandeur est égale à l'écart entre les nombres d'onde de la raie Raman et de la raie Rayleigh. Il s'agit donc d'un nombre d'onde relatif, qui présente l'avantage d'être caractéristique de la molécule étudiée et indépendant du choix de la raie excitatrice de nombre d'onde $\bar{\nu}_0$ [188].

Le spectre Raman à basse fréquence des systèmes désordonnés (amorphes solides, liquides, cristaux à désordre orientationnel, protéines, etc.) se décompose en deux contributions qui se superposent dans les liquides moléculaires fragiles [109] :

- (i) la diffusion quasi-élastique (QES pour « Quasi-Elastic Scattering ») qui domine le spectre pour $\nu < 15 \text{ cm}^{-1}$ et dépend fortement de la température. Elle résulte de fluctuations rapides.
- (ii) la diffusion inélastique, où apparaît notamment le pic boson vers $15\text{-}50 \text{ cm}^{-1}$, qui proviendrait de vibrations collectives.

Si l'on souhaite étudier la densité d'états vibrationnels (DEV) des échantillons, il est nécessaire de transformer le spectre. En effet, l'intensité du spectre Raman est reliée à la DEV selon la relation [191] :

$$I(\bar{\nu}) = C(\bar{\nu})g(\bar{\nu})\frac{n(\bar{\nu}) + 1}{\bar{\nu}} \quad (2.36)$$

où $I(\bar{\nu})$ est l'intensité du spectre Raman de la diffusion Stokes, $C(\bar{\nu})$ le coefficient de couplage lumière-vibration, dont dépendance en $\bar{\nu}$ n'est pas connue, $g(\bar{\nu})$ la DEV, et $n(\bar{\nu})$ le facteur de population de Bose. Différentes études suggèrent que $C(\bar{\nu}) \sim \bar{\nu}$ dans la fenêtre de fréquences du pic boson, soit $g(\bar{\nu}) \sim \frac{I(\bar{\nu})}{[n(\bar{\nu})+1]}$ [191].

Différentes représentations du spectre Raman sont couramment utilisées :

- l'intensité normalisée [109] : $I_n(\bar{\nu}) = \frac{I(\bar{\nu})}{\bar{\nu}[n(\bar{\nu})+1]}$

- la susceptibilité dynamique [192]: $\chi''(\bar{\nu}) = \frac{I(\bar{\nu})}{n(\bar{\nu})+1}$
- la représentation réduite [193]: $R(\bar{\nu}) = \frac{\bar{\nu}I(\bar{\nu})}{n(\bar{\nu})+1}$

Ces différentes transformations sont représentées dans le cas de l'eau pure à 295 K dans la figure 2.19, où la composante quasi-élastique a été soustraite au spectre Raman initial. L'intensité normalisée est davantage adaptée à l'étude de la contribution quasi-élastique du spectre Raman, et donc aux aspects relaxationnels, alors que la susceptibilité dynamique est appropriée pour l'étude des composantes vibrationnelles du spectre, et notamment du pic boson.

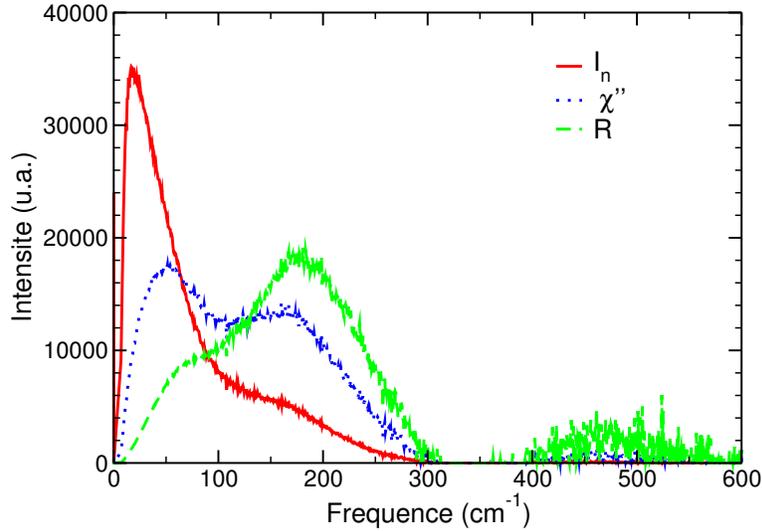


FIG. 2.19 – Différentes représentations I_n , χ'' , et R du spectre Raman aux basses fréquences de l'eau pure à 295 K. I_n , χ'' , et R désignent respectivement l'intensité normalisée, la susceptibilité dynamique, et la représentation réduite des spectres, et sont définies dans le texte. La composante quasi-élastique a été soustraite au spectre Raman initial afin de ne représenter que les composantes purement vibrationnelles.

2.2.4 Systèmes étudiés par spectroscopie Raman

Traitement préliminaire des spectres Raman basses-fréquences

Le spectre Raman basses fréquences est composé d'une contribution quasi-élastique, qui reflète les mouvements de relaxation tels que des changements de conformations moléculaires, et de contributions vibrationnelles telles que le pic boson, les bandes d'élongation des LHs, etc. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux composantes vibrationnelles des spectres. Mais, la contribution quasi-élastique se superpose en partie au pic boson, de sorte que si nous transformons directement l'ensemble du spectre Raman brut en susceptibilité, la forme et la position du pic boson est modifiée. Afin de séparer la composante relaxationnelle des composantes vibrationnelles, nous avons dans un premier temps convertit l'intensité Raman en intensité réduite ou normalisée $I_n(\nu)$ (voir section 2.2.3). Cette représentation favorise la composante quasi-élastique du spectre Raman, qui est généralement bien représentée par une fonction lorentzienne, alors que le pic boson est

bien décrit par une fonction log-normale. Nous avons alors ajusté les spectres Raman dans cette représentation, qui conduit aux meilleurs résultats, puis soustrait la contribution relaxationnelle. L'intensité réduite résultante a ensuite été transformée en susceptibilité $\chi''(\nu) = \nu I_n(\nu)$ pour une analyse plus précise des contributions vibrationnelles.

Systèmes étudiés

a) Solutions binaires

Les solutions sucre/eau de tréhalose, de maltose et de sucrose ont été préparées en dissolvant dans de l'eau doublement distillée respectivement les phases cristallines du tréhalose dihydrate, du maltose monohydrate et du sucrose anhydre fournis par Fluka. Les mesures ont été effectuées à différentes concentrations massiques de sucres. Les solutions sucrose/eau ont été analysé pour des concentrations allant de 5 à 60 % pds, alors que la concentration maximale de tréhalose et de maltose a été de 50 % pds de manière à obtenir des mélanges parfaitement homogènes. Les mélanges ont été versés dans des cellules de quartz de dimension 10 x 5mm. D'autre part, nous avons utilisé un rayon de longueur d'onde incidente 514,5 nm issu d'un laser à mélange argon-krypton. Les spectres Raman ont été mesurés en rétro-diffusion grâce au spectromètre Dilor XY du laboratoire, qui est équipé d'un dispositif à transfert de charges (CCD) refroidi à l'azote liquide. Les fentes du spectromètre ont été maintenues à une ouverture de 300 μm , qui conduit à une résolution d'environ 2,5 cm^{-1} dans la gamme de fréquences 2500-4000 cm^{-1} . Nous avons étudié systématiquement enregistré le spectre sur la gamme de fréquence 5-4000 cm^{-1} à 295 K.

b) Solutions ternaires

Le lysozyme de blanc d'oeuf de poulet a été fourni par Sigma. Les échantillons des sucres sont les mêmes que ceux des solutions binaires. Les solutions binaires sucre/eau à la concentration massique en sucre désirée ont été préparées dans un premier temps, puis la protéine a été ajoutée. Des concentrations massiques jusqu'à 40 % pds en sucre ont été analysées. Les mélanges contenant la protéine ont été agités dans un agitateur Eppendorf à environ 298 K à environ 1000 tours/min. Les mélanges sucre/eau ont été préparés en utilisant de l'eau pure doublement distillée. La concentration en protéine des mélanges ternaires est d'environ 14,58 10^{-3} mol/L (soit ~ 20 % pds), de sorte que le lysozyme soit entouré d'environ 10 couches d'hydratation dans l'eau pure et que les interactions directes protéine-protéine soient limitées. Les solutions ont été versées dans les mêmes cellules de quartz que le mélanges binaires. Des expériences de contrôle ont été effectuées à l'aide de capillaires en verre scellés Mark-Rohrchen d'un diamètre d'environ 0,7 mm. Les échantillons ont été placés dans le cryostat Oxford du spectromètre Raman permettant un contrôle précis des fluctuations de température de l'ordre de 0,1 K. Plusieurs accumulations ont été enregistrées dans la région spectrale Amide I de la protéine avec une résolution d'environ 2 cm^{-1} dans la gamme 293-383 K. Chaque spectre a été corrigé de la fluorescence en soustrayant un polynôme de second ordre au spectre. L'ensemble des ajustements des spectres a été effectué à l'aide du logiciel PeakFit.

Chapitre 3

Solutions sucre/eau

De nombreuses études expérimentales [77, 79–81, 84, 89, 92, 114, 142, 194–199] et numériques [78, 85–87, 178, 197, 200–205] ont été menées sur les mélanges disaccharide/eau.

En particulier, la température de transition vitreuse T_g des sucres varie beaucoup selon les études, car elle dépend beaucoup des conditions de préparation de l'échantillon, et notamment de la quantité d'eau résiduelle [99]. Ainsi, la T_g du tréhalose est comprise entre 350 et 391 K [81, 90, 94–97], celle du maltose entre 346 et 374 K [81, 94–96, 98, 99], et celle du sucrose entre 330 et 348 K [81, 94, 95, 98, 100, 101]. Les diagrammes d'état des solutions tréhalose/eau et sucrose/eau sont présentés ci-dessous.

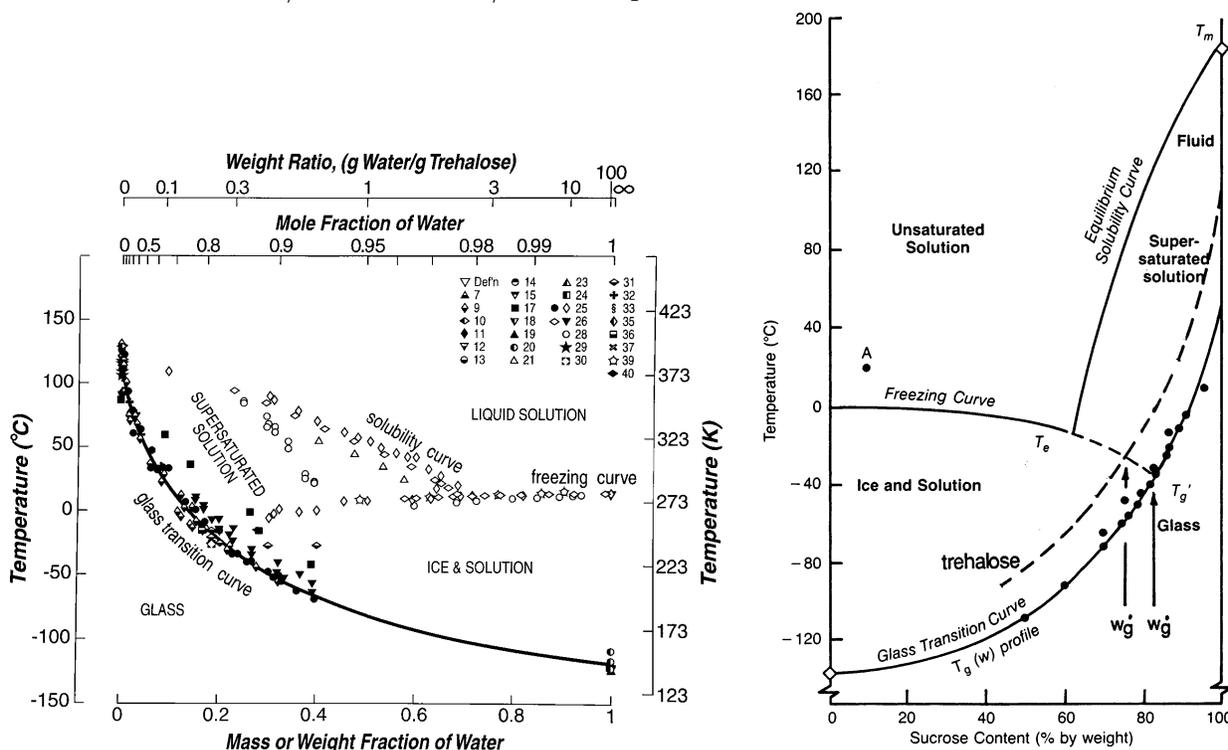


FIG. 3.1 – Diagrammes d'état des solutions tréhalose/eau (d'après réf. [206]) et sucrose/eau (d'après réf. [207]).

Nous n'avons considéré que la gamme [0-66] % pds de concentration en sucre, car les temps de relaxation des systèmes plus concentrés sont trop élevés pour que nous puissions les étudier avec des temps de calculs raisonnables.

3.1 Structure

3.1.1 Facteurs de structure expérimentaux et simulés

Afin de décrire la structure des solutions disaccharide/eau, nous avons calculé le facteur de structure statique $S(\mathbf{Q})$, qui peut être déduit des expériences de diffusion neutronique cohérente. $S(\mathbf{Q})$ s'écrit :

$$S(\mathbf{Q}) = \langle |\rho_{\mathbf{Q}}|^2 \rangle \quad (3.1)$$

$$\rho_{\mathbf{Q}}(t) = \sum_{\alpha} b_{\alpha,coh} e^{i\mathbf{Q}\mathbf{r}_{\alpha}(t)} \quad (3.2)$$

où $\rho_{\mathbf{Q}}$ est le corrélateur de densité. $b_{\alpha,coh}$ et \mathbf{r}_{α} correspondent respectivement à la longueur de diffusion cohérente et à la position de l'atome α . La somme s'effectue sur tous les atomes α du système. Une moyenne sur tous les vecteurs de diffusion \mathbf{Q} de norme $|\mathbf{Q}|$ est effectuée pour obtenir $S(Q)$. Les facteurs de structure statiques partiels $S_{HH}(Q)$ et $S_{XX}(Q)$ sont calculés en incluant respectivement l'ensemble des atomes d'hydrogène ou uniquement les atomes lourds de l'eau et des sucres.

La figure 3.2 présente une comparaison des facteurs de structure statiques partiels $S_{HH}(Q)$ et $S_{XX}(Q)$ des solutions aqueuses tréhalose/eau et de l'eau pure obtenus expérimentalement par diffraction de neutrons [208, 209] avec ceux obtenus dans la présente étude de DM. Les $S_{HH}(Q)$ et $S_{XX}(Q)$ des solutions aqueuses de maltose et de sucrose sont également inclus pour comparaison, bien qu'aucune donnée expérimentale ne soit disponible.

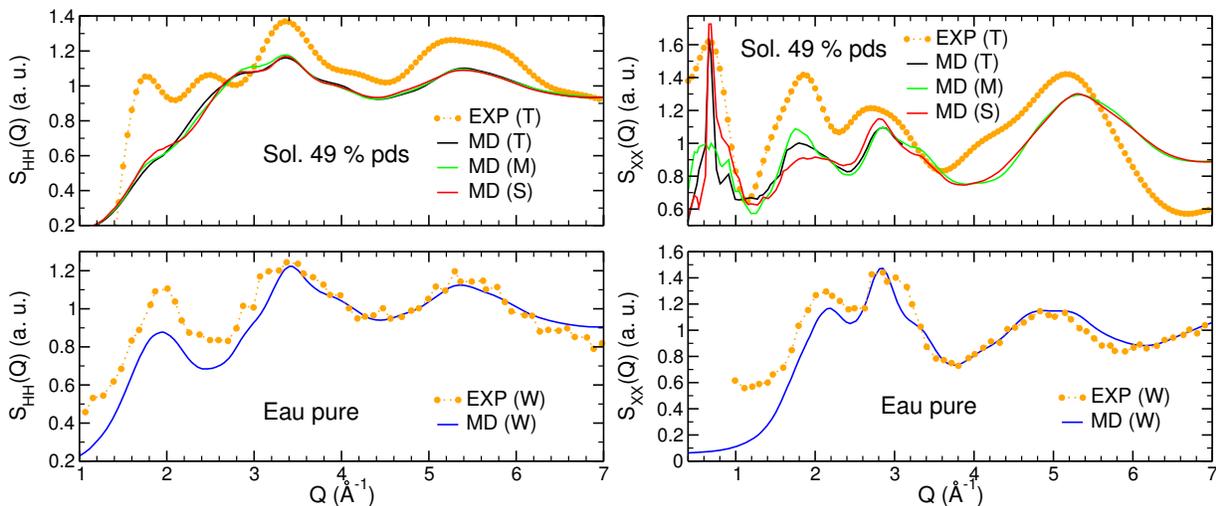


FIG. 3.2 – Facteurs de structure statiques partiels des atomes d'hydrogène $S_{HH}(Q)$ (a) et des atomes lourds $S_{XX}(Q)$ (c) des solutions sucre/eau à 49 % pds obtenus dans notre étude par dynamique moléculaire à 293K et par diffusion neutronique à 300 K (uniquement pour le tréhalose) [208, 209]. Les données de l'eau pure obtenues par simulation de DM et par une expérience de diffraction neutronique [210] sont également représentées ((b) et (d)) à titre comparatif.

L'accord obtenu entre les deux techniques est bon et meilleur pour les $S_{XX}(Q)$ que pour les $S_{HH}(Q)$, particulièrement pour $Q \leq 3 \text{ \AA}^{-1}$. Ceci résulte de la difficulté à reproduire

précisément les positions relatives des atomes d'hydrogène, qui dépendent fortement de l'orientation des molécules d'eau et des groupes hydroxyles des sucres. Le pic observé à $Q \approx 2 \text{ \AA}^{-1}$ pour l'eau pure semble décroître lors de l'ajout des sucres. Ceci pourrait représenter un ordre tétraédrique réduit des molécules d'eau. Néanmoins, aucune différence frappante et significative n'apparaît entre les $S_{HH}(Q)$ des trois solutions des sucres. De manière similaire, la modification du pic observé à $Q \approx 2.2 \text{ \AA}^{-1}$ dans le $S_{XX}(Q)$ de l'eau pure, qui est représentatif des molécules d'eau liées par LHs, pourrait suggérer une diminution de l'ordre tétraédrique de l'eau lorsque la concentration en sucre croît. Les contributions des molécules de sucre sont cependant relativement importantes dans les solutions binaires (les atomes des sucres représentent respectivement environ un tiers et la moitié des atomes considérés pour les calculs des $S_{HH}(Q)$ et des $S_{XX}(Q)$), de sorte que ce genre d'analyse est rendue délicate. Le décalage dans les solutions binaires du pic situé à $Q \approx 2 \text{ \AA}^{-1}$ dans l'eau pure pourrait être attribué aux différences de conformation et de topologie des sucres. Les différences significatives observées dans les trois solutions étudiées pour $Q \leq 1 \text{ \AA}^{-1}$, c'est-à-dire pour des distances de l'ordre des interactions intermoléculaires entre sucres, semblent plus intéressantes, d'autant que la contribution de l'eau est faible dans cette gamme de vecteurs de diffusion. Une étude plus détaillée dans laquelle les contributions respectives de l'eau et des sucres seraient séparées permettrait de sonder leur structure complexe. Nous avons cependant choisi d'étudier les interactions sucre-eau différemment, à travers le réseau de LHs des solutions binaires.

3.1.2 Cristallinité des solutions binaires

Certains auteurs ont suggéré que le riche polymorphisme cristallin du tréhalose pourrait être à l'origine de sa plus grande efficacité de biopréservation par rapport aux autres sucres, dont le maltose et le sucrose [130] (cf page 38). A partir d'expériences de diffusion neutronique, Magazù *et al.* ont récemment montré que le tréhalose possède un caractère plus cristallin que le maltose et le sucrose, qui pourrait fournir un environnement plus rigide pour la protection des systèmes biologiques [114]. En outre, Engelsen *et al.* [177] ont démontré que la forme de l'hydratation du tréhalose en solution diluée ($\approx 4 \%$ pds) ressemble à celui du cristal de tréhalose dihydrate [82]. Inspirés par les résultats de Engelsen *et al.*, nous avons comparés les sites d'hydratation des solutions tréhalose/eau plus concentrées avec ceux de la phase cristalline tréhalose dihydrate. Des fonctions de distribution radiale bidimensionnelle $g(r_1, r_2)$ (définies page 60) ont été calculées. Ces fonctions donnent la probabilité de trouver un atome d'oxygène de l'eau à une distance r_1 et r_2 de deux atomes donnés des sucres, O_2 et O'_2 (cf figure 2.10), par rapport à la probabilité attendue pour une distribution aléatoire. La figure 3.3 (a) montre la distribution de paires normalisée $g(r_1, r_2)$ de la solution tréhalose/eau à 49 % pds à 293 K. Il apparaît clairement que les molécules d'eau sont localisées dans des régions particulières de la distribution 2D, dont le maximum correspond aux sites d'hydratation du cristal dihydrate. Plus particulièrement, quatre sites ressortent : O_{W1} , O_{W2} , $O_{W1(II)}$ et $O_{W1(I+c)}$, suivant la même nomenclature que dans la référence [177], où I et II désignent respectivement les opérations de symétrie (x, y, z) et $(-x + \frac{1}{2}, -y, z)$ du tréhalose dihydrate, de symétrie $P2_12_12_1$. Un bon accord est obtenu avec la distribution $g(r_1, r_2)$ correspondante de la référence [177] pour les solutions à 4 % pds, aussi bien avec les modèles de l'eau TIP3P et SPC/E. La symétrie observée dans la forme de l'hydratation du tréhalose est cohérente avec la symétrie quasi- C_{2V} obtenue dans le cristal dihydrate [82]. Ceci implique que la conforma-

tion la plus probable du tréhalose en solution est assez proche de la conformation dans le cristal dihydrate, comme démontré dans les références [177,178]. La dépendance en concentration de la densité de l'eau à 293 K est décrite dans la figure 3.3 (b), qui montre la projection de $g(r_1, r_2)$ à $r_2 = 2.78 \pm 0.5 \text{ \AA}$ *i.e.* dans la région où la molécule d'eau O_W1 du cristal dihydrate devrait se situer.

La localisation des molécules d'eau dans les sites d'hydratation O_W1 et O_W2 (non représentée) du cristal de tréhalose dihydrate augmente significativement avec la concentration en tréhalose. Ce résultat révèle que la position des molécules d'eau est de plus en plus restreinte, en raison des contraintes stériques imposées par la présence des sucres. Il conforte clairement les résultats obtenus par Magazù *et al.* sur la cristallinité des solutions tréhalose/eau [114]. Il convient de souligner que des résultats comparables ont été obtenus pour les solutions maltose/eau pour lesquelles les molécules sont préférentiellement localisées dans le site d'hydratation du cristal monohydrate [83]. La localisation des molécules d'eau constatée dans notre étude est cohérente avec la suggestion d'Aldous *et al.* [129] selon laquelle l'état dihydrate du tréhalose agit comme une « éponge » vis-à-vis des molécules d'eau en les piégeant. En effet, la surface d'un verre de tréhalose exposée à l'air pourrait se transformer assez aisément en cristal dihydrate, stabilisant ainsi davantage la matrice de sucre. Une petite quantité d'eau absorbée pourrait au contraire plastifier la matrice de sucrose, car le sucrose ne cristallise sous aucune forme cristalline hydratée. Le maltose serait lui intermédiaire entre le tréhalose et le sucrose car il peut exister sous une forme cristalline monohydrate. Les propriétés d'hydratation des sucres vont être analysées dans ce qui suit.

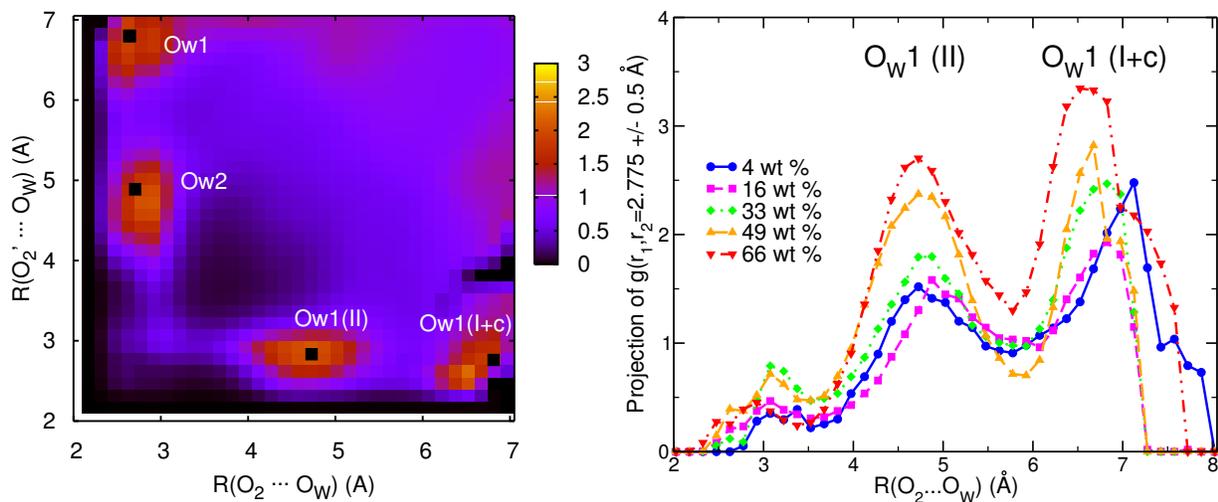


FIG. 3.3 – (a) Distribution de paires normalisée $g(r_1 = R(O_2 \cdots O_W), r_2 = R(O'_2 \cdots O_W))$ de la solution tréhalose/eau à 49 % pds à 293 K. r_1 et r_2 correspondent aux distances entre les atomes d'oxygène de l'eau et les atomes d'oxygène O_2 et O'_2 des molécules de tréhalose. Les carrés noirs indiquent la position des deux molécules du cristal de tréhalose dihydrate, O_W1 et O_W2 . Les symétries sont indiquées entre parenthèses (voir le texte et la référence [177]). (b) Projection de $g(r_1 = R(O_2 \cdots O_W), r_2 = R(O'_2 \cdots O_W))$ à $r_2 = 2.78 \pm 0.5 \text{ \AA}$ pour les différentes solutions tréhalose/eau à 293 K.

3.1.3 Nombres d'hydratation

Le tréhalose, le maltose et le sucrose ayant le même nombre de groupes hydroxyles, le nombre moyen de molécules d'eau liées par LHs aux disaccharides permet de quantifier l'interaction sucre-eau. Ce paramètre est appelé *nombre d'hydratation* n_H dans notre étude, bien que ce terme désigne souvent le nombre total de molécules d'eau situées dans la sphère de solvatation des solutés [177].

Deux critères géométriques couramment utilisés dans diverses études de dynamique moléculaire [78, 178] ont été définis et désignés I et II par la suite. Dans notre étude, deux molécules sont considérées liées par LH si la distance oxygène-oxygène d_{OO} est inférieure à 3,4 Å et l'angle O-H...O est respectivement supérieur à 160° ou 120° pour les critères I et II. Le critère I [78] est associé aux LHs relativement linéaires (fortes), alors que le critère II, moins strict, inclus également les LHs plus faibles car déformées ou bifurquées. En raison de la forte dépendance angulaire de l'énergie d'une LH, ces deux critères sont susceptibles de sonder différentes classes de LHs et ont donc été utilisés dans notre étude. D'ailleurs, nous n'avons pas considéré de critère énergétique en raison de la difficulté de définir sans la moindre ambiguïté les LHs eau-soluté, comme l'ont souligné Brady *et al.* [200].

La figure 3.4 montre le nombre d'hydratation n_H des trois disaccharides étudiés en fonction de leur concentration pour $T = 273$ et 373 K. Nous constatons clairement que n_H décroît de manière monotone d'un facteur proche de deux pour les deux critères lorsque la concentration croît de 4 à 66 % pds. Dans les solutions les plus diluées, les disaccharides sont entourés de plusieurs couches d'hydratation et leur structure résulte principalement de leur interaction avec l'eau. Aux concentrations plus élevées, les disaccharides commencent à partager les molécules d'eau et à former des LHs sucre-sucre. Le tableau 3.1 présente les statistiques des LHs sucre-sucre (selon le critère II) à $T = 293$ K. Comme attendu, le nombre moyen normalisé de LHs intermoléculaires sucre-sucre croît constamment avec la concentration. Il est important de souligner les différences significatives entre les sucres. En effet, le sucrose et le maltose forment respectivement le plus faible et le plus grand nombre de LHs dans le domaine de concentration où les LHs intermoléculaires deviennent significatives, *i.e.* 33-66 % pds. Le tréhalose forme légèrement moins de LHs intermoléculaires que le maltose. Ceci a des conséquences directes sur les agrégats de sucres, comme nous le verrons dans la section 3.1.11.

Dans la figure 3.4, le tréhalose apparaît plus hydraté que le maltose et le sucrose, quelle que soit la concentration et le critère géométrique considérés, en bon accord avec les résultats de Ekdawi-Sever *et al.* [86]. Ils ont obtenu des résultats similaires en comparant le sucrose et le tréhalose à respectivement 353 et 360 K dans le domaine de concentration 6-90 % pds, et suggèrent que les LHs intramoléculaires sont à l'origine de la différence observée entre les deux sucres. Le tableau 3.1 confirme formellement cette hypothèse. Il est de fait bien connu que le maltose et le sucrose forment des LHs intramoléculaires dans leurs phases cristallines contrairement au tréhalose [82, 83, 184] (cf figure 1.17, page 1.17). Le maltose β cristallin forme une liaison intramoléculaire entre $O_2 - HO_2$ et O'_3 . Deux LHs intramoléculaires $O_{6f} - HO_{6f} \cdots O_{5g}$ et $O_{1f} - HO_{1f} \cdots O_{2g}$ sont présentes dans le sucrose cristallin (voir figure 2.10). Par conséquent, les centres des LHs des disaccharides (*i.e.* les atomes d'hydrogène hydroxyles et d'oxygène) impliqués dans les LHs intramoléculaires ne restent plus disponibles pour former des LHs avec les disaccharides. Le grand nombre de LHs intramoléculaires du sucrose par rapport au tréhalose et au maltose pour les solutions à 4 % pds explique pourquoi son nombre d'hydratation est nettement plus petit, alors que

ceux du maltose et du tréhalose sont relativement similaires. En outre, un croisement des courbes d'hydratation du maltose et du sucrose est constaté pour les températures inférieures à 353 K, comme il est manifeste dans la figure 3.4 à $T = 273$ K. Cette particularité pourrait provenir de dépendances en concentration différentes du nombre relatif de LHs intra- et intermoléculaires entre le maltose et le sucrose. La différence entre les rapports $\langle n_{HB} \rangle_{inter}/N_S$ du maltose et du sucrose augmente abruptement pour les concentrations supérieures à 33 % pds. Simultanément, la différence entre les rapports $\langle n_{HB} \rangle_{intra}/N_S$ du maltose et du sucrose change modérément. L'effet global est donc une diminution plus prononcée des nombres d'hydratation du maltose par rapport à ceux du sucrose lorsque la concentration en disaccharide croît.

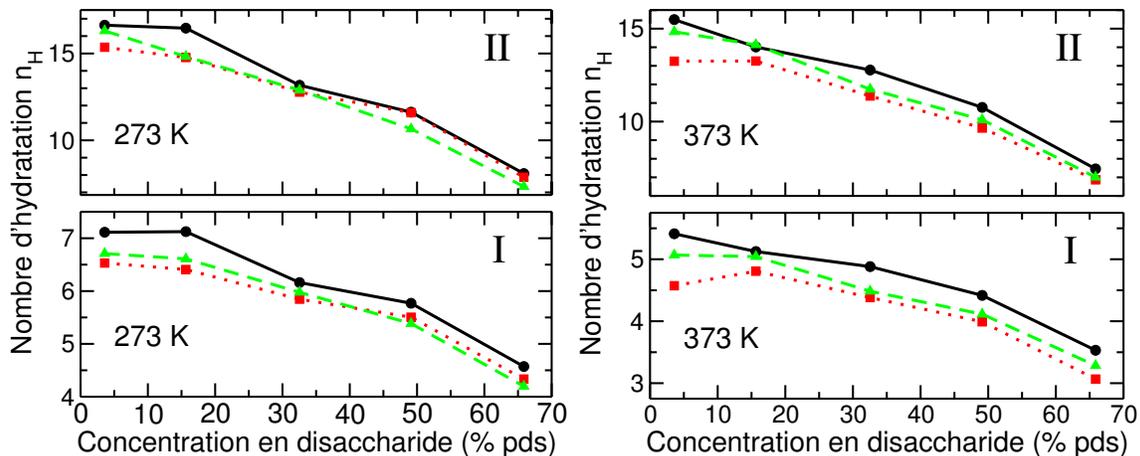


FIG. 3.4 – Nombre d'hydratation n_H du tréhalose (trait continu noir), du maltose (tirets verts) et du sucrose (pointillés rouges) en fonction de la concentration à deux températures (273 K et 373 K), pour les deux critères géométriques I et II (voir le texte pour leur définition).

TAB. 3.1 – Nombre moyen normalisé de LHs sucre-sucre intermoléculaires $\langle n_{HB} \rangle_{inter}/N_S$ et intramoléculaires $\langle n_{HB} \rangle_{intra}/N_S$ pour les solutions sucre/eau à $T = 293$ K pour les différentes concentrations ϕ en tréhalose T, en maltose M et en sucrose S (les crochets $\langle \rangle$ indiquent la moyenne en temps sur toutes les configurations et N_S désigne le nombre de sucres dans la boîte de simulation.)

ϕ (% pds)	$\langle n_{HB} \rangle_{inter}/N_S$			$\langle n_{HB} \rangle_{intra}/N_S$		
	T	M	S	T	M	S
4	0,000	0,000	0,000	0,304	0,739	2,490
16	0,153	0,361	0,266	0,146	0,455	1,962
33	0,767	0,853	0,435	0,141	0,373	2,058
49	1,322	1,942	0,738	0,451	0,346	2,210
66	2,689	2,985	2,293	0,175	0,400	1,979

Les nombres d'hydratation des solutions à 4 % pds à $T = 293$ K sont donnés dans le tableau 3.2. Le tréhalose se lie clairement par LHs à un plus grand nombre de molécules

d'eau, de sorte que la structure de l'eau est davantage affectée par ce sucre que par les deux autres, comme il sera montré dans les sections suivantes consacrées à la structure de l'eau. Les nombres d'hydratation calculés dans cette étude pourraient dépendre des régions du paysage énergétique des sucres explorées pendant la durée des simulations. Pour des raisons de temps de calcul, il n'a pas été possible d'explorer chacun des minima des cartes adiabatiques (Φ, Ψ) des sucres (voir section 3.1.9 de ce chapitre). En outre, seule la forme anomérique β des sucres a été considérée, alors qu'un équilibre s'établit en réalité entre les formes α et β . Plusieurs nombres d'hydratation de la littérature obtenus par des simulations numériques ou par des expériences sont reportés dans le tableau 3.2 pour comparaison. Nos présents résultats sont relativement en bon accord avec ces études antérieures, et confirment que le tréhalose possède toujours le nombre d'hydratation le plus élevé. Les écarts peuvent résulter des définitions très variées du nombre d'hydratation trouvées dans la littérature et les divers modèles et approches utilisés pour les déduire des mesures ultrasoniques, calorimétriques, densitométriques, viscosimétriques et d'activité de l'eau. Néanmoins, les deux critères géométriques employés dans cette étude semblent bien appropriés pour distinguer parmi la première sphère d'hydratation les molécules d'eau fortement liées par LHs aux sucres (critère I) de celles liées plus faiblement (critère II). Ces deux types de LHs pourraient être à l'origine des différences observées expérimentalement.

TAB. 3.2 – *Nombres d'hydratation n_H du tréhalose, du maltose et du sucrose dans les solutions à 4 % pds, calculés dans notre étude en utilisant les modèles de l'eau SPC/E et TIP3P à $T = 293$ K. Les nombres d'hydratation obtenus dans d'autres simulations numériques (*, $d_{OO} \leq 3.5$ Å et **, $d_{OO} \leq 2.8$ Å) et expériences (mesures acoustiques [77, 84], de viscosité [84] et calorimétriques [79, 211]) sont également indiqués pour comparaison.*

n_H	SPC/E	TIP3P	autres MDs	Expériences
Tréhalose	6.5 (I)	6.1 (I)	7.8*[177], 13.4[85], 18.9[202]	7.95[211], 10.9[79], 12.1[84]
	16.4 (II)	16.8 (II)	22.5[178], 27.5**[177]	15.2[84], 15.3[77]
Maltose	6.5 (I)	5.7 (I)	10-11[212], 22.6[200]	6.50[211], 9.5[79], 11.7[84]
	16.1 (II)	16.1 (II)		14.2[84], 14.5[77]
Sucrose	6.2 (I)	5.6 (I)	7.0*[213], 11.7[86], 24.7**[213]	6.33[211], 8.5[79], 11.2[84]
	14.8 (II)	15.1 (II)		13.8[84], 13.9[77]

3.1.4 Tessellation de Voronoi

Nous avons étudié les distributions des volumes de Voronoi, susceptibles de fournir des informations utiles sur l'environnement moléculaire local ou sur le volume libre local. Cette technique a été récemment utilisée avec succès par Starr *et al.* [214] sur un fondu de polymère formateur de verre. Nous avons calculé ce paramètre pour quantifier les changements de la structure de l'eau dans les solutions disaccharide/eau par rapport à l'eau pure et pour sonder le proche voisinage des solutés. Les distributions des volumes de Voronoi de l'eau P_W en présence des trois sucres sont indiquées dans la figure 3.5.

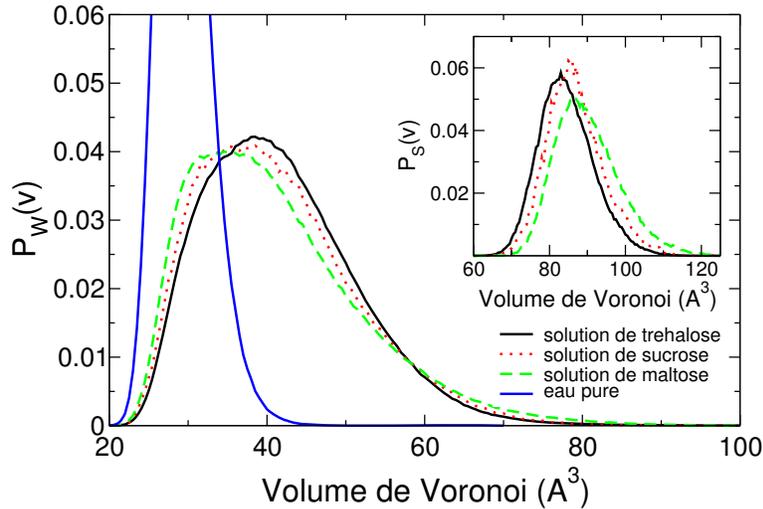


FIG. 3.5 – Distributions P_w des volumes des cellules de Voronoi de l'eau et des sucres P_s (en insert) dans les solutions aqueuses de disaccharides à 49 % pds à $T = 293$ K. La distribution P_w de l'eau pure est indiquée comme référence. Pour des raisons de clarté, sa courbe (en bleu) a été tronquée (l'amplitude maximale vaut environ 0,13) afin de mettre en évidence les différences entre les P_w des trois solutions binaires.

Ces distributions ont été calculées pour les solutions binaires à 49 % pds et à $T = 293$ K. Les distributions P_w sont nettement décalées vers les plus grands volumes et élargies par rapport à la distribution de l'eau pure (en bleu). Ces deux résultats proviennent de l'hétérogénéité des solutions binaires résultant de l'inclusion des sucres. Il s'en suit à la fois une dilatation et une distorsion du réseau de LHs de l'eau. En outre, la distribution P_w de la solution tréhalose/eau est davantage décalée que les deux autres. Ainsi, le réseau de LHs de l'eau est plus perturbé par le tréhalose que par les deux autres disaccharides. Comme il a été montré précédemment, un plus grand nombre de molécules d'eau est affecté par le tréhalose, en raison de son plus grand nombre d'hydratation n_H . Un autre fait important est révélé dans l'insert de la figure 3.5 relative aux distributions des volumes de Voronoi des sucres P_s qui permet de distinguer les effets des trois sucres à la concentration de 49 % pds. Cette concentration se situe au-dessus de la valeur seuil $\phi_A \approx 40$ % pds, à partir de laquelle les propriétés structurales des molécules d'eau changent significativement (cf section 3.1.7). Ce résultat est d'autant plus intéressant que les trois sucres sont homologues - même formule chimique, des conformations et des propriétés thermodynamiques comparables - et d'autant que d'autres paramètres, *e.g.* le coefficient de diffusion, ne sont pas suffisamment sensibles pour souligner les légères différences entre eux. Dans la figure 3.5, le volume moyen du tréhalose, que l'on peut approximer au maximum de la distribution P_s , est plus petit que pour les autres sucres. Ceci implique que les molécules de tréhalose possèdent un volume libre plus petit que celles de maltose et de sucrose. Ce résultat est en bon accord avec les volumes molaires partiels apparents des trois sucres déterminés dans des études antérieures [77, 215]. L'eau en présence de tréhalose ayant le volume de Voronoi le plus large, alors que le tréhalose a le plus faible parmi les sucres, nous pouvons supposer que les molécules d'eau mélangées au tréhalose sont moins liées entre elles en raison de leur plus grande affinité pour le tréhalose. Cette remarque est compatible avec l'existence de la phase dihydrate du tréhalose dans laquelle deux molécules d'eau sont liées de telle manière

que le complexe soit stabilisé. Ce résultat est en parfait accord avec la localisation des molécules d'eau obtenue dans la section 3.1.2 et pourrait conforter l'hypothèse de Cesàro *et al.* [216] (voir p. 38 du chapitre 1).

