

THÈSE

de

L'Université des Sciences et Technologies de Lille

présentée par

SAMIRA ACHIR

en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Molécules et Matière Condensée

Spécialité : Sciences des Matériaux

**Etude des mécanismes de stabilisation des
protéines par spectroscopie Raman et
dynamique moléculaire**

Thèse soutenue publiquement le 10 Avril 2014

devant le jury composé de :

M-C. Bellissent-Funel	Directeur de Recherches CNRS au CEA Saclay	Rapporteur
D.Champion	Professeur à l'Université de Bourgogne	Rapporteur
J. Siepmann	Professeur à l'Université Lille 2	Président
S.Foley	Maitre de Conférences à l'Université de Franche-Comté	Examinateur
A.Hédoux	Professeur à l'Université Lille 1	Directeur de thèse
F.Affouard	Professeur à l'Université Lille 1	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été menée au sein de l'équipe matériaux moléculaires et thérapeutiques à l'Unité Matériaux et Transformations (UMET) de l'Université Lille 1 - Sciences et Technologies. Les travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre du contrat ANR BIOSTAB (Projet ANR-07-PCVI-0034) dans le programme Physique-Chimie du Vivant (PCVI2007), et en grande partie subventionnés par ce contrat.

Une thèse ne peut être menée à bien sans la présence d'un directeur de thèse, je remercie donc le Pr Alain HEDOUX de m'avoir guidé durant cette thèse. Merci pour vos conseils avisés, votre gentillesse et votre disponibilité.

Bien sûr, je souhaite présenter l'expression de ma profonde gratitude au Pr Frédéric AFFOUARD, mon co-directeur de thèse. Il m'a permis de me familiariser avec la dynamique moléculaire. Merci pour la liberté qu'il m'a laissée, ainsi que la confiance dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail : Marie-Claire Bellissent-Funel et Dominique Champion rapporteurs, et Juergen Siepmann et Sarah Foley membres du jury.

Les mots vont me manquer pour exprimer la gratitude que je ressens en pensant au Dr Laurent PACCOU et au Pr YANNICK GUINET et à ce qu'ils m'ont apporté durant cette thèse. Merci pour votre aide, pour vos conseils et surtout pour vos encouragements durant la longue période de rédaction.

Une pensée toute particulière à tous mes collègues dont j'ai été très proche durant ces années passées au sein de l'équipe. Merci à chacun d'entre vous pour son amitié, son aide et son soutien.

Merci à toutes les personnes de l'université de Lille 1 et de l'université de Lille 2 dont j'ai pu croiser la route au cours de ces années.

Mes pensées vont bien sûr aux membres de ma famille qui ont toujours été là pour m'encourager. Sans leur soutien inconditionnel, il m'aurait été impossible de réaliser cette thèse et de poursuivre des études aussi longues. Merci pour votre soutien quotidien, vos conseils et votre amour.

Merci à tous ceux qui me sont chers.

Table des matières

Introduction	1
1 Présentation de l'étude	5
1.1 Les protéines	5
1.1.1 Structure	5
1.1.2 Stabilité thermodynamique des protéines	6
1.2 Lyophilisation	8
1.2.1 Principe	9
1.2.2 Description schématique d'un lyophilisateur	11
1.2.3 Mode opératoire et sources de dénaturation	12
1.3 Bioprotection	14
1.3.1 L'anhydrobiose	15
1.3.2 Les sucres	15
1.3.3 Mécanismes	16
2 Spectroscopie Raman des systèmes moléculaires et biomoléculaires	21
2.1 Spectroscopie Raman	21
2.1.1 Principe de l'effet Raman	21
2.2 Traitement du spectre Raman d'une solution aqueuse de protéine	26
2.2.1 Spectre Raman basse fréquence (0 - 500 cm^{-1})	26
2.2.2 Analyse du spectre distinctif de la conformation moléculaire (500 – 1800 cm^{-1})	29
2.3 Etude des mécanismes de dénaturation par spectroscopie Raman	38
2.3.1 Apport de la spectroscopie Raman à l'étude des mécanismes de dénaturation et stabilisation des protéines	38
2.3.2 Processus de dénaturation sous différents types de stress	39
2.3.3 Mécanismes de stabilisation des protéines par les disaccharides	45
3 Études expérimentales	51
3.1 Etude de la dénaturation chaude de BLG en fonction de la concentration	51
3.2 Analyse en temps réel des changements structuraux des protéines par microspectrométrie Raman in-situ pendant 1 cycle de lyophilisation	56
3.2.1 Méthodes et paramètres expérimentaux	56
3.3 Lyophilisation de formulations protéine/eau	58

3.4	Lyophilisation de formulations protéine/eau/tréhalose	66
3.4.1	Mesure de la température T'_g	66
3.4.2	Analyse de la protéine par micro-spectroscopie Raman in-situ durant la procédure de lyophilisation	68
3.4.3	Analyse du mécanisme de stabilisation du lysozyme par le tréhalose par imagerie Raman	74
3.5	Analyse de la stabilité de la protéine lyophilisée au cours de vieillissements accélérés	78
3.6	Influence de l'eau résiduelle	81
3.7	Conclusion	82
4	Etude des matrices bioprotectrices à base de tréhalose et de glycérol par simulation de dynamique moléculaire	85
4.1	Introduction	85
4.2	Systèmes étudiés et détails des simulations	89
4.3	Résultats des simulations	91
4.3.1	Densités et volume libre	91
4.3.2	Mouvements atomiques locaux	93
4.4	Conclusion et perspectives	97
	Conclusion	99
	Annexe	101
	Bibliographie	109

Introduction

Le développement des techniques de l'ADN recombinant engendre une quantité importante de nouvelles protéines d'intérêt pharmaceutique, sources de nouveaux traitements, mais hélas souvent très labiles en solution où elles sont actives. La stabilisation des protéines, à court terme, et à plus long terme pendant leur conditionnement et leur stockage est donc un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique. Dans le but d'améliorer leur stabilité, les protéines doivent souvent être stockées à l'état sec (poudre). Pour obtenir une protéine à l'état sec, la méthode la plus « douce » et la plus couramment utilisée est la lyophilisation. Il s'agit d'une technique de déshydratation à basse température, par sublimation de la glace. Cependant, la lyophilisation d'une formulation engendre plusieurs types de stress pour la protéine (basses températures, formation de la glace, variation de pH, déshydratation extrême..), qui sont autant de sources de dénaturation pour celle-ci. Pour pouvoir conserver une protéine à l'état sec, il est donc nécessaire de maintenir stable la conformation moléculaire de celle-ci pendant la procédure de lyophilisation. Pour cela, des formulations sont établies de manière empirique, en utilisant différents types d'excipients, visant à stabiliser la protéine contre les différentes sources de stress citées précédemment, sans connaître véritablement quel stress engendre la dénaturation de la protéine, et quel type de dénaturation subit la protéine. L'ajout d'excipients influence de manière drastique certains paramètres opératoires, telle que la température à laquelle la glace est sublimée, rendant très onéreuse une procédure de lyophilisation.

Ce travail s'insère dans le cadre du contrat de recherche ANR BIOSTAB, du programme Physique Chimie du Vivant. Il vise à améliorer la stabilité des protéines pour différents types d'applications thérapeutiques, à partir d'approches interdisciplinaires. Pour cela BIOSTAB est piloté par l'équipe MMT de l'UMET en collaboration avec trois partenaires : biophysiciens du Laboratoire Léon Brillouin de Saclay (MC. Bellissent Funel), pharmaciens de l'équipe INSERM U1008 de l'Université de Lille 2 (J. Siepmann), et physiciens de l'université d'Orléans (ML. Saboungi). La lyophilisation est la principale application thérapeutique considérée dans ce travail, et a été un objectif important du projet BIOSTAB. Les études développées au sein de l'équipe MMT visaient d'une part à déterminer le ou les sources de dénaturation des protéines durant une procédure de lyophilisation, puis à déterminer les excipients les mieux adaptés à stabiliser les protéines pendant une procédure de lyophilisation et pendant leur stockage, afin d'établir des formulations de manière non empirique qui rendront les procédures de lyophilisation moins coûteuses.

Les études préliminaires au projet BIOSTAB, réalisées au sein de l'équipe MMT par spectroscopie Raman et simulations de dynamique moléculaire, ont révélé que ces outils permettaient d'obtenir des informations originales sur les processus de dénaturation des protéines et sur les mécanismes de stabilisation des protéines par les disaccharides. Les études sont réalisées sur des protéines modèles et principalement sur le lysozyme, l'albumine sérique de bovin, la β -lactoglobuline et le chymotrypsinogène. Les agents bioprotecteurs étudiés sont des disaccharides, principalement le sucrose et le tréhalose, reconnus comme stabilisants très efficaces. Les disaccharides sont des excipients très utilisés dans le domaine de la pharmacie et l'équipe MMT a acquis une connaissance particulière des propriétés physiques des disaccharides et des mélanges eau-disaccharides. Le croisement des informations obtenues par ces deux techniques expérimentale et numérique, ont permis de proposer une description précise à l'échelle moléculaire des mécanismes de stabilisation des protéines par les sucres à température ambiante et à haute température, et de mieux comprendre l'efficacité supérieure du tréhalose par rapport à celle des autres disaccharides. Ces analyses ont montré que les principaux modèles proposés pour décrire la stabilisation des protéines contre différentes sources de stress, ne suffisaient pas à expliquer les propriétés bioprotectrices des disaccharides.

Les principaux objectifs de cette thèse ont consisté à :

- Utiliser les méthodes expérimentales (spectroscopie Raman) développées pour analyser les processus de dénaturation et décrire les mécanismes de bioprotection, afin de déterminer les sources de dénaturation auxquelles les protéines sont soumises pendant un cycle de dénaturation. La spectroscopie Raman est le seul outil expérimental qui permet de suivre la structure secondaire d'une protéine en temps réel pendant les différentes étapes d'une procédure de lyophilisation. A partir de l'expérience acquise sur l'étude de la dénaturation chaude des protéines, il sera possible de mettre en évidence des changements structuraux de la protéine lors de chacune des trois étapes d'une procédure de lyophilisation d'une formulation ne contenant pas d'agents bioprotecteurs, et d'analyser le processus de dénaturation lié à la source de stress subie par la protéine. Des analyses Raman lors d'une procédure de lyophilisation de formulations contenant des agents bioprotecteurs devraient apporter des informations sur les mécanismes de stabilisation pendant la lyophilisation.
- Analyser la stabilité des produits lyophilisés pendant le stockage, en analysant la structure secondaire des protéines par spectroscopie Raman lors de vieillissements accélérés.
- Rechercher de nouveaux agents bioprotecteurs efficaces, ou améliorer l'efficacité de certains agents lorsque la protéine est soumise à des conditions analogues à celles inhérentes à la lyophilisation et à son stockage, c'est-à-dire à l'état sec ou très peu hydraté. La compréhension des mécanismes physiques impliqués dans les propriétés bioprotectrices d'excipients est également importante pour améliorer l'efficacité bioprotectrice. La dynamique moléculaire est alors un outil important,

dans la mesure où il est possible de faire varier et d'imposer différentes valeurs de paramètres cruciaux (concentrations en eau, en excipients, . . .), dans des proportions impossibles à réaliser expérimentalement.

Le premier chapitre de ce mémoire introduira les notions de base sur les caractéristiques structurales des protéines, et des sucres (principalement les disaccharides). Le procédé de lyophilisation sera décrit ainsi que le lyophilisateur typiquement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Les sources de dénaturation auxquelles les protéines sont exposées durant chaque étape de la lyophilisation seront présentées. Les principaux modèles décrivant les mécanismes possibles de la bioprotection seront décrits.

Le second chapitre est consacré à la présentation détaillée du principe de la spectroscopie Raman. Les méthodes développées au sein de l'équipe MMT pour analyser les mécanismes de dénaturation et de stabilisation des protéines seront présentées. Ces méthodes ont été affinées au cours de ce travail, ce qui a permis d'effectuer de nouvelles analyses à partir d'anciennes expériences, non publiées et présentées dans ce mémoire.

Le troisième chapitre concerne les résultats expérimentaux, principalement obtenus par spectroscopie Raman. Des analyses de l'influence de la concentration de la β -lactoglobuline sur sa stabilité et son processus de dénaturation chaude sont présentées dans une première partie. La suite du chapitre concerne l'étude in-situ de la stabilité des protéines (β -lactoglobuline, lysozyme, chymotrypsinogène) au cours d'une lyophilisation en absence et en présence de bioprotectants, en vue de déterminer les sources de stress qui engendrent réellement une dégradation de la protéine, et d'analyser les mécanismes de stabilisation par les disaccharides. Des analyses, lors de vieillissements accélérés de la β -lactoglobuline sont également présentées, afin d'étudier l'effet bioprotectant des sucres après l'opération de lyophilisation, durant le stockage à long terme de la protéine.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude par simulation de dynamique moléculaire des mélanges ternaires tréhalose/glycérol/eau. Nous présenterons les résultats obtenus sur les interactions tréhalose/glycérol à différents niveaux d'hydratation et leurs dynamiques locales.

Chapitre 1

Présentation de l'étude

1.1 Les protéines

Une protéine est un polymère linéaire combinant 20 acides aminés naturels, de formule générale $NH_2C_\alpha R HCOOH$, où NH_2 est le groupe amine, $COOH$ le groupe acide, et R la chaîne latérale, aux propriétés chimiques différentes (Figure 1.1). Ces polymères complexes ont la charge d'assurer des rôles variés et vitaux dans tous les organismes [1] :

- Un rôle structural (comme l'actine, le collagène, l'élastine, etc.) ;
- Un rôle de reconnaissance moléculaire et de catalyse (systèmes antigène-anticorps, hormones, récepteurs membranaires, enzymes, etc.).

1.1.1 Structure

On attribue aux protéines quatre niveaux de structure allant de la structure primaire à la structure quaternaire (Figure 1.2). La structure primaire est constituée d'une séquence d'acides aminés reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. La structure primaire reste en général inchangée car les liaisons peptidiques qui relient les acides aminés sont des liaisons assez fortes et ne sont pas facilement rompues par les changements. La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine ; on distingue deux structures principales : les hélices α et les feuillets β . D'une part les

Nom	Code 3 lettres	Nom	Code 3 lettres
Alanine	ALA	Leucine	LEU
Arginine	ARG	Lysine	LYS
Asparagine	ASN	Méthionine	MET
Aspartate	ASP	Phénylalanine	PHE
Cystéine	CYS	Proline	PRO
Glutamate	GLU	Sérine	SER
Glutamine	GLN	Thréonine	THR
Glycine	GLY	Tryptophane	TRP
Histidine	HIS	Tyrosine	TYR
Isoleucine	ILE	Valine	VAL

TABLE 1.1 – *Les acides aminés chez l'homme [2]*

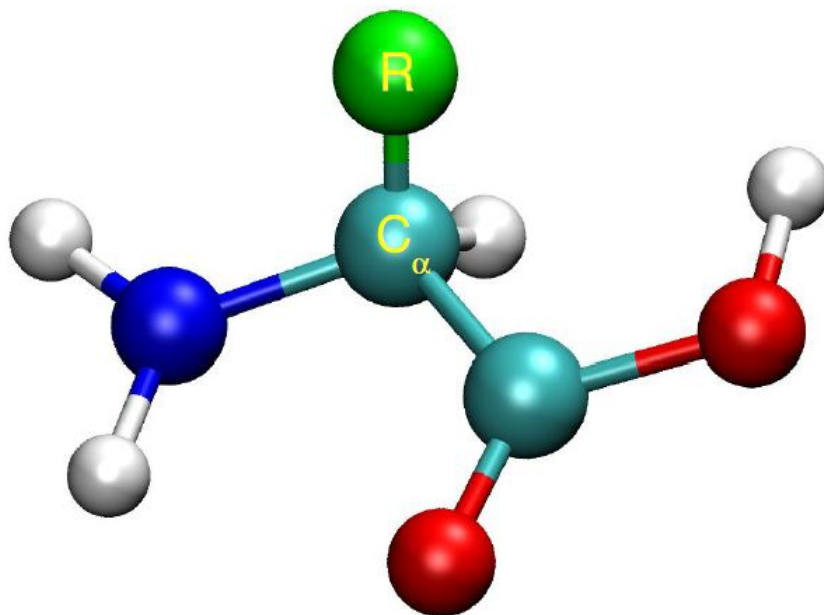


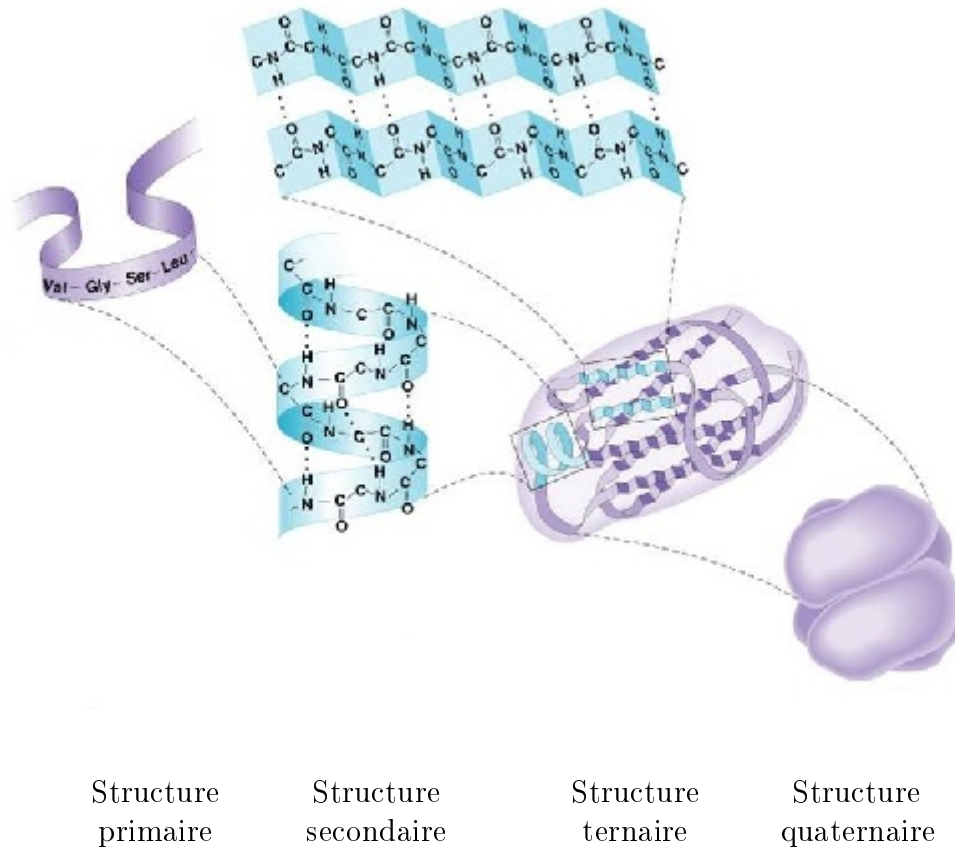
FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'un acide aminé (énantiomère L). La chaîne latérale est symbolisée par l'atome R [6]

hélices α résultent de l'enroulement de la chaîne protéique, de façon à ce que les liaisons peptidiques constituant l'épine dorsale aient la possibilité de former des liaisons hydrogène entre elles ; d'autre part les feuillets β résultent de la superposition de deux chaînes protéiques antiparallèles, plissées de manière à constituer un angle entre les plans des groupes peptidiques. La dénaturation et l'aggrégation des protéines, observées lors d'un procédé ou de leur stockage, sont généralement associées à l'altération des hélices et des feuillets [2, 5]. Les éléments structuraux (hélices, feuillets) interagissent entre eux pour former la structure secondaire. La structure tertiaire résulte d'interactions importantes qui jouent un rôle déterminant permettant à une protéine d'adopter une conformation tridimensionnelle.

Lesk (2001) décrit la structure d'une protéine comme une phrase où les acides aminés de la structure primaire sont des lettres ; la structure secondaire des mots et enfin la tertiaire une phrase [3]. Par conséquent, il existe une relation entre la structure secondaire de la protéine et sa structure primaire ou tertiaire. Si la structure secondaire est modifiée, l'activité biologique de la protéine sera affectée, car la stabilité de la structure secondaire de la protéine contribue à la stabilité de sa structure primaire et tertiaire, nécessaire à son activité biologique[4]. La structure quaternaire d'une protéine concerne uniquement les protéines qui résultent de l'association d'un certain nombre de sous-unités protéiques, par exemple la β -lactoglobuline qui est sous forme de dimères [2].

1.1.2 Stabilité thermodynamique des protéines

Au niveau moléculaire, une protéine peut adopter différentes conformations. La transition entre ces conformations est déterminée thermodynamiquement par la différence d'énergie libre de Gibbs (ΔG), entre deux états. L'équation, ci-dessous, exprime la varia-

FIGURE 1.2 – *Organisation hiérarchique de la structure d'une protéine [6]*

tion de l'énergie libre de Gibbs en fonction de l'enthalpie de transition (ΔH) et l'entropie de transition (ΔS); où (G_D) est l'énergie libre de Gibbs de la protéine à l'état dénaturé (D), (G_N) l'énergie libre de Gibbs à l'état natif (N) et (T) la température :

$$\Delta G = G_D - G_N = \Delta H - T.\Delta S \quad (1.1.1)$$

La figure 1.3 présente la courbe de stabilité de la protéine, elle montre ΔG en fonction de T . Cette courbe d'allure parabolique, implique qu'une protéine est instable à la fois aux hautes et aux basses températures [5].

La dénaturation chaude (ou thermique) est un processus de dénaturation à haute température et la dénaturation froide est celui à basse température. Les températures de dénaturation associées T_{Dh} et T_{Dc} respectivement à la dénaturation chaude et la dénaturation froide correspondent au cas où le ΔG est nul. La dénaturation thermique est facilement observée, en augmentant simplement la température, alors que la dénaturation froide est délicate à observer, car elle intervient à une température inférieure à 273 K à laquelle l'eau de la solution cristallise. La dénaturation froide peut être mise en évidence plus aisément par l'ajout de dénaturants chimiques dont l'effet est de réduire l'intervalle de stabilité des protéines, et d'abaisser le température de cristallisation de la glace. L'application d'une très forte pression hydrostatique permet également d'éviter la formation de cristaux de glace, sans modifier l'état natif de la protéine [6].

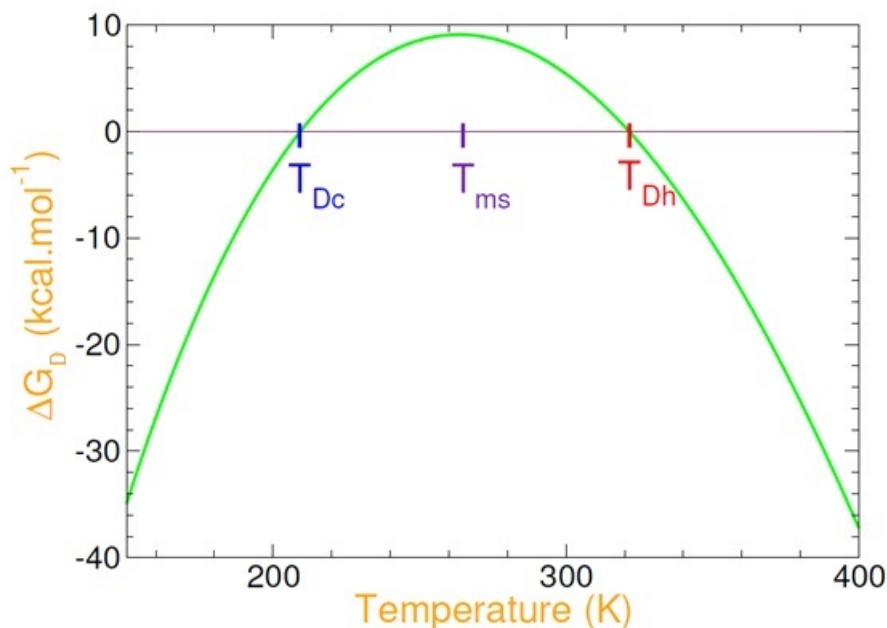


FIGURE 1.3 – Courbe de stabilité d'une protéine. L'intervalle de stabilité est déterminé par la température de dénaturation froide T_{Dc} et la température de dénaturation chaude T_{Dh} . Cette courbe passe par un maximum à la température de stabilité maximale T_{ms} [6].

1.2 Lyophilisation

La courbe de la variation d'enthalpie libre en fonction de la température (figure 1.3) montre la stabilité marginale des protéines en solution sur un intervalle de température restreint, et donc, la nécessité de conserver les protéines à l'état sec. La lyophilisation est le processus de déshydratation le moins "destructif" pour les biomolécules. Il consiste à éliminer l'eau à partir de la sublimation de la glace. Cette technologie, basée sur le maintien d'un produit sous vide à basse température pendant de longues durées, est très onéreuse et est utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire et de la pharmacie pour des produits à forte valeur ajoutée. Dans l'industrie pharmaceutique, la lyophilisation est utilisée pour conserver les vaccins, et de nombreux produits biopharmaceutiques émanant du développement intensif des biotechnologies. Ces derniers sont souvent très actifs, sources de nouveaux traitements, mais hélas très labiles en solution.

Dans le cadre de la thèse deux types de lyophilisation ont été effectués sur des formulations très simples (protéine + eau et protéine + eau + agent bioprotecteur) afin de mettre en évidence les phénomènes de dénaturation et de stabilisation éventuels de la protéine. (i) Des formulations ont été lyophilisées en utilisant le lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D installé dans l'équipe INSERM U1008 à l'Université de Lille 2, représenté sur la figure 1.4 montre les principales parties. (ii) Des expériences de spectroscopie Raman ont été réalisées in-situ pendant un cycle de lyophilisation sur un micro-volume d'une formulation protéique, en utilisant une platine à pression et température variables, décrite dans le chapitre 2. Le cycle de lyophilisation et le mode opératoire seront d'abord décrits pour un appareillage typiquement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Les pa-



FIGURE 1.4 – *Lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D installé dans l'équipe INSERM U1008 à l'Université de Lille 2*

paramètres opératoires pendant un cycle sont représentés schématiquement sur la figure 1.5.

1.2.1 Principe

Le processus de lyophilisation comprend trois étapes, basées sur les transformations de l'eau représentées sur le diagramme d'état de l'eau pure (figure 1.6). La première étape, congélation, consiste à former des cristaux de glace. La seconde étape, séchage primaire, correspond à la sublimation de la glace. Il s'agit de l'étape la plus longue et onéreuse du cycle, pendant laquelle est éliminée la plus grande partie de l'eau de la formulation. La troisième étape, séchage secondaire, correspond à la désorption de l'eau résiduelle, qui n'a pas été congelée pendant la première étape. Uniquement trois paramètres opératoires pilotent le cycle de lyophilisation : (i) la température d'étagères où sont placés les flacons contenant la formulation, (ii) la pression dans la chambre de séchage, (iii) et le temps. Ce troisième paramètre englobe le temps de refroidissement et de recuit dans la première étape, et le temps de séchage dans les seconde et troisième étapes du cycle [7]. La présence de protéine en faible concentration dans l'eau a pour effet de décaler légèrement les lignes de transitions tracées sur le diagramme d'état de la figure 1.6. La présence d'agents bioprotecteurs, principalement des sucres, aura un effet plus important sur certains paramètres opératoires, en particulier la température d'étagères pendant les deux premières étapes et la durée du séchage primaire. En partant d'une solution sucrose-eau contenant 10 % de sucrose à température ambiante (point P sur le diagramme d'état sucrose-eau tracé figure 1.7), les flèches montrent le chemin suivi dans le diagramme d'état lors de la congélation. Lorsque la température atteint la température eutectique (T_e), le sucrose ne précipite pas dans une phase cristalline, mais forme une solution sursaturée avec l'eau non congelée (représentant 15 à 20 % de l'eau initiale). La solution sursaturée est thermodynamiquement instable et très visqueuse. Une fois que le mélange (glace + solution

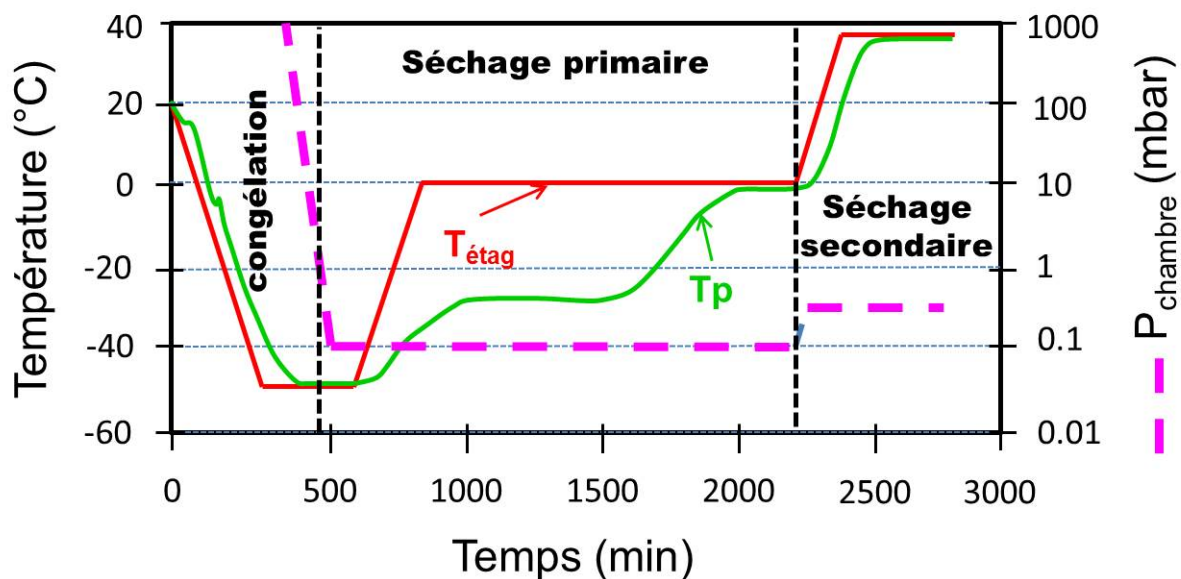


FIGURE 1.5 – Représentation des variations des paramètres opératoires (température d'étagères $T_{\text{étag}}$, pression de chambre et temps) d'un cycle de lyophilisation. La température d'étagères proche $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ lors du séchage secondaire n'est quasiment jamais réalisable pour la lyophilisation d'une protéine en présence d'agents protecteurs. T_p représente la température du produit.

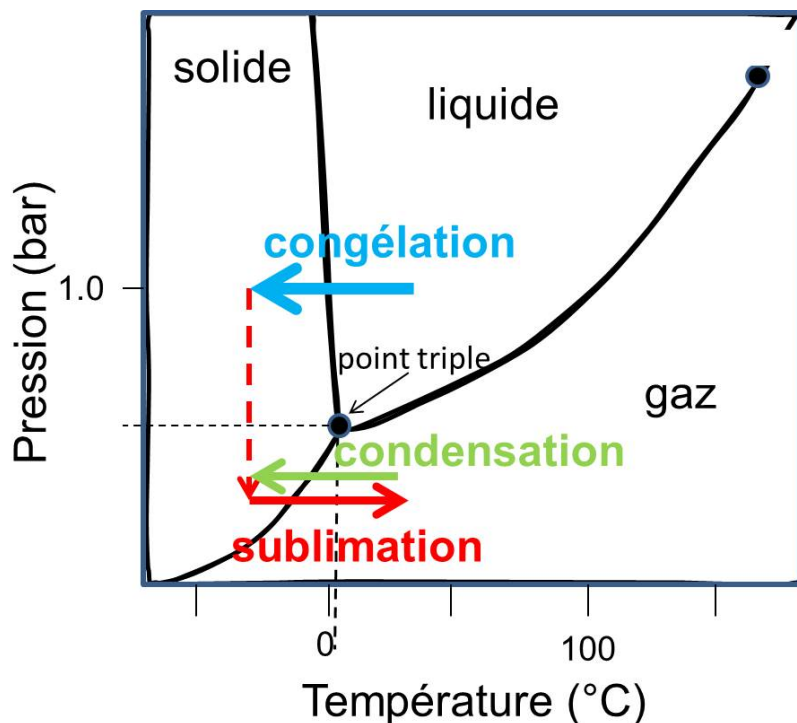


FIGURE 1.6 – Diagramme d'état de l'eau pure montrant le chemin suivi lors des transformations de phases subies par l'eau lors d'un cycle de lyophilisation : congélation (première étape), sublimation et condensation pendant l'étape de séchage primaire.

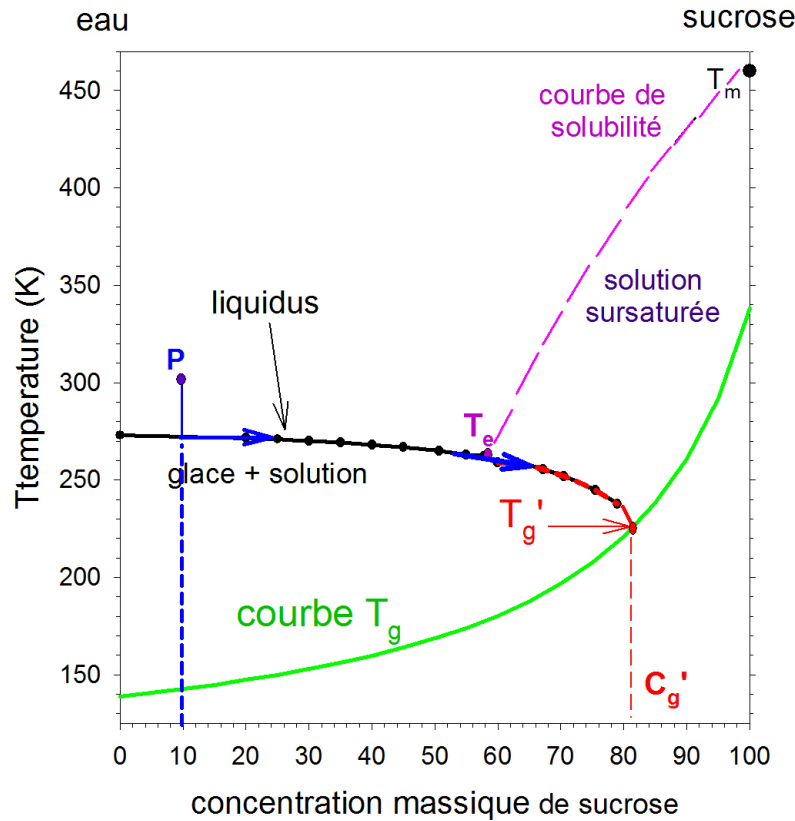


FIGURE 1.7 – *Chemin suivi lors de la congélation d'une solution sucrose-eau, contenant 10 % de sucrose au départ à température ambiante (point P).*

sursaturée) a atteint sa composition limite, correspondant à une concentration de soluté C'_g et une température de transition vitreuse T'_g , l'étape de sublimation de la glace peut débuter à une température inférieure ou égale à T'_g . Si la température du produit à lyophiliser (T_P) est élevée au-dessus de T'_g , la glace fond modifiant la concentration de la solution sursaturée, et la mobilité moléculaire de celle-ci augmente considérablement. Ces changements peuvent engendrer des conséquences dommageables sur le lyophilisat, au niveau de son aspect physique (phénomène d'effondrement ou "collapse") et au niveau de la structure de la protéine (dénaturation) [8].

1.2.2 Description schématique d'un lyophilisateur

Un lyophilisateur (schématiquement décrit dans la figure 1.8) est généralement composé d'une chambre de séchage contenant le produit à lyophiliser, d'un condenseur (piège de la vapeur d'eau résultant de la sublimation de la glace) et d'un système de pompage. La chambre de séchage, conçue de manière à éviter les fuites d'air pour atteindre un niveau de vide acceptable, est constituée d'étagères sur lesquelles sont disposés les flacons contenant les formulations à lyophiliser. Elles sont creuses, afin de permettre la circulation d'un fluide cryogénique qui assure leur mise en température. Le condenseur peut être situé à l'intérieur ou à l'extérieur de la chambre de séchage. Il est généralement amené à des températures inférieures à $-50\text{ }^\circ\text{C}$, afin de servir de point froid pour piéger la vapeur d'eau. Le système de pompage est situé après le condenseur, et permet d'atteindre un

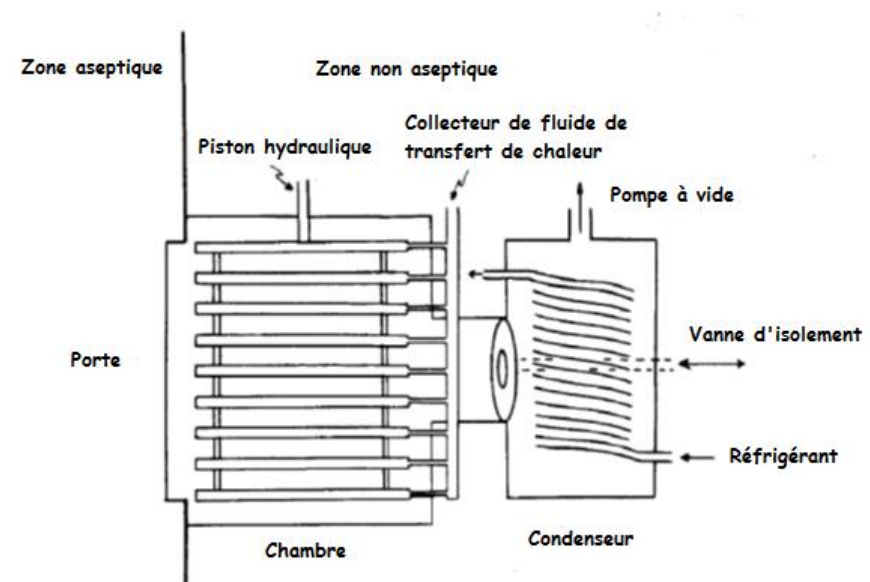


FIGURE 1.8 – Description schématique d'un lyophilisateur typiquement utilisé dans l'industrie pharmaceutique

vide de l'ordre de 15 à 25 μbar [9].

1.2.3 Mode opératoire et sources de dénaturation

Les paramètres opératoires sont choisis de manière à optimiser le cycle de lyophilisation, c'est-à-dire, principalement réduire la durée de la sublimation de la glace (deuxième étape), en évitant le phénomène de 'collapse' et en maintenant la structure de la protéine dans son état initial. La congélation est une étape qui influence directement la durée de la sublimation de la glace, dans la mesure où la taille et la forme des cristaux de glace reflèteront la structure poreuse de la couche du produit sec à travers laquelle la vapeur d'eau s'évacuera. De ce fait la nature aléatoire du phénomène de nucléation est un handicap majeur dans le contrôle de la première étape de la lyophilisation, qui conditionne le cycle entier. Il existe différentes méthodes permettant de contrôler la nucléation des cristaux de glace et de manipuler l'état congelé, dans le but d'obtenir une distribution homogène de cristaux de taille importante, favorisant une évacuation rapide de la vapeur d'eau. Ces méthodes, décrites dans la référence [9], consistent à maîtriser la vitesse de refroidissement, et effectuer des recuits de l'état congelé. Quelle que soit la méthode utilisée, l'opérateur doit déterminer deux paramètres qui sont la température et la durée de congélation. Pour éviter que le lyophilisat perde sa structure rigide et ne s'effondre en un amas coalescent, phénomène de "collapse", la température du produit ne doit pas être supérieure à une température T_C , température de "collapse". Cette température est liée à la composition de la formulation, et principalement au type d'agent bioprotecteur utilisé (disaccharides, polyols, polymères) caractérisé par sa valeur de T_g' . La température T_C est généralement de 2 degrés plus basse que T_g' . Le temps de congélation dépend à la fois du volume de remplissage des flacons et de la température des étagères qui assurent la mise en température du produit par transfert thermique. La congélation est source de nombreux

types de stress pour la protéine. La formation d'interfaces entre la glace et la solution sur-saturée, les variations de pH induites par la cristallisation des sels du mélange tampon et les fortes interactions protéine-protéine précurseur de phénomènes d'agrégation, sont des conséquences de la congélation. Lors de la congélation, la protéine est exposée au froid, qui est également une source de dénaturation importante. La stabilisation des protéines nécessite l'utilisation d'agents cryoprotecteurs. La réalisation de cette opération à une température sous T'_g , a pour conséquence de limiter la mobilité moléculaire de la protéine (piégée dans une matrice vitreuse) et donc de limiter le risque de dénaturation froide. Le séchage primaire correspond à la sublimation de la glace, et repose sur l'équilibre des flux [10] :

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt} \quad (1.2.1)$$

entre le flux de chaleur ($\frac{dQ}{dt}$) pénétrant dans le produit et la variation de chaleur accompagnant la sublimation, $\Delta H_s \frac{dm}{dt}$, où ΔH_s représente l'enthalpie de sublimation et $\frac{dm}{dt}$ la vitesse de sublimation. La vitesse de sublimation $\frac{dm}{dt}$ s'exprime en termes de résistances au flux de vapeur d'eau du produit congelé jusqu'au condenseur [10]. Cette grandeur est noté RFM, résistance au flux de matière. L'équation (1.2.2),

$$\frac{dm}{dt} \propto \frac{P_{glace} - P_{chambre}}{RFM} \quad (1.2.2)$$

montre que la vitesse de sublimation est proportionnelle à la différence entre la pression de la glace et la pression de la chambre de séchage. Cette différence de pression est appelée force motrice de sublimation. Cette étape peut être très longue (plusieurs jours) et donc très onéreuse si elle n'est pas optimisée. Le choix de deux paramètres opératoires, la température d'étagères ($T_{étag}$) et la pression de chambre ($P_{chambre}$) permettent l'optimisation de l'opération de sublimation de la glace. La force motrice de sublimation doit être la plus élevée possible, ce qui correspond à une pression de glace élevée, et une pression de chambre faible. Le diagramme d'états de l'eau (figure 1.6) montre clairement qu'augmenter la température favorise la sublimation. Cependant, une température d'étagères excessive risque d'élever la température du produit au-dessus de la température de collapse. La pression de chambre minimale des lyophilisateurs industriels varie généralement entre 50 et 200 μbar . De nombreux travaux [10, 11] ont été réalisés pour modéliser la cinétique de sublimation à partir de l'équation (1.2.1), et choisir au mieux les paramètres opératoires ($T_{étag}$, $P_{chambre}$). Le flux de chaleur des étagères au produit est donné par l'équation (1.2.3) :

$$\frac{dQ}{dT} = A_{fl} K_{fl} (T_{étag} - T_p) \quad (1.2.3)$$

où A_{fl} et K_{fl} représentent respectivement la section transverse et le coefficient de transfert thermique du flacon,

La considération des transferts thermiques montre clairement (équation 1.2.4) que les deux paramètres opératoires ($T_{étag}$, $P_{chambre}$) ont un effet corrélé sur la température

du produit.

$$A_{fl}K_{fl}(T_{étage} - T_P) = \Delta H_S \frac{(P_{glace} - P_{chambre})}{RFM} \quad (1.2.4)$$

La programmation de la température d'étagères devra donc être effectuée en assurant une marge de sécurité, de manière à ce que la température du produit ne s'élève pas au-dessus de T_C . Le troisième paramètre opératoire nécessaire à la programmation de l'étape de séchage primaire est la durée de celle-ci. Il est également important car un arrêt prématuré du séchage secondaire peut provoquer le collapse du lyophilisat, alors que maintenir le produit sous vide et à basse température représente un gaspillage d'énergie. Plusieurs méthodes existent pour déterminer la fin de l'opération de sublimation, basées sur différents types de mesures obtenues à l'aide de capteurs placés dans la chambre de séchage [9]. Le choix de la méthode dépend donc du type de lyophilisateur utilisé et de son équipement. La sublimation de la glace est une opération de déshydratation. Ce type de contrainte exercée sur des systèmes hydratés cristallins, engendre de manière générale une désorganisation structurale du réseau. L'évacuation de la glace peut donc être considérée comme une source possible de désorganisation structurale de la protéine, imposant l'utilisation d'agents lyoprotecteurs pour stabiliser la protéine. Les risques de dénaturation froide sont également existants, dans la couche de produit congelé, au cours de cette étape. Le séchage secondaire est la troisième et dernière étape du cycle de lyophilisation. Elle consiste à la désorption de l'eau résiduelle non congelée pendant la première étape du cycle. Cette eau résiduelle a deux origines possibles : (i) il s'agit de l'eau liée à la protéine, (ii) ou bien de l'eau constituant la matrice vitreuse de la solution (eau + agent bioprotecteur) sous T_g' . Cette opération est généralement effectuée sans modifier la pression de chambre en fin de séchage primaire et la température d'étagères est programmée à 35-50 °C. En dessous de ces températures, le séchage devient extrêmement long. Le degré d'hydratation résiduelle conditionne généralement la stabilité de la protéine durant le stockage. Compte tenu de son effet plastifiant, l'eau résiduelle favorise la mobilité moléculaire et donc le risque de dénaturation pendant le stockage. A l'inverse, une déshydratation intensive favorise aussi le risque de dénaturation.

1.3 Bioprotection

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les différentes étapes de la lyophilisation peuvent provoquer la dénaturation des protéines. Pour protéger une protéine lors de la lyophilisation, des bioprotectants peuvent être utilisés. Au cours des dernières années, l'intérêt pour le sujet de l'anhydrobiose a augmenté depuis que la compréhension des mécanismes de survie des organismes anhydrobiotiques peuvent permettre le développement de nouvelles méthodes de conservation et de stabilisation de matériaux biologiques telles que les protéines.

