

50376  
1994  
189

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

N° D'ORDRE: 1308

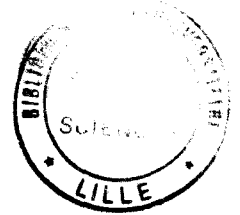
THESE

Présentée

Pour l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Isabelle KOUACH-ALIX



## LE CHAMP DE FORCES SPASIBA DE SACCHARIDES

**Sa paramétrisation et son application à l'étude  
en dynamique harmonique et dynamique  
moléculaire du chitobiose et du chitohexaose**

Soutenue le 17 Juin 1994 devant la Commission d'Examen:

Président:	Professeur A. VERBERT
Rapporteurs:	Docteur V. TRAN Docteur B. MAIGRET
Examineurs:	Professeur G. SPIK Professeur J.P. HUVENNE Professeur G. VERGOTEN

Je tiens à remercier très vivement :

- Monsieur le Professeur A. VERBERT pour l'honneur qu'il m'accorde en présidant le jury de ma thèse.

- Messieurs les Docteurs V. TRAN et B. MAIGRET d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

- Madame le Professeur G. SPIK ainsi que Messieurs les Professeurs J. P. HUVENNE et G. VERGOTEN qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à :

Monsieur le Professeur Gérard VERGOTEN, qui m'a accueilli au sein de son Unité de Recherche, pour toute l'aide et la confiance qu'il m'a accordées.

Messieurs les Docteurs Philippe LAGANT, Philippe DERREUMAUX et Manuel DAUCHEZ pour toute l'aide qu'ils m'ont prodiguée et tous les services qu'ils m'ont rendus depuis mon arrivée au laboratoire.

Mademoiselle le Docteur Majda SEKKAL pour la réalisation des spectres infrarouge.

Tout le personnel du Laboratoire: Roman, Mostafa, Franckie, Viviane, Aziz et Majid pour leur aide, leur soutien et l'amitié qu'ils me témoignent.

Ce travail a été réalisé sous la direction scientifique du Professeur Gérard VERGOTEN, Professeur à la Faculté des Sciences de Lille, au Centre de Recherches et d'Etudes en Simulations et Modélisation Moléculaires (CRESIMM), appartenant à l'Unité 279 de l'INSERM dirigée par le Professeur Yves MOSCHETTO.



## Publications

- 1) A Vibrational Molecular Force Field of Model Compounds with Biological Interest. V. Harmonic Dynamic of N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine in the crystalline state.  
Kouach-Alix I. and Vergoten G. (1994)  
J. Mol. Struct. Sous presse
- 2) A Vibrational Molecular Force Field of Model Compounds with Biological Interest. VI. Harmonic Dynamic of Methyl- $\alpha$ -D-Mannoside in the crystalline state.  
Kouach-Alix I., Dauchez M., Sekkal M. and Vergoten G. (1994)  
J. Raman Spectr. accepté pour publication
- 3) A Vibrational Molecular Force Field of Model Compounds with Biological Interest. VII. Harmonic Dynamic of N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminic acid and N-acetyl- $\alpha$ -D-muramic acid in the crystalline state.  
Kouach-Alix I., Legrand P., Huvenne J.P. and Vergoten G. (1994)  
J. Mol. Struct. accepté pour publication

## Communications par affiches (Avec résumé étendu publié)

- 1) A Vibrational Molecular Force Field for carbohydrates.  
Dauchez M., Kouach-Alix I. and Vergoten G.  
Symposium on conformational studies of oligosaccharides, polysaccharides and glycoconjugates. Le Croisic France 92
- 2) Molecular force field for the glycan moiety of glycoproteins:  
N-Acetyl-Alpha-D-glucosamine and Beta-D-N-Acetyl-neuraminic acid.  
Kouach-Alix I., Dauchez M. and Vergoten G.  
XIII<sup>th</sup> International Conference on Raman Spectroscopy. Würzburg Germany (1992).

## Abréviations utilisées

Å:	Angström
ADN:	Acide désoxyribonucléique
Asn:	Asparagine
GlcNAc:	N-acétyl-glucosamine
CMP:	Cytidine monophosphate-5'
CPU:	Central processor unit
DM:	Dynamique moléculaire
Dol-P:	Dolichol-phosphate
Dol-PP:	Dolichol-diphosphate
fs:	Femtoseconde ( $10^{-15}$ seconde)
Fuc:	Fucose
Gal:	Galactose
GDP:	Guanosine diphosphate-5'
Glc:	Glucose
IR:	Infrarouge
Kcal:	Kilocalories
Man:	Mannose
NeuAc:	Acide N-acétyl-neuraminique
nOe:	Nuclear Overhauser effect
ns:	Nanoseconde
ps:	Picoseconde
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire
RMS:	Root Mean Square ou moyenne quadratique
RX:	Rayons X
UDP:	Uridine diphosphate-5'
UMP:	Uridine monophosphate-5'

## Table des matières

	<b>pages</b>
<b>Introduction générale</b>	1
<b>Chapitre 1: Généralités sur les N-glycannes des glycoprotéines</b>	5
<b>I. Introduction</b>	6
<b>II. Définitions</b>	7
II.1. Définition générale d'une glycoprotéine	7
II.2. Définition d'une N-glycoprotéine	7
II.3. Conditions de N-glycosylation	7
<b>III. Les différents types de N-glycannes liés aux glycoprotéines</b>	8
III.1. Le noyau invariant	8
III.2. Les différentes classes des N-glycoprotéines	9
III.3. Les différentes antennes	10
III.3.1. Antennes de type oligomannosidique	10
III.3.2. Antennes de type N-acétyl-lactosaminique	11
III.3.2.1. Structure monoantennée	11
III.3.2.2. Structure biantennée	12
III.3.2.3. Structures triantennées	12
III.3.2.4. Structure tétraantennée	12
III.3.2.5. Structure pentaantennée	13
III.3.3. Antennes de type hybride	14
<b>IV. Synthèse des N-glycannes des glycoprotéines</b>	15
IV.1. Introduction	15
IV.2. Cycle des dolichols	15
IV.3. Transfert en bloc	17
IV.4. Maturation dans l'appareil de Golgi	17
<b>V. Conformations des glycannes</b>	20
V.1. Introduction	20
V.2. Les différentes conformations spatiales	20
V.2.1. La conformation Y	20
V.2.2. La conformation en T	21

V.2.3. La conformation oiseau	22
V.2.4. La conformation en aile brisée	23
V.2.5. Conformation "back-folded wing"	24
V.2.6. Autres conformations	24
V.3. Conclusion	24
<b>VI. Rôles des N-glycannes des glycoprotéines</b>	<b>25</b>
VI.1. Introduction	25
VI.2. Méthodes biochimiques pour déterminer le rôle des glycannes	25
VI.3. Rôles des N-glycannes des glycoprotéines	26
VI.3.1. Rôle dans le maintien des propriétés physico-chimiques	26
VI.3.2. Rôle dans le repliement et le maintien de la conformation de la protéine	27
VI.3.3. Rôle dans la sécrétion	28
VI.3.4. Rôle dans la circulation et le temps de vie	29
VI.3.5. Rôle des glycannes envers les protéolyses non contrôlées	30
VI.3.6. Rôle des précurseurs des glycoprotéines dans le processus de protéolyse	31
VI.3.7. Rôle des glycannes dans les interactions cellule-cellule	31
VI.3.8. Rôle des N-glycannes en immunologie	31
VI.3.9. Rôle des glycannes dans la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire	32
<b>VII. Conclusion</b>	<b>33</b>
<b>Bibliographie du chapitre 1</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 2: Généralités sur les méthodes employées pour la détermination de la conformation des glycannes</b>	<b>48</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>49</b>
<b>II. Définitions</b>	<b>49</b>
I.1. Effet anomérique, effet exoanomérique	49
I.2. La liaison glycosidique	50
<b>III. Méthodes expérimentales</b>	<b>51</b>

III.1. Applications aux saccharides de la diffraction des rayons X et de la diffusion inélastique des neutrons	51
III.2. Application de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à la détermination de conformation de sucres	52
III.3. Applications de l'absorption infrarouge et de la diffusion Raman aux sucres	53
III.3.1. Région 3700-2800 $\text{cm}^{-1}$	54
III.3.2. Région 1500-1200 $\text{cm}^{-1}$	54
III.3.3. Région 1200-950 $\text{cm}^{-1}$	54
III.3.4. Région 950-750 $\text{cm}^{-1}$	54
III.3.5. Région 750-200 $\text{cm}^{-1}$	55
III.3.6. Région au dessous de 200 $\text{cm}^{-1}$	55
<b>IV. Méthodes théoriques</b>	<b>55</b>
IV.1. Introduction	55
IV.2. Applications des méthodes <i>ab initio</i> aux sucres	55
IV.3. Applications des méthodes semi-empiriques aux sucres	56
IV.4. Méthodes empiriques	58
IV.4.1. Introduction	58
IV.4.2. Mécanique Moléculaire	59
IV.4.2.1. Principe	59
IV.4.2.2. Les différents champs de forces appliqués aux sucres	59
IV.4.2.2.1. La méthode HSEA	60
IV.4.2.2.2. Champs de forces PEF	60
IV.4.2.2.3. Champs de forces PFOS	61
IV.4.2.2.4. Champs de forces généraux et leurs dérivés	61
IV.4.2.3. Conclusion	63
IV.4.3. Dynamique harmonique: calcul des modes normaux de vibration	63
IV.4.3.1. Introduction	63
IV.4.3.2. Modèles de champs de forces	64
IV.4.3.3. Analyse de modes normaux de vibrations des saccharides	66
IV.4.4. Dynamique moléculaire	67
IV.4.4.1. Introduction	67

IV.4.4.2. Historique d'une simulation de dynamique moléculaire	67
IV.4.4.2.1. Point de départ	67
IV.4.4.2.2. Thermalisation	67
IV.4.4.2.3. Equilibrage	67
IV.4.4.2.4. Dynamique	67
IV.4.4.3. Programmes de simulation dynamique appliquée aux sucres	68
IV.4.4.4. Conclusion	70
IV.4.5. Le champ de forces SPASIBA	70
<b>V. Conclusion</b>	72
<b>Bibliographie du chapitre 2</b>	73
<b>Chapitre 3: Dynamique harmonique de monosaccharides</b>	95
<b>I. Introduction</b>	96
<b>II. Présentation des molécules</b>	96
II.1. Le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside	96
II.2. La N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine	97
II.3. L'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique	97
II.4. L'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique	98
<b>III. Données cristallographiques</b>	98
<b>IV. Représentation irréductible des modes normaux</b>	99
<b>V. Obtentions des spectres de vibrations</b>	100
<b>VI. Fonction potentielle</b>	101
<b>VII. Conditions des calculs</b>	102
<b>VIII. Résultats des dynamiques harmoniques</b>	110
<b>IX. Discussions des résultats des dynamiques harmoniques</b>	132
IX.1. Champs de forces	132
IX.2. Spectres	133
IX.3. Attributions des fréquences	133

IX.3.1. Hautes fréquences	133
IX.3.2. Domaine spectral 1800-1200 $\text{cm}^{-1}$	134
IX.3.3. Région 1200-1000 $\text{cm}^{-1}$	135
IX.3.4. Domaine 1000-700 $\text{cm}^{-1}$	135
IX.3.5. Région 700-200 $\text{cm}^{-1}$	135
IX.3.6. Domaine des basses fréquences	136
<b>X. Conclusion sur la dynamique harmonique des monosaccharides</b>	<b>136</b>
<b>Bibliographie du chapitre 3</b>	<b>137</b>
<b>Annexe du chapitre 3</b>	<b>140</b>
<b>Chapitre 4: Paramétrisation de la fonction énergie potentielle de la liaison N-glycosidique</b>	<b>165</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>166</b>
<b>II. Conditions de calcul</b>	<b>166</b>
<b>III. Résultats de la dynamique harmonique</b>	<b>169</b>
<b>IV. Discussion des résultats de la dynamique harmonique</b>	<b>177</b>
IV.1. Champs de forces	177
IV.2. Attributions des fréquences	177
IV.2.1. Hautes fréquences	177
IV.2.2. Domaine spectral 1800-1200 $\text{cm}^{-1}$	178
IV.2.3. Région 1200-1000 $\text{cm}^{-1}$	178
IV.2.4. Domaine 1000-700 $\text{cm}^{-1}$	178
IV.2.5. Région 700-200 $\text{cm}^{-1}$	178
IV.2.6. Domaine des basses fréquences	179
<b>V. Conclusion sur la dynamique harmonique de la liaison N-glycosidique</b>	<b>179</b>
<b>Bibliographie du chapitre 4</b>	<b>180</b>
<b>Annexe du chapitre 4</b>	<b>182</b>
<b>Chapitre 5: Utilisation du champ de forces SPASIBA pour des études en dynamique harmonique et des simulations moléculaires de saccharides</b>	<b>189</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>190</b>

<b>II. Dynamique harmonique de la N-acétyl-glucosamine</b>	<b>191</b>
II.1. Conditions de calcul	191
II.2. Résultats et discussions	192
II.2.1. Résultats	192
II.2.2. Discussions	194
II.3. Conclusion	195
<b>III. Dynamique harmonique du chitobiose</b>	<b>195</b>
III.1. Conditions de calcul	195
III.2. Résultats et discussions	197
III.2.1. Résultats	197
III.2.2. Discussions	207
III.3. Comparaison avec le champ de forces AMBER	207
III.3.1. Comparaison des géométries	207
III.3.2. Comparaison des facteurs de température	208
III.3.3. Comparaison des fréquences et de leurs attributions	209
III.4. Conclusion	212
<b>IV. Dynamiques moléculaires du N,N'-diacétyl-chitobiose</b>	<b>213</b>
IV.1. Introduction	213
IV.2. Conditions des études de dynamiques moléculaires	213
IV.2.1. Matériel informatique et logiciels	213
IV.2.2. Présentations des différentes simulations dynamiques	213
IV.2.3. Obtention des structures de départ	214
IV.2.4. Conditions de réalisation des différentes dynamiques	214
IV.3. Résultats et discussions des différentes dynamiques	215
IV.3.1. Temps de réalisation et place mémoire	215
IV.3.2. Temps pour atteindre la température désirée	215
IV.3.3. 135 ps et 270 ps sont-ils des temps de dynamique moléculaire suffisants ?	216
IV.3.4. Résultats et discussions des conformères obtenus	216



IV.3.4.1. Les cycles pyraniques sont-ils rigides ?	216
IV.3.4.2. Les sous-unités monosaccharidiques sont-elles rigides ?	226
IV.3.4.3. Etudes des angles $\phi$ et $\psi$	243
<b>V. Dynamique moléculaire du chitohexaose</b>	<b>259</b>
V.1. Introduction	259
V.2. Obtention de l'hexamère minimisé	260
V.3. Conditions de déroulement de la simulation	261
V.4. Résultats et discussions de la simulation moléculaire de l'hexamère	261
V.4.1. Temps de réalisation, place mémoire, température	261
V.4.2. Visualisation de la trajectoire	261
V.4.3. Analyse des angles $\phi$ et $\psi$	264
V.4.4. Analyse des torsions du cycle D du chitohexaose	270
V.5. Conclusion	271
<b>Bibliographie du chapitre 5</b>	<b>272</b>
<b>Annexe du chapitre 5</b>	<b>279</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>286</b>

# Introduction générale

Les sucres ont été longtemps considérés comme des unités biologiques sans beaucoup d'intérêt comparativement aux protéines et aux acides nucléiques car les seuls rôles reconnus étaient des rôles de réserve (amidon, glycogène) ou de protection (chitine).

Mais l'étude biologique de ces composés a connu un nouvel essor avec la détermination du rôle de composés glucidiques dans l'interaction avec des cellules (groupes sanguins), leur élimination dans les urines dans certaines pathologies (syndrome de Hurler, mannosidose), leur intervention dans les interactions avec des protéines (lectines), ou bien encore l'apparition de nouvelles formes glycosylées dans certains cancers.

Des équipes de recherche, comme celle du Professeur Jean Montreuil à Lille, ont ainsi recherché toutes les structures glycaniques, cataloguant ensuite les différentes formes de glycannes connues actuellement.

Ces glycannes sont rarement libres mais plutôt associés à des protéines (glycoprotéines) ou à des lipides (glycolipides) pour former la grande classe des glycoconjugués.

La connaissance de la biosynthèse et du catabolisme de ces composés ont été nécessaires pour comprendre l'existence de ces différentes structures.

Mais actuellement nous voyons que la connaissance de ces voies métaboliques et de la structure primaire de ces glycannes ne suffisent pas pour expliquer entièrement leurs rôles biologiques.

L'élucidation de ces rôles biologiques doit donc passer par la détermination de la structure spatiale de ces composés.

La méthode privilégiée pour la détermination spatiale devrait être la diffraction des rayons X ou la diffusion des neutrons. Mais, pour les glycannes, il existe des problèmes de cristallisation (très grande flexibilité des oligosaccharides, existence de mélange). Il n'est pas possible, actuellement, de cristalliser des saccharides composés de plus de quatre sous-unités. Pourtant, des espoirs pour régler ces problèmes sont envisageables grâce à la possibilité de co-cristallisation de ces glycannes avec des lectines. Cependant, l'environnement cristallin n'est pas l'environnement biologique.

La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire ou RMN permet aussi depuis quelques années de déterminer la conformation des oligosaccharides. L'avènement de techniques COEsy et NOEsy a pu améliorer ces méthodes, mais des problèmes existent encore dans le cas de mélange de conformères.

Pour pallier tous ces problèmes, d'autres méthodes de détermination de la structure spatiale des glycannes sont exploitées.

Ainsi, des méthodes théoriques de calculs de la conformation des glycanes se sont développées grâce aux progrès permanents des calculateurs électroniques.

Parmi ces techniques, les méthodes *ab initio* sont encore limitées pour des molécules de la taille d'un monosaccharide.

Quelques méthodes semi-empiriques telles que MINDO/3, PCILO, MNDO, AM1 ou PM3 permettent une bonne détermination de la géométrie des molécules mais elles sont souvent limitées par un temps de calcul assez long, même pour des petites molécules comme les disaccharides. C'est pourquoi, les techniques de mécanique et de dynamique moléculaires sont à l'heure actuelle les plus utilisées.

Ces méthodes permettent de décrire une molécule par un ensemble d'équivalents mécaniques formant la fonction énergie potentielle moléculaire empirique. Cette fonction énergie potentielle est souvent fonction des coordonnées internes (variations d'angles et liaisons) de la molécule. Les différents paramètres de cette fonction énergie potentielle doivent donc reproduire la géométrie (données statiques) et les données dynamiques comme les spectres de vibration d'une molécule.

Quelques fonctions énergie potentielle ont été développées ces dernières années pour les saccharides. D'autres, établies pour les protéines, ont été adaptées aux sucres.

Nous présenterons tout d'abord dans un premier chapitre les connaissances actuelles sur la structure primaire et sur la conformation des N-glycanes des glycoprotéines, nous aborderons aussi leur biosynthèse et quelques rôles biologiques actuellement élucidés, tout ceci dans le but de montrer l'intérêt de la connaissance de la conformation de ces composés.

Puis, dans un second chapitre, nous aborderons les méthodes de déterminations expérimentales et théoriques de la conformation des oligosaccharides.

Le troisième chapitre concernera la détermination des paramètres de la fonction énergie potentielle de type Urey-Bradley-Schimanouchi modifié, à partir des données de spectroscopies vibrationnelles infrarouge et Raman pour les monosaccharides suivants:

- $\alpha$ -D-méthyl-mannoside
- N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine
- acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique
- acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique

Puis dans un chapitre suivant, dans le but de lier notre travail à celui entrepris sur des acides aminés dans notre laboratoire, nous présenterons les paramètres pour la molécule de N-acétyl-glucosamine-asparagine.

Enfin, nous montrerons l'intérêt de l'introduction des paramètres déterminés auparavant dans un champ de forces plus performant SPASIBA et ses applications à la dynamique moléculaire donc à la détermination des conformations de glycannes.

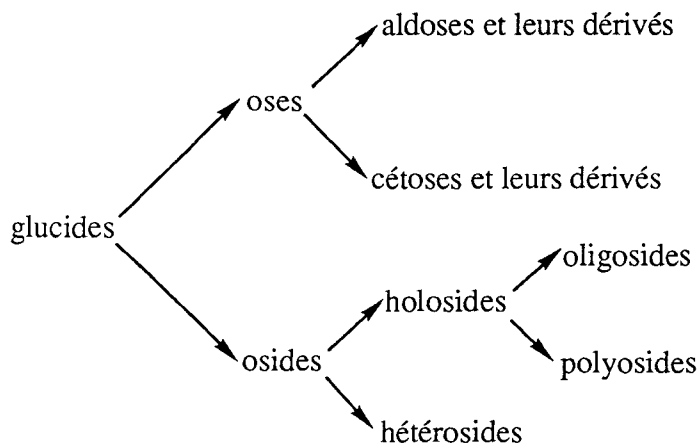
# Chapitre 1

## Généralités sur les N-glycannes des glycoprotéines

## I. Introduction:

Les glucides sont des composés naturels largement répandus chez tous les êtres vivants, soit comme éléments de structures (cellulose des végétaux, chitine des invertébrés ou polysaccharides des parois bactériennes) soit comme éléments énergétiques (glycogène du foie, amidon des graines) ou comme composants de métabolites fondamentaux (acides nucléiques, coenzymes).

Les glucides sont donc classés selon le diagramme suivant:



Ainsi parmi les oses:

- les monosaccharides sont des sucres que l'on ne peut transformer par hydrolyse en molécules plus simples. Suivant le nombre d'atomes de carbone de leurs chaînes carbonées principales on aura les trioses, les tétraoses, les pentoses, les hexoses et les heptuloses.

- les disaccharides sont des glucides qui se transforment par hydrolyse, en deux molécules d'un même monosaccharide ou en deux monosaccharides différents.

Parmi les osides:

- les oligosaccharides sont des glucides qui se transforment par hydrolyse en trois à dix monosaccharides.

- les polysaccharides ou polyosides comportent quant à eux plus de dix monosaccharides.

- les hétérosides résultent de la combinaison d'une ou de plusieurs molécules d'oses avec une fraction non glucidique appelée aglycône.

## **II. Définitions:**

### **II.1. Définition générale d'une glycoprotéine:**

C'est une hétéroprotéine qui résulte de l'association, par l'intermédiaire d'une liaison covalente, d'une fraction protéique et d'une fraction glucidique. Cette fraction glucidique peut comporter une ou plusieurs chaînes généralement de masse moléculaire faible et de structure linéaire ou ramifiée, fixées sur la séquence polypeptidique par une liaison de type N ou O-glycosidique (1). Les glycoprotéines avec les glycolipides forment la famille des glycoconjugués.

### **II.2. Définition d'une N-glycoprotéine:**

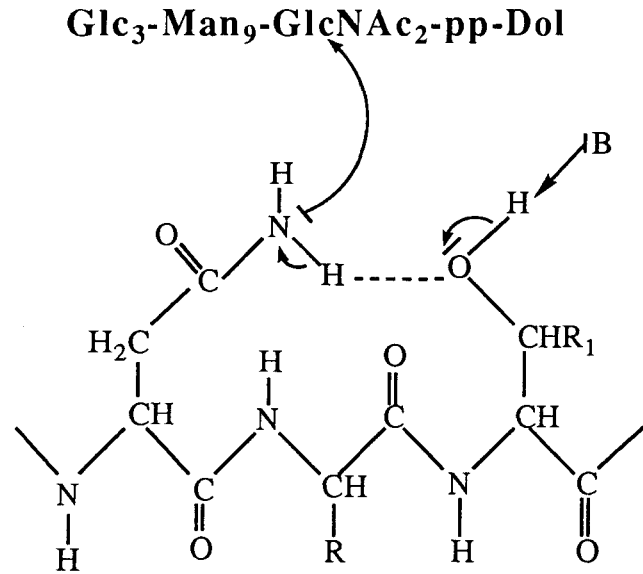
C'est une glycoprotéine pour laquelle la liaison covalente glycanne-protéine s'effectue par une liaison N-glycosidique. Cette dernière s'effectue presque exclusivement entre une N-acétyl-glucosamine et une asparagine faisant partie d'une séquence Asn-X-Ser(Thr) avec X différent d'une proline.

### **II.3. Conditions de N-glycosylation:**

Pour être N-glycosylée, une protéine doit porter dans sa structure primaire le séquen Asn-X-Ser(Thr) (2-4) mais d'autres considérations spatiales sont en jeu. Ainsi cette séquence doit se trouver dans un coude  $\beta$  formé de quatre acides aminés établissant un angle de  $180^\circ$  dans la chaîne peptidique. Cette conformation doit être stabilisée par une liaison hydrogène entre le CO du premier acide aminé du coude  $\beta$  et le NH du quatrième acide aminé (5). De plus, ce coude  $\beta$  doit être en surface de la protéine et des séquences bien particulières accessibles à des glycosyltransférases doivent exister dans cette protéine. C'est cette structure cyclique que reconnaît l'oligosaccharidyl-transférase (3) (cf. Fig. 1). La séquence Asn-X-Cys peut être aussi théoriquement glycosylée mais peu de protéines naturelles le sont (6), sans doute, parce que le groupement SH des



cystéines forme plus rapidement des ponts disulfure S-S et ne peut alors plus contribuer à la formation de cycle.



**Fig.1:** Structure cyclique formée par Asn-X-Ser(Thr).

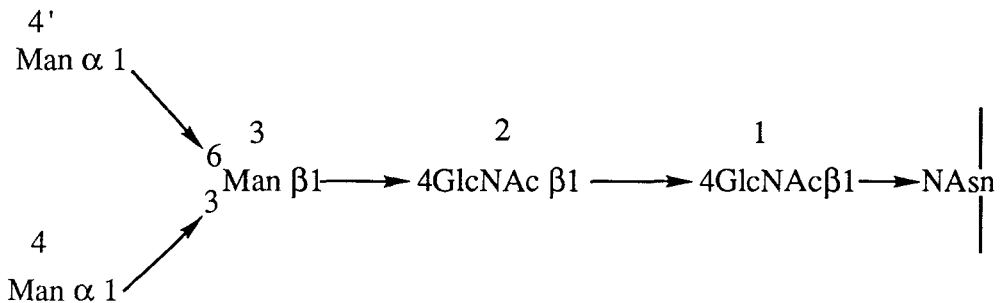
Ser: R1=H ; Thr: R1=CH<sub>3</sub>.

B est le résidu basique de l'oligosaccharidyltransférase.

### III. Les différents types de N-glycannes liés aux glycoprotéines:

#### III.1. Le noyau invariant:

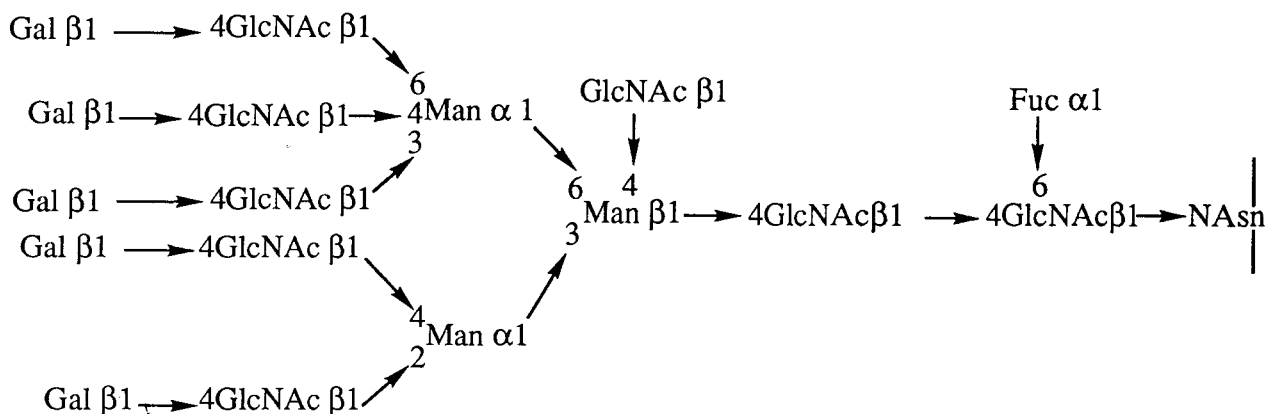
A l'opposé des O-glycoprotéines qui conduisent à une assez grande variété de glycannes, les N-glycoprotéines donnent naissance à 3 familles qui possèdent en commun un noyau mannosido-N,N'-diacétyl-chitobiose invariant. La structure primaire de ce noyau invariant est la suivante:



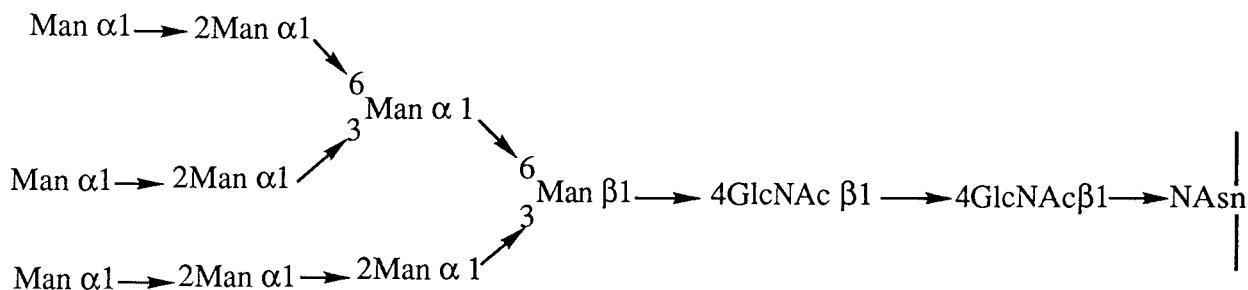
**Fig.2:** Structure primaire du noyau invariant des N-glycoprotéines.

### III.2. Les différentes classes des N-glycoprotéines:

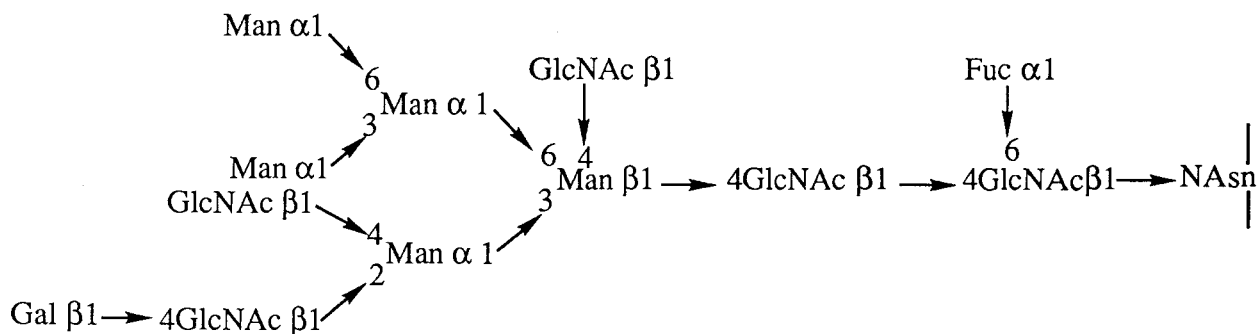
Selon la nature du motif oligosaccharidique variable qui substitue le noyau invariant, on distinguera 3 types de N-glycoprotéines dans le règne animal: le type N-acétyl-lactosaminique, le type oligomannosidique et le type complexe (cf. Fig. 3-5).



**Fig.3:** Chaîne saccharidique de type N-acétyl-lactosaminique.



**Fig.4:** Chaîne saccharidique de type oligomannosidique.

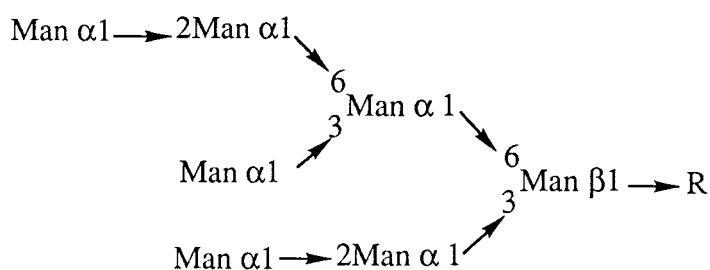
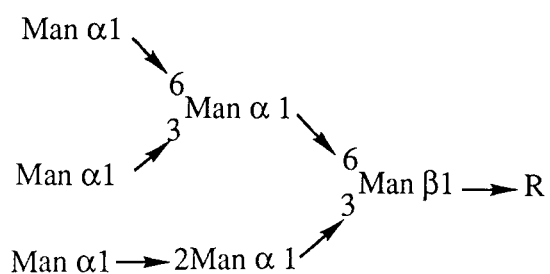
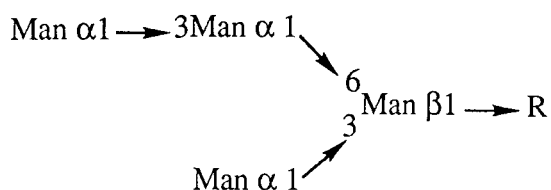
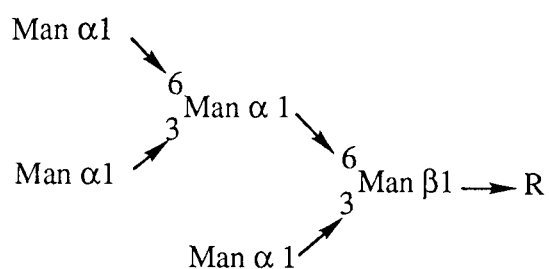


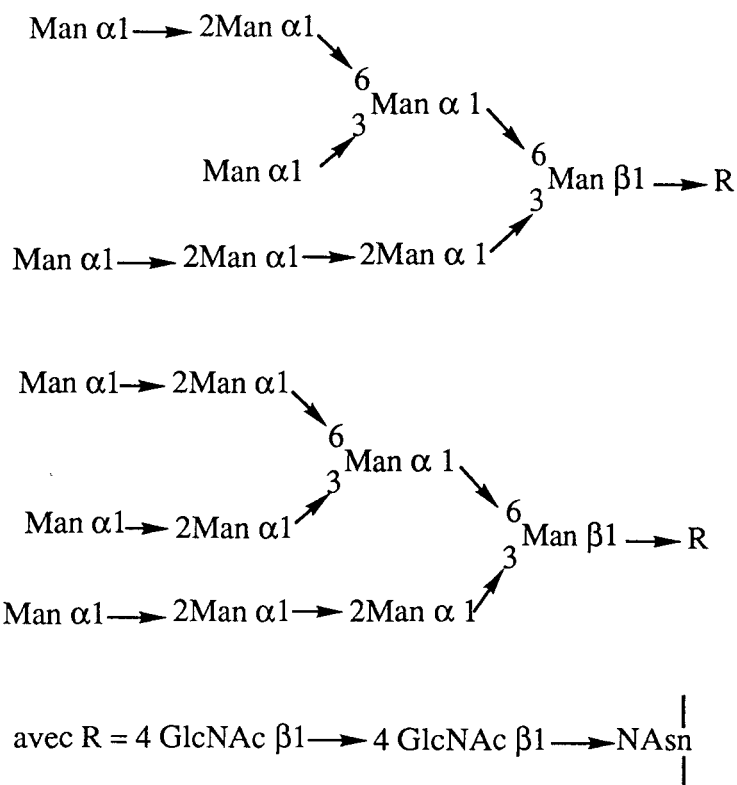
**Fig.5:** Chaîne saccharidique de type complexe.

### III.3. Les différentes antennes:

#### III.3.1. Antennes de type oligomannosidique:

Pour les glycanes de type oligomannosidique ou "high mannose type", la partie variable ou antenne est composée uniquement de mannose (Man). Ils forment un groupe très homogène dans lequel les antennes contiennent deux à six mannoses supplémentaires donnant par exemple les structures primaires extrêmes suivantes (1, 7-8):



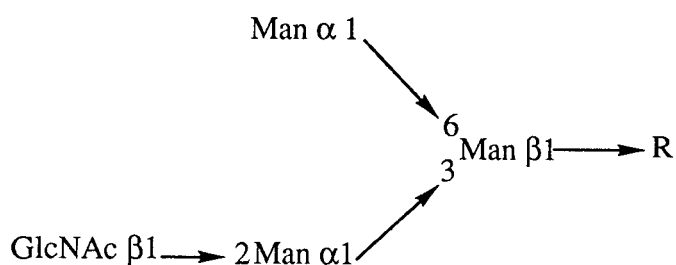


### III.3.2. Antennes de type N-acétyl-lactosaminique:

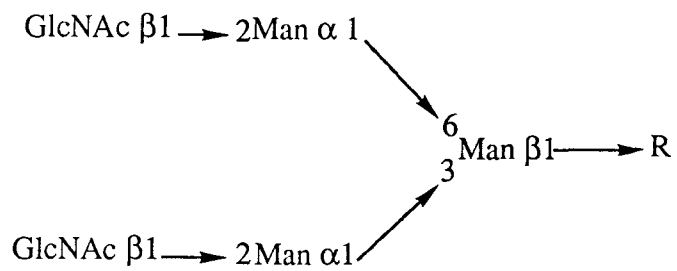
Les glycanes de type N-acétyl-lactosaminique ou "complex type" contiennent le noyau invariant substitué par des unités disaccharidiques Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc. Ces chaînons peuvent être eux-mêmes substitués par des résidus de fucose, d'acide N-acétyl-neuraminique, de N-acétyl-glucosamine ou encore de galactose. L'acide N-acétyl-neuraminique et le fucose sont souvent en position terminale non réductrice. Des groupements sulfate sont également rencontrés dans ces structures (1, 7-8).

Les différentes structures primaires rencontrées peuvent être résumées de la manière suivante:

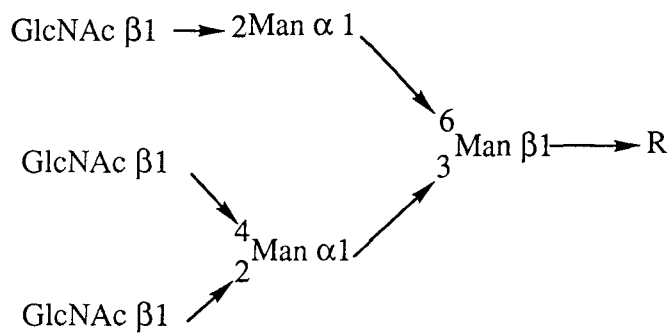
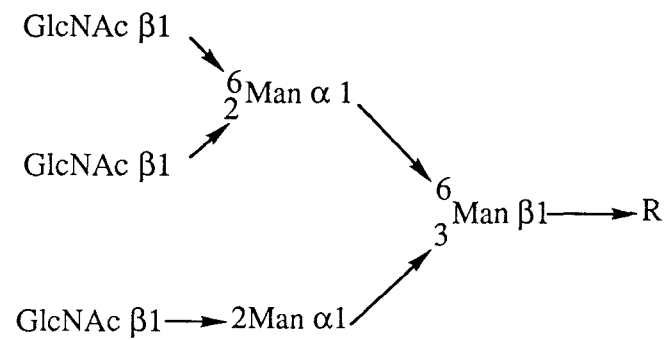
#### III.3.2.1. Structure monoantennée (1):



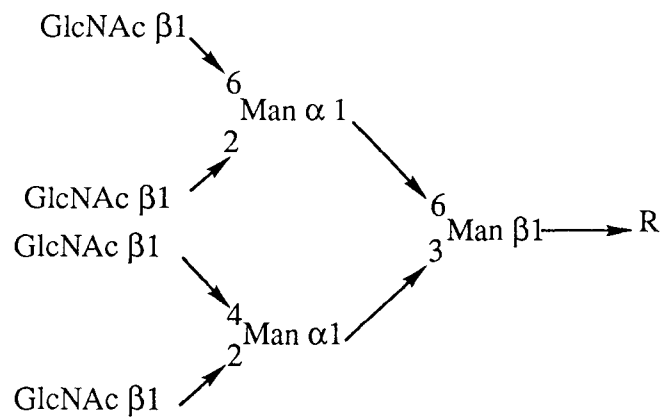
III.3.2.2. Structure biantennée (1):



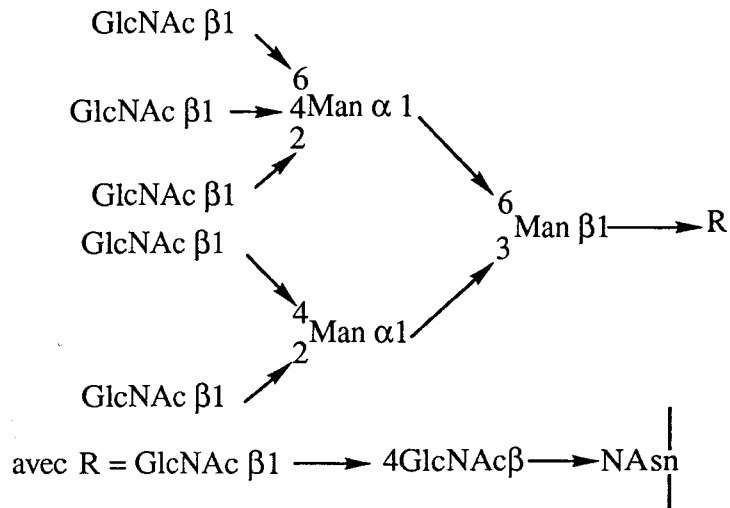
III.3.2.3 Structures triantennées (1):



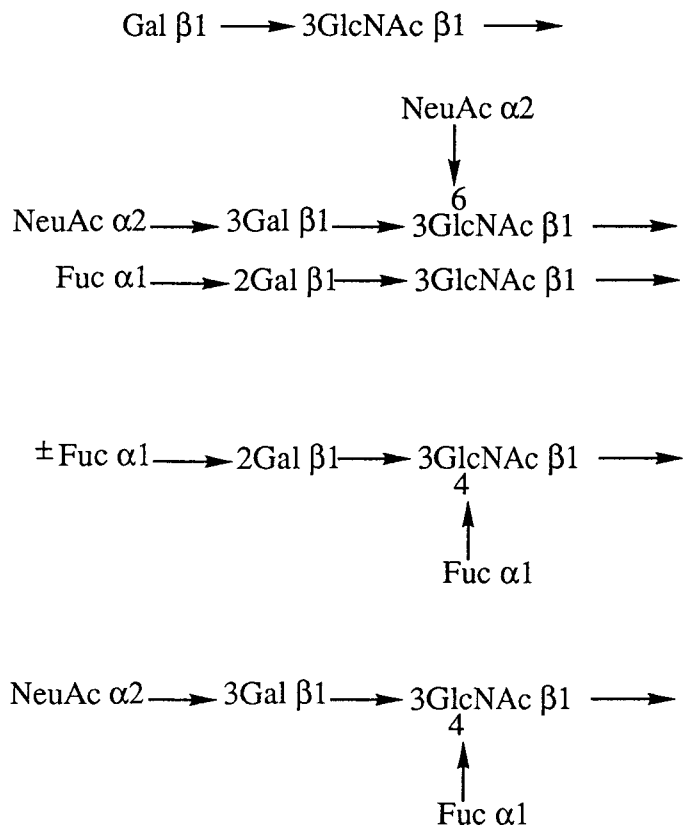
III.3.2.4 Structure tétraantennée (1):



III.3.2.5. Structure pentaantennée (7):



Ces différentes antennes peuvent alors porter les groupements variants suivants (7):





## IV. Synthèse des N-glycannes des glycoprotéines:

### IV.1. Introduction:

Comme il existe un grand nombre de combinaisons entre deux monosaccharides pour former une liaison glycosidique, donc une multiplicité de glycannes, les diverses étapes de la glycosylation sont sous la dépendance de nombreux contrôles enzymatiques (9).

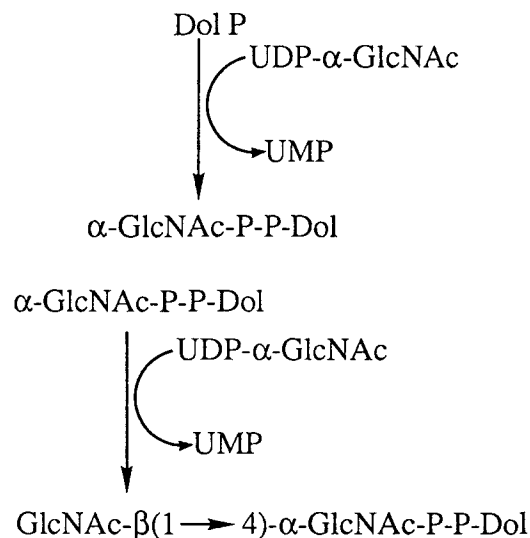
Dans la cellule, la glycosylation s'effectue dans:

- Le noyau (10-11)
- La mitochondrie (12)
- Le cytoplasme (10)
- Le réticulum endoplasmique granuleux (ou ergastoplasme) et l'appareil de Golgi (13-16).

Nous ne présenterons ici que la voie de synthèse la plus classique, s'effectuant dans l'ergastoplasme et l'appareil de Golgi chez les eucaryotes.

### IV.2. Cycle des dolichols:

Dans un premier temps, le cycle des dolichols s'effectue dans le réticulum endoplasmique granuleux. Il correspond à un préassemblage d'un oligosaccharide sur un intermédiaire polyprénique dolichol via une liaison pyrophosphate de la manière suivante:

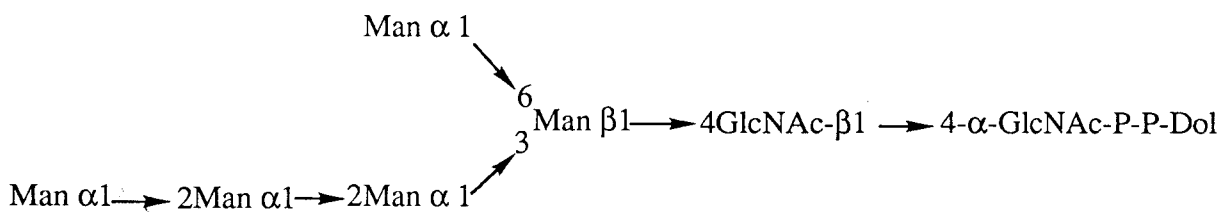




Cette réaction se déroule sur la face cytoplasmique des membranes du réticulum endoplasmique granuleux (17-18).

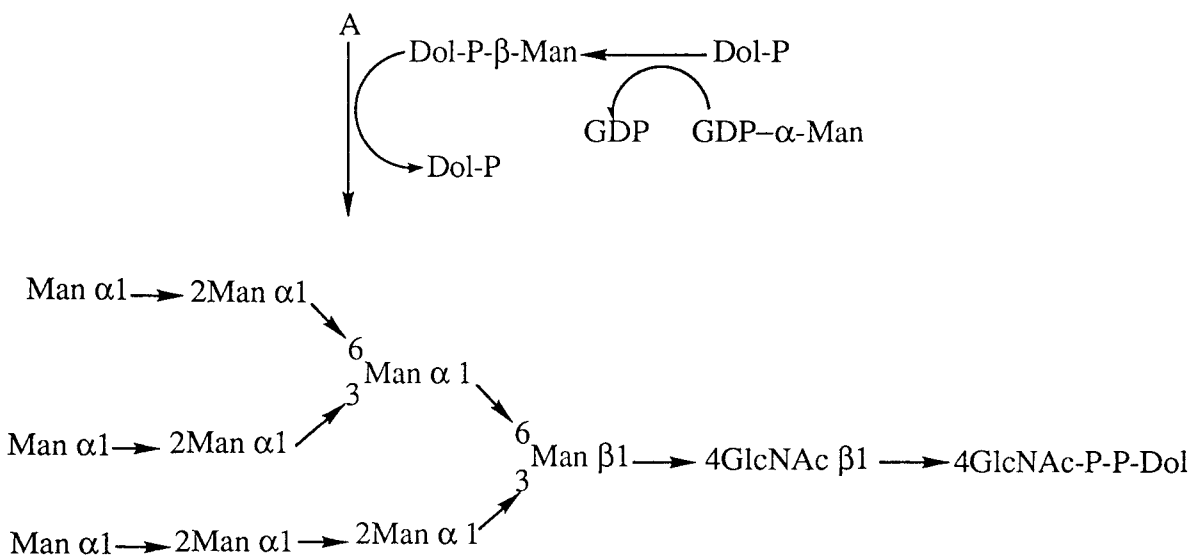
Nous voyons donc que l'intervention des donneurs comme UDP-GlcNAc, le GDP-Man, l'UDP-Glc, le GDP-Fuc, le CMP-NeuAc, et l'UDP-Gal est nécessaire. Une régulation dans le transport des glycosyl-nucléotides existera car les donneurs sont des molécules hydrophiles qui devront passer à travers des membranes intracellulaires lipophiles pour atteindre le site voulu.

Dans une seconde étape, on aura addition de cinq mannoses grâce à 5 GDP- $\alpha$ Man pour obtenir la structure A suivante:

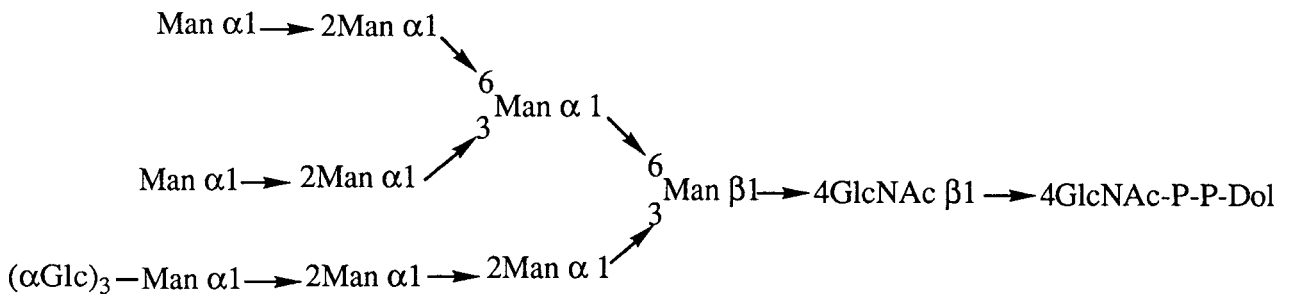


Ce composé est hydrophobe et peut se retourner dans la couche lipidique interne de l'ergastoplasme (19).

Puis, addition de quatre mannoses grâce à quatre Dol-P-Man, par une étape qui s'effectue sur la face luminale de l'ergastoplasme, pour donner le composé ci dessous:



Dans l'étape suivante on observe l'addition de trois résidus de glucose à partir d'UDP-Glc cytoplasmique pour conduire au composé suivant:



Tout ceci s'effectue sous contrôle enzymatique (16, 20).

#### IV.3. Transfert en bloc:

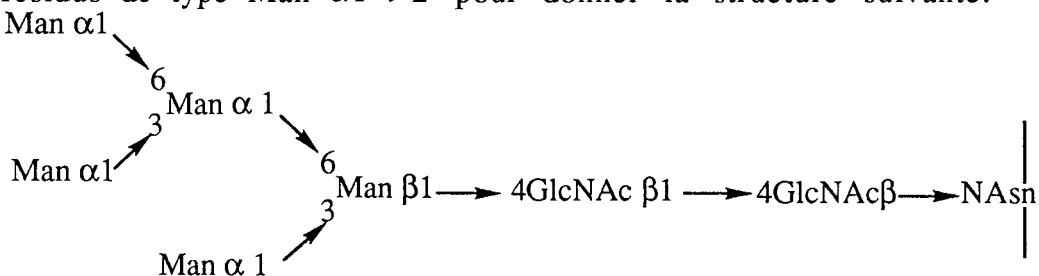
Ce dernier intermédiaire dolichol formé est transféré en bloc sur une protéine portant la séquence de reconnaissance nécessaire à sa glycosylation, ceci grâce à une oligosaccharidyltransférase (14).

#### IV.4. Maturation dans l'appareil de Golgi:

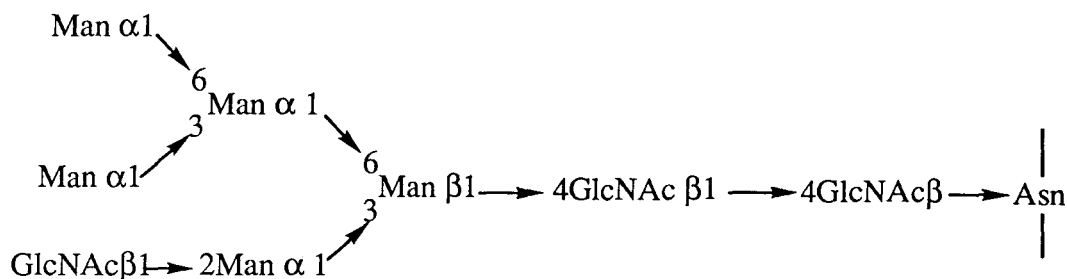
La suite de la maturation de la N-glycoprotéine aura lieu dans les différents saccules cis, médian, trans de l'appareil de Golgi. L'accès à ces différents saccules sera conditionné par des signaux portés par la protéine ou le glycanne (21).

Tout d'abord, pendant le transport jusqu'à l'appareil de Golgi, les trois résidus de glucose et le dernier mannose sont éliminés par action de deux glucosidases et d'une alpha-mannosidase situées dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Après avoir été transportée jusqu'au cis Golgi, la chaîne saccharidique sera convertie par l'action d'une alpha-mannosidase I enlevant tous les résidus de type Man  $\alpha 1 \rightarrow 2$  pour donner la structure suivante:

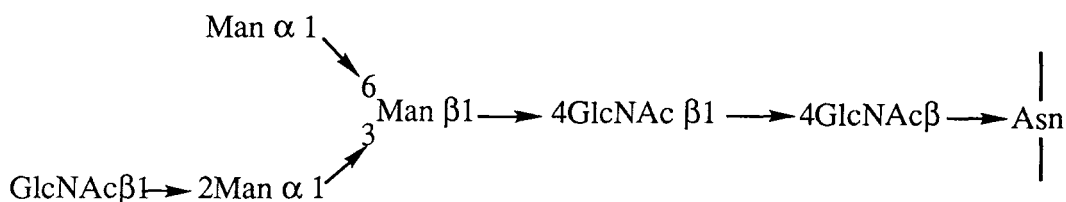


Quand la glycoprotéine passe dans le Golgi médian, une N-acétylglucosamine est ajoutée au bras  $\alpha 1 \rightarrow 3$  du noyau par l'action d'une N-acétylglucosaminyltransférase I (22), pour donner le composé I présenté ci-dessous:



L'addition de cette N-acétylglucosamine change l'environnement stérique des deux mannoses  $\alpha 1 \rightarrow 6$  et  $\alpha 1 \rightarrow 3$ . Ils peuvent alors subir l'action d'une mannosidase II provenant du Golgi (23).

On aboutira ainsi à la forme caractéristique II suivante formant une chaîne glycanique monoantennée de type complexe:



L'action d'une autre N-acétylglucosaminyltransférase III sur les intermédiaires I et II permettra la mise en place d'une N-acétylglucosamine intercalaire. Le résidu alpha mannose de ces chaînes ne peut subir l'action de l'alpha mannosidase II du Golgi (24). Les chaînes de type hybride sont obtenues à partir de ces intermédiaires I et II "verrouillés".

L'alpha fucosyltransférase responsable de la formation du noyau fucosylé a besoin de la présence du résidu N-acétylglucosamine en  $\beta 1 \rightarrow 2$  sur le bras  $\alpha 1 \rightarrow 3$  pour agir (25). Cette spécificité explique pourquoi les chaînes de type oligomannosidique ne sont pas fucosylées.

Quand le résidu GlcNAc  $\beta 1 \rightarrow 2$  est substitué par un galactose, l'addition du fucose ne peut plus se réaliser (26). Il en est de même lors de la présence d'une N-acétylglucosamine bissectrice (27).

A partir de cette chaîne monoantennée, une série de chaînes de type complexe peut être formée par action de différentes N-acétylglucosaminyltransférases ou GnT.

Le premier type de glycanne, qui peut être formé, est un glycanne biantenné grâce à l'action d'une GnT III (22).

Cette chaîne sera convertie en glycanne triantenné par l'action de GnT IV (28) ou GnT V (29). Ainsi par l'action concertée de ces deux N-acétylglucosaminyltransférases, on aura formation d'une glycoprotéine avec un glycanne tétraantenné.

Toutes ces chaînes pourront recevoir des résidus de N-acétylglucosamine intercalaires par l'action d'une GnT III. Chaque résidu  $\beta$ -D-N-acétylglucosamine pourra subir l'action de différentes glycosyltransférases pour allonger les chaînes comme le montre le schéma ci-dessous:

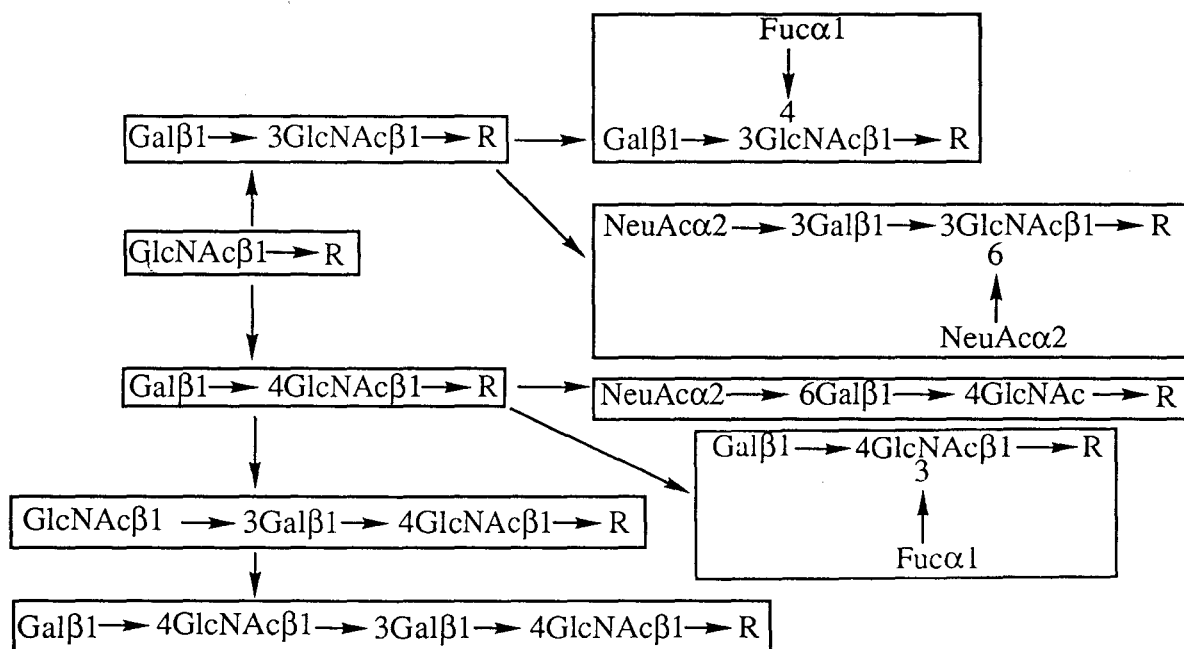


Schéma montrant les différentes chaînes pouvant exister après maturation. R représente le noyau invariant.

On aura donc un contrôle génique par la présence ou l'absence d'enzymes permettant la maturation des chaînes, mais aussi une régulation par la présence des accepteurs, des donneurs et des enzymes dans le même compartiment cellulaire (30). La glycosylation dans l'appareil de Golgi ne fait pas appel à des transporteurs lipidiques pour amener le résidu glycosyl donneur au site de glycosylation, c'est le glycosyl nucléotide qui est transporté dans la lumière du saccule golgien grâce à des transporteurs membranaires spécifiques (31-32).

Donc le type de glycoprotéine, c'est à dire oligomannosidique, N-acétyl-lactosaminique ou hybride, dépendra du chemin métabolique suivi (33).

## **V. Conformations des glycannes:**

### **V.1. Introduction:**

L'action des différentes enzymes permettant la formation des trois grandes classes de glycannes est possible car celles-ci reconnaissent les différentes structures sur lesquelles elles agissent (spécificité de substrat). Les différents intermédiaires intervenant dans la biosynthèse doivent donc présenter des conformations spatiales différentes. La connaissance de ces différentes conformations pourrait permettre d'expliquer la spécificité des enzymes agissant dans la biosynthèse.

D'autre part, le problème des rôles des glycannes des glycoprotéines ne peut être résolu en considérant uniquement la structure primaire de ces glycannes.

C'est surtout l'étude de la conformation de ces glycannes qui nous aidera à expliquer leurs interactions avec les protéines et donc leurs rôles biologiques.

### **V.2. Les différentes conformations spatiales:**

Jusqu'aux années 80, peu d'études spatiales des glycannes étaient présentées. Un des seuls résultats expérimentaux obtenus était la structure du glycanne attaché au fragment Fc de l'immunoglobuline G humaine par Deisenhofer (34).

Les différentes conformations spatiales de glycannes pouvaient être aussi évaluées grâce aux modèles atomiques. C'est ainsi que l'équipe du Professeur Jean Montreuil a présenté les différents modèles de conformations pour des glycannes biantennés (1, 8, 35-36), et pour des glycannes tétraantennés (37).

Il est actuellement possible de modéliser ces différentes conformations grâce à l'infographie par ordinateur avec des logiciels type Sybyl (38).

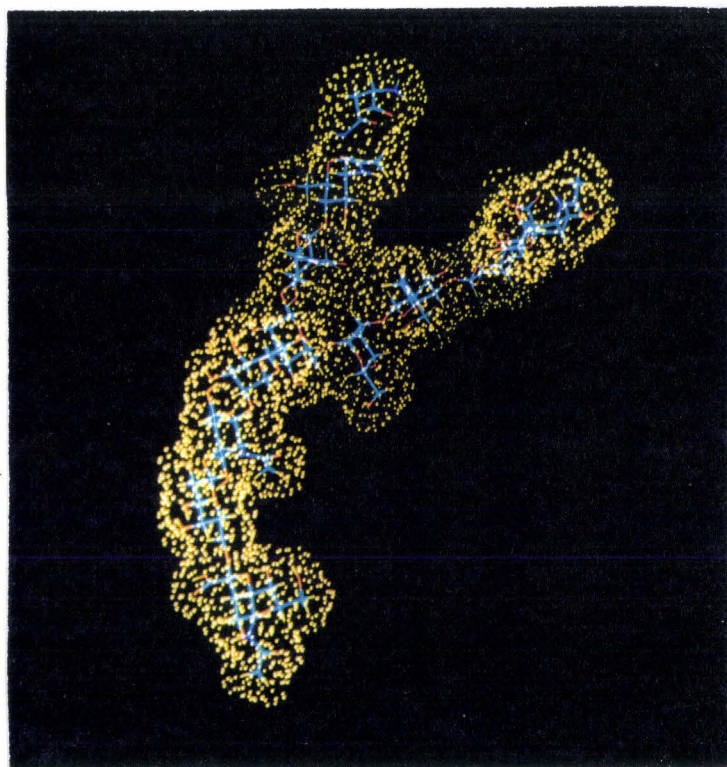
Ces conformations ont été ensuite confirmées par des résultats expérimentaux montrant aussi leurs interconversions.

#### ***V.2.1. La conformation Y:***

C'est la première proposée par Jean Montreuil (1) à partir des modèles atomiques du glycanne biantenné de la transferrine sérique humaine (35).

C'est cette conformation qui avait été choisie car elle était en accord avec les travaux de Morell *et al.* sur les lectines (36).

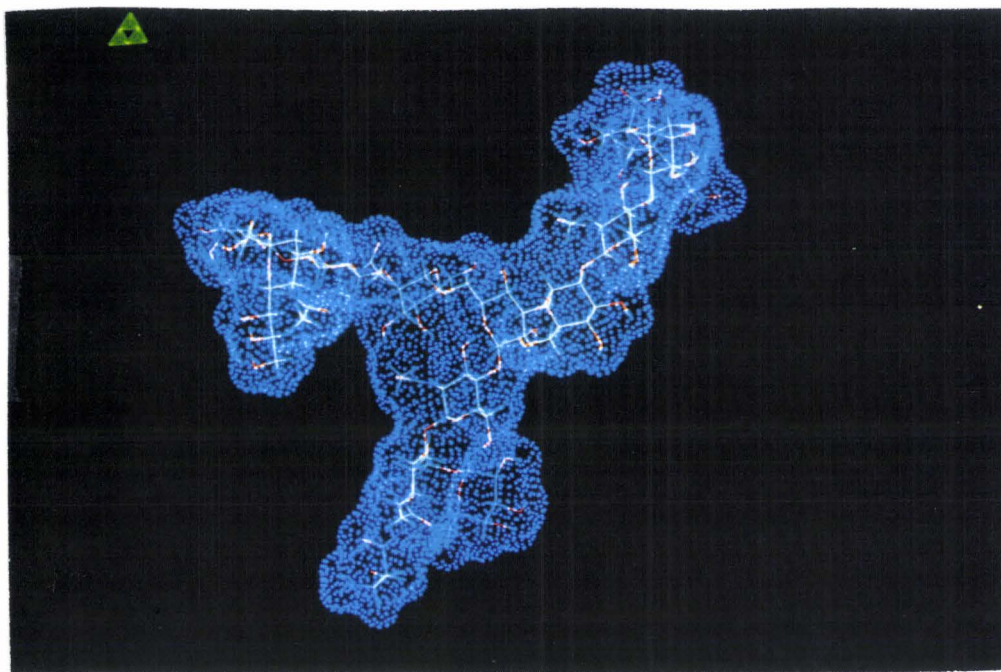
Cette conformation a été retrouvée, ainsi que les suivantes, par une étude faite sur la base de données expérimentales et de calculs semi-empiriques fondés sur le champ de forces Tripos (39-40) (cf. page 57).



### V.2.2. La conformation en T:

A partir des résultats de diffraction des rayons X sur le trisaccharide  $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ , qui montrait que la branche en  $\alpha 1 \rightarrow 3$  était perpendiculaire au plan du disaccharide  $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$  (41), la conformation Y a été modifiée et la conformation T a été proposée (36). Cette conformation a été de nouveau confirmée expérimentalement par l'étude en rayons X de Sutton *et al.* (42), par les travaux de RMN de Brisson *et al.* (43), de Homans *et al.* (44) et ceux combinés à des calculs de type HSEA de Bock *et al.* (45).

La branche  $\alpha 1 \rightarrow 3$  de ces glycanes biantennés est presque immobile car la liaison  $\alpha 1 \rightarrow 3$  l'est aussi (42, 46-48).

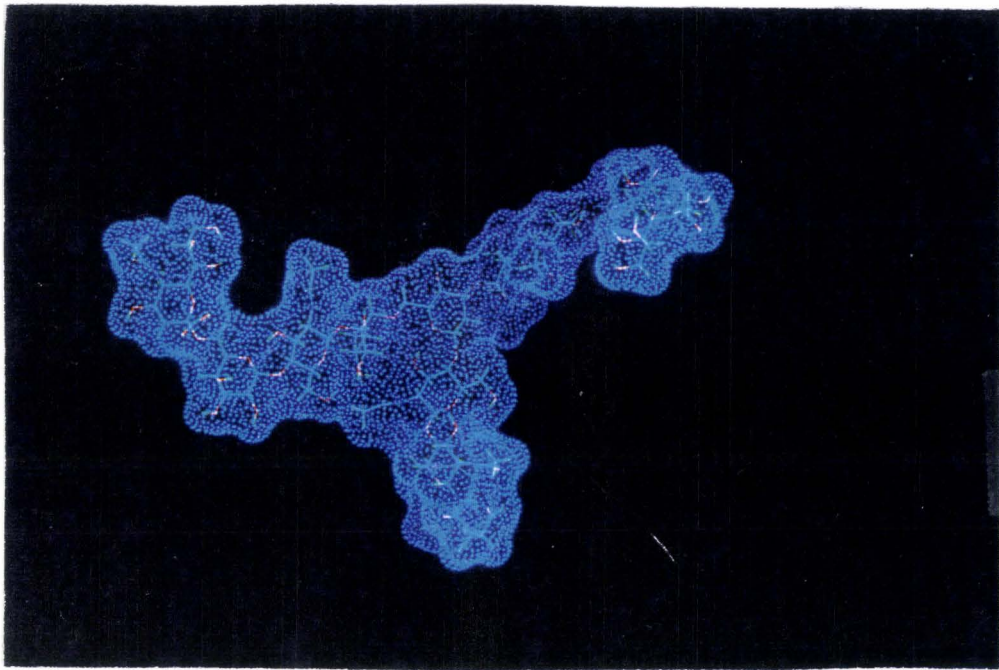


### V.2.3. *La conformation oiseau:*

A partir des résultats de Douy *et al.* sur la synthèse de polymères de glycopeptides contenant la N-acétyl-lactosamine (49), des données cristallographiques du fragment Fc de l'immunoglobuline G humaine (34, 46, 50), et des travaux de Bock *et al.* (45), la conformation appelée "bird conformation" ou conformation oiseau a été proposée (51). Bourne *et al.* dans leurs travaux de cocrystallisation de la lectine de *Lathyrus ochrus* avec un glycanne biantenné montrent aussi que ce glycanne adopte cette conformation (52).

Cette conformation existe grâce à une ample rotation de l'antenne liée en  $\alpha 1 \rightarrow 6$ . Ceci est dû à la rotation possible autour de l'angle  $\omega$  de la liaison  $\alpha 1 \rightarrow 6$ , angle qui n'existe pas dans les autres liaisons glycosidiques.

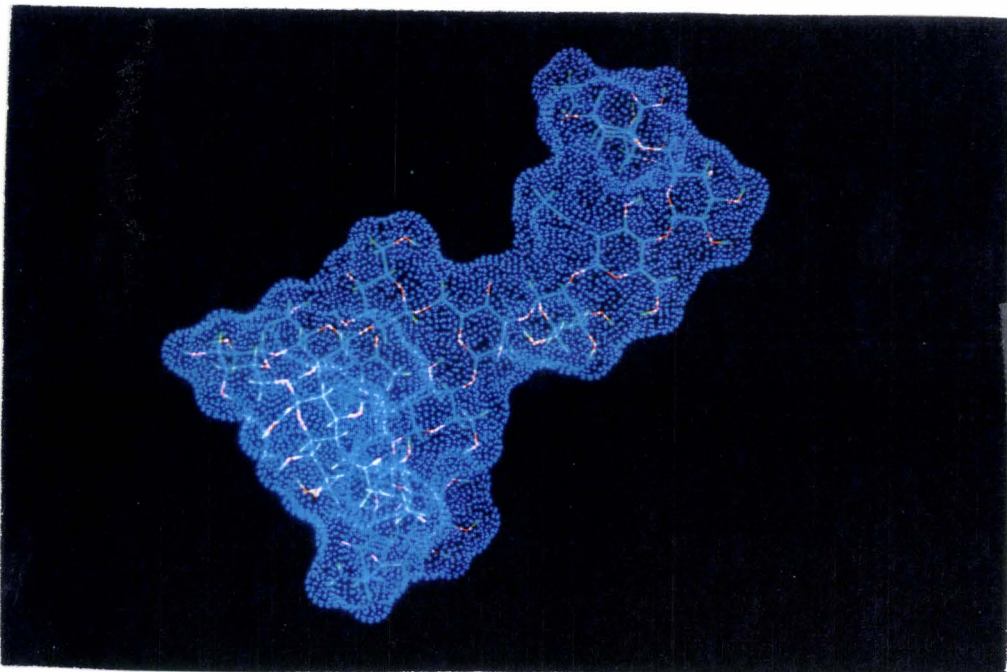




#### V.2.4. *La conformation en aile brisée:*

Des résultats de RMN (45, 48, 53-54) et de calculs HSEA (49) ont permis d'exposer la conformation aile brisée ou "broken wing" (36-37). Dans cette conformation, l'antenne liée en  $\alpha 1 \rightarrow 6$  se replie sur la protéine au dessus du noyau invariant du glycanne. Cette conformation serait favorisée par la présence d'une N-acétyl-glucosamine intercalaire.

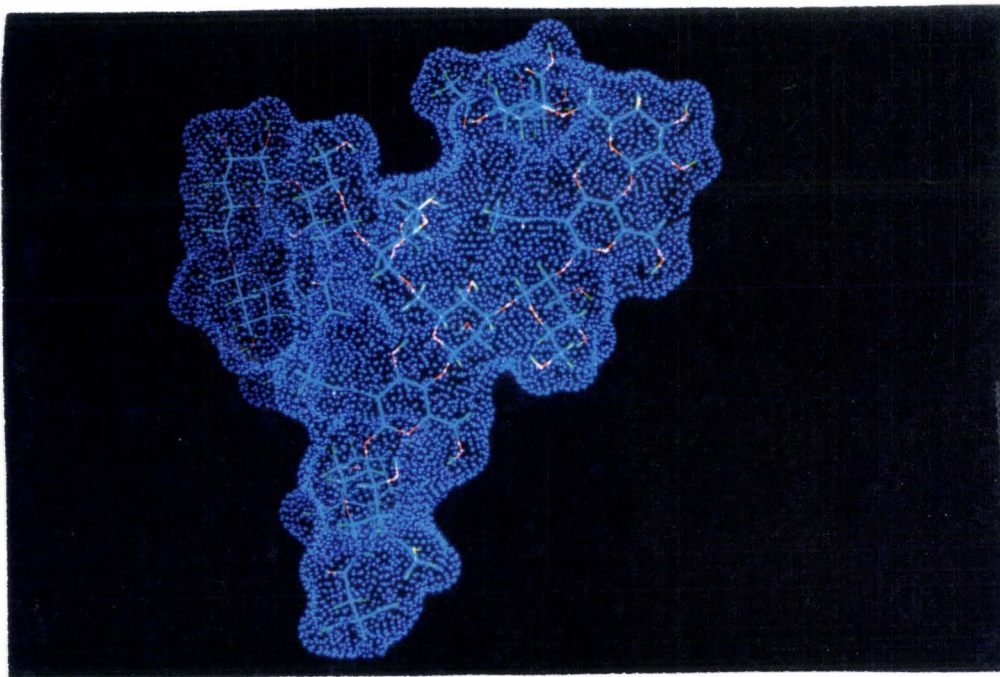
Il est à noter que seule cette conformation aile brisée est adoptée par le glycanne conjugué à la sérotransferrine de lapin (39).





### V.2.5. Conformation "back-folded wing":

Cette conformation a été dernièrement obtenue à partir de calculs semi-empiriques fondés sur le champ de forces Tripos 5.3 (39-40) (cf. page 57). Elle n'a pas encore été expérimentalement démontrée.



### V.2.6. Autres conformations:

Peu d'études ont été effectuées pour des glycannes plus complexes. Cependant, à partir des travaux de Vliegenthart *et al.* sur des glycannes de type oligomannosidique, des structures spatiales étendues ont été montrées (54).

La conformation parapluie ou "umbrella conformation" est aussi proposée pour des glycannes tétraantennés. Cette conformation est sans doute maintenue grâce à des interactions de type ionique avec des résidus comme l'acide N-acétyl-neuraminique entre les différents monosaccharides du glycanne et la protéine (55).

### V.3. Conclusion:

En fait, les glycannes n'adoptent pas une seule conformation tridimensionnelle mais plusieurs conformations spatiales qui s'échangent

avec des cinétiques encore inconnues. Il est actuellement difficile d'aborder la conformation de tous les glycanes existants par manque de données expérimentales. C'est pourquoi, il est nécessaire d'établir des méthodes théoriques fiables applicables à ces glycanes pour tenter de comprendre leurs rôles biologiques même si certains de ces rôles ont été établis par des méthodes expérimentales (56).

## **VI. Rôles des N-glycannes des glycoprotéines:**

### **VI.1. Introduction:**

Dans le but d'étudier et d'élucider les informations biologiques incluses dans les chaînes saccharidiques et leurs liaisons, une nouvelle science est née: la glycobiologie. Grâce à elle, quelques rôles des N-glycannes des glycoprotéines ont pu être élucidés.

### **VI.2. Méthodes biochimiques pour déterminer le rôle des glycanes:**

Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour élucider les rôles des glycanes des glycoprotéines sont les suivantes:

- destruction ou élimination de la partie glycanique par:

\*utilisation d'agents chimiques comme l'acide periodique (57, 58), ou l'hydrazine (59).

\*chauffage à 100°C pendant 30 heures (60).

\*utilisation de glycosidases comme les  $\beta$ -N-acétyl-endo glucosaminidases D et H, qui coupent au niveau N,N'-diacétylchitobiose du côté réducteur des chaînes N-glycanniques (61-63), ou les N-glycanases qui coupent en théorie la liaison GlcNAc-Asn (64).

Ces enzymes sont très intéressantes car elles permettent d'éliminer le glycanne sans détruire la partie protéique.

- utilisation d'inhibiteurs pendant la synthèse des N-glycoprotéines (65-67). En effet, la tunicamycine, analogue de l'UDP-GlcNAc, bloque l'étape initiale de la glycosylation lors de la formation de l'intermédiaire dolichol (cf. page 15).

La swainsonine, inhibiteur de la mannosidase II du Golgi, la 1-deoxy-nojirimycine et le bromoconduritol, inhibiteurs des glucosidases I et II et de la glucosidase II du réticulum endoplasmique respectivement, peuvent être aussi utilisés (67).

-isolement des cellules mutantes contenant au cours de la biosynthèse des glycanes matures, des structures intermédiaires avec des mutations (68).

### **VI.3. Rôles des N-glycanes des glycoprotéines:**

De nombreux exemples, dans la littérature, montrent le rôle de certains glycanes dans l'activité des protéines, mais il est impossible de généraliser ces rôles à tous les N-glycanes. Beaucoup d'entre eux sont démontrés dans des conditions non biologiques, ou *in vitro*, donc il n'est pas certain qu'*in vivo* il en soit de même. Nous pouvons tout de même remarquer que les N-glycanes peuvent intervenir:

- dans le maintien des propriétés physico-chimiques,
- dans le repliement et la conformation des glycoprotéines,
- dans la sécrétion et l'expression à la surface des cellules,
- dans le temps de vie,
- contre les protéolyses non contrôlées,
- dans le processus de protéolyse des précurseurs des glycoprotéines,
- dans les interactions cellulaires,
- en immunologie,
- dans la différenciation cellulaire.

#### **VI.3.1 Rôle dans le maintien des propriétés physico-chimiques:**

Les modifications post-traductionnelles, comme les N-glycosylations des glycoprotéines, représentent une modification significative de la taille et de la structure des protéines. Elles peuvent donc modifier des propriétés physico-chimiques de ces protéines.

Plusieurs revues en donnent des exemples (67-68). Ainsi l'invertase de levure déglycosylée a une activité biologique identique à la forme glycosylée,

mais elle est plus sensible à la dénaturation par la chaleur, par un pH acide, à la congélation-décongélation et à l'action des protéases (68).

La protéine G non glycosylée du virus indien des vésicules des stomatites ou VSV est insoluble dans les solvants contenant du Triton X-100 alors que la forme glycosylée l'est (68). Il en est de même pour la protéine G du VSV Orsay (68).

Les immunoglobulines A et E non glycosylées sont accumulées dans le réticulum endoplasmique des cellules plasmatiques de souris entraînant une déformation de cet ergastoplasme. On peut supposer que le manque de glycanne au niveau de ces immunoglobulines altère leurs propriétés physico-chimiques entraînant une agrégation et l'impossibilité pour ces immunoglobulines de circuler à travers les membranes intracellulaires des organites. En effet, les résultats de cristallographie des rayons X du fragment Fc des IgG humaines montrent que la partie glycanne masque des domaines hydrophobes de la protéine (50). Cette organisation moléculaire est essentielle pour la stabilisation de la conformation et la solubilité de la glycoprotéine native.

Une mauvaise glycosylation de la TBG ou "tyroxine-binding globuline" entraîne sa dénaturation à 37°C (69).

De même la résistance à la dénaturation par la chaleur de l'érythropoïétine est due à la présence de ces N-glycannes (70).

### ***VI.3.2. Rôle dans le repliement et le maintien de la conformation de la protéine:***

Le récepteur à Man-6-P déglycosylé perd sa structure quaternaire après un cycle de congélation-décongélation; le glycanne est donc indispensable au maintien de la conformation de la protéine (71).

L'influence des glycannes sur la conformation des glycoprotéines est aussi démontrée par l'utilisation de réactifs sérologiques. Ainsi les anticorps contre l'enveloppe non glycosylée du virus Semliki des forêts ne réagissent pas contre son homologue glycosylé mais réagissent contre des précurseurs glycopeptidiques avec des glycannes de type oligomannosidique des protéines d'enveloppe de virus (72). La maturation des chaînes glycanne donne donc des conformations caractéristiques absentes dans les formes non glycosylées.

La partie glycosidique peut être aussi importante pour la polymérisation de certaines protéines comme les immunoglobulines G (72),

les récepteurs embryonnaires musculaires d'acétylcholine (73), et aussi pour l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) (74).

En effet, pour cette glyco-hormone produite par les trophoblastes du placenta, il est indispensable que les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (75) soient correctement glycosylées pour avoir l'hormone biologiquement active (76). Un changement de conformation a été démontré quand on enlève les glycanes de cette glyco-hormone (77). Par contre Chen *et al.* (78) montrent que dans l'hCG recombinante, la sous-unité  $\beta$  qui possède un glycanne de type oligomannosidique peut être déglycosylée sans que cela affecte la combinaison des deux sous-unités. L'hormone recombinante ainsi formée a des propriétés identiques à la forme native.

De même une mauvaise glycosylation du facteur von Willebrand empêche la dimérisation de ce polypeptide (79).

Le rôle des chaînes N-glycanniques dans le repliement ou "folding" a été étudié pour quelques protéines (80-86). En général quand la glycosylation est indispensable à un bon repliement de la protéine c'est que le glycanne possède une position stratégique sur la chaîne polypeptidique (87).

Pour quelques protéines, la glycosylation est indispensable au repliement de la protéine. Pour d'autres, elle est nécessaire pour la sécrétion ou l'expression à la surface cellulaire de ces glycoprotéines (88).

Les glycanes du récepteur de la transferrine humaine jouent un rôle important pour le repliement correct de la protéine, car en l'absence de l'un de ces glycanes la polymérisation ne peut s'effectuer (89).

Par exemple, la glycosylation semble être indispensable pour la protéine CD4 car les formes recombinantes, obtenues par mutagenèse dirigée des deux sites de glycosylation ou en présence de tunicamycine, ne sont pas localisées à la surface des cellules HeLa (90).

### **VI.3.3. Rôle dans la sécrétion:**

L'érythropoïétine possède quatre sites de N-glycosylation. Dube *et al.* (91) ainsi que Yamaguchi *et al.* (92) montrent que les sites de glycosylation n'ont pas la même importance pour la sécrétion de cette protéine. De même, des quatre sites de glycosylation de la protéine C humaine, seul celui occupé par l'asparagine 97 est essentiel pour la sécrétion de la protéine (93).

En général, quand le "folding" de la protéine n'est pas bon, elle ne peut alors plus être exprimée à la surface des cellules (94).

#### VI.3.4. Rôle dans la circulation et le temps de vie:

En 1974, Ashwell et Morell (95) administrèrent des glycoprotéines désialylées à des souris. Ces protéines furent rapidement éliminées de la circulation montrant ainsi que les sucres étaient impliqués dans le catabolisme des glycoprotéines. Les cellules du foie, qui contiennent une lectine spécifique pour le galactose, sont des sites de reconnaissance rapide des glycoprotéines dans lesquelles ce monosaccharide est en position terminale non réductrice. Ces cellules détruisent alors ces protéines et affectent donc leur durée de vie.

Il est bien établi actuellement que la glycosylation joue un rôle important dans la détermination du temps de vie et la biodistribution des glycoprotéines du sérum (96-97). La suppression rapide des glycoprotéines désialylées du sérum via le récepteur hépatique des glycoprotéines asialylées est l'exemple type du système de "turn-over" des glycoprotéines basé sur la partie glycanique de ces glycoprotéines (98).

Comme toutes les glycoprotéines du sérum sont sécrétées avec un acide sialique en position terminale non réductrice des N-glycannes, l'action de la neuraminidase est donc nécessaire avant que la protéine ne soit enlevée de la circulation (99).

Des récepteurs sont donc mis en jeu dans la circulation des glycoprotéines. Par exemple, le récepteur contenu dans l'ergastoplasme met en jeu les glycoprotéines ayant un mannose libre en position terminale non réductrice sur leurs chaînes glycaniques (100) ou des Man 6-P (101), ou bien encore des glycannes sulfatés (101-102).

Le facteur GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) possède deux sites de N-glycosylation possibles. L'étude de protéines recombinantes montre l'existence des formes non, mono, ou diglycosylées, ce qui permet de déterminer l'activité de ce facteur (102). *In vitro*, le GM-CSF non glycosylé a une activité supérieure aux autres formes mais les formes glycosylées ont un temps de vie *in vivo* supérieur à celui des formes déglycosylées.

### VI.3.5. Rôle des glycanes envers les protéolyse non contrôlées:

Beeley (103) propose que les glycanes masqueraient les  $\beta$ -turn et donc les protégeraient ainsi de la protéolyse. Cette hypothèse peut être confirmée par les résultats suivants:

Les glycanes de l'hémagglutinine du virus de l'*influenza* couvrent 17 à 20% de la surface de cette protéine, or 60% des acides aminés ainsi recouverts sont hydrophiles. De plus, 2 lysines, 3 arginines et 5 acides aminés aromatiques, sites potentiels de coupures pour la trypsine et la chymotrypsine, sont aussi protégés par ces glycanes (104).

Olden *et al.* montrent aussi que la fibronectine des fibroblastes, les récepteurs de l'acétylcholine des cellules embryonnaires des muscles et les protéines de fusion myoblastiques sont dégradés plus rapidement quand ils sont cultivés en présence de tunicamycine. Cette dégradation des protéines glycosylées est partiellement arrêtée en présence d'inhibiteurs de protéases tels que la leupeptine et la pepstatine. Ces protéines seraient donc bien dégradées par des processus de protéolyse en absence de glycanes. Il a été aussi démontré que l'effet protecteur sur la protéine était inversement proportionnel à la distance entre le site de liaison protéine-glycane et le site de coupure par la trypsine et la chymotrypsine (68, 105).