3.1.5 Paramètre d'ordre orientationnel

Le paramètre d'ordre orientationnel q a été largement analysé par Debenedetti *et al.* dans le cas de l'eau pure [217]. q permet de quantifier l'écart à l'ordre tétraédrique parfait de l'arrangement d'une molécule d'eau donnée et de ses quatre voisines les plus proches. Il est défini comme :

$$q = 1 - \frac{3}{8} \sum_{j=1}^3 \sum_{k=j+1}^4 \left(\cos(\Psi_{j,k}) + \frac{1}{3} \right)^2, \quad (3.3)$$

où $\Psi_{j,k}$ désigne l'angle formé par les lignes joignant l'atome d'oxygène d'une molécule donnée à ceux des j -ème et k -ème plus proches voisines. Pour une organisation tétraédrique parfaite, $q=1$, alors que pour une organisation aléatoire dans laquelle les distributions angulaires ne sont pas corrélées, $q=0$. Les molécules d'eau à proximité des sucres dans les solutions binaires ne peuvent cependant pas adopter une organisation tétraédrique régulière, particulièrement aux concentrations élevées pour des raisons évidentes de contraintes stériques. C'est pourquoi nous n'avons pas considéré les molécules d'eau formant des LHs avec les sucres dans notre analyse de q . Néanmoins, les molécules restantes ne doivent pas être considérées comme purement volumiques car certaines molécules d'eau sont influencées par les molécules de sucres. La distribution du paramètre d'ordre q des solutions tréhalose/eau aux différentes concentrations étudiées à $T = 273$ K sont représentées dans la figure 3.6. Aux faibles concentrations, deux pics apparaissent dans la distribution de q , comme dans l'eau pure aux faibles températures. Le pic aux valeurs de q élevées est attribué à l'eau « structurée » (« ice-like »), alors que le pic aux faibles valeurs de q représente l'eau non-structurée (« liquid-like »). Lorsque la concentration en tréhalose augmente, le pic de l'eau structurée décroît en faveur du pic de l'eau non-structurée. Cette tendance devient particulièrement marquée pour les concentrations supérieures à $\phi_A \approx 40$ % pds (cf section 3.1.7). Elle reproduit le comportement obtenu lorsque la température croît dans le cas de l'eau pure, comme l'ont montré Debenedetti *et al.* [217]. A la concentration la plus élevée en sucre (66 % pds), les molécules d'eau sont principalement désordonnées, comme le montre la grande amplitude du pic de l'eau déstructurée et le décalage global de la distribution vers les faibles valeurs de q . La comparaison des distributions pour les trois disaccharides représentée dans l'insert de la figure 3.6 ne révèle pas de différences significatives entre les distributions, suggérant ainsi qu'en dehors des molécules d'eau interagissant directement avec les sucres par LHs, les molécules d'eau adoptent des configurations comparables dans les trois solutions. Le nombre de ces molécules, proportionnel à l'aire intégrée des trois distributions, et bien sûr, au nombre d'hydratation des sucres, est clairement réduit dans le cas du tréhalose par rapport au maltose et au sucrose. C'est la raison pour laquelle le tréhalose est susceptible de perturber le réseau de LHs de l'eau de manière plus prononcée, en raison de son hydratation plus élevée, mise en évidence notamment par Magazù *et al.* [84].

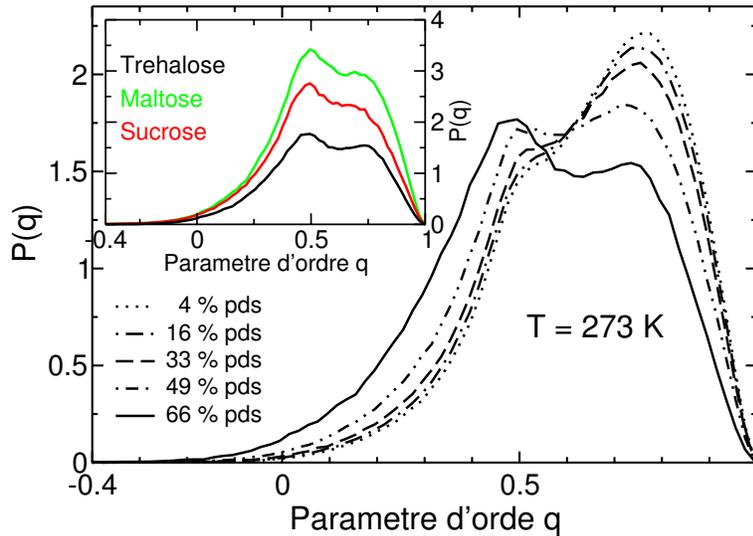


FIG. 3.6 – Distributions $P(q)$ du paramètre d'ordre orientationnel q des molécules d'eau qui ne sont pas liées par LHs aux molécules de tréhalose à différentes concentrations à $T = 273$ K. La distribution de l'eau pure est très similaire à celle de la solution à 4 % pds, et n'est donc pas représentée pour des raisons de clarté. L'insert montre les distributions des solutions aqueuses des trois sucres à 66 % pds à $T = 273$ K. Les courbes du maltose et du sucrose ne sont pas normalisées afin de mettre en évidence les différences dans les nombres d'hydratation.

3.1.6 Probabilité de LH

Le réseau de LHs de l'eau peut être décrit par la distribution f_j du nombre j de LHs que forment les molécules d'eau avec leurs voisines [8]. Les molécules d'eau sont impliquées dans quatre LHs linéaires eau-eau (deux en tant que donneur et deux en tant qu'accepteur) dans la glace, car chaque molécule d'eau est entourée par quatre voisines pour former un tétraèdre parfait (cf figure 1.4, p. 8). Dans l'eau liquide, des écarts à cette organisation tétraédrique sont observés, si bien que des LHs bifurquées et des groupes hydroxyles ne formant aucune LH existent [4]. Des études de spectroscopie Raman de la bande d'élongation OH de l'eau en fonction de la température révèlent l'existence d'un point isobestique [7]. A partir de cette observation, certains auteurs ont proposé la décomposition arbitraire de cette bande du spectre Raman en deux classes de molécules d'eau indépendantes de la température, nommées « open » et « closed » représentant respectivement les LHs intacts et rompus (voir page 31). La contribution « open » est attribuée aux molécules d'eau structurées et la contribution « closed » aux molécules d'eau restantes, incluant les LHs bifurquées, les groupes OH libres, etc. La figure 3.7 montre les populations f_j des molécules d'eau formant j LHs avec les molécules d'eau voisines pour les solutions à 66 % pds et pour l'eau pure à $T = 293$ K, en utilisant les deux critères géométriques définis précédemment. Les distributions obtenues en utilisant le critère II sont décalées vers les plus grands nombres des LHs eau-eau en comparaison avec celle obtenue en utilisant le critère I, car ce critère est moins strict. Comme attendu, le maximum de la distribution de l'eau pure vaut quatre pour le critère II. Néanmoins, la distribution est assez large en raison du désordre dû à l'agitation thermique et peut excéder 4 en raison des LHs bifurquées qui sont susceptibles d'exister. L'addition des molécules de sucre conduit à un décalage

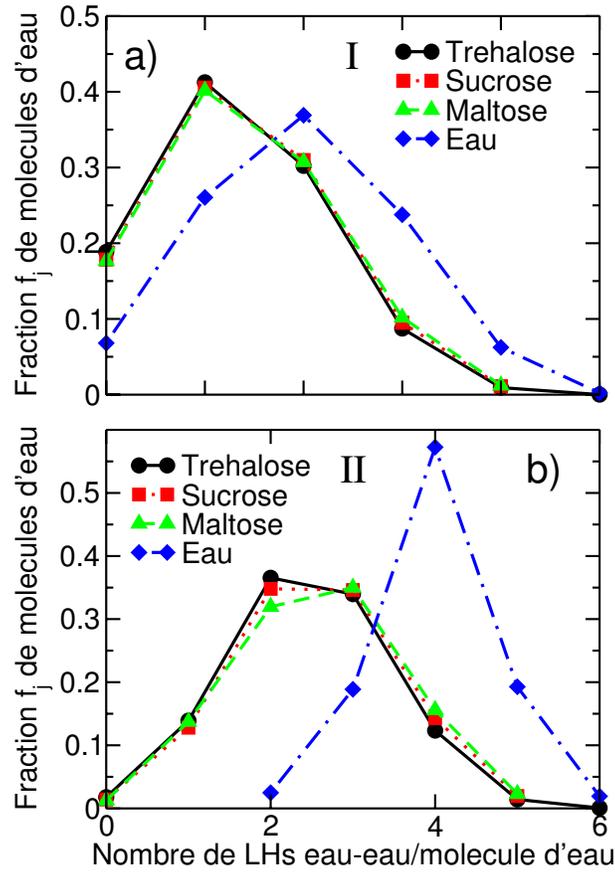


FIG. 3.7 – Fractions f_j des molécules d'eau formant j LHs avec les autres molécules d'eau voisines pour les solutions à 66 % pds et pour l'eau pure (en tirets-pointillés) à $T = 293$ K : (a) en utilisant le critère I, (b) en utilisant le critère II.

significatif du maximum de la distribution vers les valeurs plus faibles suite à la formation de LHs disaccharide-eau. Le tréhalose paraît augmenter la population des molécules d'eau aux faibles j (respectivement en-dessous de 2 et 3 pour les critères I et II) et diminuer les populations des molécules d'eau aux j élevés (respectivement au-dessus de 2 et 3 pour les critères I et II) que le maltose et le sucrose. Ceci résulte directement des différences observées dans les nombres d'hydratation. Le réseau de LHs de l'eau serait davantage rompu en présence de tréhalose qu'avec le maltose ou le sucrose. Ceci est en accord avec les nombreuses études expérimentales montrant l'effet déstructurant plus important du tréhalose comparé au maltose et au sucrose, notamment dans les expériences de diffusion Raman de Magazù *et al.* [88].

En se référant au concept de LHs intactes ou rompues, il est possible de déduire p_{HB} , la probabilité de former une LH intacte à partir des distributions précédentes. En supposant que la formation d'une LH n'est pas coopérative [218] et que le nombre de coordination de l'eau liquide vaut 4, la fraction f_j suit une distribution binômiale [8] :

$$f_j = \binom{4}{j} \cdot p_{HB}^j \cdot (1 - p_{HB})^{4-j} . \quad (3.4)$$

La figure 3.8 montre la dépendance en concentration de p_{HB} des solutions disaccharide/eau à 293 K obtenues à partir de l'équation (3.4) en utilisant le critère géométrique

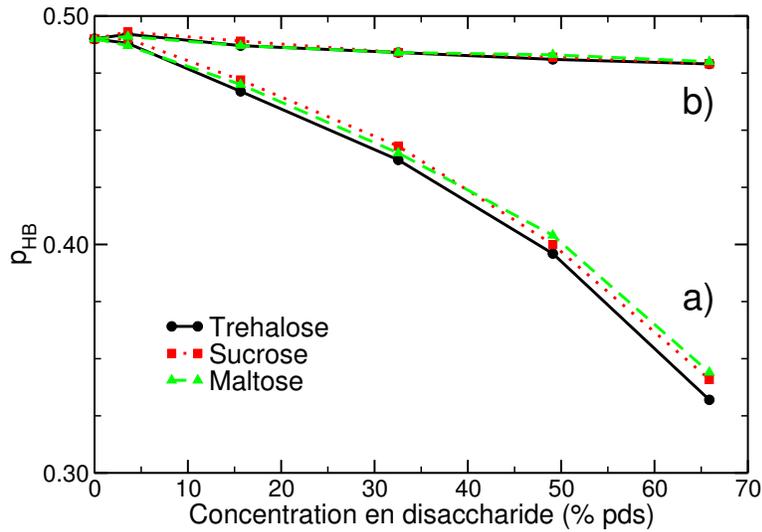


FIG. 3.8 – Dépendance en concentration de la probabilité de formation d’une LH p_{HB} déduite de l’équation (3.4) pour les solutions binaires à $T = 293$ K en utilisant le critère I: (a) pour toutes les molécules d’eau, (b) en excluant les molécules d’eau de la première couche d’hydratation (définie en utilisant le critère II).

I, choisi de telle sorte que j soit compris entre 0 et 4 dans l’eau pure (f_5 est négligeable avec le critère I). Des essais ont été tentés pour calculer p_{HB} avec le critère II, mais n’ont pas donné d’ajustements satisfaisants de l’équation (3.4) en utilisant un nombre maximal de coordination de 5 ou 6, et ne sont donc pas présentés. La décroissance de p_{HB} observée provient principalement de la substitution de LHs eau-eau par des LHs sucre-eau au fur et à mesure que la concentration en disaccharide augmente. L’évolution en concentration de p_{HB} est donc directement contrôlée par les nombres d’hydratation des sucres (cf section 3.1.3). Ce fait apparaît clairement dans la figure 3.8 (b) lorsque les molécules d’eau sont exclues de la première couche d’hydratation. p_{HB} devient beaucoup moins dépendante de la concentration en sucre et devient presque constante. Cette figure montre que la différence entre les sucres est largement réduite au-delà de la première couche d’eau d’hydratation. Lorsque les molécules de cette couche sont exclues, aucune différence entre les sucres n’est observée, comme nous l’avons vu dans les distributions de l’ordre orientationnel q (cf section 3.1.5). Il en résulte que c’est le nombre d’hydratation qui régit les différences entre les sucres dans la gamme de concentrations étudiées. Le nombre d’hydratation explique la capacité supérieure du tréhalose à perturber le réseau de LHs de l’eau, révélée par les plus faibles p_{HB} des solutions tréhalose/eau. Il convient de souligner que ces résultats sont en assez bon accord avec ceux obtenus expérimentalement par Branca *et al.*[88].

3.1.7 Agrégats de molécules d’eau

Nous avons considéré les agrégats de molécules d’eau formés dans les solutions disaccharide/eau. Les agrégats sont définis de la même manière que dans la référence [219]. Un agrégat est défini comme l’ensemble des molécules d’eau connectées entre elles par au moins une LH selon le critère géométrique I. De manière alternative, les agrégats pourraient être définis en utilisant le paramètre d’ordre orientationnel q . Dans ce cas, un

agrégat correspond à l'ensemble des molécules d'eau qui ont un paramètre q plus grand qu'une valeur seuil q_c et séparées par une distance inférieure à r_c [171]. Dans notre étude, la taille moyenne des agrégats $\langle n_w \rangle$ est calculée selon la relation :

$$\langle n_w \rangle = \sum_n n \times W_n \quad (3.5)$$

La taille n d'un agrégat donné est le nombre de molécules d'eau et W_n est la probabilité d'existence d'un agrégat de taille n . La figure 3.9 montre $\langle n_w \rangle$ en fonction de la concentration des trois sucres étudiés. Aux faibles températures et aux concentrations en-dessous de $\phi_A \approx 40$ % pds, qui semble être une concentration seuil, plus de 300 des 512 molécules d'eau de la boîte de simulation sont reliées entre elles par au moins une LH. Les sucres perturbent donc relativement peu le réseau de LHs de l'eau. De plus, des tailles d'agrégats identiques sont obtenues en présence des trois sucres. Ceci montre que l'eau n'est pas très sensible à la nature du disaccharide donné à ces concentrations. Au-dessus de $\phi_A \approx 40$ % pds, $\langle n_w \rangle$ diminue fortement et atteint une valeur d'environ 20 à une concentration de 66 % pds. Aux concentrations élevées, la solution aqueuse est composée de nombreux agrégats de petite taille comme le montre la distribution de la taille des agrégats W_n représentée dans l'insert de la figure 3.9. En outre, il est important de remarquer qu'au-dessus de la concentration seuil ϕ_A nous pouvons distinguer les trois disaccharides, le tréhalose réduisant la taille des agrégats davantage que le sucrose et le maltose. Ce résultat est confirmé dans l'insert où le nombre d'agrégats de molécules d'eau W_n de petite taille est plus grand en présence de tréhalose que de sucrose ou de maltose, alors que W_n pour les agrégats de grande taille est plus petit dans la solution tréhalose/eau. Ceci suggère que le tréhalose gêne plus efficacement la percolation du réseau de LHs de l'eau. La structure tétraédrique de l'eau en présence du tréhalose devrait être plus confinée à de petites régions spatiales. Le tréhalose apparaît être le soluté le plus destructurant parmi les trois disaccharides stéréoisomères, en bon accord avec une étude menée par Magazù *et al.* [88]. Cette caractéristique a lieu dans les expériences de la référence [88] au-dessus d'une concentration d'environ 50 % pds, proche de la valeur seuil obtenue dans notre étude de DM.

Nous avons ensuite considéré les agrégats de classe i , c'est-à-dire les ensembles de molécules d'eau liées entre elles et formant au moins j LHs eau-eau selon le critère I. Comme nous l'avons souligné, le critère I est plus approprié pour sonder l'organisation tétraédrique de l'eau, alors que le critère II inclut également des configurations plus déformées. Les agrégats de classe 1 comportent à la fois les molécules d'eau ayant un ordre tétraédrique et celles adoptant une organisation plus déformée. L'eau peut alors être décrite comme un réseau de LHs « remplissant tout l'espace », comme nous l'avons vu dans la section 1.1.4 et comme l'ont montré de précédentes études [219]. Les agrégats de classe 3 ou 4 contiennent uniquement des molécules d'eau dans des configurations quasi tétraédriques. De tels agrégats sont donc relativement petits à température ambiante et pourraient être considérés comme des noyaux précurseurs de la cristallisation de la glace. L'addition de sucres rend très faible la probabilité de trouver beaucoup de tels agrégats. Nous nous sommes donc intéressés à la proportion de molécules d'eau appartenant à chaque classe i comme un moyen de distinguer l'effet des trois disaccharides. Nous définissons $\langle F_i \rangle$ la fraction des molécules d'eau impliquées dans des agrégats de classe i (les crochets désignent la moyenne sur la durée des simulations). La figure 3.10 montre la fraction de molécules d'eau $\langle F_i \rangle$ des solutions de sucrose et de maltose pour les classes d'agrégats 1 et 3 à

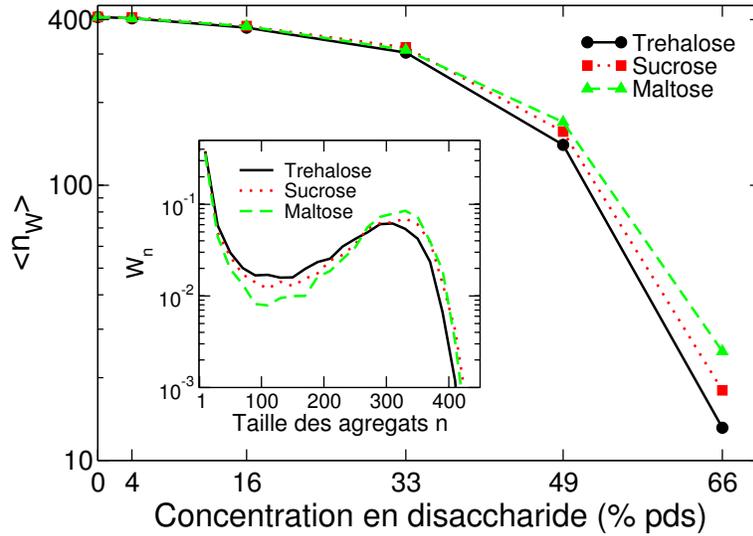


FIG. 3.9 – Dépendance en concentration de la taille moyenne pondérée en poids $\langle n_w \rangle$ des agrégats de molécules d'eau en présence des trois disaccharides (tréhalose, sucrose et maltose) à $T = 273$ K. Les distributions W_n de la taille des agrégats des trois solutions de disaccharides à 49 % pds à $T = 273$ K sont représentées en insert.

$T = 273$ K normalisées par $\langle F_i \rangle_T$, la fraction de molécules d'eau formant des agrégats de classe i en présence de tréhalose. Les fractions $\langle F_1 \rangle$ des solutions de tréhalose, de maltose ou de sucrose paraissent identiques à toutes les concentrations étudiées. Ceci indique que le nombre total de molécules d'eau impliquées dans ce type d'agrégats est quasi indépendant des sucres étudiés à $T = 273$ K, quelle que soit la concentration considérée. Autrement dit, la fraction de molécules d'eau qui ne sont pas liées entre elles par au moins une LH est sensiblement la même pour les diverses solutions. Mais, comme nous l'avons vu auparavant, les molécules d'eau se réorganisent en agrégats de taille différentes en fonction de la concentration et de la nature du sucre. Comme le montre la figure 3.10 b, les rapports $\langle F_3 \rangle / \langle F_3 \rangle_T$ du sucrose et du maltose dévient fortement de 1 pour des concentrations supérieures à ϕ_A . A ces concentrations, la plupart des molécules ressentent la présence des sucres en raison du nombre de LHs sucre-eau qui devient comparable au nombre de LHs eau-eau. C'est la raison pour laquelle les différences parmi les trois sucres augmentent et pour laquelle le tréhalose apparaît réduire davantage que le maltose ou le sucrose les régions d'ordre tétraédrique de l'eau, qui sont les précurseurs de la formation de la glace (voir également la figure 3.8). Ces centres de nucléation de la glace deviennent rares et petits à ces concentrations, à $T = 273$ K. Ceci pourrait se comprendre par la très faible probabilité de trouver une molécule d'eau entourée de quatre autres molécules d'eau formant peu de LHs avec les sucres, de sorte qu'elles puissent adopter des positions et des orientations compatibles avec un tétraèdre régulier de molécules d'eau liées entre elles par LHs. D'ailleurs, le sucrose semble perturber davantage la structure tétraédrique de l'eau que le maltose, pour les mêmes raisons que celles invoquées pour les nombres d'hydratation. Par conséquent, les nombres d'hydratation jouent un rôle essentiel à ces concentrations.

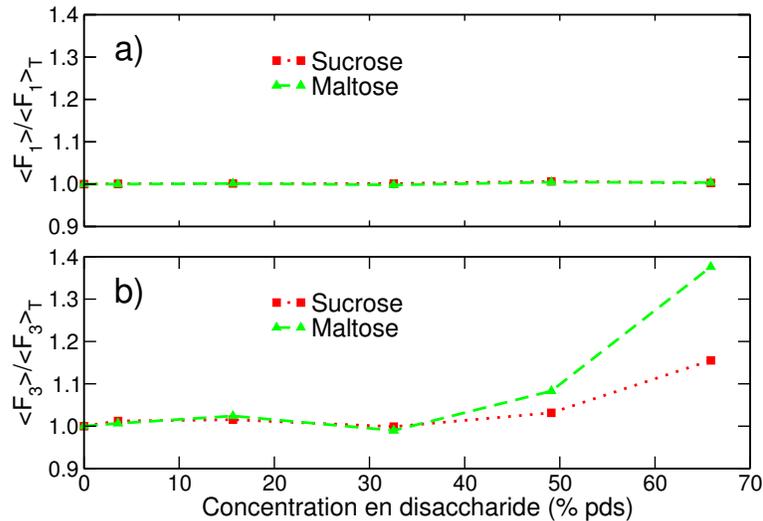


FIG. 3.10 – Dépendance en concentration de rapports normalisés (a) $\langle F_1 \rangle / \langle F_1 \rangle_T$ et (b) $\langle F_3 \rangle / \langle F_3 \rangle_T$ des solutions de sucrose et de maltose à $T = 273\text{ K}$, en utilisant le critère I. $\langle F_i \rangle$ désigne la fraction moyennée sur le temps de molécules d'eau impliquées dans des agrégats de classe i et l'indice T fait référence aux solutions de tréhalose.

3.1.8 Cycles dans les agrégats

Rahman et Stillinger [174] ont suggéré que les solutés perturbent les caractéristiques du réseau de LHs de l'eau en fonction de leur taille, de leur charge, de leur forme et de leur nature chimique. Ils ont notamment supposé que ces changements de structure devraient être apparents sur les distributions des polygones non-court-circuités (voir section 2.1.6 du chapitre 2) et qu'il serait important d'analyser les influences respectives des solutés « fabricant de structure » et « briseur de structure » (voir section 1.3.3, p. 28 du chapitre 1). C'est la raison pour laquelle nous avons analysé de manière plus fine le réseau de LHs de l'eau en calculant les distributions des polygones au sein des agrégats de molécules d'eau. Ces distributions dépendent bien sûr du modèle de l'eau et du critère (géométrique ou énergétique) considérés.

Principalement deux manières de définir les cycles ont été définies dans la littérature (cf section 2.1.6 du chapitre 2). Celle de Rahman et Stillinger, qui définit des polygones non-court-circuités conduit à des polygones de taille relativement grande (> 8). Une seconde définie par Speedy *et al.* [175] considère uniquement les polygones dits « primitifs », de sorte que la distribution en taille $\langle n \rangle_{cycle}$ décroît rapidement au-delà de 7. Ces deux définitions ont été décrites de manière détaillée dans la section 2.1.6 du chapitre 2. Afin de choisir parmi ces deux définitions celle qui semble la plus adaptée à notre étude, nous avons dans un premier temps calculé les distributions des polygones dans l'eau pure aux différentes températures étudiées (273-373K). A titre prospectif, nous avons également effectué des simulations de l'eau pure à 183 et 203 K. A ces températures, la diffusion des molécules d'eau est si lente que le régime diffusif n'est pas atteint durant le temps de simulation (400 ps) et donc ces simulations ne sont pas « équilibrées ». Mais, les molécules d'eau sont capables de s'orienter de manière à maximiser les LHs avec leurs plus proches voisines, de sorte que la topologie du réseau de LHs devrait être assez proche de celle obtenue pour des simulations beaucoup plus longues.

L'insert de la figure 3.11 présente les distributions des polygones primitifs (P) et non-

court-circuités (NC) de molécules d'eau liées par LHs (selon le critère I) pour l'eau pure à $T = 183$ K. Les cycles de taille 5 et 6 sont prépondérants dans la distribution $P(n)$ des polygones primitifs (P). Ces tailles sont typiques de celles obtenues dans les cristaux de glace cubique et hexagonale et sont celles qui permettent aux angles $O \cdots O \cdots O$ d'approcher leur valeur énergétique optimale [175]. La faible proportion des cycles de taille 3 et 4 s'explique par les contraintes géométriques imposées par le critère géométrique I, car les angles $O \cdots O \cdots O$ de ces cycles sont nécessairement déformés par rapport à la géométrie tétraédrique stable [175]. En outre, les cycles de taille supérieure à 7 sont peu nombreux car ils ne correspondent pas à des topologies probables de la glace. L'allure de la distribution $P(n)$ des polygones non-court-circuités à $T = 183$ K est complètement différente, car la proportion des cycles augmente avec leur taille (hormis pour les heptagones). Les polygones de taille 11 sont les plus nombreux, ce qui va à l'encontre des structures typiques des différentes formes de la glace. Cette distribution s'explique par la définition des cycles non-court-circuités, qui peuvent comporter différents cycles primitifs. Par exemple, deux cycles primitifs de taille 5 et 6 sont susceptibles de former un cycle non-court-circuité de taille 7 comme indiqué dans la figure 2.7 de la section 2.1.6 du chapitre 2. C'est pourquoi nous avons choisi de ne considérer dans la suite de l'étude que la définition de Speedy *et al.* [175] des polygones primitifs.

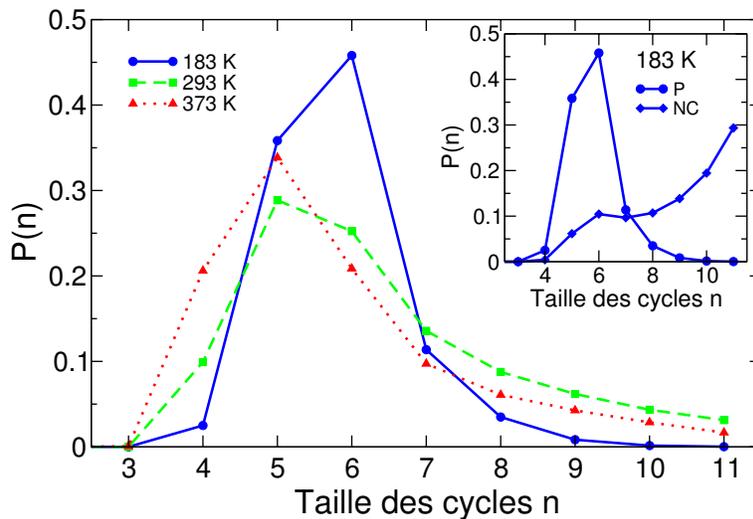


FIG. 3.11 – Distributions $P(n)$ de la taille n des polygones primitifs (P) de molécules d'eau liées par LHs (selon le critère I) pour l'eau pure à $T = 183$, 293 et 373 K. Les distributions $P(n)$ des polygones primitifs (P) et non-court-circuités (NC) dans l'eau pure à $T = 183$ K sont présentées en insert.

La figure 3.11 présente les distributions $P(n)$ de l'eau pure à $T = 183$, 293 et 373 K, afin de connaître l'effet de la température sur les distributions. Lorsque la température passe de 183 à 293 K, $P(n)$ s'élargit significativement et la proportion de cycles de taille 5 et 6 décroît surtout en faveur de celle des cycles de taille 4 ou supérieure à 7, qui ne sont plus négligeables. Lorsque la température augmente jusqu'à 373 K, $P(n)$ est décalée vers les cycles de plus petite taille, et possède un maximum situé à $n = 5$. La proportion des cycles de taille $n = 4$ augmente significativement, alors que la proportion des cycles de taille supérieure à 7 diminue. Ceci témoigne de la désorganisation du réseau de LHs de l'eau, notamment car comme nous l'avons rappelé, les cycles de taille 4 correspondent à

des configurations défavorables d'un point de vue énergétique.

Les distributions $P(n)$ peuvent être décrites par un paramètre tel que la taille moyenne des cycles $\langle n \rangle_{cycle}$ définie suivant la relation :

$$\langle n \rangle_{cycle} = \sum_n n \times P_n \quad (3.6)$$

Le comportement de $\langle n \rangle_{cycle}$ des polygones primitifs est différent de celui de $\langle n \rangle_{cycle}$ des polygones non-court-circuités ou de $\langle n_W \rangle$: $\langle n \rangle_{cycle}$ des polygones non-court-circuités croît quasi-linéairement et $\langle n_W \rangle$ de manière monotone (cf insert de la figure 3.12) lorsque la température diminue, alors que $\langle n \rangle_{cycle}$ passe par un maximum lorsque l'on considère la définition de polygone primitif de Speedy *et al.* et le critère géométrique I, comme le montre la figure 3.12. La décroissance de $\langle n \rangle_{cycle}$ observée pour les températures supérieures à 273 K correspond à la désorganisation du réseau de LHs de l'eau qui se caractérise par une diminution de l'ordre tétraédrique et qui induit un décalage des distributions $P(n)$ vers les cycles de petite taille (voir figure 3.11). La diminution de $\langle n \rangle_{cycle}$ lorsque la température passe de 273 K à 203 ou 183 K est attribuée à la réorganisation du réseau de LHs de l'eau en structure typique de la glace et à la quasi-disparition des cycles de taille supérieure à 7 qui en découle.

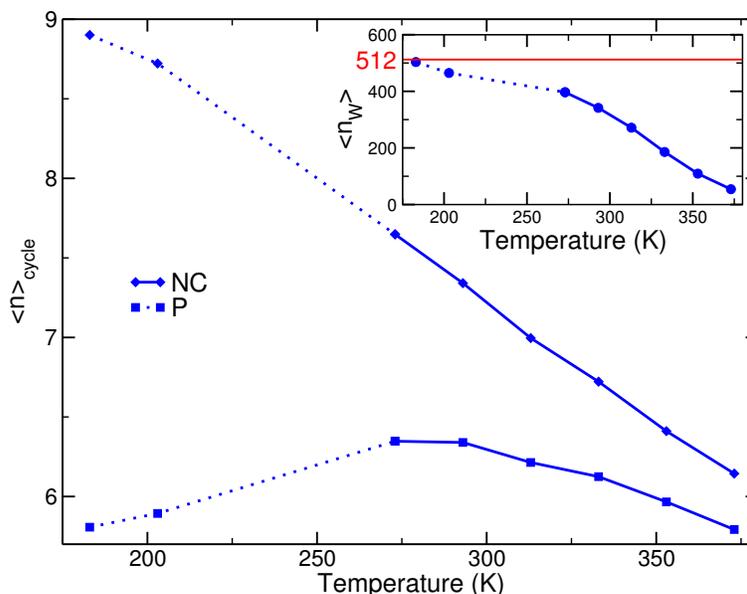


FIG. 3.12 – Evolution en température de $\langle n \rangle_{cycle}$ dans l'eau pure pour les définitions de polygones non-court-circuités (NC) et primitifs (P). La partie de la courbe joignant les points à 183 et 203 K est représentée en pointillés afin de souligner que les simulations correspondantes ne sont pas équilibrées (dans le sens où le régime diffusif des molécules d'eau n'est pas atteint durant ces simulations). L'évolution en température de la taille moyenne des agrégats de molécules d'eau $\langle n_W \rangle$ (définie dans la section 3.1.7) est représentée en insert.

Après avoir caractérisé les évolutions en température de $\langle n \rangle_{cycle}$, nous avons calculé les évolutions en concentration en sucre de $\langle n \rangle_{cycle}$ pour les trois disaccharides étudiés à $T = 273$ K représentées dans la figure 3.13. L'évolution de $\langle n \rangle_{cycle}$ est très similaire à celle de $\langle n_W \rangle$ pour des raisons analogues que nous ne décrirons donc pas à nouveau

(voir section 3.1.7 et la figure 3.9). Néanmoins, nous constatons que l'effet du tréhalose se distingue davantage de celui du sucrose ou du maltose au-delà de la concentration $\phi_A \approx 40$ % pds que pour $\langle n_W \rangle$. Ceci pourrait provenir du fait que seules les molécules d'eau formant des cycles sont considérées dans le calcul de $\langle n \rangle_{cycle}$, alors que toutes les molécules d'eau de la boîte de simulation sont prises en compte dans le calcul de $\langle n_W \rangle$. De plus, l'analyse en cycles du réseau de LHs doit probablement être plus sensible à l'organisation orientationnelle des molécules d'eau que celle en simples agrégats, car la formation des cycles requiert des contraintes géométriques plus importantes.

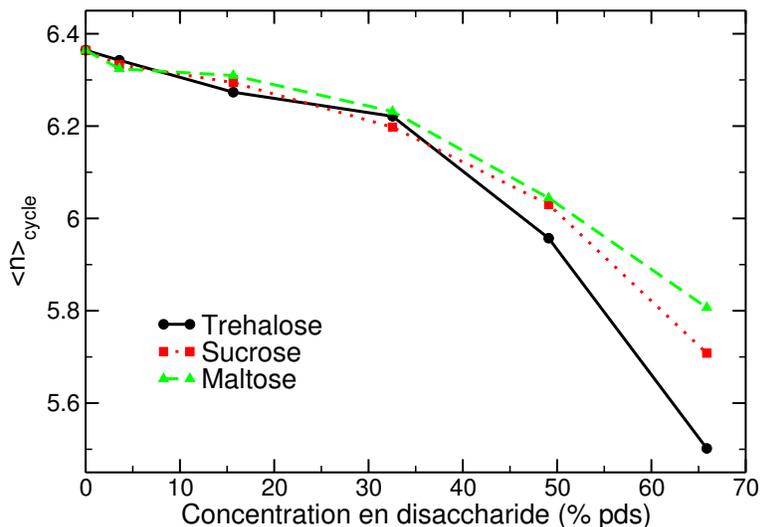


FIG. 3.13 – Dépendance en concentration de la taille moyenne pondérée en nombre des cycles des agrégats de molécules d'eau $\langle n \rangle_{cycle}$ en présence des trois disaccharides (tréhalose, sucrose et maltose) à $T = 273\text{ K}$.

3.1.9 Conformations moléculaires

Les conformations moléculaires des disaccharides peuvent être décrites par les angles Φ et Ψ qui correspondent aux angles diédraux entre les atomes $H_1 - C_1 - O_1 - C'_1$ et $C_1 - O_1 - C'_1 - H'_1$ pour le tréhalose, $H_1 - C_1 - O_1 - C'_4$ et $C_1 - O_1 - C'_4 - H'_4$ pour le maltose, et $O_{5g} - C_{1g} - O_{1g} - C_{2f}$ et $C_{1g} - O_{1g} - C_{2f} - O_{5f}$ pour le sucrose (voir figure 2.10). La figure 3.14 montre les distributions (Φ, Ψ) pour les trois disaccharides dans les solutions à 4 % en poids. Les conformations moléculaires de ces disaccharides ont déjà été beaucoup étudiées à travers les cartes adiabatiques (Φ, Ψ) dans le vide comme reporté dans les références [178, 200, 220]. Dans notre étude, le but est simplement de discriminer les comportements des conformations des sucres dans nos simulations.

Dans le cas du tréhalose, le minimum d'énergie global de la carte adiabatique dans le vide - appelé G ici - a été localisé à $(61^\circ, 64^\circ)$ et la conformation correspondante est stabilisée par une LH intramoléculaire. En plus, un vaste minimum - noté F ici - est observé vers $(-44^\circ, -44^\circ)$. Ce minimum local inclut à la fois la structure du cristal et les conformations déduites par RMN [194] et par des expériences chiroptiques [221]. Il a également été trouvé par Dowd *et al.* avec le champ de forces MM3 [222]. En bon accord avec les résultats de Liu *et al.* qui utilisent le modèle de l'eau TIP3P, nous observons que le tréhalose reste les 260 premières ps vers $(-50 \pm 13^\circ, -50 \pm 12^\circ)$, *i.e.* dans le

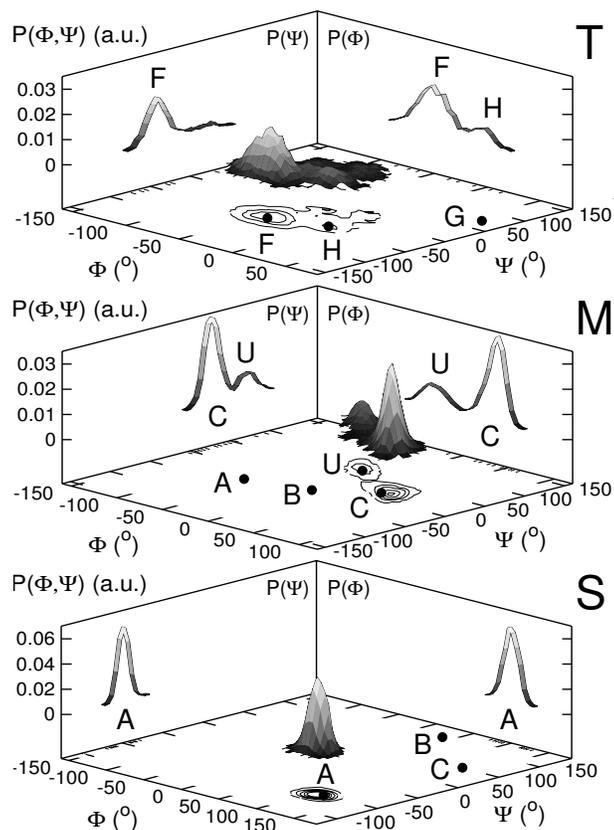


FIG. 3.14 – Distributions $P(\Phi, \Psi)$ du tréhalose (T), du maltose (M), et du sucrose (S) dans les solutions à 4 % pds à $T = 293$ K (voir le texte pour la définition des angles Φ et Ψ). Les cartes de contour des distributions $P(\Phi, \Psi)$ sont dessinées sur le plan de base des graphiques. Les projections de la surface des distributions $P(\Phi, \Psi)$ à Ψ constant, $P(\Phi)$, et à Φ constant, $P(\Psi)$, sont également montrées pour une meilleure compréhension. Les principaux minima des cartes adiabatiques sont indiqués par les lettres F, G, et H pour le tréhalose, A, B, C, et U pour le maltose, et A, B, C pour le sucrose (voir texte).

large minimum F. Ceci confirme la suggestion de Liu *et al.* que F serait la conformation du minimum global d'énergie libre en solution. Une transition semble cependant être observée dans la dernière partie de la simulation vers un petit minimum noté H ici. Ce minimum apparaît comme un petit pic dans la distribution de Φ dans la figure 3.14 et se caractérise par une LH entre les cycles du tréhalose (voir figure 3.16). En principe, nous nous attendrions à une distribution symétrique en Φ et Ψ . Mais, la symétrie de la carte adiabatique n'est pas observée car la transition vers H se produit à la fin de la simulation, comme le montre la figure 3.16b,c. Trois conformères stables sont observés dans le cas du maltose, dont deux possèdent une LH intramoléculaire $O_2 - O'_3$ (notés B et C) alors que le troisième (A) n'en forme pas, pour des raisons géométriques [200]. Aussi bien des études de rotation optique que des données NOE (pour « nuclear Overhauser effect », soit effet Overhauser nucléaire) suggèrent qu'une transition du puits C vers le puits A s'effectue en solution [223, 224]. Cette transition résulterait du remplacement de la LH intramoléculaire par une LH sucre-eau. Les minima A et C sont respectivement centrés sur $(-58.9^\circ, -43.8^\circ)$ et $(32.1^\circ, 15.5^\circ)$. Brady *et al.* [200] ont étudié A et C séparément et ont montré qu'ils restent stables durant leurs simulations courtes (temps de collection

des données respectifs de 80 et 50 ps). Dans notre simulation de 400 ps, le maltose reste la plupart du temps dans la conformation du puits C, dans laquelle une LH intramoléculaire se forme. Un pic de faible amplitude apparaît néanmoins dans les distributions de la figure 3.14 indiquant qu'un autre minimum - que nous avons désigné U - est exploré vers $(-30^\circ, 60^\circ)$. U n'apparaît pas dans la carte adiabatique calculée par Brady *et al.* [200] et la conformation du maltose correspondante ne contient aucune LH intramoléculaire. Cette conformation est cependant rare et ne survit pas plus de 90 ps (données non montrées).

La carte adiabatique du sucrose possède trois minimas principaux notés A, B et C selon Tran et Brady [225]. Le cristal appartient au minimum de plus basse énergie A localisé à $(107.8^\circ, -44.8^\circ)$. Comme l'ont souligné Engelsen *et al.* [220] qui ont effectué une simulation de 1,2 ns du sucrose dans l'eau, des transitions entre puits de la carte (Φ, Ψ) sont rarement observées. Dans nos simulations, le sucrose reste de fait dans le minimum A et la distribution (Φ, Ψ) est centrée vers $(102^\circ, -56^\circ)$. Cette conformation est stabilisée par environ deux LHs intramoléculaires, comme l'ont constaté Ekdawi-Sever *et al.* [86], alors qu'il a été suggéré qu'elles étaient plus rares en solution [220]. Ces LHs résulteraient de la propension du sucrose à les former dans le vide.

Le plus intéressant est que les fluctuations $\Delta\Phi$ et $\Delta\Psi$ des angles diédraux glycosidiques Φ et Ψ sont plus importantes dans le cas du tréhalose que pour le maltose ou le sucrose. Dans le minimum principal des sucres, celles-ci sont respectivement de $(13^\circ, 12^\circ)$, $(9^\circ, 10^\circ)$, $(11^\circ, 7^\circ)$ et $(11^\circ, 13^\circ)$, $(9^\circ, 9^\circ)$, $(9^\circ, 10^\circ)$ pour le tréhalose, le maltose et le sucrose à 4 et 49 % en poids à $T = 293$ K. Ceci témoigne de la plus grande flexibilité conformationnelle du tréhalose et suggère que le minimum d'énergie libre qu'explore le tréhalose au cours de la simulation est plus large que ceux du maltose et du sucrose. Ces résultats sont également en accord avec le nombre de LHs intramoléculaires qui est le plus faible pour le tréhalose et le plus grand pour le sucrose.