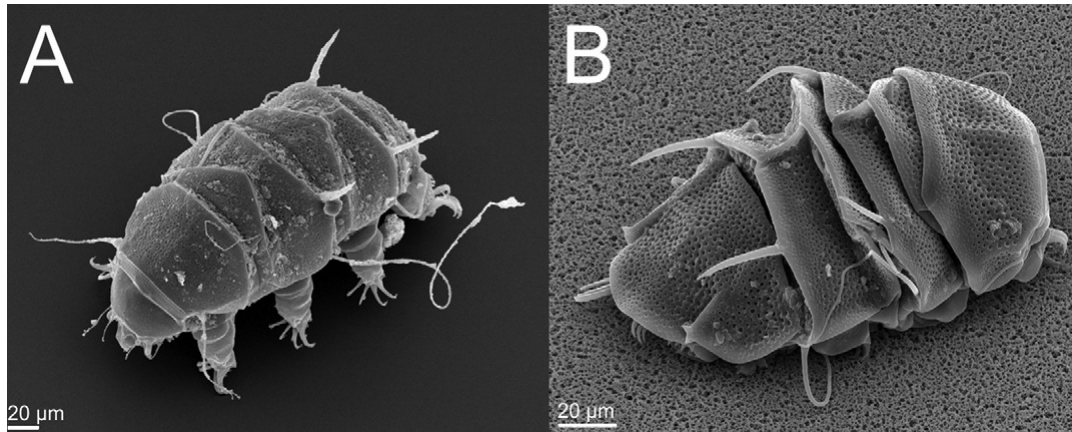


FIGURE 1.9 – Images du microscope électronique à balayage de l'*Echiniscus granulatus*. Photo A : état actif et photo B : état d'anhydrobiose [102]

1.3.1 L'anhydrobiose

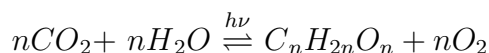
La cryptobiose est définie par Keilin (1959, [12]) comme étant un état métabolique de vie pris par un organisme en réponse à des conditions environnementales défavorables. L'anhydrobiose est induite par dessiccation et représente la forme la plus répandue de cryptobiose. Elle est définie comme un état extrêmement déshydraté (Figure 1.9) dans lequel les organismes ne présentent pas de signes de vie au niveau métabolique, mais conservent leur capacité de reprendre une vie après réhydratation [13, 14]. Puisque l'eau est l'élément fondamental de tous les organismes vivants, la déshydratation est l'un des facteurs de stress les plus importants pour la plupart des organismes. Le phénomène d'anhydrobiose a d'abord été décrit par Antoni Van Leeuwenhoek (1702) [15], qui a remarqué la renaissance de rotifères inactifs après l'entrée en contact avec l'eau. Les organismes anhydrobiotiques se trouvent parmi les organismes unicellulaires, les invertébrés et les plantes [14]. Parallèlement, de nombreux types d'organismes anhydrobiotiques accumulent des disaccharides non réducteurs, par exemple : le sucrose et le tréhalose [16, 17, 20]. Ces disaccharides sont supposés fournir une protection contre le stress de la déshydratation, et probablement aussi contre d'autres types de stress, tels que les basses températures, la congélation, l'oxydation et les rayonnements ionisants [18, 19].

Les organismes ont développé différents mécanismes pour faire face à une déshydratation. Les deux principaux types de tolérance sont définis en fonction du degré de déshydratation. Certains organismes développent une résistance à la déshydratation modérée où il n'y a plus d'eau volumique dans le cytoplasme ($0.3 \text{ g } H_2O/\text{g}$ de masse sèche) alors que d'autres, développent une résistance à la dessiccation où il n'y a plus d'eau d'hydratation [21].

1.3.2 Les sucres

Les carbohydrates sont des molécules organiques très largement répandues dans les principaux types cellulaires décrits : bactéries, cellules animales, cellules végétales. Les carbohydrates sont des molécules porteuses de nombreux groupes hydroxyles et auxquelles

correspond souvent une formule générale du type $C_x(H_2O)_y$. Ils résultent d'une réaction de photosynthèse correspondant à une oxydation du CO_2 par l'eau grâce à l'énergie apportée par les rayonnements du soleil en transformant l'eau et le CO_2 en matière organique (hydrate de carbone) :



Le terme *glucide* du grec *glukus*, signifiant doux, en raison de la saveur sucrée des carbohydrates, est le plus généralement utilisé [22].

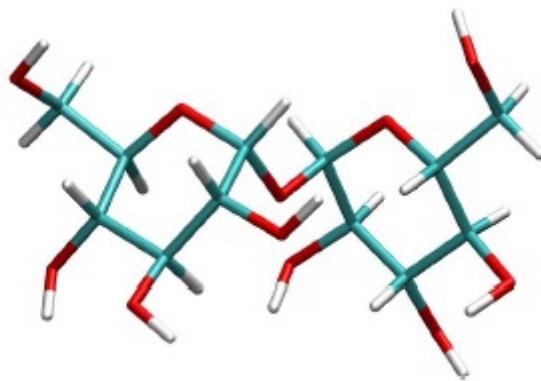
Les formes les plus simples des carbohydrates sont appelés monosaccharides ou sucres simples (e.g. glucose, fructose, galactose). Ce sont des monomères des glucides, souvent appelés les **oses**. Il s'agit de composés non ramifiés comportant un nombre d'atomes de carbone variant entre 3 et 7 et dont l'appellation dépend de ce nombre. Les monosaccharides existent sous deux formes anomériques α et β , dans lesquelles les groupes hydroxyles OH liés au carbone anomère se situent respectivement en-dessous et au-dessus du cycle. Un équilibre de la réaction de mutarotation entre les deux formes existe [6].

Les disaccharides ou les sucres sont des carbohydrates résultant de la condensation de deux molécules d'oses ou de dérivés d'oses. Cet accrochage passe par la formation d'une *liaison covalante*, la *liaison glycosidique*, réaction du carbone 1 d'un ose avec un groupe OH d'un autre ose avec élimination d'une molécule d'eau [22].

Le tréhalose, α,α (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside), est un disaccharide non réducteur, un dimère du glucose, dans lequel les deux unités de glucose sont liées en α par une liaison glycosidique entre les atomes de carbone anomères de chaque cycle (Figure 1.10). Sa masse molaire est de $342.29 \text{ g.mol}^{-1}$. Parmi les trois isomères possibles, α,α -, α,β - et β,β -, la seule forme naturelle est l'isomère α,α -. Du point de vue chimique la présence de résidus glucosidiques symétriquement liés et l'absence de groupes réducteurs en font une molécule très particulière. Parmi les sucres naturellement abondants, seul le sucrose présente les mêmes caractéristiques de stabilité chimique en solution en raison de l'absence de formes anomériques [23]. Le tréhalose est synthétisé en grande quantité dans de nombreux organismes anhydrobiotiques. Il a été émis l'hypothèse que le tréhalose est le principal bioprotecteur pour stabiliser les protéines, les acides nucléiques et les lipides membranaires pendant l'anhydrobiose [21].

1.3.3 Mécanismes

La régénération cellulaire a toujours été associée à la présence de tréhalose produit par les organismes avant l'entrée dans un état inerte. L'addition de tréhalose, à des cellules incapables de le produire spontanément, donne des résultats semblables. Cette observation implique un mécanisme de bioprotection qui rend le tréhalose si efficace. Le mécanisme d'action du tréhalose n'est toujours pas bien connu. Il existe plusieurs explications de ce mécanisme [24].

FIGURE 1.10 – *Représentation schématique du tréhalose [6]*

Hydratation préférentielle - interaction préférentielle

Deux modèles opposés sont généralement utilisés pour interpréter l'interaction entre les co-solvants et les protéines, et sont schématisés sur la figure 1.11. Dans un premier cas (schéma de gauche de la figure 1.11) la concentration des molécules de co-solvant dans l'eau est plus élevée au voisinage de la surface de la protéine que dans l'eau en grand volume, à l'intérieur d'une couche symbolisée par le trait pointillé. Ce modèle est souvent nommé « interaction préférentielle » (entre le soluté et la protéine), et s'adapte principalement aux dénaturants (urée, hydro chlorure de guanidine). Dans le second cas, opposé au premier et décrit sur le schéma de droite, les molécules d'eau sont en excès au voisinage de la protéine. Le modèle est appelé « hydratation préférentielle » ou « exclusion préférentielle » du co-solvant de la surface de la protéine. De nombreux sucres et polyols, ainsi que certains sels, sont reconnus être des agents stabilisants les protéines par exclusion préférentielle.

Dans ce cas, l'excès de molécules d'eau autour de la protéine contraint celle-ci à minimiser sa surface formant ainsi, un état plus compact. De ce fait, l'état déplié de la protéine devient thermodynamiquement moins favorable que l'état replié [6, 25, 26].

Effet destructurant

Les sucres sont considérés comme des agents formant de nombreuses liaisons H avec l'eau, déformant ainsi l'ordre local tétraédrique, par opposition à certains dénaturants (urée, hydro chlorure de guanidine,...) qui sont des agents destructeurs de liaisons H [27, 28, 29, 30, 31, 32]. Les deux effets « destructeur » et « destructurant » du réseau de liaisons H de l'eau ont pour conséquence de modifier l'ordre local de l'eau précurseur à longue portée de la glace cristalline hexagonale, inhibant la formation de cristaux de glace lorsque la température est abaissée. Cependant, il a été montré (expérimentalement par spectroscopie Raman [56]) que l'ajout de sucre dans l'eau rigidifiait le réseau de liaisons H de l'eau, et (par simulation de dynamique moléculaire [33]) augmentait la durée de vie des liaisons H entre molécules d'eau provoquant le ralentissement de la dynamique de l'eau. Ce ralentissement, lié à la formation de nombreuses liaisons H des

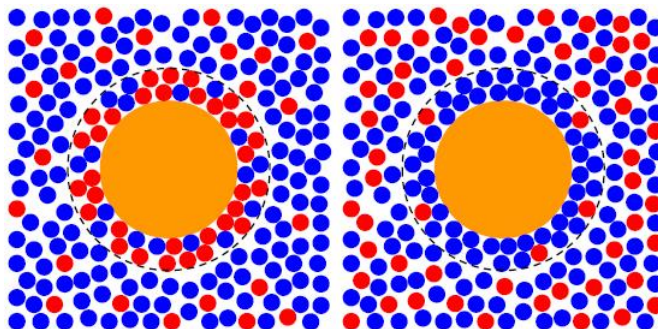


FIGURE 1.11 – Représentations schématiques de l'interaction préférentielle (à gauche) et de l'exclusion préférentielle (à droite). Dans le cas de l'interaction préférentielle, les solutés sont en concentration supérieure à la concentration volumique à la surface de la protéine, alors que c'est le contraire dans le cas de l'exclusion préférentielle. Les disques bleus représentent les molécules d'eau, ceux en rouge les molécules de solutés. Le grand cercle en orange symbolise une protéine globulaire et le cercle en tirets autour la membrane d'équilibre de dialyse [6].

sucres avec l'eau, est fortement amplifié à partir d'une concentration de 40% en masse de disaccharide par percolation du réseau de liaisons H des sucres. Ces phénomènes sont liés à la déformation du réseau de liaisons H de l'eau et permettent d'expliquer en partie les propriétés bioprotectrices des disaccharides [34, 35, 36, 37, 38, 39] aussi bien à basse qu'à haute température, en accord avec les données expérimentales [56]. La figure 1.12 représente l'effet de solutés sur le processus de nucléation de l'eau.

Vitrification

Green et Angell [42] ont relié les propriétés bioprotectrices aux valeurs de la température de transition vitreuse (T_g) des agents bioprotecteurs, sous entendant une relation entre l'effet anti-plastifiant des bioprotecteurs sur l'eau et leur efficacité bioprotectrice. Cette relation a été contredite par l'exemple du dextran [44] dont les valeurs du T_g (dépendant de son poids moléculaire) sont relativement hautes par rapport à celle de certains disaccharides (sucrose) plus efficace. Cependant l'effet anti-plastifiant des bioprotecteurs a pour conséquence de limiter la contribution des mouvements anharmoniques rapides, pris en compte dans le paramètre $\langle u^2 \rangle$ déterminé par diffusion neutronique. Il est généralement reconnu que ce type de mouvement est précurseur du dépliement des protéines [41], indiquant que l'effet anti-plastifiant du bioprotecteur a probablement une relation avec ses propriétés bioprotectrices. Cette relation pourrait être exacerbée à l'état sec, lorsque le mélange eau-bioprotecteur forme une matrice vitreuse au sein de laquelle les mouvements anharmoniques de la protéine sont très limités.

Substitution de l'eau d'hydratation

L'hypothèse d'une substitution de l'eau d'hydratation a été proposée par Crowe et al [45] après l'observation de l'interaction des sucres avec les têtes polaires des lipides constituant une membrane. Ils ont suggéré que le tréhalose forme des liaisons hydrogène,

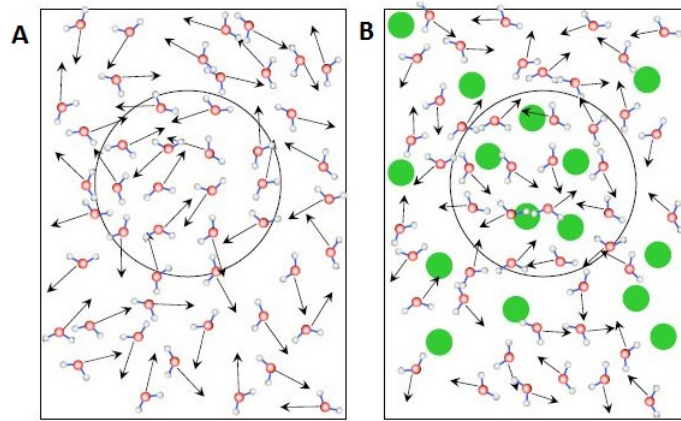


FIGURE 1.12 – Schéma indiquant l'effet de solutés (concentration 1 :4) sur le processus de nucléation de l'eau. Les flèches représentent la direction de diffusion des molécules d'eau et leur longueur indique la vitesse de diffusion. Etant donné que des solutés tels que les disaccharides diffusent beaucoup moins rapidement que l'eau, ils sont considérés immobiles sur ce schéma (aucune flèche n'est dessinée pour les solutés). Les cercles représentent le rayon critique de nucléation r_{nuc} . A) Dans l'eau pure, les centres de nucléation correspondent aux régions de structure tétraédrique. Si ce réseau est de taille supérieure à r_{nuc} , alors le cristal de glace croît. B) Les solutés augmentent la viscosité, de telle sorte que la diffusion de l'eau diminue (représentée par les plus petites flèches). De plus, une sphère de rayon r_{nuc} doit être exempte de molécules de soluté pour que le noyau critique de glace se forme. Par conséquent, plus la concentration en soluté augmente, plus la probabilité de nucléation est faible [6, 40].

par l'intermédiaire de ces groupements hydroxyles, avec les têtes polaires des molécules biologiques, se substituant ainsi aux molécules d'eau d'hydratation. Le tréhalose est en effet le seul disaccharide à ne pas présenter de liaisons hydrogène intramoléculaires lui permettant de se lier à un nombre plus important de molécules d'eau que ses congénères [6, 46]. Carpenter et al [43] ont montré que le seul modèle de la vitrification ne pouvait expliquer la stabilisation des protéines par les disaccharides lors de procédures de lyophilisation. Pour expliquer leurs résultats, ils ont proposé le modèle de « remplacement de l'eau », suivant lequel, les liaisons H entre protéine et eau seraient remplacées par des liaisons H entre protéine et sucre, lors de la procédure et formation de la glace ou d'élimination de l'eau liée à la protéine. La figure 1.13 représente schématiquement la dessiccation d'une membrane lipidique avec et sans tréhalose.

Confinement de l'eau d'hydratation

Emise par Belton et Gil [47], l'hypothèse de confinement de l'eau d'hydratation suggère que lors du séchage d'un mélange lysozyme-tréhalose-eau, l'eau se concentrerait à l'interface protéine/sucre et deviendrait confinée par la vitrification du tréhalose. Cette hypothèse est confortée par Lins et al [48], qui par la simulation de la dynamique moléculaire du mélange ternaire lysozyme-tréhalose-eau, ont montré que les molécules de tréhalose confinaient les molécules d'eau en s'agrégeant à la surface de la protéine. La figure 1.14 représente schématiquement les résultats de la simulation de Lins et al [48].

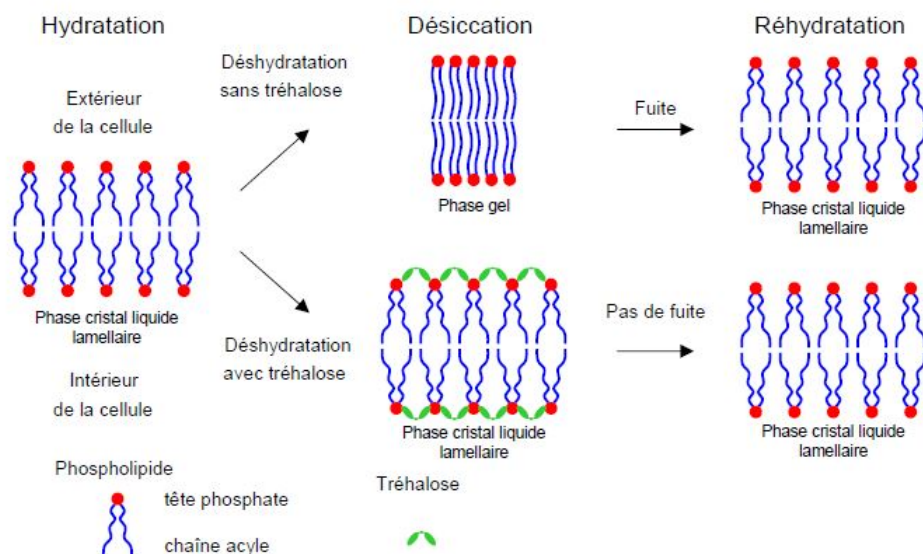


FIGURE 1.13 – Représentation schématique de la dessiccation d'une membrane lipidique avec et sans tréhalose [6]



FIGURE 1.14 – Modèle de l'interaction du tréhalose (à 18 % en poids) avec le lysozyme proposé par Lins et al. [48] à partir de résultats de simulation numérique de dynamique moléculaire. Le tréhalose initialement réparti de manière homogène s'agrège à proximité de la surface de la protéine, et piège son eau d'hydratation [6].

Chapitre 2

Spectroscopie Raman des systèmes moléculaires et biomoléculaires

2.1 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman permet d'étudier la réponse vibrationnelle de systèmes moléculaires et de solides cristallisés et amorphes par la mesure de la lumière diffusée, après excitation avec un rayonnement laser monochromatique à une longueur d'onde spécifique. Les longueurs d'onde diffusées par les molécules constituant le matériau constituent un spectre unique pour la structure moléculaire du matériau analysé. Les bandes de vibration sont caractéristiques des différents groupes moléculaires structuraux du matériau. La spectroscopie Raman est une technique très sensible, non destructive, pour analyser la conformation de molécules organiques ainsi que leur association via les liaisons H. La spectroscopie Raman est reconnue être une sonde structurale indirecte de l'ordre local (via la largeur des modes internes) jusqu'à l'ordre à longue portée (via l'étude des modes de réseau)

déterminer la structure moléculaire et leurs liaisons dans un matériau quelconque.

2.1.1 Principe de l'effet Raman

L'effet Raman fut découvert simultanément en 1928 par Raman et Krishnan lors de l'étude de la diffusion de la lumière par les liquides et par Landsberg et Mandelstam dans des travaux sur les solides. Raman en fut récompensé par le prix Nobel en 1930. Cet effet consiste en l'existence d'un glissement de fréquences par rapport au faisceau incident dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique. Ce spectre de très faible intensité est difficile à observer à côté de la lumière diffusée sans changement de fréquence. Il est caractéristique de l'échantillon étudié et lié aux vibrations des édifices atomiques constituant l'échantillon analysé [49].

Quand un liquide transparent, un gaz ou un cristal est éclairé par un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde ν_0 , une grande partie de la lumière incidente est transmise sans modification. Les photons conservent la même énergie et par

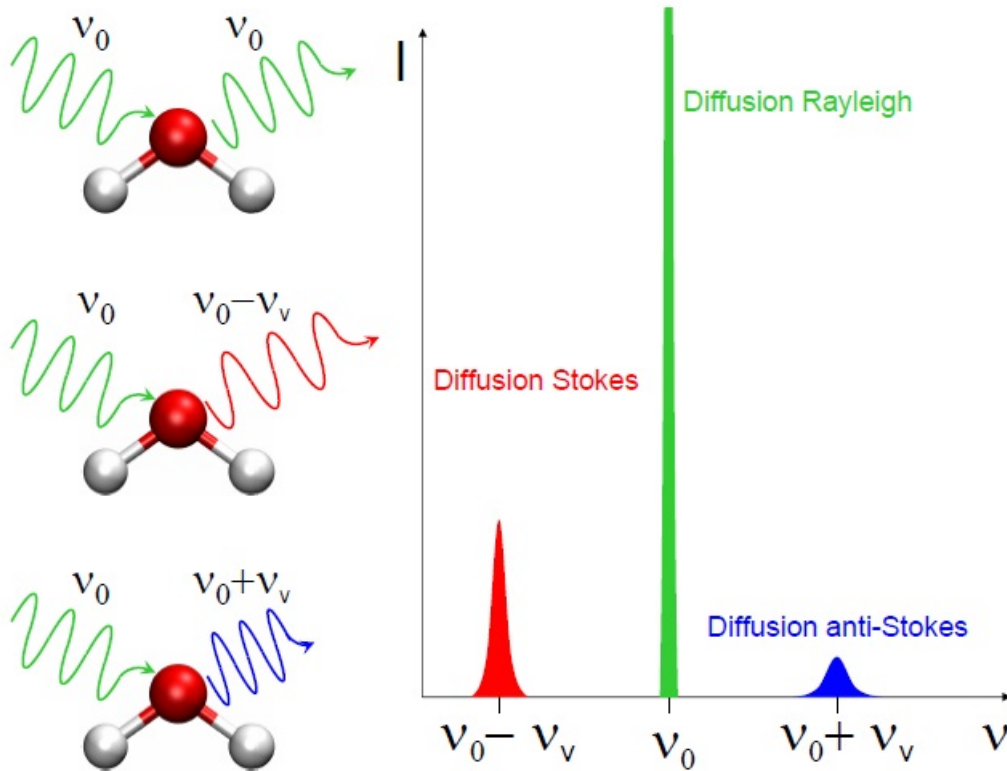


FIGURE 2.1 – Représentation schématique de la diffusion d’un photon incident de fréquence ν_0 par une molécule d’eau. Dans la plupart des cas, le photon diffusé conserve une fréquence identique à celle du photon incident (diffusion élastique ou Rayleigh). Cependant, en raison des mouvements de vibration intra- ou intermoléculaire, une petite fraction des photons incidents est diffusée à une fréquence $\nu_0 - \nu_v$ inférieure à ν_0 (diffusion Stokes) ou à une fréquence $\nu_0 + \nu_v$ supérieure à ν_0 (diffusion anti-Stokes). L’intensité de la diffusion Rayleigh est beaucoup plus élevée que celle des diffusions Stokes et anti-Stokes [6]

conséquent la même longueur d’onde que les photons incidents. On dit alors qu’ils sont diffusés de façon élastique (diffusion Rayleigh). Une partie de la lumière est dispersée et réfléchiée à une énergie différente. Si le photon incident est diffusé avec une fréquence inférieure à ν_0 le phénomène est appelé diffusion Stokes. A l’inverse si le photon incident est diffusé avec une fréquence supérieure à ν_0 , on parle alors d’une diffusion anti-Stokes. La figure 2.1 représente les différents types de diffusion Raman [50].

L’effet Raman étant relatif à une interaction d’un rayonnement électromagnétique et de matière, peut être traité de façon classique ou quantique.

Traitement Classique

Sous l’effet du champ électrique \mathbf{E} , l’irradiation d’un milieu transparent permet d’induire un moment dipolaire électrique induit \mathbf{P} [49] :

$$\vec{P} = \tilde{\alpha}\vec{E} \quad (2.1.1)$$

où $\tilde{\alpha}$ est le tenseur de polarisation pour l'ensemble des molécules, représenté par une matrice d'ordre 3 symétrique :

$$\tilde{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.1.2)$$

Un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde ν_0 présente un champ électrique \mathbf{E} de :

$$\vec{E}_i(t) = \vec{E}_{0i} \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.1.3)$$

Lorsqu'une molécule vibre à la fréquence ν_ν et que cette vibration de coordonnée normale Q fait intervenir une variation d'un élément α_{ij} du tenseur de polarisation $\tilde{\alpha}$, nous pouvons écrire que :

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 \quad (2.1.4)$$

Avec $Q = Q_0 \cos(2\pi\nu_\nu t)$

Le champ électrique diffusé E_{Diff} , proportionnel à \mathbf{P} peut s'écrire sous forme d'une somme de deux termes :

$$E_{Diff} \sim P = (\alpha_{ij})_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_\nu) + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_\nu)] \quad (2.1.5)$$

L'équation (2.1.5) montre que le champs électrique diffusé E_{Diff} , proportionnel à \mathbf{P} est composé de deux termes :

- Un terme en $\cos(2\pi\nu_0 t)$ qui correspond à une diffusion sans changement de fréquence appelée diffusion Rayleigh ou diffusion élastique.
- Un second terme composé d'un produit de deux fonctions sinusoïdales de fréquences différentes $(\nu_0 + \nu_\nu)$ et $(\nu_0 - \nu_\nu)$ et indique un changement de fréquence de la longueur d'onde de diffusion. Cette dernière est appelée diffusion ou effet Raman respectivement anti-Stokes (fréquence $(\nu_0 + \nu_\nu)$) et Stokes (fréquence $(\nu_0 - \nu_\nu)$).

L'effet Raman ne peut avoir lieu que si la dérivée de la composante α_{ij} du tenseur de la polarisation par rapport aux coordonnées normales Q est non nulle, c'est-à-dire uniquement pour les mouvements donnant lieu à une variation de la polarisabilité de la molécule :

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0 \neq 0 \quad (2.1.6)$$

Par exemple, la figure 2.2, représente les modes normaux de vibration d'une molécule d'eau isolée et les fréquences associées.

Traitement quantique

Le traitement classique ne permet pas de reproduire les intensités relatives des raies Stokes et anti-Stokes que seul le traitement quantique permet d'obtenir [49].

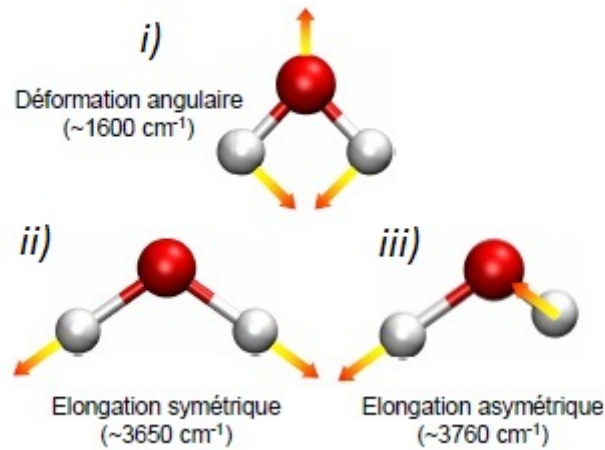


FIGURE 2.2 – Modes normaux de vibration de l'eau isolée [6]. Ces modes résultent de (i) la déformation angulaire de l'angle de valence H-O-H, (ii) l'élongation symétrique des liaisons OH, et (iii) l'élongation asymétrique des liaisons OH. Ces modes sont modifiés par la présence de liaisons H en phase condensée .

Selon les principes de la mécanique quantique, un rayonnement est absorbé ou émis par un système moléculaire à la suite d'une transition vers le haut ou vers le bas entre deux niveaux d'énergie. Le rayonnement absorbé ou émis est également quantifié, avec l'énergie associée aux photons discrets qui peuvent être considérés comme des ondes électromagnétiques. La perte ou le gain d'énergie par la molécule, E_{photon} , est équivalente à l'énergie d'un rayonnement électromagnétique émis ou absorbé. Cette énergie est proportionnelle à la fréquence ou au nombre d'onde du rayonnement .

$$E_{\text{photon}} = h\nu \quad (2.1.7)$$

où h est la constante de Plank et ν la fréquence.

L'interaction entre un photon d'énergie $h\nu$ et une molécule dans un niveau d'énergie donné peut donner naissance à différents phénomènes représentés sur la figure 2.3 :

- L'absorption infrarouge
- La diffusion Rayleigh
- La diffusion Raman Stokes
- La diffusion Raman anti-Stokes
- La fluorescence

Si la fréquence d'énergie du photon incident ν_0 est de l'ordre de ν_v ($\nu_0 \approx \nu_v$), alors la transition la plus probable est la transition $v \rightarrow v + 1$. C'est le phénomène d'absorption infrarouge. Si la fréquence d'énergie du photon incident ν_0 est supérieure à ν_v ($\nu_0 > \nu_v$), l'excitation par le photon d'énergie $h\nu$ fait transiter la molécule dans un état virtuel et redescendre sur un niveau réel. On montre que seuls les niveaux $v - 1$, v et $v + 1$ sont possibles, ce qui conduit à une diffusion de photons d'énergie [51] :

- $h\nu$ correspondant à une diffusion Rayleigh,
- $h(\nu - \nu_v)$ correspondant à une diffusion Raman Stokes,

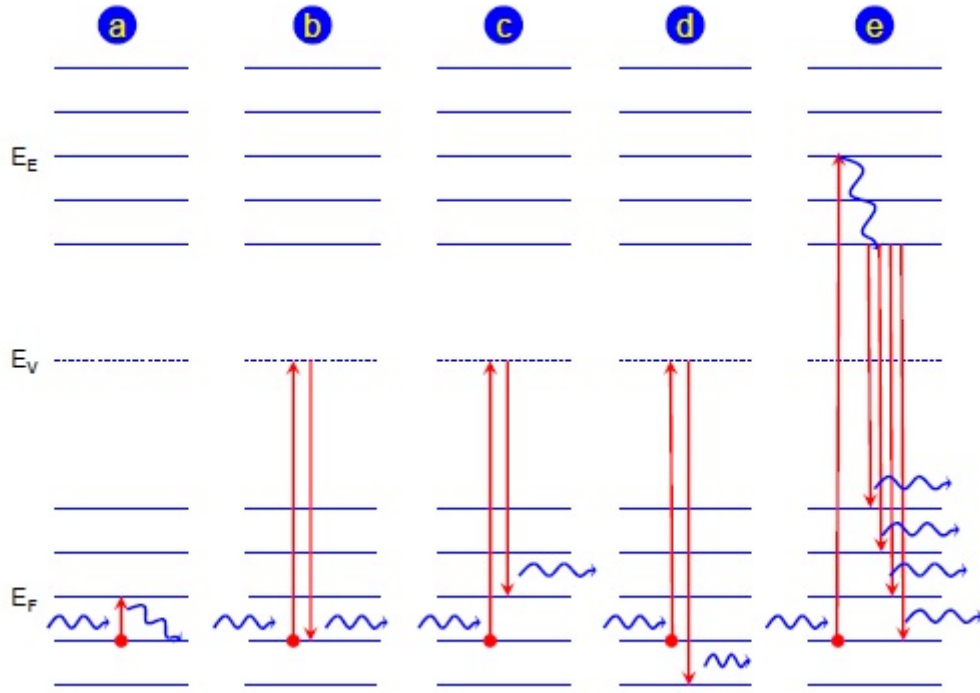


FIGURE 2.3 – Représentation schématique de différentes transitions entre niveaux d'énergie d'une molécule donnée. Les états fondamentaux, virtuel et excité sont désignés respectivement par E_F , E_V , et E_E . (a) Absorption infrarouge, (b) Diffusion Rayleigh, (c) Diffusion Stokes, (d) Diffusion anti-Stokes, (e) Fluorescence [6].

– $h(\nu + \nu_v)$ correspondant à une diffusion Raman anti-Stokes.

La diffusion Rayleigh est la plus probable, alors que les diffusions Stokes et anti-Stokes sont très peu favorisées. À une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'un ensemble de molécules obéit à une distribution de Maxwell-Boltzmann et seules celles se trouvant dans un état excité pourront donner une transition anti-Stokes de type $v \rightarrow v - 1$. Cela explique que expérimentalement les raies Stokes sont plus intenses que les raies anti-Stokes.

Le rapport des intensités des raies Stokes I_S et anti-Stokes I_{AS} est donné par l'équation [49] :

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(\frac{-h\nu_v}{k_B T} \right) \quad (2.1.8)$$

où k_B correspond à la constante de Boltzmann ($=1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T à la température thermodynamique et ν_0 à la fréquence de l'onde excitatrice.

L'intensité du spectre Raman Stokes est proportionnelle à la quantité :

$$I_{Raman} \propto N I_0 [n(\nu) + 1] (\nu_0 - \nu_i)^4 \left[\vec{e}_f \left(\frac{\partial \bar{a}}{\partial q_i} \right) - \vec{e}_j \right]^2 \quad (2.1.9)$$

Où N est le nombre de molécules.

$n(\nu) = [1 - \exp(h\nu/kT)]^{-1}$ est le facteur de Bose-Einstein, a une contribution si-

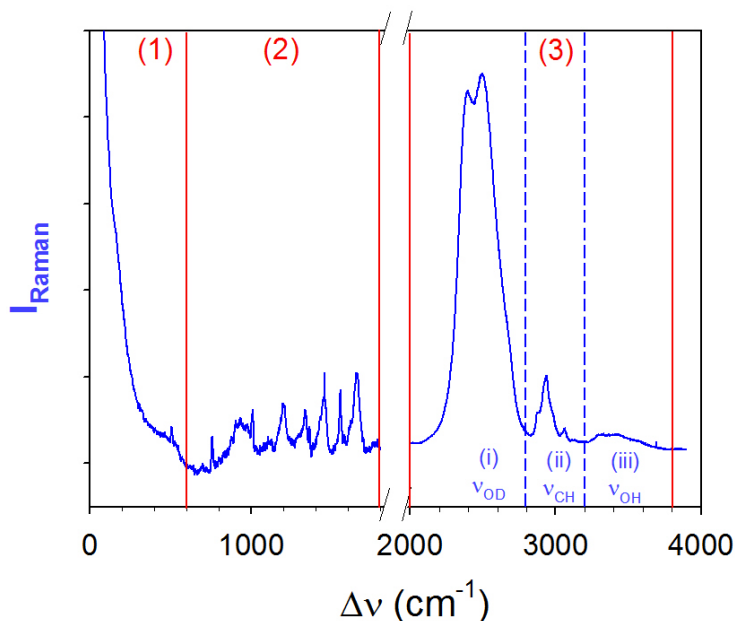


FIGURE 2.4 – Spectre Raman du lysozyme dissous dans l'eau lourde (concentration massique 10%) à température ambiante

gnificative sur l'intensité pour des valeurs de ν inférieures à 100 cm^{-1} , \bar{a} le tenseur de polarisabilité correspondant à la vibration (q_i, ν_i) et (\vec{e}_J) , (\vec{e}_f) sont les vecteurs unitaires du champ électrique incident et diffusé.

2.2 Traitement du spectre Raman d'une solution aqueuse de protéine

Le spectre complet d'une solution de lysozyme dissous dans l'eau lourde, est représenté sur la figure 2.4. Il peut être décomposé en trois parties ; (1) le domaine basse-fréquence allant de 10 à $250 - 300 \text{ cm}^{-1}$, (2) le domaine de fréquence distinctif de la conformation moléculaire du système étudié (molecular fingerprint region) entre 500 et 1800 cm^{-1} , (3) et la région des modes de vibration d'étirement des liaisons O - D, C - H, et O - H, entre 2000 et 3800 cm^{-1} .

2.2.1 Spectre Raman basse fréquence ($0 - 500 \text{ cm}^{-1}$)

Le spectre basse fréquence d'une solution aqueuse est typique d'un système moléculaire désordonné. Il est caractérisé par le chevauchement des mouvements relaxationnels de très large amplitude (anharmoniques) et des mouvements vibrationnels qui ont généralement un comportement quasi-harmonique. L'intensité Raman (I_{Raman}) est d'abord transformée en intensité réduite (I_r) par correction du facteur de Bose-Einstein, ce qui a pour conséquence de corriger le profil du spectre déformé par l'effet de la température.

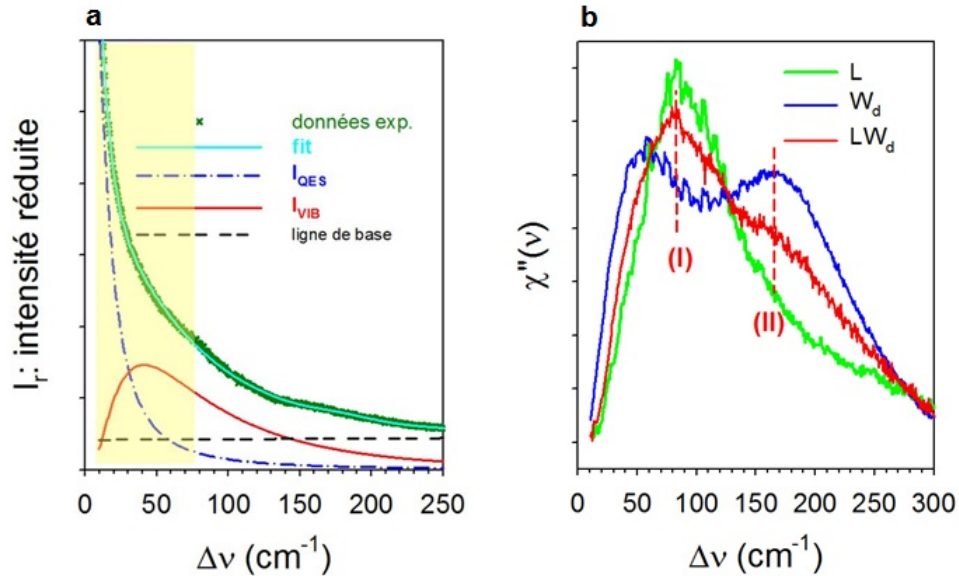


FIGURE 2.5 – Analyse du spectre basse fréquence de la solution aqueuse de lysozyme (LW_d) : a) méthode d'ajustement de l'intensité réduite pour séparer la contribution vibrationnelle de la composante relaxationnelle; la zone en jaune correspond au domaine où les contributions relaxationnelles et vibrationnelles se chevauchent. b) représentation et interprétation de la susceptibilité Raman ($\chi''(\nu)$) de la solution (LW_d), par comparaison avec les spectres de l'eau lourde (W_d) et du lysozyme à l'état sec (L).

$$I_r = I_{Raman}/[n(\nu) + 1] \quad (2.2.1)$$

La procédure d'ajustement décrite sur la figure 2.5a permet de séparer les deux contributions (relaxationnelle et vibrationnelle). Une fonction lorentzienne centrée en $\nu=0$ décrit généralement la contribution relaxationnelle dont l'intensité est notée I_{QES} . Cette intensité varie en fonction de la température, de la même manière que le déplacement quadratique moyen $\langle u^2 \rangle$, grandeur inversement proportionnelle à la viscosité du système, et le plus souvent déterminée par diffusion neutronique [52]. I_{QES} a été déterminée dans nos études par intégration entre 10 et 30 cm^{-1} de l'intensité réduite (I_r) renormée par l'intensité vibrationnelle (quasi indépendante de la température). La contribution vibrationnelle (I_{vib}) est représentée par une fonction lognormale [53]. L'intensité (I_{Vib}) est généralement transformée en susceptibilité Raman ($\chi''(\nu)$) selon l'équation :

$$\chi''(\nu) = I_{vib}(\nu) \cdot \nu = \frac{C(\nu)}{\nu} \cdot G(\nu) \quad (2.2.2)$$

$C(\nu)$ est le coefficient de couplage lumière – matière et $G(\nu)$ est la densité d'états de vibration ($VDOS$, vibrational density of states) généralement déterminée à partir d'expériences de diffusion neutronique. $G(\nu)$ correspond à la dynamique collective de petites molécules (considérées rigides) et apporte des informations sur l'organisation structurale à courte portée des molécules dans un état désordonné ou amorphe. Dans le cas des protéines, la flexibilité des systèmes moléculaires induit des mouvements internes à basse fréquence dont les bandes se superposent à celles des mouvements collectifs. Le coefficient

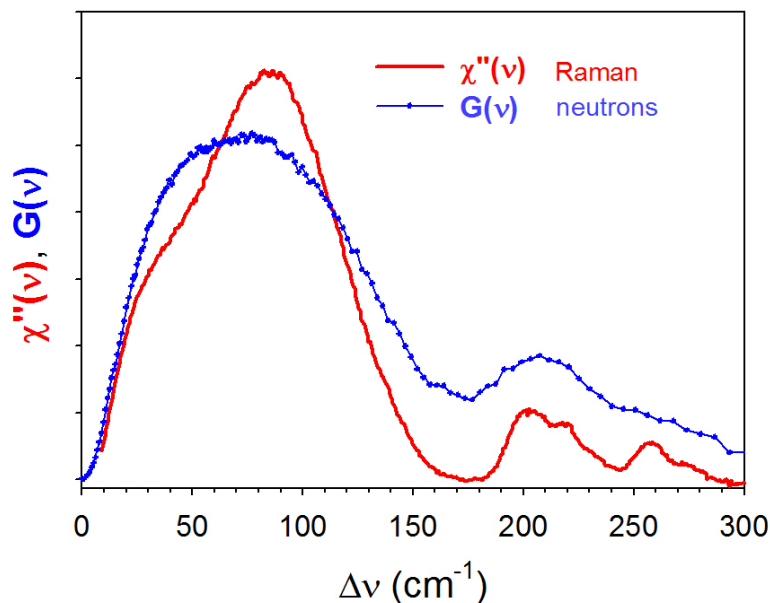


FIGURE 2.6 – Comparaison de la susceptibilité Raman et de la densité d'états de vibration, $G(\nu)$, obtenue par diffusion neutronique, dans l'état vitreux du Tri Phényle Phosphite (TPP) à $T = 190$ K.

$C(\nu)$ rend délicat le passage de la susceptibilité Raman à la densité d'états de vibration, dans la mesure où il dépend de ν . Plusieurs études ont montré une dépendance linéaire de C en fonction de ν dans le domaine très basse fréquence ($\nu < 50$ cm^{-1}), indiquant la relation de proportionnalité $\chi''(\nu) \propto G(\nu)$. Des études menées de manière conjointe par diffusion neutronique et spectroscopie Raman sur une petite molécule, le triphénylphosphite, [54] montrent clairement que le spectre de la susceptibilité Raman est fortement similaire à celui de $G(\nu)$, en présentant une meilleure résolution spectrale (figure 2.6). La représentation du spectre $\chi''(\nu)$ du lysozyme dissous dans l'eau lourde (LW_d), résultant de la transformation de I_{vib} par la relation (2.2.2) est tracée sur la figure 2.5b. Il est comparé à ceux de la protéine à l'état sec (L) et de l'eau lourde (W_d). Les spectres de LW_d et W_d sont composés de deux larges bandes. La bande à basse fréquence (50 cm^{-1}) dans le spectre de l'eau lourde est attribuée à l'effet de cage, et reflète les vibrations intermoléculaires entre une molécule et ses plus proches voisines. La bande observée à plus haute fréquence (200 cm^{-1}) dans le spectre de l'eau lourde est attribuée aux vibrations d'étirement des liaisons O–D intermoléculaires. Cette bande correspond à la bande (notée bande II) du spectre de LW_d . L'analyse de cette bande dans une solution LW_d permet donc de sonder l'organisation structurale du réseau de liaisons hydrogène dans l'eau lourde et son évolution en présence de la protéine, lors d'un processus de dénaturation. Le spectre du lysozyme à l'état sec montre que la bande basse fréquence de la solution LW_d (notée bande I) est principalement représentative de la dynamique de la protéine.

En résumé l'étude à basse fréquence d'une protéine en solution, permet d'analyser simultanément le déplacement quadratique moyen $\langle u^2 \rangle$ correspondant aux mouvements relaxationnels anaharmoniques, la dynamique vibrationnelle de la protéine et l'organisa-

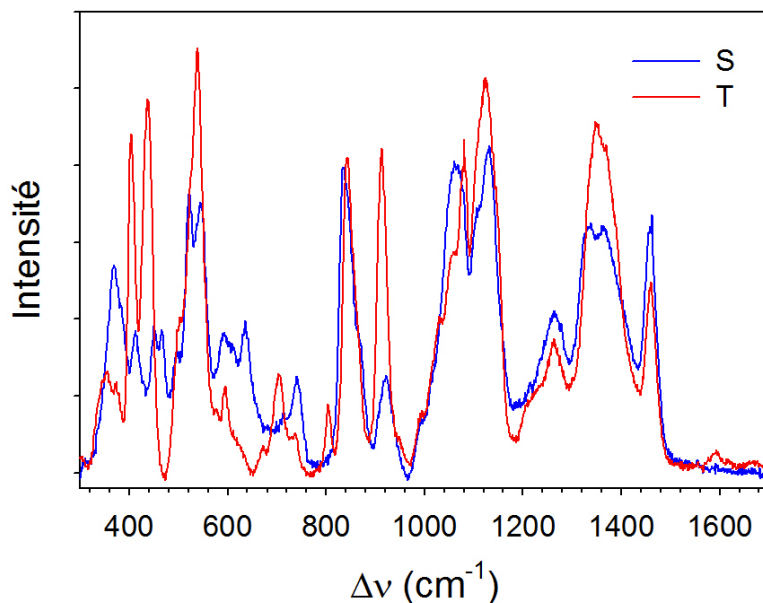


FIGURE 2.7 – Spectre du tréhalose et du sucrose à l'état amorphe, deux disaccharides de même formule chimique uniquement distinguable par leur conformation moléculaire.

tion structurale du solvant.