La taille du glycane joue aussi un rôle contre la dégradation protéolytique. Des études comparatives sur des RNases A et B d'origine bovine ont été utilisées pour comprendre l'influence de la taille et la localisation de la partie saccharidique. En effet ces deux RNases sont similaires d'un point de vue protéique, mais la RNase B porte un glycane de type oligomannosidique sur l'asparagine 34 (106).

Olden *et al.* (68) ont comparé la RNase A non glycosylée à trois RNases B glycosylées différant par la longueur du glycane. La RNase B portant le glycane complet est 6 à 10 fois plus résistante à la trypsine et à la chymotrypsine que la forme non glycosylée. Cependant on ne sait pas encore comment la partie glycanique de ces glycoprotéines protège l'axe peptidique de la protéolyse. Seule la comparaison des structures spatiales des différentes formes pourrait permettre de résoudre ce problème.

### **VI.3.6. Rôle des précurseurs des glycoprotéines dans le processus de protéolyse:**

De nombreuses protéines ou glycoprotéines sont synthétisées sous forme inactive avec une masse moléculaire plus élevée par rapport à la forme biologiquement active. En effet, cette dernière résulte d'un clivage protéolytique de la forme inactive. Puisque les glycannes recouvrent une grande partie de la protéine, ils permettent donc de sélectionner les parties protéiques devant subir cette coupure (65).

Par exemple, les glycannes contrôlent la protéolyse dans la biosynthèse du précurseur commun de l'adrénocorticotropine, de la lipoprotéine  $\beta$ , de l'endorphine  $\beta$  (107).

### **VI.3.7. Rôle des glycannes dans les interactions cellule-cellule:**

Comme les glycannes contribuent à la structure tridimensionnelle et à la taille des glycoprotéines, il n'est pas surprenant que ils interviennent à l'interaction celles-ci (108).

En effet, les glycannes sont la cible de récepteurs de virus et de bactéries qui les reconnaissent grâce à des lectines spécifiques (109-110).

De même ces sucres peuvent être reconnus par des virus, des protozoaires, des moisissures (111-115).

Les glycannes interviennent aussi dans les processus d'inhibition de contact cellulaire et donc de cancérisation (116-118).

### **VI.3.8. Rôle des N-glycannes en immunologie:**

Les systèmes immunitaires cellulaire et humoral sont contrôlés par un réseau compliqué connectant entre elles les cellules immunocompétentes. Le rôle des N-glycannes dans la construction de ce réseau est plusieurs fois démontré (119-120).

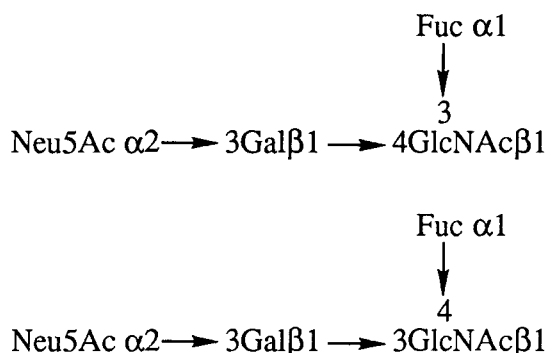
Les cellules sanguines sont emprisonnées dans le système vasculaire sanguin, quelques unes d'entre-elles comme les lymphocytes peuvent quitter ce circuit au niveau des capillaires sanguins pour rejoindre le système circulatoire lymphatique et retourner dans le circuit sanguin au niveau du canal thoracique.

Cette circulation est indispensable pour les fonctions immunitaires des cellules lymphoïdes. Le passage de ces lymphocytes du sang vers la lymphe



s'effectue grâce à des sélectines (119) au niveau des cellules épithéliales des capillaires. Les sélectines sont des glycoprotéines qui sont reconnues au niveau de leur partie glycanique par les lymphocytes (121).

On a ainsi démontré que les structures glycaniques



sont des structures qui se lient à la sélectine E (122-123).

Les immunoglobulines G, qui jouent aussi un rôle majeur dans l'immunité humorale, sont les seules glycoprotéines du sérum contenant plus de 30 chaînes glycaniques différentes (124). Après dégalactosylation des IgG, celles-ci se fixent moins facilement au sub-complément C1q et au récepteur Fc (124).

### VI.3.9. *Rôle des glycannes dans la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire:*

Plusieurs études montrent que les inhibiteurs de glycosylation bloquent le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire (65, 84).

Par exemple la tunicamycine bloque le développement des oursins de mer au stade gastrulation et les mutants déficients en glycosyltransférase possédant des modifications au niveau de la surface de leurs glycannes, sont moins adhésifs que les oursins normaux (119).

L'embryogenèse des amphibiens et des mammifères est inhibée au stade compaction et formation des blastocytes par la tunicamycine. Celle-ci peut aussi affecter les processus de différenciation tels que l'acquisition de la fusion des myoblastes pour former les myotubules pendant le développement des muscles (119).

## VII. Conclusion:

L'importance des N-glycannes des glycoprotéines n'est plus à l'heure actuelle à démontrer. Leur biosynthèse et leur dégradation sont élucidées. Néanmoins, de nombreux problèmes restent à résoudre. Par exemple, de nombreuses structures primaires de glycannes sont déterminées, mais peu de choses sont connues quant à leur conformation spatiale.

La glycobiologie, qui permet de déterminer certains rôles des N-glycannes, nous montre qu'il existe une relation constante entre le rôle de ces N-glycannes et leurs formes spatiales.

C'est pourquoi, il était nécessaire d'aborder d'autres études introduisant des méthodes physiques expérimentales comme les rayons X, la diffusion inélastique des neutrons, la résonance magnétique nucléaire, et également des méthodes théoriques de recherche de conformations des molécules comme les méthodes *ab initio*, semi-empiriques ou empiriques, pour une meilleure compréhension des interactions entre ces glycannes et les protéines.

# Bibliographie

du

Chapitre 1

- 1) Montreuil J. (1975)  
Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implications.  
Pure & Appl. Chem. 43, 431-477
- 2) Roitsch T., Lehle L. (1989)  
Structural requirements for protein N-glycosylation. Influence of acceptor peptides on cotranslational glycosylation of yeast invertase and site-directed mutagenesis around a sequon sequence.  
Eur. J. Biochem. 181, 525-529
- 3) Ronin C., Granier C., Caseti C., Bouchilloux S., Van Rietschoten J. (1981)  
Synthetic substrates for thyroid oligosaccharide transferase. Effects of peptide chain length and modifications in the -Asn-Xaa-Thr- region.  
Eur. J. Biochem. 118, 159-164
- 4) Cacan R., Villers C., Belard M., Kaiden A., Krag S., Verbert A. (1992)  
Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates.  
Glycobiology 2, 127-136
- 5) Beeley J.G. (1977)  
Peptide chain conformation and the glycosylation of glycoproteins.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1051-1055
- 6) Stenflo J., Fernlund P. (1982)  
Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C.  
J. Biol. Chem. 257, 12180-12190
- 7) Kobata A. (1992)  
Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins.  
Eur. J. Biochem. 209, 483-501
- 8) Montreuil J. (1980)  
Primary structure of glycoproteins glycans: Basis for the molecular biology of glycoproteins.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 157-223
- 9) Paulson J.C. (1989)  
Glycoproteins: what are the sugar chains for?  
Trends in Biochem. Sci. 14, 272-276
- 10) Hart G.W., Haltiwanger R.S., Holt G.D., Kelly W.G. (1989)  
Glycosylation in the nucleus and cytoplasm.  
Annu. Rev. Biochem. 58, 841-874



- 11) Letoublon R. (1992)  
Les glycosylations nucléaires.  
Regard sur la Biochimie 2, 65-68
- 12) Gasnier F., Morelis R., Louisot P., Gateau O. (1987)  
Purification and properties of a mannosyltransferase solubilized  
from mitochondrial outer membranes.  
Biochim. Biophys. Acta 925, 297-304
- 13) Verbert A., Cacan R. (1992)  
La biosynthèse des glycoprotéines: topographie  
transmembranaire et compartimentation.  
Regard sur la Biochimie 2, 59-64
- 14) Hirschberg C.B., Snider M.D. (1987)  
Topography of glycosylation in the rough endoplasmic  
reticulum and Golgi apparatus.  
Annu. Rev. Biochem. 56, 63-87
- 15) Hoflack B., Debeire P., Cacan R., Montreuil J., Verbert A. (1982)  
Dolichol-dependent synthesis of chitobiosyl proteins and their  
further mannosylation. A second route for glycosylation of  
proteins in rat-spleen lymphocytes?  
Eur. J. Biochem. 124, 527-531
- 16) Kornfeld R., Kornfeld S. (1985)  
Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.  
Annu. Rev. Biochem. 54, 631-664
- 17) Abeijon C., Hirschberg C.B. (1990)  
Topography of initiation of N-glycosylation reactions.  
J. Biol. Chem. 265, 14691-14695
- 18) Kean E.L. (1991)  
Topographical orientation in microsomal vesicles of the  
N-acetylglucosaminyltransferases which catalyze the  
biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol  
and N-acetylglucosaminyl-  
N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol.  
J. Biol. Chem. 266, 942-946
- 19) Snider M.D., Rogers O.C. (1984)  
Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during  
glycoprotein synthesis.  
Cell 36, 753-761
- 20) Banerjee D.K., Kousvelari E.E., Baum B.J. (1987)  
cAMP-mediated protein phosphorylation of microsomal  
membranes increases mannosylphosphodolichol synthase  
activity.

- 21) Munro S., Pelham H.R.B. (1987)  
A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins.  
*Cell* 48, 899-907
- 22) Harpaz N., Schachter H. (1980)  
Control of glycoprotein synthesis. V. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi  $\alpha$ -D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ -D-mannoside  $\beta$ 2-N-acetylglucosaminyltransferase I.  
*J. Biol. Chem.* 255, 4894-4902
- 23) Tulsiani D.R.P., Hubbard S.C., Robbins P.W., Touster O. (1982)  
 $\alpha$ -D-Manosidases of rat liver Golgi membranes.  
Mannosidase II is the GlcNAcMAN<sub>5</sub>-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting MAN<sub>9</sub> precursors to MAN<sub>5</sub> intermediates.  
*J. Biol. Chem.* 257, 3660-3668
- 24) Schachter H., Narasimhan S., Harpaz N., Longmore G.D. (1982)  
Oligosaccharide conformation and the control of oligosaccharide assembly: a model for carbohydrate-mediated information transfer.  
*Membr. Transp.* 1, 255-262
- 25) Longmore G.D., Schachter H. (1982)  
Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose: 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucoside(fuc-->Asn-linked GlcNAc) 6- $\alpha$ -L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver.  
*Carbohydr. Res.* 100, 365-392
- 26) Paulson J.C., Prieels J.P., Glasgow L.R., Hill R.L. (1978)  
Sialyl- and fucosyltransferases in the biosynthesis of asparaginyl-linked oligosaccharides in glycoproteins. Mutually exclusive by  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2-->6 sialyltransferase and N-acetylglucosaminide  $\alpha$ 1-->3 fucosyltransferase.  
*J. Biol. Chem.* 253, 5617-5624
- 27) Schachter H., Narasimhan S., Gleeson P., Vella G. (1983)  
Control of branching during the biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides.  
*Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 1049-1066
- 28) Gleeson P.A., Schachter H. (1983)  
Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc: GnGn (GlcNAc to MAN $\alpha$ 1-3)  $\beta$ 4-N-acetylglucosaminyltransferase IV, an enzyme in



hen oviduct which adds GlcNAc in  $\beta$ 1-4 linkage to the  $\alpha$ 1-3 linked Man residue of the trimanosyl core of N-glycosyloligosaccharides to form a triantennary structure. J. Biol. Chem. 258, 6162-6173

- 29) Gu J., Nishikawa A., Tsuruoka N., Ohno M., Yamaguchi N., Kangawa K., Taniguchi N. (1993)  
Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ -6-D-Mannoside  $\beta$ 1-6N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetyl glucosaminyltransferase V) from a Human lung cancer cell line. J. Biochem. 113, 614-619
- 30) Chaney W., Sundaram S., Friedman N., Stanley P. (1989)  
The Lec4A CHO glycosylation mutant arises from miscompartmentalization of a Golgi glycosyltransferase. J. Cell Biol. 109, 2089-2096
- 31) Verbert A., Cacan R., Cecchelli R. (1987)  
Membrane transport of sugar donors to the glycosylation sites. Biochimie 69, 91-99
- 32) Abeijon C., Hirschberg C.B. (1992)  
Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. Trends in Biochem. Sci. 17, 32-36
- 33) Weinster J., De Souza-e-Silva U., Paulson J.C. (1982)  
Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of  $\alpha$  Gal $\beta$ 1-->3(4)GlcNAc  $\alpha$ 2-->3 sialyltransferase from rat liver. J. Biol. Chem. 257, 13845-13853
- 34) Deisenhofer J. (1981)  
Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8Å resolution. Biochemistry 20, 2361-2370
- 35) Montreuil J., Fournet B., Spik G., Strecker G. (1978)  
Etude théorique de la conformation spatiale des glycanes de la sérotransferrine humaine. C. R. Acad. Sc. Paris 287, Série D 837-840
- 36) Montreuil J. (1984)  
Spatial conformation of glycans and glycoproteins. Biol. Cell 51, 115-131
- 37) Montreuil J. (1984)  
Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function, survey of a decade of research.

- 38) Sybyl (1988)  
Tripos associate, assign St Louis  
Mo, USA, 189-213
- 39) Mazurier J., Dauchez M., Vergoten G., Montreuil J., Spik G. (1991)  
Modélisation moléculaire des glycanes: structure tridimensionnelle et interaction avec la fraction protéique. L'exemple de la sérotransferrine de lapin.  
C. R. Acad. Sci. Paris 313, 7-14
- 40) Mazurier J., Dauchez M., Vergoten G., Montreuil J., Spik G. (1991)  
Molecular modeling of a disialylated monofucosylated biantennary glycan of the N-acetyllactosamine type.  
Glycoconjugate J. 8, 390-399
- 41) Warin V., Baert F., Fouret R., Strecker G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. (1979)  
The crystal structure and molecular structure of O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose.  
Carbohydr. Res. 76, 11-22
- 42) Sutton B.J., Phillips D.C. (1983)  
The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G.  
Biochem. Soc. Trans. 11, 130-131
- 43) Brisson J.R., Carver J.P. (1983)  
Solution conformation of asparagine-linked oligosaccharides:  $\alpha$ (1-2)-,  $\alpha$ (1-3)-,  $\beta$ (1-2)-, and  $\beta$ (1-4)-linked units.  
Biochemistry 22, 3671-3680
- 44) Homans S.W., Dwek R.A., Fernandes D.L., Rademacher T.W. (1982)  
Solution conformation of the biantennary N-linked oligosaccharide of human serotransferrin using  $^1\text{H}$  NMR nuclear Overhauser effect measurements.  
FEBS Lett. 150, 503-506
- 45) Bock K., Arnarp J., Lönngren J. (1982)  
The preferred conformation of oligosaccharides derived from the complex-type carbohydrate portions of glycoproteins.  
Eur. J. Biochem. 129, 171-178
- 46) Rademacher T.W., Homans S.W., Fernandes D.L., Dwek R.A., Taniguchi T., Kobata A. (1983)  
Structural and conformational analysis of immunoglobulin-derived N-linked oligosaccharides.



- 47) Brisson J.R., Carver J.P. (1983)  
Solution conformation of  $\alpha$ D(1-3)- and  $\alpha$ D(1-6)-linked oligomannosides using proton nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 22, 1362-1368
- 48) Brisson J.R., Carver J.P. (1983)  
Solution conformation of asparagine-linked oligosaccharides:  $\alpha$ (1-6)-linked moiety. *Biochemistry* 22, 3680-3686
- 49) Douy A., Gallot B. (1980)  
Synthesis and ordered structure of amphipatic block copolymers with a saccharide and a peptide block. *Biopolymers* 19, 493-507
- 50) Huber R., Deisenhofer J., Colman P.M., Matsushima M., Palm W. (1976)  
Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* 264, 415-420
- 51) Montreuil J. (1982)  
Glycoproteins. *Compr. Biochem.* 19B, 1-188
- 52) Bournes Y., Rouge P., Cambillau C. (1988)  
Crystallization and preliminary X-ray studies of two isolectins from seeds of lathyrus ochrus. *J. Mol. Biol.* 202, 685-687
- 53) Carver J.P., Cumming D.A. (1987)  
Site-directed processing of N-linked oligosaccharides: the role of three-dimensional structure. *Pure & Appl. Chem.* 59, 1465-1476
- 54) Vliegthart J.F.G., Van Halbeek H., Dorland L. (1981)  
The applicability of 500-MHz high-resolution  $^1$ H-NMR spectroscopy for the structure determination of carbohydrates derived from glycoproteins. *Pure & Appl. Chem.* 53, 45-77
- 55) Li Z.Q., Perkins S.J., Loucheux-Lefebvre M.H. (1983)  
 $\alpha_1$  acid glycoprotein: a small-angle neutron scattering study of a human plasma glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 130, 275-279
- 56) Rademacher T.W., Parekh R.B., Dwek R.A. (1988)

Glycobiology.  
Annu. Rev. Biochem. 57, 785-838

- 57) Montgomery R. (1974)  
Periodate oxidation of glycoproteins and glycopeptides.  
Colloques internationaux du CNRS 221, 171-179
- 58) Lindberg B. (1974)  
Studies on the Smith degradation.  
Colloques internationaux du CNRS 221, 189-201
- 59) Matsushima Y., Noriko F. (1957)  
Studies on aminohexoses. IV. N-deacylation with hydrazine and  
deamination with nitrous acid, a clue to the structure of amino-  
polysaccharides.  
Bull. Chem. Soc. Japan 30, 48-50
- 60) Bayard B., Montreuil J. (1972)  
Description of a fractionation of acetolyzates.  
Carbohydr. Res. 24, 427-443
- 61) Yamashita K., Tachibana Y., Kobata A. (1978)  
The structures of the galactose-containing sugar chains of  
ovalbumin.  
J. Biol. Chem. 253, 3862-3869
- 62) Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T.,  
Iwashita S., Inoue Y., Kobata A. (1975)  
Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation  
to the endo- $\beta$ -acetylglucosaminidase specificity.  
J. Biol. Chem. 250, 8569-8575
- 63) Ito S., Yamashita K., Spir R.G., Kobata A. (1977)  
Structure of a carbohydrate moiety of a unit A glycopeptide of  
calf thyroglobulin.  
J. Biochem. 81, 1621-1631
- 64) Plummer T.H., Elder J.H., Alexander S., Phelan A.W., Tarentino A.L.  
(1984)  
Demonstration of peptide: N-glycosidase F Activity in endo- $\beta$ -N-  
acetylglucosaminidase F preparations.  
J. Biol. Chem. 259, 10700-10704
- 65) Schwarz R.T., Datema Roelf (1984)  
Inhibitors of trimming: new tools in glycoprotein research.  
Trends in Biochem. Sci. 9, 32-34
- 66) Lodish H.F., Kong N. (1984)

Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the Rough Endoplasmic Reticulum to the Golgi Complex.  
*J. Cell Biol.* 98, 1720-1729

- 67) Schwarz R.T., Datema R. (1982)  
Inhibition of lipid dependant glycosylation.  
*Glycoconjugates* 3, 47-79
- 68) Olden K., Bernard B.A., Humphries M.J., Yeo T.K., Yeo K.T., White S.L., Newton S.A., Bauer H.C., Parent J.B. (1985)  
Function of glycoprotein glycans.  
*Trends in Biochem. Sci.* 10, 78-82
- 69) Muratu Y., Magner J.A., Refetoff S. (1986)  
The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin.  
*Endocrinology* 118, 1614-1621
- 70) Tsuda E., Kawanishi G., Masatsugu U., Masuda S., Sasaki R. (1990)  
The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin.  
*Eur. J. Biochem.* 188, 405-411
- 71) Wendland M., Waheed A., Schmidt B., Hille A., Nagel G., Von Figura K., Pohlmann R. (1991)  
Glycosylation of the Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. Effect on ligand binding, stability, and conformation.  
*J. Biol. Chem.* 266, 4598-4604
- 72) Schwatz R.T., Schmidt M.F.G., Datema R. (1979)  
Inhibition of glycosylation of viral.  
*Biochem. Soc. Trans* 7, 322-326
- 73) Merlie J.P., Sebbane R., Tzartos S., Lindstrom J. (1982)  
Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells.  
*J. Biol. Chem.* 257, 2694-2701
- 74) Hoshina M., Boothby M., Boime I. (1982)  
Cytological localization of chorionic gonadotropin  $\alpha$  and placenta lactogen mRNAs during development of the Human placenta.  
*J. Cell Biol.* 93, 190-198
- 75) Carlsen R.B., Bahl O.M.P., Swaminathan N. (1973)  
Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the  $\beta$  subunit.  
*J. Biol. Chem.* 248, 6810-6827

- 76) Moyle W.R., Bahl O.M.P., März L. (1975)  
Role of the carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action.  
J. Biol. Chem. 250, 9163-9169
- 77) Keutmann H.T., Johnson L., Ryan R.J. (1985)  
Evidence for a conformational change in deglycosylated glycoprotein hormones.  
FEBS. Lett. 185, 333-338
- 78) Chen W., Qing-Xiang S., Bahl O.M.P. (1991)  
Carbohydrate variant of the recombinant  $\beta$ -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system.  
J. Biol. Chem. 266, 4081-4087
- 79) Wagner D.D., Mayadas T., Maeder V.J. (1986)  
Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor.  
J. Cell Biol. 102, 1320-1324
- 80) Olden K., Pratt R.M., Jaworski C., Yamada K.M. (1979)  
Evidence for role of glycosylation carbohydrates in membrane transport: specific inhibition by tunicamycin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 791-795
- 81) Prives J.M., Olden K. (1980)  
Carbohydrate requirement for expression and stability of acetylcholine receptor on the surface of embryonic muscle cells in culture.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5263-5267
- 82) Reckhow C.L., Enns C.A. (1988)  
Characterization of the transferrin receptor in tunicamycin-treated A431 cells.  
J. Biol. Chem. 263, 7297-7301
- 83) Machamer C.E., Rose J.K. (1987)  
A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region.  
J. Cell Biol. 105, 1205-1214
- 84) Olden K., Pratt R.M., Yamada K.M. (1979)  
Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3343-3347
- 85) Schlesinger M.L., Shlesinger S. (1987)  
Domains of virus glycoproteins.  
Adv. Virus Res. 33, 1-44



- 86) Hurtley S.M., Helenius A. (1989)  
Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum.  
*Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 277-307
- 87) Hoe M.H., Hunt R.C. (1992)  
Loss of one asparagine-linked oligosaccharide from human transferrin receptors results in specific cleavage and association with the endoplasmic reticulum.  
*J. Biol. Chem.* 267, 4916-4923
- 88) Tift C.J., Proia R.L., Camerini-Otero R.D. (1992)  
The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation.  
*J. Biol. Chem.* 267, 3268-3273
- 89) Dube S., Fischer J.W., Powell J.S. (1988)  
Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function.  
*J. Biol. Chem.* 263, 17516-17521
- 90) Yamaguchi K., Akai K., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S., Sasaki R. (1991)  
Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties.  
*J. Biol. Chem.* 266, 20434-20439
- 91) Grinnell B.W., Walls J.D., Gerlitz B. (1991)  
Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin.  
*J. Biol. Chem.* 226, 9778-9785
- 92) Rasmussen J.R. (1992)  
Effect of glycosylation on protein function.  
*Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 682-686
- 93) Ashwell G., Morell A. (1974)  
Dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins.  
*Biochem. Soc. Symp.* 40, 117-124
- 94) Drickamer K. (1991)  
Clearing Up Glycoprotein hormones.  
*Cell* 67, 1029-1032
- 95) Parek R.B. (1991)  
Effects of glycosylation protein function.  
*Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 750-754
- 96) Ashwell G., Harford J. (1982)

Carbohydrate-specific receptors of the liver.  
Annu. Rev. Biochem. 51, 531-554

- 97) Breitfeld P.P., Simmons C.F., Strous G.J.A., Geuze H.J., Schwartz A.L. (1985)  
cell biology of the asialoglycoprotein receptor system: a model of receptor-mediated endocytosis.  
Int. Rev. Cyt. 97, 47-93
- 98) Stahl P.D. (1990)  
The macrophage mannose receptor current status (1990)  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2, 317-318
- 99) Kornfeld S. (1990)  
Lysosomal enzyme targeting.  
Biochem. Soc. Trans., 18, 367-374
- 100) Fiete D., Srivastava V., Hindsgaul O., Baenziger J.U. (1991)  
A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for  $\text{SO}_4^-$  4GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Man $\alpha$  that mediates rapid clearance of lutropin.  
Cell 67, 1103-1110
- 101) Baenziger J.U., Kumar S., Rodbeck R.B., Smith P.L., Beranek M.C. (1992)  
Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides.  
Proc. Natl. Acad. U.S.A. 89, 334-338
- 102) Okamoto M., Nakai M., Nakayama C., Yanagi H., Matsui H., Noguchi H., Namiki M., Sakai J., Kadota K., Fukui M., Hara H. (1991)  
Purification and characterization of three forms of differently glycosylated recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
Arch. Bioch. Biophys. 286, 562-568
- 103) Beeley J.G. (1974)  
Heterogeneity of glycoproteins  
Biochem. Soc. Symp. 40, 27-36
- 104) Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. (1981)  
Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution.  
Nature 289, 366-373
- 105) Olden K., Parent J.B., White S.L. (1982)  
Carbohydrate moieties of glycoproteins. A reevaluation of their function.  
Biochim. Biophys. Acta 650, 209-232

- 106) Plummer T.H., Hirs C.H.W. (1964)  
 Structure of bovine pancreatic ribonuclease B. Isolation of a glycopeptide.  
*J. Biol. Chem.* 239, 2530-2538
- 107) Loh Y.P., Garnier H. (1979)  
 The role of carbohydrate in the stabilization processing, and packaging of glycosylated adrenocorticotropin-endorphin common precursor in toad pituitaries.  
*Endocrinology* 105, 474-487
- 108) Sharon N., Lis H. (1993)  
 Sucres et reconnaissance cellulaire.  
 Pour la science 185, 58-65
- 109) Parekh R.B., Dwek R.A., Sutton B.J., Fernandes D.L., Leung., Stanworth D., Rademacher T.W., Mizuochi T., Taniguchi T., Matsuta K., Takeuchi F., Nagano Y., Miyamoto T., Kobata A. (1985)  
 Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG.  
*Nature* 316, 452-457
- 110) Abraham N., Sun D., Dale J.B., Beachey E.D. (1988)  
 Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae.  
*Nature* 336, 682-684
- 111) Sharon N., Lis H. (1989)  
 Lectins as cell recognition molecules.  
*Science* 246, 227-234
- 112) Vlasak R., Luytjes W., Spaan W., Palese P. (1988)  
 Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 4526-4529
- 113) Weis W., Brown J.H., Cusak S., Paulson J.C., Skehel J.J., Wiley D.C. (1983)  
 Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor sialic acid.  
*Nature* 333, 426-431
- 114) Sharon N. (1987)  
 Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease.  
*FEBS Lett.* 217, 145-157
- 115) Feizi T., Childs R.A. (1985)

Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour-associated antigens and components of receptor systems.  
Trends Biochem. Sci. 10, 24-27

- 116) Katsuko Y., Ohkura T., Tachibana Y., Takasaki S., Kobata A. (1984)  
Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis.  
J. Biol. Chem. 259, 10834-10840
- 117) Katsuko Y., Tachibana Y., Ohkura T., Kobata A. (1985)  
Enzymic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation.  
J. Biol. Chem. 260, 3963-3969
- 118) Pierce M., Arango J. (1986)  
Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNAc- $\beta$ -(1,6)Man $\alpha$ (1,6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells.  
J. Biol. Chem. 261, 10772-10777
- 119) Thiery J.P., Boyer B. (1992)  
Les molécules adhésives et la communication cellulaire.  
Pour la science 179, 36-43
- 120) Néel D., Audery M., Derappe C. (1992)  
Glycobiologie et cellules sanguines.  
Médecine/Sciences 8, 233-238
- 121) Lasky L.A., Singer M.S., Yednock T.A., Dowbenko D., Fennie C., Rodriguez H., Nguyen T., Stachel S., Rosen S. (1989)  
Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain  
Cell 56, 1045-1055
- 122) Phillips M.L., Nudelman E., Gaeta F.C.A., Perz M., Singhal A.K., Hakomori S.I., Paulson J.C. (1990)  
Elam-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le<sup>x</sup>.  
Science 250, 1130-1132
- 123) Lowe J.B., Stoolman L.M., Nair R.P., Larsen R.D., Berhend T.L., Marks R.M. (1990)  
Elam-1-dependant cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA.



Cell 63, 475-484

- 124) Tsuchiya N., Endo T., Matsuda K., Yoshinoya S., Takashi A., Kosuge E.,  
Takeuchi F., Miyamoto T., Kobato A. (1989)  
Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on  
imunological activities of human IgG.  
J. Rheumatol. 16, 285-90

## Chapitre 2

Généralités sur  
les méthodes employées  
pour la détermination de la  
conformation des glycannes

## I. Introduction:

Seules les méthodes de détermination de la conformation des glycanes des glycoprotéines permettront d'élucider complètement le rôle des glycanes.

Parmi ces méthodes, on distingue les méthodes expérimentales et les méthodes théoriques.

Nous nous attarderons dans ce chapitre uniquement aux résultats obtenus par ces méthodes pour les sucres, mais auparavant, définissons quelques termes.

## II. Définitions:

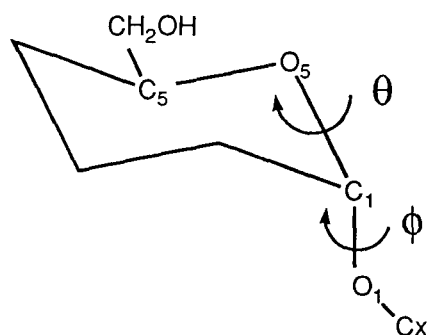
### I.1. Effet anomérique, effet exoanomérique:

De nombreuses propriétés des oligosaccharides sont déterminées par un seul groupe, le fragment acétal en C1 pour les formes aldoses et en C2 pour les cétooses. Ce fragment subit deux effets bien particuliers: l'effet anomérique et l'effet exoanomérique.

L'effet anomérique traduit la configuration alpha ou bêta d'un saccharide suivant la position de l'hydroxyl sur le carbone 1 hémiacétal et correspond donc à la torsion (C5O5C1Cx) ou  $\theta$  (1).

Cet effet anomérique est reconnu comme une caractéristique générale des molécules qui possèdent deux hétéroatomes négatifs liés à un atome central tétraédrique. Cependant, à part l'évidence d'une différence de longueur pour les liaisons C-O dans les cristaux saccharidiques, il existe des controverses sur l'amplitude de cet effet (2).

L'effet exoanomérique traduit le comportement du substituant lié à l'oxygène glycosidique. Il correspond à la torsion (O5C1O1Cx) ou  $\phi$  (3).



Suivant les méthodes de détermination de la conformation des oligosaccharides, un traitement particulier pourra être appliqué à cet effet.

## I.2. La liaison glycosidique:

La liaison glycosidique est formée par l'association de deux monosaccharides.

La diversité des glycanes provient donc de trois faits:

- la nature des monosaccharides entrant dans leur composition,
- la configuration alpha ou bêta de ces monosaccharides,
- la position des branchements: 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, ou 1-6.

Dans le cas des quatre derniers branchements, on distingue le sucre réducteur, dont la fonction semi-acétalique est engagée avec un hydroxyle alcoolique du second monosaccharide.

Cette liaison glycosidique autour de deux monosaccharides crée de nouveaux angles de torsion, importants pour la détermination de la conformation des glycanes. Ces angles peuvent être définis comme ci-dessous (4-5):

$$\Phi = \Phi(O_5-C_1-O_1-C'_X)$$

$$\Psi = \Psi(C_1-O_1-C'_X-C'_{X+1})$$

$$\omega = \omega(O_1-C'_6-C'_5-O'_5)$$

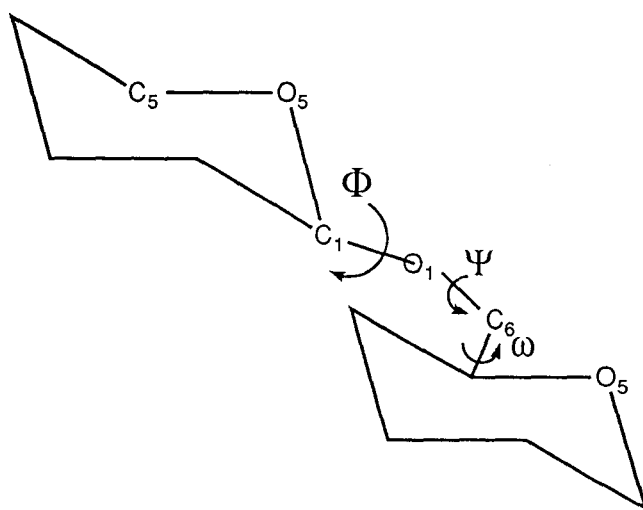
ou de la manière suivante (5):

$$\Phi_H = \Phi_H(H_1-C_1-O_1-C'_X)$$

$$\Psi_H = \Psi_H(C_1-O_1-C'_X-H'_X)$$

$$\omega_H = \omega_H(O_1-C'_6-C'_5-H'_5)$$

La première définition est celle des cristallographes, la seconde est utilisée en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.



Cette différence de nomenclature s'explique simplement par le fait qu'en diffraction des rayons X, la précision est au niveau des atomes lourds tandis que la seconde définition permet de relier la mesure des effets "nuclear Overhauser" aux hydrogènes.

### III. Méthodes expérimentales:

#### III.1. Applications aux saccharides de la diffraction des rayons X et de la diffusion inélastique des neutrons:

Ces méthodes sont sans doute les plus performantes pour obtenir des positions atomiques (6-9). Elles sont donc des méthodes de choix pour déterminer la structure tridimensionnelle de petites molécules mais aussi des macromolécules. Cependant, l'environnement cristallin n'est pas identique à l'environnement biologique. On peut donc penser que les conformations ainsi établies ne sont pas totalement identiques à la forme *in vivo*.

De plus, il n'existe pas actuellement de solution pour obtenir des cristaux simples avec des oligosaccharides de plus de quatre monosaccharides, à cause des effets défavorables des empilements cristallins des structures solides.

De nombreuses données, déterminées par diffraction des rayons X ou par diffusion des neutrons ont néanmoins été collectées sur des mono et disaccharides et leurs dérivés (10-16). L'utilisation de groupements méthyle ou acétyle est courante pour éviter les problèmes de cocrystallisation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$ .

Le premier glycanne qui fut déterminé avec une résolution suffisante est le décasaccharide du fragment Fc de l'immunoglobuline G<sub>1</sub> humaine par Deisenhofer (17). L'oligosaccharide du fragment Fc de l'IgG<sub>1</sub> de lapin a été aussi déterminé mais avec une résolution moindre (18).

Quelques structures d'oligosaccharides associés à des protéines ont été déterminées comme par exemple:

- le chitohexaose avec le lysozyme (19).
- le maltoheptaose et le maltopentaose avec une phosphorylase

(20-21).

Par contre pour les glycannes, il est souvent difficile de distinguer plus de trois ou quatre unités saccharidiques (22).

Récemment, une nouvelle possibilité de cocrystallisation de glycanne avec des lectines a été utilisée par l'équipe de C. Cambillau (23).

Donc, bien qu'elles soient des méthodes de choix pour obtenir des positions atomiques, la diffraction des RX et la diffusion des neutrons ne sont pas toujours applicables aux saccharides.

### **III.2. Application de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à la détermination de conformation de sucres:**

La résonance magnétique nucléaire ou RMN (24-27) est surtout une méthode de choix pour obtenir la structure primaire d'oligosaccharides (28). En effet, elle permet de déterminer la nature du sucre, le type de liaison glycosidique, l'anomérisé mis en jeu dans cette liaison et l'ordre de l'enchaînement des unités monosaccharidiques.

Elle permet aussi maintenant de faire des études conformationnelles (29). Pour cela, les techniques classiques de détermination des constantes de couplages et de déplacements chimiques sont souvent combinées à la mesure des effets "nuclear Overhauser ou nOe".

Pour établir une structure en trois dimensions, deux types de paramètres sont utilisés: les effets Overhauser nucléaires interprotons déterminés par des interactions dipolaires entre protons distants de moins de 5Å et les constantes de couplages  $^3J$  liées aux angles de rotation autour des liaisons simples.

La détermination des nOe de la liaison glycosidique représente un but important dans la détermination des conformations (30-31). On obtient ainsi les distances entre les atomes de la liaison glycosidique et ceux du reste de la molécule (31), qui seront alors traduites en angles  $\phi$  et  $\psi$  (32).

Cependant la détermination des distances à partir des intensités nOe n'est pas une opération simple dans la mesure où la relation de proportionnalité de l'effet n'est pas rigoureuse. De plus, la précision des nOe sur des distances assez grandes, est faible.

Des études RMN, à l'état solide, ont permis de conclure que le glissement chimique des carbones liés à la liaison glycosidique dépendait fortement des angles  $\phi$  et  $\psi$  (33-35).

Le problème de la flexibilité des liaisons glycosidiques entraîne des controverses dans les interprétations des nOe (32, 36-38).

Pour pouvoir mieux interpréter ces résultats, les nOe sont souvent étudiés avec des calculs théoriques de types HSEA ou dérivés (cf. page 60) (32, 39-40).

Il est cependant parfois impossible de trouver une seule conformation pour laquelle le spectre NOEsy peut reproduire une donnée. On en conclut alors la présence de plusieurs conformations en équilibre (41). Mais le plus souvent une seule conformation a pu être ainsi établie, comme pour les études des oligosaccharides de groupes sanguins (42-46).

Donc via la RMN, il est possible d'accéder à de nombreuses informations sur la conformation des saccharides par détermination des déplacements chimiques, des constantes de couplage, des vitesses de relaxation et des effets Overhauser nucléaires.

Ces informations sont toutefois entachées d'erreurs expérimentales moyennées par des équilibres conformationnels. Les résultats ne donnent donc qu'une image parcellaire de la conformation de la molécule.

C'est pourquoi les déterminations expérimentales doivent être jumelées à des calculs théoriques qui les rationalisent et donnent une vision globale de la conformation de la molécule. Il faut cependant que la fonction énergie potentielle empirique et les paramètres utilisés dans ces calculs théoriques soient fiables.

### **III.3. Applications de l'absorption infrarouge et de la diffusion Raman aux sucres:**

L'absorption infrarouge (47-48) et la diffusion Raman (47-50) sont deux techniques de spectroscopie de choix pour accéder aux modes de vibration d'une molécule. Ces modes de vibrations mettent en jeu les coordonnées internes de la molécule c'est-à-dire les liaisons, les angles de valence, les mouvements hors du plan et les angles de torsion entre les différents atomes de la molécule.

Ces spectroscopies ont surtout été utilisées d'un point de vue structural pour mettre en évidence les différentes formes des cycles des monosaccharides (51-52) ou leurs anoméries (53-59). Ainsi Vasko *et al.* montrent la présence en solution des bandes caractéristiques pour chacune des formes  $\alpha$  et  $\beta$  (60-62).

Les spectres infrarouge et Raman étant assez compliqués, des calculs théoriques d'analyses de modes normaux ont dû être effectués pour pouvoir

analyser les spectres obtenus. Les premiers travaux de ce genre ont été réalisés sur le glucose (60-67) ainsi que sur le galactose (67) et le mannose (67). D'autres travaux du même type ont été repris dans notre laboratoire dans le but de valider des champs de forces, sur les deux formes anomériques du glucose (68) et du galactose (69).

Quelques études ont été aussi entreprises sur des disaccharides (70-71).

A partir de toutes ces données il est possible de définir différentes régions spectrales pour les saccharides.

### III.3.1. région 3700-2800 $\text{cm}^{-1}$

Elle peut être divisée elle-même en deux sous-régions. La première de 3700 à 2900  $\text{cm}^{-1}$  concerne les vibrations d'élongation des O-H. La position et la forme de ces bandes permettent d'obtenir des informations sur les liaisons hydrogène qui peuvent être formées avec ces OH (72-73). La seconde de 2900 à 2800  $\text{cm}^{-1}$  concerne les élongations de type C-H. Les produits deutérés sont souvent utilisés pour une attribution précise des modes normaux de vibration de cette zone (74-76).

### III.3.2. région 1500-1200 $\text{cm}^{-1}$

Cette zone possède de très nombreuses bandes faisant intervenir des mouvements très couplés mettant en jeu les déformations des groupements  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , mais aussi des déformations angulaires de type CCH, HCO, et COH (61, 65-71).

### III.3.3. région 1200-950 $\text{cm}^{-1}$

Cette région fait intervenir les vibrations d'élongations C-C et C-O qu'elles soient endo ou exocycliques. De nombreuses déformations CCH et OCH interviennent aussi de manière fortement couplées.

### III.3.4. région 950-750 $\text{cm}^{-1}$

C'est la région dite anomérique ou empreinte car elle est caractéristique de la configuration rencontrée. De nombreuses études ont été



menées sur cette région (60-61, 65-71, 73, 77-78). Elle présente peu de bandes souvent caractéristiques de la configuration considérée.

### III.3.5. région 750-200 cm<sup>-1</sup>

C'est une région possédant des modes de vibrations complexes. On retrouve les vibrations correspondantes aux déformations de type CCC, COC, OCO, les torsions C-O et C-C (63-65, 78-79).

### III.3.6. région au dessous de 200 cm<sup>-1</sup>

Elle correspond aux mouvements d'ensemble de la macromolécule, couplés aussi à des modes intramoléculaires et en particulier avec des torsions. Cette région a été peu étudiée, et les seuls calculs faits jusqu'alors sont ceux des deux formes anomériques du glucose (64-68) et du galactose (69).

Ces différentes zones spectrales se compliquent en présence de groupements chimiques, comme les groupements acétamido, carboxylique, lactique, pouvant substituer les cycles pyraniques des saccharides.

## IV. Méthodes théoriques:

### IV.1. Introduction:

C'est pour pallier les difficultés rencontrées dans la détermination des conformations par des méthodes expérimentales que l'on a appliqué à ces saccharides des méthodes théoriques. Ces méthodes qu'elles soient *ab initio*, semi-empiriques ou empiriques sont soit des méthodes développées spécialement pour les saccharides, soit des méthodes généralistes. Nous allons présenter succinctement les méthodes qui ont été appliquées aux sucres.

### IV.2. Applications des méthodes *ab initio* aux sucres:

Ces méthodes permettent de résoudre l'équation de Schrödinger et donc de déterminer la structure, les divers termes énergétiques, et les spectres vibrationnels théoriques d'une molécule (80-81).

Pour les saccharides, les calculs *ab initio* sont très lourds et souvent encore inapplicables à des monosaccharides de taille supérieure au glucose. Ces calculs sont donc encore difficilement envisageables.

Cependant des fragments chimiques présents dans les cycles pyraniques ont été étudiés avec les différentes méthodes *ab initio*. Ainsi le méthadiol, le méthoxyméthanol, le diméthoxyméthane, le diméthoxyéthane, et le 2-méthoxytétrahydropyranne ont été étudiés pour obtenir des informations sur le comportement anomérique et exoanomérique (82-87).

Des monosaccharides comme le glucose (68, 88-91), le fructose (92), et des cycles furanoses (93-94) ont été tout de même étudiés. Un seul calcul sur un disaccharide a été effectué (94).

Les charges résiduelles des formes alpha et bêta du glucose ont été calculées avec des bases STO-3G, 3-21G (68). De grandes différences ont pu être ainsi observées. La géométrie du glucose est correctement reproduite avec une base telle que 3-21G, mais la reproduction du spectre vibrationnel est loin d'être bonne (68).

Donc la résolution de l'équation de Schrödinger, et l'accès de l'énergie du système moléculaire pour des glycanes est encore une utopie car les calculs demandent un coût de temps machine et des capacités de stockage énormes. C'est pourquoi des approximations supplémentaires ont été introduites pour résoudre cette équation donnant ainsi la vie aux méthodes semi-empiriques.

### IV.3. Applications des méthodes semi-empiriques aux sucres:

Ce sont des méthodes qui utilisent, comme les méthodes *ab initio*, la mécanique quantique mais avec des algorithmes qui incluent des paramètres optimisés pour reproduire les valeurs expérimentales des propriétés moléculaires (95).

D'un point de vue historique, la première méthode proposée fut la méthode PCILO ou "Perturbative Configuration Interaction using Localized Orbitals" (96-98). Puis Dewar *et al.* présentèrent les méthodes INDO ou "Intermediate Neglect of Differential Overlap" (99), et NDDO ou "Neglect of Diatomic Differential Overlap" (100). Puis une méthode modifiée de la version 3 de INDO, la méthode MINDO/3 fut proposée (101). Pour améliorer les résultats, la méthode MNDO ou "Modified Neglect of Diatomic Overlap"

apparue en 1977 (102). Cette méthode fut beaucoup utilisée. Cependant des problèmes persistaient en particulier dans le traitement des liaisons hydrogène (103).

C'est pourquoi en 1985 le modèle AM1 ou "Austin Model 1" fut publié (104). Cette méthode est encore développée actuellement.

Récemment un nouvel algorithme d'optimisation est apparu. Ce modèle est appelé MNDO-PM3 (105-106) pour indiquer qu'il correspond à la troisième paramétrisation de MNDO, AM1 étant la seconde.

Les principaux résultats de telles méthodes ont été obtenus avec la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique par Yadav *et al.* avec les méthodes MNDO (107), PCILO (108-109), CNDO (110), et INDO (110). Ces différentes méthodes ont été comparées avec les résultats empiriques de Pincus (111). Ces diverses méthodes donnent des conformations de plus basses énergies différentes. En général, les énergies de la méthode PCILO sont plus en accord avec la méthode empirique utilisée par Pincus (111) qu'avec les méthodes NDO ou MNDO. La configuration du groupement N-acétamido est en accord avec celle obtenue par la diffraction des rayons X (112). Le groupement hydroxyl primaire adopte une conformation trans/gauche différente de celle trouvée en solution par la RMN (113).

La méthode PCILO suggère que le groupement N-acétamido est important pour la conformation du cycle voisin dans les disaccharides (114).

Cette méthode PCILO est actuellement la plus utilisée des méthodes semi-empiriques. En effet elle a été aussi appliquée sur le maltose (115-116), le mannobiose (117) et le cellobiose (116-118).

La méthode MNDO a été également utilisée sur les formes anomères du galactose (119), la méthode AM1 pour optimiser la géométrie et obtenir les charges du glucose et de ses différents disaccharides pour une étude empirique (68). La méthode CNDO a été aussi utilisée pour le glucose (69).

Malgré les approximations nouvelles apportées dans ces méthodes semi-empiriques par rapport aux méthodes *ab initio*, il est souvent impossible d'effectuer des travaux sur des molécules de tailles supérieures aux disaccharides, c'est pourquoi des méthodes empiriques ont été développées.

## IV.4. Méthodes empiriques:

### IV.4.1. Introduction:

Les calculs de mécanique moléculaire sont un moyen de comprendre les propriétés physiques des systèmes moléculaires et ainsi de connaître comment l'énergie de tels systèmes varie en fonction des coordonnées des molécules. Ces calculs ont été à l'origine utilisés comme des techniques rapides de calcul pour l'analyse conformationnelle de petites molécules par des équipes de recherche comme celle de N. Allinger (120).

Il est possible de représenter la fonction énergie potentielle moléculaire comme une fonction analytique des coordonnées nucléaires en utilisant l'approximation de Born-Oppenheimer pour la séparation des mouvements électroniques rapides par rapport aux mouvements des noyaux beaucoup plus lents. Le comportement des noyaux dans le champ moyen des électrons sera alors étudié.

L'énergie moléculaire sera alors évaluée à partir de la fonction énergie potentielle. La forme analytique de cette dernière étant inconnue, plusieurs modèles sont proposés.

Les fonctions énergie potentielle habituellement utilisées dans les calculs consistent en une somme de termes divers et simplifiés représentant l'énergie totale de la molécule. Ces fonctions contiennent souvent des termes représentant les énergies de liaison, d'angles de valence et d'angles de torsion et aussi des interactions électrostatiques entre les charges partielles des atomes.

Si les composants de l'énergie sont soigneusement sélectionnés, les expressions donneront de bonnes approximations de l'énergie moléculaire. L'ajustement des paramètres qui apparaissent dans ces fonctions peut être effectué par comparaison avec des mesures expérimentales dans le but de donner une représentation aussi physiquement réaliste que possible.

Donc la détermination de l'ensemble des paramètres de la fonction énergie potentielle est une étape essentielle pour avoir une fonction potentielle fiable.

#### *IV.4.2. Mécanique Moléculaire:*

##### IV.4.2.1. Principe:

La Mécanique Moléculaire (120) utilise des fonctions énergie potentielle qui permettent des minimisations d'énergie pour obtenir une structure d'équilibre de la molécule étudiée.

Le minimum d'énergie de la molécule est obtenu par des méthodes itératives utilisant des dérivées premières ou secondes. On peut citer pour les dérivées premières les méthodes "Steepest Descent" ou SD (121) ou celle du Gradient Conjugué ou CG (122) et pour les méthodes aux dérivées secondes les méthodes "Newton Raphson" ou NR (123) et "Adapted Basis Newton Raphson" ou ABNR (124).

Le plus souvent, on applique une méthode aux dérivées premières suivie d'une aux dérivées secondes. On élimine ainsi tous les mauvais contacts grâce aux premières et on obtient une convergence rapide vers une structure stable grâce aux secondes.

Regardons maintenant succinctement les fonctions énergie potentielle les plus appliquées pour les sucres.

##### IV.4.2.2. Les différents champs de forces appliqués aux sucres:

De nombreuses fonctions énergie potentielle ou champ de forces ont déjà été appliqués aux sucres.

Ces champs de forces sont souvent des champs de forces généralistes, c'est-à-dire, applicables aussi bien aux protéines, aux acides nucléiques, qu'aux sucres. Mais il existe également des champs de forces développés spécialement pour les sucres afin de reproduire au mieux des effets particuliers comme l'effet anomérique.

Pour ces champs de forces, deux approches existent selon que l'on considère d'une part les polysaccharides comme des entités rigides (les monosaccharides) reliées par des zones flexibles (les liaisons glycosidiques) ou d'autre part que tous les degrés de liberté sont pris en compte. La méthode HSEA envisage la première approche, les champs de Rasmussen la seconde.

#### IV.4.2.2.1. La méthode HSEA:

ou "Hard Sphere ExoAnomérique". C'est un champ de forces simplifié développé par Lemieux *et al.* (32, 40). Il permet d'établir la structure secondaire d'oligosaccharides par calculs d'interactions non liées entre les monosaccharides constituant les disaccharides.

Dans le but de reproduire l'effet exoanomérique (125), un terme supplémentaire a été ajouté. Il représente la contribution de la liaison C1O1. Les paramètres sont donc différents avec une forme  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ceux-ci ont été obtenus à partir du calcul *ab initio* de Jeffrey *et al.* sur le diméthoxyméthane (85). Les conformations des cycles pyraniques sont fixées d'après des valeurs obtenues par diffraction des rayons X ou diffusion des neutrons. Cette approche a été justifiée par un grand nombre d'études par spectroscopie RMN montrant un changement dans la conformation des cycles pyraniques.

Cette méthode est très souvent employée et permet le plus souvent d'expliquer des résultats de  $nOe$  obtenus par RMN. Elle a ainsi été appliquée sur le sucrose (125-126), le gentobiose (127), sur des déterminants de groupes sanguins (39-40), et sur des oligosaccharides (39, 41-46, 128-130).

Toutefois cette méthode présente quelques imperfections (68) et le concept de sphère rigide est remis en cause par Brady *et al.* qui montrent que le cycle pyranique n'est pas rigide (37).

#### IV.4.2.2.2. Champs de forces PEF:

ou "Potentiel Energy Function". Les différents champs PEF (PEF3, PEF300, PEF400, PEF301, PEF422) ont été établis par Rasmussen afin de restreindre au maximum les différents termes énergétiques et de limiter aussi le nombre de paramètres utilisés (131-132). Les différentes versions des programmes PEF 300, PEF 400 et PEF 422 ont été utilisées sur le glucose (133-134), sur le maltose (135), le cellobiose (135), et le galactobiose (136).

Malgré leur simplicité, ces champs de forces permettent de reproduire avec précision les propriétés conformationnelles des mono- et disaccharides étudiés ainsi que les spectres vibrationnels de ces molécules.

#### IV.4.2.2.3. Champ de forces PFOS:

ou "Potentiel Functions For Oligosaccharides Structures". C'est un champ de forces développé par Pérez (137). Ce potentiel évalue l'énergie des interactions inter-résidus de type Van der Waals, l'énergie de rotation des torsions ainsi que celle des effets exoanomériques. Les liaisons hydrogène peuvent aussi être prises en compte.

Ce programme permet de présenter des cartes rigides, c'est-à-dire des cartes déterminant les régions conformationnelles les plus favorables en fonction des angles  $\phi$  et  $\psi$  pour des disaccharides. A partir de ces cartes rigides, des cartes dites relaxées sont aussi établies en utilisant d'autres fonctions potentielles dérivées de MM2 Carb (cf. paragraphe suivant), elles ont l'avantage de prendre en compte tous les paramètres moléculaires et pas seulement les angles  $\phi$  et  $\psi$  (138-139).

Grâce à cette procédure, la conformation spatiale des disaccharides suivants a pu être étudiée (139):

GlcNAc ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) GlcNAc, Man ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) GlcNAc, Man ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) Man  
Man ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) Man, GlcNAc ( $\beta 1 \rightarrow 2$ ) Man, GlcNAc ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) Man,  
GlcNAc ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) Man, Gal ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) GlcNAc, GlcNAc ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) Gal,  
Fuc ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) GlcNAc, Fuc ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ) GlcNAc, Xyl( $\beta 1 \rightarrow 2$ )Man

ainsi que l'octasaccharide  $(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2$ .

#### IV.4.2.2.4. Champs de forces généraux et leurs dérivés:

##### *\*Programmes de Mécanique Moléculaire:*

Ces programmes sont de loin les plus utilisés. Ils dérivent tous du programme MM1 d'Allinger (140) et de ses améliorations MM2 (141) et MM3 (142).

Ainsi MM1 Carb est une extension du programme MM1 développé par Jeffrey *et al.*. Ces auteurs proposent une série de paramètres pour les saccharides déterminés à partir des études quantiques de Jeffrey (83-85, 143).

Les paramètres de Jeffrey sont aussi appliqués à la version MM2 pour donner le programme MM2 Carb (2). Ce dernier permet de déterminer les régions conformationnelles les plus favorables en établissant des cartes en fonction des angles  $\phi$  et  $\psi$ .

De telles cartes ont été réalisées sur le mannobiose (144-145), le cellobiose (144, 146), le maltose (144, 147), le fructofuranose (148) et sur un pentasaccharide (149).

La méthode MM3 a été appliquée sur le glucose isolé (150) et lié à un céramide et à un glycéride (151).

*\*potentiel de Momany et Sheraga:*

C'est une fonction potentielle empirique développée en 1974 par l'équipe de Sheraga pour les acides aminés et les protéines mais qui a été aussi utilisée par de nombreux auteurs pour les sucres (152-155).

Cette fonction potentielle simple comprend des contributions électrostatiques de dispersion, des répulsions entre atomes non liés, des contributions dues aux liaisons hydrogène et enfin un potentiel de torsion intrinsèque. Les charges sont calculées à partir de la méthode semi-empirique CNDO/2. Ce potentiel a été utilisé pour étudier:

-l'interaction du lysozyme avec son substrat ou ses inhibiteurs (111, 156-157),

-la conformation du peptidoglycane des parois des bactéries (158-162), de glycosphingolipides (163), de l'héparine (164) et des oligosaccharides suivants (165):

Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>

(Man)<sub>3</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>

GlcNAc-(Man)<sub>3</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>

(GlcNAc)<sub>3</sub>-(Man)<sub>5</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>

*\*autres programmes:*

Le programme AMII "Additive Model of Interatomic Interaction" a été appliqué pour déterminer les spectres de vibrations du glucose, du galactose, du gulose, de l'allose, du  $\beta$ -mannose, du  $\beta$ -altrose et du cellobiose (70). Toutefois pour le glucose, les écarts standards avec les valeurs expérimentales de vibrations sont autour de 31 cm<sup>-1</sup>. De plus, aucune comparaison avec d'autres valeurs expérimentales n'a été entreprise pour les autres molécules.

Le programme CHARMM (124) de dynamique moléculaire pour macromolécules est utilisé par Tran *et al.* pour établir des cartes d'énergie potentielle du sucrose (166).

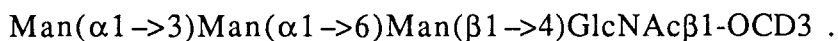
Le programme RAMM "RAndom Molecular Mechanics" est proposé pour l'analyse conformationnelle des oligosaccharides par Tvaroska *et al.*



(167). Il comprend un algorithme de mécanique moléculaire avec possibilité de solvation, de calculs de charges et de volume. Il utilise la fonction potentielle et la paramétrisation de MM2 et MM2 Carb. Des cartes d'énergie potentielle relaxées du méthyl-O-2-O-méthyl-β-D-glucopyranosyl(1-->2)α-D-glucopyranoside sont présentées en application de cette fonction énergie potentielle (167).

GEgop ou "GEometry of glycopeptides" est basé, sur un dérivé de HSEA, GESA ou "GEometry of SAccharides" pour la partie glycanique (32) et le champ de forces ECEPP/2 pour la partie peptidique (168). Cet algorithme permet une relaxation simultanée de tous les degrés de rotation de liberté des molécules étudiées durant les processus de minimisation. Les interactions mutuelles entre les glycannes et les résidus d'acides aminés peuvent être aussi étudiées en détail. Il a été appliqué sur un heptacosapeptide-décasaccharide de l'immunoglobuline G<sub>1</sub> (168).

Le champ de forces Tripos 5.3 utilisable sur le software Sybyl a été modifié en introduisant des paramètres établis pour des sucres (169-170). Ce nouveau programme PIM a été appliqué sur le tétrasaccharide (171):



#### IV.4.2.3. Conclusion:

De nombreuses méthodes de mécanique moléculaire sont donc actuellement développées pour les sucres. Cependant elles ne permettent souvent de modéliser que quelques unités saccharidiques et ne sont pas adaptées aux oligosaccharides et polysaccharides. De plus, elles sont, en général, ajustées pour reproduire au mieux des données expérimentales comme celles de la diffraction des RX ou de la RMN mais jamais les données de spectroscopie vibrationnelles de façon satisfaisante et sont, de plus, peu appropriées pour la dynamique moléculaire.

#### *IV.4.3. Dynamique harmonique: calcul des modes normaux de vibration:*

##### IV.4.3.1. Introduction:

Tout modèle de fonction potentielle se doit de reproduire toutes les données expérimentales disponibles et en particulier les spectres vibrationnels. Cependant pour les fonctions potentielles précédemment

citées, l'accord entre les fréquences calculées et observées est supérieur à  $25 \text{ cm}^{-1}$ , or pour les sucres, dans la région dite anomérique, l'écart entre raies spectrales est inférieur à  $15 \text{ cm}^{-1}$ . C'est pour pallier ces critiques que d'autres fonctions potentielles ont été développées suivant les termes d'énergie et les approximations considérées.

Les spectres Raman et IR d'une molécule sont composés d'un ensemble de raies correspondant aux modes normaux de vibration de celle-ci.

Pour le calcul des fréquences de ces modes normaux, on utilise la méthode GF de Wilson (172-173) Cette méthode considère la molécule comme un ensemble de points (atomes) liés entre eux par des ressorts (liaisons) de différentes élasticités (constantes de force). Les forces permettant la cohésion des atomes peuvent être décrites par des fonctions énergie potentielle qui sont fonction de paramètres structuraux tels que les longueurs de liaisons, les angles de valence, les interactions entre paires d'atomes non liés.... L'ensemble de ces fonctions énergie potentielle est appelé champ de forces.

#### III.4.3.2. Modèles de champs de forces:

Plusieurs modèles de champs de forces ont été proposés suivant les termes d'énergie et les approximations considérées.

Ainsi le champ de force de valence (68,174) est le plus simple des champs de forces. Il se développe suivant les modifications des coordonnées internes de la molécule. Cependant, sa simplicité ne permet pas toujours un bon ajustement des fréquences de vibrations.

Le champ de forces de valence généralisé (68, 175) est le même que le précédent mais il prend en compte en plus tous les termes non diagonaux.

Quant à l'expression de la fonction énergie potentielle du champ de force central (68, 174), elle s'écrit sous forme de modifications des liaisons et des distances interatomiques.

En 1931, Urey et Bradley (68, 176) proposent d'attribuer les termes non diagonaux du champ de forces de valence généralisé aux interactions entre atomes non liés.

C'est ce dernier champ de forces qui a été modifié par T. Shimanouchi (173, 177). Des termes de tensions et des termes d'interactions angle de valence - angle de valence ont été introduits en supplément.

L'expression analytique de ce champ est la suivante:

$$\begin{aligned}
V(r) = & 1/2 \sum_{\text{liaisons}} K_b (r_{ij} - r_o)^2 + 1/2 \sum_{\text{angles}} H_\theta r_{ij} r_{jk} (\theta_{ijk} - \theta_o)^2 \\
& + 1/2 \sum_{\text{opb}} \gamma_{ijkl} (\Delta_{ijkl})^2 + 1/2 \sum_{\text{torsions}} Y_{ijl} (\Delta \tau_{ijl})^2 \\
& + \sum_{\substack{\text{paires non liées} \\ r < 6 \text{ \AA}}} A_{ij} \exp(-B_{ij} r_{ij}) - C_{ij} / r^6 + \sum_{\substack{\text{paires non liées} \\ r < 6 \text{ \AA}}} q_i q_j / r \\
& + 1/2 \sum_{\text{distances 1,3}} F_{ij} (q_{ij} - q_o)^2 + \sum_{\text{distances 1,3}} F'_{ij} q_{ij} (q_{ij} - q_o)^2 \\
& + V_{\text{red}} + V_{\text{lh}}
\end{aligned}$$

avec  $V_{\text{red}}$ , la contribution à l'énergie potentielle de la tension interne  $K$  (68). Dans cette expression, les constantes  $K_b$ ,  $H_\theta$ ,  $Y_{ijl}$ ,  $\gamma_{ijkl}$  représentent respectivement les constantes de force associées aux mouvements d'élongations des liaisons, aux déformations angulaires, aux déformations hors du plan et aux torsions.

La constante de force  $K$  est donc la tension interne appliquée à un tétraèdre parfait.

Les constantes de forces  $F_{ij}$  et  $F'_{ij}$  sont respectivement associées aux répulsions de types 1,3 et aux termes linéaires de l'énergie de répulsion.  $F'_{ij}$  sera égale à  $-0,1F_{ij}$  si le potentiel entre paire d'atomes non liés est de type Lennard-Jones en  $R^9$ . En revanche si ce potentiel est en  $R^{12}$  comme le potentiel de type Buckingham,  $F'_{ij}$  sera égal à  $1/13 (F_{ij})$ .

A ces termes d'énergie intramoléculaire viennent s'ajouter d'autres termes importants, qui mettent en jeu des interactions de type déformation angulaire-déformation angulaire (68, 173) telles que les déformations trans/gauche, ou la constante d'interaction angulaire qui permet d'ajuster les coordonnées de symétrie de balancement et de rotation (68, 174).

C'est ce champ de forces qui sera utilisé pour établir une base de paramètres de la fonction énergie potentielle pour les saccharides.

Le champ de forces de symétrie locale (177). C'est un champ de forces qui aborde les groupements  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$  exprimés suivant leur propre symétrie contrairement au champ mUBSFF.

Ces deux derniers champs de forces permettent d'obtenir un ensemble de constantes de force caractéristique d'une réalité chimique affectées à un groupement d'atomes, ou à une molécule modèle dans des systèmes plus

complexes (178). C'est le principe de transférabilité énoncé par T. Shimanouchi (177).

#### IV.4.3.3. Analyse de modes normaux de vibrations des saccharides:

Peu d'analyses complètes des modes normaux de vibrations des saccharides ont été abordées. Ceci est dû à la complexité des spectres de ce type de molécules. La plupart des travaux ont été effectués sur le glucose.

Ainsi en 1971 et 1972 D. Vasko et J. Koenig utilisent un champ de forces dérivé du GVFF (179) pour étudier les deux formes anomères du glucose en solution (60-62), à l'état cristallin (62) et pour des formes deutérées (63). Cette étude est le point de départ de l'attribution de fréquences pour des disaccharides dérivés comme le maltose (65) et le cellobiose (180).

H. Wells propose aussi une étude sur les formes anomères du glucose avec un autre champ de forces pour laquelle les attributions des modes normaux ne sont pas toujours satisfaisantes (67). Il utilise les constantes de force ainsi obtenues pour étudier les spectres de vibration du galactose et du mannose (67).

Citons aussi le champ de forces AMII utilisé sur le  $\beta$  glucose (69) et le cellobiose (71).

Un calcul utilisant le champ de forces UBFF est aussi effectué par Hineno sur  $\beta$  glucose (63).

En 1979, dans notre laboratoire, J.P. Huvenne propose le premier calcul dans le cristal du glucose, les précédents ayant été effectués en milieu isolé (164). Puis M. Dauchez a développé ces études en milieu cristallin avec le champ de forces mUBSFF sur les deux formes anomères du glucose (68). Il obtient un très bon écart entre les fréquences observées et calculées, de l'ordre de  $10 \text{ cm}^{-1}$ .

Les premières constantes de forces ainsi obtenues ont été utilisées pour montrer la transférabilité de ce champ de forces sur différents disaccharides du glucose (68).

De même, toujours au sein de notre laboratoire, une étude sur le galactose, épimère en 4 du glucose a aussi été effectuée, agrandissant ainsi la base de paramètres de la fonction énergie potentielle empirique (69). Cette base de paramètres sera utilisée pour le programme SPASIBA (cf. page 71).

#### *IV.4.4. Dynamique moléculaire:*

##### IV.4.4.1. Introduction:

La dynamique moléculaire (181-182) permet de simuler les mouvements internes d'une molécule par résolution des équations de Newton, équation du mouvement de la mécanique classique. On appréhende ainsi l'activité et la fonction biologique d'une molécule et ceci dans un environnement qui peut être proche de la réalité puisqu'il est possible d'étudier la molécule en milieu solvaté.

##### IV.4.4.2. Historique d'une simulation de dynamique moléculaire:

###### IV.4.4.2.1. Point de départ:

Une simulation en dynamique moléculaire ou DM part d'une structure souvent obtenue à partir des rayons X par minimisation d'énergie.

###### IV.4.4.2.2. Thermalisation:

On sélectionne ensuite la vitesse initiale de chaque atome, celle du solvant comprise, à partir d'une distribution de Boltzman et à la température du système désirée. L'intégration des équations du mouvement peut être effectuée en utilisant différentes procédures d'intégration, la plus connue étant l'algorithme de Verlet (183).

###### IV.4.4.2.3. Equilibrage:

Comme les conditions de départ de la simulation sont arbitraires et souvent non réalistes, il est nécessaire d'équilibrer le système en intégrant l'équation du mouvement sur une petite période de 10 à 20 ps. Pendant cette période, la valeur de l'énergie doit être conservée et la température doit rester stable autour de la valeur désirée.

###### IV.4.4.2.4. Dynamique:

Dès que le système est suffisamment équilibré, on intègre les équations du mouvement sur une période assez longue de 10 à 800 ps pour les sucres.

Cette période sera analysée et pourra fournir la vitesse et la position des coordonnées internes pendant la simulation et en particulier les valeurs des angles  $\phi$ ,  $\psi$ , et  $\omega$  pour les saccharides mais aussi les grandeurs thermodynamiques, les amplitudes quadratiques moyennes ou RMS.

#### IV.4.4.3. Programmes de simulation dynamique appliquée aux sucres:

Les premières études de simulations dynamiques ont été effectuées par l'équipe de M. Karplus sur des protéines et des acides nucléiques (184). Ces auteurs ont ainsi démontré, par l'investigation systématique des mouvements des protéines, que dans la plupart des cas, les propriétés physico-biologiques de ces polymères ne peuvent être comprises sans prendre en compte les mouvements internes. Parmi les principaux programmes de simulation de macromolécules, on peut citer AMBER (185), CHARMM (124), DISCOVER (186), GROMOS (187), SYBYL (188). Les études dynamiques des sucres n'ont commencé que depuis peu.

Ainsi, une des premières études fut une simulation de 55ps de Post *et al.* sur le lysozyme avec son substrat l'hexamère (GlcNAc)<sub>6</sub> et 35 molécules d'eau de solvatation avec le programme CHARMM (189). Cette étude a permis d'observer les interactions du lysozyme avec son substrat.

D'autres études ont été effectuées avec ce même programme CHARMM et ses modifications. Ainsi en 1988 HA *et al.* nous ont proposé une étude de 20ps du glucose dans le vide (190), puis une dynamique de 20ps sur le maltose pour démontrer la flexibilité de la molécule (191).

A partir d'une autre version modifiée de CHARMM par le potentiel de Rasmussen (44), A. Bush *et al.* (36) nous présentent une dynamique de 800ps dans le vide des disaccharides suivants:

- Fuc  $\alpha$  (1--->2) Gal-O- $\beta$ -méthyl
- Gal  $\alpha$  (1--->3) Gal-O- $\beta$ -méthyl
- GalNAc  $\alpha$  (1--->3) Gal-O- $\beta$ -méthyl
- Gal  $\beta$  (1---->4) Glc- $\beta$ -O- $\beta$ -méthyl
- Gal  $\beta$  (1---->3) Glc- $\beta$ -O- $\beta$ -méthyl
- Gal  $\beta$  (1---->3) GlcNAc  $\beta$ -O- $\beta$ -méthyl

et des trisaccharides:

- Fuc  $\beta$  (1--->2) Gal-O- $\beta$ -méthyl [Gal  $\beta$  (1---->3)]
- Fuc  $\beta$  (1--->2) Gal  $\beta$  (1---->3) GlcNAc- $\beta$ -O- $\beta$ -méthyl

Ces di- et trisaccharides sont des fragments non réducteurs des groupes sanguins A et H.

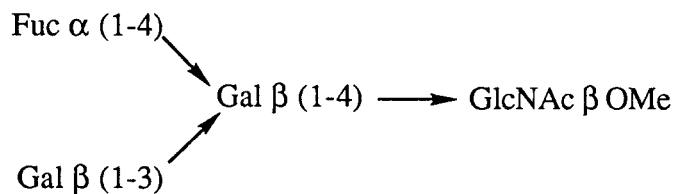
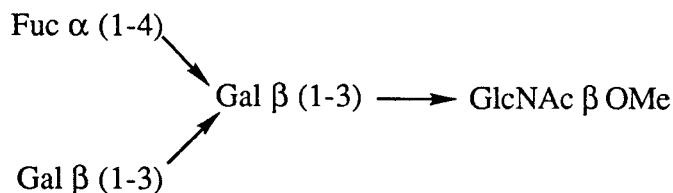
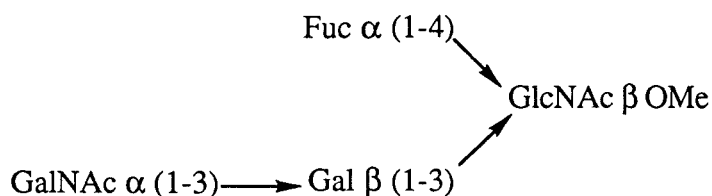
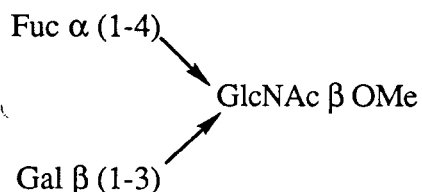
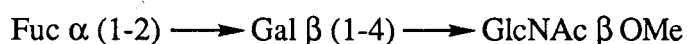
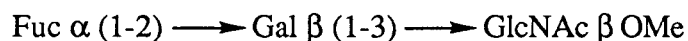
Dans cette étude, Yan *et al.* (44) démontrent:

-que le groupement acétamido des sucres aminés a peu d'influence dans la conformation de ces disaccharides,

-que le choix de la conformation de départ est aussi sans importance pour le résultat final.

Une certaine flexibilité de ces saccharides est visible pendant la simulation contrairement à ce qui était démontré par les mesures de  $^{13}\text{C}$ -nOe.

En 1991, ces mêmes auteurs proposent une simulation dynamique de 300ps toujours dans le vide, des saccharides suivants (45):



appartenants aux groupes sanguins Lewis a, Lewis b, Lewis d, A1, A2 et H.

appartenants aux groupes sanguins Lewis a, Lewis b, Lewis d, A1, A2 et H.

Les fluctuations des angles glycosidiques de ces oligosaccharides sont de plus ou moins 15° montrant une relative rigidité de ces modèles.

En 1992, une étude du trisaccharide Le<sup>x</sup>:

Galβ(1-4)Fucα(1-3)GlcNAcβOMe donne des résultats équivalents (46).

Brady *et al.* nous proposent également, pour étudier le rôle des liaisons hydrogène sur les sucres, d'effectuer une dynamique dans le vide, puis dans l'eau, du maltose. Cette solvataion est la cause de changement de conformation par rapport au vide (192).

D'autres méthodes ont été utilisées pour obtenir des simulations dynamiques de sucres. Ainsi Kroon *et al.* appliquent le programme GROMOS à l'étude du changement trans/gauche du groupement CH<sub>2</sub>OH du méthyl glucoside dans l'eau (193).

Homans modifie AMBER (185) pour proposer une dynamique dans le vide et dans l'eau du trisaccharide Man α (1-3) Man β (1-4) GlcNAc (194).

Dans notre laboratoire, une dynamique de 200ps dans le vide grâce au champ de forces de SYBYL, a été menée sur les disaccharides du glycanne monofucosylé biantenné de type N-acétyl-lactosaminique de la lactotransferrine humaine (195).

Tout récemment, le champ de forces DISCOVER a été utilisé pour effectuer une simulation dans le vide et dans l'eau à 400K du cellobiose (196-197).

#### IV.4.4.4. Conclusion:

Les travaux de dynamique moléculaire sur les saccharides ne sont actuellement qu'à leur commencement et les différentes équipes intéressées sont encore à la recherche de paramètres adaptés à ces molécules.

#### IV.4.5. *Le champ de forces SPASIBA:*

Un nouvel algorithme a été développé dans notre laboratoire pour avoir un programme de dynamique moléculaire reproduisant mieux encore toutes les données expérimentales et permettant d'effectuer des études dynamiques en solution de saccharides, mais également de très nombreuses autres molécules comme les peptides, les protéines et les acides nucléiques.



Ce potentiel utilise les termes ( $V_{AMBER}$ ) rencontrés dans AMBER représentant les coordonnées de torsion, les interactions de type Van der Waals et les liaisons hydrogène ainsi que des termes intramoléculaires ( $V_{UBS}$ ) du champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi (177).

L'expression du potentiel est alors la suivante:

$$V_{SPASIBA} = V_{AMBER} + V_{UBS}$$

avec

$$V_{AMBER} = \sum V_n / 2 \left[ 1 + \cos ( n \Phi - \gamma ) \right] + \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r'_{ij}{}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r'_{ij}{}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r'_{ij}} \right) + \sum_{\text{H-Bonds}} \left( \frac{C_{ij}}{r'_{ij}{}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r'_{ij}{}^{10}} \right)$$

A et B sont les paramètres de Lennard-Jones pour tous les types de paires d'atomes i, j.

C et D sont les paramètres 10-12 décrivant les liaisons hydrogène.

$q_i$  est la charge résiduelle de l'atome i.  $\epsilon$  est la constante diélectrique,  $r'_{ij}$  la distance entre les atomes i et j.  $V_n$  représente la barrière de rotation, n et  $\gamma$  la multiplicité et la phase de l'angle dièdre.

et avec

$$V_{UBS} = V_1 + V_2 + V_3 + V_4$$

$V_1$  correspondant aux variations des longueurs de liaison:

$$V_1 = \sum_{\text{bonds}} K ( r_{ij} - r_{ij0} )^2 + \sum_{\text{bonds}} K' r_{ij0} ( r_{ij} - r_{ij0} )$$

$V_2$  correspondant aux variations d'angles de liaison:

$$V_2 = \sum_{\text{angles}} H r_{ij0} r_{jko} ( \theta_{ik} - \theta_{iko} ) + \sum_{\text{angles}} H' r_{ij0} r_{jko} ( \theta_{ik} - \theta_{iko} )$$

$V_3$  est associé aux variations de distances entre les atomes non liés d'un angle (distance 1,3):

$$V_3 = 1/2 \sum_{\text{distances 1,3}} F_{ij} ( q_{ij} - q_{ij0} )^2 + \sum_{\text{distances 1,3}} F'_{ij} q_{ij0} ( q_{ij} - q_{ij0} )^2$$

$$V_3 = 1/2 \sum_{\text{distances } 1,3} F_{ij} (q_{ij} - q_{ijo})^2 + \sum_{\text{distances } 1,3} F'_{ij} q_{ijo} (q_{ij} - q_{ijo})^2$$

Le potentiel  $V_4$  est composé de  $F_{red}$  ainsi que trois termes non diagonaux reliés aux angles des groupements méthyle  $CH_3$  et méthylène  $CH_2$ :

$$V_4 = V_T + V_G + V_L + Kap. F_{red}$$

$F_{red}$  traite la redondance entre les angles de liaisons qui apparaît dès qu'un atome central est relié à plus de trois autres atomes dans l'espace.

$V_T$ ,  $V_G$ ,  $V_L$  sont respectivement les potentiels d'interactions: trans, gauche et angulaire. Les expressions  $V_T$  et  $V_G$  sont spécifiques des groupements  $CH_3$  et  $CH_2$  tandis que  $V_L$  ne s'applique qu'aux groupements  $CH_2$ .

$r_{ijo}$ ,  $\theta_{ijo}$  et  $q_{ijo}$  sont respectivement les valeurs d'équilibre de la longueur de la liaison entre les atomes  $i$  et  $j$ , l'angle de liaison entre atomes  $i$  et  $j$ , et la distance 1,3.  $K'$ ,  $K$ ,  $H$ ,  $H'$ ,  $F$  et  $F'$  sont les constantes de force.

Cet algorithme est utilisé pour les simulations dynamiques du chapitre 5.

## V. Conclusion:

Parmi les techniques expérimentales, la diffusion inélastique des neutrons serait déterminante. Mais les problèmes rencontrés dans la cristallisation des sucres ne nous permettent pas une exploitation complète de cette méthode.

Quant aux méthodes théoriques, pour les sucres, leur développement n'est qu'au point de départ et de nombreuses équipes de recherche essaient encore de trouver la méthode idéale.

C'est dans cette optique, que notre laboratoire développe actuellement le champ de force SPASIBA.

# Bibliographie

du

## Chapitre 2

- 1) Tvaroska I., Bleha T. (1989)  
Anomeric and exo-anomeric effects in carbohydrate chemistry.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 47, 45-123
- 2) Tvaroska I., Pérez S. (1986)  
Conformational energy. Calculation for oligosaccharides: a  
comparison of methods and a strategy of calculation.  
Carbohydr. Res. 149, 389-410
- 3) Lemieux R.U., Pavia A.A., Martin J.C., Watanabe K.A. (1969)  
Solvation effects on conformational equilibria studies related  
to the conformational properties of 2 methoxytetrahydropyran  
and related methyl glycopyranosides.  
Can. J. Chem. 47, 4427-4439
- 4) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. (1983)  
Eur. J. Biochem. 131, 5-7
- 5) Sundararajan P., Rao V.S.R. (1968)  
Theoretical studies on the conformation of aldopyranoses.  
Tetrahedron 24, 289-295
- 6) Amoros J.L., Amoros M. (1968)  
Molecular crystals: their transform and diffuse scattering.  
John Wiley and Sons, New York
- 7) Lipscomb W.N., Jacobson R. (1990)  
X-ray crystal structure analysis.  
Phys. Methods Chem., 2<sup>nd</sup> eds., 5, 1-121, ed. by Rossiter B.W.,  
Hamilton J.F., Wiley N.Y.
- 8) Magkrzakk C.F., Lehmann M.S., Cox D.E. (1990)  
The applications of neutrons diffraction techniques to structural  
studies.  
Phys. Methods Chem., 2<sup>nd</sup> eds., 5, 123-187, ed. by Rossiter B.W.,  
Hamilton J.F., Wiley N.Y.
- 9) Bacon G.E. (1978)  
Neutrons diffraction.  
Clarendon Press, Oxford.
- 10) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1974)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides  
and nucleotides 1970-72.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30, 445-466
- 11) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1975)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides  
and nucleotides 1973.

- Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 31, 347-371
- 12) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1977)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides and nucleotides 1975.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 34, 345-378
  - 13) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1980)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides and nucleotides 1976.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 374-436
  - 14) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1981)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides and nucleotides 1977 and 1978.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 38, 417-529
  - 15) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1985)  
Bibliography of crystal structures of carbohydrates, nucleosides and nucleotides 1979-80.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 43, 203-421
  - 16) Jeffrey G., Sundaralingam M. (1990)  
Crystallographic studies of carbohydrates.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 46, 89-103
  - 17) Deisenhofer J. (1981)  
Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8Å resolution.  
Biochemistry 20, 2361-2370
  - 18) Sutton B.J., Phillips D.C. (1983)  
The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G.  
Biochem. Soc. Trans. 11, 130-131
  - 19) Kelly J.A., Sielecki A.R., Sykes B.D., James M.N.G., Phillips D.C. (1979)  
1-X-ray crystallography of the binding of bacterial cell wall trisaccharide NAM-NAG-NAM to lysozyme.  
Nature 287, 875-878
  - 20) Goldsmith E., Fletterick R.J. (1983)  
Oligosaccharide conformation and protein saccharide interactions in solution.  
Pure & Appl. Chem. 55, 577-588
  - 21) Johnson L.N., Stura E.A., Sansom M.S.P. (1983)  
Oligosaccharide binding to glycogen phosphorylase b.  
Biochem. Soc. Trans 11, 142-144

- 22) Warin V., Baert F., Fouret R., Strecker G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. (1979)  
The crystal structure and molecular structure of O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose.  
Carbohydr. Res. 76, 11-22
- 23) Bournes Y., Rouge P., Cambillau C. (1988)  
Crystallization and preliminary X-ray studies of two isolectins from seeds of lathyrus ochrus.  
J. Mol. Biol. 202, 685-687
- 24) Dorome A.Z. (1987)  
Modern NMR techniques for chemistry research.  
Pergamon press, Oxford.
- 25) Ernst R.E., Bodenhauser G., Wokaun A. (1987)  
Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions.  
Clarendon press, Oxford
- 26) N.J. Oppenheimer, James T.L. (1988-1989)  
Methods in enzymology, vol. 176-177.  
Ed. Academic press Inc., San Diego, USA
- 27) Wüthrich K. (1986)  
NMR of proteins and nucleic acids.  
Eds. John Wiley and sons, New York, USA
- 28) Montreuil J. (1975)  
Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins metabolic and biological implications.  
Pure & Appl. Chem. 43, 431-477
- 29) Bossenec V.(1989)  
Etude structurale et conformationnelle de polysaccharides par résonance magnétique nucléaire.  
Thèse de Doctorat, Paris VI
- 30) Lipkind G.M., Shashkov A.S., Mamyzn S.S. (1985)  
Nuclear Overhauser effect and conformational states of cellobiose in aqueous solution.  
Carbohydr. Res. 141, 191-197
- 31) Keepers J.W., James T.L. (1984)  
A theoretical study of distance determined from NMR two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra.  
J. Magn. Reson. 57, 404-426

- 32) Thoegersen H., Lemieux R.U., Bock K., Meyer B. (1980)  
Further justification for the exo-anomeric effect. Conformational analysis based on nuclear magnetic resonance spectroscopy of oligosaccharides.  
Can. J. Chem. 60, 44-57
- 33) Gidley M.J., Bociek S.M. (1988)  
<sup>13</sup>C CP/MAS NMR studies of amylose inclusion complexes, Cyclodextrins and the amorphous phase of starch granules: Relationships between glycosidic linkage conformation and Solid-State <sup>13</sup>C Chemical Shifts.  
J. Am. Chem. Soc. 110, 3820-3829
- 34) Veregin R.P.N., Fyle C.A., Marchessault R.H., Taylor M.G. (1987)  
Correlation of carbon-13 chemical shifts with torsional angles from high-resolution carbon-13 CP-MAS NMR studies of crystalline cyclomalto-oligosaccharides complexes and their relation to the structures of the starch polymorphs.  
Carbohydr. Res. 160, 41-56
- 35) Bock K., Brignole A., Sigurskjold B.W. (1986)  
Conformational dependence of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance chemical shifts in oligosaccharides.  
J. Chem. Soc. Perkins trans II, 1711-1713
- 36) Bush A. (1992)  
Experimental determination of the three dimensional structure of oligosaccharides.  
Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 655-665
- 37) Brady J.W. (1991)  
Theoretical studies of oligosaccharide structure and conformational dynamics.  
Curr. Opin. Struct. Biol. 1, 711-715
- 38) Carver J.P. (1991)  
Experimental structure determination of oligosaccharides.  
Curr. Opin. Struct. Biol. 1, 716-720
- 39) Cumming D.A., Shah R.N., Krepinsky J.J., Grey A.A., Carver J.P. (1987)  
Solution conformation of the branch points of N-linked glycans: synthetic model compounds for triantennary and tetraantennary glycans.  
Biochemistry 26, 6655-6663
- 40) Lemieux R., Bock K., Delbaere L.T.J., Koto S., Rao V.S. (1980)  
The conformations of oligosaccharides related to the ABH and Lewis human blood group determinants.  
Can. J. Chem. 58, 631-653



- 41) Cumming D., Carver J. (1987)  
Virtual and solution conformations of oligosaccharides.  
*Biochemistry* 26, 6664-6676
- 42) Cagas P., Bush C.A. (1990)  
Determination of the conformation of Lewis blood group oligosaccharides by simulation of two-dimensional nuclear overhauser data.  
*Biopolymers* 30, 1123-1138
- 43) Bush C.A., Yan Z., Rao B.N.N. (1986)  
Conformational energy calculations and proton nuclear overhauser enhancements reveal a unique conformation for blood group A oligosaccharides.  
*J. Am. Chem. Soc.* 108, 6168-6173
- 44) Yan Z., Bush C.A. (1990)  
Molecular dynamics simulations and the conformational mobility of blood group oligosaccharides.  
*Biopolymers* 29, 799-811
- 45) Mukhopadhyay C., Bush C.A. (1991)  
Molecular dynamics simulation of Lewis blood group and related oligosaccharides.  
*Biopolymers* 31, 1737-1746
- 46) Miller K.E., Mukhopadhyay C., Gagas P., Bush C.A. (1992)  
Solution structure of the Lewis X oligosaccharide determined by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations.  
*Biochemistry* 31, 6703-6709
- 47) Theophanides T.M. (1979)  
Infrared and Raman spectroscopy of biological molecules.  
Vol 43, Reidel publ. Co.
- 48) Herzberg G. (1945)  
Infrared and Raman Spectra.  
Van Nostrand Co, New York
- 49) Delhaye M., Merlin J.C. (1975)  
Introduction à la spectroscopie Raman.  
*Biochimie*, 57, 401-415
- 50) Szymanski H.A. (1970)  
Raman spectroscopy.  
Plenum press, New York
- 51) Mathlouti M, Luu D. (1980)  
Laser-Raman spectra of D-fructose in aqueous solution.