3.1.10 Flexibilité moléculaire

La taille intrinsèque des sucres peut être estimée de manière approximative à partir de leur rayon de giration R_g défini comme :

$$R_g^2 = \frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i} \quad (3.7)$$

où i désigne l'indice des atomes d'une molécule de sucre donnée, et m_i et r_i la masse et la distance au centre de masse de la molécule de l'atome i . La figure 3.15 montre les distributions réduites $P(R_g - \langle R_g \rangle) / P(R_g)_{max}$ des rayons de giration des disaccharides pour les solutions à 4 et 49 % en poids à $T = 293$ K. Les fluctuations de R_g pour les molécules de tréhalose sont plus larges et plus asymétriques que pour le maltose ou le sucrose. Cette plus grande asymétrie pourrait refléter la plus grande anharmonicité de la région explorée par le tréhalose et est cohérente avec les amplitudes plus importantes des mouvements des cycles. Le nombre de LHs intramoléculaires est effectivement plus petit dans le cas du tréhalose que pour le maltose ou le sucrose. Ces LHs restreignent les mouvements des cycles des disaccharides et des groupes hydroxyles impliqués dans ces LHs, confinant ainsi le sucrose, et dans une moindre mesure le maltose, à des régions plus harmoniques du paysage énergétique des sucres, *i.e.* proches du minimum local. Par conséquent, le tréhalose apparaît plus flexible que le maltose et le sucrose dans les solutions à 4 et 49 % en poids à $T = 293$ K. La majeure partie de cette flexibilité provient

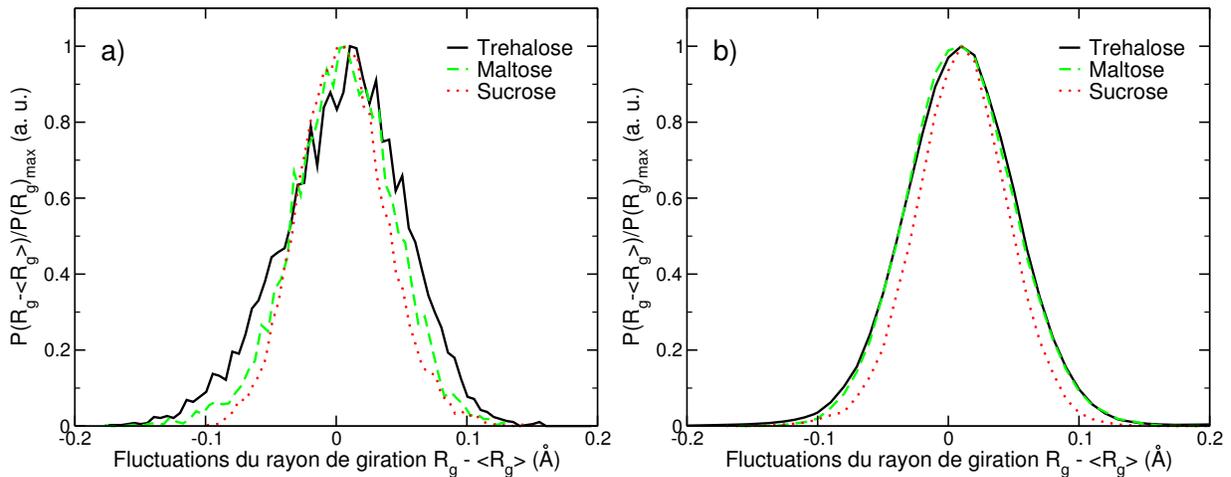


FIG. 3.15 – Distributions réduites des fluctuations du rayon de giration R_g du tréhalose, sucrose, et maltose à $T = 293$ K pour (a) les solutions à 4 % en poids et (b) les solutions à 49 % en poids. $\langle R_g \rangle$ désigne le rayon de giration moyenné sur le temps et $P(R_g)_{\max}$ correspond au maximum de probabilité de la distribution $P(R_g)$.

de petites variations des angles de torsion autour de la liaison glycosidique, car les cycles sont relativement rigides et stabilisés par des barrières d'énergie élevées [178]. Il convient de mentionner que le rayon de giration correspondant aux maxima des distributions $P(R_g)$ valent respectivement $3,40 \text{ \AA}$, $3,45 \text{ \AA}$ et $3,13 \text{ \AA}$ pour le tréhalose, le maltose et le sucrose. Le plus faible rayon de giration du sucrose résulte de sa conformation plus sphérique par rapport au maltose et au tréhalose. De plus, il est composé d'un cycle glucose et d'un cycle fructose, plus petit, alors que le maltose et le tréhalose comportent deux cycles glucose. Le plus faible rayon de giration du tréhalose comparé à celui du maltose vient de son plus grand degré de symétrie des cycles glucose par rapport à la liaison glycosidique. En effet, les cycles glucose sont liés par les liaisons $C_1 - O_1$ et $O_1 - C'_1$ dans le tréhalose, et $C_1 - O_1$ et $O_1 - C'_4$ pour le maltose (voir figure 2.10, p. 62).

Dans la figure 3.16, les fluctuations des angles diédraux glycosidiques et du rayon de giration R_g du tréhalose sont comparés. Durant les 260 premières ps de la simulation, aucune LH entre les cycles du tréhalose ne se forme (cf figure 3.16a). Pendant ce temps, les angles diédraux glycosidiques Φ et Ψ ainsi que le rayon de giration R_g fluctuent autour de valeurs stables: $\Phi = -50 \pm 13^\circ$, $\Psi = -51 \pm 12^\circ$, $R_g = 3,42 \pm 0,04 \text{ \AA}$ (voir respectivement figure 3.16b, c, d). Après 260 ps, l'angle diédral Φ effectue une transition vers $\Phi = -14 \pm 16^\circ$, alors que la transition de Ψ est moins prononcée jusqu'à $t = 350$ ps ($\Psi = -22 \pm 22^\circ$). Cette transition est liée à la formation d'une LH intramoléculaire entre les atomes d'oxygène O_2 et O'_6 . Cette LH a été observée par Conrad *et al.* pour des concentrations élevées (50 % en poids et plus) à 358 K. La conséquence directe de cette transition conformationnelle est la diminution du rayon de giration R_g , $R_g = 3,37 \pm 0,05 \text{ \AA}$ suggérant une conformation plus compacte, les cycles devenant plus proches l'un de l'autre. Nous nous attendons également à de plus petites fluctuations de R_g , mais le temps court durant lequel cette nouvelle conformation est observée ne nous permet pas de le confirmer.

En outre, cette plus grande flexibilité intrinsèque au tréhalose n'est pas contradictoire avec les plus petites fluctuations quadratiques moyennes $\langle u^2 \rangle$ du tréhalose comparé au sucrose observées expérimentalement [114], car les mouvements des atomes d'hydrogène

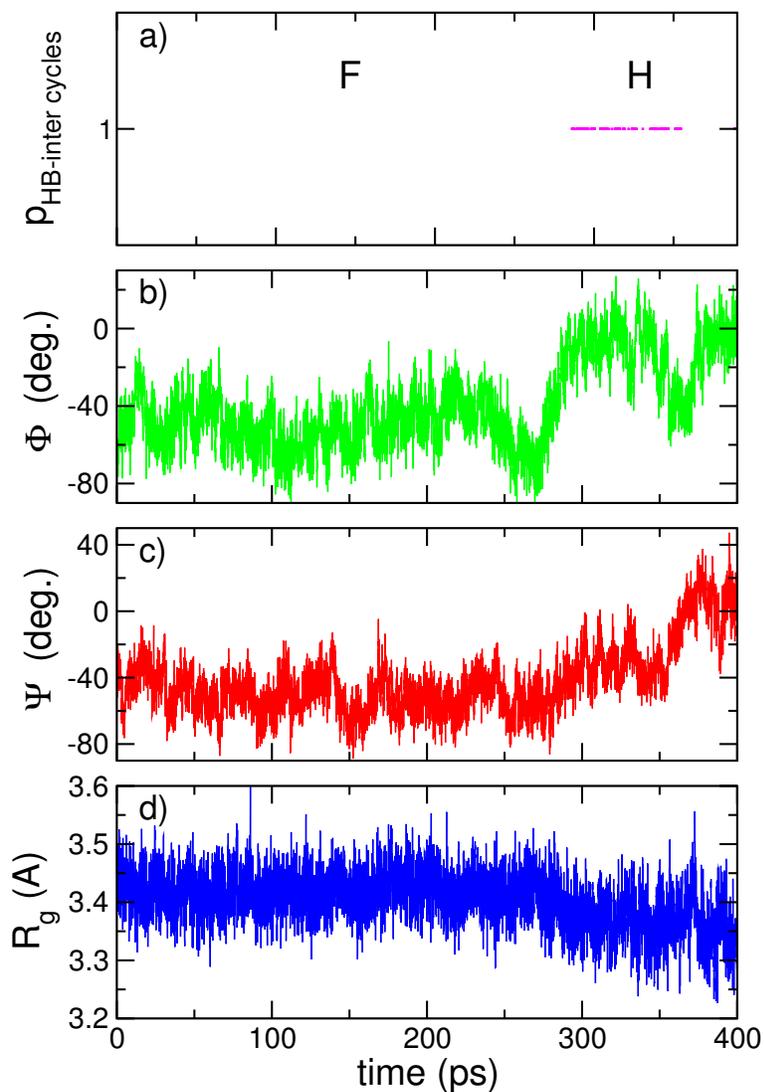


FIG. 3.16 – Dépendance temporelle de différents paramètres obtenus pour les solutions de tréhalose à 4 % en pds à $T = 293$ K : (a) Probabilité de formation d'une LH entre les cycles du tréhalose, (b) et (c) Angles de torsion glycosidiques respectivement définis par les angles diédraux entre les atomes $H_1 - C_1 - O_1 - C'_1$ et $C_1 - O_1 - C'_1 - H'_1$ (voir figure 2.10, p. 62), et (d) rayon de giration R_g .

dépendent à la fois des translations et rotations moléculaires globales et des vibrations moléculaires internes. C'est pourquoi le tréhalose pourrait avoir une plus grande flexibilité (sondée par exemple par les fluctuations du rayon de giration) et de plus petits $\langle u^2 \rangle$ comparé au sucrose.

La figure 3.16 souligne la relation étroite qui existe entre les LHs intramoléculaires et les fluctuations conformationnelles des molécules de sucre. Elle pourrait notamment confirmer l'hypothèse de Oku *et al.* [226] qui ont analysé le mécanisme de la fonction antioxydante du tréhalose par RMN et chimie quantique. Ils ont proposé que le tréhalose interagisse de manière spécifique avec une double liaison *cis* d'un acide gras non-saturé via les groupes hydroxyles $O_6 - H'_6$ et soit $O_2 - H_2$ soit $O_3 - H_3$ du tréhalose. Le complexe formé est également stabilisé par des LHs de type $O-H \cdots \pi$ et $C=H \cdots O$. La plus grande flexibilité du tréhalose que nous observons pourrait favoriser ce type d'interactions par rapport au maltose et au sucrose. Elle pourrait permettre aux groupes hydroxyles mentionnés ci-dessus d'adopter la conformation requise, sans que le tréhalose ne change de puits de potentiel après complexation. En outre, la LH entre les atomes d'oxygène O_2 et O'_6 du tréhalose observée dans la solution à 4 % en poids pourrait indiquer que la conformation stable du tréhalose est favorable à la formation d'un tel complexe. Au contraire, les LHs entre les cycles du maltose et du sucrose ainsi que leur topologie pourraient proscrire de telles interactions. Cette plus grande flexibilité pourrait également favoriser les LHs avec les groupes polaires des membranes ou des protéines comme l'ont proposé Crowe *et al.* [227] (voir section 1.3.3, p. 34).

3.1.11 Agrégats de sucres et homogénéité

Les interactions sucre-sucre deviennent d'autant plus probables que la concentration en sucres augmente, comme le montre les données du tableau 3.1 (p. 88). A une concentration seuil donnée, les agrégats de sucre sont même susceptibles de percoler, formant un réseau « remplissant tout l'espace ». La percolation du réseau de LHs du sucre pourrait expliquer le découplage des diffusions de l'eau et du sucre. Il a été observé expérimentalement que la diffusion du sucrose et de l'eau deviennent découplés pour des proportions en eau inférieures à ≈ 50 % pds [196]. De plus, Goddard *et al.* [228] ont suggéré à partir de simulations que la formation d'un réseau du sucrose aux concentrations élevées pourrait accroître à la fois la résistance à la déformation sous cisaillement et la stabilité mécanique du mélange.

La formation d'un réseau de sucre devrait être favorisée par un faible nombre de LHs intramoléculaires, car ce type de LHs implique des groupes OH des sucres qui ne restent plus disponibles pour former des LHs intermoléculaires. En outre, le nombre de LHs intermoléculaires sucre-sucre devrait révéler les tendances à l'agrégation. Le plus grand nombre de LHs intermoléculaires sucre-sucre du maltose (voir tableau 3.1) pourrait impliquer que les molécules de maltose tendent à s'organiser en agrégats de plus grande taille que celles de tréhalose ou de sucrose. Afin de décrire la formation des agrégats de sucres suggérées par les données du tableau 3.1, nous avons défini un agrégat de sucres comme l'ensemble des molécules de sucres liées entre elles par au moins une LH selon le critère II. Ce critère géométrique a été préféré au critère I car il permet d'éviter que les agrégats soient rares et donc une très pauvre statistique. Similairement aux agrégats de molécules d'eau, la taille moyenne des agrégats $\langle n_S \rangle$ a été calculée selon $\langle n_S \rangle = \frac{\sum n_S W_S}{\sum W_S}$, où n_S est le nombre de sucres composant un agrégat donné et W_S est la

probabilité de formation d'un agrégat de taille n_S . Les sucres isolés sont considérés comme des agrégats de taille 1. Etant donné que la dynamique des sucres est bien plus lente que celle de l'eau [87] et que leur nombre est relativement petit dans nos boîtes de simulation (entre 1 et 52), la statistique de formation d'agrégats est assez pauvre pour une simulation donnée. Nous avons donc moyenné $\langle n_S \rangle$ sur l'intervalle de températures (293-373 K) pour une concentration donnée, car $\langle n_S \rangle$ ne dépend pas fortement de la température. Les résultats à 273 K n'ont pas été considérés en raison de la faible diffusion des sucres aux concentrations élevées. Parmi les 60 valeurs calculées (5 températures à 4 concentrations pour les 3 sucres), 4 ont été négligées car aberrantes (deux pour le sucrose et une pour le maltose et pour le tréhalose). $\langle n_S \rangle$ indique donc de manière approximative une tendance de la formation des agrégats de sucres en fonction de la concentration.

La figure 3.17 montre l'évolution du rapport $\langle n_S \rangle / N_S$ (où N_S est le nombre total de sucres dans les boîtes de simulation) pour les solutions des trois disaccharides en fonction de la concentration. Aux faibles concentrations (16 et 33 % en poids), des agrégats de petite taille sont formés, $\langle n_S \rangle / N_S$ restant quasi-constant autour de 0,2-0,3. La taille moyenne des agrégats $\langle n_S \rangle$ est donc plutôt proportionnelle au nombre total de sucres N_S . Ce comportement change radicalement aux concentrations en sucre plus élevées, où les agrégats de sucre grandissent davantage que linéairement avec N_S et $\langle n_S \rangle / N_S$ augmente jusqu'à 1 environ pour les solutions à une concentration de 66 % en poids, qui peut être considérée comme la concentration seuil de percolation ϕ_p , pour le critère II. A cette concentration, la percolation du réseau de LHs des sucres est atteinte *i.e.* la plupart des sucres d'une boîte de simulation donnée appartient au même agrégat de grande taille. Nonobstant les barres d'erreurs assez larges, les différences en-dessous de ϕ_p entre le maltose ou le tréhalose d'une part, et le sucrose d'autre part apparaissent : le sucrose semble former de plus petits agrégats que le tréhalose ou le maltose. Ceci résulte probablement du plus grand nombre de LHs intramoléculaires des molécules de sucrose par rapport à celles de maltose et de tréhalose, car les groupes hydroxyles impliqués dans ces interactions intramoléculaires ne sont plus disponibles pour former des interactions intermoléculaires (avec les molécules d'eau ou de sucre). Par conséquent, une concentration plus élevée de sucrose est nécessaire pour obtenir un agrégat de la même taille que dans le cas du tréhalose ou du maltose. En outre, la taille moyenne $\langle n_S \rangle$ des agrégats du maltose semble proche de celle du tréhalose, en accord avec sa topologie très semblable. Néanmoins, les molécules de maltose ont tendance à former davantage de LHs entre elles que ne le font les molécules de tréhalose. Ceci est illustré dans la figure 3.17b, qui présente le nombre moyen normalisé de LHs sucre-sucre intermoléculaires $\langle n_{HB} \rangle_{inter} / N_S$ (voir également le tableau 3.1, p. 88). Aux faibles concentrations, ce nombre est limité par la probabilité assez petite de former des LHs entre les sucres, qui empêche la formation de multiples LHs entre deux sucres donnés. Il croît ensuite avec la concentration, mais est restreint aux concentrations élevées par le nombre maximal de LHs intermoléculaires que les sucres sont capables de former en raison de la gêne stérique. Le nombre moyen de LHs sucre-sucre intermoléculaires est plus grand dans les agrégats de maltose que dans ceux de tréhalose. Le maltose favorise donc davantage les LHs sucre-sucre que ne le font le tréhalose et le sucrose. Ceci explique en partie le plus faible nombre d'hydratation du maltose relativement au tréhalose aux concentrations élevées, car les LHs sucre-sucre réduisent la possibilité que les molécules d'eau ont de se lier aux sucres.

Cette balance singulière entre la capacité d'un sucre à former des LHs avec les autres sucres ou avec l'eau semble essentielle pour l'homogénéité du système et pourrait probable-

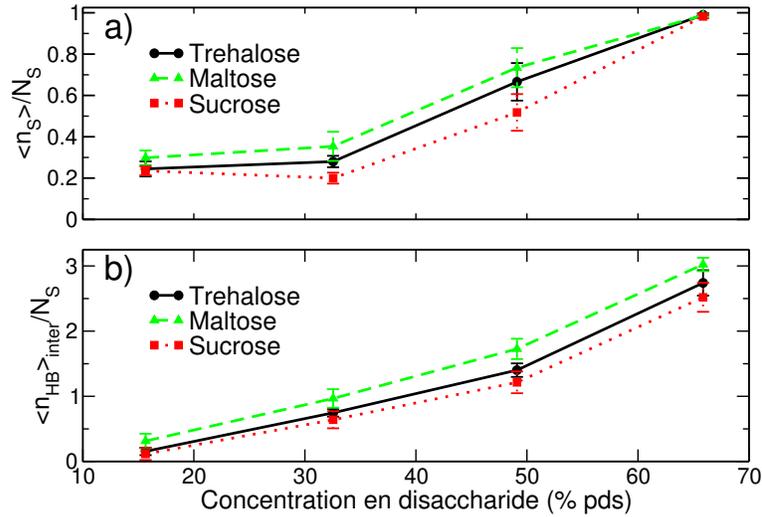


FIG. 3.17 – Dépendance en concentration de la taille moyenne normalisée des agrégats de sucre $\langle n_S \rangle / N_S$ (a) et du nombre moyen normalisé de LHs sucre-sucre $\langle n_{HB} \rangle_{inter} / N_S$ des différentes solutions des disaccharides, moyennés sur l'intervalle de température (293 K-373 K) afin d'améliorer la statistique (le tableau 3.1 indique $\langle n_{HB} \rangle_{inter} / N_S$ à $T = 293$ K). Les barres d'erreur sont calculées à partir de l'écart-type. $\langle n_S \rangle / N_S$ et $\langle n_{HB} \rangle_{inter} / N_S$ ne peuvent être calculées pour nos solutions les plus diluées (4 % en poids), car il n'y a qu'un seul sucre dans la boîte de simulation.

ment jouer un rôle significatif dans la protection des molécules biologiques. Nos résultats suggèrent qu'en-dessous de la concentration seuil de percolation ϕ_p , le tréhalose pourrait former des matrices plus homogènes avec l'eau par rapport au sucrose et au maltose [229]. Le tréhalose serait capable de former des agrégats de grande taille avec lui-même tout en préservant un nombre d'hydratation plus élevé que ceux du maltose et du sucrose. En outre, un nombre plus faible de molécules d'eau auraient un comportement volumique dans les solutions de tréhalose car celui-ci forme des LHs avec davantage de molécules d'eau que le maltose ou le sucrose. La probabilité de formation de la glace et les contraintes liées à l'évacuation de l'eau seraient ainsi réduites. Néanmoins, des expériences sondant l'influence de la matrice sucre/eau sur la cinétique de déshydratation seraient nécessaires afin de vérifier cette nouvelle interprétation.

La figure 3.18 représente de manière schématique et bidimensionnelle des solutions concentrées des trois disaccharides de manière à illustrer cette hypothèse. Ces représentations sont fondées sur l'interprétation des résultats de la figure 3.17. Il serait en effet délicat d'observer visuellement les différences entre les agrégats des trois sucres à partir d'une configuration instantanée des trajectoires de nos simulations, car les agrégats de sucres se réorganisent en permanence en-dessous de concentration seuil de percolation ϕ_p .

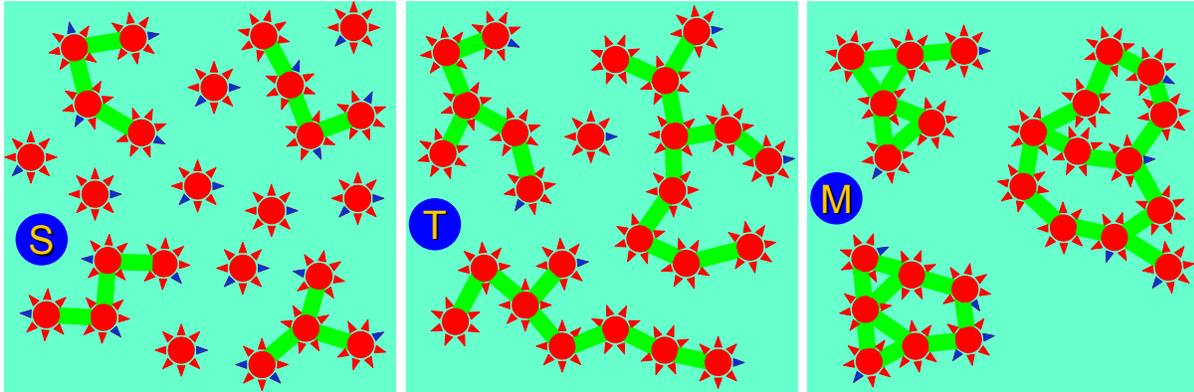


FIG. 3.18 – Représentations schématiques bidimensionnelles d’une région microscopique du sucrose (à gauche), du tréhalose (au centre) et du maltose (à droite) pour des solutions de concentrations intermédiaires (33-66 % en poids), *i.e.* en-dessous de la concentration seuil de percolation ϕ_p . Les différences entre ces trois dessins sont volontairement amplifiées de sorte à clairement distinguer les caractéristiques structurales des différentes solutions. Le fond en bleu-vert représente les molécules d’eau qu’elles soient liées aux sucres ou pas. Les sucres sont représentés par les étoiles dont chacun des huit triangles correspond à un groupe hydroxyle OH et dont le cercle central représente le squelette des sucres. Les groupes OH impliqués dans des LHs intramoléculaires sont de couleur bleue. Le tréhalose forme des agrégats de grande taille et interconnectés entre eux, alors que le sucrose est organisé en agrégats de petite taille et isolés, et que les molécules de maltose ont fortement tendance à s’agréger entre elles. Les molécules de tréhalose seraient donc moins mobiles que celles de sucrose, mais plus que celles de maltose. En outre, les molécules d’eau diffuseraient moins dans les solutions tréhalose/eau en raison des nombreuses molécules d’eau liées par LHs au tréhalose, et les sites où l’eau pourrait cristalliser (eau volumique) seraient plus rares que dans les solutions de sucrose et de maltose. Les mélanges tréhalose/eau seraient, au moins d’un point de vue structural, plus homogènes [229].

3.2 Propriétés vibrationnelles

Nous avons étudié par spectroscopie Raman les propriétés vibrationnelles des solutions sucre/eau dans différentes gammes de fréquences : celles des vibrations intermoléculaires ($[5-300] \text{ cm}^{-1}$), celle de la bande de flexion H-O-H de l'eau ($[1400-1900] \text{ cm}^{-1}$) et celle de l'élongation des liaisons O-H ($[2800-4000] \text{ cm}^{-1}$). Ces différentes gammes de fréquences nous permettent de sonder indirectement l'effet des sucres sur le réseau de LHs de l'eau [230]. Nous avons également calculer les densités vibrationnelles (DEVs) des solutions simulées à partir de la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation des vitesses des atomes :

$$c_{vv}(t) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \langle \mathbf{v}_i(0) \cdot \mathbf{v}_i(t) \rangle \quad (3.8)$$

où \mathbf{v} est le vecteur vitesse de l'atome i et m_i sa masse, et $M = \sum_i m_i$ est la masse totale du système. La DEV s'écrit alors :

$$g_{vv}(\omega) = \int_0^\infty \cos(\omega t) c_{vv}(t) dt \quad (3.9)$$

Les DEVs ont principalement été calculées dans la partie des vibrations intermoléculaires en raison du modèle rigide de l'eau utilisé. Mais, nous avons également employé un modèle flexible de l'eau afin de pouvoir calculer les DEVs dans la région de la bande de flexion de l'eau.

3.2.1 Région des vibrations intermoléculaires ($[5-300] \text{ cm}^{-1}$)

Les susceptibilités de l'eau pure et des solutions aqueuses des trois sucres à une concentration de 40 % pds à $T = 295 \text{ K}$ sont représentées dans la figure 3.19. Il est bien connu que le spectre de l'eau est composé de deux bandes principales centrées vers environ 50-60 et 170-190 cm^{-1} [6, 231]. La bande vers 50-60 cm^{-1} est généralement attribuée aux translations frustrées provenant de l'« effet de cage » [231] et celle vers 170-190 cm^{-1} à l'élongation de la liaison O-H...O entre deux molécules d'eau. De nombreuses simulations de dynamique moléculaire ont été menées afin de mieux comprendre l'origine de ces deux bandes. La première bande apparaîtrait dans tous les liquides atomiques ou moléculaires (formant des LHs ou pas) sous des conditions thermodynamiques appropriées. Dans le cas de l'eau, cette bande ne serait pas associée aux LHs contrairement à la bande à 170-190 cm^{-1} , qui est absente des spectres de liquides non-associés, et il a été montré une forte corrélation entre l'existence de la bande à 170-190 cm^{-1} et les LHs de l'eau [232–234].

Dans la figure 3.19, nous constatons que la présence des sucres réduit significativement la largeur de la seconde bande de l'eau, et décale sa position vers les plus hautes fréquences. Ceci montre que les sucres perturbent fortement le réseau de LHs de l'eau à 40 % pds, proche de la concentration seuil ϕ_A que nous avons déduit de l'analyse de plusieurs paramètres par simulation (voir *e.g.* section 3.1.7). Nous constatons que cet effet est plus marqué pour la solution de tréhalose que pour celles de sucrose et de maltose. Ceci montrerait que le tréhalose déstructure davantage le réseau de LHs de l'eau que les deux autres sucres, en accord avec les résultats des simulations et de nombreuses expériences. Il convient toutefois de rappeler que la contribution des sucres affecte notablement la forme

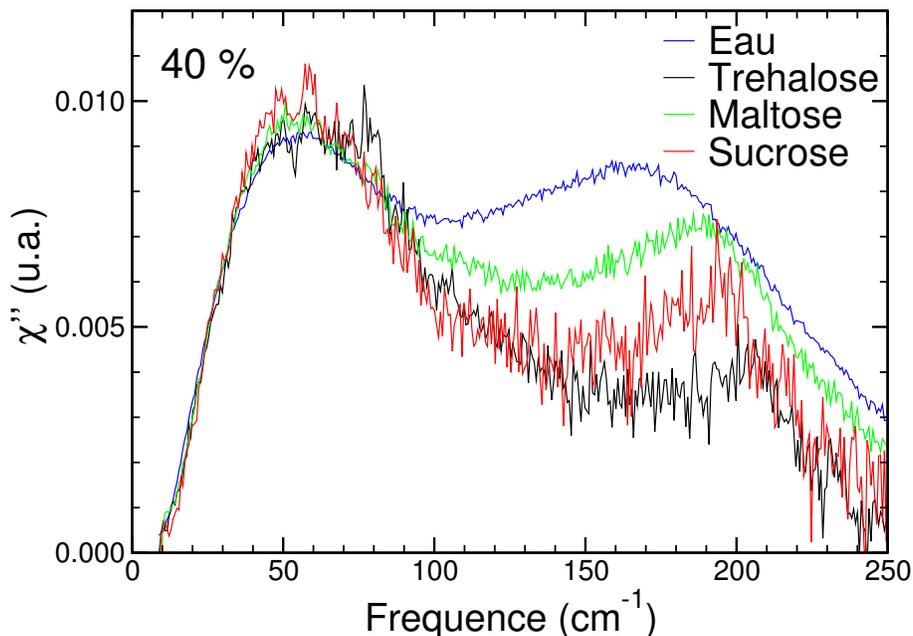


FIG. 3.19 – Susceptibilités χ'' de l'eau pure et des solutions aqueuses des trois sucres étudiés à 40 % pds et $T = 295$ K. Les spectres ont été normalisés par rapport à la première bande, afin de pouvoir comparer l'effet des sucres sur la seconde (nous supposons que les sucres affectent peu la première bande).

des spectres. Il est donc probable que les effets observés ne résultent pas uniquement des LHs eau-eau.

Nous avons calculé la DEV de l'eau en présence des sucres dans les solutions simulées afin de tenter de mieux distinguer les effets des sucres sur l'eau. La figure 3.20 présente les différentes DEVs de l'eau obtenues dans l'eau pure et dans les différentes solutions de tréhalose simulées à $T = 293$ K, dans la gamme $[0-1000]$ cm^{-1} .

La bande située vers 500 cm^{-1} correspond aux mouvements de libration des molécules d'eau. L'allure des DEVs dans la région $[0-300]$ cm^{-1} est comparable aux spectres expérimentaux de la figure 3.19, même si les intensités relatives des deux bandes discutées précédemment diffèrent. L'augmentation de la concentration en tréhalose conduit au décalage vers les plus hautes fréquences des deux bandes. La première bande connaît également un élargissement qui traduit l'hétérogénéité des environnements que sondent les molécules d'eau en raison de la présence des sucres. L'amplitude de la seconde bande décroît lorsque la concentration en tréhalose croît, en accord avec la déstructuration de plus en plus importante induite par les molécules de tréhalose. L'augmentation simultanée de la fréquence des deux bandes pourrait montrer la contrainte grandissante qu'exerce le tréhalose sur les molécules d'eau : sa faible mobilité par rapport à l'eau expliquerait l'augmentation de l'effet de cage, qui induirait également l'augmentation de la fréquence d'élongation des LHs de l'eau.

Nous avons ensuite cherché à comparer ces effets du tréhalose avec ceux du maltose et du sucrose. Les DEVs des trois sucres à une concentration données sont très similaires (données non montrées), contrairement aux spectres de la figure 3.19, de sorte qu'il est nécessaire de les ajuster pour déceler d'éventuelles différences. Nous avons choisi une fonc-

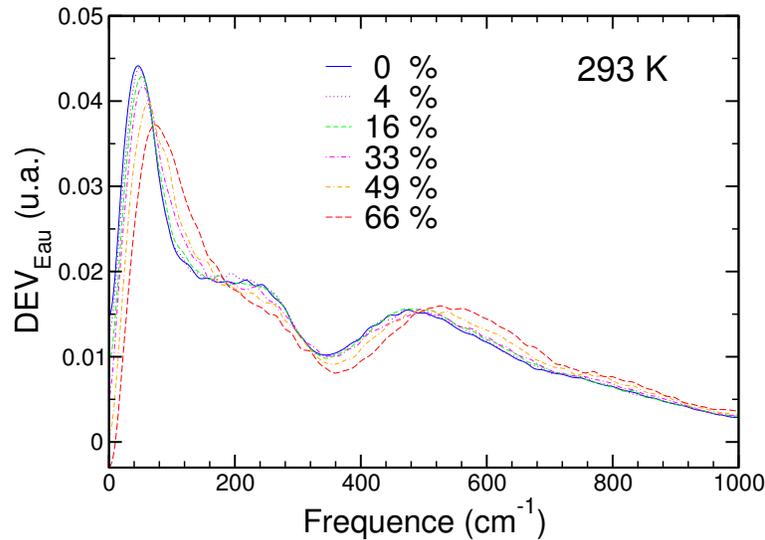


FIG. 3.20 – DEVs de l'eau pure et des solutions aqueuses de tréhalose étudiées dans les simulations à $T = 293$ K. Les courbes ont été lissées au moyen de l'algorithme de Savitzky-Golay du logiciel PeakFit v4.02 afin de faciliter la comparaison des différentes courbes.

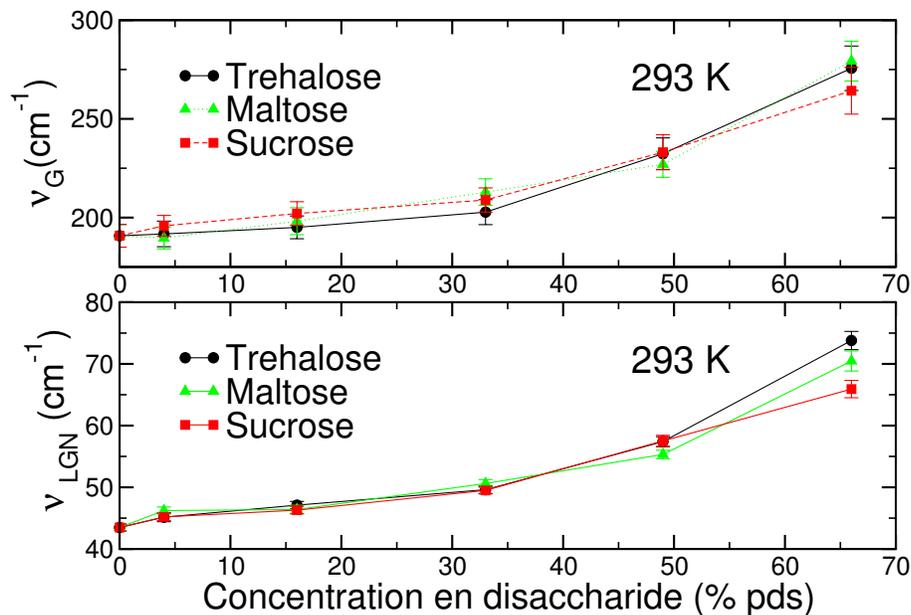


FIG. 3.21 – Evolution en concentration de la position des deux modes de la partie $[0-300]$ cm^{-1} des DEVs des différentes solutions aqueuses des trois sucres étudiés à $T = 293$ K. La première bande vers 50 cm^{-1} a été représentée par une fonction log-normale (LGN) et la seconde vers 180 cm^{-1} par une fonction gaussienne (G).

tion log-normale et une fonction gaussienne pour représenter respectivement la première et la seconde bande. Les positions de ces deux bandes déduites de la procédure d'ajustement sont indiquées dans la figure 3.21 pour les différentes solutions des trois sucres à $T = 293$ K.

Les positions des deux bandes de l'eau sont très proches d'un sucre à l'autre et des

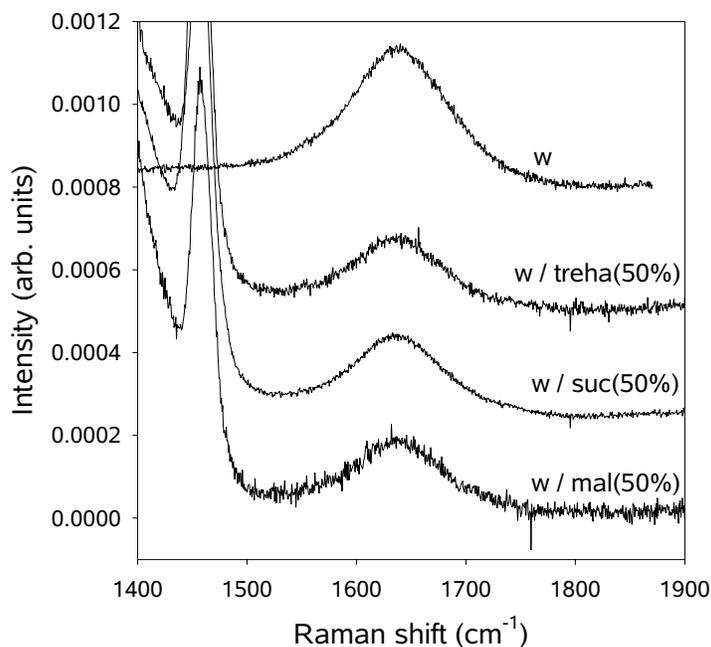


FIG. 3.22 – Mode de flexion HOH de l'eau dans les spectres Raman de l'eau pure et des mélanges disaccharide/eau à une concentration de 50 % en poids et à $T = 295$ K.

résultats analogues sont obtenus pour les largeurs de ces bandes (données non montrées). La plus grande incertitude sur la position de la seconde bande provient du fait que cette dernière est moins bien résolue, notamment à cause de la présence du côté des hautes fréquences de la bande de librations des molécules d'eau. Il apparaît délicat de distinguer les trois sucres, même s'il semble que le sucrose décale moins les bandes à 66 % pds que le maltose et le tréhalose. Il est cependant intéressant de constater qu'un changement de pente, moins prononcé pour le premier pic, s'effectue vers une concentration d'environ 40 % pds pour les trois sucres, qui correspond à la concentration seuil ϕ_A que nous avons obtenue lors de l'analyse d'autres paramètres sondant les propriétés de l'eau (voir *e.g.* section 3.1.7). C'est dans cette gamme de concentrations que notamment le nombre de LHs sucre-sucre et que le temps de vie des LHs eau-eau augmentent fortement (voir respectivement sections 3.1.11 et 3.3.3). C'est la raison pour laquelle nous observons ce changement de pente dans la position de ces deux bandes de l'eau.

3.2.2 Région de la bande de flexion de l'eau ($[1400-1900]$ cm^{-1})

L'analyse du mode de flexion H-O-H des molécules d'eau donne directement une information sur les changements structuraux induits par les disaccharides car il n'y a pas de recouvrement des bandes des sucres et de l'eau dans cette région du spectre Raman. Comme le montre la figure 3.22, le mode de flexion est très large et peu intense. Ce mode a été ajusté par une fonction lorentzienne pour chacune des solutions. La fréquence et la mi-largeur à mi-hauteur déduites de cet ajustement sont reportées dans le tableau 3.3, p. 113.

(en cm^{-1})	Eau pure	tréhalose/eau	maltose/eau	sucrose/eau
ω (Raman)	$1636,6 \pm 0,2$	$1635,9 \pm 1,2$	$1636,6 \pm 0,5$	$1636,8 \pm 0,3$
ω (MD)	$1603,8 \pm 0,4$	$1610,3 \pm 0,4$	$1612,5 \pm 0,4$	$1612,5 \pm 0,4$
HWHM (Raman)	$55,7 \pm 0,5$	$45,6 \pm 1,0$	$46,5 \pm 1,2$	$44,40 \pm 0,7$
HWHM (MD)	$40,5 \pm 0,4$	$38,4 \pm 0,4$	$37,6 \pm 0,4$	$37,3 \pm 0,4$

TAB. 3.3 – Position ω et mi-largeur à mi-hauteur HWHM du mode de flexion H-O-H des molécules d’eau pour les solutions à 50 % en poids étudiées par spectroscopie Raman à $T = 295$ K et pour les solutions à 49 % en poids simulées par dynamique moléculaire à $T = 293$ K. Les données obtenues à partir des calculs de la DEV du modèle de l’eau flexible [183] des solutions aux mêmes concentrations et à $T = 273$ K sont également indiquées.

Une procédure identique a été utilisée afin d’extraire ces paramètres pour des simulations avec un modèle flexible de l’eau. Ces données sont comparées avec celles obtenues pour l’eau pure. Il apparaît clairement que les sucres ont une faible influence sur la fréquence de la bande de flexion $\delta(\text{HOH})$, qui ne change pas jusqu’à des concentrations de 30 % en poids (données non présentées). Cette fréquence est légèrement décalée vers les plus petites fréquences par rapport à l’eau pure dans les solutions tréhalose/eau, alors que le comportement inverse est observé pour les solutions sucrose/eau. Dans les simulations numériques, cette bande est décalée vers les plus hautes fréquences, mais moins pour les solutions de tréhalose que pour celles de sucrose ou de maltose. En raison de la largeur de la bande et des grandes incertitudes, nous ne pouvons pas dire si ce comportement est significatif ou non. Une diminution de la largeur du mode de flexion de l’eau est cependant observée dans les expériences et les simulations lorsque la concentration en sucre croît. Cette tendance générale pourrait être reliée à la présence de domaines de l’eau plus petits et plus homogènes, influencés par la présence des sucres. Aucune différence significative entre les sucres n’a pu être extraite de la dépendance en concentration de la largeur de la bande. D’autre part, Maréchal [235] a observé que la bande de flexion de l’eau volumique devient plus étroite lorsque la température croît. Cette observation pourrait révéler la corrélation existant entre l’« affilage » de la bande de flexion de l’eau et la destruction de son réseau de LHs. L’effet observé de l’ajout des sucres serait donc contre-intuitif et similaire à une augmentation de la température. Les sucres réduiraient donc la température de cristallisation de l’eau, gênant ainsi la formation de la glace et limitant les contraintes associées dans les systèmes biologiques exposés aux températures inférieures à 273 K. Ceci mettrait en évidence l’effet cryoprotecteur des sucres.