2.2.2 Analyse du spectre distinctif de la conformation moléculaire (500 – 1800 cm^{-1})

Ce spectre s'étend sur le domaine de fréquences allant de 500 à 1800 cm^{-1} . Il permet de suivre les changements de conformation d'une molécule au cours de transformations de phase, ou de discriminer deux molécules de même formule chimique, mais de conformations différentes, telles que le sucrose ou le tréhalose, comme le montre la figure 2.7. Cette figure montre une très forte similarité des spectres des deux composés dans leur état amorphe. Bien que dans ce cas les deux molécules puissent être considérées comme isolées, les fines différences observées entre les deux spectres sont principalement inhérentes à leur conformation moléculaire. La zone spectrale allant de 900 à 1800 cm^{-1} , est plus particulièrement utilisée pour déterminer la structure secondaire des protéines et analyser leur modification. La figure 2.8 présente les spectres de deux protéines, lysozyme et chymotrypsinogène, qui ont une structure secondaire majoritairement constituée, respectivement, d'hélices et de feuillets. L'analyse des différents types de bande amide (I, II, et III) et principalement la bande amide I permet de déterminer la composition en feuillets et/ou en hélices de la structure secondaire [55]. Les principaux mouvements de vibration impliqués dans les trois types de bandes amide, sont décrits sur la figure 2.9. L'interprétation des bandes de vibration dans les protéines est donnée dans le tableau 2.1.

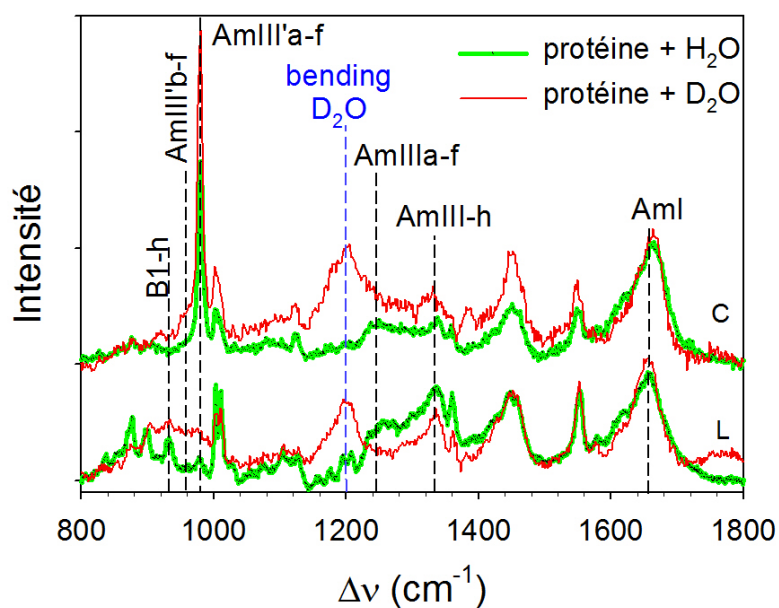


FIGURE 2.8 – Spectre de la région des bandes amides dans le cas de deux protéines dissoutes dans H_2O et D_2O ; chymotrypsinogène (C, principalement composé de feuillets β), et lysozyme (L, majoritairement composé d'hélices α).

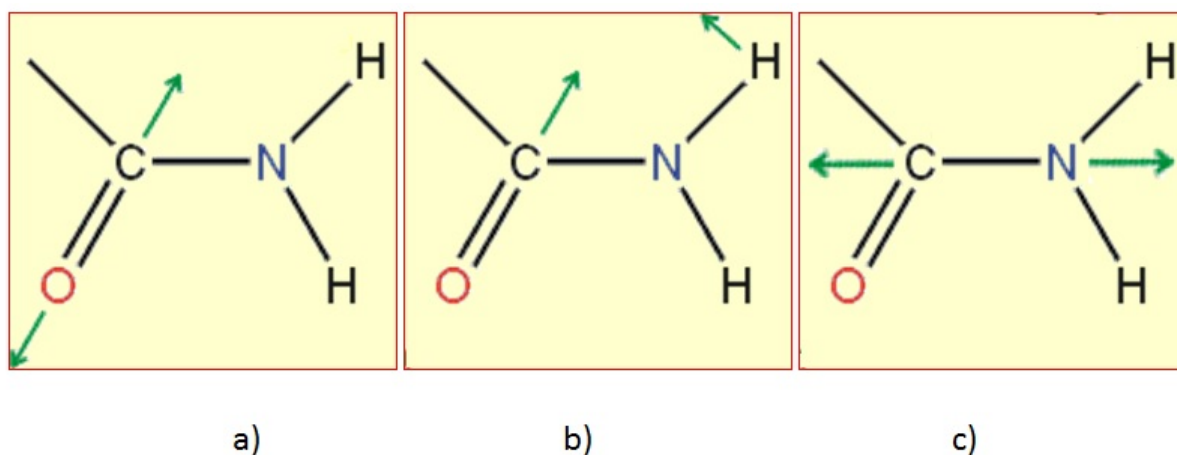


FIGURE 2.9 – Principaux mouvements impliqués dans les bandes amide I, II et III.

Fréquence (cm^{-1})	Nature des bandes	Notation
940	Squelette N-C α -C	B1-h
960	Mode d'étirement hélice- α	
960	Amide III' feuillet- β	AmIIIb'-f
980	de l'échange isotopique	
980	Amide III' feuillet- β	AmIII'a-f
980	de l'échange isotopique	
1240	Amide III' feuillet- β	AmIIIa-f
1340	Amide III (W7) hélice- α	AmIII-h
1650-1660	Amide I	AmI

TABLE 2.1 – Attribution des bandes de vibration dans le domaine spectral allant de 500 à 800 cm^{-1} .

Bande amide I (AmI)

Cette bande large et intense a généralement un maximum d'intensité situé entre 1600 et 1700 cm^{-1} . Elle est principalement due aux vibrations d'étirement des liaisons C = O du squelette de la protéine (70 – 80 %) (Figure 2.9a), et est de ce fait très sensible à la conformation de la protéine. Les 20 à 30 % restants sont dus aux vibrations d'étirement de la liaison C – N (Figure 2.9c) et au mouvement de déformation angulaire entre les liaisons C – N et N – H (Figure 2.9b). Cette dernière contribution, permet de détecter des échanges NH/ND entre la protéine et le solvant s'il est (partiellement ou complètement) deutéré. La figure 2.10a montre effectivement que sur un domaine spectral réduit (1500 – 1800 cm^{-1}),

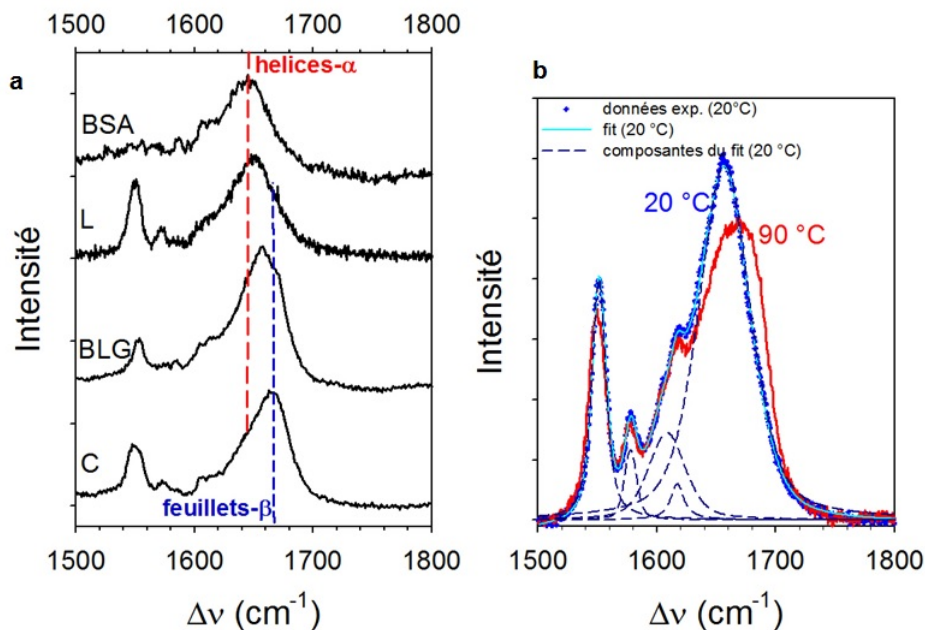


FIGURE 2.10 – Représentation de la région de la bande amide I a) pour différentes protéines en solution caractérisées par différentes structures secondaires, en partant d'une très forte proportion de feuillettes (chymotrypsinogène, C) vers une très forte proportion d'hélices (albumine, BSA) b) représentation de la région de la bande amide I du lysozyme en solution, à l'état natif (20 °C) et à l'état dénaturé (90 °C). La procédure d'ajustement permettant de déterminer la fréquence du maximum d'intensité, est représentée pour la protéine à l'état natif.

le profil de la bande amide I permet une discrimination fine de la structure secondaire de chaque protéine. Les profils des bandes AmI représentés sur cette figure correspondent à des protéines dissoutes dans l'eau lourde. L'utilisation de l'eau lourde comme solvant permet d'obtenir le spectre de la bande AmI non perturbé par la contribution du mode de « bending » intramoléculaire de l'eau normale se situant vers 1600 cm^{-1} . Le même mode de vibration dans l'eau lourde est détecté vers 1200 cm^{-1} , comme le montre la figure 2.8.

La figure 2.10b présente une comparaison des spectres de la bande AmI du lysozyme dans l'état natif et l'état dénaturé à haute température. Il est notable que l'état déplié se caractérise par rapport à l'état replié, par un glissement de la bande AmI vers les hautes fréquences. Ce phénomène s'explique par la rupture des liaisons H intramoléculaires (C = O . . . H) au sein des hélices, qui rend plus dur l'étirement de la liaison C = O. La procédure

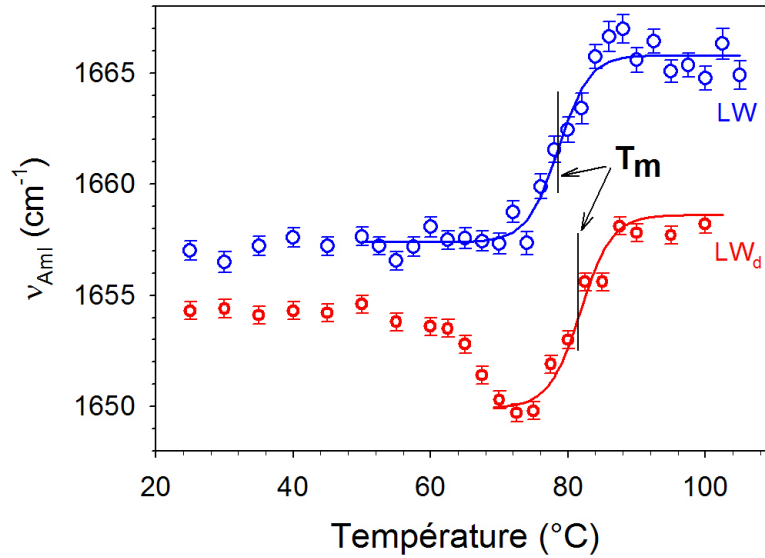


FIGURE 2.11 – *Courbes de dénaturation du lysozyme dissout dans l'eau (LW) et dans l'eau lourde (LW_d) obtenues par détermination de la fréquence de la bande AmI. Les sigmoïdes résultent de l'ajustement de la fonction (2.2.3) sur les fréquences expérimentales.*

d'ajustement du spectre de l'état natif, présenté sur la figure 2.10b, permet de tracer l'évolution de la fréquence en fonction de la bande AmI. La figure 2.11 présente l'évolution de la fréquence en fonction de la température, de la bande AmI du lysozyme dissout dans l'eau (LW) et dans l'eau lourde (LW_d). A température ambiante, la différence de fréquence de la bande AmI, déterminée entre les deux solutions est interprétée par les échanges NH/ND entre l'eau lourde et la surface de la protéine. Le second décalage de la bande AmI dans la solution d'eau lourde, observé vers 60 – 70 °C, correspond à une amplification des échanges isotopiques qui montre que des groupements non exposés au solvant, enfouis au sein de la protéine dans l'état natif, le sont devenus à cause de la pénétration du solvant à l'intérieur de la protéine. Cette pénétration, est possible uniquement dans une structure tertiaire plus flexible [56]. Cet état correspond à l'état appelé « molten globule » (MG), caractérisé par une structure tertiaire très flexible, dans laquelle la structure secondaire est intacte. La figure 2.11 montre que cet état peut être détecté par spectroscopie Raman, par utilisation de l'eau lourde comme solvant. La figure 2.11 montre également, que l'état « MG » caractérisé par une fréquence minimum de la bande AmI, est précurseur du dépliement de la structure secondaire, correspondant au glissement de la bande vers les hautes fréquences.

La partie de la courbe $\nu_{AmI}(T)$ représentant le dépliement de la structure secondaire peut être ajustée avec une fonction sigmoïdale d'expression :

$$\nu = \nu_D + [((\nu_N - \nu_D)) / ((1 + \exp(((T - T_m) / \Delta T)))] \quad (2.2.3)$$

Où ν_N et ν_D sont les fréquences de la bande AmI dans les états natif et dénaturé, T_m représente la température à demi-transformation et ΔT l'intervalle de température sur lequel s'étale la transformation. La transformation correspond ici au dépliement de la structure

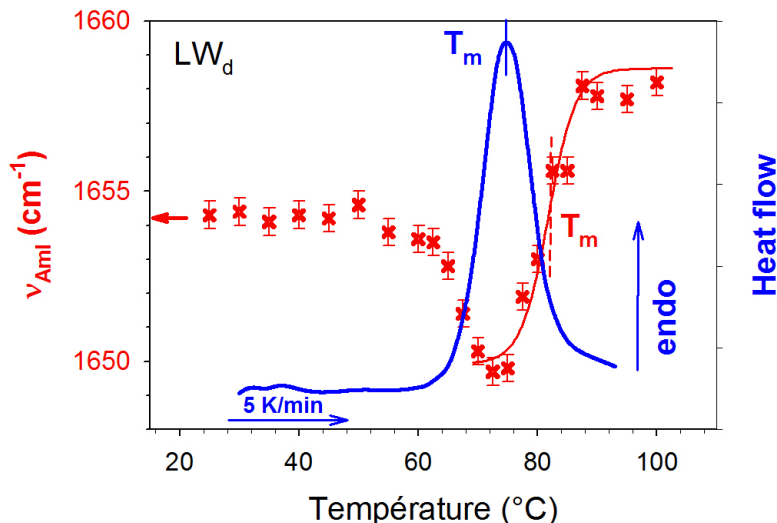


FIGURE 2.12 – Comparaison des courbes de dénaturation obtenues par spectroscopie Raman (bande AmI) et analyse enthalpique différentielle. Les températures T_m sont clairement différentes, et ne sont pas distinctives de la même transformation.

secondaire. La valeur de T_m de la solution LW_d est supérieure à celle déterminée dans la solution LW . Cet effet, généralement observé pour différentes protéines, a été attribué à une stabilité plus importante du réseau de liaisons hydrogène de l'eau lourde lorsque la température est augmentée. La température T_m déterminée par spectroscopie Raman n'a pas la même signification, et donc la même valeur, que celle déterminée par analyse calorimétrique, correspondant au maximum de l'endotherme de dénaturation chaude qui englobe les transformations des structures tertiaire et secondaire. La comparaison entre la courbe de dénaturation $\nu_{AmI}(T)$ obtenue par spectroscopie Raman et l'endotherme de dénaturation déterminée par analyse enthalpique différentielle d'une solution de lysozyme (LW_d) est présentée sur la figure 2.12. Elle montre que les transformations des structures tertiaire et secondaire ne sont discriminées que par une analyse Raman en utilisant l'eau lourde comme solvant. En utilisant un modèle de transformation à deux états natif (N) et dénaturé (D), il est possible de déterminer la portion de la branche parabolique de la courbe $\Delta G_{ND}(T)$ au voisinage de la température de dénaturation chaude T_H . La variation d'énergie libre s'exprime comme :

$$\Delta G_{ND} = -RT \ln K \quad (2.2.4)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température et $K = p_D/p_N$ la constante d'équilibre correspond au rapport des probabilités d'avoir la protéine dans l'état natif (p_N) ou dans l'état dénaturé (p_D). Ce rapport peut être exprimé en fonction de la fréquence de la bande AmI, dont la valeur est représentative du nombre de molécules dans l'état dénaturé et dans l'état natif. L'expression de K est donnée par :

$$K = p_D/p_N = (\nu_N - \nu)/(\nu - \nu_D) \quad (2.2.5)$$

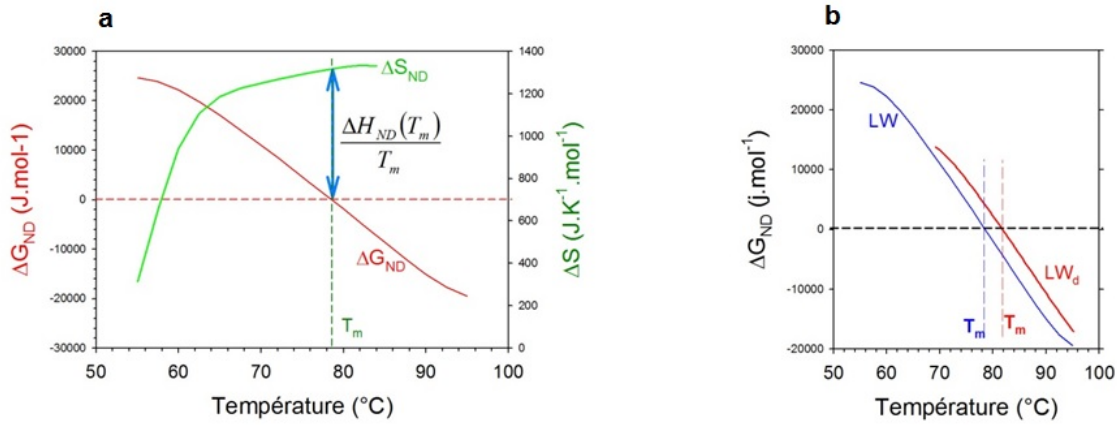


FIGURE 2.13 – Paramètres thermodynamiques de la dénaturation chaude du lysozyme, obtenus par l'analyse de la bande AmI. a) description des paramètres thermodynamiques du lysozyme en solution ; b) comparaison des évolutions de la variation d'énergie de Gibbs au voisinage de la température de dénaturation chaude (T_m) pour le lysozyme en solution dans l'eau normale (LW) et dans l'eau lourde (LW_d).

La variation d'énergie libre est tracée figure 2.13a pour une solution de lysozyme dans l'eau normale. La connaissance de la constante d'équilibre permet de déterminer ΔH_{ND} (à pression constante), d'après l'équation de Van't Hoff :

$$\partial(\ln K)/\partial T = \Delta H_{ND}/(RT^2) \quad (2.2.6)$$

Cette équation (2.2.6) donne ΔH_{ND} , et également ΔS_{ND} , en appliquant la relation :

$$\Delta G_{ND} = \Delta H_{ND} - T\Delta S_{ND} \quad (2.2.7)$$

Cette fonction (ΔS_{ND}) est également représentée sur la figure 2.13a. En se plaçant à la température T_m , ΔG_{ND} est nulle, et il est possible de retrouver la relation $\Delta H_{ND}(T_m) = T_m\Delta S_{ND}(T_m)$. La valeur de ΔH_{ND} à T_m , correspondant au dépliage du lysozyme en solution aqueuse est de 217 kJ.mol^{-1} . La fonction ΔG_{ND} a été également déterminée pour la dénaturation du lysozyme dans l'eau lourde. Elle est comparée à celle de la dénaturation du lysozyme dans l'eau normale (LW) sur la figure 2.13b. Cette figure montre que le lysozyme se dénature à plus haute température dans l'eau lourde, mais dans ce cas ΔG_{ND} est certainement plus faible à température ambiante, que lorsque la protéine est dissoute dans l'eau normale. La région de la bande amide I, peut également être utilisée pour quantifier le degré de dénaturation de la protéine. Deux méthodes ont été proposées pour évaluer quantitativement le degré de dénaturation d'une protéine, par comparaison des spectres des dérivée seconde lissés (infrarouge) de la bande AmI dans les états natif et dénaturé de la protéine. La première méthode proposée par Prestrelski et al [57] consiste à calculer le coefficient r , donné par :

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad (2.2.8)$$

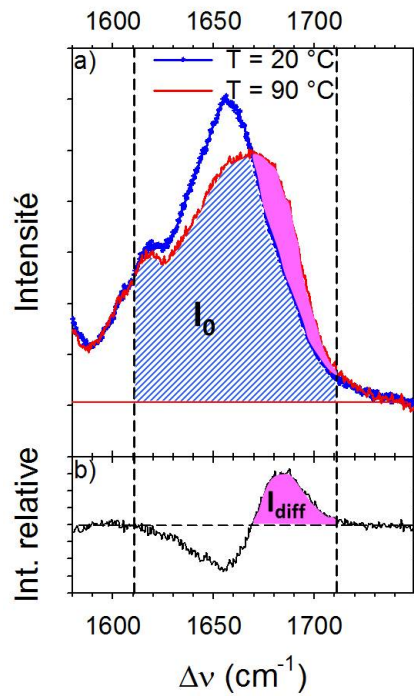


FIGURE 2.14 – description de la méthode de calcul du coefficient r , représentatif de la similarité des deux spectres correspondant aux états natif (à 20 °C) et dénaturé (à 90 °C) du lysozyme dissous dans l'eau. La zone spectrale (1610 – 1710 cm^{-1}) de la région de la bande AmI, dans laquelle l'analyse est effectuée est repérée par les traits pointillés. La zone de recouvrement des spectres (hachurée) d'intensité intégrée I_0 , est montrée en a), et la zone de non recouvrement (d'intensité I_{diff}) coloriée en rose en a), est également identifiable par différence de spectres, montrée en b).

où x_i et y_i représentent les valeurs des intensités des spectres de l'état natif et de l'état dénaturé, à la $i^{\text{ème}}$ position (fréquence) dans les deux spectres. Dans plusieurs cas, la valeur de r obtenue par cette méthode a été trouvée en désaccord avec un examen visuel des spectres. De ce fait Kendrick et al [58] ont proposé une seconde méthode pour quantifier le degré de similarité de deux spectres. Cette méthode consiste à comparer l'aire (I_0) correspondant au chevauchement de la bande AmI de deux spectres, à l'aire totale de la bande (I_{diff}). Nous avons appliqué cette dernière méthode, directement aux spectres Raman bruts (non dérivés, non lissés, mais renormés) des états natif et dénaturé d'une solution de lysozyme. Cette méthode, décrite sur la figure 2.14, conduit à la détermination du coefficient r :

$$r = I_0 / (I_0 + I_{diff}) \quad (2.2.9)$$

Ce coefficient indique un degré de similarité de deux spectres, et sera donc voisin de 1 pour deux spectres semblables. Plus sa valeur sera faible, plus le degré de dénaturation sera important. Il a été calculé afin de comparer le degré de dénaturation à haute température du lysozyme dissous dans des solutions d'eau et d'eau lourde. Les résultats sont reportés dans le tableau 2.2. Celui-ci montre que le lysozyme est plus stable dans l'eau lourde, mais que son degré de dénaturation est plus important.

Solution	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{ND}(T_m)(\text{kJmol}^{-1})$	r
<i>LW</i>	78.6 ± 0.2	217	0.897
<i>LW_d</i>	81.8 ± 0.2	454	0.804

TABLE 2.2 – *Comparaison des paramètres de dépliement de la structure secondaire, à haute température, du lysozyme dissous dans l'eau normale et dans l'eau lourde (température, enthalpie et degré de dénaturation).*

Bande amide II

Son maximum d'intensité se situe généralement entre 1500 et 1580 cm^{-1} , et est principalement dû au mouvement de déformation angulaire entre les liaisons C – N et N – H ($\sim 60\%$) (Figure 2.9b). Cette bande est donc très sensible aux échanges isotopiques NH/ND, et beaucoup moins à la conformation de la protéine. Cependant elle est principalement active en spectroscopie infrarouge, et beaucoup moins en spectroscopie Raman. Elle n'a donc pas été analysée lors de nos études.

Bandes amide III (AmIII)

Ces bandes de vibrations correspondent principalement à la combinaison des mouvements d'étirement de la liaison C–N (Figure 2.9c) et du mouvement de déformation de la liaison N–H (Figure 2.9b). Ces bandes généralement observées entre 1200 et 1400 cm^{-1} lorsque la protéine est dissoute dans l'eau (H_2O), sont de plus faible intensité que la bande amide I. Ceci provient généralement du fait que les différents types de conformation (hélices, feuillettes, ...) engendrent des bandes amide III résolues « isolées », et des contributions non résolues au spectre de la bande amide I. L'analyse des bandes amide III pourra donc être utilisée pour mieux comprendre la transformation du profil de la bande amide I (ou la transformation de la structure secondaire de la protéine) lors d'un processus de dénaturation. Les transformations du profil de la bande AmI sont effectivement difficilement interprétables en termes de modifications structurales, dans la mesure où ce profil est l'enveloppe des contributions non résolues des différentes entités structurales qui constituent la structure secondaire de la protéine. L'effet des échanges isotopiques correspond à une diminution de l'intensité des bandes AmIII au détriment de la croissance de nouvelles bandes AmIII' (Voir figure 2.8 et tableau 2.1), alors que la bande AmI subit un glissement vers les basses fréquences.

2.2.2.1 Analyse du spectre haute fréquence (2000 – 3800 cm^{-1})

Lorsque la protéine est dissoute dans l'eau lourde, le spectre de la solution aqueuse est composé de trois types de bandes de vibrations. (i) entre 2000 et 2800 cm^{-1} : les vibrations intramoléculaires d'étirement des liaisons O–D (ν_{OD}), dans le solvant principalement constitué d'eau lourde, (ii) entre 2800 et 3200 cm^{-1} : les vibrations intramoléculaires d'étirement des liaisons C–H (ν_{CH}) dans la protéine et le soluté lorsqu'il y en a un, et (iii) entre 3200 et 3800 cm^{-1} : les vibrations intramoléculaires d'étirement des liaisons O – H (ν_{OH}) dans la protéine (groupements OH non exposés au solvant) et dans le solvant ré-

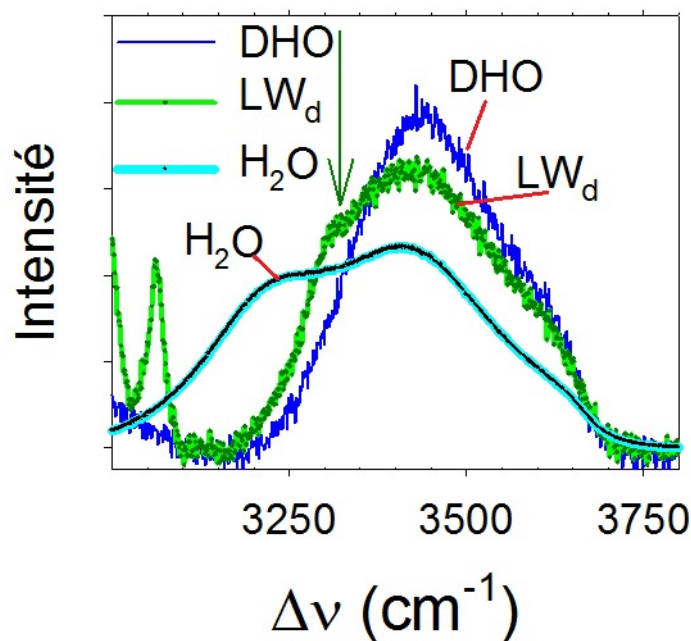


FIGURE 2.15 – Spectre des vibrations d'étirement des liaisons OH dans les solutions LW_d , DHO et H_2O

sultant des échanges isotopiques entre la surface de la protéine et le solvant. Le spectre de vibration d'étirement des liaisons OH, résultant principalement des échanges isotopiques entre la surface de la protéine et l'eau lourde, a été analysé dans l'objectif de comparer son intensité à celle du spectre d'étirement des liaisons OD, pour déterminer le nombre de molécules d'eau (nW) dans la première couche d'hydratation, directement en interaction avec la protéine [59]. Lors des échanges isotopiques il y a diffusion instantanée des protons au sein du solvant. Le spectre obtenu dans la solution de lysozyme (LW_d) est tracé sur la figure 2.15, et comparé à ceux de l'eau normale et d'une solution diluée ($\sim 3\%$) d'eau normale dans l'eau lourde notée DHO. Cette figure montre d'une part que le spectre de l'eau pure (H_2O) est beaucoup plus large que les deux autres, et d'autre part que le spectre de la solution de lysozyme (LW_d) est fort similaire à celui de la solution DHO. Le spectre de la solution DHO est généralement considéré comme un spectre ne contenant aucune contribution liée au couplage des étirements avec des vibrations intermoléculaires, et appelé de ce fait « uncoupled spectrum », contrairement à celui de l'eau pure (H_2O ou D_2O) qui présente des couplages entre les différents types de vibration basse et haute-fréquence impliquant les groupements OH. Le spectre de la solution diluée est composé de deux bandes, la bande basse-fréquence reflétant les relativement fortes liaisons H [60]. Le spectre de la protéine LW_d montre une composante basse-fréquence supplémentaire par rapport au spectre de DHO. L'évolution du spectre lors du chauffage de la solution, représentée figure 2.16a, montre que cette composante disparaît parallèlement au glissement de fréquence de la bande AmI, inhérente aux échanges isotopiques entre la surface de la protéine et l'eau lourde. Après soustraction de cette composante,

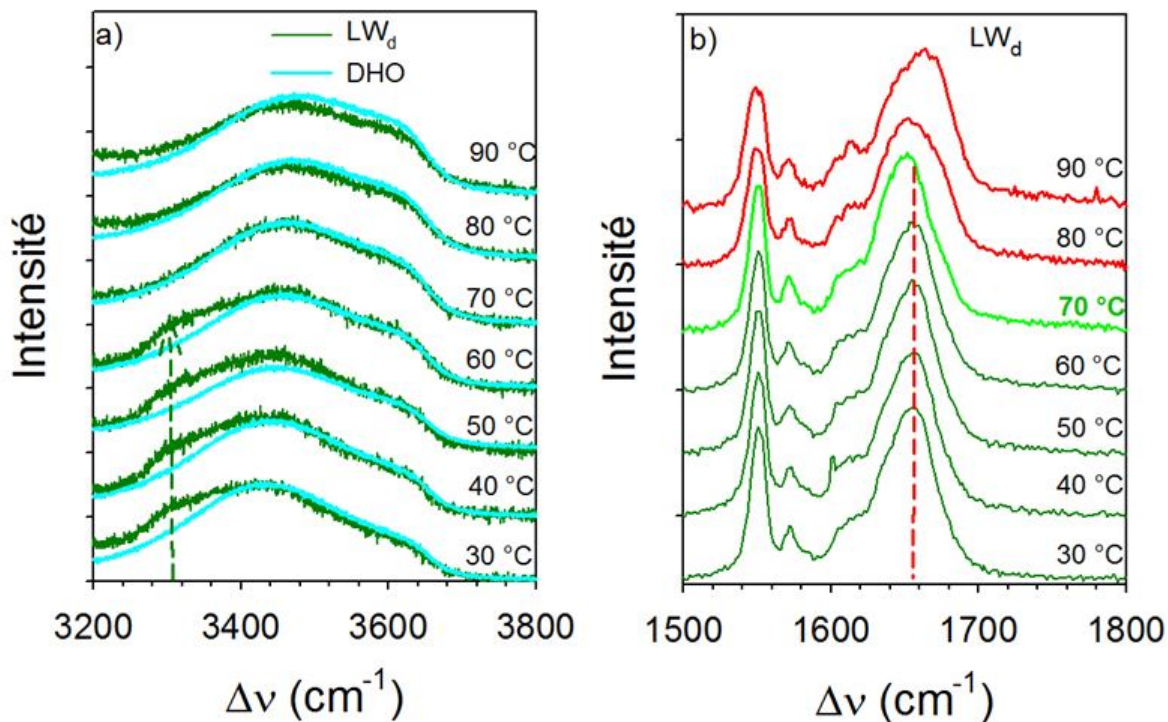


FIGURE 2.16 – Evolution en température a) du spectre d'étirement des liaisons OH dans les solutions LW_d et DHO, et b) de la bande AmI dans la solution LW_d

dont le profil est déterminé à partir d'une procédure d'affinement du spectre, le rapport d'intensité du spectre $\rho_{OH} = I_{OH}/I_{OD}$ permet d'obtenir le nombre de molécules d'eau en interaction avec la surface de la protéine, selon :

$$n_w = \frac{\rho_{OH}/cm_{LYS}}{M_{D_2O}/M_{LYS}} \quad (2.2.10)$$

Où ρ_{OH} correspond au rapport des intensités intégrées des bandes d'étirement des liaisons OH et OD I_{OH}/I_{OD} , cm_{LYS} est la concentration massique de lysozyme en solution, M_{D_2O} et M_{LYS} sont les masses molaires de l'eau lourde et du lysozyme. Un nombre de 165 (± 15) molécules d'eau lourde a été déterminé [59].

2.3 Etude des mécanismes de dénaturation par spectroscopie Raman

2.3.1 Apport de la spectroscopie Raman à l'étude des mécanismes de dénaturation et stabilisation des protéines

Les processus de dénaturation des protéines ont été étudiés dans l'équipe, par spectroscopie Raman en utilisant les méthodes d'analyse décrites dans les paragraphes précédents, et élaborées à partir des connaissances acquises dans le cadre d'études de transformations de phase de matériaux moléculaires. Le but était de mieux comprendre les

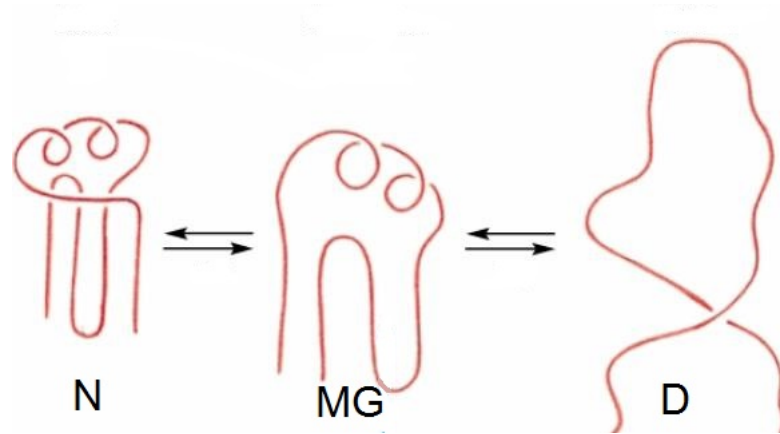


FIGURE 2.17 – Schéma descriptif du processus de dénaturation en deux étapes (N) \rightarrow (MG) \rightarrow (D)

mécanismes de stabilisation des protéines par des matériaux moléculaires formateurs de verre, les sucres en particulier. Un autre objectif a consisté à analyser la dénaturation froide, qui est considérée comme une source potentielle de dégradation des protéines pendant un cycle de lyophilisation. La dénaturation est également considérée comme l'obstacle majeur au développement de tout type de vie animale ou végétale [61]. La comparaison des processus de dénaturation, et des états dénaturés, à hautes et basses températures est toujours controversée et constitue un objectif de recherche fondamentale dans le domaine des sciences du vivant. L'analyse de la dénaturation froide est très largement perturbée par la formation de la glace qui masque les observations des phénomènes peu intenses liés à la dénaturation, et qui est également source de dénaturation. De ce fait des dénaturants sont utilisés afin d'abaisser la température de formation de la glace et de déstabiliser la protéine, donc d'augmenter la température de dénaturation froide. De ce fait, l'influence des dénaturants chimiques (urée et hydro chlorure de guanidine) a été étudiée sur le lysozyme et la β -lactoglobuline (BLG). La dénaturation froide a fait l'objet de très peu d'études (par rapport à la dénaturation chaude), et a été observée dans très peu de cas, en particulier sur BLG en présence d'urée. La contribution de la spectroscopie Raman à la compréhension du phénomène sera décrite succinctement.

2.3.2 Processus de dénaturation sous différents types de stress

Dénaturations chaude et sous pression du lysozyme

Comme montré précédemment (*Section 2.2.2*), l'utilisation de l'eau lourde comme solvant permet de mettre en évidence la transformation de la structure tertiaire, via la détection d'échanges isotopiques indiquant la pénétration du solvant au sein d'une structure tertiaire plus flexible. La dénaturation chaude a été décrite comme un processus à deux étapes : (i) une transformation de la structure tertiaire vers un état appelé « molten globule » (MG), correspondant à une structure tertiaire plus flexible au sein de laquelle la structure secondaire est intacte, (ii) et le dépliement de la structure secondaire (voir figure 2.17). Ce processus a été observé sur chaque protéine étudiée, c'est-à-dire L [63], BSA [64]

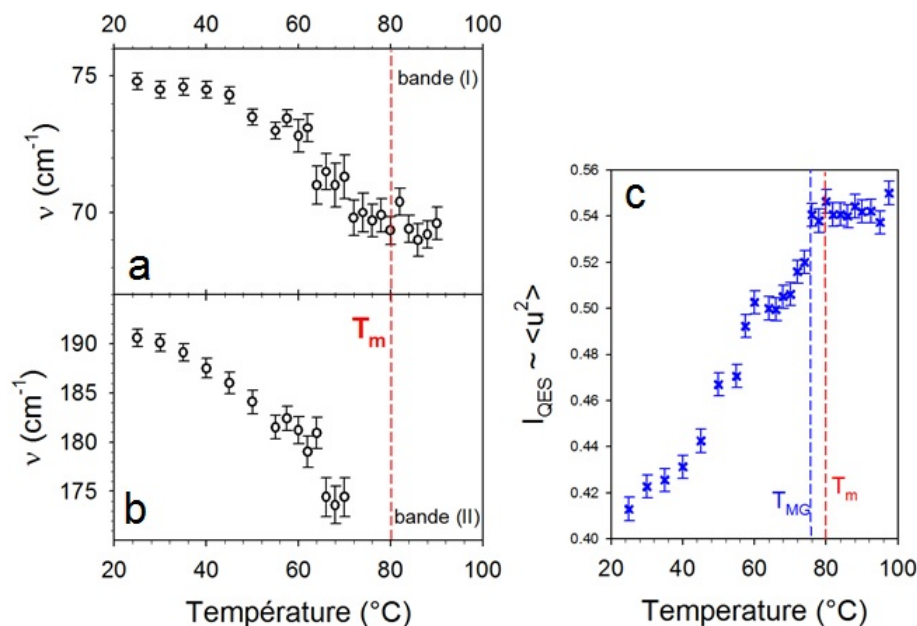


FIGURE 2.18 – Dépendance en température des mouvements : quasi-harmoniques a) de la protéine, b) du solvant et anharmoniques c) dans la solution LW ($L+H_2O$).

et BLG [65]. Il a été montré que ce changement de flexibilité résultait de la transformation du réseau de liaisons H. Cette transformation au sein du solvant est détectée à partir de l'analyse du spectre de la susceptibilité Raman, et principalement l'analyse de la bande (II) du spectre correspondant aux vibrations d'étirement des liaisons OH intermoléculaires. La figure 2.18 montre clairement le glissement de la bande (II) vers les basses fréquences. Ce comportement est accompagné d'un glissement de fréquence similaire de la bande (I) traduisant un amollissement de la dynamique de la protéine. Il est notable sur la figure 2.18, que les signatures indiquant un changement de régime des dynamiques de la protéine et du solvant ne correspondent pas à la température T_m de dépliement de la structure secondaire. Ces signatures correspondent à la transformation de l'état natif vers l'état « MG », montrant ainsi le rôle du réseau de liaisons H sur la stabilité de l'état natif de la protéine. La figure 2.18c montrant l'évolution en température de l'intensité quasi élastique, représentative des mouvements anharmoniques et proportionnelle au déplacement quadratique moyen, indique également un effet précurseur de ces mouvements, au dépliement de la structure secondaire du lysozyme. Le lysozyme est reconnu être une protéine relativement stable, et sa dénaturation n'a jamais été observée à basse température, même en présence de dénaturants chimiques. L'application d'une très forte pression conduit, par contre, à l'observation de sa dénaturation. Ce type de dénaturation est souvent considéré similaire à la dénaturation froide, et présente l'avantage de ne pas utiliser de dénaturants chimiques, responsables de transformation de l'état natif de la protéine. L'analyse de la dénaturation sous pression du lysozyme dilué dans l'eau lourde (concentration massique de 10 %) a été réalisée à partir d'investigations Raman [66] et d'expériences de diffusion neutronique inélastique [67]. Les expériences de spectroscopie Raman ont mis en évidence la dénaturation de la protéine vers 700 MPa. Les études par spectroscopie Raman ont

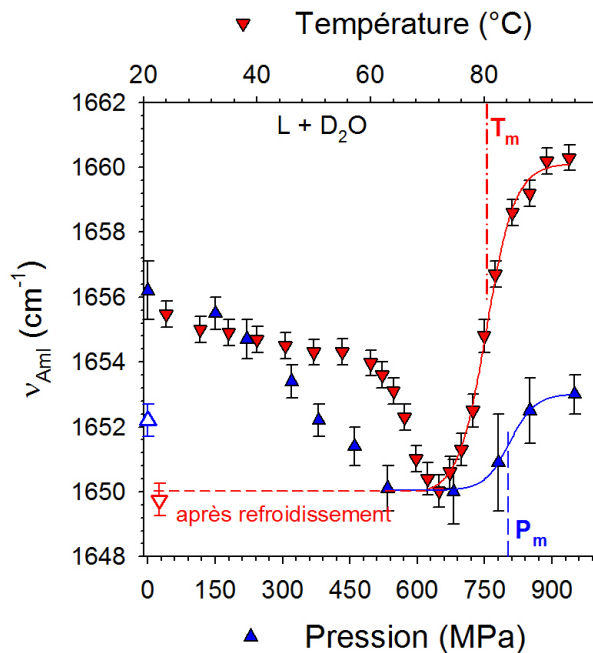


FIGURE 2.19 – Évolution de la fréquence de la bande AmI en fonction de la pression (intérieur des triangles colorié en bleu) et en fonction de la température (intérieur des triangles retournés en rouge); les triangles dont l'intérieur n'est pas colorié représentent les expériences enregistrées après relâchement de la pression (triangle à l'endroit de contour bleu), et après refroidissement à température ambiante (triangle retourné de contour rouge). Les fréquences associées à ces deux triangles caractérisent le degré de pénétration du solvant dans l'état « MG ».

montré un mécanisme de dénaturation sous pression similaire à celui observé à haute température via la pénétration du solvant à l'intérieur de la protéine comme le montre la figure 2.19 représentant l'évolution de la fréquence de la bande AmI en fonction de la pression, comparée à sa dépendance en température. Cependant le degré de dénaturation de la protéine déterminé à haute pression est plus faible qu'à haute température, probablement parce que la pénétration du solvant à l'intérieur de la structure tertiaire de la protéine est moins profonde sous haute pression, qu'à haute température. Les expériences de diffusion neutronique inélastique du lysozyme en solution sous haute pression (jusqu'à 600 MPa) révèlent une réduction importante du nombre de modes vibrationnels à basses fréquences des protéines provenant du renforcement des modes de vibrations intermoléculaires du solvant. En accord avec les expériences, les simulations numériques montrent que les modes vibrationnels du lysozyme sont plus harmoniques sous pression. L'état MG sous pression est engendré par un changement de régime des dynamiques du solvant et de la protéine, inverse à celui observé en augmentant la température. L'application de très fortes pressions à la solution de lysozyme induit un durcissement des dynamiques (figure 2.20), alors que le chauffage entraîne leur amollissement. L'état « MG » a donc des propriétés différentes suivant qu'il résulte du chauffage ou de la compression de la solution aqueuse de lysozyme. Il correspond à une structure tertiaire très flexible à haute température, et très rigide à haute pression. Les simulations de dynamique moléculaires ont également révélé que les propriétés structurales, vibrationnelles, et dynamiques de l'eau

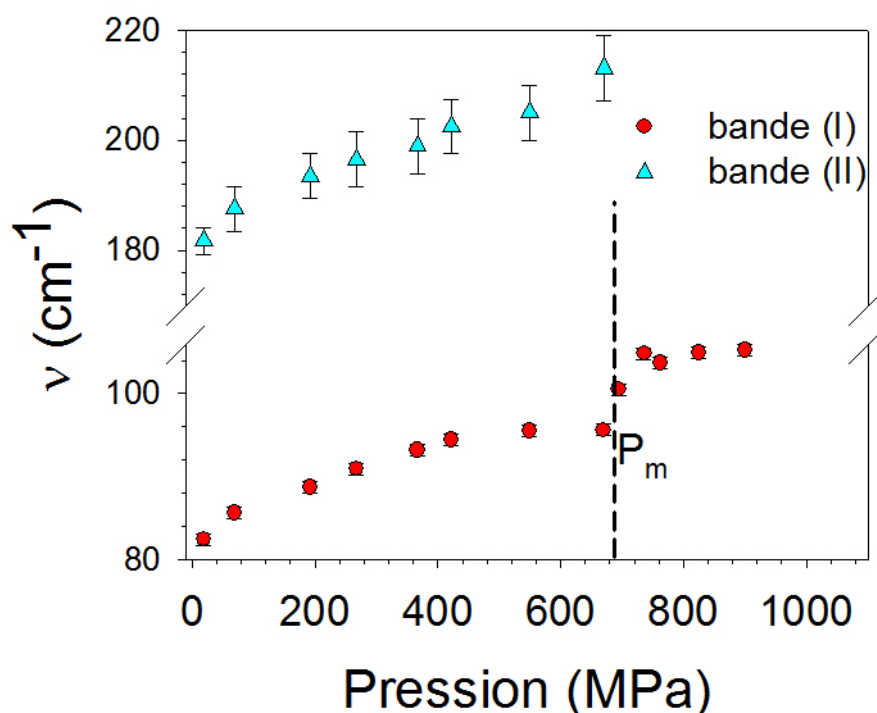


FIGURE 2.20 – Evolution des bandes (I) et (II) en fonction de la pression ; ces deux bandes correspondent respectivement aux dynamiques de la protéine et du solvant

d'hydratation sont moins sensibles à la pression que celles de l'eau en grand volume. De plus, la distorsion du réseau tétraédrique de l'eau induite par la pression pourrait faciliter le dépliement de la structure secondaire du lysozyme sous pression.

