Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique

Béatrice Sjöberg

▶ **To cite this version:**

Béatrice Sjöberg. Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique. Chimie organique. Université de Franche-Comté, 2013. Français. NNT : 2013BESA2020 . tel-01024104

HAL Id: tel-01024104
https://theses.hal.science/tel-01024104

Submitted on 15 Jul 2014

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.

Université de Franche-Comté

École Doctorale Carnot-Pasteur

Thèse de Doctorat

Spécialité Chimie

présentée par

Béatrice Sjöberg

Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique

Laboratoire Chono-Environnement - UMR CNRS 6249

Soutenue le 20 décembre 2013 devant la Commission d'Examen

Rapporteurs :	**C. Sicard-Roselli**	Maître de Conférence, HDR, Université de Paris Sud (Orsay)
	A. Hédoux	Professeur, Université Lille 1 (Villeneuve d'Ascq)
Directeur de thèse :	**M. Fromm**	Professeur, Université de Franche-Comté (Besançon)
Encadrante :	**S. Foley**	Maître de Conférence, Université de Franche-Comté (Besançon)
Examinateurs :	**J.-M. Janot**	Chargé de Recherche CNRS, Université Montpellier 2 (Montpellier)
	C. Ramseyer	Professeur, Université de Franche-Comté (Besançon)

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Pr. Michel Fromm pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, anciennement "LCPR-AC", pour ses conseils et son optimisme constant. J'adresse toute ma reconnaissance à Dr. Sarah Foley, co-encadrante de ma thèse pour m'avoir transmis son savoir faire expérimental, ainsi que pour son soutien et sa bonne humeur communicative durant toutes ces années.

Je veux exprimer toute ma gratitude à Pr. Mironel Enescu qui a énormément contribué aux travaux présentés ici. J'ai eu la chance de pouvoir bénéficier au cours de ma thèse de sa capacité à dépasser les situations d'échecs, de son expérience en spectroscopie Raman ainsi que de son travail rigoureux de correction de ce mémoire. Cette thèse resterait incomplète sans l'aide de Dr. Bruno Cardey que je remercie beaucoup pour les calculs quantiques qu'il a réalisé ainsi que toutes les explications qu'il a toujours eu la patience de me donner.

Je remercie Dr. Angela Staicu, Dr. Alexandru Pascu ainsi que Pr. Mihail Pascu pour m'avoir accueilli au National Institute for Lasers, Plasma and Radiation Physics à Bucarest et travaillé à mes côtés sur la spectroscopie de phosphorescence résolue en temps.

Je voudrais remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse ainsi que d'avoir pris le temps de lire attentivement ce manuscrit.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire, anciennement "LCPR-AC" : Franck Berger, Manuel Grivet, Christophe Mavon, Jean-Baptiste Sanchez, Sylvie Petot-Visini, Marc Bieber et tout particulièrement Jean-Emmanuel Groetz pour son aide et ses conseils à la prise en main de Linux, LaTeXet Beamer.

Mes remerciements vont aussi à tous les doctorants et stagiaires que j'ai pu connaître au cours de mes années de thèse pour leur amitié ainsi que pour la bonne humeur qui a toujours régné au sein du laboratoire. Je pense plus particulièrement à Catalina, Houda,

Laetitia, Omar, Yehyah, Abdel-Hadi, Boutheina, Rima, Nabil, Julien, Guillaume, Sophie et Déborah.

Je n'aurai pu terminer ce travail de longue haleine sans le soutien inconditionnel de mes parents, mon frère et mes amis. Mes derniers remerciements vont à mon époux pour tous ses encouragements.

Résumé

Les espèces réactives de l'oxygène sont générées dans l'environnement biologique dans le cadre du métabolisme, mais elles peuvent aussi être produites en excès dans le cas de stress oxydatif provoqué par exemple par une exposition aux rayons UV. Dans le travail présenté ici, nous nous sommes intéressés à l'oxydation des protéines par deux de ces espèces réactives de l'oxygène : le peroxyde d'hydrogène, oxydant plutôt faible avec un temps de vie long, et l'oxygène singulet, oxydant fort avec un temps de vie court. L'action de ce dernier sur les protéines est étudiée en utilisant la spectroscopie de phosphorescence résolue en temps et l'oxydation des protéines par le peroxyde d'hydrogène est suivie par spectroscopie Raman. Dans ce cas, une étude préliminaire a été nécessaire afin d'attribuer de manière précise les bandes Raman des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. Pour les deux types d'oxydation, le but du travail consiste à déterminer les constantes de vitesse des réactions pour les tripeptides et les protéines. La stratégie employée est d'utiliser de petits fragments de protéines tels que des acides aminés libres et des tripeptides pour comprendre ce qui se passe à l'échelle de la protéine soulignant ainsi l'importance de l'environnement protéique.

Abstract

Reactive species of oxygen are generated in biological environment as part of metabolism but they can also be produced in excess in case of oxidative stress provoked by UV exposure for example. In the present work we are interested in the oxidation of proteins by two of those reactive species of oxygen : hydrogen peroxide, a rather weak oxidant with a long life time, and singlet oxygen, a strong oxidant with a short life time. The action of the latter one on proteins is studied by using time-resolved phosphorescence spectroscopy and the oxidation of the proteins by hydrogen peroxide is monitored by using Raman spectroscopy. In this case a preliminary study was necessary to attribute accurately the Raman bands of amino-acid residues side chains. For both oxidations, the aim of the work is to determine the reaction rate constants for the tripeptides and the proteins. The strategy chosen is to use small fragments of proteins such as free amino-acids and tripeptides to understand what is happening at the protein scale which underlines the importance of the proteic environment.

Table des matières

Remerciements **i**

Résumé **iv**

Abstract **vii**

Table des matières **ix**

Liste des figures **xi**

Liste des tableaux **xvii**

Introduction **1**

1 Méthodes expérimentales **15**

1.1 Spectroscopie Raman 16

1.2 Spectroscopie de phosphorescence résolue dans le temps 25

2 Attribution des bandes Raman des résidus d'acides aminés dans les protéines **37**

2.1 Introduction 39

2.2 Attribution des bandes Raman des tripeptides 40

2.3 Attribution des bandes Raman des protéines 67

2.4 Conclusions 75

3 Interaction des peptides et des protéines avec le peroxyde d'hydrogène **81**

3.1 Introduction 82

3.2 Oxydation des tripeptides 84

3.3 Oxydation du tripeptide GlyMetGly 88

3.4 Oxydation du résidu méthionine en environnement protéique : les cas de la β-lactoglobuline et du lysozyme 97
3.5 Conclusions 104

4 Interaction des peptides et des protéines avec l'oxygène singulet 109
4.1 Introduction 110
4.2 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de tripeptides . . 112
4.3 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de protéines . . . 117
4.4 Conclusions 129

Conclusions 133

Annexe 135

Liste des figures

1.1 Schéma du spectromètre Raman. 24
1.2 Diagramme orbitalaire de la molécule d'oxygène singulet, $^1\Delta_g$. 26
1.3 Production de l'oxygène singulet par photosensibilisation, avec S_0, S_1 et T_1 les états singulets et triplet du photosensibilisateur, CIS la conversion intersystème et CI la conversion interne. 27
1.4 Structure du bleu de méthylène. 29
1.5 Dispositif expérimental pour mesurer la phosphorescence de l'oxygène singulet en temps résolu. 30
1.6 Spectres représentant la caractéristique de décroissance de phosphorescence de l'oxygène singulet en présence de β-lactoglobuline à concentration croissante et une concentration de bleu de méthylène constante à 50 μM pour toutes les solutions mesurées. Représentée par la courbe noire, la solution ne contient pas de protéine, la courbe rouge est réalisée avec 20 μM de protéine, la courbe verte avec 40 μM, la courbe bleue avec 60 μM, la courbe rose avec 80 μM et la courbe grise est réalisée avec 100 μM de protéine. . . 31

2.1 Structures de l'acide aminé glycine à pH 7, a), du dipeptide GlyGly à pH 7, b) et du tripeptide GlyGlyGly à pH 7, c). 41
2.2 Spectres Raman expérimentaux de la glycine à une concentration de 120 mM a), du dipeptide GlyGly à une concentration de 60 mM b) et du tripeptide GlyGlyGly c) à une concentration de 40 mM dans des solutions aqueuses à pH 7. 42
2.3 Spectres Raman calculés de la glycine a), du dipeptide GlyGly b) et du tripeptide GlyGlyGly c). Le niveau de théorie utilisé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 43
2.4 Structures des tripeptides GlyPheGly à pH 7 a), GlyTyrGly à pH 7 b) et GlyTrpGly à pH 11 c). 48

2.5 Spectres Raman du tripeptide GlyPheGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM dans une solution aqueuse à un pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 49
2.6 Spectres Raman du tripeptide GlyTyrGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 20 mM dans une solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 52
2.7 Spectres Raman du tripeptide GlyTrpGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 20 mM dans une solution aqueuse à pH 11. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 54
2.8 Structure du tripeptide GlyLeuGly à pH 7. 57
2.9 Spectres Raman du tripeptide GlyLeuGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 58
2.10 Structure du tripeptide GlyMetGly à pH 7. 60
2.11 Spectres Raman du tripeptide GlyMetGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 60
2.12 Structures des tripeptides GlyHisGly à pH 11 en a) et GlyLysGly à pH 7 en b). 62
2.13 Spectres Raman du tripeptide GlyHisGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 11. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 63
2.14 Spectres Raman du tripeptide GlyLysGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd). 65
2.15 Spectre Raman de la BSA avec une concentration de 1 mM dans une solution aqueuse à pH 7. 67
2.16 Spectre Raman de la β-lactoglobuline avec une concentration de 2 mM dans une solution aqueuse à pH 7. 68
2.17 Spectre Raman du lysozyme avec une concentration de 2 mM dans une solution aqueuse à pH 7. 69

3.1 Oxydation du résidu méthionine. 83
3.2 Spectres Raman de GlyPheGly à 20 mM avec un pH égal à 7. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 60 mM de peroxyde d'hydrogène. 85
3.3 Spectres Raman de GlyTrpGly à 40 mM avec un pH égal à 11. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 120 mM de peroxyde d'hydrogène. 85
3.4 Spectres Raman de GlyTyrGly à 28 mM avec un pH égal à 7. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 120 mM de peroxyde d'hydrogène. 86
3.5 Spectres Raman de GlyHisGly à 20 mM avec un pH égal à 10. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 60 mM de peroxyde d'hydrogène. 87
3.6 Spectre Raman de GlyMetGly à 40 mM, à pH 7, en rouge et spectre Raman de GlyMetGly 40 mM avec le peroxyde d'hydrogène 120 mM, à pH 7, en noir. 87
3.7 Réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène 88
3.8 Spectres Raman centrés sur les bandes C-S de GlyMetGly natif à 40 mM, pH 7, en rouge, et d'un mélange équimolaire de GlyMetGly et de peroxyde d'hydrogène après 1h10 et 3h50 de réaction en noir et en vert, respectivement. 89
3.9 Spectres Raman théoriques de GlyMetGly natif, A., et oxydé,B., dans les deux conformations *gauche*, en bleu, *trans* en rouge et en noir la somme pondérée des deux spectres *trans* et *gauche*. 90
3.10 Spectres Raman représentant l'évolution de la bande Raman caractéristique du peroxyde d'hydrogène pour le GlyMetGly natif à 40 mM, à pH 7, en rouge et du mélange équimolaire de GlyMetGly à 40 mM avec le peroxyde d'hydrogène, à pH 7 après 1h35 et 4h10 de réaction en noir et en vert, respectivement. 93
3.11 Mesure de la différence d'amplitude de la bande à 705 cm^{-1} en fonction du temps (points noirs). La ligne rouge correspond à la fonction de modélisation de ces points. Ces résultats sont obtenus pour 40 mM de GlyMetGly dissout dans une solution de 40 mM de peroxyde d'hydrogène. 94
3.12 Représentation schématique des coordonnées de la réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène avec RL les réactifs libres, RC les réactifs complexés, ET l'état de transition et PC les produits complexés. . 96

3.13 Spectres Raman de la β-lactoglobuline en solution à 2 mM avec et sans peroxyde d'hydrogène à 150 mM, à pH 7, en noir et en rouge, respectivement. 98

3.14 Représentation de l'amplitude de la bande à 703 cm^{-1} en fonction du temps (points noirs) et de la fonction de modélisation de ces points (ligne rouge) pour 8 mM de β-lactoglobuline dissoute dans une solution de 300 mM de peroxyde d'hydrogène. 100

3.15 Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb), avec à gauche une représentation des résidus méthionine par des sphères rouges et à droite une représentation des atomes de la protéine par des sphères de Van der Waals et en jaune les atomes de soufre des résidus méthionine exposés au solvant. 101

3.16 Spectre Raman du lysozyme en solution à 4 mM, en rouge, et dissout dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 300 mM après plus de 3h de réaction, en noir. 103

3.17 Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec à gauche une représentation des résidus méthionine par des sphères rouges et à droite une représentation des atomes de la protéine par des sphères de Van der Waals avec en jaune les atomes de soufre des résidus méthionine. 103

4.1 Produits obtenus par réaction du résidu tryptophane avec l'oxygène singulet. 110

4.2 Produits obtenus par réaction de le résidu tyrosine avec l'oxygène singulet. 111

4.3 Produits obtenus par réaction du résidu histidine avec l'oxygène singulet. . 111

4.4 Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyTyrGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.1 et la droite de modélisation. 114

4.5 Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyHisGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.2 et la droite de modélisation. 115

4.6 Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyTrpGly à pD 7,4, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.3 et la droite de modélisation. 116

4.7 Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyMetGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.4 et la droite de modélisation. 117

4.8 Représentation de l'inverse du temps de vie, de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations de la β-lactoglobuline avec les points expérimentaux issus de le tableau correspondant et la droite de modélisation. 118
4.9 Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 119
4.10 Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 120
4.11 Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 121
4.12 Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus méthionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 122
4.13 Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 123
4.14 Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 124
4.15 Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 125
4.16 Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus méthionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine. 126
4.17 Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 127
4.18 Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 128
4.19 Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 128

4.20 Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus methionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine. 129

Liste des tableaux

2.1 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle de l'acide aminé glycine libre. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement. 44

2.2 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du dipeptide GlyGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du dipeptide, ν pour une élongation, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, σ pour un cisaillement et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement. 45

2.3 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyGlyGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ζ pour un balancement dans le plan, τ pour une torsion, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, δ pour une déformation, ν pour une élongation, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement, β pour une déformation de pliage et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement. 46

2.4 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyPheGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration relative au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ν pour l'élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, ζ pour un balancement dans le plan, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan et σ pour un cisaillement, respectivement. 50

2.5 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyTyrGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, et σ pour un cisaillement, respectivement. . . . 52

2.6 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle de GlyTrpGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement et l'indice a et pour un mouvement antisymétrique, respectivement. 55

2.7 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyLeuGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, ν pour une élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, ζ pour un balancement dans le plan, γ pour un balancement hors du plan et σ pour un cisaillement, respectivement. 59

2.8 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyMetGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ν pour une élongation, l'indice s pour un mouvement symétrique, δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, γ pour le déplacement hors du plan, β pour une déformation de pliage et σ pour un cisaillement, respectivement. . 61

2.9 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyHisGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, ν pour une élongation, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, l'indice a pour un mouvement antisymétrique et σ pour un cisaillement, respectivement. . . . 64

2.10 Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyLysGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, δ pour une déformation, l'indice s pour un mouvement symétrique, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, β pour une déformation de pliage, σ pour un cisaillement, respectivement. 66

2.11 Intensités attendues en unités arbitraires des bandes Raman spécifiques de chaque acide aminé basé sur les intensités de leur chaînes latérales, sur la composition en acide aminé de chaque protéine, et sur les concentrations des échantillons mesurés. ^{a} : le nombre entre parenthèses correspond au nombre de résidu étudié dans chacune des protéines. 70

2.12 Fréquences des bandes Raman des chaînes latérales des résidus d'acides aminés des tripeptides en cm^{-1} et leur fréquences correspondantes dans les spectres expérimentaux des trois protéines étudiées. 72

3.1 Attribution des fréquences Raman théoriques obtenues pour le tripeptide natif avec les deux conformations du résidu méthionine et leur correspondances avec les fréquences expérimentales où δ est une déformation, ρ est un basculement, ν est une élongation, s est un mouvement symétrique, a est un mouvement asymétrique des liaisons définies, *squel.* est relatif au squelette du tripeptide (les deux résidus glycines et leurs deux liaisons peptidiques liées au résidu méthionine) et *pept.* est relatif à la liaison peptidique. 91

3.2 Attribution des fréquences Raman théoriques obtenues pour le tripeptide oxydé avec les deux conformations du résidu méthionine et leur correspondances avec les fréquences expérimentales où δ est une déformation, ρ est un basculement, ν est une élongation, s est un mouvement symétrique, a est un mouvement asymétrique des liaisons définies, *squel.* est relatif au squelette du tripeptide (les deux résidus glycines et leurs deux liaisons peptidiques liées au résidu méthionine) et *pept.* est relatif à la liaison peptidique. 92

4.1 Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyTyrGly utilisées, à pD 7,4 113

4.2 Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyHisGly utilisées, à pD 7,4. 114

4.3 Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyTrpGly utilisées, à pD 7,4. 114

4.4 Valeurs des temps de vie, τ, de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyMetGly utilisées, à pD 7,4. 116

4.5 Valeurs des temps de vie, τ, de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de β-lactoglobuline utilisées. 118

4.6 Surfaces des atomes des chaînes latérales des résidus tyrosine accessibles au solvant, en $Å^2$, dans un monomère de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu tyrosine correspondant dans la séquence primaire de la protéine. 120

4.7 Surfaces des atomes de soufre accessibles au solvant, en $Å^2$, des résidus méthionine présents dans un monomère de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu méthionine dans la séquence primaire de la protéine. 121

4.8 Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en Å^2, des résidus tyrosine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu tyrosine (Y) dans la séquence primaire de la protéine. 124
4.9 Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en Å^2, des résidus histidine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu histidine dans la séquence primaire de la protéine. 125
4.10 Surfaces des atomes de soufre accessibles au solvant, en Å^2, des résidus méthionine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu méthionine dans la séquence primaire de la protéine. 126
4.11 Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en Å^2, des résidus tryptophane présents dans le lysozyme (2LYZ.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position des résidus tryptophane dans la séquence primaire de la protéine. 129

Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont principalement produites de manière endogène par le métabolisme mitochondrial. En effet, la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie réduit l'oxygène et génère ainsi des radicaux anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) [1, 2]. Dans la réaction finale de la chaîne respiratoire mitochondriale, la majeure partie de l'oxygène est réduite en eau par l'enzyme cytochrome c oxydase mais une petite partie des molécules d'oxygène (1 à 2 %) [3] est convertie en radical anion superoxyde, pour la plupart via le complexe III (coenzyme Q : cytochrome c oxydo-réductase) [4, 5, 6] et le complexe I (NADH déshydrogénase) [7]. Les autres sources d'ERO sont les processus d'inflammation, différentes influences environnementales (rayons UV, pesticides, métaux...) et le métabolisme du cytochrome p450. En général, l'oxygène moléculaire a une multitude d'opportunités fournies par l'environnement réducteur du milieu cellulaire pour subir une réduction séquentielle. Ainsi, en plus du radical anion superoxyde, le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont les produits courants de la vie en milieu aérobie et ces agents peuvent être responsables de la toxicité de l'oxygène [1].

Les ERO en faibles quantités sont nécessaires pour certains mécanismes cellulaires [1]. Par exemple, elles jouent un rôle dans l'expression des gènes, l'élimination des pathogènes [8] et dans les voies de signalisation cellulaires [9, 10]. Cependant les ERO sont préjudiciables pour les cellules lorsqu'elles sont en quantités excessives. C'est pourquoi les cellules possèdent des défenses, des espèces antioxydantes et des enzymes antioxydants capables d'inactiver et de capturer les intermédiaires réactifs de l'oxygène (superoxyde dismutase, glutathion réductase, catalase...). Ces enzymes et espèces antioxydantes ne sont cependant pas capables d'éviter les dommages oxydatifs. Ainsi, d'autres enzymes sont produits afin de retirer ou de réparer les dégâts oxydatifs créés (thiorédoxine réductase, méthionine sulfoxyde réductase...) [1]. Malgré ces protections anti-oxydantes, il est impossible d'échapper au stress oxydatif qui est le résultat d'un déséquilibre entre espèces oxydantes et anti-oxydantes en faveur des espèces oxydantes, conduisant potentiellement

à des dommages [11] et qui inclue une rupture du signal rédox [12]. Au niveau cellulaire, les cibles potentielles du stress oxydant sont les composants cellulaires tels que les acides gras polyinsaturés, les glucides, l'ADN et les protéines [1].

La formation des espèces oxygénées citées précédemment peut être présentée de manière plus synthétique avec comme point de départ la molécule de dioxygène réduite de manière successive :

$$O_2 \xrightarrow{e^-} {O_2}^{\bullet -} \xrightarrow[2H^+]{e^-} H_2O_2 \xrightarrow[H^+]{e^-} OH^{\bullet} + H_2O \tag{1}$$

Le radical anion superoxyde

Le radical anion superoxyde est un des produits de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. Sa durée de vie est relativement longue ce qui lui permet de jouer un rôle important dans l'agrégation plaquettaire ou d'être utilisé comme messager lors de l'apoptose [13]. Ce radical est à l'origine de la formation de radicaux plus réactifs tel que le radical hydroxyle lorsqu'il réagit avec le peroxyde d'hydrogène suivant la réaction d'Haber-Weiss, éq.2, et peut initier la cascade des oxydes d'azote.

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

Le radical superoxyde est éliminé principalement par dismutation, de manière spontanée avec le perhydroxyle ($HO_2^{\bullet}$, la forme protonée du superoxyde), ou par catalyse grâce à la superoxyde dismutase [14, 15, 16] ou encore subit des réactions de réduction à un électron avec des ions métalliques [17].

$$2{O_2}^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \tag{3}$$

Le peroxyde d'hydrogène

Les principaux sites producteurs de peroxyde d'hydrogène sont les mitochondries et le réticulum endoplasmique. H_2O_2 est généré par la réduction et la dismutation enzymatique ou non du radical anion superoxyde ainsi que par des enzymes telles que certaines oxydases et peroxydases [18]. L'addition de deux radicaux anions superoxydes peut aussi donner le peroxyde d'hydrogène.

$${O_2}^{\bullet -} + {O_2}^{\bullet -} \xrightarrow{2H^+} O_2 + H_2O_2 \tag{4}$$

Le peroxyde d'hydrogène libre peut être réduit par des métaux tel que Fe^{3+} via la réaction de Fenton pour former le radical hydroxyle [14, 19, 20, 21] :

$$H_2O_2 + {Fe_2}^+ \rightarrow HO^\bullet + HO^- + Fe^{3+} \tag{5}$$

ou par le radical anion superoxyde suivant la réaction d'Haber-Weiss, [1] :

$$H_2O_2 + {O_2}^{\bullet -} \rightarrow HO^\bullet + HO^- + O_2 \tag{6}$$

D'autres ions métalliques que Fe^{2+} peuvent catalyser la réaction de Fenton, tels que les ions Cu^{2+}, Mn^{2+}, Cr^{3+} et Ni^{2+}.

H_2O_2 joue un rôle important dans la carcinogénèse car il est capable de diffuser dans la mitochondrie (grâce à un temps de vie supérieur à celui des espèces radicalaires) et au travers des membranes cellulaires (grâce à sa charge électrique neutre) ce qui lui permet de générer plusieurs types de dégâts cellulaires malgré une réactivité plus faible comparée à celle des autres ERO [21,22,23]. Il nécessite la présence d'ions métalliques, de conditions alcalines ou d'un acide (permettant la formation d'un peracide) pour causer des dommages importants aux protéines [24].

Au sein des protéines, le peroxyde d'hydrogène peut oxyder les résidus méthionine, cystéine, tyrosine et tryptophane [24, 25, 26]. Il peut aussi rompre des liaisons S-S [24] et créer ces mêmes liaisons au sein de protéines ou peptides [27, 28]. Le nombre de résidus oxydés ainsi que l'effet qui en résulte diffère beaucoup d'une protéine à l'autre. En effet, les paramètres importants sont le degré d'exposition du résidu affecté par l'oxydation et son rôle dans la stabilité et l'activité de la protéine [24].

Le radical hydroxyle

De part sa très haute réactivité le radical hydroxyle ($HO^\bullet$) est l'espèce oxydante la plus dangereuse pour l'organisme. Parmi les nombreuses voies de production de ce radical, trois peuvent expliquer la quasi-totalité de la production de radicaux chez les êtres vivants. La radiolyse de l'eau est la première, qui a lieu lorsque l'eau est exposée à des rayons ionisants. Ce phénomène permet d'obtenir le radical hydroxyle à partir d'une molécule d'eau de deux manières différentes et ce en quelques picosecondes [29] :

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^+ + e^-_{aq} \tag{7}$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + HO^\bullet \tag{8}$$

ou

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^* \tag{9}$$

$$H_2O^* \rightarrow H + HO^\bullet \tag{10}$$

avec e^-_{aq} l'électron aqueux, H_2O^+ une molécule d'eau ionisée et H_2O^* une molécule d'eau dans un état excité.

La deuxième voie de prodution de $HO^\bullet$ met en jeu la décomposition du peroxyde d'hydrogène exposé à des rayons UV (pour une longueur d'onde comprise entre 280 et 320 nm). La troisième voie est encore une décomposition du peroxyde d'hydrogène via la réaction de Fenton, éq. 5.

Au niveau protéique, $HO^\bullet$ oxyde dans différentes mesures toutes les chaînes latérales des résidus d'acides aminés avec une action plus rapide pour les chaînes latérales soufrées et aromatiques [30, 29], les constantes de vitesses correspondantes varient peu suivant les différentes chaînes latérales rencontrées (de 10^7 à 10^{10} M^{-1} s^{-1}) [29]. La perte d'un atome d'hydrogène liée à l'action de $HO^\bullet$ sur le carbone α des acides aminés et du squelette polypeptidique ainsi que les chaînes latérales aliphatiques des résidus d'acides aminés hydrophobiques sont des sites d'attaque initiaux [31,32,33,34,35]. Ce radical endommage à la fois les chaînes latérales et le squelette (et ainsi participe à la fragmentation de la protéine) [30].

L'oxygène singulet

L'oxygène singulet ($^1O_2$), une autre espèce réactive de l'oxygène, est principalement produite dans le vivant suite à une exposition à des rayons lumineux [36]. Cet état excité de l'oxygène est le résultat de l'absorption de ces rayons par des chromophores endogènes ou exogènes. Après avoir été excités, ces chromophores (C) réagissent suivant deux types de réaction. Les réactions de type I impliquent un transfert d'électron (k_{et}) ou une perte d'hydrogène (k_H) du chromophore excité (C^*) vers le solvant ou vers un substrat (S) créant ainsi des espèces radicalaires ($S^\bullet$).

$$C \xrightarrow{h\nu} C^* + S \underset{k_H}{\xrightarrow{k_{et}}} C + S^\bullet \tag{11}$$

Les réactions de type II correspondent au passage du chromophore ($C(S_0)$) à l'état fondamental à l'état excité singulet ($C(S_1)$) puis à l'état excité triplet ($C(T_1)$) via une

conversion intersystème (k_{ISC}) par exposition à la lumière :

$$C(S_0) \xrightarrow{h\nu} C(S_1) \xrightarrow{k_{ISC}} C(T_1) \tag{12}$$

Un transfert d'énergie (k_{en}) entre le chromophore excité à l'état triplet ($C(T_1)$) et la molécule de dioxygène fait passer l'oxygène de son état fondamental ($^3O_2$) à un état excité singulet ($^1O_2$).

$$C(T_1) + {}^3O_2 \xrightarrow{k_{en}} C(S_0) + {}^1O_2 \tag{13}$$

Il existe d'autres voies de production de l'oxygène singulet notamment chimiques et enzymatiques [37,38]. Il est possible que l'oxygène singulet fasse partie d'un processus similaire à la réaction de Fenton, [36, 39] :

$$H_2O_2 + {O_2}^{\bullet -} \rightarrow HO^- + HO^{\bullet} + {}^1O_2 \tag{14}$$

La réaction entre le radical anion superoxyde et le radical hydroxyle peut aussi être à l'origine de la formation de l'oxygène singulet [36, 40].

$$HO^{\bullet} + {O_2}^{\bullet -} \rightarrow {}^1O_2 + HO^- \tag{15}$$

Au niveau biologique, l'oxygène singulet est à l'origine de la majorité des dégâts infligés aux protéines par exposition aux rayons UV [17]. En effet, les constantes de réaction de l'oxygène singulet avec les chaînes latérales des protéines sont plus élevées qu'avec la plupart des autres cibles cellulaires [41]. De plus, les protéines sont présentes dans la plupart des systèmes biologiques et à des concentrations particulièrement élevées ce qui en fait des cibles privilégiées de l'oxygène singulet [42, 43, 44, 45].

La plupart des interactions de l'oxygène singulet avec les protéines impliquent des modifications chimiques plutôt que des processus de quenching. Ces derniers ont pour finalité un simple retour à l'état fondamental pour la molécule de dioxygène sans endommager l'accepteur d'énergie libérée, e.g. la protéine, par transfert d'énergie [44]. Dans le cas des protéines, seul le résidu tryptophane donne lieu à un quenching physique significatif [44, 46, 47], tandis que les acides aminés tryptophane, histidine, tyrosine, méthionine et cystéine réagissent rapidement de manière chimique avec l'oxygène singulet à un pH physiologique [44, 45, 46, 48, 49, 17, 42, 43, 50, 30, 41]. A un pH élevé, la photo-oxydation des résidus arginine et lysine peut aussi avoir lieu, ils sont alors sous leur formes déprotonées (neutres) [51, 44]. Les réactions impliquant l'oxygène singulet ont pour produits initiaux

des endoperoxydes pour les résidus aromatiques et des zwittérions pour les résidus soufrés. Ces intermédiaires subissent différentes réactions ultérieures qui peuvent donner lieu à des réactions d'ouverture de cycle et à la formation de radicaux [17].

La réaction de l'oxygène singulet avec les protéines peut avoir plusieurs effets incluant l'oxydation des chaînes latérales, la fragmentation du squelette protéique, la dimérisation/agrégation, le déploiement ou des changements conformationnels, l'inactivation enzymatique et des altérations dans l'entretien et le renouvellement cellulaire [44, 45, 52]. Ce dommage peut jouer un rôle important dans le développement de coup de soleil, de la cataracte et de certains cancers de la peau [44, 43, 53].

Action des ERO sur les protéines

Les protéines peuvent subir l'action directe des ERO suivant ces étapes, [54] :

1. Modifications oxydatives réversibles : formation de disulfures, d'acide sulfénique et de méthionine sulfoxyde résultant de l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, les plus sensibles à l'oxydation.

2. Formation de réticulations intra- et inter-moléculaires et/ou fragmentation des chaînes polypeptidiques par oxydation du squelette carboné de la protéine.

3. Fragmentation de la chaîne carbonée par oxydation d'un résidu glutamyl ou par α-amidation et oxydation directe de chaînes latérales de résidus sensibles (lysine, arginine, proline, thréonine) conduisant à la formation de groupes carbonylés sur la protéine.

Les résultats les plus fréquents de modifications oxydatives des protéines sont une diminution de l'activité enzymatique, une stabilité plus faible face à la chaleur, une hydrophobicité augmentée et une susceptibilité plus forte à la dégradation protéolytique [55]. De nombreuses études ont suggéré l'implication de l'oxydation des protéines au cours du stress oxydant et du vieillissement [56, 57, 58, 59, 60]. De plus, un nombre croissant de preuves a montré que les maladies neurodégénératives sont accompagnées par le phénomène d'oxydation des protéines [1, 61] (maladie d'Huntington [62, 63], maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer [64, 65]) de même qu'une large variété de désordres liés à l'âge [66, 67, 68].

Problématique et contenu de la thèse

Le travail de thèse rapporté dans ce manuscrit a pour but l'étude de deux voies d'oxydation des protéines avec pour intérêt la détermination des mécanismes réactionnels mis en jeu et la mise en évidence du rôle de l'environnement protéique. Nous avons choisi de travailler avec l'oxygène singulet, qui est un oxydant fort à l'origine d'importants dommages photo-induits et le peroxyde d'hydrogène, un oxydant plus faible mais à durée de vie plus longue qui présente des cibles variées. Afin de mettre en évidence leurs actions sur les protéines, nous avons choisi trois protéines modèles : l'albumine sérique bovine, le lysozyme et la β-lactoglobuline. Afin de montrer le rôle de l'environnement protéique dans les oxydations étudiées, nous avons travaillé avec des tripeptides en tant que courts fragments de protéines. La méthode d'investigation suivie est donc de comparer les résultats obtenus pour l'oxydation des tripeptides avec ceux obtenus dans le cas des protéines notamment au niveau des constantes de vitesse de réaction déterminées.

Afin d'étudier les deux processus d'oxydation, nous avons choisi deux techniques expérimentales différentes. L'action de l'oxygène singulet sur les protéines a été mise en évidence par spectroscopie de phoshorescence résolue en temps. Cette technique nous permet, grâce à la détection du signal de phosphorescence caractéristique de l'oxygène singulet dans le temps, de déterminer des constantes de vitesse de réaction de ce dernier avec les tripeptides puis avec les protéines modèles. Ces résultats sont présentés dans le chapitre *"Interaction des peptides et des protéines avec l'oxygène singulet"*.

Dans le cas de l'action du peroxyde d'hydrogène sur les protéines, l'étude a été réalisée en utilisant la technique de spectroscopie Raman. Cette technique non invasive permet de mettre en évidence des modifications chimiques directes telles que des disparitions ou formations de liaisons ainsi que des changements conformationnels au niveau des protéines. Ainsi, les spectres Raman enregistrés au fur et à mesure des réactions observées ont pu nous donner accès à des constantes de vitesse d'oxydation, présentées dans le chapitre *" Interaction des peptides et des protéines avec le peroxyde d'hydrogène"*. Pour arriver à ce résultat, une partie importante du travail de thèse a été dédiée à l'attribution des bandes Raman des résidus d'acides aminés. Cette attribution a été réalisée à partir des bandes Raman de tripeptides expérimentales et théoriques comparées à celles des protéines modèles utilisées ici. Les résultats correspondants sont présentés dans le chapitre *"Attribution des bandes Raman des résidus d'acides aminés dans les protéines"*. Le chapitre suivant cette introduction porte sur les deux techniques expérimentales choisies pour ce travail de thèse qui sont la spectroscopie Raman et la spectroscopie de phosphorescence résolue

en temps.

Les résultats théoriques présentés dans ce manuscrit, notamment dans les chapitres *"Attribution des bandes Raman des résidus d'acides aminés dans les protéines"* et *"Interaction des peptides et des protéines avec le peroxyde d'hydrogène"* sont une contribution de l'équipe de recherche.

Bibliographie

[1] A. HÖHN, J. KÖNIG et T. GRUNE : Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J. Proteomics*, 92:132–159, 2013.

[2] S. DROSE et U. BRANDT : Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 748:145–169, 2012.

[3] A. BOVERIS et B. CHANCE : The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134:707–716, 1973.

[4] A. BOVERIS, E. CADENAS et A.O. STOPPANI : Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 156:435–444, 1976.

[5] E. CADENAS, A. BOVERIS, C.I. RAGAN et A.O. STOPPANI : Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180:248–257, 1977.

[6] J.F. TURRENS, A. ALEXANDRE et A.L. LEHNINGER : Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237:408–414, 1985.

[7] J.F. TURRENS et A. BOVERIS : Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, 191:421–427, 1980.

[8] B.C. DICKINSON et C.J. CHANG : Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.*, 7:504–511, 2011.

[9] P.D. RAY, B.W. HUANG et Y. TSUJI : Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 24:981–990, 2012.

[10] M. JAIN, S. RIVERA, E.A. MONCLUS, L. SYNENKI, A. ZIRK, J. EISENBART, C. FEGHALI-BOSTWICK, G.M. MUTLU, G.R.S. BUDINGER et N.S. CHANDEL : Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-β signaling. *J. Biol. Chem.*, 288:770–777, 2013.

[11] H. SIES : Oxidative stress : oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82:291–295, 1997.

[12] D.P. JONES : Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8:1865–1879, 2006.

[13] M. GARDÈS-ALBERT, D. BONNEFONT-ROUSSELOT, Z. ABEDINZADEH et D. JORE : Espèces réactives de l'oxygène. comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 269-270:91–96, 2003.

[14] P. POSPÍŠIL : Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787:1151–1160, 2009.

[15] R.V. BENSASSON, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT : *R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott (Eds.), Excited States and Free Radicals in Biology and Medecine*, chapitre Activated forms of oxygen, pages 102–141. Oxford Svience Publication, Oxford, 1993.

[16] B.P. BRANCHAUD : *A. Sigel, H. Sigel (Eds.), Metals in Biological Systems, Vol. 36*, chapitre Free radicals as a result of dioxygen metabolism, pages 79–102. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.

[17] D.I. PATTISON et M.J. DAVIES : *Cancer : Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, chapitre Actions of ultraviolet light on cellular structures, pages 131–157. Birkhäuser Verlag, Switzerland, 2006.

[18] G. BARTOSZ : Reactive oxygen species : Destroyers or messengers ? *Biochemical Pharmacology*, 77:1303–1315, 2009.

[19] E.F. ELSNER : Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 33:73–96, 1982.

[20] S.I. LIOCHEV : *A. Sigel, H. Sigel (Eds.), Metals in Biological Systems, Vol. 36*, chapitre The Mechanism of "Fenton-Like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view, pages 1–39. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.

[21] S. REUTER, S.C. GUPTA, M.M. CHATURVEDI et B.B. AGGARWAL : Oxidative stress, inflammation, and cancer : How are they linked ? *Free Rad. Biol. Med.*, 49:1603–1616, 2010.

[22] J.M. MATES et F.M. SANCHEZ-JIMENEZ : Role of reactive oxygen species in apoptosis : implications for cancer therapy. *J. Biochem. Cell Biol.*, 32:157–170, 2000.

[23] G. RAY et S.A. HUSAIN : Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.*, 40:1213–1232, 2002.

[24] U. TÖRNVALL, M. HEDSTRÖM, K. SCHILLÉN et R. HATTI-KAUL : Structural, functional and chemical changes in Pseudozyma antarctica lipase B on exposure to hydrogen peroxide. *Biochimie*, 92:1867–1875, 2010.

[25] C. GIULIVI et K.J.A. DAVIES : Mechanism of the formation and proteolytic release of H_2O_2-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 276:24129–24136, 2001.

[26] N.P. NEUMANN : Oxidation [of proteins] with hydrogen peroxide. *Meth. Enzymol.*, 11:485–487, 1967.

[27] M.V. SIDOROVA, A.S. MOLOKOEDOV, A.A. AZ'MUKO, E.V. KUDRYAVTSEVA, E. KRAUSE, M.V. OVCHINNIKOV et Z.D. BESPALOVA : The use of hydrogen peroxide for closing disulfide bridges in peptides. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 30:101–110, 2004.

[28] T. Van der WIJK, J. OVERVOORDE et J. Den HERTOG : H_2O_2-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 279:44355–44361, 2004.

[29] G.V. BUXTON, C.L. GREENSTOCK, W.P. HELMAN et A.B. ROSS : Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH/^{\bullet}O^{-}$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 17:513–886, 1988.

[30] M.J. DAVIES : The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703:93–109, 2005.

[31] E.R. STADTMAN et R.L. LEVINE : Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in protein. *Amino Acids*, 25:207–218, 2003.

[32] W.M. GARRISON, M.E. JAYKO et W. BENNETT : Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Rad. Research*, 16:483–502, 1962.

[33] W.M. GARRISON : Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem. Rev.*, 87:381–398, 1987.

[34] A.J. SWALLOW : *Swallow A.J. (Ed), Radiation chemistry of organic compounds.*, chapitre Effect of ionizing radiation on proteins, RCO groups, peptide bond cleavage, inactivation, -SH oxidation., pages 211–224. John Wiley & Sons, New York, 1960.

[35] H. SCHUESSLER et K. SHILLING : Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 45:267–281, 1984.

[36] W. FREINBICHLER, M. A. COLIVICCHI, C. STEFANINI, L. BIANCHI, C. BALLINI, B. MISINI, Peter WEINBERGER, W. LINERT, D. VAREŠLIJA, K.F. TIPTON et L. Della CORTE : Highly reactive oxygen species : detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68:2067–2079, 2011.

[37] D.B. MIN et J.M. BOFF : Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 1:58–72, 2002.

[38] N.I. KRINSKY : Singlet oxygen in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 2:35–38, 1977.

[39] E.W. KELLOGG et I. FRIDOVICH : Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 250:8812–8817, 1975.

[40] A.U. KHAN et M. KASHA : Singlet molecular oxygen in the haber-weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12365–12367, 1994.

[41] F. WILKINSON, W.P. HELMAN et A.B. ROSS : Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. an expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24:663–1021, 1995.

[42] M.J. DAVIES : Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3:17–25, 2004.

[43] M.J. DAVIES et R.J.W. TRUSCOTT : Photo-oxidation of protein and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B*, 63:114–125, 2001.

[44] M. GRACANIN, C.L. HAWKINS, D.I. PATTISON et M.J. DAVIES : Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation : Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Rad. Biol. Med.*, 47:92–102, 2009.

[45] M.J. DAVIES : Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305:761–770, 2003.

[46] I.B.C. MATHESON et J. LEE : Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 29:879–881, 1979.

[47] M.C. PALUMBO, N.A. GARCIA et G.A. ARGUELLO : The interaction of singlet molecular-oxygen O_2 ($^1\triangle_g$) with indolic derivatives, distinction between physical and reactive quenching. *J. Photochem. Photobiol. B*, 7:33–42, 1990.

[48] B. MONROE : *Frimer A.A. (Ed.), Singlet O_2*, chapitre Singlet oxygen in solution : lifetimes and reaction rate constants, pages 177–224. CRC Press, Boca Raton, 1985.

[49] A. MICHAELI et J. FEITELSON : Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.*, 59:284–289, 1994.

[50] R.C. STRAIGHT et J.D. SPIKES : *A.A. Frimer (Ed.), Singlet O2, Vol. 4.*, chapitre Photosensitized oxidation of biomolecules., pages 91–143. CRC Press, Boca Raton, 1985.

[51] G. PAPESCHI, M. MONICI et S. PINZAUTI : pH effect on dye sensitized photo-oxidation of amino acids and albumins. *Med. Biol. Environ.*, 10:245–250, 1982.

[52] A. WRIGHT, C.L. HAWKINS et M.J. DAVIES : Photo-oxidation of cells generates longlived intracellular protein peroxides. *Free Radic. Biol. Med.*, 34:637–647, 2003.

[53] F. TRAUTINGER : Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.*, 26:573–577, 2001.

[54] M.A. BARAIBAR, R. LADOUCE et B. FRIGUET : Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *J. Proteomics.*, 92:63–70, 2013.

[55] E.R. STADTMAN et R.L. LEVINE : Protein oxidation. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 899:191–208, 2000.

[56] M.A. BARAIBAR et B. FRIGUET : Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp. Gerontol.*, 48:620–625, 2013.

[57] E. CABISCOL, E. PIULATS, P. ECHAVE, E. HERRERO et J. ROS : Oxidative stress promotes specific protein damage in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.*, 275:27393–27398, 2000.

[58] K. ENGLAND, C. O'DRISCOLL et T.G. COTTER : Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11:252–260, 2004.

[59] T. NYSTROM : Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.*, 24:1311–1317, 2005.

[60] H. MIRZAEI et F. REGNIER : Creation of allotypic active sites during oxidative stress. *J. Proteome Res.*, 5:2159–2168, 2006.

[61] A. MARTINEZ, M. PORTERO-OTIN, R. PAMPLONA et I. FERRER : Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol.*, 20:281–297, 2010.

[62] M.A. SOROLLA, M.J. RODRIGUEZ-COLMAN, N. VALL-LLAURA, J. TAMARIT, J. ROS et E. CABISCOL : Protein oxidation in Huntington disease. *Biofactors*, 38:173–185, 2012.

[63] M.A. SOROLLA, M.J. RODRIGUEZ-COLMAN, J. TAMARIT, Z. ORTEGA, J.J. LUCAS, I. FERRER, J. ROS et E. CABISCOL : Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, 49:612–621, 2010.

[64] M. MOHSENZADEGAN et A. MIRSHAFIEY : The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 11:203–216, 2012.

[65] C.D. SMITH, J.M. CARNEY, P.E. STARKE-REED, C.N. OLIVER, E.R. STADTMAN, R.A. FLOYD et W.R. MARKESBERY : Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10540–10543, 1991.

[66] R.L. LEVINE et E.R. STADTMAN : Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.*, 36:1495–1502, 2001.

[67] M.A. BARAIBAR, L. LIU, E.K. AHMED et B. FRIGUET : Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2012:919832, 2012.

[68] E.R. STADTMAN : Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.*, 40:1250–1258, 2006.

Chapitre 1

Méthodes expérimentales

Sommaire

1.1 Spectroscopie Raman 16
1.1.1 Etats moléculaires vibrationnels 16
1.1.1.1 Modes normaux 16
1.1.1.2 Projection des modes normaux 18
1.1.2 Transitions vibrationnelles : règles de sélection 19
1.1.2.1 Propriétés de symétrie des coordonnées normales . . . 19
1.1.2.2 Propriétés de symétrie des fonctions d'onde vibrationnelles 19
1.1.2.3 Règles de sélection 20
1.1.3 Diffusion Raman 21
1.1.3.1 Généralités 21
1.1.3.2 Calcul des intensités Raman loin de la résonance . . . 22
1.1.4 Méthode expérimentale 23
1.2 Spectroscopie de phosphorescence résolue dans le temps . . . 25
1.2.1 Photophysique de l'oxygène singulet 26
1.2.2 Méthode expérimentale 28
1.2.2.1 Dispositif expérimental 29

1.1 Spectroscopie Raman

1.1.1 Etats moléculaires vibrationnels

La séparation du mouvement électronique du mouvement des noyaux est faite par l'approximation adiabatique. En appliquant cette approximation, les fonctions d'ondes Ψ des états vibrationnels stationnaires sont donc solutions de l'équation de Schrödinger :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_\alpha} \frac{\partial^2}{\partial X_\alpha^2} + U(X_1, X_2, \ldots, X_n) \right] \Psi_{noy}(X_1, X_2, \ldots, X_n) = \\ = E\, \Psi_{noy}(X_1, X_2, \ldots, X_n) \tag{1.1}$$

où X_α sont les coordonnées des noyaux, m_α sont les masses des noyaux et $U(X_1, X_2, \ldots, X_n)$ est l'énergie potentielle du système (n=3N, où N est le nombre d'atomes dans le système). Dans le cas de faibles déplacements des noyaux autour d'une configuration d'équilibre, l'approximaion harmonique peut s'appliquer et l'énergie potentielle s'écrit alors :

$$U(X_1, X_2, \ldots, X_n) \approx U(X_1^{(0)}, X_2^{(0)}, \ldots, X_n^{(0)}) + \frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{\partial^2 U}{\partial\, x_i\, \partial\, x_j}\, x_i\, x_j \tag{1.2}$$

où $x_i = X_i - X_i^{(0)}$, $X_i^{(0)}$ sont les valeurs d'équilibre des coordonnées cartésiennes.