3.2.3 Région des bandes d’élongation O-H ([2800-4000] cm^{-1})

Le spectre Raman de l’eau liquide se compose des bandes d’élongation O-H situées entre 2800 et 3800 cm^{-1} , comme le montre la figure 3.23. Cette région peut être décomposée en trois gaussiennes. La première est généralement associée aux vibration O-H des molécules d’eau ayant un ordre tétraédrique, alors que la seconde correspond aux molécules d’eau dont les LHs sont déformées (cf figure 1.21 du chapitre 1, p. 31). La troisième, qui n’a pas été considérée dans les études antérieures sur les solutions disac-

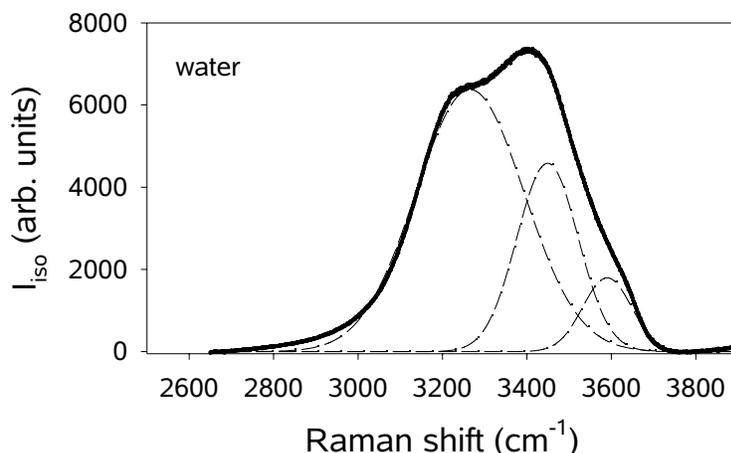


FIG. 3.23 – Spectre Raman de la bande d'élongation O-H de l'eau à $T = 295$ K. Les lignes en tirets correspondent aux composantes issues de la procédure d'ajustement.

charide/eau [88, 236], correspond aux molécules d'eau dont au moins un groupe OH ne forme aucune LH, appelée eau libre. Les spectres Raman des mélanges sucre/eau à 5 et 50 % en poids et à 295 K enregistrés dans la gamme de fréquences 2500-4000 cm^{-1} sont représentés dans la figure 3.24. Les intensités de diffusion isotropique sont calculées selon la relation $I_{iso} = I_{VV} - 4/3 \cdot I_{VH}$, où I_{VV} et I_{VH} désignent respectivement les intensités en polarisation parallèle et croisée. Chaque spectre se compose des bandes d'élongation C-H et O-H situées respectivement entre 2600 et 3100 cm^{-1} et entre 2800 et 3800 cm^{-1} . Nous voyons aisément dans la figure 3.24 que les bandes d'élongation C-H et O-H se recouvrent.

C'est la raison pour laquelle l'ensemble du spectre ($[2500-4000] \text{ cm}^{-1}$) a été ajusté afin de rigoureusement déterminer les contributions relatives des composantes de la bande O-H du spectre Raman. Il convient de souligner que la résonance de Fermi entre $\delta(\text{HOH})$ et $\nu(\text{OH})$ sont susceptibles de modifier l'enveloppe de la bande d'élongation O-H. Néanmoins, compte-tenu de la forme aplatie de la bande de flexion $\delta(\text{HOH})$ et du bon accord entre les données expérimentales et la courbe d'ajustement (avec 3 composantes), cette éventuelle contribution n'a pas été considérée. La figure 3.24 montre que la composante correspondant à l'eau libre est nécessaire pour que la procédure d'ajustement reproduise de manière satisfaisante les courbes expérimentales. L'intensité intégrée relative de la contribution « open » et de celle de l'eau « libre » par rapport à l'intensité totale intégrée de la bande d'élongation $\nu(\text{OH})$ est représentée en fonction de la concentration pour les trois sucres étudiés dans la figure 3.25.

Pour les concentrations modérées en sucre, l'intensité relative de la contribution « open » représente approximativement le taux de molécules d'eau dont l'ordre est tétraédrique. La figure 3.25 révèle une dépendance en concentration similaire de chacune des composantes de la bande d'élongation OH des solutions de tréhalose, maltose et sucrose pour les concentrations inférieures à 30 % en poids. Au-dessus de cette concentration, la dépendance en concentration des solutions de tréhalose se distingue de celles de maltose et de sucrose. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par simulation numérique sur le réseau de LHs de l'eau, pour lesquels le tréhalose se distingue du maltose et du sucrose au-dessus

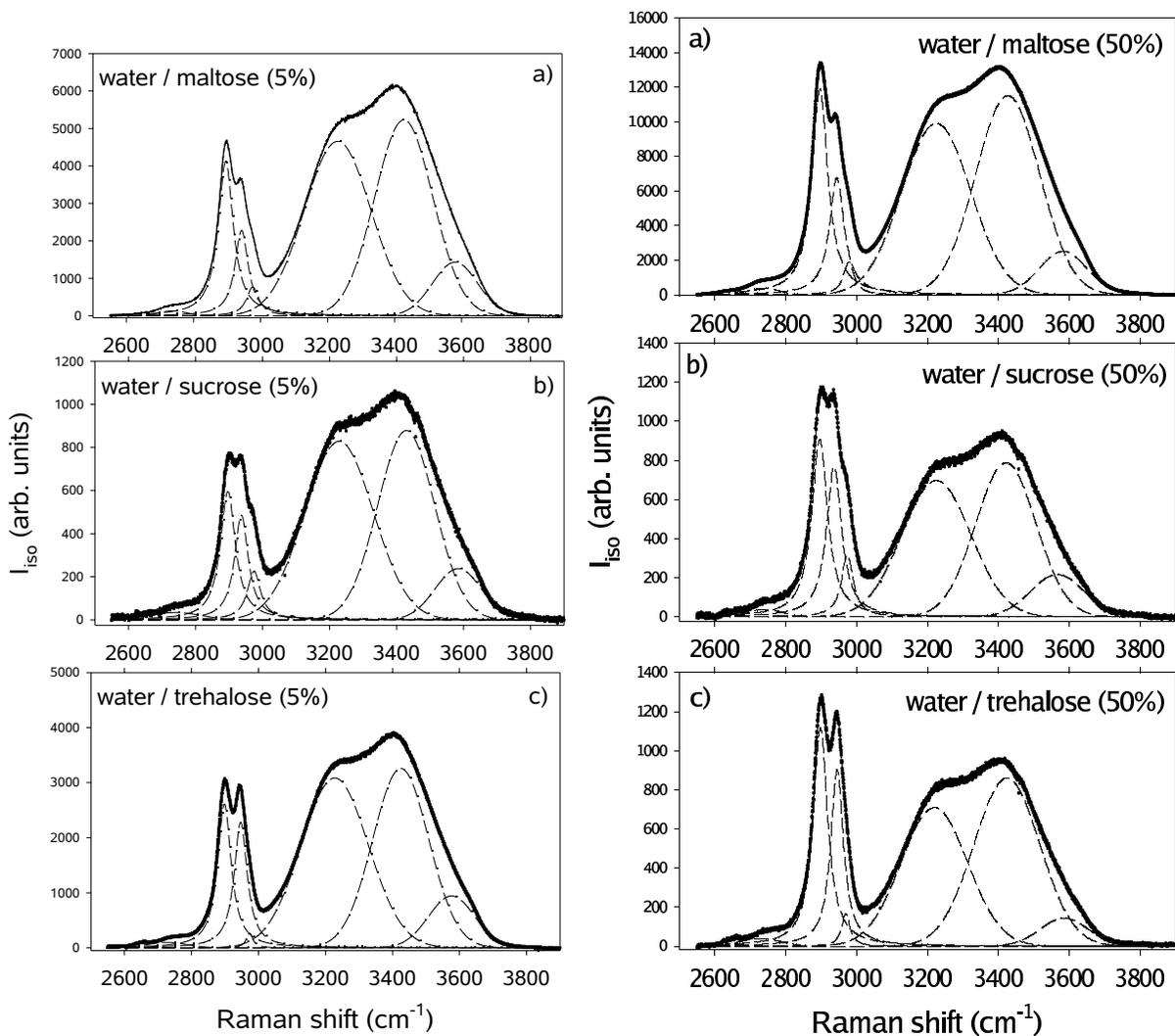


FIG. 3.24 – *A gauche* : Spectres Raman des régions des elongations C-H et O-H des mélanges disaccharide/eau à 5 % en poids à $T = 295 \text{ K}$. Les lignes en tirets correspondent aux composantes issues de la procédure d'ajustement. *A droite* : Spectres Raman des régions des elongations C-H et O-H des mélanges disaccharide/eau à 50 % en poids à $T = 295 \text{ K}$. Les lignes en tirets correspondent aux composantes issues de la procédure d'ajustement.

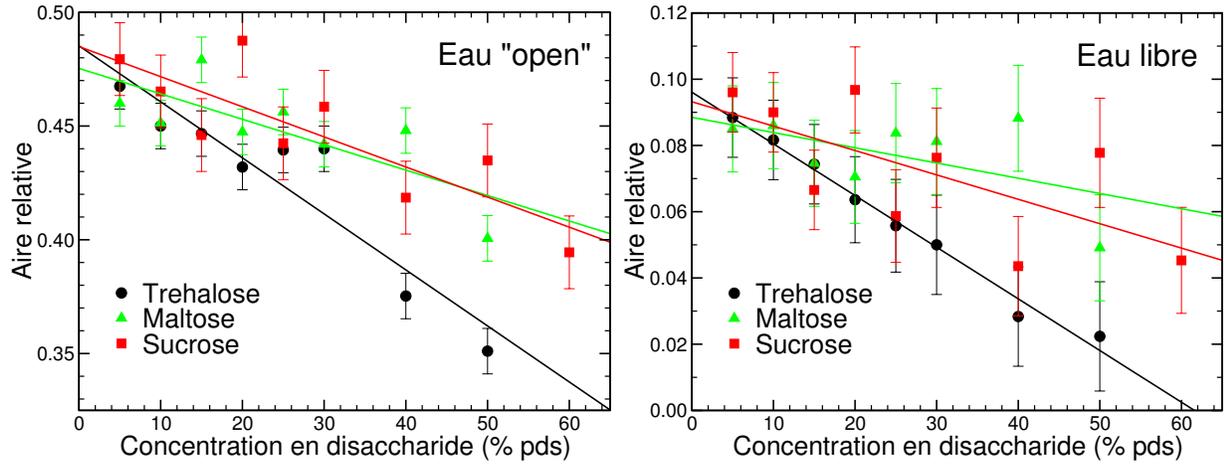


FIG. 3.25 – Dépendance en concentration en sucre des intensités intégrées relatives de la première (à gauche) et de la troisième (à droite) contributions des bandes d'élongation O-H (par rapport à l'intensité totale intégrée de la bande OH). Les lignes représentent les régressions linéaires.

d'une concentration $\phi_A \approx 40\%$ pds. La décroissance de la contribution « open » lorsque la concentration en sucre croît indique indubitablement l'effet destructurant des sucres sur le réseau de LHs de l'eau, comme l'ont suggéré Magazù *et al.* [88]. La concentration de 30 % en poids apparaît comme la proportion de sucre à partir de laquelle l'effet de déstructuration du tréhalose semble plus marqué. Ce résultat est également confirmé par la décroissance de l'intensité intégrée de la bande de l'eau libre. Il suggère que les sucres imposent leur propre structure de LHs, le tréhalose davantage que le maltose et le sucrose. Ceci signifierait que le tréhalose réduit plus efficacement la température de cristallisation des solutions biologiques en perturbant davantage que le maltose et le sucrose le réseau de LHs de l'eau.

3.3 Propriétés dynamiques

3.3.1 Fonctions de diffusion intermédiaires

Nous avons calculé les fonctions de diffusion intermédiaires des solutions $S(Q,t)$ des solutions disaccharide/eau, où Q est le vecteur de diffusion. Ces fonctions s'écrivent :

$$S_{inc}(Q,t) = \left\langle \sum_{\alpha} b_{\alpha,inc}^2 e^{i.Q.[r_{\alpha}(t)-r_{\alpha}(0)]} \right\rangle \quad (3.10)$$

$$S_{coh}(Q,t) = \left\langle \sum_{\alpha \neq \beta} b_{\alpha,coh} b_{\beta,coh} e^{i.Q.[r_{\alpha}(t)-r_{\beta}(0)]} \right\rangle \quad (3.11)$$

$$(3.12)$$

où $b_{\alpha,inc}$ et $b_{\alpha,coh}$ correspondent aux longueurs de diffusion respectivement incohérente et cohérente de l'atome α et les crochets désignent la moyenne sur toutes les origines de temps des simulations.

Ces fonctions correspondent à la transformée de Fourier temporelle des facteurs de structure dynamiques $S(Q,\omega)$, qui sont des quantités essentielles obtenues par les expériences de diffusion de neutrons. La diffusion incohérente donne accès aux corrélations dans les mouvements d'atomes individuels, tandis que la diffusion cohérente permet d'étudier des mouvements collectifs. La pondération respective des contributions incohérente et cohérente est déterminée par les longueurs de diffusion $b_{\alpha,inc}$ et $b_{\alpha,coh}$.

Les figures 3.26 et 3.27 représentent la comparaison de quelques $S(Q,t)$ incohérents $S_{inc}(Q,t)$ et cohérents $S_{coh}(Q,t)$ expérimentaux et calculés. L'accord est relativement bon, même si les allures des $S_{inc}(Q,t)$ expérimental et calculé de la solution de tréhalose diffèrent à $Q = 1,7 \text{ \AA}^{-1}$. Il convient de souligner que les incertitudes sur les $S_{inc}(Q,t)$ (non représentées dans la figure 3.26) sont importantes et le $S_{inc}(Q=1,7 \text{ \AA}^{-1}, t)$ calculé est compris dans ces incertitudes. Aux vues des figures 3.26 et 3.27 nous pouvons déduire que la dynamique des solutions de tréhalose est bien reproduite par les simulations.

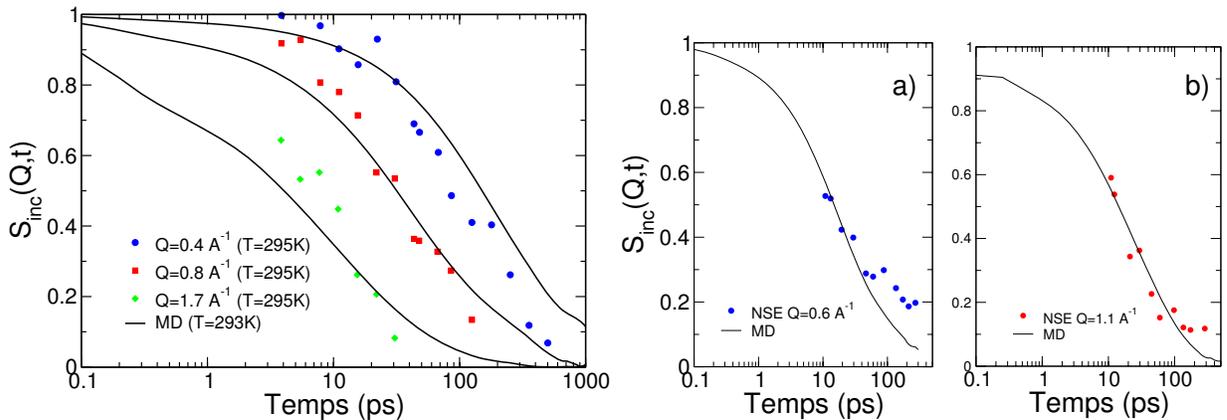


FIG. 3.26 – *A gauche* : Fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ pour $Q = 0,4, 0,8$ et $1,7 \text{ \AA}^{-1}$ de la solution tréhalose/eau à 50 % pds obtenues dans notre étude (MD, trait plein) à $T = 293 \text{ K}$ et expérimentalement (points) à $T = 295 \text{ K}$ (réf. [237]). *A droite* : (a) Fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ pour $Q = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ de la solution tréhalose/eau à 50 % pds obtenues à $T = 353 \text{ K}$ dans notre étude (MD) et expérimentalement (points). (b) Fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ pour $Q = 1,1 \text{ \AA}^{-1}$ de la solution sucrose/eau à 50 % pds obtenues à $T = 293 \text{ K}$ dans notre étude et expérimentalement (réf. [238]). L'ensemble des points expérimentaux ont été obtenus par diffusion neutronique à écho de spin NSE (pour « Neutron Spin Echo »).

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux $S_{inc}(Q,t)$ des molécules d'eau [239]. La figure 3.28 montre les $S_{inc}(Q,t)$ de l'eau en présence de tréhalose à différentes températures (l'eau se comporte de manière similaire en présence de maltose et de sucrose).

Aux temps très courts ($< 0,1 \text{ ps}$), une première décroissance de $S_{inc}(Q,t)$ est observée pour toutes les solutions et températures. Elle correspond à la dynamique vibrationnelle et ne varie pas significativement avec la concentration en sucre. Nous ne discuterons donc que de la dynamique aux temps plus longs que $0,1 \text{ ps}$ par la suite. Aux températures élevées, $S_{inc}(Q,t)$ décroît mono-exponentiellement vers 0. Lorsque la température diminue, la dynamique ralentit fortement et un processus de relaxation en deux temps apparaît, comme pour les liquides sous-refroidis [240]. Ce comportement est couramment interprété en termes de découplage dynamique α - β , comme le décrit la théorie des modes

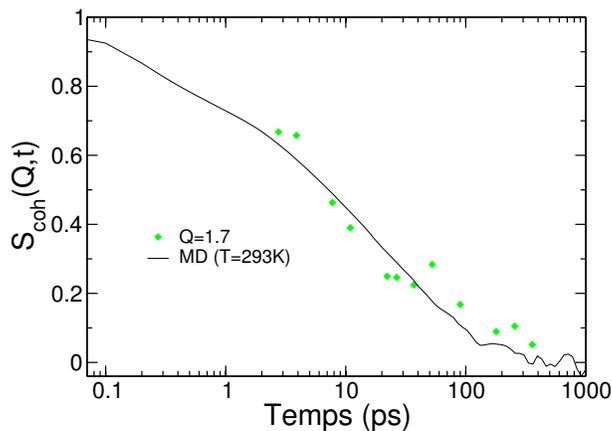


FIG. 3.27 – Fonctions de diffusion intermédiaires cohérentes $S_{coh}(Q,t)$ pour $Q = 1,7 \text{ \AA}^{-1}$ de la solution tréhalose/eau à 50 % pds obtenues dans notre étude (courbe en trait plein) à $T = 293 \text{ K}$ et expérimentalement (points) à $T = 300 \text{ K}$ (réf. [237]).

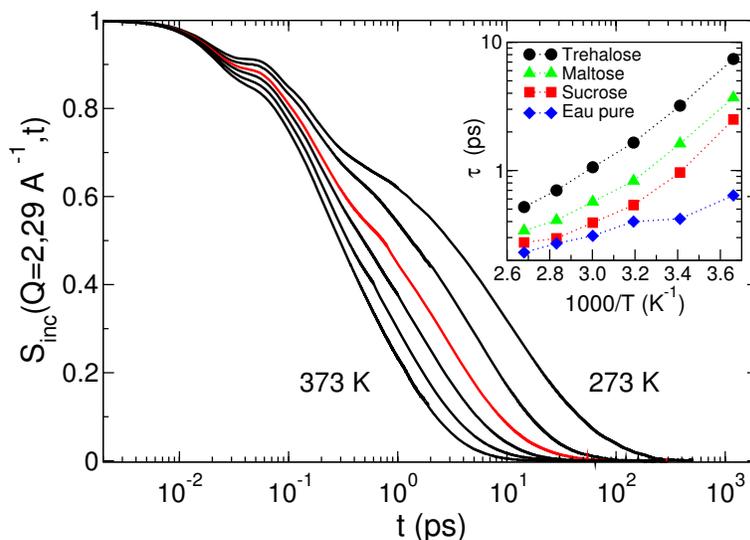


FIG. 3.28 – Fonctions de diffusion intermédiaire incohérentes de l'eau $S_{inc}(Q,t)$ des solutions de tréhalose à 49 % pds aux différentes températures étudiées (de 373 à 273 K, de gauche à droite, par pas de 20 K). La courbe à $T = 313 \text{ K}$, représentée en rouge, montre l'apparition d'un plateau et suggère que la température T_A est proche de 313 K (voir texte). L'insert montre la dépendance en température des temps caractéristiques de relaxation τ des solutions sucre/eau à 49 % en poids et de l'eau pure. τ correspond au temps de décroissance en $1/e$ de $S_{inc}(Q,t)$, pour Q valant $2,29 \text{ \AA}^{-1}$, qui correspond à la position du premier principal maximum du facteur de structure statique partiel S_{O-O} de l'eau pure.

couplés (MCT) [116]. La relaxation aux temps longs (α), ajustée par une exponentielle étirée de Kohlrausch-Williams-Watts, est séparée du régime aux temps courts (β) par un « plateau », associé à l'effet de cage (cf Annexe du chapitre 1, p. 43). A partir des $S_{inc}(Q,t)$, nous pouvons estimer une température de « croisement », notée T_A qui correspond à l'apparition d'une dynamique lente, où les relaxations sont non-exponentielles et non-Arrhéniennes. T_A a été identifiée pour des liquides binaires de Lennard-Jones [241]

au-dessus de la température critique T_c prédite par la théorie MCT, et interprétée comme la température à laquelle la dynamique du système commence à être influencée par le paysage énergétique lors du refroidissement. Nous avons identifié de manière approximative T_A comme étant la température à laquelle un plateau apparaît dans la fonction $S_{inc}(Q,t)$. Au-dessus de T_A , les liquides se comportent comme des liquides simples et relaxent de manière exponentielle. En-dessous de T_A , la dynamique de l'eau est ralentie et la matrice devient très visqueuse. Pour les solutions tréhalose/eau à une concentration de 49 % pds, T_A est estimée à environ 320 K. Pour les mélanges avec le maltose et le sucrose, nous avons obtenu $T_A \approx 300$ K. Ceci signifie que l'eau en présence de tréhalose peut être maintenue dans une situation de dynamique lente à des températures plus élevées qu'avec le maltose ou le sucrose. Lors d'un changement de température, le tréhalose protégerait donc les molécules biologiques en réduisant leurs relaxations conformationnelles. La température T_A pourrait jouer un rôle important dans la bioprotection, en plus de la température de transition vitreuse T_g dans le modèle de Green et Angell. A partir des fonctions $S_{inc}(Q,t)$, nous avons déduit les temps de relaxation τ de l'eau en présence des trois sucres aux différentes températures étudiées, représentés dans l'insert de la figure 3.28. Les temps de relaxation de l'eau pure sont également indiqués pour comparaison. τ est de 1,2 à 10 fois plus grand en présence des sucres que dans l'eau pure, en fonction de la température considérée. De plus, nous parvenons à distinguer les temps de relaxation en présence des différents sucres, ceux en présence de tréhalose étant les plus longs. Celui-ci ralentit donc l'eau liquide plus efficacement que le maltose et le sucrose. Le tréhalose doit donc avoir une plus grande influence que le sucrose et le maltose sur la dynamique de l'eau, *i.e.* la dynamique des molécules de tréhalose est imposée à un plus grand nombre de molécules d'eau.

3.3.2 Coefficients de diffusion

Le coefficient de diffusion translationnel peut être calculé à partir de la pente aux temps longs du déplacement carré moyen du centre de masses des molécules, dont la dépendance temporelle doit être linéaire selon la relation d'Einstein :

$$D = \frac{1}{2d} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle [r(t) - r(0)]^2 \rangle}{t} \quad (3.13)$$

où D est le coefficient de diffusion, d la dimensionnalité du système et les crochets désignent une moyenne sur l'ensemble des origines de temps et l'ensemble des molécules d'eau de la boîte de simulation. L'accord est satisfaisant avec des résultats obtenus expérimentalement par diffusion neutronique quasi-élastique [238], reportés dans le tableau 3.4. Le coefficient de diffusion des molécules d'eau en présence du tréhalose est environ 5 fois plus petit que celui de l'eau pure ($\approx 2,3 \cdot 10^{-5}$ cm²/s) à 293 K. De plus, les molécules de tréhalose diffusent d'environ un ordre de grandeur plus lentement que les molécules d'eau à une température donnée.

$T(K)$	$D_T(MD)$ (cm^2/s)	$D_T(NS)$ (cm^2/s)	$D_W(MD)$ (cm^2/s)	$D_W(NS)$ (cm^2/s)
273	$2,4 \cdot 10^{-7}$		$2,2 \cdot 10^{-6}$	
283		$2,8 \cdot 10^{-7}$		$2,0 \cdot 10^{-6}$
293/295	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$
308		$5,4 \cdot 10^{-7}$		$5,5 \cdot 10^{-6}$
313	$7,1 \cdot 10^{-7}$		$8,5 \cdot 10^{-6}$	
320		$8,5 \cdot 10^{-7}$		$8,3 \cdot 10^{-6}$
333	$1,4 \cdot 10^{-6}$		$1,3 \cdot 10^{-5}$	
353	$2,2 \cdot 10^{-6}$		$1,9 \cdot 10^{-5}$	
373	$3,8 \cdot 10^{-6}$		$2,6 \cdot 10^{-5}$	

TAB. 3.4 – Comparaison des coefficients de diffusion translationnels du tréhalose et de l'eau dans les solutions à 50 % en poids de notre étude (respectivement $D_T(MD)$ et $D_W(MD)$) avec ceux obtenus par diffusion neutronique quasi-élastique (respectivement $D_T(NS)$ et $D_W(NS)$), selon la référence [238].

La figure 3.29 présente les coefficients de diffusion de l'eau D_W à $T = 293$ K pour les différentes concentrations étudiées.

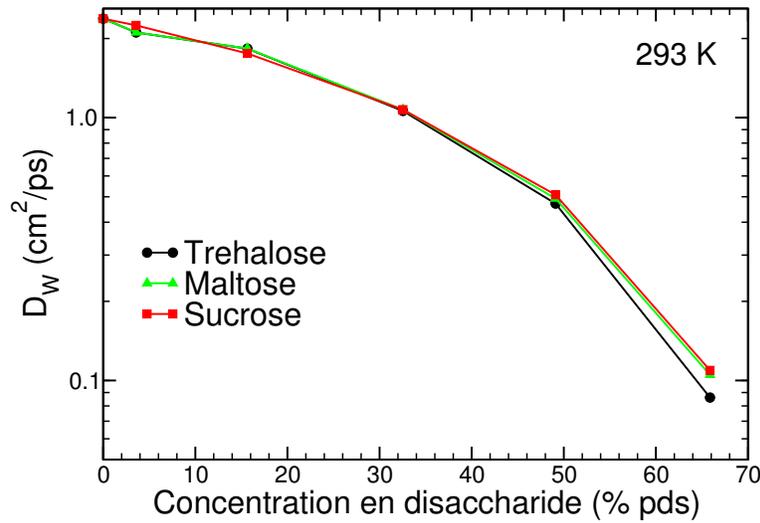


FIG. 3.29 – Dépendance en concentration du coefficient de diffusion translationnel D_W de l'eau à $T = 293$ K pour les différents disaccharides étudiés.

Ceux-ci diminuent de plus d'un ordre de grandeur lorsque la concentration en sucre passe de 4 à 66 % pds. L'allure de D_W ressemble à celles de $\langle n_W \rangle$ ou de p_{HB} (cf figures 3.8 et 3.9). Ceci suggère que plus les molécules d'eau forment de LHs avec les sucres, plus leur coefficient de diffusion diminue, comme nous pouvions nous y attendre d'après le faible coefficient de diffusion du tréhalose par rapport à celui de l'eau à une température donnée (cf tableau 3.4). Le point intéressant qu'il convient de souligner est la brusque diminution de D_W lorsque la concentration passe de 49 à 66 % pds. Celle-ci est en accord avec la rapide augmentation de viscosité observée par Miller *et al.* lorsque la concentration en disaccharide augmente [80]. Elle s'interprète bien si l'on remarque que c'est dans cette gamme de concentrations que la percolation du réseau de LHs des sucres se produit. La formation des nombreuses LHs intermoléculaires sucre-sucre permet

la formation d'un agrégat auquel la quasi-totalité des molécules de sucres appartient et qui pourrait accroître à la fois la résistance à la déformation sous cisaillement et la stabilité mécanique du mélange, comme l'ont suggéré Goddard *et al.* [228] à partir de simulations de matrices de sucrose. En outre, les D_W pour les mélanges disaccharide/eau ne sont réellement distinguables qu'à la concentration de 66 % pds. Ceci est en accord avec les résultats expérimentaux de Rampp *et al.* [196] et numériques de Ekdawi-Sever *et al.* [87], qui montrent que les différences entre les coefficients de diffusion du tréhalose et du sucrose sont maximales aux concentrations élevées et aux faibles températures. Le coefficient de diffusion de l'eau à $T = 293$ K est plus faible en présence de tréhalose qu'en présence de maltose ou de sucrose en raison du nombre d'hydratation plus élevé du tréhalose.

3.3.3 Temps de vie des LHs

Le temps de vie des LHs de l'eau peut être estimé à partir du temps de décroissance en $1/e$ de la fonction d'autocorrélation normalisée $C(t)$ de l'opérateur de LH $h(t)$, qui vaut 1 si une LH qui existait au temps 0 existe encore au temps t , qu'elle ait été rompue ou non entre ces deux instants, et 0 sinon.

$$C(t) = \langle h(0).h(t) \rangle \quad (3.14)$$

$C(t)$ décroît rapidement aux temps très courts en raison des librations des molécules d'eau susceptibles de rompre les LHs (données non présentées). La décroissance aux temps longs de $C(t)$ correspond à la diffusion relative de deux molécules d'eau initialement liées par LHs et dont la LH est rompue parce que la distance entre leurs atomes d'oxygène respectifs dépasse le critère de distance d_{OO} . Le temps en $1/e$ est donc directement relié au coefficient de diffusion des molécules d'eau. La figure 3.30 présente la dépendance en concentration du temps caractéristique des LHs eau-eau τ_{HB} à $T = 293$ K. Les courbes pour les trois sucres sont similaires jusqu'à une concentration de 50 % en poids, mais le temps τ_{HB} de la solution tréhalose/eau est plus grand que ceux des solutions de maltose et de sucrose. Ceci est en accord avec le comportement des coefficients de diffusion de l'eau (voir figure 3.29). Aux faibles concentrations, le nombre de molécules d'eau formant des LHs avec les sucres est trop faible par rapport au nombre total de molécules d'eau des boîtes de simulation pour que les différences existant entre les nombres d'hydratation des trois sucres ne soient observables dans les temps de vie de LHs. Ces différences n'apparaissent qu'à partir de 66 % en poids, *i.e.* quand le nombre de LHs sucre-eau est comparable au nombre de LHs eau-eau.

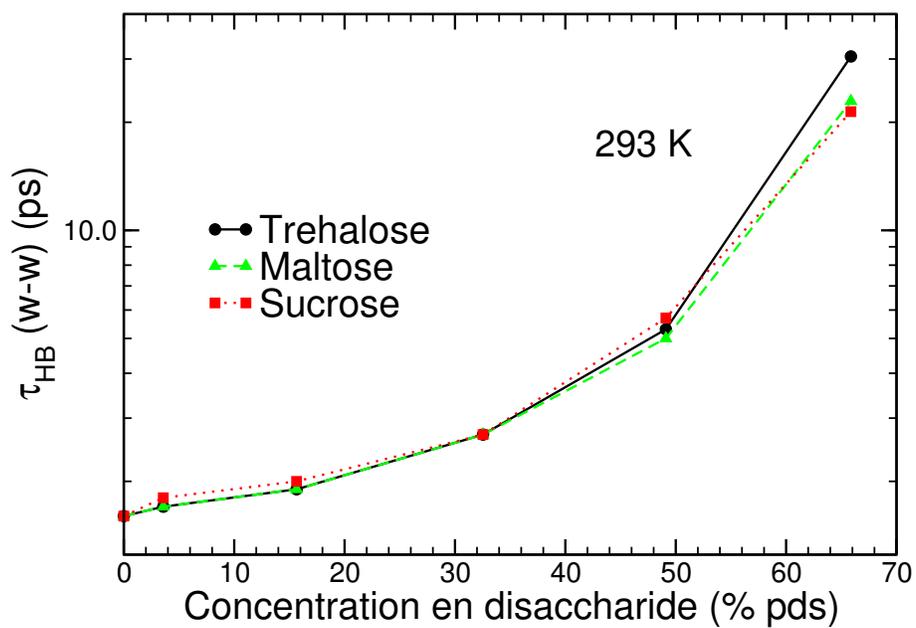


FIG. 3.30 – Dépendance en concentration du temps caractéristique des LHs eau-eau $\tau_{HB}(w-w)$ à $T = 293\text{ K}$ pour les différentes solutions binaires disaccharide/eau étudiées.

Chapitre 4

Solutions lysozyme/sucre/eau

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'influence des mélanges sucre/eau sur les propriétés vibrationnelles et dynamiques d'une protéine globulaire modèle, le lysozyme. Nous avons dans un premier temps localisé les zones dont les fluctuations sont sensiblement plus élevées ou plus faibles que les fluctuations moyennes du lysozyme. Nous avons ensuite analysé les interactions des molécules d'eau et de sucre avec le lysozyme, et observé leurs conséquences sur les propriétés vibrationnelles et dynamiques du lysozyme. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'influence des sucres sur la transition dynamique et sur la dénaturation thermique du lysozyme.

4.1 Structure du lysozyme

4.1.1 Ecart par rapport à la structure cristallographique

Afin de suivre l'évolution temporelle de la structure du lysozyme dans les différentes solutions, nous avons calculé l'écart moyen RMSD (pour « Root Mean Square Deviation ») par rapport à sa structure cristallographique [185], à la fois pour tous les atomes du lysozyme ou uniquement pour les atomes de carbone C_α de la chaîne polypeptidique. L'écart moyen entre les structures en solution et cristallographique du lysozyme s'écrit :

$$RMSD = \left(\frac{\sum_{i=1}^N m_i [(x_i - x_i^{cryst})^2 + (y_i - y_i^{cryst})^2 + (z_i - z_i^{cryst})^2]}{\sum_{i=1}^N m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.1)$$

où (x_i, y_i, z_i) et $(x_i^{cryst}, y_i^{cryst}, z_i^{cryst})$ sont respectivement les coordonnées des atomes i du lysozyme en solution et dans le cristal. Les $RMSD(C_\alpha)$ sondent les changements de structure du squelette du lysozyme, alors que les $RMSD(\text{tous-atomes})$ dépendent également des atomes en contact avec le solvant. La figure 4.1 présente les RMSDs du lysozyme dans les différentes solutions étudiées. Nous constatons que les $RMSD(C_\alpha)$ et les $RMSD(\text{tous-atomes})$ dans l'eau pure augmentent pendant 5 ns environ puis se stabilisent vers 1,5 Å et 2,3 Å respectivement. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par Lins *et al.* [125] et par Sterpone *et al.* [187], qui emploient le modèle TIP3P pour représenter les molécules d'eau. Ce résultat semble montrer que le champ de forces utilisé pour la protéine [186] est compatible avec le modèle SPC/E, bien qu'il ait été paramétré pour le modèle TIP3P.

La présence des sucres limite les changements conformationnels du lysozyme et réduit significativement l'augmentation des RMSDs. Les $RMSD(C_\alpha)$ et les $RMSD(\text{tous-}$

atomes) oscillent respectivement autour de 0,9-1,1 Å et de 1,6-1,9 Å pour les trois sucres aux différentes concentrations étudiées. Globalement, aucune différence majeure n'apparaît. Le RMSD(tous-atomes) dans la solution de sucrose à 50 % semble cependant augmenter davantage que pour les solutions de maltose et de tréhalose, même si les valeurs des RMSDs en fin de simulation sont comparables pour les trois solutions. Ceci pourrait résulter d'un nombre de LHs sucre-protéine plus faible dans la solution de sucrose que dans les solutions de maltose et de tréhalose (comme nous le verrons par la suite). Ces résultats suggèrent qu'à ces concentrations, qui sont supérieures ou égales à la concentration seuil de percolation ϕ_A définie dans les systèmes binaires, les sucres ont une influence importante sur les changements conformationnels du lysozyme, alors que Lins *et al.* [125] ont montré que le RMSD(C_α) du lysozyme en présence du tréhalose à 18 % pds n'est pas modifié par rapport à celui dans l'eau pure.

Nous avons également calculé le rayon de giration R_g du lysozyme (voir équation 3.7 du chapitre 3, p. 102), représenté dans la figure 4.2 pour les différentes solutions étudiées. Dans l'eau pure, R_g se stabilise autour de 14,05 Å au bout de 4 ns environ. Les R_g du lysozyme en présence des sucres sont un peu plus élevés et évoluent davantage que dans l'eau pure. Ce comportement est susceptible de traduire la dépendance de la dynamique du lysozyme vis-à-vis de celle des sucres, car le réseau de LHs des solutions mixtes sucre/eau se réorganise plus lentement que celui de l'eau pure, de sorte que les mouvements des résidus sont davantage contraints. La comparaison des trois sucres aux diverses concentrations ne nous permet pas de réellement les distinguer, mise à part le fait que le R_g en présence de maltose à 37 % pds tend vers celui du lysozyme dans l'eau pure, alors que ceux du tréhalose et du sucrose sont similaires et d'environ 0,25 Å plus élevés.

Ces deux paramètres montrent que la structure du lysozyme est stable dans toutes les simulations effectuées.

4.1.2 Fluctuations quadratiques moyennes du lysozyme

L'analyse des fluctuations quadratiques moyennes des atomes du lysozyme MSFs (pour « Mean Square Fluctuations ») donne une information sur les mouvements internes de la protéine, car les MSFs sont une mesure de la largeur des fonctions de distribution des positions atomiques. Pour chaque configuration i d'une trajectoire donnée, la position et l'orientation du lysozyme sont ajustées par rapport à une structure de référence. Les MSFs sont alors calculées à partir des nouvelles configurations du lysozyme i^* par :

$$MSF = \frac{1}{3}[(\langle x_i^{*2} \rangle - \langle x_i^* \rangle^2) + (\langle y_i^{*2} \rangle - \langle y_i^* \rangle^2) + (\langle z_i^{*2} \rangle - \langle z_i^* \rangle^2)]^2 \quad (4.2)$$

où les crochets désignent la moyenne sur les configurations et (x_i^*, y_i^*, z_i^*) sont les nouvelles coordonnées des atomes i du lysozyme, une fois la translation globale et la rotation du lysozyme corrigée. Similairement à Maragliano *et al.* [242], nous avons calculé les MSFs en moyennant par blocs de 250 ps, afin de limiter l'effet des changements de conformation du lysozyme au cours de la simulation. Les fluctuations varient beaucoup selon le résidu du lysozyme considéré, reflétant l'hétérogénéité de leurs environnements locaux. Nous distinguons clairement 5 zones, notées I à V, dont les fluctuations sont nettement plus élevées que la moyenne (voir figure 4.3). Les résidus appartenant à ces différentes zones sont indiqués de manière schématique dans la figure 4.4. Il s'agit majoritairement de boucles (zones III et V), de petites hélices α_{3-10} (zones I et IV) et de certains résidus

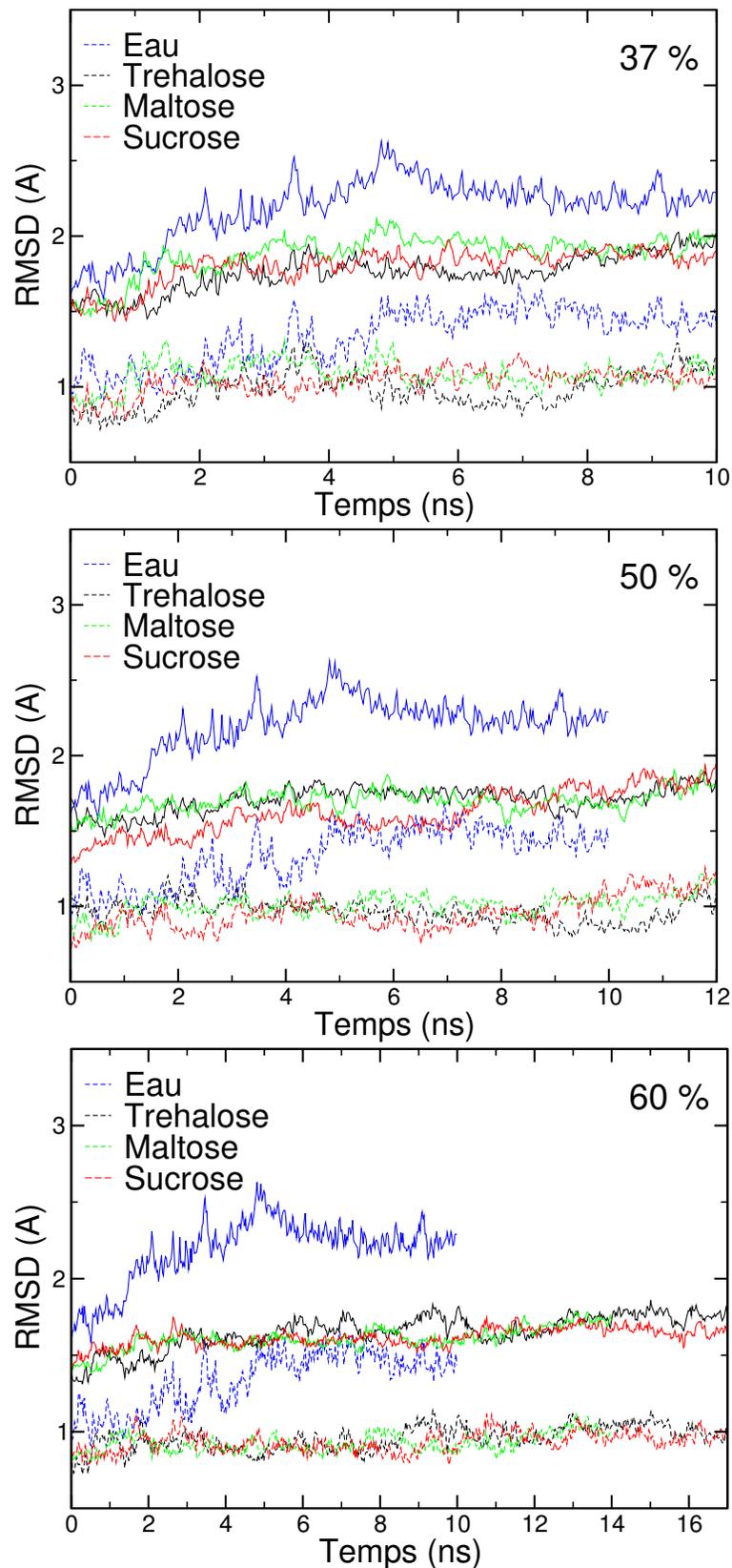


FIG. 4.1 – *Ecart moyen RMSD du lysozyme par rapport à sa structure cristallographique dans les différentes solutions étudiées à $T = 300$ K. Les courbes en traits pleins correspondent aux RMSDs calculés sur tous les atomes du lysozyme et celles en tirets représentent les RMSDs des atomes de carbone α du squelette.*

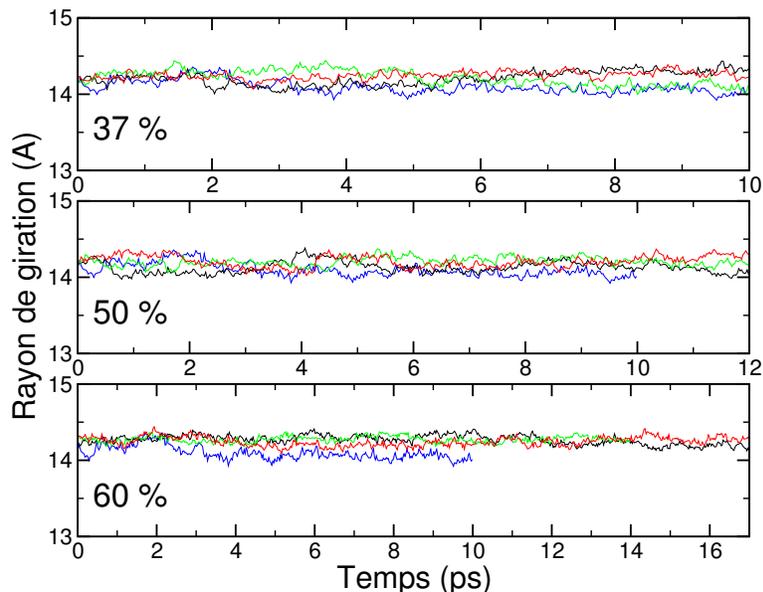


FIG. 4.2 – Dépendance temporelle du rayon de giration du lysozyme dans les différentes solutions étudiées à $T = 300$ K. Le code des couleurs est le même que celui de la figure 4.1 : eau pure en bleu, tréhalose en noir, maltose en vert et sucrose en rouge.

du feuillet β (zone II). Ces résidus se situent tous à la surface du lysozyme et peuvent donc former des LHs avec l'eau ou les sucres. Leurs mouvements sont permis par la réorganisation permanente du réseau de LHs protéine-solvant en solution aqueuse. Les deux zones A et B dont les fluctuations sont nettement plus réduites que la moyenne correspondent respectivement à une grande hélice α et à une boucle situées au coeur du lysozyme. Ces résidus sont très peu accessibles aux molécules du solvant (voir section 4.1.3) et leurs mouvements sont contraints stériquement par la présence des résidus voisins.