Dénaturation par des agents chimiques

Les résultats concernant l'influence de l'urée sur le lysozyme et la β -lactoglobuline seront succinctement présentés afin de décrire le mécanisme de dénaturation froide de la β -lactoglobuline en présence d'urée, observée à partir d'expériences d'analyse calorimétrique [69, 70, 71, 72]. L'évolution de la fréquence de la bande AmI du lysozyme en fonction de la concentration en urée a été comparée à la dépendance en température, pour une solution de lysozyme diluée dans l'eau lourde. Cette comparaison présentée sur la figure 2.21a montre que l'urée a pour effet de transformer la structure tertiaire du lysozyme vers un état « molten globule » (MG) très flexible comme le montre l'évolution de l'intensité quasi élastique, comparée à sa dépendance en température sur la figure 2.21b. L'analyse de la susceptibilité Raman du solvant et de la protéine dissoute dans le solvant (figure 2.22), en fonction de la concentration en urée met en évidence deux phénomènes importants. (i) l'effet destructif de l'urée sur le réseau de liaisons H de l'eau observé via la disparition de la bande (II) associée aux vibrations d'étirement des liaisons OH intermoléculaires, (ii) la dynamique de la protéine est imposée par celle du solvant. Ce phénomène est clairement observé à partir de la superposition des spectres de la susceptibilité du solvant et de la solution de protéine pour une concentration de 6 moles/litre d'urée (figure 2.22). Il est

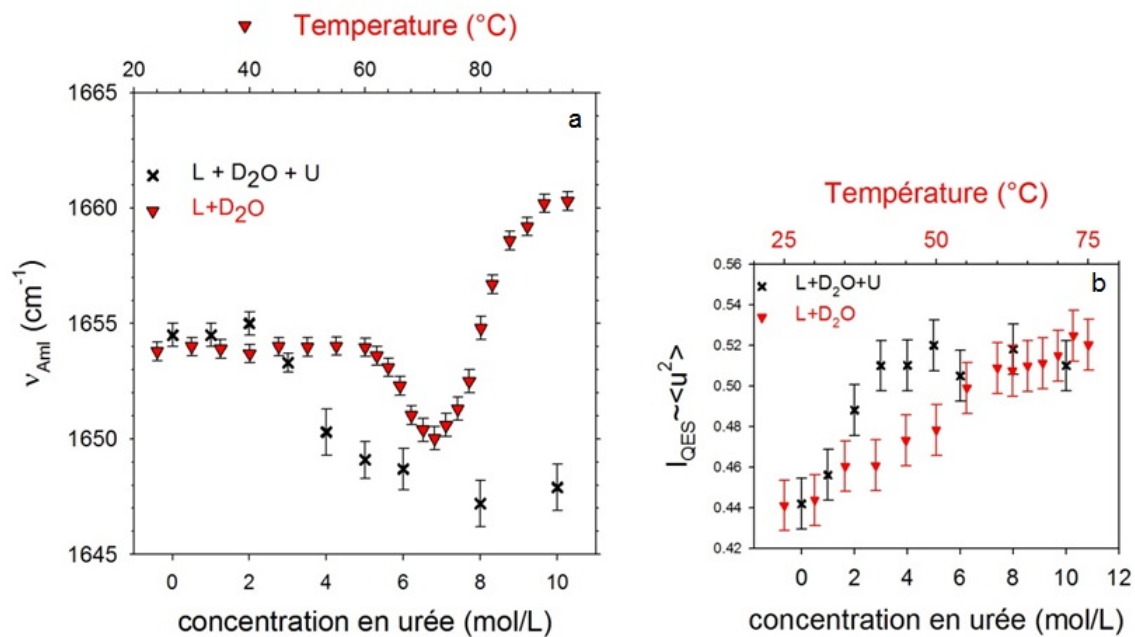


FIGURE 2.21 – Comparaisons entre évolution en fonction de la concentration en urée et dépendance en température a) de la fréquence de la bande AmI, b) l'intensité quasi élastique.

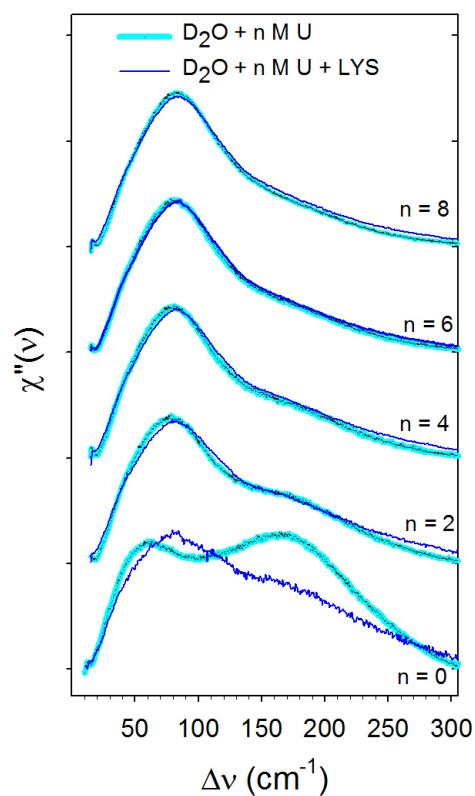


FIGURE 2.22 – Évolution des spectres de susceptibilité Raman d'une solution de lysozyme en présence de n (de 0 à 8) moles/litre d'urée et du solvant (eau + n moles/litre d'urée)

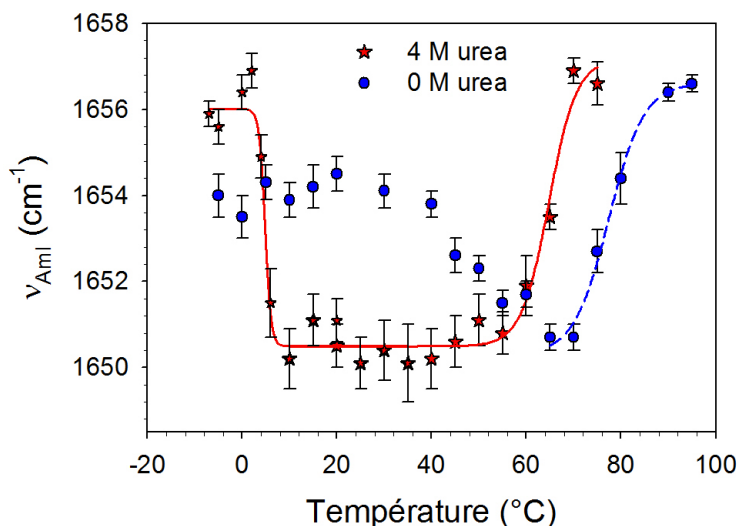


FIGURE 2.23 – Dépendance en température de la fréquence de la bande AmI de BLG dans une solution d'eau lourde (concentration massique 10%) en présence de 4 moles/litre d'urée ou en absence d'urée.

certainement inhérent à la destruction du réseau de liaisons H de l'eau, et à l'interaction directe entre l'urée et la protéine.

Dénaturation chaude et froide de la β -lactoglobuline en présence d'urée

Il a été reporté que la dénaturation froide de BLG était détectable en présence de 4 moles/litre d'urée [69, 70, 71, 72]. Les dénaturations chaude et froide de BLG ont également été étudiées par spectroscopie Raman dans ces conditions [93]. La figure 2.23 montre clairement que la bande AmI subit le même glissement vers les hautes fréquences aux basses et hautes températures, en présence de 4 M d'urée. Il est notable qu'à température ambiante, en présence d'urée, la fréquence de la bande AmI est similaire à celle déterminée en absence d'urée vers 60 °C. Cette fréquence minimum est caractéristique de l'état « MG ». Il semble donc que la protéine ne se dénature à basse température qu'à partir de cet état « MG ». La figure 2.23 montre également que la fréquence de la bande AmI est similaire dans les états dénaturés à basse et haute température, ce qui indique des états dénaturés et des processus de dénaturation identiques, inhérents à la pénétration du solvant au sein de la structure tertiaire de la protéine. L'analyse basse fréquence de la solution de protéine et du solvant en fonction de la concentration en urée, a révélé les mêmes phénomènes que l'étude sur le lysozyme, c'est-à-dire, les observations de la destruction du réseau de liaisons hydrogène de l'eau, et de la similarité des dynamiques de la protéine et du solvant à partir de 4 moles/litre d'urée dans la solution. Ces phénomènes ont mis en évidence le rôle prépondérant de l'organisation structurale (réseau de liaisons H) du solvant dans le processus de dénaturation de la protéine, en relation avec la dynamique (quasi-harmonique et anharmonique) de la protéine. La synthèse de ces deux études (BLG à basse température et L sous haute pression) montre que la dénaturation froide s'opère via un état intermédiaire « molten globule », comme pour la dénaturation

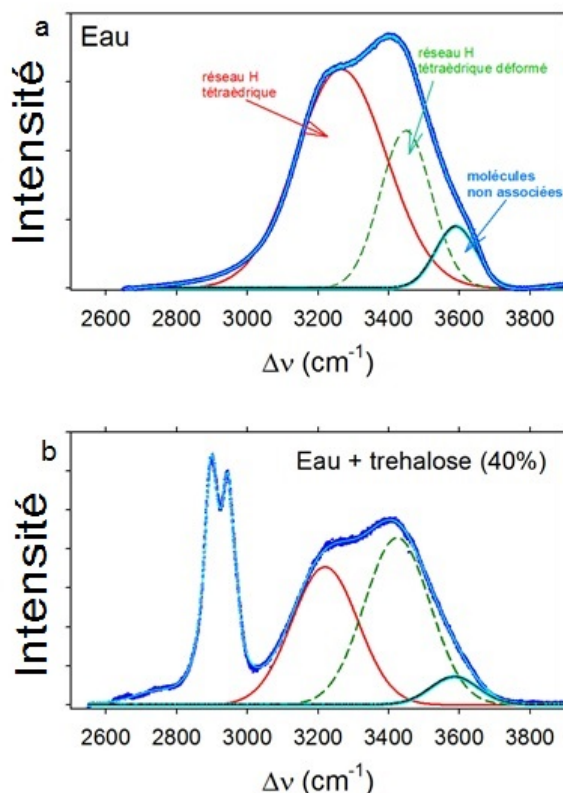


FIGURE 2.24 – Spectre des vibrations d'étirement des liaisons intra moléculaires OH, a) dans l'eau, b) dans le mélange eau/tréhalose (40%)

chaude et que l'origine de la dénaturation est liée à la désorganisation (déformation ou destruction) de l'ordre local tétraédrique de l'eau.

2.3.3 Mécanismes de stabilisation des protéines par les disaccharides

La compréhension des mécanismes de bioprotection a été réalisée en deux étapes. Une première étape a porté sur l'analyse de la dynamique des systèmes binaires Eau/disaccharides (disaccharides = maltose, sucrose et tréhalose, uniquement distinguables les uns des autres par leur conformation moléculaire), puis une seconde sur l'étude des mélanges protéines/eau/disaccharides lors de processus de dénaturation à haute température.

Mélanges eau/disaccharides

L'influence des sucres sur l'organisation structurale de l'eau a d'abord été analysée en absence de protéine, dans les domaines des vibrations d'étirement des liaisons intra moléculaires OH [34], et à basse fréquence. Le spectre de l'eau pure représenté sur la figure 2.24a est clairement composé de trois larges bandes. La bande située aux plus basses fréquences (maximum d'intensité vers 3250 cm^{-1}) est attribuée à la vibration des liaisons OH impliquées dans les liaisons H qui présentent une organisation locale tétraédrique similaire à celle observée dans la glace hexagonale, alors que la bande dont le maximum

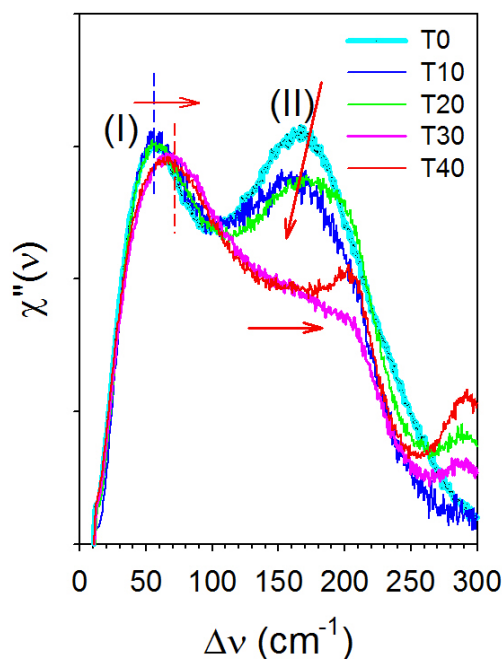


FIGURE 2.25 – Spectre de l'eau en absence (T_0) et en présence de tréhalose à différentes concentrations, de 10 (T_{10}) à 40% en masse (T_{40}).

d'intensité se situe vers 3450 cm^{-1} correspond aux mêmes vibrations, mais dans un réseau de liaisons H déformé. La bande d'intensité plus faible observée vers 3600 cm^{-1} , correspond aux vibrations d'étirement OH dans les molécules d'eau non liées aux autres par liaisons H. L'ajout de sucre dans l'eau induit une réduction de l'intensité des bandes situées vers 3250 et 3600 cm^{-1} aux dépens de la troisième bande. L'effet observé sur la bande située à plus basse fréquence a été interprété comme une désorganisation de l'ordre tétraédrique, alors que celui observé sur la bande à 3600 cm^{-1} démontre un plus grand nombre de molécules d'eau associées par liaisons H en présence de sucre. Ces deux effets sont clairement observés sur la figure 2.24b. Il a été montré [34, 62] que c'est le tréhalose qui était le plus apte, parmi les trois sucres, à former des liaisons H avec les molécules d'eau, et à déformer le réseau de liaisons H de l'eau, principalement au-dessus d'une concentration massique de 30%. Cette propriété du tréhalose a été attribuée à sa conformation moléculaire, qui ne lui permet pas de former des liaisons intra moléculaires, contrairement aux deux autres disaccharides. Le spectre basse fréquence de l'eau est comparé (figure 2.25) à celui des mélanges eau/tréhalose avec une concentration en sucre variant de 10 à 40% par rapport à la masse d'eau. L'ajout de sucre provoque une diminution d'intensité de la bande (II), accompagnée d'un glissement de la bande vers les hautes fréquences, pour de faibles concentrations en sucre. Cette tendance est très nettement accentuée à partir de 30% de sucre. Ces observations traduisent la déformation du réseau de liaisons hydrogène de l'eau avec un durcissement des interactions intermoléculaires OH. Il a été noté que cet effet, amplifié au-dessus de la concentration de 30% est en relation avec le durcissement de la cage (caging effect) observé via le glissement de la bande (I) à partir d'une concentration en tréhalose de 30%.

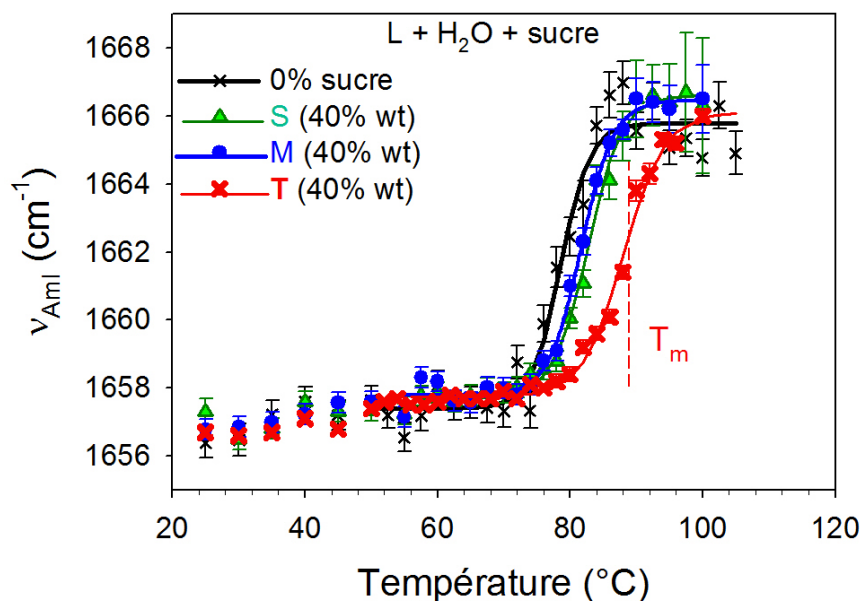


FIGURE 2.26 – Dépendance en température de la fréquence de la bande AmI du lysozyme (L) dissous dans l'eau en absence et en présence de disaccharides (40% par rapport à la masse d'eau).

Mélanges protéine/eau/disaccharide

Les processus de dénaturation chaude de plusieurs protéines (L, BSA, BLG) ont été analysés par spectroscopie Raman. Ces études ont conduit aux mêmes conclusions résumées ici, sur l'exemple du lysozyme [63, 68]. L'effet stabilisant de ces trois sucres a clairement été montré sur l'analyse de la bande AmI lors du chauffage de solutions de lysozyme dissous dans un mélange eau-sucré (concentration massique en sucre de 40%). Les évolutions de fréquence de la bande en fonction de la température, tracées sur la figure 2.26, montrent également que le tréhalose est l'agent bioprotecteur le plus efficace des trois sucres. Afin de comprendre le mécanisme de stabilisation et l'efficacité du tréhalose, le spectre basse fréquence d'une solution aqueuse de lysozyme (LW) en absence de sucre est comparé, à température ambiante, à ceux d'une solution de lysozyme en présence d'une forte concentration (40%) de tréhalose (LWT_{40}) et de sucrose (LWS_{40}). Cette comparaison est présentée sur la figure 2.27. La bande (I) du spectre, représentative de la dynamique de la protéine, n'est pas modifiée par ajout de sucre en forte concentration, contrairement à ce qui a été observé pour l'eau (figure 2.25). Ceci montre qu'il n'y a pas d'interaction entre les sucres et la surface de la protéine, en accord avec l'hypothèse de l'hydratation préférentielle [26] (Section 1.3.3) selon laquelle les molécules de sucre sont préférentiellement exclues de la surface de la protéine. La bande (II) de la solution de lysozyme subit les mêmes effets (diminution d'intensité et glissement vers les hautes fréquences) que celle de la susceptibilité de l'eau, montrant que les sucres déforment le réseau de liaisons H du solvant. Les évolutions en température des fréquences des bandes de vibration (I) et (II) des solutions aqueuses de lysozyme en absence et en présence de 40% de sucre (tréhalose et sucrose) sont tracées sur les figures 2.28a et 2.28b. La figure

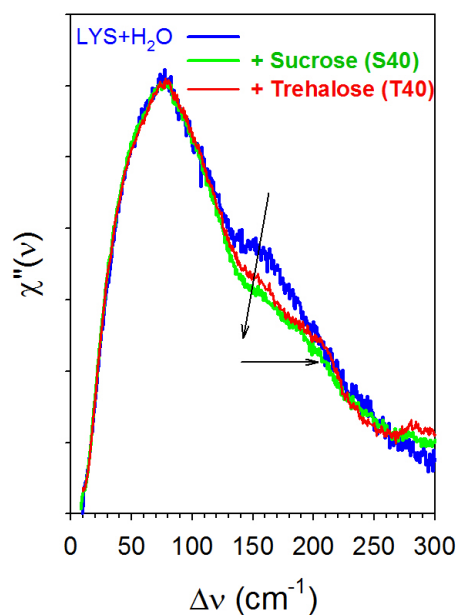


FIGURE 2.27 – Comparaison de la susceptibilité Raman des solutions aqueuses de lysozyme en absence et en présence de 40 % de sucre (sucrose et tréhalose). Les flèches montrent d'une part la diminution de l'intensité de la bande d'élargissement des liaisons OH intermoléculaires, et d'autre part son glissement vers les hautes fréquences, lorsqu'on ajoute un disaccharide (sucrose ou tréhalose).

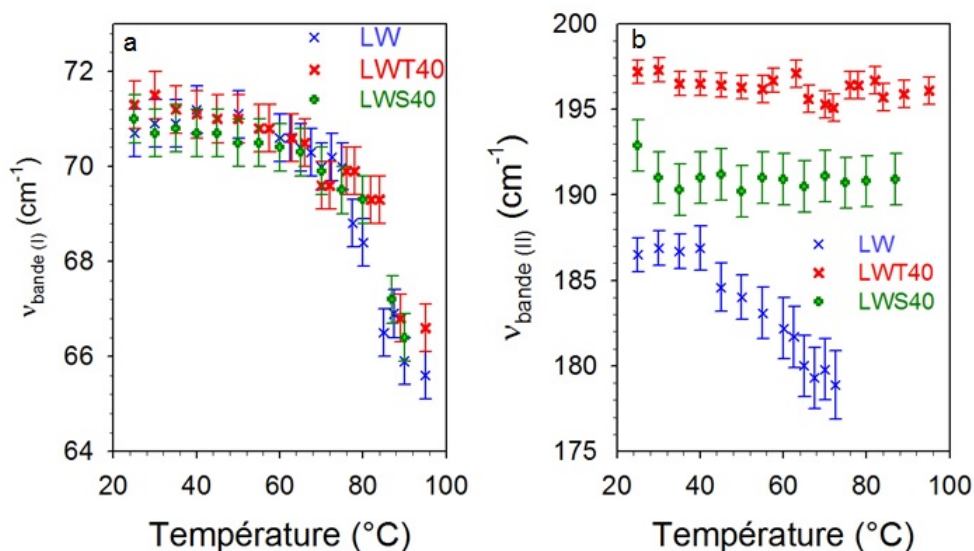


FIGURE 2.28 – Comparaison des dépendances en température des fréquences a) des bandes (I) et b) des fréquences des bandes (II) pour les solutions lysozyme/eau (LW), lysozyme/eau/sucres (LWS₄₀, et LWT₄₀). La concentration de lysozyme est de 10% par rapport à la masse de solvant et la concentration de sucrose et tréhalose est de 40% par rapport à la masse d'eau.

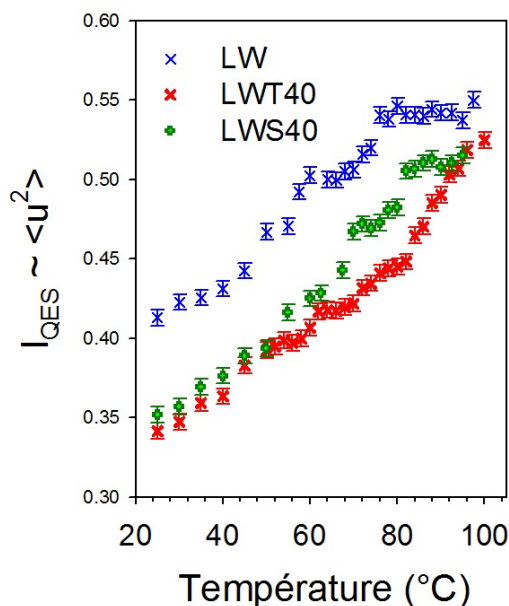


FIGURE 2.29 – Évolution en température de l'intensité quasi-élastique pour les solutions lysozyme/eau (*LW*), lysozyme/eau/sucres (*LWS*₄₀, et *LWT*₄₀).

2.28a montre que les sucres ont peu d'influence sur le comportement en température des mouvements quasi-harmoniques de la protéine. Par contre la figure 2.28b montre qu'ils rigidifient les interactions OH intermoléculaires et le réseau de liaisons H du solvant, par l'observation du glissement de la bande (II) vers les hautes fréquences. Cet effet est plus marqué pour le tréhalose que pour le sucrose. Une conséquence est la stabilisation du réseau de liaisons H du solvant à haute température. Une seconde conséquence est la limitation de l'intensité quasi élastique, dès la température ambiante, comme le montre la figure 2.29. La rigidification du réseau de liaisons H, limite clairement l'anharmonicité des mouvements, et donc la flexibilité de la protéine. Il est notable que l'anharmonicité est d'avantage limité en présence de tréhalose dans la gamme de température allant de 50 à 90 °C, ce qui rend certainement le tréhalose plus efficace pour stabiliser la protéine à haute température.

En résumé, le mécanisme de bioprotection des sucres à haute température consiste à déformer, rigidifier et stabiliser le réseau de liaisons H du solvant. La conséquence est de limiter l'anharmonicité des mouvements et donc la flexibilité de la protéine. L'efficacité bioprotectrice du tréhalose résulte de sa capacité à former de nombreuses liaisons H avec l'eau, qui est une propriété probablement inhérente à sa conformation moléculaire.

Chapitre 3

Études expérimentales

3.1 Etude de la dénaturation chaude de BLG en fonction de la concentration

Il est reporté dans la littérature [90, 91, 92] que le processus de dénaturation de BLG en solution est étroitement corrélé avec la concentration de la protéine. Une nouvelle étude a donc été réalisée pour des formulations à plus faible concentration (5% de protéine par rapport à la masse d'eau lourde) que celle correspondant aux études antérieures (10% de BLG, [65, 93]), afin d'analyser l'influence de la concentration sur la stabilité de la protéine, et sur le processus de dénaturation. La figure 3.1 montre la région des bandes

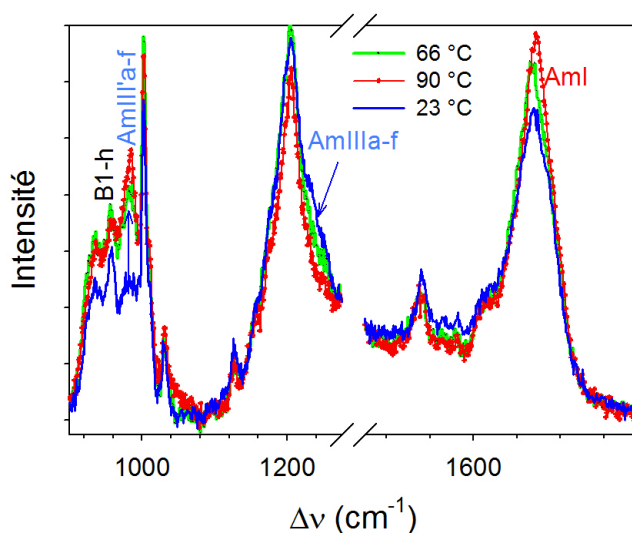


FIGURE 3.1 – Représentation de la région des bandes amide I et III, dans l'état natif ($T = 23$ °C), l'état « molten globule » (66 °C) et l'état dénaturé (90 °C) de BLG.

amide aux températures correspondant à l'état natif (23 °C), à l'état « MG » (66 °C) et l'état dénaturé (90 °C). On remarque la contribution importante du mode de bending de l'eau lourde vers 1200 cm^{-1} , avec un épaulement significatif sur son côté haute fréquence ($\sim 1250\text{cm}^{-1}$) correspondant aux vibrations de la bande amide III dans les feuillettes β . La transformation de l'état natif vers l'état « MG » correspondant à une structure tertiaire

imbibée de solvant (eau lourde dans le cas présent) est distinguable par la disparition de l'épaule (bande AmIIIa-f) au détriment de la croissance de la bande AmIII'a-f ($\sim 980\text{cm}^{-1}$), correspondant aux mêmes vibrations que la bande AmIIIa-f, mais décalée par rapport à celle-ci vers les basses fréquences à cause des échanges isotopiques (NH/ND). Ces échanges isotopiques sont également observables dans la région de la bande AmI, via un glissement de cette bande vers les basses fréquences. L'évolution de fréquence de la bande AmI en fonction de la température a été déterminée à partir d'une procédure d'affinement dans laquelle la somme d'une Gaussienne et d'une Lorentzienne a été utilisée pour décrire au mieux le profil de la bande AmI. Cette évolution est tracée sur la figure 3.2. L'évolution montre clairement les deux étapes de la dénaturation chaude, comme

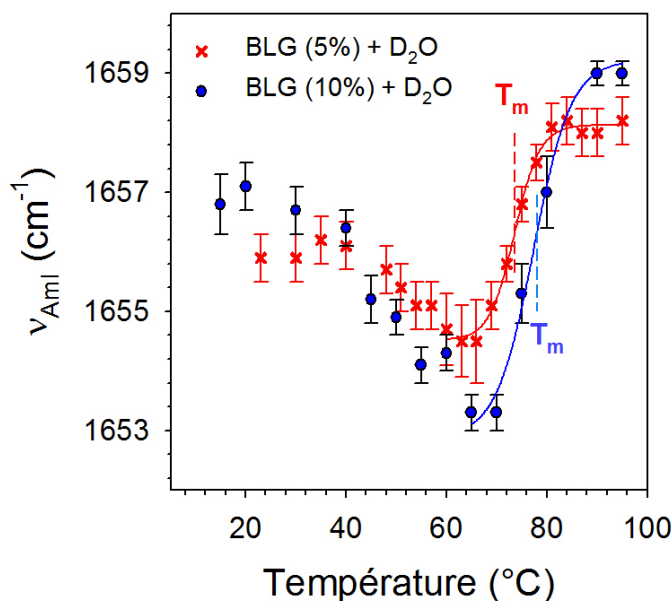


FIGURE 3.2 – Évolution de la fréquence de la bande AmI en fonction de la température pour les deux solutions $\text{D}_2\text{O} + 5\%$ de BLG (croix rouge) ou $+ 10\%$ de BLG (cercle bleu); les lignes correspondent à l'ajustement de la fonction.

observée pour le lysozyme. La première étape correspond au premier glissement de la bande vers les basses fréquences, associé aux échanges isotopiques entre le solvant et les groupements NH de la protéine non exposés au solvant à température ambiante. Ce glissement indique donc la transformation de l'état natif vers l'état « MG » précurseur de la modification de la structure secondaire. Celle-ci se caractérise par un glissement de la bande vers les hautes fréquences. Cette partie de la courbe est ajustée avec la loi (*Section 2.2.2*), permettant la détermination de $T_m = 73.6 \text{ °C} (\pm 0.3)$. Ce glissement de fréquence serait principalement lié au dépliement des structures en hélice, si on se réfère aux études réalisées antérieurement sur des formulations à 10% de BLG [65]. Ces mêmes études ont montré, d'une part, que les hélices dépliées formaient des feuillets β , et d'autre part que la courbe de dénaturation pour une concentration de 10% se distinguait de celle correspondant à une concentration de 5%, par deux effets principaux. La figure 3.2 montre effectivement que le glissement vers les basses fréquences de la bande AmI

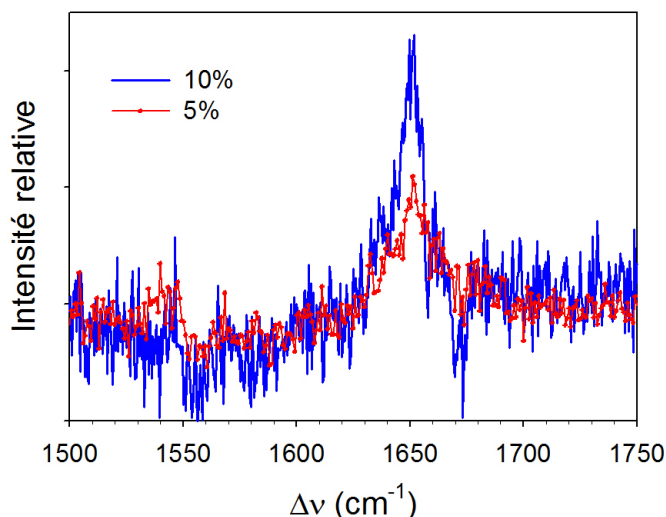


FIGURE 3.3 – Différences entre les spectres de la bande AmI dans les états MG et natif pour les deux solutions BLG + D₂O à 5 et 10% de BLG.

est amplifié lorsque la concentration augmente, et que la température T_m augmente avec la concentration. Les différences de spectres (tracées figure 3.3) entre l'état « MG » et l'état natif pour les deux solutions de BLG (à 5 et 10% de concentration) confirment l'amplification des échanges isotopiques en augmentant la concentration de BLG de 5 à 10%. Ces résultats peuvent être interprétés en termes de proportions et de stabilité des dimères en fonction de la concentration en protéine. La proportion de ces dimères serait statistiquement plus importante à forte concentration, et ceux-ci seraient stables à plus haute température, ce qui expliquerait le décalage de la température T_m observé sur la figure 3.2. L'évolution de l'intensité réduite des spectres Raman est représentée sur la figure 3.4a en fonction de la température, pour une solution contenant 5% de BLG. L'intégration de ces spectres entre 10 et 30 cm^{-1} donne l'intensité I_{QES} tracée sur la figure 3.4b pour les deux formulations de BLG correspondant à des concentrations massiques de 5 et 10 %. Cette intensité quasi-élastique varie de manière inversement proportionnelle à la concentration en BLG, indiquant une flexibilité plus grande (stabilité plus faible) à faible concentration. Ces observations sont donc en adéquation avec la considération d'une proportion statistique de dimères plus importante à haute concentration de BLG, qui aurait pour conséquence de stabiliser la protéine. Les spectres Raman basse fréquence des deux solutions (contenant 5 et 10 % de BLG) sont tracés sur la figure 3.5a dans la représentation de la susceptibilité Raman, dans le domaine où sont détectées les bandes correspondant principalement à la dynamique de la protéine en régime quasi-harmonique (bande I), et aux vibrations d'étirement des liaisons OD intermoléculaires dans le réseau de liaisons hydrogène du solvant (bande II). Un léger décalage, significatif, de la bande (I) vers les hautes fréquences, est observé lorsque la concentration de BLG est augmentée de 5 à 10%. Ceci indique un durcissement de la dynamique de la protéine en fonction de la concentration en BLG, cohérent avec la diminution de flexibilité (diminution de I_{QES}) de la protéine. L'intensité de la bande (II) décroît avec l'augmentation de la concentration

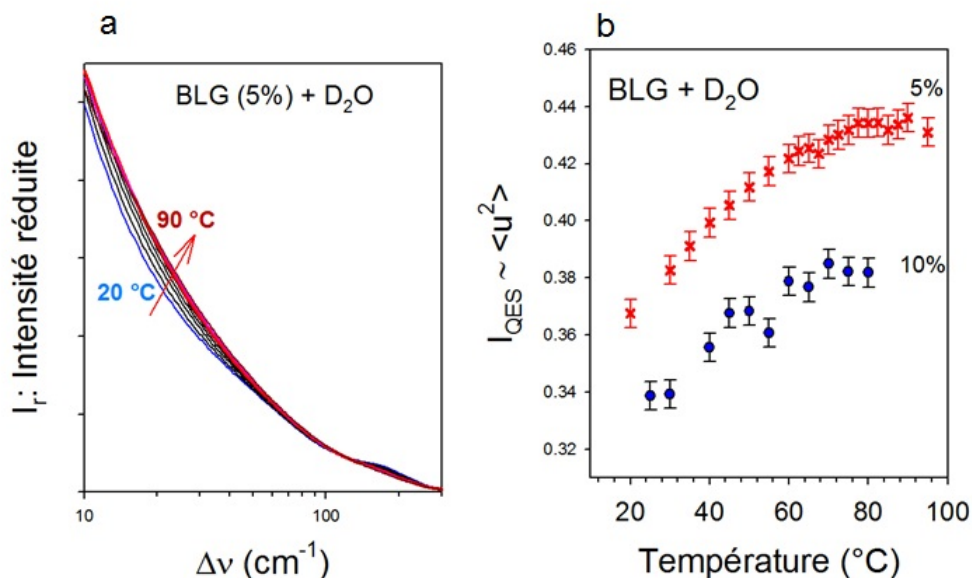


FIGURE 3.4 – Analyse de l'intensité réduite : a) Evolution du spectre $I_r(\nu)$ en fonction de la température pour la solution à 5% de BLG b) I_{QES} en fonction de la température, obtenue en intégrant les spectres $I_r(\nu)$ entre 10 et 30 cm^{-1} pour les deux solutions à 5 et 10% de BLG.

en BLG, reflétant ainsi la désorganisation du réseau de liaisons hydrogène du solvant lorsque la protéine est ajoutée dans la solution aqueuse. L'évolution en température de la susceptibilité Raman est tracée sur la figure 3.5b pour la solution contenant 5% de BLG. L'observation la plus marquante correspond à l'évolution de la bande II du spectre, dont la fréquence et l'intensité décroissent lorsque la température est augmentée. Ces observations sont inhérentes à l'effet du chauffage sur tout réseau de liaisons H, qui induit la rupture des liaisons H et l'amollissement de la dynamique du solvant. La conséquence de cet effet est l'amollissement de la dynamique vibrationnelle de la protéine observée sur la figure 3.5c, où sont représentées les évolutions des fréquences des deux bandes I et II en fonction de la température. Cette figure montre une évolution monotone décroissante des fréquences des deux bandes en fonction de la température sur l'intervalle 20 – 100°C, ce qui différencie BLG du lysozyme, où les fréquences devenaient indépendantes de la température au-dessus de T_{MG} (température où l'état MG est atteint). On remarque seulement un léger accident à cette température (trait hachuré sur la figure 3.5c) . Cette étude montre donc qu'une augmentation de la concentration en BLG abaisse la flexibilité de la protéine et stabilise la structure de celle-ci à haute température. Le processus de dénaturation reste similaire pour les deux solutions. La dépendance en température de la fréquence de la bande (I) reflétant majoritairement les vibrations quasi-harmoniques de la protéine, est différente pour les deux solutions. Dans le cas de la solution à 10% de BLG, la bande se décale légèrement vers les hautes fréquences [65] alors que pour la solution à 5% de BLG la bande glisse vers les basses fréquences. Le décalage vers les hautes fréquences a été interprété comme résultant d'un phénomène d'agrégation, qui serait moins accentué dans une solution plus diluée.

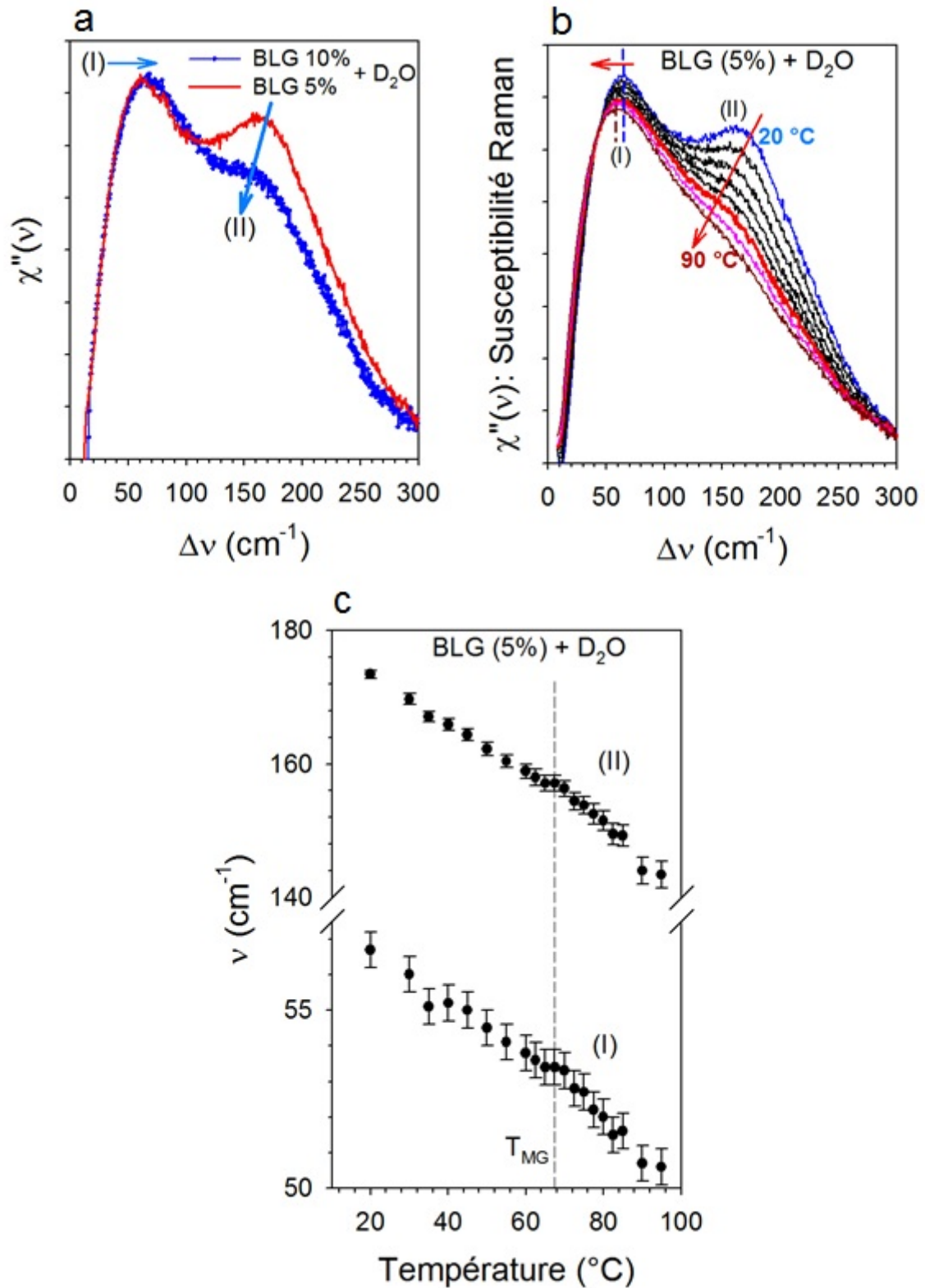


FIGURE 3.5 – Étude de la susceptibilité Raman de la solution à 5% de BLG a) Comparaison des spectres des deux solutions à température ambiante b) Evolution du spectre de la solution à 5% de BLG en fonction de la température (entre 20 et 90 °C par pas de 10°) c) Evolution des fréquences des deux bandes du spectre $\chi''(\nu)$ en fonction de la température

3.2 Analyse en temps réel des changements structuraux des protéines par micro-spectrométrie Raman in-situ pendant 1 cycle de lyophilisation

La micro-spectroscopie Raman offre la possibilité de suivre in-situ la stabilité de la protéine lors d'une procédure de lyophilisation, permettant ainsi de déterminer la (ou les) source(s) de stress responsable(s) de changements structuraux au sein de la protéine. La majorité des études menées dans le but de déterminer les changements structuraux inhérents à une procédure de lyophilisation correspondent principalement à des mesures réalisées à la fin du cycle, sur le lyophilisat. Une cellule à pression et température variable (*description du matériel en annexe*), a permis de simuler un cycle de lyophilisation, en reproduisant les trois étapes du cycle décrites dans le chapitre 1. Les principales différences entre nos études réalisées sur des micro volumes et les cycles réalisés à l'échelle industrielle ou avec des lyophilisateurs de laboratoire, résultent des faibles quantités de produit à lyophiliser engendrant une variation importante des échelles de temps sur lesquelles s'effectuent les différentes étapes du cycle. Les analyses ont été effectuées sur des formulations les plus simples possibles (protéine/eau, protéine/eau/sucre), pour permettre, d'une part une mise en évidence claire, de changements structuraux, et d'autre part de montrer et comprendre l'effet stabilisateur des sucres, en particulier celui du tréhalose. Deux types de cycles de lyophilisation ont été menés sur plusieurs protéines modèles (lysozyme, β -lactoglobuline, albumine et chymotrypsinogène), suivant que la formulation contenait ou pas de sucre.

3.2.1 Méthodes et paramètres expérimentaux

3.2.1.1 Description des cycles de lyophilisation

En absence de sucre, le cycle de lyophilisation est représenté sur la figure 3.6a. La congélation est réalisée en amenant la formulation à -45°C à la vitesse $T=20^{\circ}/\text{min}$, puis la température est élevée à -10°C à la même vitesse, pour l'étape de sublimation de la glace. La température est ensuite élevée à 30°C pour le séchage secondaire, consistant à éliminer l'eau résiduelle qui n'a pas été congelée lors de la première étape du cycle. En présence de sucre, le cycle suivi est représenté sur la figure 3.6b. Il diffère essentiellement du précédent (figure 3.6a) par la température à laquelle s'opère le séchage primaire, qui doit être inférieure à la température T_g' de la formulation. L'abaissement de la température de sublimation a pour principale conséquence d'allonger le temps de l'étape de séchage primaire. Cette augmentation n'est pas très significative pour la lyophilisation de micro-volumes, mais peut être très importante sur des quantités industrielles.