1.1.1.1 Modes normaux

Le choix des coordonnées est capital dans le traitement quantique des vibrations. En passant des coordonnées cartésiennes, x_i, aux coordonnées cartésiennes pondérées par les masses, $q_i = \sqrt{m_i} x_i$, l'équation 1.1 est simplifiée une première fois :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i} \frac{\partial^2}{\partial\, q_i^2} + \frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{\partial^2 U}{\partial\, q_i\, \partial\, q_j}\, q_i\, q_j \right] \Psi_{noy}(q_1, q_2, \ldots, q_n) = E\, \Psi_{noy}(q_1, q_2, \ldots, q_n) \tag{1.3}$$

L'utilisation d'une transformation des coordonnées unitaire peut diagonaliser le Hessien $\frac{\partial^2 U}{\partial\, q_i\, \partial\, q_j}$ en préservant la forme diagonale de l'énergie cinétique. Les nouvelles coordonnées, Q_j, sont appelées coordonnées normales :

$$Q_j = \sum_i t_{ji}\, q_i \tag{1.4}$$

Les éléments matriciels t_{ji} satisfont le système d'équations, [1] :

$$\sum_{i=1}^{n} t_{ji} \left(F_{ki} - \delta_{ki}\, \lambda_{jj}\right) = 0 \tag{1.5}$$

où $\lambda_{jj} = \frac{\partial^2 U}{\partial\, Q_j^2}$, $F_{ki} = \frac{\partial^2 U}{\partial\, q_k\, \partial\, q_i}$, $k = 1, 2, \ldots, n$ et $j = 1, 2, \ldots, n$. L'équation 1.3 peut donc être réécrite :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{n} \frac{\partial^2}{\partial\, Q_i^2} + \sum_{i=1}^{n} \frac{\partial^2 U}{\partial\, Q_i^2}\, Q_i^2\right] \Psi_{noy}\left(Q_1, Q_2, \ldots, Q_n\right) = E\, \Psi_{noy}\left(Q_1, Q_2, \ldots, Q_n\right) \tag{1.6}$$

En diagonalisant le Hessien on obtient 3N constantes de force diagonales. Parmi celles-ci, 6 sont nulles et correspondent aux trois degrés de liberté de rotation et aux trois degrés de liberté de translation de la molécule. Les mouvements caractéristiques des coordonnées normales Q_i sont appelés modes normaux.

En conclusion, le système possède 3N-6 coordonnées normales (3N-5 pour les molécules linéaires). Les 3N-6 mouvements de ces coordonnées sont découplés. Ainsi, la fonction d'onde du système est un produit de fonctions d'onde uni-dimensionnelles, $\Psi_{\upsilon_\alpha}(Q_\alpha)$ et chacune de ces fonctions est la solution d'une équation Schrödinger du type oscillateur harmonique :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2}\frac{d^2}{dQ_\alpha^2} + \frac{1}{2} K_{Q_\alpha} Q_\alpha^2\right] \Psi_{\upsilon_\alpha}(Q_\alpha) = \epsilon_{\upsilon_\alpha} \Psi_{\upsilon_\alpha}(Q_\alpha) \tag{1.7}$$

où $K_{Q_\alpha} = \frac{\partial^2 U}{\partial\, Q_\alpha^2}$ représente la constante de force du mode α et υ_α est le nombre quantique de vibration correspondant à ce mode. L'énergie d'excitation du mode α est alors :

$$\epsilon_{\upsilon_\alpha} = \hbar\, \omega_\alpha \left(\upsilon_\alpha + \frac{1}{2}\right) \tag{1.8}$$

où $\omega_\alpha = \sqrt{K_{Q_\alpha}}$ est la fréquence angulaire du mode. Les modes dégénérés sont les modes normaux dont les fréquences sont identiques. Les fonctions d'onde des modes normaux non-dégénérés s'écrivent :

$$\Psi_\alpha(Q_\alpha) = N_\nu\, e^{(-\frac{1}{2}\, c_\alpha^2\, Q_\alpha^2)} H_{\nu_\alpha}(c_\alpha\, Q_\alpha) \tag{1.9}$$

et celles des modes dégénérés ont pour expression :

$$\Psi_\alpha\left(Q_{\alpha_1}, Q_{\alpha_2} \ldots\right) = N_\nu\, e^{(-\frac{1}{2}\, c_\alpha^2 \sum_{i=1}^{g} Q_{\alpha_i}^2)} \prod_{i=1}^{g} H_{\nu_{\alpha_i}}(c_\alpha\, Q_{\alpha_i}) \tag{1.10}$$

où N_ν est une constante de normalisation, $c_\alpha = \sqrt{\frac{\omega_\alpha}{\hbar}}$, H_{ν_α} le polynôme d'Hermite de rang ν_α et g le degré de dégénérescence du mode.

1.1.1.2 Projection des modes normaux

La décomposition d'un mode normal en déplacements cartésiens ou en déplacements des coordonnées internes permet de dégager la signification physique de ce mode.

Soit $\vec{e}_{Q_i}$ le vecteur unitaire du mode normal i dans l'espace des coordonnées pondérées par les masses. La projection de ce vecteur unitaire sur le vecteur unitaire cartésien $\vec{e}_j$ est :

$$t_{ij} = \vec{e}_{Q_i} \cdot \vec{e}_j \tag{1.11}$$

En suivant la même démarche, une projection dans l'espace des coordonnées non-pondérées peut être faite :

$$t'_{ij} = \vec{e}'_{Q_i} \cdot \vec{e}_j \tag{1.12}$$

$\vec{e}'_{Q_i}$ est dans ce cas le vecteur unitaire du mode normal i dans l'espace des coordonnées non-pondérées. Le passage entre l'espace des coordonnées pondérées par les masses et l'espace des coordonnées non-pondérées se fait par l'expression :

$$t_{ij} = \frac{\sqrt{m_j}\, t'_{ij}}{\sqrt{\sum_j m_j\, t'^2_{ij}}} \tag{1.13}$$

Ici, la masse correspondant au déplacement le long du vecteur unitaire $\vec{e}_j$ est m_j. Les coordonnées pondérées par les masses et les coordonnées cartésiennes sont moins parlantes dans l'analyse d'un mode normal. Un ensemble de coordonnées défini en termes de liaisons, d'angles et d'angles dièdres est préférable.

La projection du vecteur unitaire $\vec{e}'_{Q_i}$ sur les différents vecteurs unitaires des coordonnées internes $\vec{e}_{\xi_j}$ permet l'analyse d'un mode normal en termes de coordonnées internes dans l'espace des coordonnées non-pondérées :

$$l'_{ij} = \vec{e}'_{Q_i} \cdot \vec{e}_{\xi_j} \tag{1.14}$$

La projection d'un mode normal i d'amplitude Q'_i sur la direction de la coordonnée interne ξ_j s'écrit alors :

$$\xi'_j = Q'_i \cdot l_{ij} \tag{1.15}$$

1.1.2 Transitions vibrationnelles : règles de sélection

1.1.2.1 Propriétés de symétrie des coordonnées normales

Dans l'étude des vibrations moléculaires, l'application de la théorie des groupes est particulièrement utile. Soit $\hat{R}$ une opération de symétrie appartenant au groupe de symétrie de la molécule. L'application de $\hat{R}$ à la coordonnée normale Q_j doit la transformer en une combinaison des coordonnées de même fréquence. Cela découle directement du fait que l'énergie de vibration doit être invariante par rapport à $\hat{R}$.

En effet, les coordonnées Q_{α_j} des modes normaux de même fréquence se transforment linéairement entre elles dans le cas d'une transformation qui se rapporte au groupe de symétrie de la molécule. Ces transformations se font de telle façon que la somme des carrés $\sum_j (Q_{\alpha_j})^2$ reste inchangée :

$$\hat{R}\, Q_{\alpha_j} = \sum_i R^{\alpha}_{ji}\, Q_{\alpha_j} \tag{1.16}$$

Cela veut dire que les coordonnées Q_{α_j} réalisent une représentation irréductible du groupe de symétrie de la molécule. R^{α} sont les matrices de cette représentation.

1.1.2.2 Propriétés de symétrie des fonctions d'onde vibrationnelles

Ces propriétés sont la conséquence des propriétés de symétrie des coordonnées normales. Soit la fonction d'onde :

$$\Psi_{\nu_\alpha}(Q_\alpha) = N_\nu\, e^{(-\frac{1}{2}\, c_\alpha^2\, Q_\alpha^2)}\, H_{\nu_\alpha}(c_\alpha\, Q_\alpha) \tag{1.17}$$

Dans toutes les transformations de symétrie, le facteur exponentiel dans l'équation 1.17 reste invariant (conformément au paragraphe précédent). Dans les polynômes d'Hermite, les termes de chaque degré se transforment exclusivement entre eux. En conséquence, le terme de plus haut degré du polynôme d'Hermite détermine entièrement les propriétés de symétrie de celui-ci. Le polynôme H_{ν_α} a les mêmes propriétés de symétrie que celles de la fonction Ψ_{ν_α}. De même, les propriétés de symétrie de H_{ν_α} sont identiques à celles du terme $Q_\alpha^{\nu_\alpha}$. La fonction d'onde vibrationnelle totale est un produit de fonctions $H_{\nu_\alpha}(\alpha = 1, 2, \ldots)$

qui vont générer une représentation $\Gamma = \Gamma^{\alpha} \otimes \Gamma^{\alpha+1} \otimes \ldots$, produit direct des représentations $\Gamma^{\alpha}, \Gamma^{\alpha+1}, \ldots$.

1.1.2.3 Règles de sélection

Théorème :
Soit $I = \int f(Q)\, dQ$
où Q représente l'ensemble des coordonnées normales. Supposons que f appartient à la représentation Γ^f qui, en général, peut être réductible. Le terme I est non-nul seulement si Γ^f contient la représentation unité Γ^E.

Conséquence 1 :
Soit $f^{(\alpha)}$ et $f^{(\beta)}$ deux fonctions appartenant à deux représentations irréductibles Γ^{α} et Γ^{β}. Alors $\int f^{(\alpha)}(Q)\, f^{(\beta)}(Q)\, dQ = \Gamma^{\alpha} \otimes \Gamma^{\beta} \neq 0$ seulement si $\alpha = \beta$.

Conséquence 2 :
Soit $f^{(\alpha)}$, $f^{(\gamma)}$ et $f^{(\beta)}$ trois fonctions appartenant à trois représentations irréductibles Γ^{α}, Γ^{γ} et Γ^{β}.
$\int f^{(\alpha)}(Q)\, f^{(\gamma)}(Q)\, f^{(\beta)}(Q)\, dQ = \Gamma^{\alpha} \otimes \Gamma^{\gamma} \otimes \Gamma^{\beta} \neq 0$ seulement si le produit $\Gamma^{\alpha} \otimes \Gamma^{\gamma}$ contient la représentation Γ^{β}.

Application :
Soit $\hat{h}$ l'hamiltonien décrivant une interaction qui peut induire une transition entre l'état de fonction d'onde $\Psi^{\alpha}(Q)$ et celui de fonction d'onde $\Psi^{\beta}(Q)$. La probabilité de transition est proportionnelle au carré de l'élément de matrice respectif de $\hat{h}$:

$$P \approx \left| \int \Psi^{\alpha *}(Q)\, \hat{h}\, \Psi^{\beta}(Q)\, dQ \right|^2 \tag{1.18}$$

La probabilité P sera non-nulle seulement si le produit $\Gamma^{\alpha} \otimes \Gamma^{h}$ contient la représentation Γ^{β}. C'est la formulation la plus générale des règles de sélection pour les transitions vibrationnelles.

1.1.3 Diffusion Raman

1.1.3.1 Généralités

La diffusion inélastique de la lumière par les molécules peut être traitée à trois niveaux de théorie. Tout d'abord le niveau classique, où les molécules et le rayonnement sont détaillés dans le cadre de la physique classique. Puis le niveau semi-classique, où la théorie classique décrit le rayonnement et la théorie quantique décrit les molécules. Enfin, le niveau quantique où le rayonnement et les états moléculaires sont quantifiés.

Le traitement classique offre une description intuitive du processus de diffusion mais il ne permet pas d'expliquer ses règles de sélection ni les propriétés de polarisation du rayonnement diffusé. Ces problèmes sont inexistants dans le traitement semi-classique qui offre un cadre adéquat pour la simulation numérique des spectres Raman.

Ce traitement, proposé par A.C. Albrecht [2], a comme point de départ l'expression de l'intensité Raman diffusée par une molécule dans un angle solide de 4π. Cette expression a été obtenue après avoir effectué une moyenne par rapport aux orientations possibles de cette molécule :

$$I_{mn} = \frac{2^7\,\pi^5}{3^2\,c^4\,\epsilon_0^2}\,I_0\,(\nu_0+\nu_{mn})^4 \sum_{\rho,\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2 \tag{1.19}$$

Dans l'équation précédente, n représente l'état initial de la molécule, m est l'état final, $\nu_{mn} = (E_m - E_n)/h$, h la constante de Planck, I_0 est l'intensité laser et ν_0 est la fréquence laser. Dans un référentiel solidaire à la molécule, $(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}$ est l'élément de matrice du tenseur polarisabilité de la molécule avec $\rho = x, y, z$ et $\sigma = x, y, z$.

L'expression quantique de $(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}$ est :

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{h}\sum_r \Big(\frac{(M_\rho)_{rn}\,(M_\sigma)_{mr}}{\nu_{rm}-\nu_0} + \frac{(M_\rho)_{rn}\,(M_\sigma)_{mr}}{\nu_{rn}+\nu_0} \Big) \tag{1.20}$$

La somme est effectuée sur tous les états vibroniques de la molécule. Ici $(M_\rho)_{rn}$ et $(M_\sigma)_{mr}$ sont les amplitudes (scalaires) des moments dipolaires de transition respectifs qui

ont pour expression :

$$(M_\rho)_{rn} = \int \Psi_r^* \, M_\rho \, \Psi_m \, dr \tag{1.21}$$

où Ψ_r et Ψ_m sont les fonctions d'onde vibroniques et M_ρ est la composante ρ du vecteur du moment dipolaire. Les différences entre les énergies des états vibroniques donnent par calcul les fréquences ν_{rm} et ν_{rn} respectives dans l'équation 1.20.

1.1.3.2 Calcul des intensités Raman loin de la résonance

Loin de la résonance, l'expression de l'intensité Raman totale est obtenue en utilisant le développement en série limitée de la polarisabilité $\alpha_{\sigma\rho}$ en fonction des coordonnées Q_a.

Dans l'approximation du premier ordre en Q_a :

$$\alpha_{\sigma\rho} = \alpha^0_{\sigma\rho} + \sum_a \Big(\frac{\partial \alpha_{\sigma\rho}}{\partial Q_a}\Big) Q_a \tag{1.22}$$

et donc :

$$(\alpha_{\sigma\rho})_{mn} = \alpha^0_{\sigma\rho} < m|n > + \sum_a \Big(\frac{\partial \alpha_{\sigma\rho}}{\partial Q_a}\Big) < m|Q_a|n > \tag{1.23}$$

Le premier terme de l'équation 1.23 est responsable de la diffusion Rayleigh et le deuxième de la diffusion Raman. Dans ce cas, l'état initial $|n >$ et l'état final $|m >$ s'écrivent : $|n >= |g_i >$ et $|m >= |g_j >$, respectivement (avec g pour l'état électronique et i et j pour les états vibrationnels). La contribution de la polarisabilité à l'effet Raman est donc donnée par l'expression :

$$(\alpha_{\sigma\rho})^R_{gi,gj} = \sum_a \Big(\frac{\partial \alpha_{\sigma\rho}}{\partial Q_a}\Big) < gi|Q_a|gj > \tag{1.24}$$

Pour une transition $v^i_a \rightarrow v^i_a + 1$ on peut écrire :

$$< gi|Q_a|gj >= [(v^i_a + 1)/\, 2\gamma_a]^{1/2} \tag{1.25}$$

avec $\gamma_a = \frac{4\,\pi^2\,\nu_a}{h}$ où ν_a est la fréquence caractéristique du mode normal a.

La substitution des équations 1.24 et 1.25 dans l'équation 1.19 donne :

$$I_{gi,gj} = \frac{2^4\,\pi^3}{3^2\,c^4\,\epsilon_0^2}\, I_0\, (\nu_0 - \nu_a)^4 (v^i_a + 1)\, h/v_a \sum_{\rho,\sigma} \Big(\frac{\partial \alpha_{\sigma\rho}}{\partial Q_a}\Big)^2 \tag{1.26}$$

L'équation 1.26 est utilisée par la plupart des logiciels de calcul moléculaire *ab initio* pour le calcul d'intensités Raman.

1.1.4 Méthode expérimentale

Le spectromètre Raman utilisé dans le cadre de cette thèse est un système original configuré au sein du laboratoire. Ce système présenté Fig. 1.1 est composé d'un laser Nd :YAG Spectra Physics, modèle LAB-170-10 délivrant des impulsions laser de 5 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz et d'un système de détection Roper Scientifique constitué d'un monochromateur Spectra Pro 2500i avec une caméra CCD PIMAX-1024-RB de Princeton Instruments avec une résolution maximale de 0,035 nm.

La configuration choisie présente les spécificités suivantes :

- Elle fonctionne en régime impulsionnel. Cela permet de réduire le rapport entre le signal de fluorescence et le signal Raman. En effet, à partir d'un certain niveau d'intensité du faisceau laser incident, l'intensité de fluorescence est saturée tandis que l'intensité Raman continue à augmenter linéairement par rapport à l'intensité incidente.
- L'intensificateur de la caméra CCD (I) est synchronisé avec l'impulsion laser. Ainsi, l'intensificateur est actif seulement pendant la durée de 5 ns de l'impulsion laser. Cela permet de réduire fortement le bruit d'obscurité du système de détection.
- Elle donne accès à des fluences d'irradiation très élevées. Pour une longueur d'onde de 532 nm la puissance maximum équivalente en continue du faisceau laser est de 4,5 W.

Ces caractéristiques permettent d'augmenter largement la sensibilité du système qui présente une résolution spectrale de 7 cm^{-1}, la largeur à mi-hauteur du pic de l'azote dans l'air. En effet, l'analyse d'échantillon de concentration faible, de l'ordre d'1 mM est possible. Les spectres sont enregistrés en utilisant la longueur d'émission du deuxième harmonique du laser Nd :YAG soit 532 nm. L'échantillon (E) est placé dans une cuve en quartz d'1 cm$\times$ 1 cm. Elle est irradiée par un faisceau laser de 10 mm de diamètre à une densité de puissance équivalente de 35 mW mm^{-2}. La lumière diffusée par l'échantillon est détectée à un angle de 90 $^\circ$. Cette lumière est recueillie par un système optique. Une première lentille (L_1) de distance focale 120 mm focalise la lumière qui arrive ensuite sur le diaphragme (D). Le faisceau lumineux sortant du diaphragme passe par un filtre Notch (F). Ce filtre a pour fonction de rejeter la lumière issue du laser à 532 nm. La bande passante du filtre Notch est de 300 cm^{-1} ce qui impose une limite inférieure de 150 cm^{-1}

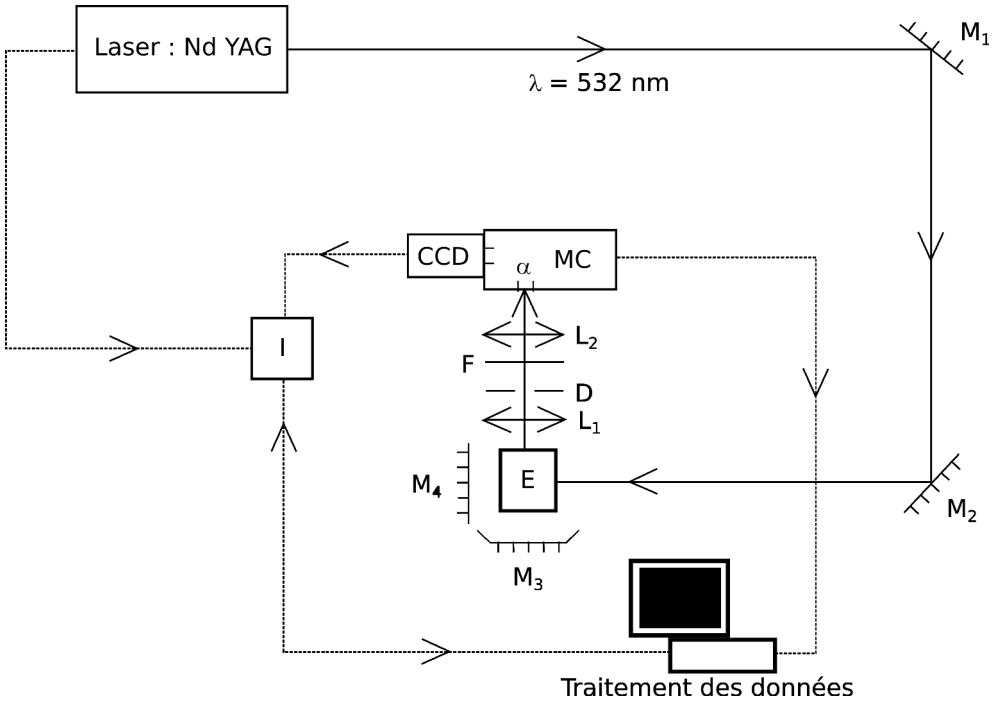

Figure 1.1 – Schéma du spectromètre Raman.

aux fréquences Raman détectables par ce système. En sortie du filtre une deuxième lentille (L_2) de distance focale 100 mm focalise la lumière au niveau de la fente d'entrée (α) du monochromateur (MC). En amont de ce système optique, le miroir plan (M_4) et le miroir sphérique (M_3) sont placés derrière l'échantillon face au faisceau laser incident et face à la fente (α), respectivement. Ces deux miroirs ont pour but d'augmenter l'intensité du signal détecté en renvoyant le faisceau laser incident une deuxième fois vers l'échantillon pour (M_4) et en renvoyant la lumière diffusée de l'échantillon vers le système optique pour le miroir (M_3). L'utilisation du miroir (M_4) double alors l'intensité du signal obtenu.

La référence de normalisation des spectres Raman enregistrés est la mesure de l'intensité de la bande Raman de l'azote de l'air à 2332 cm^{-1}. Les spectres Raman finaux des solutions étudiées sont obtenus par enregistrements successifs de plusieurs spectres intermédiaires (S_i) de 10 nm de largeur à raison de 1000 coups laser par S_i. La largeur des S_i correspond à la largeur de la fenêtre spectrale d'enregistrement qui se fait par rapport aux longueurs d'onde en nm. Ainsi, pour un spectre final couvrant 1400 cm^{-1}, l'enregistrement de 53 S_i successifs décalés les uns par rapport aux autres d'un nm est réalisé. Afin de normaliser l'intensité du signal de chaque S_i enregistré, la mesure de l'intensité relative de la bande de l'azote dans l'air est réalisée avant et après chaque enregistrement de S_i. L'intensité relative de la bande de l'azote est calculée en soustrayant l'intensité de la ligne

de base à l'intensité maximale du pic. Pour l'enregistrement d'un seul S_i, deux intensités relatives de l'azote sont calculées et la moyenne (M_i) de ces deux valeurs est utilisée pour normaliser l'intensité du S_i en divisant celle-ci par M_i. Cette normalisation permet de limiter l'influence de la fluctuation de l'intensité des S_i au cours de leur enregistrement qui pour un spectre final couvrant 1400 cm^{-1} nécessite environ 4h d'utilisation continue du laser.

Le spectre final est obtenu en réalisant la somme de chacun des S_i normalisés au niveau des longueurs d'ondes où ils se superposent. Cela a pour conséquence que chaque point du spectre final est le résultat d'une moyenne sur dix points issus de 10 S_i différents. Ce travail donne donc un spectre final équivalant à un spectre enregistré dans son ensemble sur 10000 coups laser. De plus, cette méthode permet d'obtenir une ligne de base de meilleure qualité sur la totalité du spectre. Ce protocole est utilisé dans le cas d'enregistrement de spectres dont la fenêtre spectrale dépasse 10 nm soit environ 325 cm^{-1}.

Dans le cadre de cette thèse, les échantillons étudiés sont des molécules en solutions aqueuses. Les pH des solutions protéiques et peptidiques sont ajustés à l'aide de solutions concentrées de NaOH et de HCl. Afin de retirer la contribution du solvant dans les spectres des échantillons, l'enregistrement du spectre de l'eau est aussi réalisé suivant la même méthode que celle choisi pour chaque échantillon. Ce spectre de l'eau est ensuite soustrait à celui de l'échantillon en lui appliquant un facteur compris entre 0,9 et 1,1 ce qui permet d'améliorer la ligne de base du spectre de l'échantillon en plus de retirer la contribution du solvant.

1.2 Spectroscopie de phosphorescence résolue dans le temps

Dans le cadre de la photo-oxydation des protéines, la spectroscopie de phosphorescence résolue dans le temps est utilisée pour étudier la réactivité de l'oxygène singulet en solution dans de l'eau deutérée avec des tripeptides puis des protéines (Chapitre "Interaction des peptides et des protéines avec l'oxygène singulet").

1.2.1 Photophysique de l'oxygène singulet

L'oxygène singulet est la molécule de d'oxygène située dans l'état excité $^1\Delta_g$ de plus faible énergie. Les trois états singulet et triplets de la molécule de d'oxygène les plus bas en énergie sont l'état fondamental $^3\Sigma^-$ triplet, l'état excité $^1\Delta_g$ singulet à 94,5 kJ.mol^{-1} et l'état excité $^1\Sigma^+$ à 132,3 kJ.mol^{-1} [3, 4]. Seule la structure des orbitales π anti-liantes occupées de ces trois états diffère des deux autres. Pour l'état fondamental de la molécule de dioxygène, on a la configuration des orbitales moléculaires suivante : $(1\sigma_g)^2$ $(1\sigma_u^\star)^2$ $(2\sigma_g)^2$ $(2\sigma_u^\star)^2$ $(3\sigma_g)^2$ $(1\pi_{u,x})^2$ $(1\pi_{u,y})^2$ $(1\pi_{g,x}^\star)^1$ $(1\pi_{g,y}^\star)^1$, avec deux électrons célibataires de même spin répartis sur les deux orbitales $\pi_{g,x}^\star$ et $\pi_{g,y}^\star$. Dans le cas de l'oxygène singulet moléculaire ces deux électrons sont de spins opposés et se trouvent tous les deux sur l'orbitale antiliante $\pi_{g,x}^\star$, représentés figure 1.2 d'après [5, 6]. Pour le deuxième état excité de l'oxygène, $^1\Sigma_g^+$, qui est le plus élevé en énergie, ces deux électrons sont toujours de spins opposés mais répartis entre les deux orbitales antiliantes $\pi_{g,x}^\star$ et $\pi_{g,y}^\star$.

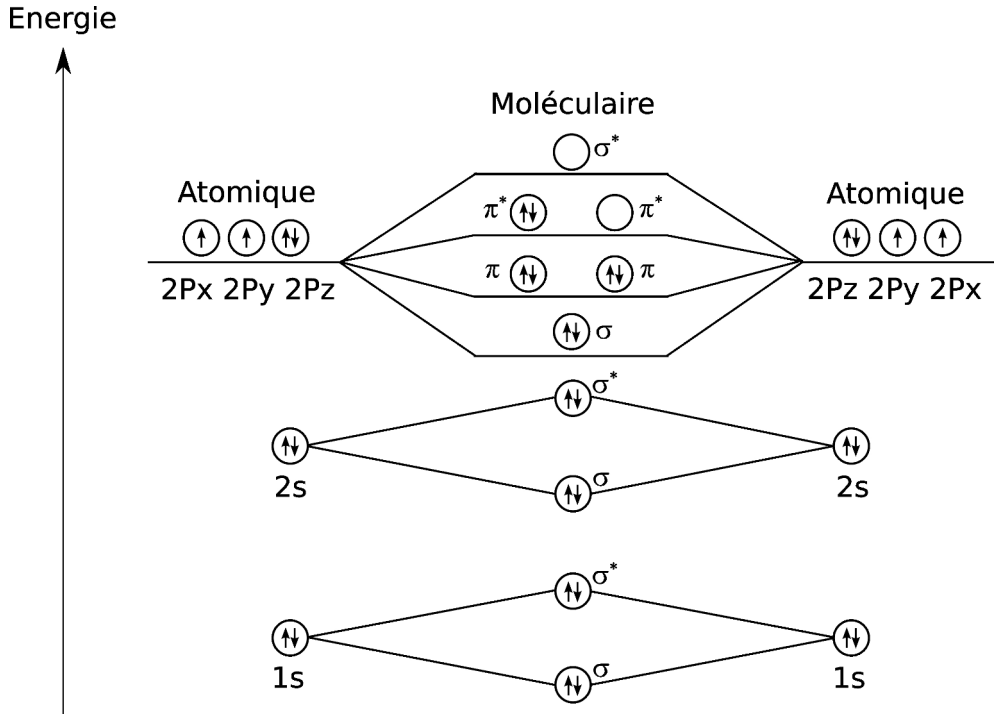

Figure 1.2 – Diagramme orbitalaire de la molécule d'oxygène singulet, $^1\Delta_g$.

L'oxygène singulet est l'une des principales espèces activées de l'oxygène (ERO) responsable des effets néfastes de la lumière sur les systèmes biologiques (effets photodynamiques). Cet état excité de l'oxygène moléculaire est aussi un intermédiaire oxydant important dans les processus chimiques [7, 3] et l'un des plus actifs impliqué dans

les réactions photosensibilisées de l'oxygène dans les systèmes chimiques et biologiques, [8, 9, 10, 11]. Il est invoqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20].

In vivo, la photosensibilisation est majoritairement responsable de la production d'oxygène singulet [7, 21]. Ainsi, l'oxygène singulet est principalement le résultat d'un transfert d'énergie issu d'un sensibilisateur à l'état triplet vers de l'oxygène moléculaire dissout. L'oxygène moléculaire ainsi excité se relaxe par des processus radiatifs ou non induits par le solvant présentés figure 1.3 d'après [22]. Il peut aussi être désactivé en oxydant une molécule acceptrice et/ou un quencheur physique [7]. Il y a presque 30 ans, cette énergie de transfert du photosensibilisateur vers l'oxygène moléculaire ainsi que la relaxation des états excités formés étaient décrits par le modèle standard de Parker et al. [8, 23].

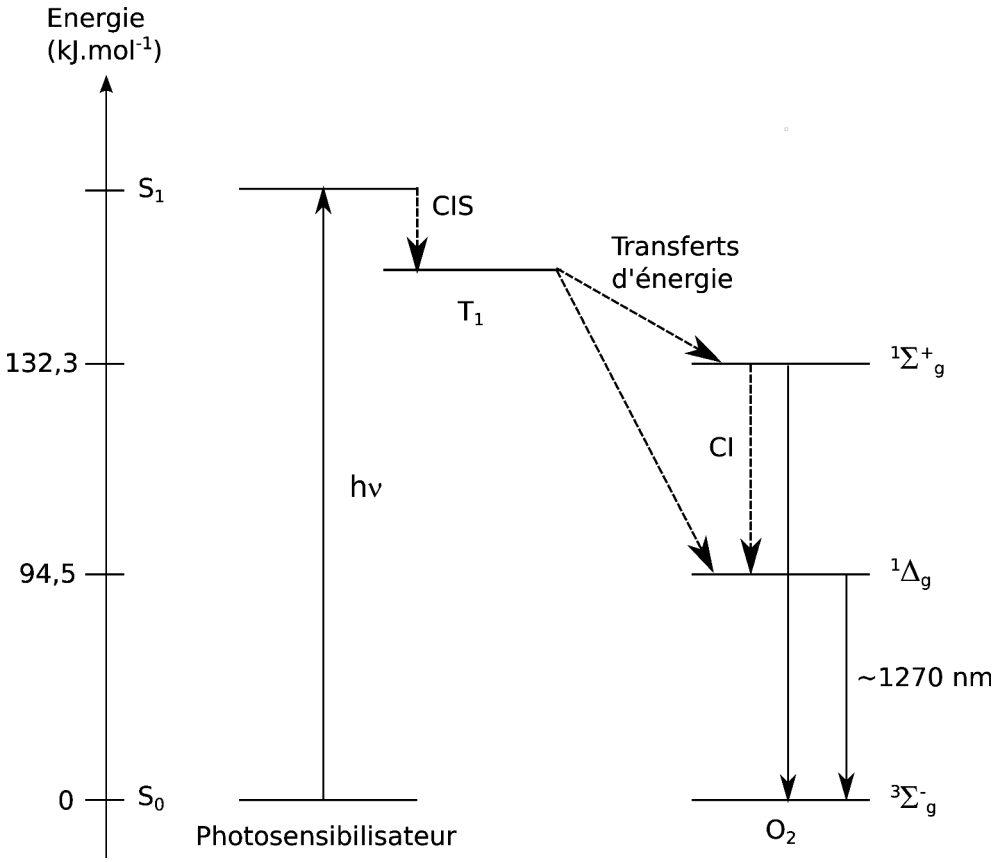

Figure 1.3 – Production de l'oxygène singulet par photosensibilisation, avec S_0, S_1 et T_1 les états singulets et triplet du photosensibilisateur, CIS la conversion intersystème et CI la conversion interne.

La désexcitation de l'oxygène singulet vers l'état fondamental ${}^3\Sigma_g^-$ est interdite de spin (d'après les règles de sélection, le spin ne doit pas changer lors d'une transition

électronique soit $\Delta S = 0$ alors qu'ici il passe de S=1 pour l'état fondamental triplet à S=0 pour l'état excité singulet [24]). C'est pourquoi l'oxygène singulet a un temps de vie relativement long de 10^{-6} à 10^{-3} s en solution comparé à celui du deuxième état excité, $^1\Sigma_g^+$, pour qui la trasnsition de spin vers l'état $^1\Delta_g$ est permise, sa durée de vie en solution est de 10^{-11} à 10^{-9} s [3,25]. Les transitions entre l'état $^1\Delta_g$ vers l'état $^3\Sigma_g^-$ sont observées pour des spectres d'absorption et d'émission à 1268,7 nm bien qu'elles soient interdites de spin et de symétrie, [3, 26].

1.2.2 Méthode expérimentale

Une méthode directe et précise fréquemment appliquée pour détecter l'oxygène singulet est la mesure de sa phosphorescence à environ 1270 nm [8, 9, 10, 27, 28, 29, 30, 31]. Cette phosphorescence est due à la transition de l'état excité $^1\Delta_g$ vers l'état fondamental $^3\Sigma_g^-$. Le maximum d'émission en utilisant D_2O et H_2O est à 1274 nm [8, 32]. Les mesures de luminescence de l'oxygène singulet, comprenant la phosphorescence à 1270 nm, offrent de nombreux avantages dans la détection de transitions faibles et un grand nombre d'informations a été obtenu avec ces outils spectroscopiques [33, 34, 35, 36, 37].

Dans le cadre de notre étude sur l'oxydation des protéines par l'oxygène singulet, nous avons choisi la technique de spectroscopie de phosphorescence résolue en temps. Elle permet de mesurer le temps de vie de l'oxygène singulet en solution avec des tripeptides et des protéines à différentes concentrations. Ces temps de vie permettent par la suite de calculer les constantes de vitesse de réaction d'oxydation correspondantes.

Nous avons choisi de travailler en solution d'eau deutérée avec le bleu de méthylène comme photosensibilisateur pour générer l'oxygène singulet, Fig.1.4. Le bleu de méthylène est un colorant phénothiazinium avec une forte absorbance dans la gamme de 550-700 nm [3,38], dans D_2O, il a un rendement quantique Φ_Δ égal à 0,52 [12]. La durée de vie de l'oxygène singulet est plus longue dans l'eau deutérée que dans l'eau [33, 39], ainsi elle est de ~ 67 μs au lieu de $\sim 3{,}5$ μs dans l'eau [8, 37]. Cette durée de vie plus longue facilite l'étude de la phosphorescence émise par l'oxygène singulet.

L'oxygène singulet est généré par la photoexcitation des molécules du bleu de méthylène avec des impulsions laser à $\lambda = 532$ nm (le bleu de méthylène a une absorbance de 0,25 à 532 nm) suivie par un transfert d'énergie entre l'état triplet du bleu de méthylène et les molécules de dioxygène dissoutes à l'état fondamental suivant les équations :

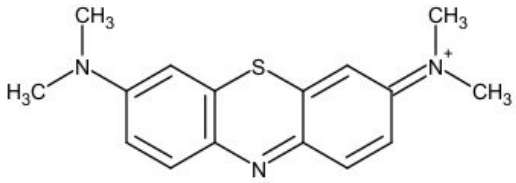

Figure 1.4 – Structure du bleu de méthylène.

$$BM\,(S_0) \xrightarrow{h\nu} BM\,^*(S_1) \xrightarrow{CIS} BM\,^*(T_1) \tag{1.27}$$

$$BM\,^*(T_1) + {}^3\mathrm{O}_2 \rightarrow BM\,(S_0) + {}^1\mathrm{O}_2 \tag{1.28}$$

avec BM le bleu de méthylène, S_0 l'état singulet fondamental, S_1 l'état singulet excité, CIS la conversion inter-système et T_1 l'état triplet excité. La phosphorescence de l'oxygène singulet à $\lambda = 1270$ nm a été utilisée pour mesurer son temps de vie.

1.2.2.1 Dispositif expérimental

Le faisceau laser utilisé comme source d'excitation pour les mesures cinétiques de phosphorescence est donné par le deuxième harmonique d'un laser Nd :Yag (Continuum, Excel technology) à une longueur d'onde de 532 nm, modèle Surelite II avec une fréquence de 10 Hz, une durée d'impulsion de 6 ns et une énergie maximale de 3 mJ. Le faisceau laser est dirigé à l'aide de miroirs et adapté aux conditions expérimentales utilisées comme représenté Fig.1.5.

La phosphorescence résolue en temps de l'oxygène singulet a été mesurée en utilisant un photomultiplicateur (PM) proche infra-rouge refroidi à -60°C (Hamamatsu H-10330) dont la sortie est reliée à un oscilloscope digital (Tektronix DPO 7254). L'échantillon (E) est placé dans une cuvette en quartz de 1 cm × 1 cm sur la trajectoire du faisceau laser. Le flux de photons de phosphorescence est collecté avec un angle de 90° par rapport au faisceau laser incident et fortement filtré pour éviter les longueurs d'ondes autres que 1270 nm par des arrangements optiques (lentille (L), diaphragme (D) et filtre (F) placés devant le photomultiplicateur proche infrarouge). Le déclenchement de l'oscilloscope est assuré par un signal TTL provenant de la source laser.

Pour chaque tripeptide ou protéine, une série de mesures de phosphorescence de l'oxygène singulet est réalisée. Une solution témoin est d'abord utilisée contenant du bleu de

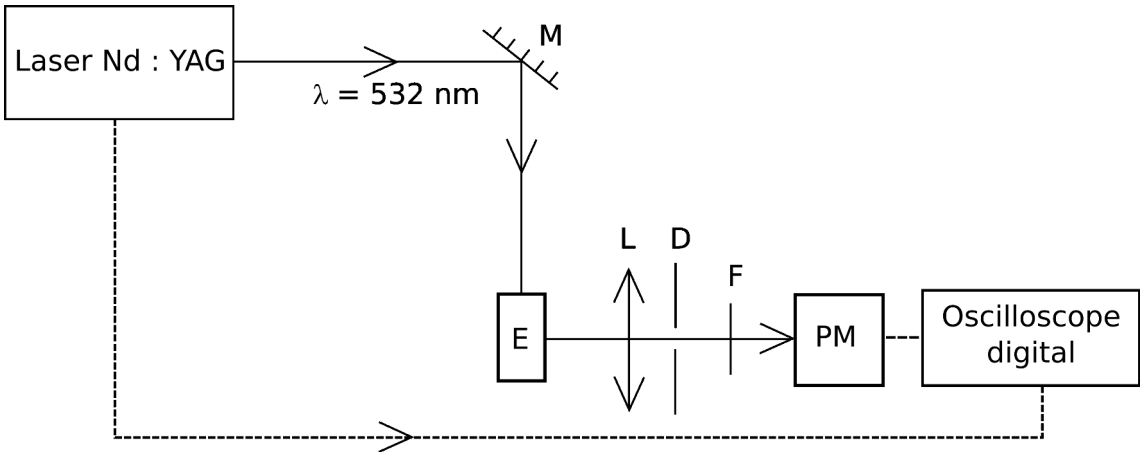

Figure 1.5 – Dispositif expérimental pour mesurer la phosphorescence de l'oxygène singulet en temps résolu.

méthylène à une concentration de 50 μM dans D_2O pour mesurer le temps de vie de l'oxygène singulet généré sans quencheur (tripeptide ou protéine) ajouté dans la solution. Puis, cinq solutions sont préparées avec une concentration constante de bleu de méthylène (50 μM) et une concentration croissante de tripeptide ou protéine. Toutes les solutions étant à base d'eau lourde, le pD des solutions a été ajusté à 7,4. D'après la théorie de Gross-Butler-Purlee [40,41,42], la relation entre les activités des ions H^+ et D^+ est donnée par l'équation :

$$pD = pH^* + 0,44 \tag{1.29}$$

avec pH^* la mesure directe du pH à l'aide d'un pH-mètre calibré pour H_2O dans une solution deutérée. Les six solutions décrites précédemment sont ensuite exposées l'une après l'autre au faisceau laser. Le spectre de phoshorescence de l'oxygène singulet est mesuré pour chacune d'elles et visualisé par l'oscilloscope digital relié au photomultiplicateur sur une moyenne de 1000 coups laser. Nous obtenons alors des courbes donnant l'intensité (relativement à la tension) en fonction du temps, comme celles présentées pour la β-lactoglobuline, figure 1.6.

Par définition, la durée de vie d'une espèce à l'état excité correspond au temps nécessaire pour que la concentration des molécules excitées diminue d'une valeur 1/e de sa valeur initiale, résultat de processus de désactivation du premier ordre. L'équation suivante donne l'expression de la constante de désactivation d'un état excité E, [22] :

$$-\frac{d[E]}{dt} = \left(\sum k_i\right)[E] \tag{1.30}$$

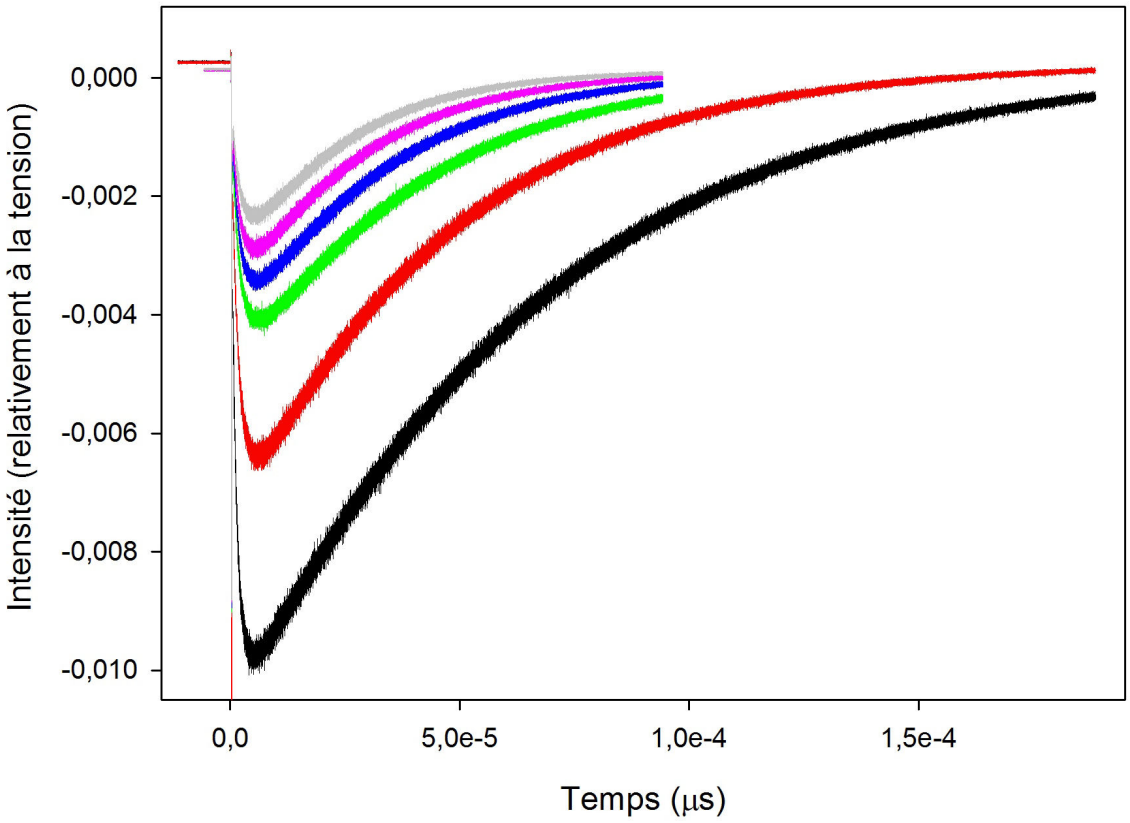

Figure 1.6 – Spectres représentant la caractéristique de décroissance de phosphorescence de l'oxygène singulet en présence de β-lactoglobuline à concentration croissante et une concentration de bleu de méthylène constante à 50 μM pour toutes les solutions mesurées. Représentée par la courbe noire, la solution ne contient pas de protéine, la courbe rouge est réalisée avec 20 μM de protéine, la courbe verte avec 40 μM, la courbe bleue avec 60 μM, la courbe rose avec 80 μM et la courbe grise est réalisée avec 100 μM de protéine.

avec $[E]$ la concentration de l'espèce excitée au temps t et k_i la constante de vitesse du premier ordre de processus de désactivation (luminescence, conversion interne, etc.). En intégrant cette équation nous avons :

$$[E] = [E]_0 \, e^{(\sum k_i \, t)} \tag{1.31}$$

où $[E]_0$ est la concentration initiale de l'espèce excitée E. Le temps de vie, τ, de l'espèce E est alors :

$$\tau = \frac{1}{\sum k_i} \tag{1.32}$$

Le temps de vie radiatif intrinsèque de l'espèce E est l'inverse de la constante de vitesse d'émission de luminescence, c'est ce temps de vie relatif à l'émission de phosphorescence qui nous intéresse. La concentration en espèce excitée, l'oxygène singulet, est proportionnelle au signal de phosphorescence mesuré. Le temps de vie de l'oxygène singulet est déterminé en modélisant la partie décroissante du signal de phosphorescence éphémère avec des fonctions mono-exponentielles. En effet, sur cette partie décroissante du signal, nous avons :

$$i_t = i_0 \, e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \tag{1.33}$$

avec i_t l'intensité du signal à l'instant t, i_0 l'intensité du signal à $t = 0$, t le temps et τ le temps de vie de l'oxygène singulet.