L'addition des sucres aux concentrations étudiées réduit significativement les fluctuations du lysozyme. Mais, la forme de la distribution reste globalement la même, c'est-à-dire que les zones I à V restent identifiables jusqu'à 60 % pds. La comparaison des fluctuations du lysozyme en présence des différents sucres à 37 % pds ne semble pas révéler de différences significatives entre les trois sucres. A 50 % pds, le sucrose apparaît réduire plus faiblement les MSFs du lysozyme que le tréhalose et le maltose, quel que soit le résidu considéré. Nous essaierons dans la section suivante (section 4.1.3) d'expliquer ce résultat. Enfin, à 60 % pds, le maltose semble globalement réduire davantage les MSFs que le tréhalose et le sucrose, notamment pour les résidus de la zone III. Afin de distinguer plus facilement les différences entre effets des sucres sur le lysozyme, nous avons calculé les distributions $P(\langle u^2 \rangle)$ des MSFs du lysozyme ainsi que les MSFs moyennes $\langle u^2 \rangle_{av}$ (cf figure 4.5). Nous constatons une diminution globale des fluctuations du lysozyme en présence des sucres par rapport au lysozyme dans l'eau pure, qui se traduit par un décalage vers les faibles valeurs de $\langle u^2 \rangle$ des distributions $P(\langle u^2 \rangle)$. Les distributions sont très similaires dans les différentes solutions à 37 % pds, mais des différences sont observées à 50 et 60 % pds. En particulier, le lysozyme fluctue nettement plus en présence de sucrose que de tréhalose ou de maltose à 50 % pds. A 60 % pds, les MSFs du lysozyme en présence de tréhalose semblent plus élevées qu'en présence de maltose, mais plus faibles

qu'en présence de sucrose. Les valeurs moyennes $\langle u^2 \rangle_{av}$ des atomes du squelette et des chaînes latérales présentées dans la partie droite de la figure 4.5 montrent que l'effet des sucres est plus marqué sur les chaînes latérales que sur le squelette du lysozyme, car l'écart entre les fluctuations moyennes de ces deux catégories d'atomes est de $0,51 \text{ \AA}^2$ dans l'eau pure (les $\langle u^2 \rangle_{av,W}$ valent respectivement $2,43$ et $1,92 \text{ \AA}^2$) alors qu'il est de $0,20$ - $0,25 \text{ \AA}^2$ pour les solutions contenant les sucres. En outre, les effets respectifs des trois sucres sont sensiblement les mêmes sur les chaînes latérales et sur le squelette du lysozyme, le maltose paraissant réduire le plus les valeurs moyennes des $\langle u^2 \rangle$. L'analyse ultérieure du nombre de LHs sucre-protéine et de la dynamique des différents types de LHs (eau-protéine, sucre-protéine, sucre-sucrose) nous permettra de comprendre ces différences.

4.1.3 Interactions protéine-solvant

La forte réduction des fluctuations quadratiques moyennes MSFs des atomes du lysozyme en présence des sucres suggèrent que ceux-ci interagissent par LHs avec le lysozyme aux concentrations étudiées. Les nombres moyens de LHs que forment les sucres avec les différents résidus du lysozyme sont représentés dans la figure 4.6. En accord avec les MSFs de la figure 4.3, les résidus des zones A et B ne forment pratiquement aucune LH avec les sucres car ces résidus sont très peu exposés au solvant. D'autres résidus peu exposés au solvant forment également peu de LHs avec les sucres (par exemple les résidus vers 10 et 110). La distribution du nombre de LHs sucre-lysozyme suit relativement bien celle des MSFs, ce qui semble cohérent avec le fait que les résidus qui fluctuent le plus sont ceux les plus exposés au solvant, et *a fortiori* les plus susceptibles d'interagir avec les sucres. Quelques différences sont observées entre les trois sucres, notamment à 37 et 50 % pds. Par exemple, le sucrose semble former davantage de LHs avec les résidus de la zone IV que le maltose et le tréhalose dans les solutions à 37 % pds. De même, la maltose semble interagir fortement avec les résidus de la zone II dans la solution à 50 % pds. Ces différences d'interaction ne sont probablement pas significatives car elles ne sont pas observées à toutes les concentrations. Elles proviennent sans doute des diverses configurations initiales des sucres, malgré le fait que les mélanges aient été chauffés à 473 K pendant 1 ns à 37 et 50 % pds et pendant 2 ns pour les solutions à 60 % pds (voir tableau 2.12 du chapitre 2, page 72). D'ailleurs, les distributions des solutions à 60 % pds semblent plus homogènes entre les différents sucres. Ceci peut résulter de la plus longue période de mélange à 473 K, mais également du fait qu'à cette concentration les sucres sont susceptibles de recouvrir l'ensemble du lysozyme, de sorte que les écarts entre les sucres s'atténuent.

Les nombres moyens de LHs disaccharide-protéine $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ et de LHs eau-lysozyme $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ sont représentés dans la figure 4.7a,b. Les données relatives à la solution du sucrose à 50 % pds semblent se distinguer, alors qu'à 37 et 60 % pds elles sont comparables à celles de solutions de maltose et/ou de tréhalose. De même, le nombre $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ de la solution de maltose à 37 % pds semble particulièrement élevé (voir figure 4.7b). L'évolution temporelle de $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ des différentes solutions (cf figure 4.8) révèle que le $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ de la solution de sucrose à 50 % est plus faible dans la configuration équilibrée (temps $t = 0$ ns) et le reste pendant les 12 ns de la simulation. Ceci pourrait signifier qu'à cette concentration les sucres ne peuvent se réorganiser autour du lysozyme en 12 ns. Cependant, le sucrose semble être capable de se réorganiser autour du lysozyme en quelques ns dans la solution à 60 % pds. En outre, le comportement des

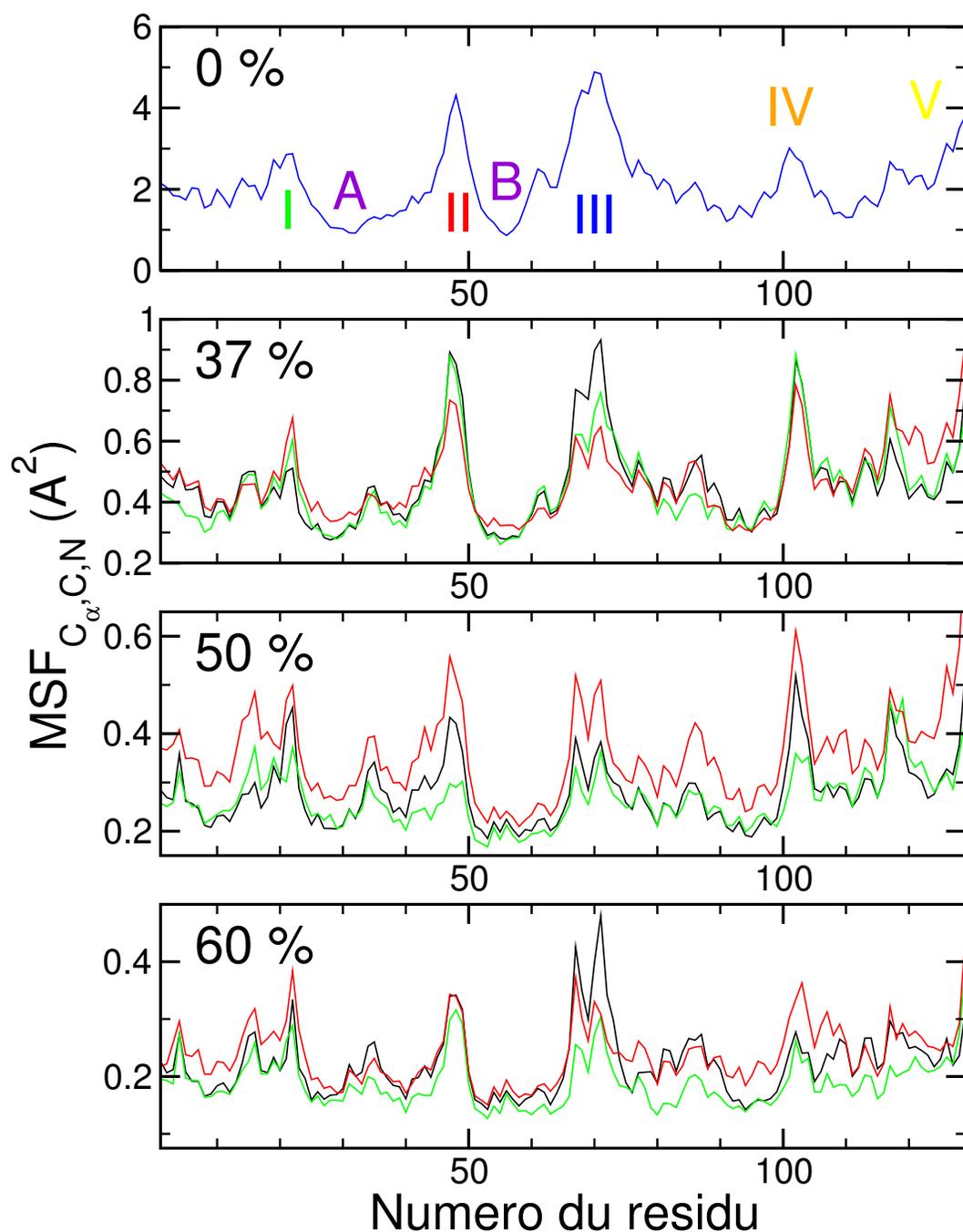


FIG. 4.3 – Fluctuations quadratiques moyennes des atomes du squelette du lysozyme (C_{α} , C , N) dans les différentes solutions étudiées à $T = 300$ K. Les courbes relatives au lysozyme, au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en bleu, en noir, en vert et en rouge. NB: les échelles en ordonnée pour les différentes concentrations ne sont pas les mêmes afin de pouvoir distinguer les différences existant entre les trois sucres.

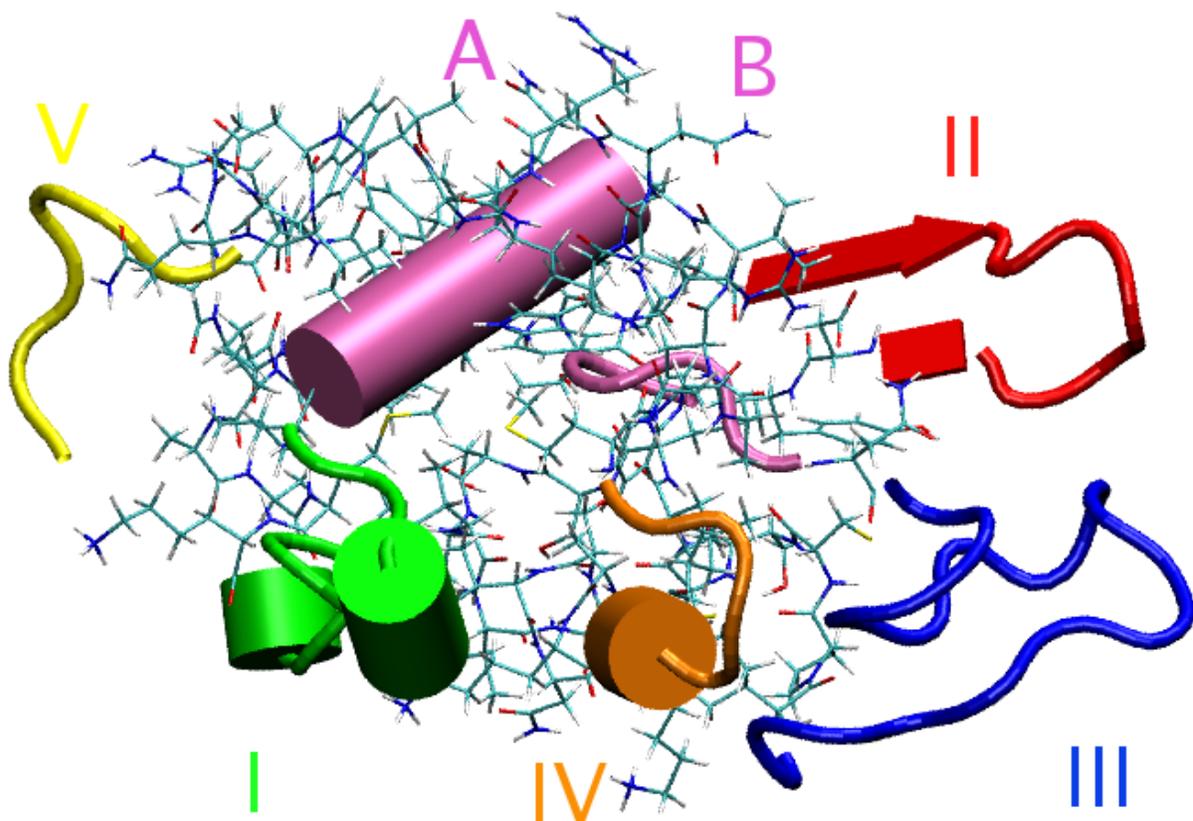


FIG. 4.4 – Localisation des résidus dont les fluctuations quadratiques moyennes sont nettement plus élevées (zones I à V de la figure 4.3) ou nettement plus faibles (zones A et B de la figure 4.3) que les fluctuations quadratiques moyennes de l'ensemble des résidus du lysozyme. Les résidus des zones I à V se situent tous à la surface du lysozyme et sont susceptibles d'interagir fortement avec le solvant, alors que ceux des zones A et B sont localisés dans le « cœur » du lysozyme. Ces différents résidus sont représentés de manière schématique afin de mettre en évidence les éventuels éléments de structure secondaire (les hélices α et les feuillets β sont respectivement représentés par des cylindres et des flèches antiparallèles) qui les composent.

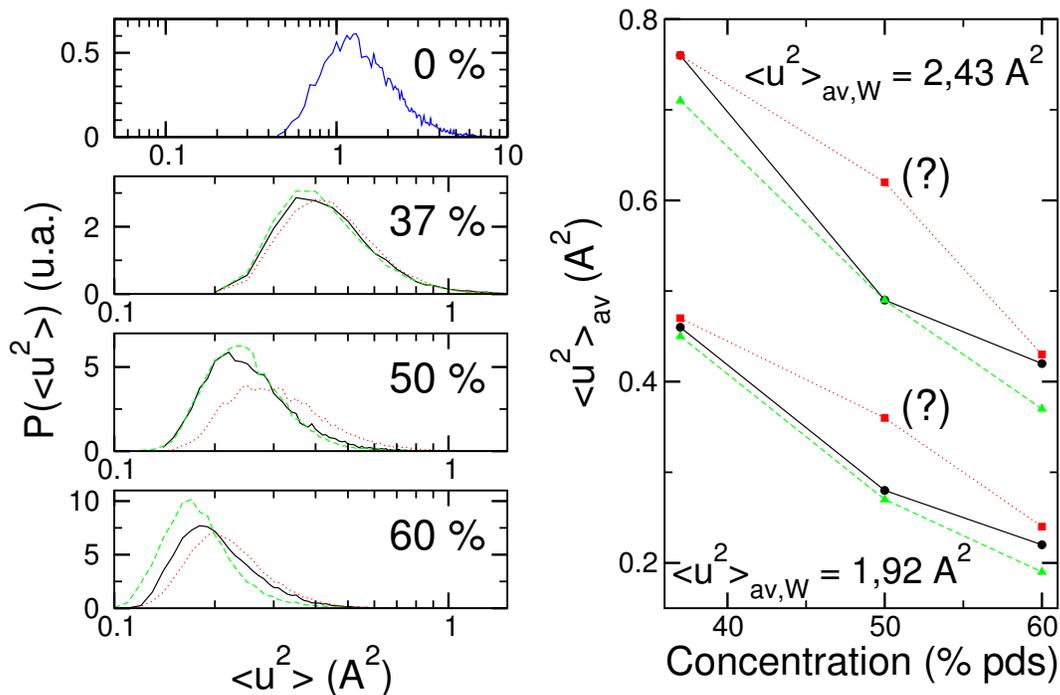


FIG. 4.5 – A gauche : Distributions des fluctuations quadratiques moyennes $P(\langle u^2 \rangle)$ du squelette du lysozyme dans les différentes solutions étudiées à $T = 300 \text{ K}$. NB : les échelles en ordonnée et en abscisse pour les différentes concentrations ne sont pas les mêmes afin de pouvoir distinguer les différences existant entre les trois sucres. Les courbes relatives au lysozyme, au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en bleu, en noir, en vert et en rouge. A droite : Valeurs moyennes des distributions des fluctuations quadratiques moyennes $\langle u^2 \rangle_{av}$ du squelette (courbes du bas) et des chaînes latérales (courbes du haut) du lysozyme en fonction de la concentration en sucre. Les valeurs moyennes correspondant au lysozyme dans l'eau pure $\langle u^2 \rangle_{av,W}$ sont indiquées et valent respectivement $1,92$ et $2,43 \text{ \AA}^2$. Les points d'interrogation soulignent le fait que les résultats de la solution contenant le sucrose à 50 % pds semblent aberrants.

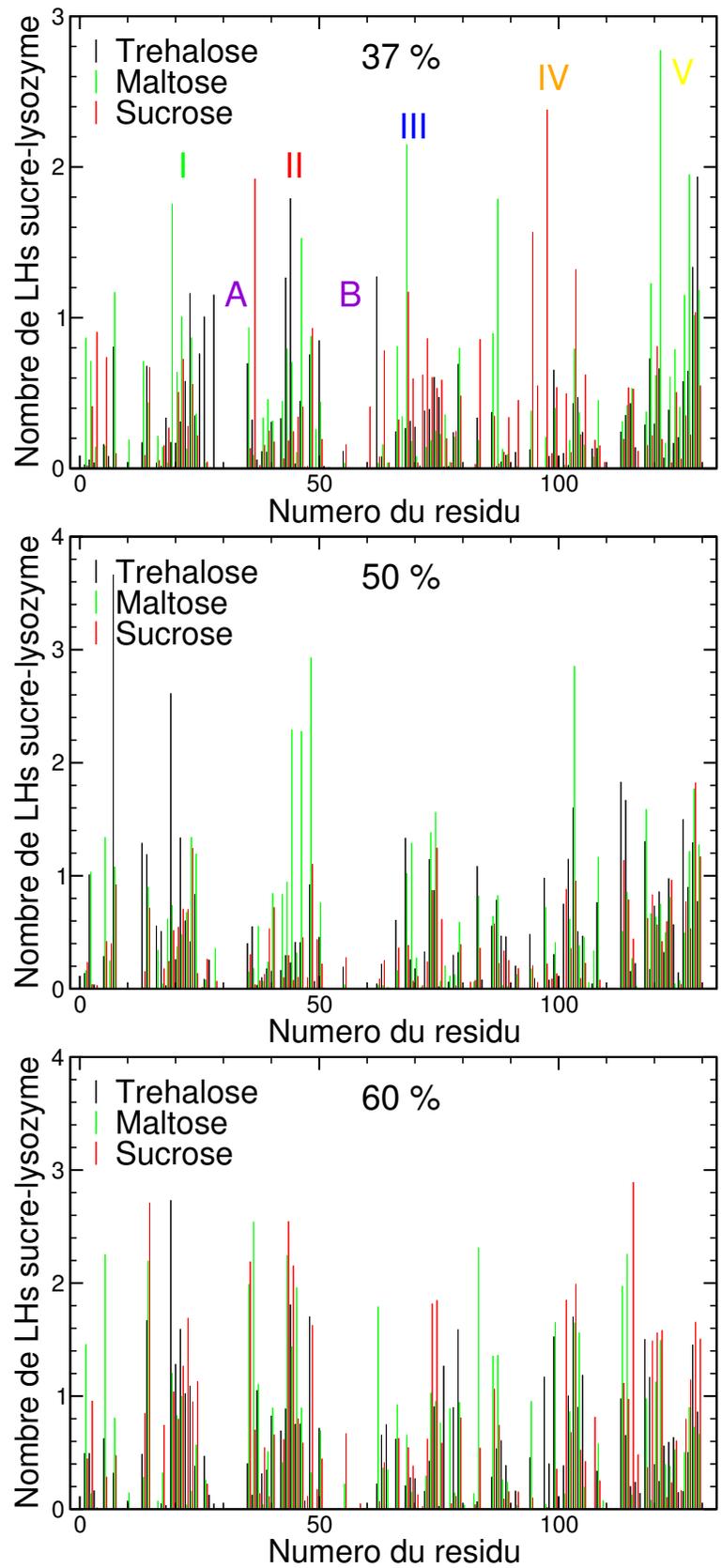


FIG. 4.6 – Nombre moyen de LHs sucrose-lysozyme en fonction des résidus du lysozyme pour les différentes solutions ternaires lysozyme/sucrose/eau étudiées.

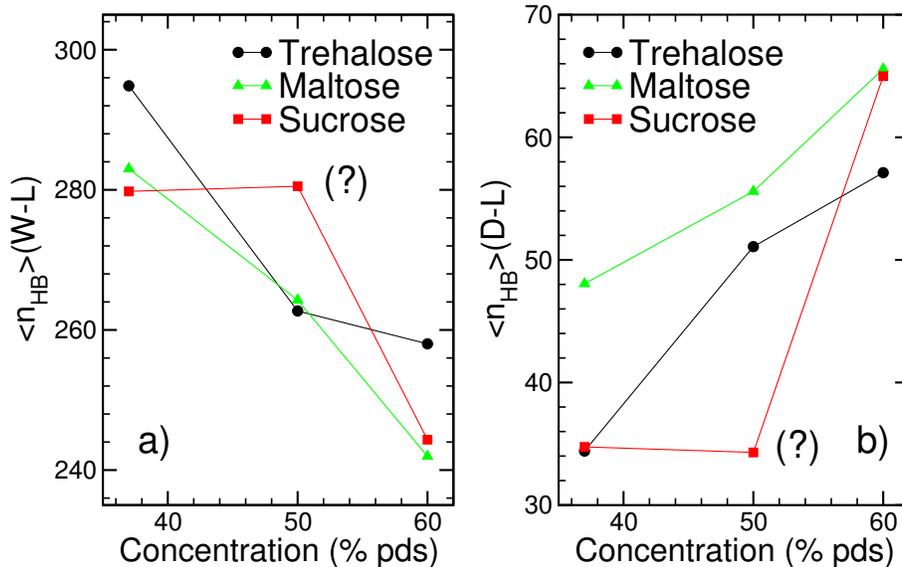


FIG. 4.7 – Dépendance en concentration des nombres moyens de LHs eau-lysozyme $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ (a) et disaccharide-lysozyme $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ (b) pour les différentes solutions étudiées à $T = 300$ K. Les points d’interrogation soulignent le fait que les résultats de la solution contenant le sucrose à 50 % pds semblent aberrants.

$\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ des sucres dans les solutions à 37 % pds est très semblable d’un sucre à l’autre pendant les 3,5 premières ns de la simulation. Mais, le $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ de la solution de maltose augmente et se stabilise autour de 45, alors que ceux des solutions de sucrose et de tréhalose oscillent autour de 35. Ces évolutions temporelles des interactions sucre-lysozyme soulignent la difficulté de simuler les solutions ternaires dans la gamme de concentrations que nous avons étudiée. En effet, à plus haute concentration (*e.g.* 80-100 % pds), les sucres n’auraient pas le temps de se réorganiser et les nombreuses interactions sucre-lysozyme seraient moins dépendantes de la position et de l’orientation de chaque sucre. A plus basse concentration, les sucres pourraient diffuser plus librement. Il convient également de souligner que la taille et la forme de la boîte de simulation choisie présente le défaut de ne pas pouvoir répartir les sucres de manière complètement isotrope, car le volume disponible pour placer les sucres dans les directions transverses du lysozyme est relativement réduit.

Le maltose apparaît former davantage de LHs avec le lysozyme que le tréhalose et le sucrose, quelle que soit la concentration considérée. Le $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ du tréhalose est comparable à celui du sucrose dans les solutions à 37 % pds, mais sensiblement plus faible dans les solutions à 60 % pds. Le comportement de $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ est relativement cohérent avec celui de $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$, c’est-à-dire que lorsque les sucres se lient par LHs au lysozyme le nombre $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ diminue. Nous ne savons pas si les différences observées dans les $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ sont significatives. Selon l’hypothèse de Timasheff (voir section 1.3.3, p. 25 du chapitre 1), le tréhalose serait davantage exclu de la surface du lysozyme que le maltose et le sucrose dans des solutions relativement diluées. Crowe *et al.* suggèrent qu’à l’état solide le tréhalose se substitue davantage aux molécules d’eau d’hydratation que le maltose et le sucrose. Si l’on suppose que ces hypothèses sont valides aux concentrations respectivement faibles et élevées, il est nécessaire que son interaction

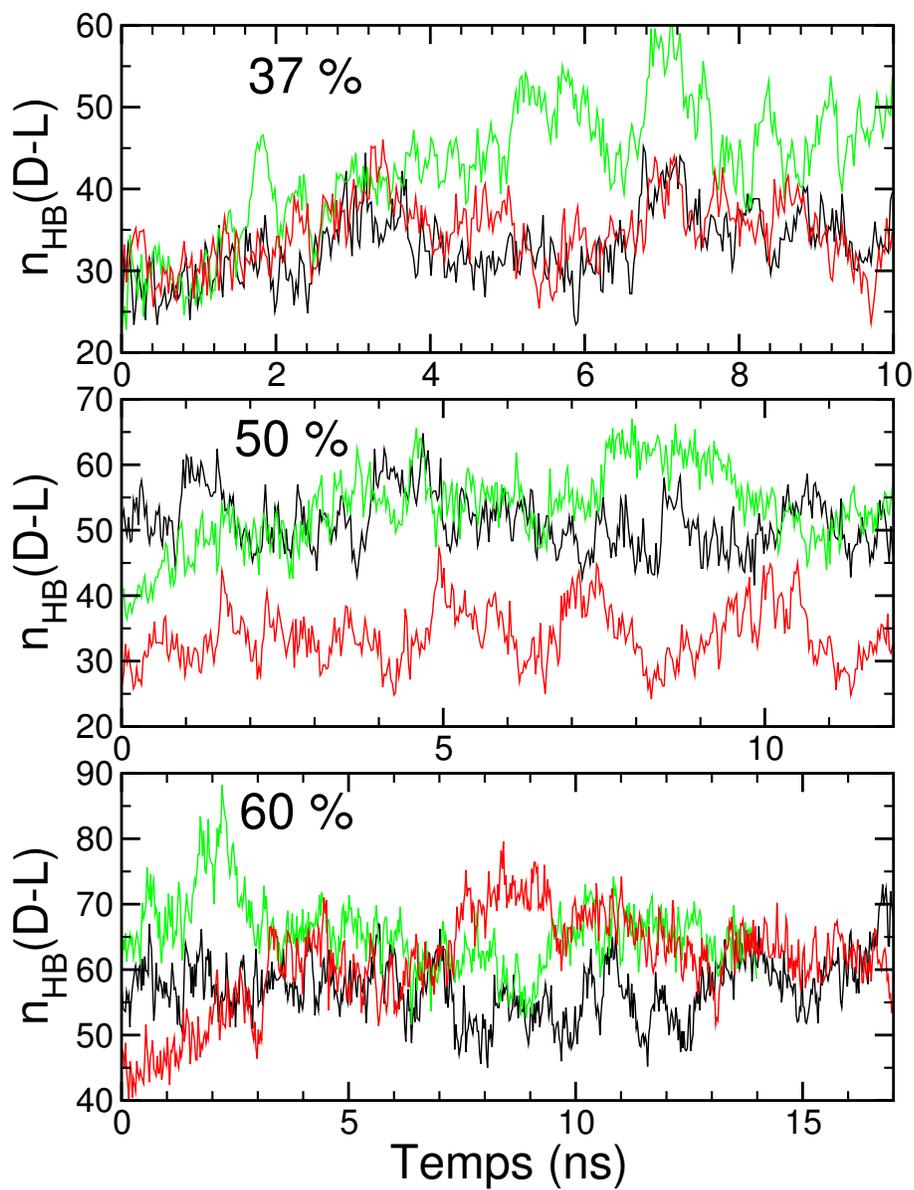


FIG. 4.8 – Evolutions temporelles du nombre de LHs disaccharide-lysozyme $n_{HB}(D - L)$ dans les différentes solutions étudiées à $T = 300\text{ K}$. Les courbes relatives au lysozyme, au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en bleu, en noir, en vert et en rouge.

avec le lysozyme change lorsque sa concentration varie. Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent ni de vérifier cet éventuel comportement, ni de conforter formellement l'une de ces hypothèses. Si l'on exclut le $\langle n_{HB} \rangle (D - L)$ de la solution de sucrose à 50 % qui paraît aberrant, le tréhalose semble former moins de LHs avec le lysozyme que le maltose. Ceci semblerait aller à l'encontre de l'hypothèse de Crowe *et al.*.

Les molécules d'eau se situant à proximité des résidus apolaires exposés au solvant ne forment pas de LHs avec leurs chaînes latérales. C'est pourquoi le nombre $\langle n_{HB} \rangle (W - L)$ n'est pas le mieux approprié pour tester l'hypothèse de l'hydratation préférentielle de Timasheff *et al.*.

Nous avons calculé les distributions radiales du nombre d'atomes d'oxygène des molécules d'eau et des groupes hydroxyles des sucres situés à une distance r de l'atome lourd (C, N, O ou S) du lysozyme le plus proche. Les figures 4.9, 4.10, 4.11 et 4.12 présentent ces distributions pour les différentes solutions étudiées. Le pic vers 2,8 Å (voir figures 4.9 et 4.11) correspond à la distance donneur-accepteur d'une LH entre le lysozyme et une molécule de solvant, alors que le pic vers 3,7 Å (voir figures 4.10 et 4.12) correspond à l'hydratation des résidus hydrophobes. Ceci apparaît clairement car nous avons distingué la nature de l'atome lourd, polaire (N, O, S) ou apolaire (C). Ces résultats sont en accord avec les profils de densité calculés par Smolin et Winter dans le cas de la staphylococcal nucléase [12]. En accord avec le nombre de LHs eau-lysozyme, les pics situés à environ 2,8 Å et 3,7 Å diminuent lorsque la concentration en sucre croît, et le tréhalose semble hydrater davantage le lysozyme que le sucrose et le maltose à 37 et 60 % pds. A 50 % pds, le sucrose hydrate davantage la protéine en raison d'un nombre de LHs sucrose-lysozyme particulièrement faible. Les résultats de la figure 4.11 confirment ceux de la figure 4.9, c'est-à-dire que le tréhalose se lie moins par LH que le maltose et le sucrose à 37 et 60 % pds. A 50 % pds, la plus faible amplitude du pic situé vers 2,8 Å de la solution de sucrose montre qu'il se lie par LHs nettement moins que le maltose et le tréhalose au lysozyme. La figure 4.12 révèle un résultat inattendu pour les solutions à 50 % pds. Le tréhalose apparaît avoir moins de groupes hydroxyles à proximité des atomes de carbone du lysozyme que le sucrose, alors que ce dernier hydrate davantage la protéine. En outre, la figure 4.12 montre clairement que la répartition des groupes hydroxyles du tréhalose autour des atomes de carbone du lysozyme est plus homogène que celle de maltose et de sucrose. Ceci pourrait résulter du plus grand nombre de LHs que forme le tréhalose avec les molécules d'eau. Le nombre d'hydratation plus important du tréhalose empêcherait ses groupes hydroxyles de s'approcher des groupes apolaires du lysozyme.

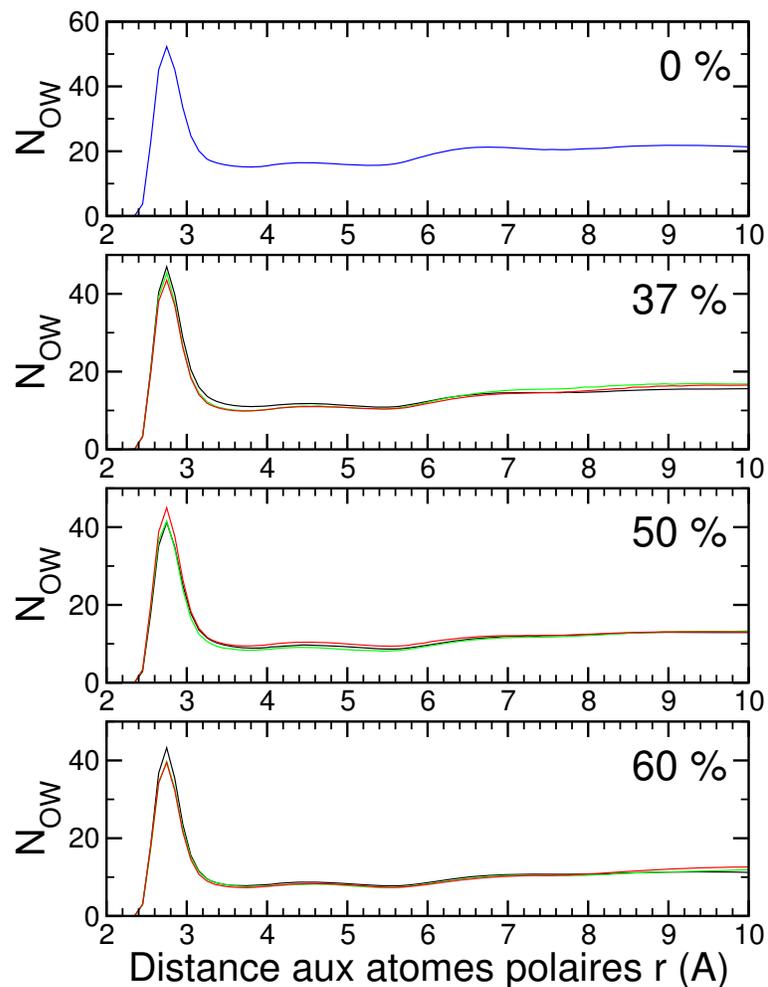


FIG. 4.9 – Nombre d'atomes d'oxygène N_{OW} des molécules d'eau situés à une distance minimale r d'un atome polaire du lysozyme (azote N, oxygène O ou soufre S) pour les différentes solutions aqueuses de lysozyme étudiées à $T = 300$ K. Les courbes relatives au lysozyme, au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en bleu, en noir, en vert et en rouge.

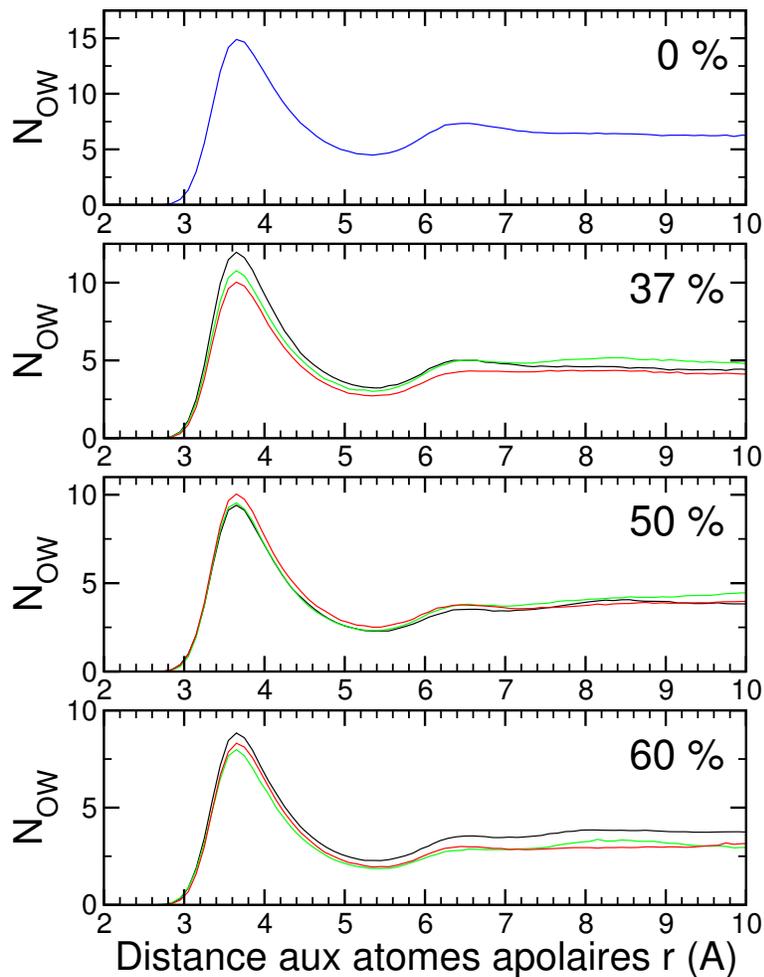


FIG. 4.10 – Nombre d'atomes d'oxygène N_{OW} des molécules d'eau situés à une distance minimale r d'un atome apolaire du lysozyme (carbone C) pour les différentes solutions aqueuses de lysozyme étudiées à $T = 300$ K. Les courbes relatives au lysozyme, au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en bleu, en noir, en vert et en rouge.

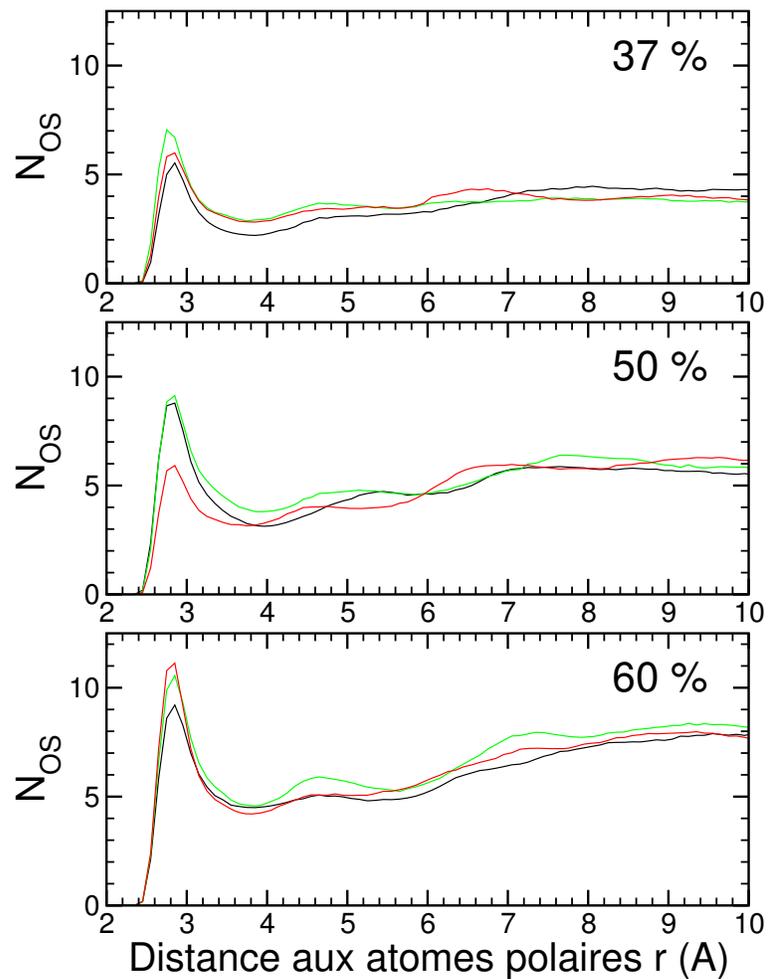


FIG. 4.11 – Nombre d'atomes d'oxygène des groupes hydroxyles N_{OS} des molécules de sucre situés à une distance minimale r d'un atome polaire du lysozyme (azote N , oxygène O ou soufre S) pour les différentes solutions ternaires étudiées à $T = 300$ K. Les courbes relatives au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en noir, en vert et en rouge.

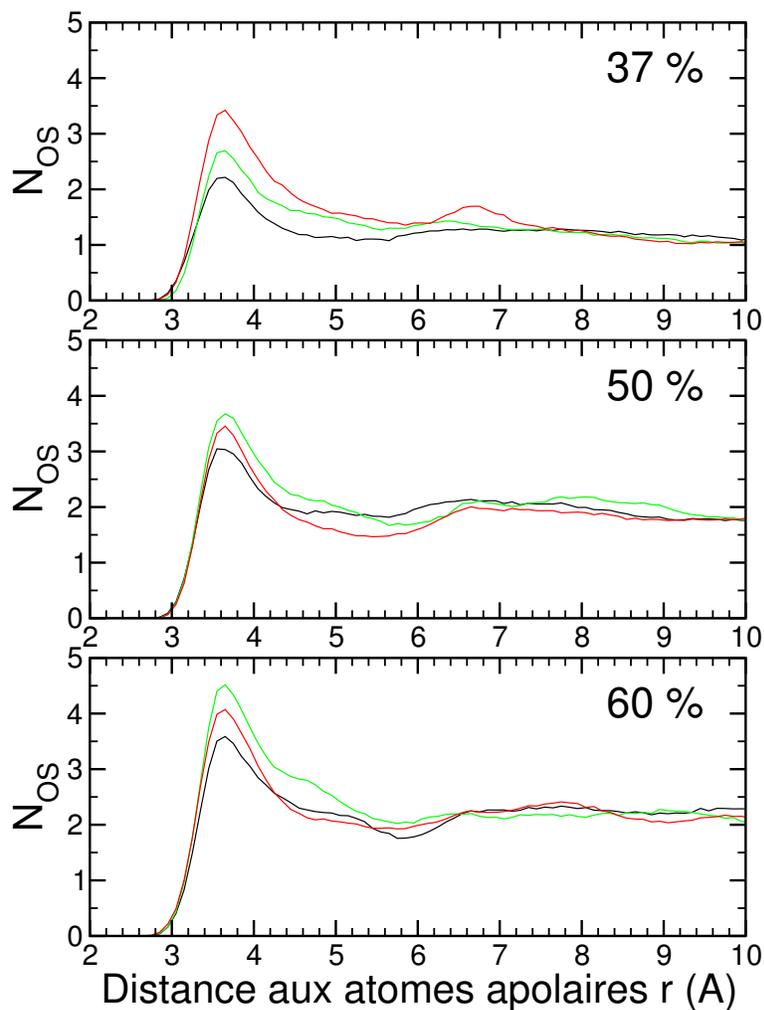


FIG. 4.12 – Nombre d'atomes d'oxygène des groupes hydroxyles N_{OS} des molécules de sucre situés à une distance minimale r d'un atome apolaire du lysozyme (carbone C) pour les différentes solutions ternaires étudiées à $T = 300$ K. Les courbes relatives au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en noir, en vert et en rouge.

