Résonance en dynamique chimique : caractérisation de réseaux de réactions et séparation

Hélène Berthoumieux

▶ **To cite this version:**

Hélène Berthoumieux. Résonance en dynamique chimique : caractérisation de réseaux de réactions et séparation. Chimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : . tel-00443988

HAL Id: tel-00443988
https://theses.hal.science/tel-00443988

Submitted on 5 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie Physique Théorique

Ecole doctorale : Chimie Physique et Chimie Analytique ED 388

Melle Hélène Berthoumieux

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Résonance en dynamique chimique :
caractérisation de réseaux de réactions et séparation.

soutenue le 4 juillet 2008.

devant le jury composé de :

M. Ludovic Jullien	Directeur de thèse
M. Tony Maggs	Rapporteur
M. Vincent Hakim	Rapporteur
M. Hong Qian	Examinateur
M. Edouard Kierlik	Examinateur
M. Francois Amblard	Examinateur
Mme Annie Lemarchand	Examinatrice

Remerciements

Ce travail de thèse s'est déroulé de septembre 2005 à juillet 2008, au sein de l'équipe de Ludovic Jullien du département de l'Ecole Normale Supérieure de Chimie et de Annie Lemarchand au sein du Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée (LPTMC) de l'Université Paris 6.

Mon travail de thèse a été effectué sous la direction conjointe de Ludovic Jullien et de Annie Lemarchand. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Ludovic Jullien, pour m'avoir intégrée à son équipe, pour les sujets passionants qu'il a proposés tout au long de ces trois ans et pour toute l'autonomie qu'il m'a laissée dans mon travail. Je tiens tout particulièrement à remercier Annie Lemarchand pour sa grande gentillesse et pour son implication tout au long de ma thèse. Elle a toujours considéré que j'étais en formation et ne m'a jamais laissée seule devant les difficultés. Son aide quotidienne m'a permis de progresser et m'a appris la prudence et les démonstrations rigoureuses. Ce fut une grande chance de travailler avec elle pendant trois ans.

Je remercie Vincent Hakim, Tony Maggs, Hong Qian, François Amblard et Edouard Kierlik pour l'intérêt et l'attention qu'ils ont portés à mon travail en acceptant de participer à mon jury de thèse. Ce fut pour moi un grand honneur. Je tiens à remercier particulièrement les rapporteurs, Vincent Hakim et Tony Maggs, pour le sérieux avec lequel ils ont accompli cette tâche. Leurs remarques pertinentes m'ont été d'une aide précieuse.

Je remercie Charlie Gosse d'avoir encadré ma courte incursion dans le monde expérimental. J'y ai retrouvé, grâce à lui, la même rigueur que dans le travail théorique.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe de l'ENS, tout d'abord Nathalie Gagey, qui a subi mes états d'âme pendant trois ans, mes excès d'enthousiasme et de désespoir avec patience et humour. Ce soutien a été plus que précieux. Tous mes remerciements également à André Estevez-Torres, qui m'a accueillie chaleureusement dès mon arrivée dans l'équipe et qui m'a soutenue tout au long de la thèse. Merci à Isabelle Aujard, Chouaha Benbrahim et Ludivine Dewimille pour l'excellente ambiance qui régnait dans le bureau P6, c'était un plaisir d'y travailler. Merci à Thomas Lesaux, Thomas Barilero, Pierre Neveu qui m'ont accueillie si gentiement en S13 quand je me suis fait renvoyer du P6. Bon courage à Thomas B. pour les quelques mois qu'il lui reste avant la soutenance, le champagne est proche ! Merci aux nouveaux arrivants, Ludivic Fournier, You Feng Gao, Ludovic Costa, qu'il a été agréable de croiser la dernière année.

Je remercie également tous les membres d'Ivry : Charles Antoine, qui s'est vivement intéressé à mon travail de thèse, si loin de sa formation initiale, et qui m'a apporté une aide précieuse durant la dernière année ; Guillaume Dumazer, Gérard Le Denmat et Jerome Gariel pour les conversations passionantes autour d'un bon café ; Gérard Gauron pour sa disponibilité, son dynamisme et son enthousiasme ; Béatrice Guibal pour son humour, sa fantaisie et sa grande gentillesse.

Enfin, merci à ma famille et mes amis qui m'encouragent à continuer dans cette voie incertaine ; leur soutien m'est précieux.

Table des matières

I Introduction générale **5**

II Modulation de la température et phénomène de résonance : caractérisation de la topologie et de la dynamique des réseaux de réactions chimiques. **8**

II–1 Réseaux de réactions chimiques et modulation de température **9**
1 Introduction . . . 9
2 Réseaux de réactions chimiques . . . 10
3 Etat stationnaire d'un réseau à la température T^0 . . . 12
4 Modulation de température . . . 12
5 Plan de la première partie . . . 13

II–2 Construction d'une fonction résonnante pour un réseau à n espèces **15**
1 Introduction . . . 15
2 Réseaux de réactions chimiques et modulation de température . . . 16
3 Conception d'une fonction résonnante . . . 18
4 Fonction résonnante et écart au principe de bilan détaillé . . . 20
5 Conclusion . . . 20

II–3 Utilisation de la fonction résonnante pour la caractérisation de réseaux enzymatiques obéissant au modèle de Michaelis-Menten **22**
1 Modèle de Michaelis-Menten . . . 22
2 Expression de la fonction réponse . . . 24
3 Démonstration numérique d'un maximum . . . 27
4 Protocole expérimental . . . 28
5 Exemple d'utilisation du filtre cinétique . . . 33
6 Conclusion . . . 34

II–4 Le déplacement hors de l'état d'équilibre fournit une signature des mécanismes **36**
1 Introduction . . . 36
2 Réaction unimoléculaire à deux états . . . 37
3 Réaction unimoléculaire à trois états . . . 39
4 Réseau de réactions chimiques à n espèces . . . 45
5 Application à la détermination de mécanismes . . . 47
6 Conclusion . . . 50

III Extraction de molécules sous contrôle cinétique 52

III–1 Description de méthodes existantes 53
1 Introduction . . . 53
2 Modèle . . . 54
3 Phénomène de dispersion et séparation sur critères cinétiques . . . 55
4 Double modulation et mouvement orienté . . . 56
5 Conclusion . . . 58

III–2 Mouvement orienté dans un potentiel asymétrique et séparation de molécules réactives 59
1 Introduction . . . 59
2 Séparation en présence d'un potentiel permanent . . . 60
3 Séparation avec arrêt du potentiel . . . 61
3.1 Conditions de résonance . . . 63
3.2 Expression de T_1^R . . . 63
3.3 Expression de T_2^R . . . 64
3.4 Expression du potentiel E_2 . . . 65
3.5 Expression de la concentration effective de B . . . 66
4 Validation numérique du protocole . . . 67
4.1 Absence de champ E_2 durant T_2 . . . 68
4.2 Présence d'un champ E_2 durant le temps T_2 . . . 71
5 Mise en oeuvre de la séparation . . . 75
6 Conclusion . . . 76

IV Conclusion et perspectives 79

Bibliographie 83

V Annexe : articles 87

Première partie

Introduction générale

Le phénomène de résonance déterministe est connu depuis longtemps en physique. Les systèmes électriques et mécaniques peuvent entrer en résonance lorsqu'ils sont soumis à une excitation externe de fréquence égale à l'une des fréquence propres du système. Il y a près de 30 ans, en 1981, le phénomène de résonance stochastique a été mis en évidence pour la première fois et a permis d'expliquer la périodicité des ères glacières [1, 2, 3]. Le phénomène de résonance stochastique peut être induit par des fluctuations externes ou internes du système. Il est encore aujourd'hui largement étudié [4, 5].

Les systèmes que nous considérons sont des réseaux de réactions chimiques linéaires et des réactions chimiques non linéaires. Ils sont décrits de manière macroscopique. L'originalité de ce travail théorique est de mettre en évidence des phénomènes de résonance déterministe dans l'espace des constantes cinétiques, pour les systèmes simples, ou dans l'espace de paramètres dynamiques choisis, pour les réseaux. Dans cette approche, contrairement à la résonance déterministe classique, la fréquence de l'excitation est fixée et les paramètres dynamiques varient.

Etre capable de faire résonner un système chimique choisi, caractérisé par un jeu de paramètres dynamiques donné, permet d'identifier, parmi un ensemble d'espèces réactives, celle associée à ce jeu de paramètres, de la doser dans un milieu inconnu ou de l'extraire sélectivement d'un mélange. Dans la première partie de ce manuscrit, nous proposons deux méthodes permettant de caractériser la topologie et la dynamique *in vivo* de réseaux de réactions chimiques et dans la seconde partie, nous décrivons un protocole permettant d'extraire d'un mélange une espèce caractérisée par ses propriétés dynamiques. La mise en oeuvre expérimentale de chaque méthode théorique proposée semble envisageable. Cette étude s'inscrit dans la continuité de travaux précédemment effectués dans l'équipe qui mettaient en évidence des phénomènes de résonance en dynamique [6, 7, 8] et les utilisaient afin de réaliser des extractions sélectives [9, 10].

Les mécanismes mis en jeu dans une cellule biologique sont composés de réseaux compliqués de réactions chimiques. Les temps caractéristiques de ces réactions peuvent être courts, comme la réaction d'association et de dissociation entre un ligand et son récepteur ($<$1s), ou grands comme la synthèse d'une protéine ($>10^3$s) [11]. La caractérisation de la topologie et de la dynamique *in vivo* des réseaux de réactions chimiques est un défi en biologie. En effet, les concentrations d'équilibre et la structure des différentes biomolécules ne sont pas directement liées au comportement dynamique d'une cellule. Dans une première partie, nous proposons deux méthodes d'investigation permettant de caractériser des réseaux de réactions qui utilisent la réponse des systèmes chimiques à une modulation de température. Cette perturbation est non invasive et son temps caractéristique peut varier sur la même échelle que celle des réactions rencontrées dans une cellule biologique. Nous commençons cette partie par la description des réseaux de réactions chimiques considérés.

Puis, dans les chapitres 3 et 4, nous développons une méthode, fondée sur un phénomène de résonance, permettant de caractériser la dynamique d'un réseau de topologie connue. Le chapitre 5 diffère du reste du travail et présente une méthode d'investigation n'est pas fondée sur un phénomène de résonance. Cette fois, la fréquence de la perturbation est une variable et les paramètres dynamiques sont fixés. Cependant, cette méthode apporte des informations complémentaires à la méthode présentée précédemment, tout en utilisant le même type de perturbation. Nous montrons qu'une faible modulation de température entraîne un déplacement hors de l'équilibre du système chimique pouvant dans certains cas être maximisé. Le déplacement hors de l'équilibre de l'espèce réactive incluse dans un réseau de topologie inconnue en fonction de la pulsation de la perturbation fournit une signature du réseau. Cette signature contient des informations sur la topologie et la dynamique du réseau et dans certains cas permet de dessiner le diagramme d'énergie en fonction d'une coordonnée réactionnelle.

Dans la seconde partie du manuscrit, nous nous intéressons à un thème de recherche traditionnel de l'équipe : l'extraction d'un mélange de molécules réactives selon des critères cinétiques [7, 8, 10]. Après une courte présentation de méthodes existantes, nous nous intéressons à la séparation de molécules grâce à l'application d'un potentiel électrique en dents de scie. Cette méthode avait déjà été envisagée d'un point de vue théorique [6], cependant sa mise en oeuvre expérimentale était contraignante. Nous avons repris le protocole théorique existant et avons proposé une solution alternative afin de rendre la réalisation plus simple.

L'ensemble de ce travail a été mené en parallèle d'un travail expérimental, effectué par d'autres membres de l'équipe, et la validation de chacune des méthodes proposées ici est en cours [12].

Deuxième partie

Modulation de la température et phénomène de résonance : caractérisation de la topologie et de la dynamique des réseaux de réactions chimiques.

Chapitre II–1

Réseaux de réactions chimiques et modulation de température

1 Introduction

Une cellule biologique est un mélange complexe de protéines, lipides, acides nucléiques... Pour décrire ces objets, on dispose à l'heure actuelle de techniques théoriques, comme la DFT (Density Functional Theory) et les méthodes de calculs *ab initio* [13, 14, 15], et de techniques expérimentales comme la RMN 3D (Résonance Magnétique Nucléaire à 3 dimensions) [16] et la spectroscopie des rayons X. Ces méthodes permettent de déterminer la structure tridimensionnelle des macromolécules. Elles donnent notamment accès à la géométrie du site actif des enzymes. Cependant, une petite modification de la structure microscopique d'un objet biologique peut entraîner une grande modification de ses propriétés cinétiques. Il est donc intéressant de développer d'autres approches pour caractériser la dynamique des systèmes biologiques.

Une cellule peut être décrite comme un ensemble de voies métaboliques [17, 18], souvent schématisées par un ensemble de noeuds, qui correspondent aux molécules biologiquement actives, et de flèches, qui représentent l'action d'un noeud sur l'autre (transcription, activation, inhibition...) [19]. Depuis que les voies métaboliques principales ont été identifiées il y a une trentaine d'années, un grand nombre d'investigations *in vivo* ont permis d'observer divers aspects de la régulation biologique, comme l'induction et l'inhibition des enzymes par exemple. Il existe aujourd'hui de nombreux modèles mathématiques, utilisant la théorie du contrôle, qui décrivent la façon dont un réseau biologique répond à de petites perturbations au voisinage d'un état stationnaire [20, 21, 22]. En utilisant ces modèles, on peut déterminer un certain nombre de temps caractéristiques associés à la voie métabolique dominante en imposant au système une perturbation et en analysant sa réponse. Ainsi, l'équipe de Alexander van Oudenaarden a caractérisé les temps d'inhibition d'une MAPK (mitogen-activate protein kinase) d'une levure (*Saccharomyces cerevisae*) en analysant sa réponse à une modulation de pression osmotique [11].

A un niveau de description plus précis, une cellule peut être considérée comme un mélange complexe de réactions chimiques qui forment des réseaux [23]. Dans cette vision, qui sera la nôtre au cours de ce travail, la nature et la structure de l'espèce réactive importent peu. Le milieu biologique est décrit comme un ensemble de réseaux de réactions chimiques et chaque réseau est caractérisé par le nombre d'espèces réactives qui le constitue, sa topologie et les valeurs de ses constantes cinétiques.

Beaucoup d'informations sur la cinétique et le mécanisme d'une réaction peuvent être obtenues en observant les fluctuations intrinsèques d'un système [24, 25, 26]. On peut également perturber intentionnellement un paramètre et observer la réponse du réseau à la perturbation. Lorsque l'on connaît l'ensemble des espèces qui le constitue, il est possible de déterminer la topologie d'un réseau inconnu, linéaire ou non. Pour cela on impose, par exemple, un saut de concentration d'une espèce réactive et on observe la réponse transitoire de chacune des autres espèces constituant le réseau. La concentration de chaque espèce A_i passe par un maximum à un instant t_i avant d'atteindre le nouvel état d'équilibre. La topologie du réseau est déduite de l'ensemble des valeurs des temps t_i [27, 28].

Une solution alternative aux méthodes de perturbation est de soumettre le réseau de réactions chimiques à la faible modulation permanente d'un paramètre et d'analyser la réponse permanente du système. Dans cette partie, on s'intéresse à la réponse d'un réseau linéaire de réactions chimiques à une faible oscillation de la température. Cette perturbation est non invasive et devrait permettre d'étudier la dynamique de systèmes *in vivo*. Des cellules microfluidiques permettant une modulation contrôlée en fréquence et en amplitude de la température sont actuellement développées au sein de l'équipe. Les dimensions micrométriques du système permettent d'obtenir dans le milieu une modulation de température à une fréquence pouvant atteindre 10^5 Hz [12].

2 Réseaux de réactions chimiques

Le système réactionnel que nous considérons est un ensemble de n espèces réactives A_i, (i=1,...,n) et toutes les isomérisations possibles entre deux de ces espèces. Un tel réseau N de réactions chimiques peut s'écrire de la manière suivante :

$$\mathrm{A}_i \underset{k_{ji}}{\overset{k_{ij}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{A}_j \qquad i,j = 1,...,n \tag{1.1}$$

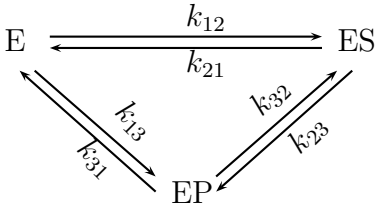
où les constantes cinétiques k_{ij} sont des constantes cinétiques du premier ordre. Nous nous intéressons à des réseaux de réactions chimiques *in vivo*.

Les concentrations des espèces biochimiques varient sur dix ordres de grandeur dans une cellule. On trouve une ou deux copies par cellule de petits ARN (acide ribonucléique)

messagers [29] et 30000 copies des protéines les plus abondantes [30]. La concentration la plus élevée est la concentration physiologique en NaCl (chlorure de sodium) dont la valeur varie de 50.10^{-3} à 100.10^{-3} mol.L^{-1}. La variation de la concentration d'une espèce peut être négligée devant une autre lorsque la première est présente en excès. C'est le cas dans la catalyse enzymatique où la concentration des substrats et des produits peut souvent être considérée comme constante [31]. Le schéma de réaction d'une enzyme vérifiant la cinétique de Michaelis-Menten à trois états est le suivant :

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{21}}{\overset{k^*_{12}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{EP} \underset{k^*_{13}}{\overset{k_{31}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{1.2}$$

Les constantes cinétiques k^*_{12} et k^*_{13} sont des constantes cinétiques du deuxième ordre. Les concentrations du substrat S et du produit P étant considérées comme constantes, la réaction peut s'écrire de la manière suivante :



Du point de vue de l'enzyme, cette réaction est cyclique et unimoléculaire. Les constantes cinétiques k_{21}, k_{23}, k_{32}, k_{31} sont du premier ordre et les constantes cinétiques $k_{12} = k^*_{12}S$ et $k_{13} = k^*_{13}P$ sont du pseudo-premier ordre.

Les milieux biologiques sont des milieux ouverts et la concentration de certaines espèces, comme par exemple de l'adénosine triphosphate (ATP), y est maintenue constante grâce à un ensemble de sources.

Lorsqu'une espèce est en excès ou quand sa concentration est maintenue constante, une réaction bimoléculaire peut donc être considérée comme une pseudo-isomérisation caractérisée par des constantes cinétiques du pseudo-premier ordre. Le modèle de réseau considéré Eq. (1.1) s'étend donc à un ensemble de pseudo-isomérisations caractérisées par des constantes cinétiques du premier ordre ou du pseudo-premier ordre et permet entre autre de décrire la catalyse enzymatique.

3 Etat stationnaire d'un réseau à la température $\mathbf{T}^0$

On s'intéresse à l'état stationnaire du réseau N défini Eq. (1.1) à la température T^0. Il est caractérisé par le vecteur $\mathbf{A}^0 = \begin{pmatrix} A_1^0 \\ ... \\ A_n^0 \end{pmatrix}$, où A_i^0 est la concentration de l'espèce A_i à la température T^0. La conservation de la matière impose la relation : $A_1^0 + A_2^0 + ... + A_n^0 = 1$. L'état stationnaire $\mathbf{A}^0$ à la température T^0 est la solution de l'équation $\mathbf{M}^0\mathbf{A}^0 = 0$ où $\mathbf{M}^0$ est la matrice suivante :

$$\mathbf{M}^0 = \begin{pmatrix} -\Sigma_{\nu\neq 1} k_{1\nu} & k_{21} & ... & k_{n1} \\ k_{12} & -\Sigma_{\nu\neq 2} k_{2\nu} & ... & k_{n2} \\ ... & ... & ... & ... \\ k_{1n} & k_{2n} & ... & -\Sigma_{\nu\neq n} k_{\nu n} \end{pmatrix} \tag{1.3}$$

L'existence d'une solution non nulle pour le vecteur $\mathbf{A}^0$ implique que la matrice $\mathbf{M}^0$ admet toujours au moins une valeur propre nulle. En l'absence d'échange avec l'extérieur, le système chimique vérifie le principe de bilan détaillé [23].

Le bilan détaillé ou équilibre détaillé signifie que pour chaque paire d'espèces réactives (A_i,A_j) le nombre de processus d'isomérisations de A_i en A_j est égal à celui de A_j en A_i à tout instant. Les espèces sont à l'équilibre deux à deux.

L'état stationnaire $\mathbf{A}^0$ est alors un état d'équilibre et les concentrations A_i^0 et A_j^0 des espèces A_i et A_j sont liées par la relation :

$$\frac{A_i^0}{A_j^0} = \frac{k_{ji}}{k_{ij}} \tag{1.4}$$

En conséquence, pour chaque chemin réactionnel fermé reliant l'espèce A_i et l'espèce A_j, tel que $i = i_0, i_1, i_2, ...i_{n-1}, i_n = j$, les constantes cinétiques vérifient :

$$\frac{k_{i_0,i_1} k_{i_1,i_2} ... k_{i_{n-1},i_n} k_{i_n,i_0}}{k_{i_1,i_0} k_{i_2,i_1} ... k_{i_n,i_{n-1}} k_{i_0,i_n}} = 1 \tag{1.5}$$

Certaines constantes cinétiques sont du pseudo-premier ordre et comportent des concentrations cachées, comme la concentration du substrat et du produit dans l'exemple de la cinétique de Michaelis-Menten. Les relations données Eqs. (1.4, 1.5) indiquent que ces espèces cachées sont à l'équilibre chimique. *In vivo*, certains réseaux de réactions chimiques sont maintenus dans un état stationnaire différent de l'état d'équilibre [31] par un ensemble de flux de concentrations. D'autres réactions sont à l'équilibre, comme par exemple la réaction creatine+ATP $\rightleftharpoons$ procreatine+ADP (adénosine diphosphate) [32] qui se déroule dans les cellules musculaires, et vérifient le principe de bilan détaillé.