D'après Stern-Volmer, [43], dans le cas d'un seul quencheur Q, l'équation peut s'écrire comme :

$$k = k_0 + k[Q] \tag{1.34}$$

avec k la constante de vitesse de la réaction entre l'oxygène singulet et le quencheur, k_0 la constante de désactivation de l'oxygène singulet en l'absence de quencheur et $[Q]$ la concentration en quencheur. Cette relation peut aussi s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k[Q] \tag{1.35}$$

avec τ la durée de vie de l'oxygène singulet en présence du quencheur, τ_0 le temps de vie de l'oxygène singulet en l'absence de quencheur. La valeur de k est déduite de la représentation de $\frac{1}{\tau}$ en fonction de la concentration du quencheur $[Q]$.

En prenant l'exemple précédent de la β-lactoglobuline, le fait d'avoir mesuré la phosphorescence de l'oxygène singulet pour une série d'échantillons donne les temps de vie de celui-ci en fonction des concentrations de protéine. Ces données donnent par la suite accès à la constante de vitesse de réaction de l'oxygène singulet avec la protéine en solution (données présentées dans le chapitre *"Interaction des peptides et des protéines avec l'oxygène singulet"*).

Bibliographie

[1] E.B. Wilson JR., J.C. DECIUS et P.C. CROSS : *Molecular Vibrations. The theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra*. Dover Publications, Inc., New York, 1995.

[2] P.A. KOLLMAN, R. DIXON, W. CORNELL, T. FOX, C. CHIPOT et A. POHORILLE : *Computer Simulation of Biomolecular Systems, Vol. 3*. Elsevier, New York, 1997.

[3] M.C. DEROSA et R.J. CRUTCHLEY : Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, 233-234:351–371, 2002.

[4] G. HERZBERG : *Molecular spectra and Molecular Structure I : Spectra of Diatomic Molecules, 2nd ed.* VonNostrand, New York, 1950.

[5] D.B. MIN et J.M. BOFF : Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 1:58–72, 2002.

[6] D.B. MIN et H.O. LEE : *Flavor chemistry : thirty years of progress*, chapitre Chemistry of lipid oxidation, pages 175–187. New York : Kluwer Academic/plenum Publishers, 1999.

[7] M.L. DÁNTOLA, A.H. THOMAS, A.M. BRAUN, E. OLIVEROS et C. LORENTE : Singlet oxygen ($O_2(^1\triangle_g)$)quenching by dihydroproteins. *J. Phys. Chem. A*, 111: 4280–4288, 2007.

[8] J. BAIER, T. FUSS, C. PÖLLMANN, C. WIESMANN, K. PINDL, R. ENGL, D. BAUMER, M. MAIER, M. LANDTHALER et W. BÄUMLER : Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, 87:163–173, 2007.

[9] J. BAIER, M. MAIER, R. ENGL, M. LANDTHALER et W. BAUMLER : Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *J. Phys. Chem. B*, 109:3041–3046, 2005.

[10] A.A. KRASNOVSKY JR. : Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems : IR phosphorescence studies. *Membr. Cell Biol.*, 12:665–690, 1998.

[11] B.C. WILSON, M. OLIVO et G. SINGH : Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced

fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 65:166–176, 1997.

[12] K.K. CHIN, C.C. TREVITHICK-SUTTON, J. MCCALLUM, S. JOCKUSCH, N.J. TURRO, J.C. SCAIANO, C.S. FOOTE et M.A. GARCIA-GARIBAY : Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:6912–6913, 2008.

[13] J.R. KANOFSKY, J. WRIGHT, G.E. MILES-RICHARDSON et A.I. TAUBER : Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *J. Clin. Invest.*, 74:1489–1495, 1984.

[14] J.R. KANOFSKY, J. WRIGHT et A.I. TAUBER : Effect of ascorbic acid on the production of singlet oxygen by purified human myeloperoxidase. *FEBS Lett.*, 187: 299–301, 1985.

[15] J.R. KANOFSKY : Singlet oxygen production by lactoperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 258:5991–5993, 1983.

[16] J.R. KANOFSKY : Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, 263:14171–14175, 1988.

[17] J.R. KANOFSKY : Singlet oxygen production by chloroperoxidase-hydrogen peroxide-halide systems. *J. Biol. Chem.*, 259:5596–5600, 1984.

[18] J.R. KANOFSKY et B. AXELROD : Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 261:1099–1104, 1986.

[19] J.R. KANOFSKY, H. HOOGLAND, R. WEVER et S.J. WEISS : Singlet oxygen production by human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, 263:9692–9696, 1988.

[20] M.J. STEINBECK, A.U. KHAN et M.J. KARNOVSKY : Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.*, 268:15649–15654, 1993.

[21] M. TARR et D.P. VALENZENO : Singlet oxygen : the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2:355–361, 2003.

[22] A.M. BRAUN, M.-T. MAURETTE et E. OLIVEROS : *Photochemical Technology*. John Wiley and Sons, Chichester, 1991.

[23] J.G. PARKER et W.D. STANBRO : Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphyrin structure and solvent. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 170:259–284, 1984.

[24] C.E. WAYNE et R.P. WAYNE : *Photochemistry.* Oxford University Press, Oxford, 1996.

[25] P.B. MERKEL et D.R. KEARNS : Remarkable solvent effects on the lifetime of $^1\triangle_g$ oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 94:1029–1030, 1972.

[26] C.A. LONG et D.R. KEARN : Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. II. Temperature dependence and solvent effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 97:2018–2020, 1975.

[27] S. EGOROV, A. TAUBER, A.A. KRASNOVSKII, A.N. NIZHNIK, A. NOKEL et A.F. MIRONOV : Photogeneration of singlet molecular oxygen by the components of hematoporphyrin IX derivative. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 108:440–442, 1989.

[28] M.A.J. RODGERS et P.T. SNOWDEN : Lifetime of oxygen ($O_2(^1\triangle_g)$) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:5541–5543, 1982.

[29] L.K. ANDERSEN et P.R. OGILBY : Time-resolved detection of singlet oxygen in a transmission microscope. *Photochem. Photobiol.*, 73:489–492, 2001.

[30] D. BAUMER, M. MAIER, R. ENGL, R.M. SZEIMIES et W. BAUMLER : Singlet oxygen generation by 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) in solution. *Chem. Phys.*, 285:309–318, 2002.

[31] R. KILGER, M. MAIER, R.M. SZEIMIES et W. BAUMLER : Bidirectional energy transfer between the triplet T1 state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide. *Chem. Phys. Lett.*, 343:543–548, 2001.

[32] J.M. WESSELS et M.A.J. RODGERS : Effect of solvent polarizability on the forbidden $^1\triangle_g$ to $^3\sum_g$ transition in molecular oxygen : a Fourier transform near-infrared luminescence study. *J. Phys. Chem.*, 99:17586–17592, 1995.

[33] L.K. ANDERSEN et P.R. OGILBY : Absorption spectrum of singlet oxygen in D_2O : enabling the test of a model for the effect of solvent on oxygen's radiative transitions. *J. Phys. Chem. A*, 106:11064–11069, 2002.

[34] A.A. GORMAN et M.A.J. RODGERS : *J.C. Scaiano (Ed.), Handbook of Organic Photochemistry, Vol. 2.*, pages 229–247. CRC Press : Boca Raton, FL, 1989.

[35] D. WELDON, T.D. POULSEN, K.V. MIKKELSEN et P.R. OGILBY : Singlet sigma : The "other" singlet oxygen in solution. *Photochem. Photobiol.*, 70:369–379, 1999.

[36] F. WILKINSON, W.P. HELMAN et A.B. ROSS : Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 22:113–262, 1993.

[37] F. WILKINSON, W.P. HELMAN et A.B. ROSS : Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24:663–1021, 1995.

[38] R.W. REDMOND et J.N. GAMLIN : A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.*, 70:391–475, 1999.

[39] P.R. OGILBY et C.S. FOOTE : Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ($^1\triangle_g$) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:2069–2070, 1982.

[40] A. KRĘŻEL et W. BAL : A formula for correlating pk_a values determined in D_2O and H_2O. *J. Inorg. Biochem.*, 98:161–166, 2004.

[41] K. MIKKELSEN et S.O. NIELSEN : Acidity measurements with the glass electrode in H_2O-D_2O mixtures. *J. Phys. Chem.*, 64:632–637, 1960.

[42] E.L. PURLEE : On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 81:263–269, 1959.

[43] O. STERN et M. VOLMER : Über die Abklingzeit der Fluoreszenz. *Physik. Zeitschr.*, 20:183–188, 1919.

Chapitre 2

Attribution des bandes Raman des résidus d'acides aminés dans les protéines

Sommaire

2.1 Introduction 39

2.2 Attribution des bandes Raman des tripeptides 40

2.2.1 Contribution du squelette des tripeptides : cas des Gly, GlyGly et GlyGlyGly 40

2.2.2 Attribution des bandes des tripeptides 48

2.2.2.1 GlyPheGly, GlyTyrGly et GlyTrpGly 48

2.2.2.2 GlyLeuGly 57

2.2.2.3 GlyMetGly 58

2.2.2.4 GlyHisGly et GlyLysGly 62

2.3 Attribution des bandes Raman des protéines 67

2.3.1 Résidu phénylalanine 68

2.3.2 Résidu tyrosine 69

2.3.3 Résidu tryptophane 71

2.3.4 Résidu leucine 73

2.3.5 Résidu méthionine 74

2.3.6 Résidu histidine 74
2.3.7 Résidu lysine 74
2.4 Conclusions 75

Ce chapitre présente l'attribution des bandes Raman des chaînes latérales de quelques résidus d'acides aminés dans les protéines. Cette attribution est essentielle pour l'utilisation de la spectroscopie Raman dans l'étude des réactions chimiques des protéines.

2.1 Introduction

Lorsque les acides aminés ($NH_2-C(H)R-COOH$) se combinent via des liaisons peptidiques pour former des protéines, ce sont les propriétés de leurs chaînes latérales (R) qui vont déterminer la spécificité de la conformation et de la fonction de la protéine. De plus, les chaînes latérales des acides aminés sont les cibles préférentielles de réactifs variés participant à la biochimie de la cellule [1]. En conséquence, les changements dans leur bandes vibrationnelles donnent des informations précieuses lorsque les mécanismes de réaction des protéines sont étudiés. Ces changements peuvent être suivis par spectroscopie Raman et infra-rouge qui sont des techniques non destructives importantes utilisées pour la caractérisation structurelle des peptides et des protéines [2, 3, 4, 5, 6]. Cependant, les spectres Raman des protéines sont souvent difficiles à analyser à cause de leur structures complexes. En outre, il a été bien démontré qu'à la fois l'intensité relative et la fréquence des bandes Raman du squelette du polypeptide et des chaînes latérales sont sensibles aux changements chimiques et au micro-environnement autour des groupes fonctionnels. Par exemple, l'effet de changements conformationnels sur les ponts disulfure et de l'implication des résidus tyrosine dans les liaisons hydrogène sont bien connus [7, 8, 9].

Les spectres vibrationnels des acides aminés libres en solution aqueuse sont souvent utilisés pour déchiffrer la complexité des spectres de protéine [10, 11, 12, 13]. Plus récemment, des attributions détaillées des bandes vibrationnelles des acides aminés basées sur des calculs *ab initio* ont été rapportées [11, 12, 13, 14]. Cependant, il y a très peu d'études qui s'intéressent aux spectres Raman de di- ou tripeptides ou encore d'études qui ont pour but de déterminer comment les bandes Raman des chaînes latérales des acides aminés sont affectées par l'environnement du peptide [15, 16, 17]. C'est pourtant une étape nécessaire pour une attribution non ambigüe des bandes Raman des protéines. Dans ce chapitre nous donnons les spectres détaillés d'une série de tripeptides de formule basique Gly-AA-Gly pour lesquels l'acide aminé (AA) varie et est alternativement la glycine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Les acides aminés centraux aromatiques ont été sélectionnés car leurs bandes Raman sont intenses et

participent de manière significative aux spectres Raman des protéines. Les autres acides aminés centraux ont été choisis à cause de leur abondance dans la séquence des protéines analysées ici.

L'étude est focalisée sur les bandes Raman des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. Leurs bandes ont été séparées avec attention de la contribution de celles du squelette des tripeptides de manière à être utilisées par la suite dans l'attribution de bandes Raman de protéines. Cette attribution a été finalement réalisée avec trois protéines modèles, l'albumine sérique bovine (ou BSA, bovine serum albumin), le lysozyme et la β-lactoglobuline. Tous les spectres Raman étant réalisés avec le même dispositif expérimental, l'attribution des bandes Raman des spectres des protéines a été basée non seulement sur leur fréquences, comme c'est le cas habituellement, mais aussi sur les intensités des bandes correspondantes observées dans les spectres des tripeptides.

2.2 Attribution des bandes Raman des tripeptides

2.2.1 Contribution du squelette des tripeptides : cas des Gly, GlyGly et GlyGlyGly

Afin de séparer correctement la contribution du squelette du tripeptide (correspondant ici aux deux résidus glycine ainsi qu'aux deux liaisons peptidiques reliant les trois acides aminés entre eux) dans le spectre Raman des différents tripeptides analysés, nous avons réalisé une étude préliminaire avec la série suivante : l'acide aminé glycine libre, le dimère GlyGly et le trimère GlyGlyGly dont les structures sont présentées Fig.2.1. Les spectres Raman expérimentaux et théoriques correspondants, sont présentés Fig.2.2 et Fig.2.3, respectivement. Comme pour tous les tripeptides étudiés ici, la gamme spectrale explorée est de 400 à 1800 cm^{-1} car cette région donne les informations sur les modes vibrationnels du squelette ainsi que sur ceux de la chaîne latérale.

Dans la configuration expérimentale utilisée, la résolution spectrale est de 7 cm^{-1}, ce qui correspond à la largeur à mi-hauteur du pic de l'azote dans l'air. Pour une bande Raman isolée de protéine et d'acide aminé en solution aqueuse, la largeur à mi-hauteur est d'environ 20 cm^{-1}. La détermination avec précision de la position du maximum d'intensité de la bande se fait à l'aide d'un traitement avec une fonction Lorentzienne pour les bandes

Raman bien résolues ce qui donne la position de la bande étudiée avec une erreur inférieure à 0,5 cm^{-1}. Dans le cas de bandes moins bien résolues, les maximums d'intensité ont été évalués visuellement avec une reproductibilité de $\pm$ 2cm^{-1}.

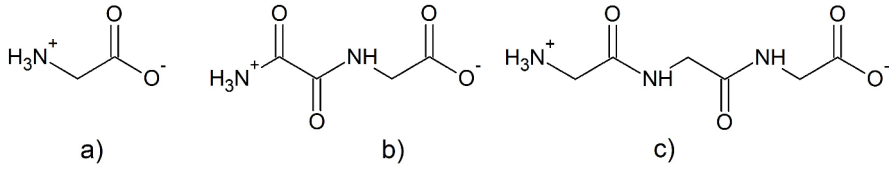

Figure 2.1 – Structures de l'acide aminé glycine à pH 7, a), du dipeptide GlyGly à pH 7, b) et du tripeptide GlyGlyGly à pH 7, c).

Le spectre Raman de la glycine est relativement simple contenant des pics bien définis et peu nombreux et dont les positions sont en bon accord avec celles rapportées précédemment [12,17]. L'attribution détaillée des bandes issus des calculs *ab initio* pour la glycine, GlyGly et GlyGlyGly est donnée dans les tableaux 2.1, 2.2 et 2.3, respectivement.

Les bandes Raman théoriques sont calculées en utilisant le programme Gaussian 09 [18]. Une optimisation complète de la géométrie de toutes les molécules est réalisée en utilisant la méthode DFT utilisant la fonctionnelle hybride à trois paramètres de Becke combinée à la fonctionnelle de corrélation de Lee, Yang et Parr (B3LYP) [19, 20] avec l'ensemble de fonctions de base 6-311+G(2df, 2pd). Les fréquences vibrationnelles sont alors calculées au même niveau de théorie pour toutes les molécules étudiées. Tous les calculs sont réalisés en solution aqueuse en utilisant le modèle continu de solvatation (ou PCM pour Polarizable Continuum Model) [21]. L'analyse du mode normal en termes de coordonnées internes est fourni par Gaussian 09 et visualisé par le logiciel Chemcraft 1.6 utilisant un élargissement lorentzien de 15 cm^{-1} pour la largeur à mi-hauteur [22]. Le but des calculs étant d'aider à interpréter les spectres expérimentaux (plutôt que de les reproduire avec précision), seul le conformère le plus stable de chaque molécule est considéré. Les coordonnées cartésiennes des structures obtenues sont données en annexe. Il est supposé ici que les déplacements de pics probables, dus aux variations de la structure du squelette des molécules ne sont pas suffisamment significatifs pour empêcher une attribution fiable des bandes expérimentales.

L'addition d'une ou deux glycines modifie significativement les spectres Raman obtenus. Pour la glycine seule, une bande intense est observée à 899 cm^{-1} et elle a été attribuée à l'élongation ν(CC) (apparaissant à 865 cm^{-1} dans le spectre calculé). L'addition d'une ou deux glycines modifie considérablement cette bande : pour le dipeptide et le tripep-

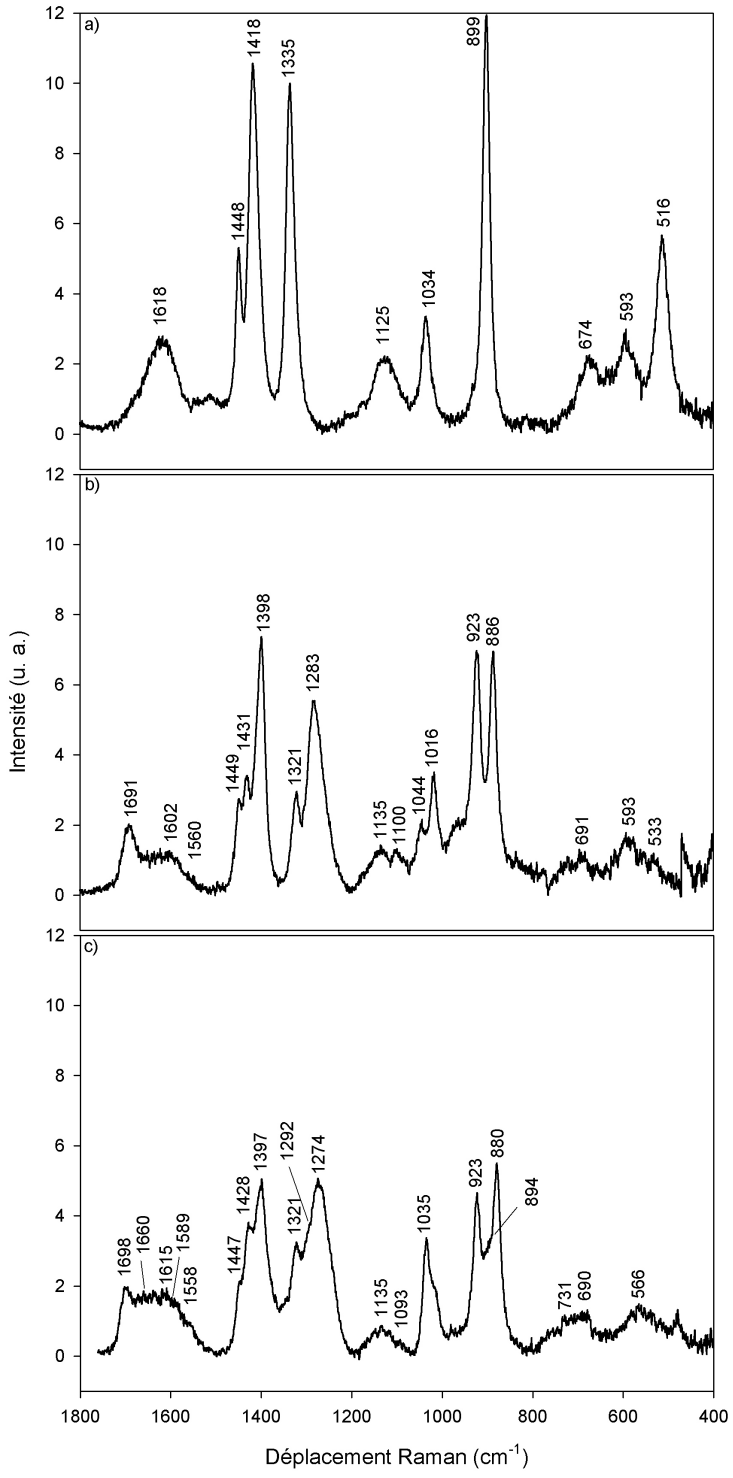

Figure 2.2 – Spectres Raman expérimentaux de la glycine à une concentration de 120 mM a), du dipeptide GlyGly à une concentration de 60 mM b) et du tripeptide GlyGlyGly c) à une concentration de 40 mM dans des solutions aqueuses à pH 7.

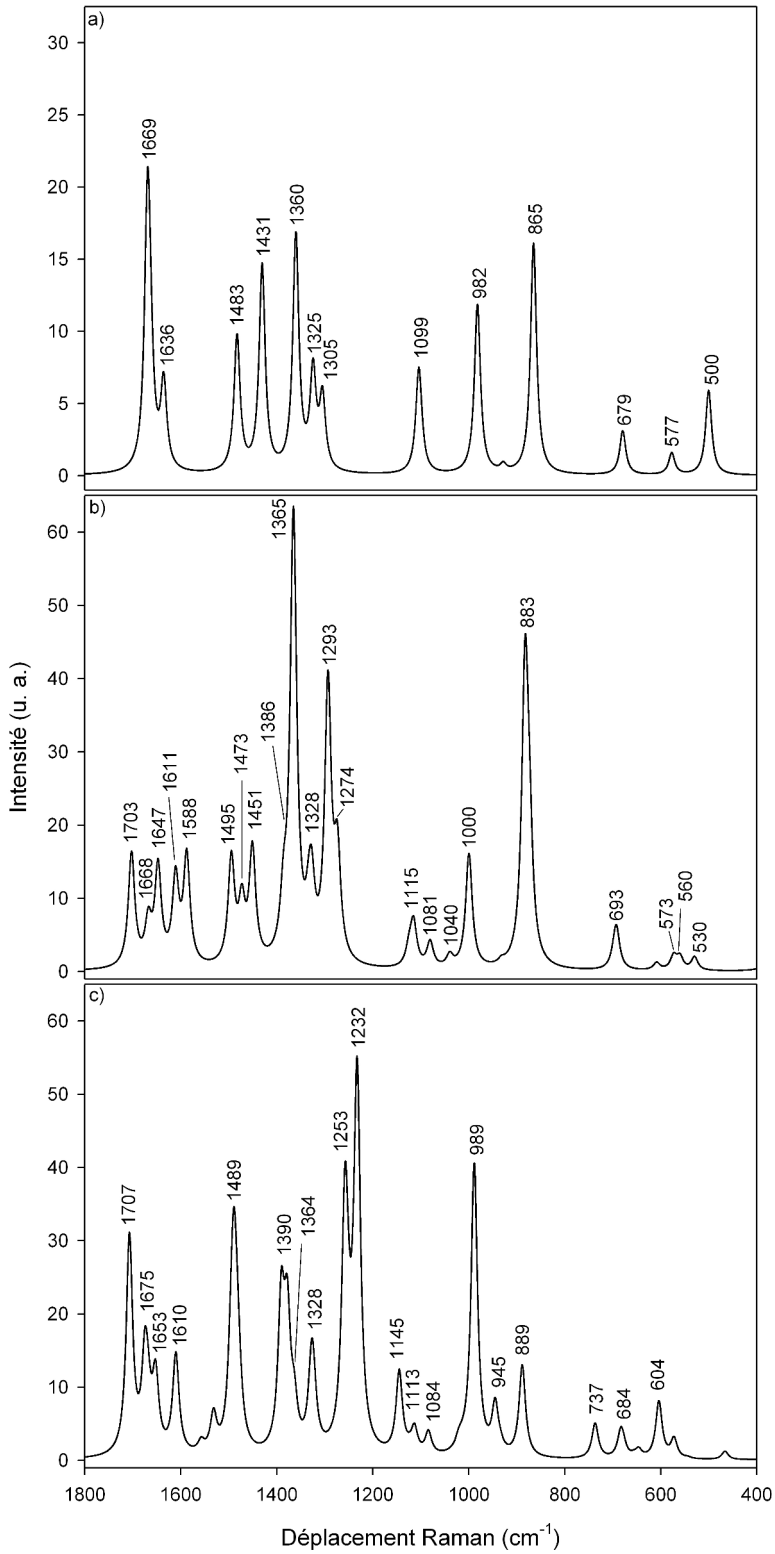

Figure 2.3 – Spectres Raman calculés de la glycine a), du dipeptide GlyGly b) et du tripeptide GlyGlyGly c). Le niveau de théorie utilisé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

Expérimental	Calculé	Mode
516	500	δ(OCC), δ(NCC)
593	577	ν(CO), $\zeta(CH_2)$
674	679	ν(CC), δ(OCO)
899	865	ν(CC)
1034	982	ν(CN)
1125	1099	$\tau(NH_3^+)$, $\tau(CH_2)$
	1104	$\gamma(CH_2)$, $\gamma(NH_3^+)$
1335	1305	$\tau(CH_2)$, $\tau(NH_3^+)$
	1325	ν(CC), $\gamma(CH_2)$
	1360	ν(CC), δ(OCO)
1418	1431	$\nu_s(COO^-)$, $\gamma(NH_3^+)$
1448	1483	$\sigma(CH_2)$
1618	1636	$\sigma(NH_3^+)$
	1663	$\tau(NH_3^+)$
	1669	ν_a(CO)

Tableau 2.1 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle de l'acide aminé glycine libre. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement.

tide deux bandes intenses sont localisées dans la même région, à 886 et 923 cm^{-1} pour le dipeptide et 880 et 923 cm^{-1} pour le tripeptide. Comme montré dans les tableaux, la première de ces bandes est attribuée à l'élongation de la liaison CC en alpha de l'amine terminale à la fois pour le di- et tripeptide. La bande située à 923 cm^{-1} est aussi attribuée à une élongation CC. Pour le dipeptide, cela correspond à l'élongation de la liaison CC en alpha du carboxyle terminal tandis que pour le tripeptide, l'élongation concerne la liaison CC centrale (Fig.2.1). La bande à 923 cm^{-1} est une caractéristique commune à tous les spectres Raman des tripeptides et son équivalent théorique est localisé autour de 1000 cm^{-1}.

Tableau 2.2 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du dipeptide GlyGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du dipeptide, ν pour une élongation, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, σ pour un cisaillement et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement.

Expérimental	Calculé	Mode
533	530	β(NH)
578	560	$\zeta(CH_2)_{COO^-}$, δ(squel.)
593	573	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\zeta(CH_2)_{COO^-}$, δ(squel.)
691	693	δ(CCN), δ(OCO), δ(squel.)
	697	δ(CCN), δ(squel.)
886	874	$\nu(CC)_{NH_3^+}$, $\zeta(CH_2)_{COO^-}$
	883	$\nu(CC)_{COO^-}$
923	1000	$\nu(CN)_{COO^-}$, $\nu(CN)_{NH_3^+}$
1016	1040	$\zeta(CH_2)_{COO^-}$
1044	1081	$\nu(CN)_{COO^-}$, $\nu(CN)_{NH_3^+}$
1100	1115	$\delta(NH_3{}^+)$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
1135	1124	$\tau(CH_2)_{NH_3^+}$, $\tau(NH_3{}^+)$
1283	1274	$\tau(CH_2)_{COO^-}$, δ(CNH)
	1293	$\tau(CH_2)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$, δ(squel.)
1321	1328	$\tau(CH_2)_{NH_3^+}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
	1333	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\tau(CH_2)_{NH_3^+}$
1398	1365	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\sigma(CH_2)_{COO^-}$
	1386	$\nu(CC)_{NH_3^+}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
1431	1451	$\sigma(CH_2)_{COO^-}$
1449	1473	$\gamma(NH_3{}^+)$, $\sigma(CH_2)_{NH_3^+}$
	1495	$\sigma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\gamma(NH_3{}^+)$
1560	1588	$\nu(CN)_{peptide}$, δ(CNH)
1602	1611	$\nu_a(CO)_{COO^-}$
	1647	$\sigma(NH_3{}^+)$
	1768	$\sigma(NH_3{}^+)$

Suite à la page suivante

Tableau 2.2 – Suite du tableau d'attribution de GlyGly.

Expérimental	Calculé	Mode
1691	1703	ν(CO), $\sigma(NH_3{}^+)$
Fin du tableau d'attribution de GlyGly.		

Il y a deux autres bandes Raman intenses dans le spectre de la glycine, à 1335 et 1418 cm^{-1}. D'après l'analyse théorique, la première est attribuée à la torsion des groupes $NH_3{}^+$ et CH_2. La deuxième bande à 1418 cm^{-1} correspond à l'élongation du groupement COO^- couplé au balancement hors du plan du groupement $NH_3{}^+$. Enfin, un pic de faible intensité mais néanmoins bien défini est trouvé à 1448 cm^{-1}. Ce pic est dû au cisaillement du groupe CH_2. Comme il peut être vu dans la figure 2.2, des bandes similaires donnant naissance à la bande amide III sont aussi indexées dans les spectres Raman du dipeptide et du tripeptide. Elles sont moins bien résolues et sont déplacées à des fréquences plus faibles lorsqu'elles sont comparées aux bandes du spectre de la glycine. Dans le tableau 2.3, ces bandes sont associées à la torsion, au balancement hors du plan et au cisaillement des différents groupes CH_2 ainsi qu'à la déformation du groupe CNH. Dans le cas de GlyGly et de GlyGlyGly le balancement hors du plan du groupe NH_3^+ est couplé au cisaillement des groupes CH_2 générant les vibrations observées à 1449 et 1428 cm^{-1}, respectivement. Cette attribution est en bon accord avec d'autres résultats publiés [23]. La bande intense à 1398 cm^{-1} pour GlyGly et 1397 cm^{-1} pour GlyGlyGly est le résultat de la combinaison de l'élongation symétrique du groupe carboxyle avec l'élongation de la liaison CC et le balancement hors du plan du groupe CH_2.

Tableau 2.3 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyGlyGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ζ pour un balancement dans le plan, τ pour une torsion, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, δ pour une déformation, ν pour une élongation, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement, β pour une déformation de pliage et l'indice a pour un mouvement antisymétrique, respectivement.

Expérimental	Calculé	Mode
566	604	$\zeta(CH_2)_{COO^-}$, $\tau(CH_2)_{squel.}$
690	684	δ(squel.), δ(CCN)
		Suite à la page suivante

Tableau 2.3 – Suite du tableau d'attribution de GlyGlyGly

Expérimental	Calculé	Mode
731	737	δ(squel.), δ(CCN)
880	889	$\nu(CC)_{COO^-}$
894	945	$\nu(CC)_{NH_3^+}$
923	989	$\nu(CC)_{squel.}$
1035	1084	$\nu(CN)_{COO^-}$, $\nu(CN)_{squel.}$
1093	1113	$\gamma(NH_3^+)$
1135	1145	$\tau(CH_2)_{COO^-}$
1274	1232	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{squel.}$, δ(CNH)
	1237	$\tau(CH_2)_{COO^-}$
1292	1253	$\tau(CH_2)_{squel.}$
	1258	β(NH), $\gamma(CH_2)_{squel.}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
1321	1323	$\tau(CH_2)_{NH_3^+}$, $\tau(NH_3^+)$
	1328	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{squel.}$
1345	1364	$\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\gamma(CH_2)_{squel.}$, β(NH)
1397	1378	ν_s $(COO^-)_{COO^-}$, $\nu(CC)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
	1391	$\nu(CC)_{NH_3^+}$,δ (CNH), $\gamma(CH_2)_{squel.}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
1428	1478	$\sigma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\sigma(CH_2)_{squel.}$, γ (NH_3^+)
1447	1483	$\sigma(CH_2)_{COO^-}$
	1489	$\sigma(CH_2)_{squel.}$, $\sigma(CH_2)_{NH_3^+}$
	1495	$\gamma(NH_3^+)$, $\nu(CN)_{NH_3^+}$,$\sigma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\sigma(CH_2)_{squel.}$
1558	1532	$\beta(NH)_{COO^-}$, $\nu(CN)(COO^-)$
1589	1610	$\nu_a(COO^-)_{COO^-}$
1615	1653	$\sigma(NH_3^+)$
	1668	$\sigma(NH_3^+)$
1660	1675	$\nu(CO)_{squel.}$, $\sigma(NH_3^+)$
1698	1707	$\nu(CO)_{NH_3^+}$, $\sigma(NH_3^+)$
Fin du tableau d'attribution de GlyGlyGly		

Les bandes les plus larges observées dans le spectre du tripeptide sont le résultat d'un chevauchement de pics similaires. Ces pics appartiennent à des résidus glycine distincts vibrant à des fréquences légèrement différentes les unes des autres. Ainsi, comme attendu par l'addition de plusieurs acides aminés, les bandes amide I et amide II sont plus im-

portantes dans le spectre du tripeptide. Pour le tripeptide, deux pics sont présents dans le domaine spectral de la bande amide II. Le premier, situé à 1558 cm^{-1} est un mélange de déformation de pliage du groupe NH avec l'élongation du groupe CN. Le deuxième pic, situé à 1589 cm^{-1} est attribué à l'élongation asymétrique du groupe carbonyle ce qui est en bon accord avec une autre étude [24]. Trois bandes sont clairement identifiables au niveau de la bande amide I située entre 1600 et 1700 cm^{-1}. La bande à 1615 cm^{-1} est assignée au cisaillement des groupes NH_3^+ et les deux bandes à 1660 et 1698 cm^{-1} montrent une association de deux modes, l'élongation des groupes C=O et le cisaillement du groupe NH_3^+, ainsi que pour Sieler et al [24].

2.2.2 Attribution des bandes des tripeptides

Les spectres Raman expérimentaux et théoriques des tripeptides choisis sont analysés ici afin de pouvoir attribuer les bandes caractéristiques des chaînes latérales des résidus d'acides aminés centraux des tripeptides.

2.2.2.1 GlyPheGly, GlyTyrGly et GlyTrpGly

Les acides aminés aromatiques phénylalanine et tryptophane sont deux des neuf acides aminés essentiels requis pour la croissance humaine. La tyrosine qui est le troisième acide aminé aromatique analysé ici est synthétisé à partir de la phénylalanine et fait partie des acides aminés dits "conditionnellement essentiels" [25]. La structure de ces trois tripeptides est présentée figure 2.4.

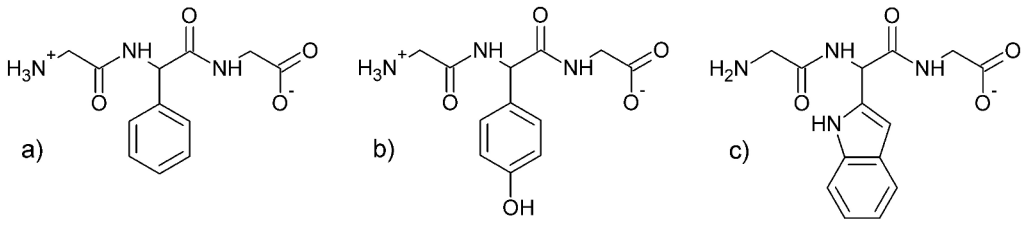

Figure 2.4 – Structures des tripeptides GlyPheGly à pH 7 a), GlyTyrGly à pH 7 b) et GlyTrpGly à pH 11 c).

L'acide aminé aromatique le plus simple est la phénylalanine. Les spectres Raman théorique et expérimental pour le tripeptide correspondant sont donnés figure 2.5. Le pic le plus intense est celui situé à 1006 cm^{-1}. Il est légèrement déplacé vers le bleu par rapport

à la bande de l'acide aminé phénylalanine libre dont la fréquence a été déjà rapportée à 1004 ou 1005 cm^{-1} dans des études précédentes [10,11,25]. En nous basant sur les calculs théoriques, nous avons attribué cette bande à la respiration du cycle benzénique, en accord avec d'autres travaux [11,16,25].

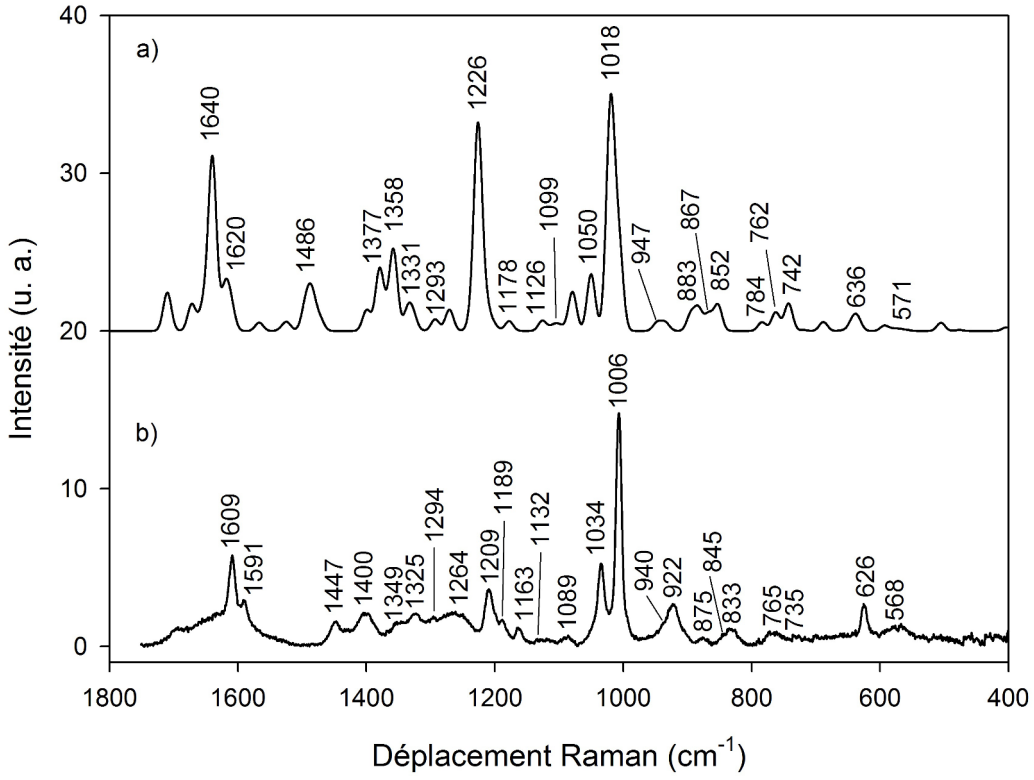

Figure 2.5 – Spectres Raman du tripeptide GlyPheGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM dans une solution aqueuse à un pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

Nous avons trouvé d'autres bandes importantes pour GlyPheGly et qui sont largement associées au cycle aromatique. Ces bandes sont situées à 626, 1034, 1609 cm^{-1}. La bande à 626 cm^{-1} est attribuée à la respiration symétrique du cycle tandis que celle à 1034 cm^{-1} est associée à la déformation de pliage des groupements CH au niveau du cycle aromatique. Enfin, la bande à 1609 cm^{-1} est liée à la déformation du cycle aromatique, notamment à l'élongation CC. Elle contient aussi une contribution de la torsion du groupe CH_2 de la chaîne latérale de la phénylalanine. De telles attributions sont en bon accord avec de précédents travaux [11,16,25]. Cependant, à l'instar de la bande à 1006 cm^{-1}, ces pics, qui sont tous associés au cycle aromatique, sont tous déplacés vers des fréquences plus élevées (d'à peu près 4 cm^{-1}) que celles obtenues pour la phénylalanine libre [10,11,25].

Finalement, une autre bande relativement intense est présente à 1209 cm^{-1}. Nos calculs

attribuent cette bande à deux modes normaux quasi-dégénérés : l'un combinant l'élongation CC de la chaîne latérale de la phénylalanine avec la déformation du cycle aromatique, et l'autre combinant la torsion du groupe CH_2 dans la chaîne de la phénylalanine couplée avec la déformation du groupe CNH dans la chaîne du tripeptide. Le tableau 2.4 donne l'attribution complète des vibrations associées au résidu phénylalanine du tripeptide.

Tableau 2.4 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyPheGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration relative au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ν pour l'élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, ζ pour un balancement dans le plan, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan et σ pour un cisaillement, respectivement.

Expérimental	Calculé	Mode
568	571	$\delta(\mathrm{CCN})_{squel.}$, δ(squel.), δ(cycle)
626	636	δ(cycle)
735	742	β(NH), δ(cycle)
765	762	δ(squel.), δ(cycle)
790	784	$\delta(\mathrm{CH})_{cycle}$
833	852	$\nu_a(\mathrm{CC})_{Phe}$
845	867	$\beta(\mathrm{CH})_{cycle}$
875	883	$\zeta(\mathrm{CH_2})_{Phe}$, $\delta(\mathrm{CH})_{cycle}$
940	947	$\beta(\mathrm{CH})_{cycle}$
1006	1018	$\nu(\mathrm{CC})_{Phe}$, δ(cycle)
	1020	$\nu(\mathrm{CC})_{Phe}$, δ(cycle)
	1023	$\nu(\mathrm{CC})_{Phe}$, $\beta(\mathrm{CH})_{cycle}$
1034	1050	δ(cycle)
1089	1099	δ(cycle), $\nu(\mathrm{CN})_{\mathrm{COO^-}}$
1132	1126	$\nu(\mathrm{CN})_{squel.}$, $\nu(\mathrm{CN})_{\mathrm{COO^-}}$, $\tau(\mathrm{CH_2})_{Phe}$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
1163	1178	$\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
1188	1202	$\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
	1213	δ(CNH), β(CH), $\tau(\mathrm{CH_2})_{Phe}$
1209	1226	$\nu(\mathrm{CC})_{Phe}$, δ(cycle)
	1227	δ(CNH), $\tau(\mathrm{CH_2})_{Phe}$
Suite à la page suivante		

Tableau 2.4 – Suite du tableau d'attribution de GlyPheGly

Expérimental	Calculé	Mode
1294	1293	$\delta(\mathrm{CCH})_{Phe}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{COO^-}}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{NH_3^+}}$
	1331	$\nu_a(\mathrm{CC})_{cycle}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{COO^-}}$, $\delta(\mathrm{CCH})$
1325	1336	$\delta(\mathrm{cycle})$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{COO^-}}$, $\beta(\mathrm{CH})$
1349	1358	$\gamma(\mathrm{CH_2})_{Phe}$, $\delta(\mathrm{CCH})$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
	1367	$\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{NH_3^+}}$, $\delta(\mathrm{CCH})$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
1400	1377	$\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{NH_3^+}}$, $\delta(\mathrm{CCH})$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
1447	1486	$\sigma(\mathrm{CH_2})_{Phe}$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
	1488	$\sigma(\mathrm{CH_2})_{Phe}$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle}$
1591	1620	$\delta(\mathrm{cycle})$
1609	1640	$\delta(\mathrm{cycle})$
Fin du tableau d'attribution de GlyPheGly		

La tyrosine a une structure identique à celle de la phénylalanine, en dehors du groupement OH supplémentaire au niveau du cycle aromatique. Cependant, en comparant les figures 2.5 et 2.6, les deux spectres Raman théoriques et expérimentaux de GlyPheGly et GlyTyrGly différent de manière significative. Comme pour la phénylalanine, les pics les plus intenses du spectre expérimental de GlyTyrGly sont associés aux vibrations du cycle aromatique (Tableau.2.5). Le pic à 647 $\mathrm{cm^{-1}}$ correspond au mode de respiration symétrique du cycle qui est déplacé de manière significative vers le bleu par rapport à la bande similaire à 626 $\mathrm{cm^{-1}}$ de GlyPheGly.

Les deux bandes à 833 et 856 $\mathrm{cm^{-1}}$ sont les vibrations caractéristiques du doublet de Fermi de la tyrosine. La deuxième bande à 856 $\mathrm{cm^{-1}}$ est déplacée vers une fréquence un peu plus élevée comparée à celle de l'acide aminé tyrosine libre [10, 11]. Notre approche théorique ne prend pas en compte la résonance de Fermi donc ici l'équivalent du doublet de Fermi suivant cette approche est une bande unique. D'après nos calculs, cette bande se situe à 849 $\mathrm{cm^{-1}}$. C'est une combinaison de la déformation de pliage des groupes CH appartenant au cycle aromatique avec le mode de respiration du cycle, en accord avec de précédents résultats [11, 26, 27].

Le pic à 1212 $\mathrm{cm^{-1}}$ est aussi remarquable dans le spectre expérimental. Il est dû à un mode normal combinant la déformation de pliage des groupes CH du cycle aromatique avec

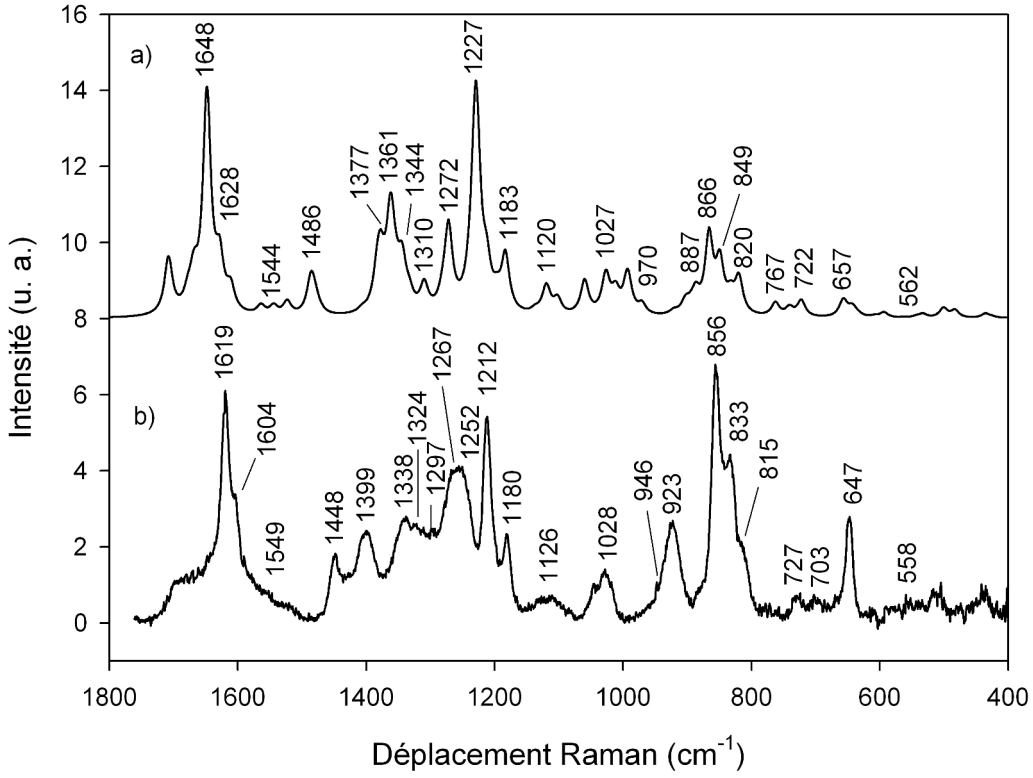

Figure 2.6 – Spectres Raman du tripeptide GlyTyrGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 20 mM dans une solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

l'élongation CC de la chaîne aliphatique de la tyrosine. Ce pic à 1212 cm^{-1} de GlyTyrGly est similaire à celui observé à 1209 cm^{-1} pour GlyPheGly. Enfin, la bande intense à 1619 cm^{-1} est attribuée à l'élongation CC au sein du cycle aromatique (Tableau.2.5).