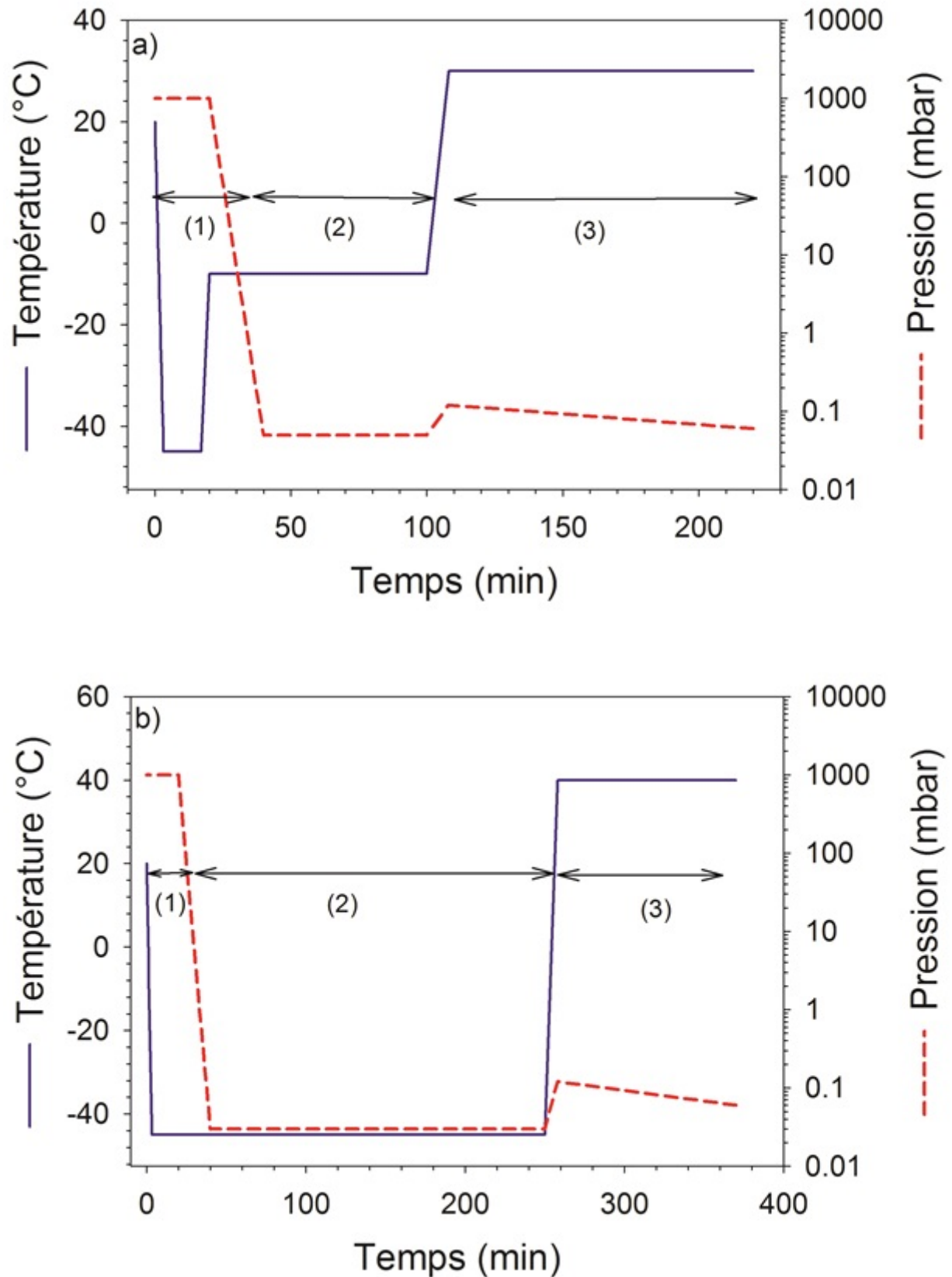


FIGURE 3.6 – Cycles de lyophilisation d'une solution de protéine en absence de tréhalose a), et en présence de tréhalose b). (1) correspond à la congélation de la solution, (2) au séchage primaire (sublimation de la glace) et (3) au séchage secondaire

3.2.1.2 Paramètres expérimentaux liés aux analyses in-situ pendant un cycle de lyophilisation

Dans chaque type d'analyses d'une formulation réalisées in-situ pendant un cycle de lyophilisation, le choix des conditions expérimentales au niveau du spectromètre Renishaw (*voir annexe*), résulte de la configuration environnement/échantillon. Le choix de l'objectif du microscope (x50 longue distance focale) est imposé par l'utilisation d'une cellule pression-température, et a pour conséquence d'élargir la profondeur d'intégration du signal, et donc augmenter la résolution spatiale en profondeur et le volume d'analyse. La longueur d'onde a été sélectionnée en fonction de la contribution de la fluorescence au signal Raman. Pour les protéines lysozyme (L) et β -lactoglobuline (BLG), la longueur d'onde $\lambda=514.5$ nm a été sélectionnée, permettant l'analyse d'un volume de $100 \mu m^3$. Pour les protéines, albumine (BSA) et chymotrypsinogène (C), la diode Renishaw émettant à la longueur d'onde $\lambda = 785$ nm a été utilisée. Dans ce cas la résolution et le volume d'étude sont élargis à $400 \mu m^3$, principalement à cause de la nature du faisceau incident.

3.3 Lyophilisation de formulations protéine/eau

Dans cette partie, chaque formulation étudiée correspond à une protéine dissoute dans l'eau lourde (10% de concentration massique), afin d'observer d'éventuels échanges isotopiques, lors des étapes de la procédure de lyophilisation, qui indiqueraient l'altération de l'état natif de la protéine. Les spectres Raman ont été enregistrés dans la région des bandes amide I et II, entre 600 et 1800 cm^{-1} , et dans la région des vibrations d'étirement des liaisons intramoléculaires OD, afin de suivre les modifications structurales de la protéine en fonction des caractéristiques du solvant (l'état physique, concentration, ...). Les figures 3.7a et 3.7b montrent ces deux régions spectrales au cours des trois étapes du cycle de lyophilisation de la solution BLG/ D_2O . La bande très intense située vers 2300 cm^{-1} (figure 3.7b) est la signature de la glace cristalline hexagonale, et son intensité est représentative de la proportion de glace dans le produit gelé. L'étude quantitative de cette bande de vibration permet donc d'analyser les transformations structurales de la protéine en fonction du solvant (état physique : liquide ou solide, concentration) sur un volume d'environ $100 \mu m^3$ qui reste identique sur tout le cycle. L'examen simultané des figures 3.7a et 3.7b montre clairement des modifications spectrales dans la région $600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ lorsque la bande intense de la glace vers 3000 cm^{-1} a disparu du spectre des vibrations d'étirement OD. Cette région peut être divisée en deux parties pour mieux analyser les modifications spectrales et les interpréter en termes de transformations structurales. La figure 3.8a présente le spectre de la région de la bande AmI à chaque fin d'étape du cycle de lyophilisation. Cette figure révèle des modifications significatives du spectre, principalement à la fin de l'étape de sublimation (séchage primaire). On observe un élargissement de la bande AmI accompagné d'un glissement vers les hautes fréquences. Afin d'évaluer l'amplitude des transformations spectrales observées pendant le cycle de lyophilisation, la différence des spectres à $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ est comparée, avec celle résultant de l'étude de la dénatura-

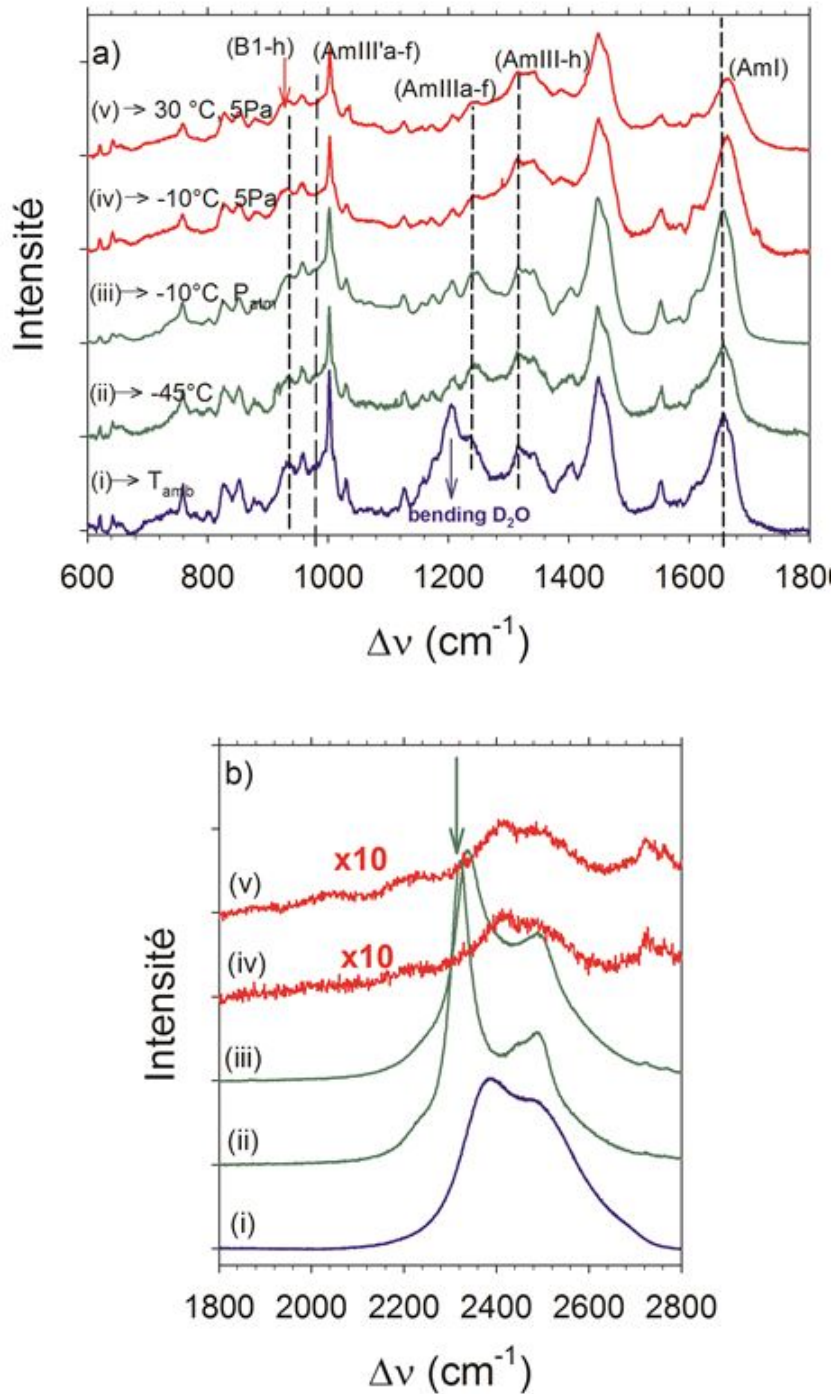


FIGURE 3.7 – Évolution du spectre Raman de la solution BLG/D₂O, lors des différentes étapes du cycle de lyophilisation; (i) solution sous conditions ambiantes, (ii) et (iii) en phase de congélation; (iv) en fin de séchage primaire; (v) après séchage secondaire a) Dans la région des bandes amides I et III b) Dans la région des vibrations d'étirement des liaisons intramoléculaires OD

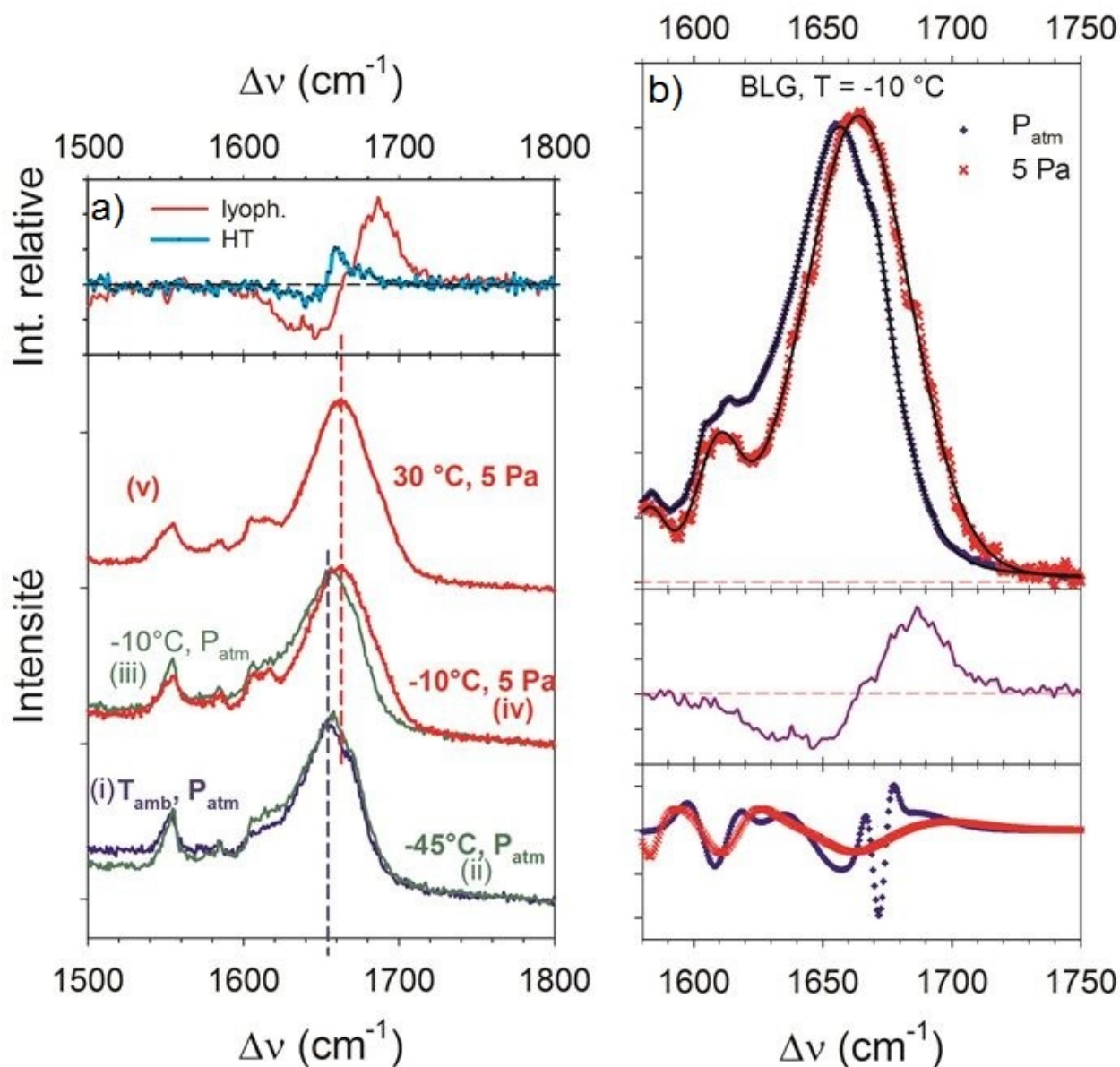


FIGURE 3.8 – a) Évolution du spectre de la région de la bande AmI au cours des étapes de la lyophilisation de la solution BLG/D₂O ; (i), (ii), (iii), (iv) et (iv) ont la même signification que sur la figure 3.7. Le graphe supérieur montre la différence des spectres entre les états (iv) et (iii), comparés à la différence de spectres caractéristiques de la dénaturation chaude. b) Analyse de la bande AmI de BLG à -10 °C, avant et après l'étape du séchage primaire ; le graphe supérieur montre les spectres de la bande AmI dans un domaine restreint, celui au centre la différence entre ces deux spectres, et le graphe inférieur montre les spectres dérivée seconde.

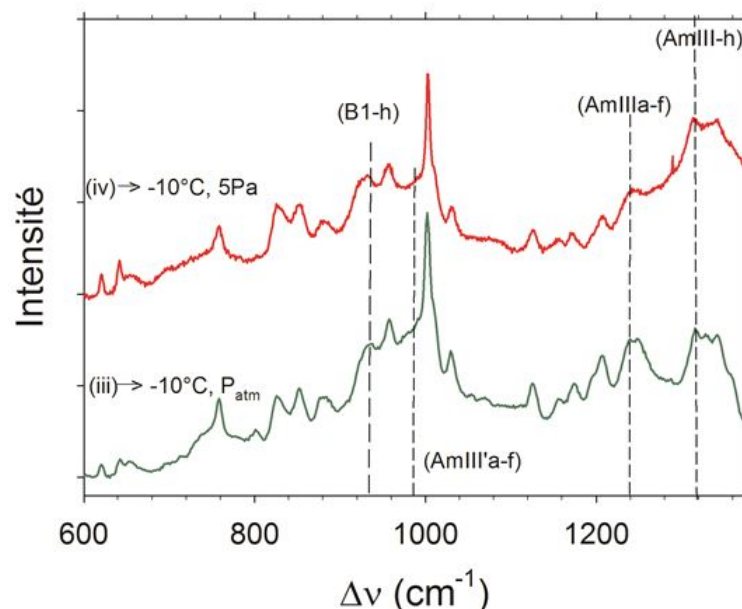


FIGURE 3.9 – Agrandissement de la région des bandes amide III, à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant et après séchage primaire de la solution BLG/ D_2O .

tion chaude, dans la partie supérieure de la figure 3.8a. Il est observé que les modifications induites par la sublimation de la glace sont beaucoup plus importantes que celles induites par le chauffage d'une solution aqueuse. Les modifications sont également différentes, dans la mesure où les minima et maxima des spectres de différence sont décalés les uns par rapport aux autres. La figure 3.8b présente les spectres dérivée seconde, avant et après l'étape de séchage primaire. Ce type de représentation met en évidence un élargissement général des bandes de vibration dans cette région, sans émergence de nouvelles bandes qui traduiraient des transformations de la structure secondaire de la protéine. La figure 3.9, représentant un agrandissement de la région des bandes amide III, révèle également un élargissement des bandes distinctives des arrangements structuraux en feuillets et hélices, c'est-à-dire les bandes AmIIIa-f pour les feuillets, et AmIII-h et B1-h pour les hélices. Ces élargissements sont accompagnés de légers décalages de fréquences. La combinaison de ces effets peut être interprétée comme résultant de déformation des structures en hélices et feuillets, qui induisent des désorganisations locales des groupements atomiques dont les vibrations sont impliquées dans les bandes élargies. On notera à partir d'une observation détaillée des figures 3.7a, 3.8a et 3.9, qu'aucune signature d'échanges isotopiques n'est détectée. En effet, une attention particulière sur la bande AmI ne révèle aucun glissement vers les basses fréquences, contrairement à ce qui est observé par chauffage d'une solution aqueuse de BLG (figure 3.1, 3.2, 3.3 et 3.4). On remarque également qu'il n'y a pas d'augmentation d'intensité au voisinage de 980 cm^{-1} , où l'intensité de la bande AmIII'a-f augmente aux dépens de la bande AmIIIa-f lors de l'amplification d'échanges isotopiques (figure 3.1). Il a été montré précédemment que tout dépliement de structure secondaire était précédé de la pénétration du solvant, aussi bien pour la dénaturation chaude, que pour la dénaturation froide et la dénaturation sous pression. Les résultats présentés ici, montrent clairement un processus de dénaturation des protéines pendant le séchage pri-

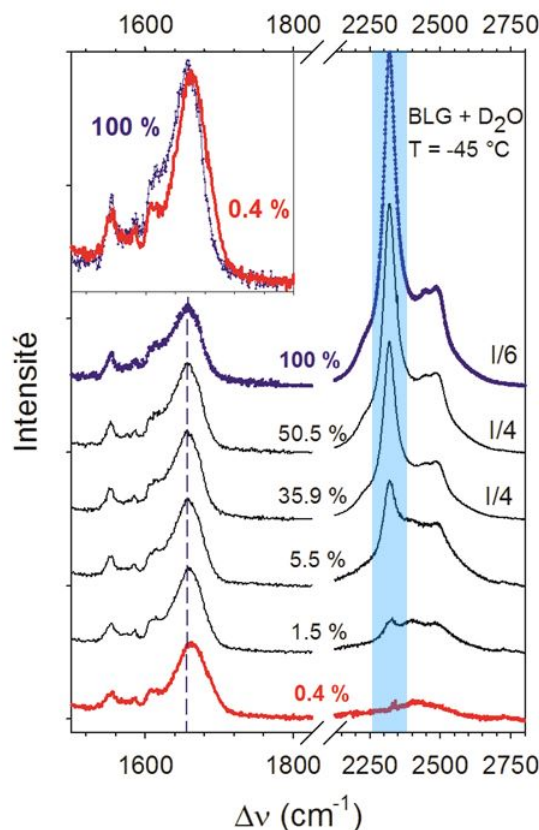


FIGURE 3.10 – Spectres Raman collectés simultanément dans la région de la bande AmI et celle des vibrations d’étirement des liaisons OD, durant la cinétique de sublimation à -45 °C du produit congelé (BLG/ D_2O). Les pourcentages reportés sur cette figure correspondent à la proportion de glace déterminée par intégration de la bande située dans la zone coloriée. L’insert supérieur gauche montre les spectres de la bande AmI pour une proportion de 100 % et 0.4 % de glace dans le volume analysé.

maire, différent de celui observé lorsque la protéine en solution est exposée à différents types de stress. La structure secondaire de la protéine ne serait donc pas dépliée sous l’effet du séchage primaire, mais seulement déformée de manière importante étant donné les variations d’intensité relative du spectre différence observées sur la figure 3.8a. Les figures 3.7a et 3.8 montrent clairement que les modifications de structure sont observées pendant l’étape de séchage primaire de BLG. Pour avoir des informations plus précises sur l’origine des modifications structurales, l’analyse de la bande AmI est comparée avec celle de la bande intense et fine correspondant aux vibrations d’étirement des liaisons OD dans la glace, les deux régions ayant été enregistrées simultanément durant le séchage primaire. Le cycle de lyophilisation suivi correspond dans ce cas à la description de la figure 3.6b. Ce choix a été fait de manière à ralentir l’opération de sublimation afin de pouvoir suivre les modifications de la bande AmI à différentes proportions de glace. L’intensité intégrée de cette bande située vers 2300 cm^{-1} , est considérée représentative de la proportion de glace dans les volumes analysés, avec une précision acceptable compte tenu des caractéristiques de la bande (forte intensité, faible largeur). La figure 3.10 montre les spectres Raman enregistrés simultanément dans les deux régions (AmI, étirements OD) à différentes étapes du séchage primaire. L’intensité intégrée de la bande à 2300 cm^{-1} avant

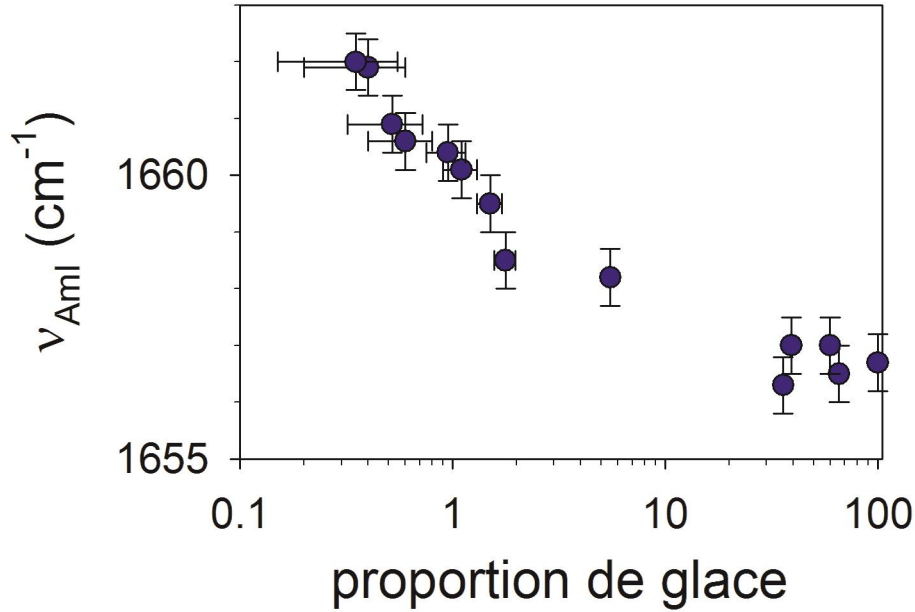


FIGURE 3.11 – Évolution de la fréquence de la bande AmI en fonction de la proportion de glace durant la cinétique de sublimation.

le début de l'opération de pompage, a été considérée comme représentant une proportion de 100% de glace dans le volume de produit congelé analysé ($= 100 \mu m^3$). L'évolution du spectre de la bande AmI présente des modifications uniquement à de très faibles concentrations de glace ($< 5 \%$). Le graphe de la fréquence de la bande AmI en fonction de la proportion de glace permet d'obtenir une courbe de dénaturation, représentée sur la figure 3.11. Il est clair à la vue des figures 3.10 et 3.11 que ce n'est pas la sublimation de la glace en grand volume qui provoque les modifications spectrales dans la région de la bande AmI. L'examen de la figure 3.7b ne montre aucun changement significatif de l'intensité, des bandes de vibration des groupements OD qui appartiennent à la protéine et qui proviennent des échanges isotopiques entre l'eau lourde et la surface de BLG, entre la fin du séchage primaire et la fin du séchage secondaire. Ceci indique que l'eau liée à la protéine a été éliminée, par entraînement dû au pompage lors du séchage primaire. Il est donc probable que l'origine des modifications de structure ne soit pas dû à la sublimation de la glace, mais plutôt à la désorption de l'eau liée à la protéine, non transformée en glace pendant la congélation. Il est logique que cette désorption de l'eau liée se produise en fin d'étape de sublimation, lorsque la plus grande partie de la glace a été sublimée. Les analyses effectuées sur le chymotrypsinogène ont révélé les mêmes informations. Les modifications structurales provenant de l'étude de la bande amide I sont détectées en fin de sublimation de la glace et, aucune modification supplémentaire n'est observée pendant le séchage secondaire. La figure 3.12, sur laquelle sont représentés les spectres après les étapes de congélation et de séchage primaire, montre un élargissement systématique des bandes AmI, AmIIIa-f et AmIII'a-f, accompagnés de glissements de fréquence. On notera que l'étude de ces deux dernières bandes permet de discriminer les transformations

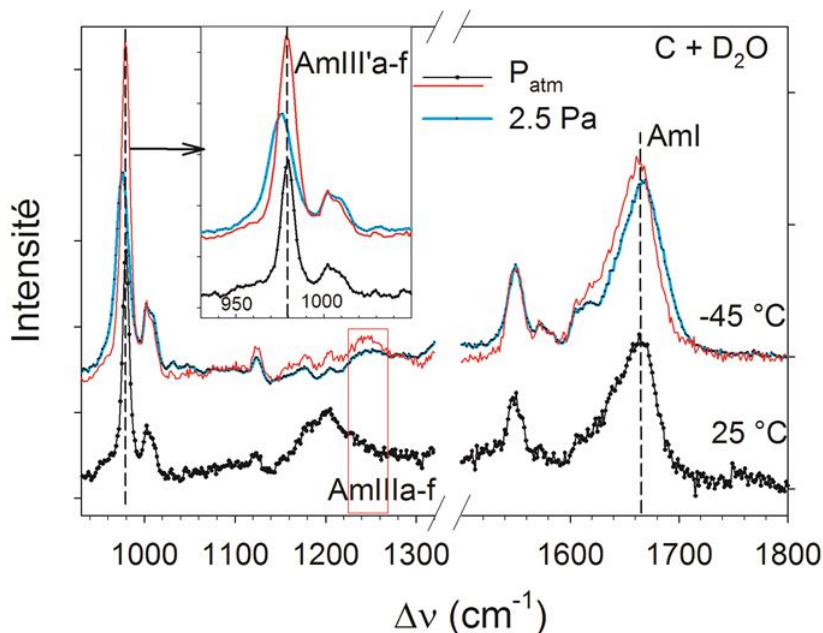


FIGURE 3.12 – Spectre Raman de la solution chymotrypsinogène/ D_2O à température ambiante (avant le début de la procédure de lyophilisation) comparé à ceux enregistrés après congélation ($-45^\circ C$, P_{atm}) et après séchage primaire ($-45^\circ C$, $2.5 Pa$).

structurales des feuillets exposés au solvant, en surface de la protéine (bande AmIII'a-f résultant d'échanges isotopiques) de celles des feuillets non exposés au solvant (bande AmIIIa-f). L'étude de la lyophilisation du lysozyme conduit à une différence notable par rapport aux études menées sur la β -lactoglobuline et le chymotrypsinogène, correspondant à des modifications spectrales détectées pendant le séchage secondaire pour le lysozyme et non-observées dans les deux premiers cas. Les spectres collectés dans la région de la bande AmI et dans la région des vibrations d'étirement des liaisons OD sont représentés sur la figure 3.13. Cette figure montre qu'à la fin de la cinétique de sublimation (0% de glace à $-45^\circ C$) l'intensité des bandes d'étirement OD est plus importante, et que la bande AmI est moins décalée, qu'après le séchage secondaire ($40^\circ C$). Ces observations montrent qu'au moins une partie des modifications structurales de la protéine est inhérente à la désorption de l'eau liée, non congelée pendant la première étape de la lyophilisation.

L'étude in-situ des cycles de lyophilisation de formulations protéine/ D_2O a donc révélé que :

- L'origine principale des modifications structurales était la désorption de l'eau liée à la protéine qui se produit en fin de cinétique de sublimation et après séchage secondaire ;
- La nature des modifications structurales est différente de celle correspondant à un dépliage de la structure secondaire de la protéine en solution aqueuse, soumise à différents types de stress (haute et basse températures, haute pression). Il s'agit plutôt d'une déformation des feuillets et hélices induite par la désorption d'eau ce qui engendre une désorganisation des arrangements structuraux.

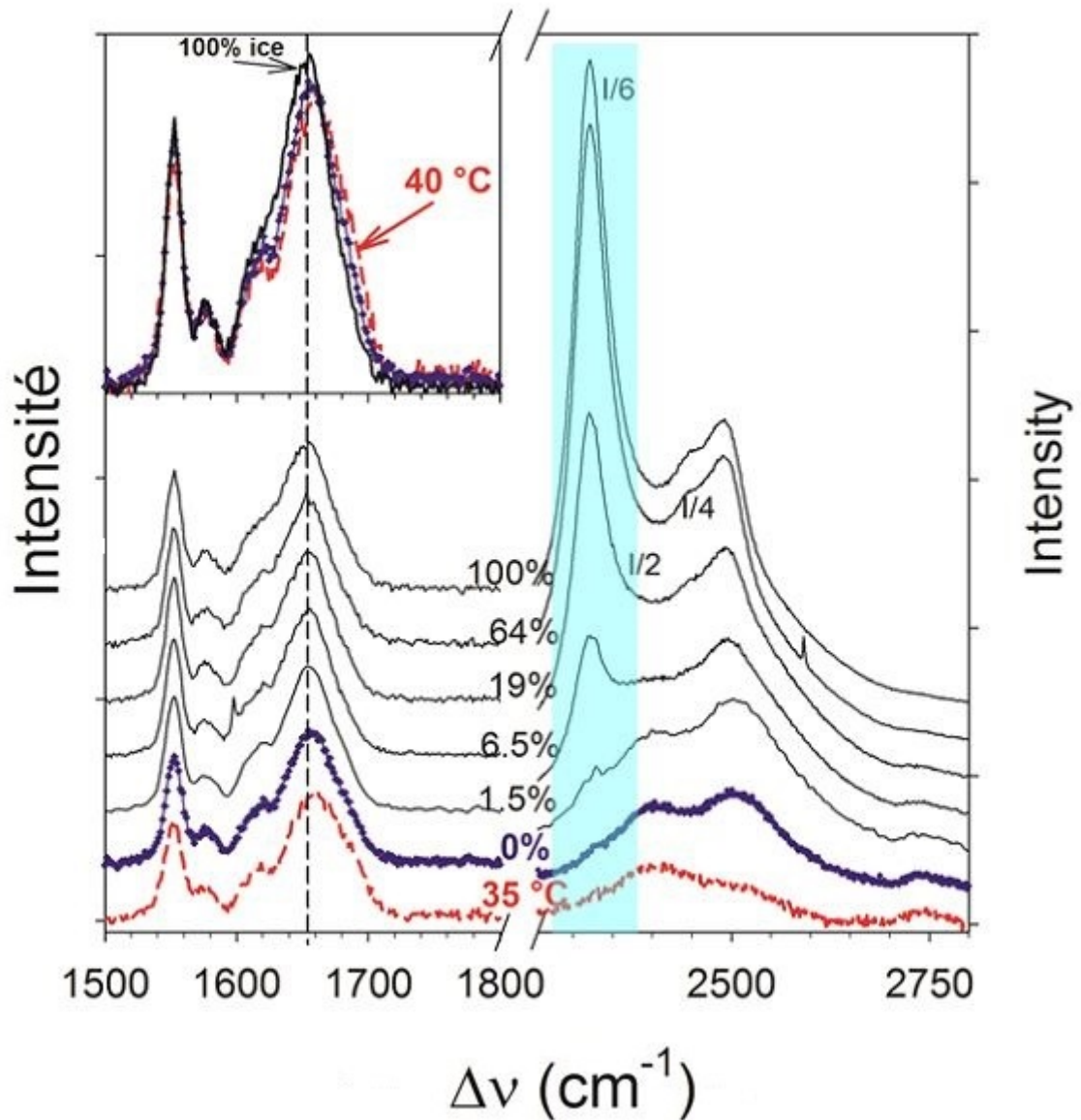


FIGURE 3.13 – Évolution du spectre Raman d'une formulation (lysozyme + D_2O) dans les régions de la bande AmI et des vibrations intramoléculaires d'étirement des liaisons OD pendant les séchages primaire et secondaire. Le pourcentage de glace reporté sur la figure est déterminé par le calcul de l'intensité intégrée de la bande fine distinctive de la glace hexagonale dans la région coloriée en bleu. L'insert situé dans le coin supérieur gauche de la figure représente la superposition de la bande AmI avant le début de la sublimation de la glace (100% de glace à -45 °C), après sublimation de la glace (0% de glace à -45 °C) et après séchage secondaire (40 °C).

3.4 Lyophilisation de formulations protéine/eau/tréhalose

3.4.1 Mesure de la température T_g'

Comme nous l'avons vu dans la section 1.2, afin d'éviter un phénomène d'effondrement ou « collapse », et de favoriser un phénomène de dénaturation via une mobilité moléculaire trop importante, la température du produit (T_p) ne doit pas être supérieure à la température de « collapse » (T_c). Cette dernière dépend de la composition de la formulation, et principalement des agents bioprotecteurs utilisés. La température T_c est généralement de 2 degrés plus basse que T_g' . Pour éviter les dommages que peut subir un lyophilisat au niveau de la structure de la protéine (dénaturation), la détermination de la température T_g' d'une formulation à lyophiliser est importante. Différentes formulations ont été analysées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) afin de déterminer les valeurs T_g' . La température des échantillons a d'abord été équilibrée à -70 °C, puis augmentée (rampe de 10 °C/min) jusqu'à 0 °C (*Voir annexe*). La mesure de la température T_g' a été réalisée pour différentes formulations protéine-sucres-eau. Nous avons d'abord préparé des solutions tréhalose/eau à différentes concentrations en tréhalose : 10%, 20% et 30% (p/p) auxquelles nous avons ajouté la protéine (BLG) de manière à ce que le rapport en poids tréhalose/BLG soit égal à 2/1. Les formulations de tréhalose pur et de BLG pure contiennent, respectivement, en masse 10% de tréhalose/eau et 10% de BLG/eau. Les thermogrammes sont présentés sur la figure 3.14a et la dérivée du signal a été tracée sur la figure 3.14b afin de mieux visualiser les variations de T_g' . La mesure de T_g' a également été réalisée pour des formulations protéine-sucres-eau à différents rapports en poids sucres/protéine. Les résultats sont reportés sur la figure 3.15. Les résultats de l'analyse DSC (figures 3.14 et 3.15 et tableau 3.1) montrent que la température T_g' du mélange ternaire dépend essentiellement du rapport massique Tréhalose/BLG, et que sa valeur est systématiquement supérieure à la valeur de T_g' du mélange binaire (eau/Tréhalose). Il est donc nécessaire qu'un cycle de lyophilisation s'opère au-dessous de -30 °C pour éviter tout risque d'effondrement et de dénaturation. La figure 3.15 indique qu'il est important d'utiliser (à l'échelle industrielle) la concentration minimum de tréhalose pour stabiliser la protéine durant la lyophilisation, de manière à maintenir une valeur de T_g' la plus haute possible et donc à limiter la durée de la cinétique de sublimation de la glace.

Formulation	T_g' (°C)
β -lactoglobuline	ND
Tréhalose- β -lactoglobuline 1-3	-21.5
Tréhalose- β -lactoglobuline 1-2	-22.8
Tréhalose- β -lactoglobuline 1-1	-24.3
Tréhalose- β -lactoglobuline 2-1	-26.2
Tréhalose- β -lactoglobuline 3-1	-26.9
Tréhalose	-30

TABLE 3.1 – Valeur du T_g' des différentes formulations BLG/Tréhalose

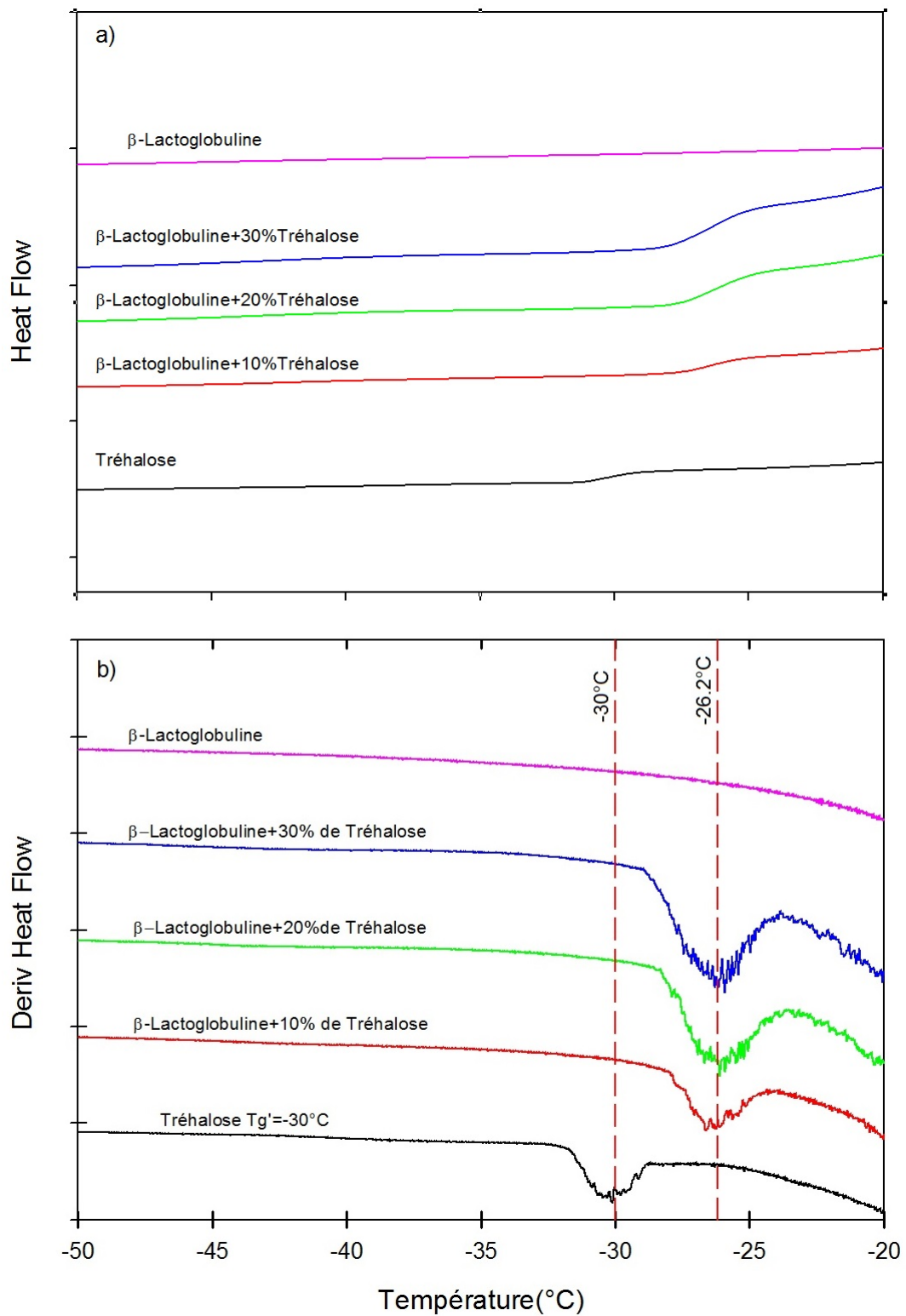


FIGURE 3.14 – Valeurs des T_g' des mélanges ternaires en fonction de la concentration en tréhalose pour les formulations BLG/Tréhalose/Eau avec un rapport massique Tréhalose/BLG égale à 2/1 : a) thermogrammes et b) dérivée du signal

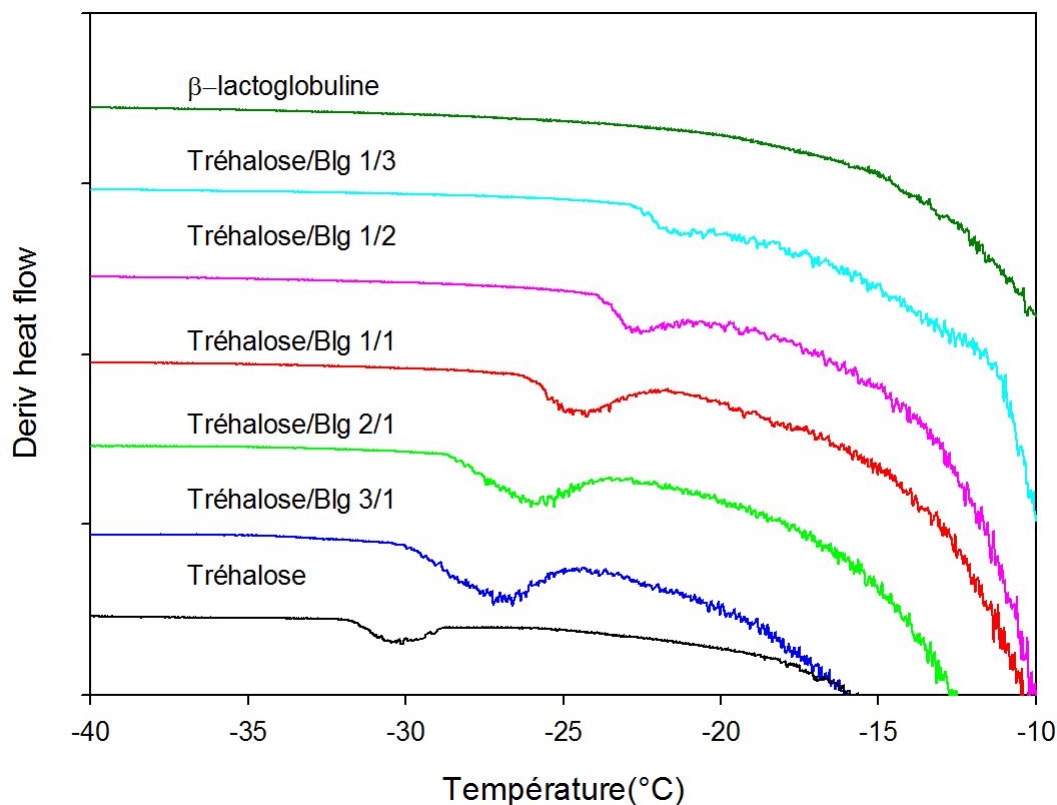


FIGURE 3.15 – Thermogrammes des valeurs des T_g' des mélanges ternaires en fonction du rapport massique Tréhalose/BLG

3.4.2 Analyse de la protéine par micro-spectroscopie Raman in-situ durant la procédure de lyophilisation

Les analyses des formulations à base de lysozyme et chymotrypsinogène en présence de 10, 20 et 30% de tréhalose (par rapport à la masse d'eau) ont été réalisées in-situ pendant un cycle de lyophilisation correspondant à la figure 3.6b. Dans ce cas, le séchage primaire s'opère à la température de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, ce qui permet d'éviter tout risque d'effondrement du lyophilisat. Compte tenu des résultats obtenus sur les formulations simples (protéine/ D_2O), ne révélant des transformations structurales qu'à partir du séchage primaire, les études réalisées en présence de tréhalose ont principalement focalisé sur les deux étapes de séchage.