4 Modulation de température

Le réseau défini Eq. (1.1) est soumis à une faible modulation de température :

$$T = T^0[1 + \beta \sin(\omega t)] \qquad \beta \ll 1 \tag{1.6}$$

autour de la température T^0. La pulsation ω de la modulation est choisie suffisamment petite pour que l'équilibre thermique dans le milieu soit toujours atteint. Selon le modèle de Eyring [33], les constantes cinétiques dépendent de la température de la façon suivante :

$$k_{ij} = \frac{k_B T}{h} \exp(\frac{\Delta_{ij} S^{\neq 0}}{R}) \exp(\frac{-\Delta_{ij} H^{\neq 0}}{RT}) \tag{1.7}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, R est la constante des gaz parfaits, h est la constante de Planck, $\Delta_{ij} H^{\neq 0}$ et $\Delta_{ij} S^{\neq 0}$ sont respectivement l'enthalpie standard d'activation et l'entropie standard d'activation de la réaction. $\Delta_{ij} H^{\neq 0}$ et $\Delta_{ij} S^{\neq 0}$ sont considérées comme constantes sur l'échelle de température considérée. L'expression de la constante cinétique donnée dans l'Eq. (1.7) est développée au deuxième ordre en fonction du paramètre β. On obtient l'expression :

$$k_{ij}(t) = k_{ij}^0 + \beta k_{ij}^0 (\epsilon_{ij} + 1) \sin(\omega t) + \beta^2 k_{ij}^0 \frac{\epsilon_{ij}^2}{4} (1 - \cos(2\omega t)) \tag{1.8}$$

où $k_{ij}^0 = \frac{k_B T^0}{h} \exp(\frac{\Delta_{ij} Si^{\neq 0}}{R}) \exp(\frac{-\Delta_{ij} H^{\neq 0}}{RT^0})$ est la constante cinétique à la température T^0, $\epsilon_{ij} = \frac{\Delta_{ij} H^{\neq 0}}{RT^0}$ est l'énergie d'activation réduite. La constante cinétique perturbée $k_{ij}(t)$ est donc la somme de la constante cinétique non perturbée à l'ordre 0, d'un terme oscillant à la pulsation ω en phase avec la température à l'ordre 1 et de la somme d'un terme constant et d'un terme oscillant à la pulsation 2ω à l'ordre 2.
La modulation de température, entraîne une modulation des constantes cinétiques et donc une modulation des concentrations. Nous négligeons le régime transitoire et ne nous intéressons qu'au régime permanent. La concentration d'une espèce réactive A_i soumise à l'oscillation de température donnée dans l'Eq. (1.6) s'écrit sous la forme :

$$\begin{aligned} A_i(t) &= A_i^0 + \beta(A_{i,\sin}^1 \sin(\omega t) + A_{i,\cos}^1 \cos(\omega t)) \\ &+ \beta^2(A_{i,cst}^2 + A_{i,\sin}^2 \sin(2\omega t) + A_{i,\cos}^2 \cos(2\omega t)) \end{aligned} \tag{1.9}$$

où A_i^0 est la concentration stationnaire de l'espèce A_i à la température T^0 ; $A_{i,sin}^1$ et $A_{i,cos}^1$ sont les amplitudes des oscillations de la concentration, à la pulsation ω, au premier ordre de la perturbation, respectivement en phase et quadrature de phase avec la température. $A_{i,\sin}^2$ et $A_{i,\cos}^2$ sont les amplitudes des oscillations des concentrations à la pulsation 2ω au deuxième ordre de la perturbation ; $A_{i,cst}^2$ est une correction de la valeur stationnaire A^0 au deuxième ordre de la perturbation, c'est-à-dire un déplacement hors de l'équilibre.

5 Plan de la première partie

Dans les deux premiers chapitres de cette partie, nous développons une méthode théorique permettant de caractériser la dynamique d'un réseau linéaire de topologie connue.

Nous choisissons un jeu de paramètres dynamiques, fonctions des constantes cinétiques, qui caractérise la dynamique d'un réseau et qui est adapté à notre objectif. Inspirés par les travaux d'Eigen [34], nous nous intéressons à l'amplitude d'oscillation de la concentration $A_{i,\cos}$, au premier ordre de la perturbation, en quadrature de phase avec la température. Nous construisons une fonction réponse, définie pour n'importe quel réseau et maximum pour un réseau associé à une dynamique choisie, i. e., pour un jeu fixé de paramètres. La valeur de la fonction réponse d'un réseau inconnu permet de déterminer le jeu de paramètres auquel il est associé, avec une précision que l'on peut évaluer. Dans un premier temps, nous présentons cette méthode dans le cas général d'un réseau linéaire constitué de n espèces réactives, puis nous explicitons analytiquement ce protocole dans le cas d'un réseau à trois espèces, modèle de la catalyse enzymatique de Michaelis-Menten à trois états.

Dans une seconde partie, nous nous intéressons au déplacement hors de l'équilibre induit par la modulation de température. Nous montrons que le déplacement hors de l'état d'équilibre d'une espèce réactive en fonction de la fréquence d'excitation ω est une signature du réseau de réactions dans lequel l'espèce observée est impliquée et que l'on peut extraire de cette signature des informations sur la topologie du réseau, les paramètres caractérisant sa dynamique, y compris dans certains cas la valeur des énergies d'activation. Nous commençons par étudier analytiquement le cas simple d'une réaction unimoléculaire à deux états, avant de traiter le cas d'une réaction unimoléculaire à trois états, puis de généraliser les résultats à un réseau de n espèces.

Tous les calculs sont traités pour des systèmes initialement à l'équilibre. Cependant, dans le cas où la modulation de température n'affecte pas les flux maintenant le réseau dans un état stationnaire et que les constantes cinétiques suivent le modèle d'Eyring, les méthodes proposées peuvent *a priori* s'appliquer à l'étude de réseaux initialement dans un état stationnaire hors d'équilibre.

Chapitre II–2

Construction d'une fonction résonnante pour un réseau à n espèces

1 Introduction

La caractérisation de la dynamique *in vivo* des réseaux de réactions chimiques est un défi en biologie.
Il existe de nombreuses techniques expérimentales, compatibles ou non avec une investigation *in vivo* permettant de déterminer le temps de relaxation de réactions chimiques du premier ordre ou du pseudo-premier ordre, du type A $\rightleftharpoons$ B. Les plus anciennes sont les techniques de relaxation classiques. On perturbe le système chimique en faisant varier brusquement un paramètre d'équilibre, la température [34], la pression ou la concentration [35, 36, 37] d'une espèce réactive par exemple, et on observe l'évolution du système vers un nouvel état d'équilibre. Une autre méthode consiste à mélanger très rapidement deux réactifs dont l'un est en excès et à observer l'évolution du système vers l'état d'équilibre. C'est le principe de fonctionnement du 'stopped flow' [38]. On peut également perturber un système chimique grâce à une impulsion lumineuse. Le développement des lasers pulsés a ainsi permis l'observation de phénomènes associés à des temps caractéristiques très courts, de l'ordre de la nanoseconde, comme par exemple le repliement des protéines qui peut être initié par l'absorption d'un photon [39].
Le temps caractéristique d'une réaction peut aussi être déterminé sans perturber l'état d'équilibre du système mais en analysant les fluctuations autour de cet état d'équilibre. Ces fluctuations sont observables grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN) [40] ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [41, 42, 43].
Ces méthodes analysent la réponse transitoire d'un système à une perturbation ou des fluctuations et déduisent le temps de relaxation d'une réaction chimique à l'aide d'ajustements de l'évolution temporelle des concentrations.

Récemment, des méthodes analysant un système réactif dans un état permanent ont été développées. Les avancées récentes en microfluidique ont permis de développer des dispositifs, comme le 'T-sensor' [44, 45] dans lequel les réactifs sont injectés en continu. A une position donnée dans le canal correspond une valeur donnée de l'avancement de la réaction. Dans ce système ouvert, la figure observée est stationnaire. Cependant, cette méthode est incompatible avec une investigation *in vivo*. En revanche, Albert Libchaber et Dieter Braun ont étudié la cinétique de la réaction d'ouverture d'un balise moléculaire (beacon) d'ADN, en soumettant le système chimique à une modulation de température dans une cellule microfluidique. Ils déterminent le temps de relaxation de la réaction en analysant le régime permanent du système et cette méthode est compatible avec une observation *in vivo* [46].

Il existe donc un large choix de techniques expérimentales, compatibles ou non avec une investigation *in vivo* qui permettent de déterminer le temps de relaxation d'une réaction simple, mais aucun protocole ne permet de caractériser la dynamique globale d'un réseau de réactions chimiques.

Pour les réseaux complexes, linéaires ou non, des méthodes théoriques d'optimisation, fondées sur le traitement numérique de séries temporelles, permettent de déterminer la valeur d'un grand nombre de constantes cinétiques [47, 48]. Cependant, ces techniques utilisent des ajustements des concentrations des espèces réactives en fonction des constantes cinétiques. Or leur dépendance en fonction des constantes cinétiques est fortement non linéaire. Cela limite la précision des résultats et ne permet pas d'évaluer l'erreur commise. De plus, cela nécessite d'acquérir un grand nombre de données expérimentales.

Nous développons dans ce chapitre une méthode théorique permettant de caractériser la dynamique d'un réseau linéaire de topologie connue. Cette méthode est fondée sur un phénomène de résonance, ne nécessite pas d'ajustements et permet d'évaluer la précision du résultat. Sa mise en oeuvre expérimentale est envisageable et elle est compatible avec l'observation de systèmes *in vivo*.

2 Réseaux de réactions chimiques et modulation de température

On considère un réseau linéraire de réactions chimiques à n espèces :

$$\mathrm{A}_i \underset{k_{ji}}{\overset{k_{ij}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{A}_j \qquad i,j = 1,...,n \tag{2.1}$$

Les constantes cinétiques k_{ij} sont du premier ordre ou du pseudo-premier ordre. Le réseau est soumis à la faible modulation de température décrite dans l'Eq. (1.6) et on rappelle

que l'expression des constantes cinétiques au premier ordre de la perturbation est :

$$k_{ij} = k_{ij}^0 + \beta k_{ij}^1 \sin(\omega t) \tag{2.2}$$

avec $k_{ij}^1 = k_{ij}^0 \epsilon_{ij}$ où k_{ij}^0 est la constante cinétique à la température T^0 et $\epsilon_{ij} = (\Delta_{ij} H^{\neq 0}/RT^0 + 1)$ dans ce chapitre. $\Delta_{ij} H^{\neq 0}$ est l'enthalpie standard d'activation de la réaction et R la constante des gaz parfaits. Le réseau est à l'équilibre à la température T^0. Il obéit au principe de bilan détaillé et les concentrations à la température T^0 vérifient la relation :

$$\frac{A_i^0}{A_j^0} = \frac{k_{ji}^0}{k_{ij}^0} \tag{2.3}$$

La conservation de la matière impose la relation : $A_1^0 + A_2^0 + ...A_n^0 = 1$. L'état du réseau N, au premier ordre de la perturbation, à tout instant t est décrit par le vecteur $\mathbf{A}(t)=\mathbf{A}^0+\beta\mathbf{A}^1(\mathrm{t})= \begin{pmatrix} A_1(t) \\ ... \\ A_{n-1}(t) \end{pmatrix}$ où $A_i(t)$ est la concentration de l'espèce A_i. Le vecteur $\mathbf{A}(t)$ vérifie l'équation :

$$\frac{d\mathbf{A}(t)}{dt} = \Big(\mathbf{M}^0 + \beta \mathbf{M}^1 \sin(\omega t)\Big)\mathbf{A}(t) \tag{2.4}$$

avec

$$\mathbf{M}^i = \begin{pmatrix} -\Sigma_{\nu\neq 1} k_{1,\nu}^i - k_{n,1}^i & k_{2,1}^i - k_{n,1}^i & ... & k_{n-1,1}^i - k_{n,1}^i \\ k_{1,2}^i - k_{n,2}^i & -\Sigma_{\nu\neq 2} k_{2,\nu}^i - k_{n,2}^i & ... & k_{n-1,2}^i - k_{n,2}^i \\ ... & ... & ... & ... \\ k_{1,n-1}^i - k_{n,n-1}^i & k_{2,n-1}^i - k_{n,n-1}^i & ... & -\Sigma_{\nu\neq n} k_{n-1,\nu}^i - k_{n,n-1}^i \end{pmatrix} i = 0, 1 \tag{2.5}$$

Une des conséquences du bilan détaillé est que la matrice $\mathbf{M}^0$ possède $n-1$ valeurs propres réelles et négatives λ_i, $(i = 1, ..., n-1)$ [49]. On considère le cas non dégénéré dans lequel les $(n-1)$ valeurs propres sont différentes.

La dépendance exponentielle des constantes cinétiques en fonction des énergies d'activation a pour conséquence qu'une faible variation de l'énergie d'activation entraîne une grande variation de la valeur de la constante cinétique. Les énergies d'activation varient sur une échelle de valeur beaucoup plus restreinte que les constantes cinétiques. Afin de diminuer le nombre de variables, on considère par la suite que les énergies d'activation sont des paramètres constants. Dans ce cas, la dynamique du réseau N ne dépend que des $n(n-1)$ constantes cinétiques.

En utilisant la matrice de passage normée $\mathbf{P}$, associée à la matrice $\mathbf{M}^0$, nous introduisons de nouvelles coordonnées pour décrire l'état du réseau :

$$\mathbf{X}(t) = \mathbf{P}^{-1}\mathbf{A}(t) \tag{2.6}$$

Chaque vecteur colonne normé de la matrice $\mathbf{P}$ définit une direction propre du système, définie par $(n-2)$ angles. L'état instantané du réseau N est caractérisé de manière équivalente par le vecteur $\mathbf{A}(t)$ et $\mathbf{X}(t) = \mathbf{X}^0 + \beta\mathbf{X}^1(t)$. De même, le réseau N est défini de

manière équivalente par les $n(n-1)$ constantes cinétiques ou par les $(n-1)$ concentrations d'équilibre A_i^0 $(i = 1, ..., n-1)$, les $(n-1)$ valeurs propres λ_i $(i = 1, ..., n-1)$ et les $(n-1)(n-2)$ angles θ_{ij} $(i = 1, ..., n-1$ et $j = 1, ..., n-2)$ caractérisant les $(n-1)$ directions propres associées à la matrice $\mathbf{M}^0$. Les équations de la dynamique associées au vecteur $\mathbf{X}(t)$ sont découplées et on obtient au premier ordre de la perturbation :

$$\frac{dX_i^1(t)}{dt} = \lambda_i X_i^1 + \alpha_i \sin(\omega t) \qquad i = 1, ..., n-1 \tag{2.7}$$

où α_i est la i^{eme} coordonnée du vecteur $\mathbf{P}^{-1}\mathbf{M}^1\mathbf{P}\mathbf{X}^0$. On néglige le régime transitoire et on s'intéresse au régime permanent. Le vecteur $\mathbf{X}^1(t)$ s'écrit sous la forme : $\mathbf{X}^1(t) = \mathbf{X}^1_{\sin}(\omega)\sin(\omega t) + \mathbf{X}^1_{\cos}(\omega)\cos(\omega t)$ avec :

$$X^1_{i,\sin}(\omega) = -\alpha_i \frac{-\lambda_i}{\omega^2 + \lambda_i^2} \tag{2.8}$$

$$X^1_{i,\cos}(\omega) = -\alpha_i \frac{\omega}{\omega^2 + \lambda_i^2} \tag{2.9}$$

On note que la fonction $|X^1_{i,\cos}(\omega)|$ passe par un maximum pour $\omega = |\lambda_i|$. L'expression des concentrations est obtenue en inversant l'Eq. (2.6). On obtient :

$$\mathbf{A}^1_{\sin} = \mathbf{P}\mathbf{X}^1_{\sin}, \qquad \mathbf{A}^1_{\cos} = \mathbf{P}\mathbf{X}^1_{\cos}. \tag{2.10}$$

Les coefficients α_i, introduits dans l' Eq. (2.7), sont des combinaisons linéaires des enthalpies standard de réaction $\Delta_{ij}H^0 = (\epsilon_{ij} - \epsilon_{ji})RT^0$. Ils s'annulent lorsque les isomérisations composant le réseau sont des réactions athermiques ; la modulation ne perturbe alors pas le système qui reste à l'équilibre.

La réponse des concentrations $\mathbf{A}^1_{\sin}$ et $\mathbf{A}^1_{\cos}$ à une modulation de température, ne dépend pas linéairement des constantes cinétiques k^0_{ij}. Deux réseaux, N^1 et N^2 , définis par deux jeux de constantes cinétiques, dont certains couples $(k^{01}_{ij}, k^{02}_{ij})$ différent de plusieurs ordres de grandeurs, peuvent avoir des réponses voisines. Il est donc plus approprié de caractériser la dynamique d'un réseau N par le jeu de paramètres suivant : (λ_i, θ_{ij}).

3 Conception d'une fonction résonnante

On suppose que les amplitudes des oscillations des concentrations en quadrature de phase avec la température $\mathbf{A}^1_{\cos}$ sont mesurables expérimentalement. On considère un état d'équilibre donné $\mathbf{A}^{0R}$. Plusieurs jeux de constantes cinétiques k^0_{ij}, décrivant plusieurs réseaux, correspondent à cet état d'équilibre. Ils sont associés à des valeurs propres et des directions propres différentes. Notre but est de définir, pour chaque réseau N dans l'état d'équilibre $\mathbf{A}^{0R}$, une réponse $R(N)$ construite à partir des amplitudes en quadrature de phase pour des fréquences appropriées telle que $R(N)$ soit maximum pour un réseau

choisi N^R. En d'autres termes, la fonction R est une fonction des valeurs propres λ_i et des angles caractérisant les directions propres θ_{ij} et est maximum pour un jeu choisi de valeurs $(\lambda_i^R, \theta_{ij}^R)$.
Selon l'Eq. (2.9), l'amplitude $X_{i,\cos}^{1,R}(\omega)$, considérée comme une fonction de ω est maximale pour la pulsation $\omega = |\lambda_i^R|$. On choisit donc de soumettre le réseau à une somme de modulation de température de pulsation égale à la valeur absolue des valeurs propres $|\lambda_i^R|$ du réseau N^R :

$$T = T^0\Big(1 + \beta\Sigma_{i=1}^{n-1}\sin(|\lambda_i^R|t)\Big) \tag{2.11}$$

L'expression des concentrations des espèces réactives a la forme suivante au premier ordre de la perturbation :

$$A_i(t) = A_i^{0R} + \beta\Sigma_{j=1}^{n-1}\Big(A_{i,\sin}^1(\omega = |\lambda_j^R|)\sin(|\lambda_j^R|t) + A_{i,\cos}^1(\omega = |\lambda_j^R|)\cos(|\lambda_j^R|t)\Big) \tag{2.12}$$

On définit le filtre cinétique $\mathbf{P}^{-1R}$ comme la matrice inverse de la matrice de passage $\mathbf{P}^R$ et on construit le vecteur :

$$\mathbf{S}(N,\omega) = \mathbf{P}^{-1R}\mathbf{A}_{\cos}^1(\omega) \tag{2.13}$$

Le vecteur $\mathbf{S}(N,\omega)$ est la projection du vecteur $\mathbf{A}_{\cos}^1(\omega)$ de coordonnées $A_{i,\cos}^1(\omega)$ sur les directions propres du réseau N^R. On définit la fonction de réponse $R(N)$ de la manière suivante :

$$R(N) = \Pi_{i=1}^{n-1}|S_i(N, \omega = |\lambda_i^R|)| \tag{2.14}$$

où S_i est la i^{eme} coordonnée du vecteur $\mathbf{S}(N,\omega)$ excitée à la fréquence $\omega = |\lambda_i^R|$. La fonction $R(N)$ est une fonction des valeurs propres et des angles définissant les directions propres du réseau N. Pour le réseau N^R, l'Eq. (2.14) peut se réécrire en utilisant l'Eq. (2.10) sous la forme suivante :

$$R(N^R) = \Pi_{i=1}^{n-1}|X_{i,\cos}^{1,R}(|\lambda_i^R|)| \tag{2.15}$$

Nous avons déjà constaté que pour des valeurs propres λ_i^R fixées, chaque terme du produit $X_{i,\cos}^{1,R}(\omega)$, considéré comme une fonction de ω, est maximum pour $\omega = |\lambda_i^R|$. Maintenant pour des pulsations d'excitation fixées, et pour des valeurs propres et des directions propres variables, nous conjecturons que la fonction $R(N)$ passe par un maximum :

$$|\lambda_i| = |\lambda_i^R| \quad \text{pour} \quad i = 1, ..., n-1 \tag{2.16}$$

$$\theta_{ij} = \theta_{ij}^R \quad \text{pour} \quad i = 1, ..., n-1, \quad j = 1, ..., n-2 \tag{2.17}$$

En d'autres termes, la fonction $R(N)$ est maximale pour le réseau N^R, associé à l'état d'équilibre $\mathbf{A}^{0R}$, aux valeurs propres λ_i^R et aux directions propres définies par les angles

θ_{ij}^R. Il est facile de démontrer ce résultat dans le cas de réseaux à $n = 2$ états, car la fonction $R(N)$ ne dépend que d'une seule variable, la valeur propre λ_1 [34]. L'expression de la fonction réponse $R(N)$ dans le cas $n = 2$ est la suivante :

$$R(N) = A_1^{0R}(1 - A_1^{0R})\Delta_{12}H\frac{\lambda_1^R\lambda_1}{(\lambda_1^R)^2 + (\lambda_1)^2}. \tag{2.18}$$

Pour un état d'équilibre A^{0R} fixé, la fonction réponse $R(N)$ est bien maximum pour $\lambda_1 = \lambda_1^R$. Nous verrons dans le chapitre 4 que ce résultat est également exact dans le cas d'un réseau à $n = 3$ états.

La fonction $R(N)$ peut être utilisée pour évaluer l'influence de l'environnement sur la dynamique d'un réseau ou pour tester un grand nombre de réseaux inconnus et déterminer celui qui est associé au jeu de paramètres dynamiques (λ_i, θ_{ij}) le plus proche d'un jeu choisi $(\lambda_i^R, \theta_{ij}^R)$. Ces deux exemples seront traités dans le paragraphe suivant.

4 Fonction résonnante et écart au principe de bilan détaillé

Dans les paragraphes précédents, nous avons développé un protocole permettant de construire, pour n'importe quel réseau N^R vérifiant le principe de bilan détaillé, une fonction $R(N)$ qui est maximum pour ce réseau.

Nous considérons maintenant un réseau N^R hors de l'état d'équilibre à la température T^0. Lorsque l'état stationnaire est proche de l'état d'équilibre, les valeurs propres de la matrice $\mathbf{M}^0$ sont réelles et négatives. Si la source de hors équilibre n'est pas affectée par la modulation de température et que les constantes cinétiques suivent le modèle d'Eyring, défini Eq. (1.7), le raisonnement théorique développé précédemment reste valable et permet d'associer à ce réseau une fonction réponse R.