Tableau 2.5 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyTyrGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, et σ pour un cisaillement, respectivement.

Expérimental	Calculé	Mode
558	562	$\delta(\mathrm{CNH})_{squel.}$, δ(squel.), $\beta(\mathrm{CH})_{cycle}$
Suite à la page suivante		

Tableau 2.5 – Suite du tableau d'attribution de GlyTyrGly

Expérimental	Calculé	Mode
647	643	β(NH)
	657	δ(cycle)
703	722	δ(cycle), β(NH)
727	741	δ(squel.), δ(cycle)
	762	δ(squel.), δ(cycle)
815	819	δ(cycle), $\delta(CCC)_{squel.}$
833	832	$\beta(CH)_{cycle}$
	849	$\beta(CH)_{cycle}$, $\zeta(CH_2)_{Tyr}$
856	866	$\nu_a(CC)_{Tyr}$, δ(cycle)
	887	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\zeta(CH_2)_{Tyr}$, $\beta(CH)_{Tyr}$
923	903	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\nu(CC)_{NH_3^+}$, $\zeta(CH_2)_{Tyr}$, $\beta(CH)_{cycle}$
946	970	$\beta(CH)_{cycle}$
	990	$\beta(CH)_{cycle}$
1028	1027	$\nu(CN)_{NH_3^+}$, $\nu(CC)_{Tyr}$, $\zeta(CH_2)_{Tyr}$
1111	1120	$\delta(CCH)_{cycle}$, $\delta(COH)_{Tyr}$
1126	1137	$\nu(CN)_{centre}$, $\delta(CCH)_{cycle}$, $\delta(COH)_{Tyr}$
1181	1183	δ(COH)
	1196	$\delta(CCH)_{cycle}$
	1212	δ(CNH), β(CH), $\tau(CH_2)_{Tyr}$
1212	1227	$\nu(CC)_{Tyr}$
	1230	$\tau(CH_2)_{Tyr}$, δ(CNH), $\delta(CCH)_{cycle}$, δ(OH)
1267	1272	$\nu(CO)_{Tyr}$, δ(cycle)
	1280	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, δ(NH), $\delta(CH)_{Tyr}$
1297	1310	δ(CNH), $\delta(CCH)_{Tyr}$
1324	1344	$\nu_a(CC)_{cycle}$, $\delta(CCH)_{cycle}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\beta(CH)_{Tyr}$
1338	1361	$\gamma(CH_2)_{Tyr}$, β(CH), δ(cycle), δ(COH), $\tau(CH_2)_{NH_3^+}$
	1367	$\delta(CCH)_{cycle}$, δ(COH), δ(CCH)
1399	1377	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\tau(CH_2)_{Tyr}$
1448	1486	$\sigma(CH_2)_{Tyr}$
1521	1523	$\nu(CN)_{peptide}$
1549	1544	$\gamma({NH_3}^+)$, $\delta(CCH)_{cycle}$

Suite à la page suivante

Tableau 2.5 – Suite du tableau d'attribution de GlyTyrGly

Expérimental	Calculé	Mode
1604	1611	$\nu_a(\mathrm{CC})_{\mathrm{COO^-}}$
1619	1628	$\nu(\mathrm{CC})_{cycle}$, $\delta(\mathrm{COH})$
	1648	$\nu(\mathrm{CC})_{cycle}$, $\delta(\mathrm{COH})$
Fin du tableau d'attribution de GlyTyrGly		

Les spectres expérimental et théorique obtenus pour GlyTrpGly sont montrés figure 2.7, tandis que le tableau 2.6 détaille les modes normaux associés à la chaîne latérale du tryptophane.

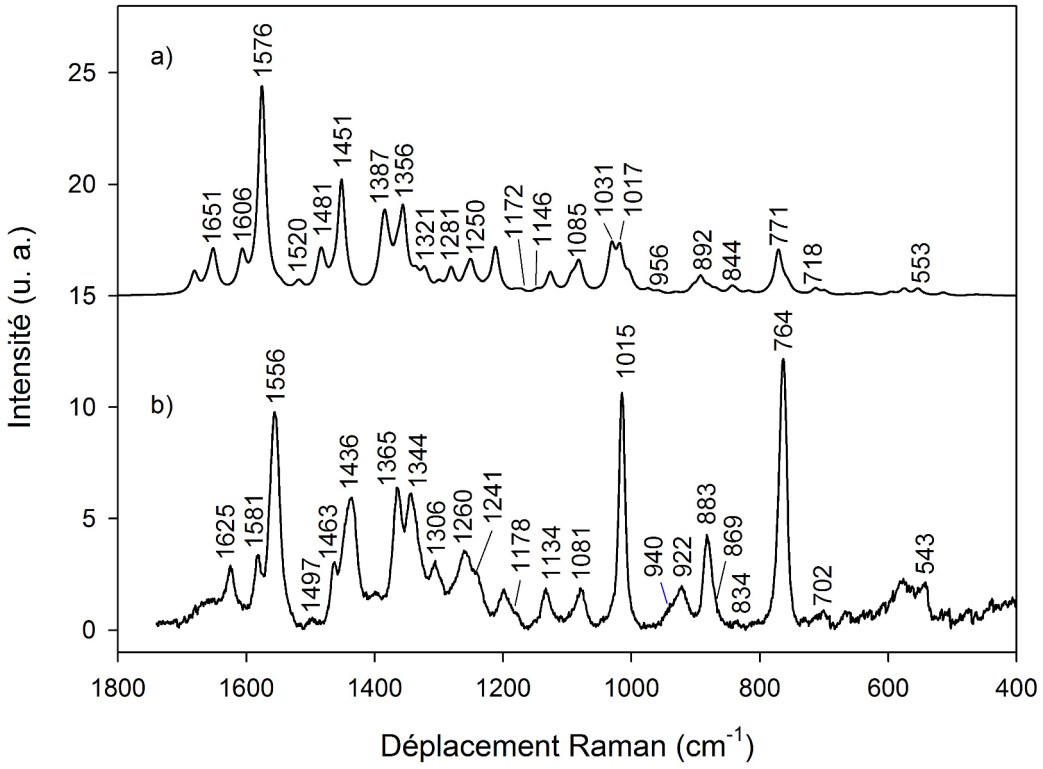

Figure 2.7 – Spectres Raman du tripeptide GlyTrpGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 20 mM dans une solution aqueuse à pH 11. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

A pH 7 GlyTrpGly n'étant pas assez soluble, le spectre expérimental a été mesuré à pH 11. Cependant, cette modification de pH n'affecte pas l'état de protonation du résidu tryptophane ni les bandes Raman liées à sa chaîne latérale. De manière prévisible, la présence des deux cycles augmente la complexité des spectres Raman obtenus. Le pic le

plus intense appartenant au résidu tryptophane est celui situé à 764 cm^{-1}. Il est déplacé vers le bleu d'à peu près 4-8 cm^{-1} par rapport au pic similaire du tryptophane libre dans l'eau, comme rapporté dans de précédents travaux [10, 11, 14]. Basé sur les calculs de chimie quantique, nous avons attribué ce pic à un mode normal combinant la déformation de pliage des CH du cycle à 6 carbones et la respiration en phase des deux cycles. Cette attribution diffère des précédentes pour ce pic avec seulement la déformation de pliage des CH pour Hernandez et al. [11] ou la seule respiration du cycle pour Chuang et al. [14].

Tableau 2.6 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle de GlyTrpGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, τ pour une torsion, γ pour un balancement hors du plan, σ pour un cisaillement et l'indice a et pour un mouvement antisymétrique, respectivement.

Expérimental	Calculé	Mode
543	553	δ(cycle 6), δ(squel.)
702	714	δ(NH), δ(squel.), δ(cycles)
730	756	$\beta(CH)_{cycle6}$
	763	$\delta(CCN)_{COO^-}$, $\beta(CH)_{cycle6}$
764	771	δ(cycles)
834	817	$\beta(CH)_{cycle5}$, δ(squel.)
869	844	$\beta(CH)_{cycle5}$
883	867	$\beta(CH)_{cycle6}$
	880	$\zeta(CH_2)_{Trp}$, δ(cycles)
	892	δ(cycles), $\nu(CC)_{COO^-}$
940	958	$\beta(CH)_{cycle6}$
1015	1018	$\nu(CC)_{Trp}$, $\tau(CH_2)_{Trp}$, δ(cycles)
	1031	δ(cycle 6)
1081	1085	$\nu(CN)_{COO^-}$, δ(cycles)
1134	1146	$\delta(CCH)_{cycle6}$
1178	1172	$\delta(CCH)_{cycle6}$
1241	1250	δ(cycles), $\gamma(CH_2)_{Trp}$
1260	1281	$\delta(CCH)_{cycles}$, $\delta(NH)_{cycle5}$, δ(CH), $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
		Suite à la page suivante

Tableau 2.6 – Suite du tableau d'attribution de GlyTrpGly

Expérimental	Calculé	Mode
	1300	$\delta(\mathrm{CCH})_{cycles}$, $\delta(\mathrm{CCH})_{Trp}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{COO^-}}$
1306	1321	$\nu(\mathrm{CC})_{Trp}$, δ(cycles), $\delta(\mathrm{CH_2})_{Trp}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{COO^-}}$
1344	1356	$\gamma(\mathrm{CH_2})_{Trp}$, δ(CH), δ(cycles)
1365	1365	δ(cycles)
	1376	$\nu(\mathrm{CC})_{\mathrm{COO^-}}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})_{Trp}$, $\gamma(\mathrm{CH_2})$, $\delta(\mathrm{CCH})_{cycles}$
	1382	$\delta(\mathrm{CCH})_{cycles}$, β(CH), $\tau(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{NH_2}}$
	1385	δ(cycles), $\tau(\mathrm{CH_2})_{Trp}$, $\delta(\mathrm{CH_2})_{\mathrm{NH_2}}$
1436	1451	$\delta(\mathrm{CNH})_{cycle5}$, δ(cycles)
1463	1480	$\sigma(\mathrm{CH_2})_{Trp}$, δ(cycles)
	1483	$\sigma(\mathrm{CH_2})_{Trp}$
1497	1520	δ(cycles), $\delta(\mathrm{CCH})_{cycle6}$, $\delta(\mathrm{CNH})_{cycle5}$
1556	1575	$\nu_a(\mathrm{CC})_{Trp}$, δ(cycles)
1581	1606	δ(cycles)
1625	1652	δ(cycles)
Fin du tableau d'attribution de GlyTrpGly		

La bande à 883 $\mathrm{cm^{-1}}$, déjà connue comme marqueur du tryptophane dans l'environnement biologique, a été attribuée à la déformation de pliage du cycle à 6 carbones (Tableau.2.6). Une bande additionnelle a été détectée sous forme d'un épaulement à 869 $\mathrm{cm^{-1}}$ et a été assignée à la déformation de pliage des CH du cycle à 5 carbones. Les deux bandes sont déplacées vers le bleu de 3-8 $\mathrm{cm^{-1}}$ et 3-7 $\mathrm{cm^{-1}}$ respectivement, par rapport aux bandes déjà indexées pour le tryptophane libre [10, 11, 14].

De plus, nous avons détecté un faible pic à 834 $\mathrm{cm^{-1}}$ qui est dû, d'après nos calculs, à la déformation de pliage du CH sur le cycle indole mélangé avec la déformation du squelette du tripeptide. Ce pic n'a pas été détecté dans le cas du tryptophane libre [11]. Un autre marqueur Raman important du tryptophane dans les protéines est la bande intense que nous avons trouvé à 1015 $\mathrm{cm^{-1}}$. D'après notre analyse théorique des modes normaux, cette bande appartient au résidu tryptophane et associe la torsion du $\mathrm{CH_2}$ de la chaîne du tryptophane avec l'élongation CC du cycle benzénique (Tableau.2.6).

Une autre bande intense à 1365 $\mathrm{cm^{-1}}$ est prédite pour représenter la superposition de deux modes normaux : une combinaison de l'élongation CC vers le carboxyl terminal de

la chaîne peptidique aussi bien que la déformation des cycles et la torsion du groupe CH_2 le long de la chaîne du tryptophane. La bande à 1556 cm^{-1} est elle aussi intense et est attribuée à l'élongation antisymétrique de la liaison CC liant le carbone du cycle indole au carbone de la chaîne aliphatique du tryptophane. Ces deux bandes à 1365 et 1556 cm^{-1} sont déplacées vers le bleu de 3 à 5 cm^{-1} par rapport aux bandes correspondantes pour le tryptophane libre [10, 11].

2.2.2.2 GlyLeuGly

Le tripeptide aliphatique contenant la leucine a été choisi car la leucine constitue plus de 10% du contenu en acides aminés de la BSA et de la β-lactoglobuline. La structure de ce tripeptide est présentée figure 2.8.

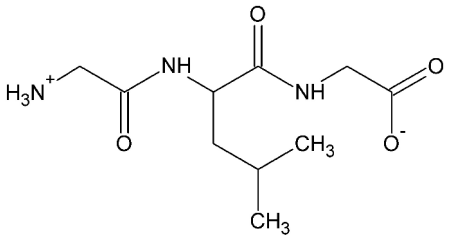

Figure 2.8 – Structure du tripeptide GlyLeuGly à pH 7.

Bien qu'étant un acide aminé essentiel, la leucine n'est pas un acide aminé aromatique et c'est pourquoi son spectre Raman est moins fréquemment rapporté dans la littérature. Ses bandes Raman sont relativement faibles et ainsi difficiles à détecter dans de grands systèmes biologiques [12, 28]. La figure 2.9 présente les spectres Raman théorique et expérimental obtenus pour GlyLeuGly. Une description détaillée de l'attribution des bandes concernant le résidu leucine au sein du tripeptide est donnée dans le tableau 2.7.

D'après la figure 2.9, le spectre expérimental du GlyLeuGly est plus complexe que celui du GlyGlyGly. La bande Raman centrée à 922 cm^{-1} et correspondant à la vibration d'élongation de la liaison CC centrale est la bande la plus remarquable. De nombreux pics sont spécifiques à la chaîne latérale de la leucine : le pic à 833 cm^{-1} a été assigné à l'élongation symétrique de la liaison CC tandis que l'élongation antisymétrique correspondante de cette liaison a été trouvée comme contribuant aux pics Raman à 963 et 1131 cm^{-1}. De telles vibrations ont été précédemment considérées comme des marqueurs de la leucine [28].

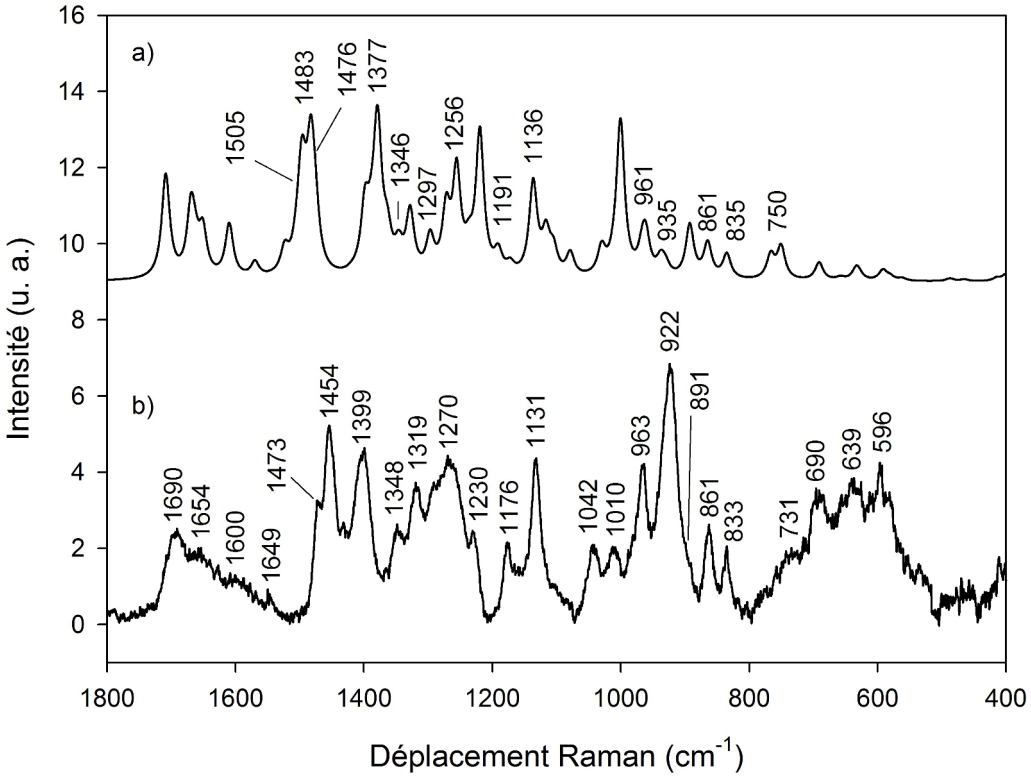

Figure 2.9 – Spectres Raman du tripeptide GlyLeuGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

Les bandes situées entre 1250 et 1470 cm^{-1} sont associées à différentes formes de balancement hors du plan, de torsion et de cisaillement des différents groupements CH_2 du tripeptide. Les pics listés dans le tableau 2.7 montrent uniquement les contributions issues de la chaîne latérale de la leucine. Parmi ces pics c'est celui à 1454 cm^{-1} qui a la plus forte intensité. Il a été attribué au balancement hors du plan et au cisaillement du groupement CH_2 au sein de la chaîne latérale de la leucine.

2.2.2.3 GlyMetGly

Pour le tripeptide GlyMetGly, représenté figure 2.10, les bandes Raman les plus intenses sont situées à 658, 702 et 727 cm^{-1}, respectivement (Fig.2.11). D'après notre analyse théorique, ces bandes appartiennent aux différents modes d'élongation CS, comme souligné dans le tableau 2.8.

La bande à 658 cm^{-1} correspond à l'élongation symétrique C-S-CH_3 couplé au cisaille-

Expérimental	Calculé	Mode
731	750	δ(CNH), δ(Leu)
833	835	$\nu_s(CC)_{Leu}$
861	865	$\tau(CH_2)_{Leu}$, δ(Leu)
922	930	δ(Leu), δ(squel.)
	935	$\zeta(CH_2)_{NH_3^+}$, δ(Leu)
963	961	$\nu_a(CC)_{Leu}$
1010	966	$\delta(CH_3)_{Leu}$
1131	1136	$\nu_a(CC)_{Leu}$
1176	1191	$\nu(CC)_{Leu}$, $\delta(CH_3)_{Leu}$
1270	1256	δ(CNH), $\gamma(CH_2)_{Leu}$
1319	1297	δ(Leu), δ(squel.)
1348	1346	$\nu(CC)_{Leu}$, $\delta(CCH)_{Leu}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$)
1365	1363	$\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\delta(CCH)_{Leu}$, δ(CCH)
1399	1377	$\tau(CH_2)_{Leu}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
	1389	$\gamma(CH_2)_{Leu}$, $\delta(CCH)_{Leu}$
1432	1476	$\sigma(CH_2)_{Leu}$, $\delta(NH_3^+)$
1454	1483	$\sigma(CH_3)_{Leu}$
	1489	$\sigma(CH_2)_{Leu}$
	1495	$\delta(CH_3)_{Leu}$
1473	1505	$\delta(CH_3)_{Leu}$

Tableau 2.7 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyLeuGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, ν pour une élongation, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, ζ pour un balancement dans le plan, γ pour un balancement hors du plan et σ pour un cisaillement, respectivement.

ment du groupe carboxyle terminal (COO^-). Le pic à 702 cm^{-1} est attribué à l'élongation S-CH_3, tandis que celui à 727 cm^{-1} est assigné à l'élongation antisymétrique des liaisons C-S-CH_3. Une bande plus faible située à 807 cm^{-1} est aussi due à l'élongation C(CH_2)-S qui diffère ainsi des attributions précédentes pour lesquelles aucune bande n'était rapportée à cette fréquence ou alors seule une vibration d'élongation CC était rapportée [29,30].

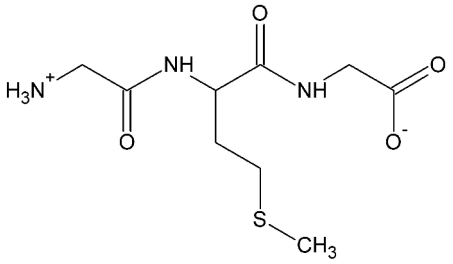

Figure 2.10 – Structure du tripeptide GlyMetGly à pH 7.

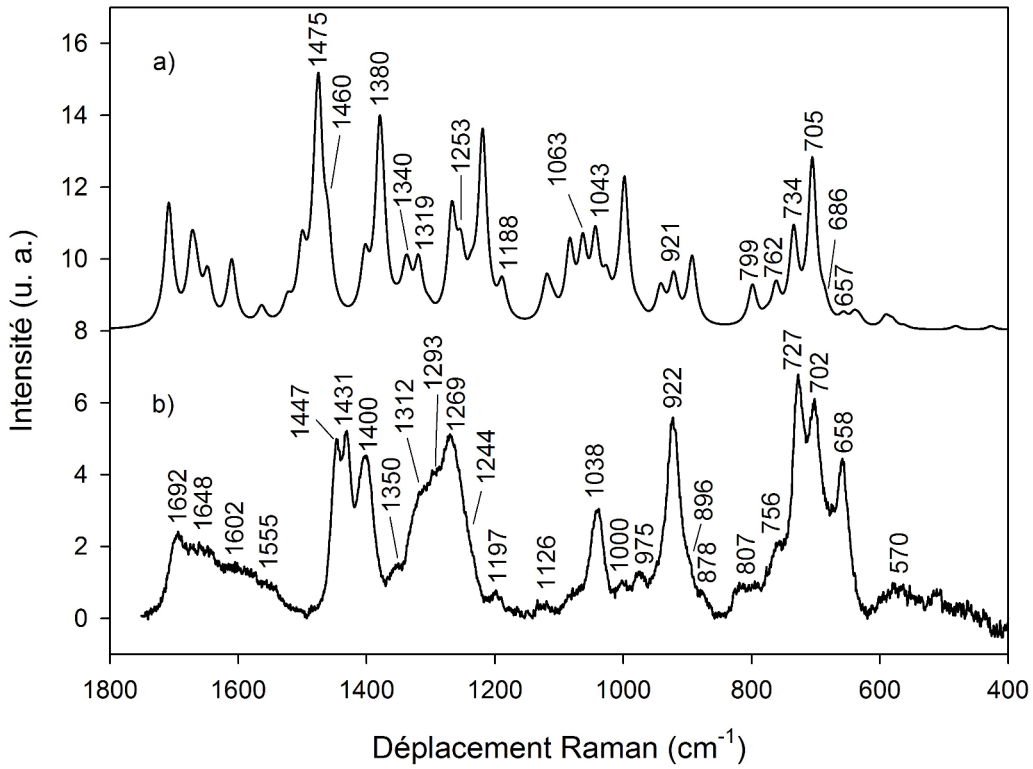

Figure 2.11 – Spectres Raman du tripeptide GlyMetGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

Nous avons aussi mis en évidence deux petits pics à 975 et 1000 cm^{-1}. A l'aide de notre analyse théorique, nous attribuons ces pics à la chaîne latérale de la méthionine : le premier correspond à l'élongation CC couplée à la torsion des groupes CH_2 et le deuxième à 1000 cm^{-1} correspond à l'élongation CC seule. De nombreuses bandes sont situées dans la région de 1200 à 1450 cm^{-1} et associées aux groupements CH_2. Le tableau 2.8 montre uniquement les bandes qui appartiennent à la chaîne latérale de la méthionine. Ainsi, les bandes dont les fréquences sont comprises entre 1250 et 1320 cm^{-1} sont associées à la torsion des groupes CH_2. Les fréquences attribuées au balancement hors du plan des

groupes CH_2 sont trouvées entre 1350 et 1431 cm^{-1}. Enfin, la bande Raman présente à 1447 cm^{-1} est due au cisaillement des groupes CH_2.

Expérimental	Calculé	Mode
658	657	ν_s(CS), δ(OCO), δ(squel.)
	686	ν_s(CS), $\delta(CNN)_{NH_3^+}$, δ(squel.)
702	705	ν(CS)(CH_3)
727	734	ν_a(CS), δ(squel.)
756	762	$\delta(CCC)_{squel.}$, δ(Met)
807	799	$\nu(CS)_{CH_2}$, $\delta(CCC)_{Met}$
896	921	$\nu(CC)_{Met}$
975	1042	$\nu(CC)_{Met}$, $\tau(CH_2)_{Met}$
1000	1063	$\nu(CC)_{Met}$
1197	1188	$\tau(CH_2)_{Met}$
1244	1253	$\gamma(CH_2)_{Met}$, β(CH), δ(CNH)
	1303	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{Met}$, $\tau(CH_2)_{Met}$
1293	1319	$\tau(CH_2)_{Met}$, δ(CH), $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
1312	1340	$\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\tau(CH_2)_{Met}$, δ(CNH)
	1353	$\gamma(CH_3)_{Met}$
1350	1374	$\gamma(CH_2)_{Met}$, β(CH), $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$
1400	1380	$\nu(CC)_{COO^-}$, $\gamma(CH_2)_{Met}$, β(CH)
	1381	$\gamma(CH_2)_{Met}$, $\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$, δ(CCH)
1431	1460	$\gamma(CH_3)_{Met}$
1447	1475	$\sigma(CH_3)_{Met}$, $\sigma(CH_2)_{Met}$

Tableau 2.8 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyMetGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ν pour une élongation, l'indice s pour un mouvement symétrique, δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, l'indice a pour un mouvement antisymétrique, τ pour une torsion, γ pour le déplacement hors du plan, β pour une déformation de pliage et σ pour un cisaillement, respectivement.

2.2.2.4 GlyHisGly et GlyLysGly

L'histidine et la lysine font partie des acides aminés chargés positivement. La charge positive vient du groupe fonctionnel imidazole dans le cas de l'histidine tandis que la charge positive excédentaire de la lysine provient du groupement chimique contenant de l'azote à la dernière position de sa chaîne latérale. La structure des deux tripeptides correspondants, GlyHisGly et GlyLysGly est présentée figure 2.12.

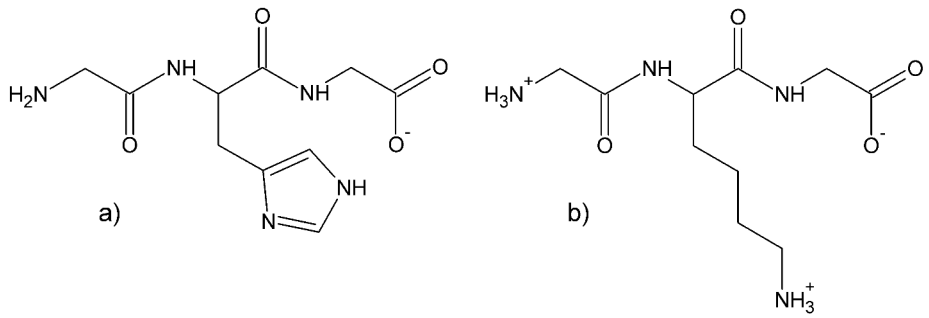

Figure 2.12 – Structures des tripeptides GlyHisGly à pH 11 en a) et GlyLysGly à pH 7 en b).

A cause d'un manque de solubilité de GlyHisGly à pH 7, le spectre Raman de ce tripeptide a été mesuré à pH 11 (Fig.2.13). A ce pH, la forme stable de l'histidine est neutre qui ne contient qu'un seul proton sur le cycle imidazole. Tandis qu'à pH neutre, cette forme est en équilibre avec l'histidine chargée positivement (chacune de ces formes étant représentées à environ 50%). En conséquence, le spectre théorique de GlyHisGly a été calculé dans le cas où l'histidine est neutre. Les bandes Raman qui sont associées au groupe fonctionnel de l'histidine sont données dans le tableau 2.9.

Comme attendu, de nombreux pics sont concernés par le cycle imidazole. Par exemple, le pic intense centré à 1576 cm^{-1} est assigné à l'élongation CC du cycle imidazole déprotoné en bon accord avec une étude précédente [31]. De plus, ce pic détecté pour le tripeptide est déplacé vers le bleu de 4 cm^{-1} par rapport au pic correspondant de l'histidine libre. D'autres bandes associées au cycle de l'histidine sont situées à 1169 et 1274 cm^{-1}. Elles ont été attribuées à l'élongation et à l'élongation antisymétrique de la double liaison CN du cycle imidazole, respectivement. Le pic à 1238 cm−1 est assigné à la déformation de pliage dans le plan de =CH, en accord avec Majoube et al. [32]. Les deux bandes à 1169 et à 1238 cm^{-1} sont aussi déplacées vers le bleu (de 9 cm^{-1} et 4 cm^{-1}, respectivement) par rapport au spectre Raman de l'histidine libre mesuré à pH 11 [31].

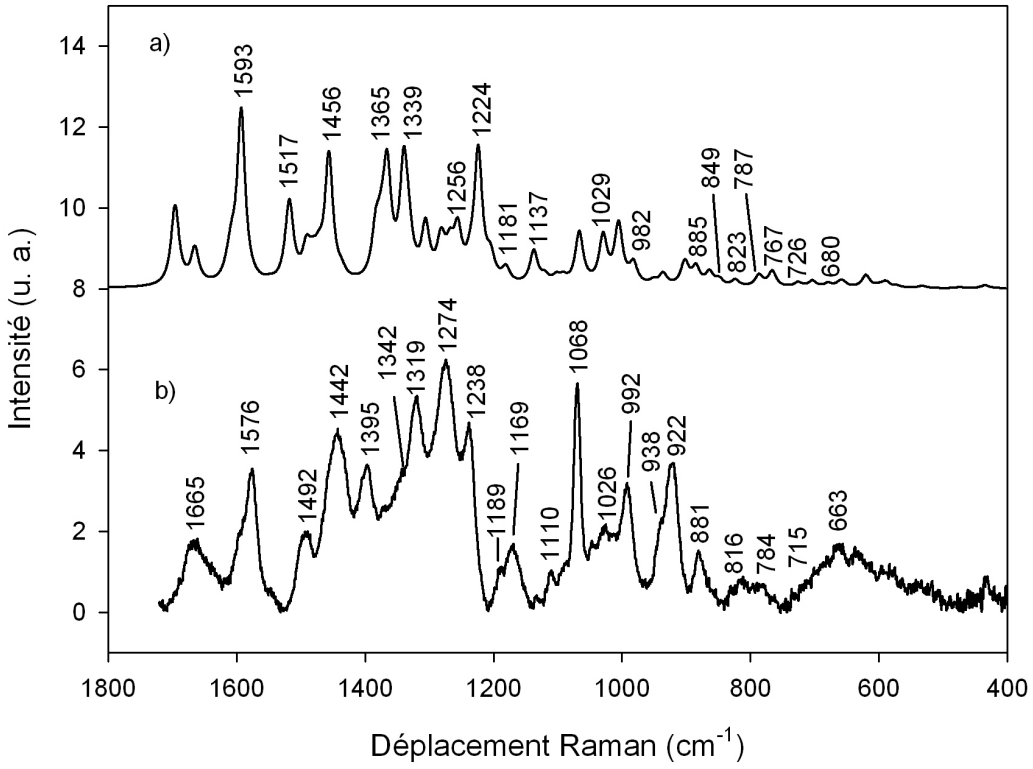

Figure 2.13 – Spectres Raman du tripeptide GlyHisGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 11. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

Les précédents articles concernant le spectre Raman de l'histidine ont aussi montré un pic autour de 920 cm^{-1}. Par exemple, une étude sur l'histidine cristallisée a attribué ce pic à une vibration de déformation de CCH [33] tandis qu'une autre étude réalisée sur un imidazole en solution aqueuse a suggéré que le pic appartient à une déformation du cycle [34]. Dans notre étude, nous avons détecté un pic Raman à 922 cm^{-1} qui est commun à tous les spectres de tripeptide réalisés. Ce pic a été attribué à l'élongation CC du squelette du tripeptide. De manière intéressante, notre analyse théorique montre que, dans le cas de GlyHisGly, cette élongation CC est couplée à une élongation CN et à une déformation du groupe CNH du cycle imidazole (Tableau 2.9). Pour des fréquences inférieures à 922 cm^{-1}, les pics Raman obtenus expérimentalement sont d'intensité relativement faible. Cependant, nous avons détecté un pic non observé précédemment à 881 cm^{-1}. Ce pic a été assigné à une combinaison entre le balancement dans le plan du groupe CH_2 de la chaîne latérale de l'histidine et le balancement hors du plan du NH_2 terminal (Tableau 2.9).

Expérimental	Calculé	Mode
663	680	δ(His), δ(squel.)
715	726	δ(cycle), δ(squel.)
784	766	$\delta(CCN)_{squel.}$, δ(squel.), δ(His)
	787	$\nu(CH)_{His}$, δ(squel.)
	823	$\nu(CC)_{His}$, δ(CCC)
816	849	$\beta(CH)_{His}$
881	885	$\zeta(CH_2)_{His}$, $\gamma(NH_2)$
992	982	$\nu(CC)_{squel.}$, δ(cycle)
1026	1029	$\nu(CC)_{His}$
1169	1137	$\nu(CN)_{cycle}$
	1181	$\tau(NH_2)$, $\tau(CH_2)_{His}$
1189	1204	$\tau(NH_2)$, $\tau(CH_2)_{His}$, δ(CNH)
1238	1224	$\beta(CH)_{cycle}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\delta(NCH)_{cycle}$
1274	1256	$\nu_a(CN)_{His}$, $\nu(CC)_{His}$, $\delta(HCN)_{His}$
	1268	δ(squel.), δ(cycle)
	1282	$\delta(CN)_{His}$, $\delta(CNH)_{His}$, $\gamma(CH_2)_{His}$,$\gamma(CH_2)_{COO^-}$
1319	1339	$\nu_a(CN)_{His}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$, $\beta(CH)_{His}$
1342	1365	$\gamma(CH_2)_{His}$
1442	1456	$\sigma(CH_2)_{His}$, δ(cycle)
	1472	$\sigma(CH_2)_{His}$, δ(cycle)
1492	1517	$\nu(CNC)_{His}$, δ(cycle)
1576	1593	$\nu_a(CC)_{His}$

Tableau 2.9 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyHisGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : δ pour une déformation, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, ν pour une élongation, β pour une déformation de pliage, ζ pour un balancement dans le plan, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, l'indice a pour un mouvement antisymétrique et σ pour un cisaillement, respectivement.

Les spectres Raman du tripeptide contenant la lysine sont représentés dans la figure 2.14 et montrent une série de bandes d'intensités relativement faibles. Les attributions

correspondantes associées à la chaîne latérale de la lysine sont données dans le tableau 2.10.

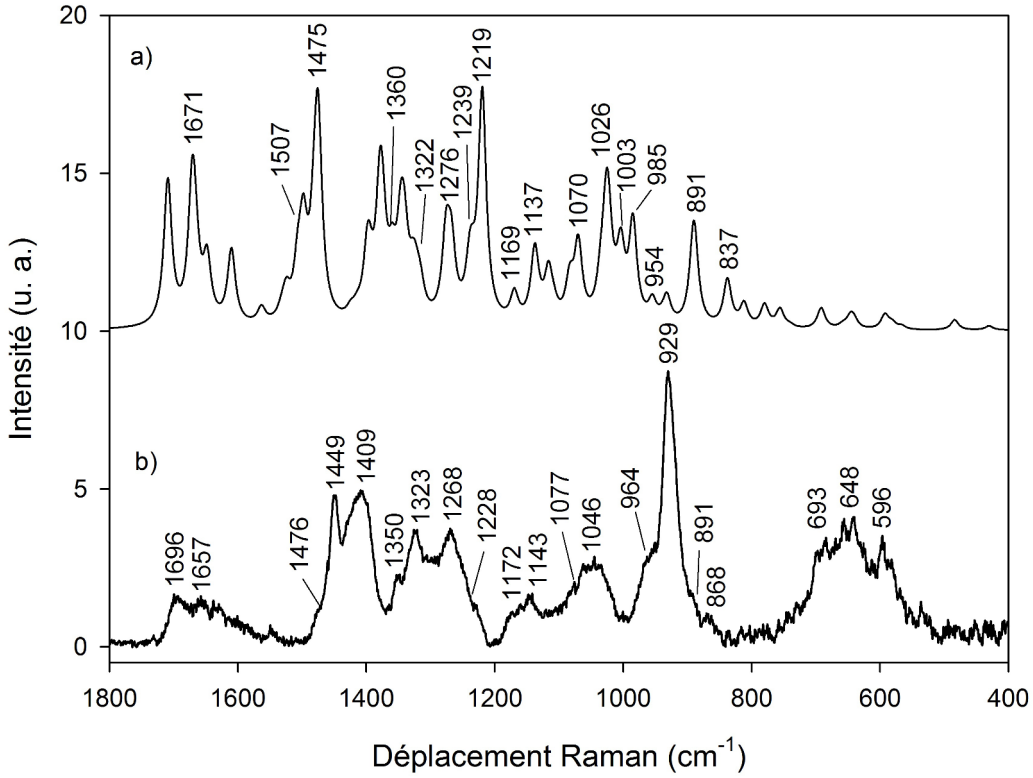

Figure 2.14 – Spectres Raman du tripeptide GlyLysGly calculé a) et expérimental b) avec une concentration en tripeptide de 40 mM en solution aqueuse à pH 7. Le niveau de théorie utilisé pour le spectre calculé est B3LYP/6-311+G(2df,2pd).

La bande la plus intense se trouve à 929 cm^{-1}. Elle est le résultat du couplage entre l'élongation CC symétrique sur la chaîne aliphatique de la lysine et l'élongation CC du squelette du tripeptide. Deux pics bien définis ont été détectés à 1268 et 1323 cm^{-1}. Ces deux pics sont attribués à la torsion des groupes CH_2 de la chaîne latérale de la lysine. Elle est combinée à la torsion du groupe CH_2 au niveau du carboxyle terminal pour le premier pic. Pour le deuxième pic à 1323 cm^{-1}, la torsion des groupes CH_2 de la chaîne latérale de la lysine est combinée avec la torsion du groupe CH_2 de l'amine terminale (Tableau 2.10). De plus, la bande large centrée à 1409 cm^{-1} est attribuée au balancement hors du plan des groupes CH_2 de la chaîne latérale de la lysine. Le pic bien défini à 1449 cm^{-1} est assigné au cisaillement des groupes CH_2 de la chaîne latérale de la lysine. Pour finir, la déformation angulaire du groupe NH_3^+ terminal de la chaîne latérale de la lysine donne naissance à une vibration de fréquence égale à 1657 cm^{-1}.

Expérimental	Calculé	Mode
868	837	$\zeta(CH_2)(NH_3^+)_{Lys}$
891	888	$\nu(CN)(NH_3^+)_{Lys}$
964	954	δ(Lys)
929	985	$\nu(CC)_{squel.}$, $\nu_s(CC)_{Lys}$
	1003	$\nu(CC)_{Lys}$, $\nu(CC)_{squel.}$, δ(squel.)
	1022	$\nu(CC)_{Lys}$, δ(Lys)
1046	1026	$\nu(CN)_{NH_3^+}$, $\nu(CC)_{Lys}$
	1035	$\nu(CC)_{Lys}$, $\nu(CN)_{NH_3^+}$
1077	1070	$\nu(CC)_{Lys}$, δ(Lys)
1143	1137	$\gamma(NH_3^+)_{Lys}$
1172	1169	$\nu(CN)_{squel.}$, δ(Lys)
1228	1219	$\delta(CNH)_{COO^-}$, δ(CCH), $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
	1239	$\tau(CH_2)_{Lys}$
1268	1276	$\gamma(CH_2)_{Lys}$, $\delta(CNH)_{squel.}$
	1322	$\tau(CH_2)_{Lys}$
	1340	$\tau(CH_2)_{Lys}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
1323	1346	$\nu(CC)_{Lys}$, $\delta(CCH)_{Lys}$, $\gamma(CH_2)_{COO^-}$
	1360	$\tau(CH_2)_{(NH_3^+)_{Lys}}$
1350	1374	$\gamma(CH_2)_{NH_3^+}$, $\tau(CH_2)_{Lys}$, β(CH)
1409	1393	$\gamma(CH_2)_{Lys}$
1449	1475	$\sigma(CH_2)_{Lys}$
1476	1507	$\sigma(CH_2)_{(NH_3^+)_{Lys}}$
1657	1666	$\sigma(NH_3^+)_{Lys}$
	1671	$\sigma(NH_3^+)_{Lys}$

Tableau 2.10 – Fréquences Raman observées, nombres d'ondes vibrationnels calculés et attribution vibrationnelle du tripeptide GlyLysGly. Les fréquences théoriques sont calculées par les fonctions B3LYP/6-311+G(2df,2pd). Les symboles utilisés pour le type de vibration sont : ζ pour un balancement dans le plan, ν pour une élongation, δ pour une déformation, l'indice s pour un mouvement symétrique, *squel.* pour une vibration liée au squelette du tripeptide, γ pour un balancement hors du plan, τ pour une torsion, β pour une déformation de pliage, σ pour un cisaillement, respectivement.

2.3 Attribution des bandes Raman des protéines

Les bandes Raman identifiées précédemment pour les huit tripeptides ont été utilisées par la suite pour l'analyse des bandes Raman de la BSA, de la β-lactoglobuline et du lysozyme (Fig.2.15, 2.16 et 2.17, respectivement).

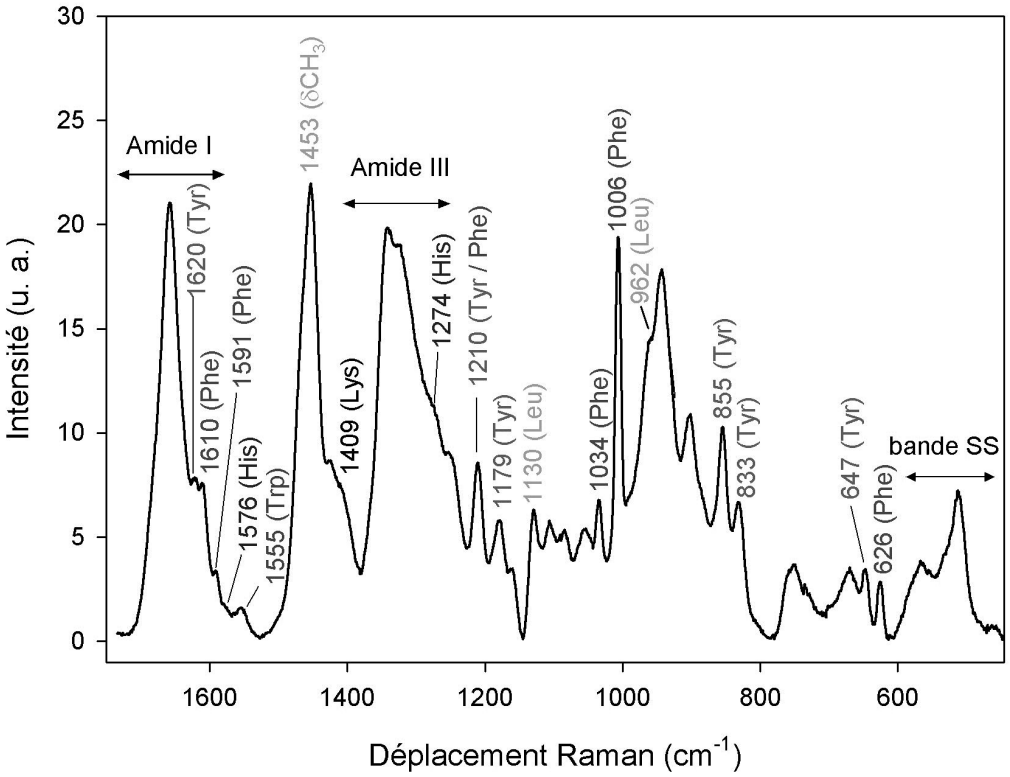

Figure 2.15 – Spectre Raman de la BSA avec une concentration de 1 mM dans une solution aqueuse à pH 7.

Pour chaque résidu d'acide aminé étudié ici nous avons calculé les intensités attendues de ses bandes Raman principales dans les spectres des trois protéines (Tableau.2.11). Les calculs sont basés sur les intensités des bandes Raman dans les spectres des tripeptides et sur la composition en résidus de chaque protéine. Les intensités attendues ont été utilisées comme un critère additionnel dans l'attribution des bandes Raman des protéines. La position des pics principaux trouvés dans les spectres des tripeptides ainsi que leur positions correspondantes au sein des spectres des trois protéines sont présentées dans le tableau 2.12.