- 52) Michalska D., Back D., Polavarapu P. (1984)  
Identification of characteristic anomeric bands in Infrared spectrum of lyxose in aqueous solution.  
Carbohydr. Res. 131, 29-38
- 53) Barker S.A., Bourne E.J., Stacey M., Whiffen D. (1954)  
Infrared spectra of carbohydrates. I. Some derivatives of D-glucopyranose.  
J. Chem. Soc., 171-176
- 54) Barker S.A., Bourne E., Stephens R., Whiffen D. (1954)  
Infrared spectra of carbohydrates. II. Anomeric configuration of some hexo- and pentopyranoses.  
J. Chem. Soc., 3468-3473
- 55) Barker S.A., Bourne E., Pinkard J., Whiffen D. (1958)  
Infrared spectra of carbohydrates. Differentiation of  $\gamma$  and  $\delta$  lactones of aldonic acids.  
Chem. Ind. (London), 658-659
- 56) Tipson R., Isbell H., (1960)  
Conformations of the pyranoid sugars II. Infrared absorption spectra of some aldopyranosides.  
J. Res. Natl. Bur. Stand., sect A 64, 239-263
- 57) Tipson R., Isbell H., (1960)  
Conformations of the pyranoid sugars III. Infrared absorption spectra of some acetylated aldopyranosides.  
J. Res. Natl. Bur. Stand., sect A 64, 405-426
- 58) Tipson R., Isbell H., (1961)  
Conformations of the pyranoid sugars IV. Infrared absorption spectra of some fullyacetylated pyranoses.  
J. Res. Natl. Bur. Stand., sect A 65, 249-266
- 59) Mathlouti M., Koenig J.L. (1985)  
Vibrational spectra of carbohydrates.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 44, 7-88
- 60) Vasko D. (1971)  
Spectroscopic and vibrational studies of carbohydrates.  
Case Western Reserve University, PhD, Cleveland, Ohio, U.S.A.
- 61) Vasko P., Blackwell J., Koenig J. (1971)  
Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates: Part I. Identification of OH and CH related vibrational modes for D-glucose, maltose, cellobiose and dextran by deuterium-substitution.

- 62) Vasko P., Blackwell J., Koenig J. (1972)  
Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates: Part II.  
Normal coordinate analysis of  $\alpha$ -D-glucose.  
Carbohydr. Res. 23, 407-416
- 63) Hineno M. (1977)  
Infrared spectra and normal vibrations of  $\beta$ -D-glucose.  
Carbohydr. Res. 56, 219-227
- 64) Huvenne J.P., Vergoten G., Fleury G., Legrand P. (1981)  
Champ de forces de symétrie locale de molécules cycliques: III.  
Interprétations des spectres de vibration de glucose cristallisé  
sous les formes  $\alpha$  et  $\beta$ .  
J. Mol. Struct. 74, 169-180
- 65) Cael J.J., Koenig J., Blackwell J. (1974)  
Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part IV.  
Identification of configuration and sensitive mode for D-glucose  
by normal coordinate analysis.  
Carbohydr. Res. 32, 79-91
- 66) Cael J., Koenig J., Blackwell J. (1973)  
Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates: Part III.  
Raman spectra of the polymorphic forms of amylose.  
Carbohydr. Res. 29, 123-134
- 67) Well H. (1977)  
An investigation of the vibrational spectra of glucose, galactose  
and mannose.  
PhD Thesis, Appleton, England
- 68) Dauchez M. (1990)  
Elaboration d'une base de paramètres de la fonction énergie  
potentielle empirique de saccharides en vue de son utilisation  
en mécanique moléculaire et dynamique moléculaire de  
glycannes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 69) Sekkal M. (1990)  
Utilisation conjointe de la spectrométrie IRTF et de la  
modélisation moléculaire à l'étude structurale des  
carraghenanes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 70) Andrianov V., Zhabankov R., Dashevski V. (1980)  
Calculation of the conformation and vibrational spectrum of  $\beta$ -  
D-glucose within the framework of the additive model of  
interatomic interaction.

- 71) Andrianov V., Zhabankov R., Dashevski V. (1980)  
Calculations of conformations and frequencies of vibrational spectra of a series of monosaccharides.  
Zh. Strukt. Khim. 21/1, 42-47
- 72) Szarek W., Korppi-Tommolas S., Shurvell H., Smith V., Martin O. (1984)  
A Raman and infrared study of crystalline D-fructose, L-sorbose and related carbohydrates hydrogen bonding and sweetness.  
Can. J. Chem. 62, 1512-1518
- 73) Kogan G., Tul'chinskii V., Shuman M., Zurabyan S., Khorlin A. (1973)  
Hydrogen bonds in crystalline monosaccharides. Spectra of monosaccharides derivatives in the middle- and far-infrared regions.  
Carbohydr. Res. 26, 191-200
- 74) Longhi G., Paterlini G., Abate S., Ricard L., Zerbi G. (1987)  
Vibrational spectroscopy of D-glucose: the CH stretching region.  
J. Mol. Struct. 142, 403-406
- 75) Longhi G., Zerbi G., Paterlini G., Ricard L., Abate S. (1987)  
Conformational dependence of CH(CD)-stretchings in D-glucose and some deuterated derivatives as revealed by infrared and Raman spectroscopy.  
Carbohydr. Res. 161, 1-22
- 76) Sekkal M., Legrand P., Vergoten G. (1992)  
A vibrational molecular force field of model compounds with biological interest III. Harmonics of  $\alpha$  and  $\beta$ -D-galactose in the crystalline state.  
Spectroch. Acta 48A, 959-973
- 77) Huvenne J.P. (1979)  
Redondance et symétrie locale de molécules cycliques.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 78) Vasko P., Koenig J. (1972)  
Infrared studies of chain folding in polymers. IX. Amylopectin and amylose.  
J. Macromol. Sci. Phys., 6, 117-127
- 79) Tulchinski V.M., Zurabyan S.E., Asankoshoev K.A., Kogan G.A., Khorlin A.Y. (1976)  
Study of the infrared spectra of oligosaccharides in the region 1000-40  $\text{cm}^{-1}$ .  
Carbohydr. Res. 51, 1-8

- 80) Hehre W.J., Radom L., Scheyer P.V.R., Pople J.A. (1970)  
Ab initio orbital theory.  
Ed. Mc Graw Hill
- 81) Clark T. (1985)  
A handbook of computational chemistry.  
Eds. John Wiley and sons
- 82) Jeffrey G.A., Pople J.A., Radom L. (1972)  
The application of ab initio molecular orbital theory to the  
anomeric effect. A comparison of theoretical predictions and  
experimental data on conformations and bond lengths in some  
pyranoses and methyl pyranosides.  
Carbohydr. Res. 25, 117-131
- 83) Jeffrey G.A., Pople J.A., Radom L. (1974)  
Application of ab initio molecular theory to structural moieties  
of carbohydrates II.  
Carbohydr. Res. 38, 81-95
- 84) Tvaroska I., Bleha T. (1975)  
Molecular orbital studies of the conformations of dimethoxy-  
methane  
J. Mol. Struct. 24, 249-259
- 85) Jeffrey G.A., Pople J.A., Binkley J.S., Vishveshwara S. (1978)  
Application of ab initio molecular orbital calculations to the  
structural moieties of carbohydrates.  
J. Am. Chem. Soc. 100, 373-378
- 86) Tvaroska I., Kozar T. (1980)  
Theoretical studies on the conformation of saccharides. 3.  
Conformational properties of the glycosidic linkage in solution  
and their relation to the anomeric and exoanomeric effect.  
J. Am. Chem. Soc. 102, 6929-6936
- 87) Tvaroska I., Bleha T. (1989)  
Anomeric and exoanomeric effects in carbohydrate chemistry.  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 47, 45-123
- 88) Jeffrey G., Yates J. (1980)  
Application of ab initio molecular orbital calculation to the  
structural moieties of carbohydrates. Part VI.  
Carbohydr. Res. 79, 155-163
- 89) Jeffrey G., Yates J. (1981)  
Application of ab initio molecular orbital calculations to the  
structural moieties of carbohydrates.  
Carbohydr. Res. 96, 205-213



- 90) Melberg S., Rasmussen K., Scormadaglia R., Tosi C. (1979)  
The non-bonded interaction in D-glucose and  $\beta$ -maltose: ab initio study of conformations produced by empirical forces field calculations.  
Carbohydr. Res. 76, 23-37
- 91) Woods R., Smith V., Szarek W., Farazdel A. (1987)  
Ab initio LCAO-MO calculations on  $\alpha$ -D-glucopyranose,  $\beta$ -D-fructopyranose and their thiopyranoid ring analogues. Applications to a theory of sweetness.  
J. Chem. Soc. Chem. Commun, 12, 937-939
- 92) Szarek W., Korppi-Tommala S., Martin O., Smith V.H. (1984)  
Examination of the molecular properties of D-fructose and L-sorbose by *ab initio* LCAO-MO calculations.  
Can. J. Chem. 62, 1506-1511
- 93) Darsey J., Voll R., Younathan E., Koerner T. (1988)  
Ab initio SCF energy calculations of the rotational orientation each of the exocyclic groups of 6-O-methyl- $\beta$ -D-galactofuranose.  
Carbohydr. Res. 173, 197-204
- 94) Garrett E.C., Seriani A.S. (1990)  
Ab initio molecular orbital calculations on carbohydrates. In Computer modeling of carbohydrates molecules. eds. A.D. French, J.W. Brady , Ch 3, 91-119
- 95) Dieter K.M., Stewart J.J.P., Seiler F.J. (1990)  
Modified neglect of diatomic overlap-type semi-empirical methods. In Computer Modeling of carbohydrates molecules. eds. A.D. French, J.W. Brady , Ch 3, 29-41
- 96) Diner S., Malrieu J.P., Claverie P., Jordan F. (1968)  
Fully localized bond orbitals and the correlation problem. Chem. Phys. Lett. 2, 319-323
- 97) Diner S., Malrieu J.P., Claverie P., Jordan F. (1969)  
Localized bond orbitals and the correlation problem. II Application to  $\pi$ -electron systems. Theor. Chim. Acta 13, 18-45
- 98) Malrieu J.P. (1977)  
The PCILO method. In Semi-empirical methods of electronic structure calculation. Chap 3, Part B, Gerald A. Ed Plenum Publishing Corporation.
- 99) Thiel W. (1988)  
Semi-empirical methods: current status and perspectives.

- 100) Pople J.A., Beveridge D.L. (1970)  
Approximate Molecular Orbital Theory.  
McGraw-Hill, N.Y.
- 101) Bingham R.C., Dewar M.J.S., Lo D.H. (1975)  
Ground states of molecules. 25. MINDO/3. An improved version  
of the MINDO semi-empirical SCF-method.  
J. Am. Chem. Soc. 97, 1285-1293
- 102) Dewar M.J.S., Thiel W. (1977)  
Ground states of molecules. 38. The MNDO method.  
Approximations and parameters.  
J. Am. Chem. Soc. 99, 4899-4907
- 103) Dewar M.J.S., Thiel W. (1977)  
Ground states of molecules. 39. MNDO results for molecules  
containing hydrogen carbon, nitrogen and oxygen.  
J. Am. Chem. Soc. 99, 4907-4917
- 104) Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. (1985)  
AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular  
model.  
J. Am. Chem. Soc. 107, 3902-3909
- 105) Stewart J.J.P. (1989)  
Optimization of parameters for semi-empirical methods. I.  
Methods.  
J. Comput. Chem. 10, 209-220
- 106) Stewart J.J.P. (1989)  
Optimization of parameters for semi-empirical methods. II.  
Applications  
J. Comput. Chem. 10, 221-264
- 107) Yadav J.S., Labinschinski H., Barnickel G., Bradaczek H. (1981)  
Quantum chemical studies on the conformational structure of  
bacterial peptidoglycan I. MNDO calculations on the glycan  
moiety.  
J. Theor. Biol. 88, 441-457
- 108) Yadav J.S., Barnickel G., Bradaczek H., Labischinski H. (1982)  
Quantum chemical studies on the conformational structure of  
bacterial peptidoglycan II. PCILO calculations on the  
monosaccharides.  
J. Theor. Biol. 95, 151-166
- 109) Yadav J.S., Barnickel G., Bradaczek H., Labischinski H. (1982)



- Quantum chemical studies on the conformational structure of bacterial peptidoglycan IV. PCILO calculation on the disaccharide part on the glycan moiety.  
J. Theor. Biol. 95, 285-303
- 110) Yadav J.S., Barnickel G., Bradaczek H., Labischinski H. (1982)  
Quantum chemical studies on the conformational structure of bacterial peptidoglycan III. CNDO and INDO calculation on the N-acetyl-glucosamine.  
J. Theor. Chem. 95, 167-179
- 111) Pincus M.R., Burgess A.W., Sheraga H.A. (1979)  
Conformational energy calculations of enzyme-substrate complexes of lysozyme. I. Energy minimization of monosaccharides and oligosaccharides inhibitors and substrates of lysozyme.  
Biopolymers 15, 2485-2521
- 112) Mo J., Jensen L.H. (1975)  
A refined model for N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine.  
Acta Cryst. B31, 2867-2873
- 113) Berman E. (1987)  
Conformational analysis and the fine structure of cross peaks in phase-sensitive homonuclear two-dimensional correlated NMR spectra oligosaccharides.  
Eur. J. Biochem. 165, 385-391
- 114) Yadav P.S.V.S., Yadav L.S., Yadav J.S. (1987)  
Quantum chemical studies on the conformational structure of bacterial peptidoglycan: the role of N-acetyl group.  
Theor. Chem. 37, 169-178
- 115) Giacomini M., Pullman B., Maigret B. (1970)  
Quantum research on the conformation of disaccharides.  
Theor. Chim. Acta, 19, 347-364
- 116) Stevens E.S., Sathyanarayana B.K. (1989)  
Potential energy surfaces of cellobiose and maltose in aqueous solution: a new treatment of disaccharide optical rotation.  
J. Am. Chem. Soc. 111, 4149-4154
- 117) Tvaroska I., Pérez S., Noble O., Taravel F. (1987)  
Solvent effect on the stability of mannobiose conformers.  
Biopolymers 26, 1499-1508
- 118) Tvaroska I. (1984)  
Theoretical studies on the conformation of saccharides VIII. Solvent effect on the stability of  $\beta$ -cellobiose conformers.  
Biopolymers 23, 1951-1960

- 119) De Vries N., Buck H. (1987)  
Different rotamer populations around the C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> bond for  $\alpha$  and  $\beta$ -D-galactopyranosides through the combined interaction of gauche and anomeric effects: A 300 Mhz <sup>1</sup>H MNR and MNDO study.  
Carbohydr. Res. 165, 1-16
- 120) Burkert U., Allinger N.L. (1982)  
Molecular mechanics.  
ACS monograph 177
- 121) Wiberg K. (1965)  
A scheme for strain energy minimization. Application to the cycloalkanes.  
J. Am. Chem. Soc. 87, 1070-1078
- 122) Van Gunsteren W., Karplus M. (1982)  
Effect of constraints on the dynamics molecules.  
Macromolecules 15, 1528-44
- 123) Boyd R. (1968)  
Method for calculation of the conformation of minimum potential-energy and thermodynamics functions of molecules from empirical valence force potentials. Application to the cyclophanes.  
J. Chem. Phys. 49, 2574-2584
- 124) Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. (1983)  
A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations.  
J. Comput. Chem. 4, 187-217
- 125) Norskov-Lauritsen L., Allinger N.L. (1984)  
A molecular treatment of the anomeric effect.  
J. Comput. Chem. 5, 326-335
- 126) Bock K., Lemieux R.U. (1982)  
The conformational properties of sucrose in aqueous solution: intramolecular hydrogen-bonding.  
Carbohydr. Res. 100, 63-74
- 127) Bock K., Vingnon M. (1982)  
A conformational study of gentobiose octoacetate by nuclear magnetic resonance spectroscopy and hard sphere calculations  
Nouv. J. Chim. 6, 301-304
- 128) Homans S., Dwek R., Rademacher T. (1987)



Solution conformations of N-linked.  
Biochemistry 26, 6649-6655

- 129) Tvaroska I. (1984)  
An attempt to derive the potential function for evaluation of the energy associated with the exo-anomeric effect.  
Carbohydr. Res. 125, 155-160
- 130) Brant D.A, Christ M.D. (1990)  
Realistic conformation modeling of carbohydrates.  
In Computer modeling of carbohydrates molecules, eds. by A.D. French, J.W. Brady, 42-68
- 131) Rasmussen K. (1982)  
Conformation and anomer ratio of D-glucopyranose indifferent potential energy functions.  
Acta Chem. Scand. A36, 323-327
- 132) Rasmussen K. (1983)  
The consistent force field: representation of molecular structure by potential energy functions.  
J. Mol. Struct. 97, 53-56
- 133) Brady J.W. (1986)  
Molecular dynamics simulations of  $\alpha$ -D-glucopyranose.  
J. Am. Chem. Soc. 108, 8153-8160
- 134) Brady J.W. (1987)  
Molecular dynamics simulations of  $\beta$ -D-glucopyranose.  
Carbohydr. Res. 165, 306-312
- 135) Melberg S., Rasmussen K. (1979)  
Potential energy function for calculation of structures, vibrational spectra and thermodynamic functions of alkanes, alcohols, ethers and carbohydrates.  
J. Mol. Struct. 57, 215-239
- 136) Rasmussen K. (1986)  
Conformations of disaccharides by empirical force field calculations: Part IV.  $\beta$ -Galactobiose.  
Acta Chem. Scand. A40, 149-153
- 137) Pérez S. (1978)  
Analyse cristallographique de structures polymères: conception et critique de nouveaux systèmes d'information.  
Thèse de Doctorat d'Etat, Grenoble
- 138) Imberty A., Gerber S., Tran V., Pérez S. (1990)

Data bank of three-dimensional structure of disaccharides. A tool to build 3D structures of oligosaccharides. Part I. Oligomannose type N-glycans. Glycoconjugate J. 7, 27-54

- 139) Imberty A., Delage M.M., Bourne Y., Cambillau C., Pérez S. (1991)  
Data bank of three dimensional structure of disaccharides: Part II. N-acetyllactosaminic type N-glycans comparison with the crystal of a biantennary octosaccharide. Glycoconjugate J. 8, 456-483
- 140) Allinger N.L., Chung D.Y. (1976)  
Conformational analysis. 118. Application of the molecular-mechanics method to alcohols and ethers. J. Am. Chem. Soc. 98, 6798-6803
- 141) Allinger N.L. (1977)  
Conformational analysis. 130. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. J. Am. Chem. Soc. 99, 8127-8134
- 142) Allinger N.L., Yuh Y.H., Lii J.H. (1989)  
Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. J. Am. Chem. Soc. 111, 8551-8566
- 143) Jeffrey G.A., Taylor R. (1980)  
The application of molecular mechanics to the structures of carbohydrates. J. Comput. Chem. 1, 99-109
- 144) French A.D. (1988)  
Rigid and relaxed residue conformational analysis of cellobiose using the computer program MM<sub>2</sub>. Biopolymers 27, 1519-1525
- 145) Jimenez-Barbero J., Noble O., Pfeffer C., Pérez S. (1988)  
Solvent specific energy surfaces of carbohydrates: the mannobiose case. New J. Chem. 12, 941-946
- 146) French A. (1989)  
Comparison of rigid and relaxed conformational maps for cellobiose and maltose. Carbohydr. Res. 188, 206-211
- 147) Tran V., Buleon A., Imberty A., Pérez S. (1989)  
Relaxed potential energy surfaces of maltose. Biopolymers 28, 679-690

- 148) French A.D., Tran V. (1990)  
Analysis of fructofuranose conformations by molecular mechanics.  
*Biopolymers* 29, 1599-1611
- 149) Raggazi M., Ferro D.R., Perly B., Sinay P., Petitou M., Choay J. (1990)  
Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding of heparin for antithrombin III.  
*Carbohydr. Res.* 195, 169-185
- 150) French A.D., Rowland R.S., Allinger N.L. (1990)  
Modeling of glucopyranose. The flexible monomer of amylose.  
In *Computer modeling of carbohydrates molecules*. ACS Symposium, serie 430, CH 7, 120-140.
- 151) Nyholm P.G., Pascher I. (1993)  
Orientation of the saccharide chains of glycolipids at the membrane surface: Conformational analysis of the glucose-ceramide and the glucose-glyceride linkage using molecular mechanics (MM3).  
*Biochemistry* 32, 1225-1234
- 152) Momany F.A., Carruthers L.M., McGuire R.F., Sheraga H.A. (1974)  
Intermolecular potentials from crystal data. III. Determination of empirical potentials and application to the packing configurations and lattice energies in crystals of hydrocarbons, carboxylic acids, amines and amides.  
*J. Phys. Chem.* 78, 1595-1620
- 153) Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Sheraga H.A. (1975)  
Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial charges, non-bonded interactions, hydrogen bond interactions and intrinsic torsional potentials for the occurring naturally amino acid.  
*J. Phys. Chem.* 79, 2361-2381
- 154) Momany F.A., Carruthers L.M., Sheraga H.A. (1974)  
Intermolecular potentials from crystal data. IV. Application of empirical potentials to the packing configurations and lattice energies in crystals of amino acids.  
*J. Phys. Chem.* 78, 1621-1630
- 155) Dunfield L.G., Burgess A.W., Sheraga H.A. (1978)  
Energy parameters in polypeptides. 8. Empirical potential energy algorithm for the conformational analysis of large molecules.  
*J. Phys. Chem.* 82, 2609-2615
- 156) Pincus M.R., Zimmerman S.S., Sheraga H.A. (1976)



Prediction of three-dimensional structures of enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of lysozyme.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 4261-4265

- 157) Pincus M.R., Sheraga H.A. (1981)  
Prediction of the three-dimensional structures of complexes of lysozyme with cell wall substrates.  
Biochemistry 20, 3960-3965
- 158) Pincus M.R., Sheraga H.A. (1979)  
Conformational energy calculations of enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of lysozyme. 2. Calculation of the structure of complexes with a flexible enzyme.  
Macromolecules 12, 633-644
- 159) Virudachalam R., Rao V.S.R. (1979)  
Theoretical studies on peptidoglycans. II. Conformations of the disaccharide-peptide subunit and three dimensional structure of peptidoglycan.  
Biopolymers 18, 571-589
- 160) Leps B., Barnickel G., Bradaczek H. (1984)  
Structural studies on the bacterial cell wall peptidoglycan pseudomurein I. Conformational energy calculation on the glycan strands in C1 conformational and comparison with murein.  
J. Theor. Biol. 107, 85-114
- 161) Leps B., Labischinski H., Barnickel G., Bradaczek H., Giesbrecht P. (1984)  
A new proposal for the primary and secondary structure of the glycan moiety of pseudomurein. Conformational energy calculations on the glycan strands with talosaminuronic acid in comparison with murein.  
Eur. J. Biochem. 144, 279-286
- 162) Leps B., Labischinski H., Bradaczek H. (1987)  
Conformational behaviour of the polysaccharide backbone of murein.  
Biopolymers 26, 1391-1406
- 163) Wynn C.H., Marsden A., Robson B. (1986)  
Calculation of the conformation of glycosphingolipids 1- $\beta$ -D-glucosyl-N-(2-D-hydroxyoctodecanoyl)-D-dihydrosphingosine (glucosyl-ceramide) and  $\alpha$ -D-N-acetylneuraminyl- (2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactose.  
J. Theor. Biol. 119, 81-87
- 164) Nagarajan M., Rao V.R.S. (1979)

Conformation studies of proteoglycans: theoretical studies on the conformation of heparin.  
*Biopolymers* 18, 1407-1420

- 165) Biswas M., Sekharudu C.Y., Rao V.S.R. (1986)  
Complex carbohydrates: 1. Conformational studies on some oligosaccharides related to N-glycosyl proteins which interact with concanavalin A.  
*Int. J. Macromol. Struct. Funct. Int.* 7, 349-356
- 166) Tran V.H., Brady J.W. (1990)  
Disaccharides conformational flexibility I. An adiabatic potential energy map for sucrose.  
*Biopolymers* 29, 961-976
- 167) Kozar T., Petrak F., Galova Z., Tvaroska I. (1990)  
RAMM. A new procedure for theoretical conformational analysis of carbohydrates.  
*Carbohydr. Res.* 204, 27-36
- 168) Stuike-Prill R., Meyer B. (1990)  
A new force field program for the calculation of glycopeptides and its application to a heptacosapeptide-decasaccharide of immunoglobulin G1. Importance of 1-6 glycosidic linkages in carbohydrate peptide interactions.  
*Eur. J. Biochem.* 194, 903-919
- 169) Clark M., Cramer R.D., Van Opdenbosh N.J. (1989)  
Validation of the general purpose tripos 5.2 force field.  
*J. Comput. Chem.* 10, 982-1012
- 170) Imberty A., Hardman K.D., Carver J.P., Pérez S. (1991)  
Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A.  
*Glycobiology* 1, 631-640
- 171) Imberty A., Pérez S., Hricovini M., Shah R.N., Carver J.P. (1993)  
Flexibility in a tetrasaccharide fragment from the high mannose type of N-linked oligosaccharides.  
*Int. J. Biol. Macromol.* 15, 17-23
- 172) Wilson E., Decius J., Cross P. (1958)  
Molecular vibrations.  
Mc Graw Hill, New York.
- 173) Shimanouchi T. (1970)  
In physical chemistry an advance treatise, vol. 4, ed. Henderson, academic Press



- 174) Califano S (1976)  
Vibrational states.  
J. Wiles & Son Ltd
- 175) Snyder R.G., Schachtschneider J.H. (1969)  
Vibrational analysis of a series of n-alkylchlorides in the solid state: ethyl chloride through n-hexylchloride.  
Spectrochimica Acta 19, 1963-1970
- 176) Urey H., Bradley C. (1931)  
The vibrations of pentatomic tetrahedral molecules.  
Phys. Rev. 38, 1969-1978
- 177) Shimanouchi T. (1963)  
Force constants of small molecules.  
Pure & Appl. Chem. 7, 131-145
- 178) Derreumaux P. (1988)  
Dynamique harmonique de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique du boeuf.  
Thèse de Doctorat, Lille II
- 179) Boerio F. Koenig J. (1971)  
Vibrational analysis of poly(vinylidene fluoride)  
J. Polym. Sci. A2/9, 1517-1523
- 180) Cael J.J., Gardner K., Koenig J.L., Blackwell J. (1975)  
Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part V.  
Normal coordinate analysis of cellulose I.  
J. Chem. Phys. 62, 1145-1153
- 181) Mc Cammon J.A., Harvey S.C. (1987)  
Dynamics of proteins and nucleic acids.  
Ed. Cambridge university press
- 182) Brooks C.L., Karplus M., Pettit B.M. (1977)  
A theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics.  
Eds. John & Wiley sons
- 183) Verlet L. (1967)  
Computer "experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard Jones molecules.  
Phys. Rev. 159, 98-103
- 184) Mc Cammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. (1977)  
Dynamics of folded proteins.  
Nature 267, 585-590



- 185) Weiner S., Kollman P., Case D., Singh U., Ohio C., Alagoma G., Profeta S., Weiner P. (1984)  
A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins.  
J. Am. Chem. Soc. 106, 765-784
- 186) Discover  
Biosym technologies Inc.  
10065 Barnes Canyon Road suite A, San Diego, CA, 92121 U.S.A.
- 187) Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. (1977)  
Algorithms for macromolecules dynamics and constraints dynamics.  
Mol. Phys., 34, 1311-1327
- 188) Sybyl (1988)  
Tripos associate, assigne St Louis  
Mo, USA, 189-213
- 189) Post C.B., Brooks B.R., Karplus M., Dobson C.M., Artymiuk P.J., Cheetham J.C., Phillips D.C. (1986)  
Molecular dynamics simulations of native and substrate-bound lysozyme.  
J. Mol. Biol., 190, 455-479
- 190) Ha S.N., Giammona A., Field M., Brady J.W. (1988)  
A revised potential-energy surface for molecular mechanics studies of carbohydrates.  
Carbohydr. Res. 180, 207-221
- 191) Ha S.H., Madsen L.J., Brady J.W. (1988)  
Conformational analysis and molecular dynamics simulations of maltose.  
Biopolymers 27, 1927-1952
- 192) Brady J.W., Schmidt R.K. (1993)  
The role of hydrogen bonding on carbohydrates/ molecular dynamics simulations maltose aqueous solution.  
J. Phys. Chem. 97, 958-966
- 193) Kroon-Batenburg L.M., Kroon J. (1990)  
Solvent effect on the conformation of the hydroxymethyl group established by molecular dynamics simulations of methyl- $\beta$ -D-glucoside in water.  
Biopolymers 29, 1243-1248
- 194) Homans S.W, Pastore A., Dwek R.A., Rademacher T.W. (1987)  
Structure and dynamics in oligomannose-type oligosaccharides.  
Biochemistry 26, 649-655

- 195) Dauchez M., Mazurier J., Montreuil J., Spik G., Vergoten G. (1992)  
Molecular dynamics simulations of a monofucosylated  
biantennary glycan of the N-acetyllactosamine type: the human  
lactotransferrin glycan.  
*Biochimie* 74, 63-74
- 196) Hardy B.J., Sarko A. (1993)  
Conformational analysis and molecular dynamics simulation of  
cellobiose and larger celooligomers.  
*J. Comput. Chem.* 14, 831-847
- 197) Hardy B.J., Sarko A. (1993)  
Molecular dynamics simulation of cellobiose in water.  
*J. Comput. Chem.* 14, 848-857
- 198) Derreumaux P. (1993)  
Communications personnelles
- 199) Derreumaux P., Lagant P., Vergoten G. (1993)  
Comparison of the IR and Raman vibrational frequencies and  
intensities of alkanes using the AMBER and SPASIBA force fields.  
Application to ethane, and gauche- and trans-n-butane.  
*J. Mol. Struct.*, 295, 223-232
- 200) Derreumaux P., Dauchez M., Vergoten G. (1993)  
The structure and vibrational frequencies of a series of alkanes  
using the SPASIBA force field.  
*J. Mol. Struct.*, 295, 203-221
- 201) Derreumaux P., Vergoten G. (1993)  
Harmonic and molecular dynamics of n-octane. Comparison  
between the AMBER and SPASIBA force field.  
*J. Mol. Struct.*, 295, 233-244
- 202) Chhiba M., Derreumaux P., Vergoten G. (1994)  
The use of SPASIBA spectroscopic potential to determine the  
structures and vibrational frequencies of a series of acids: acetic  
acid, pivalic acid, succinic acid, adipic acid and L-glutamic  
acid.  
*J. Mol. Struct.*, 317, 171-184



## Chapitre 3

# DYNAMIQUE HARMONIQUE DE MONOSACCHARIDES

## I. Introduction:

Avant d'étudier à l'aide des méthodes de simulations par ordinateur l'adaptabilité conformationnelle d'oligosaccharides, il est nécessaire d'établir une base de paramètres de la fonction énergie potentielle empirique des entités qui les constituent.

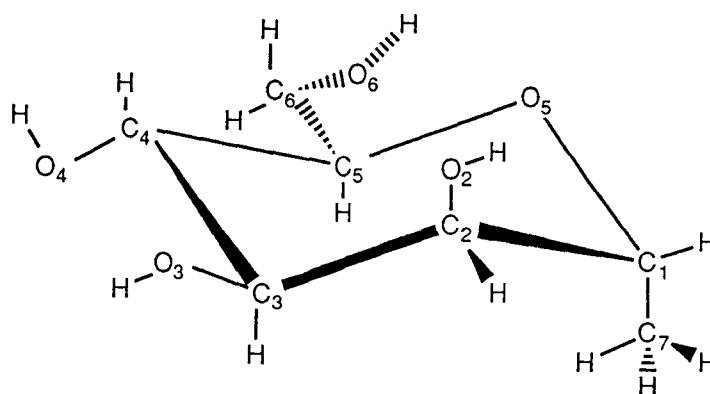
La suite de l'établissement de la base de paramètres de la fonction énergie potentielle, commencé par M. Dauchez (1) et M. Sekkal (2), est réalisé dans ce chapitre, à partir de données cristallographiques de monosaccharides et des spectres infrarouge et Raman.

La transférabilité des paramètres énoncée par Shimanouchi (3) est utilisée. Les constantes de forces obtenues pour le glucose (1), le N-méthylacétamide (4) et l'acide pivalique (5) servent de point de départ pour la dynamique harmonique des molécules suivantes:

- le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside
- la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine
- l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique
- l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique

## II. Présentation des molécules:

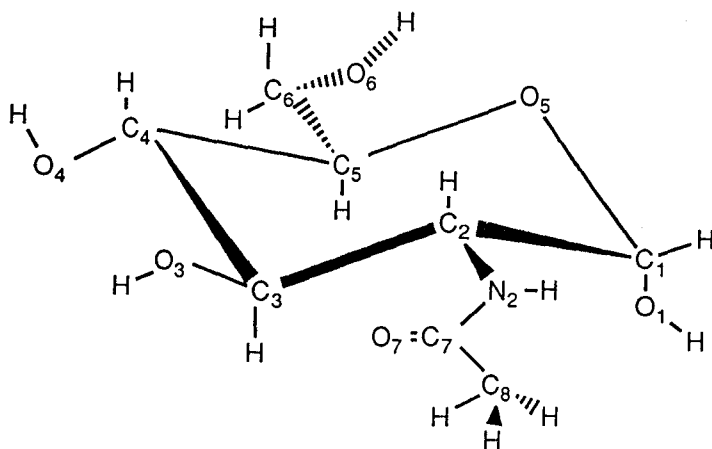
### II.1. Le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside:



Le mannose est un monosaccharide à six carbones, épimère en 2 du glucose. Il est souvent associé à lui-même dans les homosaccharides en  $\beta$ 1-4,  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-2 des levures ou des plantes. Il entre aussi dans la composition de nombreux oligosaccharides, en particulier dans les N-glycannes.

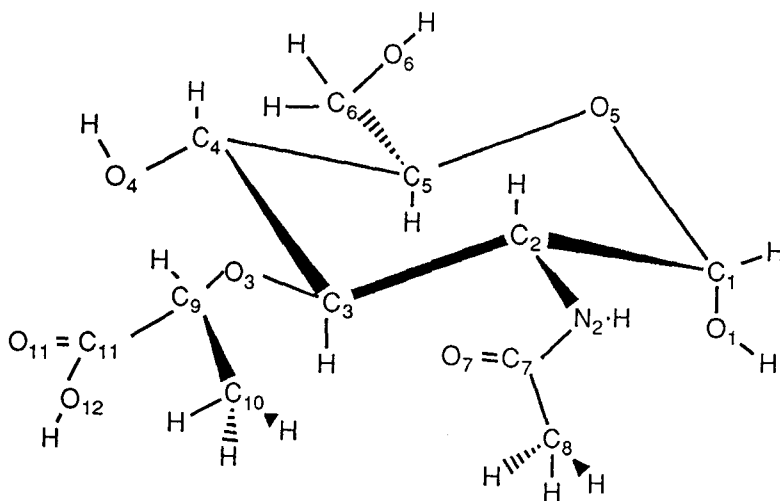
La forme méthyl- $\alpha$ -D-mannoside a été choisie pour notre étude car elle permettait de résoudre les problèmes de mélange d'anomères  $\alpha$  et  $\beta$  présents dans les formes cristallines du mannose.

## II.2. La N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine:



La N-acétyl-glucosamine est un monosaccharide possédant un groupement acétamido en position 2 équatoriale du cycle pyranique. L'établissement de son champ de forces, nous permettra d'obtenir une base de paramètres pour les sucres aminés rencontrés dans les structures glycaniques.

## II.3 L'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique:



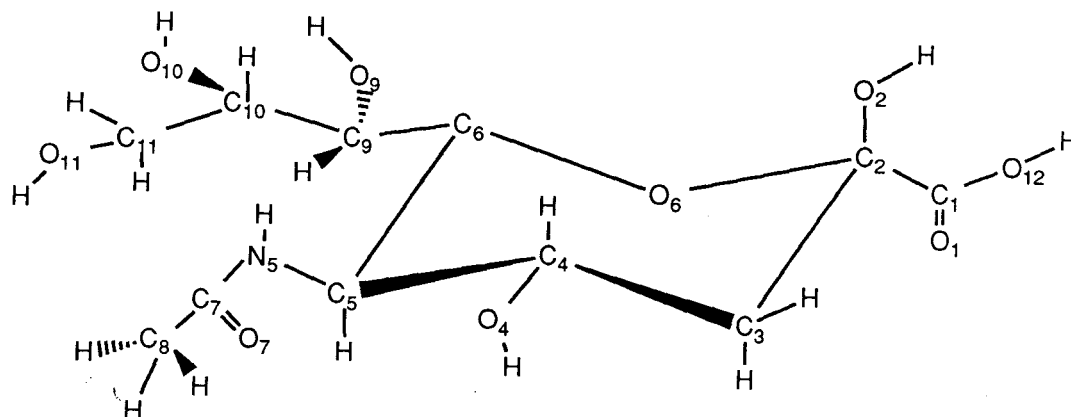
Dans le but d'agrandir notre base de données, il nous a paru intéressant d'obtenir le champ de forces de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique. En effet, ce dernier lié en  $\beta$  1-4 à la N-acétyl-glucosamine, forme l'ossature glucidique de la muréine de certains parois



bactériennes. Ce champ de forces pourra nous permettre d'appréhender des études dynamiques sur le peptido-glycane de cette muréine.

Vu l'homologie de structure entre cette molécule et la N-acétyl-glucosamine, nous pourrions utiliser le champ de force de la N-acétyl-glucosamine comme point de départ de cette étude.

#### II.4. L'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique:



L'acide N-acétyl-neuraminique est un monosaccharide à 11 carbones de la classe des acides sialiques. Il n'existe que sous la forme  $\beta$  à l'état libre. Contrairement aux monosaccharides vus précédemment, le cycle pyranique adopte la forme  ${}^2C_5$ . Ce cycle pyranique est substitué sur son carbone 5 par un groupement N-acétamido. Le carbone 2 de ce cycle porte l'hydroxyle anomère mais il est aussi substitué par un groupement acide carboxylique.

Ce monosaccharide est rarement rencontré à l'état libre, le plus souvent il est lié à des glycannes des glycoprotéines ou des glycolipides.

L'établissement de ce champ de forces nous permettra de voir si les constantes de force obtenues pour des cycles pyraniques en configuration  ${}^4C_1$  peuvent convenir pour des cycles en configuration  ${}^1C_4$  ou  ${}^2C_5$ .

### III. Données cristallographiques:

Les données cristallographiques de ces quatre molécules sont obtenues par diffusion des neutrons pour le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside (Me-MAn) (6) et par diffraction des rayons X pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine (GlcNAc) (7), l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique (MurNAc) (8) et pour l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique (NeuAc) (9).

L'ensemble de ces données cristallographiques est résumé dans le tableau 1 ci-dessous:

Tableau 1: Données cristallographiques de nos molécules.

	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
nombre d'atomes	27	30	39	40
groupe spatial	P <sub>21</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P <sub>21</sub>	P <sub>21</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P <sub>21</sub>
paramètres de la maille				
a (Å)	9,429	11,573	7,833	8,306
b (Å)	9,315	4,849	8,084	12,708
c (Å)	10,055	9,739	23,495	8,237
α	90°	90°	90°	90°
β	90°	116°72	90°	112°3
γ	90°	90°	90°	90°
nombre de molécules/maille	4	2	4	2
nombre de molécules H <sub>2</sub> O/maille	0	0	1	2
facteur d'accord R	0,03	0,024	0,079	0,049

Toutes les molécules de la maille sont obtenues à partir de la molécule de référence x, y, z par les opérations de symétrie résumées dans le tableau 2 ci-dessous:

Tableau 2: Définitions des opérations de symétrie

	Me-Man			GlcNAc			MurNAc			NeuAc		
	x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z
molécule 1	x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z
molécule 2	x+0,5	0,5-y	-z	-x	y+0,5	-z	0,5-x	-y	0,5+z	-x	0,5+y	-z
molécule 3	0,5-x	-y	z+0,5	-	-	-	0,5+x	0,5-y	-z	-	-	-
molécule 4	-x	y+0,5	0,5-z	-	-	-	-x	0,5+y	0,5-z	-	-	-

#### IV. Représentation irréductible des modes normaux:

Les molécules ne possédant pas de symétrie, le groupe C<sub>1</sub> est à la fois groupe moléculaire et groupe de site. Pour les deux molécules appartenant au groupe spatial P<sub>21</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> le groupe facteur est D<sub>2</sub> et pour les deux autres C<sub>2</sub>.

Les représentations irréductibles du réseau sont alors:

6 A + 5 B<sub>1</sub> + 5 B<sub>2</sub> + 5 B<sub>3</sub> pour le groupe facteur D<sub>2</sub> et,

5 A + 4 B pour le groupe facteur C<sub>2</sub>.



Les translations Tx, Ty et Tz (espèces B1, B2, B3) et Ty, Tx et Tz (espèces A et B) correspondent aux modes acoustiques (fréquences nulles) pour le groupe facteur D<sub>2</sub> et pour le groupe facteur C<sub>2</sub> respectivement.

Dans l'approximation du cristal flexible, les vibrations du réseau se couplent à celles des molécules conduisant aux représentations irréductibles présentées dans le tableau 3 ci-dessous:

Tableau 3: Représentations irréductibles de nos molécules.

	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
nombre d'atomes	27	30	39 + H <sub>2</sub> O	40 + 2H <sub>2</sub> O
3N-6	75	84	114	120
représentation	81A + 80B1 +	89 A + 88 B	114 A + 113 B1 +	125 A + 124 B
irréductible	80B2 + 80 B3		113 B2 + 113 B3	

## V. Obtention des spectres de vibration:

Le méthyl- $\alpha$ -mannoside, la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D muramique et l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique provenant de chez Sigma-chimie (La Verpillière France) ont été utilisés sans purification ultérieure.

L'ensemble des spectres enregistrés a été obtenu de la manière suivante:

- Les enregistrements de spectroscopie Raman ont été obtenus sur le spectromètre à triple monochromateur Coderg T800 du laboratoire. La lumière excitatrice utilisée était la raie à 514.5 nm et pour la région des basses fréquences la raie 488 nm d'un laser argon ionisé Spectra-physics 2025.

Selon le domaine spectral étudié, la puissance du laser était de 400 à 600 mW et la résolution obtenue avec le spectromètre était de 2 à 3.5 cm<sup>-1</sup>.

- Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier de type IFS 113V Brüker du LASIR (Lille). Ce spectromètre fonctionne sous vide, ce qui permet d'éliminer les vapeurs d'eau et de CO<sub>2</sub>. La résolution est de 2 cm<sup>-1</sup>.



## VI. Fonction potentielle:

L'expression analytique de la fonction énergie potentielle intramoléculaire choisie est celle d'Urey-Bradley-Shimanouchi modifiée.

$$V(r) = 1/2 \sum_{\text{liaisons}} K_b (r_{ij} - r_o)^2 + 1/2 \sum_{\text{angles}} H_\theta r_{ij} r_{jk} (\theta_{ijk} - \theta_o)^2 + 1/2 \sum_{\text{opb}} \gamma_{ijkl} (\Delta_{ijkl})^2 + 1/2 \sum_{\text{torsions}} Y_{il} (\Delta\tau_{il})^2 \\ + 1/2 \sum F_{ij} (q_{ij} - q_o)^2 + \sum F'_{ij} q_{ij} (q_{ij} - q_o)^2 + V_{\text{red}}$$

avec  $V_{\text{red}}$ , la contribution à l'énergie potentielle de la tension interne  $K_{ap}$  (1). Dans cette expression, les constantes  $K_b$ ,  $H_\theta$ ,  $Y_{il}$ ,  $\gamma_{ijkl}$  représentent respectivement les constantes de force associées aux mouvements d'élongation des liaisons, aux déformations angulaires, aux déformations hors du plan et aux torsions.

La constante de force  $K_{ap}$  est donc la tension interne appliquée à un tétraèdre parfait.

Les constantes  $F_{ij}$  et  $F'_{ij}$  sont respectivement les constantes de force quadratique et linéaire associées aux termes d'énergie des répulsions angulaires de type 1,3.

A ces termes d'énergie intramoléculaire viennent s'ajouter d'autres termes importants, qui mettent en jeu des interactions de type déformation angulaire-déformation angulaire (1) telles que les déformations trans/gauche, ou la constante d'interaction angulaire qui permet d'ajuster les coordonnées de symétrie de balancement (wagging) et de rotation (rocking) (1).

La fonction potentielle intermoléculaire est définie par les termes exposés comme ci-dessous:

-le potentiel d'interaction entre paires d'atomes non liés de type Buckingham,  $A_{ij} \exp(-B_{ij}R) - C_{ij}/R^6$  dans lequel  $A_{ij}$ ,  $B_{ij}$ , et  $C_{ij}$  sont des paramètres spécifiques des atomes mis en jeu (10).

-le terme d'interaction électrostatique de type coulombien, avec des charges résiduelles déterminées pour les molécules par des calculs semi-empiriques de type MNDO (11).

-le terme  $V_{1h}$  lié au potentiel des liaisons hydrogène qui, dans nos calculs, est une fonction spécifique de type Urey-Bradley et qui prend la forme suivante:

$$\begin{aligned}
V_{Ih} = & 1/2 K_{O...H} (\Delta r_{O...H})^2 + 1/2 K_{O5...H} (\Delta r_{O5...H})^2 \\
& + 1/2 K_{H...O=C} (\Delta r_{H...O=C})^2 + 1/2 K_{NH...O=C} (\Delta r_{NH...O=C})^2 \\
& + 1/2 H_{O-H...OH} r_{OH} r_{O...H} (\Delta \theta_{O-H...O})^2 + 1/2 H_{H...OH} r_{H...O} r_{OH} (\Delta \theta_{H...O-H})^2 \\
& + 1/2 H_{CO5...H} r_{CO5} r_{O5...H} (\Delta \theta_{CO5...H})^2 + 1/2 H_{O5...HO} r_{O5...H} r_{HO} (\Delta \theta_{O5...HO})^2 \\
& + 1/2 H_{NH...O=C} r_{NH} r_{H...O} (\Delta \theta_{NH...O=C})^2 + 1/2 H_{H...O=C} r_{H...O} r_{O=C} (\Delta \theta_{H...O=C})^2 \\
& + 1/2 H_{OH...O=C} r_{OH} r_{H...O} (\Delta \theta_{OH...O=C})^2 + 1/2 H_{H...O=C} r_{H...O} r_{O=C} (\Delta \theta_{OH...O=C})^2 \\
& + 1/2 Y_{O-H} (\Delta \tau_{O-H})^2 + 1/2 Y_{H...O} (\Delta \tau_{H...O})^2 + 1/2 Y_{CO5} (\Delta \tau_{CO5})^2 \\
& + 1/2 Y_{O5...H} (\Delta \tau_{O5...H})^2 + 1/2 Y_{C=O...NH} (\Delta \tau_{H...O})^2 + 1/2 Y_{C=O...H} (\Delta \tau_{C=O...N})^2 \\
& + 1/2 Y_{O...H} (\Delta \tau_{O...H})^2
\end{aligned}$$

dans laquelle, K, H, et Y sont respectivement les constantes de force associées aux élongations de la liaison hydrogène, aux trois angles de valence intervenant dans le processus donneur-accepteur et aux torsions supplémentaires amenées par la présence d'une liaison hydrogène.

C'est cette expression qui sera utilisée pour établir une base de paramètres de la fonction énergie potentielle pour les saccharides.

## VII. Conditions des calculs:

Les coordonnées cartésiennes sont celles données par Jeffrey *et al.* (6) pour le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, par Mo et Jensen pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine (7), par Knox et Murthy pour l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique (8) et par Flippen pour l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique (9).

Pour des raisons de simplicité de calcul, la géométrie des groupements  $CH_3$  a été légèrement modifiée par rapport aux données de départ afin d'obtenir des tétraèdres parfaits. Les positions de certains atomes d'hydrogènes ont été déplacées, pour obtenir des distances C-H classiques (12). Les hydrogènes non positionnés en diffraction des RX ont été placés en respectant des valeurs standards de distances, d'angles de valences et d'angles de torsions.

La description des coordonnées internes de chacune des quatre molécules est donnée ci-dessous.

Tableau 4: Définition des coordonnées internes des différentes molécules.

Liaisons		GlcNac		MurNAc		NeuAc	
Me-Man							
R1	C1-C2	R1	C1-C2	R1	C1-C2	R1	C2-C3
R2	C2-C3	R2	C1-O5	R2	C1-HC1	R2	C3-C4
R3	C3-C4	R3	C1-HC1	R3	C1-O1	R3	C4-C5
R4	C4-C5	R4	C1-O1	R4	C2-C3	R4	C5-C6
R5	C5-O5	R5	C2-C3	R5	C2-HC2	R5	C6-O6
R6	O5-C1	R6	C2-HC2	R6	C2-N2	R6	C2-O6
R7	C1-H1	R7	C2-N2	R7	C3-C4	R7	C2-C1
R8	C1-O1	R8	C3-C4	R8	C3-HC3	R8	C1-O1
R9	C2-H2	R9	C3-HC3	R9	C3-O3	R9	C1-O12
R10	C2-O2	R10	C3-O3	R10	C4-C5	R10	O12-H
R11	C3-H3	R11	C4-C5	R11	C4-H4	R11	C2-O2
R12	C3-O3	R12	C4-H4	R12	C4-O4	R12	O2-H
R13	C4-H4	R13	C4-O4	R13	C5-O5	R13	C3-H
R14	C5-O5	R14	C5-O5	R14	C5-H5	R14	C3-H
R15	C5-H5	R15	C5-H5	R15	C5-C6	R15	C4-H
R16	C5-C6	R16	C5-C6	R16	O1-HO1	R16	C4-O4
R17	O1-C7	R17	O1-HO1	R17	O4-HO4	R17	O4-H
R18	O3-HO3	R18	O3-HO3	R18	C6-O6	R18	C5-H
R19	O4-HO4	R19	O4-HO4	R19	C6-H1C6	R19	C5-N5
R20	C6-O6	R20	C6-O6	R20	C6-H2C6	R20	N5-H5
R21	C6-H1C6	R21	C6-H1C6	R21	O6-H	R21	N5-C7
R22	C6-H2C6	R22	C6-H2C6	R22	N2-H	R22	C7-O7
R23	O6-HO6	R23	O6-H	R23	N2-C7	R23	C7-C8
R24	C7-H1C7	R24	N2-H	R24	C7-O7	R24	C8-H
R25	C7-H2C7	R25	N2-C7	R25	C7-C8	R25	C8-H
R26	C7-H3C7	R26	C7-O7	R26	C8-H1C8	R26	C8-H
R27	O2-HO2	R27	C7-C8	R27	C8-H2C8	R27	C6-H
		R28	C8-H1C8	R28	C8-H3C8	R28	C6-C9
		R29	C8-H2C8	R29	O3-C9	R29	C9-O9
		R30	C8-H3C8	R30	C9-HC9	R30	O9-H
				R31	C9-C10	R31	C9-H
				R32	C9-C11	R32	C9-C10
				R33	C11-O11	R33	C10-H
				R34	C11-O12	R34	C10-O10
				R35	O12-H	R35	O10-H
				R36	C10-H1C10	R36	C10-C11
				R37	C10-H2C10	R37	C11-H
				R38	C10-H3C10	R38	C11-H
				R39	C1-O5	R39	C11-O11
				R40	OW-H	R40	O11-H
				R41	OW-H	R41	OW1-H
						R42	OW1-H
						R43	OW2-H
						R44	OW2-H

*Angles de valence*

Me-Man		GlcNac		MurNAc		NeuAc	
R28	C2-C1-O5	R31	C2-C1-O5	R42	C2-C1-O5	R45	C3-C2-O5
R29	C2-C1-HC1	R32	C2-C1-HC1	R43	C2-C1-HC1	R46	C3-C2-C1
R30	C2-C1-O1	R33	C2-C1-O1	R44	C2-C1-O1	R47	C3-C2-O2
R31	O5-C1-HC1	R34	O5-C1-HC1	R45	O5-C1-HC1	R48	O6-C2-C1
R32	O5-C1-O1	R35	O5-C1-O1	R46	O5-C1-O1	R49	O6-C2-O2
R33	HC1-C1-O1	R36	HC1-C1-O1	R47	HC1-C1-O1	R50	C1-C2-O2
R34	C1-C2-C3	R37	C1-C2-C3	R48	C1-C2-C3	R51	C2-C3-C4
R35	C1-C2-HC2	R38	C1-C2-N2	R49	C1-C2-HC2	R52	C2-C3-H
R36	C1-C2-O2	R39	C1-C2-N2	R50	C1-C2-N2	R53	C2-C3-H
R37	C3-C2-HC2	R40	C3-C2-HC2	R51	C3-C2-HC2	R54	C4-C3-H
R38	C3-C2-O2	R41	C3-C2-N2	R52	C3-C2-N2	R55	C4-C3-H
R39	HC2-C2-O2	R42	HC2-C2-N2	R53	HC2-C2-N2	R56	H-C3-H
R40	C2-C3-C4	R43	C2-C3-C4	R54	C2-C3-C4	R57	C3-C4-C5
R41	C2-C3-HC3	R44	C2-C3-HC3	R55	C2-C3-HC3	R58	C3-C4-H
R42	C2-C3-O3	R45	C2-C3-O3	R56	C2-C3-O3	R59	C3-C4-O4
R43	C4-C3-HO3	R46	C4-C3-HC3	R57	C4-C3-HC3	R60	C5-C4-H
R44	C4-C3-O3	R47	C4-C3-O3	R58	C4-C3-O3	R61	C5-C4-O4
R45	C4-C3-HC3	R48	HC3-C3-O3	R59	HC3-C3-O3	R62	HC4-C4-O4
R46	C3-C4-C5	R49	C3-C4-C5	R60	C4-C3-C5	R63	C4-C5-C6
R47	C3-C4-HC4	R50	C3-C4-HC4	R61	C3-C4-HC4	R64	C4-C5-H
R48	C3-C4-O4	R51	C3-C4-O4	R62	C3-C4-O4	R65	C4-C5-N5
R49	C5-C4-HC4	R52	C5-C4-HC4	R63	C5-C4-HC4	R66	C6-C5-H
R50	C5-C4-O4	R53	C5-C4-O4	R64	C5-C4-O4	R67	C6-C5-N5
R51	HC4-C4-O4	R54	HC4-C4-O4	R65	HC4-C4-O4	R68	H-C5-N5
R52	C4-C5-O5	R55	C4-C5-O5	R66	C4-C5-O5	R69	C5-C6-O6
R53	C4-C5-HC5	R56	C4-C5-HC5	R67	C4-C5-HC5	R70	C5-C6-H
R54	C4-C5-C6	R57	C4-C5-O5	R68	C4-C5-C6	R71	C5-C6-C9
R55	O5-C5-HC5	R58	O5-C5-HC5	R69	O5-C5-HC5	R72	O6-C6-H
R56	O5-C5-C6	R59	O5-C5-C6	R70	O5-C5-C6	R73	O6-C6-C9
R57	HC5-C5-C6	R60	HC5-C5-C6	R71	HC5-C5-C6	R74	H-C6-C9
R58	C1-O5-C5	R61	C1-O5-C5	R72	C5-O5-C1	R75	C6-O6-C2
R59	C1-O1-C7	R62	C1-O1-HO1	R73	C1-O1-HO1	R76	C2-C1-O1
R60	C3-O3-HO3	R63	C3-O3-HO3	R74	C3-O3-HO3	R77	C2-C1-O12
R61	C4-O4-HO4	R64	C4-O4-HO4	R75	C4-O4-HO4	R78	O1-C1-O12
R62	C5-C6-O6	R65	C5-C6-O6	R76	C5-C6-O6	R79	C2-O12-H
R63	C5-C6-HC6	R66	C5-C6-HC6	R77	C5-C6-HC6	R80	C4-O4-H
R64	C5-C6-HC6	R67	C5-C6-H1C6	R78	C5-C6-HC6	R81	C1-O1-H
R65	O6-C6-HC6	R68	O6-C6-HC6	R79	C6-O6-HO6	R82	C9-O9-H
R66	O6-C6-HC6	R69	O6-C6-H2C6	R80	O6-C6-HC6	R83	C6-C9-O9
R67	HC6-C6-HC6	R70	HC6-C6-HC6	R81	C6-O6-HC6	R84	C6-C9-H
R68	C6-O6-HO6	R71	C6-O6-HO6	R82	C6-O6-HO6	R85	C6-C9-C10
R69	O1-C7-HC7	R72	C2-N2-H	R83	O3-C9-HC9	R86	O9-C9-H
R70	O1-C7-HC7	R73	C2-N2-C7	R84	O3-C9-C11	R87	O9-C9-C10
R71	O1-C7-HC7	R74	HN2-N2-C7	R85	O3-C9-C10	R88	H-C9-C10
R72	HC7-C7-HC7	R75	N2-C7-O7	R86	HC9-C9-C11	R89	C5-N5-H
R73	HC7-C7-HC7	R76	N2-C7-C8	R87	HC9-C9-C10	R90	C5-N5-C7
R74	HC7-C7-HC7	R77	O7-C7-C8	R88	C11-C9-C10	R91	H-N5-C7
R75	C2-O2-HO2	R78	C7-C8-H1C8	R89	C2-N2-H	R92	N5-C7-O7
		R79	C7-C8-H2C8	R90	C2-N2-C7	R93	N5-C7-C8
		R80	C7-C8-H3C8	R91	H-N2-C7	R94	O7-C7-C8
		R81	HC8-C8-HC8	R92	N2-C7-O7	R95	C7-C8-H

Tableau 4 suite

Me-Man	GlcNac	MurNac	NeuAc
	R82 HC8-C8-HC8	R93 N2-C7-C8	R96 C7-C8-H
	R83 HC8-C8-HC8	R94 O7-C7-C8	R97 C7-C8-H
		R95 C7-C8-HC8	R98 H-C8-H
		R96 C7-C8-HC8	R99 H-C8-H
		R97 C7-C8-HC8	R100 H-C8-H
		R98 HC8-C8-HC8	R101 C9-C10-H
		R99 HC8-C8-HC8	R102 C9-C10-O10
		R100 HC8-C8-HC8	R103 C9-C10-C11
		R101 C9-C11-O11	R104 H-C10-O10
		R102 C9-C11-O12	R105 H-C10-C11
		R103 O11-C-O12	R106 H-C10-C11
		R104 C9-C-HC10	R107 C10-O10-H
		R105 C9-C-HC10	R108 C10-C11-H
		R106 HC10-C-HC10	R109 C10-C11-H
		R107 C11-O-HO12	R110 C10-C-O11
		R108 C9-C-HC10	R111 H-C11-H
		R109 HC10-C-HC10	R112 H-C11-O11
		R110 H-OW-H	R113 H-C11-O11
		R111 HC10-C-HC10	R114 C11-O11-H
			R115 H-OW-H
			R116 H-OW-H

*Angles de torsion*

Man-CH <sub>3</sub>	GlcNac	MurNac	NeuAc
R76 C1-C2	R85 C1-C2	R114 C1-C2	R120 C2-C3
R77 C2-C3	R86 C2-C3	R115 C2-C3	R121 C2-O2
R78 C3-C4	R87 C3-C4	R116 C3-C4	R122 C2-C1
R79 C4-C5	R88 C4-C5	R117 C4-C5	R123 C1-O1
R80 C5-O5	R89 C5-O5	R118 C5-O5	R124 C3-C4
R81 C1-O5	R90 C1-O1	R119 C1-O1	R125 C4-O4
R82 C1-O1	R91 C3-O3	R120 C2-N2	R126 C4-C5
R83 O1-C7	R92 C4-O4	R121 N2-C7	R127 C5-N5
R84 C2-O2	R93 C5-C6	R122 C7-C8	R128 N5-C7
R85 C3-O3	R94 C6-O6	R123 O5-C1	R129 C7-C8
R86 C4-O4	R95 C2-N2	R124 C3-O3	R130 C5-C6
R87 C5-C6	R96 N2-C7	R125 O3-C9	R131 C6-C9
R88 C6-O6	R97 C6-O6	R126 C9-C11	R132 C9-O9
	R98 O5-C1	R127 C11-O12	R133 C9-C10
		R128 C9-C10	R134 C10-O10
		R129 C4-O4	R135 C10-C11
		R130 C5-C6	R136 C11-O11
		R131 C6-O6	R137 C6-O6
			R138 O6-C1

*Mouvement hors du plan*

Me-Man	GlcNac	MurNac	NeuAc
	R84 C7-O7-N2-C8	R112 C7-O7-N2-C8	R117 N5-H-C5-C7
		R113 C11-O11-C9-O12	R118 C7-O7-N5-C8
			R119 C1-O1-C2-O12

A partir de ces coordonnées internes, nous avons construit les matrices permettant d'accéder aux coordonnées de symétrie.

Pour obtenir les coordonnées de symétrie des quatre molécules, nous avons dû éliminer les redondances suivantes:

- les 6 associées au cycle pyranique et les 5 associées aux carbones tétraédriques de ce cycle. L'expression des coordonnées de symétrie ainsi obtenue met en jeu une combinaison linéaire des coordonnées suivantes:

- \* les 6 liaisons du cycle,

- \* les 31 déformations angulaires définies par ces six atomes du cycle et leurs substituants,

- \* les 6 torsions du cycle.

- la redondance associée au groupement CH<sub>2</sub>OH (13),

- les redondances associées au groupement CH<sub>3</sub> (13),

- les redondances associées aux mouvements hors du plan (13).

Les autres coordonnées de symétrie des matrices U sont diagonales et correspondent aux coordonnées internes restantes.

Les calculs étant effectués dans le cristal, nous avons pris en compte la première, ou les deux premières couches de mailles entourant celle de référence. Soit 27 ou 125 mailles pour retrouver les liaisons hydrogène définies par les données cristallographiques.

Le tableau 5 ci-dessous résume le nombre de liaisons hydrogène existantes dans le réseau cristallin de chaque molécule, ainsi que le nombre de mailles nécessaires pour retrouver toutes ces liaisons hydrogène.

Tableau 5: Nombre de liaisons hydrogène pour chaque molécule.

	Me-Man	GlcNac	MurNAc	NeuAc
nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires	0	0	2	2
nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires	4	6	4	9
nombre de mailles utilisées pour le calcul	27	125	27	125

Le calcul des interactions non liées et coulombiques est donc effectué pour les 27 ou 125 mailles avec une distance de coupure maximale  $d_{\max}=12 \text{ \AA}$ .

Cette distance a été choisie car elle permet de prendre en considération des contacts importants pour les fréquences calculées. En fait, au dessus de 6 Å, les fréquences calculées varient peu mais l'énergie de réseau est modifiée.

Ainsi pour le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside

$$\epsilon=3 \text{ et } d_{\max}= 6\text{\AA} \text{ E= } -7.04 \text{ kcal}$$

$$\epsilon=3 \text{ et } d_{\max}= 8\text{\AA} \text{ E= } +12.16 \text{ kcal}$$

$$\epsilon=3 \text{ et } d_{\max}=10\text{\AA} \text{ E= } +2.49 \text{ kcal}$$

$$\epsilon=3 \text{ et } d_{\max}= 12\text{\AA} \text{ E= } -12.95 \text{ kcal}$$

Des distances de coupures maximales de valeurs supérieures augmentent considérablement le temps de calcul ordinateur, pour des résultats similaires.

La distance de coupure  $R_{\max}$  sera donc prise à 12Å pour les quatre molécules.

Les distances de coupures  $R_{\min}$  de chaque molécule sont présentées dans le tableau 6 suivant:

Tableau 6: Distances de coupures minimales (Å).

type	Me-Man	GlcNac	MurNAc	NeuAc
C---C	2.8	2.92	3.0	3.0
C---O	2.65	2.65	2.8	2.8
C---H	2.25	2.45	2.5	2.5
O---O	2.6	2.78	2.6	2.6
O---H	2.29	2.1	2.5	2.5
H---H	2.0	2.5	2.0	2.0
C---N		2.8	2.6	2.8
N---N		2.6	2.6	2.6
N---O		2.76	2.8	2.6
N---H		2.3	2.3	2.3

Les paramètres de la fonction Buckingham (10) utilisés sont donnés dans le tableau 7 ci-dessous:

Tableau 7: paramètres de la fonction Buckingham

$$V(r) = A e^{-Br-C/r^6}$$

type	A (kcal/mol)	B (Å <sup>-1</sup> )	C (kcal/mol)
C---C	83630	3.6	568
C---O	63700	3.881	441
C---H	8766	3.670	125
O---O	96500	4.333	346
O---H	57500	4.727	122
C---N	55300	3.768	456
N---N	76200	4.063	402
N---O	86100	4.194	374
N---H	86100	4.561	130
H---H	2654	3.74	23.7

Les charges résiduelles associées à chaque atome sont obtenues à partir de calculs semi-empiriques de type MNDO (11). C'est cet hamiltonien qui semble donner les meilleurs résultats pour le calcul des charges résiduelles associées aux monosaccharides (1). Les charges ainsi obtenues sont présentées dans le tableau 8 ci-dessous.



Tableau 8: Charges résiduelles calculées pour chaque atome.

Me-Man		GlcNac		MurNAc		NeuAc	
Atome	Charge	Atome	Charge	Atome	Charge	Atome	Charge
C1	0.2785	C1	0.1214	C1	0.1245	C1	0.3403
C2	0.0803	C2	0.0791	C2	0.0349	C2	0.2517
C3	0.0735	C3	0.0027	C3	0.0083	C3	-0.0319
C4	0.1164	C4	0.0093	C4	-0.0094	C4	0.1306
C5	0.0854	C5	0.0536	C5	-0.0285	C5	0.1023
C6	0.1626	C6	0.0066	C6	-0.0130	C6	0.0920
C7	0.2151	C7	0.2951	C7	0.3059	C7	0.3216
O1	-0.3629	C8	0.2398	C8	-0.2375	C8	0.0098
O2	-0.3098	O1	-0.3350	C9	0.044	C9	0.1549
O3	-0.3188	O3	-0.3035	C10	-0.2112	C10	0.0677
O4	-0.3183	O4	-0.2937	C11	0.2818	C11	0.1386
O5	-0.3316	O5	-0.2843	O1	-0.3459	O1	-0.3467
O6	-0.3197	O6	-0.3228	O3	-0.2517	O12	-0.2349
HO2	0.1906	O7	-0.3498	O4	-0.3352	O2	-0.3018
HO3	0.1803	N2	-0.3621	O5	-0.3155	O4	-0.3098
HO4	0.1875	HN2	0.2118	O6	-0.3318	O6	-0.3096
HO6	0.1842	HO1	0.1992	O7	-0.3939	O7	-0.3574
HC1	0.0538	HO3	0.2142	O11	-0.3772	O9	-0.3539
HC2	0.0225	HO4	0.1988	O12	-0.3120	O10	-0.3711
HC3	0.0411	HO6	0.2133	N2	-0.3704	O11	-0.3220
HC4	0.0469	HC1	0.1725	HN2	0.2608	N4	-0.3315
HC5	0.0302	HC2	0.1582	HO1	0.2150	HN4	-0.2925
HC61	-0.0003	HC3	0.0626	HO4	0.2250	HO1	0.2133
HC62	0.03	HC4	0.1500	HO6	0.2164	HO2	0.1848
HC81	-0.0157	HC5	0.0863	HO12	0.2453	HO4	0.1705
HC82	0.0126	HC61	0.0833	HC1	0.1447	HO9	0.2140
HC83	-0.0144	HC62	0.1271	HC2	0.1284	HO10	0.1954
		HC81	0.1143	HC3	0.1221	HO11	0.1663
		HC82	0.1210	HC4	0.1179	H1C3	0.0277
		HC83	0.0944	HC5	0.1109	H2C3	0.0399
				HC61	0.078	HC4	-0.0083
				HC62	0.1123	HC5	0.0833
				HC81	0.1127	HC6	0.0293
				HC82	0.1017	HC81	0.0344
				HC83	0.1030	HC82	0.0188
				HC9	0.1432	HC83	0.0091
				H1C10	0.097	HC9	0.0511
				H2C10	0.1001	HC10	0.0245
				H3C10	0.102	H1C11	0.0285
				OW	-0.3934	H2C11	0.0431
				HOW	0.1976	O1W	-0.3315
				HOW	0.1960	O2W	-0.2925
						HO1W	0.16
						HO1W	0.1752
						HO2W	0.1539
						HO2W	0.156

## VIII. Résultats des dynamiques harmoniques:

Les fréquences calculées de chaque espèce de symétrie, à partir du programme C.V.O.A. (14), sont données et comparées aux fréquences observées en Raman et infrarouge. Ces spectres sont présentés dans l'annexe de ce chapitre (page 140).

L'ensemble des constantes de forces intramoléculaires et intermoléculaires, obtenues après affinement, est présenté ci-dessous:

Tableau 9: Valeurs des constantes de forces intramoléculaires

Constantes d'élongations

élongations	K <sub>B</sub> mdyne/Å				K <sub>B</sub> kcal/mole.Å			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
Ccy-Ccy	3.1	3.00	2.8	2.8	223	215.8	201.4	201.4
C1C2		2.85		2.6		205		187.0
C2C3	2.95				212.2			
C3C4			2.4				172.6	
C4C5		2.65				190.6		
C5C6	2.65	2.50	2.4	2.6	191	178.8	172.6	187.0
C7C8		2.2	2.2	2.1		158.25	158.25	151.05
C9C10			2.8				201.4	
C1O5	2.4	2.8	2.95	2.8	172.6	201.4	212.2	201.4
C5O5	3.1	3.1	3.0	3.0	222.9	222.9	215.7	215.7
C-O			3.0				215.8	
C1(2)O(2)	2.9	2.9	2.9	2.65	208.6	208.59	208.59	201.4
C2O2	2.6				187			
C3O3	2.78	3.7	2.9	2.65	200	266.14	208.59	190.61
C4O4	3.0	3.3			215.8	237.37		
C6O6	3.6	3.6	3.2		258.95	258.95	230.17	
C7O1	3.0				216			
C7O7		8.28	8.49	8.05		595.58	610.7	579
C9O3			2.8				201.4	
C11(1)O12			4.5	4.5			323.7	323.7
C11=O11			9.38				617.7	
C-H	3.985	3.978	3.973	4.00	286.6	286.13	284.34	287.72
C2-H		3.962				284.98		
C3-H			4.00				287.7	
C6-H	4.02				289.2			
C8-H		4.463	4.75	4.69		321.0	341.66	337.35
O-H	6.18	6.24	5.7	5.98	444.5	448.84	410.0	430.14
O1H		6.03	6.22			433.74	447.4	
O4-H			5.98				430.14	
O3H		5.81				417.91		
O6-H	5.998	6.12			431.5	440.21		
O12(1)-H			4.82	4.82			346.7	346.7
OH H2O			7.15				514.30	
N-H		5.41	5.14	5.43		389.1	369.72	390.58
C2(4)N		4.1	4.1	4.12		295	295	296.35
C7N		5.2	5.15	5.05		374	370.44	363.24

avec  $K$  (kcal/mole.Å) =  $K$  (mdyne/Å) \* 143,6 / 2

Tableau 9 suite

## Angles de valence

Angle	H (mdyne/Å)				H (Kcal.mol/rad <sup>2</sup> )			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
CCC	0.33	0.33	0.36	0.36	56.3	56.65	60.46	60.46
C1C2C3		0.36				60.77		
C3C4C5	0.36				51.78			
C4C5C6	0.32	0.32	0.32	0.3	53.02	53.21	52.51	50.12
CCH		0.18	0.22	0.184		19.7	24.19	20.22
C1C2H	0.19	0.205	0.23		20.66	22.62	26.09	
C2C1H	0.215	0.226	0.24		22.46	24.93	26.65	
C2C3H	0.19				13.67			
C3C2H	0.19	0.202			20.67	22.23		
C3C4H		0.18	0.18			19.69	19.57	
C4C5H	0.2		0.22		13.39		24.07	
C5C4H	0.19				13.67			
C5C6H	0.175	0.206			25.16	22.42		
C6C5H	0.2	0.216			14.38	23.5		
C6C9H				0.20				21.82
C7C8H		0.189	0.18	0.184		22.34	19.82	19.76
C9CH			0.165	0.19			19.12	20.93
C10CH				0.22				23.94
CCO			0.265	0.25			41.88	39.19
C1C2O2	0.25				35.98			
C2C1O1	0.41	0.43	0.43		60.4	65.95	65.95	
C2C3O3	0.26	0.23	0.32		37.40	36.19	50.61	
C2C1O5	0.4	0.4	0.42		57.44	58.2	60.23	
C3C2O2	0.25				35.96			
C3C4O4	0.29	0.25		0.30	40.86	39.24		44.2
C4C3O3	0.3				41.58			
C5C4O4	0.19	0.2			27.34	31.54		
C4C5O5	0.18	0.2	0.16		28.89	31.83	25.45	
C5C6O6	0.27	0.26		0.25	42.23	40.06		36.43
C6C5O5	0.20	0.24	0.20		32.23	37.82	31.37	
C8C7O7		0.44	0.30	0.40		58.94	39.18	51.54
CC=O12			0.20	0.22			28.74	33.78
CCO11(1)			0.29	0.24			37.52	33.59
C10C9O9				0.30				47.00
CC11O11				0.22				31.2
C5O5C1	0.6	0.6	0.6		84.16	86.32	83.16	
C3O3C9			0.6				89.49	
C6O6C2				0.6				88.13
C1O1C7	0.99				146.9			
O6C2O2				0.32				46.05
O=C1-O1			1.03	1.07			113.42	118.22
O5C1O1	0.34	0.33	0.30		43.95	42.66	44.40	
COH	0.23	0.258	0.249	0.251	16.54	21.26	17.1	22.7
C1OH		0.282	0.28	0.423		25.96	25.36	34.27
C2OH	0.25			0.255	17.98			22.59
C3OH		0.25				18.51		
C6OH	0.294	0.314			21.15	25.1		
C11O12H			0.410	0.423			41.43	44.27

tableau 9-suite

Angle	H (mdyne/Å)				H (Kcal.mol/rad <sup>2</sup> )			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
HCO		0.18		0.219		18.5		22.62
HC1O1	0.274	0.213			19.7	21.29		
HC1O5	0.22	0.259	0.28		15.82	26.69	28.49	
HC7O1	0.2				14.39			
HC2O2	0.212				15.25			
HC3O3		0.18				18.5		
HC4O4	0.218		0.237		21.68		24.5	
HC6O6	0.17	0.195	0.21	0.26	19.23	19.86	21.28	26.78
HC5O5	0.263	0.22	0.22		23.92	23.75	23.00	
HC9O			0.245				27.15	
CC2(4)N		0.165	0.18	0.2		26.45	29.83	31.85
C8C7N		0.06	0.09	0.035		2.95	13.88	4.99
NC=O		0.5	0.50	0.47		58.78	59.85	54.00
HC2N		0.285	0.237	0.273		29.86	24.51	28.56
C2NC7		0.32	0.300	0.365		45.14	41.15	50.7
C2NH		0.17	0.16	0.135		14.4	13.22	11.84
C7NH		0.264	0.28	0.27		20.68	24.22	22.42
C1C2N		0.2	0.18	0.2		32.15	29.83	31.85
HC3H				0.39				28.17
HC8H		0.41	0.434	0.414		35.03	31.21	35.38
HC7H	0.406				29.20			
HC6H	0.42	0.434	0.396		30.21	31.21	28.48	
HOH			0.53	0.535			35.13	36.95

avec  $H_{ijk}$  (kcal.mol/rad<sup>2</sup>) =  $[H$  (mdyne/Å) \* 143,86 \*  $r_{ij}$  \*  $r_{jk}] / 2$

Tableau 9 suite

Angle	F (mdyne/Å)				F (Kcal.mol/rad <sup>2</sup> )			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
CCC	0.195	0.19	0.21	0.21	14.02	15.1	15.11	15.11
C1C2C3		0.21				13.67		
C3C4C5	0.21				15.21			
C4C5C6	0.2	0.2	0.2	0.18	14.38	14.38	14.38	12.95
CCH		0.4	0.44	0.386		28.78	31.64	27.76
C1C2H	0.44	0.41			31.65	29.5		
C2C1H	0.41	0.44	0.44		29.49	31.65	31.64	
C2C3H	0.42		0.47		30.21		33.8	
C3C2H	0.41	0.407			29.49	29.27		
C3C4H		0.35	0.41			25.17	29.5	
C4C5H	0.44		0.46		31.65		33.1	
C5C4H	0.42				30.21			
C5C6H	0.41	0.46			29.59	33.08		
C6C5H	0.51	0.45			36.38	32.37		
C6C9H				0.45				32.36
C7CH		0.435	0.45	0.436		31.28	32.37	31.55
C9CH				0.42				30.21
C10CH				0.46				33.08
CCO			0.55	0.52			39.56	37.40
C1C2O2	0.52				37.4			
C2C1O1	0.34	0.42	0.42		24.46	28.7	28.70	
C2C3O3	0.55	0.408	0.62		39.56	29.34	44.5	
C2C1O5	0.75	0.85	0.9		53.95	61.14	64.74	
C3C2O2	0.52				37.4			
C3C4O4	0.58	0.45		0.655	41.72	32.37		47.11
C4C3O3	0.59				42.44			
C5C4O4	0.45	0.3			32.37	21.58		
C4C5O5	0.65	0.32	0.62		46.75	23.01	44.59	
C5C6O6	0.4	0.5		0.65	28.77	35.96		46.75
C6C5O5	0.38	0.5	0.45		27.33	35.96	32.37	
C8C7O7		0.9	0.7	0.85		64.74	50.35	61.14
CC1=O12			0.8	0.72			57.54	51.79
CCO11(1)			1.315	1.00			94.59	71.93
C10C9O9				0.62				44.60
C10C11O11				0.48				34.5
C5O5C1	0.42	0.42	0.42		30.21	30.35	30.20	
C3O3C9			0.42				30.20	
C6O6C2				0.42				30.21
C1O1C7	0.9				64.74			
O6C2O2				0.63				45.31
O=C1-O1			0.92	0.97			66.17	69.77
O5C1O1	0.76	0.652	0.6		54.67	47.51	43.16	
COH	0.606	0.623	0.61	0.621	43.59	44.81	43.8	44.66
C1OH		0.626	0.61			45.03	43.8	
C2OH	0.62			0.574	44.59			41.29
C3OH		0.625				44.95		
C6OH	0.622	0.64			44.74	46.03		
C11O12H			0.38	0.403			27.53	28.98

tableau 9-suite

Angle	F (mdyne/Å)				F (Kcal.mol/rad <sup>2</sup> )			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
HCO		0.5		0.665		35.96		47.83
HC101	0.633	0.56			45.53	40.28		
HC105	0.62	0.46	0.82		44.59	33.09	59.00	
HC701	0.55				39.56			
HC202	0.64				46.04			
HC303		0.51				36.68		
HC404	0.67		0.694		48.19		50.00	
HC606	0.5	0.55	0.6	0.808	35.97	39.56	43.16	58.12
HC505	0.8	0.55	0.67		57.54	39.88	48.2	
HC90			0.732				52.65	
CC2(4)N		0.3	0.36	0.4		21.58	25.9	28.77
C8C7N		0.38	0.4	0.4		27.33	28.77	28.77
NC=O		0.81	0.82	0.75		58.26	60.00	53.95
HC2N		0.48	0.437	0.51		34.52	31.44	36.68
C2NC7		0.26	0.24	0.28		18.7	17.26	20.14
C2(4)NH		0.36	0.36	0.25		25.89	25.89	17.98
C7NH		0.42	0.44	0.42		30.21	31.65	30.42
C1C2N		0.4	0.36	0.4		28.77	25.9	28.77
HC3H				0.07				10.07
HC8H		0.07	0.07	0.07		10.07	10.07	10.07
HC7H	0.07				10.07			
HC6H	0.07	0.07	0.07		10.07	10.07	10.07	
HOH			0.481	0.53			34.6	38.12

avec  $F$  (Kcal.mol/rad<sup>2</sup>) =  $F$  (mdyne/Å) \* 143,86 / 2

*Torsions*

Torsions	Y mdyne.Å				Y Kcal/mole			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
CCYCCY	0.1	0.1	0.1		3.2	3.2	3.2	
C5-C6	0.08	0.10	0.16	0.125	2.55	3.2	5.11	3.996
C7C8		0.04	0.0345	0.04		0.639	2.48	2.87
C9-C10			0.148				4.73	
C9-C11			0.13				4.15	
C-C				0.0157				0.5
C101	0.15	0.14	0.20		4.79	4.47	9.18	
C202	0.686				2.36			
C303	0.065	0.04	0.2		2.07	1.27	6.39	
C404	0.074	0.085		0.0686	2.17	2.72		2.19
C-O			0.08	0.146			2.55	4.66
C606	0.1	0.0795	0.083		3.2	2.54	2.65	
C105	0.0615	0.0615	0.083		1.96	1.96	2.65	
C505	0.0615	0.0615		0.053	1.96	1.96		1.694
C701	0.127			0.0615	1.966			1.97
C10-O				0.063				2.0
C3-O9			3.42			0.107		
C11-O12			0.1464				10.5	
C(4)N		0.0058	0.0058	0.0058		0.092	0.417	0.185
C7N		0.206	0.11	0.254		14.81	7.91	18.2

avec  $Y$  (kcal/mole) =  $Y$  (mdyne/Å) \* 2 \* 143,86 / n<sup>2</sup> et n ordre de la torsion



Tableau 9 suite

*Mouvements hors du plan*

OPB	W mdyne.Å				W Kcal/mole			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
C7=O7		0.652	0.74	0.65		46.90	53.23	46.75
C11=O			0.24				17.26	
C1=O				0.2993				21.53
N-H				0.192				13.81

$$\text{avec } W \text{ (kcal/mole)} = W \text{ (mdyne/Å)} * 143,86 / 2$$

*Kappas*

Kappa	kap mdyne.Å				kap Kcal/mole			
	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc	Me-Man	GlcNAc	MurNAc	NeuAc
C	0.03	0.03	0.03	0.03	2.16	2.16	2.16	2.16
C1	0.095	0.095	0.095		6.83	6.83	6.83	
C6	0.0105	0.0105	0.0105		0.755	0.755	0.755	
C8		-0.08	-0.08	-0.08		-5.75	-5.75	-5.75
C9			0.075	0.075			5.39	5.39
C10			0.075				5.39	

$$\text{avec } \text{Kap (kcal/mole)} = \text{kap (mdyne/Å)} * 143,86 / 2$$

Les valeurs des constantes de forces intermoléculaires liées aux liaisons hydrogène sont présentées dans le tableau 10 ci-dessous:

Tableau 10: constantes de forces intermoléculaires

constantes de force	valeurs (mdyne/Å)
KO..H	0.15
KOCY..H	0.085
KH..O=C	0.135
KNH..O=C	0.135
HO-H...OH	0.03
HH..OH	0.03
HCOcy...H	0.03
HOcy...HO	0.04
HNH...O=C	0.03
HH..O=C	0.03
HOH...O=C	0.03
YO-H	0.0
YH...O	0.0
YCOcy	0.0
YOcy..H	0.0
YC=O..NH	0.0
YC=O...H	0.0
YO...H	0.0

Une attribution des modes normaux de vibration est donnée pour chaque molécule dans les tableaux 11 à 14 suivants à partir de la distribution d'énergie potentielle des différentes coordonnées internes ou de symétrie pour les groupes CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub>OH et les mouvements hors du plan.

Pour la région des basses fréquences, la description est également faite avec les coordonnées externes Ra, Rb, Rc, Tx, Ty, Tz.