Formulations à base de lysozyme

La figure 3.16 montre l'évolution de la bande AmI avec le spectre des vibrations d'étirement des liaisons OD, pour une formulation contenant 30% de tréhalose. Dans ce cas, le glissement de fréquence de la bande AmI n'est détectable qu'à partir du séchage secondaire, contrairement à ce qui est observé sur la figure 3.13 où un décalage est très clairement détecté à la fin du séchage primaire. On remarque à la fin du séchage primaire une intensité importante des bandes d'étirement OD en présence de 30% de tréhalose (figure 3.16), par rapport à celle observée en absence de tréhalose (figure 3.13). Ceci provient de la contribution de l'eau lourde formant la matrice vitreuse D_2O /Tréhalose,

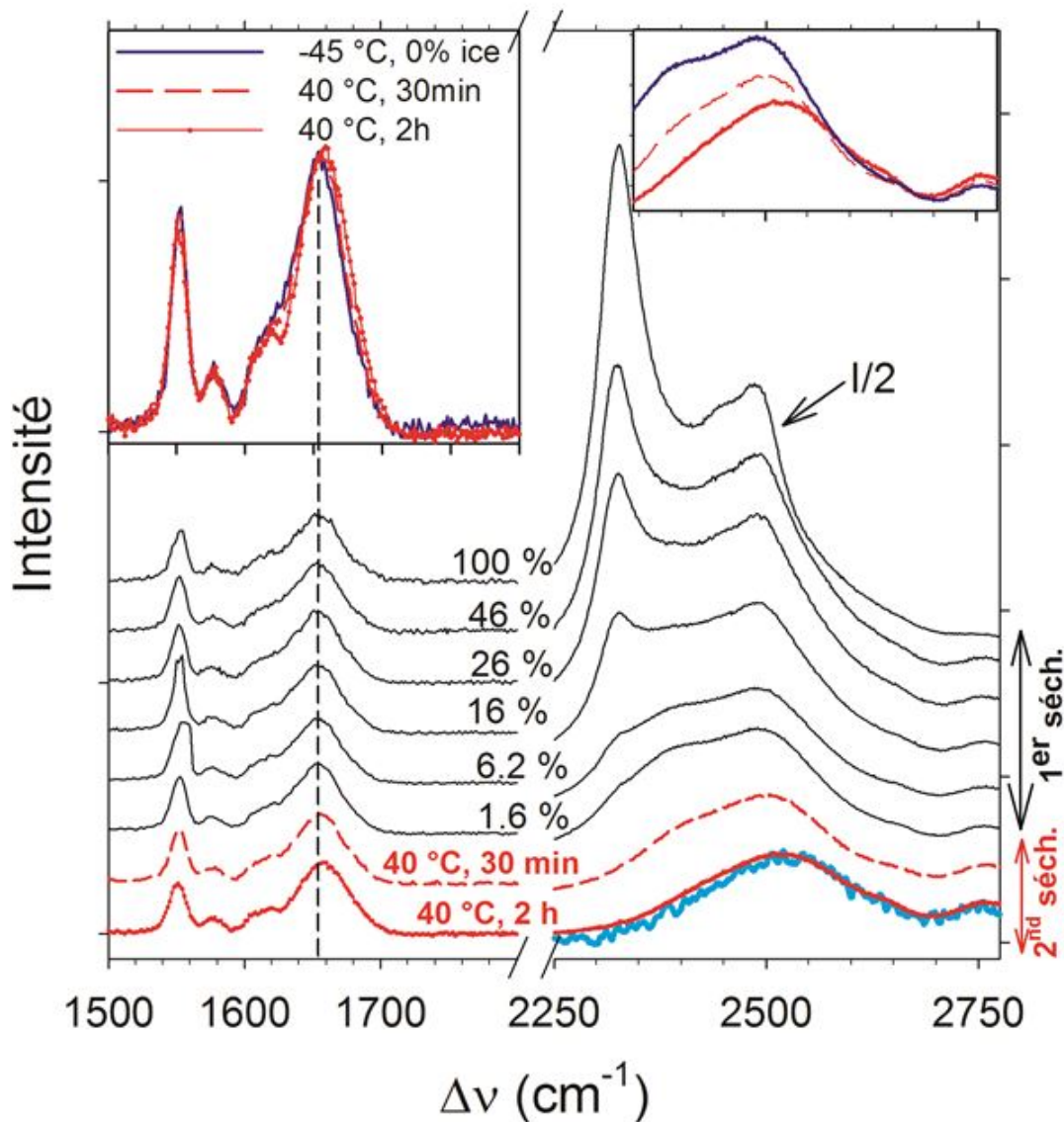


FIGURE 3.16 – Évolution du spectre Raman d'une formulation (lysozyme + D_2O + T30) dans les régions de la bande AmI et des vibrations intramoléculaires d'étirement des liaisons OD pendant les séchages primaire et secondaire. Le pourcentage de glace reporté sur la figure est déterminé par le calcul de l'intensité intégrée de la bande fine distinctive de la glace hexagonale vers 2300 cm^{-1} . Le spectre bleu représenté dans la région d'étirement OD correspond au spectre du tréhalose seul, après lyophilisation dans l'eau lourde. La superposition de ce spectre avec celui du produit lyophilisé montre qu'il n'y a aucune trace d'eau lourde liée à la protéine en fin de cycle de lyophilisation. L'insert dans le coin supérieur gauche montre la superposition de la bande AmI, en fin de cinétique de sublimation (0% de glace à -45 °C), en début de séchage secondaire (40 °C , 30 min) et en fin de séchage secondaire (40 °C , 2h). La superposition des spectres d'étirement OD aux mêmes étapes du cycle est représentée dans l'insert supérieur droit. Il reflète principalement l'élimination de l'eau lourde du mélange (D_2O + T30) inhérent au chauffage au-dessus de T_g' de la matrice vitreuse formée lors de l'étape de congélation.

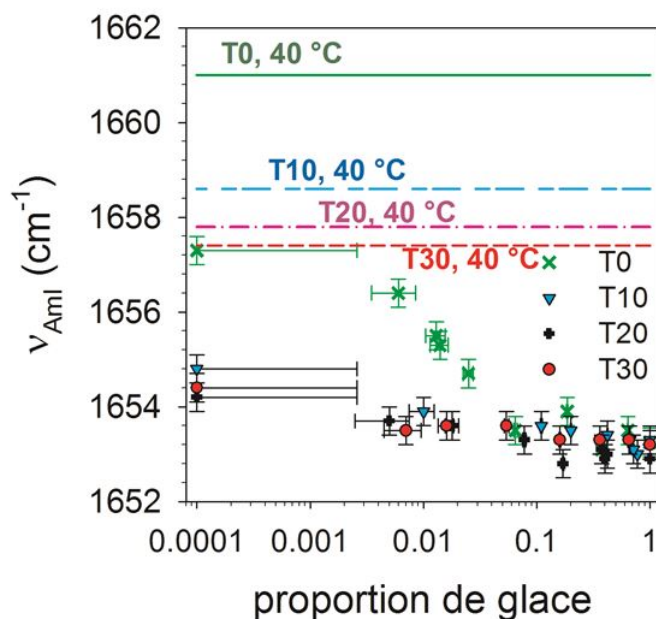


FIGURE 3.17 – Évolution de la fréquence de la bande AmI pendant la cinétique de sublimation de la glace lors du cycle de lyophilisation des solutions ($LYS + D_2O + T$) pour des concentrations en Tréhalose de 0, 10, 20 et 30% (T0, T10, T20 et T30) par rapport à la masse d'eau lourde. Les traits horizontaux repèrent les valeurs de la fréquence de la bande AmI, après le séchage secondaire (à 40 °C) de chaque formulation.

et donc non congelée pendant la première étape du cycle. Le séchage secondaire a pour principal objectif d'éliminer cette eau qui forme un mélange liquide avec le tréhalose, lorsque la température est amenée à 40 °C (au-dessus de T_g^i) pour la dernière étape de séchage. Il est probable que ce séchage provoque également l'élimination de l'eau liée à la protéine et donc la déformation des édifices structuraux de la protéine. Afin de mieux évaluer l'influence du tréhalose sur la structure de la protéine pendant les deux étapes de séchage, les spectres de la bande AmI ont été affinés lors de ces deux étapes pour les formulations contenant 10, 20 et 30%. Les valeurs des fréquences de la bande AmI déterminées lors de la lyophilisation de formulations contenant du sucre peuvent être comparées à celles obtenues en absence de sucre. L'évolution de la fréquence de la bande AmI a été tracée en fonction de la proportion de glace pendant le séchage primaire sur la figure 3.17, et comparée à la fréquence en fin de cycle, pour une concentration de 0, 10, 20 et 30% de tréhalose. Le coefficient r , reflétant la similarité des spectres de la bande AmI par rapport à celui enregistré avant le séchage primaire a été calculé en fin de séchage primaire et secondaire en absence et en présence de 10, 20 et 30% de tréhalose. Les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 3.2.

Il est observé sur le tableau 3.2 et la figure 3.17 que la présence de tréhalose (même en faible concentration) stabilise la structure de la protéine lors des séchages primaire et secondaire. La région des bandes amide III donne la possibilité d'analyser l'effet du tréhalose sur les parties non exposées (correspondant aux groupements atomiques impliqués dans les bandes AmIII) et les parties exposées au solvant (bandes AmIII'). Les figures 3.18a et 3.18b montrent les modifications spectrales des bandes AmIIIa-f et AmIII'a-f en

Lysozyme	+D ₂ O	+D ₂ O+T10%	+D ₂ O+T20%	+D ₂ O+T30%	+D ₂ O+S30%
1 ^{er} séchage	0.92	0.95	0.97	0.97	0.97
2 nd	0.85	0.9	0.91	0.91	0.91
séchage					

TABLE 3.2 – Valeurs du coefficient r , traduisant le degré de similarité entre les spectres des solutions Lysozyme/D₂O/Trehalose, enregistrés après les première et seconde étapes de séchage, et celui enregistré avant séchage à -45 °C. La dernière colonne correspond à la formulation Lysozyme/D₂O/Sucrose, pour une concentration de 30% de sucrose.

absence et en présence de 30% de tréhalose pendant le séchage primaire. La figure 3.18a montre qu'en absence de tréhalose les bandes AmIII-h et AmIII'a-f sont décalées vers les basses fréquences et élargies. En présence de 30% de tréhalose, les bandes sont moins élargies et moins décalées en fréquence (figure 3.18b), indiquant un effet stabilisant du tréhalose sur les parties exposées et non exposées au solvant, avec un effet plus marqué sur les parties exposées. Une formulation de lysozyme dans laquelle le tréhalose a été substitué par du sucrose (en concentration de 30%) a également été analysée. Les valeurs du coefficient r sont reportées dans le tableau 3.2, et ne montre aucune différence significative par rapport au tréhalose, à chaque fin d'étape de séchage.

Formulations à base de chymotrypsinogène

Dans le cas de cette protéine dont la structure secondaire est principalement composée de feuillet β , la bande AmIII'a-f située vers 980 cm^{-1} , est très sensible aux échanges isotopiques. Cette bande est la plus intense du spectre de la solution (C + D₂O) dans la région 800 – 1800 cm^{-1} et subit des modifications importantes et facilement quantifiables pendant le séchage primaire (figure 3.12). La figure 3.19 montre qu'après le séchage primaire, les modifications spectrales (élargissement et décalage en fréquence) de la bande AmIII'a-f sont moins importantes en présence de 30% de tréhalose, alors que le profil de la bande AmIIIa-f n'est quasiment pas modifié. Durant le séchage secondaire, des modifications significatives sur la bande AmIII'a-f et à un degré moindre sur la bande AmI, sont observées pendant le séchage secondaire, alors que la bande AmIIIa-f reste toujours pratiquement intacte. Ces observations sur les bandes AmIII'a-f et AmI sont reportées sur les figures 3.20a et 3.20b correspondant à l'évolution des fréquences des bandes pendant le séchage primaire et en fin de séchage secondaire. Le tableau 3.3 présente les valeurs du coefficient r , correspondant au degré de similarité entre les spectres de la bande AmI enregistrés à la fin des séchages primaire et secondaire et celui enregistré à -45 °C avant le début de la cinétique de sublimation. Le tableau 3.3 montre qu'une très faible concentration de tréhalose (10%) induit un effet stabilisant de manière significative lors des deux étapes de séchage de la protéine. Une augmentation de 10 à 20% de la concentration en tréhalose n'a pas d'effet notable. Les observations faites sur le profil des bandes AmIIIa-f et AmIII'-f indiquent qu'en présence de tréhalose, les parties non exposées au solvant sont protégées, et que les parties exposées au solvant subissent également des transformations toutefois, moins importantes qu'en absence de tréhalose. Le tréhalose a donc une action

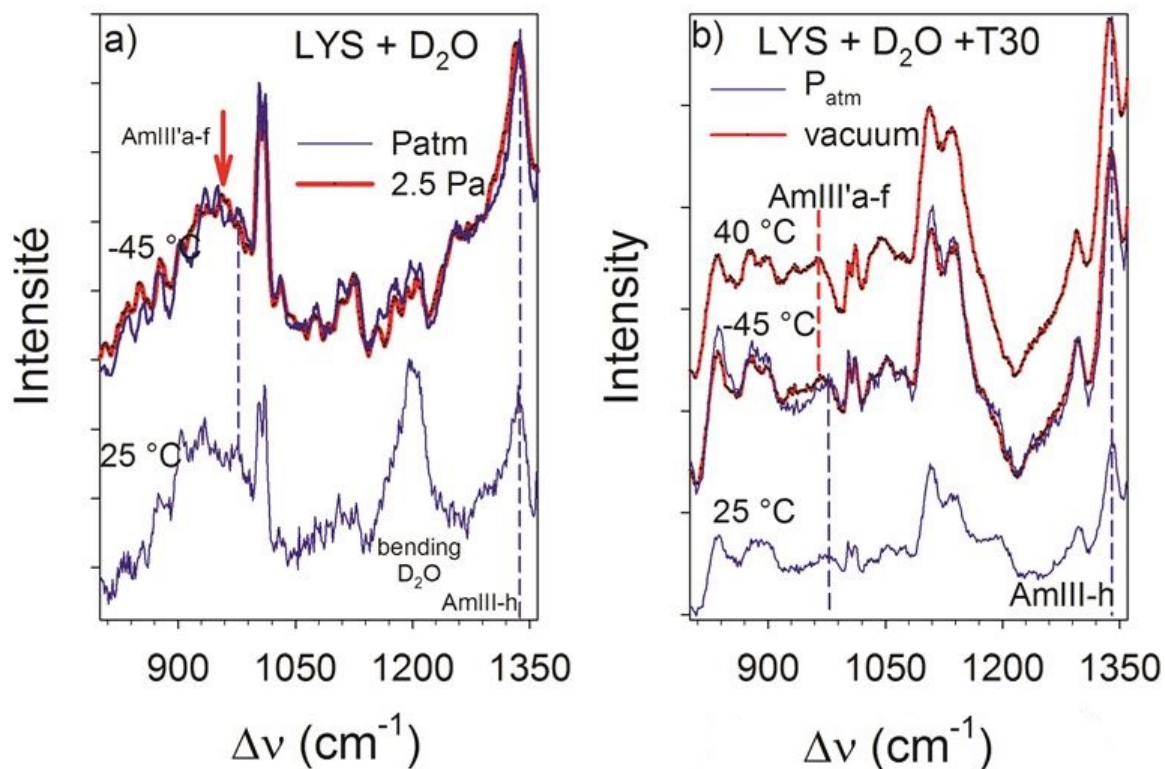


FIGURE 3.18 – Spectres Raman dans la région des bandes amide III à différentes étapes d'un cycle de lyophilisation a) De la formulation (LYS + D₂O) à température et pression ambiantes (état liquide) et à l'état solide au début (trait bleu) et à la fin (trait rouge) du séchage primaire b) De la formulation (LYS + D₂O + T30) à l'état liquide (conditions ambiantes) et à l'état solide : avant et après séchage primaire à -45 °C, puis après séchage secondaire à 40 °C.

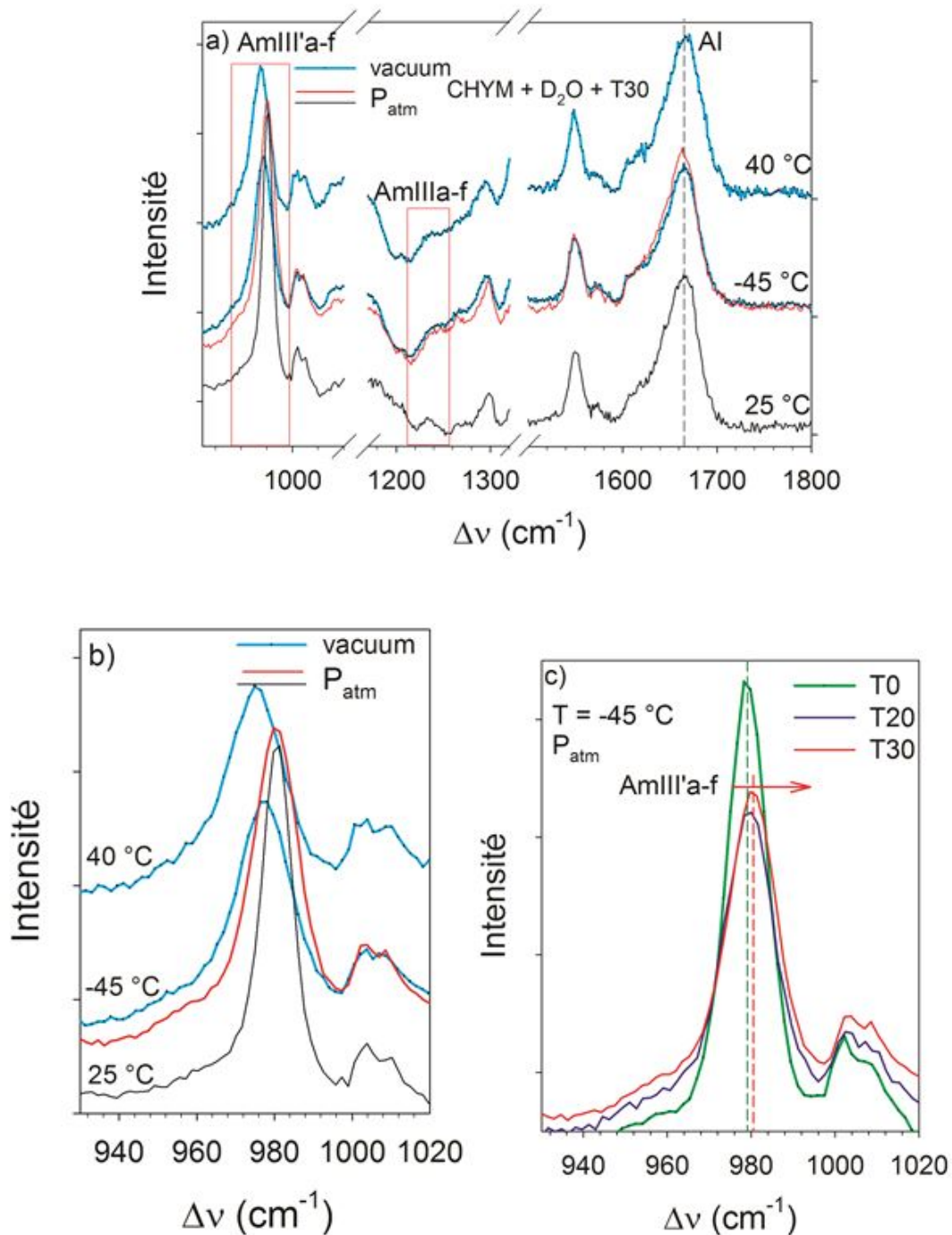


FIGURE 3.19 – Panel de spectres dans la région des bandes amide I et III de formulations à base de chymotrypsinogène a) Spectres de la formulation (C + D₂O + T30) à chaque étape du cycle de lyophilisation dans la région complète des bandes amide b) Agrandissement de la région spectrale correspondant à la bande AmIII'a-f, afin de montrer clairement les modifications de cette bande c) Même agrandissement sur la bande AmIII'a-f pour montrer les modifications de la bande en fonction de la concentration en tréhalose dans la formulation.

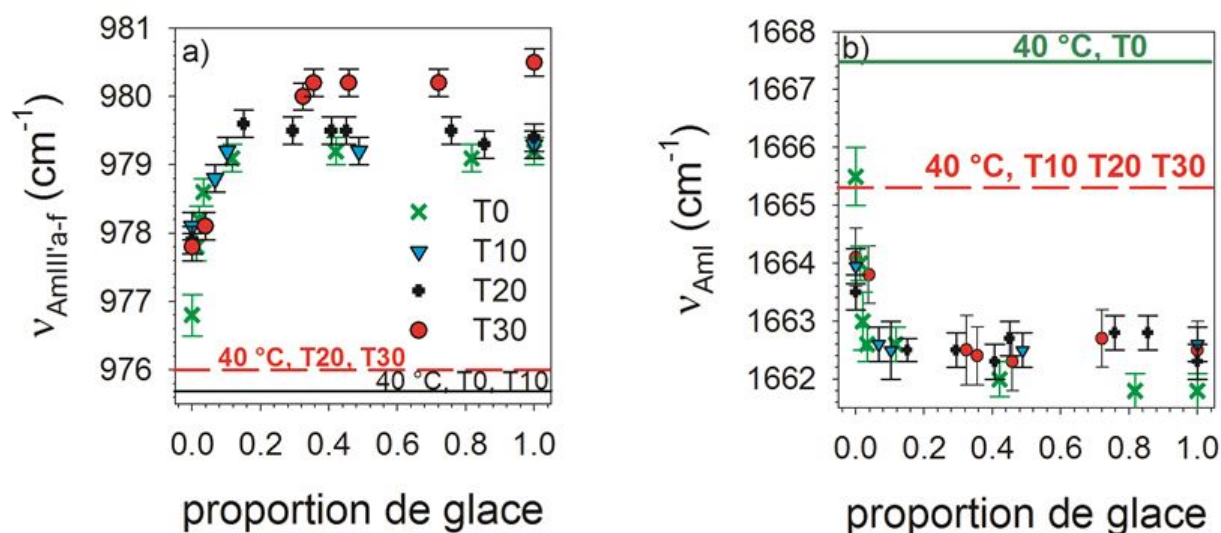


FIGURE 3.20 – Évolution de la fréquence de la bande AmIII'a-f a), et de la bande AmI b) pendant la cinétique de sublimation de la glace lors du cycle de lyophilisation des solutions (CHYM + D₂O + T) pour des concentrations en Tréhalose de 0, 10, 20 et 30% (T0, T10, T20 et T30) par rapport à la masse d'eau lourde. Les traits horizontaux repèrent les valeurs de la fréquence des deux bandes, après le séchage secondaire (à 40 °C) de chaque formulation

protectrice sur l'ensemble de la structure de la protéine. On remarque sur la figure 3.19c qu'à -45°C et Patm, l'addition de tréhalose dans la formulation induit à la fois un léger élargissement et un glissement de la bande AmIII'a-f vers les hautes fréquences. Ces observations sont détectables sur cette bande car elle est relativement fine et isolée. De ce fait de très légères modifications spectrales ($\Delta\nu \sim 1 \text{ cm}^{-1}$ pour T30) sont visibles sans traitement de données (procédure d'ajustement). Le glissement de fréquence indique une rigidification de la protéine en fonction de la concentration de tréhalose visible sur la figure 3.19a, principalement pour la concentration de 30%.

Chymotrypsinogène	+D ₂ O	+D ₂ O+T10%	+D ₂ O+T20%	+D ₂ O+T30%
1 ^{er} séchage	0.88	0.97	0.97	0.97
2 nd séchage	0.88	0.94	0.94	0.94

TABLE 3.3 – Valeurs du coefficient r , traduisant le degré de similarité entre les spectres des solutions Chymotrypsinogène/D₂O/Trehalose, enregistrés après les première et seconde étapes de séchage, et celui enregistré avant séchage à -45 °C

3.4.3 Analyse du mécanisme de stabilisation du lysozyme par le tréhalose par imagerie Raman

Afin de comprendre le mécanisme de stabilisation du tréhalose sur la protéine, des cartographies Raman ont été réalisées à la fin des étapes de congélation et de séchage primaire, sur une zone identique de $60 \times 60 \mu\text{m}^2$. Lors du chauffage de l'échantillon à 40 °C pour le séchage secondaire, les déplacements de matière sont trop importants pour pouvoir continuer d'analyser la même zone de l'échantillon. Les cartographies ont été

réalisées sur le spectromètre Renishaw équipé de la technologie d'imagerie hyper rapide Streamline. La zone de l'échantillon sélectionnée est balayée par ligne, et non en mode point par point comme il est d'usage pour une imagerie conventionnelle. La taille du spot étant estimée à $\varnothing = 1.1 \mu\text{m}$ (et $\Delta z = 8 \mu\text{m}$), un pas de $1.1 \mu\text{m}$ a été utilisé pour couvrir le domaine de $60 \times 60 \mu\text{m}^2$. 3248 spectres ont été enregistrés pendant le balayage en 57 minutes. L'objectif des cartographies Raman est :

- après congélation : analyser les distributions des molécules de tréhalose par rapport à celles du lysozyme et à la glace,
- après séchage primaire : toujours analyser les distributions des molécules de tréhalose par rapport à celles du lysozyme, et également détecter si la dégradation de la protéine est homogène.

La formulation à 10% de tréhalose a été choisie pour cette analyse, car le tableau 3.2 montre un faible effet stabilisant, permettant d'analyser des changements structuraux de la protéine. Ce mélange à 10% de sucre, représente une proportion massique 1/1 entre sucre et protéine, évitant ainsi des inhomogénéités de distribution d'espèces moléculaires liées aux disproportions présentes dans la formulation. La première cartographie réalisée après l'étape de congélation ($T = -45 \text{ }^\circ\text{C}$, P_{atm}) a consisté à enregistrer deux régions spectrales. La première est la région des vibrations d'étirement des liaisons OD représentée sur la figure 3.21a. La présence de sucre se traduit par la diminution de l'intensité I_{glace} de la bande fine distinctive de la structure hexagonale de la glace située vers 2300 cm^{-1} au détriment de l'intensité des bandes à plus haute fréquence. Le rapport d'intensité $I_{\text{glace}}/I_{\text{tot}}$ a donc été considéré comme étant représentatif de la teneur en tréhalose par rapport à celle de la glace. La région allant de 1250 à 1750 cm^{-1} (figure 3.21b) a été sélectionnée car elle permet d'analyser la structure de la protéine via la détermination de la fréquence de la bande AmI, en fonction de la teneur en tréhalose déterminée par le calcul de l'intensité intégrée de la bande située vers 1390 cm^{-1} distinctive du tréhalose. Après l'étape de congélation un premier panel d'images a été obtenu et présenté sur la figure 3.22. La figure 3.22a représente l'image optique du produit congelé, caractérisée par de larges bandes délimitées par des canaux relativement fins. La région sombre entourée d'une ellipse correspond à un amas de glace. L'image Raman de la figure 3.22b a été obtenue par le traitement des intensités (calcul du rapport $I_{\text{glace}}/I_{\text{tot}}$) décrit sur la figure 3.21a. On remarque que cette image Raman représentant la distribution des molécules de tréhalose par rapport à la glace, reproduit clairement la structure en bandes observée sur l'image optique. Les bandes de couleur jaunâtre sont des régions plus riches en glace, alors que les canaux, de couleur sombre, sont caractérisés par une plus forte teneur en tréhalose. La seconde image Raman, correspondant à la figure 3.22c, a été obtenue à partir du rapport d'intensité des bandes distinctives du tréhalose (vers 1390 cm^{-1}) et du lysozyme (bande AmI vers 1650 cm^{-1}) décrites sur la figure 3.21b. La structure de cette seconde image Raman est la réplique de la première. Dans ce cas les parties jaunâtres de l'image correspondent à des régions riches en lysozyme, alors que les canaux sont toujours des domaines à plus haute teneur en tréhalose. Les deux images Raman obtenues par deux méthodes d'analyse

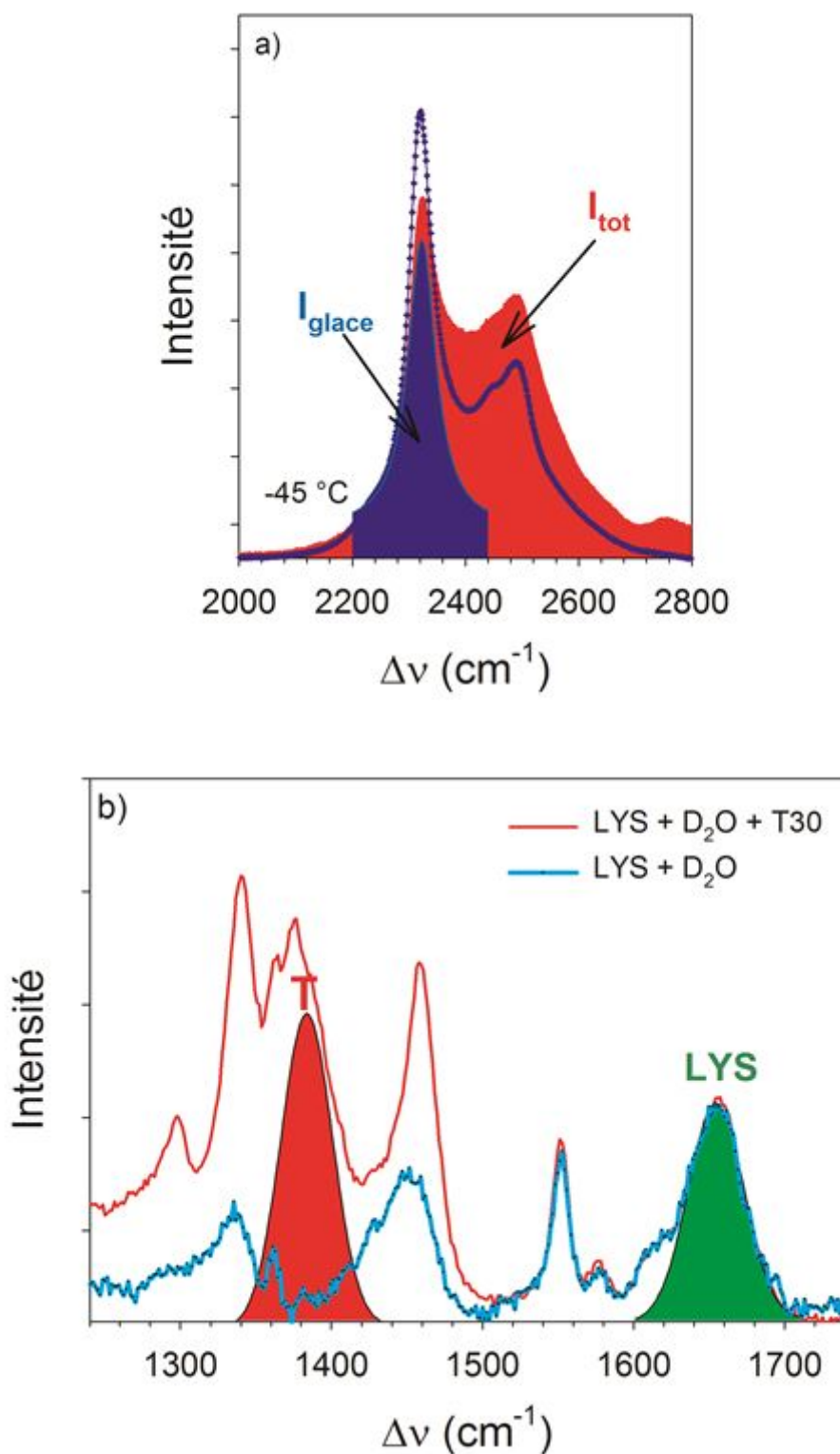


FIGURE 3.21 – Spectres Raman des formulations de lysozyme dissous dans l'eau lourde en absence et en présence de 30% de Tréhalose, utilisées pour obtenir les images Raman durant un cycle de lyophilisation a) Dans la région des vibrations d'étirement des liaisons OD; les aires coloriées en bleu et rouge ont été utilisées pour déterminer les distributions des molécules d'eau et de tréhalose l'une par rapport à l'autre b) Dans la région des bandes amide; les aires coloriées en rouge et vert ont été utilisées pour déterminer les distributions des molécules de tréhalose et de lysozyme l'une par rapport à l'autre. La fréquence de la bande AmI a été utilisée pour obtenir l'image Raman reflétant le degré de dénaturation de la protéine dans la zone analysée.

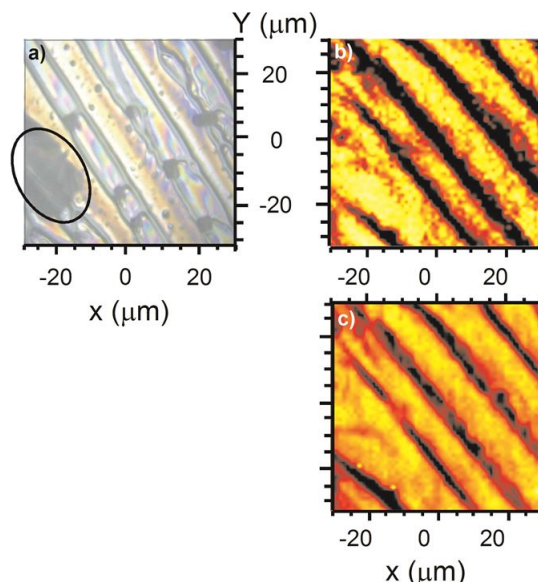


FIGURE 3.22 – *Panel d’images obtenues après l’étape de congélation de la solution (LYS + D2O + T10) a) Image optique; l’ellipse entoure une région sombre correspondant à un amas de glace b) Image Raman reflétant les distributions de molécules d’eau et de molécules de tréhalose l’une par rapport à l’autre; plus la couleur est claire plus la zone est riche en eau, plus la couleur est sombre plus la zone est concentrée en sucre c) Image Raman reflétant les distributions de molécules de lysozyme et de molécules de tréhalose l’une par rapport à l’autre; plus la couleur est claire plus la zone est riche en lysozyme, plus la couleur est sombre plus la zone est concentrée en sucre.*

différentes sont cohérentes entre elles et également avec l’image optique. Elles indiquent de larges domaines principalement constitués de glace et protéine, séparés par des zones plus étroites à plus forte teneur en tréhalose. Les régions jaunâtres riches en lysozyme correspondent à une concentration 1.5 fois plus élevée que dans les domaines de couleur sombre. Cette répartition des trois espèces moléculaires (glace, protéine et tréhalose) dans le produit congelé suggère que le tréhalose est préférentiellement exclu de la surface de la protéine dans l’état initial de la formulation (état liquide), en adéquation avec l’hypothèse de l’hydratation préférentielle proposée par Timasheff [26]. A la fin de l’étape de séchage primaire, un nouveau panel de trois images est présenté sur la figure 3.23. La figure 3.23a représente toujours l’image optique, qui apparaît plus homogène qu’en fin de congélation en présence de glace (figure 3.22a). Les deux images Raman correspondant aux figures 3.23b et 3.23c ont été obtenues par traitement du spectre présenté sur la figure 3.21b. Ces figures montrent une zone sombre entourée d’une ellipse, correspondant à l’amas de glace révélé par l’image optique de la figure 3.22a. Après sublimation de la glace, cette zone ne contient quasiment plus de matière, engendrant une défocalisation du faisceau laser incident et un signal Raman non exploitable. Le traitement des intensités des bandes caractéristiques du tréhalose et du lysozyme conduit à la détermination de la distribution des espèces moléculaires (protéine et sucre) l’une par rapport à l’autre, représentée sur la figure 3.23b. Cette image Raman peut être considérée comme une réplique des images Raman des figures 3.22b et 3.22c; les différentes zones étant moins contrastées, ce qui indique une réduction des inhomogénéités. Les larges domaines jaunâtres correspondent

toujours à des zones riches en lysozyme, alors que le tréhalose est plus concentré dans les canaux étroits. La seconde image Raman représentée sur la figure 3.23c, est obtenue à partir de la détermination de la position de bande AmI en utilisant la procédure de fit du logiciel d'imagerie. L'image reproduit toujours la structure de bandes obtenue à l'étape de congélation du produit. Les zones plus claires correspondent à des fréquences plus élevées de la bande AmI. Les deux images Raman 3.23b et 3.23c indiquent donc que les zones à plus haute teneur en tréhalose sont des domaines où la protéine subit les transformations les plus importantes. L'écart de fréquences $\Delta\nu$ (AmI) le plus important, reflétant les zones les plus contrastées de l'image 3.23c, est d'environ 0.7 cm^{-1} , pour un décalage moyen de 1.6 cm^{-1} par rapport à la position correspondant à l'état natif (voir figure 3.17). Cette tendance montre que l'hypothèse de « remplacement », selon laquelle la substitution de liaisons H entre eau et protéine par des liaisons H entre tréhalose et protéine stabiliserait la structure de la protéine, n'est pas en adéquation avec nos résultats. En résumé, les analyses de cartographie Raman ont montré une inhomogénéité de distribution des espèces moléculaires, dès l'étape de congélation. Le produit congelé présente une structure en bandes correspondant à des domaines où la protéine coexiste principalement avec la glace, séparés par des zones à plus haute teneur en tréhalose. Cette structure, résultant d'interactions préférentielles entre la protéine et l'eau est conservée après sublimation de la glace. La même distribution entre lysozyme et tréhalose est observée après sublimation de la glace ce qui permet de montrer que les zones à plus haute teneur en tréhalose correspondent aux régions où la protéine est plus dénaturée. Le modèle de remplacement des liaisons entre l'eau et la protéine par des liaisons entre tréhalose et protéine ne permet donc pas d'interpréter la stabilisation du lysozyme par le tréhalose lors d'un cycle de lyophilisation. La figure 3.19b montre que le tréhalose rigidifie la protéine, via la détection du léger mais significatif décalage de la bande AmIII'a-f vers les hautes fréquences. Cette rigidification peut expliquer la préservation de la structure de la protéine contre des déformations induites par la désorption des molécules d'eau liées à la protéine. Ces résultats sont en accord avec de récentes simulations de dynamique moléculaire [84] qui mettent également en évidence cet effet rigidifiant du tréhalose sur la protéine.

3.5 Analyse de la stabilité de la protéine lyophilisée au cours de vieillissements accélérés

Il a été montré précédemment, que l'influence d'un sucre dans une formulation protéique était importante pour stabiliser la protéine au cours d'un cycle de lyophilisation. Il est tout aussi important d'analyser l'influence du sucre pendant le stockage de la protéine. Plusieurs types de formulations à base de BLG, en absence et en présence de tréhalose, de sucrose et tréhalose/glycérol, ont été lyophilisés au cours d'un même cycle (similaire à la figure 3.6b) dans le lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D installé dans l'équipe INSERM U1008 à l'Université de Lille 2 (*Voir section 1.2*).

Les formulations à lyophiliser ont été préparées en trois étapes : i) En l'absence de

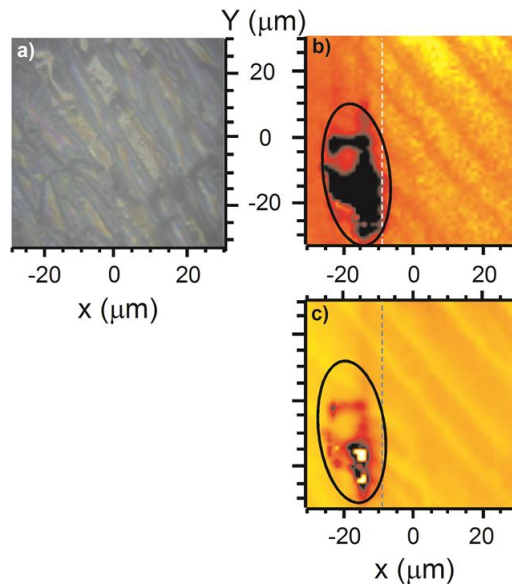


FIGURE 3.23 – *Panel d’images obtenues après l’étape de séchage primaire de la solution (LYS + D₂O + T10) a) Image optique b) Image Raman reflétant les distributions des molécules de lysozyme et des molécules de tréhalose l’une par rapport à l’autre ; plus la couleur est claire plus la zone est riche en lysozyme, et plus la couleur est sombre plus la zone est concentrée en sucre c) Image Raman reflétant le degré de dénaturation du lysozyme à la fin du séchage primaire ; plus la couleur est claire plus la fréquence de la bande AmI est élevée, et plus le degré de transformation de la protéine est important. l’ellipse sur les deux images Raman entoure la région correspondant à l’amas de glace visualisé sur la figure 3.22a au même endroit. Après sublimation de la glace, la faible quantité de produit engendre une défocalisation importante du faisceau laser incident, rendant le signal Raman inexploitable dans cette région.*

bioprotectant, la formulation à lyophiliser a été préparée par dissolution de la BLG dans H₂O à T = 23 °C, ii) En présence de tréhalose ou de sucrose, une solution Tréhalose/H₂O et sucrose/H₂O, à 30% p/p, ont été préparées en premier à T = 23 °C, ensuite la protéine a été ajoutée, iii) En présence de glycérol (Gly), le mélange Tréhalose/H₂O (30% p/p) a d’abord été préparé à T = 23 °C, ensuite, une concentration de 5% en poids en glycérol a été ajoutée au mélange Tréhalose/H₂O, et enfin, la protéine a été ajoutée. Pour toutes les formulations, une concentration en protéines de 10% en masse par rapport à la masse des mélanges tréhalose/H₂O, sucrose/H₂O et tréhalose/Glycérol/H₂O a été utilisée. Avant lyophilisation, les solutions ont été agitées dans un agitateur Eppendorf à température ambiante (23 °C) pendant 1 h. L’étude de stabilité des formulations lyophilisées a été effectuée au moyen d’une étude de vieillissement accéléré à une température de 40±2°C et à 70±5% d’humidité résiduelle [94]. Les formulations ont été conservées au cours du temps dans une étuve. L’humidité résiduelle a été obtenue par évaporation naturelle d’un réservoir d’eau, le taux d’humidité de 70±5% est obtenu en ajustant la surface d’échange entre l’eau et l’air confiné dans l’enceinte. La température est obtenue à l’aide d’une résistance électrique chauffante branchée à un potentiomètre. L’humidité résiduelle et la température ont été mesurées au milieu de l’étuve à l’aide d’un capteur d’humidité et de température «rotonic». Les évolutions du spectre de la bande AmI en

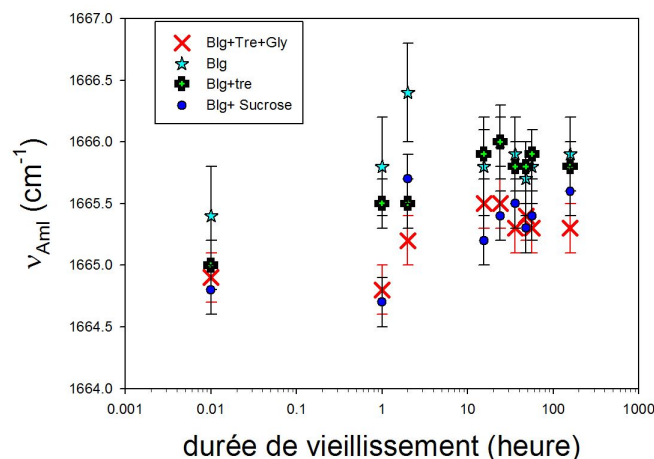


FIGURE 3.24 – Évolution de la fréquence de la bande AmI au cours du vieillissement accéléré pour les différentes formulations lyophilisées

fonction du temps sont représentées pour les quatre formulations étudiées sur la figure 3.24. En absence d'additifs bioprotecteurs, le profil de la bande AmI apparaît indépendant du temps. La procédure d'affinement habituelle du profil de la bande AmI, permet de déterminer la fréquence de la bande AmI. Son évolution en fonction du temps est tracée sur la figure 3.25. Cette figure montre effectivement que la fréquence reste relativement stable par rapport à celle déterminée à la fin du cycle de lyophilisation. Ceci indique que les modifications de structure de la protéine se sont principalement produites pendant le processus de lyophilisation, induites par la désorption de molécules d'eau dans la première couche d'hydratation, en interagissant directement avec les résidus polaires de la surface de la protéine en fin de sublimation de la glace, et lors du séchage secondaire. En présence de bioprotecteurs (tréhalose, sucrose et mélange tréhalose/glycérol) un effet stabilisant significatif est observé. Celui-ci est clairement exacerbé en présence de glycérol, comme le montre les figures 3.24 et 3.25. L'effet bioprotecteur du tréhalose est probablement lié à sa capacité de réduire la flexibilité des protéines, et donc les amplitudes des mouvements atomiques de la protéine en accord avec l'étude précédente (Section 3.4). Bien que les positions de la bande Am I soient très voisines pour les produits lyophilisés en présence d'agents bioprotecteurs, on notera qu'en présence de sucrose la bande est systématiquement plus basse qu'en présence de tréhalose. Ceci semble indiquer que l'efficacité du sucrose serait sensiblement supérieure à celle du tréhalose lors du stockage de produits lyophilisés. L'addition d'une faible concentration de glycérol (5%) améliore l'effet stabilisant du tréhalose principalement au cours du stockage. Les études de simulation de dynamique moléculaire des mélanges tréhalose/glycérol/eau, menées dans le chapitre 4, ont montré que la présence du glycérol exacerbait l'effet antiplastifiant du tréhalose. La présence d'une faible concentration en glycérol (5%) permettait d'améliorer la compacité moléculaire du tréhalose en raison d'une création d'un réseau de fortes liaisons hydrogène [87], conduisant à la suppression de la dynamique du système et, par conséquent, à l'amélioration de la capacité du tréhalose de réduire la flexibilité des protéines.

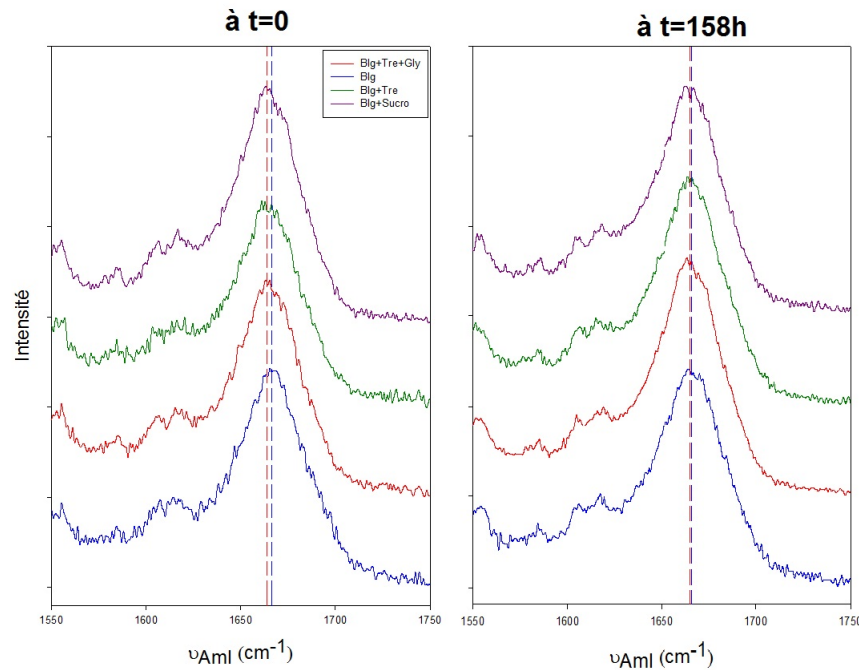


FIGURE 3.25 – Panel de spectres dans la région de la bande amide I au cours du vieillissement accéléré pour les différentes formulations lyophilisées à base de BLG à $t=0h$ et à $t=158h$.