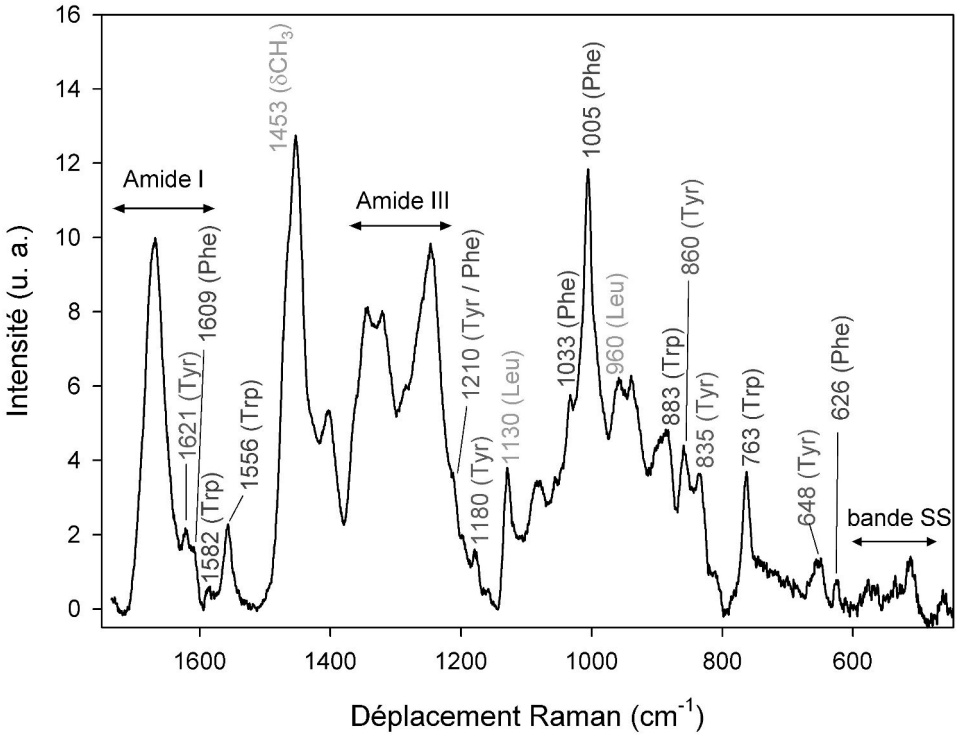

Figure 2.16 – Spectre Raman de la β-lactoglobuline avec une concentration de 2 mM dans une solution aqueuse à pH 7.

2.3.1 Résidu phénylalanine

Ce résidu possède une bande Raman très spécifique à 1006 cm^{-1} (Fig.2.5) et son attribution au sein des protéines est bien renseignée [35, 36, 37]. Etant donné le contenu en phénylalanine des trois protéines, les intensités attendues de cette bande (Tableau 2.11) sont de 18,0 u. a. pour la BSA (qui contient 24 résidu Phe), 6,0 u. a. pour la β-lactoglobuline (qui contient 4 résidus Phe et dont le spectre a été mesuré à 2 mM) et 4,5 pour le lysozyme (qui contient 3 résidus Phe et dont le spectre a été mesuré à 2 mM).

La bande est clairement visible dans le spectre Raman de la BSA et son intensité est très proche de celle attendue (Figure.2.15). Dans le spectre de la β-lactoglobuline, l'intensité de cette bande apparaît beaucoup plus forte par rapport à celle calculée (Fig.2.16). Clairement, la raison de cette apparence est la superposition avec d'autres bandes de fréquences proches, comme suggéré par l'élargissement de la base de la bande. Une superposition similaire a lieu pour le lysozyme (Fig.2.17) où le maximum de la bande est déplacé à 1011 cm^{-1}. Dans ce cas, le déplacement de la bande apparente est dû à un chevauchement avec la bande très intense du tryptophane à 1015 cm^{-1}.

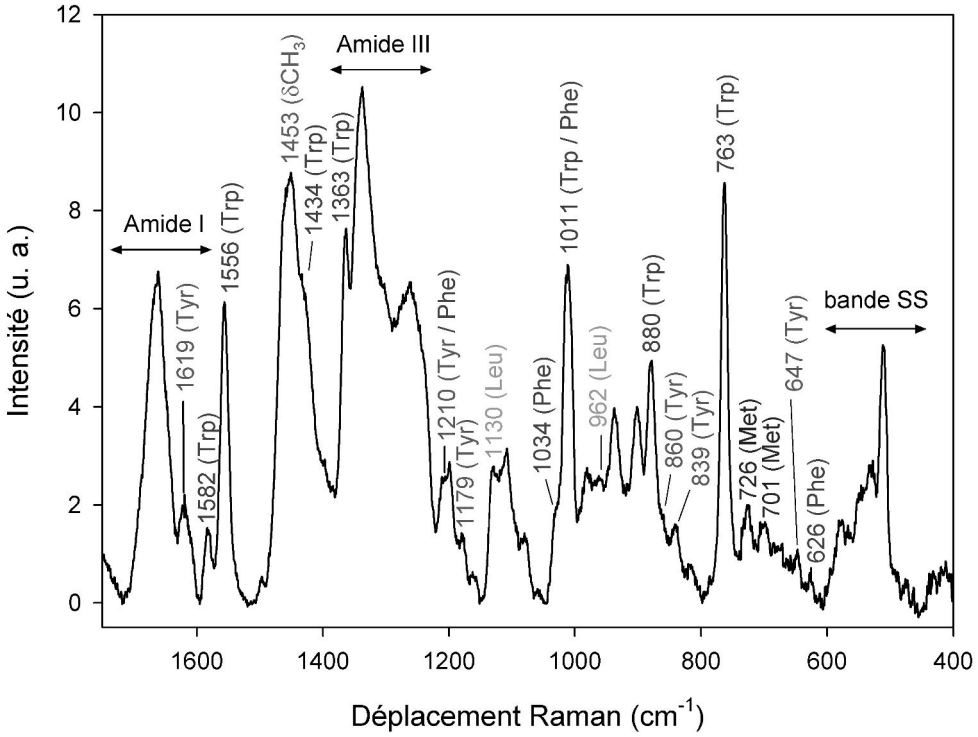

Figure 2.17 – Spectre Raman du lysozyme avec une concentration de 2 mM dans une solution aqueuse à pH 7.

D'autres pics associés au cycle phényl et apparaissant dans le spectre de la BSA sont ceux situés à 626, 1034 et 1610 cm^{-1}. Ils peuvent être aussi observés dans le spectre Raman de la β-lactoglobuline à des fréquences presque identiques. Parmi ces pics, dans le cas du lysozyme, seul celui à 626 cm^{-1} apparaît distinctement tandis que le pic à 1034 cm^{-1} donne naissance à un épaulement en bon accord avec les spectres Raman rapportés précédemment du lysozyme [38, 39].

2.3.2 Résidu tyrosine

Le résidu tyrosine est largement représenté dans la BSA (20 résidus) alors que la β-lactoglobuline et le lysozyme n'en contiennent que 4 et 3, respectivement. Le doublet de Fermi est visible dans les trois spectres Raman à 833 et 855 cm^{-1} pour la BSA, à 835 et 860 cm^{-1} pour la β-lactoglobuline et à 838 et 860 cm^{-1} pour le lysozyme. Dans le cas de la BSA les positions des deux bandes sont presque identiques comparées à celles trouvées pour le tripeptide tandis que pour les deux autres protéines des déplacements significatifs vers le bleu sont observés.

Tableau 2.11 – Intensités attendues en unités arbitraires des bandes Raman spécifiques de chaque acide aminé basé sur les intensités de leur chaînes latérales, sur la composition en acide aminé de chaque protéine, et sur les concentrations des échantillons mesurés. [a] : le nombre entre parenthèses correspond au nombre de résidu étudié dans chacune des protéines.

Acide aminé	Tripeptide (cm^{-1})	BSA (1 mM)	β-lactoglobuline (2 mM)	Lysozyme (2 mM)	Seulement la chaîne latérale
Phénylalanine	626	3,3 (24)[a]	1,1 (4)	0,9 (2)	2,7
	1006	18,0	6,0	4,5	14,9
	1035	6,4	2,2	1,6	5,3
	1209	4,5	1,5	1,1	3,7
	1610	7,1	2,4	1,7	5,9
Tyrosine	647	2,8 (20)	1,1 (4)	0,9 (3)	2,8
	833	4,4	1,8	1,3	4,4
	856	6,8	2,7	2,1	6,8
	1180	2,4	1,0	0,7	2,4
	1212	5,4	2,2	1,6	5,4
	1619	6,2	2,5	1,9	6,2
Tryptophane	764	1,2 (2)	2,4 (2)	7,3 (6)	12,2
	883	0,4	0,9	2,6	4,4
	1015	1,1	2,1	6,5	10,8
	1344	0,6	1,2	3,7	6,2
	1365	0,7	1,3	3,9	6,5
	1436	0,6	1,2	3,6	6,0
	1556	1	2,0	5,9	9,8
	1581	0,3	0,7	2,0	3,4
Leucine	963	6,2 (58)	4,7 (22)	1,7 (8)	4,3
	1131	6,4	4,8	1,8	4,4
	1454	7,7	5,8	2,1	5,3
Méthionine	702	0,6 (4)	1,2 (4)	0,6 (2)	6,2
	727	0,7	1,4	0,7	6,9
	1431	0,5	1,1	0,5	5,3
	1447	0,5	1,0	0,5	5,1

Suite à la page suivante

Tableau 2.11 – Suite du tableau des intensités attendues des résidus d'acides aminés.

Acide aminé	Tripeptide (cm^{-1})	BSA (1 mM)	β-lactoglobuline (2 mM)	Lysozyme (2 mM)	Seulement la chaîne latérale
Histidine	1274	2,7 (17)	0,6 (2)	0,3(1)	6,3
	1319	2,3	0,5	0,3	5,4
	1442	2,0	0,5	0,2	4,6
	1576	1,5	0,4	0,2	3,6
Lysine	1409	7,4 (59)	3,8 (15)	1,5 (6)	5,0
	1449	7,2	3,7	1,5	4,9
Fin du tableau des intensités attendues des résidus d'acides aminés.					

Les quatre bandes Raman suivantes sont associées à la chaîne latérale de la tyrosine, elles sont situées à 647, 1179, 1210 et 1620 cm^{-1} dans le spectre de la BSA, à 648, 1180, 1209 et 1621 cm^{-1} dans le spectre de la β-lactoglobuline et à 647, 1179, 1210 et 1619 cm^{-1} dans le spectre du lysozyme.

2.3.3 Résidu tryptophane

Parmi les trois protéines, celle contenant le plus de résidus tryptophane est le lysozyme. Les bandes Raman du tryptophane qui apparaissent distinctement dans le spectre Raman du lysozyme sont situées à 763, 880, 1011, 1366, 1436, 1556 et 1582 cm^{-1}. La bande à 1011 cm^{-1} est légèrement déplacée vers le rouge comparée à celle trouvée pour le tripeptide GlyTrpGly (à 1015 cm^{-1}). Ce déplacement peut être expliqué par la superposition avec le pic correspondant à la respiration du cycle phényl à 1006 cm^{-1}. La position de ce pic ainsi que son attribution est en bon accord avec des travaux précédents [38].

La bande de GlyTrpGly à 1366 cm^{-1} apparaît dans le spectre Raman du lysozyme à 1363 cm^{-1} tandis que la bande à 1436 cm^{-1} est visible sous la forme d'un épaulement. Un autre pic important de la chaîne latérale du tryptophane, à 1344 cm^{-1} dans le spectre du tripeptide semble être complètement éclipsé par la bande amine III du lysozyme (Fig.2.17). Les bandes à 1363 et 1344 cm^{-1} ont précédemment été attribuées aux résidus tryptophane du lysozyme et sont connues pour être un marqueur de l'hydrophobicité de l'environnement moléculaire [40].

Bandes Raman des tripeptides	BSA	β-lactoglobuline	Lysozyme
626 (Phe)	626	625	626
647 (Tyr)	647	648	647
702 (Met)			701
727 (Met)			726
764 (Trp)		763	763
833 (Tyr)	833	835	839
856 (Tyr)	855	860	860
883 (Trp)		885	880
963 (Leu)	962	960	962
1006 (Phe)	1006	1005	1011
1016 (Trp)			1011
1035 (Phe)	1035	1033	
1131 (Leu)	1130	1130	1130
1180 (Tyr)	1179	1180	1179
1209 (Phe)	1210	1210	1210
1212 (Trp)	1210	1210	1210
1274 (His)	1274		
1366 (Trp)			1363
1409 (Lys)	1409		
1436 (Trp)			1434
1454 (Leu)	1453	1453	1449
1556 (Trp)	1555	1556	1556
1576 (His)	1576		
1581 (Trp)		1582	1582
1609 (Phe)	1610	1609	
1619 (Tyr)	1620	1621	1619

Tableau 2.12 – Fréquences des bandes Raman des chaînes latérales des résidus d'acides aminés des tripeptides en cm^{-1} et leur fréquences correspondantes dans les spectres expérimentaux des trois protéines étudiées.

Le spectre Raman de la β-lactoglobuline montre des pics Raman distincts de la chaîne latérale du tryptophane à 763, 883, 1556 et 1582 cm^{-1} tandis que la bande à 1015 cm^{-1} est probablement éclipsée par la bande plus intense de la phénylalanine à 1005 cm^{-1}.

De manière similaire, la bande à 1436 cm^{-1} dont l'intensité devrait être significative est probablement cachée par la bande très intense de la leucine à 1453 cm^{-1}.

La structure de la BSA contient seulement deux résidus tryptophane, ainsi les bandes caractéristiques de la chaîne latérale du tryptophane sont difficiles à identifier dans le spectre Raman de la BSA. Il est cependant à remarquer la présence de la bande à 1555 cm^{-1} qui est l'une des bandes Raman les plus intenses du tryptophane dans GlyTrpGly (détectée à 1556 cm^{-1}) mais difficilement visible dans le spectre Raman de la BSA. Il a été proposé précédemment que le tryptophane contribue aussi au spectre Raman de la BSA dans le domaine spectral habituellement couvert par les bandes SS [41]. Cependant, nous remarquons que l'intensité de la bande du tryptophane à 543 cm^{-1} qui pourrait être responsable d'une telle contribution est au moins 5 fois plus faible que celle de la bande à 1556 cm^{-1} (Fig.2.7). D'où le fait qu'elle ne soit pas vraiment visible dans le spectre Raman de la BSA.

2.3.4 Résidu leucine

Bien que le contenu en leucine pour les trois protéines modèles soit très important (58 résidus pour la BSA, 22 pour la β-lactoglobuline et 8 pour le lysozyme) il y a très peu de bandes spécifiques de la chaîne latérale de la leucine dans leur spectres Raman. Apparemment, la bande très intense à 1453 cm^{-1} présente dans les trois spectres Raman (Figures 2.15, 2.16 et 2.17) peut être attribuée à la leucine car une bande similaire est présente dans le spectre Raman de GlyLeuGly. Cependant, l'intensité attendue de cette bande (Tableau 2.11) est beaucoup plus faible que les intensités observées ici dans le spectre de la protéine. D'après notre analyse théorique, le pic de GlyLeuGly à 1453 cm^{-1} est dû à la déformation angulaire du groupe CH_3. Par conséquent, il devrait être commun à tous les acides aminés contenant des chaînes latérales hydrocarbonées (alanine, valine, isoleucine). D'où la bande Raman intense correspondante dans les spectres des protéines qui est très probablement une contribution commune de tous ces résidus. De plus, le cisaillement de différents groupes CH_2 donne aussi des pics dans le domaine spectral (1440-1470 cm^{-1}) couverts par la bande Raman de la protéine à 1453 cm^{-1}. Deux autres pics spécifiques de la chaîne latérale de la leucine sont à 963 et 1131 cm^{-1} impliquant l'élongation CC. Les deux sont observés dans les spectres Raman des trois protéines à des fréquences presque identiques.

2.3.5 Résidu méthionine

Le nombre de méthionines dans chacune des protéines étudiées est relativement faible, quatre dans la BSA et la β-lactoglobuline et seulement deux dans le lysozyme. Ainsi, les intensités attendues des bandes principales de la méthionine sont faibles (Tableau 2.11). Dans le cas des spectres Raman de la BSA et de la β-lactoglobuline rapporté dans les figures 2.15 et 2.16, respectivement, les bandes caractéristiques à 702 et 727 cm^{-1} sont couvertes par du bruit expérimental, mais elles sont visibles dans le spectre Raman du lysozyme (Fig. 2.17). Quand le temps d'acquisition est augmenté, ces bandes deviennent visibles dans le cas de la BSA et aussi de la β-lactoglobuline. A propos des bandes à 1431 et 1447 cm^{-1} qui sont dues à différents mouvements angulaires des groupes CH_3 et CH_2, elles contribuent à une bande Raman de forte intensité à 1453 cm^{-1}.

2.3.6 Résidu histidine

Les résidus histidine comptent pour 2,9 % de la séquence d'acides aminés de la BSA (17 résidus) mais ils sont présents en faible quantité dans la β-lactoglobuline (2 résidus) et dans le lysozyme (1 résidu). L'intensité du spectre Raman pour le GlyHisGly est relativement faible et ainsi il est difficile de localiser précisément ces pics associés à l'histidine. Cependant, en considérant l'intensité relative des pics, deux pics attribués à l'histidine peuvent être localisés dans le spectre Raman de la BSA. Le premier de ces pics est un épaulement situé à 1274 cm^{-1} qui est attribué à l'élongation antisymétrique des liaisons CN dans le cycle imidazole. Cet épaulement est superposé à la bande amine III, beaucoup plus large, et apparaît uniquement dans le spectre de la BSA. L'autre pic visible à 1576 cm^{-1} est dû à l'élongation antisymétrique CC de l'histidine. Cependant, ce pic a été rapporté précédemment à une fréquence de 1580 cm^{-1} et attribué au résidu phénylalanine [35, 42].

2.3.7 Résidu lysine

Le cas de la lysine est comparable à celui de la leucine : en dépit de la teneur importante en résidus lysine des trois protéines modèles (59 résidus dans la BSA, 15 dans la β-lactoglobuline et 6 dans le lysozyme), les bandes spécifiques de la lysine sont difficilement visibles dans les spectres Raman correspondants. Cependant, il est possible d'attribuer à la lysine l'épaulement à 1409 cm^{-1} présent dans le spectre Raman de la BSA. La lysine

peut aussi contribuer à la bande intense à 1453 cm^{-1} par sa vibration à 1449 cm^{-1} qui est due au cisaillement des groupes CH_2.

2.4 Conclusions

Les spectres Raman expérimentaux et théoriques ont été mesurés et analysés pour une série de huit tripeptides. Les fréquences des bandes Raman appartenant aux chaînes latérales des résidus d'acides aminés sont souvent déplacées vers le bleu par rapport aux bandes correspondantes des acides aminés libres, spécialement dans le cas des acides aminés aromatiques. Notre analyse théorique suggère que ce déplacement est dû au couplage entre les vibrations (coordonnées internes) des chaînes latérales et celles du squelette du peptide. D'autre part, un très bon accord a été observé entre les bandes Raman des chaînes latérales des tripeptides et celles des résidus d'acides aminés correspondants dans les protéines. Cet accord concerne non seulement les fréquences des bandes, mais aussi leur intensités. Basé sur ce résultat, nous avons été capables d'attribuer de manière non ambigüe plusieurs bandes Raman significatives dans les spectres des trois protéines modèles. Les résultats obtenus ici donnent une base utile pour le suivi spectral des changements moléculaires induits par des réactions biologiques au sein d'un environnement protéique.

Bibliographie

[1] A. BARTH et C. ZSCHERP : What vibrations tell about proteins. *Q. Rev. Biophys.*, 35:369–430, 2002.

[2] J. T. PELTON et L.R. MCLEAN : Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.*, 277, 2000.

[3] J. KONG et S. YU : Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 39, 2007.

[4] S.U. SANE, S.M. CRAMER et T.M. PRYBYCIEN : A holistic approach to protein secondary structure characterization using amide I band Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.*, 269, 1999.

[5] G. J. Thomas JR. : New structural insights from Raman spectroscopy of proteins and their assemblies. *Biopolymers*, 67, 2002.

[6] R. TUMA : Raman spectroscopy of proteins : from peptides to large assemblies. *J. Raman Spectrosc.*, 36, 2005.

[7] M.N. SIAMWIZA, R.C. LORD, M.C. CHEN, T. TAKAMATSU, I. HARADA, H. MATSUURA et T. SHIMANOUCHI : Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry*, 14, 1975.

[8] K. NAKAMURA, S. ERA, Y. OZAKI, M. SOGAMI, T. HAYASHI et M. MURAKAMI : Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. *FEBS Letters*, 417, 1997.

[9] A.T. TU : Use of Raman spectroscopy in biological compounds. *J. Chin. Chem. Soc.*, 50, 2003.

[10] G. ZHU, X. ZHU, Q. FAN et X. WIAN : Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim. Acta A*, 78, 2011.

[11] B. HERNÁNDEZ, F. PFLÜGER, A. ADENIER, S.G. KRUGLIK et M. GHOMI : Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. VIII. Amino acids with aromatic side chains : L-phenylalanine, L-tyrosine and L-tryptophan. *J. Phys. Chem. B*, 114, 2010.

[12] N. DERBEL, B. HERNÁNDEZ, F. PFLÜGER, J. LIQUIER, F. GEINGUENAUD, N. JAÏDANE, Z. Ben LAKHDAR et M. GHOMI : Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. I. L-glycine and L-leucine. *J. Phys. Chem. B*, 111, 2007.

[13] B. HERNÁNDEZ, F. PFLÜGER, N. DERBEL, J. De CONINCK et M. GHOMI : Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. VI. Amino acids with positively charged side chains : L-lysine and L-arginine. *J. Phys. Chem. B*, 114, 2010.

[14] C.-H. CHUANG et Y.-T. CHEN : Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles : vibrational assignment and structural determination. *J. Raman Spectrosc.*, 40, 2009.

[15] E. PODSTAWKA, Y. OZAKI et L. M. PRONIEWICZ : Part I : Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Applied Spectroscopy*, 58, 2004.

[16] F. WEI, D. ZHANG, N.J. HALA et J.D. HARTGERINK : Aromatic amino acids providing characteristic motifs in the Raman and SERS spectroscopy of peptides. *J. Phys. Chem. B*, 112, 2008.

[17] Y. XIAOJUAN, G. HUAIMIN et W. JIWEI : Surface-enhanced Raman spectrum of Gly-Gly adsorbed on the silver colloidal surface. *J. Mol. Struct.*, 977, 2010.

[18] M.J. FRISCH, G.W. TRUCKS, H.B. SCHLEGEL, G.E. SCUSERIA, M.A. ROBB, J.R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G.A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H.P. HRATCHIAN, A.F. IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J.L. SONNENBERG, M. HADA, M. EHARA, K. TOYOTA, R. FUKUDA, J. HASEGAWA, M. ISHIDA, T. NAKAJIMA, Y. HONDA, O. KITAO, H. NAKAI, T. VREVEN, J.A. MONTGOMERY JR., J.E. PERALTA, F. OGLIARO, M. BEARPARK, J.J. HEYD, E. BROTHERS, K.N. KUDIN, V.N. STAROVEROV, R. KOBAYASHI, J. NORMAND, K. RAGHAVACHARI, A. RENDELL, J.C. BURANT, S.S. IYENGAR, J. TOMASI, M. COSSI, N. REGA, J.M. MILLAM, M. KLENE, J.E. KNOX, J.B. CROSS, V. BAKKEN, C. ADAMO, J. JARAMILLO, R. GOMPERTS, R.E. STRATMANN, O. YAZYEV, A.J. AUSTIN, R. CAMMI, C. POMELLI, J.W. OCHTERSKI, R.L. MARTIN, K. MOROKUMA, V.G. ZAKRZEWSKI, G.A. VOTH, P. SALVADOR, J.J. DANNENBERG, S. DAPPRICH, A.D. DANIELS, O. FARKAS, J.B. FORESMAN, J.V.

ORTIZ, J. CIOSLOWSKI et D.J. FOX : *Guaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2009.

[19] A.D. BECKE : Density−functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 98:5648–5652, 1993.

[20] C. LEE, W. YANG et R.G. PARR : Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37, 1988.

[21] M. COSSI, G. SCALMANI, N. REGA et V. BARONE : New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. *J. Chem. Phys.*, 117, 2002.

[22] http ://www.chemcraftprog.com.

[23] A.V. MIKHONIN, Z. AHMED, A. IANOUL et S.A. ASHER : Assignments and conformational dependencies of the amide III peptide backbone UV resonance Raman bands. *J. Phys. Chem. B*, 108, 2004.

[24] G. SIELER et R. SCHWEITZER-STENNER : The amide I mode of peptides in aqueous solution involves vibrational coupling between the peptide group and water molecules of the hydration shell. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 1997.

[25] J.L. CASTRO, M.R. LÓPEZ-RAMÍREZ, J.F. ARENAS et J.C. OTERO : Vibrational spectra of 3-phenylpropionic acid and L-phenylalanine. *J. Mol. Struct.*, 744-747, 2005.

[26] R.P. RAVA et T.G. SPIRO : Resonance enhancement in the ultraviolet Raman spectra of aromatic amino acids. *J. Phys. Chem.*, 89, 1985.

[27] S. STEWART et P.M. FREDERICKS : Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta A*, 55, 1999.

[28] S. O. OVERMAN et G. J. THOMAS JR. : Raman markers of nonaromatic side chains in an $\alpha-$helix assembly : Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage fd subunits. *Biochemistry*, 38, 1999.

[29] M. BRIGET MARY, M. UMADEVI, S. PANDIARAJAN et V. RAMAKRISHNAN : Vibrational spectral studies of l−methionine l−methioninium perchlorate monohydrate. *Spectrochim. Acta A.*, 60, 2004.

[30] A. TORREGGIANI, S. BARATA-VALLEJO et C. CHATGILIALOGLU : Combined Raman and IR spectroscopic study on the radical-based modifications of methionine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 2011.

[31] J. GERBRAND-MESU, T. VISSER, F. SOULIMANI et B. M. WECKHUYSEN : Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of l-histidine in aqueous environment. *Vib. Spectrosc.*, 39, 2005.

[32] M. MAJOUBE, P. MILLIE et G. VERGOTEN : Vibrational spectra of 4−methylimidazole : assignment of modes and calculation of Raman and resonance Raman intensities at the ab initio $6-31$G level. *J. Mol. Struct.*, 344, 1995.

[33] J. L. B. FARIA, F. M. ALMEIDA, O. PILLA, F. ROSSI, J. M. SASAKI, F. E. A. MELO, J. MENDES FILHO et P. T. C. FREIRE : Raman spectra of L-histidine hydrochloride monohydrate crystal. *J. Raman Spectrosc.*, 35, 2004.

[34] S. HASHIMOTO, K. ONO, H. TAKEUCHI et I. HARADA : Vibrational analysis of the imidazolate ring. *Spectrochim. Acta A*, 50, 1994.

[35] M. IOSIN, V. CANPEAN et S. ASTILEAN : Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 217:395–401, 2011.

[36] G. NAVARRA, A. TINTI, M. LEONE, V. MILITELLO et A. TORREGGIANI : Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin : Aggregation kinetics and structural changes. *J. Inorg. Biochem.*, 103:1729–1738, 2009.

[37] S. IKEDA et E.C.Y. LI-CHAN : Raman spectroscopy of heat-induced fine-stranded and particulate β-lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 18:489–498, 2004.

[38] J. HU, R.S. SHENG, Z.S. XU et Y. ZENG : Surface enhanced Raman spectroscopy of lysozyme. *Spectrochim. Acta A*, 51, 1995.

[39] G. DAS, F. GENTILE, M.L. COLUCCIO, A.M. PERRI, A. NICASTRI, F. MECARINI, G. COJOC, P. CANDELORO, C. LIBERALE, F. De ANGELIS et E. Di FABRIZIO : Principal component analysis based methodology to distinguish protein SERS spectra. *J. Mol. Struct.*, 993:500–505, 2011.

[40] A. TORREGGIANI, M. D. FOGGIA, I. MANCO, A. De MAIO, S. A. MARKARIAN et S. BONORA : Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme : A calorimetric and Raman study. *J. Mol. Struct.*, 891, 2008.

[41] J. De GELDER, K. De GUSSEM, P. VANDENABEELE et L. MOENS : Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.*, 38, 2007.

[42] Z. CHI, X. G. CHEN, J. S. W. HOLTZ et S. A. ASHER : UV resonance Raman-selective amide vibrational enhancement : quantitative methodology for determining protein secondary structure. *Biochemistry*, 37, 1998.

Chapitre 3

Interaction des peptides et des protéines avec le peroxyde d'hydrogène

Sommaire

3.1 Introduction 82

3.2 Oxydation des tripeptides 84

3.3 Oxydation du tripeptide GlyMetGly 88

3.3.1 Analyse des changements spectraux 88

3.3.2 Détermination de la constante de vitesse de réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène 93

3.3.3 Confirmation théorique du mécanisme de la réaction d'oxydation du GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène 96

3.4 Oxydation du résidu méthionine en environnement protéique : les cas de la β-lactoglobuline et du lysozyme 97

3.4.1 Mise en évidence de modifications des spectres Raman de la β-lactoglobuline en présence de peroxyde d'hydrogène 97

3.4.2 Détermination de la constante de vitesse de réaction d'oxydation de la β-lactoglobuline en présence de peroxyde d'hydrogène . . 98

3.4.3 Oxydation du lysozyme par le peroxyde d'hydrogène 102

3.5 Conclusions 104

Dans ce chapitre, les résultats concernant l'oxydation de différents tripeptides Gly-(acide aminé réactif)-Gly, de la β-lactoglobuline et du lysozyme par le peroxyde d'hydrogène suivie par spectroscopie Raman sont présentés. Ces résultats sont centrés sur l'oxydation du résidu méthionine dans les trois cas de figure envisagés.

3.1 Introduction

Le peroxyde d'hydrogène fait partie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont les produits d'un métabolisme cellulaire normal. Elles jouent un rôle vital dans la stimulation des voies de signalisation chez les cellules végétales ou animales en réponse à des changements dans les conditions environnementales intra- et extra-cellulaires [1, 2]. La chaîne respiratoire de la mitochondrie au sein des cellules produit la plupart des ERO [1, 3]. Elles sont présentes dans le milieu biologique de manière contrôlée dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie ou en excès lors du phénomène de stress oxydant [4, 1, 3].

H_2O_2 est généré par la réduction et la dismutation enzymatique ou non du radical anion superoxyde, équation 3.1 ainsi que par des enzymes.

$$2{O_2}^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \tag{3.1}$$

Comparé aux autres ERO, le peroxyde d'hydrogène présente un temps de vie assez long (comparé à celui des espèces radicalaires) et présente l'avantage de pouvoir migrer au travers des membranes cellulaires grâce à sa charge électrique neutre. Ces caractéristiques lui donnent accès à des cibles biologiques variées.

Les protéines sont des cibles majeures pour les ERO [5, 1, 6]. En effet, elles sont abondantes dans les systèmes biologiques et leur constantes de réaction d'oxydation sont élevées. L'oxydation d'une protéine peut avoir plusieurs sites d'attaque comme par exemple son squelette constitué d'enchaînements de liaisons peptidiques ou les chaînes latérales de ses acides aminés. Dans le cas du squelette protéique, la plupart des constantes de vitesse des réactions d'oxydation avec des oxydants non radicaux tel que le peroxyde d'hydrogène sont faibles. Généralement, peu de dommages sont observés dans cette partie de la protéine. Trois cas principaux peuvent être distingués pour les chaînes latérales : les chaînes latérales aliphatiques, aromatiques et soufrées. Les chaînes latérales aliphatiques sont oxydées par les oxydants radicaux les plus réactifs et les aromatiques réagissent principalement suivant des additions avec la plupart des oxydants. Un schéma général est que

les réactions les plus rapides se font avec les chaînes latérales qui sont riches en électrons car beaucoup d'espèces réactives générées dans les systèmes biologiques sont déficitaires en électrons (oxydants, électrophiles) [5].

L'atome de soufre, présent au sein des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, est oxydé. Ainsi, ces résidus sont les sites majeurs de l'oxydation au sein des protéines [5]. La réaction d'oxydation de la cystéine (CS) avec le peroxyde d'hydrogène donne l'acide sulfénique, ($CSOH$). La réaction avec des thiols en excès donne rapidement lieu à la formation d'un disulfure dans le cas de thiols à faibles poids moléculaires, [7,5,8,9] :

$$CSH \rightleftharpoons CS^- + H^+ \tag{3.2}$$

$$CS^- + \mathrm{H_2O_2} \rightarrow CSOH + HO^- \tag{3.3}$$

$$CSOH + CS^- \rightarrow CSSC + HO^- \tag{3.4}$$

Comme la plupart des systèmes biologiques ont des moyens efficaces, les réductases et les disulfure isomérases, pour maintenir les résidus cystéine dans leur forme réduite, ces dimères ($CSSC$), cystine ou pont disulfure, font partie des rares lésions oxydatives observées sur les protéines qui peuvent être rapidement réparées [10, 11].

L'oxydation des résidus méthionine est une des conséquences les plus importantes de l'attaque des ERO parmi les modifications post-traductionnelles covalentes [12, 13, 14]. L'oxydation du résidu méthionine donne majoritairement le sulfoxyde correspondant et ce pour des oxydants radicalaires ou non comme pour le peroxyde d'hydrogène [5, 15]. Une oxydation supplémentaire, moins courante, donne alors la sulfone correspondante Fig.3.1, [16].

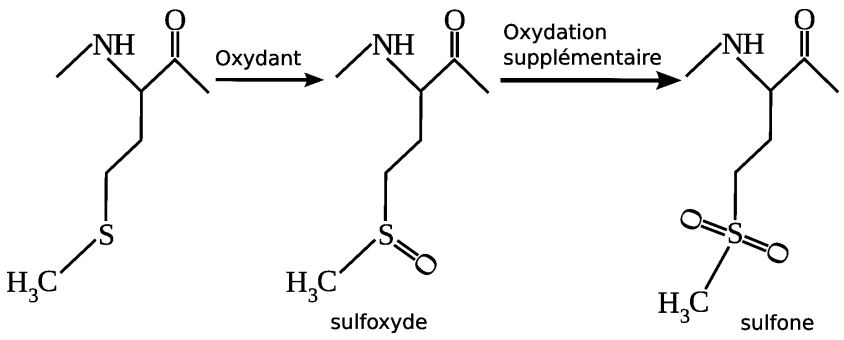

FIGURE 3.1 – Oxydation du résidu méthionine.

Les résidus méthionine et cystéine peuvent tous deux être réduits après oxydation, dans le cas de la méthionine grâce à la méthionine sulfoxyde réductase [12]. Les résí-

dus méthionine font alors partie d'un système de défense anti-oxydant de la "dernière chance" pour les protéines [17]. La concentration effective en résidus méthionine est très élevée au sein des protéines. Cela leur permet de protéger la structure ou la fonction protéique en "récupérant" les oxydants de manière efficace avant qu'ils n'attaquent des résidus critiques [17, 18]. Il peut cependant arriver que les formes modifiées de la méthionine s'accumulent dans les systèmes vivants malgré le fait que la méthionine sulfoxyde puisse être réparée. Ainsi, des résidus méthionine présents dans de nombreux sites actifs d'enzymes peuvent être oxydés par le peroxyde d'hydrogène. Le résultat est alors une détérioration possible de l'activité des enzymes [13, 19]. Ce phénomène s'explique par une dégradation des systèmes de défense et du taux de renouvellement des cellules. Cela a pour conséquence une implication de cette accumulation dans des processus dégénératifs liées à des conditions pathologiques et de vieillissement [12].

3.2 Oxydation des tripeptides

Afin d'étudier la réactivité des différents résidus d'acides aminés avec le peroxyde d'hydrogène, un travail préliminaire a été réalisé sur l'oxydation d'une série de résidus d'acides aminés spécifiques au sein de tripeptides. Ces résidus ont été choisis par rapport à leur réactivités attendues en présence de peroxyde d'hydrogène : des résidus à chaînes latérales aromatiques (histidine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et portant un atome de soufre (méthionine). Ces acides aminés sont étudiés liés à un acide aminé glycine à chacune de leur extrémités par des liaisons peptidiques. Ces tripeptides, représentant de petits fragments de protéine, permettent alors de mettre en évidence l'action du peroxyde d'hydrogène sur ces résidus d'acides aminés spécifiques sans l'influence de l'environnement protéique.

Les spectres Raman des tripeptides avec résidus centraux aromatiques GlyPheGly, Fig.3.2, GlyTrpGly ,Fig.3.3, et GlyTyrGly, Fig. 3.4, sont mesurés avant et après réaction avec le peroxyde d'hydrogène. Ils ne présentent pas de changements spectraux en dehors de l'apparition du pic caractéristique du peroxyde d'hydrogène à 876 cm^{-1}. Pour le GlyTrpGly le pic du peroxyde se superpose au pic caractéristique du résidu tryptophane à 883 cm^{-1} lié aux vibrations des cycles aromatiques.

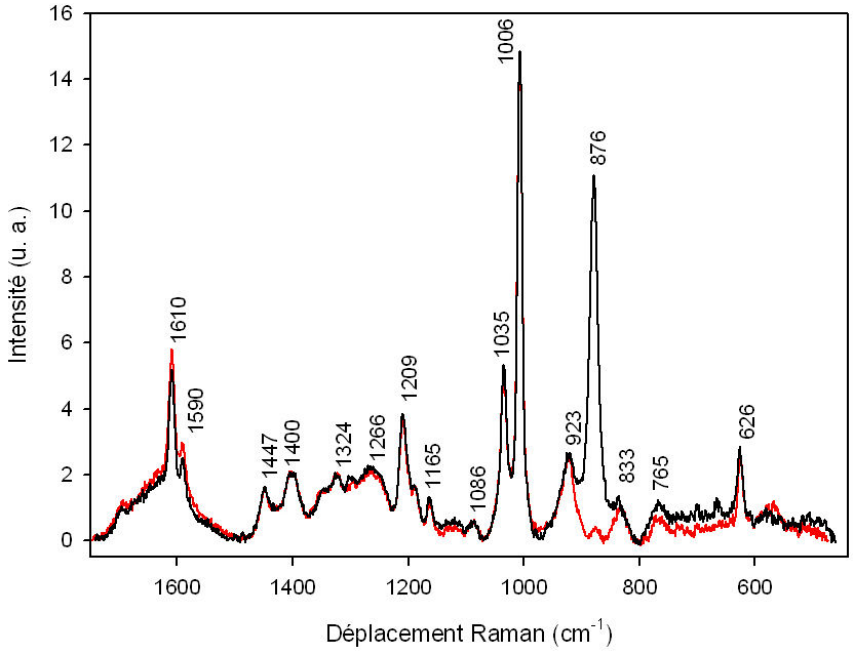

Figure 3.2 – Spectres Raman de GlyPheGly à 20 mM avec un pH égal à 7. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 60 mM de peroxyde d'hydrogène.

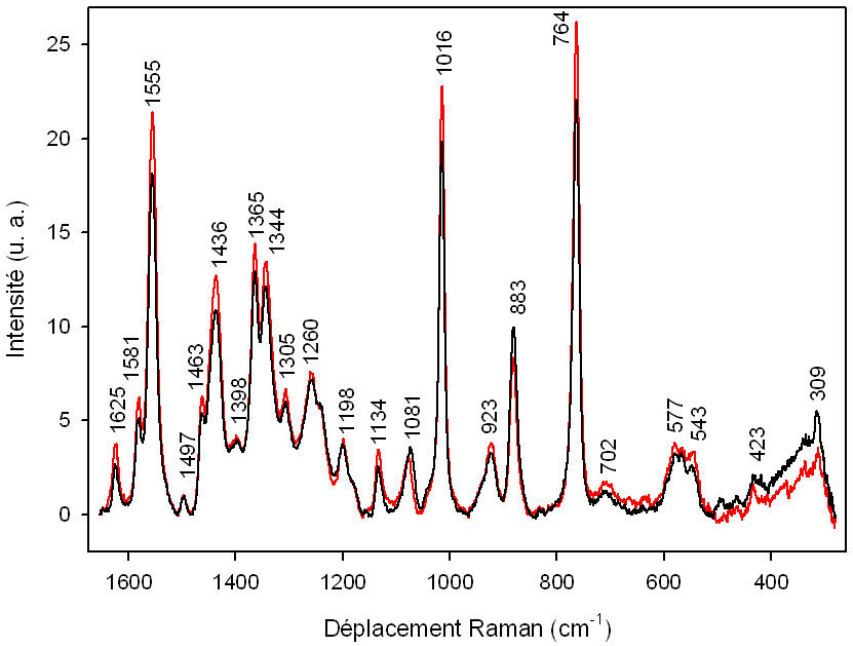

Figure 3.3 – Spectres Raman de GlyTrpGly à 40 mM avec un pH égal à 11. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 120 mM de peroxyde d'hydrogène.

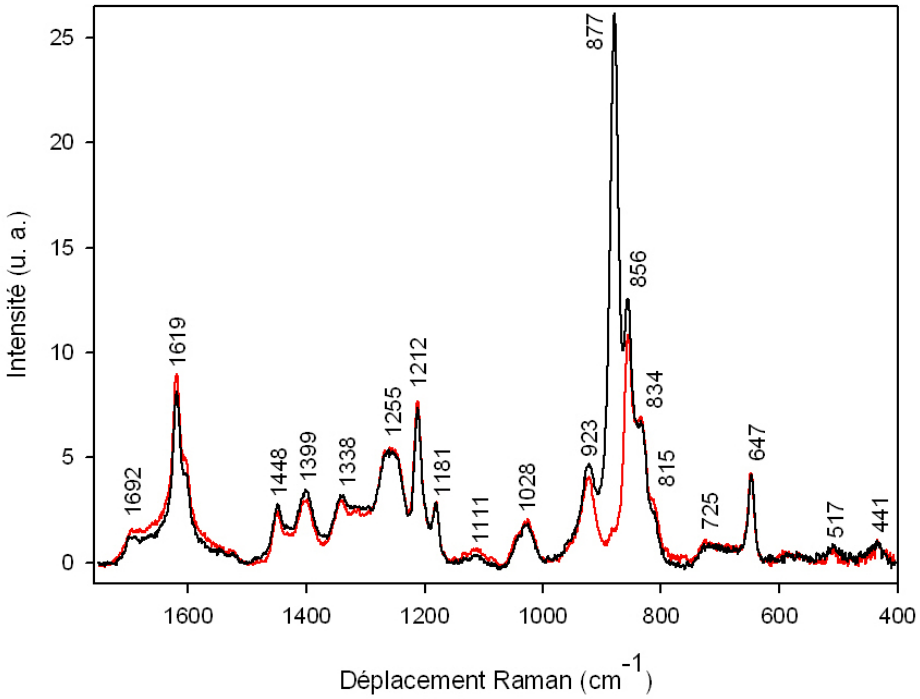

Figure 3.4 – Spectres Raman de GlyTyrGly à 28 mM avec un pH égal à 7. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 120 mM de peroxyde d'hydrogène.

Dans le cas du GlyHisGly, Fig.3.5, le pic du peroxyde à 876 cm^{-1} disparaît. Il n'est plus visible dans le spectre du mélange GlyHisGly/peroxyde d'hydrogène. De plus, l'amplitude de la bande caractéristique du résidu histidine à 1069 cm^{-1} diminue de manière significative. Cette bande peut alors être utilisée pour mettre en évidence l'oxydation des résidus histidine par spectroscopie Raman.

Des changements spectraux importants sont observés pour l'oxydation de GlyMetGly, Fig.3.6. L'addition du peroxyde est suivie par l'apparition d'une bande Raman de forte intensité à 705 cm^{-1}, de deux autres bandes d'intensités plus faibles à 1006 et 1419 cm^{-1} ainsi que de la bande caractéristique du peroxyde d'hydrogène à 876 cm^{-1}. Ces modifications spectrales s'imposent comme un marqueur très spécifique de l'oxydation des résidus méthionine. Compte-tenu de l'importance de l'oxydation de la méthionine, la suite de l'étude a été focalisée sur l'oxydation de ce résidu en particulier.

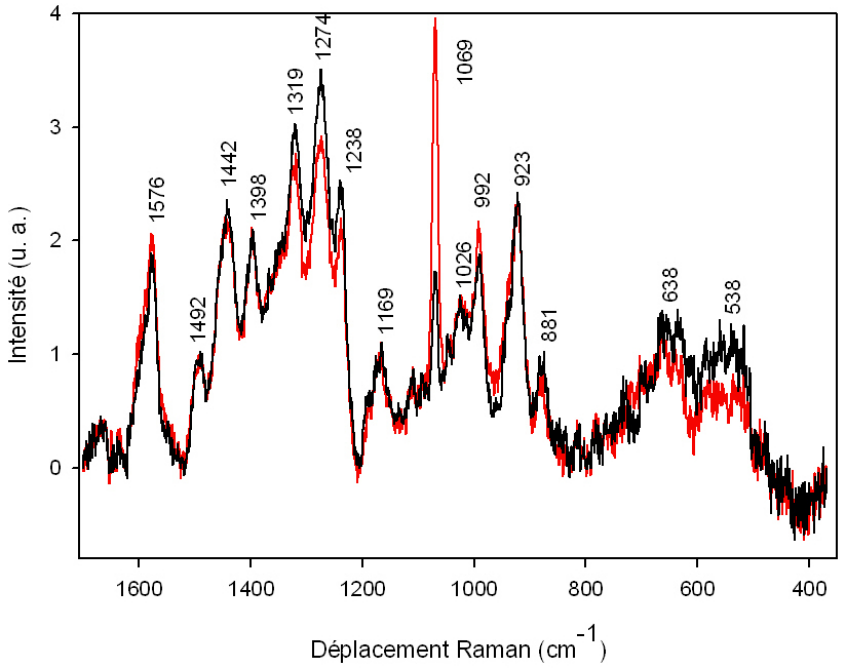

Figure 3.5 – Spectres Raman de GlyHisGly à 20 mM avec un pH égal à 10. Le spectre représenté en rouge correspond à celui du tripeptide natif et en noir à celui du tripeptide avec 60 mM de peroxyde d'hydrogène.

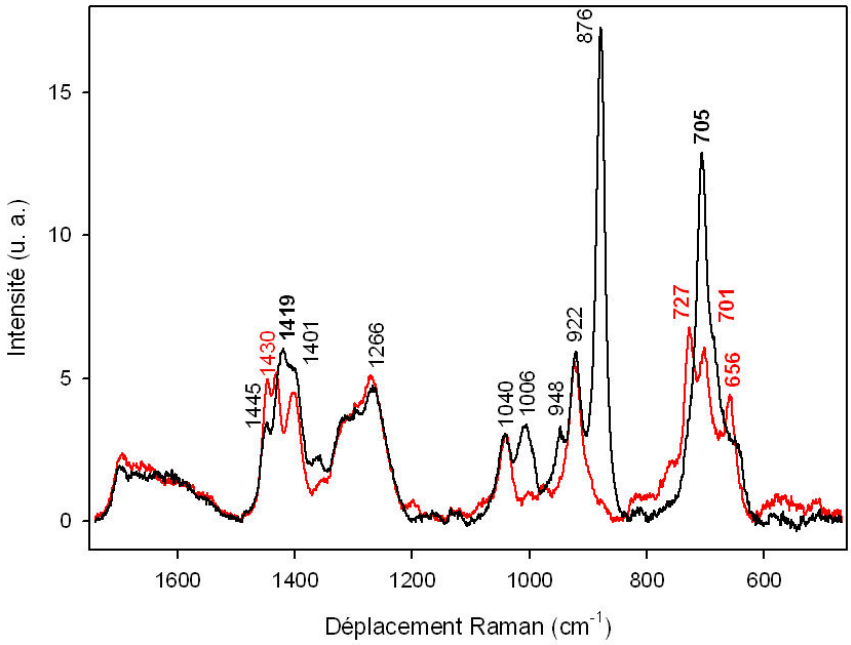

Figure 3.6 – Spectre Raman de GlyMetGly à 40 mM, à pH 7, en rouge et spectre Raman de GlyMetGly 40 mM avec le peroxyde d'hydrogène 120 mM, à pH 7, en noir.