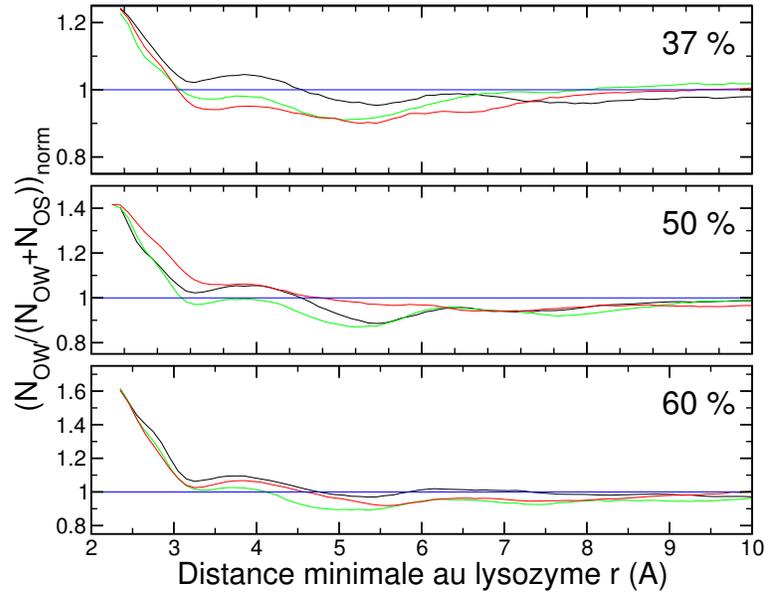


FIG. 4.13 – Evolution de la proportion normalisée d'oxygènes (hydroxyles) de l'eau ($N_{OW}/(N_{OW}+N_{OS})_{norm}$) en fonction de la distance minimale au lysozyme à $T = 300$ K. N_{OW} et N_{OS} désignent respectivement le nombre d'oxygènes hydroxyles de l'eau et des sucres. La normalisation est effectuée par rapport aux proportions d'oxygènes de l'eau dans les différents systèmes ternaires étudiés. Ces proportions valent respectivement $2800/(2800+85*8) \approx 0,80$, $2400/(2400+125*8) \approx 0,71$ et $2100/(2100+165*8) \approx 0,61$ pour les solutions ternaires à 37, 50 et 60 % pds (les molécules d'eau et de sucre comportent respectivement 1 et 8 oxygènes appartenant à un groupe hydroxyle OH). Les courbes relatives au tréhalose, au maltose et au sucrose sont respectivement en noir, en vert et en rouge.

Afin de savoir plus précisément si le tréhalose hydrate préférentiellement le lysozyme aux concentrations étudiées, nous avons calculé le rapport $N_{OW}/(N_{OW}+N_{OS})$ en fonction de la distance minimale au lysozyme. Nous avons normalisé ce rapport par sa valeur moyenne dans l'ensemble de la boîte de simulation pour pouvoir aisément comparer les résultats aux différentes concentrations. Le rapport $N_{OW}/(N_{OW}+N_{OS})$ moyen vaut $N_W/(N_W+8.N_S)$, où N_W et N_S désignent respectivement le nombre de molécules d'eau et de sucre de la boîte de simulation. Si le rapport normalisé est supérieur à 1, alors la proportion locale d'oxygènes de l'eau est supérieure à sa proportion moyenne, et *vice versa*. La figure 4.13 présente ces rapports normalisés pour les différentes solutions ternaires étudiées.

Si l'on exclut la solution de sucrose à 50 % pds, nous constatons que le tréhalose hydrate préférentiellement le lysozyme plus que ne le font le sucrose et le maltose. L'hydratation préférentielle du lysozyme semble augmenter avec la concentration en sucre. Selon le modèle de Timasheff *et al.*, ceci signifierait que le lysozyme est davantage stabilisé aux concentrations élevées en sucre, ce qui paraît cohérent avec les résultats que nous avons obtenu par spectroscopie Raman sur la dénaturation thermique du lysozyme (voir la section 4.5 de ce chapitre, p. 156). Il est néanmoins nécessaire de souligner que ce résultat peut provenir d'un artéfact de la simulation, car les molécules d'eau d'hydra-

tation confinées par les sucres autour du lysozyme diffusent très peu. Comme dans les systèmes simulés le nombre total de molécules d'eau diminue lorsque la concentration en sucre augmente, la part relative de l'eau d'hydratation croît systématiquement. Cottone *et al.* [128] ont également montré que le sucrose et le tréhalose à 89 % pds hydratent préférentiellement la carboxy-myoglobine (MbCO). Ils montrent cependant que le sucrose hydrate davantage cette protéine que le tréhalose. Mais, la concentration des systèmes qu'ils ont simulé est beaucoup plus importante (89 % pds) et il est possible que l'effet du tréhalose varie en fonction de la concentration. De fait, l'hypothèse de Timasheff *et al.* suppose que le tréhalose est plus exclu que le sucrose en solution diluée, alors que l'hypothèse de Crowe *et al.* suggère qu'il interagisse davantage avec les molécules biologiques aux concentrations élevées.

4.2 Propriétés vibrationnelles

4.2.1 Spectroscopie Raman

Nous avons mesuré le spectre Raman du lysozyme sec afin de connaître ses principales bandes aux basses fréquences. Celui-ci est représenté dans la figure 4.14a. Une seule fonction log-normale est suffisante pour ajuster ce spectre et localise le pic à $74,4 \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$, en bon accord avec la position du premier pic des solutions aqueuses de lysozyme étudiées (voir tableau 4.1). Nous pourrions en déduire que la position du premier pic de ces mélanges est fortement influencée par le lysozyme et que le second pic résulte principalement de la contribution de l'eau, comme le suggère la comparaison des spectres du lysozyme sec, de l'eau et d'une solution aqueuse de lysozyme représentés dans la figure 4.14a. Néanmoins, il convient de souligner que certains modes comme les mouvements librationnels d'atomes des chaînes latérales du lysozyme se situant à plus hautes fréquences (vers $200\text{-}300 \text{ cm}^{-1}$) peuvent être activés en solution aqueuse par la formation de LHs avec l'eau d'hydratation. D'ailleurs, Colaianni et Nielsen ont publié le spectre Raman dans la représentation $R(\bar{\nu}) = \nu\chi''(\bar{\nu})$ du lysozyme en solution aqueuse à 20 % pds, auquel ils ont soustrait celui de l'eau pure afin de ne représenter que la contribution du lysozyme (voir figure 4.15). A cet effet, ils ont normalisé le spectre de l'eau pure de sorte que l'intensité des deux spectres soient égales à 180 cm^{-1} . Le spectre qu'ils ont obtenu est composé de deux bandes, centrées respectivement vers 100 et 290 cm^{-1} , dont l'amplitude croît avec la concentration en protéine. Colaianni et Nielsen suggèrent que la bande vers 290 cm^{-1} résulte de l'influence du lysozyme sur l'eau d'hydratation, dont la structure serait similaire à celle de l'eau sous-refroidie, se référant à l'étude de Krishnamurthy *et al.* [243], montrant que l'intensité de cette bande dans l'eau pure croît d'un facteur huit lorsque la température passe de 313 K à 253 K . Krishnamurthy *et al.* ont assigné cette bande à un mode d'agrégat de molécules d'eau dont l'ordre est tétraédrique. Colaianni et Nielsen soulignent toutefois que d'autres interprétations de cette bande sont possibles et que d'autres études sont nécessaires.

Les spectres Raman transformés en susceptibilité χ'' du lysozyme dans l'eau pure et dans les solutions de tréhalose, maltose et sucrose à 40 % pds à $T = 298 \text{ K}$ et $T = 368 \text{ K}$ sont représentés dans la figure 4.14b,c. Le spectre à $T = 298 \text{ K}$ est composé d'une première bande centrée vers 80 cm^{-1} et d'une seconde centrée vers 180 cm^{-1} qui apparaît comme un épaulement. L'allure du spectre est similaire à celui de l'eau pure,

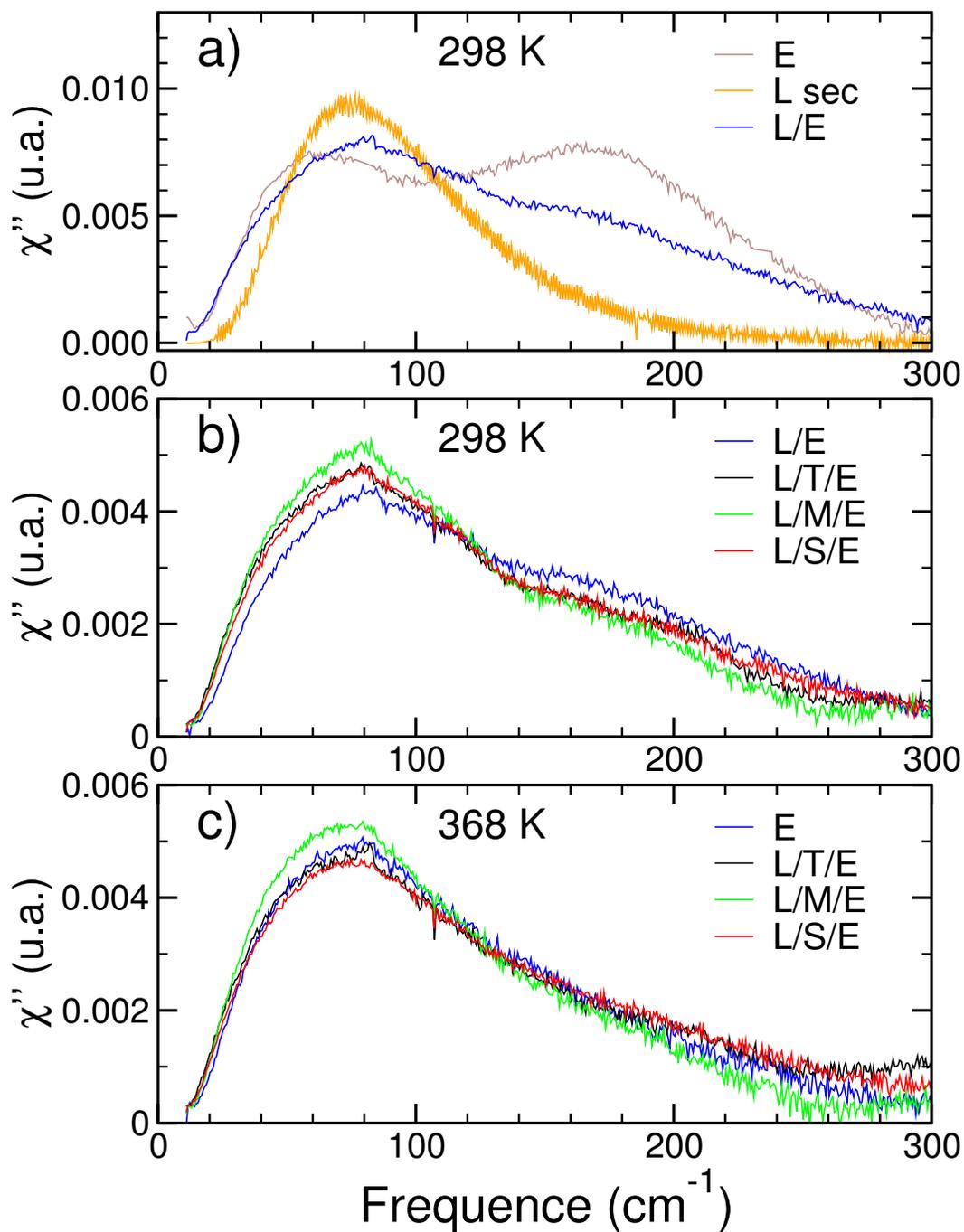


FIG. 4.14 – (a) Susceptibilités χ'' du lysozyme à l'état sec $L \text{ sec}$, de l'eau pure E , et d'une solution aqueuse de lysozyme L/E à $T = 298 \text{ K}$. (b) Susceptibilités χ'' des solutions aqueuses de lysozyme dans l'eau L/E et en présence du tréhalose $L/T/E$, du maltose $L/M/E$ et du sucrose $L/S/E$ à 40 % pds à $T = 298 \text{ K}$. (c) Susceptibilités χ'' des solutions aqueuses de lysozyme dans l'eau L/E et en présence du tréhalose $L/T/E$, du maltose $L/M/E$ et du sucrose $L/S/E$ à 40 % pds à $T = 368 \text{ K}$.

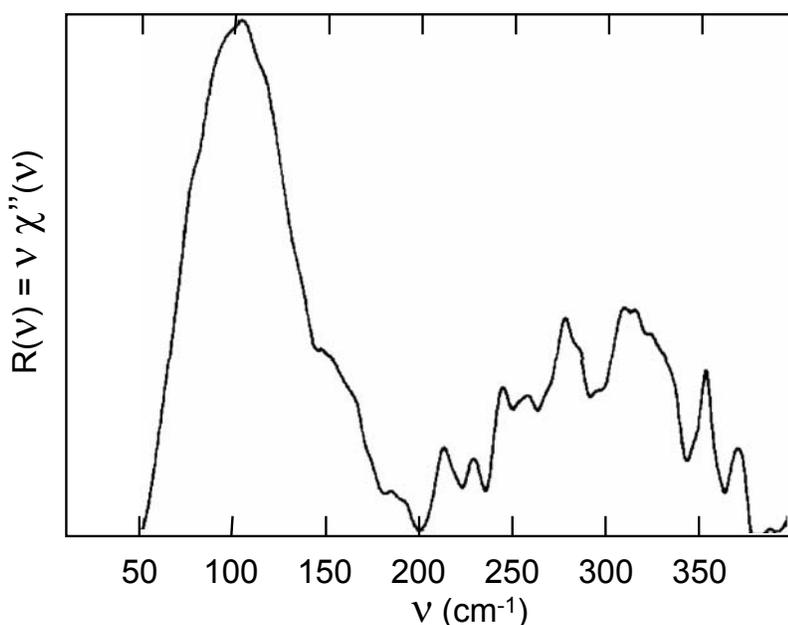


FIG. 4.15 – Représentation réduite $R(\nu) = \nu\chi''(\nu)$ du spectre Raman à Transformée de Fourier proche infrarouge d'une solution aqueuse de lysozyme à 20 % pds, à laquelle a été soustraite la représentation réduite $R(\nu)$ de l'eau liquide (d'après la référence [244]).

mise à part le fait que la première bande se situe à une fréquence plus élevée ($\nu \sim 50 \text{ cm}^{-1}$ dans l'eau pure, voir figure 4.14a). C'est la raison pour laquelle nous avons ajusté les spectres avec les mêmes composantes, *i.e.* une fonction log-normale pour représenter le pic boson et une fonction gaussienne pour la seconde bande, dont les positions issues de cet ajustement sont indiquées dans le tableau 4.1. La position du premier pic semble décalée vers les plus basses fréquences en présence des sucres, ce qui serait à l'opposé de l'effet attendu, car la plus grande viscosité du solvant devrait augmenter l'effet de cage. Les sucres semblent également réduire l'amplitude de la seconde bande. L'interprétation de ces résultats est délicate compte-tenu du fait que le lysozyme, les sucres et l'eau représentent respectivement 15, 30, et 55 % en poids de la solution. La contribution de l'eau au spectre total est donc prépondérante, mais celle des sucres est significative et étudier l'influence de l'eau et des sucres sur le lysozyme dans cette gamme de fréquences s'avère difficile (voir figure 4.16). A $T = 368 \text{ K}$, le pic boson est décalé vers les plus basses fréquences. Ce comportement est similaire à celui observé pour l'eau pure ou pour les solutions sucre/eau (données non montrées) et témoigne de la diminution de l'effet de cage, car les molécules du solvant diffusent beaucoup plus. A cette température, le lysozyme est dénaturé (voir la section 4.5 dédiée à l'étude de la dénaturation du lysozyme) et les contraintes stériques imposées par la formation d'éléments de structure secondaire dans l'état natif et compact du lysozyme (les hélices α notamment) sont réduites en raison du dépliement partiel ou total de la chaîne polypeptidique. Le pic boson de la protéine doit donc également être décalé vers les plus basses fréquences, comme observé dans la figure 4.14b,c. Le second effet notable de l'augmentation de température est la diminution de la bande située vers 200 cm^{-1} et témoigne de la désorganisation du réseau de LHs de l'eau, qui pourrait faciliter la dénaturation du lysozyme car l'eau joue un rôle important sur la stabilisation

Positions (cm ⁻¹)	L/W	L/M/W	L/S/W	L/T/W
Log-normale	77,7 (0,4)	72,1 (0,2)	73,4 (0,3)	71,6 (0,2)
Gaussienne	195,2 (0,9)	191,4 (1,0)	202,8 (1,3)	195,4 (0,8)

TAB. 4.1 – Positions des bandes déduites de l’ajustement de la partie (0;300) cm⁻¹ des spectres Raman du lysozyme dans l’eau pure L/W et en solution avec le maltose L/M/W, avec le sucrose L/S/W et avec le tréhalose L/T/W à 40 % pds et à $T = 298$ K. Les barres d’erreur sont indiquées entre parenthèses.

des protéines en formant de nombreuses LHs. Au fur et à mesure que la température augmente, la cinétique d’échange entre les molécules d’eau d’hydratation et les molécules d’eau volumiques devient plus rapide de sorte que les mouvements des chaînes latérales des résidus en contact avec le solvant sont facilités et susceptibles de mener à la dénaturation. Il convient toutefois de rappeler que l’agitation thermique au sein du lysozyme est un facteur essentiel de la dénaturation, car elle réduit significativement l’énergie des LHs intramoléculaires dans les hélices α et les feuillets β .

4.2.2 Dynamique moléculaire

Nous avons calculé les DEVs des solutions du lysozyme dans l’eau pure et en solution avec les disaccharides aux différentes concentrations étudiées. La figure 4.16 présente les DEV totale et partielles de la solution du lysozyme en présence de tréhalose à 37 % pds. L’allure du spectre calculé est comparable à celle du spectre expérimental jusqu’à 300 cm⁻¹, mise à part le fait que des pics supplémentaires apparaissent vers 60 et vers 130 cm⁻¹. Ceux-ci résultent du spectre de tréhalose. Nous ne nous intéressons dans notre étude qu’à l’effet des sucres sur l’eau et sur le lysozyme, de sorte que nous ne discuterons que des spectres calculés de l’eau et du lysozyme. Nous avons dans un premier temps ajusté les spectres de l’eau par une fonction log-normale pour le premier pic et par une fonction gaussienne pour le second, afin de comparer de manière quantitative les effets des sucres sur l’eau. Les positions des deux pics déduits des ajustements sont indiquées dans le tableau 4.2. Aucune différence significative n’apparaît entre les trois sucres aux différentes solutions. Les différences observées sur la seconde bande des solutions à 60 % semble provenir principalement de la médiocre qualité de l’ajustement (non montrés). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans les simulations binaires et confirment que les effets des sucres sur les vibrations intermoléculaires des molécules d’eau sont proches.

Nous avons vu que les sucres réduisent significativement les fluctuations quadratiques moyennes des atomes du lysozyme aux concentrations étudiées. Ces effets ont une conséquence sur la DEV du lysozyme comme le montre la figure 4.17. La DEV du lysozyme dans l’eau pure calculée présente un premier pic vers 60-65 cm⁻¹ correspondant au pic boson. Ce pic rend compte de l’effet de « cage » et sa largeur témoigne de l’hétérogénéité des environnements locaux qu’explorent chacun des atomes du lysozyme, comme le montre les distributions des MSFs de la figure 4.3. Une seconde bande très large centrée vers 220 cm⁻¹ apparaît. Cette bande pourrait provenir de mouvements de libration des atomes des résidus du lysozyme exposés au solvant, car elle n’existe pas dans le lysozyme à l’état sec (voir figure 4.14a). Cette DEV est qualitativement en accord avec le spectre obtenu par Colaianni et Nielsen [244] (cf figure 4.15), mais les positions des pics se situent à des fréquences plus faibles dans notre étude.

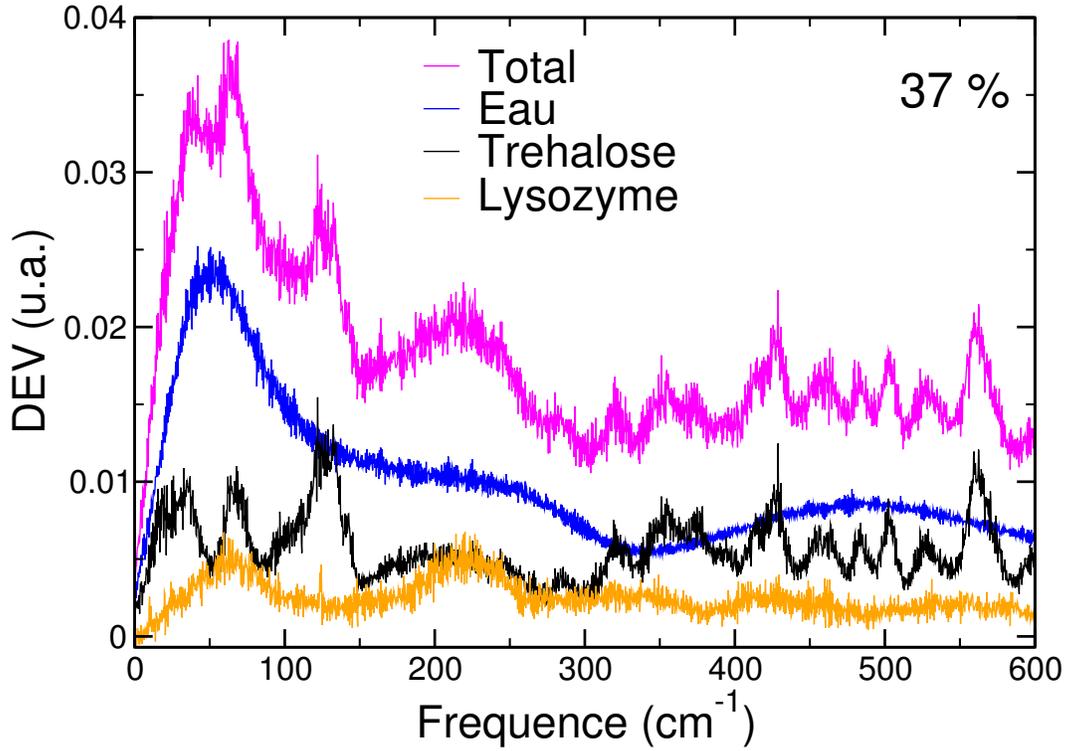


FIG. 4.16 – *DEVs totale et partielles de la solution aqueuse de lysozyme en présence de tréhalose à 37 % pds, à $T = 300$ K*

Concentration (% pds)		T	M	S
37	LGN	47,2(0,2)	47,2(0,2)	47,1(0,2)
	G	201,3(1,9)	201,9(1,9)	195,0 (2,0)
50	LGN	49,9(0,2)	49,9(0,2)	49,7(0,2)
	G	205,0(2,2)	203,0(2,6)	205,1 (2,1)
60	LGN	53,6(0,3)	52,5(0,3)	50,1(0,5)
	G	215,1(2,6)	204,3(4,0)	222,4(5,1)

TAB. 4.2 – *Positions des bandes déduites de l'ajustement de la partie (0;300) cm^{-1} de la DEV de l'eau dans les différentes solutions ternaires étudiées à $T = 300$ K. Les bandes de l'eau situées vers 50 cm^{-1} et vers 200 cm^{-1} ont respectivement été ajustées par une fonction log-normale LGN et par une fonction gaussienne G.*

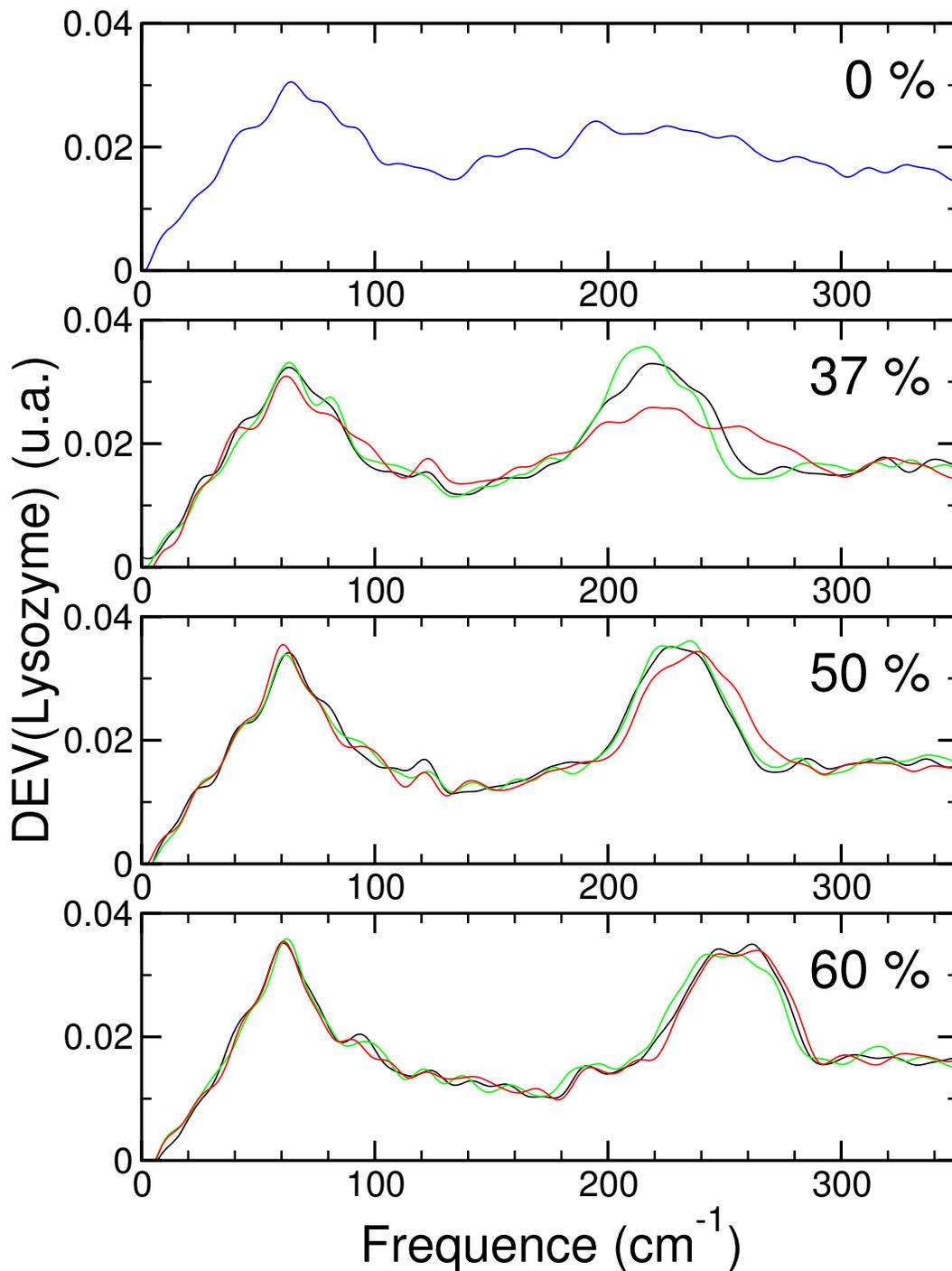


FIG. 4.17 – DEV du lysozyme à 300 K pour les différentes solutions étudiées. Les courbes relatives aux solutions de tréhalose *T*, de maltose *M*, et de sucrose *S* sont respectivement de couleur noire, verte et rouge. Les courbes ont été lissées au moyen de l'algorithme de Savitzky-Golay du logiciel PeakFit v4.02 afin de faciliter l'analyse des résultats.

Il convient toutefois de rappeler que la représentation $R(\bar{\nu})$ a tendance à décaler les pics vers les plus hautes fréquences que la représentation en susceptibilité $\chi''(\bar{\nu})$. La présence des sucres semble avoir deux conséquences importantes sur la DEV du lysozyme. La première est la réduction de la largeur du pic boson de la protéine, d'autant plus forte que la concentration en sucre croît. Cet effet s'avère en bon accord avec la réduction de la largeur des distributions des fluctuations atomiques des atomes du squelette du lysozyme présentées dans la figure 4.5. L'écart-type de la distribution du lysozyme dans l'eau pure est de 1,27 Å alors qu'il est respectivement de 0,22, 0,11 et 0,09 Å dans les solutions de tréhalose à 37, 50 et 60 % pds. Les sucres auraient donc tendance à réduire les différences entre les effets de « cage » des différents atomes du lysozyme. Dans l'eau pure, l'amplitude des mouvements des résidus du coeur du lysozyme est limitée par les contraintes stériques imposées par les autres résidus de la chaîne polypeptidique du lysozyme. Le mouvement des résidus se situant à l'interface protéine/solvant sont plus libres, car les molécules d'eau les « facilitent ». Les sucres limiteraient fortement l'amplitude des mouvements des résidus avec lesquels ils forment des LHs, de sorte que ces résidus seraient davantage contraints. C'est la raison pour laquelle la différence entre les effets de « cage » des atomes du coeur du lysozyme et des atomes en contact avec le solvant serait réduite en présence des sucres. La seconde conséquence notable de la présence des sucres sur la DEV du lysozyme est la bien meilleure définition de la seconde bande du lysozyme. La largeur de cette bande est beaucoup plus faible en présence des sucres et son amplitude croît et devient comparable à celle de la première bande. De plus, sa position passe d'environ 220 cm^{-1} à environ 250 cm^{-1} lorsque la concentration en sucre passe de 37 à 60 % pds. Cette bande se situe dans la même gamme de fréquences que la seconde bande de l'eau. En outre, nous avons vu dans les solutions sucre/eau que la position de cette bande croît significativement à partir d'une concentration d'environ 40-50 % pds. Le spectre du tréhalose de la figure 4.16 présente également une bande vers 210 cm^{-1} . La réduction de la largeur de cette bande lorsque la concentration en sucre croît pourrait donc provenir du renforcement des LHs eau-lysozyme et de la formation des LHs sucre-lysozyme. En présence des sucres, le temps de vie des LHs eau-lysozyme augmente significativement comme indiqué dans le tableau 4.3. De plus, le temps de vie des LHs sucre-protéine est d'au moins un ordre de grandeur plus long que celui des LHs eau-lysozyme à une concentration donnée. Les mouvements des atomes du lysozyme impliqués dans ces LHs seraient donc plus limités et contribueraient à décaler vers les plus hautes fréquences cette bande de la DEV du lysozyme. La comparaison de l'effet des trois sucres ne conduit pas à des différences majeures à une concentration donnée. La différence la plus apparente est la bande plus large du lysozyme dans la solution de sucrose à 37 % pds que dans les solutions de tréhalose et de maltose.

4.3 Propriétés dynamiques

Nous avons calculé les fonctions de diffusion intermédiaire incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ (voir section 3.3.1, p. 116 du chapitre 3) du lysozyme afin d'étudier son comportement relaxationnel dans les différentes solutions. Nous avons arbitrairement choisi de sonder la dynamique du lysozyme à un vecteur de diffusion Q de 2,29 Å⁻¹, qui correspond à la position du premier pic du facteur de structure statique S_{O-O} de l'eau et qui a été utilisé dans notre étude des systèmes binaires. Cette valeur de Q permet que les fonctions

$S_{inc}(Q,t)$ ne soient pas trop bruitées et relaxent vers 0 pour toutes les concentrations étudiées. Celles-ci sont représentées dans la figure 4.18.

Les temps caractéristiques de relaxation ont été définis comme les temps de décroissance en $1/e$ des $S_{inc}(Q,t)$. L'addition de sucre aux concentrations étudiées fait significativement croître le temps de relaxation du lysozyme, plus de deux ordres de grandeur pour les solutions à 60 % pds. A 37 % pds, les $S_{inc}(Q,t)$ du lysozyme en présence des trois sucres semblent proches les uns des autres, même si celui en présence de maltose semble relaxer un peu plus lentement. A 50 % pds, les $S_{inc}(Q,t)$ en présence de tréhalose et de maltose sont similaires, mais celui en présence de sucrose relaxe environ deux fois plus rapidement. Ceci provient du faible nombre de LHs sucrose-lysozyme et du grand nombre d'hydratation de la protéine. A 60 % pds, le $S_{inc}(Q,t)$ du lysozyme en présence de maltose se distingue de celui en présence de tréhalose et de sucrose par un temps de relaxation environ deux fois plus important. Il convient toutefois de souligner que les courbes sont relativement bruitées aux temps longs, indiquant que la relaxation du lysozyme pour le vecteur de diffusion Q choisi n'est que partielle pendant la durée des simulations. De ce fait, il est possible que la courbe relative au maltose tende davantage vers celles du tréhalose et du sucrose pour des temps de simulations plus importants. Nous constatons que le comportement des temps de relaxation du lysozyme suit assez bien celui du nombre de LHs sucre-protéine. L'exemple le plus marquant est la solution de sucrose à 50 % pds pour laquelle le $S_{inc}(Q,t)$ du lysozyme relaxe bien plus rapidement que ceux des solutions de tréhalose et de maltose, tandis que le nombre de LHs sucre-protéine est nettement plus faible que dans les deux autres solutions. Ceci n'est cependant pas vérifié si l'on compare les solutions de sucrose et de tréhalose à 60 % pds dans lesquelles le sucrose se lie par LHs au lysozyme davantage que le tréhalose, mais le temps de relaxation semble plus long en présence de tréhalose. Ceci montre que le ralentissement dynamique du lysozyme est à la fois fonction du nombre de LHs sucre-lysozyme et du temps caractéristique de relaxation du solvant, et notamment des sucres.

Nous avons cherché à savoir si l'hétérogénéité des fluctuations quadratiques moyennes du lysozyme discutées dans la section 4.1.2 se reflète dans les processus de relaxation du lysozyme. Pour cela, nous avons calculé les fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ des résidus des différentes zones identifiées dans la section 4.1.2 (voir figure 4.4). La figure 4.19 présente les fréquences caractéristiques de relaxation $1/\tau_{1/e}$, où $\tau_{1/e}$ désigne le temps caractéristique de décroissance en $1/e$ des $S_{inc}(Q,t)$ pour $Q = 2,29 \text{ \AA}^{-1}$.

Nous constatons que les fréquences de relaxation des zones I à V sont nettement plus élevées que celles des zones A et B pour le lysozyme dans l'eau pure, en bon accord avec les $\langle u^2 \rangle$ de la figure 4.1.2. Nous remarquons que les résidus de la zone V fluctuent significativement plus rapidement que les résidus des zones I à IV. Ce résultat peut être interprété par le fait que ces résidus correspondent à la boucle du N-terminal, *i.e.* l'une des extrémité de la chaîne polypeptidique du lysozyme. Par conséquent, ces résidus ne sont contraints que par un seul côté de la chaîne. La comparaison des fréquences de relaxation du lysozyme en présence des sucres est très intéressante, car elle suit de manière exacte l'ordre relatif des $\langle u^2 \rangle$ du lysozyme en présence des trois sucres, quelle que soit la concentration et la zone considérées, et facilite la comparaison de l'effet des trois sucres. La maltose apparaît clairement être le sucre qui ralentit le plus la relaxation du lysozyme et le sucrose celui qui la ralentit le moins. De plus, il est important de signaler le fait que les zones avec lesquelles un sucre donné forme notablement plus de LHs que les deux

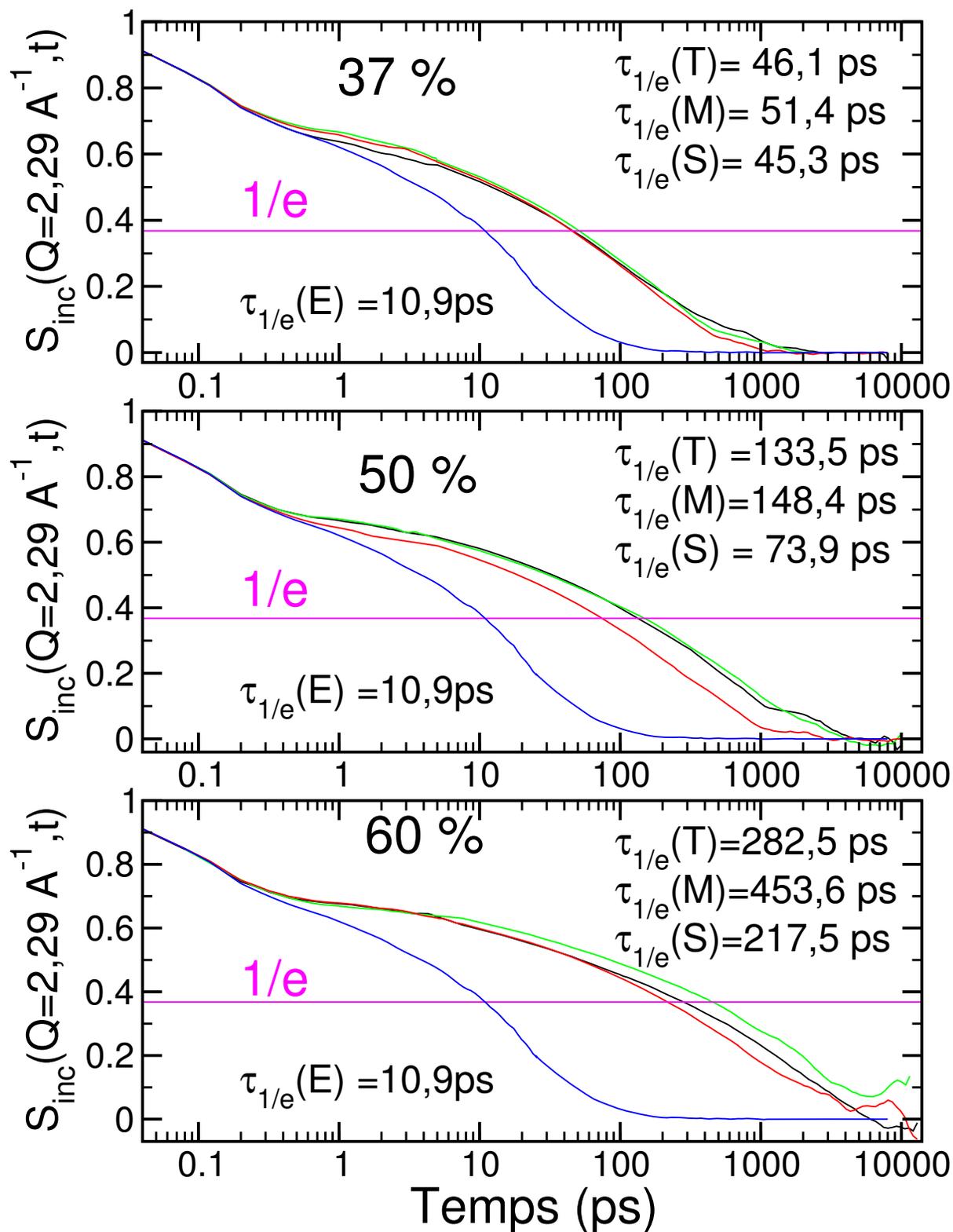


FIG. 4.18 – Fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ du lysozyme dans les solutions à 37, 50 et 60 % pds pour $Q = 2,29 \text{ \AA}^{-1}$ et à $T = 300 \text{ K}$. Les courbes relatives aux solutions de tréhalose T, de maltose M, et de sucrose S sont respectivement de couleur noire, verte et rouge. La fonction $S_{inc}(Q,t)$ du lysozyme dans l'eau pure E est indiquée à titre comparatif (courbes bleues). Les temps de décroissance en $1/e$ $\tau_{1/e}$ des $S_{inc}(Q,t)$ sont également indiqués.