3.6 Influence de l'eau résiduelle

La teneur en humidité résiduelle après lyophilisation contrôle souvent la stabilité des protéines à long terme [103, 106]. La teneur en humidité d'une formulation protéique lyophilisée peut varier considérablement au cours du stockage en raison d'une variété de facteurs, tels qu'une mauvaise isolation, la cristallisation d'un excipient amorphe ou la libération de l'humidité d'un excipient hydrate [104]. L'eau peut affecter la stabilité des protéines à la fois indirectement en tant que moyen plastifiant ou directement en tant que réactif [105]. Nous avons mesuré la teneur en humidité de différentes formulations contenant protéine/sucre, en utilisant deux sucres (tréhalose et sucrose) à différentes concentrations, après l'étape de la dessiccation primaire et après une lyophilisation par analyse thermique gravimétrique (TGA) (*Voir annexe*). Les lyophilisations ont été réalisées à l'aide du lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D installé dans l'équipe INSERM U1008 à l'Université de Lille 2 (*Voir section 1.2*). Le cycle suivi est représenté sur la figure 3.6b. La figure 3.26 représente la teneur en eau présente dans les formulations exprimée en nombre de molécules d'eau par nombre de molécules de BLG, après l'étape de la dessiccation primaire (Dess 1) et après un cycle de lyophilisation (Lyoph). En absence de sucre, l'écart des teneurs en eau, présentes dans les formulations après l'étape de la dessiccation primaire (Dess 1) et après cycle de lyophilisation, montre que l'eau éliminée pendant l'étape du séchage secondaire est due à la désorption d'eau de la protéine. En présence de sucre (tréhalose et sucrose), cet écart représente la désorption de l'eau liée au sucre. Les résultats, obtenus après l'étape de la dessiccation primaire (Dess 1), montrent que l'addition de sucre (sucrose et tréhalose) augmenterait la teneur en eau

dans les produits lyophilisés. Ce résultat est dû à la capacité des sucres (notamment le tréhalose et le sucrose) à empêcher la cristallisation de l'eau, en raison d'une formation d'une matrice vitreuse contenant plus d'eau lorsque la concentration en sucre augmente. La mesure de la teneur en eau présente dans les produits lyophilisés après un cycle de lyophilisation indique que l'addition de sucre (tréhalose ou sucrose) augmenterait la quantité d'eau présente dans les formulations. Cette augmentation peut être attribuée à une étape de séchage secondaire pas assez poussée. En présence de sucre, l'étape du séchage secondaire doit avoir une plus longue durée qu'en absence de sucre en raison de la présence d'une plus grande quantité d'eau. Une seconde interprétation consiste à considérer que la présence de sucre assure une humidité résiduelle nécessaire à la stabilité de la protéine. Le sucre associé à l'eau résiduelle rigidifie la matrice Protéine-Sucre-Eau résiduelle, inhibant la dénaturation de la protéine en limitant les fluctuations dynamiques.

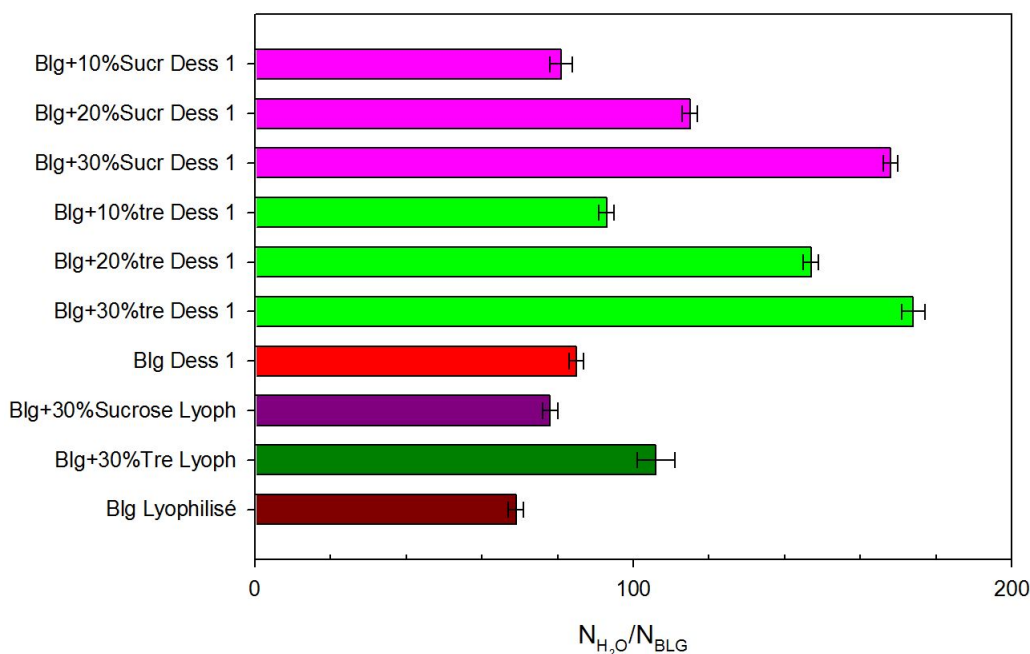


FIGURE 3.26 – Teneur en eau présente dans les formulations BLG-sucre (trehalose ou sucrose) lyophilisées, exprimée en nombre de molécules d'eau par nombre de molécules de BLG.

3.7 Conclusion

Les études de la dénaturation des protéines sous différents types de stress présentées dans cette thèse, montrent que la spectroscopie Raman est une technique qui permet de décrire les processus de dénaturation de manière très détaillée, lorsque des investigations à basses fréquences ($10 - 300cm^{-1}$) sont réalisées conjointement à l'étude du domaine de l'empreinte moléculaire allant de 800 à $1800cm^{-1}$. L'analyse des bandes amide permet de sonder la structure secondaire de la protéine, alors que le domaine basse fréquence permet d'accéder à des paramètres ($\langle u^2 \rangle$, densité d'états de vibration), souvent étudiés par diffusion neutronique, qui sonde la dynamique de la protéine et du solvant. Ce croise-

ment des données basse et haute fréquence est essentiel pour comprendre les mécanismes de transformation de phase associée au processus de dénaturation. La spectroscopie Raman présente l'avantage par rapport à la diffusion neutronique de pouvoir obtenir ce type d'informations lors d'une même expérience. Un second avantage, concerne la résolution expérimentale des spectres, qui est généralement meilleure pour la spectroscopie Raman. Cette technique présente toutefois des inconvénients par rapport à la diffusion neutronique. Le principal inconvénient résulte de la perturbation apportée par la fluorescence, qui rend difficile l'exploitation des spectres, et empêche dans certains cas l'obtention de spectres de bonne qualité, la fluorescence conduisant à la saturation du signal. Un second inconvénient, est l'impossibilité d'analyser la dynamique de la protéine seule, le signal basse fréquence résultant d'un processus de diffusion de nature cohérente, ne permettant pas de pouvoir séparer les contributions du solvant et de la protéine.

Le travail exposé dans cette thèse a montré que la spectroscopie Raman était bien adaptée pour suivre la stabilité d'une protéine pendant un cycle de lyophilisation. La structure secondaire de la protéine peut ainsi être sondée simultanément avec la proportion de solvant sous ses différentes formes (eau en grand volume, glace, eau résiduelle). Cette particularité a permis de déterminer que la source de stress qui engendrait des modifications structurales des différentes protéines étudiées était la désorption de l'eau liée à la protéine. L'analyse d'un large domaine spectral correspondant à la région « fingerprint » a montré que les changements structuraux engendrés par l'élimination de l'eau liée, correspondent à des déformations des entités structurales (hélices, feuillets, . . .) et non à des dépliements de la structure secondaire observés à basse ou haute température. La nature de la source de stress responsable des modifications structurales, indique qu'il est donc primordial de choisir des agents bioprotecteurs de type lyoprotecteur, pour stabiliser la protéine lors d'une procédure de lyophilisation. La comparaison des analyses menées lors de procédures de lyophilisation en présence ou non d'agents stabilisants (figures 3.17, 3.20) montre un effet important du tréhalose sur la stabilisation de la protéine en fin de cinétique de sublimation, à basse température lorsque la protéine est piégée dans une matrice vitreuse eau-sucre très rigide. Les analyses d'imagerie Raman ont apporté des informations importantes sur les interactions protéine-solvant et protéine-cosolvant en liaison avec le degré de dénaturation de la protéine. La mise en évidence, après l'étape de congélation, de zones à plus haute concentration en tréhalose séparant des domaines plus concentrés en protéine et glace, reflète l'existence d'interactions préférentielles entre la protéine et l'eau et donc l'exclusion du sucre autour de la surface de la protéine lorsque celle-ci est en solution. L'image Raman (figure 3.23) montrant la distribution de fréquences de la bande AmI, n'est pas cohérente avec l'hypothèse de remplacement de l'eau, selon laquelle la stabilisation de la protéine résulterait de la substitution des liaisons H entre protéine et eau par des liaisons H entre protéine et sucre. La rigidification de la protéine dans une matrice rigide eau-sucre serait le principal effet bioprotecteur des disaccharides pendant l'opération de lyophilisation. On notera que les performances du sucrose sont équivalentes à celles du tréhalose lors de la lyophilisation.

Les analyses réalisées lors de vieillissements accélérés de produits lyophilisés (β -lactoglobuline en présence ou non d'agents bioprotecteurs) ont montré que le tréhalose semble moins efficace que le sucrose pour stabiliser la protéine lors de son stockage. Cependant, l'ajout d'une faible quantité de glycérol, améliore considérablement son efficacité, indiquant que le mélange tréhalose/glycérol, pour de faibles concentrations en glycérol, apparait comme un système bioprotecteur prometteur pour le stockage de protéines après lyophilisation.

Chapitre 4

Etude des matrices bioprotectrices à base de tréhalose et de glycérol par simulation de dynamique moléculaire

Certaines protéines thérapeutiques sont généralement conservées dans des matrices vitreuses composées d'excipients stabilisants (Tréhalose, PVP,...). Ces matrices contrôlent leur stabilité à long terme pendant leur stockage, et donc leur utilisation potentielle dans les traitements médicaux [7]. Les sources de dégradations physiques et chimiques des protéines au cours de leur stockage sous forme de lyophilisat sont nombreuses : agrégation, oxydation, brunissement, ou réaction de Maillard, etc [7]. Dans des conditions de stockage convenables (températures basses, faible humidité) la composition des lyophilisats (bioprotectant, eau résiduelle) est le facteur déterminant de la stabilité des protéines pour un stockage à long terme [79]. Le rôle précis de certains paramètres, telle que l'humidité résiduelle présente dans les lyophilisats à la fin d'une lyophilisation et/ou le choix optimal des bioprotectants, restent encore mal compris [7]. Pour faire la lumière sur l'influence de ces paramètres, des simulations de dynamique moléculaire (DM) sur des matrices vitreuses composées de tréhalose, glycérol et d'un peu d'eau à différentes concentrations ont été effectuées. Dans ce chapitre, la problématique physique sera présentée en introduction puis les systèmes étudiés en simulation ainsi que les conditions choisies seront décrits. Les analyses effectuées sur :

- la densité et le volume libre des lyophilisats,
- les mouvements de petites amplitudes $\langle u^2 \rangle$,
- et le réseau de liaisons hydrogène seront détaillées.

Les principes des simulations DM seront décrits en annexe.

4.1 Introduction

Le stockage des molécules biologiques, tels que les tissus [74] et les cellules [75], est souvent réalisé par leur lyophilisation en présence de disaccharides. Le tréhalose s'est montré particulièrement efficace à cet égard. En effet, ce sucre présente un certain nombre

de propriétés remarquables. Le tréhalose possède la température de transition vitreuse la plus élevée ($T_g = 120^\circ\text{C}$) parmi les disaccharides [76]. Le coefficient de diffusion de l'eau dans le tréhalose est plus petit que dans les autres disaccharides (par exemple le sucrose) [77], et la liaison glycosidique de tréhalose, particulièrement stable, est résistante à l'oxydation [79]. Toutefois de récentes études ont démontré que l'addition d'une faible quantité d'un polyol de T_g plus faible, le glycérol ($T_g = -83^\circ\text{C}$), peut réellement améliorer la capacité du tréhalose à prolonger la durée de vie des enzymes lyophilisées en opposition avec le lien suggéré dans les hypothèses de « vitrification » entre T_g et stabilisation [79].

Dans leurs études, Cicerone et al [78] ont en effet étudié la stabilité des deux enzymes (peroxyde de raifort et alcool déshydrogénase de levure) contenues dans des matrices glycérol-tréhalose à différentes concentrations en mesurant les temps de désactivation des enzymes à diverses températures. Les temps de désactivation ont montré un maximum à une concentration en glycérol de 5% dans la matrice de tréhalose. Cicerone et al [85] ont aussi mené des investigations sur des mélanges binaires tréhalose-glycérol à différentes concentrations. Par diffusion neutronique incohérente inélastique, les auteurs ont pu étudier la dynamique rapide de ces mélanges (β_{fast}) aux faibles concentrations en glycérol et obtenir le déplacement quadratique moyen $\langle u^2 \rangle$ qui caractérise le mouvement des atomes d'hydrogène sur une échelle de temps de la picoseconde. Alors que la température de transition vitreuse T_g (relaxation α) des mélanges présente un comportement monotone et diminue avec l'addition de glycérol –effet plastifiant–, ils ont montré un comportement non monotone (effet antiplastifiant) du paramètre $\langle u^2 \rangle$ similaire à l'évolution observée pour les deux enzymes. Cicerone et al [85] ont observé la diminution des dynamiques locales $\langle u^2 \rangle$ aux temps courts à la même concentration en glycérol de 5% suggérant qu'il y a une corrélation entre la préservation des enzymes et la dynamique locale. Il a été suggéré toutefois par Averett et al [79] dans leurs simulations que l'eau résiduelle pouvait maximiser l'effet antiplastifiant du tréhalose lorsque la concentration en glycérol est de 5%.

Des travaux par simulation de dynamique moléculaire ont été aussi réalisés par De Pablo [97] et Dirama [87] afin d'obtenir des informations à l'échelle microscopique des mécanismes physiques. Les auteurs ont notamment montré que la dynamique rapide du tréhalose est plus limitée à la concentration de glycérol 5% par rapport au tréhalose pur. Dirama et al [87] ont suggéré, dans leur étude, que l'origine moléculaire de la suppression de la dynamique rapide est la formation d'un solide réseau de liaison hydrogène. Ils ont illustré par des exemples tirés des simulations et de l'expérimentation, comment le glycérol améliore la capacité de liaison hydrogène du tréhalose et pourquoi la concentration de glycérol optimale est de 5%. De toute évidence, la formation simultanée de trois liaisons H entre le tréhalose et le glycérol (voir le figure 4.3) conduirait à une plus forte corrélation entre les molécules lesquelles, à leur tour, devraient réduire leur dynamique, ce qui expliquerait la concentration optimale en glycérol de 5%.

En premier lieu, il a été observé que l'oxygène glycosidique O1 (Figure 4.1) ne formait pas de liaisons hydrogène avec le glycérol (Figure 4.2), comme prévu en raison de

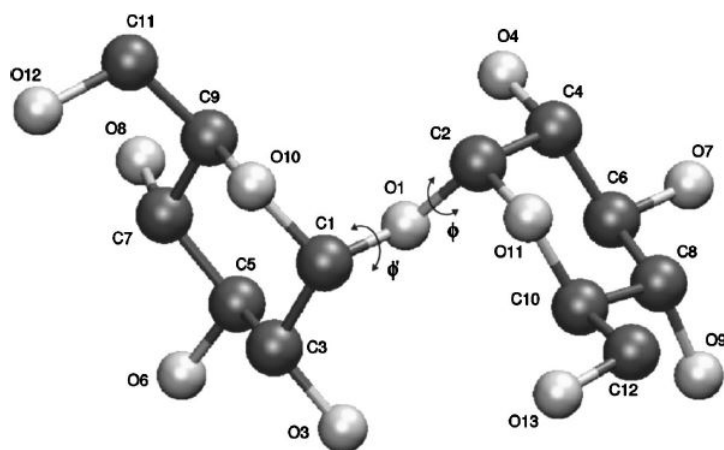


FIGURE 4.1 – *Schéma illustrant les différents atomes C et O du Tréhalose [87]*

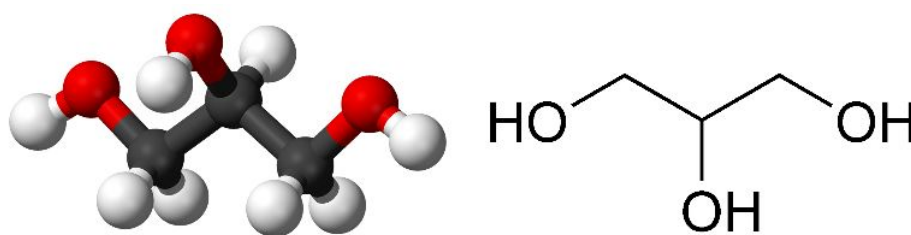


FIGURE 4.2 – *Structures du glycérol [80]*

l'encombrement stérique, et que les oxygènes O10 O11 (Figure 4.1) formaient des liaisons hydrogène avec le glycérol. Toutefois, le nombre de ces liaisons est plus faible que pour les groupes hydroxyles en raison de l'encombrement stérique. Leurs effets sur la dynamique devraient cependant être importants car si une liaison hydrogène est formée, il est probable que les autres groupes hydroxyles dans le glycérol vont former une liaison hydrogène. Ces ponts de glycérol, représentés sur la figure 4.3 (a), limiteraient le mouvement de la molécule entière de tréhalose, limitant ainsi sa flexibilité.

D'autres résultats de l'étude de Dirama [87] montrent clairement que le glycérol est concentré principalement autour des groupes hydroxyles à une distance où la formation de liaisons hydrogène est possible. Divers scénarios possibles sont envisageable. Tout d'abord, le glycérol peut former deux ou trois liaisons hydrogène avec les groupes hydroxyles sur l'un des cycles du tréhalose limitant ainsi le mouvement des atomes d'hydrogène. En outre, il permettrait également de réduire le mouvement du cycle entier, car il augmenterait son encombrement, réduisant ainsi la dynamique de tous les atomes d'hydrogène dans ce cycle comme illustré dans la figure 4.3 (b). Enfin, les molécules de tréhalose voisines pourraient être mieux corrélées par des liaisons hydrogène formées par des ponts de glycérol que par des liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles dans les cycles. Ce scénario peut être rationalisé par le fait que le glycérol peut former des liaisons hydrogène avec deux groupes hydroxyles sur une molécule de tréhalose et une autre molécule de tréhalose comme le montre la figure 4.3 (c). De toute évidence, la formation simultanée de trois liaisons hydrogène conduirait à une plus forte corrélation entre les molécules qui, à son

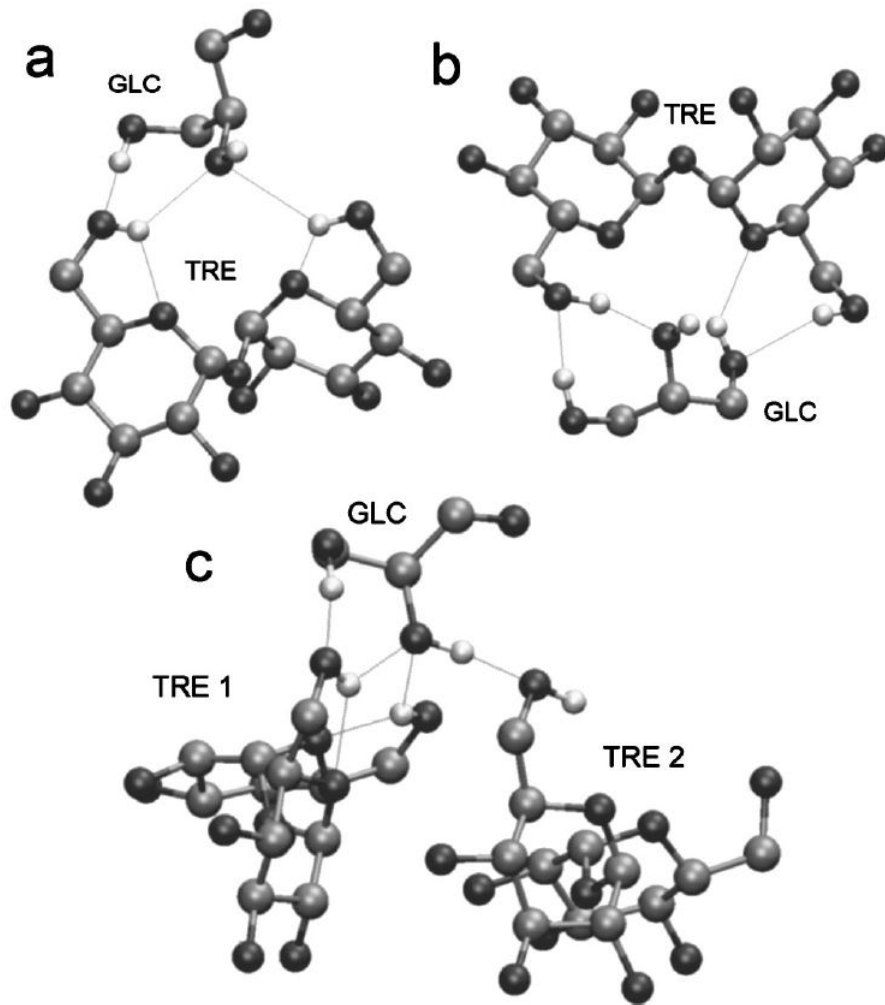


FIGURE 4.3 – Schéma illustrant la formation de liaisons hydrogène entre le glycérol et le tréhalose à partir de simulations de dynamique moléculaire du mélange contenant 5% de glycérol et 95% de tréhalose [87]

tour, devrait limiter leur dynamique, expliquant par conséquent la concentration optimale en glycérol de 5%.

Les auteurs [87, 97] ont aussi montré que l'addition de seulement 5% de glycérol au tréhalose diminue de manière significative sa fragilité. Cependant, la fragilité augmente puis diminue avec une addition supplémentaire de glycérol. De toute évidence, le glycérol modifie la fragilité du sucre d'une manière non monotone. Sokolov et al [88] ont montré que les fluctuations conformationnelles rapides à des températures inférieures à T_g sont plus réprimées dans les systèmes vitreux forts que dans les systèmes vitreux fragiles.

Dans leurs simulations, Averett et al [79] ont suggéré que l'eau résiduelle pouvait jouer un rôle important dans l'antiplastification des matrices de sucre en présence de faible quantité de glycérol (5%). Bien que Dirama et al [87] aient montré que l'origine moléculaire de la suppression de la dynamique rapide du tréhalose est la formation d'un réseau de liaison H, les auteurs ne précisent cependant pas comment la présence d'eau résiduelle pourrait améliorer la capacité du glycérol à influencer l'effet antiplastifiant du tréhalose. Cet effet mérite une étude approfondie afin de comprendre l'influence de l'eau sur l'effet du glycérol.

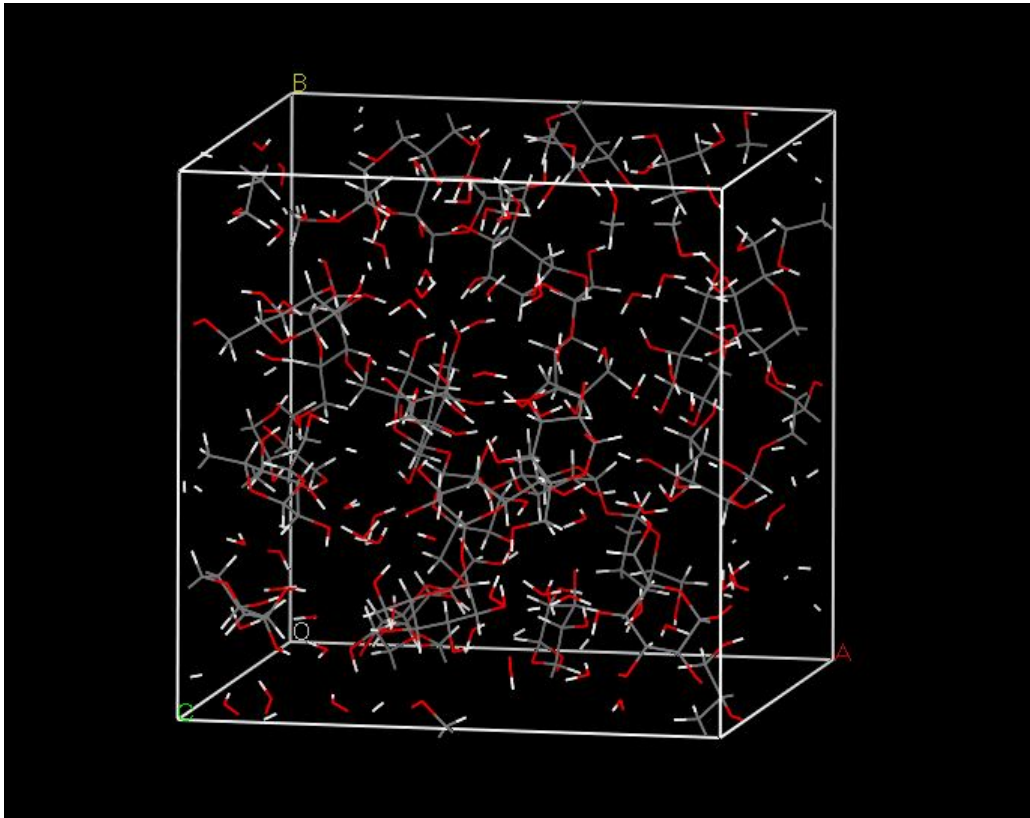


FIGURE 4.4 – *Exemple de boîte générée par Materials Studio avec le module amorphous cell. Composition de la boîte : 75% tréhalose, 10% glycérol et 15% eau en concentration massique.*

4.2 Systèmes étudiés et détails des simulations

Pour obtenir des informations de l'effet du glycérol sur le tréhalose en présence d'eau, nous avons comparé différentes matrices amorphes contenant du tréhalose, du glycérol et de l'eau au moyen de simulations de la dynamique moléculaire en utilisant le logiciel de simulation Materials Studio. Un exemple de boîte de simulation est représenté dans la figure 4.4. Nous avons étudié l'influence du glycérol sur les propriétés structurales, dynamiques et thermodynamiques de ces matrices à différents niveaux d'hydratation : $h = 0, 5, 10, 15, 20, 50\%$ g d'eau/g (tréhalose+glycérol). Cette gamme d'hydratation comprend les teneurs en eau typiques trouvées dans des matrices amorphes pendant et à la fin d'un procédé de lyophilisation [95]. Nous avons calculé différents paramètres : volume libre, densité et déplacement carré moyen des atomes d'hydrogène des matrices pour comprendre l'influence de l'eau sur la concentration optimale de 5% en glycérol pour laquelle la capacité du tréhalose à prolonger la durée de vie des protéines lyophilisées est maximale.

Les configurations initiales, constituées de tréhalose, de glycérol et d'eau, ont été créés à l'aide du module "amorphous cell" du logiciel. Les systèmes résultants contiennent entre 450 et 1490 atomes. Le tableau 4.1 représente la composition des différents systèmes simulés. Une optimisation énergétique des structures a ensuite été menée.

$h = \% \text{ eau}$	$X = \% \text{ Glycérol}$	N_{Tre}	N_{Gly}	N_{eau}
0	0	10	-	-
	5	10	2	-
	10	10	4	-
	15	12	8	-
5	0	10	-	10
	5	10	2	11
	10	10	4	11
	15	12	8	14
10	0	11	-	23
	5	9	2	20
	10	10	5	24
	15	12	9	30
15	0	11	-	37
	5	10	2	35
	10	10	5	38
	15	12	10	50
20	0	12	-	57
	5	10	2	50
	10	10	5	53
	15	13	11	76
50	0	10	-	190
	5	10	4	211
	10	10	9	236
	15	10	16	272

TABLE 4.1 – *Composition des différentes matrices simulées où N_{Tre} , N_{Gly} et N_{Eau} représentent, respectivement, le nombre de molécules de Tréhalose, de Glycérol et d'eau. h et X sont, respectivement, les concentrations massiques en eau et en glycérol*

Le champ de force (intramoléculaires et intermoléculaires) PCFF (*Polymer-Consistent Force Field*) a été utilisé pour modéliser les interactions des systèmes étudiés (*voir annexe*). Le PCFF est un membre de la famille des champs de force *consistent force-field* (CFF91, PCFF, CFF et COMPASS). Ceux-ci ont été paramétrés à l'aide d'une grande gamme d'observations expérimentales pour les composés organiques contenant les atomes H, C, N, O, S, P, les ions d'halogène, des cations de métaux alcalins et plusieurs cations métalliques divalents biochimiquement importants. Le PCFF est un prolongement du CFF91¹ pour modéliser les polymères organiques (inorganiques), les métaux et les zéolithes. Le PCFF est applicable pour les simulations de polysaccharides, matériaux organiques, lipides et acides nucléiques. Le PCFF permet des calculs des énergies de cohésion, les propriétés mécaniques, les compressibilités, les capacités thermiques et constantes élastiques avec une bonne précision [81].

Les interactions électrostatiques ont été calculées en utilisant la méthode de sommation d'Ewald (*voir annexe*). Nos simulations ont été réalisées d'abord dans un ensemble isobare-isotherme (N, P, T) à 298K et 1 atm pendant 200 ps pour équilibrer la densité à la température désirée suivie de 50 ps dans l'ensemble isochore-isotherme (N, V, T) à la

1. Le CFF91 est utilisé pour les hydrocarbures, les protéines, les interactions protéine-ligand

même température. Les méthodes utilisées pour contrôler la pression et la température dans les simulations sont les méthodes de Berendsen (*voir annexe*). Les simulations ont été répétées trois fois afin d'améliorer les statistiques de calcul.

4.3 Résultats des simulations

4.3.1 Densités et volume libre

Les densités ρ des systèmes simulés sont représentées sur la figure 4.5a. Nous avons constaté que la densité du tréhalose pur obtenue par simulation est de $1,35 \text{ g/cm}^3$, significativement plus faible que celle obtenue expérimentalement $1,53 \text{ g/cm}^3$ [96]. Une étude de simulation DM réalisée par Conrad et de Pablo [97] a estimé la densité du tréhalose à 300 K à $1,47 \text{ g/cm}^3$. Nous en concluons que le champ de force PCFF ne reproduit pas bien la densité du tréhalose pur.

Nous avons constaté qu'à $h=0$, la densité ρ des systèmes simulés passe par un maximum lorsque la fraction massique du glycérol est égale à 0.05. Le comportement est donc similaire à celui observé par Dirama et al [87], bien que le champ de force PCFF ne reproduise pas bien la densité du tréhalose pur.

L'addition supplémentaire de glycérol diminue la densité ρ du mélange, tel qu'il est prévu pour un diluant. Par conséquent, la masse volumique du mélange montre un changement non monotone avec la concentration du glycérol présente, ce qui suggère donc que le mélange constitué de 5% de glycérol est plus compact. Dirama et al [87] ont montré que la formation des liaisons H à une concentration en glycérol de 5% est relativement plus fréquente que pour les autres compositions et que celles-ci ont une durée de vie moyenne plus longue. Par conséquent, la forte compacité du mélange contenant 5% de glycérol serait liée à l'existence d'un réseau plus robuste de liaison H [87]. Nous remarquons cependant qu'à différentes fractions massiques en glycérol, la densité ρ diminue lorsque le niveau d'hydratation h augmente. L'addition de petites quantités d'eau (à chaque fois 0,05) induit une diminution significative de la densité des systèmes simulés.

Pour comprendre le rôle de l'eau et du glycérol sur la compacité moléculaire, nous avons calculé la fraction de volume libre, f , des systèmes simulés. La fraction de volume libre f représente le rapport entre le volume libre total accessible, V_f , et le volume total de la boîte de simulation, V ($f = 100 * V_f / V$) [89]. Pour déterminer le volume libre, nous avons utilisé la méthode décrite en [84]. Celle-ci consiste à discrétiser le système simulé en petits éléments de volume. L'insertion possible ou non d'une sonde de rayon $r = 0.5 \text{ \AA}$ permet de définir un volume libre ou pas. Les fractions de volume libre f calculées avec un rayon de 0.5 \AA sont représentées sur la figure 4.5b. Nous avons constaté que la fraction de volume libre f obtenue par nos simulations est similaire aux résultats de Lerbret et al [84] pour le tréhalose pur sans eau. La fraction du volume libre diminue de façon significative lors de l'addition d'une petite quantité d'eau, ce qui montre clairement que les molécules d'eau remplissent les vides qui se trouvent entre les molécules de tréhalose

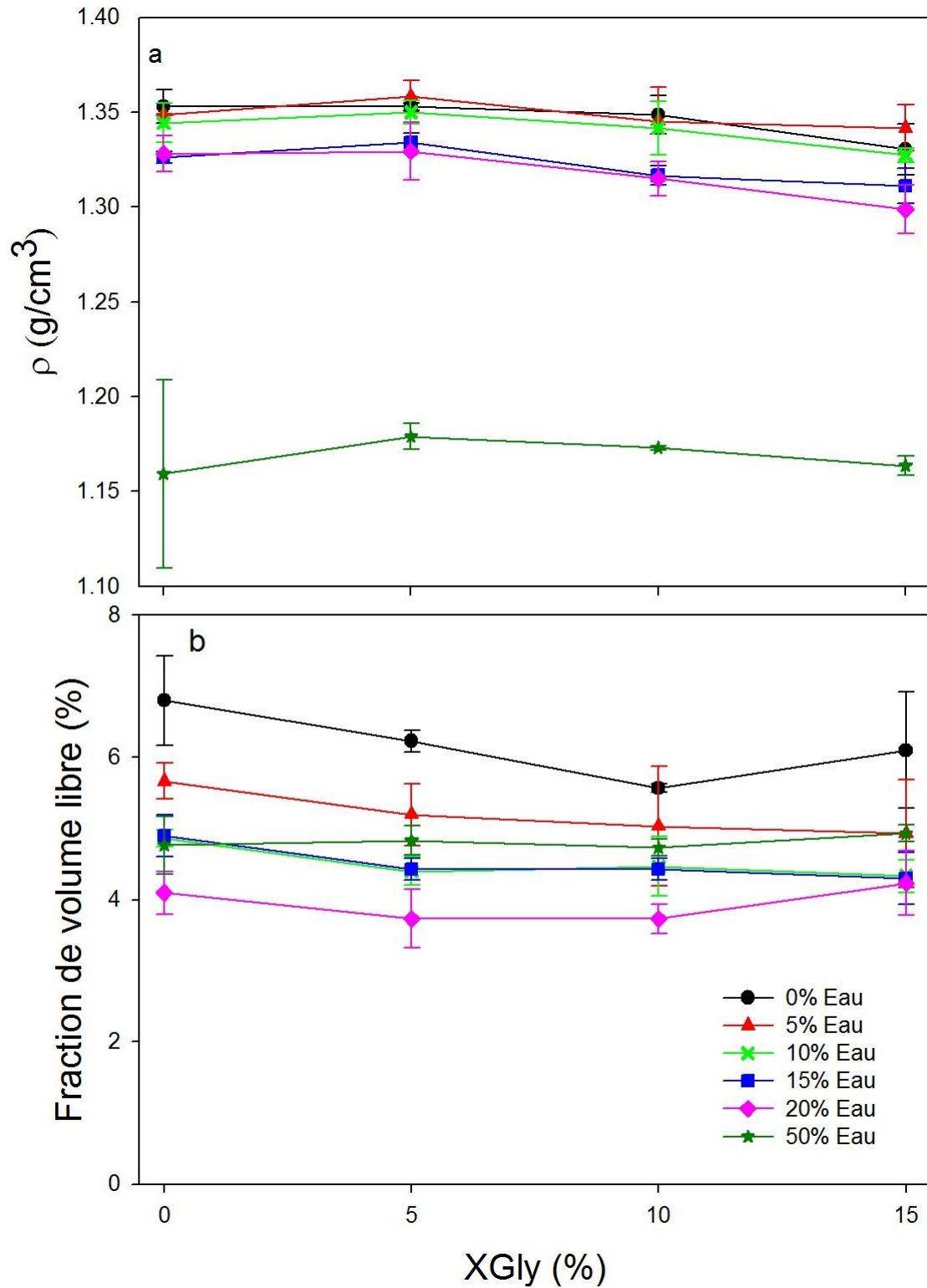


FIGURE 4.5 – *Densité (ρ) et fraction de volume libre des systèmes simulés en fonction des fractions massiques du Glycérol à différents niveaux d'hydratation (h)*

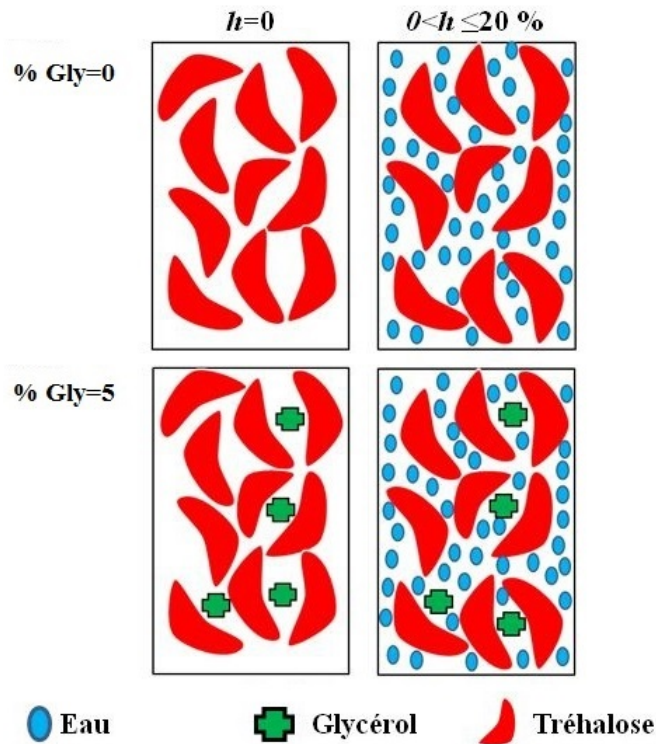


FIGURE 4.6 – Représentation schématique des boîtes de simulation à différentes concentrations en glycérol et en eau.

et de glycérol. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Lerbret et al [84] qui ont trouvé que l'addition d'une petite quantité d'eau diminuait significativement la valeur du f . L'addition de 5 % de glycérol à différents niveaux d'hydratation h diminue légèrement la fraction du volume libre f . Nous remarquons que la fraction du volume libre f est plus petite en présence de glycérol (5, 10, 15%) qu'en son absence (0%). La présence de glycérol remplit les vides entre les molécules de tréhalose, améliorant ainsi la compacité moléculaire.

La figure 4.6 résume les résultats précédents, ce qui facilitera l'interprétation des résultats sur les interactions intermoléculaires des matrices tréhalose-glycérol décrites ci-dessous. La compacité des matrices de tréhalose pur est faible compte tenu de la structure du tréhalose qui permet l'existence de vides. L'addition de 5% en glycérol remplit ces vides, conduisant à une augmentation de la densité et une diminution du volume. L'augmentation du niveau d'hydratation h et de la concentration en glycérol provoquent la dilution du système, conduisant à une diminution de la densité et du volume.

4.3.2 Mouvements atomiques locaux

Les mouvements atomiques peuvent être facilement sondés par DM à l'aide du calcul du déplacement carré moyen que nous noterons MSD (« Mean Square Displacements ») dans la suite. Le MSD correspond à la moyenne des déplacements atomiques entre l'instant t et un temps d'origine $t=0$ à priori variable [79]. Le MSD est déterminé à partir de l'équation ci-dessous :

$$MSD(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle |\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(0)|^2 \rangle \quad (4.3.1)$$

où $\vec{r}_i(t)$ est la position de l'atome i à l'instant t , N est le nombre d'atomes et $\langle \rangle$ représente une moyenne sur le temps.

Nous avons déterminé les MSDs des différents systèmes simulés (voir Tableau 4.1) à partir de simulations de dynamique moléculaire réalisées sur une échelle de temps de l'ordre de 50 ps. Au cours de cette étude, nous avons pu sonder les mouvements rapides de petites amplitudes $\langle u^2 \rangle$ à partir du choix arbitraire : $\langle u^2 \rangle = MSD(t=1ps)$ [79]. Nous avons considéré uniquement les mouvements des atomes d'hydrogène appartenant aux différentes molécules constituant les systèmes simulés (tréhalose, glycérol et eau). Les valeurs obtenues sont donc comparables aux $\langle u^2 \rangle$ classiquement déterminés par des expériences de diffusion neutronique incohérente [67, 85].

Les figures 4.7a et 4.7b représentent le paramètre $\langle u^2 \rangle$ des systèmes simulés en fonction de la concentration massique en glycérol et pour différentes hydratations h . On observe clairement sur la figure 4.7a la présence d'un minimum du $\langle u^2 \rangle$ à une fraction massique en glycérol de l'ordre de 5 % pour tous les systèmes simulés en bon accord avec les travaux expérimentaux [85] et numériques [87, 98] publiés jusqu'ici. Il faut aussi noter que les valeurs obtenues des $\langle u^2 \rangle$ dans notre étude sont significativement plus élevées que celle déterminées par Dirama et al [87] et Riggleman and De Pablo [98]. Cette différence provient : i) des densités un peu moins élevées obtenues en raison de l'utilisation du champ de force PCFF et ii) d'autre part la prise en compte dans le calcul de $\langle u^2 \rangle$ de tous les atomes d'hydrogènes des différentes molécules - y compris les plus mobiles comme l'eau - et non uniquement les atomes d'hydrogène des molécules de tréhalose comme dans les publication de Dirama et al [87] et Riggleman et De Pablo [98].

La diminution du $\langle u^2 \rangle$ obtenue par les simulations à la concentration de 5% en glycérol n'est cependant pas aussi prononcée que celle observée expérimentalement par Cicerone et al [85] mais une tendance similaire est clairement mise en évidence [87]. Ce résultat montre que la physique du problème est bien reproduite et souligne donc les capacités très particulières du glycérol à influencer les dynamiques rapides de petites amplitudes. La figure 4.7b montre de plus que les $\langle u^2 \rangle$ augmentent de manière monotone avec la concentration en eau résiduelle sans présenter de minimum. L'eau résiduelle ne semble donc pas avoir un effet similaire à celui du glycérol sur la réduction de l'amplitude des mouvements rapides comme il a été démontré par simulation DM sur des matrices déshydratées composées de lysozyme et de tréhalose [84]. Pour expliquer cette différence, on peut sans doute invoquer les fractions de volumes libres bien moins grandes dans les mélanges binaires tréhalose/glycérol qu'en présence de protéines [84]. Pour le lysozyme pur par exemple, Lerbret et al [84] ont obtenu une fraction de volume libre de l'ordre de 12% pour le lysozyme alors qu'elle n'est que de 7% dans le tréhalose pur. Les effets de l'eau sont donc sans doute fortement atténués dans les mélanges binaires.

Il est cependant intéressant de noter que la signature du minimum du $\langle u^2 \rangle$ à

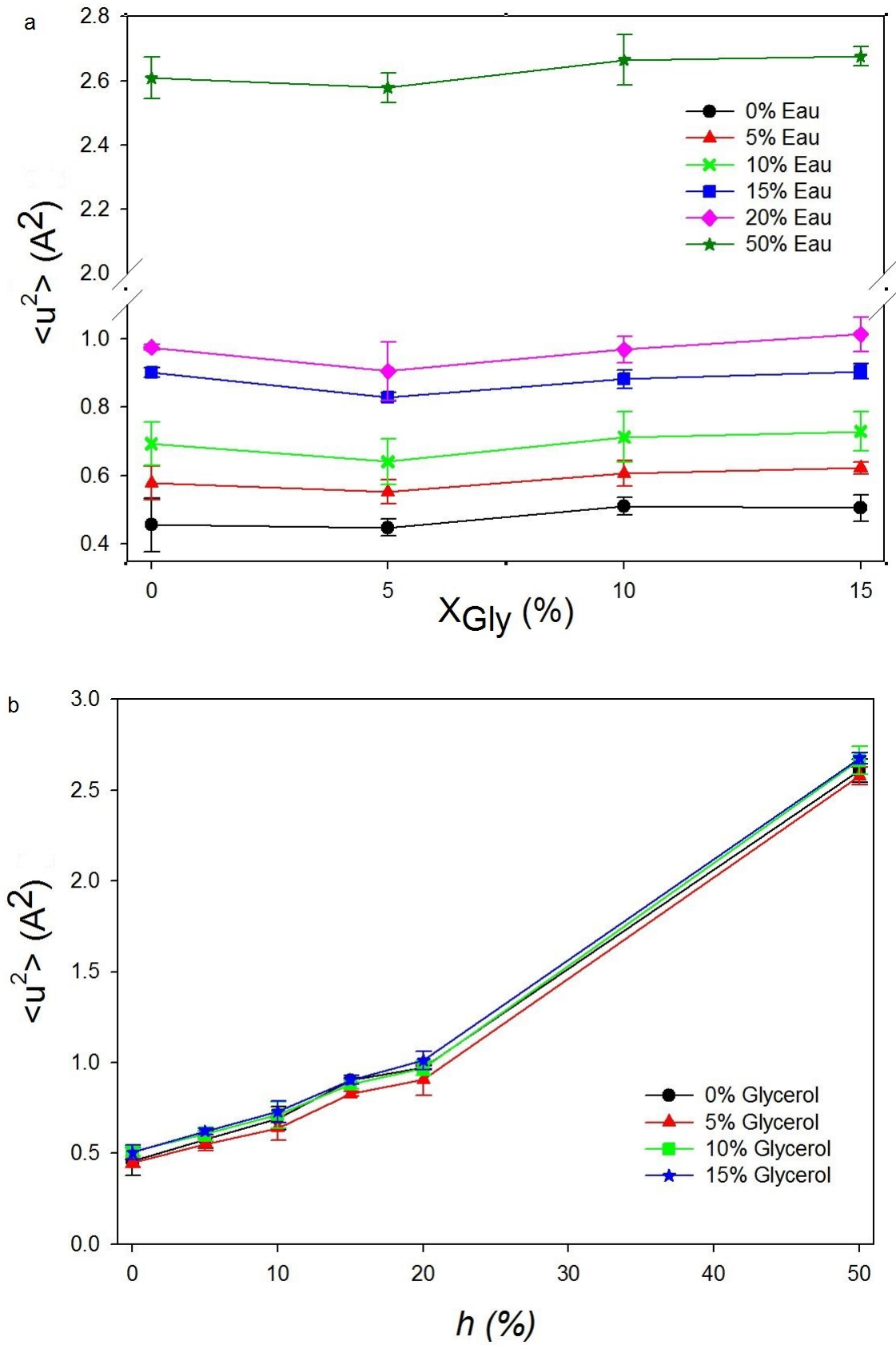


FIGURE 4.7 – Valeurs des $\langle u^2 \rangle$ des systèmes simulés en fonction : a) des fractions massiques du Glycérol à différents niveaux d'hydratation (h), b) des niveaux d'hydratation (h) à différentes fractions massiques du Glycérol.

une fraction massique en glycérol de l'ordre de 5 % semble être influencée par la présence de la concentration en eau résiduelle. Afin de quantifier cet effet nous avons déterminé la profondeur du minimum pour différentes concentrations d'eau résiduelle. La profondeur du minimum peut être estimée simplement comme le montre la figure 4.8b.