3.3 Oxydation du tripeptide GlyMetGly

3.3.1 Analyse des changements spectraux

La réaction d'oxydation attendue du résidu méthionine est donnée par l'équation présentée dans la figure 3.7. Celle-ci montre la formation d'un groupement sulfoxyde sur le résidu méthionine oxydé.

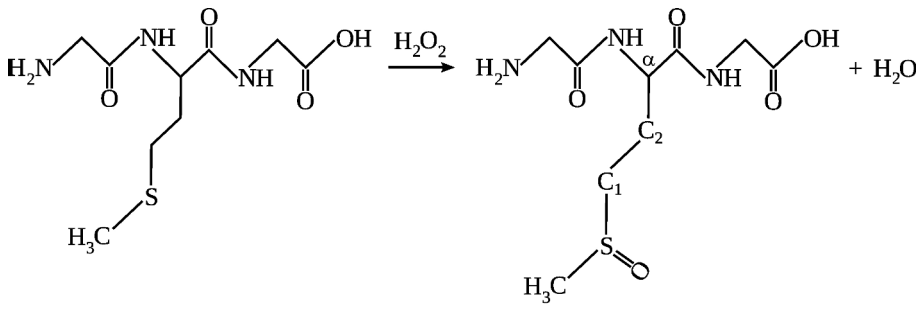

Figure 3.7 – Réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène

En Fig.3.6, deux nouvelles bandes apparaissent dans le spectre du résidu méthionine oxydé à 948 et 1006 cm^{-1}. Cette dernière à 1006 cm^{-1} est attribuable à la double liaison S=O formée au cours de la réaction, [12, 20, 21]. Les approches théoriques qui seront présentées ultérieurement dans ce chapitre donnent l'attribution de la bande à 948 cm^{-1}. Elle correspond à des vibrations de déformation du groupement méthyle et à des vibrations d'élongation de la liaison soufre-oxygène. D'autre part, les bandes regroupées autour de 1400 cm^{-1} décrivent les vibrations du groupement méthyle lié au soufre. Leur modifications suite à l'oxydation s'expliquent par le changement d'environnement dû à la formation du groupement sulfoxyde. Les bandes entre 600 et 800 cm^{-1} sont liées aux vibrations des liaisons carbone-soufre. L'action du peroxyde les transforme, comme par exemple l'augmentation de l'amplitude de la bande centrale à 705 cm^{-1}, et cela s'explique aussi par le changement de leur environnement. Ces bandes sont alors caractéristiques de la présence du groupement sulfoxyde [21, 22, 23, 24]. Par conséquent, le spectre de GlyMetGly oxydé confirme la formation du produit attendu, le résidu méthionine sulfoxyde.

Le domaine des vibrations des liaisons carbone-soufre (600-800 cm^{-1}) a été étudié plus en détails. Nous avons mesuré des spectres Raman centrés sur ces longueurs d'onde pour le tripeptide natif et après l'ajout de peroxyde d'hydrogène à différents temps de réaction, Fig. 3.8. Le spectre de GlyMetGly natif présente trois bandes à 656, 701 et 727 cm^{-1}.

Après oxydation du tripeptide, les bandes à 727 cm^{-1} et 656 cm^{-1} diminuent en intensité et la bande centrale à 701 cm^{-1} se déplace à 705 cm^{-1} et son intensité augmente avec le temps de réaction.

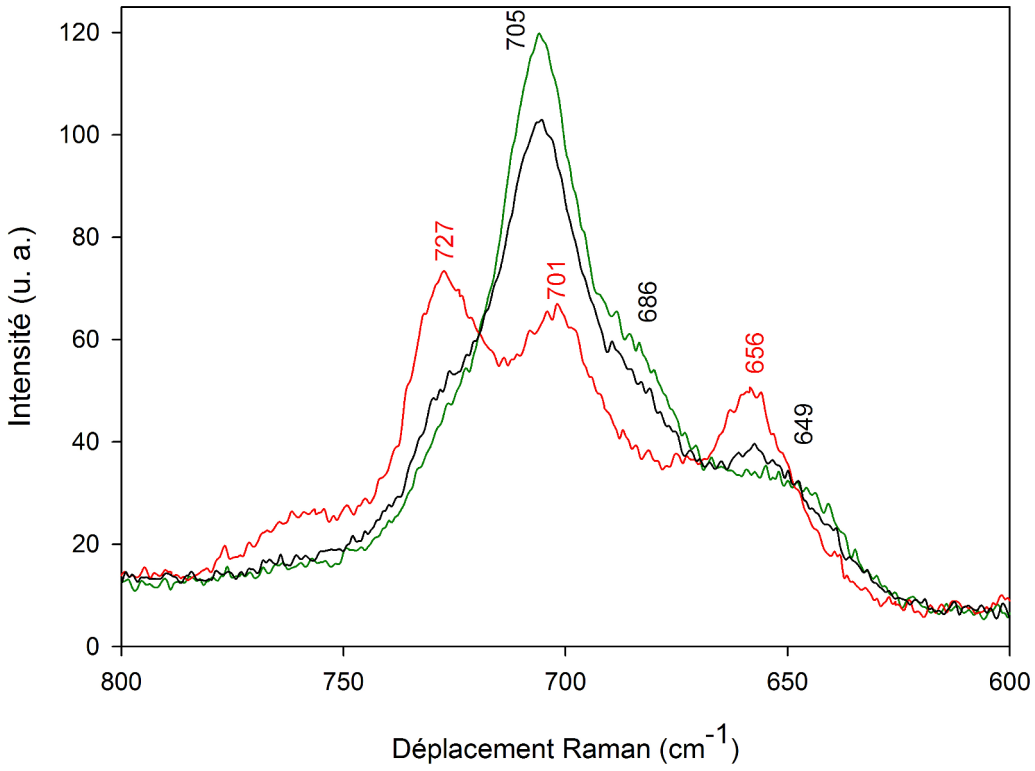

Figure 3.8 – Spectres Raman centrés sur les bandes C-S de GlyMetGly natif à 40 mM, pH 7, en rouge, et d'un mélange équimolaire de GlyMetGly et de peroxyde d'hydrogène après 1h10 et 3h50 de réaction en noir et en vert, respectivement.

Dans le but d'attribuer ces bandes observées précédemment, nous avons réalisé des simulations de spectres Raman du tripeptide GlyMetGly. Nous avons utilisé des calculs de chimie quantique au niveau de la théorie de la fonctionnelle de la densité électronique (ou DFT) avec la fonctionnelle B3LYP et le jeu de fonctions de base 6-311+G(2dF,2pd). Dans la littérature, il a été proposé que la chaîne latérale de la méthionine adopte deux conformations par rapport à la liaison carbone-soufre : une conformation dite *trans* et une conformation dite *gauche* [12]. Ces conformations sont définies par l'angle dièdre C_1 - C_2 -S-C qui est de 180 degrés pour la conformation *trans* et de 60, 120 ou 240 degrés pour la conformation *gauche*. Nos calculs confirment l'existence de deux conformations *gauche* et *trans* pour le résidu méthionine au sein du tripeptide. La différence d'énergie libre entre les deux conformères du résidu méthionine à l'état natif est de 0,88 $kcal.mol^{-1}$. La conformation *trans* est ainsi légèrement plus stable que la conformation *gauche*. Nos

calculs se sont donc portés sur les deux conformations du résidu méthionine au sein du tripeptide à l'état natif et à l'état oxydé.

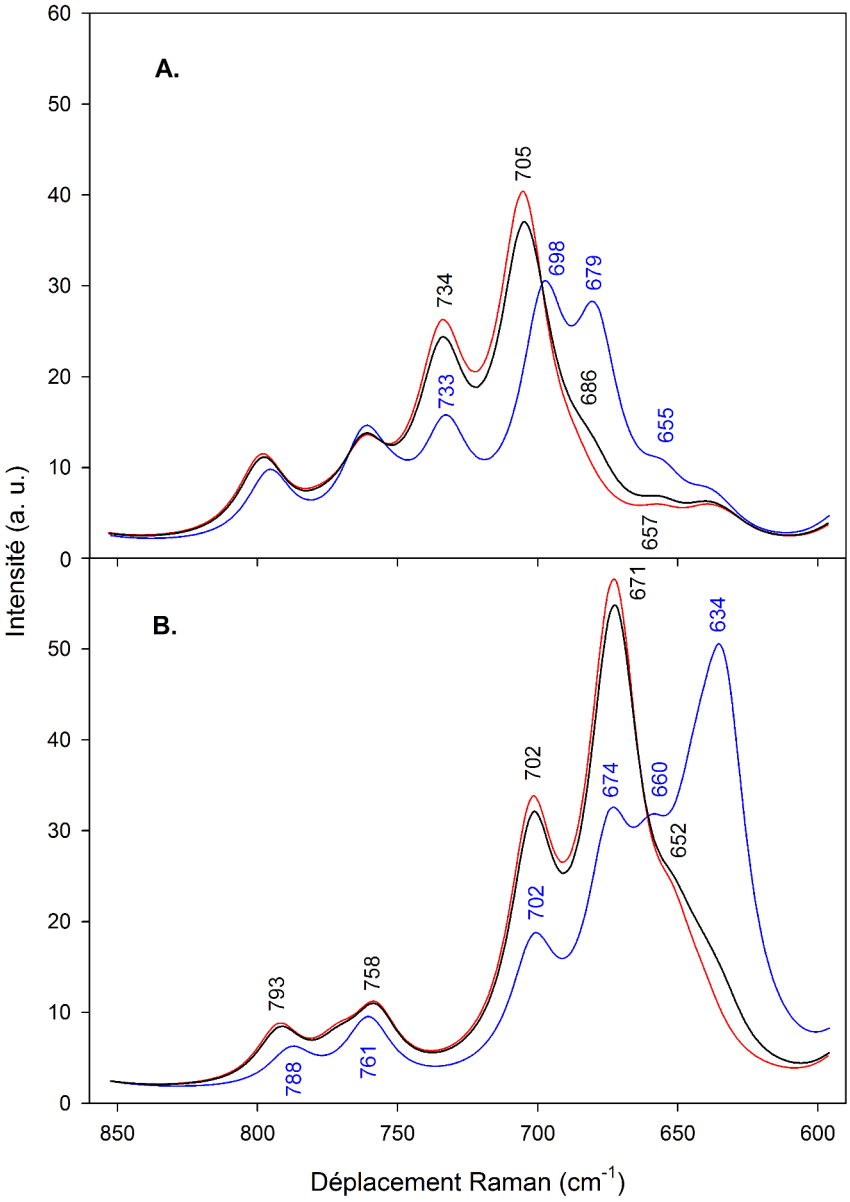

Figure 3.9 – Spectres Raman théoriques de GlyMetGly natif, A., et oxydé,B., dans les deux conformations *gauche*, en bleu, *trans* en rouge et en noir la somme pondérée des deux spectres *trans* et *gauche*.

Nos simulations de spectres Raman, Fig.3.9, montrent que les deux conformations de la méthionine à l'état natif au sein du tripeptide ont des spectres Raman similaires avec des bandes dont l'attribution est donnée dans le tableau 3.1. Pour chacune des conforma-

tions les bandes Raman théoriques comprises entre 655 et 734 cm^{-1} correspondent à des élongations des liaisons carbone-soufre. Les attributions montrent que les deux conformères contribuent à chacune des bandes expérimentales caractéristiques observées Fig.3.8 à 656, 701 et 727 cm^{-1} pour le tripeptide natif.

Expérimental	Théorique	Attribution
656	655 (g)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.), δ(OCO)
	657(t)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(OCO), δ(squel.)
	679(g)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.), δ(OCO)
	686(t)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, $\delta(\mathrm{CCN})_{\mathrm{NH_3^+}}$, δ(squel.)
701	698(g)	$\nu(\mathbf{CS})_{\mathrm{CH_3}}$, $\delta(\mathrm{CCN})_{\mathrm{NH_3^+}}$
	705(t)	$\nu(\mathbf{CS})_{\mathrm{CH_3}}$
727	733(g)	$\nu_a(\mathbf{C_1SC})$, δ(squel.)
	734(t)	$\nu_a(\mathbf{C_1SC})$, δ(squel.)

Tableau 3.1 – Attribution des fréquences Raman théoriques obtenues pour le tripeptide natif avec les deux conformations du résidu méthionine et leur correspondances avec les fréquences expérimentales où δ est une déformation, ρ est un basculement, ν est une élongation, s est un mouvement symétrique, a est un mouvement asymétrique des liaisons définies, *squel.* est relatif au squelette du tripeptide (les deux résidus glycines et leurs deux liaisons peptidiques liées au résidu méthionine) et *pept.* est relatif à la liaison peptidique.

Comme il a déjà été suggéré, [25,26,27], deux stéréoisomères du groupe sulfoxyde sont générés lors de l'oxydation du résidu méthionine. La différence d'énergie libre entre les deux conformères du résidu méthionine oxydé issue de nos calculs est de 1,2 $kcal.mol^{-1}$. La conformation *trans* est encore plus stable que la conformation *gauche* en présence du groupement sulfoxyde. Le conformère oxydé *trans* devrait ainsi avoir une contribution plus forte que celle du conformère *gauche* dans le spectre expérimental du tripeptide oxydé. Les spectres Raman théoriques du tripeptide oxydé sous ces deux conformations sont présentés Fig.3.9. Nous remarquons que les bandes à 734 cm^{-1} ont disparues, que l'intensité des bandes autour de 705 cm^{-1} a diminué et que celle des bandes autour de 670, 660 et 630 cm^{-1} a augmenté. Ces bandes sont attribuées aux différents modes normaux dans le tableau 3.2. De plus, les calculs indiquent que les deux conformères du résidu méthionine oxydé sont impliqués dans ces modifications spectrales. La bande expérimentale principale du tripeptide oxydé à 705 cm^{-1} est le résultat d'une combinaison

d'élongations impliquant les deux carbones liées au soufre. Ces liaisons sont donc sensibles à la formation de la double liaison soufre-oxygène au cours de la réaction.

Expérimental	Théorique	Attribution
649	634(g)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.)
	641(t)	δ(NH)
	643(g)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(NH)
	648(g)	δ(NH)
	652(t)	$\nu(\mathbf{CS})$, δ(NH), δ(squel.)
686	660(g)	$\nu(\mathbf{CS})$
705	671(t)	$\nu_s(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.)
	674(g)	$\nu_a(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.), δ(OCO)
	676(t)	$\nu_a(\mathbf{C_1S})$, δ(squel.)
	702(g)	$\delta(\mathrm{CCN})_{\mathrm{NH_3^+}}$
	702(t)	$\nu(\mathbf{C_1S})$, $\delta(\mathrm{CCN})_{\mathrm{NH_3^+}}$
	758(t)	δ(squel.)
	761(g)	$\rho(\mathrm{CH_2})_{Met}$

Tableau 3.2 – Attribution des fréquences Raman théoriques obtenues pour le tripeptide oxydé avec les deux conformations du résidu méthionine et leur correspondances avec les fréquences expérimentales où δ est une déformation, ρ est un basculement, ν est une élongation, s est un mouvement symétrique, a est un mouvement asymétrique des liaisons définies, *squel.* est relatif au squelette du tripeptide (les deux résidus glycines et leurs deux liaisons peptidiques liées au résidu méthionine) et *pept.* est relatif à la liaison peptidique.

De la même façon que pour l'évolution du domaine spectral des vibrations carbone-soufre du résidu méthionine, une étude dans le temps a été réalisée pour la bande caractéristique du peroxyde à 876 cm^{-1}, Fig. 3.10. L'amplitude de cette bande décroît au cours de la réaction mais le pic ne disparaît pas complètement après plus de quatre heures de réaction.

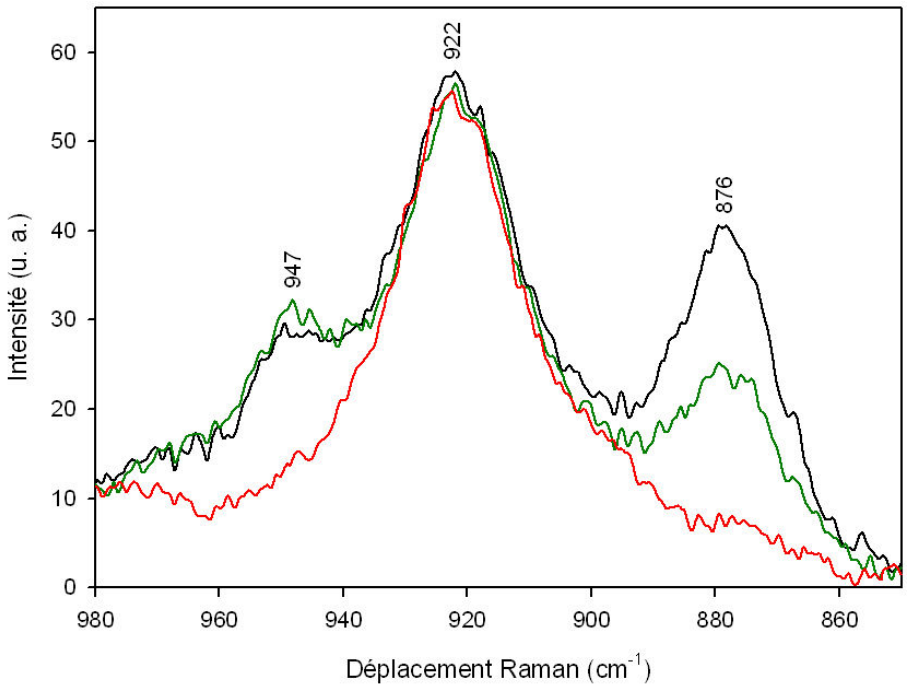

Figure 3.10 – Spectres Raman représentant l'évolution de la bande Raman caractéristique du peroxyde d'hydrogène pour le GlyMetGly natif à 40 mM, à pH 7, en rouge et du mélange équimolaire de GlyMetGly à 40 mM avec le peroxyde d'hydrogène, à pH 7 après 1h35 et 4h10 de réaction en noir et en vert, respectivement.

3.3.2 Détermination de la constante de vitesse de réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène

La bande Raman à 705 cm^{-1} a été choisie comme marqueur de l'avancement de la réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène. L'évolution de son amplitude est suivie dans le temps par enregistrement de spectres successifs. Après normalisation et soustraction de la contribution du solvant pour chaque spectre, l'amplitude de la bande à 705 cm^{-1} est mesurée et reportée dans la figure 3.11.

L'enregistrement de ces spectres commence juste après l'ajout de la solution de peroxyde à 40 mM au tripeptide sous forme de poudre pesée de façon à obtenir des conditions équimolaires entre les deux réactifs. Les spectres sont mesurés dans une fenêtre spectrale restreinte centrée sur la bande à 705 cm^{-1}, avec une accumulation constante de 5000 coups laser, ce qui a permis de réaliser des enregistrements de spectres successifs à une fréquence d'environ 10 min. Les points expérimentaux présentés Fig.3.11 sont obtenus à partir de deux séries de mesures. Ces points sont des points moyens prenant, pour chacune des

séries, l'amplitude du pic à 705 cm^{-1} comme une différence entre son intensité maximum et celle de la ligne de base du spectre.

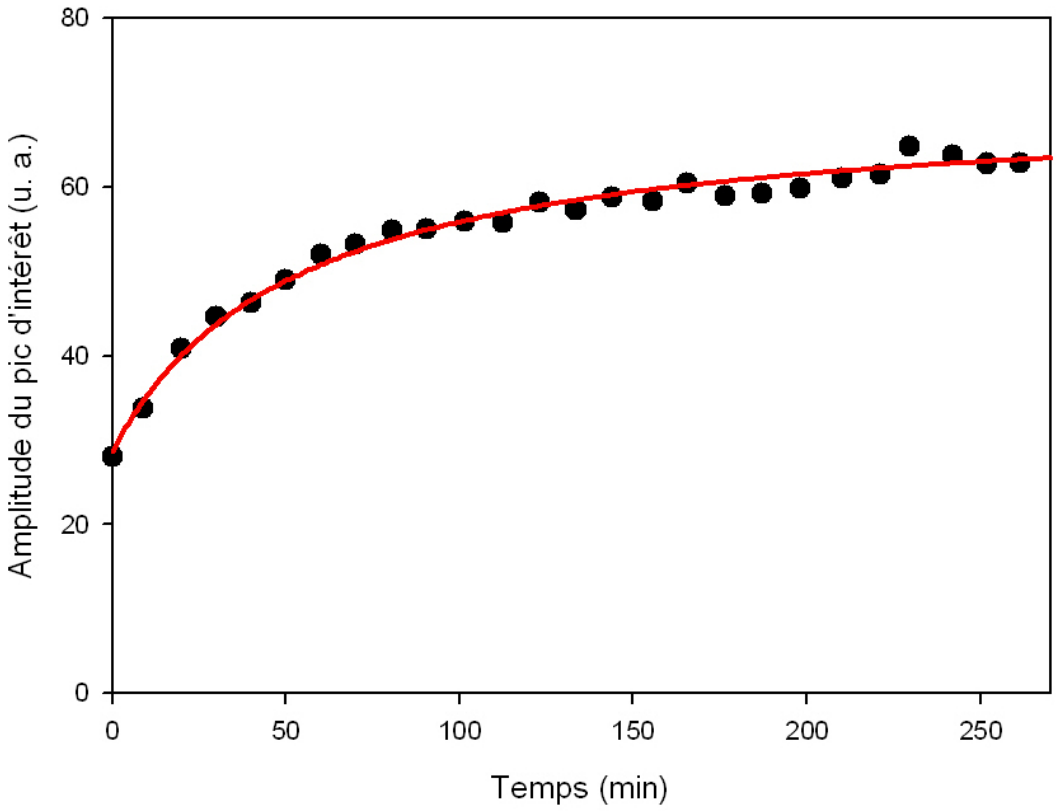

Figure 3.11 – Mesure de la différence d'amplitude de la bande à 705 cm^{-1} en fonction du temps (points noirs). La ligne rouge correspond à la fonction de modélisation de ces points. Ces résultats sont obtenus pour 40 mM de GlyMetGly dissout dans une solution de 40 mM de peroxyde d'hydrogène.

La fonction de modélisation des points expérimentaux est obtenue à partir de l'équation de vitesse Eq 3.5 :

$$\frac{-dC_{red}}{dt} = k\, C_{red}\, [H_2O_2] = k\, C_{red}^2 \tag{3.5}$$

La réaction étudiée est d'ordre deux, résultat des conditions équimolaires choisies, avec k la constante de vitesse de la réaction, C_{red} la concentration en GlyMetGly réduit et $[H_2O_2]$ la concentration du peroxyde d'hydrogène. Le GlyMetGly réduit correspond ici à l'état natif du tripeptide avant son oxydation par le peroxyde d'hydrogène.

La constante de vitesse vérifie alors l'équation 3.6 :

$$k\,t = \frac{1}{C_{red}} - \frac{1}{C_0} \tag{3.6}$$

qui résulte de l'intégration de l'équation 3.5. Ici C_0 correspond à la concentration initiale de tripeptide. L'amplitude de la bande étudiée peut être exprimée en fonction de l'intensité du signal liée au GlyMetGly oxydé, A_{ox}, et réduit, A_{red}, de la concentration en GlyMetGly réduit C_{red} et de la concentration initiale en GlyMetGly, C_0 selon l'équation Eq.3.7 :

$$A(t) = \frac{C_{red}}{C_0}\,A_{red} + \frac{1 - C_{red}}{C_0}\,A_{ox} \tag{3.7}$$

La fonction de modélisation des points expérimentaux, l'équation 3.8, est obtenue en remplaçant l'expression de C_{red} donnée par l'équation 3.6 dans l'équation 3.7 :

$$A(t) = A_{ox} - \frac{A_{ox} - A_{red}}{k\,t\,C_0 + 1} \tag{3.8}$$

La modélisation des valeurs expérimentales, Fig.3.11, donne une valeur pour k égale à (7,9 ± 0,6) 10^{-3} M^{-1} s^{-1}. Ce résultat est en accord avec la valeur de (8,1 ± 1,0) 10^{-3} M^{-1} s^{-1} rapportée dans le cas de l'oxydation du dipeptide Gly-Met par le peroxyde d'hydrogène, [28] et avec la valeur de 6 10^{-3} M^{-1} s^{-1} rapportée pour l'oxydation de la méthionine libre (sous forme d'acide aminé) par le même oxydant, [5].

Dans la théorie de l'état de transition, la constante de vitesse k est donnée par la formule d'Eyring, Eq.3.9 :

$$k = \frac{k_B\,T}{h}\,exp\left(-\frac{\Delta G^{\dagger}}{R\,T}\right) \tag{3.9}$$

Ici, $\Delta G^{\dagger}$ est la différence entre l'enthalpie libre de l'état de transition (ET) et celle des réactifs libres (RL), k_B la constante de Boltzmann, T la température absolue, h la constante de Planck et R la constante des gaz parfaits.

En utilisant cette formule, nous déduisons une valeur de 20,0 ± 0,05 $kcal.mol^{-1}$ pour

la barrière d'énergie de la réaction d'oxydation du résidu méthionine au sein du tripeptide GlyMetGly.

3.3.3 Confirmation théorique du mécanisme de la réaction d'oxydation du GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène

Une étude théorique de la réaction d'oxydation du tripeptide par le peroxyde d'hydrogène a été effectuée au sein de l'équipe afin de valider le mécanisme de la réaction proposé. Cette étude est basée sur la méthode DFT avec les potentiels PW91 et le jeu de fonctions de base 6-31G(d,p). Ces calculs ont donné les valeurs des enthalpies libres des réactifs complexés G_{RC} = 3,1 kcal.mol^{-1}, de l'état de transition, G_{ET} = 20,4 kcal.mol^{-1} et des produits complexés G_{PC} = -34,0 kcal.mol^{-1} avec pour origine l'énergie libre des réactifs libres, G_{RL}. La trajectoire de réaction est illustrée Fig.3.12.

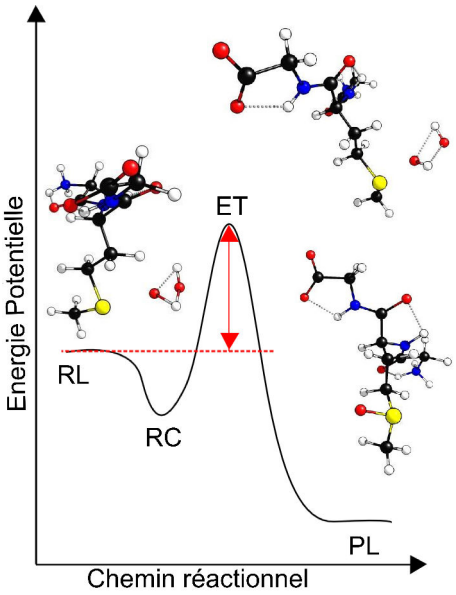

Figure 3.12 – Représentation schématique des coordonnées de la réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène avec RL les réactifs libres, RC les réactifs complexés, ET l'état de transition et PC les produits complexés.

La barrière d'énergie d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène est alors donnée par la différence entre l'enthalpie libre de l'état de transition, G_{ET}, et celle des réactifs libres, G_{RL}, qui est nulle car choisie comme origine des enthalpies libres, ce qui nous donne : $\Delta G^{\dagger}_{DFT}$ = 20,4 kcal.mol^{-1}. Cette valeur obtenue par calcul est donc très proche de celle obtenue précédemment par l'étude cinétique de la réaction. Cela confirme

l'interprétation du mécanisme de la réaction selon laquelle l'oxydation du soufre du résidu méthionine s'arrête à la formation du groupement sulfoxyde.

3.4 Oxydation du résidu méthionine en environnement protéique : les cas de la β-lactoglobuline et du lysozyme

Les spectres Raman du tripeptide GlyMetGly, comme modèle simplifié de protéine, en présence du peroxyde d'hydrogène ont mis en évidence l'oxydation du résidu méthionine en méthionine sulfoxyde. Nous nous intéressons maintenant à l'oxydation de ce résidu au sein de deux environnements protéiques : une protéine dimérique de 162 résidus par monomère dont 4 résidus méthionine dans le cas de la β-lactoglobuline et une protéine de 129 résidus contenant 2 résidus méthionine dans le cas du lysozyme.

3.4.1 Mise en évidence de modifications des spectres Raman de la β-lactoglobuline en présence de peroxyde d'hydrogène

La β-lactoglobuline est une protéine majeure du lactosérum, par sa purification aisée et sa stabilité, elle fait partie des protéines largement étudiées [29]. Les protéines telles que la β-lactoglobuline sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour réaliser l'émulsion de lipides et protègent ces lipides du phénomène d'oxydation. Il a été montré que certains des résidus de la protéine s'oxydaient avant même que l'oxydation des lipides ne se fasse [30]. Nous nous sommes intéressé à cette réaction, pour laquelle le mécanisme reste inconnu, et pour cela nous avons réalisé l'étude de l'oxydation de la β-lactoglobuline par le peroxyde d'hydrogène en utilisant la spectroscopie Raman.

Les spectres Raman de la β-lactoglobuline avec et sans peroxyde d'hydrogène sont représentés Fig. 3.13, et enregistrés avec une accumulation de 8000 coups laser. Ces spectres sont restreints au domaine spectral encadrant les bandes Raman des vibrations des liaisons carbone-soufre. Ils permettent ainsi de mettre plus aisément en évidence d'éventuels changements spectraux similaires à ceux observés pour l'oxydation du résidu méthionine dans le tripeptide.

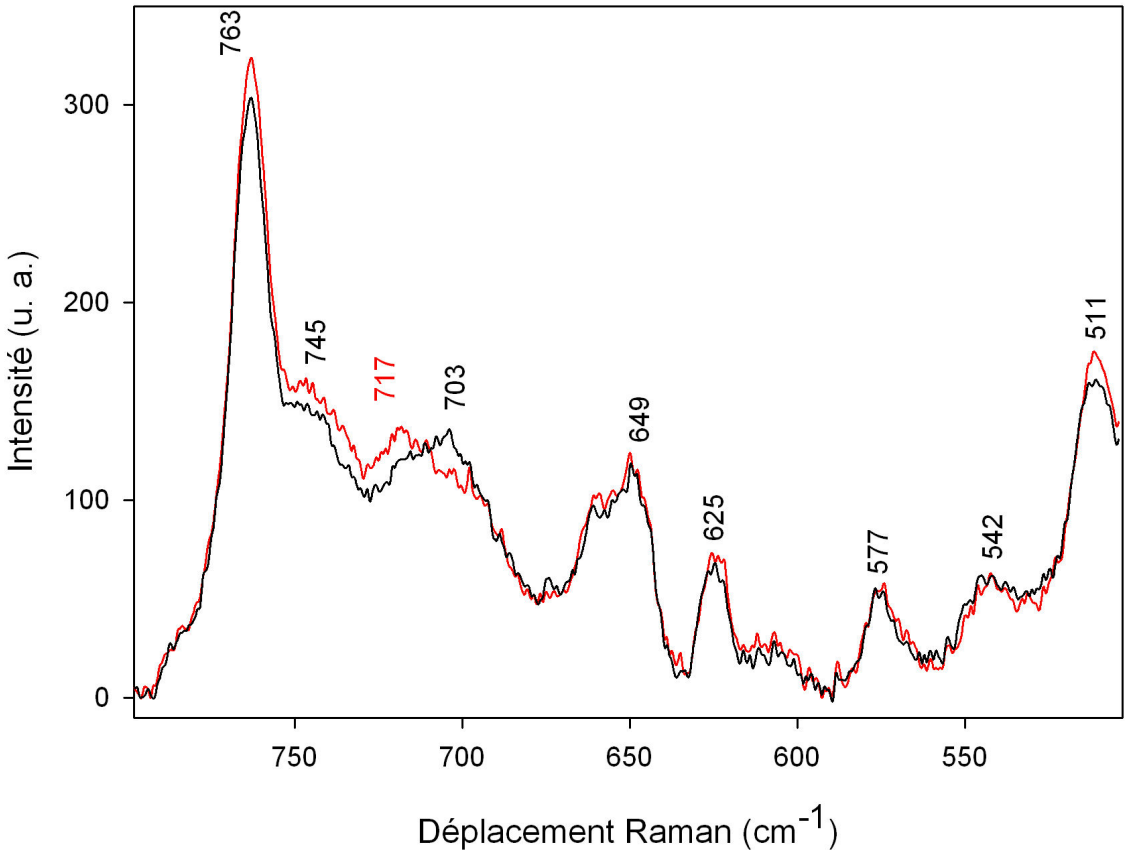

Figure 3.13 – Spectres Raman de la β-lactoglobuline en solution à 2 mM avec et sans peroxyde d'hydrogène à 150 mM, à pH 7, en noir et en rouge, respectivement.

Les spectres obtenus ne présentent pas de changements notables à part la modification d'une bande à 717 cm^{-1} et l'apparition d'une bande à 703 cm^{-1}. Ces bandes modifiées appartiennent bien au domaine spectral de vibration des liaisons carbone-soufre de la protéine. L'apparition de la bande à 703 cm^{-1} correspond à celle de la bande à 705 cm^{-1} lors de l'oxydation de GlyMetGly. Cette bande confirme la formation du groupement sulfoxyde pour les résidus méthionine oxydés de la protéine.

3.4.2 Détermination de la constante de vitesse de réaction d'oxydation de la β-lactoglobuline en présence de peroxyde d'hydrogène

Afin de réaliser une étude quantitative de la réaction d'oxydation des résidus méthionine au sein de la protéine, l'évolution de l'amplitude du pic indicateur de la formation de

méthionine sulfoxyde est suivie en fonction du temps de réaction. Les valeurs de ces amplitudes sont reportées dans la figure 3.14 après normalisation et soustraction de la contribution du solvant.

L'évolution de l'amplitude de la bande Raman à 703 cm^{-1} est suivie dans le temps par enregistrement de spectres successifs. Ces enregistrements démarrent juste après l'ajout de la solution de peroxyde à la protéine sous forme de poudre. La quantité de peroxyde d'hydrogène est en large excès devant celle de la protéine. Les spectres sont enregistrés dans une fenêtre spectrale restreinte centrée sur la bande à 703 cm^{-1}, avec une accumulation constante de 5000 coups laser, permettant de réaliser des spectres à une fréquence d'environ 10 min. Les points expérimentaux présentés Fig.3.14 sont la moyenne de deux séries de points mesurées. L'amplitude du pic d'intérêt est obtenue en réalisant la différence entre l'intensité maximale et celle à la base du pic, les deux fréquences correspondantes étant gardées constantes.

La fonction de modélisation des points expérimentaux est obtenue à partir de l'équation de vitesse (Eq 3.10) :

$$\frac{-dC_{red}}{dt} = k\, C_{red}\, [\mathrm{H_2O_2}] = k'\, C_{red} \tag{3.10}$$

Dans cette expérience, le peroxyde d'hydrogène est en large excès devant la protéine. En suivant l'approximation selon laquelle la concentration du peroxyde reste constante au cours de la réaction, la réaction étudiée est d'ordre apparent égal à un avec k la constante de vitesse de la réaction, k' la constante de vitesse apparente de la réaction, C_{red} la concentration en protéine réduite et $[\mathrm{H_2O_2}]$ la concentration du peroxyde d'hydrogène. La protéine réduite correspond ici à l'état natif de la protéine avant son oxydation par le peroxyde d'hydrogène.

La constante de vitesse apparente, k', vérifie alors l'équation Eq.3.11 :

$$C_{red} = C_0\, exp(-\, k'\, t) \tag{3.11}$$

où C_0 correspond à la concentration initiale de la protéine.

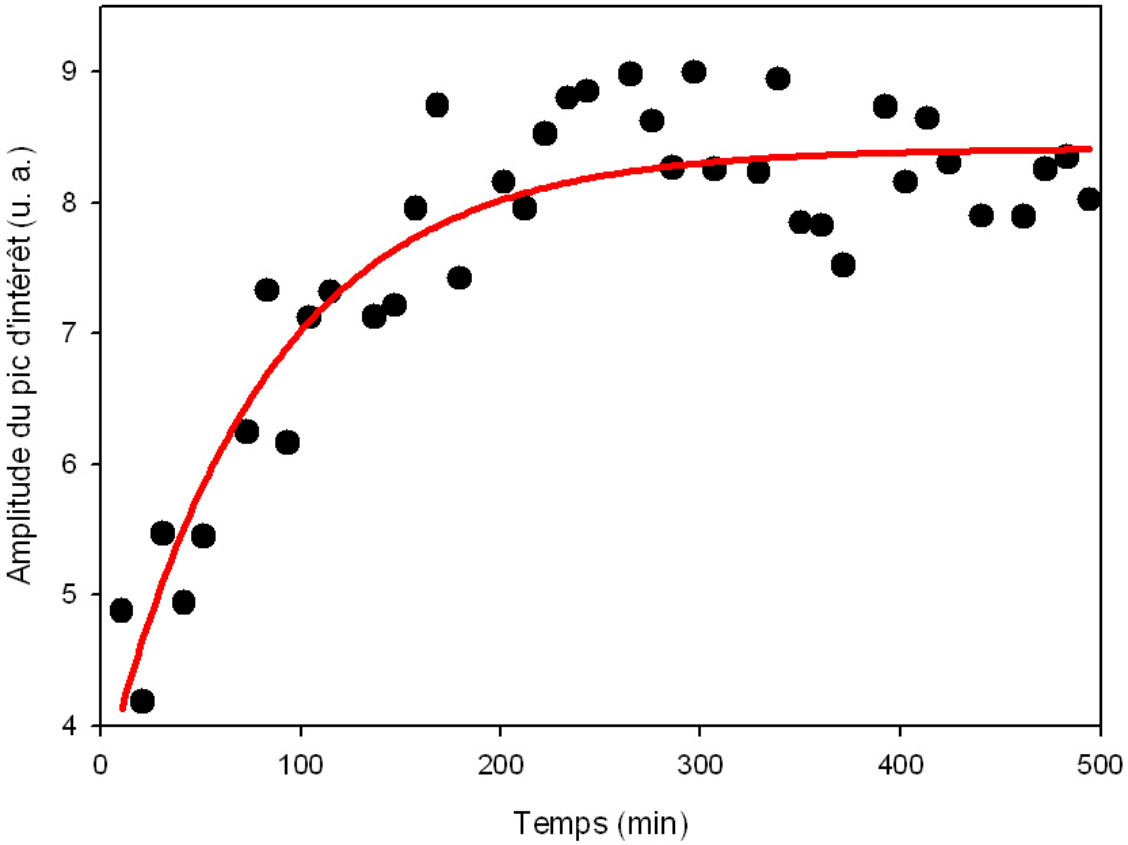

Figure 3.14 – Représentation de l'amplitude de la bande à 703 cm^{-1} en fonction du temps (points noirs) et de la fonction de modélisation de ces points (ligne rouge) pour 8 mM de β-lactoglobuline dissoute dans une solution de 300 mM de peroxyde d'hydrogène.

La fonction de modélisation des points expérimentaux, est obtenue en remplaçant l'expression de C_{red} donnée par l'équation 3.11 dans l'équation 3.7. Cela donne l'équation Eq.3.12 :

$$A(t) = [1 - exp(-\,k'\,t)]\ (A_{ox}\ -\ A_{red}) + A_{red} \tag{3.12}$$

La modélisation des points expérimentaux obtenus donne une valeur de k égale à (7,0 $\pm$ 1,1) 10^{-4} M^{-1} s^{-1}. Cette valeur est environ dix fois plus faible que celle obtenue pour l'oxydation du résidu méthionine au sein du tripeptide GlyMetGly. Ceci peut s'expliquer par la différence d'environnement des résidus méthionine dans les deux cas étudiés.

A partir de la relation d'Eyring et en utilisant la valeur de la constante de vitesse obte-

nue précédemment, la barrière d'énergie de la réaction d'oxydation de la β-lactoglobuline est de 21,4 $\pm$ 0,1 kcal.mol^{-1}. Cette valeur est proche de celle obtenue pour la réaction d'oxydation de GlyMetGly par le peroxyde d'hydrogène, 20,0 kcal.mol^{-1}.

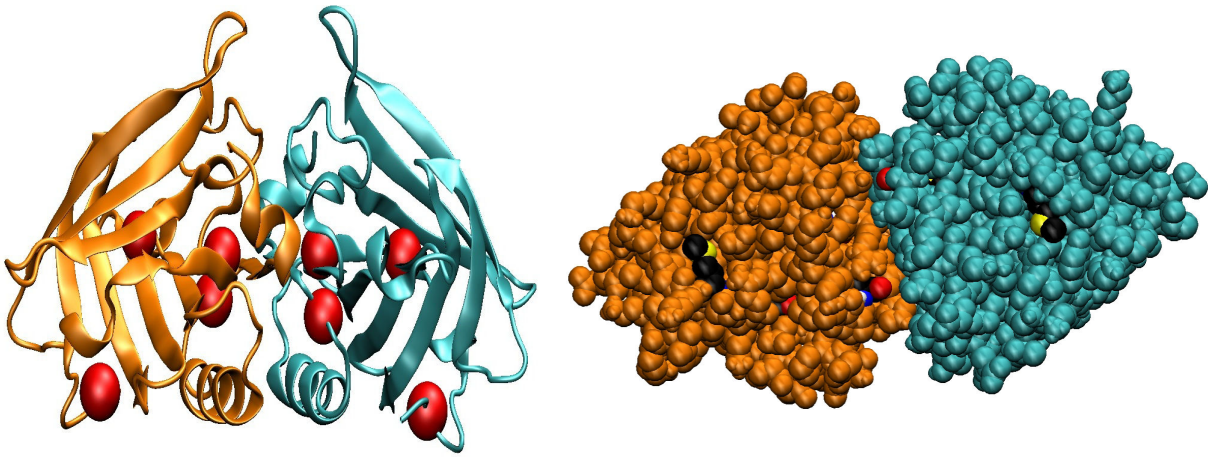

Figure 3.15 – Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb), avec à gauche une représentation des résidus méthionine par des sphères rouges et à droite une représentation des atomes de la protéine par des sphères de Van der Waals et en jaune les atomes de soufre des résidus méthionine exposés au solvant.

Ce résultat peut être expliqué en analysant la structure en trois dimensions de la protéine, qui met en évidence la position des résidus méthionine au sein de la structure protéique, Fig. 3.15. Ainsi représentée, une seule méthionine par monomère semble être exposée au solvant. Ceci est confirmé lorsque la protéine est représentée plus en détails en utilisant des sphères de Van der Waals pour représenter ses atomes.

Une approche plus quantitative est suivie en réalisant le calcul de la surface moléculaire accessible par le solvant des atomes de soufre des résidus méthionine. Ces calculs ont été réalisés en utilisant le logiciel VMD (Visual Molecular Dynamics) version 1.8.7 via la commande SASA (Solvent Accessible Surface Area) basée sur l'algorithme de Shrake-Rupley, [31]. Ainsi, en comparant les valeurs de surface accessible au solvant pour le soufre obtenues pour les résidus au sein de la protéine, il résulte que seul un résidu méthionine possède un soufre exposé au solvant, le résidu Met 107 qui présente une surface accessible de 14 Å^2. Les autres résidus Met 7, 24 et 145 présentent une surface accessible au solvant nulle. L'environnement protéique joue donc un rôle protecteur pour trois résidus méthionine sur quatre pour chaque monomère de la protéine vis à vis de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène.

3.4.3 Oxydation du lysozyme par le peroxyde d'hydrogène

Le lysozyme est un enzyme antibactérien modèle souvent utilisé pour des études immunologiques ou physico-chimiques [32]. Le lysozyme peut être inactivé par HOCl, et le système complet Myéloperoxydase/H_2O_2/Cl^- [33, 34, 35] et HOBr [36]. Dans le cas de l'oxydation du lysozyme par HOCl, le processus principal qui intervient dans l'inactivation de l'enzyme est la formation des résidus méthionine sulfoxyde [33].

L'oxydation du lysozyme par le peroxyde d'hydrogène a donc aussi été étudiée comme élément de comparaison avec l'étude précédente, prenant en compte le fait que cette protéine possède deux résidus méthionine. Les spectres Raman de la protéine avant et après réaction avec le peroxyde d'hydrogène se focalisent sur le domaine spectral des vibrations des liaisons carbone-soufre, Fig. 3.16. Les bandes Raman caractéristiques des vibrations des liaisons carbone-soufre sont présentes à 700 et 726 cm^{-1}. Aucune modification de ces bandes n'est détectable au bout de trois heures après l'ajout du peroxyde d'hydrogène. L'oxydation des résidus méthionine ne pourra se faire que très lentement, pour des durées de réaction largement supérieures à 3h. Nous en tirons la conclusion que les deux résidus méthionine du lysozyme sont bien protégés de l'action du peroxyde d'hydrogène par leur environnement protéique.

Cette conclusion basée sur la stabilité des spectres Raman enregistrés est en accord avec la structure en trois dimensions de la protéine, Fig.3.17. Dans la représentation des atomes de la protéine par des sphères de Van der Waals, les atomes de soufre des deux résidus méthionine sont complètement cachés.

Cet aspect est confirmé par les calculs de surface moléculaire accessible au solvant des soufre contenus dans les deux résidus méthionine, à l'aide du fichier 2LYZ.pdb. En effet, les valeurs obtenues pour les atomes de soufre au sein des résidus méthionine de la protéine sont quasi nulles avec 4,1 et 0,0 $Å^2$ pour les résidus Met 12 et Met 105, respectivement. Ainsi l'environnement protéique du lysozyme protège efficacement les deux résidus méthionine de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène.