Si l'état stationnaire du réseau N^R est loin de l'état d'équilibre, les valeurs propres de la matrice $\mathbf{M}^0$ peuvent être complexes. On ne peut, dans ce cas là, appliquer directement la méthode proposée. Cependant, l'information dynamique reste contenue dans la réponse du réseau de réactions à une modulation de température et il est envisageable de contruire une fonction résonnante à partir des mêmes observables. L'extension de la méthode aux réseaux associés à des valeurs propres complexes présente un intérêt évident dans le cas d'observation de systèmes *in vivo* et nous espérons y parvenir prochainement.

5 Conclusion

Nous avons construit une fonction réponse R, fonction des paramètres caractérisant la dynamique d'un réseau, (λ_i, θ_{ij}), qui est maximum pour un jeu choisi de paramètres

$(\lambda_i^R, \theta_{ij}^R)$. Cette fonction permet de tester si un réseau de dynamique inconnue est associé à un jeu de paramètres donné. La méthode proposée présente l'avantage de ne pas nécessiter d'ajustements et d'évaluer la précision du résultat obtenu. Elle s'applique à des réseaux linéaires et est particulièrement adaptée à la caractérisation de la dynamique de cycles catalytiques, notamment des enzymes vérifiant la cinétique de Michaelis-Menten. Ce dernier cas sera développé analytiquement dans le prochain chapitre.

Chapitre II–3

Utilisation de la fonction résonnante pour la caractérisation de réseaux enzymatiques obéissant au modèle de Michaelis-Menten

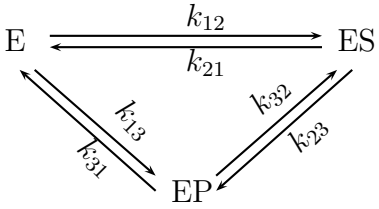
Une enzyme est un catalyseur biologique agissant à faible concentration et permettant d'accélérer des millions de fois des réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou dans le milieu extracellulaire. Il existe plus de 3500 enzymes différentes répertoriées. Nous nous intéressons plus particulièrement aux enzymes possédant un seul site de fixation et dont le mécanisme suit le modèle de Michaelis-Menten. Un certain nombre d'enzymes suivant ce modèle fonctionnent *in vivo* à l'équilibre et satisfont le principe de bilan détaillé [50]. La méthode de détermination de paramètres dynamiques d'un réseau de réactions chimiques présentée dans le paragraphe précédent est particulièrement adaptée à l'étude de ces systèmes.
Dans ce chapitre, nous explicitons cette méthode dans le cas de la caractérisation de la dynamique de réseaux catalytiques à trois états. Nous démontrons numériquement la position du maximum postulé dans les Eqs. (2.16, 2.17) et nous proposons d'appliquer cette méthode à un "screening" d'enzymes (ou criblage) afin de caractériser leurs propriétés dynamiques.

1 Modèle de Michaelis-Menten

Nous considérons une enzyme E catalysant la transformation d'un substrat S en un produit P selon un mécanisme suivant le modèle de Michaelis-Menten à trois états, E, ES et EP. Nous rappelons que ce mécanisme s'écrit sous la forme suivante :

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{21}}{\overset{k^*_{12}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{EP} \underset{k^*_{13}}{\overset{k_{31}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{3.1}$$

Le substrat S et le produit P sont en grand excès par rapport à l'enzyme E, leur concentration peut donc être considérée comme constante. Du point de vue de l'enzyme, la réaction est cyclique et unimoléculaire :



Les constantes cinétiques k_{21}, k_{23}, k_{32}, k_{31} sont du premier ordre et les constantes cinétiques $k_{12} = k_{12}^* S$ et $k_{13} = k_{13}^* P$ sont du pseudo-premier ordre.
Nous considérons ici un système vérifiant le principe du bilan détaillé, ce qui implique la relation suivante :

$$\frac{k_{12}^* k_{23} k_{31}}{k_{21} k_{32} k_{13}^*} = \frac{P}{S} \tag{3.2}$$

$$\text{i.e.} \qquad \frac{k_{12} k_{23} k_{31}}{k_{21} k_{32} k_{13}} = 1 \tag{3.3}$$

L'état d'équilibre du système à la température T^0 est donné par le vecteur $\mathcal{E}^0$ qui s'écrit :

$$\mathcal{E}^0 = \begin{pmatrix} E^0 \\ ES^0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{1+\frac{k_{12}^0}{k_{21}^0}+\frac{k_{13}^0}{k_{31}^0}} \\ \frac{1}{1+\frac{k_{21}^0}{k_{12}^0}+\frac{k_{23}^0}{k_{32}^0}} \end{pmatrix} \tag{3.4}$$

La concentration EP^0 de l'état EP est imposée par la relation de conservation $E^0 + ES^0 + EP^0 = 1$.
La matrice $\mathbf{M}^0$, opérateur linéaire associée à la dynamique du système, a pour expression :

$$\mathbf{M}^0 = \begin{pmatrix} \kappa_{1,1}^0 & \kappa_{1,2}^0 \\ \kappa_{2,1}^0 & \kappa_{2,2}^0 \end{pmatrix} \tag{3.5}$$

L'expression des coefficients κ_{ij}^0 en fonction des constantes cinétiques est donnée dans le tableau 4.1.

Une conséquence du principe de bilan détaillé est que la matrice $\mathbf{M}^0$ possède deux valeurs propres réelles négatives (λ_+, λ_-) [49, 51], ayant pour expression :

$$\lambda_\pm = \frac{\kappa_{1,1}^0 + \kappa_{2,2}^0}{2} \pm \frac{1}{2}\sqrt{(\kappa_{1,1}^0 + \kappa_{2,2}^0)^2 - 4(\kappa_{1,1}^0 \kappa_{2,2}^0 - \kappa_{2,1}^0 \kappa_{1,2}^0)} \tag{3.6}$$

et vérifiant $\lambda_- < \lambda_+$. La matrice de passage normée $\mathbf{P}$, associé à la matrice $\mathbf{M}^0$ peut s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} \cos(\theta_+) & \cos(\theta_-) \\ \sin(\theta_+) & \sin(\theta_-) \end{pmatrix} \tag{3.7}$$

$\kappa^i_{1,1}$	$i=0$	$-(k^0_{12}+k^0_{13}+k^0_{31})$	$\kappa^i_{1,2}$	$i=0$	$k^0_{21}-k^0_{31}$
	$i=1$	$-(k^1_{12}+k^1_{13}+k^1_{31})$		$i=1$	$k^1_{21}-k^1_{31}$
$\kappa^i_{2,1}$	$i=0$	$k^0_{12}-k^0_{32}$	$\kappa^i_{2,2}$	$i=0$	$-(k^0_{21}+k^0_{23}+k^0_{32})$
	$i=1$	$k^1_{12}-k^1_{32}$		$i=1$	$-(k^1_{21}+k^1_{23}+k^1_{32})$

TAB. II–3.1 – Expression des coefficients des matrices $\mathbf{M}^i$ en fonction des constantes cinétiques et des énergies d'activation réduites ϵ_{ij} telles que $k^1_{ij} = k^0_{ij}\epsilon_{ij}$

Les angles θ_+ et θ_- définissent les directions propres du système associées aux valeurs propres λ_+ et λ_-. Les expressions de l'angle θ_+ en fonction des valeurs propres et des coefficients de la matrice $\mathbf{M}^0$ et de l'angle θ_- en fonction de l'angle θ_+ et des concentrations d'équilibre sont les suivantes :

$$\theta_+ = \arctan\left(\frac{-\kappa^0_{1,1}+\lambda_+}{\kappa^0_{2,1}}\right) \tag{3.8}$$

$$\theta_- = \arctan\Big(-\frac{ES^0}{E^0}\frac{E^0\tan(\theta_+)+1-ES^0}{(1-E^0)\tan(\theta_+)+ES^0}\Big) \tag{3.9}$$

On note que pour un système vérifiant le principe du bilan détaillé, l'angle θ_- ne dépend que de l'angle θ_+ et de l'état d'équilibre et pas des valeurs propres du système. L'état d'équilibre et la dynamique d'un tel système sont caractérisés par cinq constantes cinétiques indépendantes ou, de manière équivalente, par les concentrations d'équilibre (E^0, ES^0), les deux valeurs propres (λ_+, λ_-) et un des deux angles associés aux directions propres, θ_+ par exemple. Lorsque l'on connaît l'état d'équilibre et les paramètres dynamiques d'un système, on peut en déduire la valeur des constantes cinétiques associées à ce système. L'expression des trois constantes k^0_{12}, k^0_{23} et k^0_{31} en fonction des concentrations d'équilibre, des angles définissant les directions propres et des valeurs propres est donnée dans le tableau 4.2. La valeur des trois autres constantes cinétiques est déterminée grâce aux relations de bilan détaillé $\frac{k^0_{12}}{k^0_{21}} = \frac{ES^0}{E^0}$, $\frac{k^0_{23}}{k^0_{32}} = \frac{1-E^0-ES^0}{ES^0}$ et $\frac{k^0_{31}}{k^0_{13}} = \frac{E^0}{1-E^0-ES^0}$.

2 Expression de la fonction réponse

Nous considèrons maintenant un grand nombre de réseaux enzymatiques N suivant le modèle de Michaelis-Menten à trois états et associés au même état d'équilibre $\mathcal{E}^{0R}$. On cherche, parmi la collection d'enzymes considérée, l'enzyme E^R associée à un jeu de paramètres dynamiques choisis $(\lambda^R_+, \lambda^R_-, \theta^R_+)$.

Les constantes cinétiques associées aux réseaux de catalyse enzymatique considérés sont supposées suivre le modèle d'Eyring, donné dans l'Eq. (1.7). Suivant la démarche présentée dans le chapitre précédent, on soumet chaque enzyme E à la modulation de température

k_{12}^0	$\frac{1}{\tan(\theta_-)-\tan(\theta_+)}\Big[\Big((1-E^0)\tan(\theta_+)\tan(\theta_-)+ES^0\tan(\theta_+)\Big)\lambda_+ -\Big((1-E^0)\tan(\theta_+)\tan(\theta_-)+ES^0\tan(\theta_-)\Big)\lambda_-\Big]$
k_{23}^0	$\frac{1}{\tan(\theta_-)-\tan(\theta_+)}\frac{1-E^0-ES^0}{ES^0}\Big[\Big(-E^0\tan(\theta_+)\tan(\theta_-)+ES^0\tan(\theta_+)\Big)\lambda_+ +\Big(E^0\tan(\theta_+)\tan(\theta_-)-ES^0\tan(\theta_-)\Big)\lambda_-\Big]$
k_{31}^0	$\frac{1}{\tan(\theta_-)-\tan(\theta_+)}\Big[\Big(-E^0\tan(\theta_-)+ES^0\Big)\lambda_+ + \Big(E^0\tan(\theta_+)-ES^0\Big)\lambda_-]$

TAB. II–3.2 – Expression des constantes cinétiques k_{12}^0, k_{23}^0 et k_{31}^0 en fonction des valeurs propres, des angles définissant les directions propres et des concentrations d'équilibre

suivante :

$$T = T^0 + T^0\beta\Big(\sin(|\lambda_+|t) + (\sin(|\lambda_-|t)\Big) \qquad \beta \ll 1 \tag{3.10}$$

Le développement de l'expression des constantes cinétiques au premier ordre de la perturbation est donné Eq. (1.8). L'état instantané d'un réseau catalytique est décrit par le vecteur :

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}^{0R} + \beta\mathcal{E}^1(t) = \begin{pmatrix} E(t) \\ ES(t) \end{pmatrix}. \tag{3.11}$$

L'évolution du système est gouvernée par l'équation suivante :

$$\frac{d\mathcal{E}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t)\mathcal{E}(t) + \mathbf{F}(t) \tag{3.12}$$

où $\mathbf{M}(t) = \mathbf{M}^0 + \beta\mathbf{M}^1\Big(\sin(|\lambda_+|t)+\sin(|\lambda_-|t)\Big)$ et $\mathbf{F}(t) = \mathbf{F}^0 + \beta\mathbf{F}^1\Big(\sin(|\lambda_+|t)+\sin(|\lambda_-|t)\Big)$ avec :

$$\mathbf{M}^i = \begin{pmatrix} \kappa_{1,1}^i & \kappa_{1,2}^i \\ \kappa_{2,1}^i & \kappa_{2,2}^i \end{pmatrix}, \qquad \text{pour} \qquad i = 0, 1 \tag{3.13}$$

$$\mathbf{F}^i = \begin{pmatrix} k_{31}^i \\ k_{32}^i \end{pmatrix}, \qquad \text{pour} \qquad i = 0, 1 \tag{3.14}$$

L'expression des coefficients $\kappa_{i,j}^1$ en fonction des constantes cinétiques et des énergies d'activation est donnée dans le tableau 4.1. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, les énergies d'activation associées à des réseaux de réactions biochimiques varient peu par rapport aux constantes cinétiques et on les considère comme des constantes. Dans la base des vecteurs propres de la matrice $\mathbf{M}^0$, l'état instantané du système est donné par le vecteur $\mathbf{X}(t)$:

$$\mathbf{X}(t) = \mathbf{P}^{-1}\mathcal{E}(t) = \mathbf{X}^0 + \beta\mathbf{X}^1(t) \tag{3.15}$$

α_+	$\frac{\sin(\theta_-)}{\sin(\theta_- - \theta_+)} f - \frac{\cos(\theta_-)}{\sin(\theta_- - \theta_+)} g$
α_-	$\frac{\sin(\theta_+)}{\sin(\theta_+ - \theta_-)} f - \frac{\cos(\theta_+)}{\sin(\theta_+ - \theta_-)} g$

TAB. II–3.3 – Expression des coefficients $\alpha_\pm$ en fonction des angles θ_+ et θ_- et des paramètres f et g.

Les coordonnées $X^1_\pm$ du vecteur $\mathbf{X}^1(t)$ sont associées aux équations découplées suivantes :

$$\frac{dX^1_\pm(t)}{dt} = \lambda_\pm X^1_\pm(t) + \alpha_\pm\Big(\sin(|\lambda^R_+|t) + \sin(|\lambda^R_-|t)\Big) \tag{3.16}$$

où les coefficients $\alpha_\pm$ sont les coordonnées du vecteur $\mathbf{P}^{-1}\mathbf{M}^1\mathbf{P}\mathbf{X}^0$. Leurs expressions sont données dans le tableau 4.3 et l'expression des coefficients f et g est la suivante :

$$f = E^0(-k^0_{12}\frac{\Delta_{12}H^0}{RT^0} + k^0_{13}\frac{\Delta_{31}H^0}{RT^0}) \tag{3.17}$$

$$g = E^0(k^0_{12}\frac{\Delta_{12}H^0}{RT^0} - \frac{k^0_{12}}{k^0_{21}}k^0_{23}\frac{\Delta_{23}H}{RT^0}). \tag{3.18}$$

avec $\Delta_{23}H = -\Delta_{12}H - \Delta_{31}H$. L'expression de f et g en fonction de E^0, ES^0, λ_+, λ_-, θ_+ et θ_- est aisément déduite des Eqs. (3.17, 3.18) et du tableau 4.2.
Le réseau étant à l'équilibre à la température T^0, les coefficients $\alpha_\pm$ sont des combinaisons linéaires des enthalpies standard de réaction $\frac{\Delta_{ij}H^0}{RT^0} = \epsilon_{ij} - \epsilon_{ji}$ et ils s'annulent lorsque $\epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}$. En conséquence, on retrouve que le système reste à l'équilibre si chaque pseudo-isomérisation du réseau est athermique.
On résout l'Eq. (3.16) et on trouve pour le régime permanent l'expression suivante :

$$X_\pm(t) = X^0 + \beta\Big(X^1_{\pm,\sin}(\omega = |\lambda^R_+|)\sin(\lambda^R_+ t) + X^1_{\pm,\sin}(\omega = |\lambda^R_-|)\sin(\lambda^R_- t) \tag{3.19}$$

$$+X^1_{\pm,\cos}(\omega = |\lambda^R_+|)\cos(\lambda^R_+ t) + X^1_{\pm,\sin}(\omega = |\lambda^R_-|)\cos(\lambda^R_- t)\Big) \tag{3.20}$$

avec :

$$X^1_{\pm,\sin}(\omega) = -\alpha_\pm\frac{-\lambda_\pm}{\omega^2 + \lambda^2_\pm} \tag{3.21}$$

$$X^1_{\pm,\cos}(\omega) = -\alpha_\pm\frac{\omega}{\omega^2 + \lambda^2_\pm} \tag{3.22}$$

L'expression du vecteur $\mathcal{E}(t)$ décrivant l'état instantané du système est déduite de l'expression du vecteur $\mathbf{X}$(t) en inversant l'Eq. (3.15). On obtient :

$$\mathcal{E}(t) = \mathcal{E}^{0R} + \beta\Big(\mathcal{E}^1_{\sin}(\omega = |\lambda^R_+|)\sin(\lambda^R_+ t) + \mathcal{E}^1_{\sin}(\omega = |\lambda^R_-|)\sin(\lambda^R_- t) \tag{3.23}$$

$$+\mathcal{E}^1_{\cos}(\omega = |\lambda^R_+|)\cos(\lambda^R_+ t) + \mathcal{E}^1_{\cos}(\omega = |\lambda^R_-|)\cos(\lambda^R_- t)\Big) \tag{3.24}$$

$E^1_{\sin}(\omega) = \cos(\theta_+)\frac{\alpha_+\lambda_+}{\omega^2+\lambda_+^2} + \cos(\theta_-)\frac{\alpha_-\lambda_-}{\omega^2+\lambda_-^2}$	$ES^1_{\sin}(\omega) = \sin(\theta_+)\frac{\alpha_+\lambda_+}{\omega^2+\lambda_+^2} + \sin(\theta_-)\frac{\alpha_-\lambda_-}{\omega^2+\lambda_-^2}$
$E^1_{\cos}(\omega) = \omega\Big(\cos(\theta_+)\frac{\alpha_+}{\omega^2+\lambda_+^2} + \cos(\theta_-)\frac{\alpha_-}{\omega^2+\lambda_-^2}\Big)$	$ES^1_{\cos}(\omega) = \omega\Big(\sin(\theta_+)\frac{\alpha_+}{\omega^2+\lambda_+^2} + \sin(\theta_-)\frac{\alpha_-}{\omega^2+\lambda_-^2}\Big)$

TAB. II–3.4 – Expressions des amplitudes des oscillations des concentrations, ($E^1_{sin}(\omega)$, $ES^1_{sin}(\omega)$) et ($E^1_{cos}(\omega)$, $ES^1_{sin}(\omega)$) en phase et en quadrature de phase avec la température. L'expression des coefficients $\alpha_\pm$ est donnée dans le tableau 4.3.

Les expressions des amplitudes des oscillations des concentrations, ($E^1_{sin}(\omega)$, $ES^1_{sin}(\omega)$) et ($E^1_{cos}(\omega)$, $ES^1_{sin}(\omega)$), coordonnées des vecteurs $\mathcal{E}^1_{\sin}(\omega)$ et $\mathcal{E}^1_{\cos}(\omega)$ respectivement sont données dans le tableau 4.4. En utilisant la définition de la fonction réponse R donnée dans l'Eq. (2.14) et l'expression de la matrice de passage $\mathbf{P}$ donnée dans l'Eq. (3.7), on obtient pour la fonction réponse R l'expression suivante :

$$\begin{aligned} R = &|\sin(\theta^R_-)E^1_{cos}(\omega=\lambda^R_+) - \cos(\theta^R_-)ES^1_{\cos}(\omega=\lambda^R_+)| \\ &\times|\sin(\theta^R_+)E^1_{cos}(\omega=\lambda^R_-) - \cos(\theta^R_+)ES^1_{\cos}(\omega=\lambda^R_-)| \end{aligned} \tag{3.25}$$

3 Démonstration numérique d'un maximum

Nous générons une collection de réseaux enzymatiques, vérifiant le principe de bilan détaillé et tous associés à un même état d'équilibre $\mathcal{E}^{0R} = \begin{pmatrix} E^0 \\ ES^0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.75 \\ 0.18 \end{pmatrix}$. Chaque réseau N est associé aux mêmes enthalpies de réactions : $\Delta_{12}H^0 = 5RT^0$, $\Delta_{23}H^0 = -10RT^0$, $\Delta_{31}H^0 = -\Delta_{12}H^0 - \Delta_{23}H^0$. Dans l'exemple présenté, les paramètres dynamiques résonnants sont les suivants : $\lambda^R_+ = -0.246$, $\lambda^R_- = -2.484$ et $\theta^R_+ = 2.361$ rad. La valeur de l'angle θ^R_- est imposé par le principe de bilan détaillé et vaut dans ce cas $\theta^R_- = 0.274$ rad. Afin de générer la collection de réseaux enzymatiques considérée, nous effectuons un échantillonnage uniforme en échelle logarithmique des valeurs de trois constantes cinétiques k^0_{12}, k^0_{23}, k^0_{31}, centrées sur les valeurs des trois constantes cinétiques résonnantes $k^{0R}_{12} = 10^{-2}$, $k^{0R}_{23} = 0.200$, et $k^{0R}_{31} = 1.800$ caractérisant le réseau catalytique de l'enzyme E^R. La valeur des trois autres constantes cinétiques est imposée par l'état d'équilibre et le principe du bilan détaillé. Cet échantillonage entraîne une répartition non uniforme des valeurs propres et des vecteurs propres.

Nous calculons pour chaque jeu de valeurs de paramètres généré la valeur des amplitudes des oscillations de concentration en quadrature de phase avec la température en utilisant les expressions données dans le tableau 4.4 et la valeur de la fonction résonnante grâce à l'Eq. (3.25).

La figure 4.1 représente la fonction $R(N)$ en fonction des deux valeurs propres non nulles (λ_+, λ_-) pour la collection de réseaux enzymatiques générés. Comme annoncé, la fonction présente un maximum pour $\lambda_+ = \lambda_+^R$ et $\lambda_- = \lambda_-^R$. La figure 4.1 est la projection d'une fonction de trois variables dans un espace à deux dimensions : l'ensemble des points ne définit pas une surface mais forme un nuage.
La figure 4.2 représente la fonction réponse $R(N)$ en fonction de l'angle θ_+. Nous donnons également dans la figure 4.3 la projection de la fonction $R(N)$ en fonction de l'angle θ_-.