Tableau 11. Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de vibrations du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside

Fréquences observées		Fréquences calculées				Attributions
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	Distribution de l'énergie potentielle en %
	3450	3446	3446	3446	3446	O4H (99%)
	3426	3428	3428	3428	3428	O2H (100%)
	3392	3415	3415	3415	3415	O3H (99%)
3342		3364	3364	3364	3364	O6H (99%)
3000	3010	2971	2971	2971	2971	C5H (80%)
	2959	2968	2968	2968	2968	C1H (77%)
2949		2946	2946	2946	2946	C3H (77%)+ C4H (20%)
		2932	2933	2932	2933	C2H (99%)
2930		2932	2931	2932	2931	C4H (75%) + C3H (21%)
2900	2897	2888	2888	2888	2888	ASCH <sub>2</sub> (97%)
		2857	2857	2857	2857	VSCH <sub>2</sub> (96%)
	2845	2841	2841	2841	2841	DS'CH <sub>3</sub> (82%)+ DSCH <sub>3</sub> (16%)
2836		2837	2837	2837	2837	DSCH <sub>3</sub> (81%) + DS'CH <sub>3</sub> (17%)
		2785	2785	2785	2785	TSCH <sub>3</sub> (99%)
1467	1468	1465	1464	1464	1465	HC1O1 (30%) + DDCH <sub>3</sub> (11%)
		1459	1459	1459	1459	HC5O5 (45%) + DDCH <sub>3</sub> (10%)
		1451	1451	1451	1451	DRCH <sub>3</sub> (37%) + DD'CH <sub>3</sub> (27%) + SDCH <sub>3</sub> (20%)
1448	1447	1444	1444	1444	1444	CH <sub>2</sub> SCI (57%)
		1442	1442	1442	1442	DDCH <sub>3</sub> (36%) + DD'CH <sub>3</sub> (17%) + DRCH <sub>3</sub> (11%)
		1431	1431	1432	1431	DD'CH <sub>3</sub> (17%) + DR'CH <sub>3</sub> (16%) + C2OH (13%) + SDCH <sub>3</sub> (12%)
1411	1414	1420	1419	1419	1418	C2OH (33%) + HC1O5 (14%) + HC1O1 (14%)
	1394	1399	1399	1400	1398	C4OH (26%) + HC4O4 (26%)
	1389	1389	1388	1388	1389	HC1O5 (27%) + C2C1H (26%) + C2OH (11%)
	1366	1369	1369	1369	1370	C3C4H (25%) + C4C5H (10%)
1360	1358	1358	1357	1357	1357	HC4O4 (23%) + C4OH (21%)
	1348	1355	1355	1355	1356	C4C5H (17%) + C6C5H (15%) + C4OH (14%)
1330	1327	1330	1330	1329	1330	HC2O2 (25%) + C3C2H (20%) + C2C3H (16%) + HC3O3 (10%)
	1311	1310	1310	1310	1314	HC2O2 (20%) + C2C3H (14%)
1305		1305	1307	1305	1307	C6OH (30%) + CH <sub>2</sub> WA (16%)
		1283	1283	1283	1283	C6OH (42%) + C5C4H (18%) + C3C4H (14%)

		1262	1258	1262	1258	CH <sub>2</sub> WA (23%) + C1C2H (11%)
1260	1258	1258	1255	1258	1256	CH <sub>2</sub> WA (14%) + C5C6 (11%)
	1244	1241	1238	1242	1238	C3OH (36%) + C4C3H (21%)
1217	1218	1223	1222	1222	1221	CH <sub>2</sub> TW (25%) + C3OH (8%)
1200	1200	1199	1197	1200	1199	C3OH (16%) + C3C2H (8%) + C1O1C7 (8%)
		1178	1176	1177	1178	C5C6 (18%) + CH <sub>2</sub> TW (10%)
1145	1146	1148	1151	1150	1150	C1O1(24%) +SDCH <sub>3</sub> (12%) + C1C2 (10%)
	1133	1136	1139	1139	1138	CH <sub>2</sub> TW (30%) +C4C5 (12%)
1121	1118	1114	1115	1113	1112	C3C4 (12%) + C3OH (12%)+ C2C3 (10%)
1099	1103	1093	1093	1093	1094	C5O5 (26%) + C4O4 (9%) + CH <sub>2</sub> TW (9%)
1065	1070	1067	1067	1066	1067	C4O4 (21%) + C3C4 (14%) + C2C3 (11%)
		1059	1059	1060	1059	C6O6 (22%) + DRCH <sub>3</sub> (14%)
1052	1055	1055	1056	1055	1055	SDCH <sub>3</sub> (18%) + DRCH <sub>3</sub> (15%) + DDCH <sub>3</sub> (9%)
	1040	1042	1039	1041	1040	C7O1 (44%) + C3O3 (12%) + C1O1 (9%)
1028	1028	1027	1027	1027	1027	C3O3 (20%) +C1O1 (14%)
		1004	1002	1002	1005	C1O5 (14%) + C1O1 (12%) +C7O1 (11%)
973	972	967	968	968	968	C6O6 (15%)+ C5C6 (10%) + C1O5 (10%)+ C3O3 (10%)
913	916	920	924	923	921	C2O2 (24%) + C5C6 (9%)+ C1O1 (8%)
889	889	889	887	886	890	C1O5 (22%) + C2O2 (20%)
845	847	836	837	837	836	CH <sub>2</sub> RO (60%) + To C6O6 (18%)
817	816	813	813	813	813	C2C1O5 (17%) +C1O5C5 (8%)+ C1O1C7 (7%)
	723	723	726	723	725	C1O1C7 (23%) + O5C1O1 (18%)
666	667	668	661	661	672	To C6O6 (56%) +To C4O4 (11%)
	641	642	638	640	640	C3C2O2 (28%) + C2C3O3 (9%) + C2C3C4 (8%)
609	609	610	614	621	604	C4C3O3 (14%) + CH <sub>2</sub> CCC (12%) + To C4O4 (10%)
	578	578	582	576	577	To C4O4 (64%) + To C6O6 (12%)
		526	518	524	522	To C3O3 (48%) + C4C5C6 (9%)
513	515	513	516	512	518	To C3O3 (38%) + C4C5C6 (10%)
	486	486	491	494	494	To C2O2 (25%) + C4C3O3 (14%) + C5C4O4(12%)
479		482	478	478	481	To C2O2 (63%) + C4C3O3 (8%)
452	456	452	439	442	445	C3C4O4 (19%) + CH <sub>2</sub> CCC (12%)
421	424	428	428	428	427	C1C2O2 (11%) + C2C3C4 (8%) + C5C4O4 (7%) + C2C3O3 (7%)
	412	410	412	413	410	C1O1C7 (19%) + O5C1O1 (10%) + C2C1O5 (8%)
384		382	376	368	377	C1C2O2 (21%) + C5C4O4 (10%) + C2C1O1 (8%)
348		352	354	349	349	To C7O1 (34%) + C3C4O4 (16%)
	339	337	339			To C7O1 (46%)+ C3C4O4 (16%)

329	325	321	322	325	323	C2C3O3 (17%) + C3C2O2 (16%) + C1C2O2 (14%)
				312	317	C5C4O4 (25%) + C4C3O3 (10%) + C3C4O4 (8%)
	286	286	286	292	295	C6C5O5 (27%) + To C5C6 (21%) + C4C5C6 (15%)
256	257	264	259	259	259	To C1O1 (24%) + C5C6O6 (18%)
		234	232	241	236	C2C1O1 (17%) + To C1O1(13%) + C3C2O2 (10%)
220	215		221	221	212	To C1O1 (30%) + To C1C2 (9%)
	205	208	207	203		To C5O1 (37%)
	190				193	To C1O1 (25%) + C2C1O1 (10%)
184		178	182	176	177	To C5C6 (37%) + RC (20%)
	164	163	163			To C1O1 (29%) + To C5C6 (13%) + To C1O5 (10%)
	156	156	153	150	146	To C3C4 (16%) + To C2C3 (16%) + To C4C5 (10%)
141					138	RC (13%) + To C5O5 (10%)
130	130		132			To C4C5 (34%) + To C1O5 (13%) + C4C5C6 (10%)
116	122	121				To C2C3 (12%) + To C5C6 (11%) + To C5O5 (10%) + To C3C4 (8%)
	106		110	113	113	RA (19%) + To C5C6 (18%) + TY (15%)
	103	103				RC (51%) + To C5C6 (16%)
96			94	91	90	RC (29%) + RA (18%) + RB (13%)
				90		TZ (32%) + RA (27%)
82		82	79	82	81	TY (39%) + RC (13%)
72		72	70	70	72	TZ (67%)
56		61	61	61	65	RB (55%) + RC (16%)
51		57	56			RA (53%) + TY (19%)
45		46	49			RB (29%) + TY (26%) + TZ (25%)

TX, TY, TZ correspondent aux translations de la molécule le long respectivement des axes X, Y, Z.

RA, RB, RC correspondent aux rotations de la molécule autour des axes principaux d'inertie.

To = torsion

Pour le groupement CH<sub>2</sub>: VS = élongation symétrique, AS = élongation antisymétrique

SCI = cisaillement, WA = balancement, Ro = rotation, TW = torsion,

Tableau 12: Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de vibrations de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine

Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	A	B	
3458	3465	3462	3462	O4H (100%)
3392	3385	3393	3393	O1H (100%)
	3360	3373	3373	O6H (100%)
3326	3327	3328	3335	O3H (100%)
		3262	3262	N2H (99%)
2994		2983	2983	DS'CH <sub>3</sub> (76%) + DSCH <sub>3</sub> (23%)
2938	2940	2974	2974	DSCH <sub>3</sub> (76%) + DS'CH <sub>3</sub> (23%)
	2931	2936	2936	C1H (100%)
2912	2910	2914	2914	TSCH <sub>3</sub> (98%)
2894	2895	2888	2888	C3H (72%) + C4H (20%)
		2880	2880	C5H (42%) + C4H (38%) + C3H (12%)
		2877	2876	C5H (56%) + C4H (26%) + C2H (13%)
		2872	2872	C2H (72%) + C3H (14%)
		2866	2866	ASCH <sub>2</sub> (91%)
2830		2833	2832	SSCH <sub>2</sub> (96%)
1628	1628	1626	1626	C7=O (60%) + C7N2 (15%)
	1558	1552	1554	C7N2H (46%) + C2N2H (33%)
1473	1474	1471	1472	CH <sub>2</sub> SCI (96%)
		1448	1448	HC2N (20%) + DD'CH <sub>3</sub> (18%)
		1442	1442	DDCH <sub>3</sub> (26%) + DD'CH <sub>3</sub> (15%) + HC2N (10%)
1431	1429	1434	1434	DDCH <sub>3</sub> (47%) + DD'CH <sub>3</sub> (41%)
		1423	1423	C <sub>6</sub> O <sub>6</sub> H (55%) + CH <sub>2</sub> WA (26%)
		1412	1410	C3OH (55%) + C4OH (7%)
	1390	1390	1388	C4OH (33%) + C3OH (12%)
1379	1377	1379	1380	C1OH (22%) + C2C1H (20%) + C4OH (16%)
		1375	1374	SDCH <sub>3</sub> (89%)
1360		1362	1362	HC1O1 (18%) + HC1O5 (14%) + C6C5H (10%) + HC2N (8%)
1349	1348	1351	1350	C6C5H (22%) + HC1O5 (16%) + HC1O1 (7%)

1330	1330	1328	1329	C1C2H (23%) + C3C2H (13%) + C2C3 (5%) + C1C2 (8%)
1321	1322	1319	1318	C2NH (17%) + C7C8 (16%) + C7N2 (14%) + C7NH (12%)
1291	1290	1294	1294	C3C4 (15%) + C3C4H (13%) + HC4O4 (11%) + C4C3H (9%)
1278		1277	1277	HC5O5 (12%) + C3C4H (9%) + CH <sub>2</sub> WA (9%) + CH <sub>2</sub> TW (9%)
		1265	1265	CH <sub>2</sub> WA (22%) + C4C5H (15%) + C6OH (8%)
1256		1255	1255	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H (28%)+ HC3O3 (22%)
		1252	1252	HC4O4 (26%) + C3C4H (15%) + C4C3H (14%)
		1224	1224	C1OH (32%) + C2C1H (23%) + HC1O1 (12%) + C3C2H (12%)
		1214	1212	C5C4H (24%) + HC5O5 (14%) + C4C5H (11%)
1206		1200	1202	C5C4H (16%) + CH <sub>2</sub> TW (13%)
		1187	1187	C2N2 (21%) + CH <sub>2</sub> TW (13%)
1151	1150	1156	1157	C1O5 (18%) + C1O1 (14%)+ C5C6 (7%)
1136	1137	1140	1140	C1C2 (17%) + C2C3 (10%) + C1OH (9%) + C5C6 (8%)
1125	1126	1122	1122	C1O5 (10%) + C2O3 (11%) + C3O3 (10%)
1105	1106	1108	1108	C3C4 (23%) + C3O3 (18%) + C4O4 (6%) + C5O5 (5%)
1089	1089	1088	1087	C1C2 (15%) + C3O3 (13%) + C1O5 (9%) + C4C5 (8%)
	1058	1061	1061	C5O5 (19%) + C6O6 (19%) + C4O4 (11%) + C3C4 (8%)
1036	1041	1045	1045	C4C5 (14%) + C2C3 (9%) + C6O6 (8%) + C1O5 (7%)
1028		1029	1028	DRCH <sub>3</sub> (54%) + DR'CH <sub>3</sub> (20%) + W C7=O (9%)
1018		1017	1018	C6O6 (26%) + C5O5 (14%) + C5C6 (10%)
1001	1001	999	999	DR'CH <sub>3</sub> (50%) + DRCH <sub>3</sub> (50%)
	970	977	977	C4O4 (28%) + C3C4 (15%) + C3O3 (15%)
		960	959	C4C5 (13%) + C2C3 (10%) + C4O4 (8%) + C6O6 (7%)
928		931	930	C2N2C7 (21%) + C7N2 (20%) + C7C8 (16%)
914		900	900	C1O1 (22%) + C1C2 (9%) + C4C5 (7%)
864	868	868	867	CH <sub>2</sub> RO (63%)
789		785	784	C5C6 (15%) + C2C1O5 (13%)+ C5O5 (12%)
730	730	737	742	To C3O3 (89%)
699		695	695	To C1O1 (82%)
		656	656	To C4O4 (50%) + DF C=O (9%)
		651	652	To C4O4 (30%) + DF C=O (26%) + C2N2C7 (7%)
628		627	628	WC=O (68%)+ DRCH <sub>3</sub> (7%)
618		622	622	DFC7=O (15%) + C2C1O (11%) + CH <sub>2</sub> CCC (11%)
577	578	576	576	To C2N2 (42%) + To C7N2 (38%)
552	555	555	557	To C2N2 (14%) + To C7N2 (14%) + C2C1O1 (13%)
528	528	528	525	To C6O6 (40%)
511		514	512	O5C1O1 (24%) + To C6O6 (11%) + C2C1O5 (8%)



481		484	478	To C6O6 + C3C4O4 (18%) + CH2CCC(18%)
463		460	458	C4C3O3 (14%) + To C6O6 (10%) + C5C4O4 (6%)
416		426	423	C4C5O5 (14%) + O5C1O1 (8%) + C5C4O4 (9%)
382		385	380	C3C4C5 (16%) + C2C3C4 (13%) + C5C4O4 (11%)
338	340	333	343	C2C3O3 (21%) + C3C4C5 (7%)
325		320	323	C4C3O3 (21%) + C5C4O4 (21%) + C3C4O4 (11%)
299		303	303	DFCCN (18%) + C6C5O5 (7%) + C1C2C2 (6%)
286		286		C1C2N (20%) + C3C2N (19%) + C2NC7 (10%) + C2C3O3 (7%)
		276	276	C6C5C4 (15%) + C3C2N (14%) + C6C5O5 (10%)
266			272	C3C2N (35%) + C1C2N (13%)
246		246	247	C2NC7 (21%) + C1C2N (16%) + C6C5O5 (10%)
		231	236	C3C4O4 (13 %) + CH2 CCC (12%) + C5C4O4 (9%)
195		195	194	To C7C8 (54%) + C2NC7 (7%)
181		177		To C7C8 (39%) + C2NC7 (14%)
175			174	To C2N (30%) + To C7N (21%)
171			170	C2NC7 (11%) + C4C5C6 (9%) + To C1O5 (8%) + To C1C2 (7%)
		162		C6C5C4 (14%) + C1O5C5 (13%) + To C1O1 (8%)
137		138	137	To C2NC7 (11%) + To C2N2 (12%) + C2N2C7 (12%)
115		119		To C5C6 (22%) + To C3O3 (11%) + To C7C8 (7%)
108			109	To C5C6 (48%) + To C3C4 (9%)
101		103	102	To C3C4 (14%) + TX (12%) + To C3O3 (10%) + To C4C5 (9%)
89		93	92	RC (24%) + TX (16%) + To C3O3 (10%) + TZ (6%)
81		79	83	C2N (22%) + To C2C3 (10%) + To C1C2 (10%) + RA (7%)
76		77		To C5C6 (44%) + To C2N2 (11%) + TX (7%)
72		69	73	RC (50%) + RA (10%) + To C5C6 (6%)
64		67		TZ (43%) + RC (34%)
57			59	RA (45%) + TZ (19%) + To C2N2 (19%)
44		47		RA (44%) + TZ (19%) + To C2N (19%)
35			37	TY (60%) + RB (19%)
27		31	29	RB (54%) + TX (19%) + To C2N (16%)

Les abréviations TX, TY, TZ, RA, RB, RC, To, et celles concernant le groupement CH2 sont les mêmes que pour le mannose.  
 Pour le groupement CH3: TS = élongation symétrique, DS, DS' élongations dégénérées  
 DR, DR' = rotation dégénérées, DD, DD' = déformations angulaires dégénérées, SD = déformation angulaire symétrique  
 W mouvement angulaire hors du plan, DF mouvement angulaire dans le plan.

Tableau 13: Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de l'acide alpha muramique

Fréquences observées		Fréquences calculées				Attributions
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	Distribution de l'énergie potentielle en%
3316	3492	3707	3707	3707	3707	OH H <sub>2</sub> O (99%)
		3640	3640	3640	3640	OH H <sub>2</sub> O (99%)
	3319	3495	3495	3495	3495	O4H (99%)
		3351	3351	3351	3351	O1H (99%)
		3318	3318	3318	3318	O6H (99%)
		3216	3216	3216	3216	NH (99%)
		3077	3077	3077	3077	DS'CH <sub>3</sub> (94%)
		3066	3066	3066	3066	DSCH <sub>3</sub> (94%)
		3063	3063	3063	3063	DSCH <sub>3</sub> * (98%)
		3058	3058	3058	3058	DSCH <sub>3</sub> * (88%) + DS'CH <sub>3</sub> (10%)
		3026	3026	3026	3026	C1H (99%)
		3003	3003	3003	3003	O11H (99%)
		3002	3002	3002	3002	TSCH <sub>3</sub> (98%)
		2985	2985	2994	2996	2996
2968	2968	2959	2959	2959	C3H (93%)	
2937	2930	2935	2935	2935	2935	C4H (67%) + C5H (22%)
		2933	2933	2933	2933	C9H (94%)
	2921	2921	2921	2921	C5H (65%) + C4H (24%)	
	2914	2914	2914	2914	ASCH <sub>2</sub> (85%) + SSCH <sub>2</sub> (28%) + C5H10 (10%)	
2895	2890	2897	2897	2897	C2H (98%)	
2876	2870	2868	2868	2868	SSCH <sub>2</sub> (67%) + ASCH <sub>2</sub> (32%)	
1704	1702	1702	1702	1702	1702	C11=O (68%)
	1637	1639	1639	1639	1639	HOH H <sub>2</sub> O (68%)
	1605	1601	1602	1602	1602	C7O7 (44%) + C2N7 (30%)
	1590	1588	1588	1588	1588	1588
1554		1556	1556	1556	1555	C2NH (45%) + N2C7O7 (36%)
1506		1506	1506	1506	1506	HC105 (46%) + HC101 (23%)
1450	1465	1465	1465	1465	1465	HC9O3 (31%) + HC3O3 (28%)
	1451	1451	1450	1450	1450	HC3O3 (26%) + HC9O3 (21%) + C4C3H (11%)
	1440	1440	1437	1440	1437	CH <sub>3</sub> DR* (52%) + CH <sub>3</sub> SD* (19%) + DFC11=O (11%)

	1438	1437	1437	1436	1433	C6OH (93%)
		1432	1432	1433	1432	DFC11=O (17%) + CH <sub>3</sub> DD* (12%) + CH <sub>3</sub> SD* (11%) + DFC7=O (11%)
		1431	1431	1431	1431	CH <sub>3</sub> DD' (14%) + DFC7=O (14%) + DF C11=O (13%) + CH <sub>3</sub> DD'* (11%)
		1426	1425	1425	1426	C10H (35%) + HC101 (17%) + C2C1H (12%)
		1423	1422	1423	1422	CH <sub>3</sub> DD'* (34%) + CH <sub>3</sub> SD* (32%)
	1418	1417	1417	1417	1417	CH <sub>3</sub> SD (58%) + CH <sub>3</sub> DR (30%)
		1409	1408	1408	1408	C10H (16%) + HC2N2 (14%) + C2NH (12%) + C2N2 (11%)
1396		1395	1395	1395	1395	CH <sub>3</sub> DR' (14%) + C9C11 (12%) +DFC9C11O12 (12%)
		1393	1392	1392	1393	C4C5H (16%) + C2C1H (12%)
	1390	1388	1387	1387	1388	C4C5H (21%) + C2C1H (14%) + C6C5H (11%) + C10H (10%)
	1376	1371	1371	1371	1371	HC4O4 (45%) + C3C4H (8%) + C4OH (7%)
1350		1351	1351	1351	1351	C11C9H (33%) + C10C9H (20%)
		1346	1347	1347	1346	HC5O5 (18%) + C5C4H (12%)
		1342	1343	1343	1342	CH <sub>3</sub> DD' (24%) + CH <sub>3</sub> DR* (20%)
	1339	1339	1339	1339	1339	C3C2H (12%) + C2C3H (10%)+HC5O5 (9%) + C6C5H (8%)
		1331	1331	1331	1331	C2C3H (28%) + C4C3H (18%) + HC2N (11%)
1314		1320	1314	1314	1315	C3C4H (22%) + C5C4H (15%)
		1303	1303	1303	1303	N2C7 (23%) + C2N2 (13%) + C2NH (8%) + C7NH (8%)
		1286	1284	1286	1284	CH <sub>2</sub> TW (36%) + CH <sub>2</sub> WA (26%)
	1254	1252	1251	1251	1252	CH <sub>3</sub> DR' (46%) + C11O12 (20%) + DFCCO12(12%) +C3C4 (10%)
1233		1233	1236	1233	1236	C4OH (70%) + HC4O4 (8%)
		1195	1194	1195	1195	CH <sub>2</sub> WA (40%) + CH <sub>2</sub> SCI (8%) + CH <sub>2</sub> TW (7%)
		1186	1186	1185	1185	C2N2 (23%) + CH <sub>2</sub> WA (12%) + HC2N2 (7%)+ C7C8 (7%)
		1173	1173	1173	1173	C2C3 (20%) + C1C2 (8%)
1154	1151	1155	1154	1155	1154	C5C6 (20%) + C2C3 (9%) + C6O6 (9%)
1128	1128	1127	1128	1128	1128	C101 (13%) + C105 (8%) + C9O3 (7%)
1117	1118	1119	1117	1117	1117	C9O3 (28%) + C9C10 (16%)
		1108	1109	1108	1109	C1C2 (16%) + C4C5 (11%) + C4O4 (7%) + C9C10 (9%)
1102	1099	1101	1102	1102	1102	C105 (17%) + C101 (9%) + C9C10(8%) + C9O3 (7%)
		1084	1084	1084	1084	C3O3 (21%) + C3C4 (13%) + C105 (8%)
		1059	1059	1059	1059	C3C4 (20%) + C4O4 (11%) +
		1054	1054	1054	1054	C6O6 (18%) + C4O4 (16%) + C5O5 (7%)
1046	1042	1042	1042	1042	1042	CH <sub>3</sub> DD'* (27%) + DFC11=O (15%)

	1026	1024	1024	1024	1024	C5O5 (16%) + C6O6 (11%)
1020		1016	1016	1016	1016	C3O3 (21%) + C4O4 (13%) + C3C4 (12%)
		1002	1003	1002	1003	CH <sub>3</sub> DD (42%) + WC7=O (26%) + CH <sub>3</sub> DD' (16%)
		971	970	971	970	C6O6 (20%) + C5C6 (12%)
956	956	957	957	957	957	DFC7=O (45%) + CH <sub>3</sub> DR (22%)
930	926	925	926	926	926	CH <sub>3</sub> DD* (15%) + C9O3 (11%)
916		911	911	911	911	C7N2H (17%) + C7C8 (14%) + C7N2 (11%)
	902	895	896	895	895	C9O3 (14%) + C1O1 (11%) + CH <sub>3</sub> DD* (9%)
872	865	864	865	865	864	C9C11 (19%) + C11O12 (12%) + DFC11=O (10%)
835	835	830	831	830	830	CH <sub>2</sub> RO (64%) + To C6O6 (12%)
770	772	778	778	778	778	C1O1 (12%) + C2C1O1 (9%) + C2C1O5 (7%) + C1C2C3 (7%)
746	748	749	751	751	749	DF CCO12 (32%) + C11O12 (15%) + ToC3O3 (13%) + C10C9O3 (11%)
731	733	730	729	729	730	To C1O1 (49%) + W C7=O (11%)
706	705	699	699	699	699	To C6O6 (14%) + C2C1O1 (13%)
	667	668	668	668	668	To C6O6 (21%) + To C1O1 (13%) + W C7=O (10%)
651	656	651	651	651	651	To C4O4 (77%)
		648	647	647	648	W C7=O (41%) + To C6O6 (40%)
		630	630	630	630	C7N2H (17%) + DF C8C7N (9%) +
	617	620	620	620	620	C6O6 (15%) + C3O3C9 (10%) + C11C9O3 (8%)
586	584	586	586	585	587	To C11O12 (33%) + W C11=O (16%) + C10C9C11 (11%)
		579	580	579	580	C11C9O3 (13%) + C2C3O3 (8%) + C4C3O3 (7%)
	555	556	558	558	556	To C11O12 (21%) + DF C8C7N (8%) + C3O3C9 (7%)
541	541	546	546	546	547	O5C1O1 (11%) + C4C3O3 (6%) + C2C1O5 (6%)
	528	524	523	524	524	To N2C7 (21%) + To C2N2 (15%) + N2C7O7 (11%) + C2NH (11%)
502	498	506	506	506	505	To N2C7 (32%) + To C2N2 (21%) + C2NH (10%)
487		491	492	492	490	CH <sub>2</sub> CCC (15%) + O5C1O1 (9%) + To C11O12 (7%) + W C11O11 (7%)
459	464	467	467	467	467	C8C7O7 (9%) + C8C7N2 (7%) + C4C5O5 (7%)
	440	449	452	451	450	C5C4O4 (15%) + To C3O3 (8%) + C2C1O5 (7%)
	420	416	412	411	411	To C3O3 (42%) + C11C9O3 (17%)
	380	378	378	380	377	C5C4O4 (9%) + To C3O3 (8%) + C9C11O12 (6%)
367		347	346	345	348	N2C7C8 (20%) + C5C4O4 (11%)
335	337	332	339	333	338	To C9C11 (66%) + To C3O3 (10%)
318		317	315	315	316	To C5C6 (29%) + C1C2N (10%) + C6C5O5 (9%) + C6C5C4 (7%)
	300	304	305	303	307	C10C9O3 (12%) + To C6C5 (11%) + C1C2CN2 (10%) + C3C4O4 (9%)
291		295	296	297	295	C1C2N (13%) + W C11O11 (13%) + To C6C5 (8%) + C3C4O4 (8%)
		283	286	284	283	C11C9O3 (9%) + C1C2N2 (8%) + C2C3C4 (8%) + W C11O11 (8%)
	279	281	281	280	280	W C11O11 (11%) + To C6C5 (9%) + C2N2C7 (7%)

	260	266	259	265	261	C5C6O6 (14%) + C3C4O4 (9%) + To C4C5 (9%) + C2N2C7 (7%)
		253	251	255	251	C3C2N2 (8%) + C6C5O5 (8%) + C10C9O3 (8%)
	250	250	248	251	246	C2N2C7 (15%) + To C7C8 (13%) + C10C9C11 (7%)
		243		247		To C7C8 (40%)
233		235	228	235	230	To C5C6 (18%) + C2N2C7 (15%) + To C8C7 (14%) + C5C4O4 (8%)
203		198	200		199	To C3O3 (14%) + To C2C3 (11%) + To C3C4 (10%)
	194			195	194	To C6C5 (21%) + To C3C4 (15%) + To C2C3 (14%)
		180		179		To C6O6 (32%) + To C1O5 (32%)
	164	159	158	160		To C3O3 (29%) + To C9O3 (7%) +
			150		155	To C9O3 (14%) + C2C3O3 (10%) + To C9C11 (7%) + To C2N2 (7%)
139				140	138	To C9O3 (14%) + C2C3O3 (11%) + To C2N2 (7%)
132		134	134			To C9O3 (12%) + C2N2C7 (11%)
127		129		127	125	To C3O3 (28%) + To C7C8 (7%)
			124	120		To C7C8 (27%) + C7NH (12%) + C2NH (9%)
112		114	117		113	To C7C8 (17%) + To C9C11 (12%) + To C2C3 (10%) + C2N2C7 (8%)
108		105		108		RB (19%) + To C3O3 (10%) + To C7C8 (10%) + To C9C11 (9%)
			100		100	To C9C11 (29%) + C7N2 (23%) + To C2N2 (17%)
93		93	98	98		RB (13%) + C2N2C7 (11%) + C3C2N2 (8%)
		91		91	90	TZ (31%) + To C2N2 (21%) + To C7N2 (13%)
87		88	88	86	86	To C3O3 (33%) + To C9C11 (14%) + To C2N2 (13%)
79		79	79	79	83	To C9C11 (21%) + RB (18%) + TZ (15%)
67		67	72		68	TZ (47%) + C9O3 (12%)
59		61	60	62		RZ (40%) + RX (23%)
				55	57	TZ (64%)
47		48		46	49	RY (45%) + RX (23%) + RZ (18%)
36		38		35		TX (60%) + RZ (14%)
33			32			TY (48%) + RZ (20%) + RY (17%)
27		28		26		RZ (60%) + TX (10%)
24			22			TX (70%)

Les abréviations utilisées sont les mêmes que pour la N-acétyl-glucosamine.

Tableau 14. Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de vibrations de l'acide neuraminique

Fréquences observées		Fréquences calculées		attributions
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	A	B	
		3765	3765	OH H <sub>2</sub> O (92%)
		3759	3759	OH H <sub>2</sub> O (92%)
		3664	3664	OH H <sub>2</sub> O (99%)
		3642	3642	OH H <sub>2</sub> O (99%)
	3387	3378	3378	O10H (95%)
		3373	3373	O9H (97%)
		3358	3358	O2H (57%) + O11H (92%)
		3356	3356	O4H (94%)
3340	3338	3350	3350	O11H (57%) + O2H (43%)
	3225	3243	3243	N5H (100%)
		3055	3055	DSCH <sub>3</sub> (78%) + DSCH <sub>3</sub> (22%)
		3052	3052	DS'CH <sub>3</sub> (78%) + DD'CH <sub>3</sub> (22%)
3003		3021	3021	O1H (100%)
2982		2987	2987	TSCH <sub>3</sub> (100%)
2952		2972	2972	C10H (100%)
2930		2942	2942	C6H (100%)
	2919	2924	2916	C4H (97%)
2915		2916	2913	VSCH <sub>2</sub> (98%)
		2909	2909	C9H (92%)
		2891	2891	C5H (94%)
2849		2844	2844	C3H1 (99%)
		2837	2836	VSCH <sub>2</sub> (99%)
		2808	2808	C3H2 (99%)
1725	1726	1721	1721	C1=O (65%) + C2C1 (8%)
		1663	1663	HOH <sub>H2O</sub> (97%)
1656	1656	1657	1657	HOH <sub>H2O</sub> (98%)
	1620	1627	1626	C7=O (60%) + N2C7 (16%)
		1552	1552	C7NH (27%) + C5NH (17%) + C5N (14%) + C7N (12%)+ HC5N5 (11%)

		1547	1547	$\text{CH}_2\text{SCI}$ (57%) + $\text{CH}_2\text{WA}$ (34%)
	1530	1532	1532	$\text{C2C3H}$ (37%) + $\text{HC3H}$ (27%) + $\text{C3C2H}$ (9%)
		1517	1517	$\text{HC3H}$ (43%) + $\text{C4C3H1}$ (36%) + $\text{C4C3H2}$ (9%)
	1496	1497	1497	$\text{HC4O4}$ (51%) + $\text{C3C4H}$ (11%) + $\text{C5C4H}$ (7%)
	1481	1485	1486	$\text{HC6O6}$ (54%) + $\text{C5C4H}$ (8%) + $\text{C9C6H}$ (7%)
1460	1464	1455	1455	$\text{DDCH}_3$ (50%) + $\text{DRCH}_3$ (33%) + $\text{DD}'\text{CH}_3$ (7%)
1450		1450	1450	$\text{HC5N5}$ (30%) + $\text{DDCH}_3$ (17%) + $\text{DRCH}_3$ (9%)
	1439	1432	1432	$\text{HC5N5}$ (24%) + $\text{DRCH}_3$ (20%) + $\text{DDCH}_3$ (9%)
1412		1405	1405	$\text{C1C2}$ (13%) + $\text{C1O1}$ (10%) + $\text{C5C6H}$ (8%) + $\text{C9C6H}$ (7%) + $\text{DFC1=O}$ (6%)
		1397	1397	$\text{C11C10H}$ (13%) + $\text{HC10O10}$ (12%) + $\text{CH}_2\text{WA}$ (11%) + $\text{CH}_2\text{SCI}$ (10%)
		1385	1385	$\text{C4OH}$ (21%) + $\text{C9C10H}$ (9%) + $\text{C11C10H}$ (8%) + $\text{C5C6H}$ (8%)
	1381	1384	1384	$\text{C9C10H}$ (17%) + $\text{C4OH}$ (16%) + $\text{C11C10H}$ (15%)
1375	1374	1376	1376	$\text{C4OH}$ (19%) + $\text{C6C9H}$ (13%) + $\text{C5C6H}$ (9%) + $\text{CH}_2\text{WA}$ (7%)
		1371	1371	$\text{C5C4H}$ (30%) + $\text{C3C4H}$ (28%) + $\text{C10O10H}$ (6%)
		1370	1370	$\text{C11OH}$ (23%) + $\text{CH}_2\text{WA}$ (9%) + $\text{CH}_2\text{TW}$ (9%) + $\text{C2OH}$ (9%)
	1361	1364	1364	$\text{C11OH}$ (53%) + $\text{C10OH}$ (9%)
1343	1342	1341	1341	$\text{HC9O9}$ (25%) + $\text{C6C5H}$ (10%) + $\text{C11C10H}$ (10%) + $\text{HC10O10}$ (8%)
1321	1321	1322	1322	$\text{C6C5H}$ (21%) + $\text{C4C3H}$ (17%) + $\text{C2OH}$ (12%)
	1312	1312	1313	$\text{C2OH}$ (26%) + $\text{C6C9H}$ (8%)
		1305	1305	$\text{C7N5}$ (15%) + $\text{DSCH}_3$ (9%) + $\text{DFNH}$ (9%) + $\text{DFC7=O}$ (8%)
1303	1301	1302	1302	$\text{C10OH}$ (28%) + $\text{C9C10H}$ (22%) + $\text{HC10O10}$ (20%)
		1282	1282	$\text{C10C9H}$ (39%) + $\text{C6C9H}$ (30%)
	1264	1261	1261	$\text{CH}_2\text{TW}$ (70%)
1259		1260	1260	$\text{DSCH}_3$ (59%) + $\text{C7C8}$ (15%)
1237	1239	1249	1249	$\text{C2C3H1}$ (21%) + $\text{C4C3H1}$ (17%) + $\text{C2C3H2}$ (12%) + $\text{C4C3H2}$ (11%)
	1231	1229	1229	$\text{C1OH}$ (48%) + $\text{C7=O}$ (13%) + $\text{C1C2}$ (10%)
1218	1214	1215	1215	$\text{C9OH}$ (70%)
	1194	1194	1194	$\text{C5N5}$ (21%) + $\text{HC5N5}$ (7%) + $\text{C4C5C6}$ (6%) + $\text{C6C5}$ (6%)
		1172	1172	$\text{C4C3H}$ (12%) + $\text{C2C3}$ (11%) + $\text{C3C2O6}$ (7%) + $\text{C3C4}$ (6%) + $\text{C6C9}$ (5%)
		1160	1160	$\text{C2O2}$ (16%) + $\text{C2C3}$ (15%) + $\text{C6C9}$ (6%) + $\text{O6C2O2}$ (6%) + $\text{C4C3H}$ (6%)
1148	1151	1149	1149	$\text{C2O6}$ (11%) + $\text{C6O9}$ (9%) + $\text{C4C5}$ (6%) + $\text{C5C4}$ (5%) + $\text{C2C3}$ (5%)
	1125	1123	1124	$\text{C10C11}$ (11%) + $\text{C2OH}$ (8%) + $\text{C2O2}$ (7%) + $\text{C5N5}$ (6%) + $\text{C6O6}$ (5%)
1114	1114	1112	1112	$\text{C5C6}$ (21%) + $\text{C9C10}$ (7%) + $\text{C6C9C10}$ (5%)
	1107	1106	1106	$\text{C9C10}$ (18%) + $\text{C10C11}$ (12%) + $\text{C3C4}$ (9%) + $\text{C2O6}$ (6%)
1094	1096	1090	1090	$\text{C6O6}$ (20%) + $\text{C3C4}$ (14%) + $\text{C10C11}$ (7%) + $\text{C6C9}$ (6%)
1073	1071	1073	1073	$\text{C10O10}$ (15%) + $\text{C9C10}$ (11%) + $\text{C4O4}$ (10%) + $\text{C3C4}$ (8%)



	1050	1058	1058	C4C5 (14%) + C2O6 (11%) + C11O11 (8%) + C4O4 (6%)
		1038	1038	C11O11 (16%)+ C9O9 (12%) + C6O6 (9%)+ C10O10 (6%)
1029	1027	1029	1029	C11O11 (37%) + C9C10 (14%) + C4O4 (8%) + C6O6 (6%)
		1010	1010	C10O11 (18%) + CH2RO (7%) + C11O11 (6%)
1001	1000	999	999	DD'CH <sub>3</sub> (32%) + DRCH <sub>3</sub> (20%) + WC7=O (12%) + W N5H (9%)
	985	990	990	C4O4 (32%) + C2O2 (7%)
947	947	950	950	DR'CH <sub>3</sub> (48%) + DD'CH (20%)
		941	941	C2C3H1 (10%) + C4C3H1 (7%) + C2C3H2 (6%) + C5NC7 (6%)
	926	922	922	C9O9 (25%) + C6O9 (12%)
900	901	905	905	C7C8 (29%) + C7N5 (13%) +C7=O (6%)
	888	891	891	W N5H (45%) + To C5N (19%) + To C7N (18%)
883		888	888	C10O10 (28%) + CH <sub>2</sub> RO (15%)
849	848	852	852	C2O2 (21%) + C2O6 (13%) + C2C3 (10%) + C9C6O6 (8%)
777	777	778	778	DF C1=O (36%) + C1O1 (21%)
726	702	703	703	C9C6O6 (14%) + C6C9O9 (12%) + C1C2O6 (11%)
	669	665	667	To C1O1 (17%) +DF C7=O (11%) +DF C5NC7 (9%)
657	657	658	658	To C1O1 (47%) + To C10O10 (8%)
		641	642	To C10O11 (50%) +W C7=O (11%)
		635	635	W C7=O (30%) + ToC10O10 (17%) +To C1O6 (6%)
	618	626	619	To C2O2 (50%) +W C7=O (8%)
		612	610	To C2O2 (16%) +DFC7=O (7%) + C5C6C9 (7%)
		603	608	To C2O2 (23%) + DF C7=O (6%)
594	589	587	586	To C2O2 (7%) + C6C9C10 (6%) + To C4O4 (6%) + C11C10O10(6%)
568		561	563	To C4O4 (74%)
544	544	543	544	C2O2 (11%) + DF C2C1O (10%) + C3C2O6 (8%)
		531	529	C10C9O9 (15%) +C3C4C5 (7%) + C5C4O4 (6%) + C11C10O10 (5%)
510		516	514	To C11O11 (21%) + C3C2O2 (12%) + O6C2O2 (11%)
		499	504	To C11O11 (54%) +To C2O2 (7%)
471	469	471	474	C9C10H (13%) + C4C5C6 (6%) + C3C4C5 (6%) + C5NC7 (6%)
		465	464	C11C10O10 (22%) + W C1=O (10%)
449		450	450	W C1=O (12%) + To C2O6 (7%) + O6C2O2 (7%)
		441	443	C3C2O2 (10%) + To C9O9 (9%) + C2C1O1 (8%)
427		427	424	To C9O9 (62%)
		420	422	C9C10H (14%)+ To C6C9 (8%)
		399	400	C2C1 (8%)+ C10C9O9 (7%)+ O6C2O2 (6%)
388	386	384	384	C6C5N5 (20%)+ C3C4O4 (12%) +To C6C9 (6%)
346	344	344	346	C1C2O1 (23%) + DF C2C1O (16%)

	320	318	321	CH <sub>2</sub> CCC (32%) + C9C10O10 (22%) + C10C9O9 (13%)
306	306	301	302	C6C5N (19%) + C5C4O4 (18%) + C4C5N (12%) + C3C4O4 (9%)
	288	291	288	C6C9O9 (22%) + To C9C10 (7%) + C9C6CO6 (6%)
250	248	254	254	To C10C11 (11%) + To C9C10 (10%) + To C6C9 (7%)
	242	244	244	To C6C9 (24%) + C9C10O11 (13%) + To C3C4 (9%)
	234	232		To C4C5 (12%) + C3C4O4 (8%) + To C3C4 (6%)
	226	226	225	To C2O6 (9%) + To C9C10 (7%) + To C3C4 (7%) + To C4C5 (5%)
219	219	215	220	C5C6C9 (11%) + To C6C9 (10%) + C9C10C11 (7%) + To C9C10 (6%)
	199	208	209	To C10C11 (27%) + To C6C9 (23%)
			205	To C6C9 (31%) + To C10C11 (20%)
187	188	188	193	To C10C11 (13%) + C6C9C10 (10%) + C10C11O11 (7%)
178	180	181	181	To C7C8
169			174	To C9 C10 (13%) + C1C2CO6 (12%)+ W C1=O (10%) + C3C2C1 (8%)
159	157	165		To C6C9 (30%) + To C10C11 (13%) + To C5C6 (9%) + To C9C10 (8%)
151	152	155	157	To C2C1 (12%) + C3C2C1 (9%) + To C6C9 (9%) + To C2C3 (7%)
143		140		To C9C10 (14%) + To C10C11 (12%) + C3C2C1 (8%)
133			133	RA (35%) + To C10C11 (14%)
115		118	117	To C4C5 (9%) + To C9C10 (8%) + To C5N5 (7%)
113			111	To C10O11 (54%) + To C9C10 (9%)
106		108	108	To C10C11 (42%) + To C9C10 (22%)
		102		TZ (48%) + To C10C11 (13%) + To C6C9 (8%) + To C2C1 (8%)
94		90	90	To C7N5 (29%) + To C6C9 (17%) + W N5H (11%)
88			88	TY (45%)+ RB (11%)
84			85	To C7N5 (23%) + RB (16%) + TY (16%) + To C5N5 (13%)
80		78		To C2C1 (44%) + TZ (14%)
71		73	73	RB (78%) + To C5N (12%)
63		61		To C9C10 (29%) + RA (22%) + To C10C11 (21%)
57		54		RC (29%) + RA (16%) + To C6C9 (15%) + RB (10%) + To C5N9 (10%)
51			52	RC (68%) + RA (8%)
47		47	46	RC (45%) + RB (16%) + To C9C10 (10%) + To C6C9 (10%)
35		35		TX (34%) + RB (27%) + RA (15%)

Les abréviations utilisées sont les mêmes que pour la N-acétyl-glucosamine.

## IX. Discussions des résultats des dynamiques harmoniques:

### IX.1. Champs de forces:

Les calculs des modes normaux de vibration réalisés ici donnent de bons résultats. En effet, la déviation standard entre les fréquences observées en dessous de  $1600\text{ cm}^{-1}$  et les fréquences calculées correspondantes est inférieure à  $4\text{ cm}^{-1}$  pour les quatre molécules. Les vibrations de basses fréquences sont bien reproduites. La forme analytique de la fonction potentielle choisie peut donc reproduire des spectres de vibrations assez complexes.

La comparaison des constantes de forces finales obtenues pour ces molécules et celles de départ du glucose alpha (1), du N-méthylacétamide (4) et de l'acide pivalique (5) montre que le principe de transférabilité peut être appliqué. En effet, les différences dans les valeurs des constantes de forces sont dues:

- au groupement méthyle supplémentaire pour le méthyl- $\alpha$ -mannoside,
- au groupement hydroxyle porté par le carbone 2 du cycle, qui se trouve en position axiale pour le méthyl- $\alpha$ -mannoside et équatoriale pour le glucose,
- au groupement acétamido porté par le cycle pyranique pour la N-acétyl-glucosamine, l'acide N-acétyl-muramique et l'acide N-acétyl-neuraminique,
- au groupement lactyle porté par le cycle pyranique pour l'acide N-acétyl-muramique,
- et aux modifications des torsions exocycliques C-O dues à une orientation différente des hydrogènes des groupements hydroxyles. Ce changement de position peut être expliqué par un réseau de liaisons hydrogène différent entre le glucose et ces molécules à l'état cristallin.

Pour l'acide N-acétyl- $\beta$ -neuraminique, le changement de conformation du cycle pyranique de C1 à 1C n'intervient pas dans les valeurs des constantes de forces. Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs H et F de l'angle O6C2O2 sont presque identiques aux valeurs déterminées pour le glucose  $\beta$ : 46,05 et 45,31 pour notre molécule et 45.65 et 45.00 pour le  $\beta$  glucose.

L'ensemble des paramètres ainsi obtenu définit les champs de forces de ces quatre molécules. Il conviendrait d'utiliser des spectres des dérivés deutériés, mais aussi d'effectuer des calculs d'intensités infrarouge, Raman et éventuellement Raman de résonance pour les valider définitivement. Cependant l'obtention des dérivés deutérés pour les monosaccharides n'est pas simple et le calcul d'intensité infrarouge n'a été réalisé que sur l'alpha glucose jusqu'à présent (15).

## IX.2 Spectres:

Des spectres Raman de la N-acétyl-glucosamine avaient été publiés auparavant par She *et al.* (16). Mais aucune bande n'était présentée au dessous de  $130\text{ cm}^{-1}$ .

Les spectres de She *et al.* et ceux proposés ici sont comparables. Nous pouvons, cependant, remarquer quelques décalages au niveau de certaines bandes. Ainsi, celles observées par She *et al.* à 1115, 1010, 983, 936 et  $260\text{ cm}^{-1}$ , le sont pour nous respectivement à 1105, 1001, 972, 928 et  $266\text{ cm}^{-1}$ . Pourtant, les produits étudiés ont la même provenance (Sigma) et la résolution des appareils est du même ordre.

She *et al.* présentent aussi un spectre Raman laser de 1800 à  $130\text{ cm}^{-1}$  de la N-acétyl-glucosamine deutériée nous permettant ainsi une attribution plus précise des modes de vibrations des groupements CH et NH pour cette molécule.

## IX.3. Attributions des fréquences:

### IX.3.1. Hautes fréquences:

Dans la zone des hautes fréquences, nous retrouvons tout d'abord les vibrations OH associées aux molécules d'eau, puis les modes de valence O-H des groupements COH calculés et observés entre  $3500$  et  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Les liaisons hydrogène intermoléculaires contribuent fortement à ces fréquences.

Les bandes correspondant aux élongations N-H sont calculées respectivement à 3266, 3216 et  $3225\text{ cm}^{-1}$  pour la N-acétyl-glucosamine, l'acide N-acétyl-muramique et l'acide N-acétyl-neuraminique, alors qu'elle est calculée et observée à  $3300\text{ cm}^{-1}$  pour le N-méthylacétamide (4).

Les modes de valence C-H sont calculés entre 2994 et  $2785\text{ cm}^{-1}$  et observés entre 3010 et  $2836\text{ cm}^{-1}$ .

Contrairement au glucose, il a été souvent nécessaire de différencier les constantes de forces liées aux C-H et en particulier liées aux C6-H pour obtenir une reproduction correcte de cette zone spectrale.

### IX.3.2. Domaine spectral 1800-1200 cm<sup>-1</sup>

#### - pour le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside

Les modes de vibrations HCO, HCH, COH, et CCH présents dans cette zone sont fortement couplés. On retrouve les bandes caractéristiques des groupements CH<sub>2</sub>OH calculées à 1444, 1260 et 1217 cm<sup>-1</sup> alors qu'elles figurent à 1460, 1279 et 1208 cm<sup>-1</sup> pour le glucose. Les bandes caractéristiques du groupement CH<sub>3</sub> sont aussi retrouvées.

#### - pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine

Les deux premières bandes de ce domaine sont attribuées respectivement à la bande amide I (élongations C=O et C-N) et amide II (déformation CNH). Cette attribution est identique à celle de She *et al.* (16).

La déformation symétrique du groupement CH<sub>3</sub> est attribuée à la bande observée à 1380 cm<sup>-1</sup> par She *et al.* Quant à nous, nous l'observons à 1379 cm<sup>-1</sup> et la calculons à 1375 cm<sup>-1</sup>. Il faut aussi noter la contribution du groupement CH<sub>2</sub>OH dans la fréquence calculée et observée à 1277 cm<sup>-1</sup>. Cette attribution est aussi proposée par She *et al.*, la fréquence correspondante étant calculée respectivement à 1260 et 1279 cm<sup>-1</sup> pour le méthyl- $\alpha$ -mannoside et le glucose (1).

#### - pour l'acide-N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique

La première vibration de cette région est associée au C=O du groupement carboxylique. Ensuite, nous trouvons la vibration HOH de la molécule d'eau. Les bandes amide I et amide II du groupement acétamido sont calculées et observées respectivement à 1602, 1556 cm<sup>-1</sup> et 1605, 1554 cm<sup>-1</sup>, viennent s'associer les déformations de types HCO, HCH, COH, CCH. Les contributions des groupements méthyle et hydroxyméthyle sont retrouvées dans les mêmes régions que pour les deux molécules précédentes.

#### - pour l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique

Les bandes amides I et II sont calculées respectivement à 1627 et 1552 cm<sup>-1</sup>. Ce résultat est en accord avec les résultats précédent de la N-

acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine et l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique acide mais en désaccord à l'attribution données par Mueller *et al.* (17).

Cependant, ces mêmes auteurs, attribuent la fréquence 1727  $\text{cm}^{-1}$  à la vibration C=O comme dans ce travail. Les vibrations HOH associées aux molécules d'eau sont retrouvées à 1663 et 1657  $\text{cm}^{-1}$ .

La contribution de groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  est observée à 1547  $\text{cm}^{-1}$ . Mais la comparaison avec les molécules étudiées précédemment est difficile, puisque cet hydroxyméthyle n'est pas relié ici directement au cycle pyranique.

Des contributions du groupement  $\text{CH}_3$  sont aussi retrouvées dans cette régions couplées avec les déformations associées aux groupements HCO, HCH, COH, et CCH.

### IX.2.3. Région 1200-1000 $\text{cm}^{-1}$

Cette région est, en générale, très difficile à ajuster en raison des couplages entre les fréquences correspondantes aux élongations des liaisons C-O et C-C, endo et exo-cycliques et des liaisons C-N qui se couplent comme pour le glucose avec les déformations angulaires COH, HCH et CCH.

### IX.2.4. Domaine 1000-700 $\text{cm}^{-1}$

C'est la région caractéristique de l'anométrie et peu de bandes sont observées et calculées dans cette région. Les couplages sont encore ici très importants entre les atomes responsables de l'anométrie, ceux des groupements carboxyliques et ceux des groupements acétamido.

Pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, nous remarquons une forte contribution de la torsion C3O3H à 737  $\text{cm}^{-1}$ . Cette contribution est très fortement liée aux liaisons hydrogène intervenant au niveau de cet hydroxyle.

### IX.2.5. région 700-200 $\text{cm}^{-1}$

Dans la zone de 700-500  $\text{cm}^{-1}$  interviennent principalement les torsions exocycliques C-O. Puis on observe un couplage entre les déformations angulaires de type CCC, OCO, CCO, COC, CNC, CCN, les mouvements hors du plan et les torsions exocycliques C-O, C-C, C-N.

### IX.3.6. Domaine des basses fréquences.

C'est une région fortement couplée entre les modes de vibrations intramoléculaires composés principalement des torsions de type C-C et C-N et les modes intermoléculaires.

## **X. Conclusion sur la dynamique harmonique des monosaccharides:**

Nous avons reproduit les données spectroscopiques vibrationnelles du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique et de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à partir de la fonction potentielle Urey-Bradley-Shimanouchi modifiée. Le principe de transférabilité énoncé par T. Shimanouchi est vérifié puisque les constantes<sup>1</sup> de forces établies pour le glucose, le N-méthylacétamide et l'acide pivalique, ont été le point de départ de ces études. Nous avons donc ainsi établi des paramètres qui nous serviront pour étudier des molécules plus complexes.

Il faut cependant, souligner que ces études, ont été établies à partir de résultats obtenus par cristallographie et donc ne correspondent pas exactement aux formes biologiquement actives. Néanmoins, les champs de forces ainsi établis, seront une base fiable pour l'étude de ces molécules dans leur environnement biologique (cf. chapitre 5).



Bibliographie

du

Chapitre 3

- 1) Dauchez M. (1990)  
Elaboration d'une base de paramètres de la fonction énergie potentielle empirique de saccharides en vue de son utilisation en mécanique moléculaire et dynamique moléculaire de glycannes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 2) Sekkal M. (1990)  
Utilisation conjointe de la spectrométrie IRTF et de la modélisation moléculaire à l'étude structurale des carraghenanes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 3) Shimanouchi T. (1963)  
Force constants of small molecules.  
Pure & Appl. Chem. 7, 131-145
- 4) Derreumaux P. (1988)  
Dynamique harmonique de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique du boeuf.  
Thèse de Doctorat, Lille II
- 5) Longueville W., Fontaine H., Vergoten G. (1982)  
Spectre de vibration et vibrations normales de l'acide pivalique.  
J. Raman Spectr. 18, 217-222
- 6) Jeffrey G.A., McMullan R.K., Takagi S. (1977)  
A neutron diffraction study of the hydrogen bonding in the crystal structures of methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside and methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside.  
Acta Cryst. B33, 728-737
- 7) Mo F., Jensen L.H. (1975)  
A refined Model for N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine.  
Acta Cryst. B31, 2867-2873
- 8) Knox J.R., Murthy N.S. (1974)  
The conformation of N-acetyl- $\alpha$ -D-muramic acid and its relationships to penicillin.  
Acta Cryst. B30, 365-371
- 9) Flippen J.L. (1973)  
The crystal structure of  $\beta$ -D-N-acetylneuraminic acid dihydrate C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>9</sub>, H<sub>2</sub>O.  
Acta Cryst. B29, 1881-1886
- 10) Williams D.E. (1967)  
Nonbonded potential parameters derived from crystalline hydrocarbons.

J. Chem. Phys. 47, 4680-4684

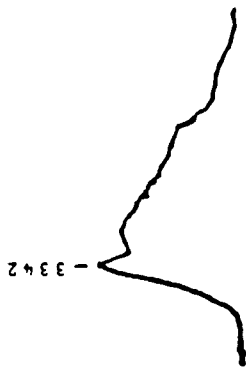
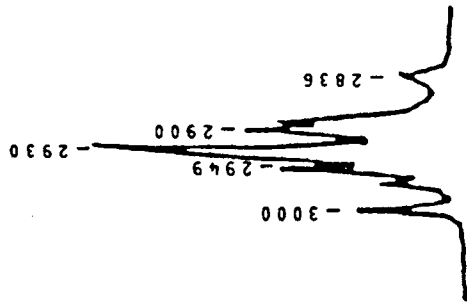
- 11) Dewar M.J.S., Thiel W. (1977)  
Ground states of molecules. 38. The MNDO method.  
Approximations and parameters.  
J. Am. Chem. Soc. 99, 4899-4907
- 12) Arnott S., Scott W.E. (1972)  
Accurate X-ray diffraction analysis of fibrous polysaccharides  
containing pyranose rings. I. Linked-atom approach.  
J. Chem. Soc. Perkins Trans 2 3, 324-335
- 13) Vergoten G. (1977)  
Mouvements de vibrations intra et intermoléculaires de  
molécules chaines.  
Thèse de Doctorat d'Etat, Lille I
- 14) Takeuchi H. (1975)  
PhD Thesis, Tokyo, Japan
- 15) Korolevich M., Zhabankov R., Sivchik V. (1990)  
Calculation of absorption band frequencies in the IR spectrum  
of  $\alpha$  glucose in a cluster.  
J. Mol. Struct. 220, 301-313
- 16) She C.Y., Dinh N.D., Tu A.T. (1974)  
Laser Raman Scattering of glucosamine, N-acetyl-glucosamine  
and glucuronic acid.  
Biochim. Biophys. Acta 372, 345-357
- 17) Mueller E., Blume A. (1993)  
FTIR Spectroscopic analysis of the amide and acid bands of  
ganglioside GM1, in pure form and in mixtures with DMPC.  
Biochim. Biophys. Acta 1146, 45-51



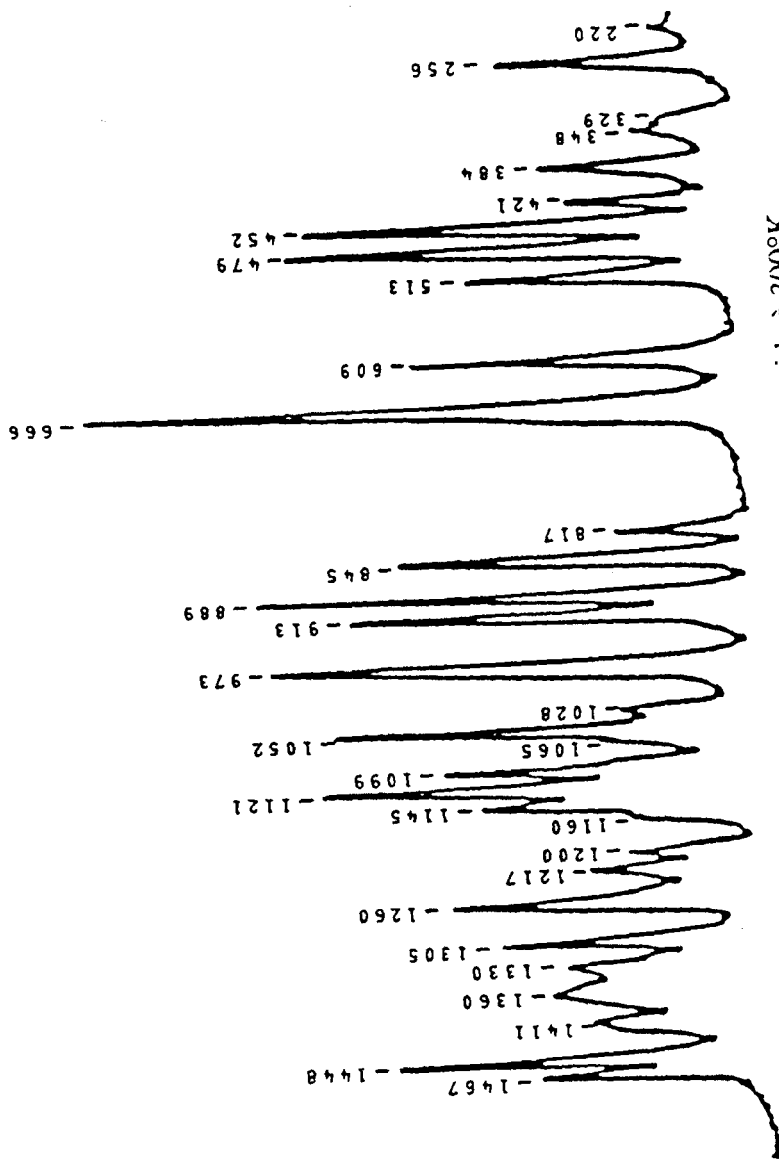
Annexe

du

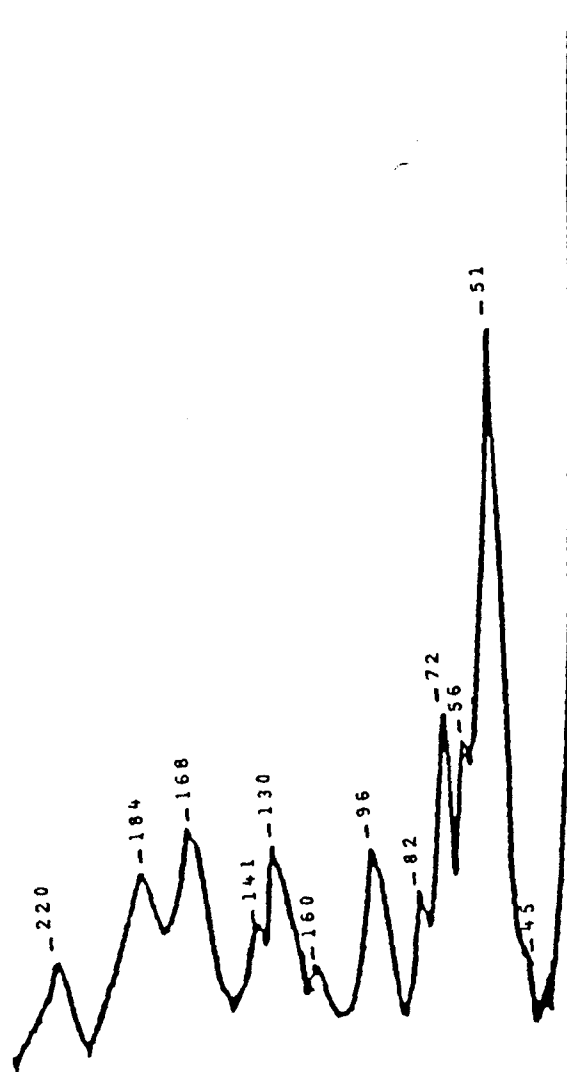
Chapitre 3



Spectres Raman du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
Région 3500-2800 cm<sup>-1</sup>.



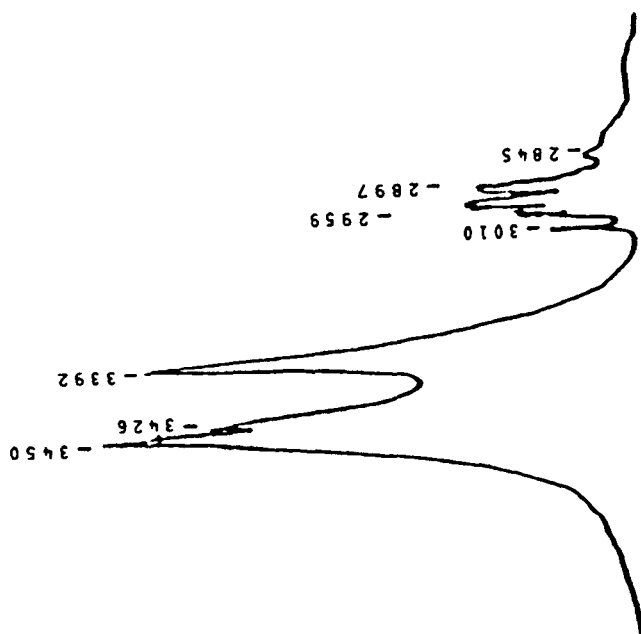
Spectre Raman du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
Région 1600-200 cm<sup>-1</sup>.



Spctre Raman du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
Région 250-20 cm<sup>-1</sup>.

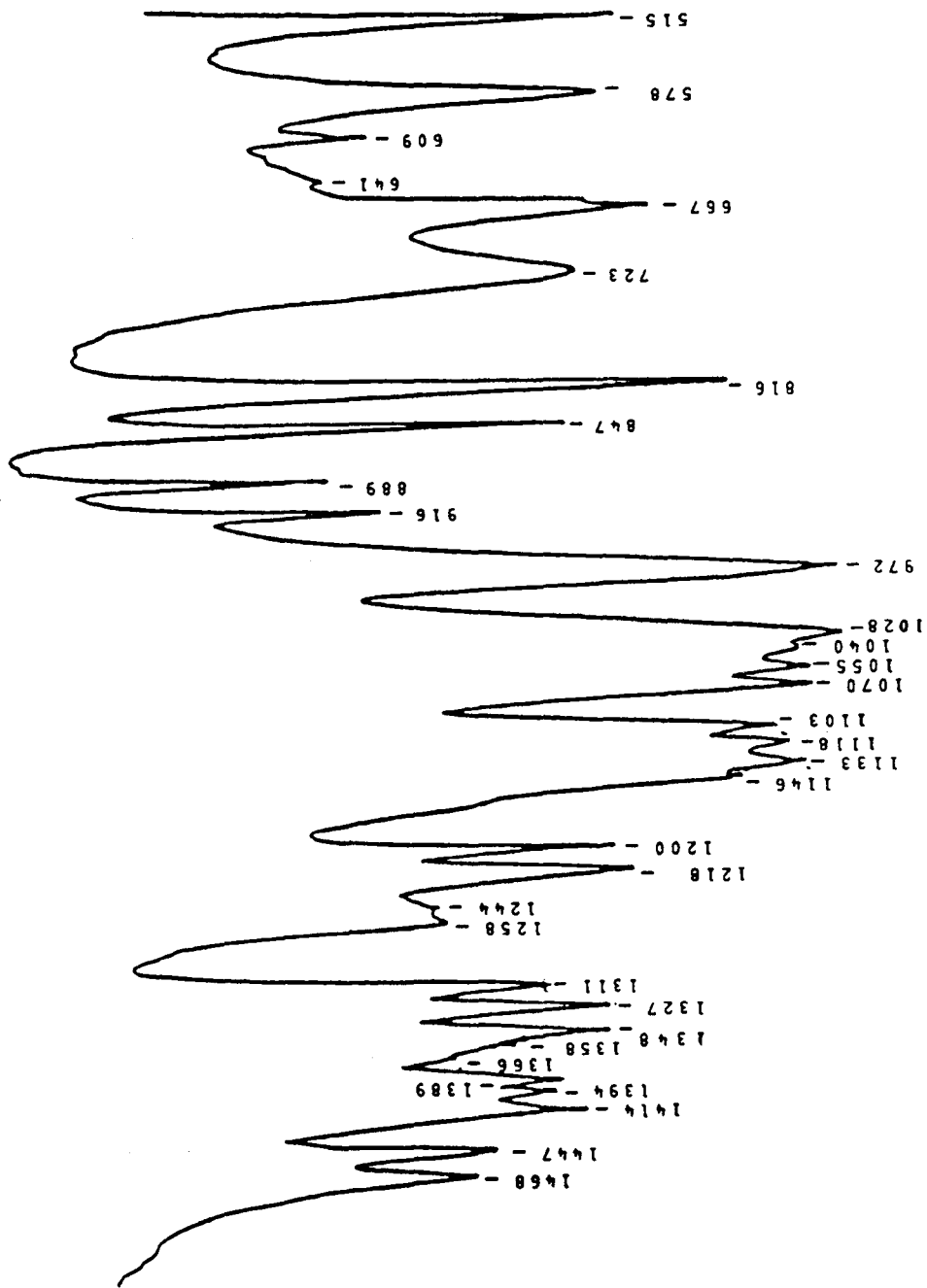




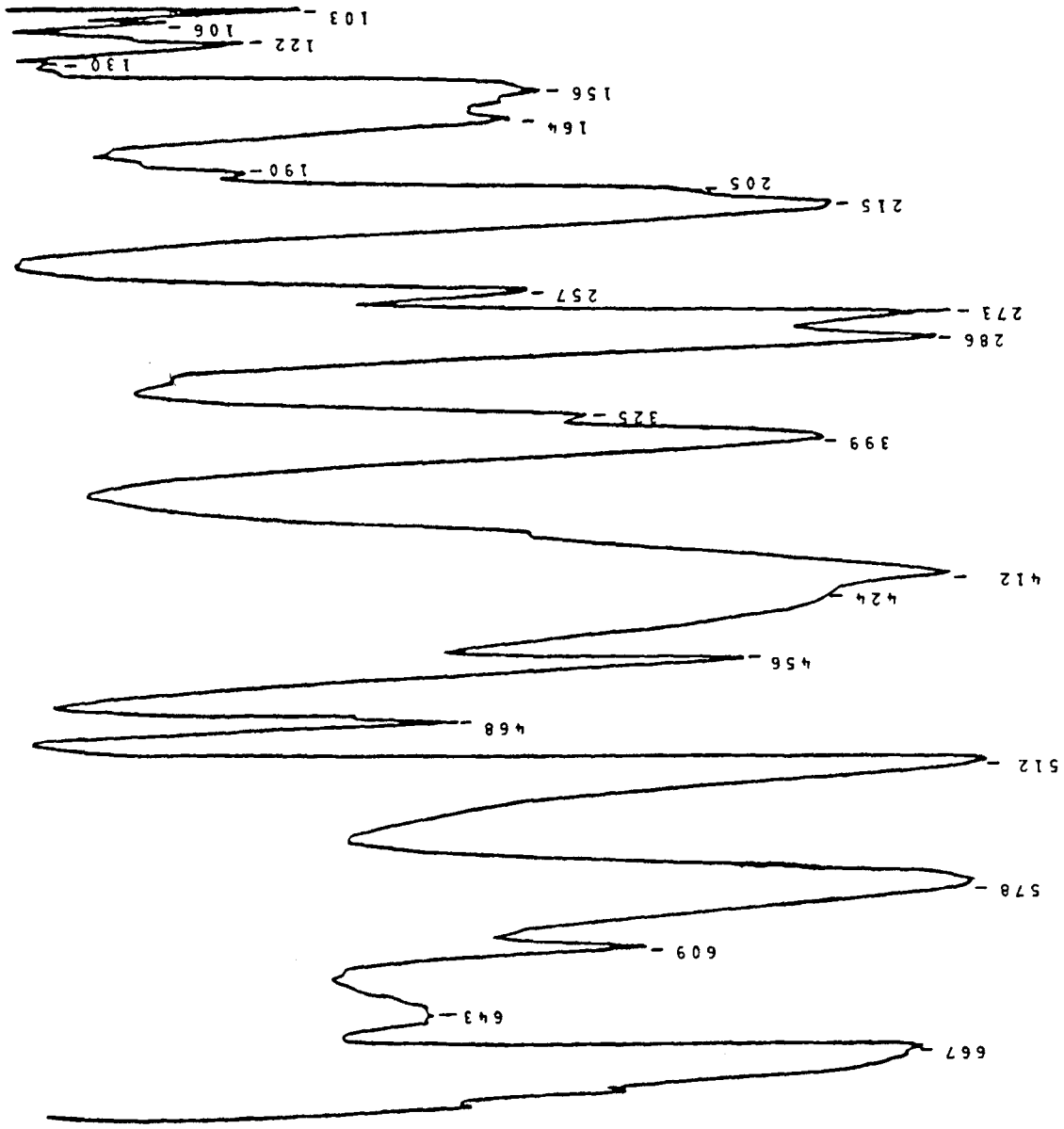


Spectre infrarouge du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
Région 2800-3500  $\text{cm}^{-1}$ .

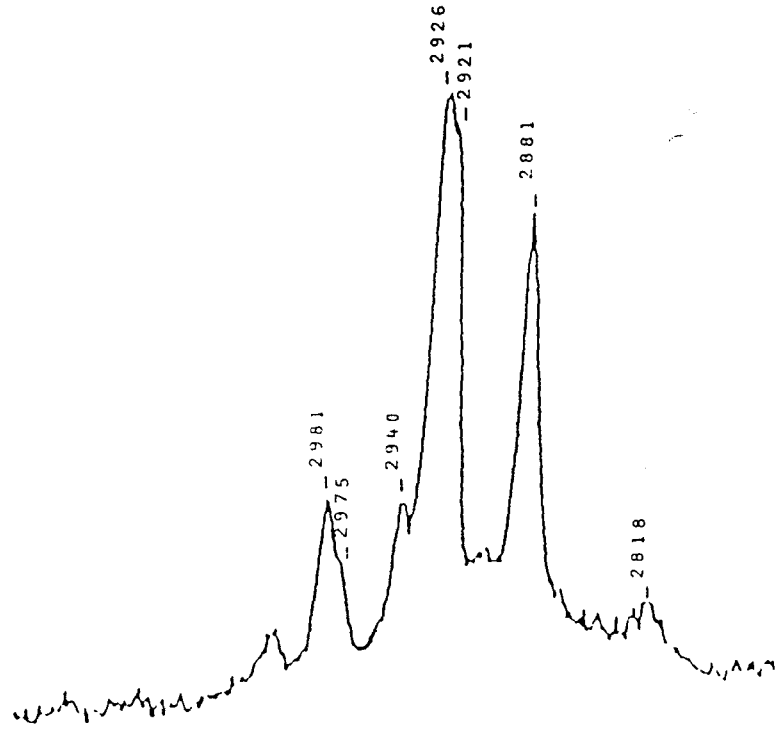




Spectre infrarouge du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
 Région 1500-500  $\text{cm}^{-1}$ .

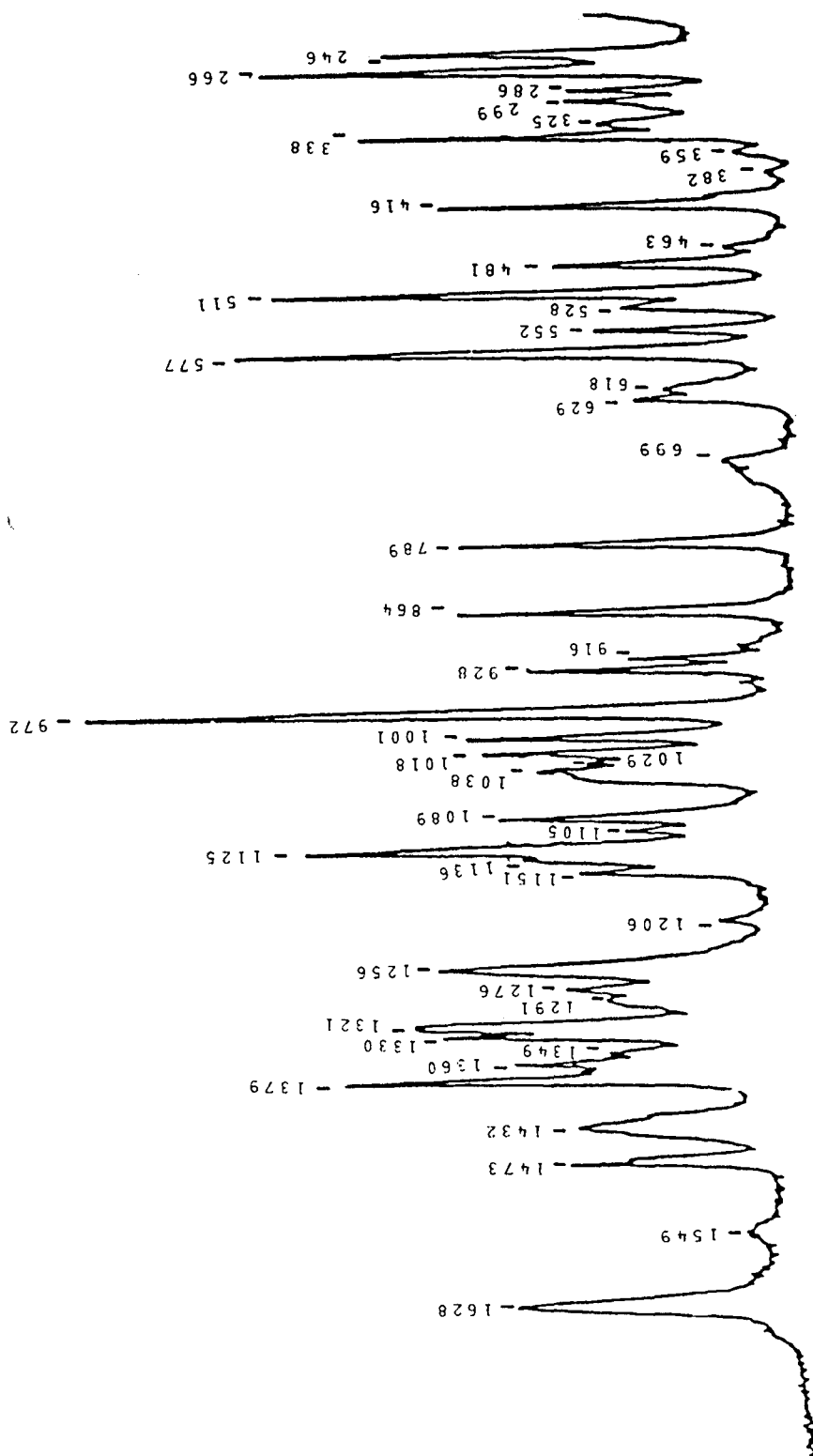


Spectre infrarouge du cristal du méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 300°K.  
Région 700-100 cm<sup>-1</sup>.



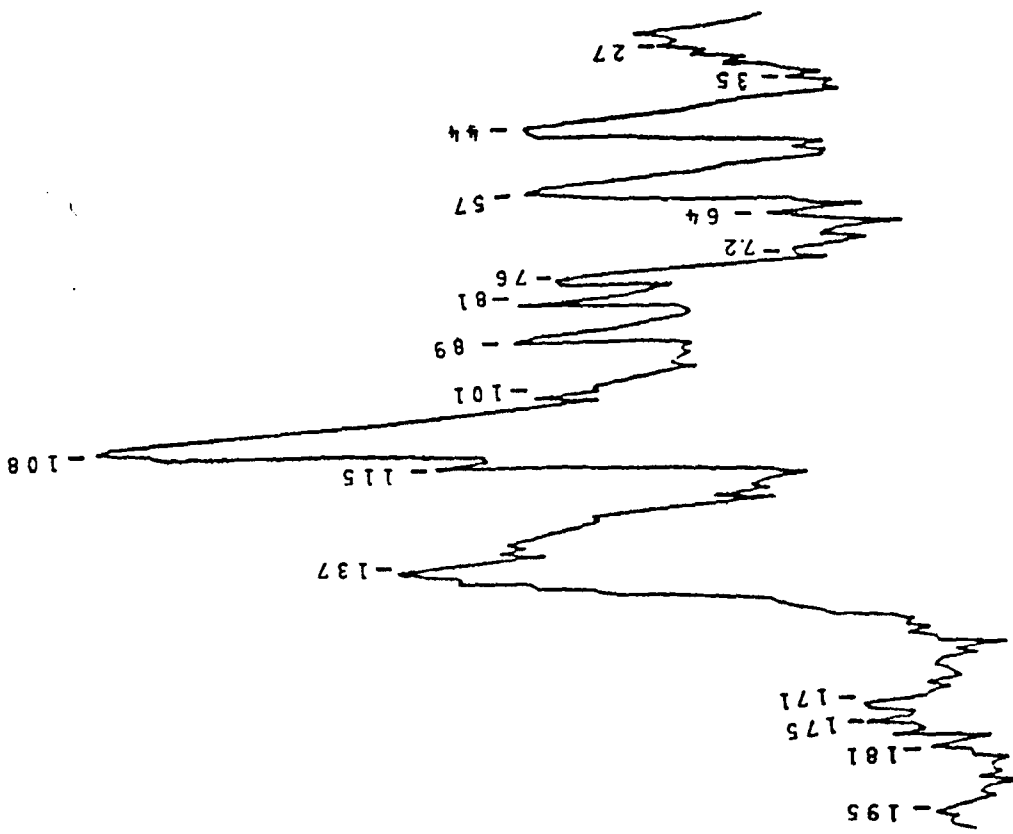
Spectre Raman du cristal de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à 300°K.  
Région 3500-2800 cm<sup>-1</sup>.



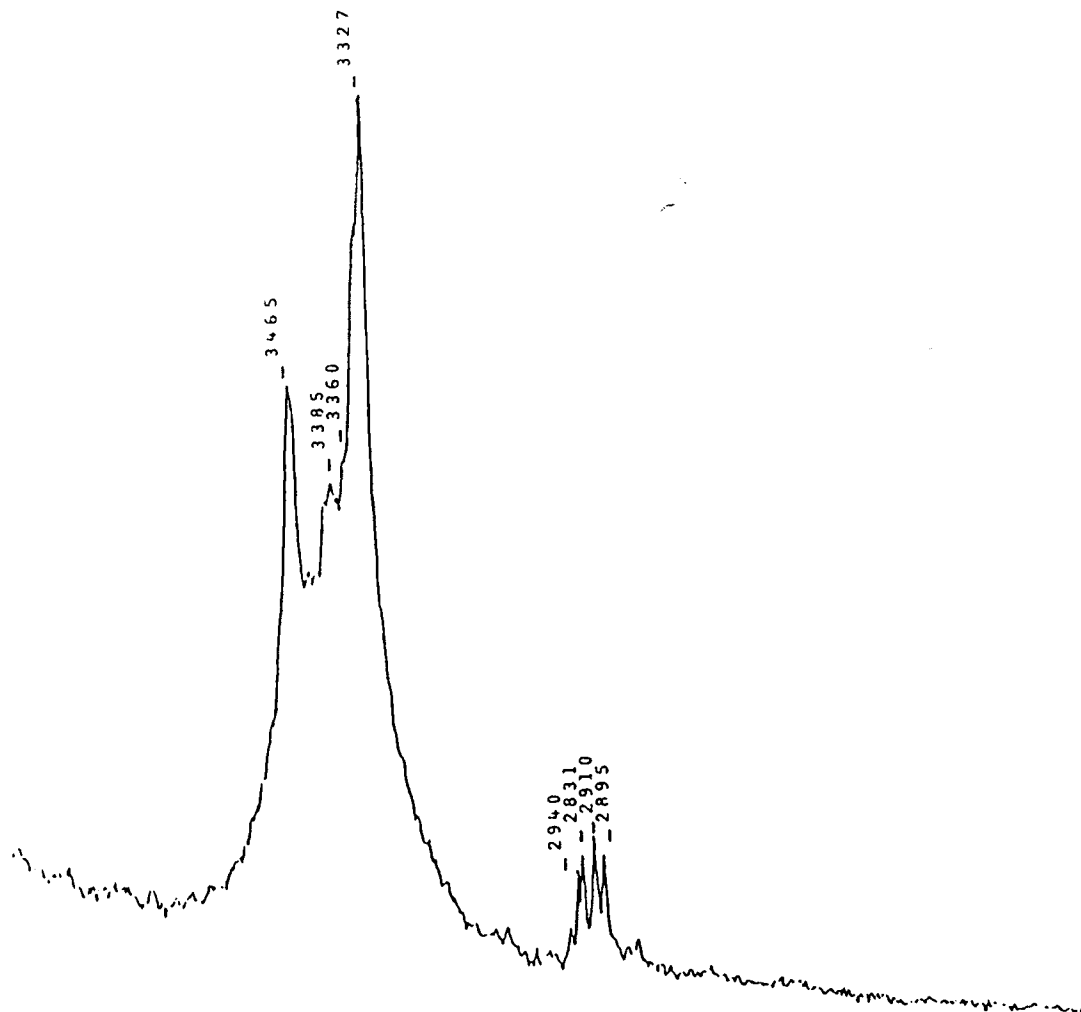


Spectre Raman du cristal de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à 300°K.  
Région 1600-200 cm<sup>-1</sup>.





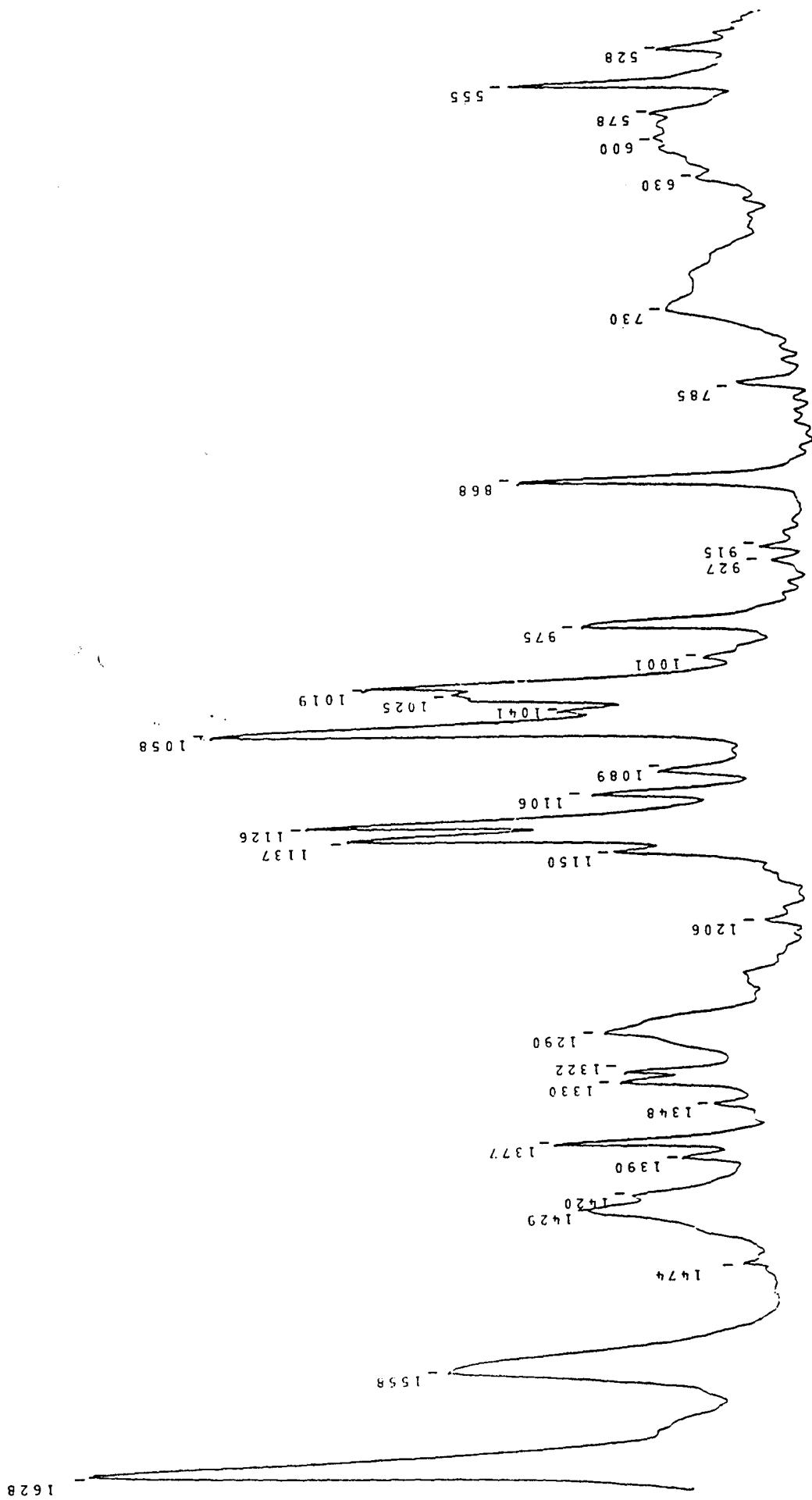
Spctre Raman du cristal de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à 300°K.  
Région 250-20  $\text{cm}^{-1}$ .