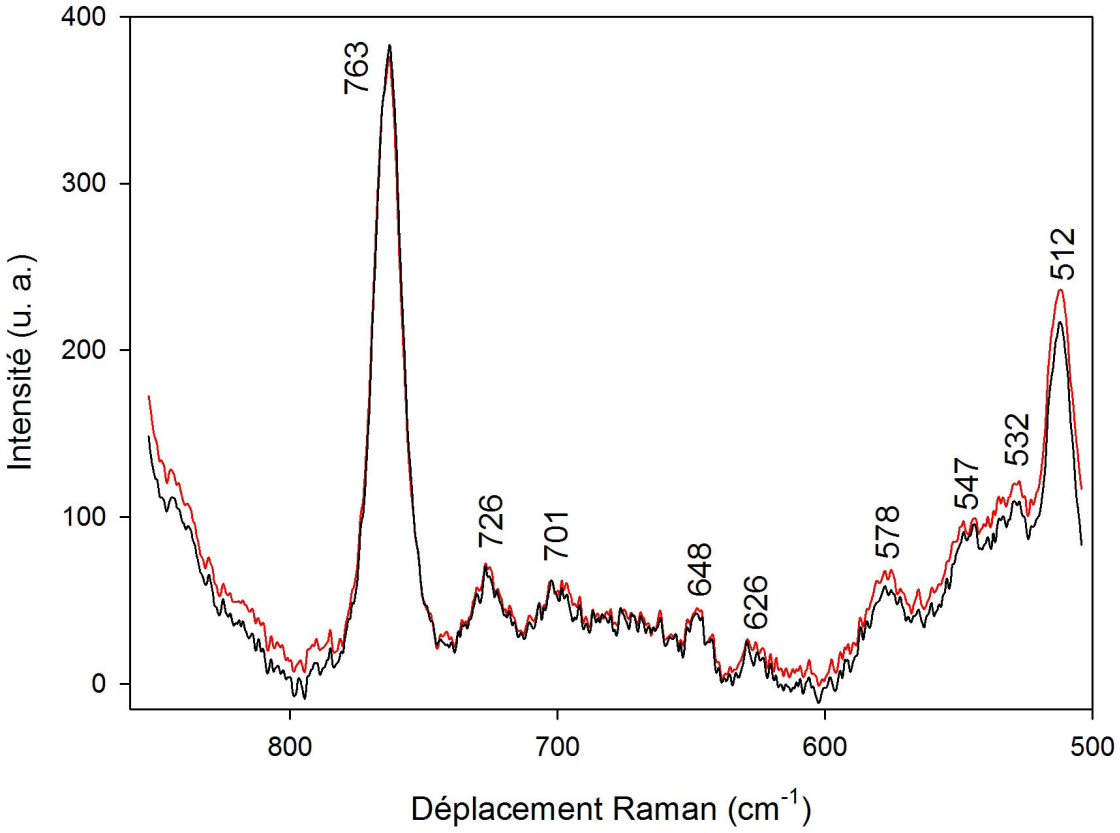

Figure 3.16 – Spectre Raman du lysozyme en solution à 4 mM, en rouge, et dissout dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 300 mM après plus de 3h de réaction, en noir.

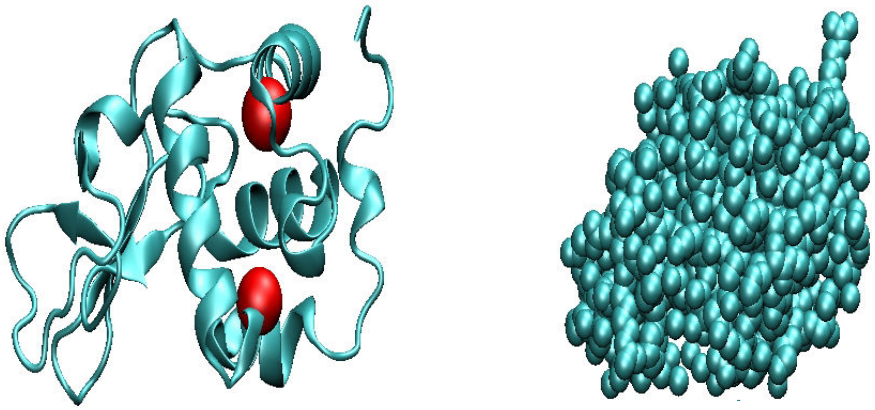

Figure 3.17 – Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec à gauche une représentation des résidus méthionine par des sphères rouges et à droite une représentation des atomes de la protéine par des sphères de Van der Waals avec en jaune les atomes de soufre des résidus méthionine.

3.5 Conclusions

L'oxydation du résidu méthionine au sein du tripeptide GlyMetGly et de la β-lactoglobuline suivie par spectroscopie Raman a mis en évidence des modifications des bandes correspondant aux vibrations des liaisons carbone-soufre du résidu dues à la formation du groupement sulfoxyde. L'étude de l'évolution dans le temps de ces modifications a permis de déterminer les constantes de vitesse et les barrières d'énergie des réactions d'oxydation correspondantes. La comparaison de l'oxydation du résidu méthionine au sein du tripeptide puis au sein des deux protéines, la β-lactoglobuline et le lysozyme, a montré l'importance de l'environnement protéique qui bloque ou non l'action du peroxyde d'hydrogène vis à vis des résidus méthionine.

Bibliographie

[1] S. REUTER, S.C. GUPTA, M.M. CHATURVEDI et B.B. AGGARWAL : Oxidative stress, inflammation, and cancer : How are they linked ? *Free Radic. Biol. Med.*, 49:1603–1616, 2010.

[2] T. JABS : Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.*, 57:231–245, 1999.

[3] R.O. POYTON, K.A. BALL et P.R. CASTELLO : Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.*, 20:332–340, 2009.

[4] M.J. GLADE : Oxidative stress and cognitive longevity. *Nutrition*, 26:595–603, 2010.

[5] M. J. DAVIES : The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703:93–109, 2005.

[6] L. TURELL, H. BOTTI, S. CARBALLAL, G. FERRER-SUETA, J.M. SOUZA, R. DURÁN, B.A. FREEMAN, R. RADI et B. ALVAREZ : Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry*, 47:358–367, 2008.

[7] C.C. WINTERBOURN et D. METODIEWA : Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 27:322–328, 1999.

[8] M.T. ASHBY et P. NAGY : On the kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J. Pharma. Sci.*, 95:15–18, 2006.

[9] D. LUO, S.W. SMITH et B.D. ANDERSON : Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, 94:304–316, 2004.

[10] M.J. DAVIES et R.T. DEAN : *Radical-Mediated Protein Oxidation : from Chemistry to medicine*. Oxford University Press, Oxford, 1997.

[11] R.T. DEAN, S. FU, R. STOCKER et M.J. DAVIES : Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324:1–18, 1997.

[12] A. TORREGGIANI, S. BARATA-VALLEJO et C. CHATGILIALOGLU : Combined Raman and IR spectroscopic study on the radical-based modifications of methionine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401:1231–1239, 2011.

[13] W. VOGT : Oxidation of methionyl residues in proteins : Tools, targets, and reversal. *Free Rad. Biol. Med.*, 18:93–105, 1995.

[14] E.R. STADTMAN, J. MOSKOVITZ et R.L. LEVINE : Oxidation of methionine residues of proteins : Biological consequences. *Antiox. Redox. Signal*, 5:577–582, 2003.

[15] S. BARATA-VALLEJO, C. FERRERI, A. POSTIGO et C. CHATGILIALOGLU : Radiation chemical studies of methionine in aqueous solution : Understanding the role of molecular oxygen. *Chem. Res. Toxicol.*, 23:258–263, 2010.

[16] H.K. NIELSEN, J. LOLIGER et R.F. HURRELL : Reactions of proteins with oxidizing lipids : 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid loss. *Br. J. Nutr.*, 53:61–73, 1985.

[17] R.L. LEVINE, L. MOSONI, B.S. BERLETT et E.R. STADTMAN : Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *PNAS*, 93:15036–15040, 1996.

[18] V.Y. REDDY, P.E. DESROCHERS, S.V. PIZZO, S.L. GONIAS, J.A. SAHAKIAN, R.L. LEVINE et S.J. WEISS : Oxidative dissociation of human alpha 2−macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. *J. Biol. Chem.*, 269:4683–4691, 1994.

[19] R.L. LEVINE, J. MOSKOVITZ et E.R. STADTMAN : Oxidation of methionine in proteins : roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*, 50:301–307, 2000.

[20] J. RAVI, A.E. HILLS, E. CERASOLI, P.D. RAKOWSKA et M.G. RYADNOV : FTIR markers of methionine oxidation for early detection of oxidized protein therapeutics. *Eur. Biophys. J.*, 40:339–345, 2011.

[21] J. DONG, C.S. ATWOOD, V.E. ANDERSON, S.L. SIEDLAK, M.A. SMITH, G. PERRY et P.R. CAREY : Metal binding and oxidation of amyloid-β within isolated senile plaque cores : Raman microscopic evidence. *Biochemistry*, 42:2768–2773, 2003.

[22] P.R. CAREY : *Biochemical Applications of Raman Spectroscopies.* Academic Press, New York, 1982.

[23] I. HARADA et H. TAKEUCHI : *R.J.H. Clark and R.E. Hester (Eds.), Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, Vol. 13, Spectroscopy of Biological Systems*, chapitre Raman and ultraviolet resonance Raman spectra of proteins and related compounds, pages 113–175. Wiley, Chichester, U.K., 1986.

[24] S.A. OVERMAN et G.J. Jr. THOMAS : Raman markers of nonaromatic side chains in α-helix assembly : Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser and Val residues of phage *fd* subunits. *Biochemistry*, 38:4018–4027, 1999.

[25] S. BAMEZAI, M.A. BANEZ et E. BRESLOW : Structural and functional changes associated with modification of the ubiquitin methionine. *Biochemistry*, 29:5389–5396, 1990.

[26] V.S. SHAROV et C. SCHONEICH : Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic. Biol. Med.*, 29:986–994, 2000.

[27] V.S. SHAROV, D.A. FERRINGTON, T.C. SQUIER et C. SCHONEICH : Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.*, 455:247–250, 1999.

[28] Y. YAO, D. YIN, G.S. JAS, K. KUCZERA, T.D. WILLIAMS, C. SCHÖNEICH et T.C. SQUIER : Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, 35:2767–2787, 1996.

[29] L. SAWYER, S. BROWNLOW, I. POLIKARPOV et S.-Y. WU : β-lactoglobulin : structural studies, biological clues. *Int. Dairy. Journal*, 8:65–72, 1998.

[30] R.J. ELIAS, D.J. MCCLEMENTS et E.A. DECKER : Antioxidant activity of cysteine, tryptophan and methionine residues in continuous phase β-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 53:10248–10253, 2005.

[31] A. SHRAKE et J.A. RUPLEY : Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J. Mol. Biol.*, 79:351–364, 1973.

[32] P. JOLLÈS et J. JOLLÈS : What's new in lysozyme research ? *Mol. Cell. Biochem.*, 63:165–189, 1984.

[33] C.L. HAWKINS et M.J. DAVIES : Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid : role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function . *Chem. Res. Toxicol.*, 18:1600–1610, 2005.

[34] M.C.M. VISSERS et C.C. WINTERBOURN : Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes. *Biochem. J.*, 245:277–280, 1987.

[35] J.W. NASKALSKI : Oxidative modification of protein structures under the action of myeloperoxidase and the hydrogen peroxide and chloride system. *Ann. Biol. Clin.*, 52:451–456, 1984.

[36] C.L. HAWKINS et M.J. DAVIES : The role of aromatic amino acid oxidation, protein unfolding, and aggregation in the hypobromous acid-induced inactivation of trypsin inhibitor and lysozyme. *Chem. Res. Toxicol.*, 18:1669–1677, 2005.

Chapitre 4

Interaction des peptides et des protéines avec l'oxygène singulet

Sommaire

4.1 Introduction 110

4.2 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de tripeptides 112

4.3 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de protéines 117

4.3.1 Oxydation de la β-lactoglobuline 118

4.3.2 Oxydation de l'albumine sérique de bovin 122

4.3.3 Oxydation du lysozyme 126

4.4 Conclusions 129

Ce chapitre présente les résultats obtenus pour l'étude de l'interaction de l'oxygène singulet avec des tripeptides modèles et trois protéines : la β-lactoglobuline, le lysozyme et l'albumine sérique bovine (BSA). Ces interactions mises en évidence par quenching de l'oxygène singulet sont interprétées en se basant sur la réactivité des résidus d'acides aminés étudiés.

4.1 Introduction

L'oxygène singulet réagit avec les protéines en oxydant leurs acides aminés. Cependant, certains acides aminés sont plus sensibles à l'action de l'oxygène singulet que d'autres. L'histidine, la tyrosine, la méthionine, la cystéine et le tryptophane ont des constantes de vitesse d'oxydation par l'oxygène singulet qui sont significatives pour des pH physiologiques [1, 2]. Les produits résultants de l'oxydation de ces acides aminés ont déjà été étudiés dans la littérature [1, 3, 4, 5]. Ainsi, dans le cas des résidus d'acides aminés aromatiques, le tryptophane a pour produits d'oxydation finaux la N-formylkynurénine et la kynurénine, Fig. 4.1 d'après [1, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Ces produits sont eux-mêmes des photosensibilisateurs qui peuvent générer l'oxygène singulet de manière plus efficace que le tryptophane sous exposition lumineuse continue [1, 12, 13, 14, 15].

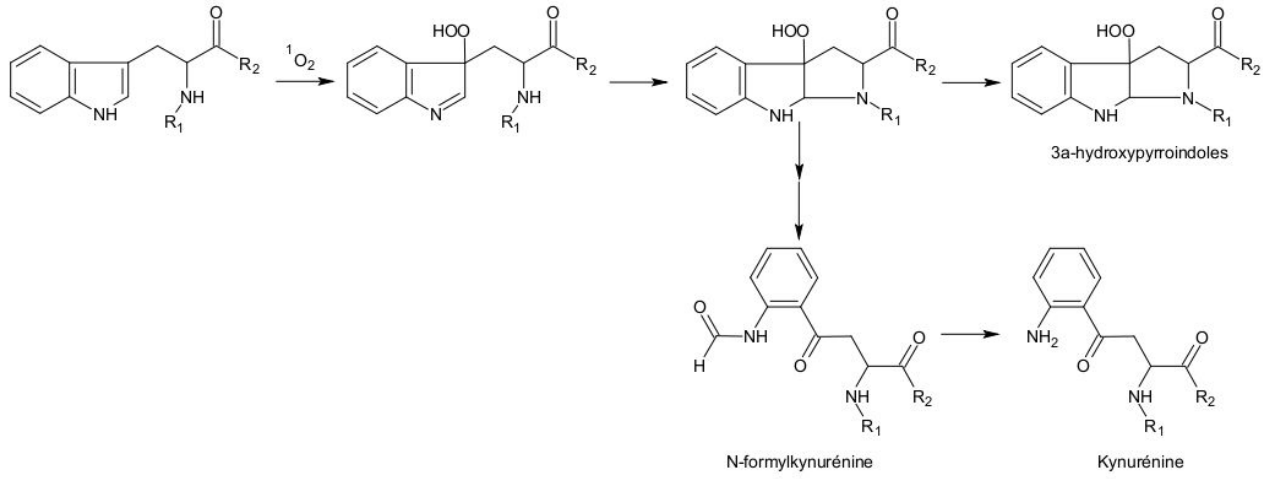

Figure 4.1 – Produits obtenus par réaction du résidu tryptophane avec l'oxygène singulet.

Le résidu tyrosine oxydé par l'oxygène singulet donne comme produit final un alcool diénone, Fig. 4.2 d'après [1]. Cet alcool peut contribuer à la réticulation de la protéine en

subissant des réactions de Michael avec des nucléophiles tels que les thiols et les amines [1, 16, 17].

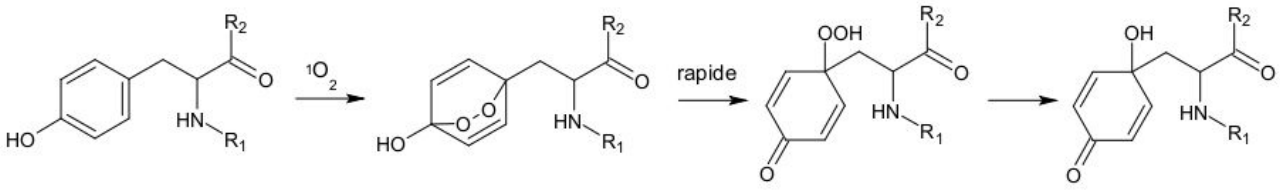

FIGURE 4.2 – Produits obtenus par réaction de le résidu tyrosine avec l'oxygène singulet.

L'histidine libre oxydée par l'oxygène singulet donne un ou plusieurs endoperoxydes qui se décomposent en plusieurs produits tels que des dérivés de l'acide aspartique, des dérivés de l'asparagine et l'urée, Fig. 4.3 d'après [1, 18, 19]. Ces produits peuvent subir de nombreuses réactions dont certaines vont aboutir à des réticulations His-His et His-Lys [1, 20, 21]. Il est vraisemblable que des réactions similaires aient lieu pour l'histidine dans un environnement protéique. En effet, elles n'impliquent ni le groupe amino-α ni d'autres groupes fonctionnels du squelette, bien que cela n'ait pas été confirmé pour l'instant [1].

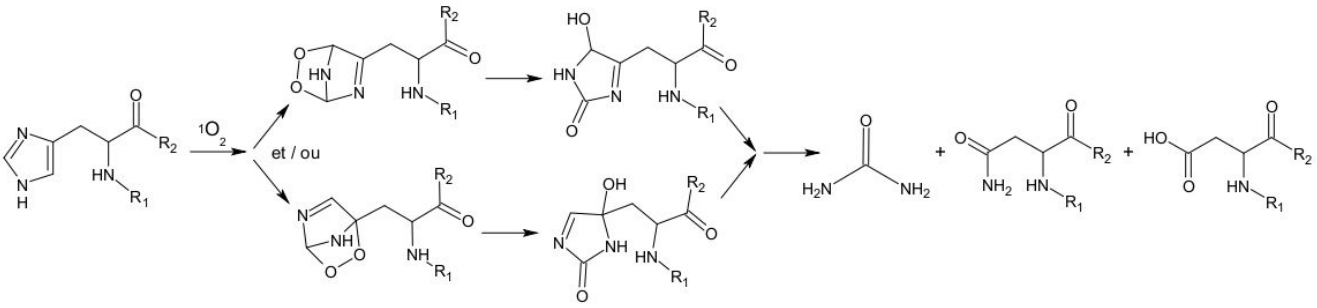

FIGURE 4.3 – Produits obtenus par réaction du résidu histidine avec l'oxygène singulet.

L'atome de soufre au sein de la méthionine libre réagit avec l'oxygène singulet suivant l'équation suivante :

$$\mathrm{R_1R_2S} + {}^1\mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{R_1R_2S^+{-}OO^-} \xrightarrow{\mathrm{R_1R_2S}} 2\,\mathrm{R_1R_2S{=}O} \tag{4.1}$$

Cette réaction nécessite la participation de deux acides aminés pour donner deux molécules de sulfoxyde [1, 22, 23, 24, 25, 26]. Pour un résidu méthionine au sein d'une protéine, le mécanisme proposé précédemment pose problème à cause de l'accessibilité réduite de

l'adduit peroxyde à un autre résidu méthionine. Ainsi, le mécanisme d'oxydation du résidu méthionine au sein d'une protéine n'est pas clairement établi. Seul le sulfoxyde a été prouvé comme étant le produit final de l'oxydation [25, 27].

L'oxygène singulet réagit rapidement avec l'acide aminé cystéine libre, 0,9 M^{-1} s^{-1} [28, 5], pour donner un di-sulfure de manière non quantitative [1, 23, 5, 24]. Les produits restants ne sont pas complètement déterminés bien qu'il soit probable que l'acide cystéique (RSO_3H) en fasse partie [1,23]. Le rendement de ces produits devrait varier fortement entre l'acide aminé libre (petite barrière électronique ou stérique) formant ainsi facilement le dimère et le résidu présent au sein d'une protéine.

Dans l'étude présentée ici, les interactions entre l'oxygène singulet et les protéines ont été évaluées en mesurant les constantes de désactivation de celui-ci. Ces constantes de désactivation ont été obtenues par quenching de l'oxygène singulet généré en solution contenant tout d'abord des tripeptides puis des protéines. Les tripeptides représentent alors de petites fractions modèles de protéine comportant des résidus d'acides aminés susceptibles de réagir avec l'oxygène singulet généré. Les constantes de désactivation obtenues pour les tripeptides sont ensuite comparées à celles obtenues dans le cas où l'oxygène singulet réagit avec des protéines.

4.2 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de tripeptides

La réactivité des différents résidus d'acides aminés avec l'oxygène singulet a été mise en évidence par un travail préliminaire réalisé sur l'oxydation d'une série de résidus d'acides aminés spécifiques au sein de tripeptides. Ces résidus ont été choisis par rapport à leur réactivités supposées en présence d'oxygène singulet : des résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine, histidine et tryptophane) et portant un atome de soufre (méthionine). Dans les tripeptides respectifs, ils sont liés à un résidu glycine à chacune de leur extrémités. Ces structures reproduisent le raccordement des résidus à la chaîne polypeptidique dans la protéine.

L'oxydation des tripeptides a été suivie en mesurant le temps de vie de l'oxygène singulet généré en solution d'eau deutérée avec une concentration croissante en tripep-

tide. Parmi les tripeptides à résidu central aromatique choisis, les valeurs des différents temps de vie de l'oxygène singulet en fonction de la concentration de tripetide ont été mesurées pour GlyTyrGly, GlyHisGly et GlyTrpGly. Elles sont données dans les tableaux 4.1, 4.2 et 4.3, respectivement. Ces valeurs ont été obtenues en mesurant la décroissance de la phosphorescence de l'oxygène singulet par rapport au temps pour les solutions des différents tripeptides. Le principe et le dispositif de cette méthode ont été décrits dans le chapitre *"Méthodes expérimentales"*. Les tripeptides jouent alors le rôle de quencheurs de l'oxygène singulet. La représentation graphique des temps de vie obtenus ainsi que la droite de modélisation correspondante sont présentées en fonction de la concentration en tripeptide dans la figure 4.4 pour GlyTyrGly, la figure 4.5 pour GlyHisGly et la figure 4.6 pour GlyTrpGly.

La modélisation de ces données est faite en utilisant l'équation de Stern-Volmer, [31] :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k\,C \tag{4.2}$$

avec τ le temps de vie de l'oxygène singulet, k la constante de vitesse de la réaction d'oxydation du tripeptide, C la concentration molaire en tripeptide et τ_0 le temps de vie de l'oxygène singulet en l'absence de quencheur. La constante de vitesse d'oxydation du tripeptide est ainsi donnée par le coefficient directeur de la droite de modélisation, k.

C_{GYG} (μM)	0	250	500	750	1000	1250
τ (μs)	66,1	63,0	60,4	57,7	55,4	53,2

Tableau 4.1 – Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyTyrGly utilisées, à pD 7,4 .

La constante d'oxydation du GlyTyrGly par l'oxygène singulet, k, est égale à 0,29 10^7 $M^{-1}s^{-1}$. Une valeur de 0,26 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ a été déterminée dans des conditions expérimentales similaires avec l'acide aminé tyrosine libre. Il a été rapporté dans la littérature une valeur d'environ 0,8 10^7 M^{-1} s^{-1} toujours pour l'acide aminé tyrosine libre [1, 3, 4]. Dans nos conditions expérimentales, la valeur de k varie peu selon l'utilisation du tripeptide GlyTyrGly ou celle de l'acide aminé tyrosine libre.

La constante d'oxydation du tripeptide GlyHisGly par l'oxygène singulet est égale à 4,1 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ pour un pD égal à 7,4. Dans la littérature, différentes valeurs de cette constante ont été rapportées pour l'acide aminé histidine libre, dépendantes de la valeur du pH des solutions utilisées. Ainsi, pour un pH égal à 7,1 $k \sim 3{,}2\ 10^7$ M^{-1} s^{-1} [3].

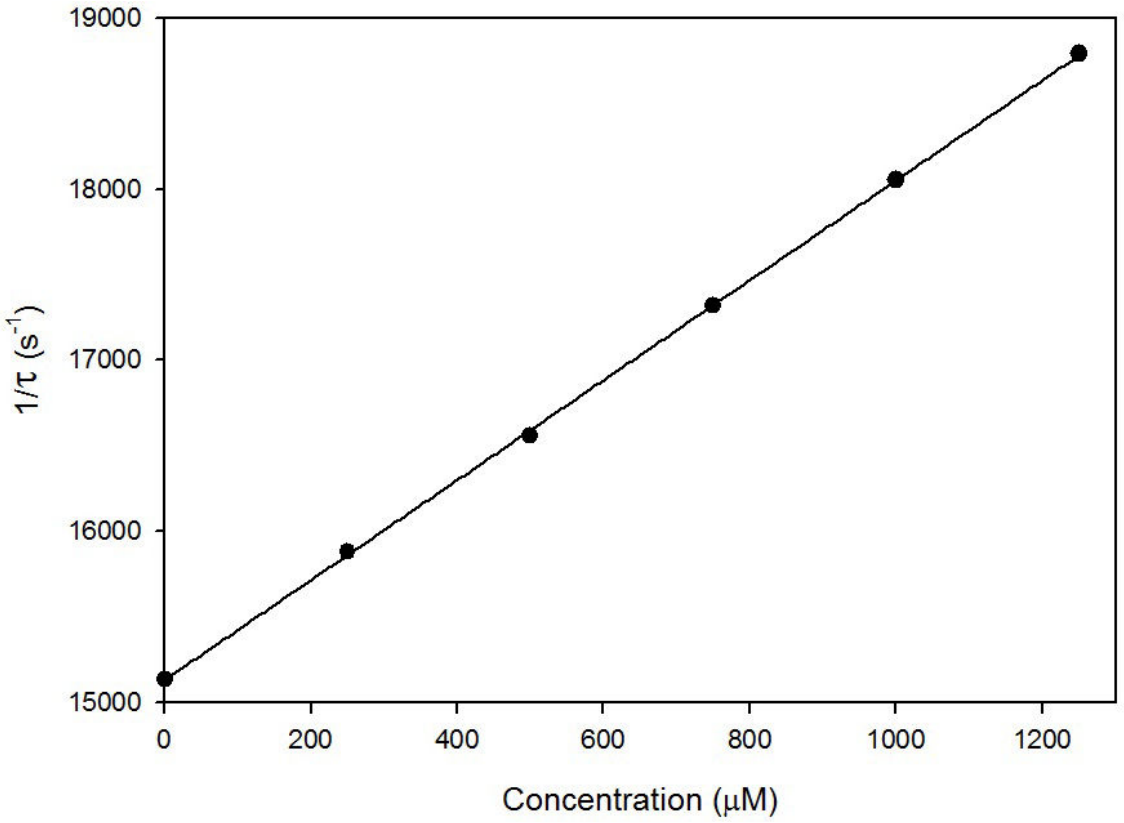

Figure 4.4 – Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyTyrGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.1 et la droite de modélisation.

C_{GHG} (μM)	0	250	500	750	1000	1250
τ (μs)	65,7	54,5	36,4	21,8	20,0	15,5

Tableau 4.2 – Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyHisGly utilisées, à pD 7,4.

C_{GWG} (μM)	0	125	250	375	500	625
τ (μs)	66,2	56,0	50,3	38,3	28,0	22,4

Tableau 4.3 – Valeurs des temps de vie τ de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyTrpGly utilisées, à pD 7,4.

La constante d'oxydation du GlyTrpGly, par l'oxygène singulet est égale à 4,7 10^7 M^{-1} s^{-1}. Une valeur de 4,6 10^7 M^{-1} s^{-1} a été déterminée dans des conditions expérimentales similaires avec l'acide aminé tryptophane libre. Les constantes de vitesse rapportées dans

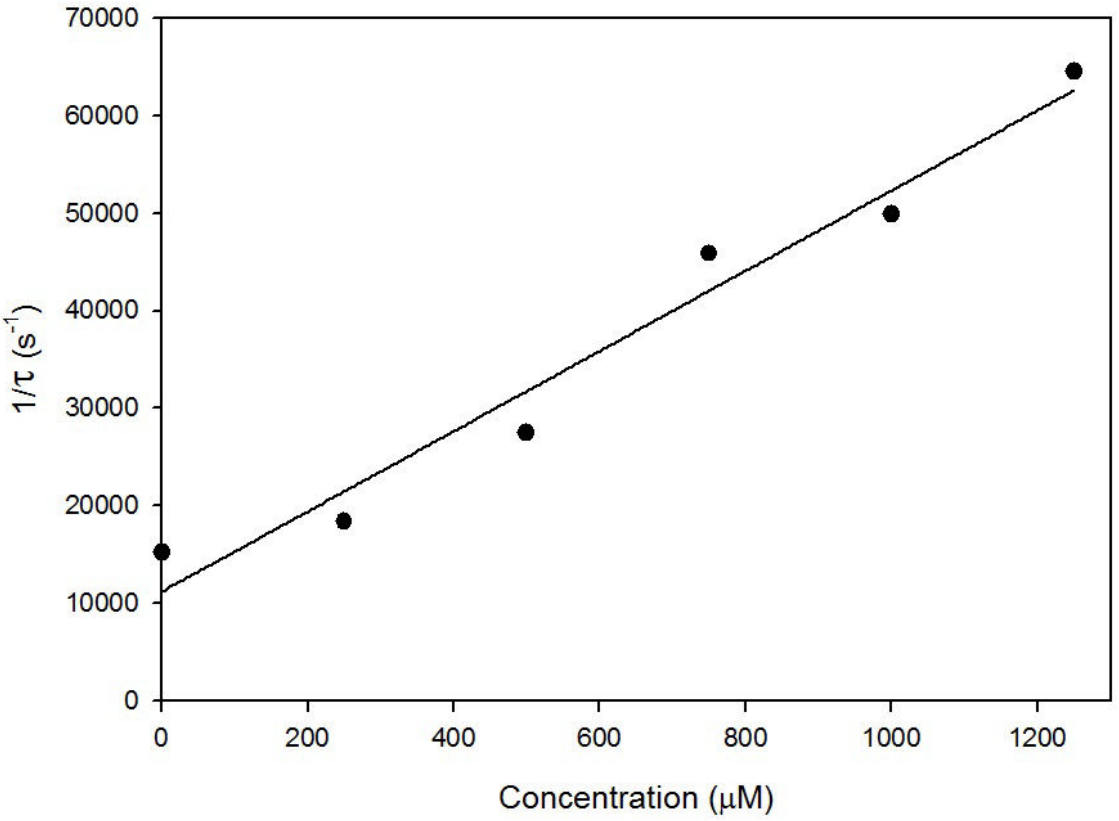

Figure 4.5 – Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyHisGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.2 et la droite de modélisation.

la littérature, pour le tryptophane libre se situent dans l'intervalle $k\sim$ 2-7 10^7 et 3 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ [1, 29].

Le temps de vie de l'oxygène singulet en solution avec GlyPheGly a aussi été mesuré. Il reste inchangé malgré l'augmentation progressive de la concentration de tripeptide en solution. Ce résultat ne nous permet donc pas de déterminer la constante d'oxydation du tripeptide par l'oxygène singulet.

Le temps de vie de l'oxygène singulet a été mesuré pour différentes concentrations du tripeptide soufré, GlyMetGly et ces valeurs sont présentées dans le tableau 4.4. Elles sont représentées graphiquement figure 4.7 avec la droite de modélisation correspondante. La constante d'oxydation de la méthionine au sein du tripeptide GlyMetGly par l'oxygène singulet a pour valeur 0,9 10^7 $M^{-1}s^{-1}$. Dans la littérature, il est rapporté une valeur de $\sim$ 1,6 10^7 M^{-1} s^{-1} pour l'acide aminé méthionine libre [1, 3, 4, 5].

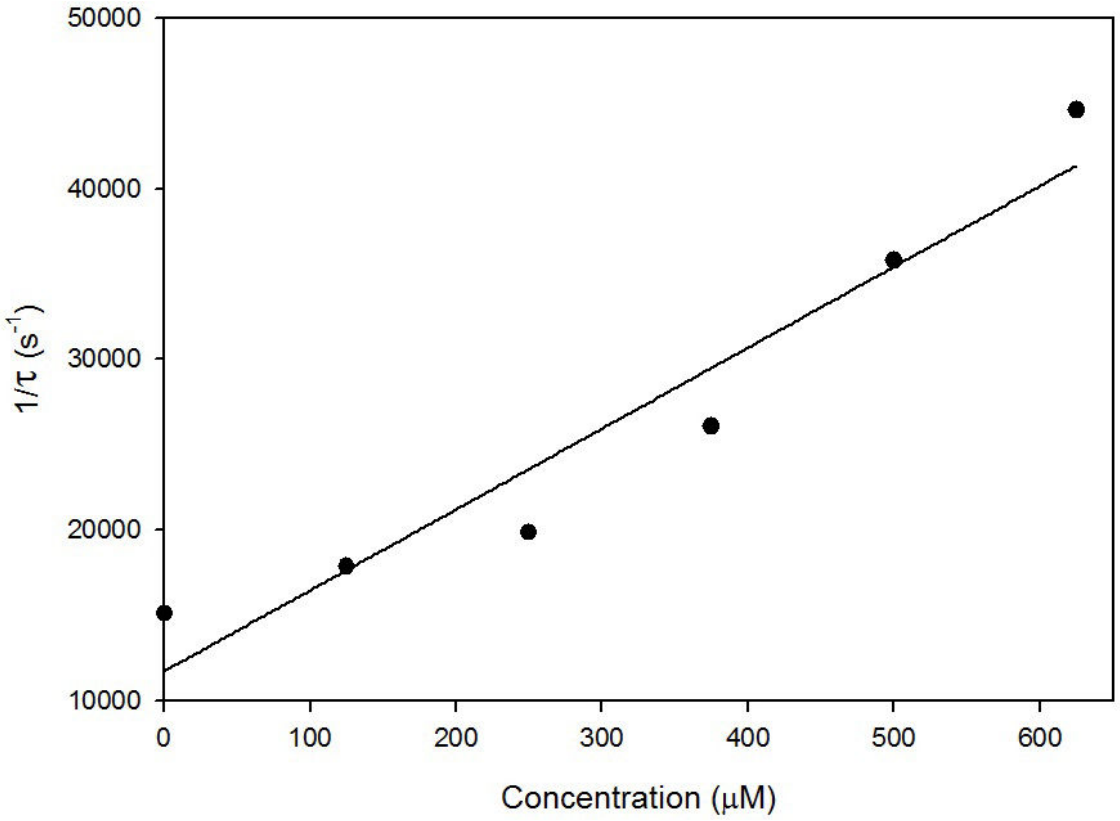

Figure 4.6 – Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyTrpGly à pD 7,4, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.3 et la droite de modélisation.

C_{GMG} (μM)	0	250	500	750	1000	1250
τ (μs)	67,6	57,6	55,3	48,1	40,8	38,9

Tableau 4.4 – Valeurs des temps de vie, τ, de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de GlyMetGly utilisées, à pD 7,4.

Les constantes d'oxydation mesurées des tripeptides comparées à celles des acides aminés seuls dans des conditions expérimentales similaires montrent que la présence des liaisons peptidiques dans les tripeptides n'affecte pas la réactivité de l'acide aminé central aromatique. Dans notre étude, la réactivité des acides aminés glycine est négligée car d'après la littérature, la constante d'oxydation de cet acide aminé par l'oxygène singulet est inférieure à 0,01 10^7 M^{-1} s^{-1} [2].

Parmi tous les tripeptides testés, celui pour lequel la constante de vitesse de disparition de l'oxygène singulet est la plus forte est le résidu tryptophane suivi dans l'ordre

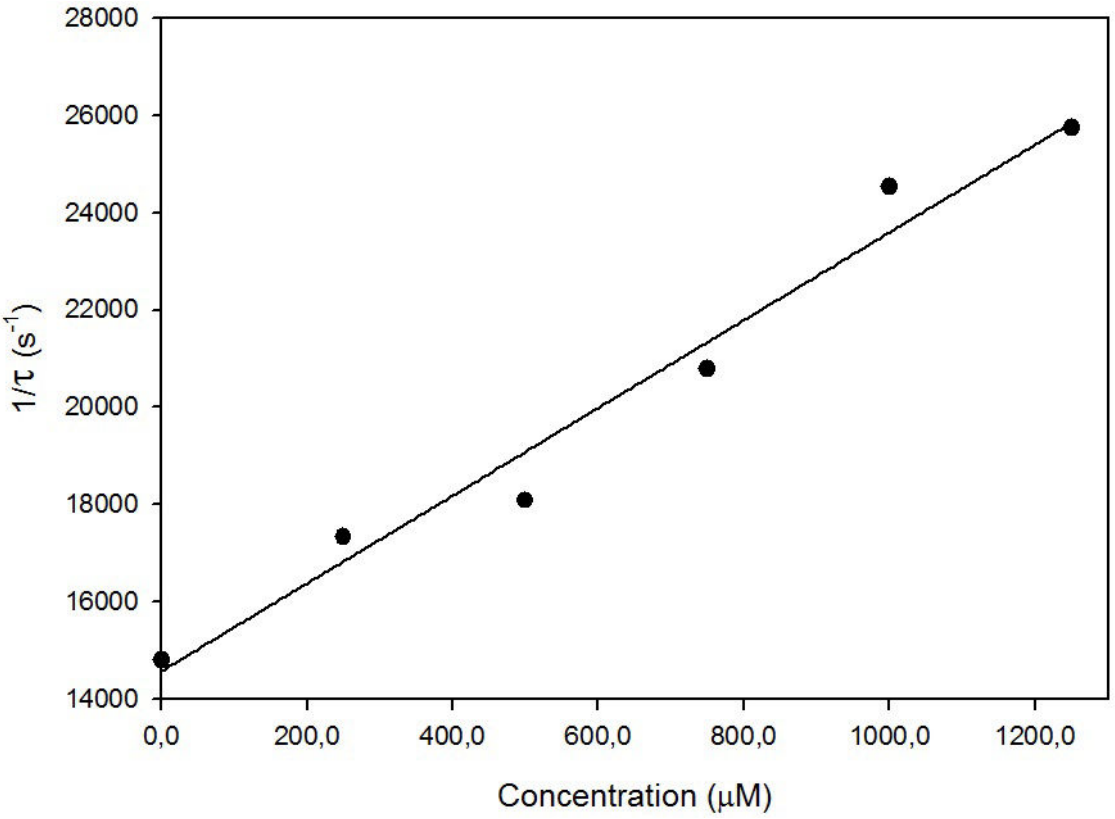

Figure 4.7 – Représentation de l'inverse du temps de vie de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations du tripeptide GlyMetGly, avec les points expérimentaux issus du tableau 4.4 et la droite de modélisation.

décroissant du résidu histidine, du résidu méthionine et du résidu tyrosine. D'après la littérature, les autres acides aminés aliphatiques ont des constantes de vitesse d'oxydation inférieures à 0,7 10^7 M^{-1} s^{-1} à un pH neutre, [1, 2] ou encore compris entre 10^4 et 10^5 M^{-1} s^{-1} si non nulles, incluant ici aussi les liaisons peptidiques [2].

4.3 Mesure du temps de vie de l'oxygène singulet en présence de protéines

La comparaison des constantes de vitesse obtenues pour l'oxydation des protéines avec celles des tripeptides permet de tirer des conclusions sur le rôle de l'environnement protéique dans cette réaction d'oxydation par l'oxygène singulet.

4.3.1 Oxydation de la β-lactoglobuline

La méthode expérimentale utilisée pour les tripeptides oxydés par l'oxygène singulet est reproduite à l'identique dans le cas des protéines. La mesure du temps de vie de l'oxygène singulet a été réalisée dans des solutions ayant différentes concentrations de β-lactoglobuline données dans le tableau 4.5. A l'aide de la modélisation des points expérimentaux présentée figure 4.8, la constante d'oxydation de la protéine par l'oxygène singulet a été déterminée et donne $k_{BL.exp}$ égale à 1,15 10^8 M^{-1} s^{-1} par monomère.

$C_{\beta-lacto}$ (μM)	0	20	40	60	80	100
τ (μs)	66,33	46,34	42,04	33,46	27,62	24,07

Tableau 4.5 – Valeurs des temps de vie, τ, de l'oxygène singulet en présence des différentes concentrations de β-lactoglobuline utilisées.

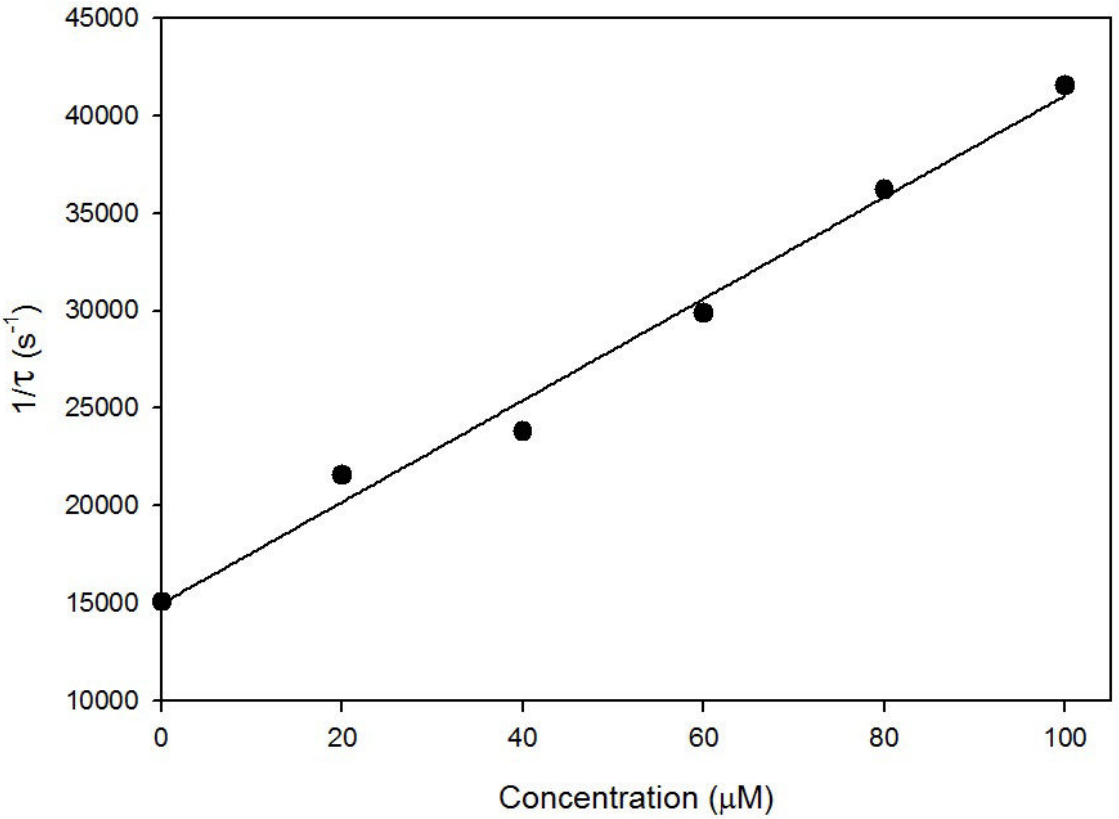

Figure 4.8 – Représentation de l'inverse du temps de vie, de l'oxygène singulet en fonction des différentes concentrations de la β-lactoglobuline avec les points expérimentaux issus de le tableau correspondant et la droite de modélisation.

Afin d'interpréter ce résultat, nous nous sommes intéressés à la séquence primaire de

cette protéine. Sur un total de 162 acides aminés par monomère, elle contient 1 résidu histidine, 2 résidus tryptophane, 3 résidus tyrosine et 4 résidus méthionine. La constante d'oxydation d'une protéine par l'oxygène singulet peut s'écrire comme la somme des constantes d'oxydation de chacun des résidus d'acides aminés les plus réactifs avec l'oxygène singulet. Ainsi, pour la β-lactoglobuline, nous avons une constante effective, k_{BL} :

$$k_{BL} = 3\,k_Y + k_H + 2\,k_W + 4\,k_M \tag{4.3}$$

avec k_Y, k_H, k_W et k_M les constantes de d'oxydation des différents résidus par l'oxygène singulet. En supposant que la réactivité de ces résidus dans la protéine est identique à celle dans les tripeptides, nous obtenons pour k_{BL} une valeur de 1,83 10^8 M^{-1} s^{-1}. Cette valeur calculée est plus importante que celle obtenue expérimentalement. Afin d'expliquer cette différence, la position des résidus d'acides aminés réactifs au sein de la structure protéique est étudiée.

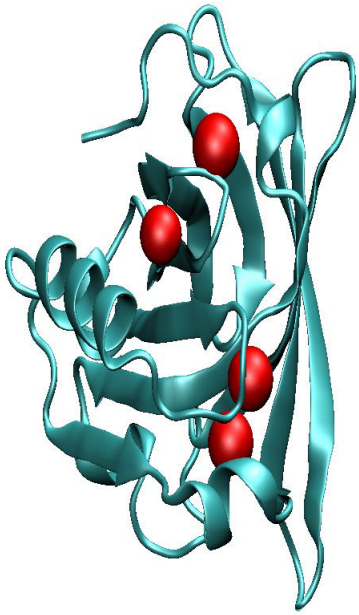

Figure 4.9 – Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

Parmi les 4 résidus tyrosine présents dans chaque monomère de la protéine, la totalité est exposée au solvant d'après la Fig.4.9. Une approche plus quantitative est suivie en réalisant le calcul de la surface moléculaire accessible au solvant des atomes de la chaîne latérale des résidus d'intérêt. Ce calcul est réalisé avec le logiciel VMD (Visual Molecular Dynamics) version 1.8.7 via la commande SASA (Solvent Accessible Surface Area) basée sur l'algorithme de Shrake-Rupley, [30]. Les valeurs des surfaces exposées au solvant des

atomes de la chaîne latérale des résidus tyrosine au sein de la protéine sont présentées dans le tableau 4.6.

Tyr 20	Tyr 42	Tyr 99	Tyr 102
1,3	0,2	27,5	12,6

Tableau 4.6 – Surfaces des atomes des chaînes latérales des résidus tyrosine accessibles au solvant, en $Å^2$, dans un monomère de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu tyrosine correspondant dans la séquence primaire de la protéine.

Les calculs de surface accessible au solvant montrent que seuls deux résidus tyrosine ont une chaîne latérale exposée au solvant. Une démarche similaire a été suivie pour les autres résidus d'acides aminés réactifs de la protéine. Le résidu histidine présent dans chaque monomère de la protéine est exposé au solvant d'après la figure 4.10. Le calcul de la surface accessible de la chaîne latérale du résidu histidine donne une valeur de 14,1 $Å^2$ ce qui confirme son exposition au solvant.