Le maximum de la fonction est bien atteint pour $\theta_+ = \theta_+^R$ et $\theta_- = \theta_-^R$. Ces figures sont la projection d'une fonction de trois variables sur un espace à une dimension, l'ensemble des points forme donc une surface.
Afin d'évaluer l'écart entre un jeu de paramètres inconnus $(\lambda_+, \lambda_-, \theta_+)$ et le jeu de paramètres résonnants $(\lambda_+^R, \lambda_-^R, \theta_+^R)$, nous définissons une distance sous la forme :

$$d = \sqrt{\sum_{\pm} \left(\frac{\lambda_\pm - \lambda_\pm^R}{\lambda_\pm^R}\right)^2 + \left(\frac{\theta_+ - \theta_+^R}{\theta_+^R}\right)^2} \tag{3.26}$$

La figure 4.4 donne la réponse normalisée $R(N)/R(N^R)$ en fonction de la distance d. Un réseau ayant une réponse proche de la réponse du réseau résonnant, i. e. vérifiant $R(N)/R(N^R) > 1/2$ est associé à des paramètres dynamiques $(\lambda_+, \lambda_-, \theta_+)$ proches des paramètres résonnants, i. e. à une distance d inférieure à 2. Par contre cela n'implique pas nécessairement que la valeur des constantes cinétiques soient proches de la valeur des constantes cinétiques associées au réseau résonnant N^R.
En effet, deux réseaux associés à des valeurs de paramètres dynamiques proches ne sont pas nécessairement associés à des valeurs de constantes cinétiques proches. La valeur des constantes cinétiques caractérisant une enzyme E^1, incluse dans le réseau N^1 et vérifiant la condition $R(N^1)/R(N^R) > 1/2$, peut différer de plusieurs ordres de grandeurs des constantes cinétiques résonnantes caractérisant le réseau N^R. Ainsi, le tableau 4.5 donne la valeur des deux jeux de paramètres, soit les concentrations d'équilibre, les valeurs propres et les vecteurs propres, soit les constantes cinétiques, associé à un réseau N^1 et au réseau résonnant N^R. La distance entre la dynamique du réseau N^1 et du réseau résonant N^R, définie dans l'Eq. (3.26) vaut $d = 2$. Pourtant, certaines des valeurs des constantes cinétiques différent d'un facteur 40. Ce résultat avait déjà était souligné dans le chapitre précédent. Il est donc très important de choisir des paramètres adaptés à la description de la dynamique d'un réseau et à l'observable choisie.

4 Protocole expérimental

Les résultats précédents peuvent être appliqués au 'screening' i. e. à la sélection d'un réseau donné N^R associé aux paramètres $(\lambda_+^R, \lambda_-^R, \theta_+^R)$ parmi une collection d'enzymes as-

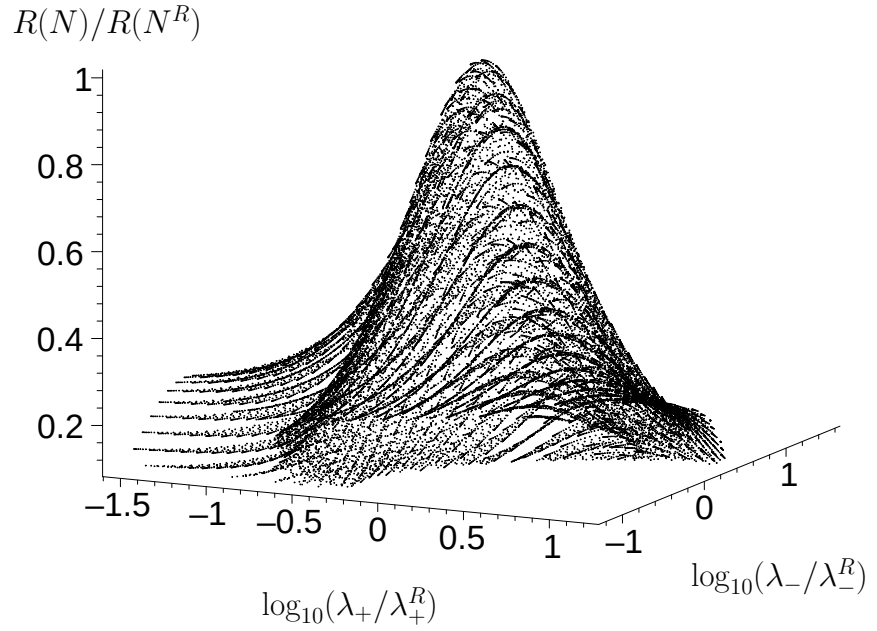


FIG. II–3.1 – Réponse normalisée $R(N)/R(N^R)$ en fonction du rapport des valeurs propres en échelle logarithmique $\log_{10}(\lambda_1/\lambda_1^R)$, $\log_{10}(\lambda_2/\lambda_2^R)$, pour des réseaux à trois espèces. La figure est construite en utilisant l'Eq. (3.25), permettant de calculer la fonction réponse, et les valeurs explicites des valeurs propres. L'ensemble des réseaux sont générés grâce à un échantillonage uniforme en échelle logarithmique des constantes cinétiques sur l'intervalle $-2 \leq \log_{10}(k_{ij}^0)/\log_{10}(k_{ij}^{0R}) \leq 2$ $(ij = 12, 23, 31)$ avec un pas de 0.1. Le réseau considéré admet l'état d'équilibre suivant : $E^{0R} = 0.75$, $ES^{0R} = 0.18$ et les enthalpies standard de réactions suivantes : $\Delta H_{12} = 5RT^0$, $\Delta H_{23} = -10RT^0$. Le réseau résonnant N^R est caractérisé par les paramètres suivants : $\lambda_+^R = -0.246$, $\lambda_-^R = -2.484$ et $\theta_+^R = 2.361$.

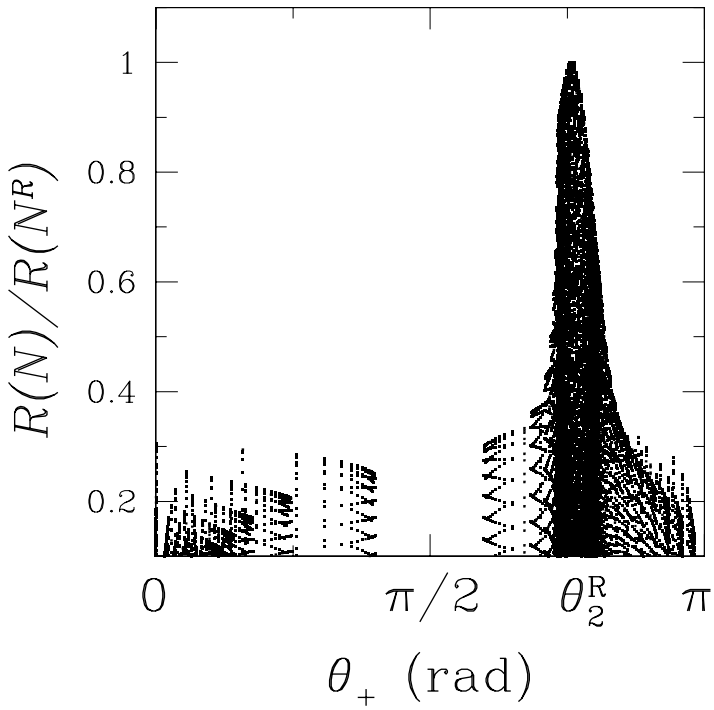


FIG. II–3.2 – Réponse normalisée $R(N)/R(N^R)$ en fonction de l'angle θ_+. Les valeurs des paramètres sont les mêmes que dans la figure 4.1.

E^{0R}	ES^{0R}	λ_+^R	λ_-^R	θ_+^R (rad)	θ_-^R (rad)
0.741	0.185	-0.246	-2.484	2.361	0.274
E^{0R}	ES^{0R}	λ_+	λ_-	θ_+ (rad)	θ_- (rad)
0.741	0.185	-0.672	-2.228	2.787	0.623
k_{12}^{0R}	k_{21}^{0R}	k_{23}^{0R}	k_{32}^{0R}	k_{31}^{0R}	k_{13}^{0R}
0.010	0.040	0.200	0.500	1.800	0.180
k_{12}^{0}	k_{21}^{0}	k_{23}^{0}	k_{32}^{0}	k_{31}^{0}	k_{13}^{0}
0.398	1.592	0.252	0.629	0.072	0.007

TAB. II–3.5 – Les quatre premières lignes donnent l'état d'équilibre et les paramètres dynamiques du réseau résonnant et d'un réseau associé à une dynamique proche ($d = 2$). La valeur des angles θ_-^R et θ_- est déduite des valeurs des autres paramètres et du bilan détaillé. Les quatre dernières lignes donnent la valeur des constantes cinétiques associées à ces deux mêmes réseaux. La distance dans l'espace des constantes cinétiques vaut $d_k = \sqrt{\left(\frac{k_{12}^0 - k_{12}^{0R}}{k_{12}^{0R}}\right)^2 + \left(\frac{k_{23}^0 - k_{23}^{0R}}{k_{23}^{0R}}\right)^2 + \left(\frac{k_{31}^0 - k_{31}^{0R}}{k_{31}^{0R}}\right)^2} = 40$.

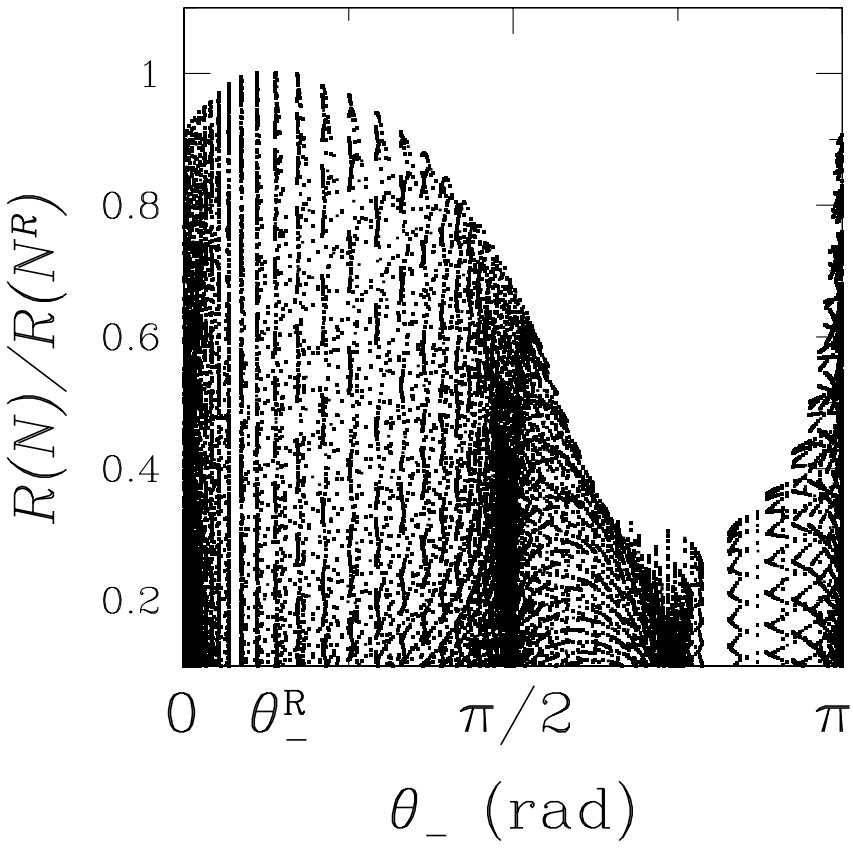


FIG. II–3.3 – Réponse normalisée $R(N)/R(N^R)$ en fonction de l'angle θ_-. Les valeurs des paramètres sont les mêmes que dans la figure 4.1.

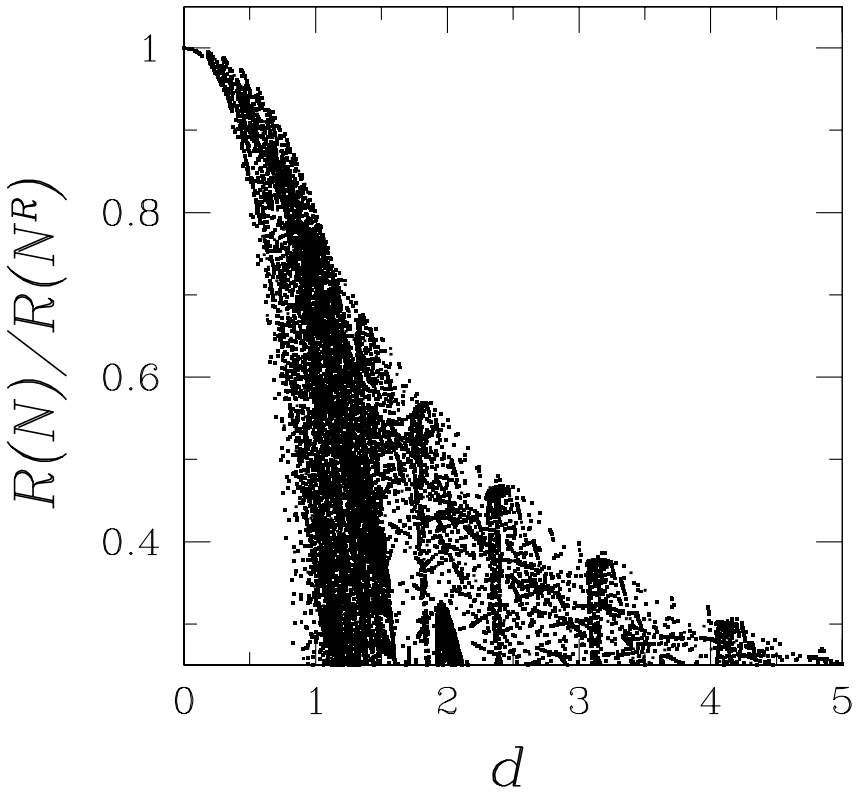


FIG. II–3.4 – Réponse normalisée $R(N)/R(N^R)$ en fonction de la distance d définie dans l'Eq. (3.26) Les valeurs des paramètres sont les mêmes que dans la figure 4.1.

sociées à des paramètres dynamiques différents et au même état d'équilibre. En l'absence du réseau recherché, la méthode proposée permet de déterminer le réseau possédant la dynamique la plus proche et d'évaluer la distance au réseau cible.

Nous proposons le protocole expérimental suivant. Nous appliquons au milieu réactionnel la modulation de température donnée dans l'Eq. (3.10). L'utilisation de cellules expérimentales de dimensions micrométriques, de hauteur de l'ordre de 50 μ m [12, 46] permet l'obtention dans le milieu d'oscillations de température à une fréquence choisie, pouvant atteindre 10^5Hz. Nous commençons par calculer la valeur $R(N^R)$ de la fonction réponse en utilisant l'Eq. (3.25), pour l'enzyme cible associée aux paramètres $(\lambda_+^R, \lambda_-^R, \theta_+^R)$. Afin de déterminer la valeur de la fonction réponse associée à un réseau inconnu, nous avons besoin de mesurer deux des trois amplitudes $E^1_{\cos}$, $ES^1_{\cos}$ et $EP^1_{\cos}$, en quadrature de phase avec la température, à chacune des deux pulsations $\omega = \lambda_+^R$ et $\omega = \lambda_-^R$. Nous suggérons de récolter deux signaux qui dépendent linéairement des concentrations $E(t)$ et $ES(t)$. Une sonde fluorescente, dont le signal est affecté par la réaction chimique, peut être liée à l'enzyme [52]. La détection de bandes infrarouges spécifiques peut aussi être envisagée [53]. Les amplitudes en quadrature de phase au premier ordre $E^1_{\cos}(\omega = \lambda_+^R)$, $E^1_{\cos}(\omega = \lambda_-^R)$, $ES^1_{\cos}(\omega = \lambda_+^R)$ et $ES^1_{\cos}(\omega = \lambda_-^R)$ sont extraites du signal global $E(t)$ et $ES(t)$ en utilisant la décomposition en série de Fourier et la transformée de Fourier. Une fois les amplitudes connues, nous calculons la valeur $R(N)$ de la fonction réponse pour ce réseau en utilisant l'Eq. (3.25). Ces étapes sont répétées pour chaque enzyme de la collection. On attribue par exemple la valeur des paramètres résonnants $(\lambda_+^R, \lambda_-^R, \theta_+^R)$ à chaque enzyme satisfaisant la condition $R(N)/R(N^R) > 1/2$.

5 Exemple d'utilisation du filtre cinétique

Nous pouvons étendre l'utilisation de la fonction réponse $R(N)$ à la caractérisation de la dynamique d'un réseau catalytique à n espèces. Nous considérons un réseau de réactions chimiques *in vitro* N^{vit}, composé de n espèces réactives, vérifiant le schéma réactionnel donné dans l'Eq. (2.1). On admet que, grâce aux techniques classiques de détermination de constantes cinétiques, les $n(n-1)$ constantes cinétiques k_{ij}^{vit} caractérisant la dynamique *in vitro* des $n(n-1)/2$ isomérisations constituant le réseau sont connues. Le réseau constitué des mêmes espèces et ayant la même topologie, mais considéré maintenant dans un milieu biologique, est noté N^{viv}. Il est associé à une dynamique inconnue que l'on cherche à déterminer. Pour cela, nous calculons la valeur, pour le réseau N^{viv}, de la fonction réponse maximum pour le réseau N^{vit}.

La connaissance des constantes cinétiques permet de calculer les valeurs propres et les angles définissant les directions propres $(\lambda_i^{vit}, \theta_{ij}^{vit})$ associées au réseau N^{vit}. Les réseaux

N^{vit} et N^{viv} sont soumis successivement à la modulation de température suivante :

$$T = T^0\Big(1 + \beta\Sigma_{i=1}^{n-1}\sin(|\lambda_i^{vit}|t)\Big) \tag{3.27}$$

Dans le cas d'un réseau constitué de n espèces, la construction de la fonction R nécessite l'observation de $(n-1)$ espèces réactives. Pour cela, on peut marquer les espèces par une sonde fluorescente dont le signal est perturbé par la réaction chimique ou observer des bandes infrarouges spécifiques. On collecte ainsi, pour chaque réseau, les $n-1$ fonctions $A_i^{vit}(t)$, respectivement $A_i^{viv}(t)$. Les amplitudes des oscillations de la concentration en quadrature de phase avec la température $A_{i,\cos}^{vit,1}(|\lambda_i^{vit}|)$ (respectivement $A_{i,\cos}^{viv,1}(|\lambda_i^{vit}|)$) à chacune des $n-1$ pulsations correspondant aux valeurs propres du réseau N^{vit} choisies sont extraites du signal global $A_i^{vit}(t)$ (respectivement $A_i^{viv}(t)$) en utilisant la décomposition en série de Fourier et la transformée de Fourier.
Les constantes cinétiques k_{ij}^{0vit} étant connues, il est possible d'écrire la matrice $\mathbf{M}^{0vit}$ définie Eq. (3.13) caractérisant la dynamique du réseau N^{vit} ainsi que l'inverse de la matrice de passage $\mathbf{P}^{-1vit}$. Nous pouvons ainsi calculer la valeur des fonctions réponses $R(N^{vit})$ $R(N^{viv})$ en utilisant la définition de la fonction R donnée Eq. (2.14) et le rapport $R(N^{viv})/R(N^{vit})$. Afin d'évaluer l'écart entre les deux jeux de paramètres $(\lambda_i^{vit}, \theta_{ij}^{vit})$ et $(\lambda_i^{viv}, \theta_{ij}^{viv})$ définissant les dynamiques des réseaux N^{vit} et N^{viv}, nous définissons une distante de même nature que la distance définie dans l'Eq. (3.26) :

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^{n-1}\Big((\frac{\lambda_i^{viv} - \lambda_i^{vit}}{\lambda_i^{vit}})^2 + \sum_{j=1}^{n-3}(\frac{\theta_{ij}^{viv} - \theta_{ij}^{vit}}{\theta_{ij}^{vit}})^2\Big)} \tag{3.28}$$

Le rapport $R(N^{viv})/R(N^{vit})$ est inférieur ou égal à 1 et tend vers 1 lorsque les deux réseaux sont caractérisés par des jeux de paramètres dynamiques de valeurs proches, i.e. pour une faible valeur de la distance d.
Dans le cas d'un réseau constitué de trois espèces réactives, $n = 3$, nous avons montré numériquement que lorsque le rapport des réponses $R(N^1)/R(N^R)$ d'un réseau de dynamique inconnue N^1 et du réseau résonnant est supérieur à $1/2$, la distance d définie Eq. (3.28) entre les paramètres dynamiques est inférieure à 2. On admet que cette relation est conservée dans le cas d'un réseau constitué de n espèces. Dans ce cas, le calcul du rapport des réponses $R(N^{viv})/R(N^{vit})$ nous permet d'évaluer la distance entre les paramètres $(\lambda_i^{vit}, \theta_{ij}^{vit})$ caractérisant la dynamique *in vitro* et les paramètres $(\lambda_i^{viv}, \theta_{ij}^{viv})$ caractérisant la dynamique *in vivo* du réseau.

6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que la méthode de détermination de paramètres dynamiques que nous proposons est particulièrement bien adaptée à la caractérisation

de réseaux enzymatiques suivant la cinétique de Michaelis-Menten. Nous avons appliqué cette méthode à des réseaux vérifiant le principe du bilan détaillé.
La démonstration du phénomène de résonance est partiellement numérique. Cependant l'expression de la fonction réponse R en fonction du jeu de paramètres choisis $(\lambda_+, \lambda_-, \theta_+, E^0, ES^0)$ et des enthalpies de réaction est connue et une démonstration analytique est actuellement en cours.

Chapitre II–4

Le déplacement hors de l'état d'équilibre fournit une signature des mécanismes

1 Introduction

Tout paramètre physique macroscopique comme la température ou la concentration d'une espèce fluctue naturellement autour d'une valeur moyenne. Ces fluctuations aléatoires peuvent dans certains cas maintenir un système réactif hors de l'état d'équilibre [54, 55, 56, 57, 58]. La possibilité de maintenir hors d'équilibre une réaction chimique unimoléculaire en imposant la modulation des précédents paramètres intéresse les chercheurs depuis plus de 20 ans. La faible oscillation de la concentration d'une espèce présente en excès, le substrat par exemple dans le cas de la catalyse enzymatique, entraîne une déviation hors de l'état d'équilibre du système au deuxième ordre de la perturbation [59, 60]. L'exemple particulier de l'effet de l'oscillation de la concentration de l'ATP (adénosine triphosphate) sur l'efficacité de pompes à protons présentes dans les membranes de cellules de levures a ainsi été prouvé [60].