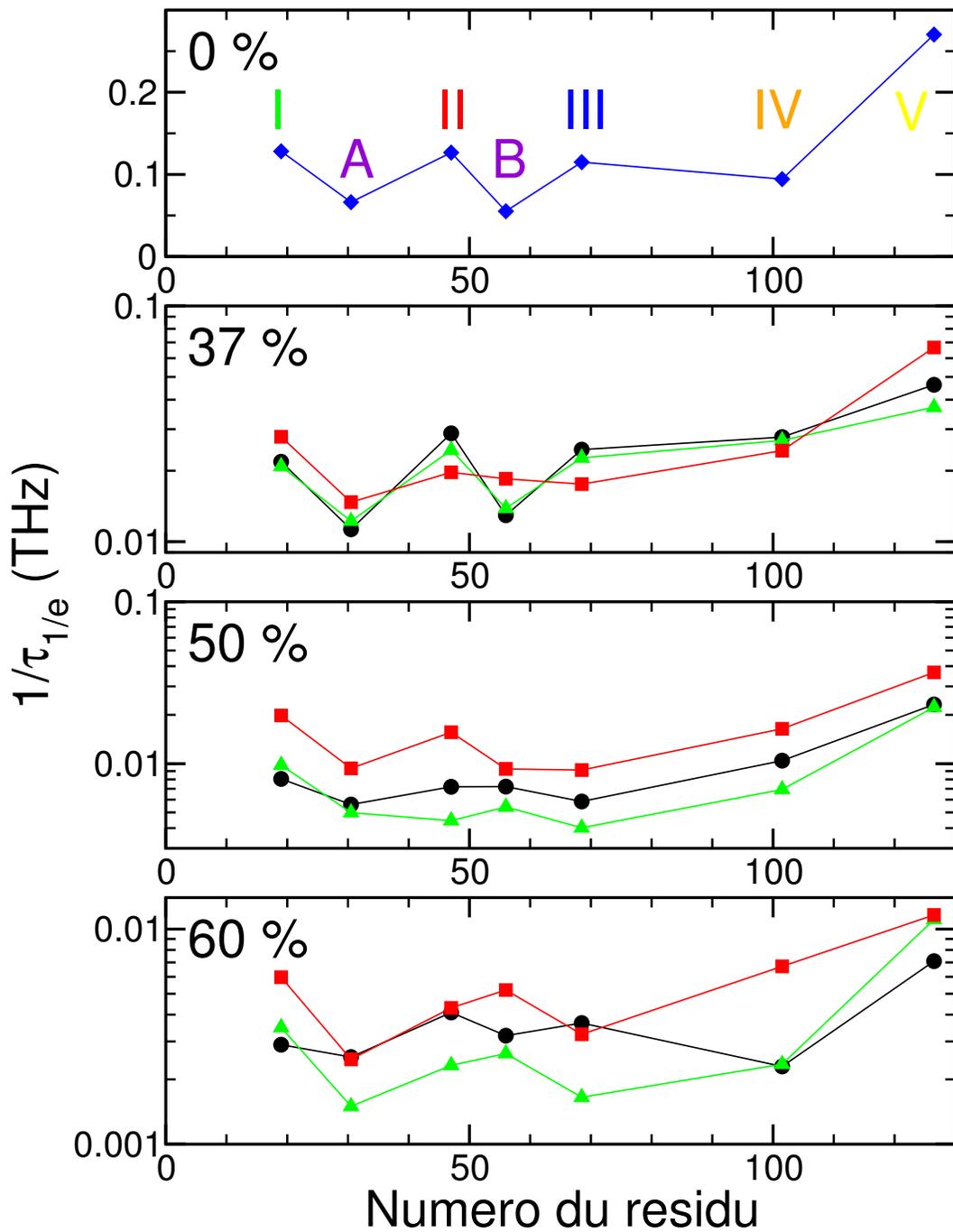


FIG. 4.19 – Fréquences caractéristiques de relaxation $1/\tau_{1/e}$ à $T = 300$ K des résidus des zones identifiées dans la section 4.1.2, p. 129. Les courbes relatives au tréhalose T , au maltose M , et au sucrose S sont respectivement de couleur noire, verte et rouge. Les fluctuations quadratiques moyennes des zones I à V sont plus élevées que les fluctuations moyennes, alors que celles de zones A et B sont plus faibles.

autres sucres sont des zones pour lesquelles les fréquences de relaxation sont faibles. A titre d'illustration, le sucrose forme significativement plus de LHs avec les résidus de la zone IV que le maltose et le tréhalose à 37 %, alors que les trois sucres sont comparables à 50 et 60 %. En accord avec ce constat, la fréquence de relaxation des résidus de la zone IV est plus faible dans les solutions de sucrose à 37 %, mais pas à 50 et 60 %.

Nous avons calculé les fonctions de diffusion intermédiaires des disaccharides aux différentes concentrations et pour le même vecteur de diffusion $Q=2,29 \text{ \AA}^{-1}$ (voir la figure 4.20).

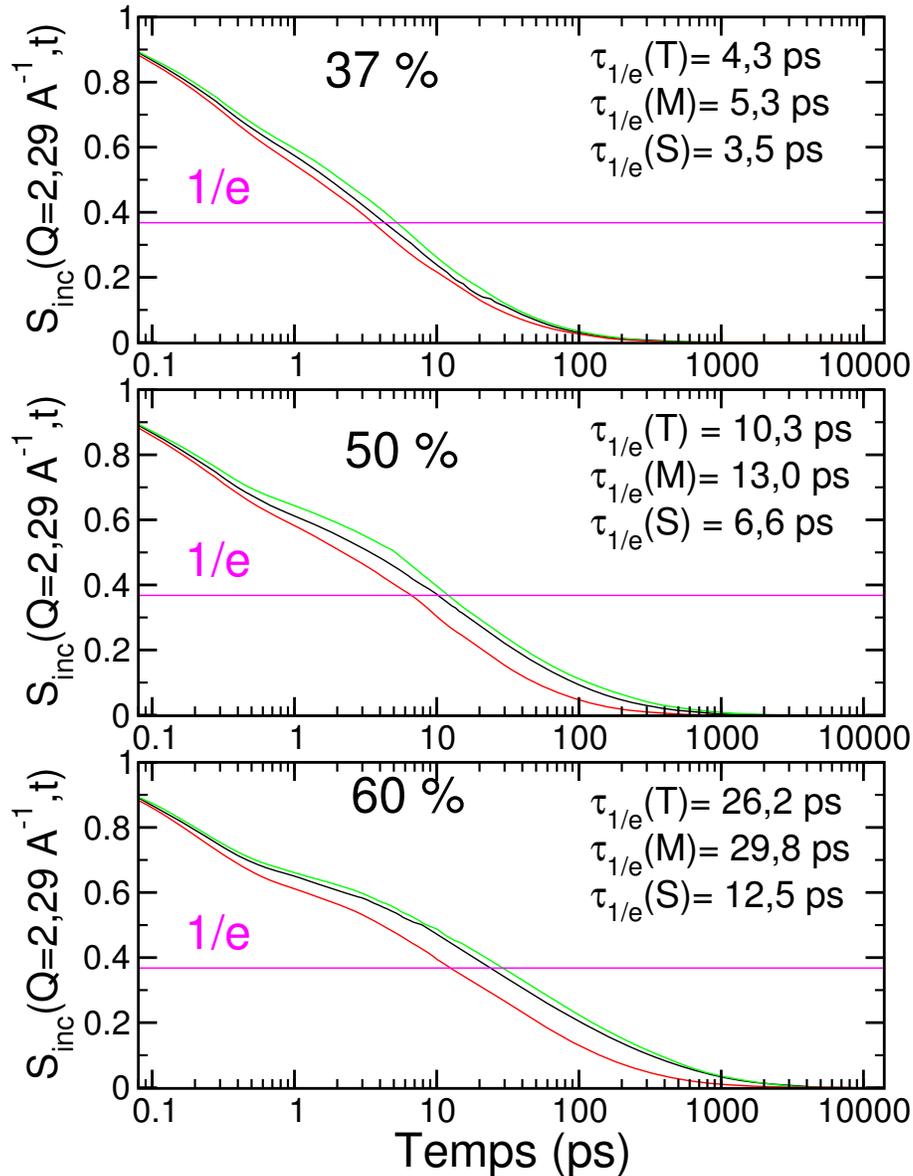


FIG. 4.20 – Fonctions de diffusion intermédiaires incohérentes $S_{inc}(Q,t)$ des disaccharides dans les solutions à 37, 50 et 60 % pds à $T = 300 \text{ K}$. Les courbes relatives au tréhalose T , au maltose M , et au sucrose S sont respectivement de couleur noire, verte et rouge. Les temps de décroissance en $1/e$ $\tau_{1/e}$ des $S_{inc}(Q,t)$ sont également indiqués.

Ces fonctions montrent clairement que le sucrose relaxe plus rapidement que la tré-

halose et le maltose quelle que soit la concentration considérée. En outre, le maltose semble relaxer un peu plus lentement que le tréhalose. Ceci semble en contradiction avec les mesures expérimentales montrant que les solutions de tréhalose ont une plus grande viscosité que celles de maltose. Il est possible que la simulation ne parvienne pas à reproduire correctement le comportement dynamique du maltose. Ceci pourrait en partie découler du fait que les deux cycles du maltose restent formés dans les simulations, alors qu'en réalité le maltose subit la réaction de mutarotation, c'est-à-dire le passage d'une forme anomère à l'autre par l'ouverture de l'un des cycles. Cette réaction est susceptible de profondément affecter la flexibilité des molécules de maltose, leurs interactions avec les molécules de maltose voisines, et donc leur dynamique. La relaxation plus rapide du sucrose que celle du tréhalose et du maltose est en bon accord avec le nombre de LHs intermoléculaires sucre-sucrose. La diffusion et la réorientation des molécules de sucre impliquées dans ce type de LHs devrait être plus limitée que celles des molécules de sucres libres, n'interagissant qu'avec l'eau.

4.3.1 Dynamique du réseau de LHs

Nous nous sommes intéressés à la dynamique de différents réseaux de LHs (eau-lysozyme, sucre-lysozyme, sucre-sucrose) afin de comprendre les effets respectifs des différents sucres. Le tableau 4.3 présente les temps de vie des LHs calculés à partir du temps de décroissance en $1/e$ de la fonction d'autocorrélation de l'opérateur de LH $h(t)$ (voir section 3.3.3).

Type de LH	Concentration (% pds)	$\tau_{HB,T}$	$\tau_{HB,M}$	$\tau_{HB,S}$
Eau-lysozyme	0	30	30	30
	37	64	87	80
	50	133	164	101
	60	185	236	176
Sucre-lysozyme	37	684	961	719
	50	1769	1758	370
	60	2513	4398	2700
Sucre-sucrose	37	134	133	87
	50	224	291	120
	60	599	575	273

TAB. 4.3 – Temps de vie τ_{HB} des LHs eau-lysozyme, sucre-lysozyme et sucre-sucrose pour les différentes solutions étudiées à $T = 300$ K (les valeurs des τ_{HB} sont en ps).

L'addition de sucres augmente significativement le temps de vie des LHs eau-protéine, car ils limitent la diffusion des molécules d'eau d'hydratation, qui se trouvent confinées entre la surface de la protéine et les sucres. D'ailleurs, environ 50 à 70 d'entre elles forment à la fois des LHs avec le lysozyme et les sucres, selon la concentration considérée (données non montrées). Ce renforcement des LHs eau-lysozyme pourrait stabiliser le lysozyme, en limitant notamment les mouvements anharmoniques des chaînes latérales des résidus en contact avec le solvant. Le réseau d'hydratation de la protéine serait donc stable à des températures plus élevées que dans l'eau pure et la dénaturation thermique serait décalée vers les plus hautes températures. Le maltose semble augmenter davantage le temps de

vie de ces LHs que les autres sucres, notamment à 50 et 60 % pds, en accord avec sa relaxation plus lente que celle du tréhalose et du sucrose observée dans les fonctions de diffusion intermédiaires de la figure 4.20. Les temps de vie des LHs sucre-protéine sont d'au moins deux ordres de grandeur plus élevés que ceux des LHs eau-protéine en raison du coefficient de diffusion beaucoup plus faible des sucres par rapport à celui de l'eau. Le temps de vie de ces LHs est nettement plus long en présence de maltose qu'en présence de tréhalose ou de sucrose. En outre, le temps de vie des LHs sucrose-lysozyme est anormalement bas à 50 % pds, en accord avec d'autres paramètres discutés précédemment. Ces données montrent que des simulations d'au moins 10 ns sont nécessaires pour permettre aux molécules de se réorganiser au moins partiellement à la surface du lysozyme et suggèrent l'importance de la position et de l'orientation des sucres dans la construction des configurations initiales des simulations. Les temps de vie des LHs sucre-sucres sont en accord avec le nombre de LHs sucre-sucres qui augmente avec la concentration en sucres. Les nombres similaires de LHs intermoléculaires dans les solutions de maltose et de tréhalose conduisent également à des temps de vie des LHs sucre-sucres comparables. Le sucrose se distingue clairement du maltose et du tréhalose par des temps de vie des LHs sucre-sucres plus faibles. Le sucrose forme moins de LHs sucre-sucres que le maltose et le tréhalose, car les plus nombreuses LHs intramoléculaires qu'il forme limitent le nombre de ses groupes hydroxyles disponibles pour former des LHs intermoléculaires avec les autres molécules de sucrose. Ces LHs influencent considérablement la diffusion des molécules de sucres aux concentrations relativement élevées (typiquement ≥ 30 % pds) et certains auteurs ont suggéré que la percolation du réseau de LHs des sucres est responsable de la brusque augmentation de la viscosité des solutions sucre/eau. L'influence des LHs sucre-sucres se perçoit dans les $S_{inc}(Q,t)$ des sucres, où le sucrose apparaît relaxer plus rapidement que le tréhalose et le maltose.

Si l'on tente d'interpréter ces résultats vis-à-vis du phénomène de la bioprotection dans cette gamme de concentrations, il semble que deux facteurs soient nécessaires à une stabilisation importante d'une protéine : (i) le ralentissement de la dynamique de son réseau d'hydratation et (ii) la présence d'une matrice dont la dynamique est lente par rapport à celle de l'eau. Le premier de ces facteurs permettrait de limiter les amplitudes des fluctuations $\langle u^2 \rangle$ des résidus en contact avec le solvant, et donc de limiter leurs relaxations rapides (β) [32, 106], alors que le second facteur éviterait les mouvements d'ensemble de plusieurs résidus, précurseurs de la dénaturation, en relaxant beaucoup plus lentement. Le maltose semblerait à première vue le meilleur bioprotecteur parmi les trois sucres étudiés puisqu'il réduit davantage les fluctuations atomiques du lysozyme et augmente son temps caractéristiques de relaxation plus que le sucrose et le tréhalose. Néanmoins, la tendance du maltose à former de nombreuses LHs avec le lysozyme n'est pas nécessairement un avantage par rapport au sucrose et au tréhalose, car il subit la réaction de mutarotation. Celle-ci ne peut être prise en compte dans les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, mais elle est susceptible de réduire l'effet bioprotecteur du maltose car la présence du maltose à proximité des résidus arginine et lysine du lysozyme favoriserait la réaction de Maillard ou « brunissement non-enzymatique ». C'est la raison pour laquelle le maltose est généralement moins utilisé que le tréhalose et le sucrose pour la stabilisation des protéines en solution ou leur lyophilisation. Si l'on compare le sucrose et le tréhalose, nous constatons que la principale différence qui permet de les distinguer est la dynamique de leur réseau de LHs. Celui-ci ne joue probablement

pas un rôle aussi important à température ambiante, où la conformation du lysozyme est stable, qu'aux températures suffisamment élevées auxquelles sont observées de larges changements conformationnels, voire la dénaturation du lysozyme. A ces températures, les LHs sucre-sucre dans les solutions de tréhalose maintiendraient davantage la structure du lysozyme que celles des solutions de sucrose et retarderaient donc la dénaturation.

4.4 Transition dynamique

Nous avons étudié l'influence des sucres sur la transition dynamique du lysozyme (voir section 1.2.3). Les fluctuations quadratiques moyennes des atomes d'hydrogène du lysozyme dans l'eau pure et dans les solutions à 50 % pds sont représentées en fonction de la température dans la figure 4.21. A faible température, le comportement est linéaire et correspond au régime harmonique. Lorsque la température croît, la forte augmentation des MSFs du lysozyme dans l'eau pure révèle l'apparition des contributions anharmoniques, *i.e.* la transition dynamique, vers 200-220 K. Cette valeur est en bon accord avec de nombreuses études expérimentales sur différentes protéines, le lysozyme en particulier. Ceci suggère que la transition dynamique est une caractéristique commune des protéines, indépendante de leur structures secondaire et tertiaires. Cette transition a également été observée dans de nombreuses études par simulations numériques avec différents champs de forces et potentiels de l'eau. En présence des sucres à 50 % pds, la transition dynamique du lysozyme est beaucoup plus limitée et semble se produire à une température plus élevée. Nous ne parvenons pas à différencier le maltose et le tréhalose. Par contre, les fluctuations semblent légèrement plus élevées en présence de sucrose. Ceci résulte probablement du nombre plus faible de LHs sucrose-lysozyme. La structure et la dynamique des molécules d'eau à l'interface protéine-solvant sont affectées par les macromolécules. Aux faibles températures, les molécules d'eau à proximité du lysozyme sont organisées en agrégats rigides et réduisent fortement les fluctuations atomiques du lysozyme. Aux températures élevées, la diffusion des molécules d'eau permet de plus grands mouvements des atomes en contact avec le solvant.

L'évolution en température des fluctuations quadratiques moyennes $\langle u^2 \rangle$ du lysozyme nous donne une information sur les vibrations locales des atomes du lysozyme. Mais, nous pouvons décrire autrement les fluctuations conformationnelles du lysozyme en calculant les fluctuations du réseau de LHs intramoléculaires, qui renseigne sur la dynamique interne du lysozyme. Nous avons calculé $n_{HBintra}(L)$, le nombre total de LHs intramoléculaires différentes se formant au sein du lysozyme pendant 250 ps, dont l'évolution en température est représentée dans la figure 4.22 pour les solutions à 0 et 50 % pds. Lorsque la température décroît, $n_{HBintra}(L)$ diminue rapidement et un changement de pente est observé à 180 K. Mais, il est moins clair que celui obtenu dans la figure 4.21. Ce fait pourrait résulter de la relative rigidité des éléments de structure secondaire présents dans le lysozyme, notamment des hélices α , dans lesquelles le groupe $C = O$ d'un résidu i donné forme une LH avec le groupe $N - H$ du résidu $i + 4$ de la chaîne polypeptidique. $n_{HBintra}(L)$ devrait donc être peu sensible à la température, en supposant que les éléments de structure secondaire ne changent pas de forme. L'allure de $n_{HBintra}(L)$ pourrait également provenir du fait que le solvant n'intervient *a priori* pas directement sur les LHs intramoléculaires entre différents résidus. L'effet du solvant serait donc moins évident que dans le cas des $\langle u^2 \rangle$. Il convient également de souligner que le critère géométrique choisi

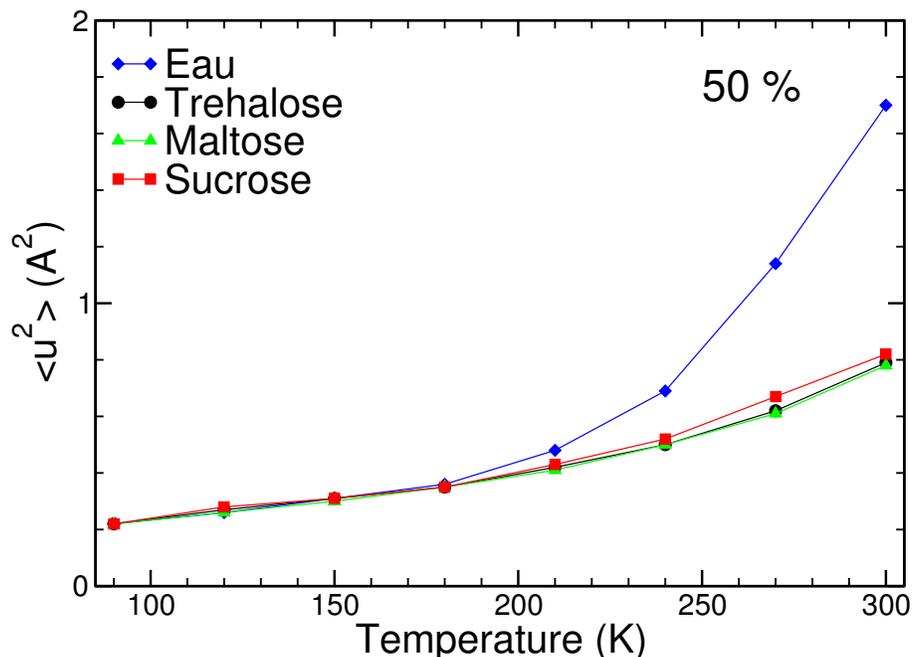


FIG. 4.21 – Evolution en température des fluctuations quadratiques moyennes des atomes d’hydrogène du lysozyme dans l’eau pure et en solution avec les disaccharides à 50 % pds.

(critère II, section 3.1.3) permet de maintenir la LH formée tant que les fluctuations relatives des atomes impliqués dans cette LH (par exemple la distance donneur-accepteur) ne sont pas trop importantes. Au dessus de 180 K, $n_{HBintra}(L)$ est plus important dans l’eau pure que dans les solutions à 50 % pds car la présence des sucres limite l’amplitude des mouvements des résidus de surface et donc la réorganisation du réseau de LHs qu’ils sont susceptibles de former avec d’autres résidus du lysozyme. Pour la même raison, la diminution avec la température de $n_{HBintra}(L)$ est moins marquée en présence des sucres. $n_{HBintra}(L)$ semble légèrement plus faible dans la solution de maltose que dans celles de tréhalose ou de sucrose, notamment à 300 K en raison du plus grand nombre de LHs sucre-protéine.

Afin d’étudier la dynamique de l’eau à la surface du lysozyme, nous avons calculé le nombre total de molécules d’eau $N_W(L)$ différentes formant des LHs avec le lysozyme en un temps donné (ici 250 ps). Ce paramètre reflète l’échange des molécules d’eau à l’interface protéine/solvant. La dépendance en température de $N_W(L)$ pour les solutions à 0 et 50 % pds sont représentés dans la figure 4.23. Le comportement de $N_W(L)$ est similaire à celui des fluctuations quadratiques moyennes $\langle u^2 \rangle$ et révèle l’activation de la dynamique du réseau de LHs à l’interface protéine-solvant, *i.e.* une sorte de transition dynamique de l’eau d’hydratation. La dynamique de l’eau d’hydratation pourrait être couplée à la dynamique des chaînes latérales polaires et être responsable du déclenchement de mouvements plus collectifs. Des études par diffusion neutronique sur la myoglobine hydratée et sèche ont montré que les modes de libration des chaînes latérales polaires augmentent en présence d’eau.

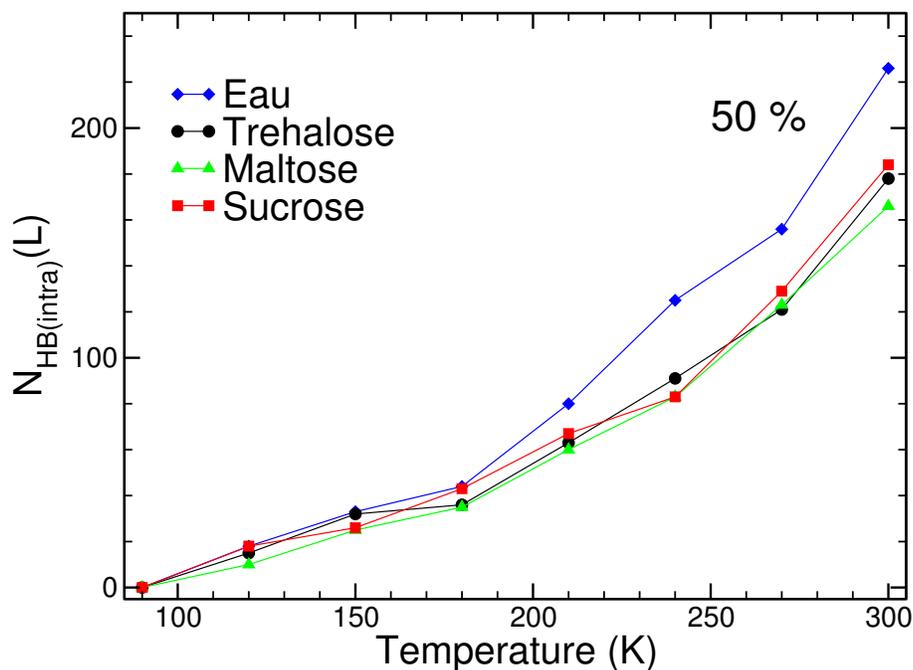


FIG. 4.22 – Evolution en température de $n_{HB(intra)}(L)$, le nombre total de LHs intramoléculaires différentes se formant au sein du lysozyme pendant 250 ps, pour les solutions à 0 et 50 % pds. $n_{HB(intra)}(L)$ est considéré nul à $T = 90$ K afin de pouvoir comparer directement les différentes solutions, car $n_{HB(intra)}(L)$ peut dépendre des différentes conformations du lysozyme.

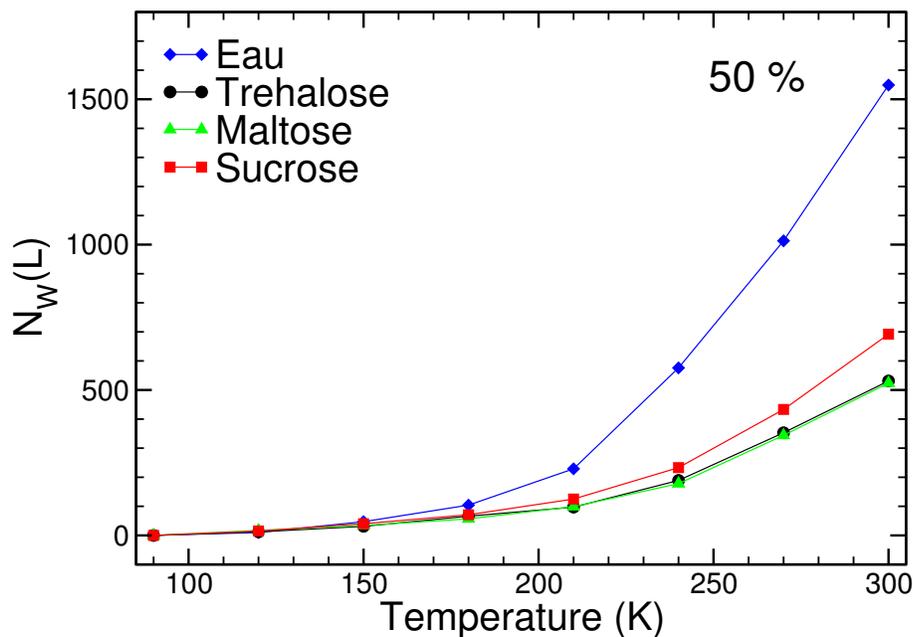


FIG. 4.23 – Evolution en température du nombre total de molécules d'eau différentes $N_W(L)$ se liant au lysozyme par LH pendant 250 ps dans les solutions à 0 et à 50 % pds.

4.5 Dénaturation thermique du lysozyme étudiée par diffusion Raman

Dans les sections précédentes de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'influence des sucres sur le lysozyme dans son état natif. Cependant, il est également nécessaire de connaître de quelle manière les sucres agissent sur l'état dénaturé du lysozyme, car certains résidus enfouis au coeur du lysozyme dans son état natif deviennent exposés au solvant de la solution dans l'état dénaturé. L'étude comparative de la dénaturation thermique du lysozyme par simulation de dynamique moléculaire est toutefois difficile en raison des temps de calculs requis : il faudrait *a priori* pouvoir modéliser les solutions pendant plusieurs dizaines de ns, même à température élevée (373-473 K) et définir des boîtes de simulation de taille plus importante afin de permettre le dépliement de la chaîne polypeptidique. C'est la raison pour laquelle les études numériques de la dénaturation thermique des protéines restent rares. Au contraire, de nombreuses études expérimentales utilisant les spectroscopies IR, UV ou de fluorescence ont permis d'étudier ce processus [107, 245–247]. Mais, les études par spectroscopie Raman sont restées beaucoup plus rares jusqu'à présent.

La spectroscopie Raman permet de sonder les changements de la structure secondaire du lysozyme en solution avec les sucres et de révéler ainsi leur spécificité. Il est bien admis que la structure secondaire des protéines se caractérise par la présence de bandes amides I vers 1650 cm^{-1} et III vers 1300 cm^{-1} , dont la position en fréquence dépend fortement de l'état de la protéine (*e.g.* natif ou dénaturé), de son environnement et des interactions moléculaires. La bande Amide I résulte principalement de modes de vibrations de la double liaison $C = O$ de la chaîne polypeptidique et la bande Amide III se compose du mode d'élongation de la liaison $C - N$ et de flexion $N - H$. Ces deux bandes sont généralement analysées afin de déterminer la structure des protéines [248]. Les sucres ont des bandes intenses dans la région des bandes Amides I et III jusqu'à environ 1500 cm^{-1} et aucune ne se superpose à la bande Amide I des protéines. En outre, cette bande est plus sensible aux effets de l'environnement et aux changements de conformations des protéines. Lors du dépliement de la chaîne polypeptidique, l'intensité de la bande Amide I diminue et sa position est décalée vers celle de la chaîne polypeptidique dépliée. L'avantage de suivre le décalage en fréquence de la bande Amide I lors du processus de dénaturation est (i) d'éviter les effets du changement de fluorescence de l'échantillon lorsque la température croît et (ii) de corrélérer directement les données à la structure secondaire du lysozyme. En outre, le mode Amide I est faiblement influencé par la bande de flexion de l'eau située vers 1640 cm^{-1} , dont l'intensité est faible.

La figure 4.24 montre la région de la bande Amide I du spectre du lysozyme dans l'eau. Cette région spectrale est composée de quatre bandes. Le décalage vers les basses fréquences de la bande carbonyle à 1656 cm^{-1} est typique d'une liaison amide des polypeptides et de la présence d'hélices α . La bande à 1550 cm^{-1} correspond à la bande tryptophane et la faible bande à 1610 cm^{-1} suggère la présence de liaisons $C = C$.

Dans l'état dénaturé, les vibrations $C = O$ de toutes les protéines se situent à environ $1665 \pm 1\text{ cm}^{-1}$. Dans cet état, la chaîne polypeptidique est dépliée et les vibrations carbonyles ne sont pas affectées par la structure secondaire. La formation de LHs entre les groupes $C = O$ et $N - H$ de la chaîne polypeptidique au sein des éléments de la structure secondaire (hélices α et feuilletts β) (voir figure 1.8 du chapitre 1, p. 12) affecte la constante de force des liaisons $C = O$ et donc décale la position de la bande Amide I,

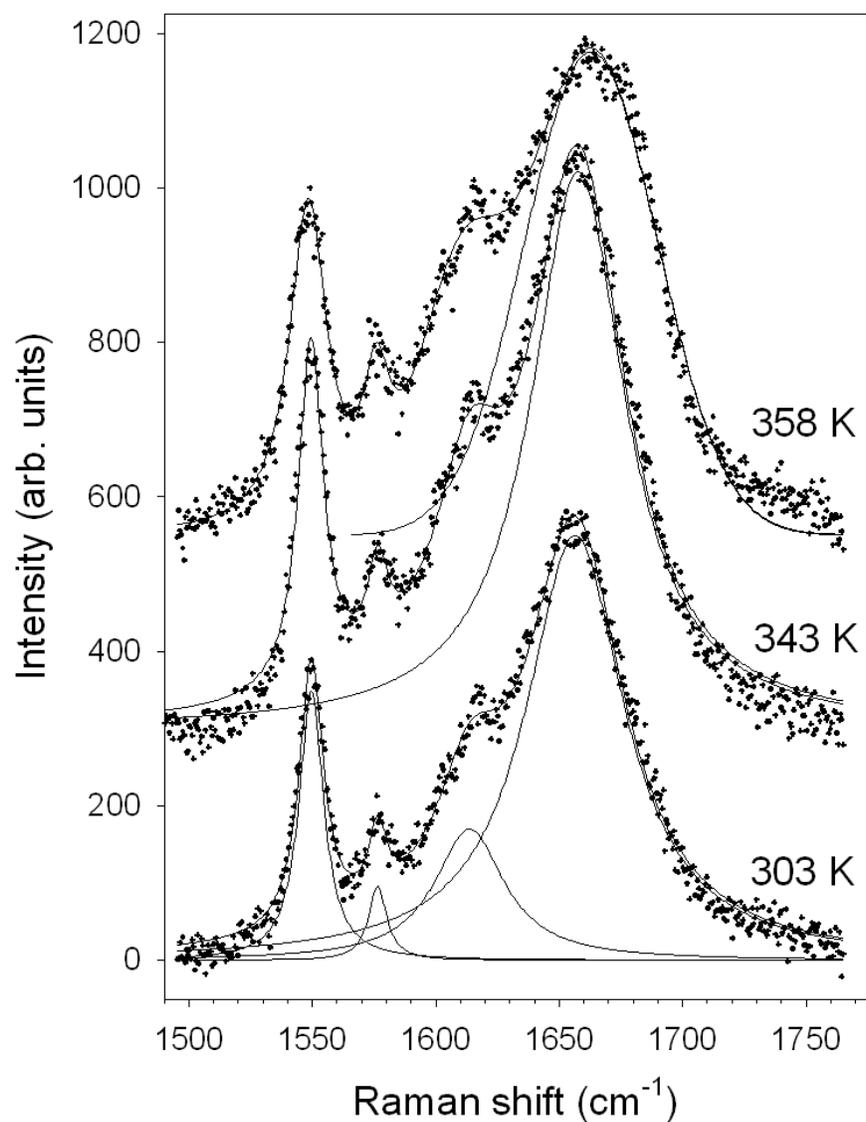


FIG. 4.24 – Dépendance en température du spectre Raman de la région de la bande Amide I du lysozyme dans l'eau. Les symboles correspondent aux données expérimentales, alors que les courbes en traits pleins résultent de la procédure d'ajustement des spectres. Les quatre bandes du spectre composant le spectre à $T = 303\text{ K}$ sont également représentées. Ces spectres ont été corrigés de la contribution de la fluorescence, comme mentionné dans le texte.

d'autant plus que les LHs sont fortes. Le décalage est d'environ 10 cm^{-1} lors de la transition pliement/dépliement des hélices α du lysozyme et un modèle d'oscillateur simple donne une modification de $0,6 \text{ N/m}$ de la constante de force de la liaison $C = O$.

Les dépendances en température de la fréquence de la bande Amide I du lysozyme ν_{AmideI} dans l'eau pure et en présence des trois sucres à une concentration de 40 % pds sont représentées dans la figure 4.25.

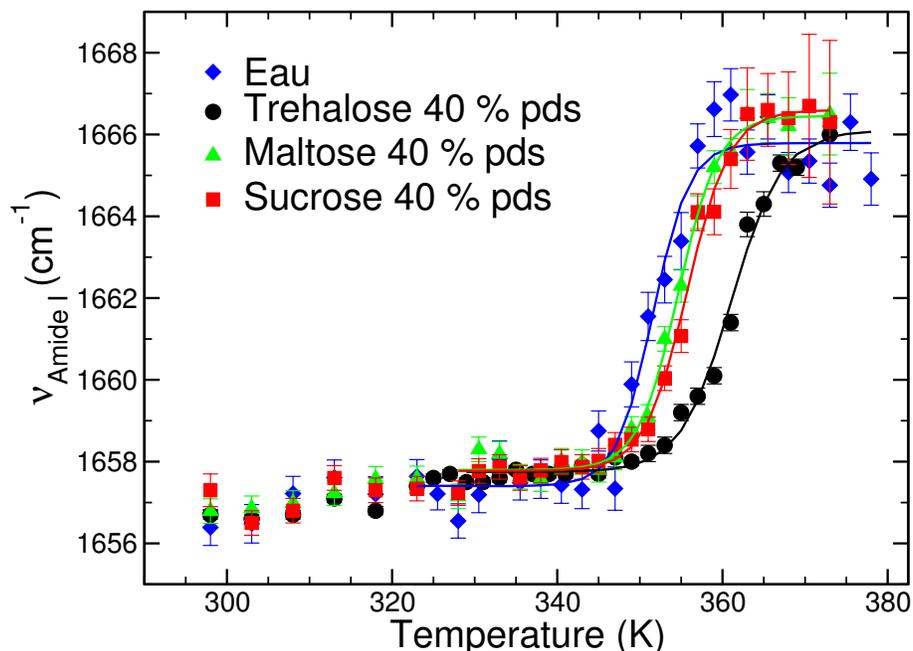


FIG. 4.25 – Dépendance en température de la position ν_{AmideI} de la bande Amide I du lysozyme dans l'eau pure (W) et en présence des trois sucres étudiés (tréhalose T , maltose M et sucrose S) à 40 % pds. Les barres représentent l'erreur expérimentale.

L'augmentation de ν_{AmideI} est faible jusqu'à environ 340 K, puis croît brusquement et atteint un palier vers 1666 cm^{-1} . Le décalage de la température de dénaturation est d'environ 10 K en présence de tréhalose et de 3-4 K en présence des deux autres sucres. Le tréhalose serait donc un meilleur bioprotecteur du lysozyme que le maltose et le sucrose. La stabilisation relativement faible du lysozyme par le maltose pourrait s'expliquer par le fait qu'il réagisse selon la réaction de Maillard avec les résidus lysine et arginine du lysozyme. Ceci dégraderait le lysozyme de sorte que sa température de dénaturation soit un peu plus faible qu'en présence de sucrose, malgré le fait que la température de transition vitreuse T_g du maltose soit plus élevée que celle du sucrose. Les paramètres thermodynamiques du lysozyme ont été déterminés à partir du modèle à deux états natif (N) et dénaturé (D) dont la constante d'équilibre K s'écrit (voir section 1.2.5 du chapitre 1) :

$$K = \frac{p_D}{p_N} = \frac{\nu_N - \nu}{\nu - \nu_D} \quad (4.3)$$

où p_D et p_N correspondent aux probabilités d'occupation des états N et D ($p_D + p_N = 1$), et ν_N et ν_D sont les fréquences du mode amide I du lysozyme dans les états N et D . Le changement d'énergie libre standard ΔG_{ND} de la transition s'écrit :

$$\Delta G_{ND}(T) = G_D - G_N = -RT \ln(K) \quad (4.4)$$

où R est la constante des gaz parfaits et T la température. La transition repliement-dépliement dont l'allure est celle d'une sigmoïde peut être ajustée par une équation de type Boltzmann :

$$\nu = \nu_D + \frac{\nu_N - \nu_D}{1 + \exp\left(\frac{T - T_m}{\Delta T}\right)} \quad (4.5)$$

où T_m est la température à mi-transition ($\Delta G_{ND}(T_m) = 0$) et ΔT est liée à la largeur en température de la transition. La température de début de transition T_{on} et la température T_d de fin de transition ont été déterminées à partir de la pente de la courbe $\nu_{AmideI}(T)$. L'énergie libre de stabilisation de l'état natif N par rapport à l'état dénaturé D $\Delta G_{ND}(T)$ a été calculée entre T_{on} et T_d .

L'ensemble des paramètres thermodynamiques obtenus à partir de la transition N→D est rassemblé dans le tableau 4.4.

Paramètres	L/W	L/M/W	L/S/W	L/T/W
T_m (K)	351,4	354,5	355,8	361
ΔT (K)	2,3	2,7	2,6	3,1
ΔE_{ND}	28,3	28,3	28,3	28,3
$\Delta S_{ND}(T_m)$ (cal/molK)	311	263	283	242
$\Delta(\Delta G_{ND})$ (kcal/mol)	-	~1	~1	~2,3

TAB. 4.4 – Paramètres thermodynamiques de la dénaturation du lysozyme dans l'eau pure (W) et dans les solutions de maltose (M), de sucrose (S) et de tréhalose (T) à 40 % pds : T_m , la température à mi-transition, ΔT , l'intervalle de température de la transition, $\Delta S_{ND}(T_m)$ le changement d'entropie entre les états natif N et dénaturé D et $\Delta(\Delta G_{ND})$ l'énergie de stabilisation des sucres par rapport au lysozyme dans l'eau pure, calculée à la température T_m des différentes solutions pour laquelle $\Delta G_{ND} = 0$.

La figure 4.26 montre le changement d'énergie libre ΔG_{ND} en fonction de la température extrait entre les températures T_{on} et T_d déterminées à partir de l'équation 4.4. Ces résultats montrent clairement que les trois sucres stabilisent le lysozyme et décalent vers les plus hautes températures le processus de dépliement (voir figure 4.25), alors que le domaine de température de la transition ΔT reste constant. Il apparaît clairement que le dépliement des hélices α est davantage décalé par le tréhalose (10 K par rapport à l'eau pure) que par le maltose et le sucrose dont la stabilisation de l'état natif est similaire (décalage de 4 K environ par rapport à l'eau pure). Le changement d'entropie lors de la dénaturation ΔS_{ND} du lysozyme est de 268 cal/molK et de 236 cal/molK en présence des sucres. L'énergie libre de stabilisation des sucres $\Delta(\Delta G_{ND}) = \Delta G_{ND}(sucre) - \Delta G_{ND}(eau)$ est d'environ 2,3 kcal/mol pour le tréhalose et de 1 kcal/mol pour le sucrose et le maltose à la température T_m à mi-transition du processus de dépliement du lysozyme dans l'eau pure (à T_m , $\Delta G_{ND}(eau) = 0$). Il convient de souligner que les valeurs des ΔS_{ND} et des $\Delta(\Delta G_{ND})$ sont en accord avec celles obtenues par des données d'absorption UV/Visible [247]. La comparaison des valeurs des énergies libres de dénaturation avec celle des LHs montre que la stabilité conformationnelle du lysozyme résulte d'une subtile balance de différents termes (interactions hydrophobes, électrostatiques, LHs, etc.) et souligne la faible stabilité de l'état replié.

En outre, la transition ND est décalée vers les plus hautes températures lorsque la concentration en tréhalose croît, comme le montre la figure 4.27. Malgré le faible nombre

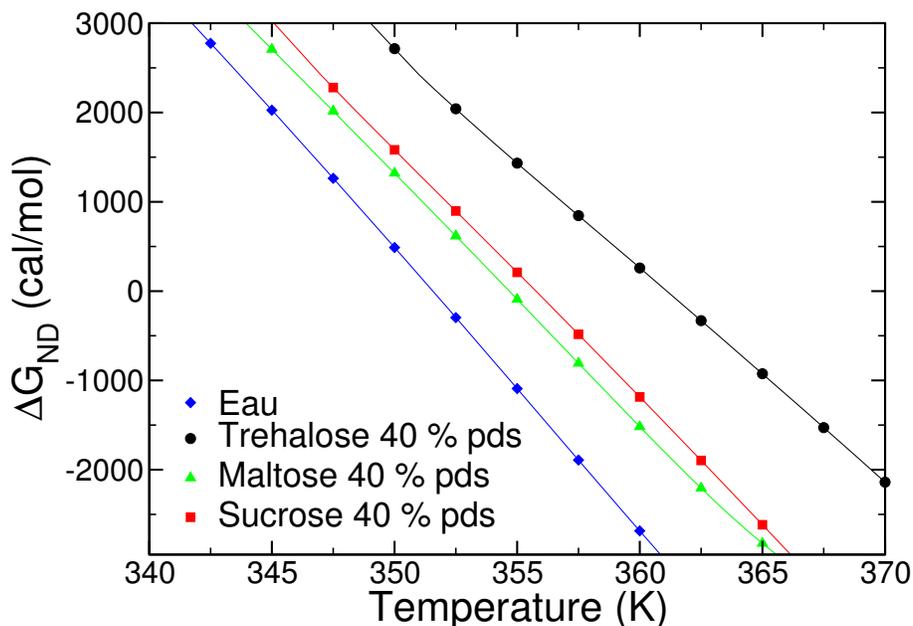


FIG. 4.26 – Dépendance en température de la différence d'énergie libre de Gibbs ΔG_{ND} entre l'état natif N et dénaturé D du lysozyme dans l'eau pure et en présence des trois sucres étudiés à 40 % pds. Les dérivées premières des droites conduisent au changement d'entropie ΔS_{ND} à T_m . Le calcul de ΔC_{pND} n'a pas été possible en raison du faible intervalle de température considéré et des grandes incertitudes sur ΔG_{ND} .

de points dans la zone de transition de la courbe représentant la concentration de 20 % pds en tréhalose (pas de 5 K contre un pas de 2 K pour la solution à 40 % pds), il semble qu'une augmentation significative de la température de dénaturation du lysozyme soit mise en évidence. Ce résultat semble différent de ceux obtenus par Lins *et al.* dans leur simulation de dynamique moléculaire d'une solution ternaire lysozyme/tréhalose/eau à 18 % pds en tréhalose. En effet, Lins *et al.* [125] montrent que la présence de tréhalose ne réduit pas les fluctuations conformationnelles du lysozyme, mais montrent que les molécules de tréhalose forment des agrégats qui confinent l'eau d'hydratation du lysozyme. Il est donc possible qu'à température ambiante l'effet du tréhalose sur l'eau d'hydratation ne soit pas suffisamment important pour qu'il ait une incidence sur les fluctuations atomiques du lysozyme. Néanmoins, les mouvements de grande amplitude du lysozyme peuvent être limités à haute température par la présence de l'agrégat de tréhalose, qui ferait croître la température de dénaturation du lysozyme.