Celle-ci est représentée sur la figure 4.8a. On observe clairement sur cette figure que la profondeur du minimum augmente significativement avec la teneur en eau résiduelle jusqu'à une concentration d'environ 20% puis semble décroître légèrement.

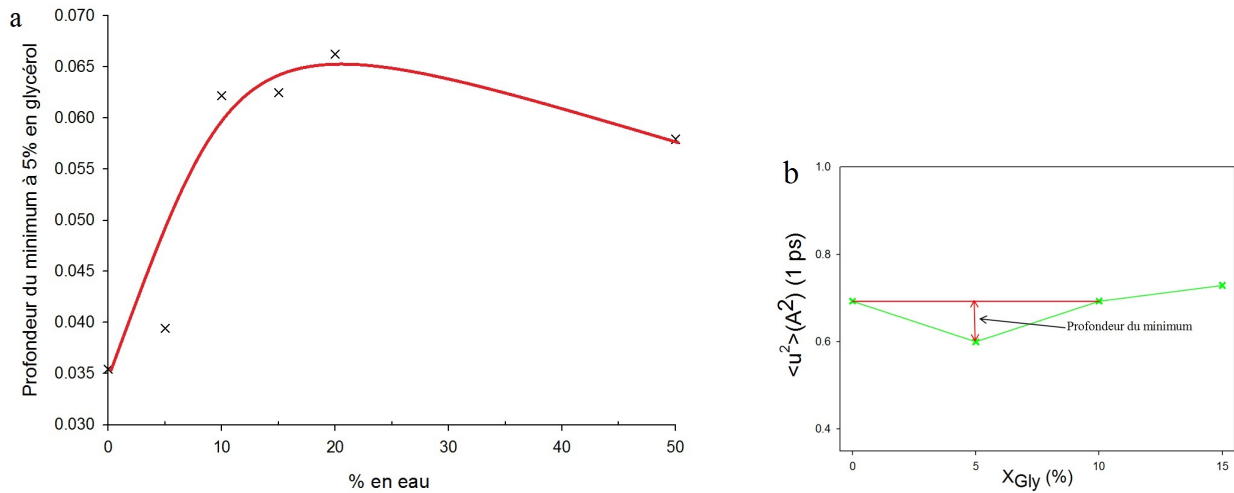


FIGURE 4.8 – *Profondeur du minimum du $\langle u^2 \rangle$ déterminée à la fraction massique de 5% en glycérol. La profondeur du minimum est obtenue par la dérivée seconde du $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la concentration en glycérol*

L'évolution du $\langle u^2 \rangle$ est cohérente avec l'évolution observée de la densité et de la fraction de volume libre (voir figure 4.5). On peut en effet remarquer sur cette figure que la présence d'une petite quantité d'eau 5 à 10 % en masse ne semble pas induire une variation significative de la densité. Pour des quantités d'eau supérieures par contre, de 15 à 20%, une diminution est clairement observée en bon accord avec l'effet connu de plastification des matrices de carbohydrates [84]. Il est intéressant de noter que la fraction de volume libre quant à elle diminue de manière monotone avec la concentration en eau. On peut donc suggérer que pour les basses concentrations d'eau résiduelle, les molécules d'eau remplissent le volume libre disponible – les lacunes – de la matrice amorphe sans perturber réellement les interactions tréhalose-glycérol. Dans cette situation, les mouvements de petites amplitudes seraient simplement la somme des mouvements provenant du tréhalose et du glycérol. Dans le cadre d'un modèle très simple, les mouvements locaux $\langle u^2 \rangle$ pourraient se décomposer entre une contribution provenant du couplage tréhalose-glycérol $\langle u_{T-G}^2 \rangle$ et une contribution due à l'eau remplissant les lacunes $\langle u_0^2 \rangle$: $\langle u^2 \rangle = \langle u_{T-G}^2 \rangle + \langle u_0^2 \rangle$. A des plus hautes concentrations en eau (15%), après l'étape correspondant au remplissage des lacunes principales de la structure amorphe, les molécules d'eau qui n'auraient pas participé au remplissage des vides commencerait à interagir avec le glycérol et le tréhalose renforçant le couplage entre les deux types de molécules. Ce couplage se manifesterait par une accentuation mar-

quée de la profondeur du minimum. Dans ce cas, les mouvements locaux $\langle u^2 \rangle$ pourraient se décomposer entre une contribution provenant du couplage tréhalose-glycérol et l'eau hors lacune $\langle u_1^2 \rangle$ et une contribution due à l'eau remplissant les lacunes $\langle u_0^2 \rangle$: $\langle u^2 \rangle = \langle u_1^2 \rangle + \langle u_0^2 \rangle + \langle u_{T-G}^2 \rangle$.

La figure 4.9a montre un exemple possible de formation d'un amas de molécules d'eau. La figure 4.9b montre clairement une molécule de glycérol liée à deux molécules d'eau. Chaque molécule d'eau est liée à son tour à une molécule de tréhalose différente, lesquelles sont liées entre elles. Ce qui expliquerait le renforcement du réseau de liaisons H conduisant au couplage en tréhalose et glycérol par l'eau.

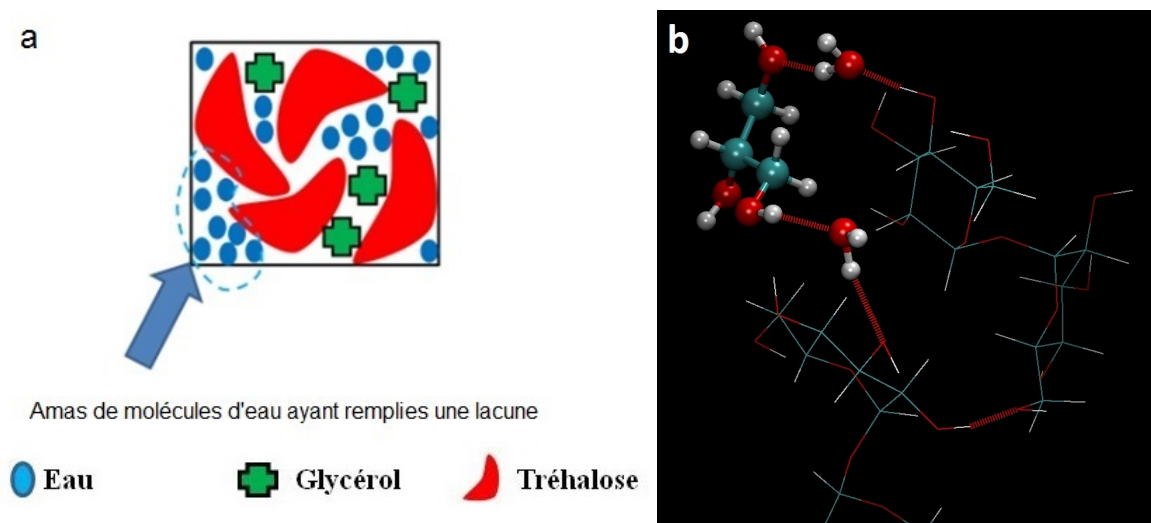


FIGURE 4.9 – *Exemples physiquement possibles d'organisation et de couplage des molécules de tréhalose, de glycérol et d'eau à partir de configurations extraites des trajectoires de simulations DM, a) représentant un agrégat de molécules d'eau suivant le modèle de remplissage des lacunes par l'eau et b) représentant un pontage entre deux tréhalose et un glycérol facilité par deux molécules d'eau.*

4.4 Conclusion et perspectives

L'idée générale de cette étude était de discuter à partir de simulations numériques certaines hypothèses « dynamiques » proposées dans la littérature pour expliquer les mécanismes bioprotecteurs des sucres. Certains modèles supposent en effet que la dégradation des molécules biologiques piégées dans des matrices vitreuses protectrices est inévitable et que les cinétiques des processus de dégradation sont simplement contrôlées par les mobilités moléculaires particulièrement complexes de ces matrices. De nombreux travaux ont de plus montré le rôle important des mouvements rapides de petites amplitudes dans le cadre de l'amélioration de la stabilité des protéines lyophilisées en présence de sucres. En opposition avec le lien suggéré dans les hypothèses de « vitrification » entre T_g et stabilisation [42], des études récentes ont démontré que par un effet antiplastifiant sur les relaxations rapides, l'addition d'une faible quantité de glycérol peut réellement augmenter les temps de stockage de plusieurs enzymes modèles lyophilisés [78, 79, 87]. Au cours

de ce travail, nous avons donc réalisé des simulations de dynamique moléculaire sur des matrices vitreuses à base de tréhalose utilisées pour la préservation d'agents biologiques labiles. Nous avons pu étudier l'influence de l'eau résiduelle sur les effets antiplastifiants, souvent peu marqués, du glycérol.

Les simulations de dynamique moléculaire, à différents niveaux d'hydratation h , ont montré que la présence de l'eau influençait l'effet antiplastifiant du glycérol. L'étude comparative des systèmes simulés a montré que la présence d'une faible concentration en glycérol (5%) permettait d'améliorer la compacité moléculaire du tréhalose. Nous avons cependant noté que la signature du minimum du $\langle u^2 \rangle$ à une fraction massique en glycérol de l'ordre de 5 % semble être influencée par la présence de la concentration en eau résiduelle (h). La structure du tréhalose permet l'existence de vides dans les lyophilisats. L'addition de 5% en glycérol remplit ces vides, conduisant à une augmentation de la densité et une diminution du volume libre. L'augmentation du niveau d'hydratation h et de la concentration en glycérol, provoquent la dilution du système et donc une diminution de la densité et du volume libre. L'addition du glycérol conduit à la création d'un réseau de liaison H avec le tréhalose menant à la suppression de la dynamique de ce dernier. L'analyse des résultats a montré que la présence de l'eau a tendance à faciliter le pontage entre le tréhalose et le glycérol conduisant au renforcement du réseau de liaisons H d'où l'amplification de l'effet du glycérol sur la dynamique du tréhalose.

Les résultats obtenus sur les systèmes ternaires tréhalose/glycérol/eau ont fourni de précieuses informations sur la capacité de l'eau résiduelle à amplifier l'effet du glycérol sur la dynamique du tréhalose. Il semblerait cependant intéressant d'effectuer de nouvelles simulations sur les systèmes quaternaires protéine/tréhalose/glycérol/eau afin de mieux comprendre le phénomène de bioprotection.

Conclusion générale

Ce travail constitue une contribution à l'étude de l'amélioration de la stabilité de protéines lors de procédures de lyophilisation inhérentes à leur stockage, mais aussi à d'autres applications thérapeutiques. Il a conduit à la détermination du stress (désorption de l'eau liée à la protéine) le plus néfaste à la stabilité de la protéine et a montré que la rigidification de la protéine au sein d'une matrice vitreuse à base de sucre était le principal effet bioprotecteur des disaccharides durant la lyophilisation et pendant le stockage. Contrairement à ce qui était attendu à partir d'analyses de protéines en solutions à haute température [63, 64, 65], le sucrose aurait une efficacité bioprotectrice supérieure à celle du tréhalose lors du stockage des protéines. Cependant l'ajout d'une faible quantité de glycérol améliore significativement la stabilité de la protéine pendant l'opération de lyophilisation et également pendant le stockage. Les simulations de dynamique moléculaire ont montré que le glycérol amplifie l'effet antiplastifiant du tréhalose uniquement en faible quantité, c'est-à-dire amplifie la rigidification de la matrice protéine-sucre. La protéine rigidifiée est ainsi plus difficilement déformable lors de la désorption de l'eau liée lors des étapes de séchage d'un cycle de lyophilisation.

Ces études ont permis de montrer que la spectroscopie Raman est particulièrement bien adaptée à l'étude in-situ des protéines lors d'un cycle de lyophilisation. Elles ouvrent ainsi d'importantes perspectives. Dans une première étape, nous avons étudié des formulations ultra simplifiées afin de mettre en évidence l'origine principale des dégradations subies par les protéines, et de comprendre les mécanismes de bioprotection par les sucres à partir de la description des interactions protéine-solvant et protéine-cosolvant. Une prochaine étape consistera à étudier l'influence d'excipients supplémentaires, souvent utilisés lors de lyophilisation, tels que les agents de masse (mannitol), pendant la lyophilisation mais aussi pendant le stockage. Une autre partie importante devra porter sur l'opération de reconstitution, et consistera à suivre la capacité des bioprotecteurs à inhiber les phénomènes d'agrégation, lors de la dissolution du lyophilisat. Améliorer l'efficacité de certains bioprotecteurs (ajout de glycérol au tréhalose) et trouver de nouveaux systèmes efficaces est également un domaine d'étude important. Ces différentes voies d'investigation ont pour objectif de pouvoir mieux définir, de manière non empirique, les formulations à lyophiliser ainsi que les paramètres opératoires d'un cycle de lyophilisation.

Annexe

Techniques instrumentales

Le spectromètre Raman

Lors de nos expériences, nous avons utilisé deux types de spectromètre Raman :

- le spectromètre Dilor XY adapté à l'étude des basses fréquences inférieures à 300 cm^{-1} ;
- le spectromètre Raman Renishaw qui a une très forte sensibilité dans la gamme de fréquences allant de 300 cm^{-1} à 2000 cm^{-1} .

a. Spectromètre Dilor XY

Le modèle Dilor XY 1800 (figure 4.10) est équipé d'un laser à mélange de gaz Argon-Krypton ionisé qui permet de travailler avec des longueurs d'ondes incidentes λ comprises entre 488 et 647,1 nm. Le spectromètre comprend des systèmes d'analyse spectrale, de détection, et d'acquisition. L'échantillon peut être analysé soit en mode macroscopique, soit en mode microscopique, modes qui diffèrent par le volume de l'échantillon analysé ($\sim\text{cm}^3$ et $\sim\mu\text{m}^3$ respectivement). La distance focale du spectromètre est de 800 mm et le système de dispersion de la lumière est constitué de trois réseaux de diffraction (spectromètre + prémonochromateur) de 1800 traits/mm autorisant une analyse très basse fréquence, et donc l'étude des mouvements intermoléculaires, avec une résolution fonction de la longueur d'onde et de la gamme de fréquences considérées. La détection du signal Raman s'effectue par un dispositif à transfert de charges (CCD, pour Charge Coupled Device) constituée d'une barrette de 1024 photodiodes, refroidie en permanence par de l'azote liquide. L'acquisition est assurée par le logiciel LABSPEC. [99, 51].

b. Spectromètre Raman Renishaw

Le modèle Raman Renishaw InVia (figure 4.11) comprenant un microscope Leica. Il possède des filtres diélectriques pour couper la partie élastique de la diffusion à 100 cm^{-1} . La distance focale du spectromètre est de 250 mm et le système de dispersion de la lumière est constitué de deux réseaux dispersifs, un de 1800 trait/mm pour le laser Argon et un second de 1200 trait/mm pour le laser diode proche-infrarouge. Il est équipé d'un laser Argon de puissance de 100 mW pour travailler avec la longueur d'onde incidente $\lambda=514,5$ nm et d'une diode laser émettant dans le proche-infrarouge ($\lambda=780$ nm) de puissance de



FIGURE 4.10 – *Spectromètre Dilor XY du laboratoire.*

300 mW. La détection du signal Raman s'effectue par un dispositif à transfert de charges (CCD, pour Charge Coupled Device). Pour la réalisation d'acquisition ou de cartographie, l'appareil est équipé d'une platine motorisée XYZ permettant de déplacer l'échantillon sur les trois axes lors de l'analyse de l'échantillon.



FIGURE 4.11 – *Microspectromètre Renishaw du laboratoire.*

Platine à température et pression variables

Le suivi in-situ des modifications de structures des protéines lors d'une lyophilisation est possible en utilisant une platine Linkam à température et pression variables (Figure 4.12) dont la conception est prévue pour une utilisation sous microscope. Cette platine permet de placer l'échantillon dans une gamme de températures allant de -196°C à 120°C avec une précision de 0.1°C . Le dispositif permet aussi d'atteindre des vitesses de chauffe ou de refroidissement d'environ $30\text{K}/\text{min}$. La platine permet d'aller jusqu'à un vide limite de 10^{-3} mbar. Les formulations sont placées dans des cellules étanches à fond plat. La position de l'échantillon peut être ajustée suivant deux axes perpendiculaires dans un plan horizontal, ce qui permet un positionnement de l'échantillon sous le faisceau laser.

La focalisation est obtenue en ajustant la position de la platine suivant Z. La régulation de la température est réalisée par un dispositif à circulation d'azote et un contrôleur de température [51].

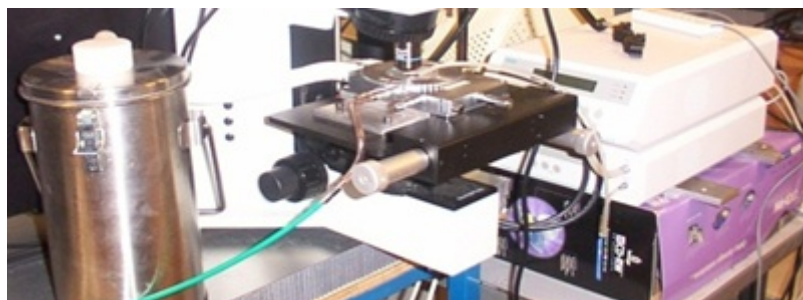


FIGURE 4.12 – *Platine Linkam*

Techniques d'analyse thermique

De façon générale, l'analyse thermique consiste à mesurer les évolutions d'une propriété physique d'un échantillon lorsqu'il est soumis à une variation programmée (généralement linéaire) de température avec le temps dans une atmosphère contrôlée. Cependant on trouvera aussi des études en fonction du temps à température constante ou non.

a. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permet de suivre en temps réel l'état thermodynamique des échantillons pendant un traitement thermique ou une isotherme, et donc d'analyser les transformations de phases (changements d'états physique, polymorphisme)[100].

Nous avons utilisé pour nos expériences la DSC 2920 et la DSC Q10 de chez TA Instruments pour mesurer la température de transition vitreuse (T_g) des échantillons lyophilisés (DSC 2920) et la température de transition vitreuse (T'_g) des solutions avant lyophilisation (DSC Q10). Elles sont équipées d'un système réfrigérant qui permet de travailler sur une gamme de température allant de -60 °C à 400 °C pour la DSC 2920 et de -180 °C à 400 °C pour la DSC Q10. Les échantillons sont placés dans des creusets en aluminium sans couvercle pour la DSC 2920 et fermés hermétiquement pour la DSC Q10. Un creuset vide tient lieu de référence. Le schéma d'une cellule de mesure DSC est représenté sur la figure 4.13.

La masse des échantillons est relativement faible, environ 5 mg pour la DSC 2920 et environ $10\mu\text{l}$ pour la DSC Q10, ce qui permet à l'échantillon de suivre le programme thermique imposé. Un balayage de la cellule de mesure avec de l'hélium améliore les transferts thermiques et permet de travailler sous atmosphère inerte. La calibration de la ligne de base se fait à four vide avec une rampe en température identique à celle de l'expérience. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Universal Analysis de TA Instruments.

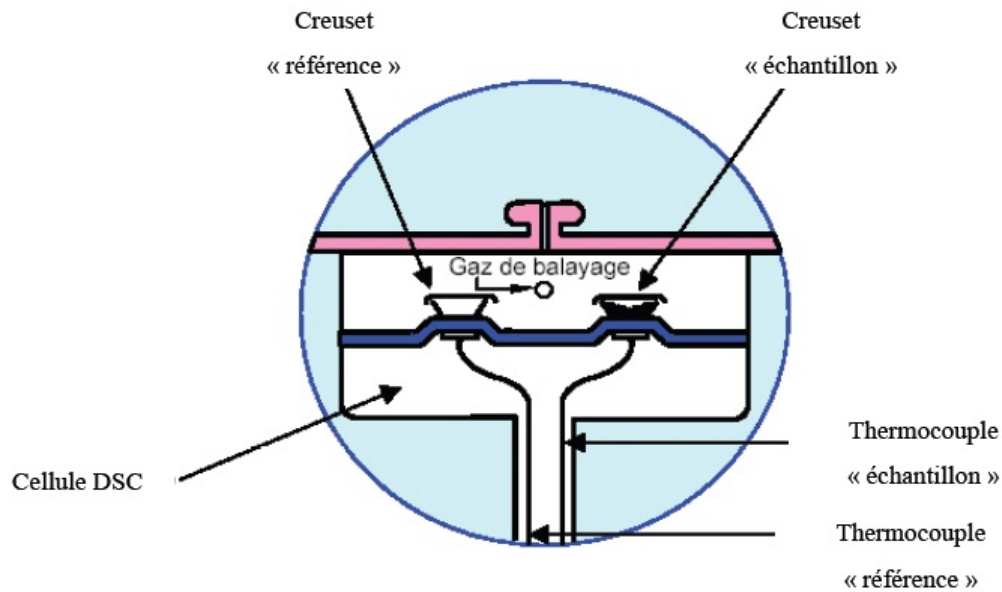


FIGURE 4.13 – Schéma d'une cellule de mesure DSC [key-83]

b. Analyse ThermoGravimétrique ATG

L'Analyse ThermoGravimétrique (ATG) permet de suivre l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction de la température ou en fonction du temps au cours d'expériences isothermes. Cette technique détecte des déshydratations ou des dégradations. Le dispositif constitué d'une microbalance et d'un système de chauffage mesure les gains ou pertes enregistrés, par un système d'acquisition. La thermogravimétrie permet, ainsi, d'obtenir une quantification de la perte d'éléments constituant les matériaux (polymères, huiles, plastifiants...) et de surveiller leurs stabilités thermiques [100, 101]. Lors de notre étude, cette technique a été utilisée afin de mesurer la quantité d'eau résiduelle présente dans les échantillons de protéines lyophilisées. L'appareil utilisé est la TGA 7 de Perkin Elmer. Les échantillons, de masse variant entre 3 mg et 5 mg, sont placés dans une nacelle en platine balayée par un flux d'azote sec à 70°C pendant 5 heures. La calibration de la balance est réalisée à l'aide de masses étalons fournies par Perkin Elmer. La température est calibrée avec les points de Curie de l'alumel et du nickel.

Dynamique moléculaire

Principe de la dynamique moléculaire

La simulation de dynamique moléculaire est une technique numérique qui produit la trajectoire d'un système composé de N particules en intégrant les équations du mouvement de Newton. Pour cela, nous avons besoin d'un ensemble de conditions initiales, d'un modèle représentant les forces agissantes entre les particules et de résoudre l'équation de mouvement [73] :

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{f}_i = \frac{\partial}{\partial \vec{r}_i} U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad (4.4.1)$$

Où m_i , \vec{r}_i , \vec{f}_i sont respectivement la masse, la position et la force agissant sur l'atome i . $U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$ est la fonction d'énergie potentielle du système à N particules, qui ne dépend que des coordonnées cartésiennes \vec{r}_i .

Champs de forces

Un champ de force CF est une expression mathématique décrivant la dépendance de l'énergie d'un système en fonction des coordonnées de ses atomes. Il est composé d'une forme analytique de l'énergie potentielle interatomique, $V(r_1, r_2, \dots, r_n)$, et d'un ensemble de paramètres entrant dans cette forme. Les paramètres sont généralement obtenus soit à partir de calculs *ab initio*, de mécanique quantique semi-empirique ou par ajustement à des données expérimentales tels que la diffusion neutronique, diffraction d'électrons, RMN, infrarouge et spectroscopie Raman etc. Les molécules sont simplement définies comme un ensemble d'atomes maintenu par de simples forces élastiques (harmoniques) et le CF remplace le potentiel réel avec un modèle simplifié valable dans un domaine particulier. Idéalement, il doit être suffisamment simple pour être évalué rapidement, mais suffisamment détaillé pour reproduire les propriétés du système étudié. Dans la littérature, on trouve beaucoup de champs de forces, ayant différents degrés de complexité et orientés pour traiter différents types de systèmes. Cependant, un CF peut s'exprimer comme :

$$V_{total} = \sum_{elongation} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{flexion} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{diedres/prpores} k_\phi [1 + \cos(m\phi - \delta)] + \sum_{diedres/impropres} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j} \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4.4.2)$$

où les quatre premiers termes renvoient aux contributions intramoléculaires ou locales de l'énergie totale (élongation, flexion, torsion), et les deux derniers termes servent à décrire les interactions répulsives de Van der Waals et les interactions de Coulomb [73].

Interactions électrostatiques

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

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_n \sum_{i < j}^N \frac{q_i \cdot q_j}{|r_{ij} + n|} \quad (4.4.3)$$

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

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_n \sum_{i<j}^N \frac{q_i \cdot q_j S(\alpha |r_{ij} + n|)}{|r_{ij} + n|} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_n \sum_{i<j}^N \frac{q_i \cdot q_j (1 - S(\alpha |r_{ij} + n|))}{|r_{ij} + n|} \quad (4.4.4)$$

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

$$V_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_n \sum_{i<j}^N \frac{q_i \cdot q_j \text{erfc}(\alpha |r_{ij} + n|)}{|r_{ij} + n|} + \frac{1}{\pi\epsilon_0} \frac{1}{L^3} \sum_{i<j} \sum_{k \neq 0} \frac{e^{-k^2/4\alpha^2}}{k^2} \left| \sum_{i=1}^N q_i e^{-ik \cdot r_i} \right|^2 - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2 \quad (4.4.5)$$

Le dernier terme de l'équation (4.4.5) est constant et correspond au terme d'auto-couplage [6].

Thermodynamique

Lors de l'intégration simultanée des équations de Newton du mouvement, l'énergie totale du système est conservée, et, pour peu que le volume soit maintenu constant. Les simulations de dynamique moléculaire produisent des trajectoires dans l'ensemble statistique microcanonique (N, V, E) , où le nombre de particules N , le volume V et l'énergie totale E sont constants. Une telle situation n'est, cependant, pas toujours satisfaisante et il peut être désirable de réaliser des simulations dans lesquelles la température, ou la pression, sont des grandeurs indépendantes, et non des propriétés dérivées [6].

Thermostat de Berendsen

La méthode de couplage faible ou méthode de Berendsen [82] consiste à placer le système en équilibre avec un bain thermique. L'équation de mouvement des atomes est alors modifiée de sorte à relaxer la température cinétique instantanée $T(t)$ vers la température T_0 désirée [6] :

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau_T} \quad (4.4.6)$$

où T désigne le temps de relaxation associé aux fluctuations de température. Durant un pas d'intégration t , l'énergie cinétique est modifiée d'une quantité ΔI donnée par :

$$\Delta I = \frac{1}{2}(\chi^2 - 1)Nk_B T(t) \quad (4.4.7)$$

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

$$\chi = \left[1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (4.4.8)$$

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

Barostat de Berendsen

De manière analogue à la méthode de couplage faible pour la température, Berendsen et al. [82] ont proposé une extension de la méthode à la pression, où cette fois la position des atomes est corrigée. Les équations de mouvement sont modifiées en fonction de la relaxation de la pression instantanée $P(t)$ vers la pression P_0 désirée [6] :

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{P_0 - P(t)}{\tau_P} \quad (4.4.9)$$

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

$$\Delta P = \frac{\Delta V}{\beta_I V} \quad (4.4.10)$$

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

$$\varsigma = \left[1 - \beta_I \delta t \frac{P_0 - P(t)}{\tau_P} \right]^{1/3} \quad (4.4.11)$$

Bibliographie

- [1] Benhabils, N.; Thomas, A.; Brasseur, R. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2000, 4 (2), 71-81.
- [2] Patrick, G.L. *Chimie pharmaceutique*. De Boeck Diffusion s.a, 2003, 20-31.
- [3] Lesk, A.M. In vivo, in vitro, in silico. In : Lesk, A.M. (Ed.), *Introduction to Protein Architecture*. Oxford University Press, Oxford. 2001, 143, pp.15–35.
- [4] Elkordy, A.A.; Forbes, R.T.; Barry, B.W. *Euro J Pharm. Sci.* 2008, 33, 177–190.
- [5] Ragoonanan, V.; Aksan, A. *Transfus Med Hemother.* 2007, 34, 246-252.
- [6] Lerbret, A. *Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une investigation par dynamique moléculaire et spectroscopie Raman*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologie de Lille, 2005.
- [7] Wang, W. *Inter J Pharma.* 2000, 203, 1-60.
- [8] Blond, G.; Simatos, D.; Catté, M.; Dussap, C.G.; Gros, J.B. *Carbohydrate Research*. 1997, 298, 139-145.
- [9] Hédoux, A. *Techniques de l'Ingénieur*. 2013, pha 2026, 1-14.
- [10] Pikal, M.J.; Roy, M.L.; Shah, S. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73, p. 1224-1237.
- [11] Tang, X. C.; Nail, S. L.; Pikal, M. J. *AAPS Annual Meeting*, Denver, Colorado, 2001.
- [12] Keilin, D. *Proceedings of the Royal Society London B150*. 1959, 149–191.
- [13] Alpert, P. *Integrative and Comparative Biology*. 2005, 45, 685–695.
- [14] Clegg, J.S. *Comparative Biochemistry and Physiology B128*. 2001, 613–624.
- [15] van Leeuwenhoek, A. *Letter 144. The Selected Works of Anton van Leeuwenhoek*. London. 1702, 2, 207–213.
- [16] Crowe, J.H.; Hoekstra, F.A.; Crowe, L.M. *Review of Physiology*. 1992, 54, 579–599.
- [17] Womersley, C.Z.; Wharton, D.A.; Higa, L.M. *Survival biology*. In : Perry, R.N., Wright, D.J. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-Parasitic Nematodes*, Vol. 11. CAB International, Wallingford, 1998, 271–302.
- [18] Storey, K.B.; Storey, J.M. *Biochemistry of cryoprotectants*. In : Lee, Jr., R.E., Denlinger, D.L. (Eds.), *Insects at Low Temperature*, Vol. 4. Chapman and Hall, New York, 1991, 64–93.
- [19] Crowe, L.M. *Comparative Biochemistry and Physiology 131A*, 2002, 505–513.

- [20] Ingram, J.; Bartels, D. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1996, 47, 377–403.
- [21] Weronika Wełnicz, W.; Grohme, M.A.; Kaczmarek, L.; Schill, R.O.; Frohme, M. J Ins Physio. 2011, 57, 577–583.
- [22] Robert, D.; Vian, B. Eléments de biologie cellulaire. Doin éditeurs, 3^{ème} édition, 2004.
- [23] Cesàro, A.; De Giacomo, O.; Sussich, F. Food Chem. 2008, 106, 1318–1328.
- [24] Jain, N.K.; Roy, I. Protein science vol 18. 2008, 24-36.
- [25] Hoekstra, F.A.; Golovina, E.A.; Buitink, J. Trends in PlantScience. 2001, 6 (9), 431.
- [26] Timasheff S.N. Biochemistry. 2002, 41 (6), 13474.
- [27] Branca, C.; Maccarrone, S.; Magazù, S.; Maisano, G.; Bennington, S.M.; Taylor, J. J. Chem. Phys. 2005, 122, 174513.
- [28] Giangiacomo, R. Food. Chem. 2006, 96, 371.
- [29] Gallina, M.E.; Sassi, P.; Paolantoni, M.; Morresi, A.; Cataliotti, R.S. J. Phys. Chem. B. 2006, 110, 8856.
- [30] Dashnau, J.L.; Sharp, K.A.; Vanderkooi, J.M. J. Phys. Chem. 2005, B 109, 24152.
- [31] Liu, Q.; Brady, J.W.. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 12276.
- [32] Branca, C.; Magazù, S.; Migliardo, F.; Migliardo, P. Physica A. 2002, 304, 314.
- [33] Lerbret, A.; F. Affouard, F.; Bordat, P.; Hédoux, A.; Guinet, Y.; Descamps, M.; J.Non-Cryst Solids, 2011, 357, 695-699
- [34] Lerbret, A.; Bordat, P.; Affouard, F.; Guinet, Y.; Hédoux, A.; Paccou, L.; Prévost, D.; Descamps, M. Carbohydrate Research. 2005,340, 881.
- [35] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, P. J. Chem. Phys. 1999, 111 (1), 281.
- [36] Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, P.; Söper, A.K. Appl. Phys. 2002, A 74, S450.
- [37] Bordat, P.; Lerbret, A.; Demaret, .; J.-P.; Affouard, F.; Descamps, M. Europhys. Lett. 2004, 65 (1), 41.
- [38] Yoon, Y. H.; Pope, J.M.; Wolfe, J. Biophys. 1998, J. 74, 1949.
- [39] Affouard, F.; Bordat, P.; Descamps, M.; Lerbret, A.; Magazù, S.; Migliardo, F.; Ramirez-Cuesta, A.J.; Telling, M.F.T. Chem.Phys. 2005, 317, 258.
- [40] Wolfe, J.; Bryant, G. Cryobiology 1999, 39, 103–129.
- [41] Slade, L.; Levine, H. Crit. Rev. Food Sci. Nutri. 1991, 30, 115–360.
- [42] Green, J. L.; Angell, C. A. J. Phys. Chem.1989, 93, 2880–2882.
- [43] Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. Biochemistry 1989, 28, 3916–3922.

- [44] Wang, W. *Int. J. Pharm.* 1999, 185, 129.
- [45] Crowe, J. H. ; Hoekstra, F. A. ; Crowe, L. M. *Ann. Rev. Physiol.* 1992, 54, 579–599.
- [46] Matsuoka, T. ; Okada, T. ; Murai, K. ; Koda, S. ; Nomura, H. *J. Molecular Liquids* 2002, 317, 98-99.
- [47] Belton, P. S. ; Gil, A. M. *Biopolymers* 1994, 34, 957.
- [48] Lins, R. D. ; Pereira, C. S. ; Hünenberger, P. H. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics* 2004, 55, 177.
- [49] Barbillat, J. ; Bougeard, D. ; Buntinx, G. ; Delhay, M. ; Dhamelincourt, P. ; Fillaux, F. *Techniques de l'Ingénieur* 1999, p2865, 1–31.
- [50] Keresztury, G. *Handbook of Vibrational Spectroscopy.* 2006, 71-87.
- [51] Paccou, L. Développement d'environnements automatisés pour des applications dans le domaine de l'optique. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologie de Lille, 2005.
- [52] Buchenau, U. ; Zorn, R. *Europhys. Lett.* 1992, 18, 523-528.
- [53] Hédoux, A. ; Guinet, Y. ; Descamps, M. *Int. J. Pharm.* 2011, 417, 17-31.
- [54] Hédoux, A. ; Derollez, P. ; Guinet, Y. ; Descamps, M. *Phys. Rev.* 2001, B 63, 144202-144210.
- [55] Williams, R.W. ; Dunker, A.K. *J Mol Biol*, 1981, 152(4), 783–813.
- [56] Hédoux, A. ; Ionov, R. ; Willart, J.F. ; Lerbret, A. ; Affouard, F. ; Guinet, Y. ; Descamps, M. ; Prevost, D. ; Paccou, L. ; Danéde, F. *J Chem Phys*, 2006, 124, 14703–14709.
- [57] Prestrelski, S.J. ; Tedeschi, N. ; Arakawa, T. ; Carpenter, J.F. *Biophys J.* 1993, 65(2), 661–671.
- [58] Kendrick, B.S. ; Dong, A. ; Allison, S.D. ; Manning, M.C. ; Carpenter, J.F. *J Pharm Sci*, 1996 85(2), 155–158.
- [59] Bellavia, G. ; Paccou, L. ; Achir, S. ; Guinet, Y. ; Siepmann, J. ; Hédoux, A. *Food Biophysics.* 2013, 8(3), 170-176.
- [60] Wall, T.T. ; Hornig, D.F.J. ; *Chem. Phys.* 1965, 43, 2079-2087.
- [61] Franks, F. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45, 221–229.
- [62] Lerbret, A. ; Bordat, P. ; Affouard, F. ; Descamps, M. ; Migliardo, F. *J Phys Chem.* 2005, B 109, 11046-1057.
- [63] Hédoux, A. ; Willart, J. F. ; Ionov, R. ; Affouard, F. ; Guinet, Y. ; Paccou, L. ; Lerbret, A. ; Descamps, M. *J Phys Chem*, 2006, 110, 22886-22893.
- [64] Hédoux, A. ; Willart, J. F. ; Paccou, L. ; Guinet, Y. ; Affouard, F. ; Lerbret, A. ; Descamps, M. *J Phys Chem.* 2009, 113, 6119-6126
- [65] Seo, A. J. ; Hédoux, A. ; Guinet, Y. ; Paccou, L. ; Affouard, F. ; Lerbret, A. ; Descamps, M. *J Phys Chem.* 2010, 114, 6675-6684

- [66] Hédoux, A. ; Guinet, Y. ; Paccou, L. *J Phys Chem.* 2011, 115, 6740-6748.
- [67] Lerbret, A. ; Hédoux, A. ; Annighöfer, B. ; Bellissent-funel, M. C. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 2013, 81, 326-340.
- [68] Ionov, R. ; Hédoux, A. ; Guinet, Y. ; Bordat, P. ; Lerbret, A. ; Affouard, F. ; Prevost, D. ; Descamps, M. ; *J of Non-Crys Solids.* 2006. 352 4430-4436.
- [69] Pace, N. C. ; Tanford, C. *Biochem*, 1968, 7, 198-208.
- [70] Xiaolin, T. ; Pikal, M. J. *Pharm. Res.* 2005, 22, 1167-1175.
- [71] Griko, Y. V. ; Kutysenko, V. P. *Biophys. J.* 1994, 67, 356-363.
- [72] Griko, Y. V. ; Privalov, P. L. *Biochem.* 1992, 31, 8810-8815.
- [73] Gonzalez, M.A. *Collection SFN.* 2011, 12, 169-200.
- [74] Matsuo, T. *Br. J. Ophthalmol.*, 2001, 85, 610-612.
- [75] Wusteman, M. C. ; Simmonds, J. ; Vaughan, D. ; D. E. Pegg, D. E. *Cryobiology*, 2008, 56, 62-71.
- [76] Cesàro, A. ; De Giacomo, O. ; Sussich, F. *Food Chemistry.* 2008, 106, 1318-1328
- [77] Ekdawi-Sever, N. ; de Pablo, J. J. ; Feick, E. ; von Meerwall, E. *J.Phys. Chem. A*, 2003, 107, 936-943.
- [78] Cicerone, T. ; Tellington, A. ; Trost, L. ; Sokolov, A. *Bioprocess International.* 2003, 1-36.
- [79] Averett, D. ; Cicerone, M.T. ; Douglasb, J.F. ; de Pablo, J.J. *Soft Matter.* 2012, 8, 4936-4945.
- [80] Cordella C. *Biofutur.* 2004, 241, 15-17.
- [81] Maple, J.R. ; Dinur, U. ; Hagler, A.T. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1988, 85, 5350-5354.
- [82] Berendsen, H. J. C ; Postma, J. P. M ; van Gunsteren, W. F ; DiNola, A ; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* 1984, 81, 3684.
- [83] Lesne, A. Paris, Eyrolles Sciences. 1996, 388, p.245.
- [84] Lerbret, A. ; Affouard, F. ; Hédoux, A. ; Krenzlin, S. ; Siepmann, J. ; Bellissent-funel, M.C. ; Descamps, M. *J Phys Chem., B* 116. 2012, 11103-11116.
- [85] Cicerone, M.T. ; Soles, C.L. *Biophys J.* 2004, 86, 3836-3845.
- [86] Bohmer, R. ; Ngai, K.L. ; Angell, C.A. ; Plazek, D.J. *J. Chem. Phys.*, 1993, 99, 4201-4209.
- [87] Dirama, T. E. ; Carri G. A. ; Sokolov, A. P. *J. Chem. Phys.*, 2005, 122, 114505-1-8.
- [88] Sokolov, A. P. ; Rossler, E. ; Kisliuk, A. ; Quitmann, D. *Phys. Rev. Lett.* 1993, 71, 2062.
- [89] Limbach, H. J. ; Ubbink, J. *Soft Matter* 2008, 4, 1887-1898.
- [90] Qi, X. L. ; Holt, C. ; McNulty, D. ; Clarke, D. T. ; Brownlow, S. ; Jones, G. R. *Biochem. J.* 1997, 324, 341-346.

-
- [91] Qi, X. L.; Brownlow, S.; Holt, C.; Sellers, P. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1248, 43-49.
- [92] Blanch, E. W.; Hecht, L.; Barron, L. D. *Protein Sci.* 1999, 8, 1362-1367.
- [93] Hédoux, A.; Seo, J. A.; Guinet, Y.; Paccou, L. *J Raman Spectro.* 2012, 43, 16-23.
- [94] Chang, B.S.; Randall, C.S.; Lee, Y.S. *Pharm Res.* 1993, 10, 1478-1483.
- [95] Hedoux, A.; Paccou, L.; Achir, S.; Guinet, Y. *J Pharm Sci.* 2013, 102(8), 2484-2494.
- [96] Zang, J.; Zograf, G. J. *Pharm. Sci.* 2001, 90, 1375-1385.
- [97] Conrad, P. B.; de Pablo, J. J. *J. Phys. Chem. A.* 1999, 103, 4049-4055.
- [98] Riggleman, R.A.; de Pablo, J.J. *J. Phys. Chem.* 2008, 112, 224504-1-224504-7.
- [99] Denicourt, T. *Etudes spectroscopiques de systèmes désordonnés profondément sous-refroidis. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 2002*
- [100] Caron, V. *Mécanosynthèse et vitrification à l'état solide d'alliages moléculaires. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologie de Lille, 2006.*
- [101] Daudon, J.L. *Techniques de l'Ingénieur.* 2001, p1260, 1-21.
- [102] Weronika Welnicz, W.; Grohme, M.A.; Kaczmarek, L.; Schill, R.O.; Frohme, M. *J Ins Physio.* 2011, 57, 577583.
- [103] Hatley, R.H.M.; Franks, F. J. *Therm. Anal.* 1990, 37, 19051914.
- [104] Yu, L.; Milton, N.; Groleau, E.G.; Mishra, D.S.; Vansickle, R.E. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 196198.
- [105] Shalaev, E.Y.; Zogra, G. J. *Pharm. Sci.* 1996, 85, 11371141.
- [106] Franks, F. *Cryo-Letters.* 1990, 11, 93110.

Résumé en français

Cette thèse est une contribution à l'étude des mécanismes de stabilisation des protéines en solution et à l'état sec. Un nombre considérable de biomolécules thérapeutiques émanant des avancées de la technologie ADN recombinant sont porteuses de nouvelles approches thérapeutiques, mais ne peuvent pas être utilisées à cause de leur très faible stabilité. Celle-ci est améliorée à l'état sec, après lyophilisation qui est toutefois source de nombreux stress pour la protéine. Les travaux ont principalement focalisé sur l'étude de la stabilité de l'état physique de protéines modèles, par micro-spectroscopie Raman in-situ au cours d'une procédure de lyophilisation. Cette analyse a permis de déterminer les sources et le processus de dénaturation, ainsi que les transformations structurales de la protéine inhérente à la lyophilisation. Des cartographies Raman réalisées aux différentes étapes d'un cycle de lyophilisation, ont conduit à la description des interactions entre protéine, solvant et co-solvant et au décryptage des mécanismes de stabilisation de la protéine pendant l'opération de lyophilisation. La stabilité de l'état physique des protéines, lyophilisées en utilisant différents agents bioprotecteurs, a également été analysée lors de vieillissements accélérés, révélant l'efficacité bioprotectrice du tréhalose, exacerbée par l'ajout d'une faible quantité de glycérol. Des simulations de dynamique moléculaire ont aussi été réalisées sur les matrices vitreuses bioprotectrices tréhalose-glycérol pour lesquelles les effets plastifiants/anti-plastifiants de l'eau résiduelle ont été étudiés.

Mots-clés

Spectroscopie Raman, lyophilisation, protéines, structure des protéines, dénaturation des protéines, mécanismes de stabilisation des protéines, tréhalose, simulations de dynamique moléculaire.

Titre en anglais :

The protein stabilizing mechanisms investigated by Raman scattering and Molecular Dynamics Simulations

Résumé en anglais

The mechanisms of protein stabilization in solution and dry state have been investigated in this thesis. New therapeutic approaches are developing from many therapeutic biomolecules related to advances in recombinant DNA technology. Although we are not able to use them because of their low stability. The latter is improved in the dry state albeit freeze-drying gets a source of stress for many proteins. This work has mainly focused on the stability of model proteins, by in-situ Raman micro-spectroscopy during freeze-drying. The analysis identified the origin and the process of denaturation and the structural transformations of the inherent protein freeze-drying. Raman mapping was implemented at different stages of drying cycle, leading to the description of the protein/solvent/co-solvent interactions and decrypting the protein stabilizing mechanisms during the whole freeze-drying process. The protein stability was also analyzed during accelerated aging, by using several biopreservers. It revealed that the bioprotective efficiency of trehalose is enhanced by adding a small amount of glycerol. Molecular dynamics simulations were also carried out on trehalose-glycerol glassy matrices and the plasticizing / anti- plasticizing effects of the residual water were studied.