D'autres travaux ont étudié l'effet de l'oscillation du potentiel électrique sur la catalyse enzymatique du type Michaelis-Menten [61, 62, 63, 64, 65]. On admet que la distribution des charges électriques portées par l'enzyme change avec sa conformation. Lorsque l'on soumet cette réaction à une oscillation de potentiel électrique, on induit un déplacement hors de l'équilibre favorisant ou défavorisant la formation du produit par rapport à l'état d'équilibre du système. Les études théoriques précédentes ont été réalisées pour des mécanismes unimoléculaires à deux, trois ou quatres états. Elles montrent que la valeur du déplacement hors de l'équilibre d'une espèce réactive dépend de la fréquence de la perturbation et mettent en évidence l'existence de fréquences caractéristiques fortement liées aux fréquences propres du réseau de réactions chimiques dans lequel est impliquée l'espèce observée.

L'enzyme (Na,K)-ATPase catalyse l'échange des ions sodium et des ions potassium à travers la membrane des globules rouges. L'action de cette enzyme peut être modélisée par un mécanisme de Michaelis-Menten à 4 états. La membrane des cellules a été soumise à un champ électrique oscillant et la variation du flux d'échange des ions en fonction de la fréquence appliquée ainsi que l'existence d'une fréquence maximisant ce flux ont été observées expérimentalement [66].
Ces travaux théoriques et expérimentaux ont mis en évidence le lien entre la dépendance en fréquence du déplacement hors de l'équilibre d'une espèce réactive et le mécanisme dans lequel elle est impliquée.
Nous nous intéressons ici au déplacement hors de l'équilibre induit par une faible oscillation de température pour un réseau de réactions chimiques unimoléculaires. Cette perturbation, contrairement à la modulation d'une concentration, est non invasive et permet d'étudier des systèmes *in vivo*. Elle est, en outre, plus facile à mettre en oeuvre expérimentalement qu'une modulation de potentiel électrique. La forme du déplacement hors de l'équilibre de la concentration d'une espèce réactive en fonction de la pulsation de la perturbation peut être considérée comme une signature du réseau de réactions dans lequel est impliquée l'espèce observée. On peut extraire de cette signature des informations sur la topologie du réseau et sur les paramètres contrôlant sa dynamique [67]. Dans ce cas, nous déterminons l'expression analytique du déplacement hors de l'équilibre pour une réaction unimoléculaire à deux états, puis à trois états. Nous généralisons les résultats obtenus pour un réseau à n espèces. Dans le dernier paragraphe, nous nous intéressons au cas particulier d'une réaction unimoléculaire à deux états avec passage par un intermédiaire réactionnel. Nous montrons que, dans ce cas, la forme du déplacement hors de l'équilibre en fonction de la pulsation de la perturbation donne également accès à l'allure du diagramme d'énergie en fonction d'une coordonnée de réaction.
Dans tout ce chapitre, nous étudions la réponse des systèmes chimiques soumis à la modulation de température donnée dans l'Eq. (1.6). Les constantes cinétiques suivent le modèle d'Eyring, décrit dans l'Eq. (1.7). Les expressions du développement limité des constantes cinétiques et des concentrations au deuxième ordre de la perturbation sont données dans les Eqs. (1.8, 1.9).

2 Réaction unimoléculaire à deux états

Nous considérons une réaction unimoléculaire à deux états :

$$\mathrm{A}_1 \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{A}_2 \tag{4.1}$$

La dynamique d'une telle réaction est gouvernée par l'équation macroscopique suivante :

$$\frac{dA_1(t)}{dt} = -k_{12}(t)A_1(t) + k_{21}(t)A_2(t) \tag{4.2}$$

La conservation de la matière impose la relation : $A_1(t) + A_2(t) = 1$. Initialement, les espèces sont à l'équilibre chimique à la température T^0 et l'expression des concentrations est la suivante :

$$A_1^0 = \frac{k_{21}^0}{k_{21}^0 + k_{12}^0}, \qquad A_2^0 = 1 - A_1^0 \tag{4.3}$$

L'équation donnée Eq. (4.2) est développée au premier ordre de la perturbation et conduit à l'équation suivante :

$$\frac{dA_1^1(t)}{dt} + (k_{12}^0 + k_{21}^0)A_1^1(t) = \frac{k_{12}^0 k_{21}^0(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})}{k_{12}^0 + k_{21}^0}\sin(\omega t) \tag{4.4}$$

Après le temps de relaxation $\tau = \frac{1}{k_{12}^0 + k_{21}^0}$ de la réaction (4.1), le système entre dans un régime sinusoidal forcé. La correction au premier ordre de la concentration de l'espèce A_1 est de la forme :

$$A_1^1(t) = A_{1,\sin}^1 \sin(\omega t) + A_{1,\cos}^1 \cos(\omega t) \tag{4.5}$$

où $A_{1,\sin}^1$ et $A_{1,\cos}^1$ sont les amplitudes des oscillations de la concentration, en phase et en quadrature de phase avec la température, qui s'écrivent de la manière suivante :

$$A_{1,\sin}^1 = \frac{k_{12}^0 k_{21}^0(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})}{(k_{12}^0 + k_{21}^0)^2 + \omega^2} \tag{4.6}$$

$$A_{1,\cos}^1 = \frac{k_{12}^0 k_{21}^0 \omega(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})}{(k_{12}^0 + k_{21}^0)\Big((k_{12}^0 + k_{21}^0)^2 + \omega^2\Big)} \tag{4.7}$$

Le développement de l'Eq. (4.2) au deuxième ordre de la perturbation conduit à l'équation différentielle suivante :

$$\begin{aligned}\frac{dA_1^2(t)}{dt} + (k_{12}^0 + k_{21}^0)A_1^2(t) &= \Big(k_{12}^0\epsilon_{12} + k_{21}^0\epsilon_{21}\Big)A_1^1(t)\sin(\omega t) \\ &\quad + \frac{k_{12}^0 k_{21}^0(\epsilon_{21}^2 - \epsilon_{12}^2)}{4(k_{12}^0 + k_{21}^0)}(1 - \cos(2\omega t))\end{aligned} \tag{4.8}$$

La solution au deuxième ordre de la perturbation s'écrit sous la forme :

$$A_1^2(t) = A_{1,cst}^2 + A_{1,\sin}^2 \sin(2\omega t) + A_{1,\cos}^2 \cos(2\omega t) \tag{4.9}$$

où le terme constant au deuxième ordre a pour expression :

$$A_{1,cst}^2 = \frac{k_{12}^0 k_{21}^0(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})(k_{12}^0\epsilon_{12} + k_{21}^0\epsilon_{21})}{2\Big((k_{12}^0 + k_{21}^0)^2 + \omega^2\Big)(k_{12}^0 + k_{21}^0)} + \frac{k_{12}^0 k_{21}^0(\epsilon_{21}^2 - \epsilon_{12}^2)}{4(k_{12}^0 + k_{21}^0)^2} \tag{4.10}$$

L'existence de ce terme prouve qu'une oscillation de température entraîne un déplacement hors de l'équilibre pour un système décrit par l'Eq. (4.1). La correction de la concentration

au second ordre $A^2_{1,cst}$ est la somme de deux contributions. Le premier terme à droite de l'égalité provient du produit de la correction au premier ordre des constantes cinétiques et de l'amplitude $A^1_{1,\sin}$ d'oscillation de la concentration en phase avec la température. Il dépend des paramètres cinétiques de la réaction étudiée $(k^0_{12}, k^0_{21}, \epsilon_{12}, \epsilon_{21})$ et de la pulsation ω. Le second terme à droite de l'égalité provient du produit des concentrations d'équilibre et du développement à l'ordre 2 des constantes cinétiques et ne dépend pas de la pulsation de la perturbation. L'expression de la correction de la valeur d'équilibre au deuxième ordre ainsi que les amplitudes d'oscillation au premier ordre s'annulent pour $\epsilon_{12} = \epsilon_{21}$. Ceci n'est vrai que parce que le système est initialement dans un état d'équilibre. Ainsi, la réaction reste à l'équilibre si elle est athermique.

Le signe du déplacement hors de l'équilibre, $A^2_{1,cst}$, est le signe de la différence d'énergies d'activation $(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})$. Une modulation de température entraîne la disparition d'une petite quantité de réactif A_1 (et donc la formation d'une petite quantité de produit A_2) dans le cas d'une réaction exothermique. On s'intéresse à la dépendance en ω du déplacement hors de l'équilibre $A^2_{1,cst}$. La figure 5.1 représente $A^2_{1,cst}$ en fonction de la pulsation ω de la perturbation pour des valeurs fixées de $(k^0_{12}, k^0_{21}, \epsilon_{12}, \epsilon_{21})$. Le signe de la dérivée de $A^2_{1,cst}(\omega)$ par rapport à ω est donné par le signe de $(\epsilon_{21} - \epsilon_{12})$. La fonction $A^2_{1,cst}(\omega)$ est donc décroissante pour des réactions exothermiques et croisssante pour les réactions endothermiques. La figure 5.1 montre l'existence d'un point d'inflexion et d'un seuil pour la pulsation :

$$\omega_s = \frac{(k^0_{12} + k^0_{21})}{\sqrt{3}} \tag{4.11}$$

La hauteur relative du saut $h = \frac{A^2_{1,cst}(\omega \to \infty) - A^2_{1,cst}(\omega \to 0)}{A^2_{1,cst}(\omega \to \infty)}$ est maximale pour des constantes cinétiques k^0_{12} et k^0_{21} du même ordre de grandeur. Dans le cas le moins favorable, pour des constantes cinétiques d'ordre de grandeur très différent, la hauteur du saut h est de l'ordre du rapport des énergies d'activation et reste donc observable. Par exemple, la réaction d'appariement de simples brins d'ADN (acide désoxyribonucléique) courts est caractérisée, à la température $T^0 = 298\text{K}$, par les paramètres suivants : $k^0_{12} = 10^5\text{M.s}^{-1}$, $k^0_{21} = 0.1\text{s}^{-1}$, $\Delta H^{\neq 0}_{12} = 8RT^0\text{J.mol}^{-1}$ et $\Delta H^{\neq 0}_{21} = 60RT^0\text{J.mol}^{-1}$ [68], ce qui conduit à une hauteur relative $h = 0.24$.

3 Réaction unimoléculaire à trois états

Dans ce paragraphe, on considère une réaction unimoléculaire à trois états :

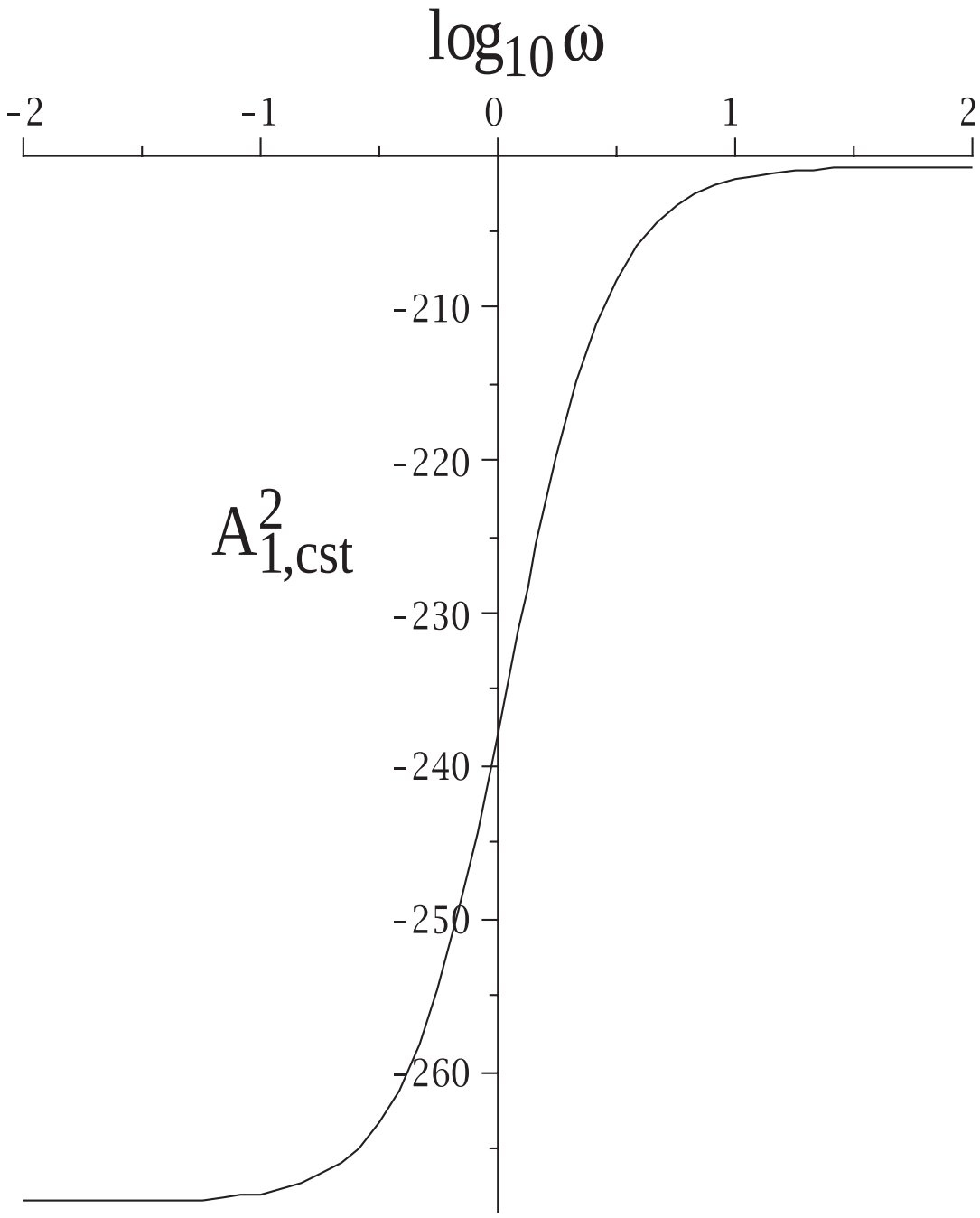
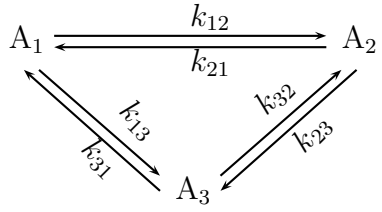


FIG. II–4.1 – Correction constante au deuxième ordre $A^2_{1,cst}$ de la concentration d'équilibre de l'espèce A_1 qui participe à une réaction unimoléculaire à deux états en fonction de $\log_{10}\omega$ pour $k^0_{12} = 0.1$, $k^0_{21} = 1$, $\epsilon_{12} = 100, \epsilon_{21} = 10$.

$\kappa^i_{1,1}$	$i=0$	$-(k^0_{12}+k^0_{13}+k^0_{31})$	$\kappa^i_{1,2}$	$i=0$	$k^0_{21}-k^0_{31}$
	$i=1$	$-(k^1_{12}+k^1_{13}+k^1_{31})$		$i=1$	$k^1_{21}-k^1_{31}$
	$i=2$	$-(k^2_{12}+k^2_{13}+k^2_{31})$		$i=2$	$k^2_{21}-k^2_{31}$
$\kappa^i_{2,1}$	$i=0$	$k^0_{12}-k^0_{32}$	$\kappa^i_{2,2}$	$i=0$	$-(k^0_{21}+k^0_{23}+k^0_{32})$
	$i=1$	$k^1_{12}-k^1_{32}$		$i=1$	$-(k^1_{21}+k^1_{23}+k^1_{32})$
	$i=2$	$k^2_{12}-k^2_{32}$		$i=2$	$-(k^2_{21}+k^2_{23}+k^2_{32})$

TAB. II–4.1 – Expression des coefficients des matrices $\mathbf{M}^i$ en fonction des constantes cinétiques et des énergies d'activation réduites $\epsilon_{ij} = \frac{\Delta_{ij}H}{RT^0}$ telles que $k^1_{ij} = k^0_{ij}(\epsilon_{ij}+1)$ et $k^2_{ij} = k^0_{ij}\epsilon^2_{ij}/4$.



Un tel système est *a priori* caractérisé par six constantes cinétiques et six énergies d'activation. En l'absence d'échanges avec l'extérieur, le système vérifie le principe de bilan détaillé et les constantes cinétiques sont liées par la relation :

$$\frac{k_{12}k_{23}k_{31}}{k_{21}k_{32}k_{31}} = 1 \tag{4.12}$$

La réaction étant cyclique, les énergies d'activation réduites vérifient : $\epsilon_{12} - \epsilon_{21} + \epsilon_{23} - \epsilon_{32} + \epsilon_{31} - \epsilon_{13} = 0$. Quand on prend en compte la relation de conservation de la matière, $A_1(t)+A_2(t)+A_3(t) = 1$, l'évolution du système est gouvernée par les équations suivantes :

$$\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} A_1(t) \\ A_2(t) \end{pmatrix} = \mathbf{M}(t)\begin{pmatrix} A_1(t) \\ A_2(t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_{31}(t) \\ k_{32}(t) \end{pmatrix} \tag{4.13}$$

avec $\mathbf{M}(t) = \mathbf{M}^0 + \beta\mathbf{M}^1 \sin\omega t + \frac{\beta^2}{2}\mathbf{M}^2[1-\cos(2\omega t)]$.
Les matrices $\mathbf{M}^i$ (i=0,1,2) sont des matrices 2x2, que l'on écrit sous la forme suivante :

$$\mathbf{M}^i = \begin{pmatrix} \kappa^i_{1,1} & \kappa^i_{1,2} \\ \kappa^i_{2,1} & \kappa^i_{2,2} \end{pmatrix}, \qquad \text{pour} \qquad i = 0,1,2. \tag{4.14}$$

L'expression des coefficients des matrices $\mathbf{M}^i$ en fonction des constantes cinétiques et des énergies d'activation est donnée dans le tableau 5.1.

Les deux valeurs propres de la matrice $\mathbf{M}^0$ sont réelles et négatives dans le cas d'une réaction vérifiant le principe du bilan détaillé [69]. Dans le cas contraire, elles peuvent

être complexes conjuguées. On traite analytiquement le premier cas. Nous rappelons les expressions des valeurs propres en fonction des paramètres de la matrice $\mathbf{M}^0$ déjà données dans l'Eq. (3.6) :

$$\lambda_\pm = \frac{\kappa^0_{1,1}+\kappa^0_{2,2}}{2} \pm \frac{1}{2}\sqrt{(\kappa^0_{1,1}+\kappa^0_{2,2})^2 - 4(\kappa^0_{1,1}\kappa^0_{2,2}-\kappa^0_{2,1}\kappa^0_{1,2})} \tag{4.15}$$

Quand les deux valeurs propres sont identiques, les deux équations qui gouvernent la dynamique de la réaction se ramènent à une équation unique. Le comportement dynamique d'un tel système est identique à celui d'une réaction unimoléculaire à deux états, cas précédemment traité. On considère donc ici le cas non dégénéré où les deux valeurs propres de la matrice $\mathbf{M}^0$ sont différentes et vérifient $\lambda_- < \lambda_+ < 0$. On introduit le paramètre :

$$r = \frac{\lambda_-}{\lambda_+} \tag{4.16}$$

Les concentrations d'équilibre à la température T^0 vérifient :

$$A^0_1 = \frac{1}{1+\frac{k^0_{12}}{k^0_{21}}+\frac{k^0_{13}}{k^0_{31}}}, \qquad A^0_2 = \frac{1}{1+\frac{k^0_{21}}{k^0_{12}}+\frac{k^0_{32}}{k^0_{23}}}, \qquad A^0_3 = 1-(A^0_1+A^0_2) \tag{4.17}$$

Au premier ordre de la perturbation, l'Eq. (4.13) conduit à l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} A^1_1(t) \\ A^1_2(t)\end{pmatrix} = \mathbf{M}^0\begin{pmatrix} A^1_1(t) \\ A^1_2(t)\end{pmatrix} + \mathbf{M}^1\begin{pmatrix} A^0_1 \\ A^0_2\end{pmatrix}\sin(\omega t) + \begin{pmatrix} k^0_{31}\epsilon_{31} \\ k^0_{32}\epsilon_{32}\end{pmatrix}\sin(\omega t) \tag{4.18}$$

Ainsi que nous l'avons signalé dans le paragraphe précédent, seuls les termes en phase avec la température contribuent au déplacement hors de l'équilibre. L'amplitude des oscillations en phase avec la température $A^1_{i,\sin}$ s'écrit sous la forme suivante :

$$A^1_{i,\sin} = \frac{a^-_{i,\sin}}{\omega^2+\lambda^2_-} + \frac{a^+_{i,\sin}}{\omega^2+\lambda^2_+},\ i=1,2 \tag{4.19}$$

L'expression des paramètres $a^-_{i,\sin}$ et $a^+_{i,\sin}$ en fonction des constantes cinétiques et des énergies d'activation est donnée dans le tableau 5.2. Les paramètres f et g sont des fonctions des énergies d'activation et s'écrivent : $f = A^0_1\kappa^1_{1,1} + A^0_2\kappa^1_{1,2} + k^0_{31}\epsilon_{31}$ et $g = A^0_1\kappa^1_{2,1} + A^0_2\kappa^1_{2,2} + k^0_{32}\epsilon_{32}$. Dans le cas d'un système vérifiant le principe du bilan détaillé, les constantes cinétiques satisfont la relation donnée Eq. (4.12) et les concentrations stationnaires A^0_i sont les concentrations d'équilibre données dans l'Eq. (4.17). On peut alors réécrire les paramètres f et g sous la forme suivante déjà établie dans les Eqs. (3.17,3.18) :

$$f = A^0_1\Big(k^0_{12}(\epsilon_{21}-\epsilon_{12}) + k^0_{13}(\epsilon_{31}-\epsilon_{13})\Big) \tag{4.20}$$

$$g = A^0_1\Big(-k^0_{12}(\epsilon_{21}-\epsilon_{12}) + \frac{k^0_{12}}{k^0_{21}}k^0_{23}(\epsilon_{32}-\epsilon_{23})\Big) \tag{4.21}$$

$a^+_{1,\sin} = \frac{1}{r^2-1}\Big((\kappa^0_{1,1} - \kappa^0_{2,2}r)f + \kappa^0_{1,2}(1+r)g\Big)$	$a^-_{1,\sin} = \frac{r}{1-r^2}\Big((r\kappa^0_{1,1} - \kappa^0_{2,2})f + \kappa^0_{1,2}(1+r)g\Big)$
$a^+_{2,\sin} = \frac{1}{r^2-1}\Big((\kappa^0_{2,2} - \kappa^0_{1,1}r)g + \kappa^0_{2,1}(1+r)f\Big)$	$a^-_{2,\sin} = \frac{r}{1-r^2}\Big((r\kappa^0_{2,2} - \kappa^0_{1,1})g + \kappa^0_{2,1}(1+r)f\Big)$
$a^+_{3,\sin} = -a^+_{1,\sin} - a^+_{2,\sin}$	$a^-_{3,\sin} = -a^-_{1,\sin} - a^-_{2,\sin}$

TAB. II–4.2 – Expression des coefficients $a^{\pm}_{i,\sin}$ introduits dans l'expression de l'amplitude $A^1_{i,\sin}$.