150

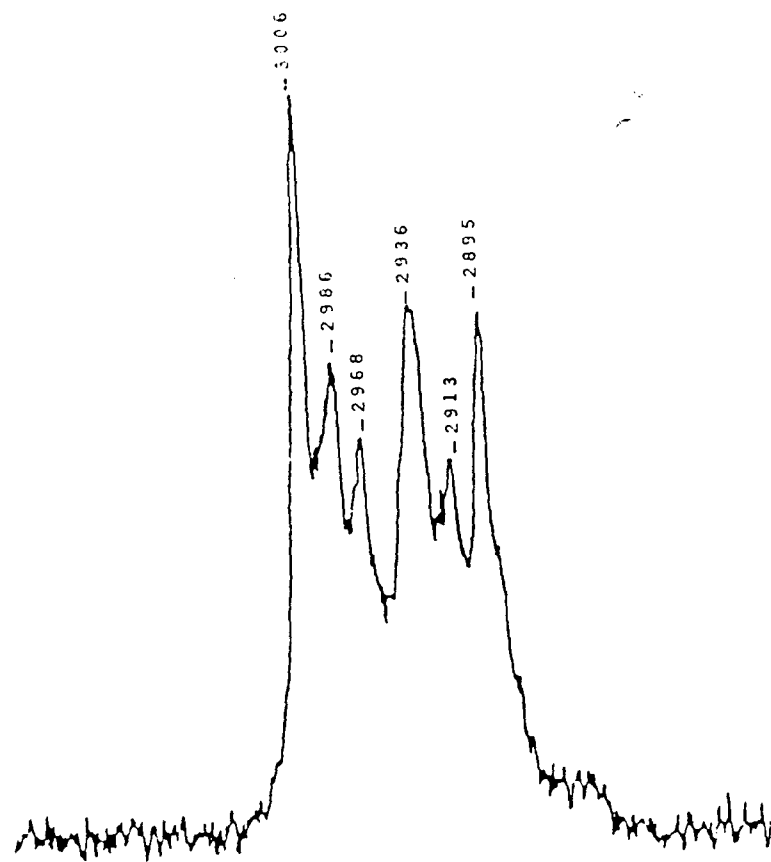
Spectre infrarouge du cristal de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à 300°K.  
Région 2800-3500 cm<sup>-1</sup>.



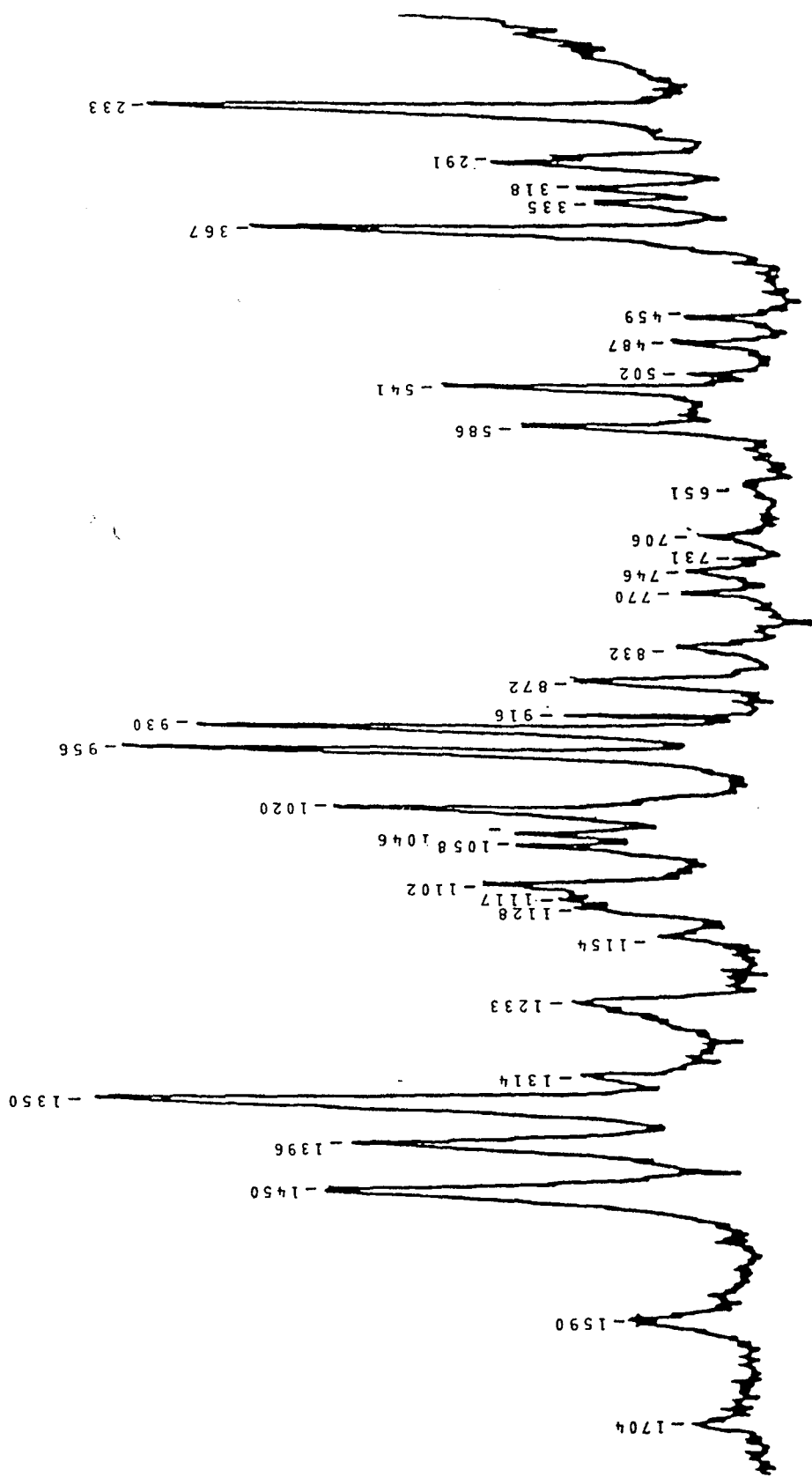


Spectre infrarouge du cristal de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à 300°K.  
 Région 1500-500 cm<sup>-1</sup>.

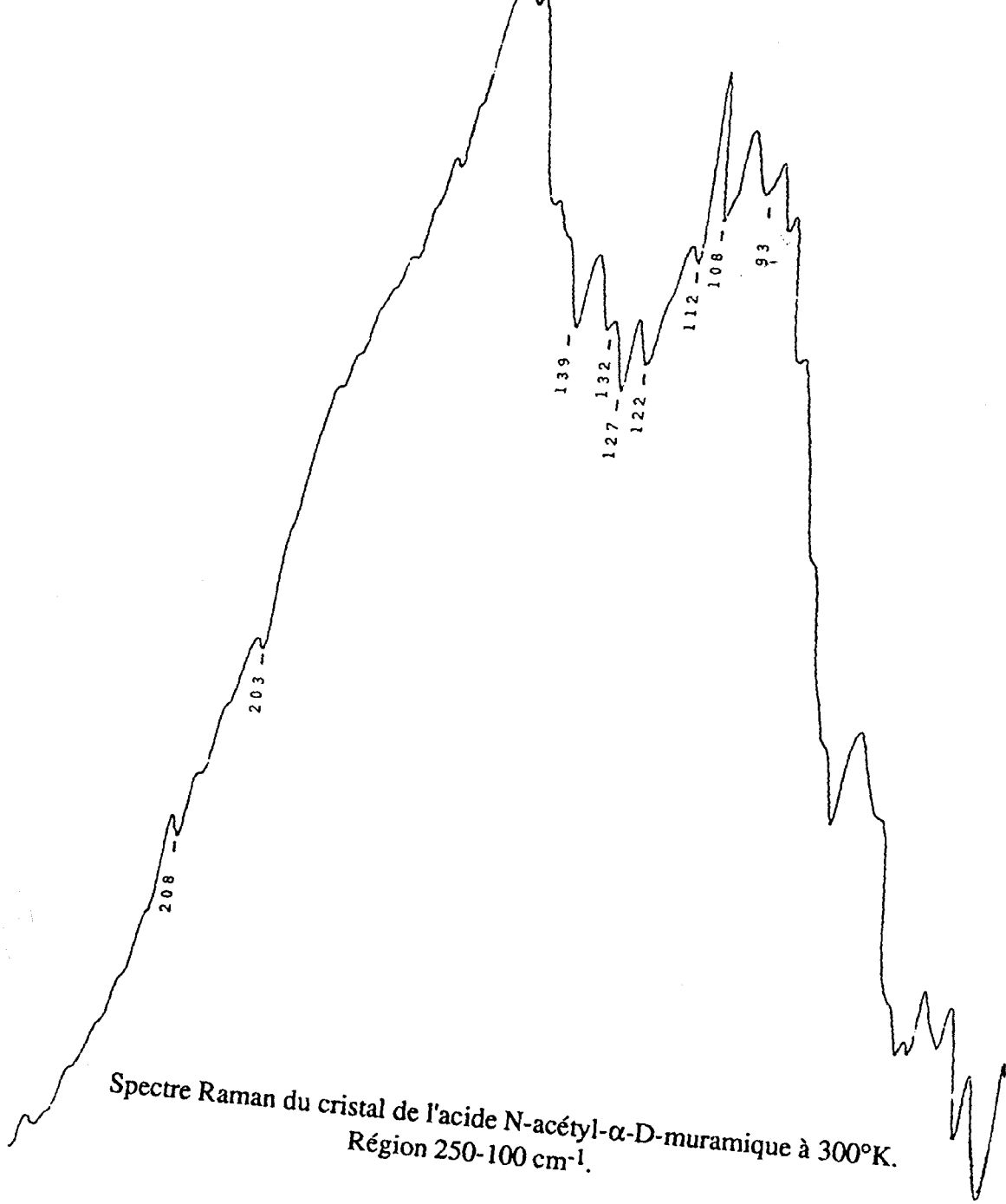


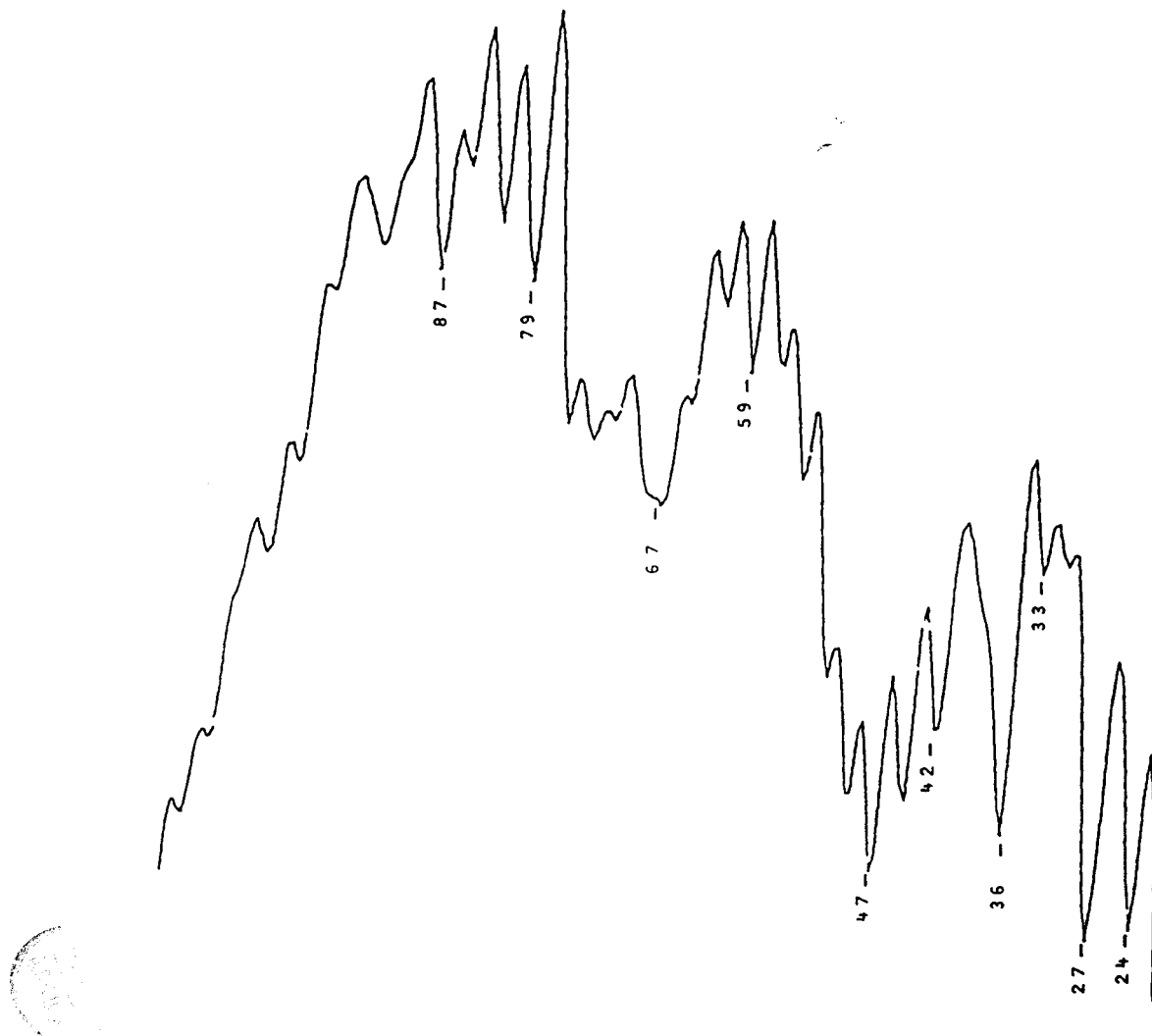


Speetre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
Région 2800-3500 cm<sup>-1</sup>.

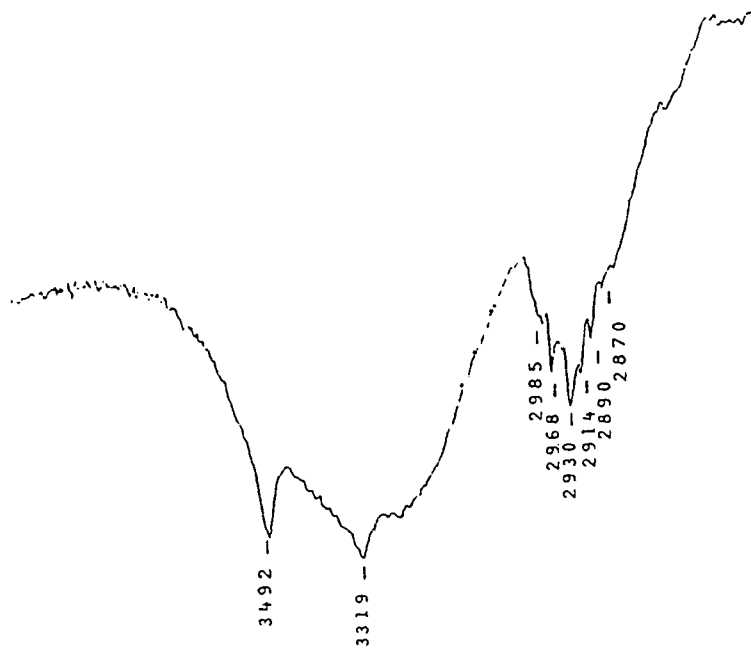


Spectre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
Région 1600-200 cm<sup>-1</sup>.

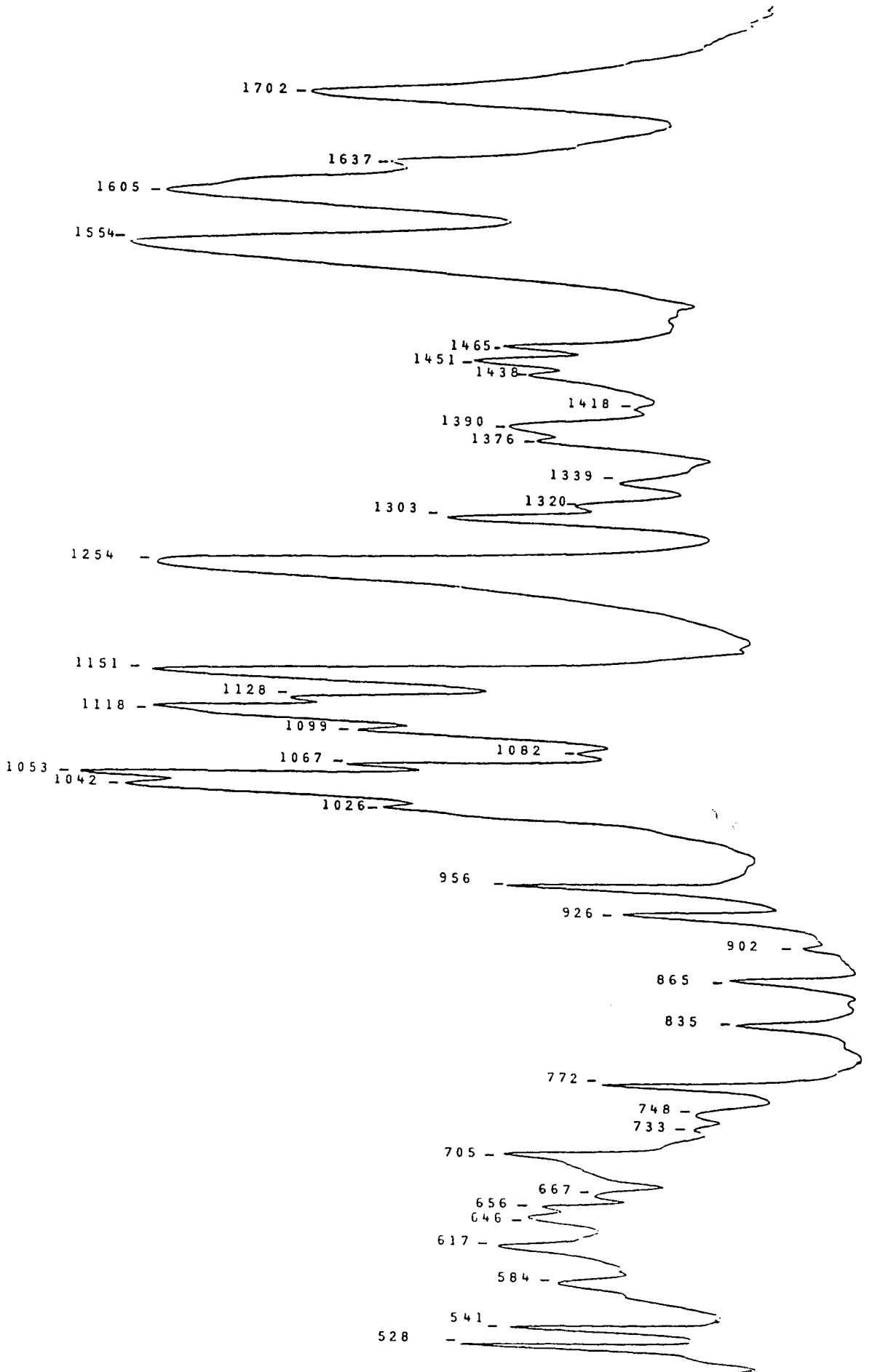




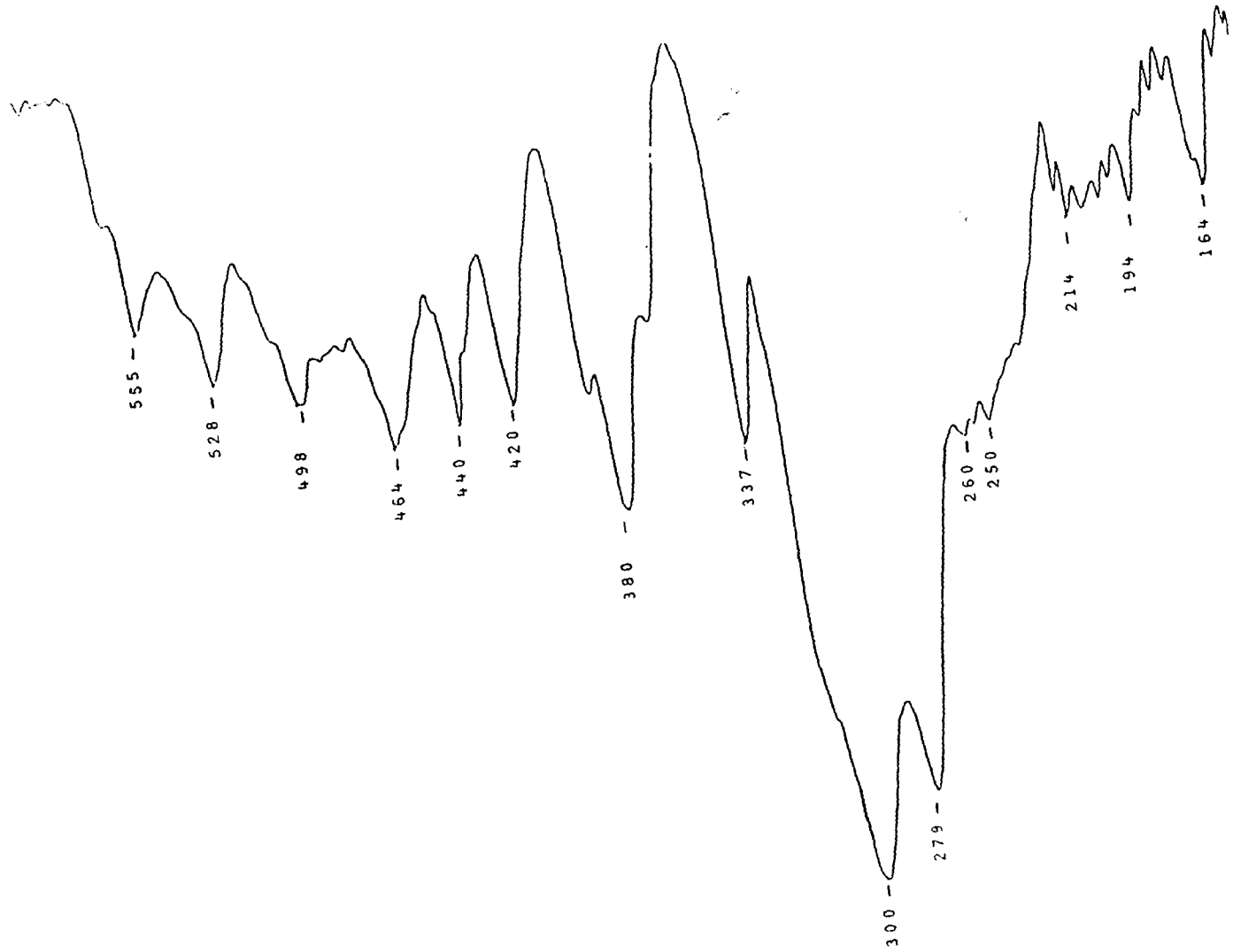
Spectre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
Région 100-20  $\text{cm}^{-1}$ .



Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
Région 2800-3500 cm<sup>-1</sup>.

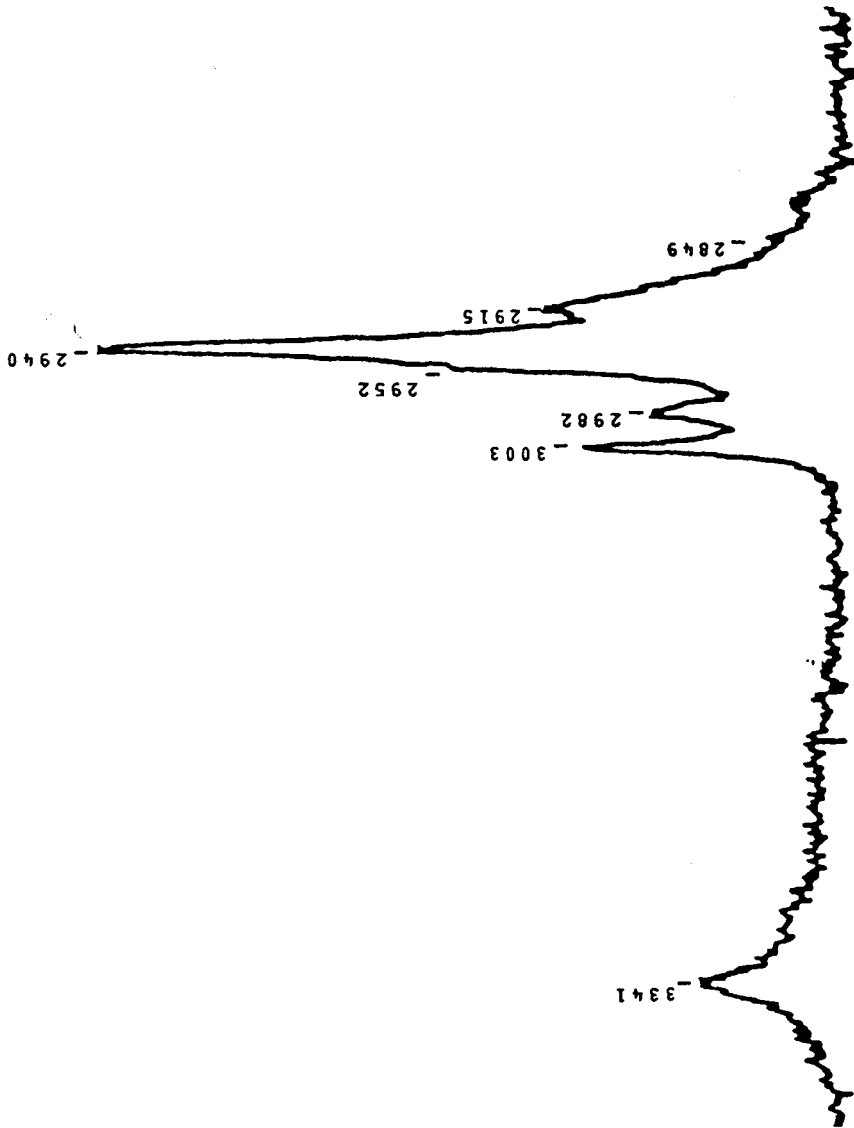


Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
 Région 1500-500  $\text{cm}^{-1}$ .

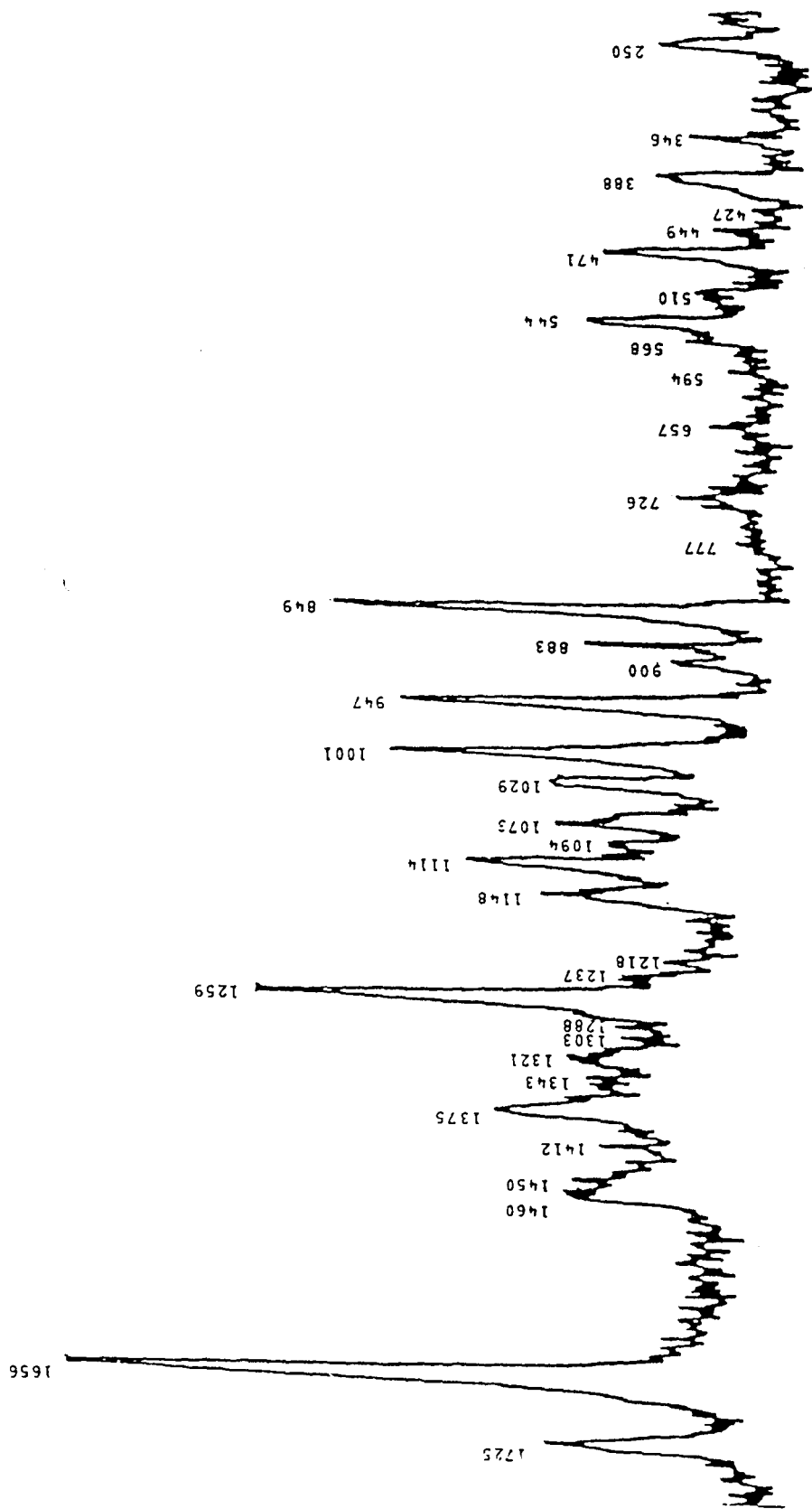


Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique à 300°K.  
Région 700-100 cm<sup>-1</sup>.

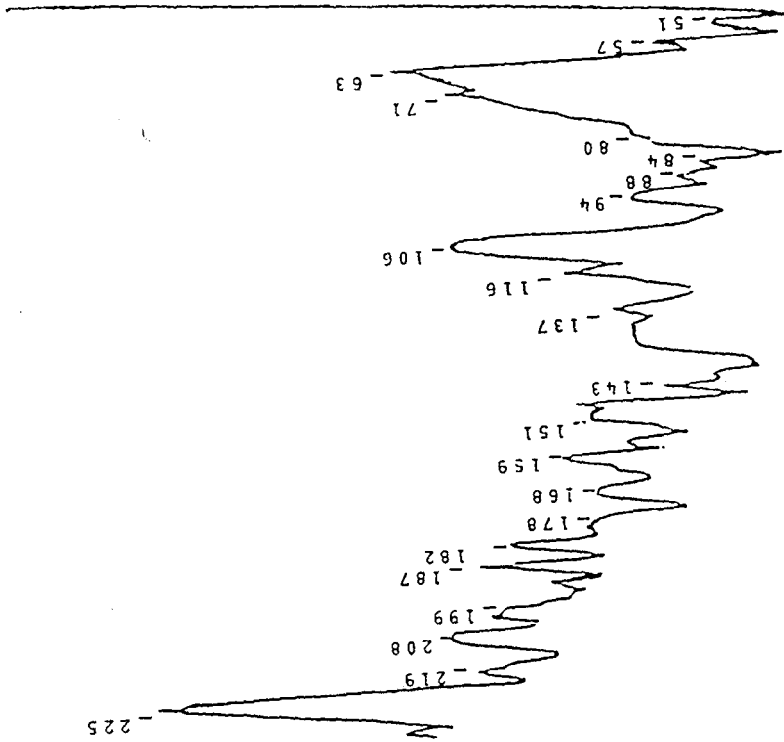




Spectre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
Région 3500-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

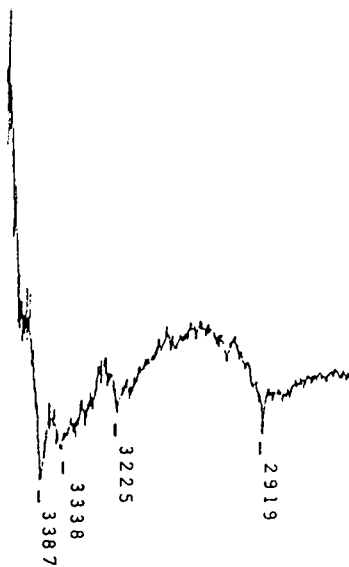


Spctre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
Région 1600-200  $\text{cm}^{-1}$ .

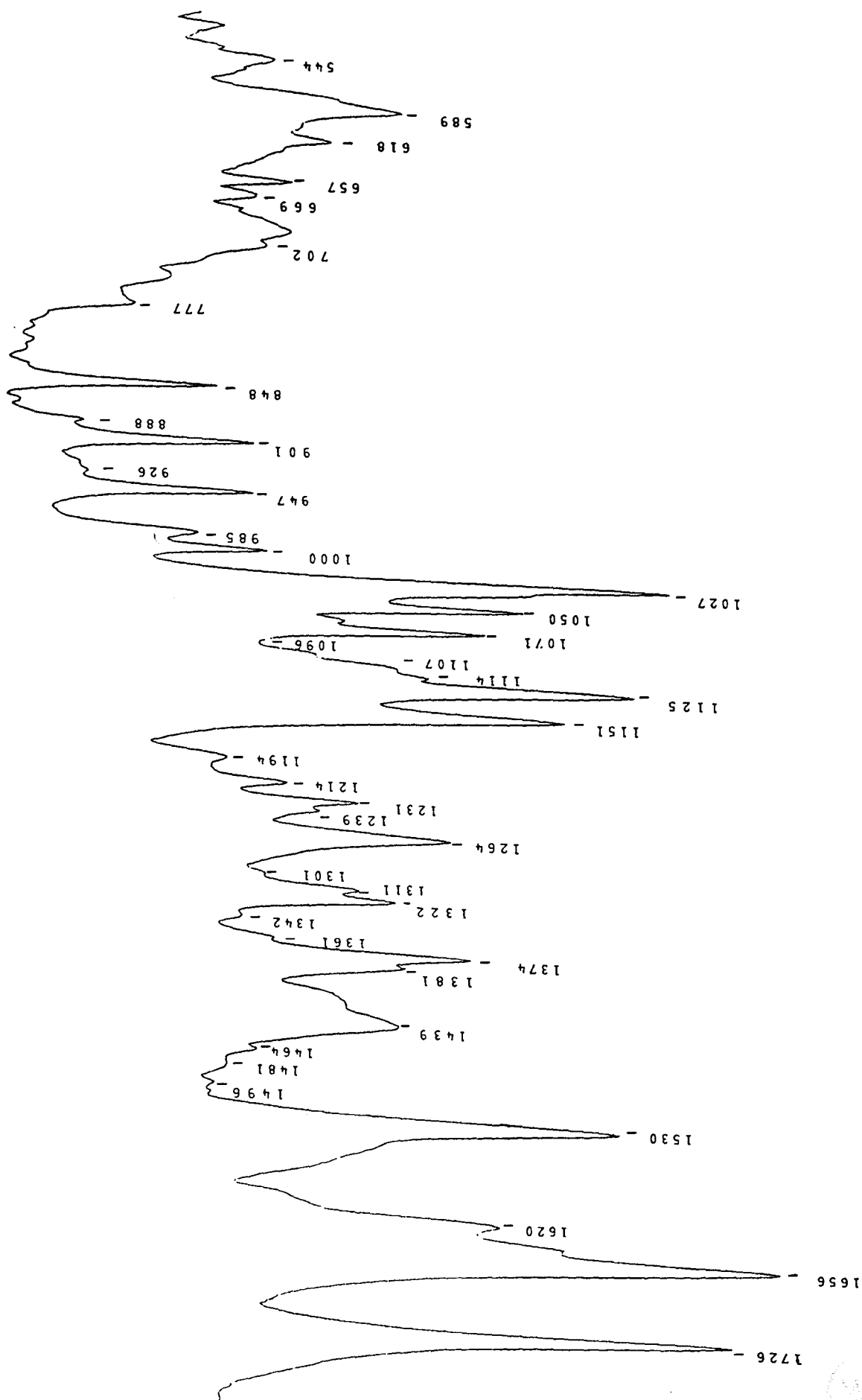


Spectre Raman du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
Région 250-20 cm<sup>-1</sup>.

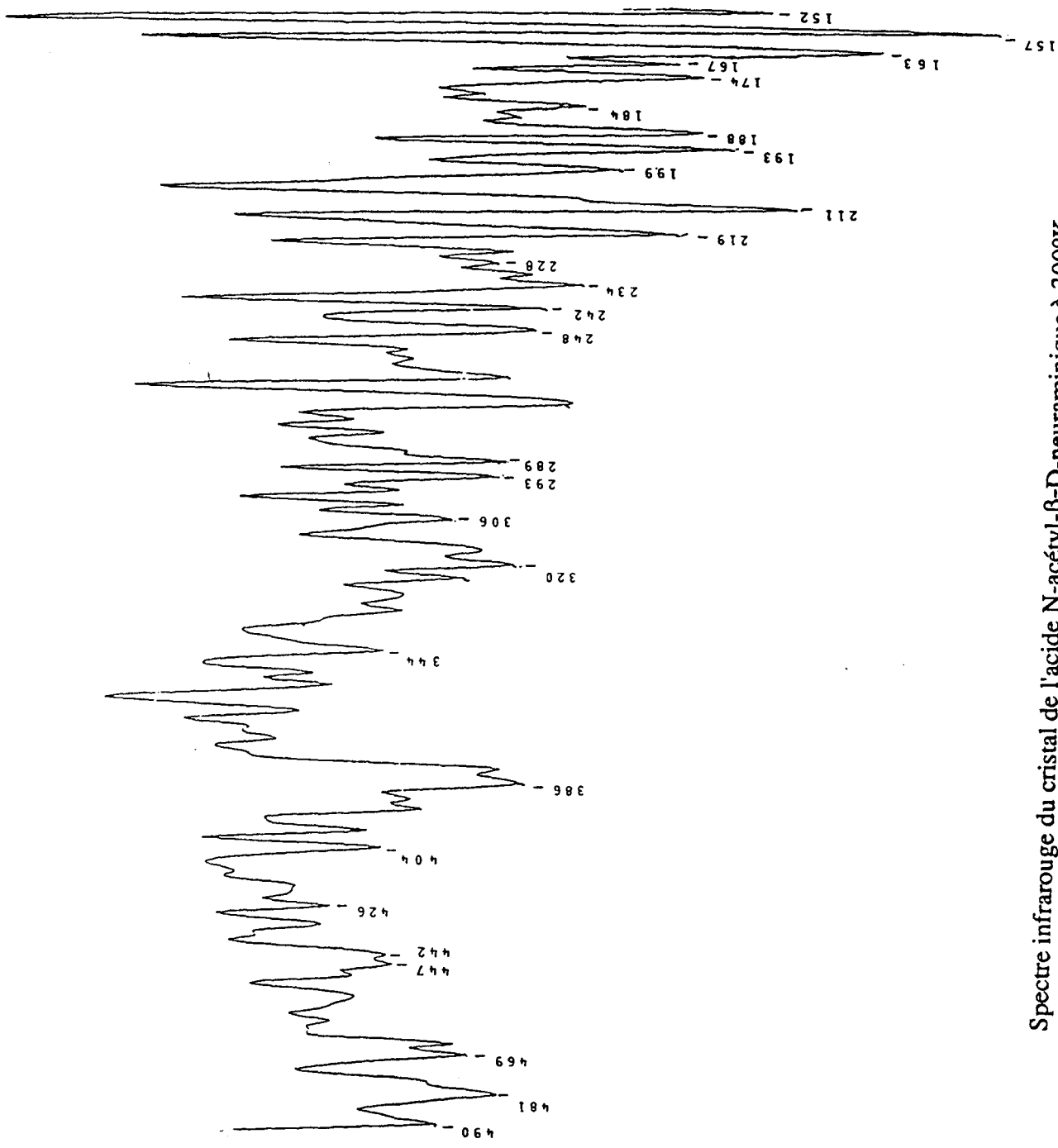




Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
Région 2800-3500 cm<sup>-1</sup>.



Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
 Région 1500-500  $\text{cm}^{-1}$ .



Spectre infrarouge du cristal de l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique à 300°K.  
Région 700-100 cm<sup>-1</sup>.



## Chapitre 4

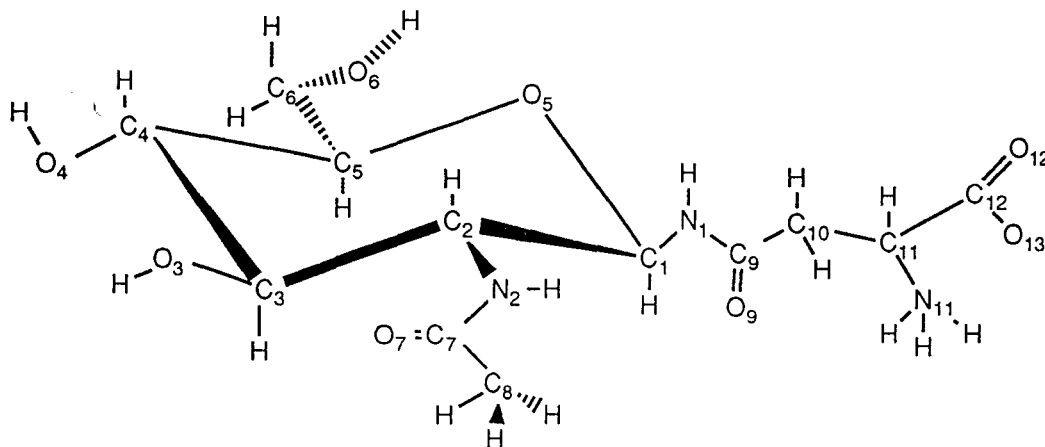
# PARAMETRISATION DE LA FONCTION ENERGIE POTENTIELLE DE LA LIAISON N-GLYCOSIDIQUE

## I. Introduction:

Plusieurs champs de forces de monosaccharides (1-5) et d'acides aminés, et en particuliers ceux de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine (3) et de l'asparagine (6) ayant été établis dans notre laboratoire, il nous a semblé judicieux de nous intéresser à la liaison entre glycannes et protéines afin d'appréhender les interactions glycannes-protéines.

Donc suivant les mêmes démarches qu'au chapitre précédent, nous avons établi le champ de forces de GlcNAc ( $\beta$ 1-N) Asn, en nous intéressant plus particulièrement à la liaison  $\beta$ 1-N.

## II. Conditions du calcul:



Les coordonnées cartésiennes de départ sont celles obtenues par diffraction des RX par L.T. Delbaere (7) avec un facteur  $R=0.129$ .

Cette molécule possède 44 atomes et cristallise avec trois molécules d'eau, les paramètres de la maille sont les suivants:

$$a = 4.94 \text{ \AA}$$

$$b = 7.77 \text{ \AA}$$

$$c = 24.24 \text{ \AA}$$

$$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 97^\circ 7'$$

On y trouve deux molécules par maille:  $x, y, z$  et  $-x, -y, z+0.5$

La molécule ne possédant pas de symétrie, le groupe  $C_1$  est à la fois groupe moléculaire et groupe de site. Le groupe spatial est  $P2_1$  et le groupe facteur est  $C_2$ . La représentation irréductible dans l'approximation du cristal flexible est alors la suivante:  $140A + 139 B$ .



Les spectres de vibrations de la molécule sont obtenus à partir du cristal de GlcNac( $\beta$ 1-N)Asn (Sigma, La Verpière, France) sans purification ultérieure, dans les mêmes conditions que pour les molécules précédentes (cf. page 100). Ils sont présentés en annexe de ce chapitre.

La fonction potentielle utilisée est également identique à celle du chapitre III (cf. page 101).

Nous avons aussi défini les coordonnées internes de la molécules soit 50 coordonnées relatives aux liaisons, 79 aux angles de valence, 5 aux mouvements hors du plan autour des liaisons N2H, C7O7, N1H, C9O9, et C12O12, et enfin 19 associées aux torsions.

A partir de ces coordonnées internes, nous avons construit la matrice U, matrice permettant d'accéder aux coordonnées de symétrie. Pour obtenir les coordonnées de symétrie, nous avons éliminé les redondances suivantes:

- les 6 associées au cycle pyranique et les 5 associées aux carbones tétraédriques de ce cycle,
- La redondance associée au groupement CH<sub>2</sub>OH,
- Les redondances associées au groupement CH<sub>3</sub>,
- Les 5 redondances associées aux mouvements hors du plan.

Les autres coordonnées de symétrie de la matrice U sont diagonales et correspondent aux coordonnées internes restantes.

Pour retrouver les 14 liaisons hydrogène dont deux intramoléculaires du cristal, nous avons pris en compte les 26 mailles entourant celles de référence.

Pour le calcul des interactions non liantes et coulombiques effectué pour les 27 mailles, la distance de coupure maximale  $d_{\max}$  est identique aux calculs précédents soit 12 Å.

Les distances de coupures  $R_{\min}$  de cette molécule sont présentées dans le tableau 1 suivant:

Tableau 1: *Distances de coupures minimales.*

type	Rmin
C---C	2.9
C---O	2.45
C---H	2.15
O---O	2.22
O---H	2.08
H---H	1.8
C---N	2.47
N---N	2.45
N---O	2.31
N---H	2.02

Les paramètres de la fonction Buckingham utilisés sont également identiques aux études précédentes (cf. page 108).

Les charges résiduelles associées à chaque atome sont obtenues à partir d'un calcul semi-empiriques de type MNDO (8). Les charges ainsi obtenues sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2: *Charges résiduelles calculées pour chaque atome.*

Atome	Charge	Atome	Charge
C1	0.2896	C9	0.3460
C2	0.0843	C10	0.009
C3	0.1030	C11	-0.0567
C4	0.1027	C12	0.3507
C5	0.0588	O9	-0.3927
C6	0.2170	O12	-0.5015
C7	0.3090	O13	-0.5432
C8	0.0601	N1	-0.3671
O3	-0.2516	N11	0.1124
O4	-0.3305	HN1	0.1888
O5	-0.3040	HN11	0.1959
O6	-0.3465	HN11	0.1212
O7	-0.3557	HN11	0.2424
N2	-0.3736	HC10	0.0597
HN2	0.1598	HC10	0.0229
HO3	0.1606	HC11	0.0463
HO4	0.1941	OW	-0.3666
HO6	0.1792	OW	-0.3519
HC1	0.0235	OW	-0.3233
HC2	0.0594	HOW	0.1676
HC3	0.0071	HOW	0.1968
HC4	0.0446	HOW	0.1623
HC5	0.0218	HOW	0.1948
HC61	-0.0104	HOW	0.1518
HC62	0.0477	HOW	0.1610
HC81	0.0405		
HC82	0.0170		
HC83	-0.0340		

### III. Résultats de la dynamique harmonique:

Les fréquences calculées de chaque espèce de symétrie, à partir du programme C.V.O.A. (9) sont données et comparées aux fréquences observées en spectroscopies Raman et infrarouge.

L'ensemble des constantes de forces intramoléculaires, obtenues après raffinement, sont présentées ci-dessous:

Tableau 3. Valeurs des constantes de forces intramoléculaires GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn

#### Constantes d'élongations

élongations	$K_B$ (mdyne/Å)	$K_B$ (kcal/mole. Å)
CyCy	2.8	201.4
C5C6	2.45	176.23
C7C8	2.1	151.05
C9C10	2.55	183.42
C10C11	2.00	140.86
C5O5	2.9	208.6
C1O5	2.8	201.4
C12-O	7.95	571.24
C9=O9	8.00	575.44
C7=O7	8.35	600.6
C6O6	3.3	237.3
CcyO	2.95	212.2
CH	4.01	288.44
C6H	3.98	286.28
C8H	4.45	318.49
OH	6.11	439.5
O6H	6.03	433.7
OWH	7.00	503.51
N2H	5.28	380.1
N1H	5.28	379.8
N11H	5.20	365.65
C2N2	4.04	290.6
C1N1	4.96	356.8
C9N1	5.30	381.23
C11N11	2.1	151.00
C7N2	5.00	359.6

#### Mouvements hors du plan

Opb	W (mdyne/Å)	W (kcal/mol)
N1H	0.218	15.68
N2H	0.23	16.54
C7O7	0.765	55.02
C9O9	0.746	53.66
C12O12	0.723	52.00

Angles de valence

angle	H mdync/Å	H Kcal/mol.Å.rad <sup>2</sup>	F mdync/Å	F Kcal/mol.Å.rad <sup>2</sup>
CcyCcyCcy	0.32	53.8	0.18	12.95
C4C5C6	0.25	41.71	0.17	12.22
CCC	0.28	47.32	0.33	23.74
OCH	0.17	18.7	0.388	27.9
C7CH	0.193	22.65	0.51	36.68
C2C3H	0.16	17.7	0.37	26.6
C5C6H	0.21	22.8	0.45	32.37
C6C5H	0.20	21.72	0.48	34.52
C9C10H	0.185	18.41	0.48	34.52
C10C11H	0.17	16.70	0.47	33.8
C11C10H	0.18	17.68	0.47	33.8
C3C4O4	0.40	62.87	0.655	47.11
CCO5	0.5	79.93	0.8	57.5
CCO	0.24	37.7	0.48	34.50
C5C6O	0.28	43.18	0.55	39.56
C6C5O5	0.2	31.49	0.45	28.77
C10C9O9	0.5	66.33	0.7	50.30
C11C12O12	0.20	27.82	0.50	35.96
C11C12O13	0.24	32.98	0.5	35.96
C8C7=O	0.44	58.000	0.88	63.3
C5O1C1	0.7	103.7	0.58	41.72
COH	0.244	24.55	0.616	44.3
C6OH	0.32	22.40	0.60	43.1
HCO	0.24	24.67	0.64	46.03
HC1O5	0.21	21.5	0.635	45.67
HC5O5	0.22	22.62	0.55	39.11
HC6H	0.38	27.33	0.07	5.035
HC8H	0.37	31.62	0.07	5.035
HC10H	0.33	19.22	0.07	5.035
HOH	0.53	36.95	0.50	36.12
CyC2N	0.145	23.14	0.24	17.26
C8C7N	0.035	5.02	0.35	25.17
C2C1N1	0.25	39.52	0.35	25.17
C10C9N1	0.4	60.05	0.6	43.16
C10C11N11	0.37	59.27	0.46	33.08
C12C11N11	0.31	50.80	0.4	28.77
C2NH	0.14	12.13	0.28	20.14
C7NH	0.256	20.34	0.448	32.22
C1NH	0.3	27.02	0.5	35.96
C9NH	0.4	33.95	0.6	43.16
C11NH	0.267	24.88	0.47	33.8
C1NC9	0.325	45.75	0.28	20.14
C2NC7	0.365	50.7	0.28	20.14
N2C7O7	0.5	58.77	0.8	57.54
NC9O9	0.43	50.4	0.7	50.35
N1C1O5	0.5	73.8	0.7	50.35
HC2N2	0.296	30.97	0.50	35.96
HC1N1	0.28	26.99	0.49	35.24
HC11N11	0.287	26.73	0.51	36.68
O=C-O	0.06	6.62	2.2	158.24
HNH	0.47	33.38	0.02	1.43

Tableau 3-suite

Angles de torsions

torsions	Y (mdyne.Å)	Y ( kcal/mol)
CcyCcy	0.1	3.2
C5C6	0.09	1.96
C7C8	0.0345	2.48
C-C	0.18	5.75
C5O	0.0615	1.96
C1O1	0.146	4.66
C3O3	0.046	1.47
C4O4	0.024	0.76
C6O	0.058	1.85
C2N	0.003	0.215
C7N2	0.23	16.54
C1N1	0.166	11.94
C9N1	0.456	32.8
C11N11	0.106	7.62

Tensions intramoléculaires

kappa	K (mdyne.Å)	K kcal/mol
C1	0.09	6.47
C	0.10	7.19
C8	-0.08	-5.75
C10	-0.02	-1.14
C11	0.185	13.3
N11	-0.06	-4.31

Les facteurs de conversion entre les constantes de forces en mdyne/Å et en kcal/mole sont identiques à ceux définis dans le chapitre 3.

Une attribution de chaque mode normal de vibration est donnée pour la molécule dans le tableau 4 à partir de la distribution d'énergie potentielle des différentes coordonnées internes ou de symétrie pour les groupes CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub>OH et les mouvements hors du plan.

Pour la région des basses fréquences, la description est également faite avec les coordonnées externes Ra, Rb, Rc Tx, Ty, Tz.

Tableau 4: Résultats et hypothèse de vibrations des modes normaux de GlcNAc( $\beta$ 1-N)-Asn

Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	A	B	
3450		3703	3703	OH H2O (98%)
		3692	3692	OH H2O (98%)
		3673	3673	OH H2O (98%)
		3611	3611	OH H2O (98%)
		3601	3601	OH H2O (98%)
		3579	3579	OH H2O (98%)
		3443	3443	O4H (99%)
		3409	3409	O6H (66%) + O3H (34%)
		3397	3397	O3H (66%) + O6H (34%)
		3316	3316	N1H (99%)
		3292	3391	N2H (99%)
		3220	3229	TS N11H (98%)
			3152	DS N11H (54%) + DS' N11H (43%)
			3075	DS' N11H (58%) + DS' N11H (32%)
		2970	2968	CH <sub>3</sub> DS' (73%) + CH <sub>3</sub> DS (26%)
2958	2961	CH <sub>3</sub> DS (73%) + CH <sub>3</sub> 'DS (26%)		
2930		2949	2949	C5H (99%)
		2927	2927	C1H (98%)
		2916	2918	C4H (97%)
		2903	2903	CH <sub>3</sub> TS (99%)
		2895	2895	C11H (97%)
		2893	2893	C3H (96%)
		2881	2881	C2H (97%)
		2866	2872	CH <sub>2</sub> VA (99%)
			2848	C10H (99%)
		2842		2839
2823	2823			CH <sub>2</sub> VS (99%)
1706	1706			C12O12 (70%) + C12O13 (25%)
1652	1652	1648	1648	C9=O9 (50%) + N1C9 (22%)
	1638	1642	1642	HC2N2 (25%) + C9O9 (16%)

Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions	
Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	A	B		
1603	1619	1635	1635	C9O9 (52%) + N1C9 (29%)	
		1634	1634	HC11N (23%) + HNH (35%) + C11NH (11%)	
		1630	1630	HOH (98)	
		1620	1620	HC1N (32%) + C1NH (22%) + HOH (12%)	
		1618	1618	HOH (58%) + C1NH (32%)	
		1606	1606	C7O7 (55%) + NC7 (14%)	
		1586	1586	HC11N (47%) + C11NH (19%)	
		1583	1583	HC2N (31%) + C3C2H (18%) + C2C3H (12%)	
1555	1554 1502	1576	1576	C6C5H (26%) + HC5O5 (22%) + C1NH (12%)	
		1553	1553	HC1N (40%)	
		1498	1498	C4C5H (41%) + C6OH (36%) + C6C5H (17%)	
		1490	1490	C11NH (61%) + HC11N (20%)	
		1486	1486	C3C2H (52%) + C1C2H (45%)	
		1475	1475	C6OH (51%) + C4C5H (27%) + HC5O5 (14%)	
		1470	1470	HC4O4 (36%) + HC5O5 (14%) + C1C2H (14%)	
		1455	1455	CH <sub>2</sub> SCI (66%)	
1451	1432	1450	1450	C7NH (38%) + C2NH (31%)	
1432		1426	1426	C2C3H (48%) + C4C3H (33%)	
1420		1420	1420	C4C5H (43%) + C3C4H (38%)	
		1406	1406	C11C10H (74%) + C9C10H (20%)	
1381		1416	1398	1398	HC1O5 (42%) + C2C1H (38%)
			1387	1387	CH <sub>3</sub> DD (57%) + CH <sub>3</sub> DD' (23%)
			1384	1384	CH <sub>3</sub> DD' (46%) + CH <sub>3</sub> DD (36%)
			1381	1381	C6C5H (24%) + HC6O6 (21%) + C12C11H (13%)
1360	1383	1379	1379	C12C11H (38%) + C1011H (24%)	
		1374	1374	C1N1 (30%) + C9N1 (11%)	
		1356	1356	C2C3H (48%) + C4C3H (33%)	
1350	1349	1348	1348	C12O12 (32%) + C12O13 (34%)	
1323		1318	1318	C3COH (82%)	
1315	1316	1311	1311	C11C10H (47%) + C9C10H (40%)	
		1303	1303	C7N2 (25%) + C7C8H (18%) + C2NH (15%)	
1302	1303	1301	1301	HC10H (55%) + C9C10H (33%)	
		1286	1286	C11N11H (30%) + HN11H (15%) + C12C11H (10%)	

Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions
Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	A	B	
1272		1267	1267	C9C10 (26%) + C9N1 (18%) + C1N1 (17%)
1258	1262	1255	1255	CH2TW (47%) + CH2WA (20%)
1233	1228	1227	1227	C11N11H (46%) + HN11H (9%)
1208		1208	1208	C4OH (30%) + C3C4H (10%)
1191	1190	1190	1190	C2N2 (32%) + C1C2 (7%) + C7C8 (6%)
1154		1152	1152	C5C6 (33%) + C6O6 (10%) + C4C5 (9%)
		1137	1137	C2C3 (14%) + C5O5 (10%)
1126		1126	1126	C1C2 (22%) + C5O5 (7%)
1110	1113	1108	1108	C4O4 (14%) + C2C3 (11%)
		1193	1093	C5O5 (12%) + C2C3 (11%)
1080		1078	1078	C4C5 (22%) + C5O5 (13%) + C2C3 (12%)
1072	1072	1067	1067	C1N11 (29%) + C10C11 (15%)
		1057	1057	CH <sub>3</sub> DR (35%) + CH <sub>3</sub> DR' (11%) + WC7=O (10%)
1054	1051	1054	1054	W N1H (15%) + C1O1 (8%) + C3C4 (7%)
1042	1044	1044	1044	C3C4 (28%) + C3O3 (15%) + C4O4 (10%)
		1022	1022	W N1H (20%) + C4O4 (12%) + C1O5 (9%)
1017		1016	1016	C1O5 (18%) + C3O3 (9%) + C10C11 (8%)
		1007	1007	C10C11 (13%) + C3O3 (12%)
	1002	997	997	CH3 DS (50%) + CH3 DD' (11%)
984	988	984	984	W N1H (21%) + C9N1 (26%) + C1N1 (22%)
966	967	969	969	W N2H (21%) + C2N2 (21%)
957	958	955	955	C6O6 (19%) + C5C6 (16%) + C3O3 (10%)
945	945	952	952	C11C12 (19%) + To C9C10 (9%) + To C10C11 (8%)
		915	916	W N2H (20%)
		910	910	To C6O6 (56%)
		905	905	CH <sub>2</sub> Ro (58%)
883		880	880	To C9C10 (23%) + C11N11 (13%)
865	865	865	865	To C4O4 (56%)
		767	767	W C12=O (18%) + C1N1C9 (11%) + OC12O (9%)
770	765	766	765	To C6O6 (56%)
	744	740	740	W C12=O (22%) + W C9=O (19%)
	720	722	722	W C7=O (21%) + C2C1N1 (10%) + W C9=O (8%)
	700	704	704	W C9=O (33%)



Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions
Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	A	B	
673		672	672	W C7=O (32%) + C2C1N1 (11%)
	666	666	666	W C7=O (21%) + C2C1N1 (10%) + W C9=O (8%)
652		650	650	DF C7=O (26%) + C7C8 (13%)
620	620	622	623	DF C9=O (9%) + DF C12=O (8%) + C2C1O5 (8%)
597		600	599	DF C12=O (12%) + C2C1N1 (8%)
573	574	574	574	O5C1N1 (9%) + C3C4O4 (8%) + C2C1N1 (7%)
546	546	546	545	To C1N1 (8%) + C4C3O3 (6%) + C10C11N11 (6%)
530	530	530	530	To C11N11 (14%) + C10C11N11 (11%) + To C9C10 (9%)
521	522	514	514	C4C5O5 (12%) + To C11N11 (11%) + C8C7O7 (9%)
	496	488	490	C10C11N11 (14%) + To C10C11 (6%)
480	481	480	481	To C10C11 (19%) + C10C11N11 (18%) + C11C12O12 (7%)
460		462	460	C3C4C5 (8%) + To C3O3 (6%) + To C4O4 (6%)
	450	441	440	To C3O3 (19%) + C12C11N11 (6%) + To C4O4 (5%)
437	437	438	437	To C3O3 (31%) + C5C6O6 (6%)
387	387	386	385	To C1N1 (10%) + To C3O3 (8%) + C1C2N2 (7%)
370	373	372	374	C12C11N11 (26%) + C11C12O13 (14%) + To C11N (8%)
		365	365	C5C4O4 (25%) + C2C3O3 (6%) + To C4O4 (6%)
	337	343	341	To C5C6 (19%) + C4C5C6 (16%) + C6C5O5 (9%)
325		329	333	To C9C10 (13%) + W N1H (7%) + C3C4O4 (5%)
315		319	319	C1C2N2 (18%) + C2C3O3 (12%) + C3C2ON (11%)
303		303	304	C9C10C11 (9%) + C1N1C9 (8%) + C12C1N1 (6%)
		293	286	C6C5O5 (8%) + C4C5C6 (7%) + C3C4O4 (7%)
	274	271	275	To C9C10 (15%) + W N1H (10%) + To C9N1 (6%)
		243	244	C10C11C12 (9%) + C2C1N1 (8%) + C3C2N2 (6%)
	220	221	224	To C9C10 (40%) + To C11C12 (9%) + To C1N1 (6%)
		216	212	To C9C10 (16%) + To C1N1 (15%) + To C5C6 (14%)
			207	To C1N (16%) + To C7C8 (10%)
	197	198		To C1N (11%) + To C9N1 (8%) + To C5O5 (6%)
		192	191	To C11C12 (19%) + To C10C11 (16%) + To C7C8 (13%)
185	189	188	189	To C7C8 (41%)
			180	To C7C8 (59%) + C11C12 (18%)
		175		To C10C11 (28%) + C5O5 (23%)
170		172		To C7N (14%) + To C1N1 (10%) + To C5C6 (10%)

Fréquences observées		Fréquences calculées		Attributions
Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	A	B	
164	161	163	164	To C7N (45%) + To C11C12 (9%) + To C4O4 (9%)
157		158	159	To C4O4 (39%) + To C10O11 (13%) + To C2C3 (8%)
147			146	To CcyCcy (32%) + To C4O4 (18%)
			140	To C10C11 (34%) + To C11C12 (18%) + To C9N1 (12%)
135			142	To C1N1 (30%) + To CcyCcy (18%)
129			134	To C1N1 (40%) + To C9C10 (20%)
122			130	To C1N1 (18%) + To C9C10 (18%) + To C5C6 (8%)
115			119	RC (17%) + To C2N (13%) + To C1N1 (12%) + To C9C10 (7%)
111			113	To C9C10 (17%) + To C2N (16%) + RB
100			106	To C5C6 (7%) + To C7N (7%) + To C9C10 (7%) + To C5O5 (6%)
94			96	To C1N1 (38%) + To C9C10 (32%)
81			92	To C1N1 (38%) + To C9C10 (32%)
76			91	To C2C3 (22%) + To C9N1 (13%) + To C1C2 (11%)
65			81	RA (46%) + To C2N (16%) + To C5C6 (10%)
60			77	RC (28%) + To C9C10 (22%) + To C1N (11%)
		67	TZ (14%) + To CcyCcy (12%)	
		66	TZ (38%) + RB (31%)	
		60	RB (39%) + TX (12%) + RC (7%)	
44		52	TX (43%) + TY (15%) + RA (10%) + RB (9%)	
32		42	TX (34%) + TY (30%) + RC (10%) + RB (9%)	
25		34		
		28		

Les abréviations utilisées sont identiques à celles utilisées dans les tableaux d'attribution du chapitre 3

## IV. Discussion des résultats de la dynamique harmonique:

### IV.1. Champ de forces:

Les calculs des modes normaux de vibration réalisés ici donnent de bons résultats. En effet, la déviation standard entre les fréquences observées et les fréquences calculées correspondantes est inférieure à  $3,1 \text{ cm}^{-1}$ .

La comparaison des constantes de forces finales obtenues pour cette molécule et celles de départ de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine (3), et de l'asparagine (7) montre qu'il n'existe pas de différences importantes dans leurs valeurs numériques.

Les constantes de forces intermoléculaires sont semblables à celles obtenues pour les quatre molécules précédentes. Aucun traitement spécial ne fut appliqué aux constantes de forces associées aux atomes liants la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine à l'asparagine.

### IV.2. Attributions des fréquences:

Les vibrations, associées à la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine précédemment étudiées, sont couplées avec celles de l'asparagine qui lui est lié.

#### IV.2.1. Hautes fréquences:

Nous retrouvons tout d'abord les vibrations OH associées aux molécules d'eau, puis les modes de valence O-H des groupements COH du monosaccharide. Ces fréquences sont calculées et observées comme pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine entre  $3500$  et  $3300 \text{ cm}^{-1}$ . Les liaisons hydrogène intermoléculaires contribuent fortement à ces fréquences.

Les bandes suivantes correspondent aux élongations N-H (N secondaires puis N tertiaires). Ces bandes sont retrouvées exactement dans les mêmes zones que dans le cas de la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine et de l'asparagine, c'est à dire entre  $3320$  et  $3290 \text{ cm}^{-1}$  pour les N tertiaires et entre  $3220$  et  $3060$  pour le N quaternaire.

Les modes de valence C-H sont calculés entre  $2970$  et  $2823 \text{ cm}^{-1}$  et observés entre  $2970$  et  $2842 \text{ cm}^{-1}$ .

#### IV.2.2. Domaine spectral 1800-1200 cm<sup>-1</sup>

Tout d'abord, comme pour les acides N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique et N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique, nous retrouvons la vibration associée aux élongations du groupement carboxylique à 1706 cm<sup>-1</sup>.

Puis de 1652 à 1586 cm<sup>-1</sup> sont retrouvées majoritairement les vibrations existantes autour des groupements NH, C=O et COO, et celles associées aux trois molécules d'eau contenues dans la maille.

Enfin viennent s'associer les déformations de types HCO, HCH, COH, CCH. Les contributions de ces groupements sont retrouvées dans les mêmes régions que pour les molécules précédentes.

#### IV.2.3. Région 1200-1000 cm<sup>-1</sup>

Dans cette région, très fortement couplée, sont principalement trouvées les déformations des liaisons C-O, C-C, et C-N, couplées avec les déformations angulaires COH, HCH et CCH.

#### IV.2.4. Domaine 1000-700 cm<sup>-1</sup>

15 bandes sont observées et calculées dans cette région. Les couplages sont encore ici très importants entre les atomes des groupements carboxyliques et ceux des groupements acétamido. Les vibrations caractéristiques de l'anométrie sont difficilement repérables du fait du très grand couplage et des faibles contributions des différents groupements. Comme pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, il faut noter la très forte contribution de deux torsions C-O exocycliques associées à des liaisons hydrogènes à 865 et 765 cm<sup>-1</sup>.

#### IV.2.5. Région 700-200 cm<sup>-1</sup>

Dans une première zone de 700-600 cm<sup>-1</sup> interviennent principalement les déformations dues aux mouvements hors du plan associées aux groupements NH et C=O. Puis on observe un couplage entre les déformations angulaires de type CCC, OCO, CCO, COC, CNC, CCN, et les torsions exocycliques C-O, C-C, C-N.

#### IV.2.6. Domaine des basses fréquences.

C'est une région fortement couplée entre les modes de vibration intramoléculaires composés principalement des torsions de type C-C et C-N et les modes intermoléculaires.

### **V. Conclusion sur la dynamique harmonique de la liaison N-glycosidique:**

Nous avons reproduit les données spectroscopiques vibrationnelles de la liaison N-glycosidique à partir de la fonction potentielle Urey-Bradley-Shimanouchi modifiée. Cette fonction potentielle permet donc d'étudier aussi bien les monosaccharides que les acides aminés. Nous avons donc ainsi établi des paramètres de la liaison N-glycosidique qui seront le point de départ pour des études en dynamique moléculaire de fractions de glycoprotéines, permettant ainsi de mieux appréhender le rôle des glycannes et en particuliers de N-glycannes dans les glycoprotéines.

# Bibliographie

du

Chapitre 4



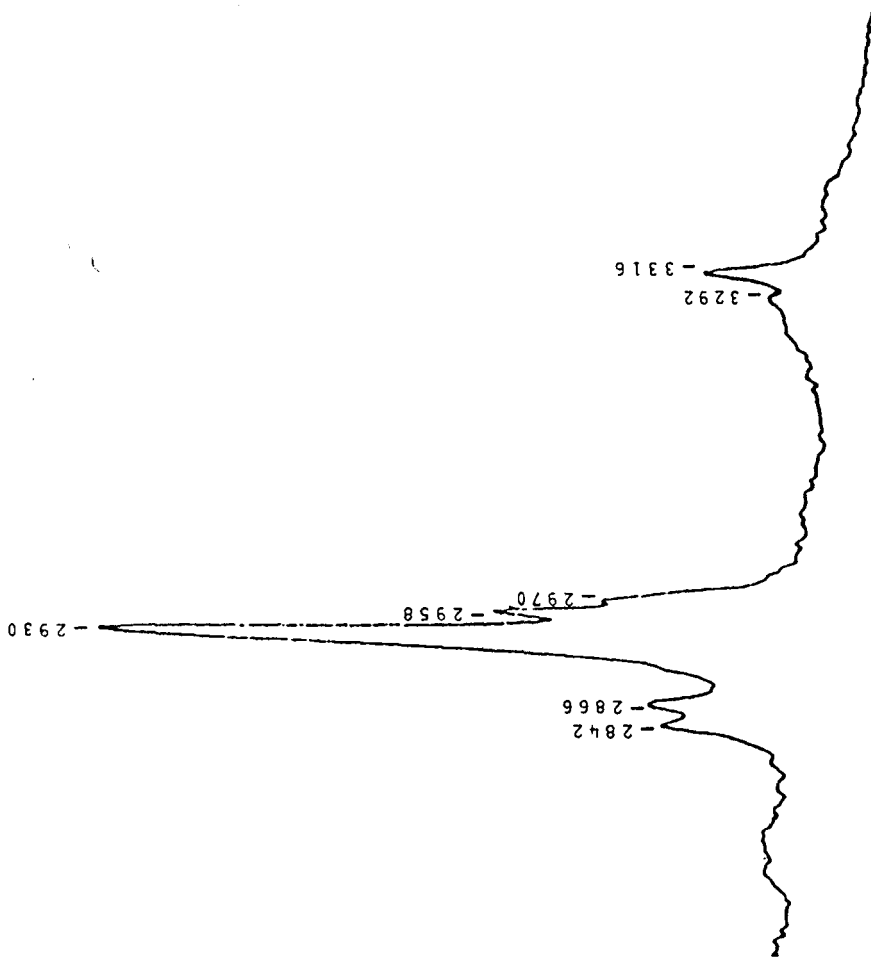
- 1) Dauchez M. (1990)  
Elaboration d'une base de paramètres de la fonction énergie potentielle empirique de saccharides en vue de son utilisation en mécanique moléculaire et dynamique moléculaire de glycannes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 2) Sekkal M. (1990)  
Utilisation conjointe de la spectrométrie IRTF et de la modélisation moléculaire à l'étude structurale des carraghenanes.  
Thèse de Doctorat, Lille I
- 3) Kouach-Alix I., Vergoten G. (1994)  
A vibrational molecular force field of model compounds with biological interest. V. Harmonic dynamic of N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine in the crytalline state.  
J. Molecular Struct. sous presse
- 4) Kouach-Alix I., Dauchez M., Sekkal M., Vergoten G. (1994)  
A vibrational molecular force field of model compounds with biological interest. VI. Harmonic dynamic of methyl- $\alpha$ -D-mannoside in the crytalline state.  
J. Raman Spectr. accepté pour publication
- 5) Kouach-Alix I., Vergoten G. (1994)  
A vibrational molecular force field of model compounds with biological interest. VII. Harmonic dynamics of N-acetyl- $\alpha$ -D-muramic acid and N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminic acid in the crytalline state.  
J. Molecular Struct. soumis pour publication
- 6) Belaïcha M.  
Communication personnelle
- 7) Delbaere L.T. (1974)  
The molecular and crystal structures of 4-N-(2acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-Asparagine trihydrate and 4-N-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparagine monohydrate.  
Biochem J. 143, 197-205
- 8) Dewar M.J.S., Thiel W. (1977)  
Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters.  
J. Am. Chem. Soc. 99, 4899-4907
- 9) Takeuchi H. (1975)  
PhD Thesis, Tokyo, Japan

Annexe

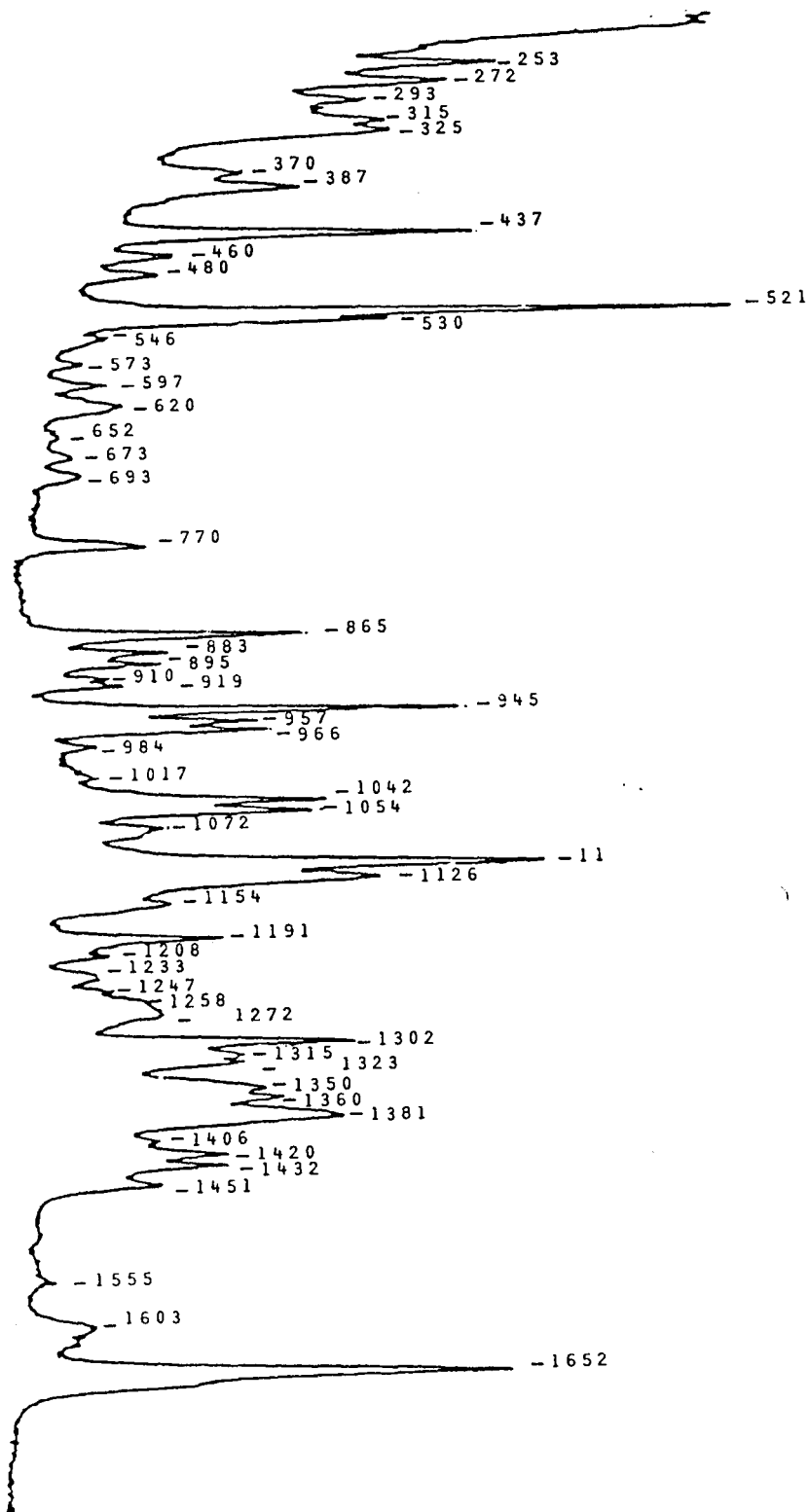
du

Chapitre 4

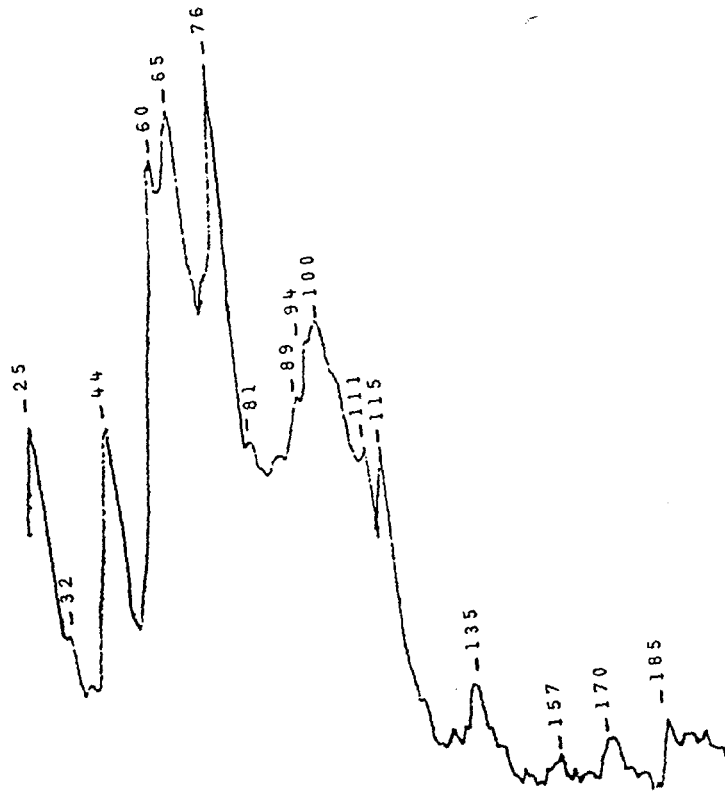




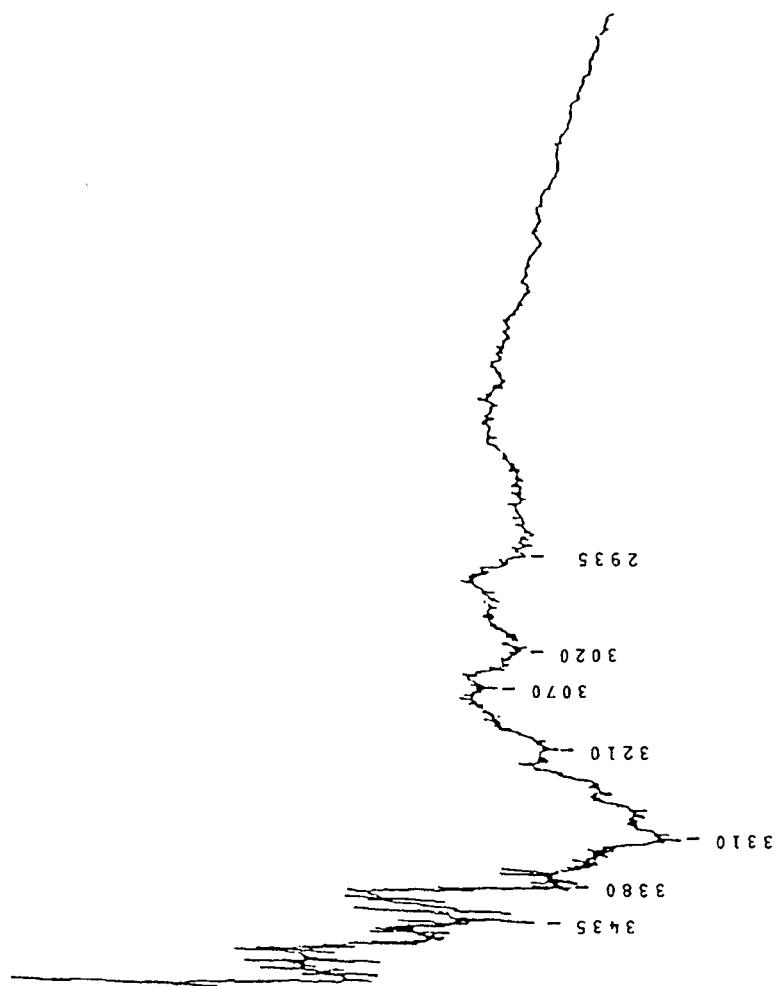
Spectre Raman du cristal de GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn à 300°K.  
Région 3500-2800  $\text{cm}^{-1}$ .



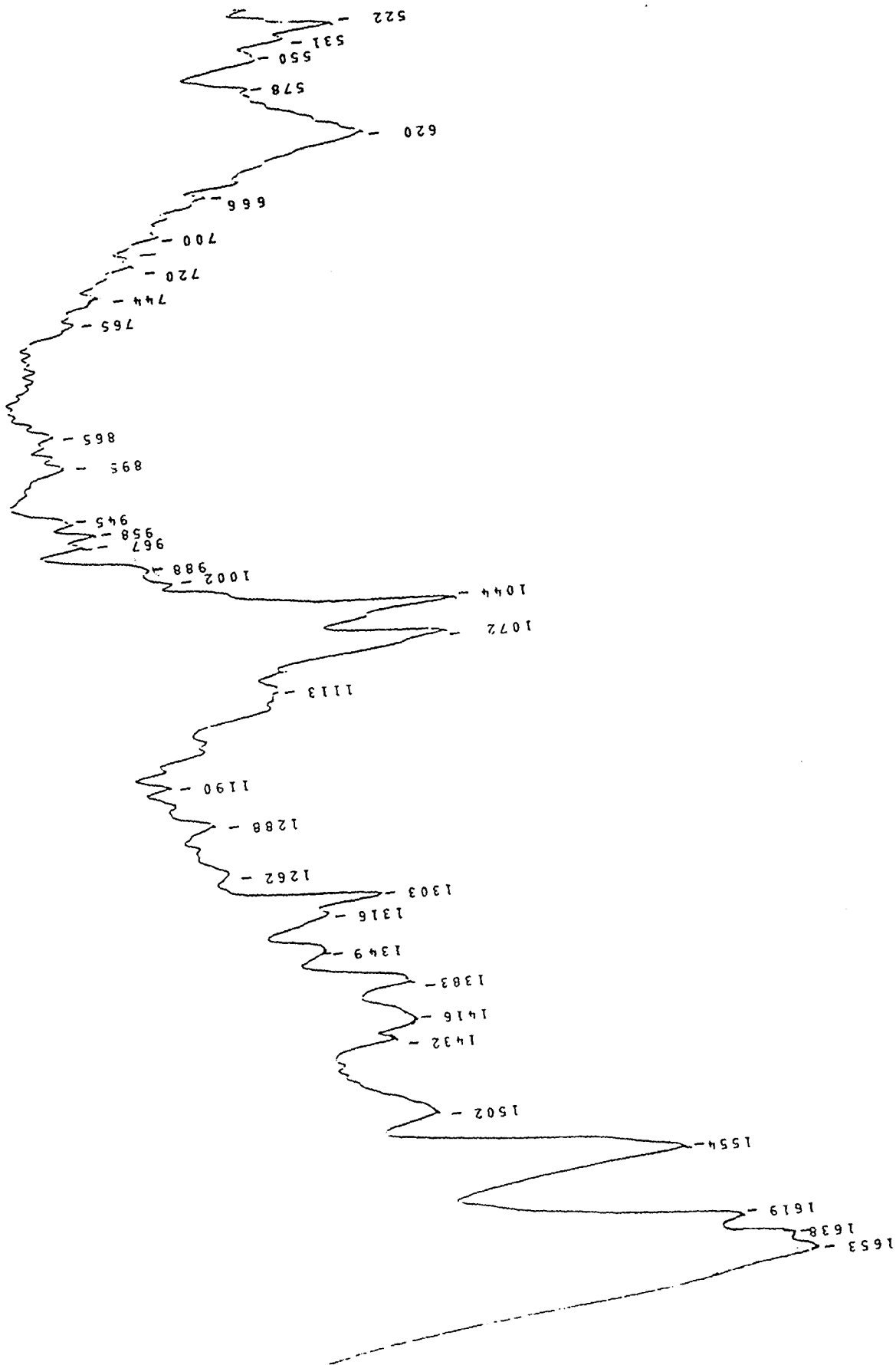
Spectre Raman du cristal de GlcNAc(B1-N)Asn à 300°K.  
 Région 1700-200 cm<sup>-1</sup>.