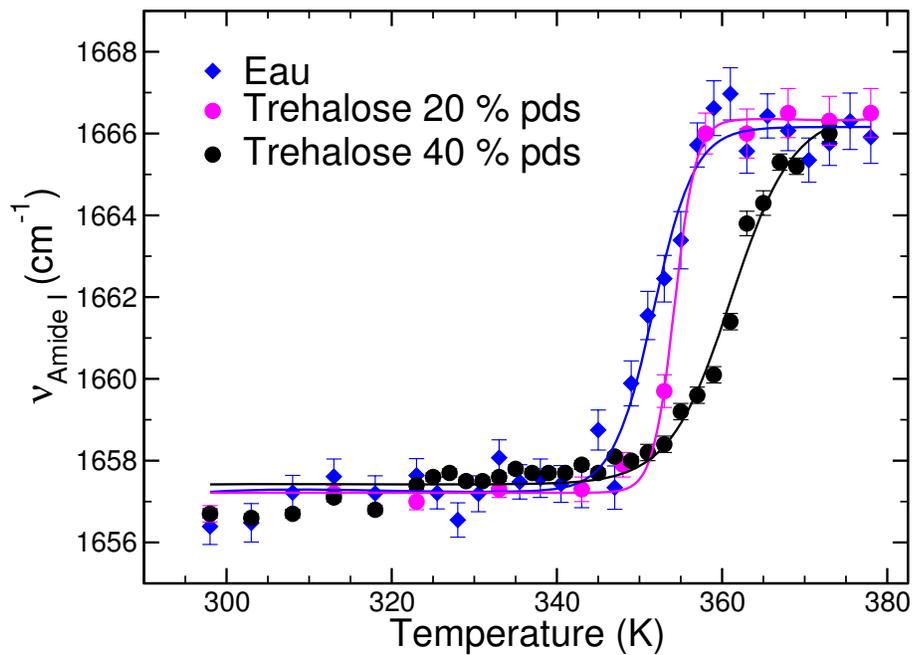


FIG. 4.27 – Dépendance en température de la position de la bande Amide I du lysozyme dans l'eau pure (W) et en présence de tréhalose à 20 et 40 % pds. Les barres représentent l'erreur expérimentale. Les courbes en trait plein résultent de l'ajustement des données par un modèle à deux états, N et D.

Conclusion et perspectives

Conclusion

La bioprotection est un problème complexe à l'interface de la physique, la chimie et la biologie. Il implique une grande diversité des composés biologiques rencontrés (protéines, membranes, cellules, etc.) et donc une très grande richesse de processus biologiques, chimiques et physiques susceptibles de se produire : synthèse et dégradation des composés stabilisateurs, changements de pH, transitions de phase, aggrégation, etc. Il est nécessaire de comprendre dans un premier temps comment ces composés se comportent vis-à-vis de facteurs déstabilisants tels que la température, le changement de pH ou d'humidité pour comprendre de quelle manière ils pourraient être stabilisés. De plus, un grand nombre d'espèces moléculaires sont en interaction mutuelle (eau, enzymes et protéines des cellules, sels et ions, composés stabilisateurs), et étudier l'influence d'un composé stabilisateur sur une molécule biologique en occultant la présence de nombreuses autres espèces est probablement une simplification importante. La bioprotection fait aussi intervenir des processus qui s'établissent sur des échelles de temps qui varient de plusieurs ordres de grandeur. Ainsi, les mouvements des atomes des protéines s'effectuent en quelques ps-ns, la déshydratation partielle ou totale d'une solution nécessite quelques minutes-heures, et les médicaments à base de protéines lyophilisés doivent être conservés plusieurs mois ou plusieurs années. Il convient donc d'étudier la bioprotection sous différents points de vue.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur les solutions binaires sucre/eau et ternaires lysozyme/sucre/eau. Dans les simulations de dynamique moléculaire, nous avons calculé un large éventail de fonctions et de paramètres visant à sonder les propriétés structurales, vibrationnelles et dynamiques des systèmes étudiés. Nous avons également testé l'influence du modèle de l'eau, SPC/E ou TIP3P, sur nos résultats. Des simulations longues (entre 10 et 17 ns) ont été nécessaires pour tenter de modéliser correctement les interactions sucre-lysozyme dans les systèmes ternaires. L'utilisation conjointe de la spectroscopie Raman dans une large gamme de fréquences [5-4000] cm^{-1} nous a permis d'étudier l'effet des sucres sur l'eau ainsi que la dénaturation du lysozyme qui serait délicate à simuler par dynamique moléculaire.

Cette étude nous a permis de montrer que la topologie des sucres, et plus particulièrement le nombre de LHs intramoléculaires qu'ils forment, jouent un rôle prépondérant sur leur interaction avec les molécules d'eau et les autres molécules de sucres. Le plus faible nombre de LHs intramoléculaires que forme le tréhalose lui permet de se lier à davantage de molécules d'eau que le maltose et le sucrose, et donc de structurer davantage le réseau de LHs de l'eau. Nous avons défini une concentration seuil ϕ_A d'environ 40-50 % pds à partir de laquelle les sucres ont une grande influence sur les propriétés structurales et dynamiques de l'eau, car à partir de cette concentration, le nombre de LHs

sucres-eau devient comparable à celui des LHs eau-eau. Nous avons également montré que le maltose et le tréhalose forment des agrégats de plus grandes tailles que ceux formés par le sucrose. Mise en parallèle avec le nombre d'hydratation des sucres, cette propriété ferait que les solutions tréhalose/eau soient plus homogènes que celles de maltose/eau ou de sucrose/eau, car les molécules de tréhalose formeraient à la fois de nombreuses LHs entre elles, mais également avec les molécules d'eau. Les LHs sucre-sucres stabiliseraient la matrice dans laquelle se trouve la molécule biologique tandis que les LHs sucre-eau gêneraient la déshydratation du milieu. Sous des conditions de déshydratation prononcée, ces LHs sucre-eau pourraient être remplacées par des LHs sucre-molécule biologique. Le tréhalose serait alors capable de former davantage de LHs avec la molécule biologique tout en maintenant un nombre élevé de LHs tréhalose-tréhalose.

D'autre part, il semble que le maltose relaxe un peu plus lentement que le tréhalose dans nos simulations contrairement aux données expérimentales. Ceci pourrait résulter d'une limitation des simulations de dynamique moléculaire qui ne permettent pas de prendre en compte l'ouverture de l'un des cycles du maltose lors de la réaction de mutarotation qu'il subit en réalité. Cette réactivité du maltose expliquerait pourquoi il stabilise moins le lysozyme que le sucrose et le tréhalose lors des expériences de dénaturation thermique que nous avons menées, alors qu'il semblerait être le meilleur bioprotecteur par simulation. Il pourrait en effet réagir avec les résidus arginine et lysine de lysozyme par réaction de Maillard (ou brunissement non-enzymatique) et le dégraderait de manière irréversible. La comparaison de l'influence du sucrose et du tréhalose sur la dynamique du lysozyme semble indiquer que le tréhalose ralentit un peu plus la relaxation du lysozyme que le sucrose. Les différences apparaissent faibles, mais elles pourraient s'accroître si l'on étudiait la dynamique du lysozyme à haute température, car la différence observée sur la relaxation des sucres suggère que le tréhalose serait plus efficace pour réduire les changements conformationnels de grande amplitude du lysozyme qui conduisent à sa dénaturation.

Pour résumer, un bon bioprotecteur se caractériserait par :

- une température de transition vitreuse T_g élevée, lui permettant de maintenir la structure tridimensionnelle des molécules biologiques à température ambiante et en présence d'une petite quantité d'eau.
- une grande capacité à former des LHs avec les molécules biologiques.

Nous pouvons également confronter nos résultats aux différentes hypothèses proposées afin d'expliquer le phénomène de bioprotection. Les systèmes que nous avons étudiés ne sont pas dans leur état vitreux, en raison de la température trop élevée et/ou la concentration en sucre trop faible. Néanmoins, il semble clair que le ralentissement dynamique du solvant induit par la présence des sucres a une influence directe sur les fluctuations atomiques et sur la relaxation du lysozyme. Selon nos résultats, le sous-refroidissement du milieu cellulaire, puis sa vitrification à des degrés de déshydratation plus élevés pourraient donc grandement stabiliser les molécules biologiques. Les différentes concentrations en sucres étudiées dans les systèmes ternaires (37, 50, 60 % pds) ne semblent pas montrer la substitution de l'eau d'hydratation. En effet, le tréhalose semble hydrater davantage le lysozyme que le maltose pour toutes les concentrations, et que le sucrose à 37 et 60 % pds. En outre, le nombre de LHs sucre-protéine n'implique pas forcément la diminution la plus grande des fluctuations atomiques, si l'on compare par exemple le sucrose et le tréhalose. Il est possible que cette hypothèse joue un rôle important lorsqu'il ne reste quasiment plus

de molécules d'eau hydratant les protéines et autres molécules biologiques. Même à des concentrations de 89 % pds, Cottone *et al.* semblent montrer que le sucrose et le tréhalose forment relativement peu de LHs avec la carboxy myoglobine (MbCO).

Nos résultats auraient davantage tendance à s'inscrire dans le cadre de l'hypothèse de l'hydratation préférentielle de Timasheff *et al.* ou du confinement de l'eau d'hydratation proposée par Belton et Gil, similairement aux résultats de Lins *et al.* et de Cottone *et al.* pour lesquelles les concentrations considérées sont respectivement de 18 et de 89 % pds. Il convient toutefois de rappeler que l'hydratation préférentielle plus importante dans les simulations de tréhalose à 37 et 60 % pds ne conduit pas à la réduction plus importante des fluctuations atomiques, ni au ralentissement dynamique plus prononcé du lysozyme par rapport aux solutions de maltose. De plus, il est possible que le lysozyme soit préférentiellement hydraté dans chaque simulation car il l'est dans la configuration initiale et que les temps de simulations ne permettent pas une réorganisation complète de l'ensemble du système.

D'autre part, nous avons clairement démontré dans notre étude des solutions binaires que le tréhalose destructure davantage le réseau de LHs de l'eau que le maltose et le sucrose, confirmant ainsi l'hypothèse de Magazù *et al.*. Cependant, des études récentes ont montré qu'il n'existait pas une parfaite corrélation entre la nature kosmotrope ou chaotrope d'un composé et sa capacité à respectivement stabiliser ou à déstabiliser les protéines. La structure du réseau de LHs sucre/protéine pourrait d'ailleurs jouer un rôle plus important que celle du réseau de LHs de l'eau aux concentrations relativement élevées, où l'influence du composé stabilisateur sur la molécule biologique est susceptible d'être la plus forte.

Enfin, nous avons montré que la structure de l'eau à proximité du tréhalose est proche de celle du cristal tréhalose dihydrate T_{2H_2O} , même aux faibles concentrations en tréhalose et semblerait suggérer que la formation de ce cristal est possible. La formation de ce cristal ne peut être toutefois pas être observée par dynamique moléculaire en raison des temps très courts des simulations.

Enfin, il convient de souligner que les différentes hypothèses proposées pour expliquer le phénomène de bioprotection ne sont pas forcément antagonistes. Par exemple, les hypothèses de Crowe *et al.* et de Timasheff *et al.* semblent à première vue contradictoires. Mais, le modèle de l'hydratation préférentielle concerne les situations où de l'eau volumique subsiste, alors que l'hypothèse de Crowe considère les solutions très déshydratées. Le tréhalose serait préférentiellement exclu à haute dilution car il forme de nombreuses LHs avec les molécules d'eau, tandis qu'il formerait davantage de LHs avec les molécules biologiques à forte concentration car les LHs eau-tréhalose se substitueraient par des LHs protéine-tréhalose. Ceci est donc parfaitement en accord avec sa capacité à former de nombreuses LHs intermoléculaires. De même, la vitrification du milieu cellulaire et la substitution des molécules d'eau d'hydratation sont compatibles, puisque qu'à concentration élevée, les sucres sont susceptibles de vitrifier et de former des LHs avec les molécules biologiques. Ces deux propriétés seraient d'ailleurs nécessaires afin de limiter des mouvements de la protéines dont les temps caractéristiques sont variés. La formation du verre limiterait les mouvements de grande amplitude des protéines, alors que les LHs limiteraient les mouvements rapides.

Perspectives

Les résultats sur la solution ternaire lysozyme/sucrose/eau à 50 % paraissent aberrants et il semblerait nécessaire d'effectuer une nouvelle simulation de ce système afin de vérifier ces résultats. En outre, l'étude des systèmes ternaires à des températures plus élevées pourrait permettre de discriminer plus aisément les différents sucres, qui doivent probablement avoir de plus grands effets sur l'état dénaturé du lysozyme que sur son état stable. L'étude de solutions sucres/eau confinées permettrait d'analyser les propriétés des solutions sucre/eau dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans le cytoplasme des cellules. D'autre part, l'étude d'autres sucres et d'autres bioprotecteurs, et en particulier de mélanges tréhalose/glycérol, sucrose/tréhalose, sorbitol/glycérol pourrait fournir de précieuses informations sur le phénomène de bioprotection, en permettant notamment de mieux comprendre les rôles respectifs des LHs protéine-matrice et de la dynamique de la matrice. Il serait également intéressant d'étudier par dynamique moléculaire orientée la déshydratation de phases cristallines (tréhalose dihydrate, maltose monohydrate, etc.) afin de d'étudier notamment les différences de cinétique de déshydratation ainsi que leur anisotropie en fonction du module et de l'orientation de la force constante imposée sur les molécules d'eau au cours des simulations. Enfin, il serait judicieux d'étudier d'autres protéines, car de nombreuses études expérimentales montrent que les effets relatifs des sucres sont susceptibles de dépendre de la protéine considérée. Le lysozyme est constitué en majorité d'hélices α et il pourrait être intéressant d'étudier l'effet des sucres sur des protéines dont la composition en éléments de structure secondaire (hélices α et feuillets β) diffèrent, telles que l'albumine ou la chymiotrypsine.

Bibliographie

- [1] Ludwig, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1808–1827.
- [2] Debenedetti, P. G. *J. Phys. : Condens. Matter* **2003**, *15*, R1669–R1726.
- [3] Cavillon, F. *Caractérisation de la liaison hydrogène dans les systèmes moléculaires d'intérêt biologique par diffusion de neutrons* Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, **2004**.
- [4] Giguère, P. A. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 4835–4839.
- [5] Park, S.-H.; Sposito, G. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 2281–2290.
- [6] Ohmine, I.; Tanaka, H. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2545–2566.
- [7] D'Arrigo, G.; Maisano, G.; Mallamace, F.; Migliardo, P.; Wanderlingh, F. *J. Chem. Phys.* **1981**, *75*, 4264–4270.
- [8] Stanley, H. E.; Teixeira, J. *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 3404–3422.
- [9] Wales, D. J., Ed. *Energy Landscapes, with Applications to Clusters, Biomolecules and Glasses*; Cambridge University Press: Cambridge, 2003.
- [10] Zanotti, J.-M. *Structure et dynamique de l'eau interfaciale. Rôle de l'eau d'hydratation dans la dynamique des protéines globulaires*. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, **1997**.
- [11] Makarov, V. A.; Andrews, B. K.; Pettitt, B. M. *Biopolymers* **1998**, *45*, 469–478.
- [12] Smolin, N.; Winter, R. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15928–15937.
- [13] Pal, S. K.; Peon, J.; Bagchi, B.; Zewail, A. H. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12376–12395.
- [14] Marchi, M.; Sterpone, F.; Ceccarelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6787–6791.
- [15] McCammon, J. A. *Rep. Prog. Phys.* **1984**, *47*, 1–46.
- [16] Hill, J. J.; Shalaev, E. Y.; Zograf, G. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1636–1667.
- [17] Ringe, D.; Petsko, G. A. *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 389–433.
- [18] Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. *Nature* **1989**, *337*, 754–756.
- [19] Ferrand, M.; Dianoux, A. J.; Petry, W.; Zaccai, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9668–9672.
- [20] Zaccai, G. *Science* **2000**, *288*, 1604–1607.
- [21] Knapp, E. W.; Fischer, S. F.; Parak, F. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 5042–5047.
- [22] Lichtenegger, H.; Doster, W.; Kleinert, T.; Birk, A.; Sepiol, B.; Vogl, G. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 414–422.
- [23] Frauenfelder, H.; Petsko, G. A.; Tsernoglou, D. *Nature* **1979**, *280*, 558–563.
- [24] Tilton, R. F. J.; Dewan, J. C.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2469–2481.
- [25] Fitter, J. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1034–1042.
- [26] Cordone, L.; Ferrand, M.; Vitrano, E.; Zaccai, G. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1043–1047.

- [27] Tsai, A. M.; Neumann, D. A.; Bell, L. N. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2728–2732.
- [28] Réat, V.; Dunn, R.; Ferrand, M.; Finney, J. L.; Daniel, R. M.; Smith, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9961–9966.
- [29] Paciaroni, A.; Cinelli, S.; Onori, G. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1157–1164.
- [30] Roh, J. H.; Novikov, V. N.; Gregory, R. B.; Curtis, J. E.; Chowdhuri, Z.; Sokolov, A. P. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 038101–4.
- [31] Caliskan, G.; Kisliuk, A.; Sokolov, A. P. *J. Non-Cryst. Sol.* **2002**, *307-310*, 868–873.
- [32] Caliskan, G.; Mechtani, D.; Roh, J. H.; Kisliuk, A.; Sokolov, A. P.; Azzam, S.; Cicerone, M. T.; Lin-Gibson, S.; Peral, I. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 1978–1983.
- [33] Lee, A. L.; Wand, J. *Nature* **2001**, *411*, 501–504.
- [34] Wong, C. F.; Zheng, C.; McCammon, J. A. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *154*, 151–154.
- [35] Arcangeli, C.; Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *291*, 7–14.
- [36] Tarek, M.; Martyna, G. J.; Tobias, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10450–10451.
- [37] Vitkup, D.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Karplus, M. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 34–38.
- [38] Tarek, M.; Tobias, D. J. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 138101–4.
- [39] Tournier, A. L.; Xu, J.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1871–1875.
- [40] Hayward, J. A.; Finney, J. L.; Daniel, R. M.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 679–685.
- [41] Becker, T.; Hayward, J. A.; Finney, J. L.; Daniel, R. M.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1436–1444.
- [42] Curtis, J. E.; Tarek, M.; Tobias, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15928–15929.
- [43] Diehl, M.; Doster, W.; Petry, W.; Schober, H. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2726–2732.
- [44] Perez, J.; Zanotti, J.-M.; Durand, D. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 454–469.
- [45] Cottone, G.; Cordone, L.; Ciccotti, G. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 931–938.
- [46] Steinbach, P. J.; Brooks, B. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9135–9139.
- [47] Hayward, J. A.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1216–1225.
- [48] Brooks, C. L.; Onuchic, J. N.; Wales, D. J. *Science* **2001**, *293*, 612–613.
- [49] Dill, K. A.; Alonso, D. O. V.; Hutchinson, K. *Biochemistry* **1989**, *28*, 5439–5449.
- [50] Keilin, D. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **1959**, *150*, 149–191.
- [51] Tunnacliffe, A.; Lapinski, J. *Phil. Trans. : Biol. Sci.* **2003**, *358*, 1755–1771.
- [52] Clegg, J. S. *Comp. Biochem. Physiol. B* **2001**, *128*, 613–624.
- [53] Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A.; Buitink, J. *Trends Plant. Sci.* **2001**, *6*, 431–438.
- [54] Wang, W. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 1–60.
- [55] Li, S.; Schoneich, C.; Borchardt, R. T. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 491–500.
- [56] Arakawa, T.; Petrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F. *Adv. Drug Deliv.* **1993**, *10*, 1–28.
- [57] Timasheff, S. N. *Adv. Prot. Chem.* **1998**, *51*, 355–432.
- [58] Wong, D.; Parascrapuria, J. *Pharm. Technol.* **1998**, *21*, 34–50.
- [59] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H.; Arakawa, T. *Dev. Biol. Stand.* **1991**, *74*, 225–239.
- [60] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H.; Arakawa, T. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 3627–3636.
- [61] Chang, B. S.; Kendrick, B. S.; Carpenter, J. F. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1325–1330.
- [62] Nema, S.; Avis, K. E. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1992**, *47*, 76–83.

- [63] Carpenter, J. F.; Pikal, M. J.; Chang, B. S.; Randolph, T. W. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 969–975.
- [64] Paulsen, H.; Pflughaupt, K.-W. In *The Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, pages 881–921, New York, 1980. W. Pigman and D. Horton and J. D. Wander (Ed.), Academic Press.
- [65] Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Jackson, S. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *220*, 477–484.
- [66] Timasheff, S. N. In *Protein-Solvent Interactions*, pages 445–482, New York, 1994. R. B. Gregory, Marcel Dekker.
- [67] Scatchard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2315–2319.
- [68] Stockmayer, W. H. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 58–61.
- [69] Shimizu, S.; Smith, D. J. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 1148–1154.
- [70] Timasheff, S. N. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13473–13482.
- [71] Wolfe, J.; Bryant, G. *Int. J. Refrigeration* **2001**, *24*, 438–450.
- [72] Acker, J. A.; McGann, L. E. *Cryobiology* **2003**, *46*, 197–202.
- [73] Wolfe, J.; Bryant, G. *Cryobiology* **1999**, *39*, 103–129.
- [74] Chitra, R.; Smith, P. E. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1491–1500.
- [75] Batchelor, J. D.; Olteanu, A.; Tripathy, A.; Pielak, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1958–1961.
- [76] Patist, A.; Zoerb, H. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2005**, *40*, 107–113.
- [77] Galema, S. A.; Hoiland, H. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5321–5326.
- [78] Roberts, C. J.; Debenedetti, P. G. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 7308–7318.
- [79] Furuki, T. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 441–450.
- [80] Miller, D. P.; de Pablo, J. J.; Corti, H. *Pharmaceutical Res.* **1997**, *14*, 578–590.
- [81] Miller, D. P.; de Pablo, J. J. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8876–8883.
- [82] Taga, T.; Senma, M.; Osaki, K. *Acta Cryst.* **1972**, *B28*, 3258–3263.
- [83] Gress, M. E.; Jeffrey, G. A. *Acta Cryst.* **1977**, *B33*, 2490–2495.
- [84] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Romeo, G. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10140–10145.
- [85] Conrad, P. B.; de Pablo, J. J. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 4049–4055.
- [86] Ekdawi-Sever, N.; Conrad, P. B.; de Pablo, J. J. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 734–742.
- [87] Ekdawi-Sever, N.; de Pablo, J. J.; Feick, E.; von Meerwall, E. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 936–943.
- [88] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, P. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 281–287.
- [89] Branca, C.; Maccarrone, S.; Magazù, S.; Maisano, G.; Bennington, S. M.; Taylor, J. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 174513.
- [90] Slade, L.; Levine, H. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **1991**, *30*, 115–360.
- [91] Petrelski, S. J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpenter, J. F. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 661–671.
- [92] Green, J. L.; Angell, C. A. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2880–2882.
- [93] De Gusseme, A.; Carpentier, L.; Willart, J. F.; Descamps, M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10879–10886.

- [94] Roos, Y. *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 39–48.
- [95] Taylor, L. S.; Zografi, G. D. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1615–1621.
- [96] Imamura, K.; Suzuki, T.; Tatsumichi, T.; Kirii, S.; Okazaki, M. *J. Chem. Eng. Japan* **2002**, *33*, 657–660.
- [97] Kawai, K.; Suzuki, T. S.; Takai, R. *Cryo-Lett.* **2002**, *23*, 79–88.
- [98] Orford, P. D.; Parker, R.; Ring, S. G. *Carbohydr. Res.* **1990**, *196*, 11–18.
- [99] Imamura, K.; Ogawa, T.; Sakiyama, T.; Nakanishi, K. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *92*, 266–274.
- [100] Roos, Y.; Karel, M. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 38–43.
- [101] Imamura, K.; Fukushima, A.; Sakaura, K.; Sugita, T.; Sakiyama, T.; Nakanishi, K. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 2175–2181.
- [102] Franks, F. *Cryo-Lett.* **1990**, *11*, 93–110.
- [103] Sola-Penna, M.; Meyer-Fernandes, J. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *380*, 10–14.
- [104] Crowe, J. H.; Carpenter, J. F.; Crowe, L. M. *Ann. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 73–103.
- [105] Sun, W. Q.; Davidson, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1425*, 235–244.
- [106] Cicerone, M. T.; Soles, C. L. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3836–3845.
- [107] Wang, W. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129–188.
- [108] Allison, S. D.; Chang, B.; Randolph, T. W.; Carpenter, J. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 289–298.
- [109] Caliskan, G.; Kisliuk, A.; Tsai, A. M.; Soles, C. L.; Sokolov, A. P. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 4230–4236.
- [110] Davidson, P.; Sun, W. Q. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 474–479.
- [111] Saleki-Gerhardt, A.; Stowell, J. G.; Byrn, S. R.; Zografi, G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 318–323.
- [112] Wolkers, W. F.; Oldenhof, H.; Alberda, M.; Hoekstra, F. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 83–96.
- [113] Gaffney, S. H.; Haslam, E.; Lilley, T. H.; Ward, T. R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1988**, *84*, 2545–2552.
- [114] Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Mondelli, C. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3241–3249.
- [115] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Telling, M. T. F. *J. Mol. Struct.* **2005**, *748*, 5–8.
- [116] Götze, W.; Sjögren, L. *Rep. Prog. Phys.* **1992**, *55*, 241–376.
- [117] Kob, W. In *Supercooled liquids, the glass transition, and computer simulations.*, page 201. J.-L. Barrat and M. Feigelman and J. Kurchan (Ed.), Springer-EDP Sciences, 2003.
- [118] Buitink, J.; van den Dries, I. J.; Hoekstra, F. A.; Alberda, M.; Hemminga, M. A. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1119–1128.
- [119] Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Crowe, L. M. *Ann. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 579–599.
- [120] Ricker, J. V.; Tsvetkova, N. M.; Wolkers, W. F.; Leidy, C.; Tablin, F.; Longo, M.; Crowe, J. H. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3045–3051.
- [121] Leslie, S. B.; Teter, S. B.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1192*, 7–13.

- [122] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3916–3922.
- [123] Lòpez-Díez, E. C.; Bone, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 139–148.
- [124] Belton, P. S.; Gil, A. M. *Biopolymers* **1994**, *34*, 957–961.
- [125] Lins, R. D.; Pereira, C. S.; Hünenberger, P. H. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004**, *55*, 177–186.
- [126] Lamosa, P.; Brennan, L.; Vis, H.; Turner, D. L.; Santos, H. *Extremophiles* **2001**, *5*, 303–311.
- [127] Cottone, G.; Ciccotti, G.; Cordone, L. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 9862–9866.
- [128] Cottone, G.; Giuffrida, S.; Ciccotti, G.; Cordone, L. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2005**, *59*, 291–302.
- [129] Aldous, B. J.; Auffret, A. D.; Franks, F. *Cryo-Lett.* **1995**, *16*, 181–186.
- [130] Sussich, F.; Skopec, C.; Brady, J.; Cesàro, A. *Carbohydr. Res.* **2001**, *334*, 165–176.
- [131] Willart, J. F.; Danede, F.; De Gussemme, A.; Descamps, M.; Neves, C. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11158–11162.
- [132] Dzyabchenko, A.; Affouard, F.; Lefort, R.; Descamps, M. *Acta Cryst. B* **2005**, *soumis*.
- [133] Brown, G. M.; Rohrer, D. C.; Berking, B.; Beevers, C. A.; Gould, R. O.; Simpson, R. *Acta Cryst.* **1972**, *B28*, 3145–3158.
- [134] Lee, C.-K.; Koh, L. L. *Acta Cryst.* **1993**, *C49*, 621–624.
- [135] Ahlqvist, M. U. A.; Taylor, L. S. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 690–698.
- [136] Miller, D. P.; de Pablo, J. J.; Corti, H. R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10243–10249.
- [137] Debenedetti, P. G., Ed. *Metastable Liquids: Concepts and Principles*; Princeton University Press: Princeton, New Jersey, 1996.
- [138] Ediger, M. D.; Angell, C. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13200–13212.
- [139] Debenedetti, P. G.; Stillinger, F. H. *Nature* **2001**, *410*, 259–267.
- [140] Cohen, M. H.; Turnbull, D. T. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1164–1169.
- [141] Adam, G.; Gibbs, J. H. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, 139–146.
- [142] Koper, I.; Bellissent-Funel, M.-C.; Petry, W. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 014514.
- [143] Allen, M. P.; Tildesley, D. J., Eds. *Computer Simulation of Liquids*; Oxford Clarendon Press: Oxford, 1989.
- [144] Leach, A. R., Ed. *Molecular Modelling: Principles and Applications, second edition*; Prentice Hall, 2001.
- [145] Rapaport, D. C., Ed. *The Art of Molecular Dynamics Simulations*; Cambridge University Press, 2004.
- [146] Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olason, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [147] Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham, T. E.; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. A. *Comp. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1–41.
- [148] Biomolecular simulation: The gromos96 manual and user guide. van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.; BIOMOS, Zurich, **1996**.
- [149] Lennard-Jones, J. E. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1924**, *106*, 463–477.

- [150] Perera, L.; Essmann, U.; Berkowitz, M. L. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 450–456.
- [151] Zuegg, J.; Gready, J. E. *Biochemistry* **1999**, *38*, 13862–13876.
- [152] Norberg, J.; Nilsson, L. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1537–1553.
- [153] Hünenberger, P. H.; Börjesson, U.; Lins, R. D. *Chimia* **2001**, *55*, 861–866.
- [154] Walser, R.; Hünenberger, P. H.; van Gunsteren, W. F. *Proteins: Struct., Func., and Gen.* **2001**, *55*, 861–866.
- [155] Gargallo, R.; Hünenberger, P. H.; Aviles, F. X.; Oliva, B. *Protein Science* **2003**, *12*, 2161–2172.
- [156] Patra, M.; Karttunen, M.; Hyvönen, M. T.; Falck, E.; Lindqvist, P.; Vattulainen, I. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3636–3645.
- [157] Ewald, P. *Ann. Phys.* **1921**, *64*, 253–287.
- [158] Neumann, M. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 5663–5672.
- [159] Darden, T. A.; York, D. M.; and, L. G. P. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- [160] Hockney, R. W., Eastwood, J. W., Eds. *Computer Simulation using Particles*, 2nd ed.; Institute of Physics: Bristol, 1988.
- [161] Chipot, C., Ed. *Les méthodes numériques de la dynamique moléculaire*; www.edam.uhp-nancy.fr/Permanents/ChrisChipot/ecole.pdf, 2003.
- [162] The dlpoly user manual. Smith, W.; Forester, T. R.; CCLRC, Daresbury Laboratory, Warrington WA4 4AD, England, **2001**.
- [163] Verlet, L. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98–103.
- [164] Hockney, R. W. *Meth. Comp. Phys.* **1970**, *9*, 136–211.
- [165] Swope, W. C.; Anderson, H. C.; Berens, P. H.; Wilson, K. R. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 637–649.
- [166] Nosé, S. *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255–268.
- [167] Hoover, W. G. *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 1695–1697.
- [168] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- [169] Idrissi, A. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectr.* **2004**, *61*, 1–17.
- [170] Roney, A. B.; Space, B.; Castner, E. W.; Napoleon, R. L.; Moore, P. B. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7389–7401.
- [171] Errington, J. R.; Debenedetti, P. G.; Torquato, S. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 215503.
- [172] Giovambattista, N.; Buldyrev, S. V.; Starr, F. W.; Stanley, H. E. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 085506.
- [173] Belch, A. C.; Rice, S. A. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 5676–5682.
- [174] Rahman, A.; Stillinger, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7943–7948.
- [175] Speedy, R. J.; Madura, J. D.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 909–913.
- [176] Andersson, C. A.; Engelsens, S. B. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 101–105.
- [177] Engelsens, S. B.; Perez, S. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9301–9311.
- [178] Liu, Q.; Schmidt, R. K.; Teo, B.; Karplus, P. A.; Brady, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7851–7862.
- [179] Ha, S. N.; Giammona, A.; Field, M.; Brady, J. W. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 207–221.
- [180] Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.

- [181] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [182] Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- [183] Teleman, O.; Jonsson, B.; Engstrom, S. *Mol. Phys.* **1987**, *60*, 193–203.
- [184] Brown, G. M.; Levy, H. A. *Acta Cryst.* **1973**, *B29*, 790–797.
- [185] Vaney, M. C.; Maignan, S.; Riès-Kautt, M.; Ducruix, A. *Acta Cryst. D* **1996**, *52*, 505–517.
- [186] Mackerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, R. L.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586–3616.
- [187] Sterpone, F.; Ceccarelli, M.; Marchi, M. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 409–419.
- [188] Barbillat, J.; Bougeard, D.; Buntinx, G.; Delhaye, M.; Dhamelin-court, P.; Fillaux, F. *Techniques de l'Ingénieur* **1999**, *p2 865*, 1–31.
- [189] Denicourt, T. *Etudes spectroscopiques de systèmes désordonnés profondément sous-refroidis*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, **2002**.
- [190] Paccou, L. *Développement d'environnements automatisés pour des applications dans le domaine de l'optique*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, **2005**.
- [191] Surovtsev, N. V.; Sokolov, A. P. *Phys. Rev. B* **2002**, *66*, 054205.
- [192] Alba-Simionesco, C.; Krakoviack, V.; Krauzman, M.; Migliardo, P.; Romain, F. *J. Raman Spectr.* **1996**, *27*, 715–721.
- [193] Colaianni, S. E. M.; Nielsen, O. F. *J. Mol. Struct.* **1995**, *347*, 267–284.
- [194] Batta, G.; Kover, K. E.; Gervay, J.; Hornyak, M.; Roberts, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1336–1345.
- [195] Elias, M. E.; Elias, A. M. *J. Mol. Liq.* **1999**, *83*, 303–310.
- [196] Rampp, M.; Buttersack, C.; Ludemann, H. D. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 561–572.
- [197] Engelsens, S. B.; Monteiro, C.; Hervé du Penhoat, C.; Perez, S. *Biophys. Chem.* **2001**, *93*, 103–127.
- [198] Matsuoka, T.; Okada, T.; Murai, K.; Koda, S.; Nomura, H. *J. Mol. Liq.* **2002**, *98-99*, 317–327.
- [199] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Telling, M. T. F. *J. Phys. Chem.* **2004**, *108*, 17069–17075.
- [200] Brady, J. W.; Schmidt, R. K. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 958–966.
- [201] Sakurai, M.; Murata, M.; Inoue, Y.; Hino, A.; Kobayashi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 847–858.
- [202] Bonanno, G.; Noto, R.; Fornili, S. L. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2755–2762.
- [203] Naidoo, K. J.; Kuttel, M. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 445–456.
- [204] Molinero, V.; Çağın, T.; Goddard III, W. A. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *168*, 3699–3712.

- [205] Lee, S. L.; Debenedetti, P. G.; Errington, J. R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 204511.
- [206] Chen, T.; Fowler, A.; Toner, M. *Cryobiology* **2000**, *40*, 277–282.
- [207] Angell, C. A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2627–2650.
- [208] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Soper, A. K. *Appl. Phys. A* **2002**, *74* [Suppl.], S450.
- [209] Cesàro, A.; Magazù, V.; Migliardo, F.; Sussich, F.; Vadalà, M. *Physica B* **2004**, *350*, E367–E370.
- [210] Soper, A. K.; Phillips, M. G. *Chem. Phys.* **1986**, *107*, 47–60.
- [211] Kawai, H.; Sakurai, M.; Inoue, Y.; Chûjô, R.; Kobayashi, S. *Cryobiology* **1992**, *29*, 599–606.
- [212] Fringant, C.; Tvaroska, I.; Mazeau, K.; Rinaudo, M.; Desbrieres, J. *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 27–41.
- [213] Engelsen, S. B.; Perez, S. *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 21–38.
- [214] Starr, F. W.; Sastry, S.; Douglas, J. F.; Glotzer, S. C. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 125501–4.
- [215] Miller, D. P.; de Pablo, J. J.; Corti, H. *Pharmaceutical Res.* **1997**, *14*, 578–590.
- [216] Sussich, F.; Princivalle, F.; Cesàro, A. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322*, 113–119.
- [217] Errington, J. R.; Debenedetti, P. G. *Nature* **2001**, *409*, 318–321.
- [218] Luzar, A.; Chandler, D. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 928–931.
- [219] Geiger, A.; Stillinger, F. H.; Rahman, A. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 4185–4193.
- [220] Engelsen, S. B.; Hervé du Penhoat, C.; Perez, S. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13334–13351.
- [221] Duda, C. A.; Stevens, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7406–7407.
- [222] Dowd, M. K.; Reilly, P. J.; French, A. D. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 102–114.
- [223] Lipkind, G. M.; Verovsky, V. E.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1984**, *133*, 1–13.
- [224] Stevens, E. S.; Sathyanarayana, B. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4149–4154.
- [225] Tran, V. H.; Brady, J. W. *Biopolymers* **1990**, *29*, 961–976.
- [226] Oku, K.; Watanabe, H.; Kubota, M.; Fukada, S.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y.; Komori, M.; Inoue, Y.; Sakurai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12739–12748.
- [227] Crowe, L. M.; Mouradian, R.; Crowe, J. H.; Jackson, S. A.; Womersley, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *769*, 141–150.
- [228] Molinero, V.; Çağın, T.; Goddard III, W. A. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 469–474.
- [229] Lerbret, A.; Bordat, P.; Affouard, F.; Descamps, M.; Migliardo, F. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 11046–11057.
- [230] Lerbret, A.; Bordat, P.; Affouard, F.; Guinet, Y.; Hédoux, A.; Paccou, L.; Prévost, D.; Descamps, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 881–887.
- [231] Padro, J. A.; Marti, J. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 452–453.
- [232] Marti, J.; Padro, J. A.; Guardia, E. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 639–649.
- [233] Sutmann, G.; Vallauri, R. *J. Phys. : Condens. Matter* **1998**, *100*, 9231–9240.
- [234] Verdaguer, A.; Padro, J. A. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 3401–3408.
- [235] Maréchal, Y. *J. Mol. Struct.* **1994**, *322*, 105.
- [236] Branca, C.; Faraone, A.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Villari, V. *Recent Res. Devel. Physical Chem.* **1999**, *3*, 361–403.

- [237] Koper, I. *Influence du tréhalose sur la dynamique de la C-phycoyanine : une étude par diffusion quasiélastique de neutrons* Thèse de Doctorat, Université Paris 6, **2002**.
- [238] Affouard, F.; Bordat, P.; Descamps, M.; Lerbret, A.; Magazù, S.; Migliardo, F.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Telling, M. F. T. *Chem. Phys.* **2005**, *317*, 258–266.
- [239] Bordat, P.; Lerbret, A.; Demaret, J.-P.; Affouard, F.; Descamps, M. *Europhys. Lett.* **2004**, *65*, 41.
- [240] Kob, W.; Andersen, H. C. *Phys. Rev. E.* **1995**, *51*, 4626–4641.
- [241] Sastry, S.; Debenedetti, P. G.; Stillinger, F. H. *Nature* **1998**, *393*, 554–557.
- [242] Maragliano, L.; Cottone, G.; Cordone, L.; Ciccotti, G. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2765–2772.
- [243] Krishnamurthy, S.; Bansil, R.; Wiafe-Akenten, J. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 5863–5870.
- [244] Colaianni, S. E. M.; Nielsen, O. F. *J. Mol. Struct.* **1995**, *347*, 267–284.
- [245] Kaushik, J.; Bhat, R. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 7058–7066.
- [246] Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Oliver, A. E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. *Cryobiology* **2001**, *43*, 89–105.
- [247] Kaushik, J.; Bhat, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26458–26465.
- [248] Pelton, J.; McLean, L. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167–176.

RÉSUMÉ en français :

La compréhension de la plus grande stabilisation des molécules biologiques par un disaccharide tel que le tréhalose par rapport à d'autres excipients fait l'objet de recherches accrues. Nous avons étudié l'influence du tréhalose et de deux autres stéréoisomères, le maltose et le sucrose, sur la structure et sur la dynamique de l'eau et d'une protéine globulaire modèle, le lysozyme. Nous avons montré que le tréhalose induit une plus grande déstructuration du réseau de liaisons hydrogène (LHs) de l'eau que le maltose et le sucrose, au-delà d'une concentration de 40-50 %, à laquelle le réseau de LHs des sucres percole. En outre, le nombre d'hydratation des sucres et le nombre de LHs sucre-sucre suggèrent que les solutions aqueuses de tréhalose sont plus « homogènes », pour des concentrations entre 33 et 66 % pds. Nous avons également localisé les zones d'interaction des sucres avec le lysozyme et montré par spectroscopie Raman que le tréhalose le stabilise davantage.

TITRE en anglais :

Study of the bioprotective action of sugars : an investigation by molecular dynamics and Raman spectroscopy

RÉSUMÉ en anglais :

Understanding the enhanced efficiency of trehalose to stabilise biological molecules compared to other excipients is a matter of intense research. We have studied the influence of trehalose and two other stereoisomers, maltose and sucrose, on the structure and on the dynamics of water and of a model globular protein, lysozyme. We have shown that trehalose induces a greater destructureation of the water hydrogen bond (HB) network than maltose and sucrose, beyond a concentration of 40-50 wt %, at which the HB network of sugars percolates. Moreover, the hydration number of sugars and the number of sugar-sugar HBs suggest that trehalose aqueous solutions are more « homogeneous », for concentrations between 33 and 66 wt %. We have also localised interaction zones between sugars and lysozyme and shown with Raman spectroscopy that trehalose stabilises it more.

DISCIPLINE : Sciences des Matériaux

MOTS-CLÉS :

Simulations de dynamique moléculaire, spectroscopie Raman, tréhalose, maltose, sucrose, lysozyme, bioprotection, dénaturation des protéines, liaisons hydrogène, hydratation, verres

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Dynamique et Structure des Matériaux Moléculaires
UMR 8024 CNRS-Université LILLE 1
Cité Scientifique, Bâtiment P5
59655 Villeneuve d'Ascq cedex