On retrouve le même résultat que dans le paragraphe précédent : un ensemble de réactions athermiques, tel que $\epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}$ reste à l'équilibre.
Au deuxième ordre, l'Eq. (4.13) s'écrit :

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} A^2_1(t) \\ A^2_2(t)\end{pmatrix} &= \mathbf{M}^0\begin{pmatrix} A^2_1(t) \\ A^2_2(t)\end{pmatrix} + \mathbf{M}^1\begin{pmatrix} A^1_1(t) \\ A^1_2(t)\end{pmatrix}\sin(\omega t) \\ &+ \mathbf{M}^2\begin{pmatrix} A^0_1 \\ A^0_2\end{pmatrix}\frac{1-\cos(2\omega t)}{2} + \begin{pmatrix} \frac{k^0_{31}\epsilon^2_{31}}{4} \\ \frac{k^0_{32}\epsilon^2_{32}}{4}\end{pmatrix}\frac{1-\cos(2\omega t)}{2} \qquad (4.22)\end{aligned}$$

En résolvant l'équation (4.22), on détermine l'expression du déplacement hors de l'équilibre pour chacune des espèces réactives :

$$\begin{aligned}\begin{pmatrix} A^2_{1,cst} \\ A^2_{2,cst}\end{pmatrix} &= -\frac{1}{2}(\mathbf{M}^0)^{-1}\mathbf{M}^1\begin{pmatrix} A^1_{1,\sin} \\ A^1_{2,\sin}\end{pmatrix} \\ &- \frac{1}{2}\Big((\mathbf{M}^0)^{-1}\mathbf{M}^2\begin{pmatrix} A^0_1 \\ A^0_2\end{pmatrix} + (\mathbf{M}^0)^{-1}\begin{pmatrix} \frac{k^0_{31}\epsilon^2_{31}}{4} \\ \frac{k^0_{32}\epsilon^2_{32}}{4}\end{pmatrix}\Big) \qquad (4.23)\end{aligned}$$

Comme nous l'avions précédemment remarqué pour une réaction à deux états, la correction de la concentration d'équilibre au second ordre est la somme de deux contributions. Le premier terme à droite de l'égalité dépend des propriétés dynamiques du système et de la pulsation ω de la perturbation. Le second terme est indépendant de la pulsation de la perturbation. Pour chaque espèce réactive A_i, l'expression de la déviation de la concentration d'équilibre est la somme d'un terme dépendant de la pulsation ω de la perturbation et d'un terme constant qui correspond à la valeur asymptotique du déplacement hors de l'équilibre pour $\omega \to \infty$:

$$A^2_{i,cst} = \frac{1}{2\lambda_-\lambda_+}\Big(\frac{a^-_{i,cst}}{\omega^2+\lambda^2_-} + \frac{a^+_{i,cst}}{\omega^2+\lambda^2_+}\Big) + A^2_{i,cst}(\omega\to\infty) \qquad (4.24)$$

L'expression de la valeur asymptotique $A^2_{i,cst}(\omega \to \infty)$ est donnée dans le tableau 5.3. Les coefficients $a^+_{i,cst}$ et $a^-_{i,cst}$ s'écrivent sous la forme suivante :

$$a^-_{i,cst} = -\alpha_i\frac{r(r+x_i)}{r^2-1} \qquad (4.25)$$

$A^2_{1,cst}(\omega \to \infty)$	$2A^0_1\Big(- \kappa^0_{2,2}(k^0_{12}\frac{\epsilon^2_{21}-\epsilon^2_{12}}{4} + k^0_{13}\frac{\epsilon^2_{31}-\epsilon^2_{13}}{4}) + \kappa^0_{1,2}(k^0_{12}\frac{\epsilon^2_{12}-\epsilon^2_{21}}{4} + \frac{k^0_{12}}{k^0_{21}}k^0_{23}\frac{\epsilon^2_{32}-\epsilon^2_{23}}{4})\Big)$
$A^2_{2,cst}(\omega \to \infty)$	$2A^0_2\Big(- \kappa^0_{3,3}(k^0_{23}\frac{\epsilon^2_{32}-\epsilon^2_{23}}{4} + k^0_{21}\frac{\epsilon^2_{12}-\epsilon^2_{21}}{4}) + \kappa^0_{2,3}(k^0_{23}\frac{\epsilon^2_{23}-\epsilon^2_{32}}{4} + \frac{k^0_{23}}{k^0_{32}}k^0_{31}\frac{\epsilon^2_{13}-\epsilon^2_{31}}{4})\Big)$
$A^2_{3,cst}(\omega \to \infty)$	$-(A^2_{1,cst}(\omega \to \infty) + A^2_{2,cst}(\omega \to \infty))$

TAB. II–4.3 – Valeur asymptotique du déplacement hors de l'équilibre dans la limite $\omega \to \infty$ pour chaque espèce A_i.

$u_1 = -\kappa^1_{1,1}\kappa^0_{2,2} + \kappa^1_{2,1}\kappa^0_{1,2}$	$u_2 = \kappa^1_{1,1}\kappa^0_{2,1} - \kappa^1_{2,1}\kappa^0_{1,1}$
$v_1 = -\kappa^1_{1,2}\kappa^0_{2,2} + \kappa^1_{2,2}\kappa^0_{1,2}$	$v_2 = \kappa^1_{1,2}\kappa^0_{2,1} - \kappa^1_{2,2}\kappa^0_{1,1}$

TAB. II–4.4 – Expressions des coefficients de la matrice $(\mathbf{M}^0)^{-1}\mathbf{M}^1$

$$a^+_{i,cst} \;=\; \alpha_i \frac{1 + x_i r}{r^2 - 1}. \tag{4.26}$$

L'expression des paramètres α_i et x_i en fonction des paramètres dynamiques est :

$$\alpha_i \;=\; u_i(\kappa^0_{1,1}f + \kappa^0_{1,2}g) + v_i(\kappa^0_{2,1}f + \kappa^0_{2,2}g) \tag{4.27}$$

$$x_i \;=\; \frac{1}{\alpha_i}\Big(u_i(-\kappa^0_{2,2}f + \kappa^0_{1,2}g) + v_i(-\kappa^0_{1,1}f + \kappa^0_{2,1}g)\Big) \tag{4.28}$$

les paramètres u_i et v_i pour $i = 1, 2$ sont les coefficients de la matrice $(\mathbf{M}^0)^{-1}\mathbf{M}^1$ et leurs expressions sont données dans le tableau 5.4. Les coefficients u_3 et v_3, associés à l'espèce A_3, vérifient $u_3 = -(u_1 + u_2)$ and $v_3 = -(v_1 + v_2)$.

La partie du terme constant au deuxième ordre $A^2_{i,cst}$ dépendant de la pulsation ω est la somme de deux fonctions lorentziennes en ω, elle présente donc des fréquences seuils $\omega_+ \simeq -\lambda_+/\sqrt{3}$ et $\omega_- \simeq -\lambda_-/\sqrt{3}$. L'allure complète de la courbe dépend *a priori* des six constantes cinétiques et des six énergies d'activation. Le nombre de variables est réduit à dix dans le cas d'un système vérifiant le principe du bilan détaillé.

Cependant on peut décrire l'allure du déplacement hors de l'équilibre de l'espèce A_i en fonction de ω grâce à trois paramètres de contrôle x_i, α_i et r. La courbe $A^2_{i,cst}(\omega)$ peut présenter deux allures : soit une fonction monotone avec deux seuils et trois points d'inflexion ou une fonction à extremum présentant deux points d'inflexion. Les résultats de l'étude de la première et de la deuxième dérivée de la fonction $A^2_{i,cst}(\omega)$ sont les suivants : si les

paramètres x_i et r vérifient la relation : $x_i < \frac{-1}{r+\frac{1}{r}}$, le déplacement de l'équilibre est une fonction monotone de la pulsation ω et possède deux seuils. La fonction est décroissante pour $\alpha_i < 0$ et croissante pour $\alpha_i > 0$. Pour $x_i > \frac{-1}{r+\frac{1}{r}}$, le déplacement hors de l'équilibre de l'espèce A_i en fonction de la pulsation ω possède un extremum pour la pulsation de résonance :

$$\omega_i = \sqrt{\lambda_+\lambda_-\left(x_i + \sqrt{1 + x_i(r + 1/r) + x_i^2}\right)} \tag{4.29}$$

Cet extremum est un maximum pour $\alpha_i < 0$ et un minimum pour $\alpha_i > 0$. L'allure de la courbe $A^2_{i,cst}(\omega)$ ne dépend pas de la valeur numérique du paramètre α_i, mais de son signe.

Tous ces résultats sont résumés dans la figure 5.2. Dans le cas d'une réaction unimoléculaire à trois espèces dont les constantes cinétiques et les énergies d'activation sont connues, ces résultats nous permettent de proposer un protocole expérimental pour contrôler le rendement d'une espèce donnée A_i. Le calcul des valeurs de x_i, r et α_i permet de prédire la forme du déplacement hors de l'équilibre en fonction de ω. Si les valeurs des paramètres sont compatibles avec l'existence d'un maximum, l'Eq. (4.29) donne la valeur de la pulsation de la modulation de température qui optimise le rendement de l'espèce A_i. Quand les valeurs propres sont d'ordres de grandeur différents, le maximum est mou et la fréquence de modulation peut être choisie dans une large plage de valeurs.

4 Réseau de réactions chimiques à n espèces

Les résultats précédents montrent que la dépendance en fréquence du déplacement hors de l'équilibre d'une espèce réactive, participant à un réseau de réactions chimiques linéraire est la somme de fonctions lorentziennes ayant pour point d'inflexion $\omega = \frac{-\lambda_i}{\sqrt{3}}$ où λ_i est une valeur propre de la matrice caractérisant la dynamique du réseau. Dans le cas de valeurs propres non dégénérées, le nombre de fréquences seuil relevé sur la courbe $A^2_{i,cst}(\omega)$ indique le nombre d'espèces qui constituent le réseau dans lequel est impliquée l'espèce observée. La courbe $A^2_{i,cst}(\omega)$ possède un seuil unique pour une réaction unimoléculaire à deux états, deux seuils pour une réaction unimoléculaire à trois états, $(n-1)$ seuils pour un réseau de n espèces.

Ces résultats peuvent être directement appliqués au le cas de la catalyse enzymatique. En particulier, la dépendance du déplacement hors de l'équilibre en fonction de la pulsation ω permet de faire la différence entre une cinétique de Michaelis-Menten à deux états E et ES :

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \rightleftharpoons \mathrm{ES} \rightleftharpoons \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{4.30}$$

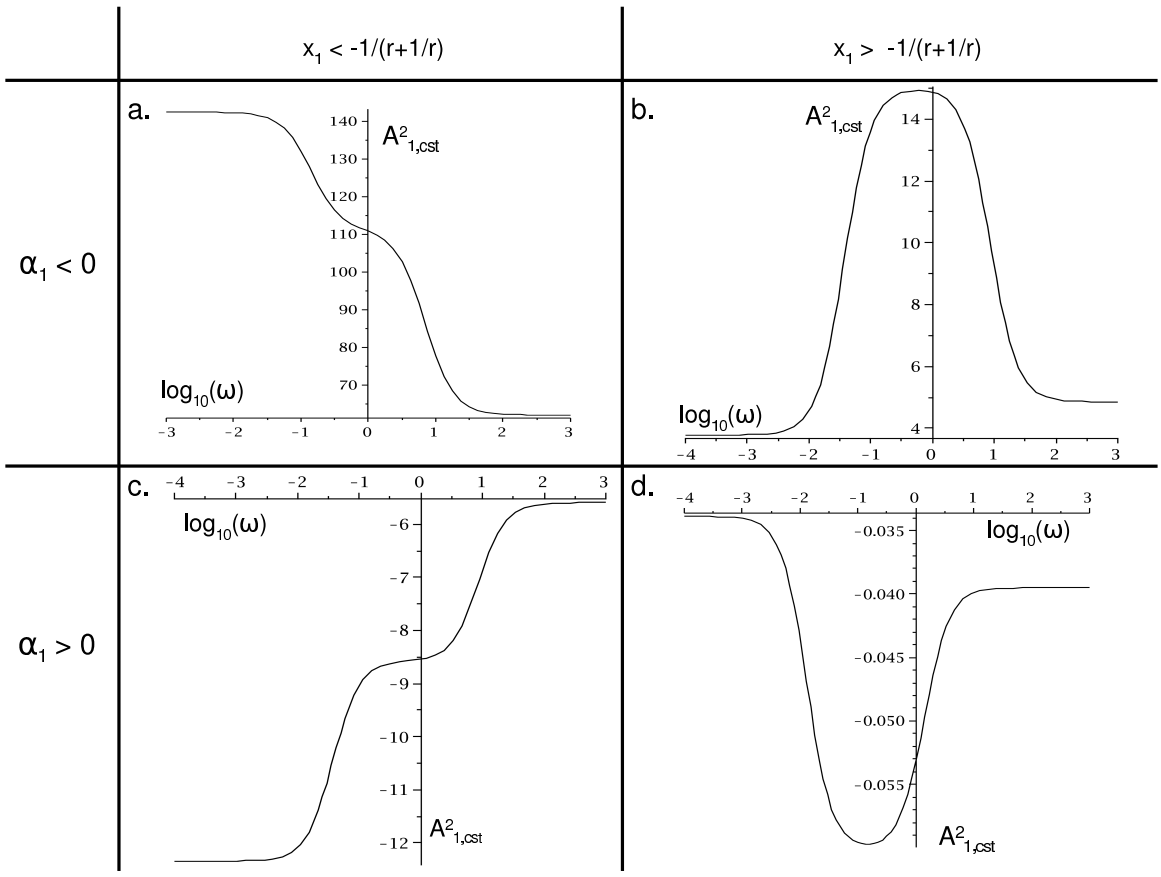


FIG. II–4.2 – Correction au second ordre $A^2_{1,cst}$ de la concentration d'équilibre de l'espèce A_1 engagée dans une réaction unimoléculaire à trois états en fonction de $\log_{10}\omega$ pour : a. $k^0_{12} = 0.5$, $k^0_{23} = 0.09$, $k^0_{31} = 0.8$, $k^0_{21} = 0.02$, $k^0_{32} = 0.03$ et $\epsilon_{12} = 100$, $\epsilon_{23} = 40$, $\epsilon_{31} = 25$, $\epsilon_{21} = 35$, $\epsilon_{32} = 80$; b. $k^0_{12} = 0.6$, $k^0_{23} = 0.01$, $k^0_{31} = 0.08$, $k^0_{21} = 0.02$, $k^0_{32} = 0.003$ et $\epsilon_{12} = 50$, $\epsilon_{23} = 150$, $\epsilon_{31} = 50$, $\epsilon_{21} = 120$, $\epsilon_{32} = 40$; c. Même valeurs des paramètres que le cas b. sauf $\epsilon_{32} = 40$; d. Même valeurs des paramètres que le cas c. sauf $k^0_{31} = 0.0008$, $k^0_{21} = 0.0002$, et $k^0_{32} = 0.0003$.

et à trois états E, ES et EP

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \rightleftharpoons \mathrm{ES} \rightleftharpoons \mathrm{EP} \rightleftharpoons \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{4.31}$$

Pour permettre sa détection, l'enzyme peut être marquée par une sonde fluorescente, par exemple. Le milieu réactionnel est soumis à une faible oscillation de température, on effectue un balayage en fréquence de la modulation et on acquiert la courbe $E^2_{cst}(\omega)$. L'existence de deux intermédiaires est simplement révélée par la présence de deux seuils sur la courbe $E^2_{cst}(\omega)$.

L'information contenue dans la dépendance en ω du déplacement hors de l'équilibre peut également être utilisée pour déterminer le nombre de sites coopératifs d'une enzyme comme par exemple l'hémoglobine [70]. La désoxy-hémoglobine E a une faible capacité à fixer l'oxygène, mais une fois la première molécule de dioxygène fixée, la forme monooxygénée EO capte plus facilement la seconde molécule pour former EO_2 qui capte encore plus facilement une troisième molécule et forme EO_3 qui capte une dernière molécule de dioxygène pour former EO_4. Dans ce cas, on détecterait quatre seuils.

La valeur des fréquences seuils donnent également accès à la valeur des valeurs propres de la matrice caractérisant la dynamique du système chimique.

Les valeurs propres de la matrice caractérisant la dynamique d'un réseau maintenu dans un état stationnaire différent de l'état d'équilibre et ne vérifiant donc pas le principe de bilan détaillé peuvent être complexes. Un couple de valeurs propres complexes, conjuguées $(\lambda_i, \overline{\lambda_i})$ n'induisent qu'un seul point d'inflexion sur la courbe $A^2_{i,cst}(\omega)$ pour la fréquence $\omega = \frac{|\lambda_i|}{\sqrt{3}}$.

5 Application à la détermination de mécanismes

Le déplacement hors de l'équilibre ne dépend pas uniquement des constantes cinétiques et de la pulsation ω mais aussi des énergies d'activation réduites ϵ_{ij}. On peut donc déduire de la forme de $A^2_{i,cst}$ des informations intéressantes sur le diagramme d'énergie en fonction des coordonnées réactionnelles.

Nous appliquons les résultats précédents au cas particulier d'une réaction unimoléculaire à deux états A_1 et A_3 possédant éventuellement un intermédiaire réactionnel A_2 :

$$\mathrm{A}_1 \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{A}_2 \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{A}_3 \tag{4.32}$$

Le diagramme d'énergie réactionnel associé à ce type de réaction est présentée figure 5.3. L'espèce A_2 est un intermédiaire réactionnel, c'est une espèce peu stable, haute en énergie. Ce système est caractérisé par quatre constantes cinétiques k^0_{12}, k^0_{23}, k^0_{21}, et k^0_{32} et

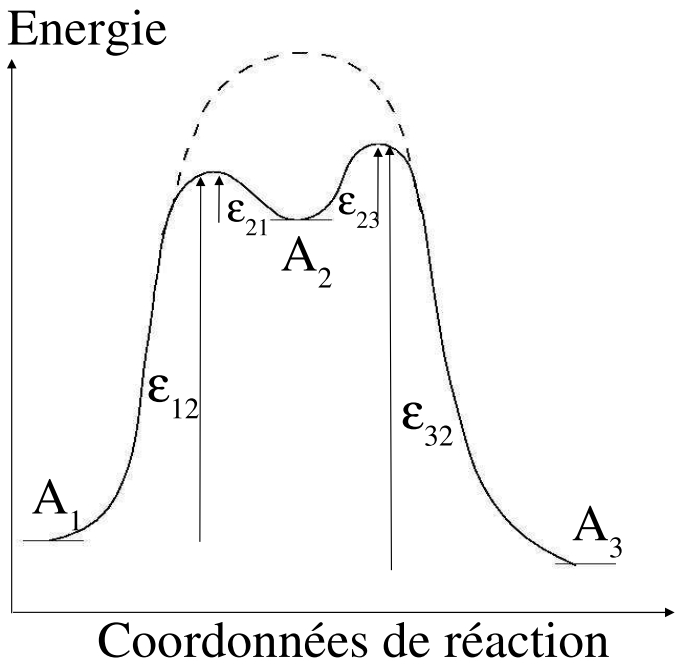


FIG. II–4.3 – Diagramme d'énergie en fonction d'une coordonnée réactionnelle dans le cas d'une réaction unimoléculaire faisant intervenir un réactif A_1 et un produit A_3 passant (ligne continue) ou ne passant pas (ligne pointillée) par un intermédiaire réactionnel A_2. Dans cet exemple, les énergies d'activation vérifient : $\epsilon_{23} > \epsilon_{21}$ et $\epsilon_{32} > \epsilon_{12}$.

quatre énergies d'activation ϵ_{12}, ϵ_{23}, ϵ_{21}, ϵ_{32}. Les constantes cinétiques k_{12}^0 et k_{32}^0 associées aux réactions de formation de l'intermédiaire réactionnel A_2 ont des valeurs beaucoup plus faibles que celles associées à sa disparition, k_{21}^0 et k_{23}^0. Au contraire, les énergies d'activation ϵ_{12} et ϵ_{32} ont des valeurs beaucoup plus grandes que ϵ_{21} et ϵ_{23}. On exprime les paramètres de contrôle r, α_1, x_1 à l'ordre dominant en fonction de deux paramètres $\delta_k = \frac{k_{i2}^0}{k_{2j}^0}$ et $\delta_\epsilon = \frac{\epsilon_{2j}}{\epsilon_{i2}}$ avec $i, j = 1, 3$ et $i \neq j$. L'expression des valeurs propres à l'ordre dominant est la suivante :

$$\lambda_+ = -\frac{k_{12}^0 k_{23}^0 + k_{21}^0 k_{32}^0}{k_{21}^0 + k_{23}^0} \tag{4.33}$$

$$\lambda_- = -(k_{21}^0 + k_{23}^0) \tag{4.34}$$

Elles sont réelles et négatives et vérifient $|\lambda_+| \ll |\lambda_-|$. Selon les Eqs. (4.16,4.33,4.34) et Eqs. (4.27,4.28), le développement limité à l'ordre dominant des trois paramètres de contrôle est :

$$r = \frac{(k_{21}^0 + k_{23}^0)^2}{k_{12}^0 k_{23}^0 + k_{21}^0 k_{32}^0} \tag{4.35}$$

$$\alpha_1 = \frac{k_{12}^0 k_{23}^0 k_{21}^0 k_{32}^0}{k_{12}^0 k_{23}^0 + k_{21}^0 k_{32}^0}(\epsilon_{23} - \epsilon_{21})(k_{21}^0 + k_{23}^0)(\epsilon_{12} k_{21}^0 + \epsilon_{32} k_{23}^0) \tag{4.36}$$

$$x_1 = \frac{(\epsilon_{12} - \epsilon_{32})(\epsilon_{12} k_{12}^0 k_{23}^0 + \epsilon_{32} k_{21}^0 k_{32}^0)}{(\epsilon_{23} - \epsilon_{21})(k_{21}^0 + k_{23}^0)(\epsilon_{12} k_{21}^0 + \epsilon_{32} k_{23}^0)} \tag{4.37}$$

Le signe de α_1 est donné par le signe de la différence des énergies d'activation $(\epsilon_{23} - \epsilon_{21})$. On considère la variation du déplacement hors de l'équilibre de l'espèce A_1 entre $\omega \to 0$ et $\omega \to \infty$, et on définit la hauteur h_1 de la manière suivante :

$$h_1 = A_{1,cst}^2(\omega \to \infty) - A_{1,cst}^2(\omega \to 0) = \frac{-\alpha_1 x_1}{2\lambda_+^2} \tag{4.38}$$

En utilisant les Eqs. (4.36,4.37), on montre que le signe de h_1 est simplement donné par le signe de $(\epsilon_{32} - \epsilon_{12})$. Les techniques classiques de thermodynamique permettent de déterminer l'enthalpie de réaction d'une réaction inconnue mais ne donnent pas d'informations sur la partie intermédiaire du diagramme. Les résultats précédents nous permettent de proposer un protocole expérimental permettant de déterminer l'existence d'un intermédiaire réactionnel entre un réactif et un produit. Ce protocole peut être réalisé sans aucune connaissance des valeurs des paramètres dynamiques de la réaction.