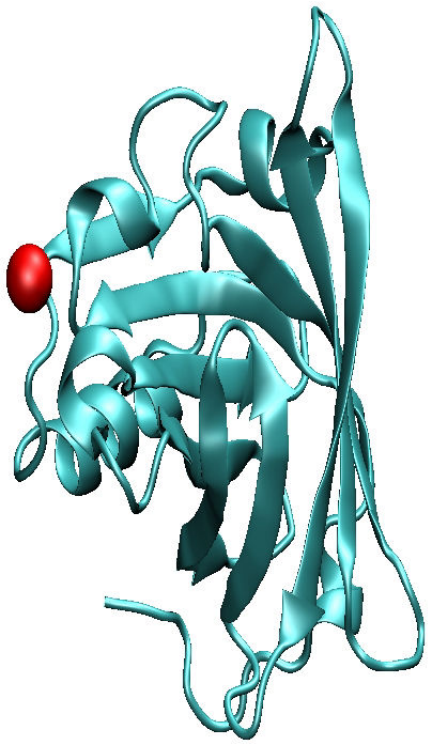

Figure 4.10 – Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

2 résidus tryptophane sont présents dans chaque monomère de la protéine. Un seul est exposé au solvant d'après la figure 4.11. Les calculs de surfaces accessibles au solvant donnent le même résultat. En effet, pour le résidu tryptophane 19 la surface accessible est nulle et pour le résidu 61 la surface accessible est de 94,1 Å^2.

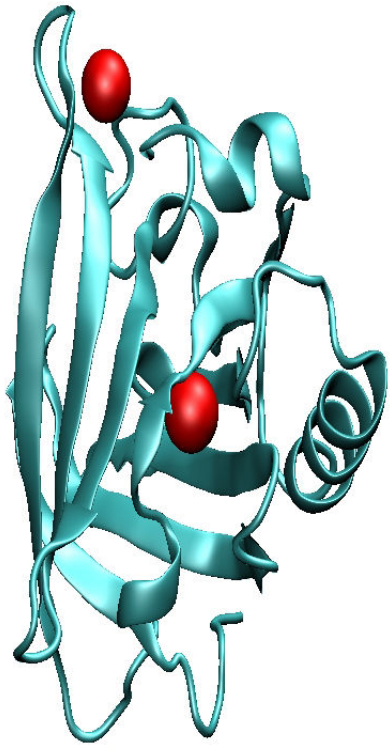

Figure 4.11 – Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

Parmi les 4 résidus méthionine présents dans chaque monomère de la protéine, un seul est exposé au solvant d'après la figure 4.12. Les calculs de surfaces accessibles au solvant des atomes de soufre de ces résidus montrent le même résultat, Tableau 4.7.

Met 7	Met 24	Met 107	Met 145
2,3	0,0	14,4	0,0

Tableau 4.7 – Surfaces des atomes de soufre accessibles au solvant, en Å^2, des résidus méthionine présents dans un monomère de la β-lactoglobuline (1BEB.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu méthionine dans la séquence primaire de la protéine.

Ainsi sur un total de 10 résidus d'acides aminés réactifs présents dans la séquence de

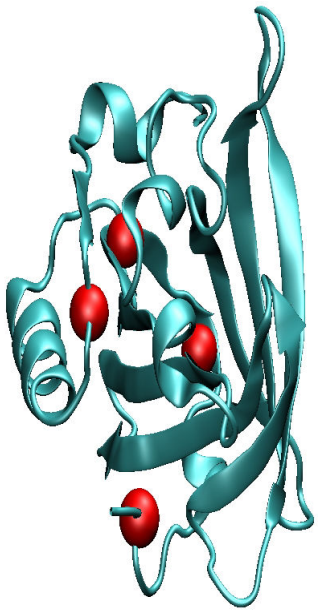

Figure 4.12 – Représentation en trois dimensions de la β-lactoglobuline (BEB.pdb), avec les résidus méthionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

la β-lactoglobuline, seuls 5 ont une chaîne latérale exposée au solvant de manière significative, c'est-à-dire présentant une surface accessible au solvant de leur chaînes latérales, ou de leur atome de soufre, supérieure à 10 Å^2.

4.3.2 Oxydation de l'albumine sérique de bovin

En suivant la même méthode expérimentale que précédemment pour la β-lactoglobuline, l'oxydation de la BSA par l'oxygène singulet est étudiée. La BSA est une protéine de 583 acides aminés par monomère. Elle possède 20 résidus tyrosine, 16 résidus histidine, 2 résidus tryptophane et 4 résidus méthionine. Dans une solution d'eau deutérée à pD égal à 7,4 contenant de la BSA, la constante de d'oxydation de la protéine par l'oxygène singulet, $k_{BSA.exp}$, est de 4,9 10^8 $M^{-1}s^{-1}$. Cette constante peut être exprimée, en suivant la même hypothèse que précédemment, comme :

$$k_{BSA} = 20\, k_Y + 16\, k_H + 2\, k_W + 4\, k_M \tag{4.4}$$

avec k_Y, k_H, k_W et k_M les constantes de désactivation de l'oxygène singulet obtenues avec les différents tripeptides. La valeur de k_{BSA} est de 8,4 10^8 M^{-1} s^{-1}, cette valeur est plus grande que celle obtenue expérimentalement. La position des résidus d'acides aminés

réactifs au sein de la structure protéique est étudiée afin d'expliquer cette différence.

Parmi les 20 résidus tyrosine présents dans la séquence primaire de la BSA, une dizaine est exposée au solvant d'après la représentation de la figure 4.13. En réalisant les calculs de surface accessible au solvant des atomes de la chaîne latérale des résidus tyrosine, dont les résultats sont présentés dans le tableau 4.8, il apparaît que 15 résidus tyrosine sont exposés au solvant.

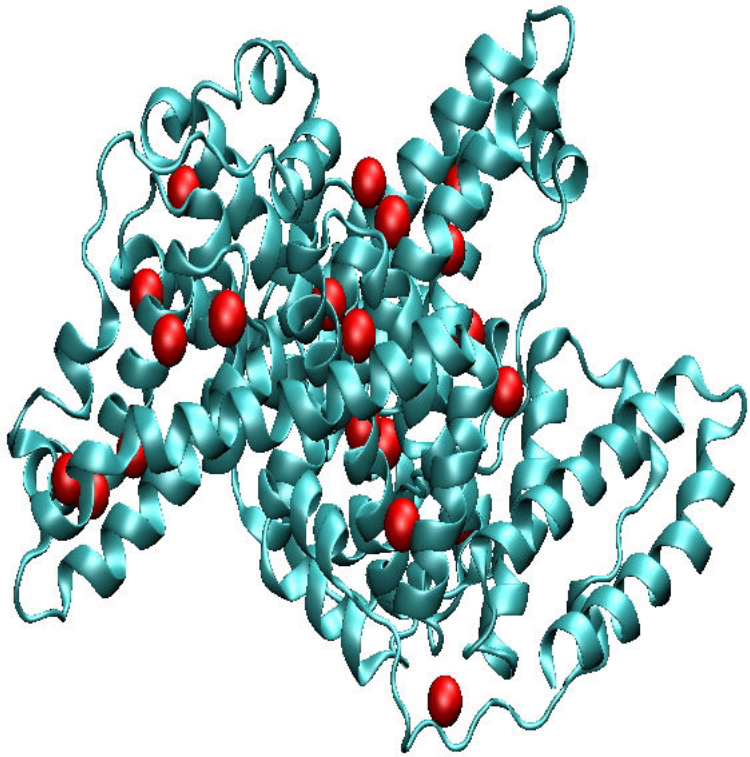

Figure 4.13 – Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

10 résidus histidine sur les 16 présents dans la séquence primaire de la BSA sont exposés au solvant d'après la représentation de la figure 4.14. Les calculs de surface d'exposition au solvant des atomes de la chaîne latérale de ces résidus donnent 13 résidus accessibles, Tableau 4.9.

La totalité des résidus tryptophane présents dans la séquence primaire de la BSA sont exposés au solvant d'après la figure 4.15. Les résultats des calculs de surface accessibles pour les atomes des chaînes latérales de ces résidus donnent 20,7 $Å^2$ pour le tryptophane 134 et 41,1 $Å^2$ pour le tryptophane 213. Ces deux résidus sont donc bien exposés au

Y 30	Y 84	Y 137	Y 139	Y 147	Y 149	Y 155	Y 156	Y 160	Y 262
4,1	16,2	25,5	9,4	13	15,6	38,2	10,4	27,9	60,9
Y 318	Y 331	Y 333	Y 340	Y 352	Y 369	Y 400	Y 410	Y 451	Y 496
21,8	3,9	28,7	37,7	1,4	7,8	83,4	14,1	54,8	31,6

Tableau 4.8 – Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en $Å^2$, des résidus tyrosine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu tyrosine (Y) dans la séquence primaire de la protéine.

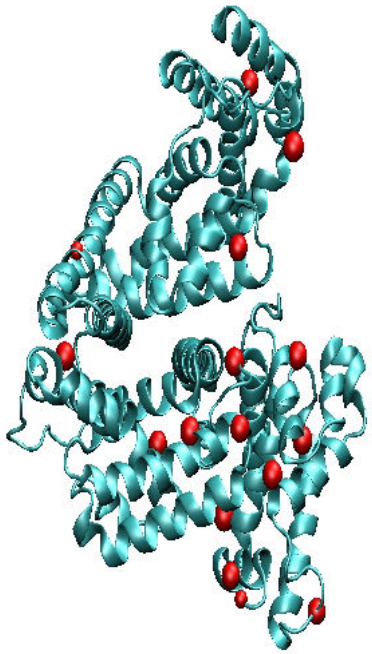

Figure 4.14 – Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

solvant.

Parmi les 4 résidus méthionine présents dans la séquence primaire de la BSA, deux sont exposés au solvant, Fig.4.16. Le tableau 4.10 présente les surfaces accessibles au solvant des atomes de soufre de ces résidus méthionine. Seul le résidu méthionine 547 expose son atome de soufre au solvant.

En conclusion, sur les 42 résidus d'acides aminés réactifs présents dans la protéine

His 9	His 18	His 39	His 59	His 67	His 105	His 145	His 241
47,6	34,8	0,7	78,8	28,9	46,6	29,9	7,1
His 246	His 287	His 337	His 366	His 378	His 463	His 509	His 534
81,8	14,6	49,9	65,0	84,9	3,7	134,2	47,6

Tableau 4.9 – Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en $Å^2$, des résidus histidine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu histidine dans la séquence primaire de la protéine.

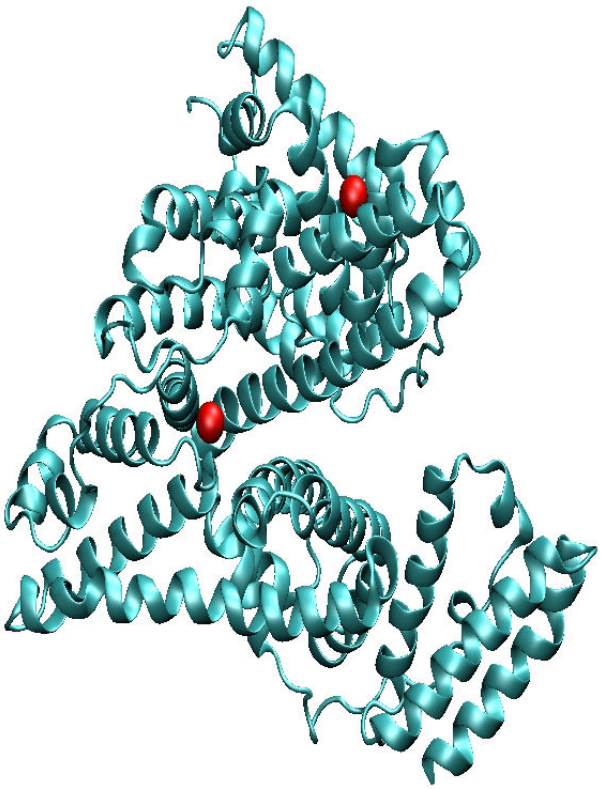

Figure 4.15 – Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

seuls 31 sont exposés au solvant ce qui explique une valeur plus faible de $k_{BSA.exp}$ par rapport à k_{BSA}.

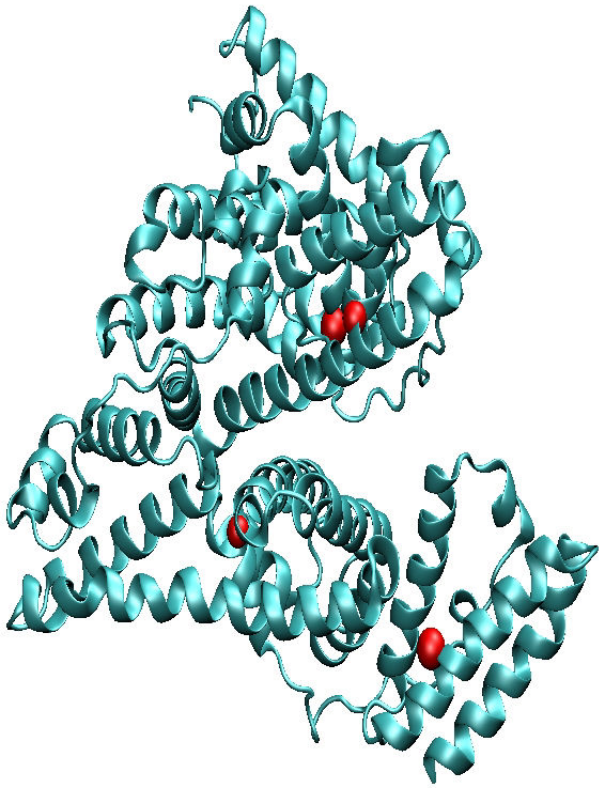

Figure 4.16 – Représentation en trois dimensions de la BSA (3V03.pdb), avec les résidus méthionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires d'un monomère de la protéine.

Met 87	Met 184	Met 445	Met 547
2,6	0,0	6,9	26,3

Tableau 4.10 – Surfaces des atomes de soufre accessibles au solvant, en $Å^2$, des résidus méthionine présents dans un monomère de la BSA (3V03.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position du résidu méthionine dans la séquence primaire de la protéine.

4.3.3 Oxydation du lysozyme

La mesure du temps de vie de l'oxygène singulet a été réalisée avec différentes concentrations de lysozyme en solution. A l'aide de la modélisation des points expérimentaux, la constante d'oxydation de la protéine par l'oxygène singulet, $k_{Lyso.exp}$, a été déterminée : 1,2 10^8 M^{-1} s^{-1}. Le lysozyme est une protéine de 129 acides aminés, dont 3 résidus tyrosine, 1 résidu histidine, 6 résidus tryptophane et 2 résidus méthionine. En effectuant la somme

des constantes d'oxydation pour chacun des résidus d'acides aminés réactifs présents dans la séquence de la protéine, nous obtenons l'équation :

$$k_{Lyso} = 3\,k_Y + \ k_H + 6\,k_W + 2\,k_M \tag{4.5}$$

avec k_Y, k_H, k_W et k_M les constantes d'oxydation des différents tripeptides étudiés par l'oxygène singulet. Nous obtenons alors une valeur de 3,5 10^8 M^{-1} s^{-1}, cette valeur est supérieure à celle obtenue pour $k_{Lyso.exp}$. La position des résidus d'acides aminés réactifs au sein de la structure protéique est étudiée pour expliquer cette différence.

Tous les résidus tyrosine présents dans la séquence primaire du lysozyme sont exposés au solvant d'après la représentation figure 4.17. En réalisant les calculs de surface accessible au solvant des atomes de la chaîne latérale de ces résidus, il apparaît qu'ils sont en effet tous les 3 exposés au solvant. Ainsi les surfaces obtenues sont 46,7 ; 49,7 et 18,9 $Å^2$ pour les résidus tyrosine 20, tyrosine 23 et tyrosine 53, respectivement.

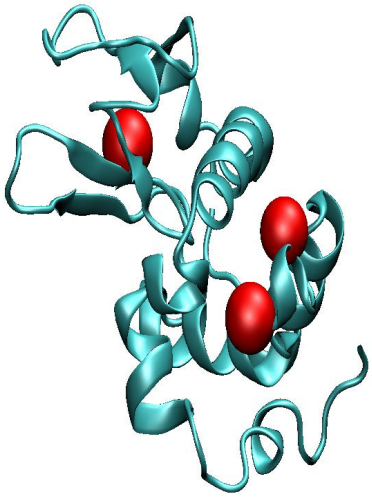

Figure 4.17 – Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus tyrosine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

Le lysozyme possède un seul résidu histidine et il est exposé au solvant, Fig.4.18. D'après les calculs de surface accessible au solvant ce résidu a une chaîne latérale exposée au solvant avec une surface égale à 14 $Å^2$.

Sur les 6 résidus tryptophane présents, 3 sont exposés au solvant d'après la représentation de la figure 4.19. Les résultats des calculs de surface accessible au solvant des atomes de la chaîne latérale des résidus tryptophane sont présentés dans le tableau 4.11. D'après ces calculs, 4 résidus tryptophane sont exposés au solvant.

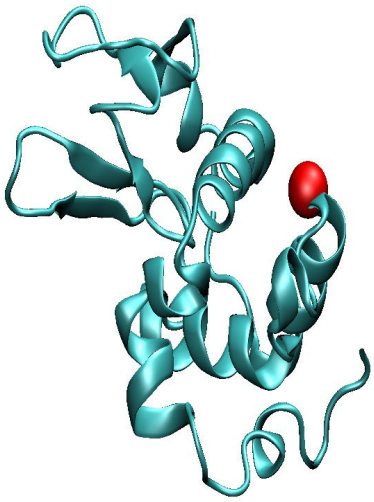

Figure 4.18 – Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus histidine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

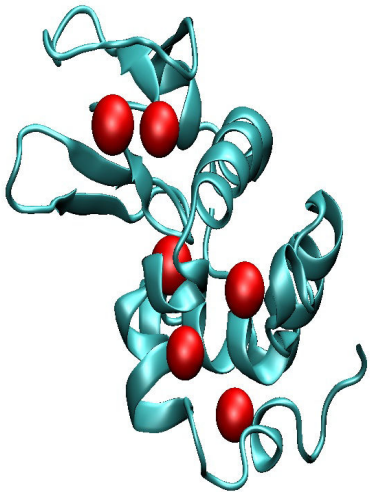

Figure 4.19 – Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus tryptophane assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

La représentation figure 4.20 montre qu'aucun des 2 résidus méthionine présents n'est exposé au solvant. Les calculs de surface accessible au solvant des atomes de soufre de ces résidus nous donnent une surface nulle et de 4,1 $Å^2$ pour les résidus méthionine 105 et 12 respectivement et donc confirment le résultat précédent.

Sur les 12 résidus d'acides aminés réactifs présents dans la protéine seuls 7 sont exposés au solvant ce qui explique une valeur plus faible de $k_{Lyso.exp}$ par rapport à k_{Lyso}.

Trp 28	Trp 62	Trp 63	Trp 108	Trp 111	Trp 123
1,2	74,8	30,8	1,9	14,3	26,5

Tableau 4.11 – Surfaces des atomes de la chaîne latérale accessibles au solvant, en $Å^2$, des résidus tryptophane présents dans le lysozyme (2LYZ.pdb). Ces surfaces sont présentées en fonction de la position des résidus tryptophane dans la séquence primaire de la protéine.

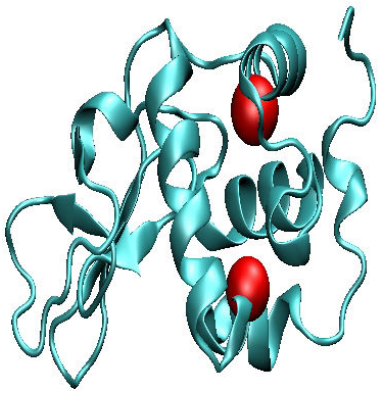

Figure 4.20 – Représentation en trois dimensions du lysozyme (2LYZ.pdb), avec les résidus methionine assimilés à des sphères rouges au sein des structures secondaires de la protéine.

4.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons déterminé les constantes d'oxydation de tripeptides Gly-(acide aminé réactif)-Gly et de trois protéines à l'aide de la phosphorescence de l'oxygène singulet en suivant un protocole expérimental identique. Ces constantes ont montré que la réactivité des résidus d'acides aminés dans les tripeptides est très proche de celle mesurée pour les acides aminés libres. Cela met en évidence que les groupements amine et carboxyle n'affectent pas la réactivité des acides aminés libres.

La comparaison entre la constante de vitesse d'oxydation expérimentale et la somme des réactivités des résidus d'acides aminés présents dans la structure protéique nous a permis de montrer la différence de réactivité des résidus au sein de protéines et au sein de tripeptides. Dans les protéines, les réactivités des résidus sont diminuées par rapport à celles mesurées dans les tripeptides. Cela a été expliqué en considérant le degré d'exposition au solvant de ces résidus.

Bibliographie

[1] M.J. DAVIES : Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305:761–770, 2003.

[2] A. MICHAELI et J. FEITELSON : Reactivity of singlet oxygen towards amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.*, 59:284–289, 1994.

[3] F. WILKINSON, W.P. HELMAN et A.B. ROSS : Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24:663–1021, 1995.

[4] B. MONROE : *A.A. Frimer (Ed.), Singlet O_2, Vol. 1*, chapitre Singlet oxygen in solution : lifetimes and reaction rate constants., pages 177–224. CRC Press, Boca Raton, 1985.

[5] M. ROUGEE, R.V. BENSASSON, E.J. LAND et R. PARIENTE : Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensivity. *Photochem. Photobiol.*, 47:485–489, 1988.

[6] M. NAKAGAWA, K. YOSHIKAWA et T. HINO : The photosensitized oxygenation of Nb-methyltryptamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 97:6496–6501, 1975.

[7] M. NAKAGAWA, H. OKAJIMA et T. HINO : Photosensitized oxygenation of Nb-methoxycarbonyltryptophan methyl ester and Nb-methoxycarbonyl tryptamine. Isolation and novel transformation of a 3a-hydroperoxypyrroloindole. *J. Am. Chem. Soc.*, 98:635–637, 1976.

[8] M. NAKAGAWA, H. WATANABE, S. KODATO, H. OKAJIMA, T. HINO, J.L. FLIPPEN et B. WITKOP : A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine-25 years later. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:4730–4733, 1977.

[9] M. NAKAGAWA, H. OKAJIMA et T. HINO : Photosensitized oxygenation of Nb-methoxycarbonyltryptamines. A new pathway to kynurenine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 99:4424–4429, 1977.

[10] I. SAITO, T. MATSUURA, M. NAKAGAWA et T. HINO : Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives. *Acc. Chem. Res.*, 10:346–352, 1977.

[11] R. LANGLOIS, H. ALI, N. BRASSEUR, J.R. WAGNER et J.E. van LIER : Biological activities of phythalocyanines -IV. Type II sensitized photooxydation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 44:117–123, 1986.

[12] R.W. REDMOND et J.N. GAMLIN : A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.*, 70:391–475, 1999.

[13] P. WALRANT et R. SANTUS : N-formyl-kynurenine, a tryptophan photooxidation product, as a photodynamic sensitizer. *Photochem. Photobiol.*, 19:411–417, 1974.

[14] M.-P. PILENI, R. SANTUS et E.J. LAND : On the photosensitizing properties of N-formylkynurenine and related compounds. *Photochem. Photobiol.*, 28:525–529, 1978.

[15] M.-P. PILENI, M. GIRAUD et R. SANTUS : Kynurenic acid. II. Photosensitizing properties. *Photochem. Photobiol.*, 30:257–261, 1979.

[16] T. TOKOROYAMA : Discovery of the Michael reaction. *Eur. J. Org. Chem.*, 2010: 2009–2016, 2010.

[17] A. MICHAEL : Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *J. Prakt. Chem.*, 35:349–356, 1887.

[18] M. TOMITA, M. IRIE et T. UKITA : Sensitized photooxydation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. *Biochemistry*, 8:5149–5160, 1969.

[19] P. KANG et C.S. FOOTE : Synthesis of a C-13, N-15 labeled imidazole and characterization of the 2,5-endoperoxide and its decomposition. *Tetrahedron Lett.*, 41:9623–9626, 2000.

[20] H.-R. SHEN, J.D. SPIKES, P. KOPECEKOVA et J. KOPECEK : Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing *n*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. *J. Photochem. Photobiol. B*, 34:203–210, 1996.

[21] H.-R. SHEN, J.D. SPIKES, C.J. SMITH et J. KOPECEK : Photodynamic crosslinking of proteins. IV. Nature of the His-His bond(s) formed in the rose bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine. *J. Photochem. Photobiol. A*, 130:1–6, 2000.

[22] P.K. SYSAK, C.S. FOOTE et T.-Y. CHING : Chemistry of singlet oxygen-XXV. Photooxygenation of methionine. *Photochem. Photobiol.*, 26:19–27, 1977.

[23] R.C. STRAIGHT et J.D. SPIKES : *A.A. Frimer (Ed.), Singlet O_2, vol. 4*, chapitre Photosensitized oxidation of biomolecules., pages 91–143. CRC Press, Boca Raton, 1985.

[24] W. ANDO et T. TAKATA : *A.A. Frimer (Ed.), Singlet O_2, vol. 3*, chapitre Photooxidation of sulfur compounds, pages 1–117. CRC Press, Boca Raton, 1985.

[25] M.J. DAVIES : The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703:93–109, 2005.

[26] C.S. FOOTE et J.W. PETERS : Chemistry of singlet oxygen : XIV. A reactive intermediate in sulfide photooxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 93:3796–3975, 1971.

[27] M.J. DAVIES et R.T. DEAN : *Radical-mediated protein oxidation : from chemistry to medicine.* Oxford University Press, Oxford, 1997.

[28] M.J. DAVIES : Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3:17–25, 2004.

[29] I.B.C. MATHESON, R.D. ETHERIDGE, N.R. KRATOVICH et J. LEE : The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. *Photochem. Photobiol.*, 21:165–171, 1975.

[30] A. SHRAKE et J.A. RUPLEY : Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J. Mol. Biol.*, 79:351–364, 1973.

[31] O. STERN et M. VOLMER : Über die Abklingzeit der Fluoreszenz. *Physik. Zeitschr.*, 20:183–188, 1919.

Conclusions

Nous nous sommes intéressés à l'action de deux oxydants, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet, sur des protéines modèles, la β-lactoglobuline, le lysozyme et l'albumine sérique bovine ainsi que sur une série de tripeptides. Nous avons conduit notre étude en ayant pour but la détermination des constantes de vitesse d'oxydation des protéines et la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les tripeptides. Cette étude a été faite à l'aide de deux techniques expérimentales : la spectroscopie de phosphorescence résolue en temps et la spectroscopie Raman.

Dans le cas du peroxyde d'hydrogène, nous avons utilisé la spectrocopie Raman. L'attribution précise des bandes Raman des protéines a été réalisée a l'aide d'une étude systématique des bandes Raman d'acide aminé, de dipeptide, de tripeptide et de protéines modèles. Cette étude a montré un bon accord entre les bandes Raman des chaînes latérales des résidus d'acides aminés de tripeptides et celles obtenues pour les protéines. Elle nous a permis de lister les bandes de référence des spectres protéiques et de suivre la réaction d'oxydation de la β-lactoglobuline au cours du temps par spectroscopie Raman. Cela a révélé l'oxydation d'un seul type de résidu, la méthionine, grâce à la position d'une de ses bandes Raman dans le spectre de la protéine dont la l'intensité c'est trouvée modifiée au cours de l'oxydation. Ce résultat montre la finesse de la technique Raman utilisée ainsi que la spécificité de l'action du peroxyde d'hydrogène.

L'action de l'oxygène singulet sur les tripeptides et protéines a été étudiée en utilisant la spectroscopie de phosphorescence résolue en temps. La détermination du temps de vie de l'oxygène singulet en présence des différents réactifs choisis (acides aminés, tripeptides, protéines modèles) nous a permis de calculer les constantes de vitesse d'oxydation correspondantes. Les résultats ont révélé que la réactivité des acides aminés libres est quasi

identique à celle des résidus au sein des tripeptides ainsi qu'une diminution de la réactivité des résidus au sein des protéines comparativement à celles observées au sein des tripeptides. Ainsi, les fonctions carboxyles et amines ne prennent pas part à l'oxydation et l'environnement protéique influe sur la réactivité des résidus en les exposant ou non au solvant.

L'étude de l'action du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène singulet a montré l'importance de l'environnement protéique. Cette importance a pu être mise en évidence par la démarche originale suivie, débutant nos expérimentations avec des tripeptides, en tant que petits fragments élémentaires de protéines, et ensuite comparant ces résultats avec ceux obtenus pour les protéines modèles. Ainsi, les constantes de vitesse d'oxydation des protéines modèles par l'oxygène singulet ne sont pas égales à la somme des constantes de vitesses de chacun des résidus d'acides aminés qui les constituent. De la même façon, l'oxydation de la méthionine par le peroxyde d'hydrogène n'a été observée que pour la β-lactoglobuline alors que cet acide aminé est aussi présent dans la séquence des deux autres protéines modèles. Ce résultat s'explique par les différences d'exposition au solvant des résidus méthionine présents dans les trois protéines modèles.

Le travail réalisé ouvre donc la voie pour d'autres études portant sur les protéines modèles et utilisant la spectroscopie Raman grâce au travail d'attribution de leur bandes. Une suite immédiate de ce travail serait de mettre en évidence l'action de l'oxygène singulet sur les protéines modèles par spectroscopie Raman afin de compléter les résultats obtenus ici par spectroscopie de phosphorescence résolue en temps. La spectroscopie Raman pourrait alors montrer les résidus oxydés au sein des protéines via des modifications spectrales. De manière plus générale, il est possible d'étudier l'action d'autres espèces réactives de l'oxygène s'attaquant aux protéines notamment le radical hydroxyle et le radical anion superoxyde en utilisant la méthode suivie pour ce travail de thèse.

Annexe

Coordonnées cartésiennes des structures des tripeptides

Ces structures ont été utilisées pour la réalisation de spectres Raman théoriques de ces tripeptides, dipeptide et acide aminé. Elles ont toutes été optimisées en utilisant Gaussian 09, avec le niveau de théorie B3LYP/6-311+G(2df,2pd) et le modèle de solvant continu et polarisable.

Gly	N	1.743200000	0.071782000	-0.000131000
	C	0.549857000	-0.836720000	0.000180000
	C	-0.715464000	0.061321000	-0.000045000
	O	-1.804628000	-0.532850000	-0.000130000
	O	-0.483859000	1.298992000	0.000097000
	H	1.292805000	1.016718000	0.000118000
	H	0.573175000	-1.465812000	-0.883474000
	H	0.572899000	-1.465015000	0.884456000
	H	2.330470000	-0.032545000	0.822943000
	H	2.329791000	-0.032562000	-0.823677000

GlyGly	C	-2.262660000	0.572300000	0.509070000
	N	-3.357095000	0.131473000	-0.405582000
	C	-1.022512000	-0.246017000	0.124650000
	O	-1.068057000	-0.937707000	-0.895558000
	H	-2.076104000	1.630571000	0.350939000
	H	-2.887685000	-0.448065000	-1.127228000
	N	0.022189000	-0.137957000	0.938507000
	C	1.327410000	-0.708266000	0.647041000
	C	2.291589000	0.221106000	-0.144262000
	O	3.412809000	-0.290661000	-0.377064000
	O	1.881867000	1.357733000	-0.464938000
	H	-0.040730000	0.513442000	1.704920000
	H	1.801884000	-0.976304000	1.589295000
	H	1.183944000	-1.623352000	0.078029000
	H	-2.560038000	0.415058000	1.540359000
	H	-3.840197000	0.908376000	-0.850844000
	H	-4.052631000	-0.443996000	0.065542000

GlyGlyGly	C	0.525882000	0.477938000	-0.019402000
	N	1.753820000	-0.288442000	-0.009001000
	C	-0.647614000	-0.504839000	-0.010148000
	O	-0.444785000	-1.722305000	-0.006603000
	H	0.471165000	1.131556000	0.852433000
	H	1.622760000	-1.293473000	-0.002536000
	C	2.961036000	0.261541000	-0.011552000
	N	-1.855892000	0.053930000	-0.007216000
	O	3.185670000	1.473199000	-0.019510000
	C	-3.106434000	-0.680849000	0.000911000
	C	-4.304678000	0.297129000	0.009935000
	O	-5.433965000	-0.242087000	0.018990000
	O	-4.037791000	1.524346000	0.007208000
	C	4.144339000	-0.714417000	-0.010703000
	N	5.380395000	0.121133000	0.044660000
	H	6.013147000	-0.057479000	-0.731884000
	H	5.900340000	-0.005817000	0.910467000
	H	-1.981921000	1.059410000	-0.007853000
	H	-3.182302000	-1.324691000	-0.876850000
	H	-3.169782000	-1.326016000	0.878620000
	H	4.114155000	-1.376358000	0.848664000
	H	4.154379000	-1.312392000	-0.916419000
	H	0.472737000	1.111285000	-0.906282000
	H	5.048848000	1.103383000	-0.002375000

GlyPheGly	C	-0.259355000	0.208771000	0.250364000
	C	0.196371000	-1.073523000	0.995199000
	C	1.534196000	-1.605398000	0.544915000
	C	2.705369000	-1.273198000	1.227782000
	C	3.940291000	-1.753942000	0.802375000
	C	4.020854000	-2.580018000	-0.313376000
	C	2.858822000	-2.924466000	-0.998440000
	C	1.627699000	-2.441121000	-0.570836000
	N	0.626311000	1.335976000	0.504320000
	C	-1.657603000	0.608980000	0.747490000
	O	-1.772404000	1.340927000	1.734470000
	H	2.650225000	-0.638810000	2.103201000
	H	4.836963000	-1.487175000	1.345896000
	H	2.910940000	-3.573401000	-1.862552000
	H	0.728493000	-2.719348000	-1.106580000
	H	0.219197000	-0.853027000	2.063280000
	H	-0.573007000	-1.830590000	0.838792000
	H	-0.269349000	0.027693000	-0.821698000
	H	0.442462000	1.836571000	1.363803000
	C	1.504607000	1.824142000	-0.369352000
	N	-2.684083000	0.084749000	0.079061000
	O	1.742337000	1.363448000	-1.484964000
	C	-4.079231000	0.264057000	0.433873000
	C	-4.987719000	-0.506068000	-0.552924000
	O	-6.215406000	-0.426115000	-0.323656000
	O	-4.417719000	-1.131124000	-1.481277000
	C	2.270588000	3.070327000	0.095756000
	N	3.184526000	3.448328000	-1.023249000
	H	3.022232000	2.736150000	-1.760426000
	H	4.165952000	3.431520000	-0.754125000
	H	-2.552626000	-0.492334000	-0.743318000
	H	-4.269191000	-0.094843000	1.446585000
	H	-4.350515000	1.320865000	0.411909000
	H	1.593539000	3.892843000	0.302869000
	H	2.855874000	2.860797000	0.985638000
	H	2.978573000	4.369468000	-1.404629000
	H	4.979173000	-2.958101000	-0.643107000

GlyMetGly (*trans*)	C	-0.005555000	-0.253346000	0.102999000
	C	-0.477044000	1.156377000	0.514797000
	N	-0.919618000	-1.296661000	0.551976000
	C	1.359771000	-0.543921000	0.748104000
	O	1.413451000	-1.070643000	1.862794000
	H	-0.578353000	1.186125000	1.601477000
	H	0.307425000	1.865364000	0.245552000
	H	0.063698000	-0.316898000	-0.981060000
	H	-0.757212000	-1.626539000	1.494897000
	C	-1.776042000	-1.939795000	-0.239777000
	N	2.425902000	-0.157395000	0.049132000
	O	-1.985787000	-1.684204000	-1.424980000
	C	3.797681000	-0.263305000	0.509284000
	C	4.766834000	0.286815000	-0.563110000
	O	5.980953000	0.236718000	-0.263970000
	O	4.253248000	0.727343000	-1.621351000
	C	-2.541591000	-3.095828000	0.415725000
	N	-3.545662000	-3.564121000	-0.585221000
	H	-3.309484000	-3.071250000	-1.465879000
	H	-4.499677000	-3.319467000	-0.326358000
	H	2.346282000	0.249210000	-0.875575000
	H	3.938523000	0.296179000	1.435557000
	H	4.054727000	-1.302604000	0.719925000
	H	-1.865331000	-3.913496000	0.647115000
	H	-3.047116000	-2.786132000	1.324363000
	C	-1.787553000	1.565775000	-0.148339000
	H	-1.683017000	1.572325000	-1.233411000
	H	-2.590361000	0.878373000	0.115474000
	S	-2.272008000	3.242973000	0.401399000
	C	-3.845071000	3.420750000	-0.493508000
	H	-4.242052000	4.402327000	-0.244362000
	H	-3.686938000	3.362395000	-1.568607000
	H	-4.555998000	2.658451000	-0.180478000
	H	-3.510840000	-4.569549000	-0.739213000

GlyLeuGly	C	0.285948000	0.129487000	-0.189541000
	C	0.424998000	1.577341000	-0.701458000
	N	1.415960000	-0.702162000	-0.591703000
	C	-0.974910000	-0.505277000	-0.797116000
	O	-0.911444000	-1.083074000	-1.886349000
	H	0.540714000	1.533035000	-1.787132000
	H	-0.517308000	2.096796000	-0.508087000
	H	0.232301000	0.109850000	0.896169000
	H	1.349892000	-1.082897000	-1.526617000
	C	2.381715000	-1.119804000	0.222212000
	N	-2.099670000	-0.345711000	-0.099986000
	O	2.509140000	-0.809964000	1.406910000
	C	-3.412122000	-0.785593000	-0.533497000
	C	-4.476676000	-0.432995000	0.531801000
	O	-5.648983000	-0.767353000	0.248093000
	O	-4.072535000	0.147675000	1.569558000
	C	3.417172000	-2.059077000	-0.411863000
	N	4.384900000	-2.414483000	0.668412000
	H	5.341776000	-2.149336000	0.444755000
	H	4.377728000	-3.407616000	0.891121000
	H	-2.110307000	0.110954000	0.804033000
	H	-3.685932000	-0.312727000	-1.478163000
	H	-3.422739000	-1.863922000	-0.700169000
	H	2.951880000	-2.962281000	-0.793504000
	H	3.945798000	-1.564773000	-1.220811000
	C	1.578565000	2.391091000	-0.094480000
	H	2.495646000	1.801091000	-0.182974000
	C	1.780480000	3.681853000	-0.895458000
	H	1.995165000	3.469814000	-1.944103000
	H	0.886236000	4.308953000	-0.857339000
	H	4.069635000	-1.882921000	1.502178000
	C	1.350939000	2.704778000	1.387548000
	H	0.446763000	3.304132000	1.520329000
	H	1.248728000	1.801383000	1.988602000
	H	2.188920000	3.273893000	1.792906000
	H	2.610695000	4.263963000	-0.492831000

GlyHisGly (pour pH égal à 11)	C	-0.006603000	0.041829000	0.322893000
	C	0.468805000	-1.263065000	1.012047000
	N	0.904142000	1.145389000	0.566602000
	C	-1.390194000	0.421890000	0.867892000
	O	-1.491835000	1.020452000	1.942973000
	H	0.580758000	-1.068595000	2.079340000
	H	-0.321659000	-2.008132000	0.901207000
	H	-0.046797000	-0.114152000	-0.752090000
	H	0.868790000	1.548120000	1.490924000
	C	1.613959000	1.780648000	-0.389779000
	N	-2.434593000	0.033579000	0.132321000
	O	1.658448000	1.416113000	-1.562633000
	C	-3.822576000	0.241626000	0.496698000
	C	-4.761548000	-0.306952000	-0.602451000
	O	-5.985391000	-0.160946000	-0.381562000
	O	-4.220475000	-0.841947000	-1.601511000
	C	2.342463000	3.035269000	0.074071000
	N	3.533931000	3.259695000	-0.739208000
	H	3.858475000	4.211781000	-0.626458000
	H	3.292151000	3.136656000	-1.716054000
	H	-2.317243000	-0.433318000	-0.758180000
	H	-4.054990000	-0.256940000	1.439577000
	H	-4.027813000	1.303863000	0.639109000
	H	1.608285000	3.850837000	0.013477000
	H	2.623924000	2.939812000	1.123270000
	N	1.787650000	-2.441392000	-0.771442000
	C	3.044794000	-2.782487000	-0.954675000
	C	1.742279000	-1.807615000	0.456006000
	C	2.997771000	-1.778020000	1.002829000
	N	3.816638000	-2.402807000	0.092567000
	H	3.444720000	-3.301100000	-1.809612000
	H	3.369100000	-1.382309000	1.930674000
	H	4.807041000	-2.555884000	0.187627000

GlyTrpGly (pour pH égal à 11)	C	0.802002000	0.176592000	0.004721000
	C	0.081499000	-0.906417000	-0.842417000
	C	-2.534424000	-0.934283000	-0.512822000
	C	-3.072724000	0.061294000	-1.342011000
	C	-4.443964000	0.253179000	-1.363653000
	C	-5.301006000	-0.531210000	-0.569451000
	C	-4.802035000	-1.525143000	0.256800000
	C	-3.420424000	-1.717498000	0.274131000
	N	0.021411000	1.388743000	0.139496000
	C	2.139995000	0.520582000	-0.664930000
	O	2.180558000	1.301843000	-1.619777000
	H	-2.427432000	0.672685000	-1.958905000
	H	-4.867620000	1.018121000	-2.000753000
	H	-5.460213000	-2.131176000	0.865166000
	H	-0.096479000	-0.495176000	-1.838035000
	H	0.778763000	-1.736648000	-0.968535000
	H	0.968815000	-0.210578000	1.007430000
	H	-0.060293000	2.006089000	-0.658328000
	C	-0.497082000	1.848288000	1.288997000
	N	3.212504000	-0.107499000	-0.174309000
	O	-0.425948000	1.267638000	2.373995000
	C	4.555992000	0.008881000	-0.706329000
	C	5.535866000	-0.875648000	0.099611000
	O	6.726084000	-0.847884000	-0.288259000
	O	5.055648000	-1.531400000	1.057177000
	C	-1.200407000	3.201441000	1.187849000
	N	-1.351392000	3.698334000	-0.178035000
	H	-1.328817000	4.708405000	-0.201396000
	H	-2.233710000	3.408530000	-0.579633000
	H	3.149500000	-0.729456000	0.621858000
	H	4.585496000	-0.294721000	-1.754308000
	H	4.901041000	1.043597000	-0.664827000
	H	-2.143913000	3.101452000	1.731050000
	H	-0.587039000	3.900480000	1.758098000
	H	-6.367889000	-0.356385000	-0.606474000
	N	-2.654573000	-2.618246000	0.973304000

GlyTrpGly (pour pH égal à 11) (suite)	C	-1.329977000	-2.433741000	0.649340000
	C	-1.200656000	-1.410042000	-0.252998000
	H	-3.001875000	-3.316242000	1.607547000
	H	-0.570646000	-3.057524000	1.090734000

GlyLysGly	C	-0.135687000	0.266597000	0.093450000
	C	0.382997000	-1.116152000	0.530452000
	N	0.730788000	1.354509000	0.532701000
	C	-1.516416000	0.517885000	0.723376000
	O	-1.601258000	1.097191000	1.810089000
	H	0.480267000	-1.122216000	1.618809000
	H	-0.381281000	-1.853879000	0.278391000
	H	-0.199999000	0.309866000	-0.992266000
	H	0.517245000	1.713151000	1.455149000
	C	1.567522000	2.023048000	-0.258185000
	N	-2.559588000	0.038852000	0.047523000
	O	1.825430000	1.745805000	-1.429074000
	C	-3.934313000	0.087104000	0.508710000
	C	-4.869955000	-0.586388000	-0.522204000
	O	-6.083721000	-0.595451000	-0.217850000
	O	-4.332903000	-1.055548000	-1.556324000
	C	2.247068000	3.239535000	0.383482000
	N	3.194780000	3.785394000	-0.633045000
	H	4.168450000	3.703823000	-0.346813000
	H	3.014195000	4.762115000	-0.855499000
	H	-2.457172000	-0.415320000	-0.852503000
	H	-4.037477000	-0.422704000	1.467990000
	H	-4.256055000	1.119004000	0.657675000
	H	1.513301000	3.999828000	0.632955000
	H	2.791552000	2.966923000	1.281532000
	C	1.707214000	-1.525441000	-0.115591000
	H	1.605152000	-1.509392000	-1.203306000
	H	2.472418000	-0.788544000	0.140342000
	C	2.135185000	-2.925475000	0.332991000

GlyLysGly	H	2.237851000	-2.962353000	1.420566000
(suite)	H	1.350545000	-3.640960000	0.079735000
	C	3.405735000	-3.449442000	-0.315135000
	H	3.592806000	-4.482403000	-0.037037000
	H	3.371094000	-3.379643000	-1.399668000
	N	4.629697000	-2.674991000	0.116921000
	H	4.573715000	-1.693608000	-0.153724000
	H	5.473514000	-3.057392000	-0.309181000
	H	4.756132000	-2.706785000	1.128932000
	H	3.047522000	3.210534000	-1.483593000
GlyTyrGly	C	0.534308000	0.312117000	-0.054315000
	C	-0.097173000	-0.697704000	-1.049460000
	C	-1.501752000	-1.117572000	-0.696119000
	C	-2.610316000	-0.477127000	-1.253447000
	C	-3.906624000	-0.847540000	-0.919456000
	C	-4.116312000	-1.881686000	-0.012015000
	C	-3.025514000	-2.541202000	0.550133000
	C	-1.735626000	-2.156815000	0.205908000
	O	-5.409871000	-2.213013000	0.285296000
	N	-0.205317000	1.566900000	-0.014846000
	C	1.965265000	0.640135000	-0.506214000
	O	2.162803000	1.573720000	-1.290181000
	H	-2.461981000	0.322359000	-1.968072000
	H	-4.757771000	-0.346191000	-1.359522000
	H	-3.184154000	-3.353986000	1.248104000
	H	-0.898357000	-2.682372000	0.647986000
	H	-0.079588000	-0.246922000	-2.042977000
	H	0.555066000	-1.571364000	-1.083462000
	H	-5.429287000	-2.934490000	0.923540000
	H	0.531104000	-0.107138000	0.948526000
	H	0.076353000	2.212903000	-0.738748000
	C	-0.950638000	1.956757000	1.032622000
	N	2.921554000	-0.160920000	-0.039192000
	O	-1.130717000	1.297347000	2.046922000

GlyTyrGly	C	4.321741000	-0.083022000	-0.410889000
(suite)	C	5.131635000	-1.184306000	0.312994000
	O	6.354873000	-1.209460000	0.049654000
	O	4.495991000	-1.940106000	1.088913000
	C	-1.649039000	3.314532000	0.975813000
	N	-1.728572000	3.988805000	-0.366534000
	H	-0.842943000	4.400187000	-0.663112000
	H	-2.403519000	4.754472000	-0.328639000
	H	2.725390000	-0.900844000	0.624460000
	H	4.441972000	-0.203306000	-1.488666000
	H	4.737570000	0.891120000	-0.148318000
	H	-2.668098000	3.163140000	1.315592000
	H	-1.153161000	4.000440000	1.657323000
	H	-2.046620000	3.351187000	-1.098181000