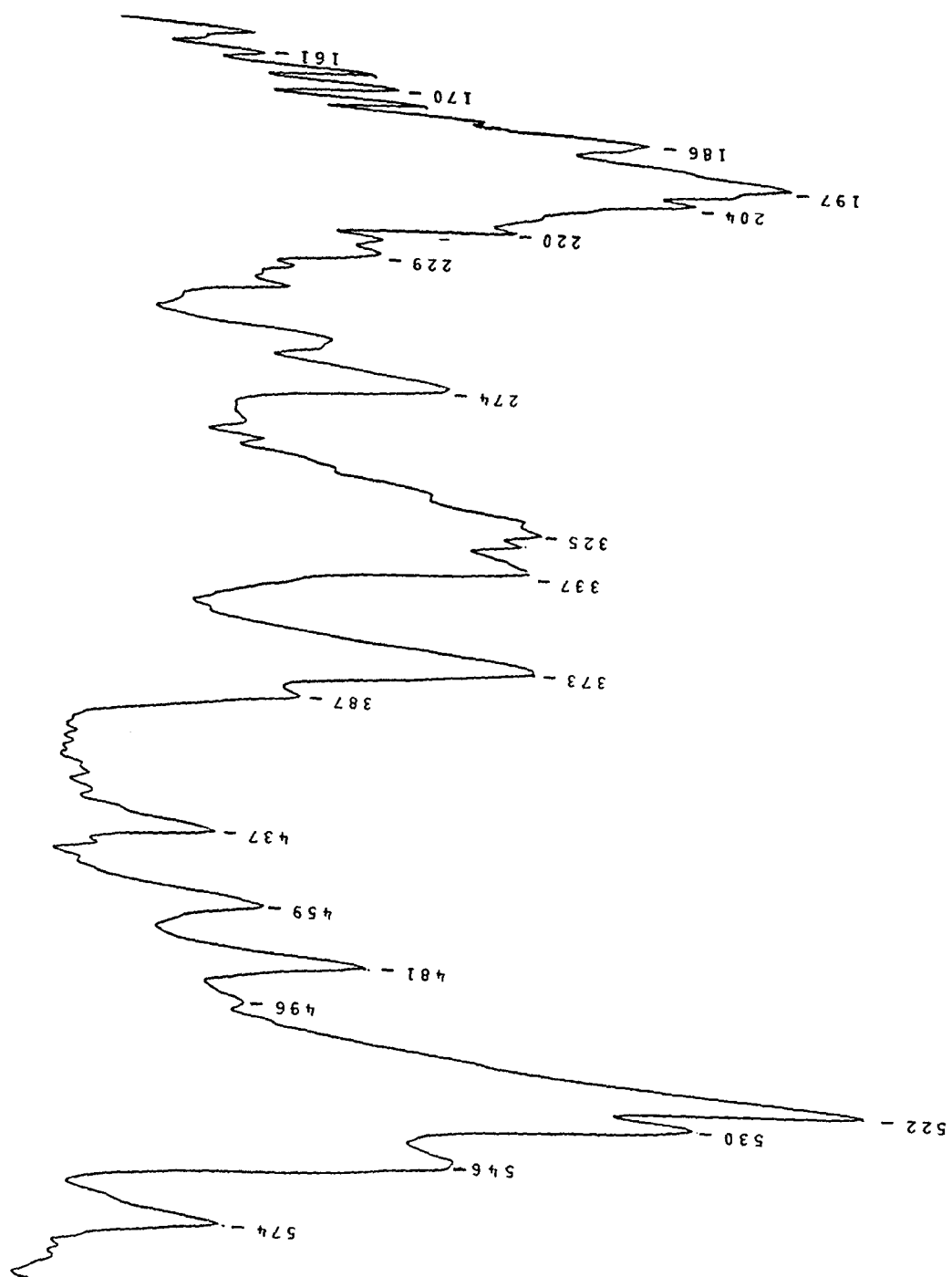
Spectre Raman du cristal de GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn à 300°K.  
Région 200-20 cm<sup>-1</sup>.



Specre infrarouge du cristal de GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn à 300°K.  
Région 2800-3500  $\text{cm}^{-1}$ .



Spectre infrarouge du cristal de GlnNac( $\beta$ 1-N)Asn à 300°K.  
 Région 1500-500  $\text{cm}^{-1}$ .



Spectre infrarouge du cristal de GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn à 300°K.  
Région 500-150  $\text{cm}^{-1}$ .



## Chapitre 5

# UTILISATION DU CHAMP DE FORCES SPASIBA POUR DES ETUDES DE DYNAMIQUE HARMONIQUE ET DES SIMULATIONS DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE DE SACCHARIDES

## I. Introduction:

Le champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi (UBS) (1) utilisé dans les deux chapitres précédents permet une très bonne reproduction des spectres de vibrations des molécules, mais le programme C.V.O.A. (2) qui utilise ce champ de forces ne permet pas sous sa forme actuelle d'aborder des dynamiques moléculaires. C'est pour pallier cet inconvénient qu'a été créé le programme SPASIBA ou "Spectroscopic Potential Algorithm for SIMulating Biomolecular Adaptability" (3).

Ce programme combine les champs de forces UBS et AMBER (4) (cf. chapitre 2 pages 70-71)

SPASIBA a déjà été testé en dynamique harmonique sur les alcanes (5-6) et les acides (7). Il reproduit de manière satisfaisante les spectres de vibrations puisque la déviation standard entre les fréquences observées et calculées est de  $13 \text{ cm}^{-1}$  avec utilisation de seulement 18 constantes de forces différentes pour les alcanes. Cet écart est du même ordre que les résultats obtenus par Lifson et Stern (8) et bien meilleur que ceux donnés avec le champ de forces de Discover (9). Ce dernier permet d'obtenir des déviations standards de  $26 \text{ cm}^{-1}$  pour le butane,  $30 \text{ cm}^{-1}$  pour l'éthane et  $19 \text{ cm}^{-1}$  pour l'isobutane (8).

Une étude de dynamique moléculaire du n-octane, permettant de retrouver pour la première fois les populations de conformères trans et gauche obtenus expérimentalement (10), a aussi été réalisée (11).

Des paramètres ont été aussi développés pour les acides aminés (12), permettant la réalisation d'une dynamique sur un peptide de 28 résidus (12).

Les paramètres déterminés pour la N-acétyl-glucosamine (13) avec le champ de force Urey-Bradley-Shimanouchi (1) modifié ont été introduits dans SPASIBA (3). A partir de cet ensemble de paramètres, nous avons reproduit les spectres de vibration du N,N'-diacétylchitobiose, dimère en  $\beta 1-4$  de la N-acétyl-glucosamine. Puis, des études de dynamiques moléculaires dans différentes conditions de ce disaccharide ont été abordées.

Enfin une étude dynamique d'un substrat du lysozyme, l'hexamère  $[\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}]_3$ , de 64 ps a été réalisée.



## II. Dynamique harmonique de la N-acétyl-glucosamine:

### II.1. Conditions de calcul:

Le champ de force SPASIBA (3) utilise la même définition des constantes de forces intramoléculaires que le champ Urey-Bradley-Shimanouchi modifié sauf pour les constantes de forces liées aux torsions:

pour le champ de forces UBS:  $V_{\text{(torsion)}} = 1/2 \sum Y_{il} (\Delta T_{il})^2$

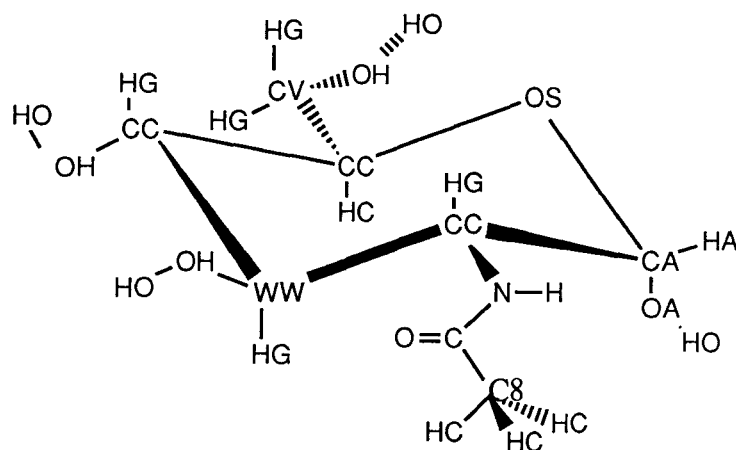
pour le champ de forces SPASIBA  $V_{\text{(torsion)}} = \sum V_n/2 [1 + \cos(n\Phi - \gamma)]$

Cependant les barrières de rotations ou constantes de forces déterminées pour ces dernières doivent être identiques.

La géométrie de référence prise, bien que le calcul soit effectué dans le vide, est celle obtenue par diffractions des rayons X (14). En effet, cette structure ne doit pas être éloignée d'un minimum. Toutefois, à chaque fois que les valeurs des distances C-H et O-H ainsi que les angles de valences attribués au groupement méthyle, donnés par la cristallographie, ne nous semblaient pas correctes, nous avons préféré utiliser les valeurs standards définies par Arnott et Scott (15). Les angles autour du groupement N-H ont été aussi légèrement modifiés de manière à définir un mouvement hors du plan.

Les charges résiduelles associées à chaque atome sont celles obtenues par MNDO (16) et utilisées pour la dynamique harmonique avec le champ de force Urey-Bradley-Shimanouchi modifié (cf. page 109).

Les 30 atomes de la molécule sont alors ainsi définis:



La structure de départ est alors minimisée dans le vide, avec une constante diélectrique  $\epsilon$  égale à 1, tout d'abord par des méthodes aux dérivés premières (méthode "Steepest descent" (17) pendant 20 cycles puis la méthode du gradient conjugué (18) pendant 1200 autres cycles). On utilise ensuite une méthode aux dérivées secondes de type quasi-Newton-Raphson (19).

La dynamique harmonique est alors effectuée dans le vide, avec un potentiel d'interactions non liantes de type Lennard-Jones, les paramètres de ce potentiel étant pris dans la littérature.

Nous avons alors modifié certains paramètres de départ pour obtenir une bonne reproduction de la géométrie et des spectres de vibration.

Pour obtenir une bonne reproduction de la géométrie, nous avons modifié uniquement la phase  $\gamma$  des torsions intervenant au niveau des groupements hydroxyles. En effet, il était impossible d'obtenir une bonne valeur des angles de torsions CC-WW-OH-HO avec une phase à  $0^\circ$  tandis qu'une valeur à  $180^\circ$  reproduisait la géométrie désirée. Par soucis d'homogénéité, nous avons donc mis toutes les phases des torsions liées aux groupement de type C-C-OH-HO à  $180^\circ$ , sans conséquence pour les autres torsions du même type.

Pour avoir une très bonne reproduction des spectres de vibrations, nous avons, dans un premier temps, modifié légèrement certaines valeurs des barrières de rotation. Cependant les variations entre les spectres ainsi calculés et ceux observés ont pour origine des interactions intermoléculaires de types liaisons hydrogènes non prises en compte dans les conditions du calcul (calcul dans le vide). Il conviendrait d'envisager plutôt l'introduction de molécules d'eau pour reproduire parfaitement les spectres de vibration du cristal de cette molécule.

## II.2. Résultats et discussions

### II.2.1. Résultats

Les déviations standards ou écarts types et les valeurs de RMS entre la géométrie de départ obtenue par diffraction des RX et celle obtenue après minimisation sont résumées dans le tableau suivant:

	liaisons	angles de valence	torsions
déviations standards	0.002 Å	0.64°	0.157°
valeurs de RMS	0.043 Å	0.80°	0.397°

Le tableau suivant donne les fréquences calculées et les compare aux fréquences observées.

fréquences observées			fréquences calculées			fréquences observées			fréquences calculées		
cm <sup>-1</sup>		cm <sup>-1</sup>	cm <sup>-1</sup>		cm <sup>-1</sup>	cm <sup>-1</sup>		cm <sup>-1</sup>	cm <sup>-1</sup>		
IR	Raman		IR	Raman		IR	Raman		IR	Raman	
		3397		1360	1357	730	730	729			
3385	3392	3394	1348	1349	1345		699	695			
3360		3374	1330	1330	1326		628	630			
3326	3327	3334	1322	1321	1318		618	615			
		3267	1290	1291	1288	578	577	578			
	2994	2983			1288	555	552	558			
2940	2938	2942		1278	1283	528	528	532			
2931		2936			1269		511	514			
2912	2910	2910		1256	1253			502			
		2900			1237		481	490			
2895	2894	2887		1206	1211		463	460			
		2881			1177		416	419			
		2879	1150	1151	1161		382	385			
		2873	1137	1136	1142		338	347			
	2830	2838	1125	1126	1130		299	295			
1628	1628	1629	1106	1105	1109			291			
1558		1555	1089	1089	1094		286	281			
		1488	1058		1063		266	265			
1474	1473	1475	1041	1036	1042		246	248			
		1468		1028	1030			233			
		1460		1018	1023			166			
		1456	1001	1001	999			161			
		1442		970	977			129			
1431	1429	1430		928	932		115	112			
		1396		914	917		101	104			
	1390	1395	868	864	871		89	89			
1377	1379	1383			813		57	62			
		1371		789	784		44	38			

La déviation standard entre les fréquences observées et les fréquences calculées est de 4.4 cm<sup>-1</sup>.

Les paramètres obtenus pour les torsions sont les suivants:

torsions	Yn/2 en kcal/mole	$\gamma$ (deg)	n
X-AC-CC-X	3.2	0	3
X-CC-CC-X	3.2	0	3
X-CC-WW-X	3.2	0	3
X-CC-CV-X	3.2	0	3
X-C-C8-X	2.8	0	3
X-CC-OS-X	2.57	0	3
X-CA-OS-X	1.9	0	3
X-CA-OA-X	4.5	180	3
X-CC-OH-X	2.9	180	3
X-CV-OH-X	2.1	180	3
X-WW-OH-X	1.1	180	3
X-CC-N-X	0.15	0	3
X-C-N-X	10.5	180	2

### II.2.2. Discussions

Ces valeurs de constantes sont à comparer avec celles obtenues par Homans (20) pour le champ de forces AMBER modifié (Ha *et al.* (21)). Ce champ de forces combine les paramètres déterminés pour les monosaccharides par lui-même et les résultats *ab initio* sur la liaison glycosidique de Wiberg *et al.* (22).

Pour les liaisons de type C-C du cycle pyranique, les constantes de forces sont équivalentes: 214 kcal/mole pour Homans et entre 205-220 kcal/mole dans ce travail.

Pour les liaisons C-O, la valeur déterminée par Homans est bien supérieure aux nôtres: 334 kcal/mole pour Homans et 200 à 280 kcal/mole pour SPASIBA.

Il est à noter que nous avons différencié plus de constantes de forces que Homans dans le but d'obtenir une meilleure reproduction des spectres de vibration.

Pour les liaisons de type O-H les valeurs des constantes de forces sont semblables: 460 kcal/mole pour Homans et entre 430 et 440 pour SPASIBA; tandis que pour la liaison C-H elles sont différentes: 337 kcal/mole pour Homans et 286 kcal/mole pour SPASIBA.

Pour les constantes de forces attribuées aux angles de valence, il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues puisque les champs de forces AMBER et SPASIBA n'utilisent pas les mêmes expressions analytiques.

Quant aux mouvements hors du plan, ils n'ont pas été pris en compte par Homans.

Enfin, les paramètres définis pour les torsions sont très différents. Ainsi pour les torsions de type C-C, la valeur de la barrière de rotation est doublée dans notre étude. De plus, il existe des incohérences dans les travaux de Homans (la barrière de rotation entre le cycle pyranique et le groupement acétamido est prise nulle).

Les valeurs de RMS pour les torsions entre les valeurs calculées et les valeurs déterminées par les rayons X sont de 7.25 à 8.72 pour Homans, alors qu'elle n'est que de 0,397 pour nous.

Les charges résiduelles associées à chaque atome type déterminées par Homans ne permettent pas, une fois introduite dans notre champ de forces SPASIBA, une bonne reproduction à la fois de la géométrie et des spectres de vibration.

Les termes de van der Waals sont identiques pour les deux études puisque pris dans les deux cas directement des travaux de Ha *et al.* (21).

### **II.3. Conclusion:**

Les paramètres déterminés grâce au champ de force Urey-Bradley-Shimanouchi modifié pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine puis introduit dans SPASIBA permet à la fois une bonne reproduction de la géométrie et des spectres de vibrations.

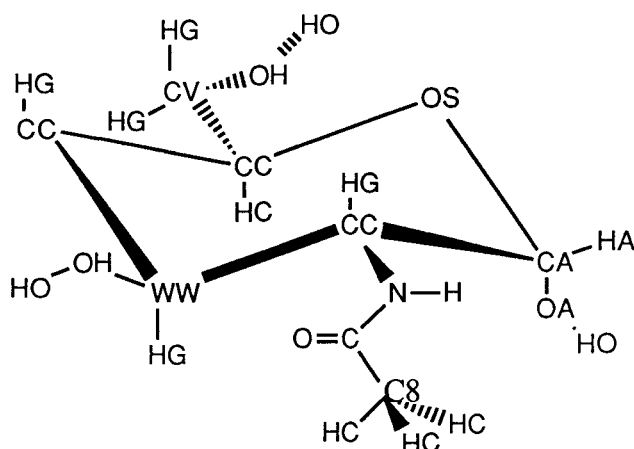
Tous ces paramètres pourront donc être utilisés avec confiance pour réaliser des simulations de dynamique harmonique et dynamique moléculaire de sucres comportant des sous-unités de type N-acétyl-glucosamine.

## **III. Dynamique harmonique du chitobiose:**

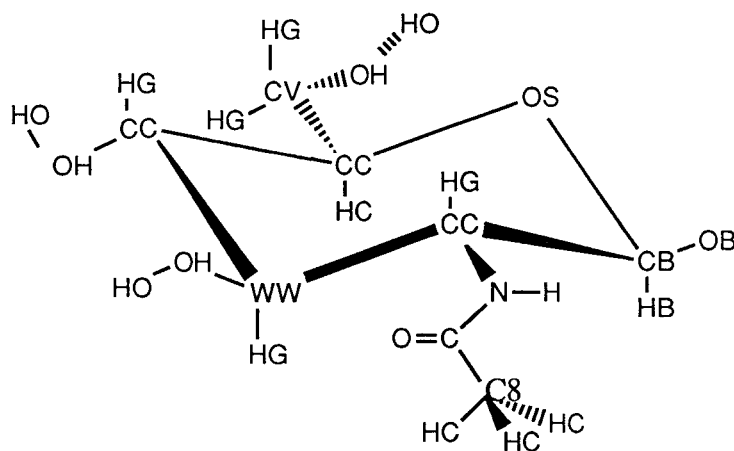
### **III.1. Conditions de calcul**

Pour valider les paramètres obtenus pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, nous avons étudié dans les mêmes conditions ( $\epsilon=1$  dans le vide) un disaccharide en  $\beta$ 1-4 à partir de ce monosaccharide: le chitobiose.

Ce disaccharide a été construit comme deux sous-unités monosaccharidiques: une première en position réductrice appelée NAG1, et une seconde en position non réductrice NAG2. Ces deux unités sont présentées ci-dessous.



sous-unité NAG1



sous-unité NAG2

Le monosaccharide en position réductrice a été choisi sous la forme alpha, nous permettant ainsi de comparer les spectres de vibration calculés avec SPASIBA avec ceux obtenus à partir du cristal du chitobiose de chez Sigma (La Verpillière, France) et présentés en annexe de ce chapitre. En effet, le produit commercialisé par Sigma étant obtenu par la méthode mise au point par Barker *et al.* (23), le monosaccharide en position réductrice est de la forme alpha.

Les constantes de forces de départ sont celles établies pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine pour le monomère NAG1. Pour le second

monomère, nous avons modifié les constantes de forces liées à l'anométrie en utilisant les valeurs déterminées pour le cellobiose, dimère en  $\beta$ 1-4 du glucose (24).

Les charges associées à chaque atome pour les sous-unités NAG1 et NAG2 sont celles déterminées auparavant pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine.

La géométrie du disaccharide ainsi obtenue a été alors minimisée dans les mêmes conditions que la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine.

Les constantes de forces ont été alors très légèrement modifiées (quand cela était nécessaire) de manière à obtenir une très bonne reproduction de la géométrie de la molécule et des spectres de vibrations.

### III.2. Résultats et discussions:

#### III.2.1. Résultats:

Les déviations standards et les valeurs de RMS entre la géométrie de départ correspondant à celle obtenue par diffraction des RX (25) et celle obtenue après minimisation sont les suivants:

	liaisons	angles de valence	torsions
déviations standard	0.013 Å	1.07°	0.208°
valeurs de RMS	0.011 Å	1.04°	0.450°

Les constantes de forces finales sont présentées dans le tableau suivant:

Kappa	Kap (kcal/mole)
CA	3.15
CB	2.15
CC	2.15
WW	2.15
CV	0.755
C8	1.438

mouvement hors du plan	Vn/2 (Kcal/mole)	$\gamma$ (deg)	n
X-X-C-O	10.5	180	2
X-X-N-H	2.00	180	2

liaisons	K (Kcal/mole.Å <sup>2</sup> )	r <sub>0</sub> (Å)
CA-CC	215.	1.534
CB-CC	205.	1.534
CC-CC	215.	1.53
CC-WW	215.	1.525
CC-CV	205.	1.513
C8-C	215.	1.508
CA-OA	220.	1.39
CB-OB	200.	1.394
AC-OS	200.	1.433
BC-OS	200.	1.433
CC-BO	225.	1.448
CC-OH	245.	1.433
WW-OH	245.	1.43
CC-OS	215.	1.448
CV-OH	280.	1.416
C-O	600.	1.235
CA-HA	286.	1.099
CB-HB	286.	1.099
CC-HG	286.	1.099
WW-HG	286.	1.099
CV-HG	286.	1.099
C8-HC	320.	1.110
OA-HO	430.	0.911
OH-HO	440.	0.972
N-H	390.	1.010
CC-N	310.	1.457
C-N	400.	1.346



angle	H(Kcal/ mole.rad <sup>2</sup> )	F (kcal/ mole.Å <sup>2</sup> )	θ <sub>0</sub> (deg)
CA-CC-WW	29.89	32.21	110
CB-CC-WW	26.89	32.21	110
CC-CC-CC	20.1	27.34	110
CC-WW-CC	28.1	34.34	109.8
CC-CC-WW	25.1	28.34	109
CC-CC-CV	23.02	28.76	112
CC-AC-OA	20.389	48.54	108.44
CC-CB-OB	25.77	48.54	108.3
CC-AC-OS	50.16	130.28	109.28
CC-BC-OS	50.16	130.28	1110
CC-CC-OH	19.54	62.28	110.1
CC-WW-OH	19.50	62.69	107.6
CC-CC-OS	25.39	64.02	108.42
CV-CC-OS	17.26	71.96	108.7
CC-CV-OH	24.7	77.92	110.40
WW-CC-OH	25.5	79.00	110.1
C8-C-O	28.65	96.48	120.90
CC-CA-HA	14.25	62.3	108.8
CC-CB-HB	14.00	61.8	113.24
CA-CC-HG	13.00	55.00	107.97
CB-CC-HG	13.00	55.00	107.97
CC-CC-HG	14.5	58.5	109.2
CC-WW-HG	14.0	56.00	109.2
HG-CC-WW	13.5	58.5	109.2
CV-CC-HG	14.4	58.5	106.73
WW-CC-HG	14.00	54.54	109.2
CC-CV-HG	13.5	54.16	107.35
C-C8-HC	14.80	64.30	109.47
HB-CB-OB	13.00	62.00	111.4
HA-CA-OA	13.00	62.00	109.63
AH-CA-OS	20.5	71.18	108.73
HB-CB-OS	20.5	71.60	106.04
HG-CC-OH	16.5	75.92	110.8
HG-WW-OH	13.95	73.36	110.5
HG-CC-OS	19.55	108.24	109.63
HG-CV-OH	18.03	83.12	111.76



angle	H(Kcal/ mole.rad <sup>2</sup> )	F (kcal/ mole.Å <sup>2</sup> )	θ <sub>o</sub> (deg)
HG-CV-HG	27.5	10.07	109.85
HG-CC-OB	14.0	76.00	112.50
HC-C8-HC	30.5	10.07	109.47
CC-OS-CB	68.55	100.00	113.9
CC-OS-CA	68.7	100.70	114.9
OS-CB-OB	17.26	61.85	107.67
OS-CA-OA	19.55	61.00	110.9
CA-OA-OH	20.00	83.00	109.17
CC-OH-HO	30.00	100.00	110.6
WW-OH-HO	30.00	100.00	110.6
WW-CC-N	14.87	45.10	110.3
C8-C-N	4.32	50.60	116.0
N-C-O	30.5	81.52	123.05
HG-CC-N	18.5	66.00	108.68
CC-N-C	32.5	37.28	125.17
CC-N-H	20.00	54.00	115.67
C-N-H	19.50	54.00	117.19
CA-CC-N	10.80	40.00	111.1
CCC-N	10.80	40.00	11.2
CV-OH-HO	21.5	90.00	103.18
CB-OB-CC	67.54	95.00	116.33
CC-CC-OB	28.93	57.00	109.0
WW-CC-OB	20.00	66.00	106.8

torsions	Vn/2 (Kcal/mole)	$\gamma$ (deg)	n
X-CC-CA-X	3.2	0	3
X-CB-CC-X	3.2	0	3
X-CC-CC-X	3.2	0	3
X-WW-CC-X	3.2	0	3
X-CC-CV-X	3.2	0	3
X-C-C8-X	2.8	0	3
X-CC-OS-X	2.57	0	3
X-AC-OS-X	1.97	0	3
X-BC-OS-X	1.97	0	3
X-CC-OH-X	2.80	180	3
X-WW-OH-X	1.1	180	3
X-CV-OH-X	1.4	180	3
X-CA-OA-X	3.20	180	3
X-CB-OB-X	3.0	180	3
X-CC-N-X	0.15	0	3
X-C-N-X	10.5	180	2
X-OB-CC-X	3.00	0	3

Les fréquences calculées, les fréquences observées ainsi que les attributions obtenues sont présentées dans le tableau suivant:

Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de vibrations du chitobiose

Fréquences observées		Fréquences calculées	Attributions	type de groupement intervenant en %		
Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )		Distribution de l'énergie potentielle en %	liaisons	angles	torsions
	3390	3396	OH-HO 100%	100	0	0
		3395	OH-HO 100%	100	0	0
		3394	OH-HO 100%	100	0	0
	3375	3375	OH-HO 100%	100	0	0
		3374	OH-HO 100%	100	0	0
	3355	3341	OA-HO 100%	100	0	0
		3245	N-H 100%	100	0	0
	3220	3241	N-H 100%	100	0	0
		2965	C8-HC 100%	100	0	0
	2970	2965	C8-HC 100%	100	0	0
2965	2960	2964	C8-HC 100%	100	0	0
		2964	C8-HC 100%	100	0	0
2935		2932	CC-HG 100%	100	0	0
	2930	2931	CC-HG 96%	100	0	0
		2918	CB-HB 98%	100	0	0
		2907	CA-HA 100%	100	0	0
		2905	CC-HG 75% + WW-HG 25%	100	0	0
		2903	CC-HG 68% + WW-HG 31%	100	0	0
2898		2900	C8-HC 100%	100	0	0
		2899	C8-HC 100%	100	0	0
	2895	2893	WW-HG 65% + CC-HG 35%	100	0	0
		2891	WW-HG 56% + CC-HG 42%	100	0	0
		2888	CV-HG 100%	100	0	0
2878		2876	CC-HG 86% + WW-HG 12%	100	0	0
		2876	CC-HG 90% + WW-HG 10%	100	0	0
		2869	CV-HG 100%	100	0	0
		2845	CV-HG 100%	100	0	0
		2837	CV-HG 100%	100	0	0
	1648	1644	C-O 67% + N-C 25%	95	5	0
		1637	C-O 68% + N-C 25%	95	5	0
	1554	1558	CC-N 20% + N-C 17% + C-O 7%	52	47	1

		1557	CC-N 21% + N-C 17% + C-O 8%	52	47	1
	1494	1494	HG-CV-HG 56% + HG-CV-OH 16%	6	80	14
	1478	1484	HG-CV-HG 59% + HG-CV-OH 18%	8	80	12
		1469	HC-C8-HC 94%	0	98	2
		1469	HC-C8-HC 98%	0	98	2
		1461	HC-C8-HC 88%	2	95	3
		1460	HC-C8-HC 74%	8	90	2
1455	1457	1458	HC-C8-HC 32% + CC-OH-HO 18%	22	73	5
		1452	HA-CA-OS 12% + HC-C8-HC 10%	31	52	17
1447		1448	HG-CC-OS 13% + HB-CB-OS 12%	17	62	21
		1446	WW-OH-HO 22% + HG-CC-OS 20%	20	65	15
		1428	WW-OH-HO 22% + HG-CC-OS 20%	19	66	15
		1421	HG-CC-OS 20% + HG-C-N 10%	25	60	15
1413	1415	1410	CC-OH-HO 50%	15	73	12
		1399	HB-CB-OS 13% + HG-C-N 12% + WW-OH-HO 12%	16	61	23
1392		1396	HC-C8-HC 59% + C-C8-HC 29%	11	89	0
		1385	HC-C8-HC 59% + C-C8-HC 29%	11	89	0
1379		1380	HA-CA-OS 15%	30	52	18
	1374	1377	CC-CC-HG 13%	41	43	16
		1370	CC-CC-HG 14%	43	43	14
1357		1360	HG-CC-OH 20% + CC-OH 13%	33	50	17
		1344	CC-CC-HG 15% + CA-CC 10% + CC-WW 9%	49	42	9
1335	1334	1337	CC-CV-HG 15% + HG-CV-HG 15%	34	56	10
		1331	HG-CV-HG 19% + CC-CV-HG 17% + CV-OH-HO 12%	26	64	10
	1326	1327	OA-CA-HA 10% + CC-CV-HG 10% + CA-OA 11% + CC-AC 11%	36	48	16
1322		1321	CC-CC-HG 11% + HG-CC-OB 10%	36	50	14
	1314	1316	C-C8 10% + N-C 10%	50	41	9
1305	1307	1304	CC-WW-HG 20% + CC-WW 10%	41	45	14
		1297	WW-OH-HO 12% + WW-CC-HG 10% + WW-OH 10%	31	52	17
		1295	N-C 80% + C-C8 10% + WW-OH 8%	46	43	11
1287	1284	1284	C-C8 11% + N-C 10% + CC-WW 8%	47	44	9
		1278	CC-WW 15% + CC-WW-HG 15%	30	56	14
		1266	CV-OH-HO 35% + HG-CV-OH 24% + CC-CV-HG 12%	10	82	8
1262	1261	1262	CV-OH-HO 20% + HG-CV-OH 16%	20	69	11
		1256	HG-WW-CC 25%	20	58	22
		1252	HG -CC-CC 15%	13	63	24
1239	1241	1244	HG-WW-OH 17% + CC-WW-HG 10% + WW-OH 11%	33	52	15

	1227	1223	CA-OA-HO 12% + W-CC-HG 10% + HG-WW-OH 8%	28	58	14
		1217	CA-OA-HO 34%	24	66	10
		1214	CV-OH-HO 18% + HG-CV-OH 18%	15	76	9
		1212	CV-OH-HO 24% + HG-CV-OH 20% + CC-CC-HG 16%	14	77	9
1204	1204	1205	CC-N 20%	45	47	8
	1200	1190	CC-N 21%	47	44	8
		1171	CV-OH 10% + WW-CC-HG 10%	40	45	15
1165	1162	1163	CV-OH 25% + CC-CV 18%	64	30	6
1155		1152	CC-CV 15% + CC-N 13% + CV-OH 13%	68	25	7
1143		1142	CA-C-HG 12% + WW-CC-HG 11% + CA-OA 11%	44	42	14
1130		1133	CC-CC 16% + CC-OH 14% + CC-OS 13%	58	36	6
		1131	CC-CC 27% + CC-OB 9%	66	28	6
	1116	1122	CC-OS 23% + WW-OH 14% + CC-WW 11%	68	25	7
		1113	CC-OS 15% + WW-OH 14%	66	26	8
1102	1105	1102	CV-OH 28% + CC-OS 15%	69	23	8
		1095	WW-CC 19% + WW-OH 17% + CC-OS 12%	79	15	6
		1091	WW-OH 19% + CC-CC 12% + CV-OH 11% + CC-WW 10%	71	22	7
	1087	1085	CV-OH 38% + WW-OH 15%	80	16	4
	1081	1078	CC-WW 32%	72	20	8
	1058	1059	CC-OH 15% + CB-OS 12% + CA-OA 11%	76	17	7
		1055	CB-OS 21% + CA-OA 10%	79	15	6
1043	1044	1040	CB-OS 21% + CA-OA 10% + CA-OS 10%	79	15	6
	1037	1035	CB-OS 17% + CC-OH 16% + CC-OS 10%	83	12	5
1030		1029	CC-OB 30% + CB-OB 12%	7	54	39
		1024	C-C8-HC 56% + To C-C8 27%	2	56	42
	1018	1023	WW-OH 20% + CA-OS 10% + CC-WW 10%	77	16	7
		1012	CA-OS 24% + WW-OH 13%	77	17	6
	1000	995	CV-OH 16% + CC-CV 13% + WW-OH 11%	77	18	5
		993	C-C8-HC 74%	24	74	2
		975	C-C8-HC 75%	23	75	2
946	946	950	CC-CV 20% + CB-OB 18% + CV-OH 13% + CC-OS 10%	80	14	6
927	931	929	C-C8 26% + N-C 23% + C-O 17%	86	13	1
		915	C-C8 19% + N-C 18% + C-O 13%	86	12	2
906	906	913	CA-OA 13% + To CA-OA 10%	60	24	16
893	896	888	To CV-OH 33% + CC-CV-HG 22% + CC-OS 10% + TO CC-CV 10%			
867	874	866	CA-OA 18% + CC-OS 11%	20	44	36
843	844	836	To CA-OA 85%	39	31	30

781	781	777	To CA-OA 32% + CC-CV 10%	45	23	32
	748	762	To C-N 28% + CC-OB-CB 9%	29	30	41
	735	730	To C-N 74% + OPB CO 11%	2	4	94
	722	723	To C-N 75% + OPB CO 15%	3	5	92
685	682	685	To CC-OH 57%	10	25	65
675	670	675	CC-CV-OH 11%	24	54	22
651	654	651	To CC-OH 36% + To N-C 15%	13	24	63
630	630	630	To N-C 18% + To CC-OH 16% + N-C-O 10%	22	28	50
615	615	615	To CC-OH 53%	10	22	68
		603	To CC-OH 43%	9	31	60
581	582	579	To N-C 28%	2	5	93
572	567	572	To CC-OH 15% + To C-N 15% + To C8-C 15%	1	3	96
560	567	567	OPB C-O 46% + To N-C 26%	4	12	84
	553	563	OPB C-O 44% + To N-C 25%	18	37	45
536	536	547	OPB C-O 22% + To CV-OH 10% + CC-CA-OA 10%	17	53	30
520	520	519	To CV-OH 53%	21	37	42
510	510	514	To CC-OH 27%	17	60	23
		503	To CV-OH 61%	5	21	74
495	496	496	To CV-OH 28%	10	40	50
	488	484	To CV-OH 71%	15	22	70
464	464	472	To CV-OH 68%	8	41	30
	456	458	To CV-OH 59%	6	12	82
438		444	To CV-OH 136%	15	27	58
		427	To CC-OH 31% + To OB-CB 10%	13	21	66
421	420	416	To WW-OH 18% + To CV-OH 10%	13	30	57
		403	To WW-OH 31% + CC-OB 10%	8	21	70
	380	374	To WW-OH 79%	2	8	90
355		359	To WW-OH 42% + To CV-OH 30%	2	12	86
335		343	To WW-OH 90%	4	21	75
320	325	324	To WW-OH 47% + To CC-CV 12%	4	22	74
	307	313	To WW-OH 49%	8	20	72
295	298	296	To WW-OH 41%	10	28	62
	293	288	N-C-O 11% + To WW-OH 10%	11	52	37
		285	To WW-OH 51%	7	20	73
	279	278	To WW-OH 48% + To N-C 15%	5	15	80
269	265	267	To CC-CV 24% + To N-C 22%	6	19	75
		262	To N-C 49%	8	26	66

		255	To WW-OH 16% + To CA-CC 10%	5	18	77
245	241	235	To CC-WW 18 %	29	33	38
	225	231	To WW-OH 86 %	2	8	90
191		190	To WW-OH 18 %	14	33	53
	180	182	To CC-WW 20% + To CC-OS 10%	9	33	58
	164	166	To AC-CC 13% + To CC-WW 12%	4	38	58
		155	To C-N 26% + To CC-WW 10%	4	27	69
139		145	To CC-WW 45%	19	22	59
129		129	To CC-CV 62 %	3	17	80
123		123	To CC-CV 52% + To CC-C 10%	1	13	86
		113	To CC-WW 42% + To C-C8 10% + To CC-CC 10%	2	17	81
109		109	To C8-C	3	12	85
99		98	To C8-C 99 %	1	17	82
		95	To CC-CV 36% + To C-C8 21%	0	4	96
83		88	To CC-CV 21% + To C-C8 17%	0	1	99
79		76	To C-C8 68 %+ To N-C 20%	0	3	97
71		68	To C-C8 98%	0	0	100
61		57	To CC-WW 16% + To CC-BC 12% + To CC-OS 11%	0	15	85
47		48	To C-C8 25% + To CB-OB 14% + To C-N 14%	0	7	93
		42	To OB-CB 16% + To CC-OS 11% + To CB-CC 10%	0	13	87
37		37	To CC-N 30% + To C-C8 15% + To CC-CC	0	9	91
		29	To CC-CB 33% + To CC-N 20%	1	14	85
22		21	To CC-OB 66% + To CB-OB 20%	1	7	92

To = torsion, OPB = mouvement hors du plan



La déviation standard entre les fréquences observées et les fréquences calculées est de 3,8 cm<sup>-1</sup>.

### III.2.2. Discussions:

Les attributions obtenues montrent un très fort couplage des coordonnées internes. Très souvent, les contributions de chaque liaison, chaque angle de valence, chaque mouvement hors du plan et chaque torsion ne dépassent pas 10% de la contribution totale. C'est pourquoi, nous avons présenté également la contribution en pourcentage de toutes les liaisons, de tous les angles de valence, et de toutes les torsions pour chaque vibration (les mouvements hors du plan étant comptés avec les torsions). Nous retrouvons les mêmes régions spectrales caractéristiques que celles déterminées pour les monosaccharides (cf. chapitre 3).

### III.3. Comparaison avec le champ de forces AMBER:

Afin de mieux évaluer les performances du champ de forces SPASIBA, nous avons réalisé une étude de dynamique harmonique du N,N'-diacétylchitobiose avec le champ de forces AMBER. Tous les paramètres utilisés sont tirés de la base de données d'AMBER (4-26). Les minimisations sont effectuées dans les mêmes conditions que précédemment avec SPASIBA.

#### III.3.1. Comparaison des géométries:

Le tableau ci-dessous présente les valeurs de déviation standard et les RMS entre les paramètres moyens donnés dans la base de données et la géométrie finale obtenue après minimisation.

	liaisons	angles de valence	torsions
déviati on standard	0.110 Å	1.23°	0.395°
RMS	0.105Å	1.11°	0.628°

Ces valeurs sont très légèrement supérieures à celles obtenues avec SPASIBA (0.013Å, 1.07°, 0.208° pour les déviations standards et 0.011Å, 1.04°, 0.45° pour les RMS)

La comparaison entre cette géométrie finale et la géométrie donnée par la diffraction des rayons X donne les résultats suivants:

	liaisons	angles de valence	torsions
déviations standard	0.07 Å	12°	38°
valeurs de RMS	0.27 Å	3.47°	6°

Les déviations sont plus importantes que celles obtenues avec SPASIBA. Ceci nous montre que les paramètres géométriques de la base de données d'AMBER ne sont pas utilisables dans le cas de cycles pyraniques. En effet, ces paramètres sont déterminés pour des cycles furaniques de type ribose, composé présent dans les nucléotides des acides nucléiques comme l'ADN.

### III.3.2. Comparaison des facteurs de température:

Le tableau suivant permet la comparaison des facteurs de température B obtenus par diffractions des RX (25-27) et ceux calculés par SPASIBA et AMBER. Pour la diffraction des rayons X, les facteurs de température sont calculés à partir des paramètres d'agitation thermique anisotrope (28).

Atome	facteur de température (Å <sup>2</sup> )			Atome	facteur de température (Å <sup>2</sup> )		
	RX	AMBER	SPASIBA		RX	AMBER	SPASIBA
O1	3,29	8	6	O1'	2,44	1	2
C1	2,67	3	3	C1'	2,40	1	1
C2	2,76	1	1	C2'	2,67	1	3
N2	3,1	3	2	N2'	3,04	4	3
C7	3,79	5	5	C7'	4,18	10	7
O7	4,97	8	17	O7'	7,24	18	22
C8	5,68	16	13	C8'	6,4	18,5	14
C3	2,55	2	2	C3'	2,83	2	2
O3	3,28	6	5	O3'	3,92	6	6
C4	2,41	1	1	C4'	3,2	3	2
C5	2,58	2,5	2	O4'	4,52	8	6,5
O5	2,69	3	2	C5'	3,37	2	1,5
C6	3,38	7	3	O5'	2,83	1	2
O6	4,04	11	7	C6'	4,19	4	5
				O6'	6,54	7	9

Atome	facteur de température			Atome	facteur de température		
	RX	AMBER	SPASIBA		RX	AMBER	SPASIBA
HO1	4,4	14	10	HC1'	0,5	2,5	3,5
HC1	0,6	6	6	HC2'	2,7	4	3
HC2	1,1	2	4	HN'	2,8	6	12
HN	2,2	7	13	HC8'	8,0	41	61
HC8	6,5	29	52	HC8'	4,8	33	59
HC8	6,5	32	49	HC8'	11,8	48	62
HC8	6,2	32	50	HC3'	2,7	5	5,5
HC3	0,3	4,5	5	HO3'	8,4	12	15
HO3	4,9	10	17	HC4'	0,8	6	5
HC4'	1,0	3	4	HO4'	8,6	13	12
HC5'	2,0	5	5	HC5'	3,6	4	5
HC6	3,4	12	8	HC6'	4,1	8	11
HC6	2,4	10	6	HC6'	2,6	7	10
HO6	14,8	16	14	HO6'	9,7	12	18

Le tableau ci-dessous présente les valeurs de déviation standard et les valeurs de RMS entre les facteurs de température obtenus par diffraction des rayons X, et ceux calculés par SPASIBA et AMBER.

	pour les atomes lourds		pour les atomes d'hydrogènes	
	SPASIBA	AMBER	SPASIBA	AMBER
déviati on standard	3.87 Å <sup>2</sup>	3.85 Å <sup>2</sup>	18 Å <sup>2</sup>	10.55 Å <sup>2</sup>
valeurs de RMS	1.97 Å <sup>2</sup>	1.96 Å <sup>2</sup>	4.25 Å <sup>2</sup>	3.24 Å <sup>2</sup>

D'après ce tableau, nous voyons que, pour les atomes lourds, les valeurs déterminées par SPASIBA et AMBER sont proches, tandis que pour les atomes d'hydrogènes, SPASIBA donne des valeurs plus élevées en particulier pour les groupements méthyles.

### III.3.3. Comparaison des fréquences et de leurs attributions:

Si on observe les fréquences calculées avec AMBER avec celles observées, nous pouvons remarquer que:

- au niveau des hautes fréquences:

Les fréquences attribuées aux élongations de type O-H sont au moins 150  $\text{cm}^{-1}$  supérieure à celles observées.

Pour les groupements N-H, les fréquences sont observées autour de 3220  $\text{cm}^{-1}$  alors qu'elles sont calculées avec AMBER à 3306 et 3309  $\text{cm}^{-1}$ .

Pour les élongations C-H, les spectres observés et calculés sont équivalents.

- pour la région 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$

Les bandes amides I sont calculées à 1698  $\text{cm}^{-1}$  au lieu de 1648  $\text{cm}^{-1}$  et présentent une contribution plus faible de la liaison CO par rapport au calcul réalisé avec SPASIBA (24% au lieu des 67%) et aussi une contribution de 30% des angles de valences existant autour de la liaison NH-CO, ces dernières contributions devant intervenir pour les bandes amides II. Ces bandes amides II sont calculées à 1636  $\text{cm}^{-1}$  au lieu de 1554  $\text{cm}^{-1}$ . Il est aussi à noter des contributions trop élevées (à 30%) à 1518 et 1503  $\text{cm}^{-1}$  des liaisons de type C-C.

Par suite du peu de paramètres définis par la base de données d'AMBER, il est très difficile de différencier les contributions des différents groupements comme  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2\text{OH}$ , il n'est donc pas facile d'expliquer cette région spectrale.

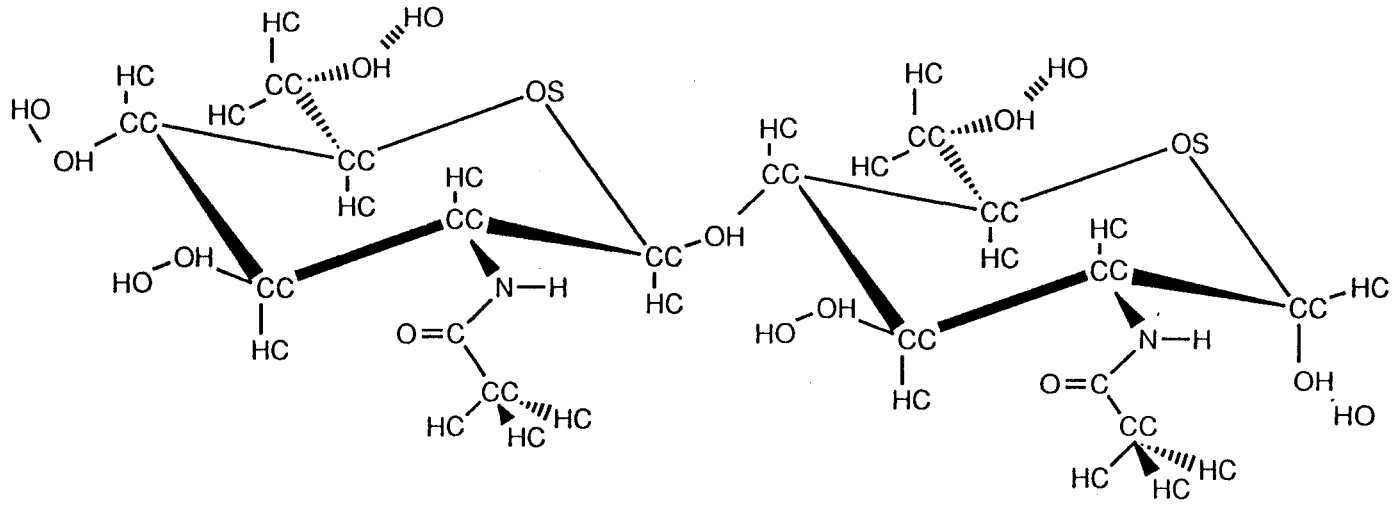
-région 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ :

La contribution de toutes les liaisons dans cette région est très faible, elle ne dépasse jamais 31% alors qu'elle peut aller jusque 83% avec SPASIBA. On observe également une contribution trop forte des différents angles de valence de type C-C-H, H-C-O, H-C-O5

-région 1000-700  $\text{cm}^{-1}$ :

Le tableau suivant présente les fréquences calculées et les attributions obtenues avec AMBER.

Noms des atomes définis dans la base de données d'AMBER  
pour le N,N'-diacétyl-chitobiose



Résultats et hypothèses d'attributions des modes normaux de vibrations du chitobiose avec AMBER  
pour la région 700-1000  $\text{cm}^{-1}$

Fréquences observées		Fréquences calculées	Attributions	type de groupement intervenant en %		
Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )			liaisons	angles	torsions
			Distribution de l'énergie potentielle en %			
	1000	993	CC-CC-HC 23% + CC-CC 17%	28	72	0
		985	CC-CC-HC 37% + CC-CC 19% + HC-CC-OH 13%	32	67	1
		979	CC-CC-HC 26% + HC-CC-OH 14% + CC-CC 13%	23	75	2
		964	CC-OS 16% + HC-CC-OS 15% + HC-CC-OH 15%	35	64	1
		961	HC-CC-OH 20% + CC-OH 17%	40	60	0
946	946	953	HC-CC-OH 28% + CC-OH 17%	33	67	0
931	927	931	HC-CC-OH 30% + CC-OH 20% + CC-CC-HC 10%	41	57	2
		929	CC-OH 31% + HC-CC-OH 25%	42	58	0
		924	CC-CC-HC 73% + To CC-C 12%	3	79	18
		923	CC-CC-HC 77% + To CC-C 14%	0	80	20
	906	914	CC-OH 26% + HC-CC-OH 24% + CC-CC-HC 10% + CC-CC-OH 10%	39	60	1
893	896	889	C-CC-HC 24% + CC-OH 14% + CC-OS 12%	46	54	0
		884	C-CC-HC 65%	13	87	0
		882	C-CC-HC 78%	7	93	0
867	874	857	C-O 20% + C-CC 15% + C-CC-HC 10% + N-C 11%	57	43	0
		853	C-O 21% + C-CC 15% + C-CC-HC 13% + N-C 10%	61	38	1
844	844	849	CC-OH 25% + CC-CC 19% + CC-CC-HC 10%	60	39	1
		830	CC-OH 19% + CC-CC 13% + CC-CC-HC 12%	46	51	3
781	781	772	HC-CC-OH 44% + CC-CC-HC 40%	4	93	3
		766	HC-CC-OH 42% + CC-CC-HC 40%	6	91	3

To = torsion

C'est une région qui doit présenter peu de bandes. 11 bandes sont observées et 14 calculées avec SPASIBA, alors qu'avec AMBER, 20 sont calculées, dont 11 entre 1000 et 900  $\text{cm}^{-1}$ .

Par contre, deux fréquences seulement sont calculées entre 800 et 700  $\text{cm}^{-1}$  une à 766  $\text{cm}^{-1}$  et l'autre à 772  $\text{cm}^{-1}$ . De plus, ces deux fréquences ne correspondent pas du tout aux mêmes attributions que celles obtenues avec SPASIBA. Pour AMBER, au niveau de ces deux fréquences interviennent pour 43% et 40% respectivement les groupements H-C-O et C-C-H.

Les fréquences autour de 748, 735, et 722  $\text{cm}^{-1}$  ne sont pas retrouvées.

- région 700-200  $\text{cm}^{-1}$ :

Les torsions exocycliques de type C-O n'apparaissent qu'à partir de 418  $\text{cm}^{-1}$ . C'est surtout les déformations angulaires de type CCO, OCO,CCN et CCC qui sont présentes dans cette région.

- région des basses fréquences:

Les contributions des torsions de type C-C n'apparaissent qu'à 83  $\text{cm}^{-1}$ . De 200 à 80  $\text{cm}^{-1}$  interviennent encore principalement les déformations angulaires de type CCO, CCN, CCC. La fréquence à 13  $\text{cm}^{-1}$  est trop basse par rapport aux spectres observés, les déformations angulaires y interviennent encore pour 62%, alors que les torsions C-O contribuent seulement pour 26%.

Donc les paramètres définis dans le champ de force AMBER ne permettent ni une bonne reproduction des spectres des vibrations et en particulier des différentes régions spectrales des saccharides (mais cela était prévisible), ni une bonne reproduction de la géométrie de chitobiose (et cela est plus catastrophique)

#### **III.4. Conclusion:**

Le champ de forces SPASIBA établi pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine est meilleur que celui établi avec AMBER, il pourra donc être utilisé à chaque fois qu'une sous-unité monosaccharidique de ce type sera rencontrée dans les saccharides, en particulier pour des études en dynamique moléculaire.

## **IV. Dynamique moléculaire du N,N'-diacétyl-chitobiose:**

### **IV.1. Introduction:**

La validité des résultats de simulations de dynamique moléculaire pour une molécule biologique dépend du champ de forces utilisé (il doit être fiable) mais aussi des conditions de représentation du milieu biologique.

C'est pourquoi avant de réaliser des simulations de dynamique moléculaire d'un composé d'intérêt biologique comme l'hexamère (GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc)<sub>3</sub>, substrat du lysozyme, nous avons effectué cinq études de dynamiques avec SPASIBA: quatre avec des valeurs différentes de la constante diélectrique et une cinquième dans l'eau.

Nous espérons ainsi voir si les sous-unités monosaccharidiques de type N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine peuvent être prises comme des entités rigides ou non, et comparer les différentes méthodes utilisées pour prendre en compte les effets du solvant.

Une sixième dynamique dans le vide, avec les paramètres d'AMBER, est aussi réalisée.

### **IV.2. Conditions des études de dynamiques moléculaires:**

#### IV.2.1. Matériel informatique et logiciels

Le champ de forces utilisé est SPASIBA avec les constantes de forces et les paramètres déterminés auparavant.

Les calculs ont été effectués sur un Dec 3400 à processeur alpha.

L'analyse de ces différentes trajectoires a été réalisée grâce au logiciel Sybyl (29).

#### IV.2.2. Présentation des différentes simulations dynamiques:

Deux premières dynamiques de 270 ps avec SPASIBA et AMBER avec une constante diélectrique de 1 ont été établies.

Une troisième de 270 ps est ensuite réalisée avec SPASIBA et une constante diélectrique de 80.



Pour les deux suivantes de 270 ps aussi,  $\epsilon$  est fonction d'une fonction dépendante de la distance:  $\epsilon=4r_{ij}$  pour la première et  $\epsilon$  variant suivant une fonction sigmoïdale présentée par Dagett *et al.* (30) pour la seconde.

Une sixième dynamique de 135 ps a été réalisée dans une boîte d'eau.

#### IV.2.3. Obtention des structures de départ:

Pour  $\epsilon=1$ , les structures de départ sont celles obtenues pour la réalisation des dynamiques harmoniques précédentes avec SPASIBA et AMBER.

Pour  $\epsilon=80$ , la structure de départ est minimisée avec une constante diélectrique de 80.

La troisième structure a été minimisée en prenant la constante diélectrique dépendante de la distance de type  $\epsilon=4r_{ij}$ .

Pour l'obtention de la structure obtenue avec une constante diélectrique dépendante d'une fonction sigmoïdale, nous avons utilisé la procédure de minimisation utilisant cette fonction (30).

Enfin la dernière structure a été obtenue après avoir construit une boîte d'eau d'une couche entourant le N,N'-diacétyl-chitobiose soit 175 molécules d'eau selon un modèle TIP3 (31). La valeur de la constante diélectrique est alors prise à 1. Puis, une minimisation a été réalisée avec tout d'abord 50 pas de méthode "Steepest Descent" et 7000 pas de méthode du Gradient Conjugué. Ces 7050 pas ont été nécessaires pour obtenir une valeur de RMS de 0.001 sur l'énergie entre deux pas de minimisation.

Toutes ces géométries de départ obtenues sont très proches les unes des autres et les déviations standards pouvant exister entre la structure déterminée par diffraction des rayons X et celles obtenues après minimisation sont très faibles.

#### IV.2.4. Conditions de réalisation des différentes dynamiques:

Les cinq dynamiques de 270 ps ont été divisées en 6 fois 45 ps et celle de 135 ps avec la boîte d'eau en 6 fois 22,5 ps.

Les dynamiques sont réalisées avec une température initiale de 10 K. A chaque atome est attribué une vitesse initiale extraite d'une distribution

de Boltzman à la température choisie de 300 K. L'algorithme d'intégration utilisé est celui de Verlet (32) et le pas d'intégration est de 0.5fs.

Les coordonnées et les vitesses sont affichées tous les 50 pas soit tous les 0,25ps.

Aucune contrainte n'est portée sur les différentes coordonnées internes des molécules.

### IV.3. Résultats et discussions des différentes dynamiques:

#### IV.3.1. Temps de réalisation et place mémoire:

Le tableau ci-dessous présente les différents temps de réalisation des dynamiques ainsi que la place mémoire utilisée.

	AMBER	$\epsilon=1$	$\epsilon=80$	$\epsilon=4rij$	$\epsilon=sig$	e a u
temps de la dynamique	270 ps	270 ps	270 ps	270 ps	270 ps	135 ps
temps cpu	4h37min	4h9min	4h9min	4h1min	4h41min	41h8min
Place mémoire en blocs	85216	85216	85216	85216	85216	57653

Remarque: 1 bloc= 500 octets.

#### IV.3.2. Temps pour atteindre la température désirée:

Le tableau suivant présente ces données:

	AMBER	$\epsilon=1$	$\epsilon=80$	$\epsilon=4rij$	$\epsilon=sig$	e a u
valeurs de RMS sur la température (K)	20,1	20,6	20,3	20,7	20,08	8,1
température initiale(K)	11	11	11	11	10,96	9,947
nombre de pas pour obtenir la température désirée de 300K	450	250	250	250	250	450
temps pour atteindre cette température en ps	0,225	0,125	0,125	0,125	0,125	0,225

#### IV.3.3. 135 ps et 270 ps sont-ils des temps de dynamique moléculaire suffisants ?

Les hautes fréquences correspondent à des mouvements rapides de la molécule, par exemple la fréquence à  $3390\text{ cm}^{-1}$  du N,N'-diacétylchitobiose correspond à un mouvement d'élongation de type O-H qui se réalise tous les 9,8 femtosecondes. Pour cette même molécule, les mouvements les plus lents correspondent à la fréquence  $20\text{ cm}^{-1}$  soit un mouvement tous les 1,67 ps.

Nous voyons donc que les temps des dynamiques sont suffisants pour espérer observer tous les mouvements de la molécule. Des temps de simulation de dynamique moléculaire de l'ordre de 1ns peuvent être utiles pour interpréter des résultats de RMN (33-34).

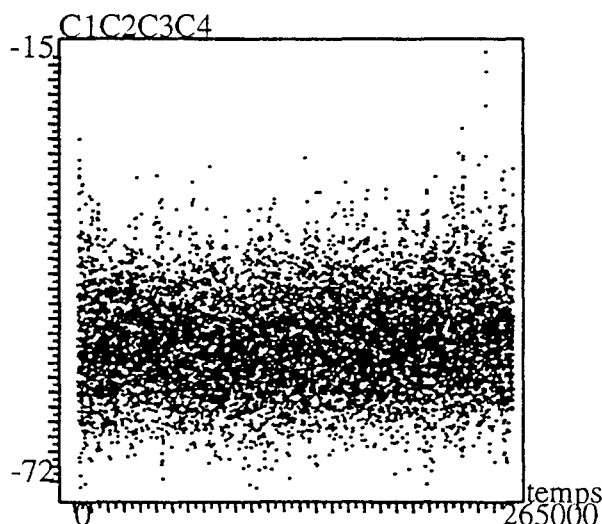
#### IV.3.4. Résultats et discussions des conformères obtenus

##### IV.3.4.1 Les cycles pyraniques sont-ils rigides ?

Pour vérifier si les cycles pyraniques étaient rigides ou non, nous avons étudié les variations des angles de torsion endocycliques.

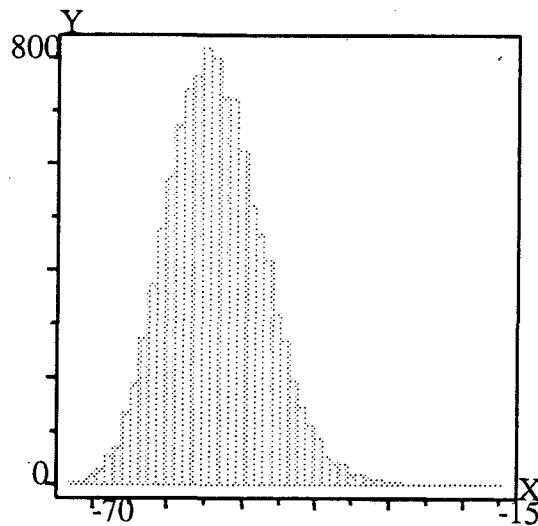
Les graphiques représentant les valeurs des angles de torsion en fonction du temps comme celui présenté ci-dessous semble montrer une certaine flexibilité de la torsion autour d'une valeur moyenne.

Valeurs de la torsion C1C2C3C4 de NAG1 (degré) en fonction du temps (fs)  
pour la simulation effectuée avec SPASIBA et  $\epsilon = 1$

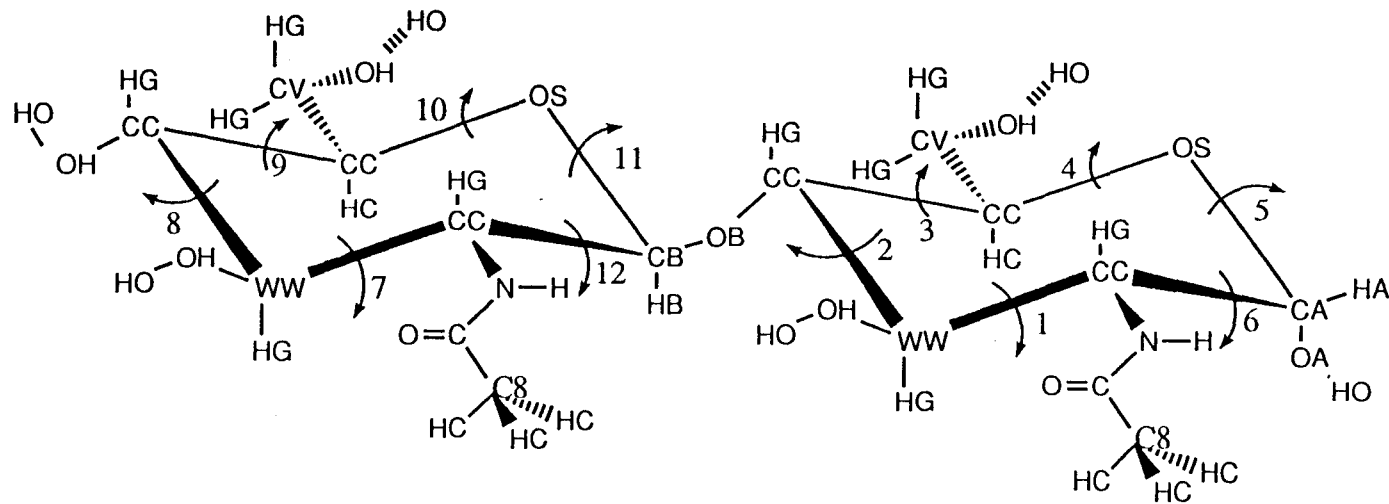


Cependant, l'interprétation de ce type de graphique n'est pas facile, c'est pourquoi nous avons préféré construire des histogrammes présentant la population des conformères obtenus en fonction de la valeur de la torsion comme celui présenté ci-dessous.

Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion C1C2C3C4 de NAG1 (degré) pour la simulation effectuée avec SPASIBA et  $\epsilon = 1$



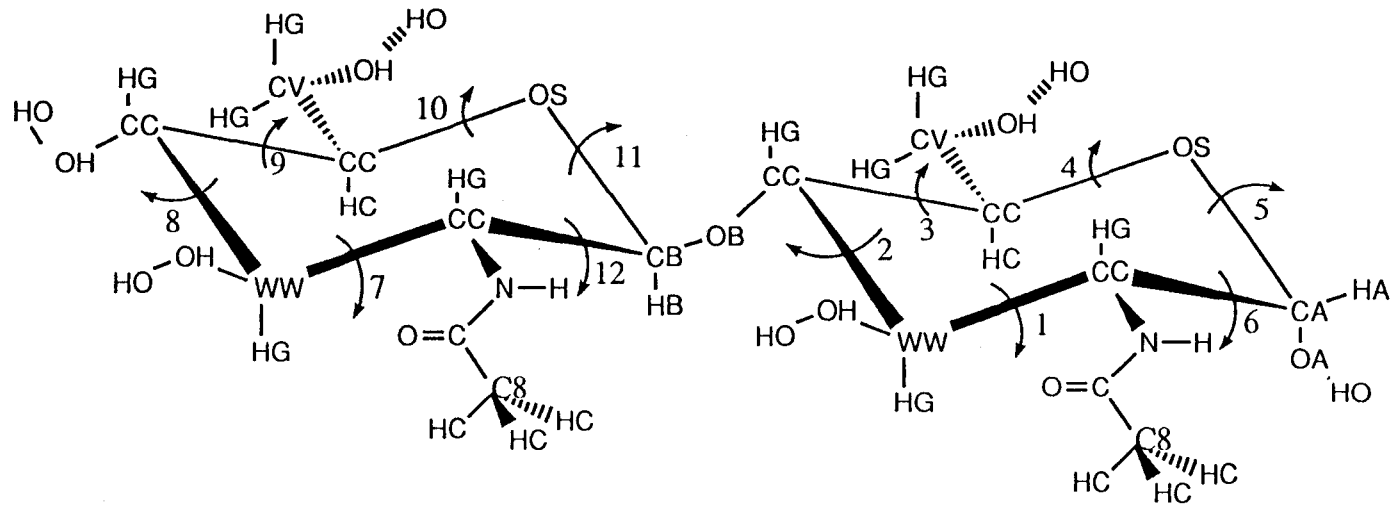
Les pages suivantes donnent la définition des torsions étudiées et résument les résultats obtenus.



Les torsions étudiées sont définies comme ci-dessous:

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	1	C1C2C3C4	NAG2	7	C1C2C3C4
NAG1	2	C2C3C4C5	NAG2	8	C2C3C4C5
NAG1	3	C3C4C5O5	NAG2	9	C3C4C5O5
NAG1	4	C4C5O5C1	NAG2	10	C4C5O5C1
NAG1	5	C5O5C1C2	NAG2	11	C5O5C1C2
NAG1	6	O5C1C2C3	NAG2	12	O5C1C2C3

torsion	RX	étude avec AMBER et $\epsilon=1$					étude avec SPASIBA et $\epsilon=1$				
		nombre de conformère	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de conformère	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
1	-55°	2	-55° 75%	35° 25%		0° et 90°	1	-74°	-30°	-55°	0°
2	55°	2	50° 88%	-50° 22%		5° et 105°	1	23°	77°	55°	0°
3	-56°	2	-50° 79%	22° 21%		6° et 78°	1	-76°	-19°	-55°	1°
4	60°	1	-35°	95°	55°	35°	1	28°	78°	60°	0°
5	-60°	2	-60° 98%	40° 2%		0° et 100°	1	-74°	-37°	-58°	2°
6	57°	2	55° 97%	-65° 3%		2° et 112°	1	30°	71°	58°	1°
7	-57°	2	-55° 46%	55° 54%		2° et 112°	1	-72°	-14°	-57°	0°
8	54°	2	-30° 47%	55° 53%		84° et 1°	1	26°	77°	60°	6°
9	-55°	1	-50°	60°	-80°	25°	1	77°	-29°	-58°	3°
10	59°	1	-65°	5°	60°	1°	1	29°	81°	60°	1°
11	-62°	2	-60° 90%	30° 10%		2° et 92°	1	-78°	-36°	-58°	4°
12	60°	2	-20° 44%	50° 56%		80° et 10°	1	22°	74°	65°	5°

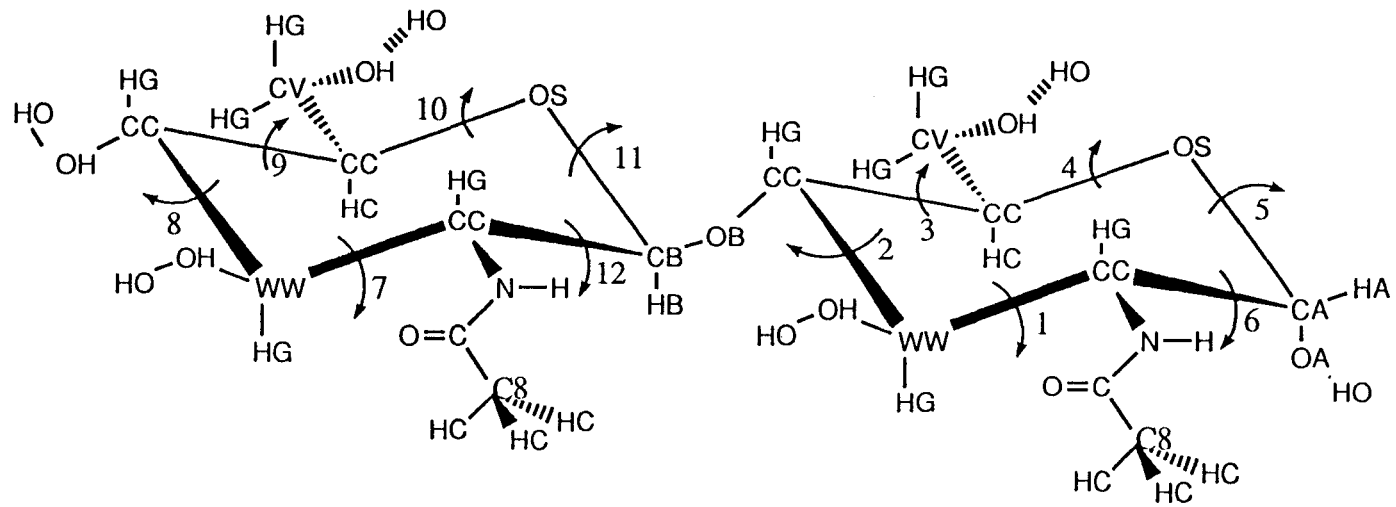


Les torsions étudiées sont définies comme ci-dessous:

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	1	C1C2C3C4	NAG2	7	C1C2C3C4
NAG1	2	C2C3C4C5	NAG2	8	C2C3C4C5
NAG1	3	C3C4C5O5	NAG2	9	C3C4C5O5
NAG1	4	C4C5O5C1	NAG2	10	C4C5O5C1
NAG1	5	C5O5C1C2	NAG2	11	C5O5C1C2
NAG1	6	O5C1C2C3	NAG2	12	O5C1C2C3

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\epsilon=80$					étude avec SPASIBA et $\epsilon=4r_{ij}$				
		nombre de conformère	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de conformère	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
1	-55°	1	-75°	-26°	-60°	5°	1	-73°	-22°	-58°	3°
2	55°	1	25°	74°	57°	2°	1	24°	76°	50°	5°
3	-56°	1	-72°	-27°	-55°	1°	1	-76°	-23°	-60°	4°
4	60°	1	35°	78°	58°	2°	1	35°	81°	55°	5°
5	-60°	1	-78°	-40°	-58°	2°	1	-77°	-37°	-62°	2°
6	57°	1	29°	74°	55°	2°	1	28°	72°	54°	3°
7	-57°	1	-75°	-30°	-57°	0°	1	-75°	-27°	-60°	3°
8	54°	1	31°	77°	55°	1°	1	32°	76°	52°	2°
9	-55°	1	-78°	-31°	-58°	3°	1	-77°	-30°	-60°	5°
10	59°	1	36°	79°	60°	1°	1	37°	83°	60°	1°
11	-62°	1	-77°	-39°	-57°	5°	1	-76°	-35°	-55°	7°
12	60°	1	30°	75°	57°	3°	1	28°	74°	52°	8°





Les torsions étudiées sont définies comme ci-dessous:

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	1	C1C2C3C4	NAG2	7	C1C2C3C4
NAG1	2	C2C3C4C5	NAG2	8	C2C3C4C5
NAG1	3	C3C4C5O5	NAG2	9	C3C4C5O5
NAG1	4	C4C5O5C1	NAG2	10	C4C5O5C1
NAG1	5	C5O5C1C2	NAG2	11	C5O5C1C2
NAG1	6	O5C1C2C3	NAG2	12	O5C1C2C3

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\epsilon =$ sigmoïdale					étude avec SPASIBA et $\epsilon = 1$ dans l'eau				
		nombre de conformère	valeur minimale	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de conformère	valeur minimale	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
1	-55	1	-75°	-28°	-55°	0°	1	-69°	-35°	-58°	3°
2	55	1	26°	74°	55°	0°	1	33°	72°	60°	5°
3	-56	1	-76°	-26°	-55°	1°	1	-74°	-33°	-57°	1°
4	60	1	76°	25°	55°	5°	1	42°	77°	60°	0°
5	-60	1	-76°	-38°	+55°	5°	1	-77°	-41°	-60°	0°
6	57	1	33°	73°	-60°	3°	1	33°	70°	56°	1°
7	-57	1	-75°	-21°	55°	3°	1	72°	-37°	-58°	1°
8	54	1	27°	77°	-55°	1°	1	37°	74°	58°	4°
9	-55	1	-79°	-32°	55°	0°	1	-73°	-35°	-58°	3°
10	59	1	34°	82°	60°	1°	1	37°	76°	58°	1°
11	-62	1	-77°	-37°	-60°	2°	1	-77°	-43°	-62°	0°
12	60	1	29°	74°	52°	8°	1	40°	77°	58°	2°

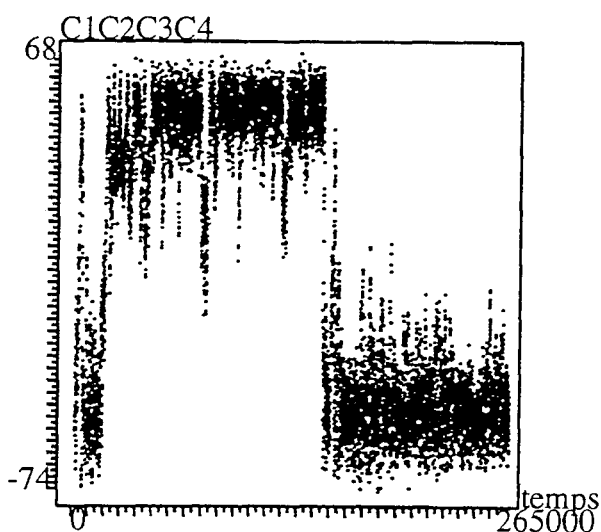
D'après ce tableau, nous voyons que:

- Pour la dynamique réalisée avec AMBER, nous observons pour les torsions 1, 2, 3, 7, 8, et 12, l'existence de deux valeurs de torsions, une des deux correspondant à celle observée en diffraction des rayons X.

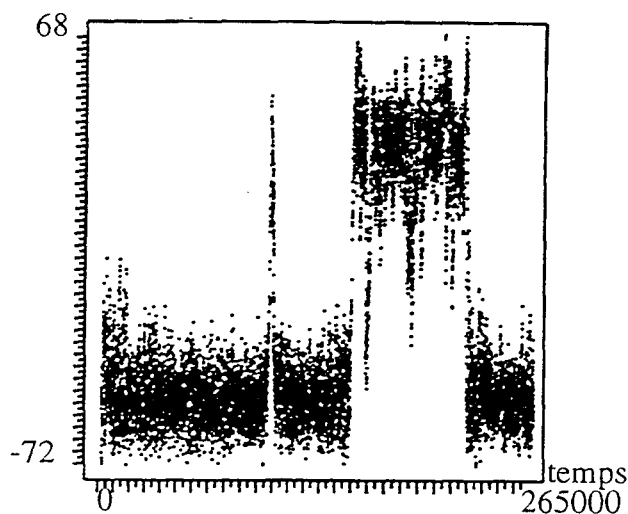
L'existence de cette seconde valeur de torsion montre que les cycles pyraniques ne sont pas rigides.

Les graphiques suivants montrent l'évolution de la torsion C1C2C3C4 des cycles NAG1 et NAG2 en fonction du temps.

Valeurs de la torsion C1C2C3C4 de NAG1 (degré) en fonction du temps (fs) pour la simulation effectuée avec AMBER



Valeurs de la torsion C1C2C3C4 de NAG2 (degré) en fonction du temps (fs) pour la simulation effectuée avec AMBER



Les figures stéréoscopiques suivantes présentent les conformations obtenues pour la molécule à différents temps de la simulation.

Vue stéréo de la molécule à 0,3 ps

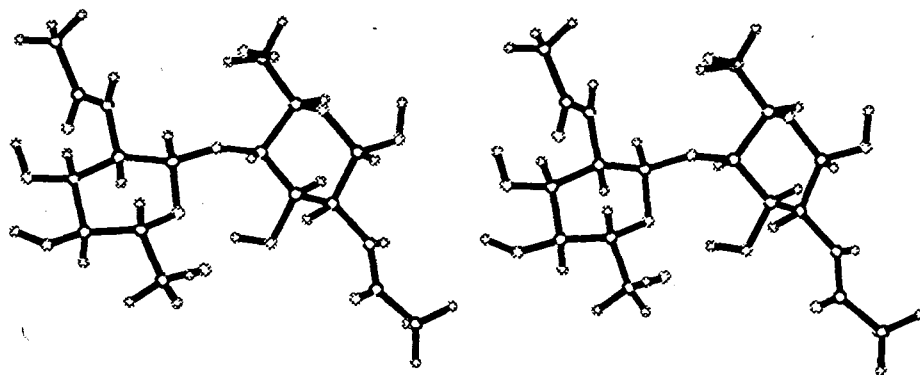


Fig. 1-a

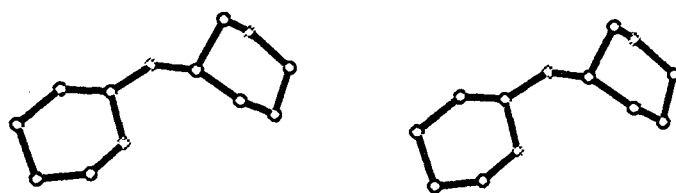


Fig 1-b



Vue stéréo de la molécule à 21 ps

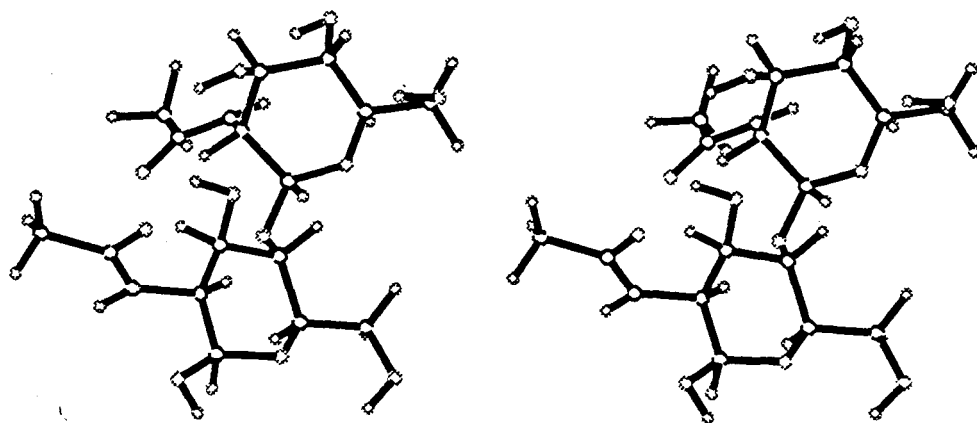


Fig. 2-a



Fig. 2-b

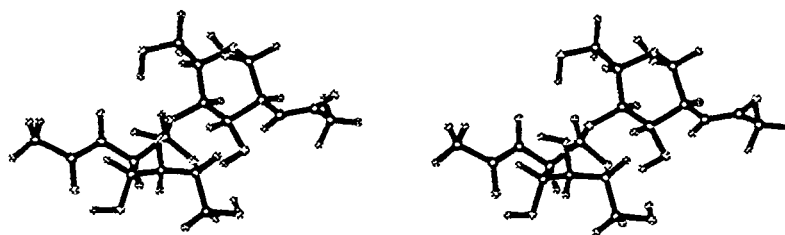


Fig. 3-a

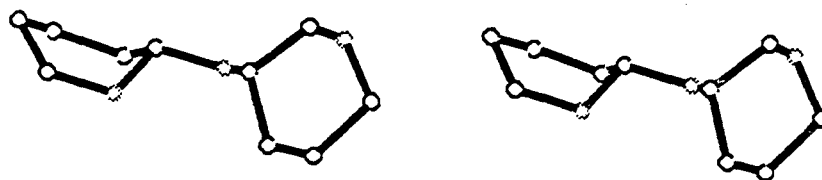


Fig. 3-b

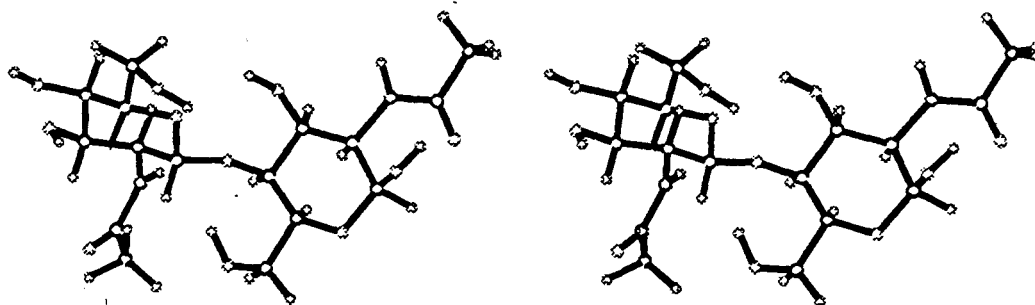


Fig. 4-a

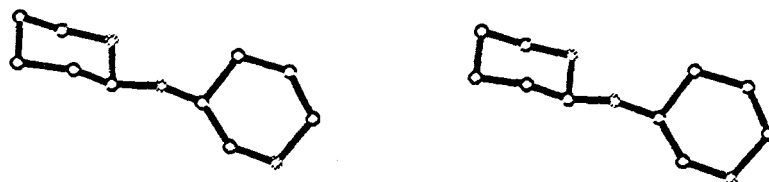


Fig. 4-b



Les figures montrent qu'au départ de la simulation les deux cycles adoptent des conformations chaises (fig. 1a et 1b), puis à environ 22 ps, le cycle NAG1 se déforme pour passer à une conformation bateau twisté (fig. 2a et 2b). A 165 ps, le cycle NAG1 reprend une conformation chaise tandis que le cycle NAG2 se déforme à son tour pour aussi adopter une conformation bateau twisté (fig. 3a et 3b). Enfin, à 230 ps, les deux cycles sont à nouveau tous les deux en conformation chaise (fig. 4a et 4b).

De telles distorsions ont déjà été obtenues avec des simulations moléculaires effectuées avec le champ de forces de Rasmussen (35) sur des oligosaccharides représentant des groupes sanguins Lewis (36) et comprenant des sous-unités de type N-acétyl-glucosaminique. Cependant de tels résultats semblent peu probables puisque de telles conformations n'ont jamais été retrouvées par diffraction des rayons X ou RMN pour des sous-unités monosaccharidiques de ce type.

- Pour les dynamiques effectuées avec SPASIBA, chaque torsion présente une distribution de type gaussienne autour d'une valeur moyenne et ceci quelle que soit la nature de la constante diélectrique, ou le solvant pris en compte. Nous pouvons donc en déduire une rigidité du cycle pyranique. Les valeurs de torsions retrouvées correspondent à celles obtenues expérimentalement (25). Les cycles restent donc sous forme chaise.

Dans l'eau, la rigidité de ces cycles est supérieure puisque les écarts entre les valeurs de torsions minimales et maximales de la distribution sont inférieurs aux autres études :

49° avec  $\epsilon = 1$ , 44° avec  $\epsilon = 80$ , 46° avec  $\epsilon = 4r_{ij}$ , 46° avec  $\epsilon =$  sigmoïdale et 37° dans la boîte d'eau.

#### IV.3.4.2 Les sous-unités monosaccharidiques sont-elles rigides?

Pour vérifier si les sous-unités monosaccharidiques pouvaient être prises comme rigides, nous avons alors étudié les variations d'angles des torsions exocycliques, ainsi que celles du groupement acétamido.

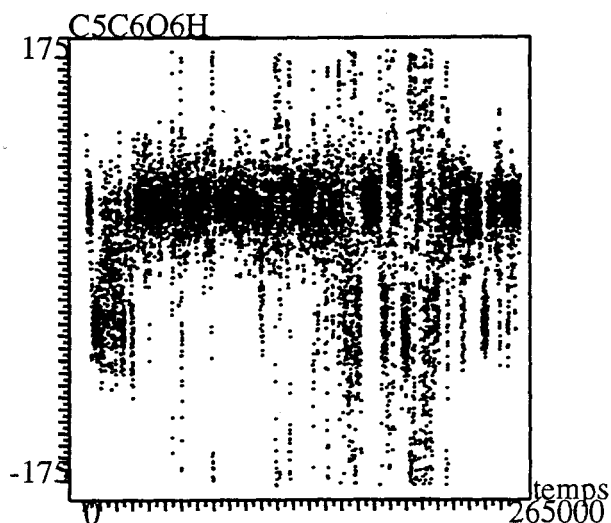
Nous avons aussi utilisé la représentation en histogramme pour étudier les variations de ces angles.

Les pages suivantes présentent pour chaque simulation, les variations en fonction du temps de la torsion C5C6O6H du cycle NAG2,

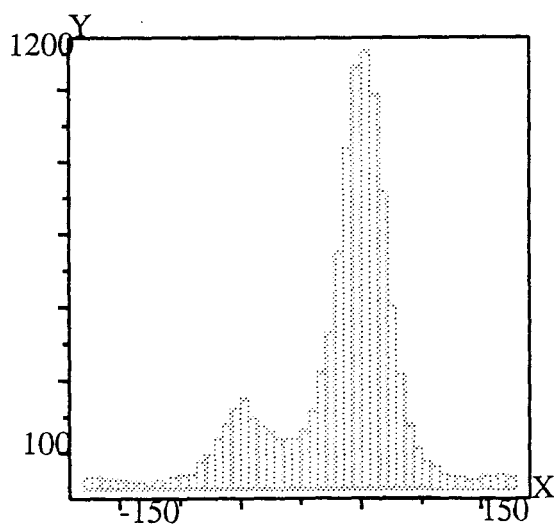


ainsi que les histogrammes représentant la population des conformères obtenus en fonction de la valeur de cette torsion.