Pour cela, on soumet le milieu réactionnel à une modulation de température de faible amplitude et on effectue un balayage en fréquence. La forme de la dépendance en ω de la correction constante du deuxième ordre révèle les informations principales de la dynamique du système. En effet, la forme de la courbe est directement reliée au nombre d'espèces participant au réseau de réactions : si $A_{1,cst}^2$ présente un saut unique, le mécanisme n'inclut que deux espèces et le passage du réactif au produit est direct. S'il y a deux

sauts, alors le mécanisme compte trois espèces, cela prouve le passage par un intermédiare réactionnel. Les deux fréquences de coupure donnent accès aux valeurs propres de la matrice décrivant la dynamique du réseau. De plus, l'allure de la courbe $A^2_{1,cst}$ en fonction de la pulsation ω donne le signe de h_1 et permet de déduire le signe de α_1. Si la courbe est décroissante ou présente un maximum, α_1 est positif. Si, au contraire, elle est croissante ou possède un minimum alors α_1 est négatif. Comme le montrent les Eqs. (4.36,4.38), les signes de α_1 et h_1 sont directement reliés aux signes des différences d'énergies d'activation $(\epsilon_{23} - \epsilon_{21})$ et $(\epsilon_{32} - \epsilon_{12})$. En conséquence, l'allure de la courbe $A^2_{1,cst}(\omega)$ donne accès à l'allure du diagramme d'énergie en fonction d'une coordonnée réactionnelle. Cela permet de classer les valeurs de certaines énergies d'activation et en particulier les deux faibles barrières qui entourent l'intermédiaire réactionnel. Les quatres cas possibles sont résumés dans la figure 5.4.

6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons déterminé l'expression analytique du déplacement hors de l'équilibre induit par une faible modulation de température pour une réaction unimoléculaire à deux ou trois espèces. Le modèle étudié s'applique à la catalyse enzymatique obéissant à la cinétique de Michaelis-Menten. Nous avons caractérisé la dépendance en fréquence du déplacement hors de l'équilibre et avons déterminé des conditions permettant de maximiser le rendement d'une réaction. Pour $n = 3$, nous avons donné l'expression analytique de la fréquence de résonance associée au maximum de déviation hors de l'équilibre. Nous avons montré que l'on peut déduire de l'allure du déplacement hors de l'équilibre en fonction de la pulsation ω le nombre d'espèces constituant le réseau dans lequel l'espèce observée est impliquée.

De plus, étudier la réponse à une oscillation de température présente l'avantage d'introduire les énergies d'activation dans l'expression du déplacement hors de l'équilibre. Dans le cas d'une isomérisation passant par un intermédiaire réactionnel, l'allure du déplacement hors de l'équilibre du réactif ou du produit, en fonction de la pulsation de la perturbation, donne accès à l'allure du diagramme d'énergie réactionnel. Une faible modulation de température peut donc être envisagée pour étudier les propriétés dynamiques des systèmes biochimiques *in vivo*.

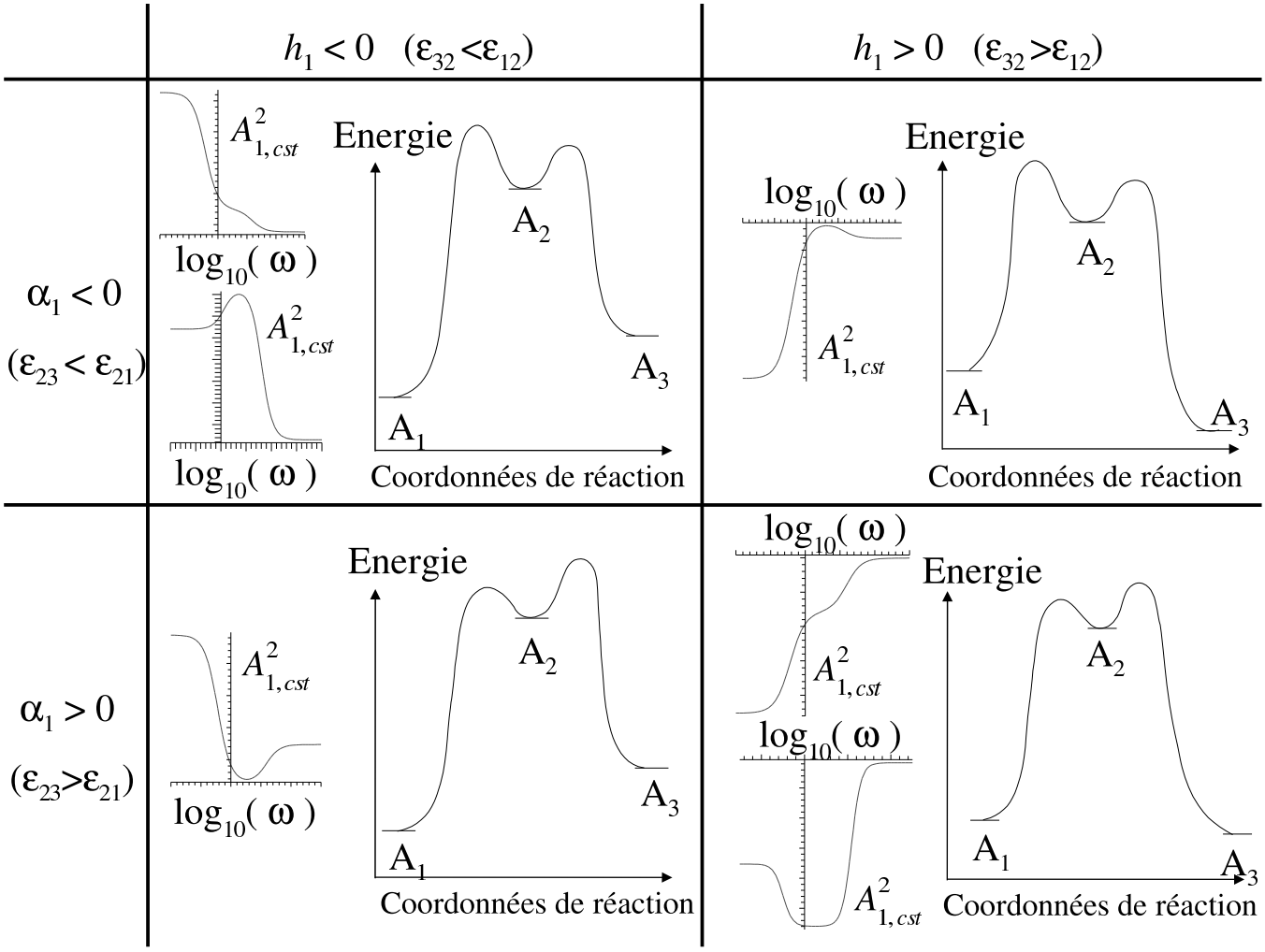


FIG. II–4.4 – Les différentes allures possibles du déplacement hors de l'équilibre $A^2_{1,cst}$ en fonction de la pulsation ω de la perturbation pour l'espèce A_1 et le diagramme d'énergie en fonction d'une coordonnée réactionnelle correspondant, dans le cas d'une réaction unimoléculaire à trois états, un réactif A_1, un produit A_3 et un intermédiaire réactionnel A_2.

Troisième partie

Extraction de molécules sous contrôle cinétique

Chapitre III–1

Description de méthodes existantes

1 Introduction

La séparation est une étape clé en chimie. En effet, la plupart des synthèses et des procédés d'extraction d'espèces naturelles conduisent à des mélanges. Les techniques de séparation font généralement appel à la mise en mouvement des espèces à séparer. La séparation consiste en une redistribution spatiale, sous l'action d'une force extérieure, des espèces initialement mélangées. Les techniques classiques [71] séparent les espèces selon leurs propriétés physiques (taille, forme, charge électrique) ou selon des critères thermodynamiques lorsque la méthode de séparation fait intervenir une réaction chimique au sens large (échange entre phase, adsorption, complexation...).
Il peut également être intéressant d'extraire d'un mélange une molécule réactive caractérisée par ses propriétés dynamiques, i. e. par l'ensemble des constantes cinétiques associées à une réaction d'intéret. Nous considérons, par exemple, la réaction suivante :

$$\mathrm{ssADN}_\ell + \mathrm{ssADN} \underset{k_{-\ell}}{\overset{k_{+\ell}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{dsADN}_\ell \tag{1.1}$$

La réaction (1.1) décrit l'hybridation d'un ensemble ssADN_ℓ de simples brins d'ADN (acide désoxyribonucléique) de séquences variées avec un simple brin cible d'ADN, ssADN, de séquence donnée, pour former un ensemble double brin d'ADN, dsADN_ℓ. La valeur des constantes cinétiques d'appariement et de désappariement $(k_{+\ell}, k_{-\ell})$ dépend de la complémentarité des séquences des brins ssADN_ℓ avec le brin ssADN [72]. On cherche à extraire d'un tel mélange un brin ssADN^R de séquence choisie associé à des constantes cinétiques (k_+^R, k_-^R) de valeur connue. L'espèce à extraire est ainsi caractérisée par deux paramètres, au lieu d'un seul dans les techniques classiques ce qui permet, en principe, une meilleure sélectivité.
Plusieurs méthodes théoriques de séparation sur critères cinétiques, présentant une bonne sélectivité et dont la mise en oeuvre expérimentale est envisageable, ont été développées

au sein de l'équipe. Dans ce chapitre, nous rappelons brièvement le principe de deux méthodes. La première est fondée sur l'optimisation d'un phénomène de dispersion provenant du couplage entre réaction chimique et champ électrique oscillant [7, 73, 74, 75, 76, 77, 78]. Cette méthode a été validée expérimentalement [9]. La seconde méthode est l'application simultanée d'une faible modulation de température et d'un champ électrique oscillant qui induit un mouvement orienté de vitesse v.

2 Modèle

Nous considérons un mélange d'espèces réactives A_ℓ qui réagissent toutes avec une même espèce cible B, pour donner un mélange d'espèce C_ℓ selon la réaction suivante :

$$\mathrm{A}_\ell + \mathrm{B} \quad \underset{k_{2\ell}}{\overset{k_{1\ell}}{\rightleftharpoons}} \quad \mathrm{C}_\ell \tag{1.2}$$

Les couples d'espèces réactives (A_ℓ, C_ℓ) ne diffèrent les uns des autres que par les valeurs des constantes cinétiques ($k_{1\ell}$,$k_{2\ell}$). Les espèces A_ℓ et C_ℓ sont chargées et l'espèce cible B est neutre. Par la suite, on omet l'indice ℓ et on caractérise un couple (A,C) par le jeu de constantes cinétiques (k_1, k_2).

Le but est d'extraire sélectivement du milieu un couple réactif donné (A^R,C^R) associé à des constantes cinétiques choisies (k_1^R,k_2^R). Pour cela, on soumet le milieu à un champ éléctrique E adapté. On considère un système de réaction-diffusion à une dimension. L'espèce B est introduite en excès et sa concentration B est considérée comme constante. On adopte une description macroscopique du système, les concentrations $A(x,t)$ et $C(x,t)$ des espèces A et C vérifent les équations suivantes :

$$\frac{\partial A(x,t)}{\partial t} = -k_1 B A(x,t) + k_2 C(x,t) + D_A \frac{\partial^2 A(x,t)}{\partial x^2} + \mu_A \frac{\partial E A(x,t)}{\partial x} \tag{1.3}$$

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = k_1 B A(x,t) - k_2 C(x,t) + D_C \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} + \mu_C \frac{\partial E C(x,t)}{\partial x} \tag{1.4}$$

où t est le temps et x la coordonnée spatiale, μ_A et μ_C les mobilités respectives de A et C, D_A et D_C les coefficients de diffusion respectifs de A et C. Le membre de droite des Eqs. (1.3,1.4) comporte quatres termes. Les deux premiers rendent compte de la réaction chimique, le troisième de la diffusion brownienne et le quatrième de la migration électrophorétique induite par le champ électrique.

Nous introduisons deux grandeurs permettant de caractériser le profil de concentration d'un couple (A,C) donné, la position moyenne $\overline{x}(t)$ et la variance $\sigma^2(t)$:

$$\overline{x}(t) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} x(A(x,t)+C(x,t))dx}{\int_{-\infty}^{\infty}(A(x,t)+C(x,t))dx} \tag{1.5}$$

$$\sigma^2(t) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty}(x-\overline{x}(t))^2(A(x,t)+C(x,t))dx}{\int_{-\infty}^{\infty}(A(x,t)+C(x,t))dx} \tag{1.6}$$

On détermine l'expression analytique du coefficient de dispersion D_{disp} pour la première méthode, et de la vitesse v pour la seconde. On déduit de ces expressions les conditions de résonance caractérisant le couple que l'on va extraire du milieu.

3 Phénomène de dispersion et séparation sur critères cinétiques

Nous soumettons une réaction de type (1.2) à un champ électrique créneau $E(t)$ périodique de période T.

$$\begin{aligned} E(t) &= a \qquad nT \leq t < (n+1/2)T \qquad \text{avec} \qquad n \qquad \text{entier} \\ E(t) &= -a \qquad (n+1/2)T \leq t < (n+1)T \end{aligned} \tag{1.7}$$

Le mélange des couples réactifs (A,C) est introduit en $x = 0$ à l'équilibre. Après un régime transitoire et si on néglige les oscillations, le mouvement des espèces A et C est diffusif et la variance des profils de concentrations $A(x,t)$ et $C(x,t)$ est de la forme :

$$\sigma_A^2(t) = \sigma_C^2(t) = 2D_{eff}t. \tag{1.8}$$

où D_{eff} est le coefficient de diffusion effectif associé au couple (A,C). La position moyenne $\overline{x}(t)$ de la distribution de concentration du couple (A,C) est nulle. Le champ électrique oscille symétriquement autour de zéro et n'induit pas de mouvement orienté. En multipliant les Eqs. (1.3,1.4) par x^2, en les sommant, les intégrant et en utilisant l'expression de $\sigma_C^2(t)$ donnée dans l'Eq. (1.8) on détermine l'expression analytique du coefficient de diffusion effectif, $D_{eff} = D_{diff} + D_{disp}$ [7], avec :

$$D_{diff} = \frac{k_2}{k_1B + k_2}D_A + \frac{k_1B}{k_1B + k_2}D_C \tag{1.9}$$

et

$$D_{disp} = a^2(\mu_A - \mu_C)^2 \frac{k_1k_2B}{(k_1B + k_2)^3}\Big(1 - \frac{4}{k_1B + k_2}\frac{1 - \exp(-(k_1B + k_2)T/2)}{1 + \exp(-(k_1B + k_2)T/2)}\Big) \tag{1.10}$$

D_{disp} est une fonction symétrique de (k_1B, k_2) et est maximum pour :

$$k_1^RB = k_2^R \approx 3,312/T \tag{1.11}$$

Le coefficient 3,312 est proche de π, coefficient obtenu dans le cas de l'application d'un champ électrique sinusoïdal. Le terme D_{disp} est proportionnel au carré de l'amplitude a du champ électrique $E(t)$. Pour des champs suffisamment forts, le coefficient de diffusion D_{diff} est négligeable devant le coefficient de dispersion D_{disp}. Lorsque l'on est dans ce cas, l'élargissement du profil de concentration du couple (A^R,C^R), associé aux constantes

cinétiques (k_1^R, k_2^R) définies dans l'Eq. (1.11) est supérieur à l'élargissement du profil de concentration de tout autre couple. Les pics de concentration ne se déplaçant pas en moyenne, on peut extraire ce couple du mélange en collectant les ailes du pic de concentration.

Ce principe a été validé expérimentalement dans le cas d'un mélange de deux colorants diazoïques chargés C_1 et C_2 complexés par l'α-cyclodextrine neutre, notée α. Les constantes cinétiques associées à la complexation de C_1 (respectivement C_2) sont [9, 10] : $k_1^1 = 2.1$ $s^{-1}.mol^{-1}$,$k_2^1 = 6.3.10^{-3} s^{-1}$ (respectivement $k_1^2 = 1.10^2$ $s^{-1}.mol^{-1}$,$k_2^1 = 0.1$ s^{-1}). Le dispositif de séparation est une cellule d'électrophorèse composée de deux réservoirs contenant l'α-cyclodextrine à la concentration $[\alpha]$ désirée et contenant chacun une électrode permettant l'application du champ électrique. Ces deux réservoirs sont reliés par un capillaire de section carrée de 1mm. Un mélange de colorants (C_1,C_2) est introduits au centre du capillaire. Le champ électrique appliqué a une amplitude de $3000 V.m^{-1}$ afin que les systèmes chimiques soient sous le régime dispersif.

Pour extraire le colorant C_1, (respectivement C_2) on fixe $[\alpha]^1$=3mmol (respectivement $[\alpha]^2$=1mmol) et la période du champ électrique T^1 =510 s (respectivement T^2=31 s). Le rapport des coefficients de dispersion vaut alors $\frac{D^1_{disp}}{D^2_{disp}} = 9$ (respectivement $\frac{D^2_{disp}}{D^1_{disp}} = 3$).

Cette méthode de séparation, fondée sur l'optimisation d'un phénomène de dispersion, n'est pas associée à un mouvement orienté des espèces réactives. Le centre de la distribution de concentration ne peut donc pas être extrait. Une méthode fondée sur un mouvement orienté est *a priori* plus efficace.

4 Double modulation et mouvement orienté

On considère le même mélange de couples (A,C) participant à la réaction (1.2), la concentration B de l'espèce neutre B étant maintenue constante dans tout le milieu. Les concentrations $A(x,t)$ et $C(x,t)$ des espèces A et C vérifient les Eqs. (1.3,1.4). Les différents couples du mélange sont introduits à l'équilibre, en $x = 0$.

On soumet le milieu à un champ électrique oscillant $E(t)$ de valeur moyenne nulle, d'amplitude a et de pulsation ω :

$$E(t) = a\cos(\omega t) \tag{1.12}$$

On impose également dans le milieu une faible modulation de température T autour de la température T^0 à la pulsation ω et déphasée de $\pi/2$ par rapport au champ électrique :

$$T = T^0(1 + \beta\sin(\omega t)) \qquad \beta \ll 1 \tag{1.13}$$

On considère que les constantes cinétiques suivent le modèle d'Eyring introduit dans le chapitre 2, Eq. (**??**). On retrouve que l'expression des constantes cinétiques au premier

ordre en β est la suivante :

$$k_i = k_i^0 + \beta\epsilon_i k_i^0 \sin(\omega t) \tag{1.14}$$

avec $\epsilon_i = \frac{\Delta_{ij}H^{\neq 0}}{RT^0} + 1$ où $\Delta_{ij}H^{\neq 0}$ est l'enthalpie standard d'activation et R la constante des gaz parfaits.

En multipliant les Eqs. (1.3, 1.4) par x, et en les sommant on obtient une équation différentielle pour la position moyenne $\overline{x}$ du couple (A,C) :

$$\frac{d\overline{x}}{dt} = -E(t)\Big((\mu_A - \mu_C)I(t) + \mu_C\Big) \tag{1.15}$$

où $I(t) = \int_{-\infty}^{\infty} A(x,t)dx$ est la quantité d'espèce A dans le milieu à l'instant t. La conservation de la matière impose la relation $1 - I(t) = \int_{-\infty}^{\infty} C(x,t)dx$. L'expression analytique de $I(t)$ est obtenue en intégrant l'Eq. (1.3) sur x. Négligeant le régime transitoire, on obtient :

$$\begin{aligned} I(t) &= \frac{k_2^0}{k_1^0 B + k_2^0} + \beta\frac{k_1^0 B k_2^0(\epsilon_1 - \epsilon_2)}{(k_1^0 B + k_2^0)^2}\Big(\cos(\omega t)\frac{\omega(k_1^0 B + k_2^0)}{\omega^2 + (k_1^0 B + k_2^0)^2} \\ &+ \sin(\omega t)\frac{(k_1^0 B + k_2^0)^2}{\omega^2 + (k_1^0 B + k_2^0)^2}\Big) \end{aligned} \tag{1.16}$$

La quantité totale $I(t)$ d'espèce A est la somme de la concentration d'équilibre et de deux termes d'ordre 1 en β, oscillant en phase et quadrature de phase avec la température. Les termes d'ordre 1 s'annulent pour $\epsilon_1 = \epsilon_2$. Comme prévu, les concentrations de A et C restent à leurs valeurs d'équilibre lorsque la réaction (1.2) est athermique. On déduit l'expression de $\overline{x}$ de l'Eq. (1.15) :

$$\begin{aligned} \overline{x}(t) &= -a\frac{k_2^0\mu_A + k_1^0 B\mu_C}{\omega(k_2^0 + k_1^0 B)}\sin(\omega t) \\ &\quad +\beta\frac{a(\mu_A - \mu_C)(\epsilon_1 - \epsilon_2)k_1^0 k_2^0 B}{2(k_1^0 B + k_2^0)}\frac{\omega}{\omega^2 + (k_1^0 B + k_2^0)^2}t \end{aligned} \tag{1.17}$$

La position moyenne du couple (A,C) est la somme d'un terme à l'ordre zéro en β associé à la position moyenne de la population à l'équilibre qui oscille autour de la position $x = 0$ en quadrature de phase avec le champ électrique et un terme d'ordre 1 en β, fonction affine de t. Le couplage de l'oscillation du champ électrique et de la température induit un mouvement orienté [8]. La vitesse $v = \frac{\overline{x}}{t}$ du mouvement orienté est la suivante :

$$v = \beta\frac{a(\mu_A - \mu_C)(\epsilon_1 - \epsilon_2)k_1^0 k_2^0 B}{2(k_1^0 B + k_2^0)}\frac{\omega}{\omega^2 + (k_1^0 B + k_2^0)^2} \tag{1.18}$$

La vitesse est une fonction symétrique de $(k_1^0 B, k_2)$. Elle est maximum pour :

$$\omega^R = 2k_1^{0R} B = 2k_2^{0R} \tag{1.19}$$

Le profil de concentration du couple réactif (A^R,C^R) associé aux constantes cinétiques (k_1^R, k_2^R) vérifiant l'Eq. (1.19) se déplace avec une vitesse maximale et peut être ainsi extrait du mélange.