Simulation effectuée avec AMBER,  $\epsilon = 1$

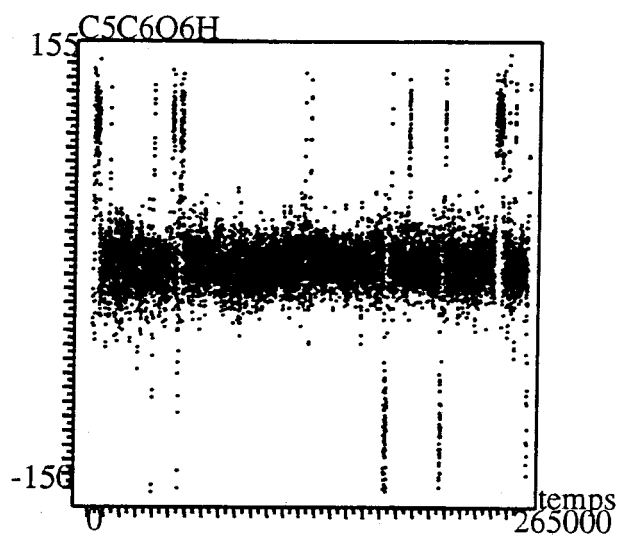


Valeurs de la torsion C5C6O6H de NAG1 (degré) en fonction du temps (fs)

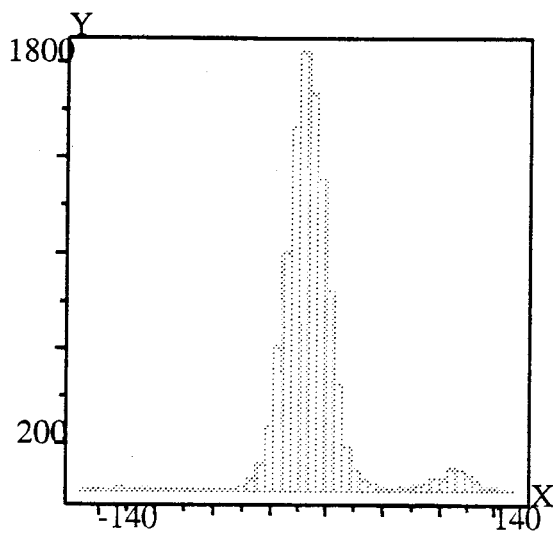


Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion  
C5C6O6H de NAG1

La simulation effectuée avec SPASIBA.  $\epsilon=1$

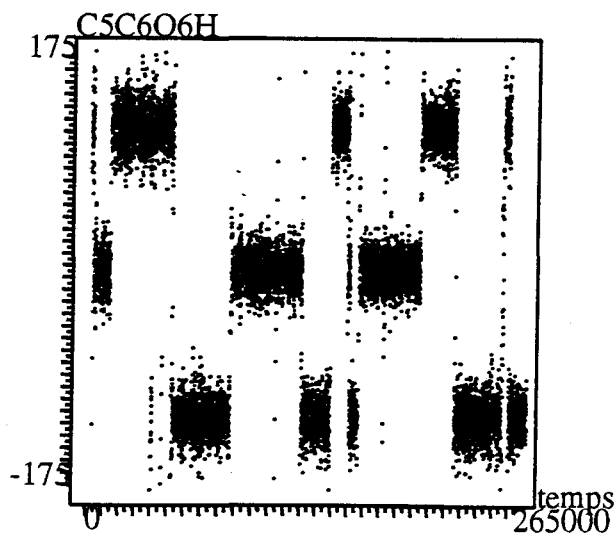


Valeurs de la torsion C5C6O6H (degré) en fonction du temps (fs)

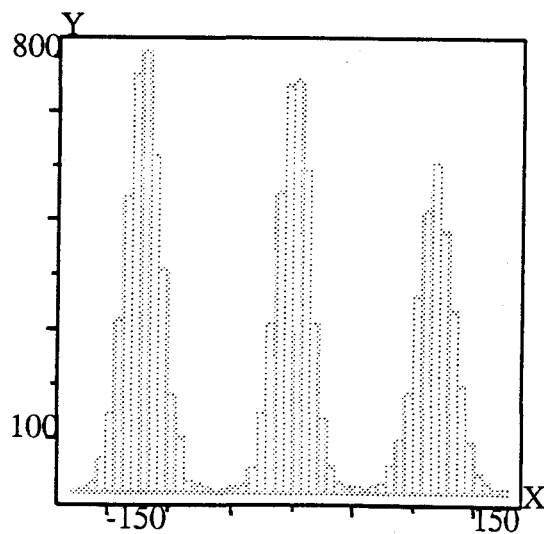


Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion  
C5C6O6H

La simulation effectuée avec SPASIBA.  $\epsilon=80$

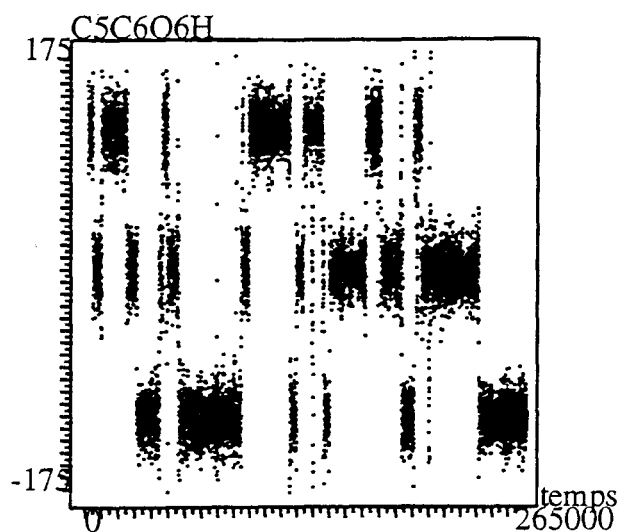


Valeurs de la torsion C5C6O6H (degré) en fonction du temps (fs)

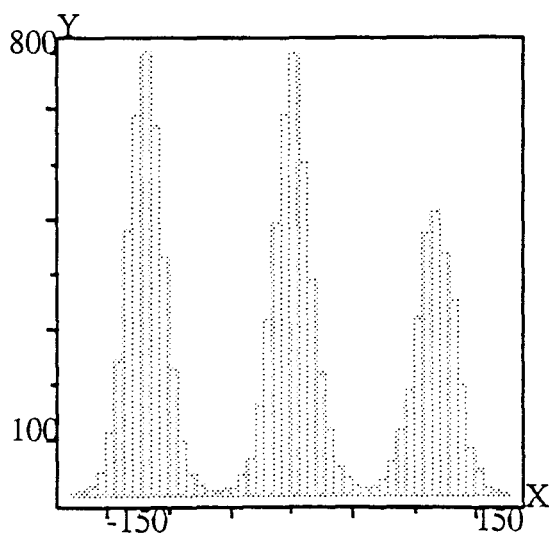


Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion C5C6O6H

La simulation effectuée avec SPASIBA,  $\epsilon=4r_{ij}$

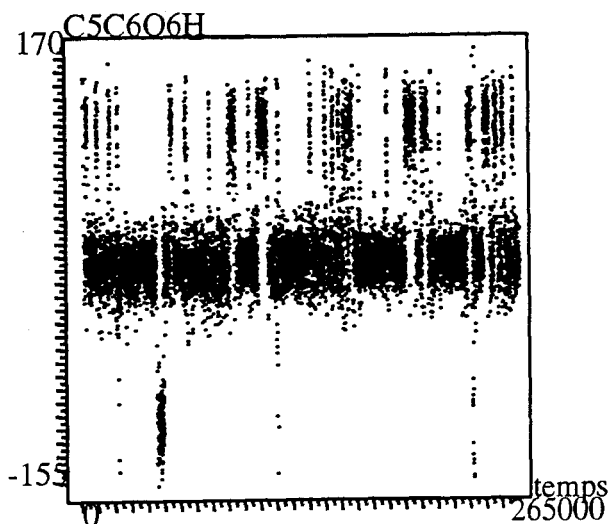


Valeurs de la torsion C5C6O6H (degré) en fonction du temps (fs)

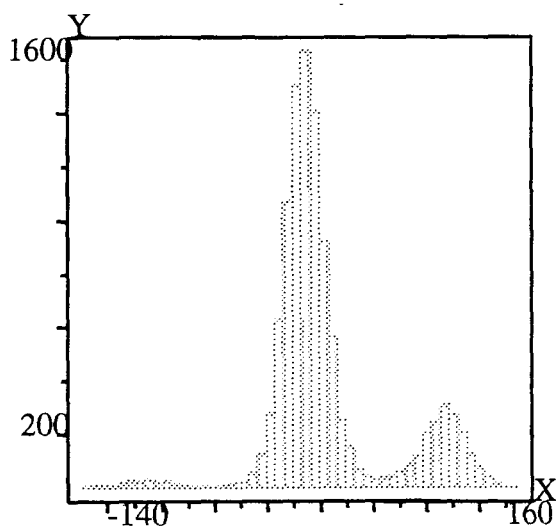


Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion  
C5C6O6H

La simulation effectuée avec SPASIBA et la fonction sigmoïdale de  
Dagett et al.



Valeurs de la torsion C5C6O6H (degré) en fonction du temps (fs)

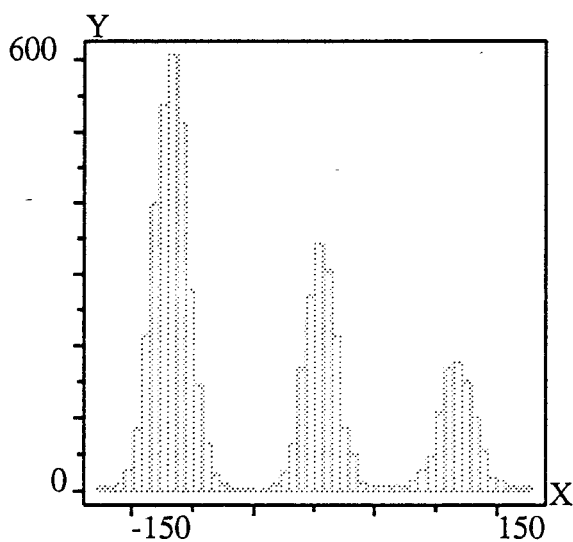


Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion  
C5C6O6H

Simulation effectuée dans l'eau avec SPASIBA

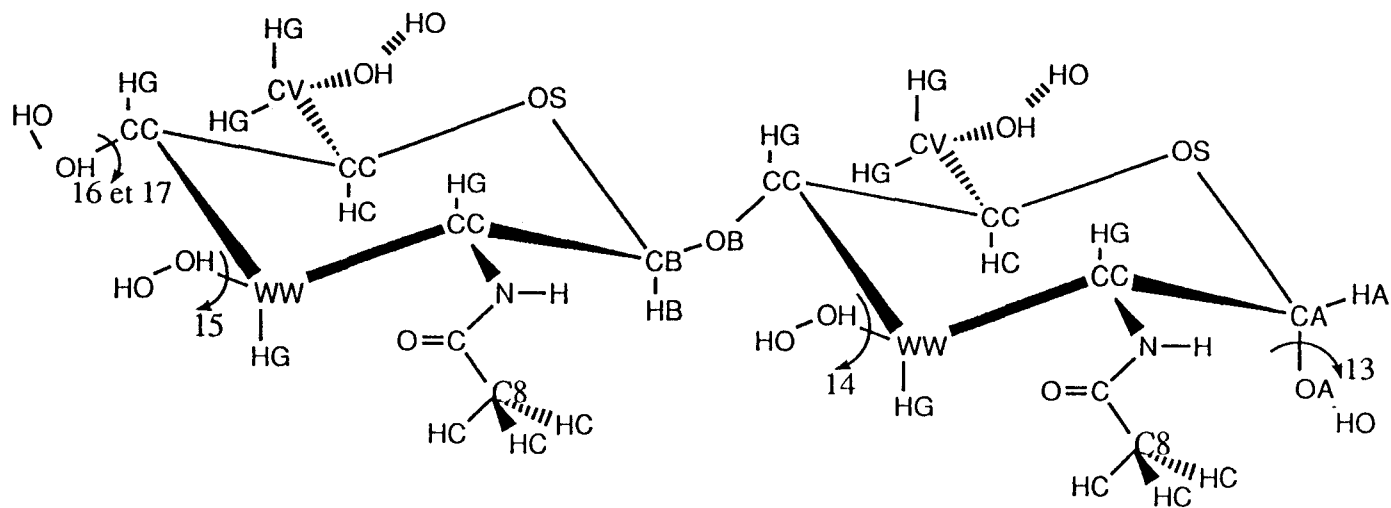


Valeurs de la torsion C5C6O6H de NAG1 (degré) en fonction du temps (fs)



Population des conformères obtenus suivant les valeurs de la torsion C5C6O6H de NAG1

Les tableaux ci-après résument tous les résultats obtenus pour les torsions exocycliques et celles du groupement acétamido.



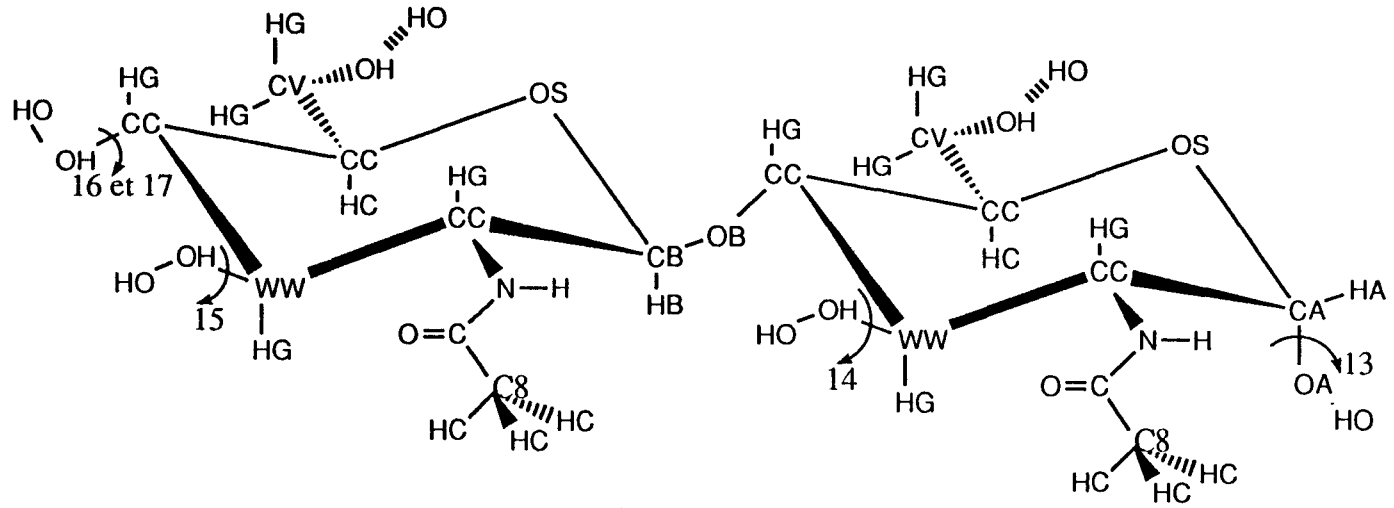
pour les torsions du type C-C-O-H

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	13	C2C1O1H	NAG2	16	C5C4O4H
NAG1	14	C2C3O3H	NAG2	17	C3C4O4H
NAG2	15	C2C3O3H			

Pour les groupements hydroxyles secondaires

torsion	RX	étude avec AMBER et $\epsilon=1$					étude avec SPASIBA et $\epsilon=1$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
13	-163°	3	-50° 7%	50° 68%	180° 25%	113° 147° 17°	3	-125° 21%	25° 36%	125° 43%	38° 172° 72°
14	143°	2		60° 37%	180° 63%	83° 37°	3	-110° 21%	0° 37%	135° 42%	107° 143° 8°
15	-51°	3	-50° 58%	50° 38%	180° 100°	1° 101° 129°	3	-110° 44%	0° 52%	150° 4%	59° 51° 159°
16	74°	3	-50° 11%	75° 21%	180° 68%	124° 1° 106°	3	-125° 54%	25° 2%	125° 44%	161° 49° 51°
17	99°	3	-50° 25%	+50° 64%	180° 11%	149° 49° 81°	2		0° 2%	120° 98%	99° 21°

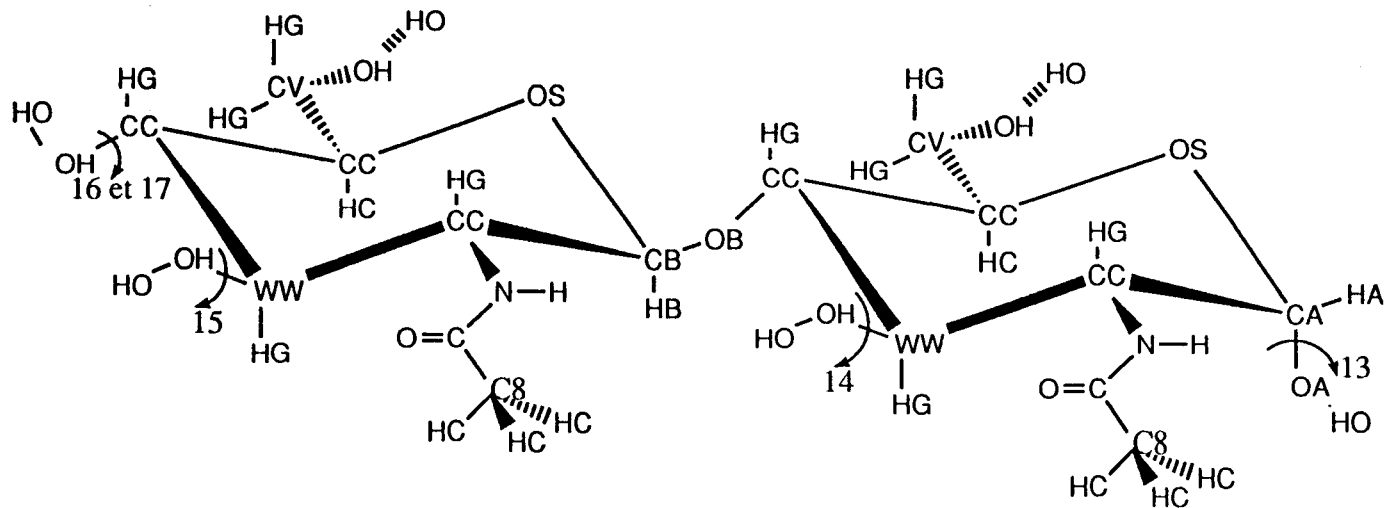




pour les torsions du type C-C-O-H

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	13	C2C1O1H	NAG2	16	C5C4O4H
NAG1	14	C2C3O3H	NAG2	17	C3C4O4H
NAG2	15	C2C3O3H			

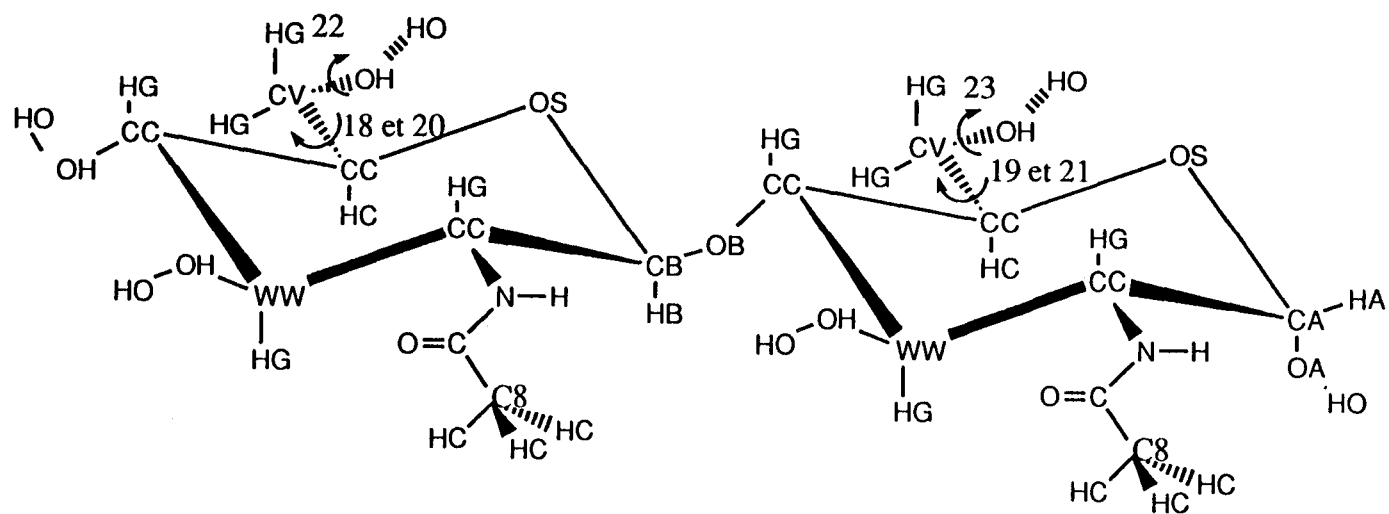
torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\varepsilon=80$					étude avec SPASIBA et $\varepsilon=4r_{jj}$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
13	-163°	3	-125° 35%	0° 21%	125° 44%	38° 163° 72°	3	-125° 49%	0° 45%	100° 6%	38° 163° 97°
14	143°	3	-125° 35%	0° 19%	130° 46%	92° 143° 13°	3	-125° 52%	0° 44%	100° 4%	110° 143° 43°
15	-51°	3	-125° 24%	50° 34%	120° 42%	74° 101° 171°	3	-125° 39%	0° 34%	125° 26%	74° 51° 176°
16	74°	3	-120° 35%	0° 43%	125° 22%	166° 74° 51°	3	-125° 49%	0° 45%	100° 6%	161° 74° 26°
17	99°	1	-155°	-54°	-100°	153°	1	-41°	39°	0°	99°



pour les torsions du type C-C-O-H

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG1	13	C2C1O1H	NAG2	16	C5C4O4H
NAG1	14	C2C3O3H	NAG2	17	C3C4O4H
NAG2	15	C2C3O3H			

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\epsilon =$ sigmoïdale					étude avec SPASIBA et $\epsilon = 1$ dans l'eau				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
13	-163°	3	-125° 34%	0° 61%	125° 5%	38° 163° 72°	3	-125° 41%	0° 57%	125° 2%	38° 163° 72°
14	143°	3	-125° 4%	0° 63%	110° 33%	92° 143° 33°	3	-125° 39%	0° 59%	100° 2%	92° 143° 43°
15	-51°	3	-120° 19%	0° 80%	125° 1%	69° 51° 176°	3	-125° 7%	0° 68%	120° 25%	74° 51° 171°
16	74°	3	-125° 77%	0° 2%	125° 21%	161° 74° 51°	3	-125° 64%	0° 28%	125° 8%	161° 74° 51°
17	99°	1	-41°	42°	0°	99°	1	-47°	37°	0°	99°

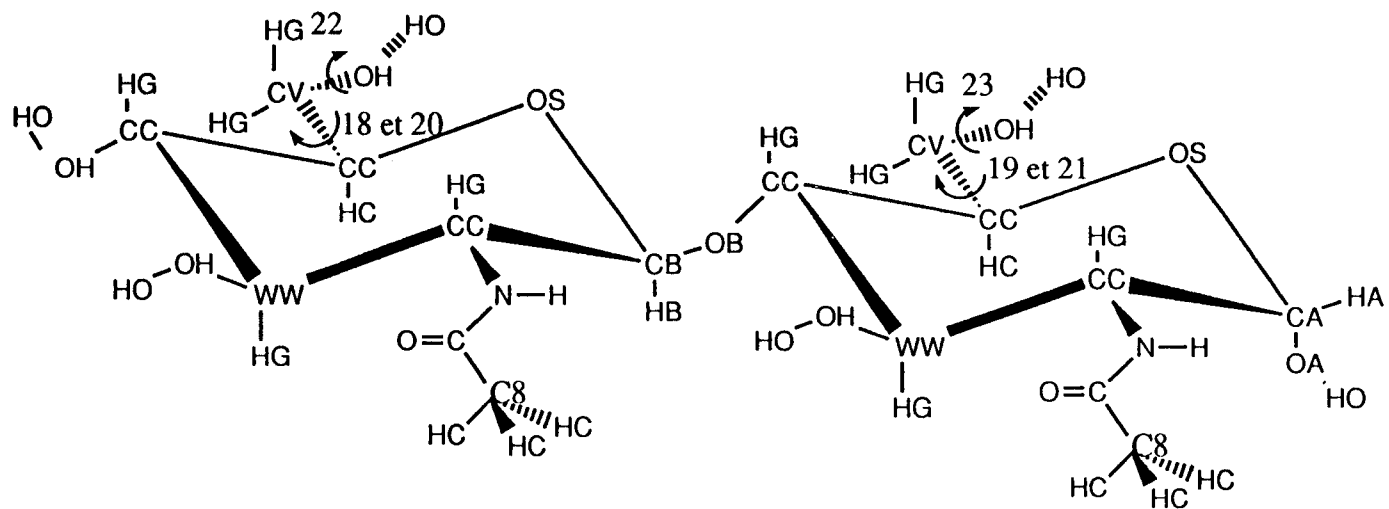


- pour les groupements CH<sub>2</sub>OH

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	18	C4C5C6O6	NAG1	21	O5C5C6O6
NAG1	19	C4C5C6O6	NAG2	22	C5C6O6H
NAG2	20	O5C5C6O6	NAG1	23	C5C6O6H

Pour les groupements hydroxyles primaires

torsion	RX	étude avec AMBER et $\epsilon=1$					étude avec SPASIBA et $\epsilon=1$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
18	45°	2		-60° 5%	180° 95%	105° 135°	1	20°	110°	50°	5°
20	-74°	2		65° 26%	180° 74%	139° 106°	1	-103°	-10°	-55°	19°
19	56°	2		60° 48%	180° 52%	4° 124°	1	10°	118°	65°	9°
21	-65°	3		60° 63%	150° 37%	125° 145°	1	-110°	-16°	-60°	5°
22	88°	2	-50° 15%	50° 85%		138° 33°	2		10° 62%	110° 38%	78° 22°
23	-91°	3	-50° 58%	50° 38%	180° 4%	41° 141° 89°	3	-120° 5%	10° 67%	120° 28%	29° 101° 149°

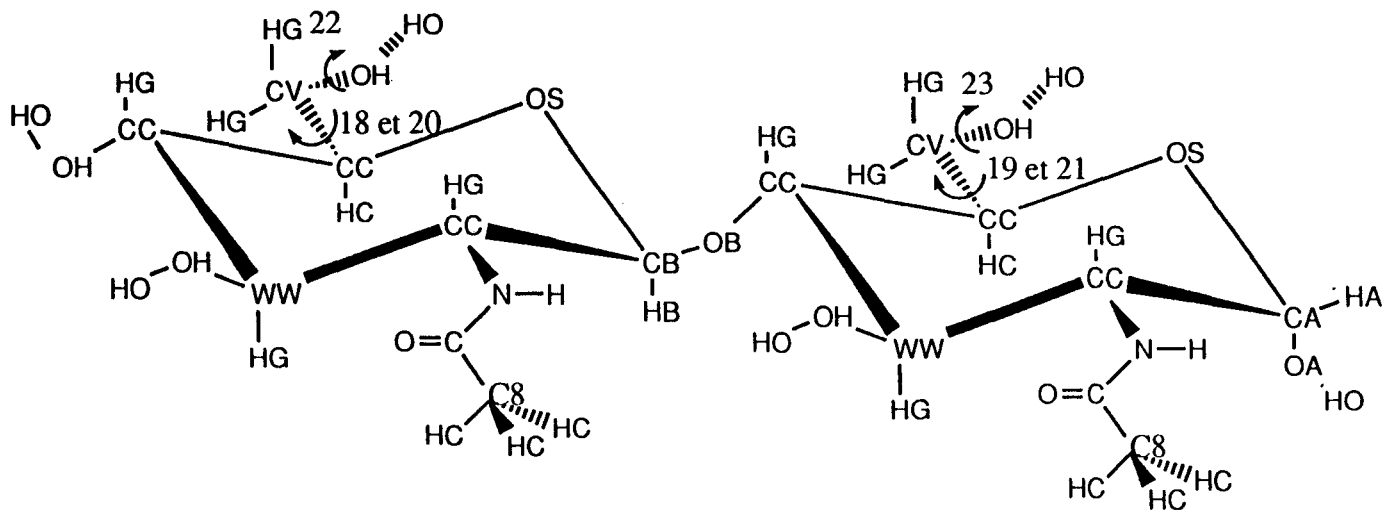


- pour les groupements CH<sub>2</sub>OH

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	18	C4C5C6O6	NAG1	21	O5C5C6O6
NAG1	19	C4C5C6O6	NAG2	22	C5C6O6H
NAG2	20	O5C5C6O6	NAG1	23	C5C6O6H

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\epsilon = 80$					étude avec SPASIBA et $\epsilon = 4r_{ij}$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
18	45°	1	16°	99°	55°	10°	2	-70° 26%	58° 74%		13° 115°
20	-74°	1	-104°	-22°	-70°	4°	2	-70° 73%		180° 27%	4° 106°
19	56°	2	-70° 11%	60° 89%		126° 4°	2		180° 3%	60° 97%	124° 4°
21	-65°	2	-75° 92%	180° 8%		10° 65°	2	-64° 96%		68° 4%	1° 133°
22	88°	3	-125° 40%	0° 33%	160° 27%	147° 88° 72°	3	-125° 40%	0° 38%	75° 22%	147° 88° 13°
23	-91°	3	-120° 5%	10° 67%	120° 28%	29° 101° 149°	3	-125° 5%	0° 52%	110° 43%	34° 91° 139°

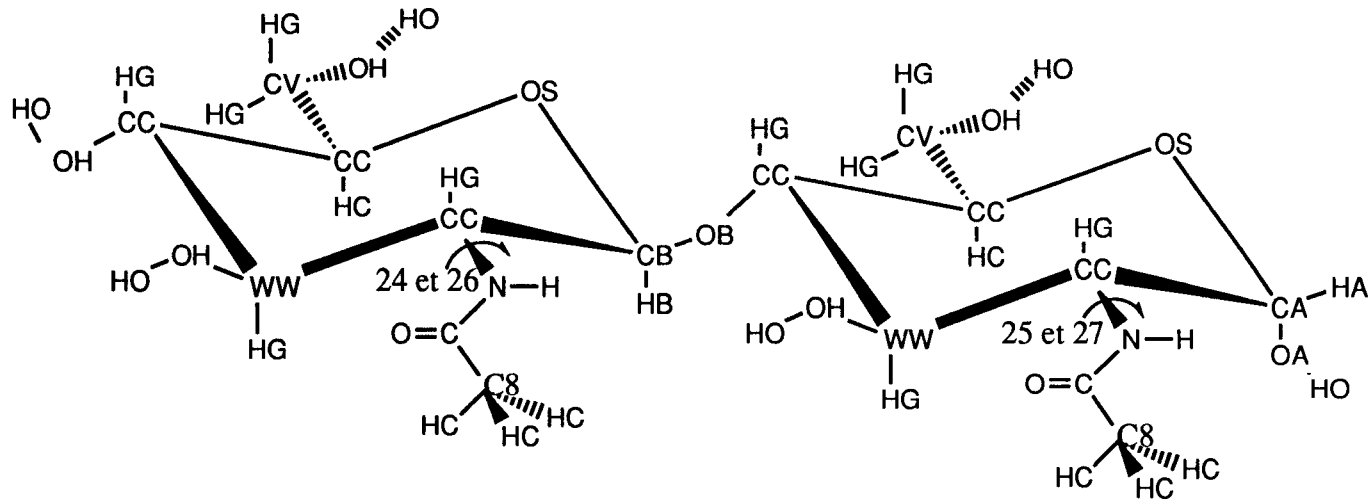




- pour les groupements CH<sub>2</sub>OH

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	18	C4C5C6O6	NAG1	21	O5C5C6O6
NAG1	19	C4C5C6O6	NAG2	22	C5C6O6H
NAG2	20	O5C5C6O6	NAG1	23	C5C6O6H

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\varepsilon =$ sigmoïdale					étude avec SPASIBA et $\varepsilon = 1$ dans l'eau				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
18	45°	1	14°	115°	60°	15°	1	27°	101°	60°	15°
20	-74°	1	-103°	8°	-60°	14°	1	-94°	-20°	-60°	14°
19	56°	3	-65° 4%	60° 38%	180° 58%	121° 4° 124°	2		60° 8%	180° 92%	4° 124°
21	-65°	3	-60° 28%	60° 67%	180° 5%	5° 125° 115°	2	-60° 5%		60° 95%	50° 125°
22	88°	3	-125° 5%	0° 86%	110° 9%	147° 88° 22°	3	-125° 48%	0° 32%	110° 20%	147° 88° 22°
23	-91°	3	-125° 2%	10° 95%	110° 3%	34° 101° 159°	3	-125° 16%	10° 34%	120° 50%	34° 101° 149°

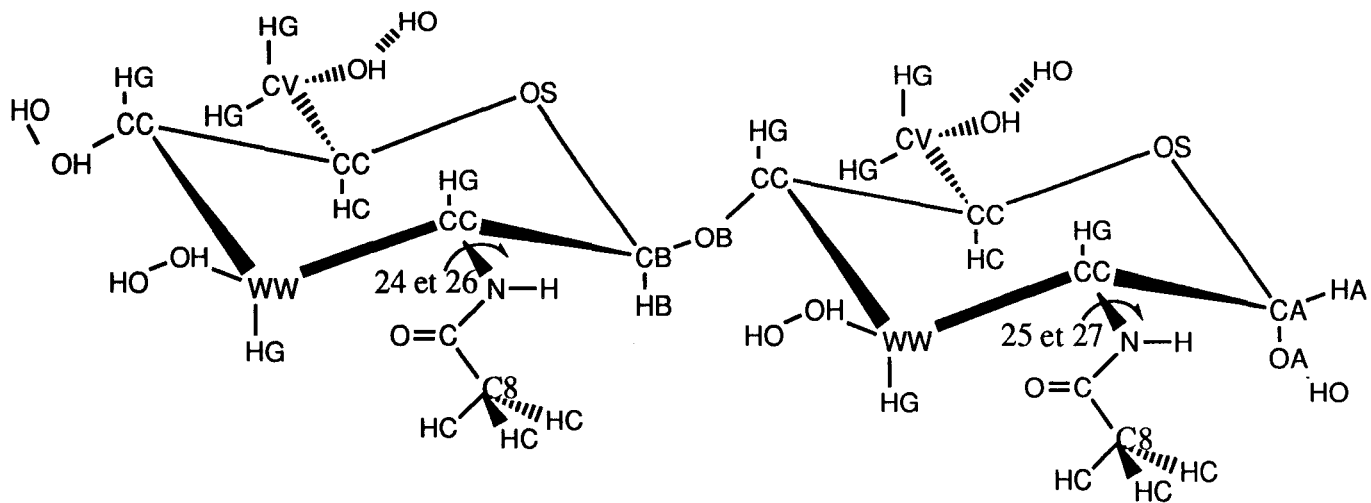


- pour les groupements acétamido

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	24	C1C2N2C7	NAG2	26	C3C2N2C7
NAG1	25	C1C2N2C7	NAG1	27	C3C2N2C7

Pour les groupements acétamido

torsion	RX	étude avec AMBER et $\epsilon = 1$					étude avec SPASIBA et $\epsilon = 1$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
24	138°	1	30°	190°	75°	63°	2	-90° 2%		90° 98%	132° 48°
25	100°	2		60° 52%	150° 48%	40° 50°	2	-55° 59%		130° 41%	155° 30°
26	-98°	1			180°	82°	2		30° 15%	180° 85%	128° 82°
27	-136°	2		50° 94%	180° 6%	174° 44°	2	-90° 42%	55° 58%		46° 169°

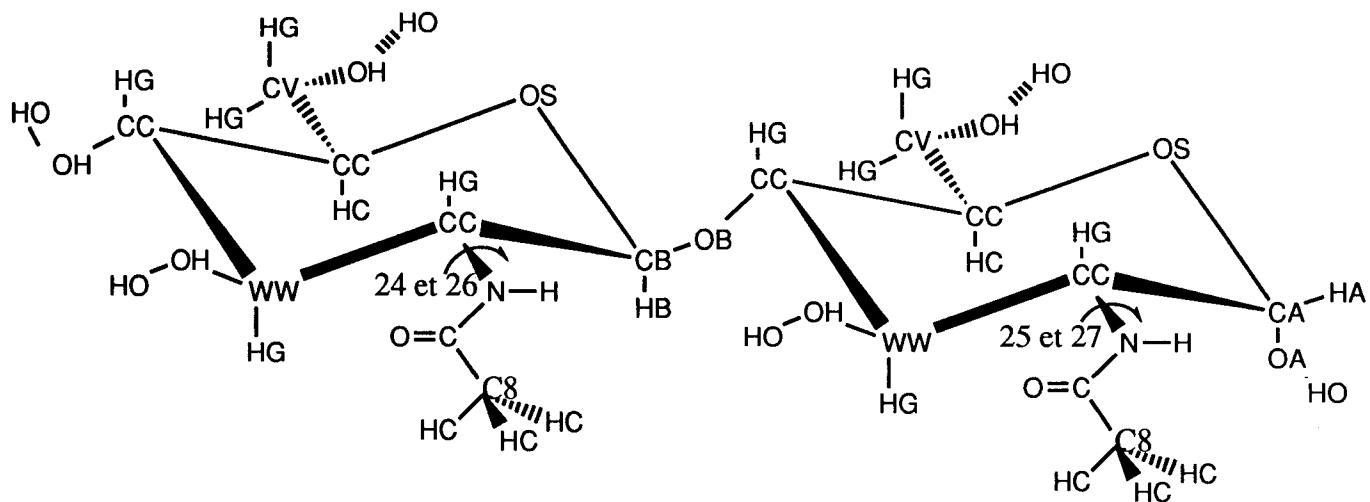


239-bis

- pour les groupements acétamido

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	24	C1C2N2C7	NAG2	26	C3C2N2C7
NAG1	25	C1C2N2C7	NAG1	27	C3C2N2C7

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\varepsilon = 80$					étude avec SPASIBA et $\varepsilon = 4r_{ij}$				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
24	138°	2	-100° 7%		100° 93%	122° 38°	2	-80° 6%		100° 94%	142° 38°
25	100°	2	-150° 1%		100° 99%	110° 0°	2	-65° 93%		120° 7%	165° 20°
26	-98°	2		50° 30%	180° 170%	148° 82°	2		50° 3%	180° 97%	148° 82°
27	-136°	1			180°	44°	2	-65° 93%		120° 7%	71° 104°



240-bis

- pour les groupements acétamido

résidu	torsion	définition	résidu	torsion	définition
NAG2	24	C1C2N2C7	NAG2	26	C3C2N2C7
NAG1	25	C1C2N2C7	NAG1	27	C3C2N2C7

torsion	RX	étude avec SPASIBA et $\epsilon =$ sigmoïdale					étude avec SPASIBA et $\epsilon = 1$ dans l'eau				
		nombre de torsion	valeur minimale ou répartition	valeur maximale	moyenne	écart avec RX	nombre de torsion	valeur minimale	valeur maximale	moyenne	écart avec RX
24	138°	2		70° 30%	150° 70%	68° 12°	2		70° 60%	140° 40%	68° 2°
25	100°	2	-60° 44%		125° 56%	160° 25°	2		125° 98%	180° 2%	25° 80°
26	-98°	1	140°	180°	180°	82°	1	140°	180°	180°	82°
27	-136°	2	-110° 58%	60° 42%		26° 164°	1	-3	-167	-110°	31°





Si nous comparons les études faites avec AMBER et  $\epsilon=1$ , avec SPASIBA dans les mêmes conditions et les résultats obtenus par diffraction des rayons X, nous pouvons en déduire les remarques suivantes:

- pour les groupements C-C-O-H

Toutes les valeurs de torsions retrouvées avec AMBER sont assez éloignées de celles données par la cristallographie sauf pour la torsion 15 (C2C2O3H), ou un des conformères existant correspond à celui obtenu par diffraction des rayons X.

Par contre, les valeurs de torsions, obtenues dans les mêmes conditions avec SPASIBA, sont en générale plus proches de celles déterminées par diffraction des rayons X sauf pour cette même torsion 15.

- pour les groupements CH<sub>2</sub>OH

Avec AMBER, pour les torsions de type O5C5C6O6 et C5C6O6H, il n'existe pas de conformères proches de ceux déterminés par diffraction des rayons X, alors qu'avec SPASIBA, une des trois torsions existantes est proche de la valeur expérimentale:

- pour les groupements acétamido

Nous observons des différences notables entre les valeurs expérimentales et celles déterminées pendant les simulations effectuées avec AMBER et SPASIBA.

Si nous comparons, les différents résultats obtenus par SPASIBA nous remarquons:

- pour les groupements C-C-O-H

En générale, les valeurs de torsions trouvées sont identiques quelle que soit la constante diélectrique, cependant, les populations de ces différents conformères sont très différentes. De plus, il existe de grandes différences pour la torsion 17 (C3C4O4H) suivant la nature de la constante diélectrique choisie. En observant les différentes valeurs de cette torsion, nous pouvons dire qu'une constante diélectrique égale à 80 ne mime pas les effets de l'eau. Parmi les deux autres méthodes permettant de reproduire les effets de l'eau, nous voyons qu'une constante diélectrique dépendante d'une fonction sigmoïdale reproduit mieux les effets de l'eau puisqu'en général, les conformères retrouvés avec ce type de constante diélectrique sont aussi ceux obtenus dans l'eau.

Il est à noter que les valeurs des torsions déterminées par diffraction des rayons X ne sont pas toujours retrouvées dans les différents conformères existants.

- pour les groupements CH<sub>2</sub>OH

La méthode prenant en compte une constante diélectrique décrite par une fonction sigmoïdale est encore celle qui reproduit le mieux les effets de la solvataion. Cependant, parfois le conformère de plus forte population pour les torsions C5C6O6H dans l'eau ne correspond pas toujours à celui de plus forte population pour cette dernière fonction. Parmi les conformères retrouvés, existent ceux déterminés par diffraction des rayons X.

- pour les groupements acétamido

Les valeurs des angles de torsion C2N2C7C8 sont toujours égales à 180° et celles des angles de torsion C2N2C7O7 égales à 0°, quelle que soit la constante diélectrique, comme déterminées par diffraction des rayons X. Pour les groupements méthyles, on observe une libre rotation, plus ou moins rapide de ces groupements.

Le calcul effectué avec la constante diélectrique fonction sigmoïdale est celui qui donnent des résultats les plus proches du calcul effectué dans l'eau.

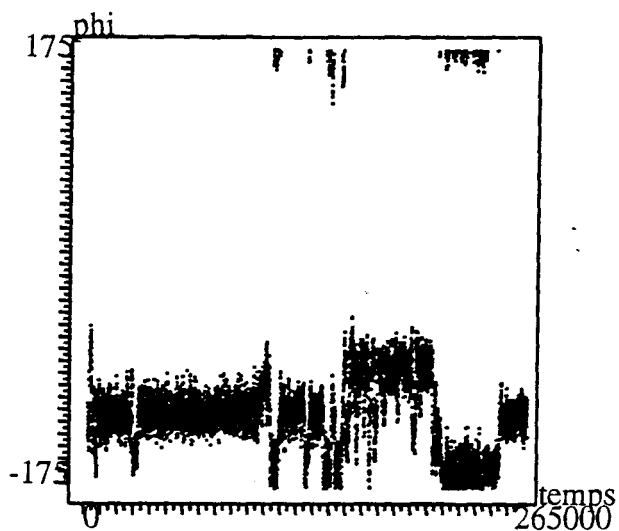
D'après ces résultats, nous voyons:

- que les unités monosaccharidiques ne peuvent être pris en compte comme rigides puisque nous avons différentes valeurs d'angles de torsion donc plusieurs conformères pour chaque cycle.

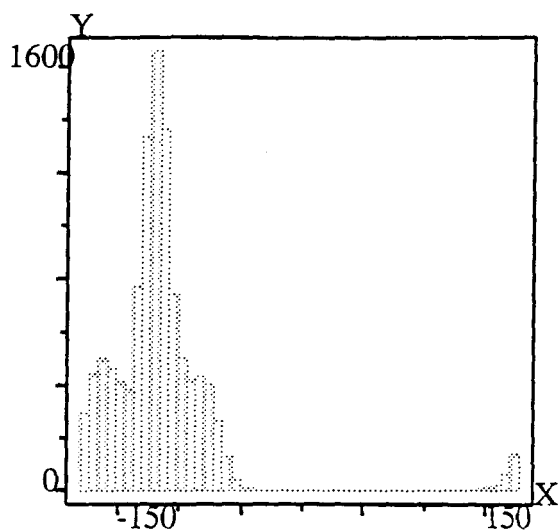
- que la méthode qui mime le mieux les effets de l'eau est celle qui consiste à considérer que la constante diélectrique dépendante de la fonction sigmoïdale décrite par Dagett *et al.*.

#### IV.3.4.3. Etudes des angles $\phi$ et $\psi$

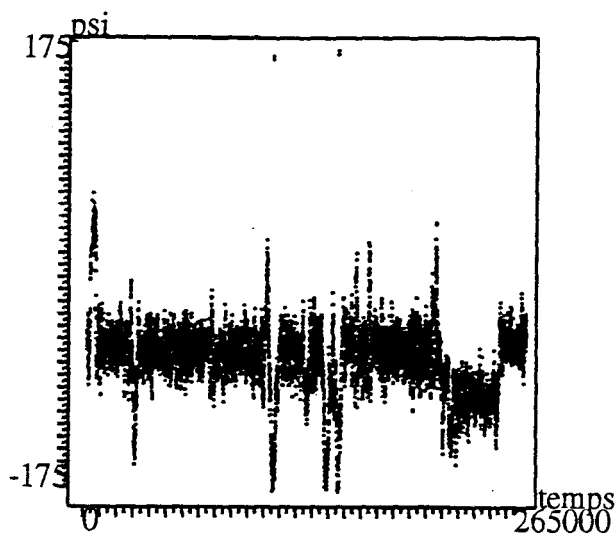
Les angles de torsion  $\phi$  (O5C1O1C4) et  $\psi$  (C1O1C4C5) sont ceux qui rendent mieux compte de la conformation spatiale du disaccharide. Les pages suivantes présentent la variation des angles phi et psi en fonction du temps, ainsi que les histogrammes et les conformations correspondantes.



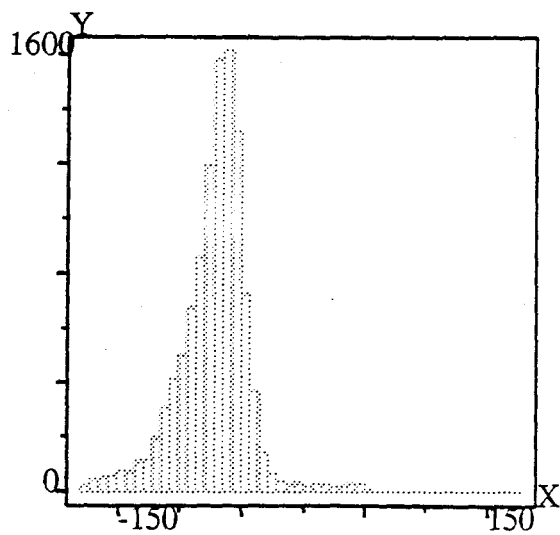
Valeurs de la torsion phi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



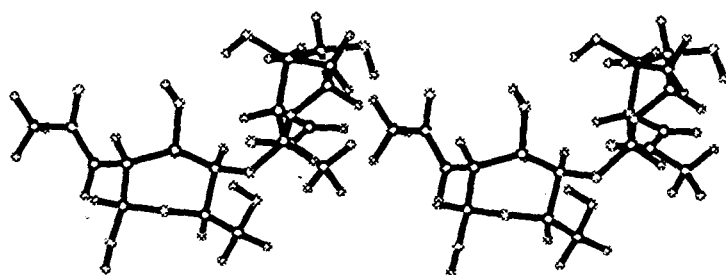
Valeurs de la torsion psi (degré)  
en fonction du temps (fs)



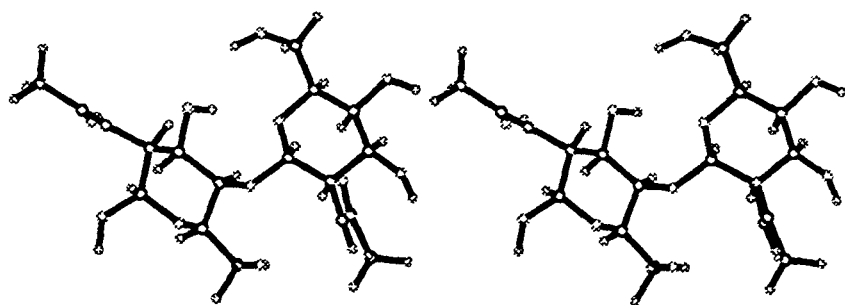
Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



Simulation effectuée avec AMBER,  $\epsilon = 1$

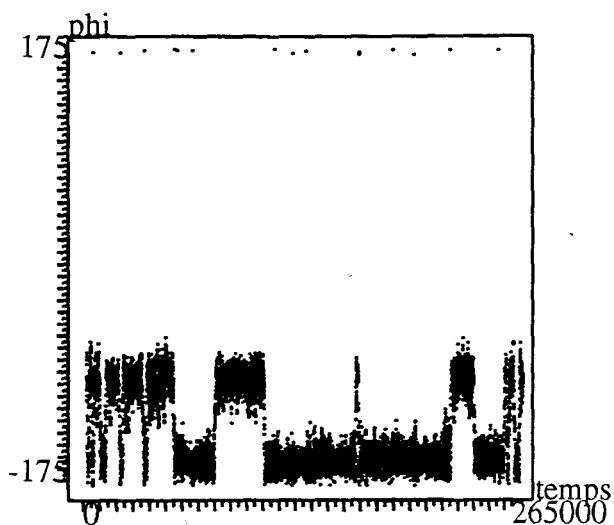


Vue stéréo de la molécule à 3 ps

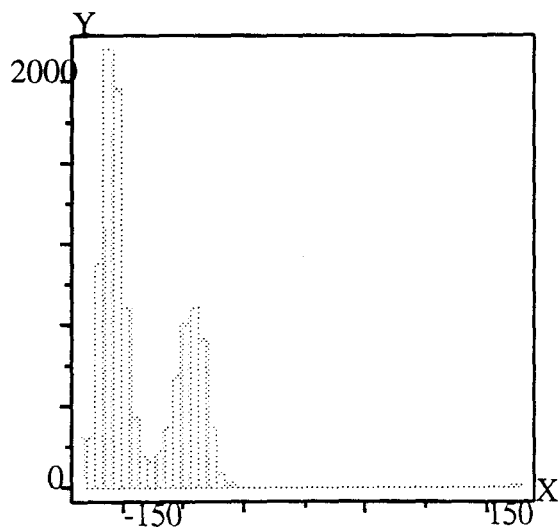


Vue stéréo de la molécule à 240 ps

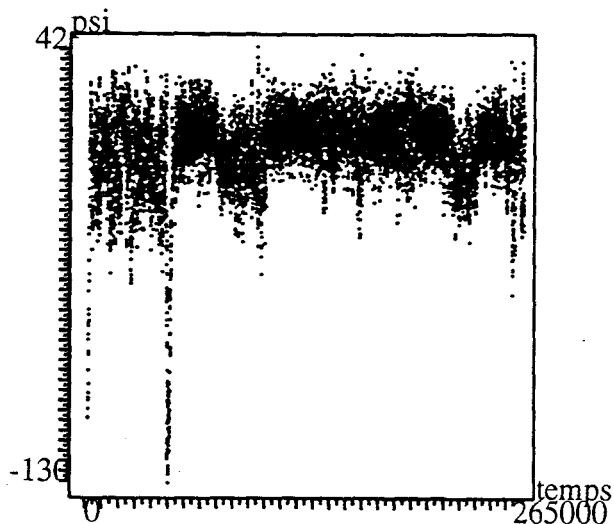




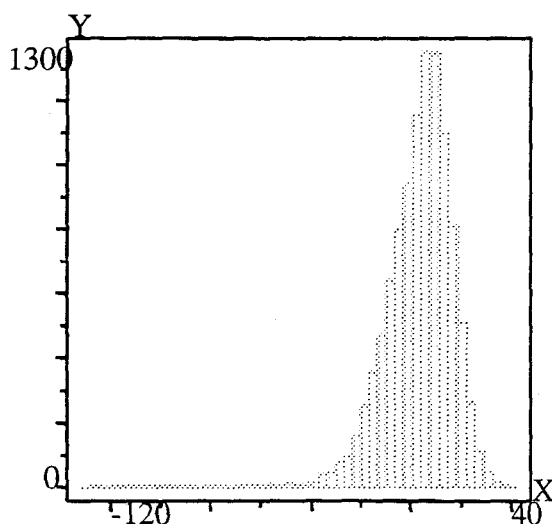
Valeurs de la torsion phi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi

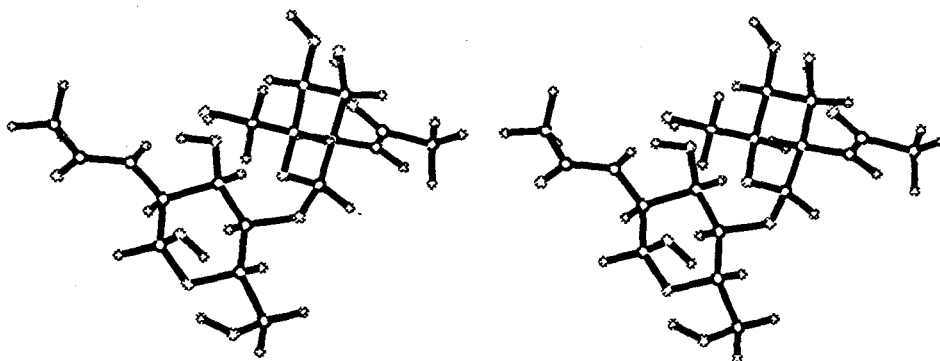


Valeurs de la torsion psi (degré)  
en fonction du temps (fs)

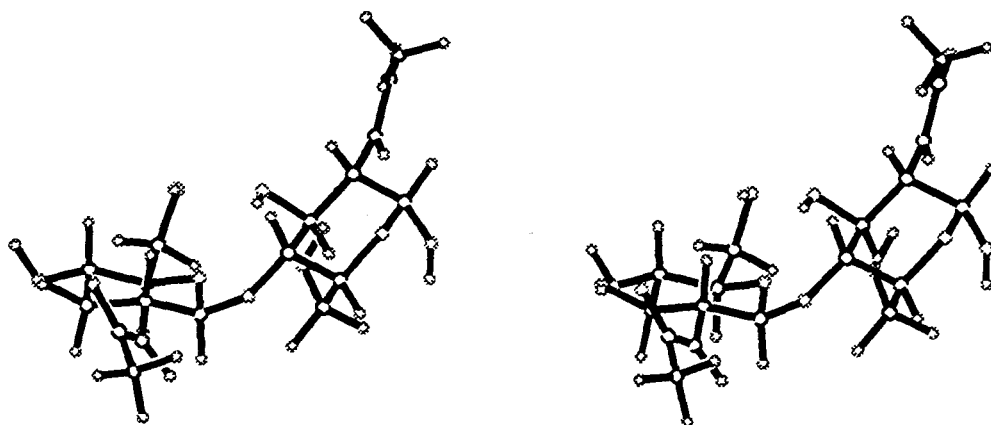


Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi

Simulation effectuée avec SPASIBA,  $\epsilon = 1$

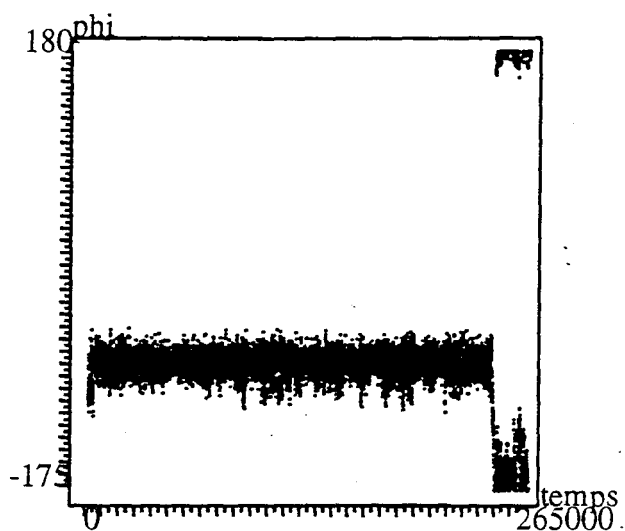


Vue stéréo de la molécule à 70 ps

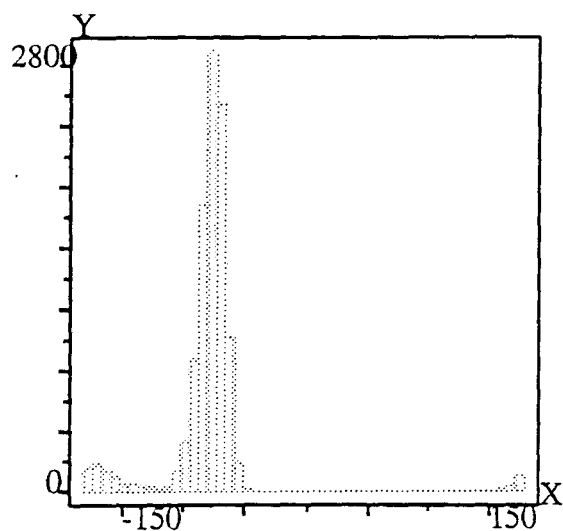


Vue stéréo de la molécule à 100 ps

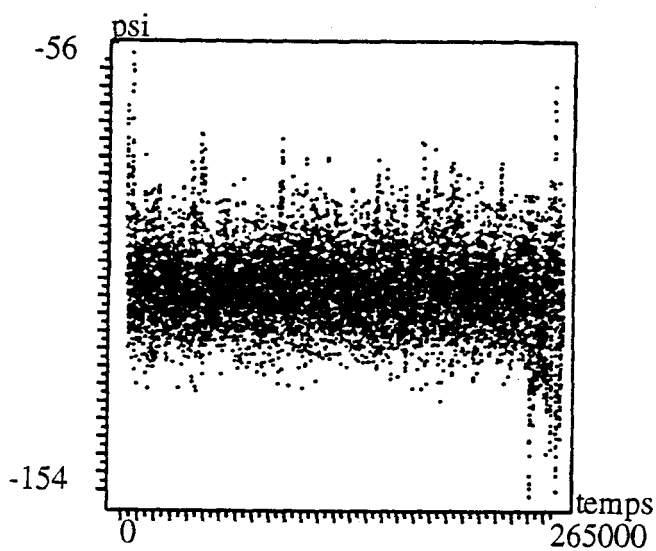
*Chimie*



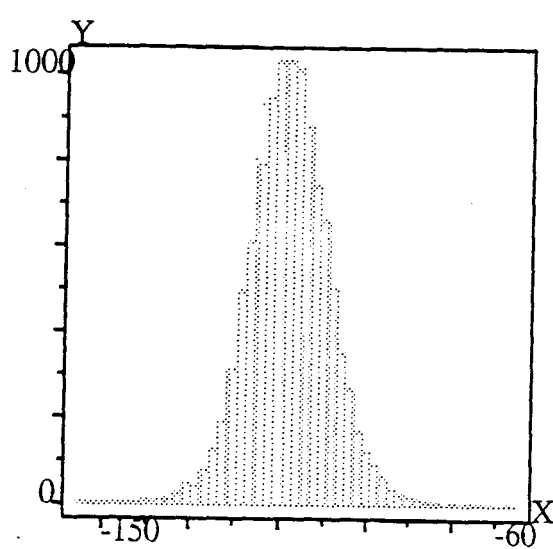
Valeurs de la torsion phi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



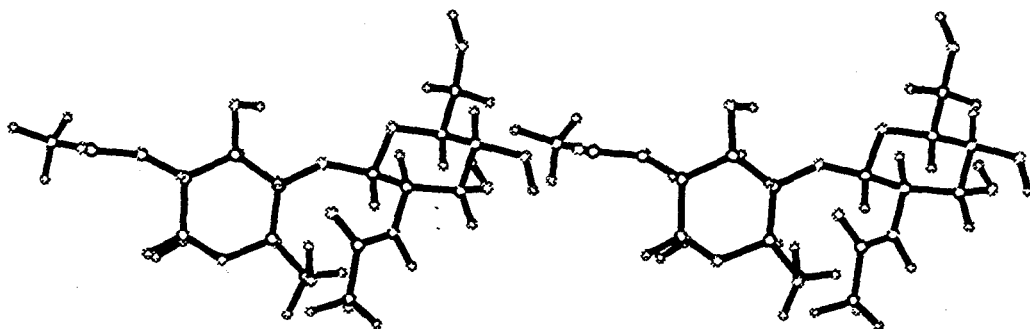
Valeurs de la torsion psi (degré)  
en fonction du temps (fs)



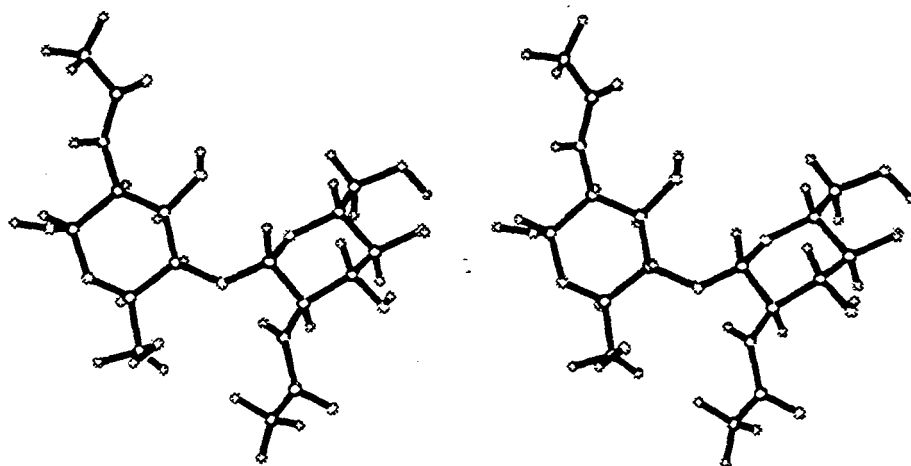
Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



Simulation effectuée avec SPASIBA,  $\epsilon = 80$



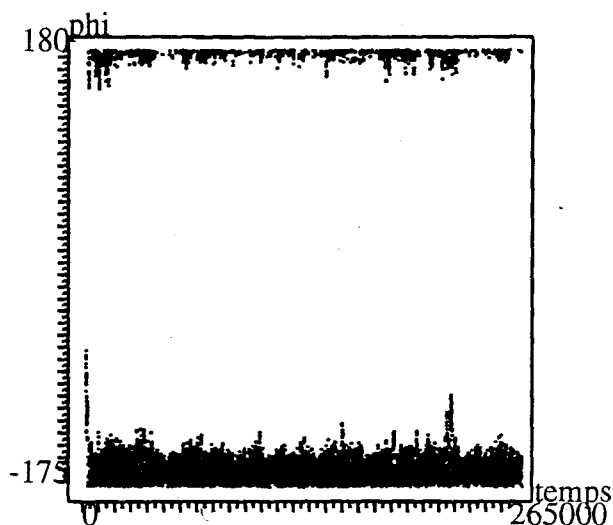
Vue stéréo de la molécule à 102 ps



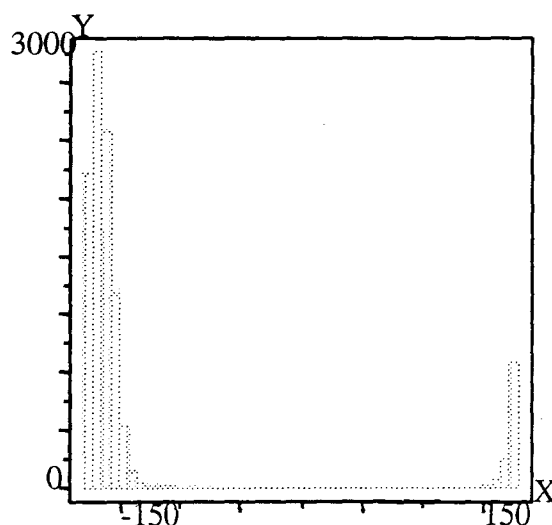
Vue stéréo de la molécule à 154 ps



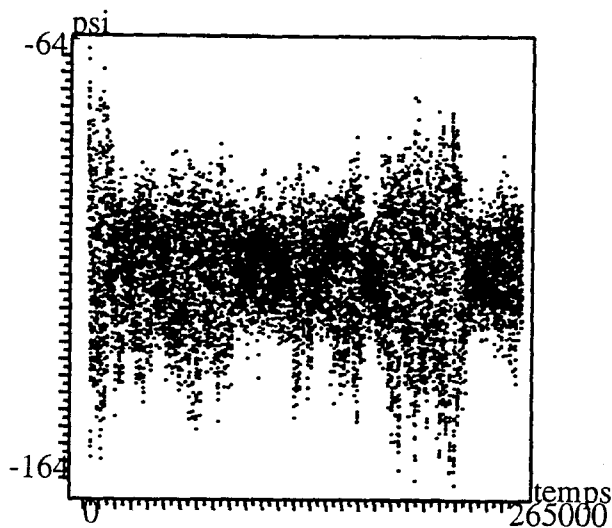




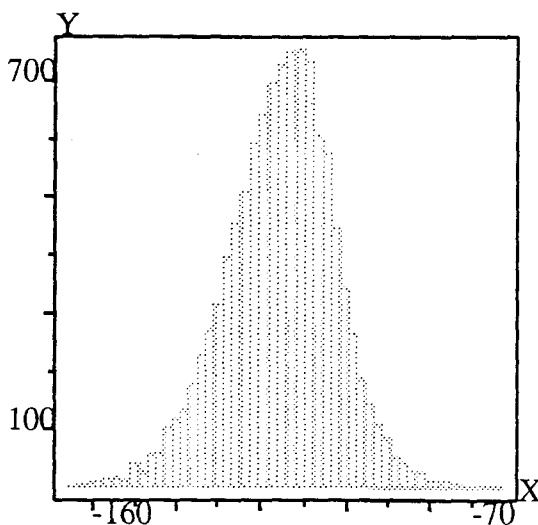
Valeurs de la torsion phi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



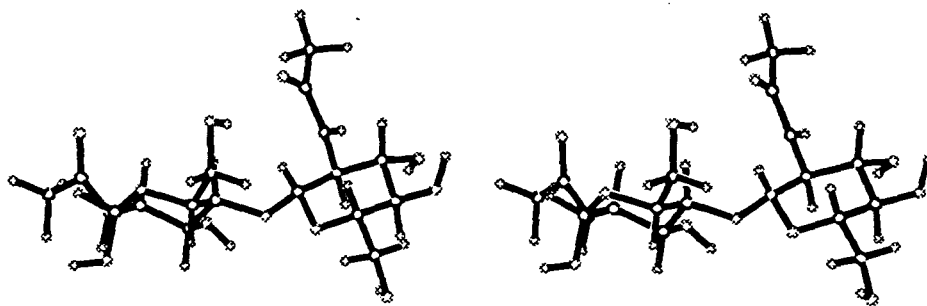
Valeurs de la torsion psi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi

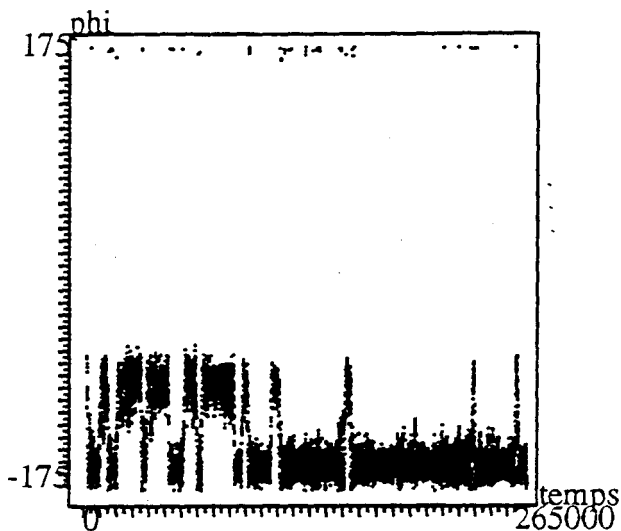


Simulation effectuée avec SPASIBA,  $\epsilon = 4r_{ij}$

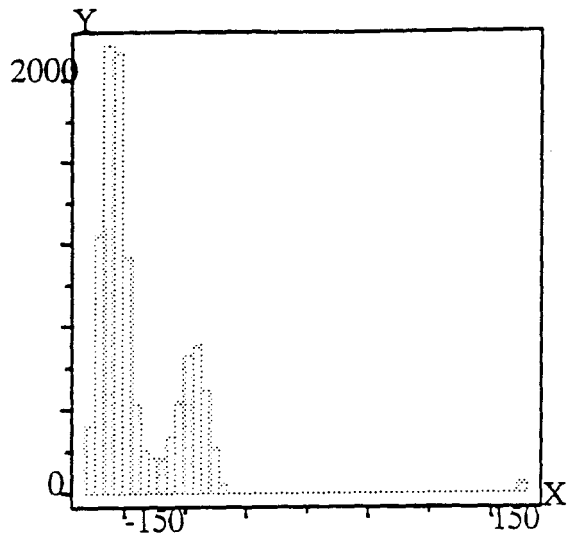


Vue stéréo de la molécule à 100 ps

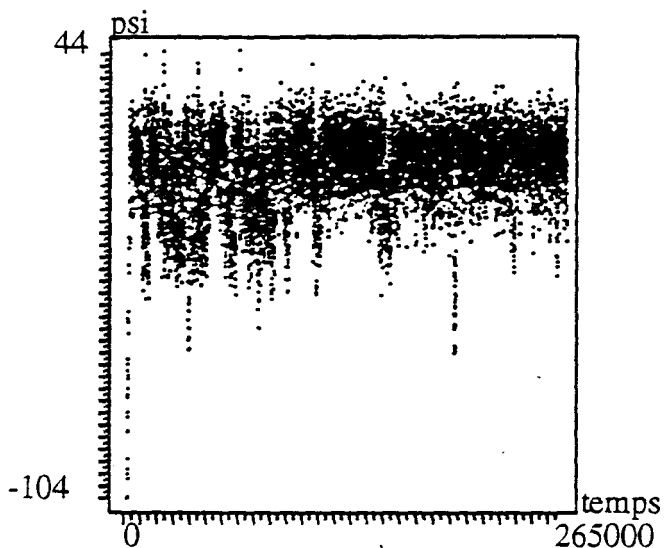
Simulation effectuée avec SPASIBA  
et la fonction sigmoïdale de Dagett *et al.*



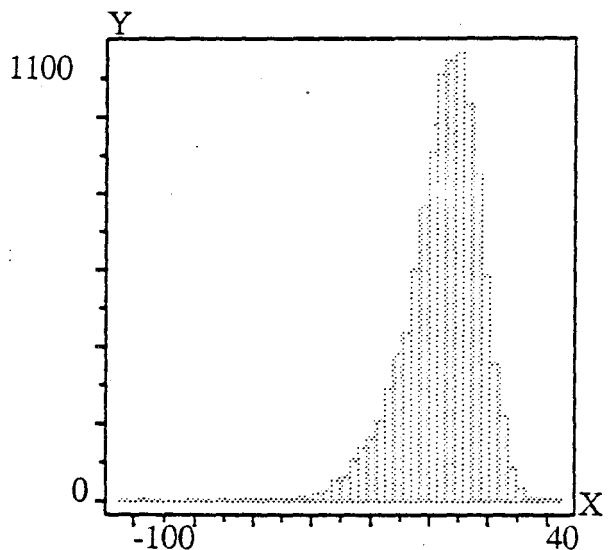
Valeurs de la torsion phi (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



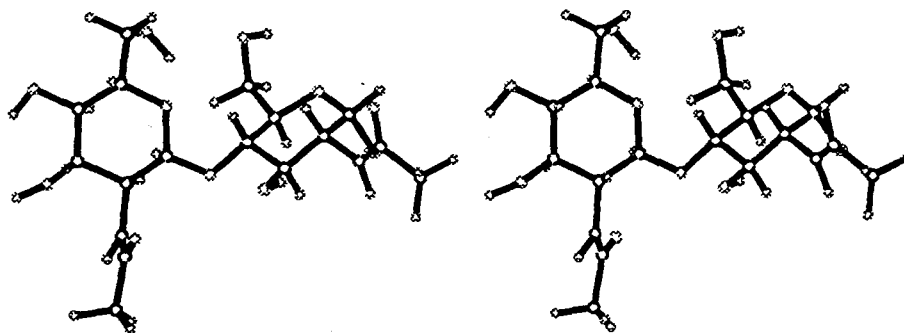
Valeurs de la torsion psi (degré)  
en fonction du temps (fs)



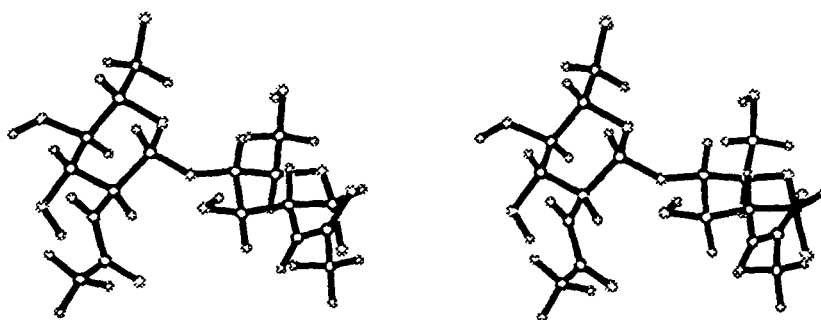
Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



Simulation effectuée avec SPASIBA  
et la fonction sigmoïdale de Dagett *et al.*



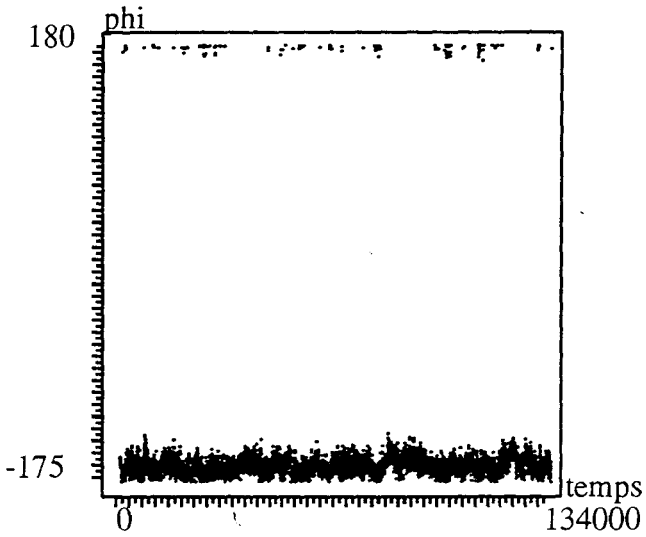
Vue stéréo de la molécule à 85 ps



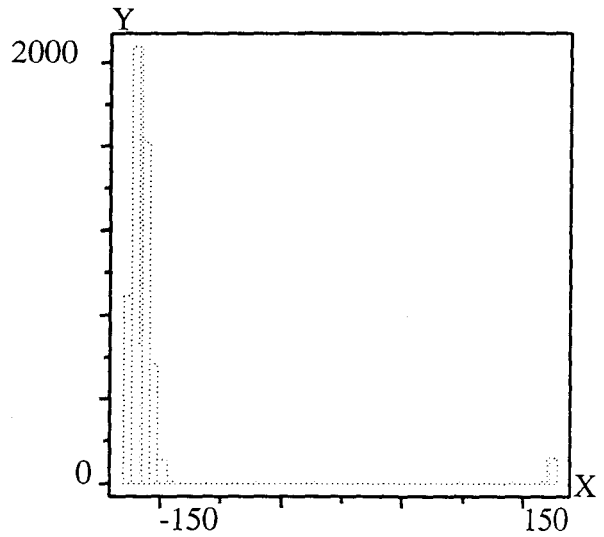
Vue stéréo de la molécule à 140 ps



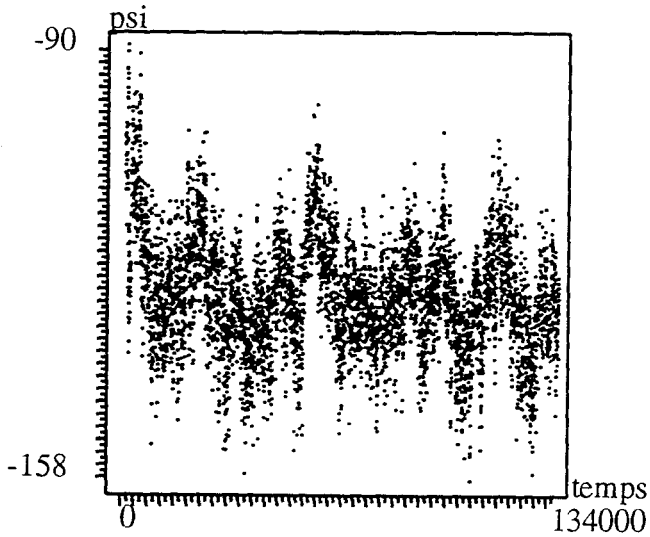
Simulation effectuée dans l'eau avec SPASIBA



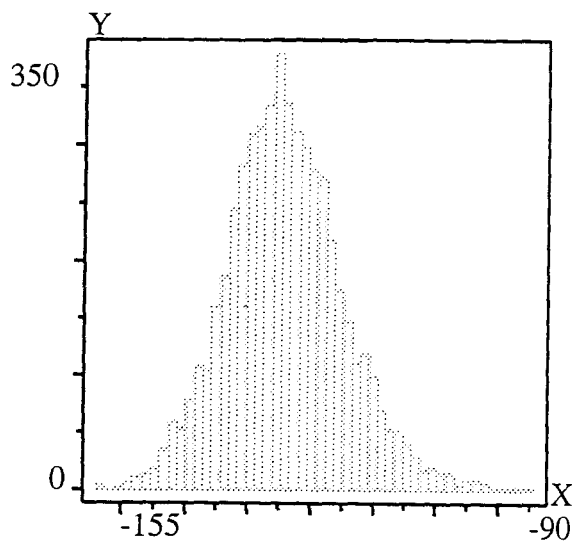
Valeurs de la torsion  $\phi$  (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion  $\phi$

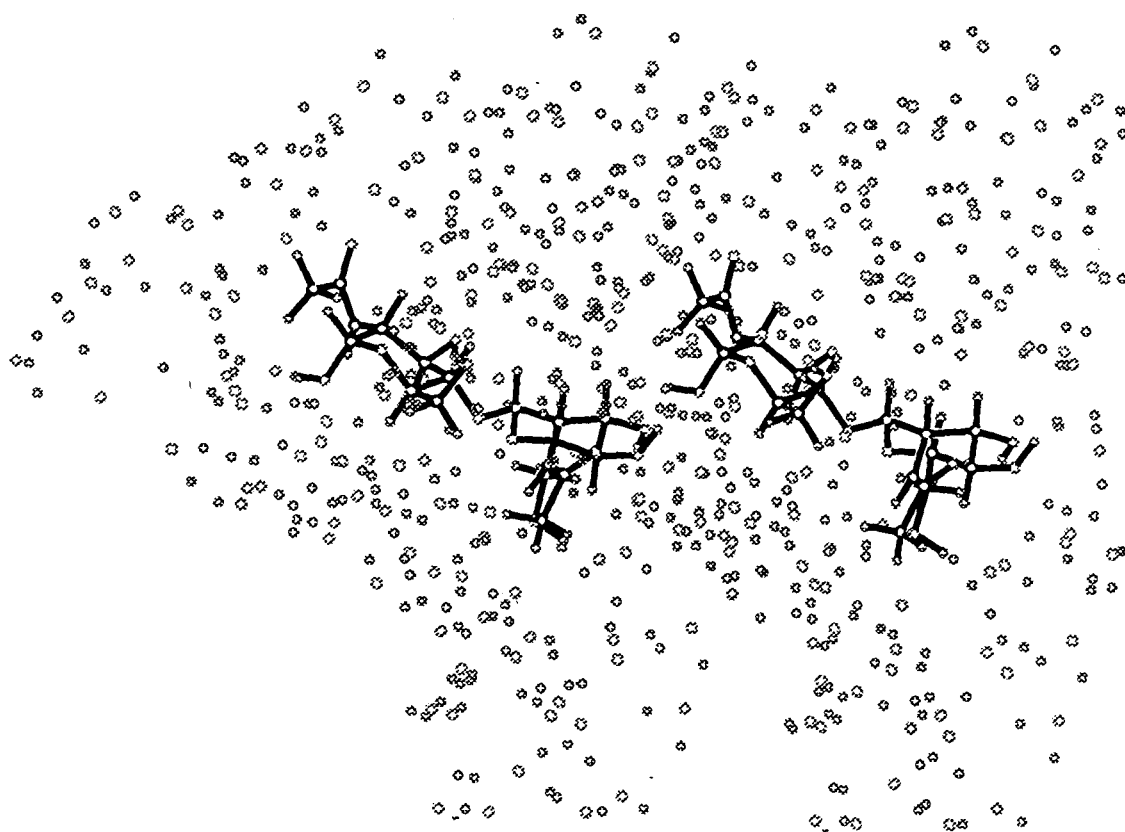


Valeurs de la torsion  $\psi$  (degré)  
en fonction du temps (fs)



Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion  $\psi$

Simulation effectuée dans l'eau avec SPASIBA

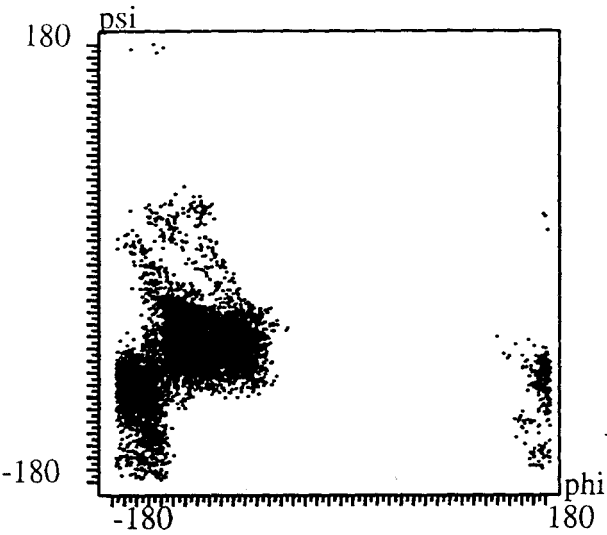


Vue stéréo de la molécule à 70 ps

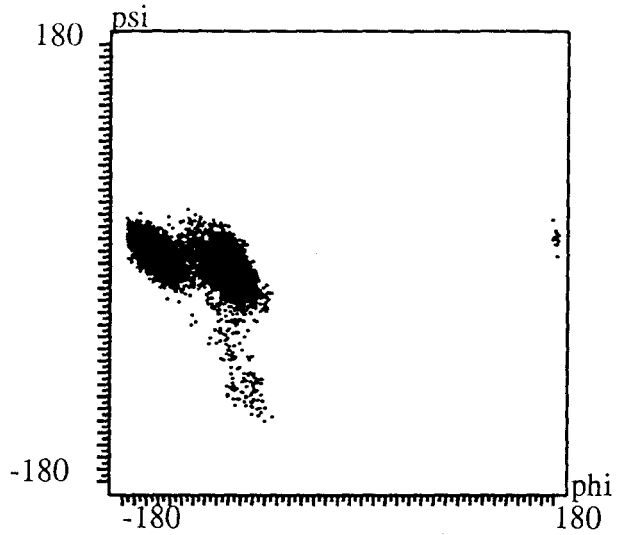
D'après tous ces graphiques, nous pouvons observer pour l'angle  $\Phi$  qu'il existe un seul conformère quelque soit la méthode utilisée. Pour cet angle, la valeur trouvée avec AMBER est la plus proche de celle observée par diffraction des rayons X (27). Avec SPASIBA, nous remarquons des valeurs différentes suivant la manière dont l'effet de solvation a été pris en compte. Aucune de ces valeurs ne correspond avec celles obtenues par diffraction des rayons X. Donc dans le vide ou en solution le diacétylchitobiose ne présentent pas la même conformation, démontrant par là une importante flexibilité.

Les graphiques de la page suivante montrent les régions préférées pour la liaison  $\beta$ 1-4 pour chaque simulation effectuée.

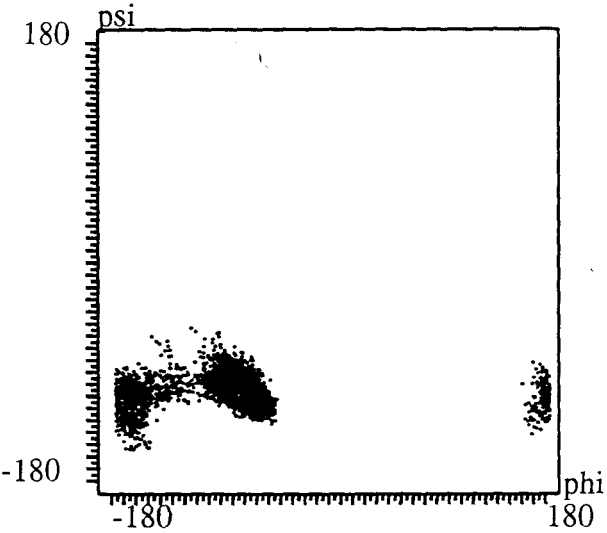
Simulation effectuée  
avec AMBER,  $\epsilon = 1$   
 $\psi = f(\phi)$



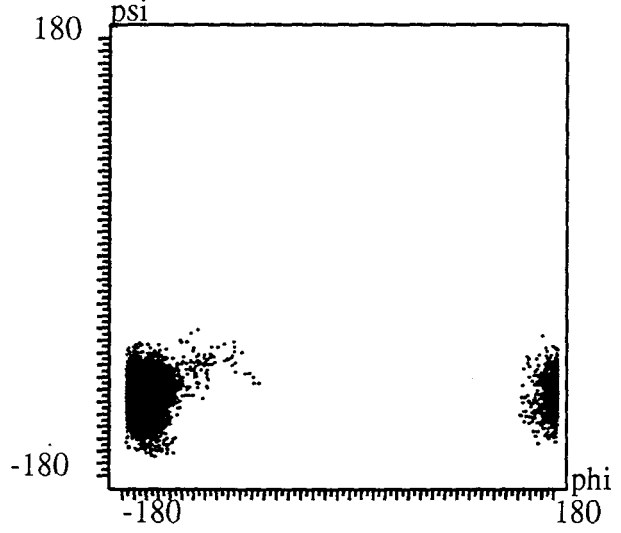
Simulation effectuée  
avec SPASIBA,  $\epsilon = 1$   
 $\psi = f(\phi)$



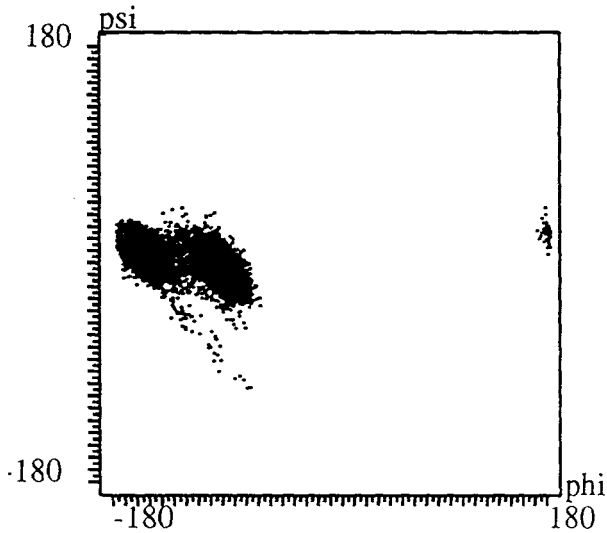
Simulation effectuée  
avec SPASIBA,  $\epsilon = 80$   
 $\psi = f(\phi)$



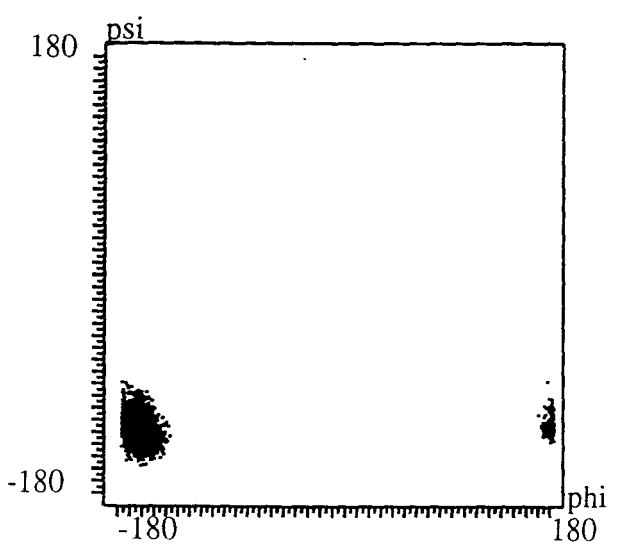
Simulation effectuée  
avec SPASIBA,  $\epsilon = 4r_{ij}$   
 $\psi = f(\phi)$



Simulation effectuée  
avec SPASIBA,  $\epsilon = \text{sigmoïdale}$   
 $\psi = f(\phi)$



Simulation effectuée  
avec SPASIBA, dans l'eau  
 $\psi = f(\phi)$





Contrairement aux simulations effectuées par Homans *et al.* et Dauchez *et al.* (37), le conformère défini par la diffraction des rayons X de Mo et Jensen (25) n'est retrouvé qu'au cours de la simulation effectuée avec SPASIBA et  $\epsilon = 80$ .

Deux régions sont retrouvées pour toutes les simulations sauf pour celles effectuées avec SPASIBA,  $\epsilon = 4r_{ij}$  et dans l'eau, pour lesquelles une seule région est retrouvée.

Il faut toutefois remarquer que cette liaison  $\beta 1-4$  est assez flexible puisque nous ne retrouvons pas, d'un résultat de diffraction des rayons X à un autre, les mêmes valeurs pour ces angles phi et psi comme le montre le tableau ci-dessous.

référence RX	phi (en degré)	psi (en degré)
Mo 1979 (27)	-90	-162
Mo et Jensen 1978 (25)	-79.5	106.8
Kurachi <i>et al.</i> 1974 (38)	-60	-151
Shaanan <i>et al.</i> 1991 (39)	47	11
Strynadka <i>et al.</i> 1991 (40)	-89	-108
Strynadka <i>et al.</i> 1991 (40)	-120	-110

#### IV.4. Conclusion:

Aucune représentation de la constante diélectrique ne simule véritablement les effets de l'eau. Par conséquent, bien que la solvation des molécules demande d'importants moyens informatiques, c'est la seule méthode actuelle pour simuler les mouvements de saccharides dans leur milieu biologique.

## V. Dynamique moléculaire du chitohexaose:

### V.1. Introduction:

Le chitohexaose est un hexamère de la N-acétyl-glucosamine liée en  $\beta$ 1-4. Cet hexamère est un inhibiteur compétitif du lysozyme, le substrat naturel étant le polysaccharide des parois cellulaires des bactéries de Gram positif (41). Ce dernier polysaccharide est caractérisé par l'alternance de la N-acétyl-glucosamine liée en  $\beta$ 1-4 à l'acide N-acétyl-muramique.

L'enzyme possède donc deux activités: une activité N-acétyl-muraminidase (N-acétylmuramide glycanohydrolase, EC 3.2.1.17) et une activité  $\beta$ 1-4 glucosaminidase ou chitinase (41).

Le cristal de cet enzyme a été de nombreuses fois obtenu notamment avec différents sucres occupant son site actif comme l'alpha-GlcNAc (42), le béta-GlcNAc (43), le tri N-acétylchitotriose (42, 44).

Le mécanisme d'action du lysozyme proposé est une catalyse acide (45-46) dans laquelle six unités monosaccharidiques se lient au site actif, chacun des monosaccharides se situant dans des sites bien définis appelés, A, B, C, D, E et F.

Dans les différents mécanismes proposés, un des points les plus controversés est la distorsion du cycle du résidu occupant le site D du site actif. La déformation du cycle pyranique permettrait des interactions avec la chaîne latérale du tryptophane en position 108 de l'enzyme, entraînant la formation d'un intermédiaire oxocarbone de vie inhabituellement longue. Cet intermédiaire serait aussi stabilisé par des interactions avec l'asparagine 52 de la chaîne polypeptidique.

Certains travaux en diffraction de rayons X comme ceux de Post *et al.* (47), Kelly *et al.* (48), d'autres en RMN de Patt *et al.* (49), ou d'autres encore en modélisation moléculaire (50-53) réfutent cette hypothèse. Mais les résultats de diffraction des rayons X sont établis avec une résolution insuffisante, et la non considération des effets de solvation et la nature de la fonction potentielle utilisée pour les travaux en modélisation moléculaire rendent les résultats incertains.

Par contre, les résultats de Strynadka *et al.* (40) en diffraction des rayons X avec une résolution supérieure aux précédents travaux démontrent une distorsion du cycle pyranique situé dans le site D du site actif du lysozyme.



une valeur de RMS sur l'énergie de 0.003 Kcal/mole. Cette minimisation a duré plus de 117 heures CPU.

### **V.3. Conditions de déroulement de la simulation:**

A partir de la molécule minimisée, nous avons effectué une dynamique moléculaire de 64 ps avec une constante diélectrique égale à 1 dans les mêmes conditions que celles énoncées au paragraphe IV.2.4 page 214.

Nous avons cependant dû, et c'est là l'écueil majeur, pour des raisons de taille de fichier, ne prendre en considération que les interactions non liantes dont les distantes entre elles ne dépassaient pas 4Å.

### **V.4. Résultats et discussions de la simulation moléculaire de l'hexamère:**

#### V.4.1. Temps de réalisation, place mémoire, température

Plus de 10 jours et 19 heures de calcul CPU ont été nécessaires à la réalisation de cette dynamique sur notre Dec 3400 à processeur alpha. Les fichiers de résultats obtenus occupent 920999 blocs soit 460,5 mégaoctets.

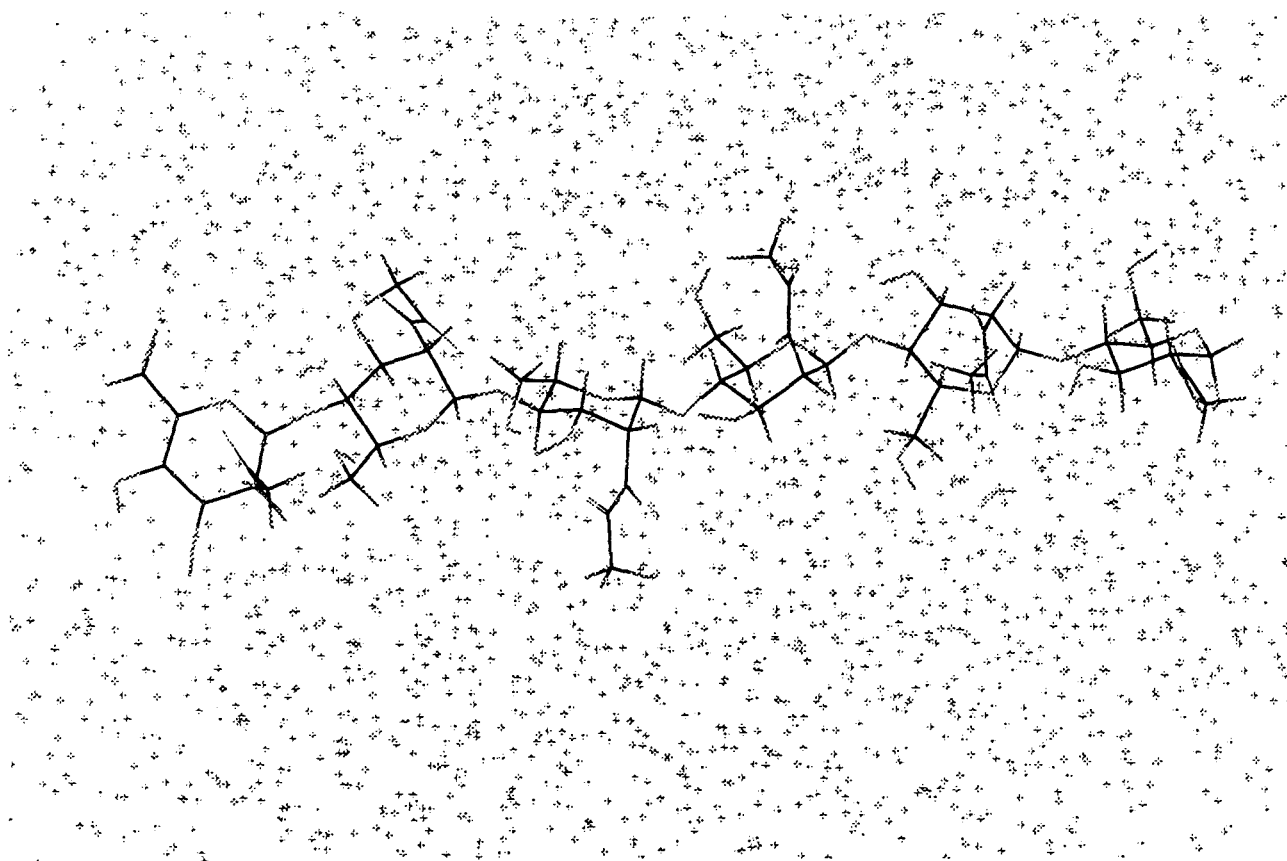
700 pas, soit 0,35 ps, ont été nécessaires pour atteindre une température à 300K. La valeur de RMS sur cette température est de 9K.

L'analyse du fichier historique est réalisée, comme auparavant, avec le logiciel SYBYL (29).

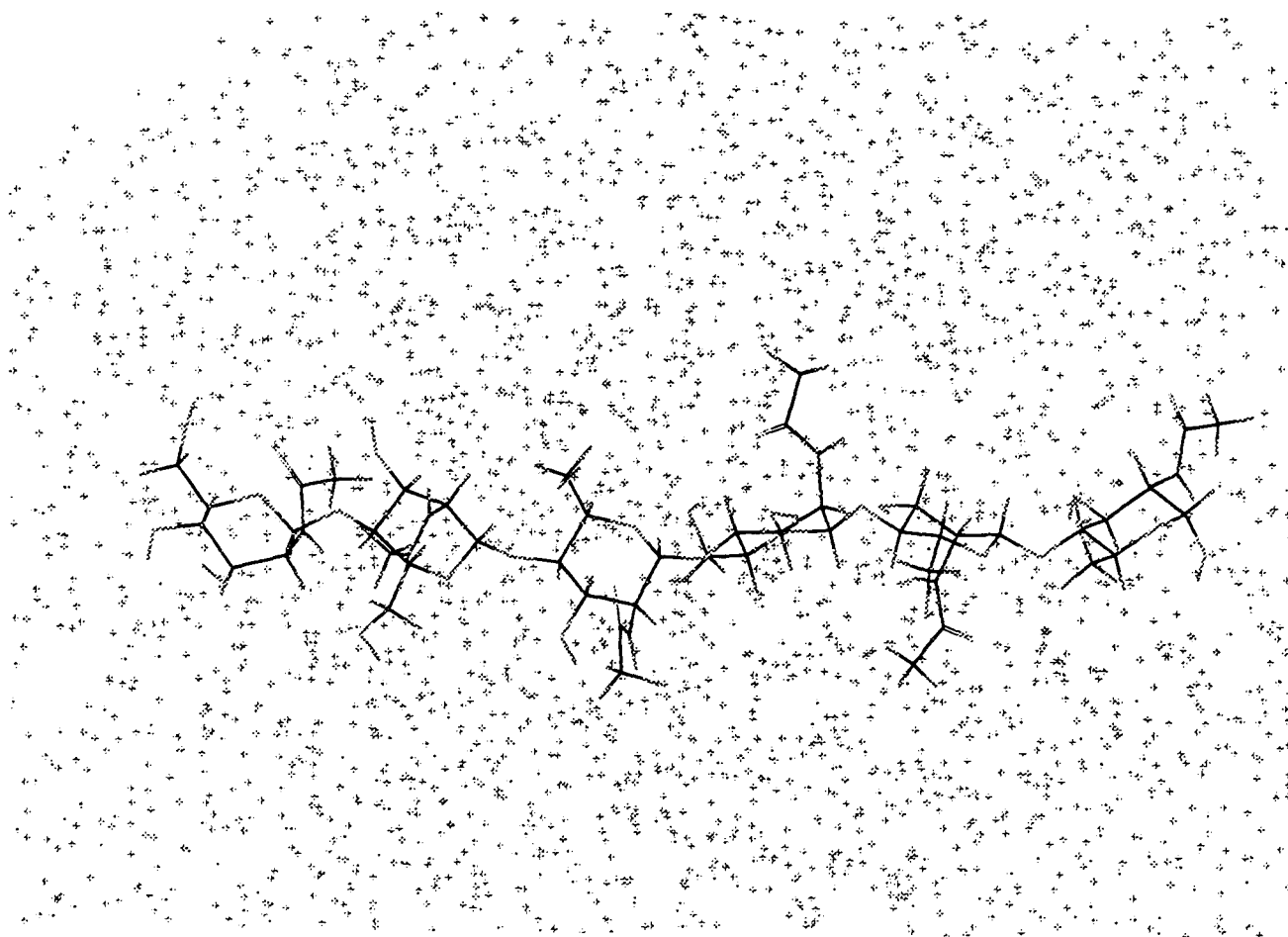
#### V.4.2. Visualisation de la trajectoire

Les figures suivantes montrent les conformations adoptées par le chitohexaose à différents temps de la simulation.

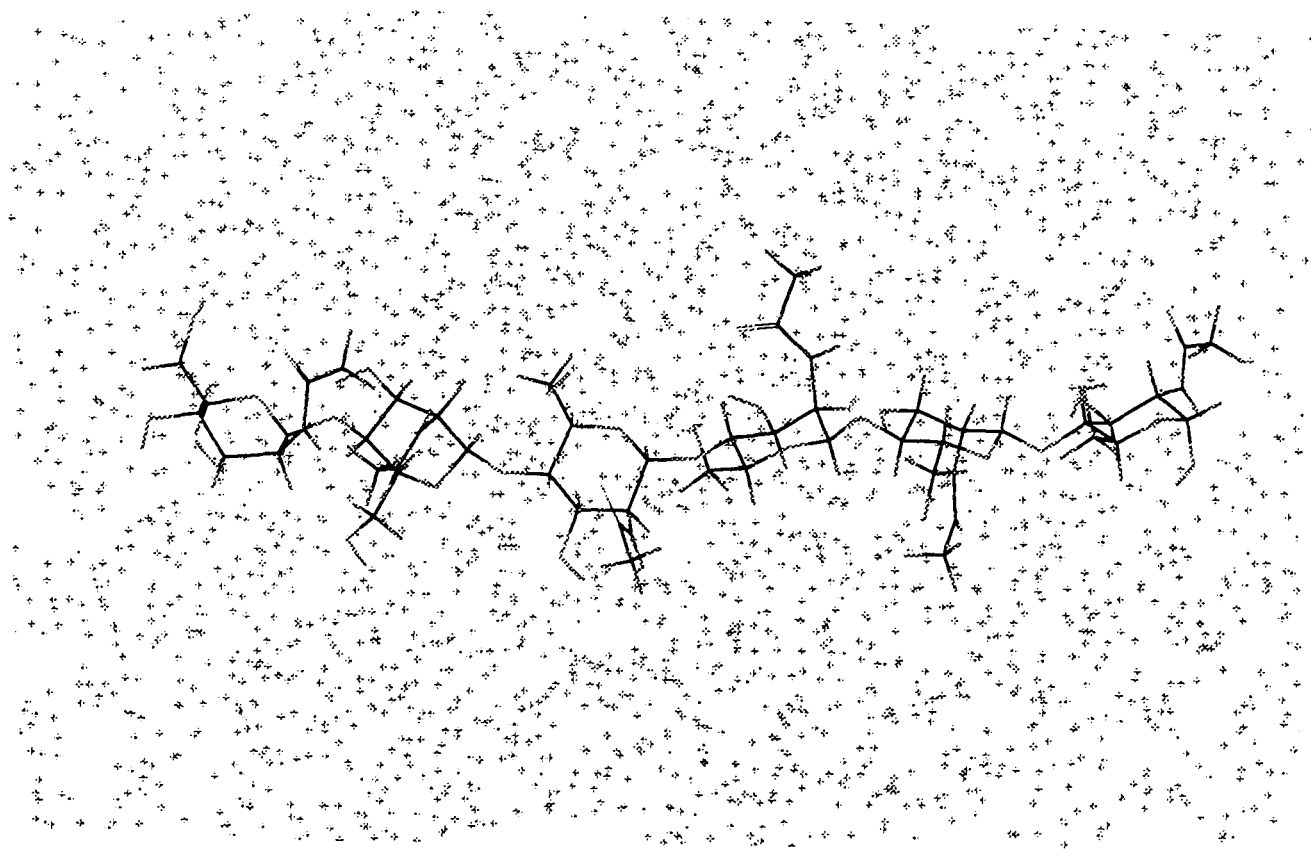
Conformation de la molécule à 0.1 ps



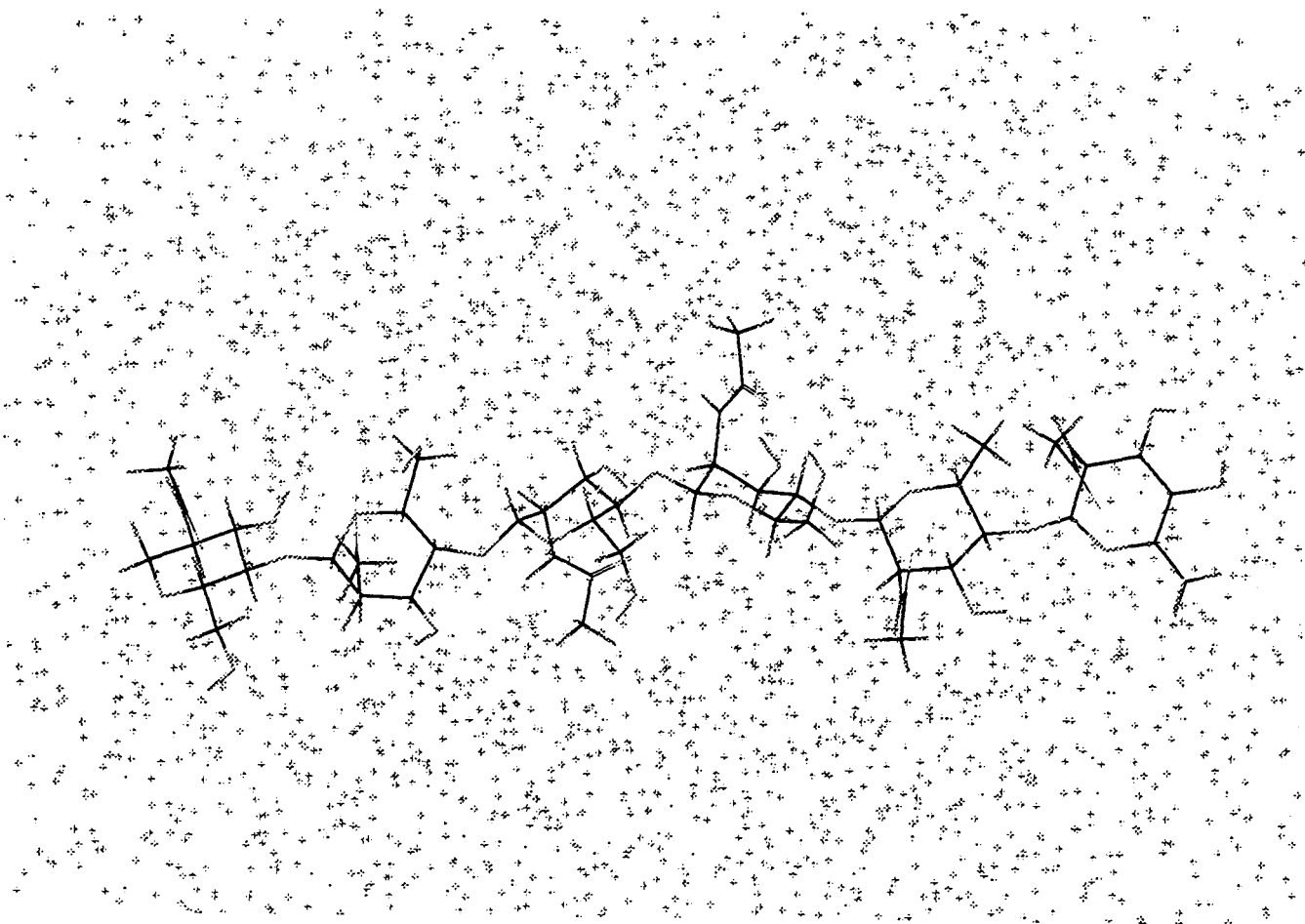
Conformation de la molécule à 11 ps



Conformation de la molécule à 32 ps



Conformation de la molécule à 64 ps



La visualisation de la trajectoire des atomes de la molécule nous permet d'observer qu'il n'existe pas de grands mouvements de l'ensemble de la molécule tels des repliements. Ceci est dû au grand nombre de liaisons hydrogène s'établissant avec toutes les molécules d'eau entourant le chitohexaose. En effet, il existe en permanence en moyenne une trentaine de liaisons hydrogène entre l'hexamère et les molécules d'eau. Les seuls mouvements visibles sont ceux autour des angles de torsions C-OH, CO-CH<sub>3</sub> et C-N.

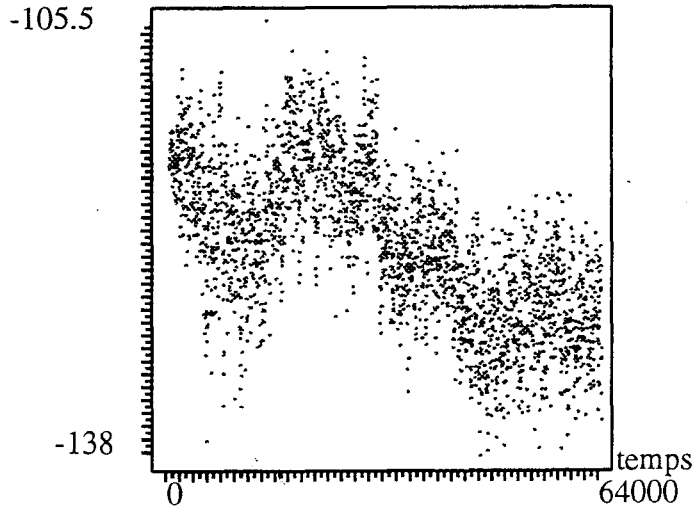
#### V.4.3. Analyse des angles phi et psi:

Les graphiques suivants montrent les variations des torsions phi et psi en fonction du temps pour chaque cycle. Le premier cycle du côté non réducteur étant le cycle A et celui en position réductrice le cycle F. Ces variations sont à comparer avec les valeurs obtenues par diffraction des rayons X données par Strynadka *et al.* (40) et présentées dans le tableau suivant:

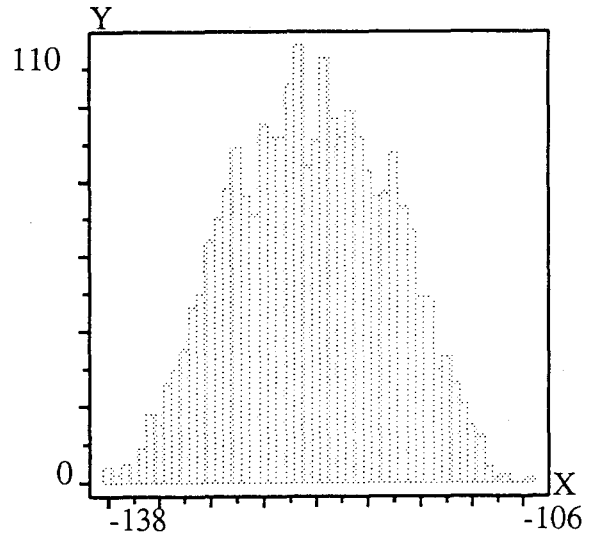
	phi	psi
MGM		
BC	-89°	-120°
CD	-108°	-110°
GGG		
AB	-40°	-126°
BC	-90°	-117°

M= acide N-acétyl-muramique, G= N-acétyl-glucosamine

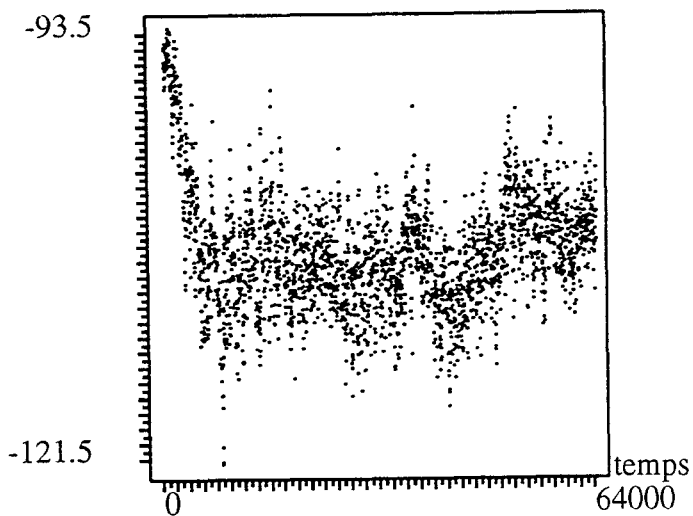
Valeurs de la torsion phi (degré)  
entre les cycles A et B  
en fonction du temps (fs)



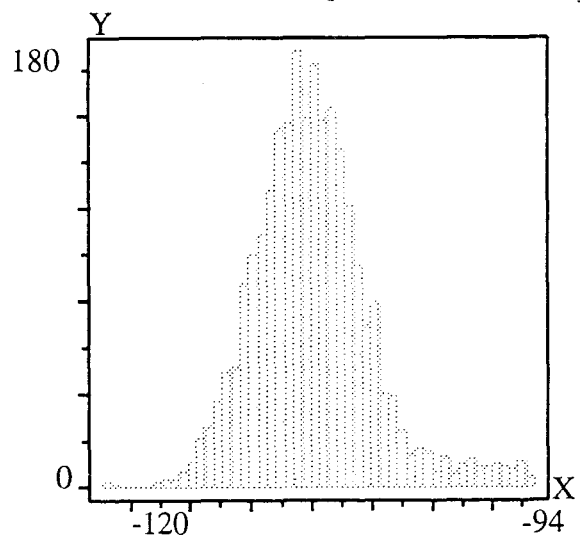
Population des conformères  
entre les cycles A et B  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



Valeurs de la torsion psi (degré)  
entre les cycles A et B  
en fonction du temps (fs)

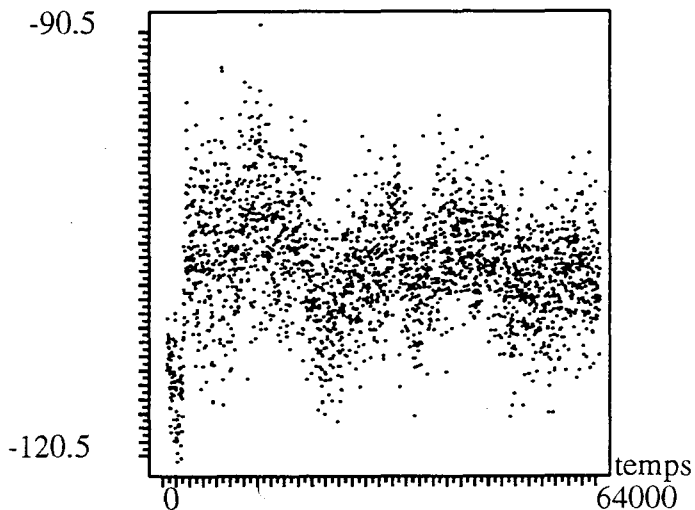


Population des conformères  
entre les cycles A et B  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi

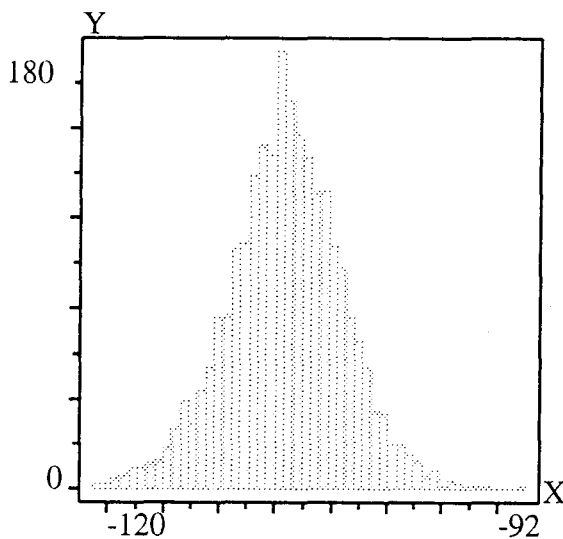




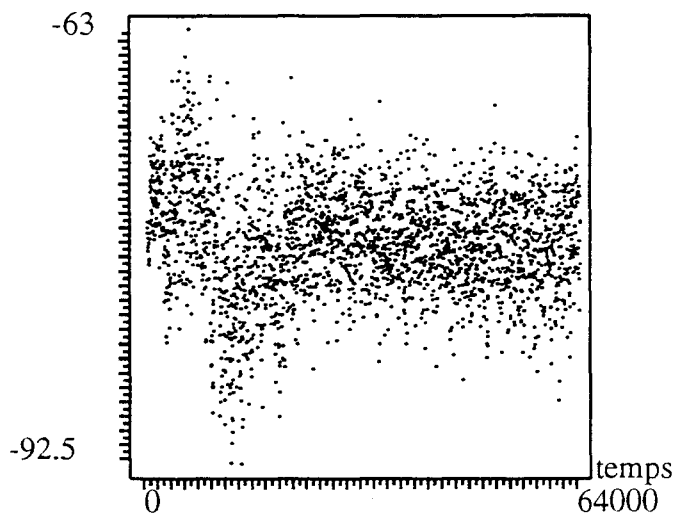
Valeurs de la torsion phi (degré)  
entre les cycles B et C  
en fonction du temps (fs)



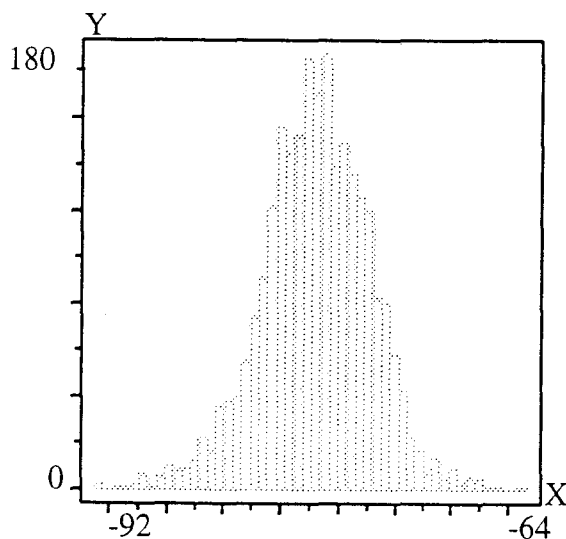
Population des conformères  
entre les cycles B et C  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



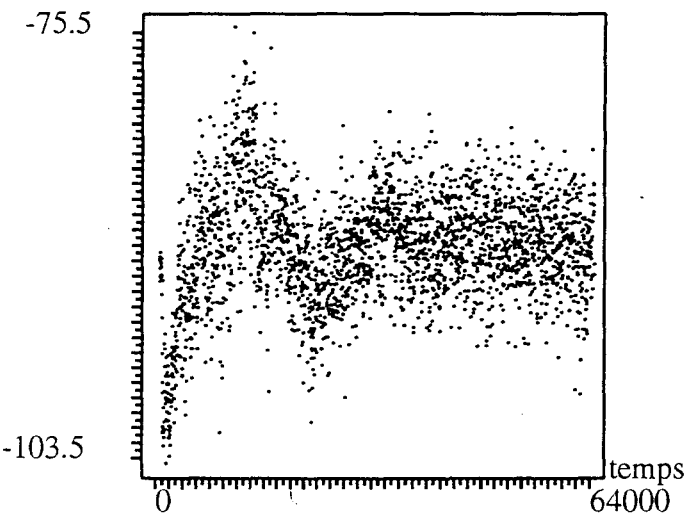
Valeurs de la torsion psi (degré)  
entre les cycles B et C  
en fonction du temps (fs)



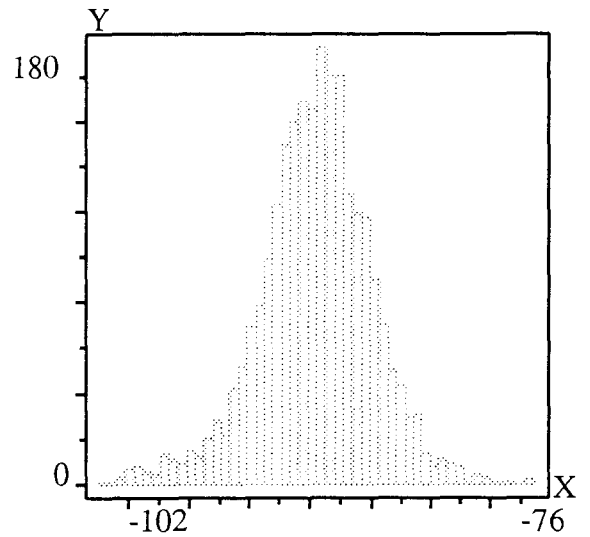
Population des conformères  
entre les cycles B et C  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



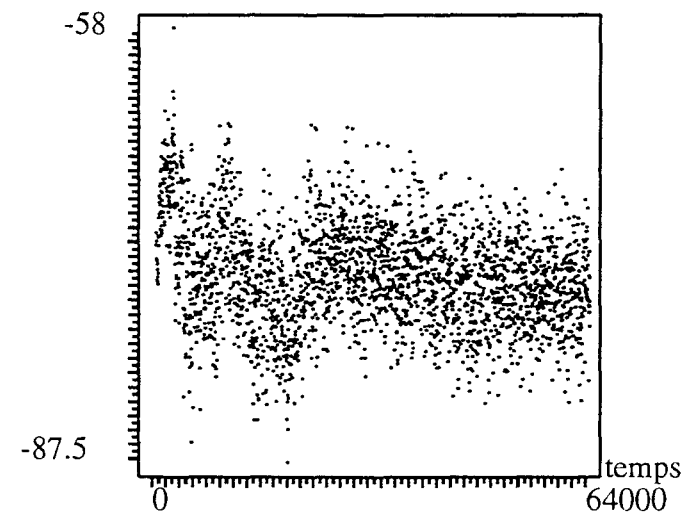
Valeurs de la torsion phi (degré)  
entre les cycles C et D  
en fonction du temps (fs)



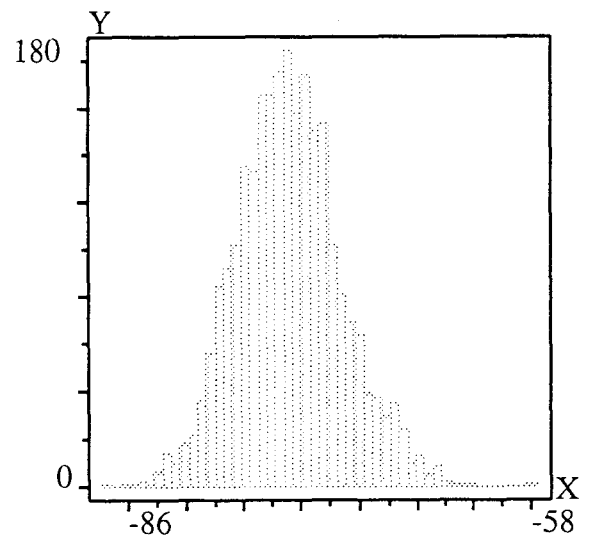
Population des conformères  
entre les cycles C et D  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



Valeurs de la torsion psi (degré)  
entre les cycles C et D  
en fonction du temps (fs)

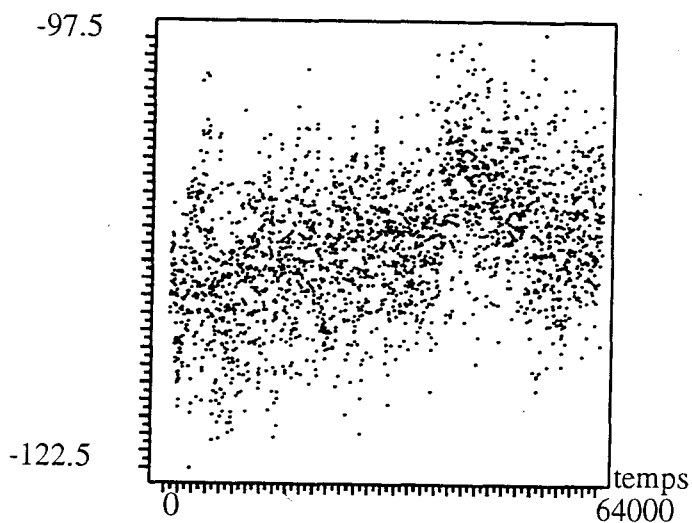


Population des conformères  
entre les cycles C et D  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi

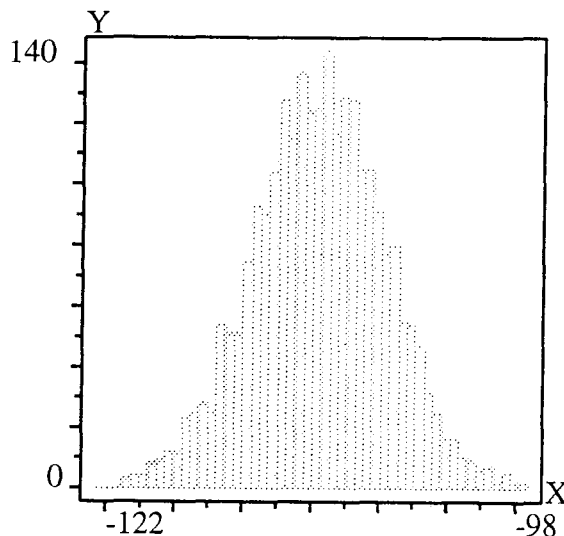


UP  
1998

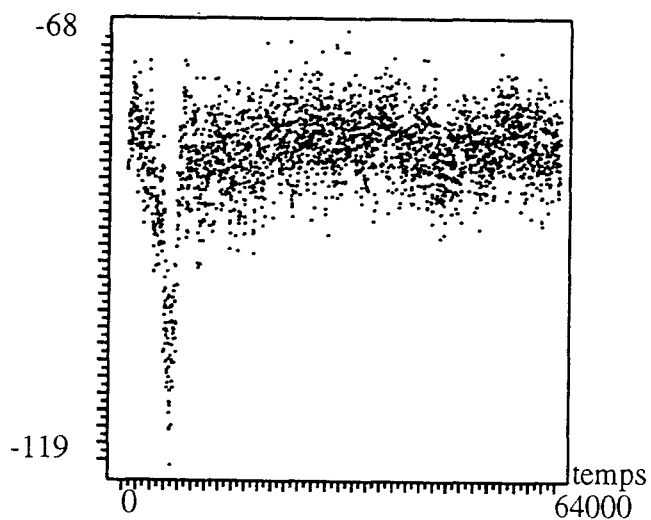
Valeurs de la torsion phi (degré)  
entre les cycles D et E  
en fonction du temps (fs)



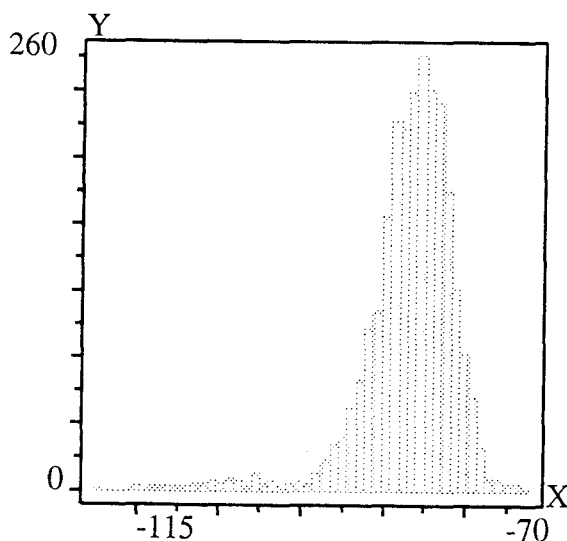
Population des conformères  
entre les cycles D et E  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



Valeurs de la torsion psi (degré)  
entre les cycles D et E  
en fonction du temps (fs)

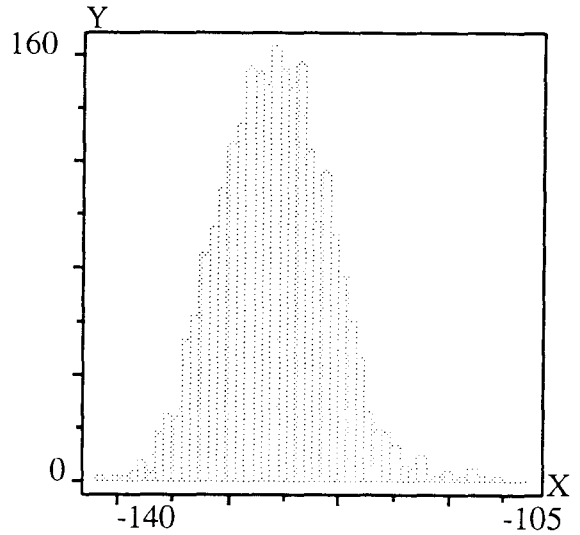
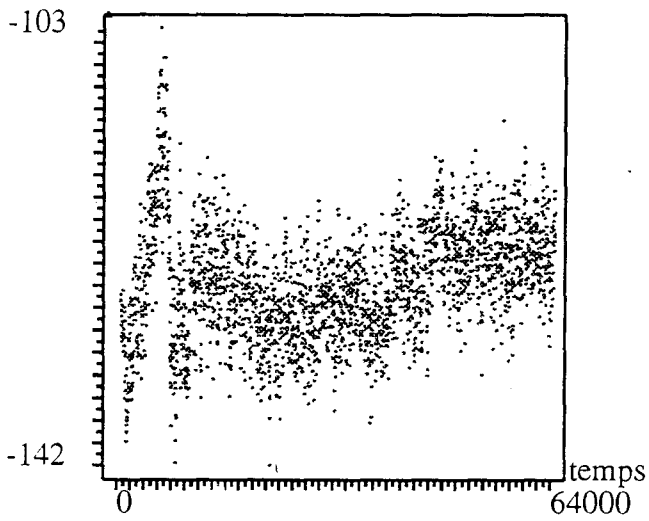


Population des conformères  
entre les cycles D et E  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



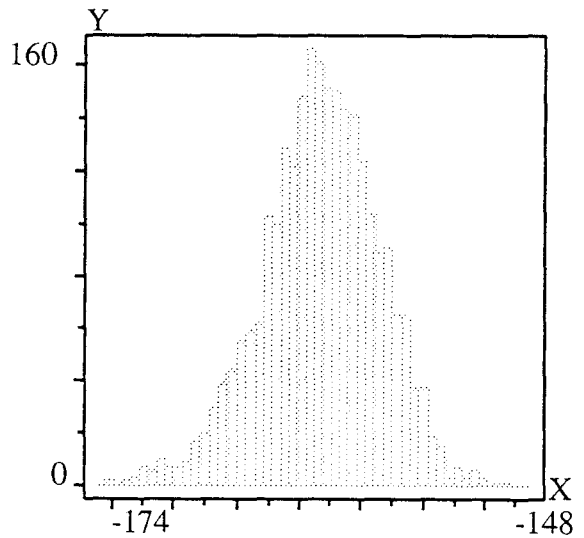
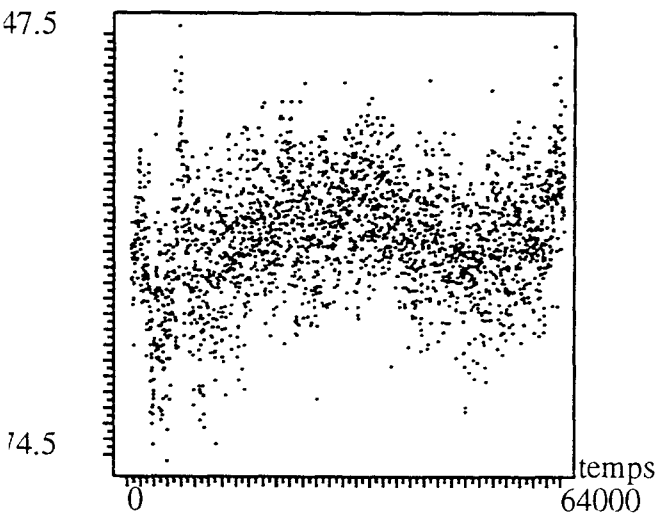
Valeurs de la torsion phi (degré)  
entre les cycles E et F  
en fonction du temps (fs)

Population des conformères  
entre les cycles E et F  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion phi



Valeurs de la torsion psi (degré)  
entre les cycles E et F  
en fonction du temps (fs)

Population des conformères  
entre les cycles E et F  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion psi



D'après ces graphiques, nous pouvons observer que les valeurs de ces torsions varient peu en fonction du temps. De plus, les valeurs déterminées, pour ces torsions, par la diffraction des rayons X de l'hexamère dans le site actif du lysozyme ne sont pas retrouvées.

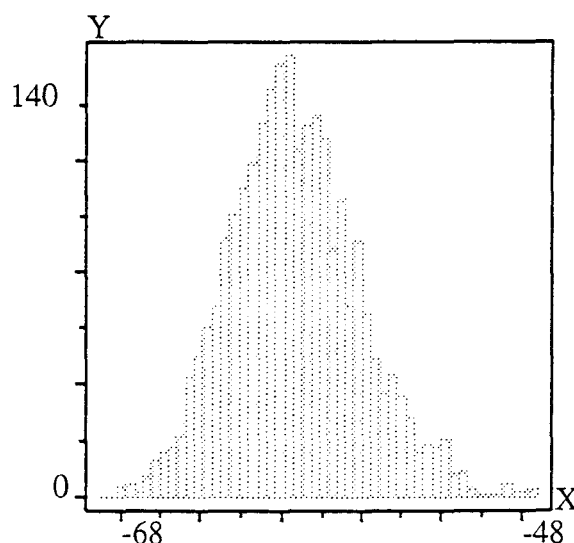
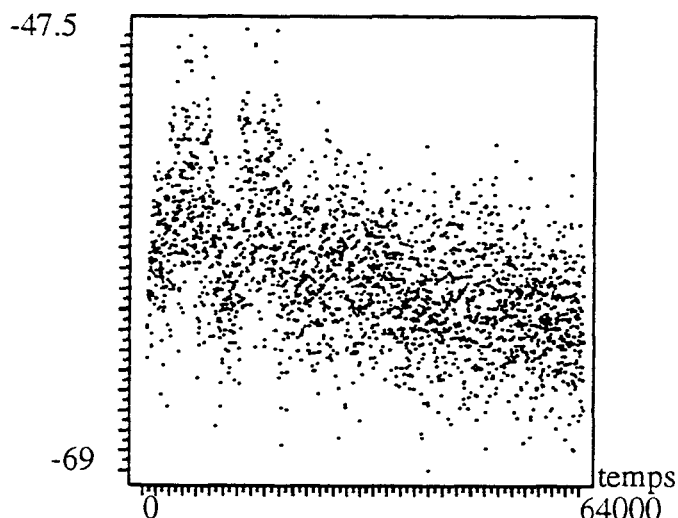
#### V.4.4. Analyse des torsions du cycle D du chitohexaose:

Le but final de cette étude de dynamique étant d'observer la possibilité de déformation du cycle D à partir de l'extrémité non réductrice, nous nous sommes donc attachés à analyser les torsions de ce cycle.

Les graphiques suivants présentent la variation de la torsion C1C2C3C4 du cycle D en fonction du temps, et l'histogramme correspondant.

Valeurs de la torsion  
C1C2C3C4 (degré) du cycle D  
en fonction du temps (fs)

Population des conformères  
obtenus suivant les valeurs  
de la torsion C1C2C3C4  
du cycle D



Nous n'observons pas de distorsion du cycle. Ceci peut être expliqué par la trop grande rigidité de la molécule dans ce milieu solvaté. Dans le site actif du lysozyme, il n'existe que quelques molécules d'eau et les

interactions existantes avec la chaîne peptidique ne sont pas suffisantes pour empêcher tous les mouvements de l'hexasaccharide.

#### **V.5. Conclusion:**

Cette étude des mouvements d'un inhibiteur du lysozyme dans l'eau ne nous a pas permis de mettre en évidence les distorsions du cycle D. En effet, la molécule est très rigide du fait du grand nombre de liaisons hydrogène qui existe entre elle et les molécules d'eau.

Les valeurs des angles phi et psi rencontrées tout au long de cette simulation ne sont pas celles déterminées expérimentalement.

Une simulation de cet hexamère dans le site actif du lysozyme serait nécessaire pour mieux appréhender les mouvements réels dans le cas d'une réaction enzymatique.

Bibliographie

du

Chapitre 5



- 1) Shimanouchi T. (1970)  
In physical chemistry an advance treatise, vol. 4, ed.  
Henderson, academic Press
- 2) Takeuchi H. (1975)  
PhD Thesis, Tokyo, Japan
- 3) Derreumaux P.(1993)  
Communications personnelles
- 4) Weiner S., Kollman P., Case D., Singh U., Ohio C., Alagoma G.,  
Profeta S., Weiner P. (1984)  
A new force field for molecular mechanical simulation of  
nucleic acids and proteins.  
J. Am. Chem. Soc. 106, 765-784
- 5) Derreumaux P., Dauchez M., Vergoten G. (1993)  
The structure and vibrational frequencies of a series of alkanes  
using the SPASIBA force field.  
J. Mol. Struct. 295, 203-221
- 6) Derreumaux P., Lagant P., Vergoten G. (1993)  
Comparison of the IR and Raman vibrational frequencies and  
intensities of alkanes using the AMBER and SPASIBA force  
fields. Application to ethane, and gauche- and trans-n-  
butane.  
J. Mol. Struct. 295, 223-232
- 7) Chhiba M., Derreumaux P., Vergoten G. (1994)  
The use of SPASIBA spectroscopic potential to determine the  
structures and vibrational frequencies of a series of acids:  
acetic acid, pivalic acid, succinic acid, adipic acid and L-  
glutamic acid.  
J. Mol. Struct. 317, 171-184
- 8) Lifson S., Stern P.S. (1982)  
Born-Oppenheimer energy surfaces of similar molecules:  
interrelations between bond lengths, bond angles and  
frequencies of normal vibrations in alkanes.  
J. Chem. Phys. 77, 4542-4550
- 9) Discover  
Biosym technologies Inc.  
10065 Barnes Canyon Road suite A, San Diego, CA, 92121  
U.S.A.
- 10) Snyder R.G., Kim Y. (1991)  
Conformation and low-frequency isotropic Raman spectra of  
the liquid n-alkanes.  
J. Phys. Chem. 95, 602-610



- 11) Derreumaux P., Vergoten G. (1993)  
Harmonic and molecular dynamics of n-octane. Comparison between the AMBER and SPASIBA force field.  
J. Mol. Struct. 295, 233-244
- 12) Derreumaux P., Vergoten G. (1993)  
Influence of the spectroscopic potential energy function SPASIBA on molecular dynamics of proteins: comparison with the AMBER potential.  
J. Mol. Struct. 286, 55-64
- 13) Kouach-Alix I., Vergoten G. (1994)  
A vibrational molecular force field of model compounds with biological interest. VI. Harmonic dynamic of N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine.  
J. Mol. Struct. sous presse
- 14) Arnott S., Scott W.E. (1972)  
Accurate X-ray diffraction analysis of fibrous polysaccharides containing pyranose rings. I. Linked-atom approach.  
J. Chem. Soc. Perkins Trans 2 3, 324-335
- 15) Mo F., Jensen L.H. (1975)  
A refined Model for N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine.  
Acta Cryst. B31, 2867-2873
- 16) Dewar M.J.S., Thiel W. (1977)  
Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters.  
J. Am. Chem. Soc. 99, 4899-4907
- 17) Van Gunsteren W., Karplus M. (1982)  
Effect of constraints on the dynamics molecules.  
Macromolecules 15, 1528-44
- 18) Boyd R. (1968)  
Method for calculation of the conformation of minimum potential-energy and thermodynamics functions of molecules from empirical valence force potentials. Application to the cyclophanes.  
J. Chem. Phys. 49, 2574-2584
- 19) Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. (1983)  
A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations.  
J. Comput. Chem. 4, 187-217

- 20) Homans S.W. (1990)  
A molecular mechanical force field for the conformational analysis of oligosaccharides: comparison of theoretical and crystal structures of  $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ .  
*Biochemistry* 29, 9110-9118
- 21) Ha S.N., Giammona A., Field M., Brady J.W. (1988)  
A revised potential-energy surface for molecular mechanics studies of carbohydrates.  
*Carbohydr. Res.* 180, 207-221
- 22) Wiberg K.B., Murcho M.A. (1989)  
Rotational barriers. 4. Dimethoxymethane. The anomeric effect revised.  
*J. Am. Chem. Soc.* 111, 4821-4828
- 23) Barker S.A., Foster A.B., Stacey M., Webber J.M. (1958)  
Amino-sugars and related compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin.  
*J. Chem. Soc.* 2218-2227
- 24) Dauchez M., Lagant P., Derreumaux P., Vergoten G. (1994)  
Force field and vibrational spectra of oligosaccharides with different glycosidic linkages -Part II. Maltose monohydrate, cellobiose and gentobiose.  
*Spectrochimica Acta* 50A, 105-118
- 25) Mo F., Jensen L.H. (1978)  
The crystal structure of a  $\beta(1-4)$ linked disaccharide,  $\alpha$ -N,N'-diacetylchitobiose monohydrate.  
*Acta Cryst.* B34, 1562-1569
- 26) Weiner J.S., Kollman P.A., Nguyen T.D., Case D.A. (1986)  
A new force field for simulations on proteins and nucleic acids.  
*J. Comp. Chem.* 7, 230-252
- 27) Mo F. (1979)  
On the conformational variability of the N-acetylglucosamine  $\beta(1-4)$  linked dimer. Crystal and molecular structure of  $\beta$ -N,N'-diacetylchitobiose trihydrate.  
*Acta Chem. Scand.* A33, 207-218
- 28) Lipscomb W.N., Jacobson R. (1990)  
X-ray crystal structure analysis.  
*Phys. Methods Chem.*, 2<sup>nd</sup> Eds., 5, 1-121,  
eds. by Rossiter B.W., Halmiton J.F., Wiley N.Y.



- 29) Sybyl (1988)  
Tripos associate, assigne St Louis  
Mo, USA, 189-213
- 30) Dagett V., Kollman P.A., Kuntz I.D. (1991)  
Molecular dynamics simulations of small peptides:  
Dependence on dielectric model and pH  
Biopolymers 31, 285-304
- 31) Jorgensen W.L. (1981)  
Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10.  
Transferable intermolecular potential functions for water,  
alcohols and ethers. Application to liquid water.  
J. Am. Chem. Soc. 103, 335-340
- 32) Verlet L. (1967)  
Computer experiments on classical fluids. I.  
Thermodynamical properties of Lennard Jones molecules.  
Phys. Rev. 159, 98-103
- 33) Balaji P.V., Qasba P.K., Rao V.S.R. (1993)  
Molecular dynamics simulations of asialoglycoprotein  
receptor ligands.  
Biochemistry 32, 12599-12611
- 34) Hardy B.J., Sarko A. (1993)  
Conformational analysis and molecular dynamics simulation  
of cellobiose and larger celooligomers.  
J. Comp. Chem. 4, 831-847
- 35) Rasmussen K. (1982)  
Conformation and anomer ratio of D-glucopyranose  
indifferent potential energy functions.  
Acta Chem. Scand. A36, 323-327
- 36) Miller K.E., Mukhopadhyay C., Gagas P., Bush C.A. (1992)  
Solution structure of the Lewis X oligosaccharide determined  
by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations.  
Biochemistry 31, 6703-6709
- 37) Dauchez M., Mazurier J., Montreuil J., Spik G., Vergoten G. (1992)  
Molecular dynamics simulations of a monofucosylated  
biantennary glycan of the N-acetyllactosamine type: the  
human lactotransferrin glycan.  
Biochimie 74, 63-74
- 38) Kurachi K., Sicker L.C., Jensen L.H. (1974)  
Metal ion binding in triclinic lysozyme.  
J. Mol. Biol. 101, 11-24

- 39) Shaanan B., Lis H., Sharon N. (1991)  
Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose.  
*Science* 254, 862-865
- 40) Strynadka N.C.J., James M.N.G. (1991)  
Lysozyme revisited: Crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D.  
*J. Mol. Biol.* 220, 401-424
- 41) Imoto I., Johnson L.N., North A.C.T., Phillips D.C., Rupley J.A. (1972)  
In *The Enzymes* ( Boyer P. ed.) 3rd ed., vol. 7, pp 665-868.  
Academic press New York
- 42) Blake C.C.F., Johnson L.N., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R. (1967)  
Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme.  
*Proc. Roy Soc. ser. B* 167, 378-388
- 43) Beddell C.R., Moulton J., Phillips D.C. (1970)  
In "Molecular Properties of drug receptors", Churchill, London
- 44) Cheetham J.C., Artymiuk P.J., Phillips D.C. (1992)  
Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen Egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution.  
*J. Mol. Biol.* 224, 613-628
- 45) Phillips D.C. (1967)  
The hen egg-white lysozyme molecule.  
*Proc. Roy Acad. Sci.* 57, 484-495
- 46) Blake C.C.F., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R. (1965)  
Structure of hen egg-white lysozyme - A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution.  
*Nature* 206, 757-761
- 47) Post C.B., Brooks B.R., Karplus M., Dobson C.M., Artymiuk P.J., Cheetman J.C., Phillips D.C (1986)  
Molecular dynamics simulations of native and substrate-bound lysozyme. A study of the average structures and atomic fluctuations.  
*J. Mol. Biol.* 190, 455-479
- 48) Kelly J.A., Sielecki A.R., Sykes B.D., James M.N.G., Phillips D.C. (1979)  
X-ray crystallography of the binding of the bacterial cell wall trisaccharide NAM-NAG-NAM to lysozyme.

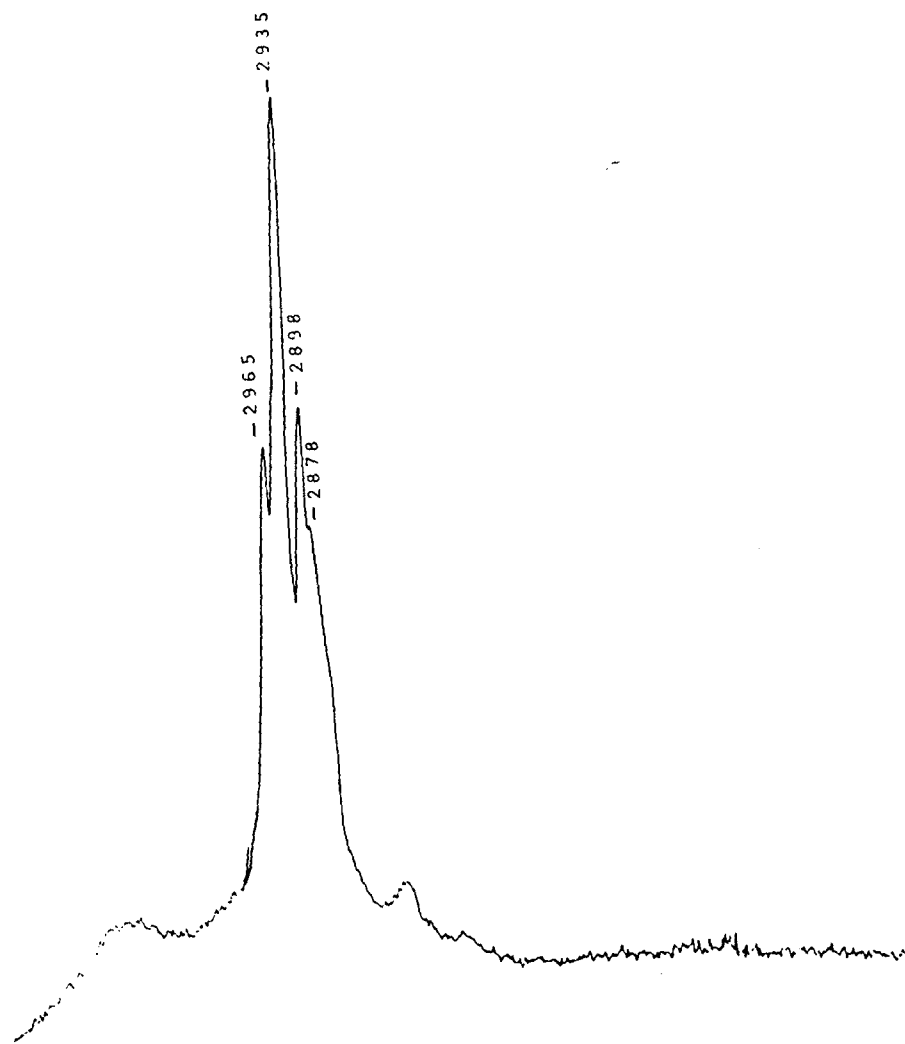


- 49) Patt S.L., Baldo J.H., Boekelheide K., Weisz G., Sykes B.D. (1978)  
The nuclear magnetic resonance determination of the conformation of saccharides bound in subsite D of lysozyme.  
Canad. J. Biochem. 56, 624-629
- 50) Pincus M.R., Sheraga H.A. (1981)  
Prediction of the three-dimensional structures of complexes of lysozyme with cell wall substrates.  
Biochemistry 20, 3960-3965
- 51) Pincus M.R., Sheraga H.A. (1979)  
Conformational energy calculations of lysozyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of lysozyme. 2. Calculation of the structures of complexes with a flexible enzyme.  
Macromolecules 12, 633-644
- 52) Levitt M. (1974)  
In Peptides, polypeptides and proteins, pp 99-113, Wiley et Sons, New-York.
- 53) Warshel A., Levitt M. (1976)  
Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme.  
J. Mol. Biol. 103, 227-249

Annexe

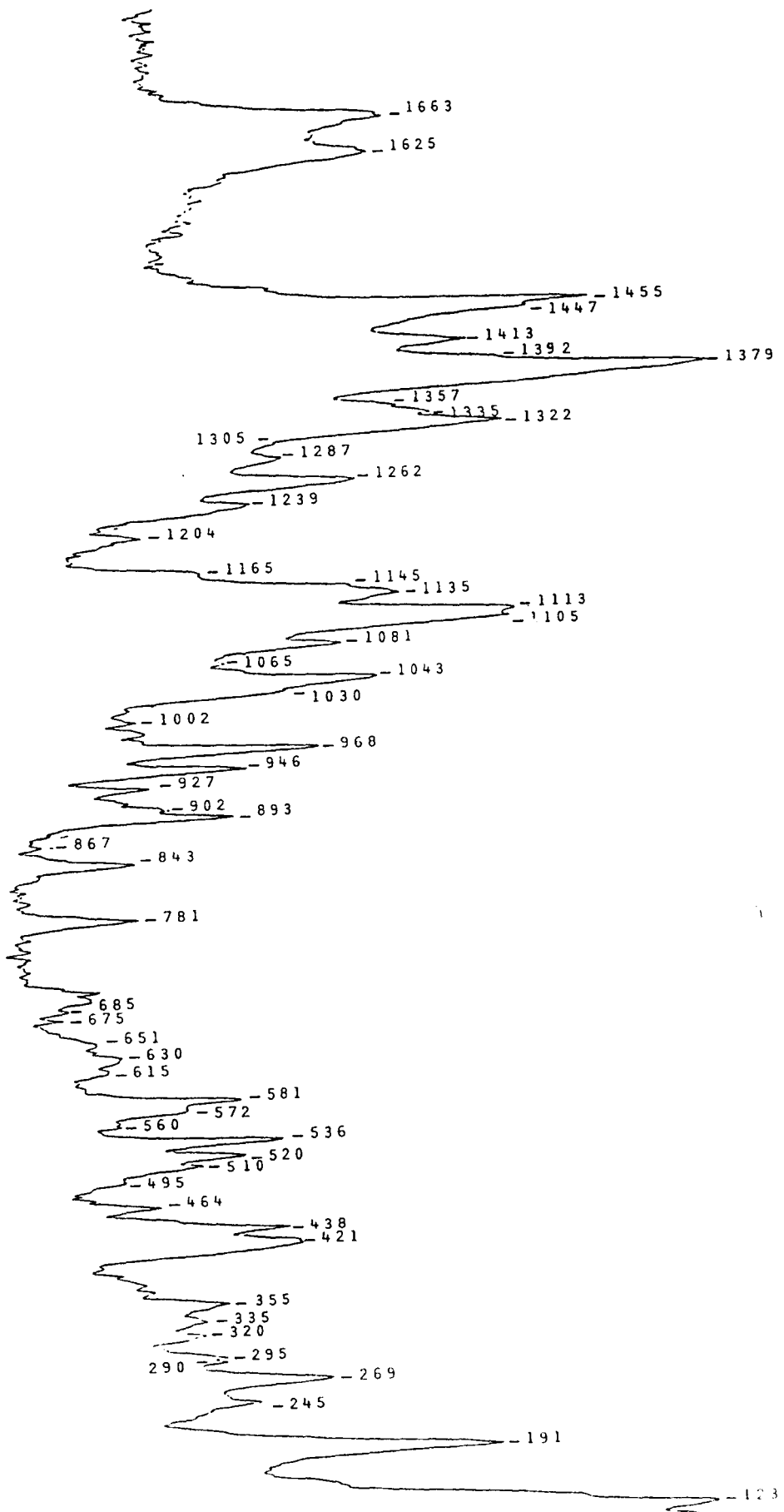
du

Chapitre 5

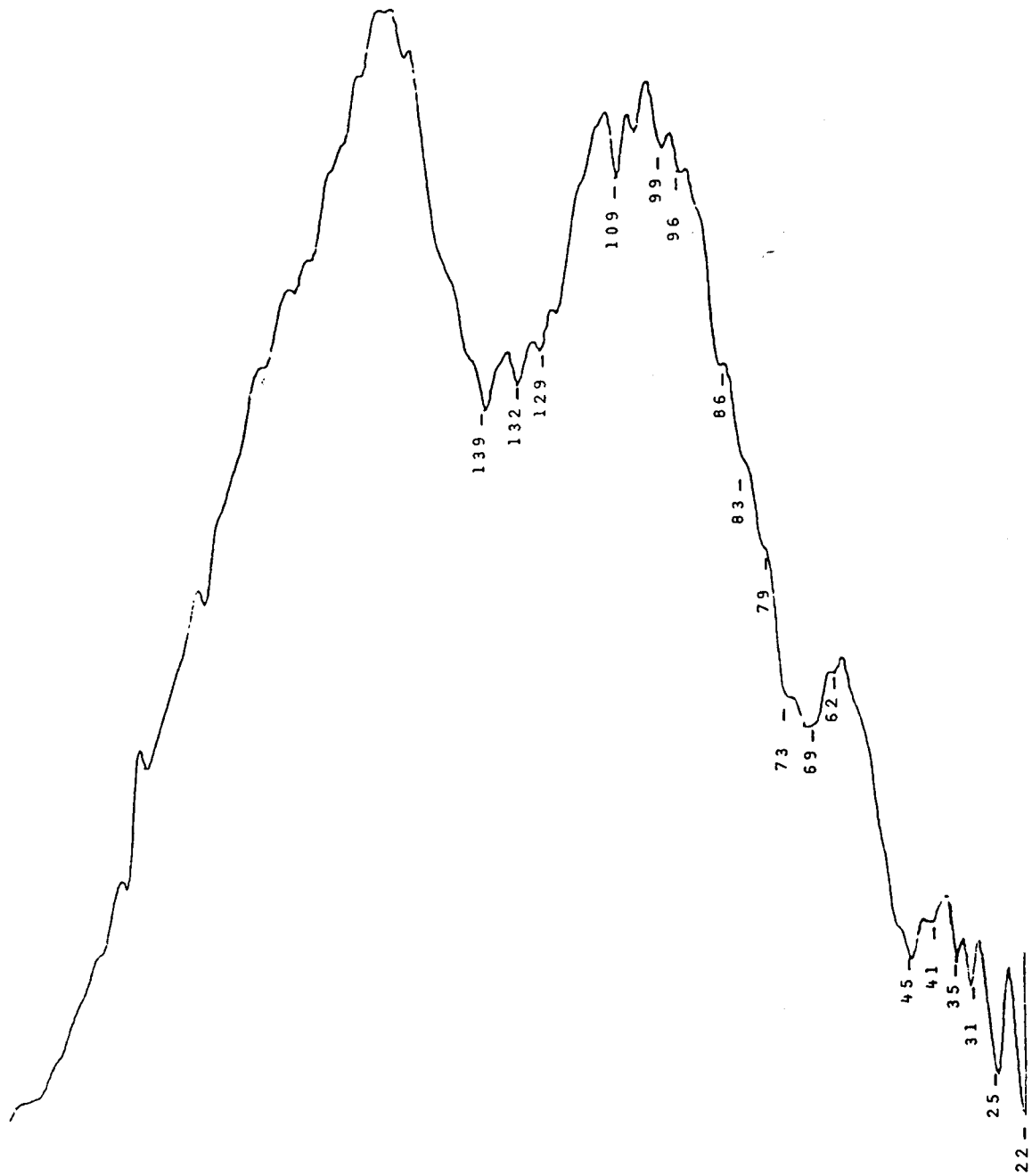


Spectre Raman du cristal du N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
Région 3500-2800 cm<sup>-1</sup>.

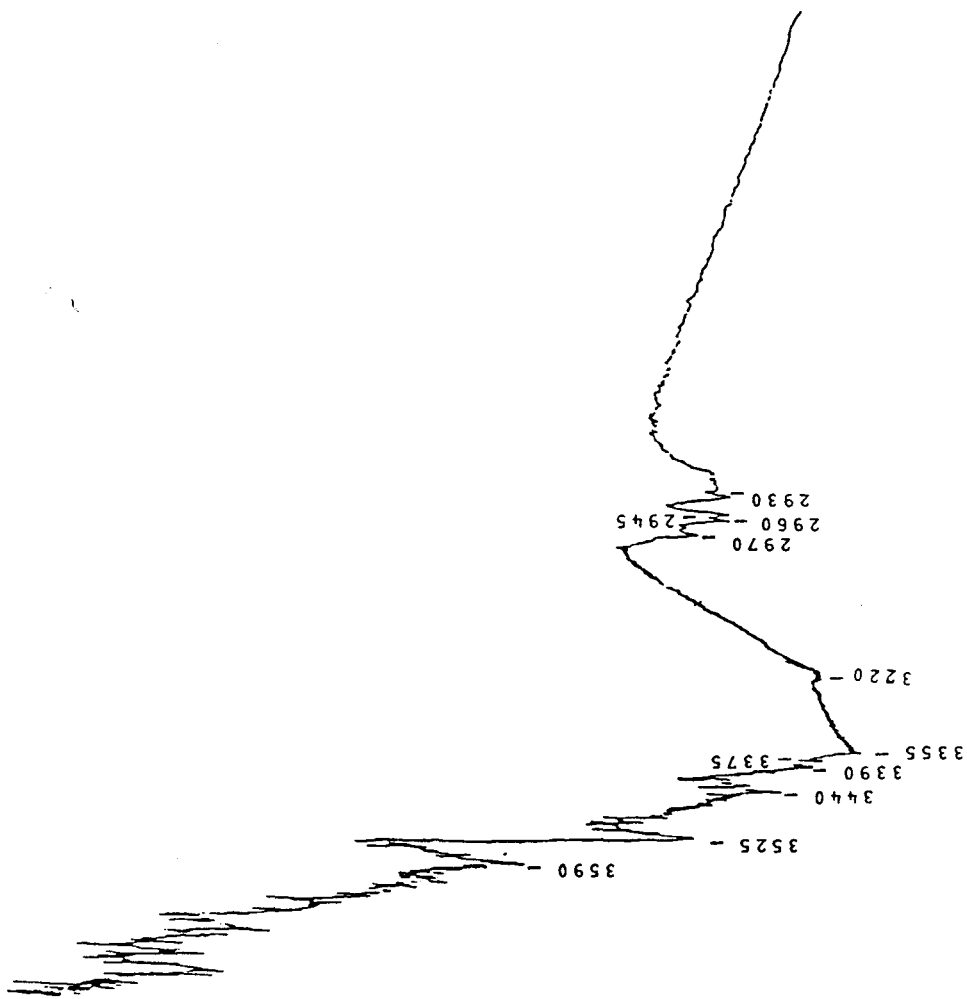
Spectre Raman du cristal du N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
 Région 1600-200 cm<sup>-1</sup>.





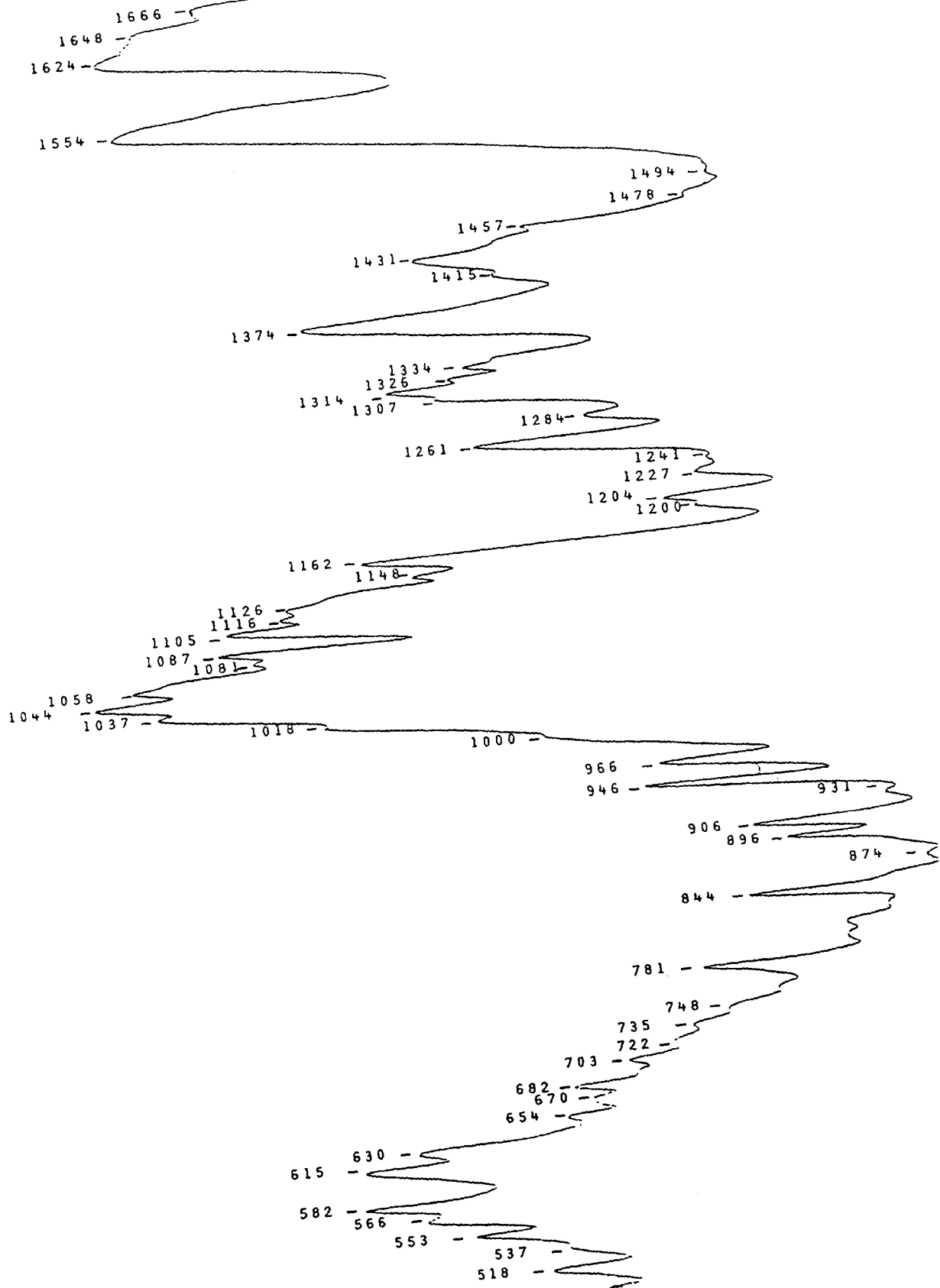


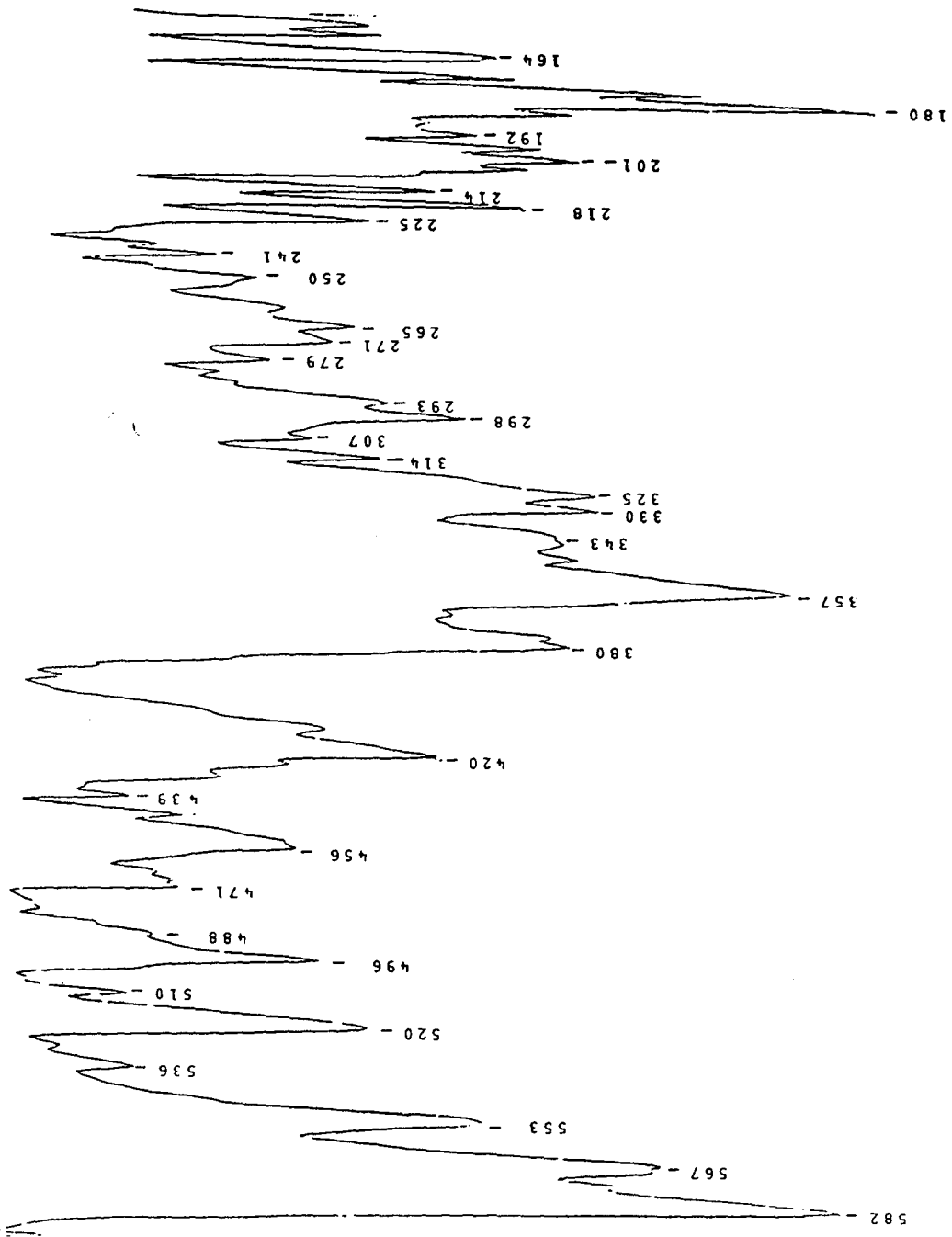
Spectre Raman du cristal du N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
Région 250-20 cm<sup>-1</sup>.



Spectre infrarouge du cristal de N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
 Région 2800-3500 cm<sup>-1</sup>.

Specre infrarouge du cristal du N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
Région 1500-500 cm<sup>-1</sup>.





Spectre infrarouge du cristal du N,N'-diacétyl-chitobiose à 300°K.  
 Région 700-100 cm<sup>-1</sup>.

Conclusion générale

et

Perspectives

La connaissance des voies métaboliques de biosynthèse et de dégradation, mais aussi de la structure primaire des glycannes des glycoprotéines ne suffit pas à expliquer le rôle de ces glycannes. La connaissance de la conformation spatiale de ces N-glycannes paraît donc indispensable pour la compréhension de ces rôles.

Pour déterminer ces conformations spatiales, des techniques expérimentales telles la diffraction des rayons X, la diffusion des neutrons ou encore la résonance magnétique nucléaire peuvent être utilisées. Cependant pour les deux premières méthodes, leurs applications aux sucres restent limitées du fait de la difficulté d'obtention de cristal pur. Quant à la résonance magnétique nucléaire, elle ne donne qu'une vision globale de la conformation spatiale. De plus, son exploitation complète demande l'utilisation conjointe de méthodes théoriques empiriques de détermination de la structure spatiale.

Donc, les méthodes théoriques semblent être, à l'heure actuelle, les méthodes les plus efficaces pour la détermination de la conformation spatiale. Cependant, les méthodes *ab initio* et semi-empiriques sont encore, pour l'instant, peu utilisées vue la taille des saccharides étudiés. Quant aux méthodes empiriques, le problème réside dans l'obtention d'un champ de forces fiable applicable aux saccharides. En effet, les champs de forces considérant les monosaccharides comme des sous-unités rigides et ceux ne permettant pas une bonne reproduction de la géométrie des molécules ou des spectres de vibrations sont à proscrire.

C'est pourquoi, nous nous sommes attachés dans la première partie de notre travail à déterminer un ensemble de paramètres de la fonction énergie potentielle en utilisant le champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi modifié pour les monosaccharides suivant: le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside, la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine, l'acide N-acétyl- $\alpha$ -D-muramique et l'acide N-acétyl- $\beta$ -D-neuraminique. Les résultats obtenus montrent que ces paramètres ont l'avantage de reproduire de manière très satisfaisante les spectres de vibration des molécules étudiées (RMS entre les fréquences observées et calculées inférieur à  $4 \text{ cm}^{-1}$ , bonne reproduction des régions spectrales des saccharides).

Nous avons également déterminé le champ de forces de la liaison N-glycosidique qui fait le lien entre les glycannes et les protéines.

Puis les paramètres déterminés pour la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosamine ont été introduits dans le champ de forces SPASIBA, qui utilise les termes, représentant les coordonnées de torsions, les interactions de type Van de Waals et les liaisons hydrogène, rencontrés dans le champ de forces AMBER. Les autres termes intramoléculaires sont tirés du champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi modifié.

En utilisant ces constantes de forces, nous avons effectué une étude de dynamique harmonique du N,N'-diacétylchitobiose (dimère en  $\beta$ 1-4 de la N-acétyl-glucosamine). Les résultats obtenus montrent que le champ de forces SPASIBA garde les avantages des deux champs de forces dont il est issu (bonne reproduction de la géométrie et des spectres de vibrations des molécules).

Pour comparer les méthodes, nous avons réalisé la même étude en utilisant le champ de forces AMBER. Les résultats montrent clairement que la base de données d'AMBER n'est pas adaptée à tous les saccharides (mauvaise reproduction de la géométrie et des spectres de vibrations).

Nous avons ensuite entrepris, avec le champ de forces SPASIBA, quatre simulations de dynamique moléculaire du N,N'-diacétylchitobiose de 270 ps avec des constantes diélectriques différentes ( $\epsilon = 1$ ,  $\epsilon = 80$ ,  $\epsilon = 4r_{ij}$ ,  $\epsilon$  dépendant de la fonction sigmoïdale de Dagett *et al.*), puis une cinquième de 135 ps en immergeant la molécule dans une boîte d'eau.

Une sixième dynamique de 270 ps avec le champ de forces AMBER et une constante diélectrique  $\epsilon = 1$  a été également entreprise pour permettre des comparaisons. Lors de cette dernière simulation, la molécule adopte des conformations irréalistes (cycles pyraniques adoptant des conformations bateau twisté).

A partir des simulations effectuées avec SPASIBA, nous pouvons conclure que:

- les cycles pyraniques sont rigides.
- les entités monosaccharidiques ne le sont pas puisque nous observons des mouvements importants des groupements COH et acétamido.
- aucune des représentations de la constante diélectrique ne permet de mimer les effets de l'eau.
- les valeurs des angles phi et psi déterminées sont différentes de celles obtenues par diffraction des rayons X.

Une dernière simulation moléculaire, dans l'eau, de 64 ps, du chitohexaose (hexamère en  $\beta$ 1-4 de la N-acétyl-glucosamine), inhibiteur compétitif du lysozyme, ne montre pas de mouvements de l'ensemble de la molécule, ni de distorsion de cycle D, contrairement à ce qui a pu être démontré par diffraction des rayons X dans le site actif du lysozyme. Cette grande rigidité doit être due au grand nombre de liaisons hydrogène (une trentaine) immobilisant la molécule.

Il conviendrait donc d'effectuer une dynamique moléculaire de cet hexamère avec les acides aminés du site actif du lysozyme pour observer dans les mêmes conditions les mouvements de la molécule.

Il serait également intéressant d'introduire tous les paramètres déjà déterminés actuellement pour les monosaccharides avec le champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi dans SPASIBA. Ceci permettrait des études de saccharides plus complexes tels des N-glycannes complets.