5 Conclusion

Nous avons rappelé brièvement les principes théoriques de deux méthodes précédemment développées dans l'équipe permettant une séparation d'espèces réactives sur critères cinétiques, la première fondée sur un phénomène de dispersion et la seconde sur la création d'un mouvement orienté induit par une double modulation de champs. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à une autre méthode classique de conversion de l'énergie chimique en mouvement orienté, fondée sur le principe des moteurs moléculaires. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette méthode peut être utilisée pour extraire une espèce réactive sur critères cinétiques.

Chapitre III–2

Mouvement orienté dans un potentiel asymétrique et séparation de molécules réactives

1 Introduction

Les fluctuations thermiques entraînent un mouvement aléatoire des particules en solution et donnent naissance au mouvement brownien. Les particules browniennes peuvent acquérir un mouvement orienté lorsqu'on les soumet à un potentiel périodique et asymétrique spatialement et ceci même si la force moyenne appliquée est nulle. Ce phénomène, généralement connu sous le nom de Brownian ratchet (moteur brownien) présente un grand intérêt, théorique et expérimental, et a été abondemment traité à la fois en physique et en technologie.

La plupart des études concernent des systèmes unidimensionnels dans lesquels les particules browniennes sont soumises à un potentiel en dents de scie périodiquement éteint [79]. Quand le potentiel est appliqué, les particules sont drainées jusqu'au minimum du potentiel, alors qu'elles diffusent librement lorsqu'il est éteint. Le potentiel étant asymétrique, un mouvement orienté apparaît. Un tel potentiel peut être créé par une distribution périodique et asymétrique de microélectrodes [80, 81].

Les fluctuations générées par une réaction chimique hors de son état d'équilibre peuvent biaiser le mouvement brownien d'une espèce réactive, lorsque celle-ci se trouve dans un milieu anisotrope. Ce phénomène permet d'utiliser l'énergie chimique pour mettre en mouvement des espèces réactives et peut être utilisé à des fins variées, notamment la conception de moteurs moléculaires, de pompes et la séparation de molécules [82].

Ainsi, une méthode de séparation sur critères cinétiques fondée sur le couplage entre une réaction chimique et un potentiel électrique asymétrique en dents de scie a été développée dans l'équipe. Pour obtenir un mouvement orienté permanent, le milieu doit être maintenu hors d'équilibre en maintenant la concentration d'une espèce constante et uniforme.

Cependant, cette condition est difficile à réaliser expérimentalement. Nous proposons d'exploiter un état transitoire hors d'équilibre du milieu, renouvelé grâce à un arrêt périodique du potentiel asymétrique. Cela permettrait une validation expérimentale plus simple.
Dans le premier paragraphe, nous rappelons le principe de séparation dans un potentiel électrique permanent. Puis nous décrivons un protocole théorique avec arrêt périodique du potentiel que nous validons ensuite numériquement.

2 Séparation en présence d'un potentiel permanent

Nous considérons un mélange d'espèces réactives A_ℓ qui réagissent toutes avec une même espèce cible B, pour donner un mélange d'espèces C_ℓ selon la réaction suivante :

$$A_\ell + B \underset{k_{2\ell}}{\overset{k_{1\ell}}{\rightleftharpoons}} C_\ell \tag{2.1}$$

Les couples d'espèces réactives (A_ℓ, C_ℓ) ne diffèrent les uns des autres que par les valeurs des constantes cinétiques ($k_{1\ell}$,$k_{2\ell}$). Les espèces A_ℓ, C_ℓ et B sont supposées avoir le même coefficient de diffusion D. Les réactifs A_ℓ sont chargés, de charge $|z_A|$ et de mobilité μ, l'espèce cible B porte la charge $|z_B|$ et a une mobilité μ, les produits C_ℓ sont neutres. La condition d'électroneutralité impose la relation suivante $z_A = -z_B$. Notre but est d'extraire sélectivement du milieu un couple réactif donné (A,C) associé à des constantes cinétiques choisies (k_1,k_2).
Nous nous intéressons ici à une méthode de séparation, fondée sur le principe des moteurs moléculaires [83, 82]. On considère un milieu unidimensionnel contenant l'espèce B à une concentration uniforme B. On introduit le mélange des couples réactifs (A_ℓ, C_ℓ) en un point. L'application dans le milieu d'un potentiel électrique en dents de scie crée un mouvement orienté permanent, à condition que le système soit maintenu hors d'équilibre en maintenant la concentration de l'espèce B constante [6].
Le potentiel en dents de scie considéré décroît sur une longueur x_1 et croît sur une longueur x_2 avec $x_1 > x_2$. La barrière du potentiel a une hauteur $\Delta\psi$. Lorsque le couple réactif (A,C) est sous forme chargée A, il subit l'action du potentiel et est drainé jusqu'aux maxima de $\psi_1(x)$. Lorsqu'il est sous forme neutre C, il ne subit pas le potentiel électrique, son mouvement est diffusif et le couple peut ainsi franchir la barrière de potentiel. Le potentiel étant asymétrique, un mouvement orienté apparaît. Le mouvement est permanent si le milieu est maintenu hors d'équilibre. La hauteur de la barrière de potentiel $\Delta\psi$ doit vérifier la relation suivante :

$$\Delta\psi \gg \frac{2D}{\mu} \tag{2.2}$$

pour empêcher que la diffusion ne contrôle le mouvement de l'espèce A [6].
La vitesse d'un couple dépend de la valeur de ses constantes cinétiques (k_1,k_2) et est maximale pour un couple donné que l'on pourra extraire du mélange . Le couple (A^B,C^B) associé à la vitesse résonnante est caractérisé par les constantes cinétiques suivantes :

$$k_1^B B = \kappa_1^B = \frac{\mu \Delta \psi}{x_1^2} \tag{2.3}$$

$$k_2^B = \frac{4D\ln(2)}{x_2^2} \tag{2.4}$$

L'exposant B indique que ces relations sont obtenues dans le cas ou l'espèce B est maintenue à concentration constante B . La première condition de résonance, donnée dans l'Eq. (2.3), traduit le fait que la durée de vie moyenne de l'espèce résonnate A^B, $\tau_{A^B} = 1/\kappa_1^B$, correspond au temps de la migration électrophorétique sur la longueur x_1. La seconde condition de résonance, donnée dans l'Eq. (2.4), traduit le fait que la durée de vie moyenne de l'espèce neutre résonnante C^B, $\tau_{C^B} = 1/k_2^B$, correspond à la durée nécessaire pour qu'un profil de diffusion, initiallement sous la forme d'un pic de Dirac $\delta(x)$, atteigne une largeur x_2.
Si la concentration de l'espèce cible B n'est pas maintenue constante dans le milieu, le mouvement orienté est observé pendant une période transitoire jusqu'à ce que l'équilibre chimique et électrique du système soit atteint. Le mouvement orienté cesse alors. Maintenir constante et homogène la concentration d'une espèce réactive chargée dans un potentiel en dents de scie peut s'avérer difficile à réaliser expérimentalement.
Dans le paragraphe suivant, nous proposons un moyen simple de générer un mouvement orienté durable, grâce à une coupure périodique du potentiel en dents de scie, sans pour autant maintenir la concentration de l'espèce B constante [84].

3 Séparation avec arrêt du potentiel

Nous considérons le mélange d'espèces réactives A_ℓ décrit dans le paragraphe précédent. L'espèce A réagit avec l'espèce cible B selon la réaction donnée dans l'Eq. (2.1). Nous définissons un protocole permettant d'extraire du mélange un couple donné (A^R,C^R) associé aux constantes cinétiques (k_1^R, k_2^R).
Nous appliquons périodiquement le potentiel en dents de scie $\psi_1(x)$ durant un temps T_1 jusqu'à ce que l'équilibre électrique et chimique du couple (A^R, C^R) soit atteint. Puis, le potentiel $\psi_1(x)$ est coupé pendant un temps T_2, durant lequel le profil de concentration des espèces évolue sous l'action de la diffusion et de la réaction chimique.
Afin d'augmenter la sélectivité de la méthode de séparation, l'application d'une rampe de potentiel $\psi_2(x)$ durant le temps T_2, permettant d'annuler la vitesse globale des espèces

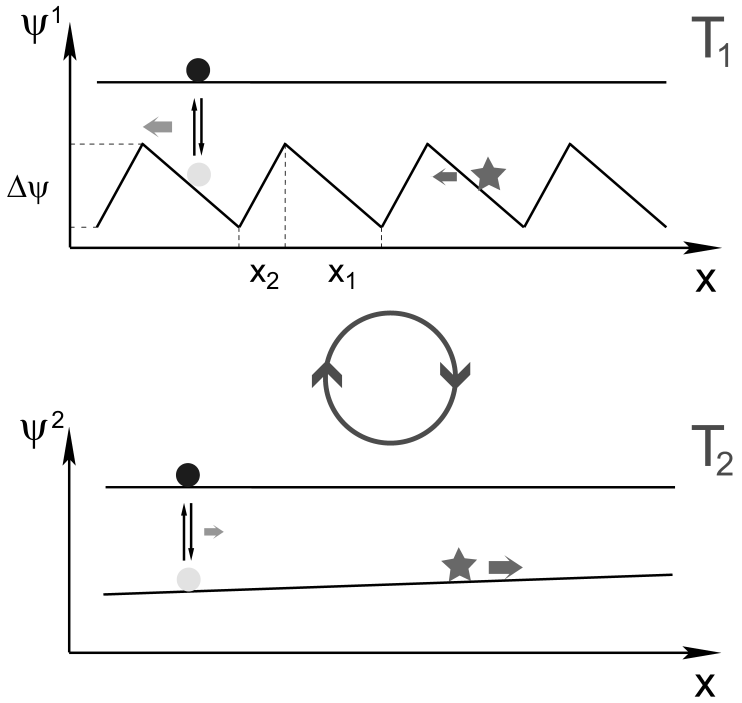


FIG. III–2.1 – Séparation sur critères cinétiques grâce à un mouvement orienté créé par l'application d'un potentiel en dents de scie. Le mélange d'espèces réactives est soumis à 1) un potentiel en dents de scie durant un temps T_1 ; 2) une rampe de potentiel $\psi_2(x)$ créant un champ constant $\overrightarrow{E_2}$ durant un temps T_2. Contrairement à une espèce chargée réactive (étoile) l'espèce résonnante A^R (disque clair) réagit avec l'espèce cible B pour donner l'espèce neutre C^R (disque foncé). Durant le temps T_1 le couple résonnant (A^R,C^R) parcourt une distance plus grande que l'espèce non réactive, car il franchit la barrière de potentiel lorsqu'il est dans son état neutre. Durant le temps T_2, le couple résonnant (A^R,C^R) recule moins que l'espèce non réactive A_{nr} car il est partiellement sous forme neutre. La vitesse moyenne du couple résonnant est donc plus grande que celle de l'espèce non réactive et peut être maximisée.

chargées non réactives A_{nr}, sera envisagée dans un deuxième temps. Ce protocole est schématisé dans la figure 7.1.

Nous considérons un couple (A,C) associé à des constantes cinétiques (k_1,k_2). Nous adoptons une description macroscopique du système. Dans un milieu unidimensionnel, les concentrations $A(x,t)$, $B(x,t)$ et $C(x,t)$ des espèces A, B et C vérifient les équations suivantes :

$$\frac{\partial A(x,t)}{\partial t} = -k_1 A(x,t)B(x,t) + k_2 C(x,t) + D\frac{\partial^2 A(x,t)}{\partial x^2} + \mu\frac{\partial E_i A(x,t)}{\partial x} \quad (2.5)$$

$$\frac{\partial B(x,t)}{\partial t} = -k_1 A(x,t)B(x,t) + k_2 C(x,t) + D\frac{\partial^2 B(x,t)}{\partial x^2} - \mu\frac{\partial E_i B(x,t)}{\partial x} \quad (2.6)$$

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = k_1 A(x,t)B(x,t) - k_2 C(x,t) + D\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (2.7)$$

où t est le temps et x la coordonnée spatiale. Le champ E_i est égal au champ E_1, dérivé du potentiel ψ_1 pendant le temps T_1 et est nul ou égal au champ E_2 dérivé du potentiel ψ_2 durant le temps T_2. Pour caractériser l'évolution du système, nous nous intéressons particulièrement à la position moyenne $\overline{x}$ et à la variance σ^2 de la position x des profils de concentration des espèces A et C :

$$\overline{x} = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} x(A(x,t)+C(x,t))dx}{\int_{-\infty}^{\infty}(A(x,t)+C(x,t))dx} \tag{2.8}$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_{-\infty}^{\infty}(x-\overline{x}(t))^2(A(x,t)+C(x,t))dx}{\int_{-\infty}^{\infty}(A(x,t)+C(x,t))dx} \tag{2.9}$$

A une échelle de temps plus grande que la période T_1+T_2 du phénomène, les grandeurs $\overline{x}$ et σ^2 croissent linéairement avec le temps. On peut ainsi définir une vitesse de déplacement v comme la pente de la courbe $\overline{x}(t)$ et un coefficient de diffusion apparent D_{app} tel que :

$$\sigma^2 = 2D_{app}t. \tag{2.10}$$

Les Eqs. (2.5-2.7) sont non linéraires et ne sont pas solubles analytiquement. Nous cherchons à déterminer un jeu de valeurs des paramètres du problème, la barrière de potentiel $\Delta\psi$, les longueurs caractéristiques du potentiel x_1 et x_2, les temps caractéristiques T_1^R et T_2^R, la valeur du champ électrique E_2 et la concentration initiale de l'espèce B, qui permettent de maximiser la vitesse du mouvement orienté d'un couple donné (A^R,C^R), caractérisé par ses constantes cinétiques (k_1^R, k_2^R). Puis, nous validons les résultats analytiques approchés obtenus grâce à des résolutions numériques des équations exactes.

3.1 Conditions de résonance

On admet que le couple d'espèces réactives (A^R,C^R) se déplaçant avec la vitesse la plus grande vérifie les conditions de résonance dans le cas de l'application permanente du potentiel, données dans les Eqs. (2.3-2.4), en remplaçant la concentration B par une concentration effective B_{eff} dont l'expression analytique sera déterminée ultérieurement. Les constantes cinétiques (k_1^R, k_2^R) associées au couple résonnant vérifient donc les relations suivantes :

$$k_1^R B_{eff} = \kappa_1^R = \frac{\mu\Delta\psi}{x_1^2} \tag{2.11}$$

$$k_2^R = \frac{4D\ln(2)}{x_2^2} \tag{2.12}$$

3.2 Expression de T_1^R

Le temps T_1^R est le temps nécessaire pour que le couple (A^R,C^R) atteigne l'équilibre chimique et électrique dans le potentiel en dents de scie. Les espèces A^R et C^R sont

initialement introduites à l'équilibre chimique en $x = 0$

$$A^R(x,0) = \frac{k_2^R \delta(x)}{\kappa_1^R + k_2^R} \tag{2.13}$$

$$C^R(x,0) = \frac{\kappa_1^R \delta(x)}{\kappa_1^R + k_2^R} \tag{2.14}$$

On choisit le temps T_1^R comme le temps nécessaire pour que la position moyenne $\overline{x}$ du profil $[A^R(x,t) + C^R(x,t)]$ parcourt une distance x_1 en présence d'un champ uniforme $-\Delta\psi/x_1$ et d'une concentration constante B_{eff} de l'espèce B. Les équations gouvernant l'évolution du système sont les suivantes :

$$\frac{\partial A^R(x,t)}{\partial t} = -\kappa_1^R A^R(x,t) + k_2^R C^R(x,t) + D\frac{\partial^2 A^R(x,t)}{\partial x^2} - \frac{\mu\Delta\psi}{x_1}\frac{\partial A^R(x,t)}{\partial x} \tag{2.15}$$

$$\frac{\partial C^R(x,t)}{\partial t} = \kappa_1^R A^R(x,t) - k_2^R C^R(x,t) + D\frac{\partial^2 C^R(x,t)}{\partial x^2} \tag{2.16}$$

avec $\kappa_1^R = k_1^R B_{eff}$. En multipliant les Eqs. (2.15, 2.16) par x, en intégrant sur l'espace et en les sommant, on obtient une équation différentielle pour $\overline{x}$ qui donne :

$$\overline{x} = \frac{\mu\Delta\psi}{x_1}\frac{k_2^R}{\kappa_1^R + k_2^R}t \tag{2.17}$$

En utilisant l' Eq. (2.11) et la définition du temps T_1^R, on trouve :

$$T_1^R = \frac{1}{k_1^R B_{eff}} + \frac{1}{k_2^R} \tag{2.18}$$

Le temps T_1^R est la somme des durées de vies moyennes respectives des espèces A^R et C^R, $\tau_{A^R} = \frac{1}{k_1^R B_{eff}}$ et $\tau_{C^R} = \frac{1}{k_2^R}$. Il est supérieur au temps de relaxation de la réaction $\tau_\chi^R = \frac{1}{k_1^R B_{eff} + k_2^R}$ ce qui est en accord avec le fait que T_1^R soit le temps nécessaire pour que le couple résonnant atteigne l'équilibre chimique et électrique. En utilisant les Eqs. (2.11, 2.12), on peut réécrire T_1^R sous la forme suivante :

$$T_1^R = \frac{x_1^2}{\mu\Delta\psi} + \frac{x_2^2}{4D\ln(2)} \tag{2.19}$$

3.3 Expression de T_2^R

Après l'application du potentiel en dents de scie $\psi_1(x)$ pendant le temps T_1^R, les distributions des espèces (A^R,C^R) et B sont étroites, centrées respectivement sur les maxima et les minima du potentiel. On considère que les profils de concentration sont à l'équilibre chimique. La coupure du potentiel en dents de scie pendant le temps T_2^R permet aux profils de concentration de s'élargir et aux espèces de charges opposées, A^R et B, de se rencontrer et de réagir à nouveau. La distance la plus courte séparant deux pics de concentration de A^R et B est x_2.

En admettant que la concentration de B est uniforme et de valeur B_{eff}, on choisit le temps T_2^R comme le temps nécessaire pour que la largeur à mi-hauteur d'une distribution de $[A^R(x,t) + C^R(x,t)]$, initialement sous forme d'un pic de Dirac $\delta(x)$, atteigne $2x_2$ sous l'effet de la diffusion. On considère que, dans le cas où on choisit de l'appliquer, le champ électrique constant E_2 ne perturbe que faiblement le système et on le néglige. Les équations gouvernant la dynamique d'un tel système sont obtenues à partir des Eqs. (2.15, 2.16) en supprimant le terme de migration :

$$\frac{\partial A^R(x,t)}{\partial t} = -\kappa_1^R A^R(x,t) + k_2^R C(x,t) + D\frac{\partial^2 A^R(x,t)}{\partial x^2} \tag{2.20}$$

$$\frac{\partial C^R(x,t)}{\partial t} = \kappa_1^R A^R(x,t) - k_2^R C^R(x,t) + D\frac{\partial^2 C^R(x,t)}{\partial x^2} \tag{2.21}$$

Les conditions initiales sont données dans les Eqs.(2.13, 2.14). En multipliant les Eqs. (2.20, 2.21) par x^2, en les sommant et en les intégrant sur l'espace, on obtient une équation différentielle pour la variance σ^2. En utilisant la définition de T_2^R proposée, on obtient :

$$T_2^R = \frac{1}{k_2^R} \tag{2.22}$$

T_2^R a pour valeur la durée de vie moyenne de l'espèce neutre C^R. En utilisant l'Eq. (2.12), on obtient l'expression :

$$T_2^R = \frac{x_2^2}{4D\ln(2)} \tag{2.23}$$

3.4 Expression du potentiel E_2

En l'absence de champ durant le temps T_2^R, les espèces chargées non réactives notées A_{nr} présentent un mouvement orienté avec une vitese importante, *a priori* proche de celle du couple résonnant (A^R,C^R), puisqu'elles parcourent une distance x_1 durant le temps T_1^R et franchissent la barrière de potentiel par diffusion durant le temps T_2^R. Elles étaient associées à une vitesse nulle dans le cas de l'application permanente du potentiel en dents de scie. Afin de conserver une bonne sélectivité pour ce protocole de séparation, on peut appliquer un champ uniforme E_2 durant le temps T_2^R, choisi pour annuler la vitesse des espèces non réactives.

Après l'application du potentiel en dents de scie durant le temps T_1^R, la distribution des espèces chargées non réactives A_{nr} est un ensemble de pics étroits situés dans les maxima du potentiel. Durant le temps T_2^R, ces pics s'élargissent sous l'effet de la diffusion et subissent une translation sous l'effet du champ uniforme E_2. On considère, par exemple, le pic central situé en $x = 0$. Après le temps T_2^R, le profil de concentration de A_{nr} est une gaussienne centrée en $x = -\mu E_2 T_2^R$. Durant le temps T_1^R, la queue du profil située en $x > x_1$ se reconcentre sur le maximum situé en $x = x_1 + x_2$ alors que la partie située en

$x < -x_2$ se reconcentre sur le maximum situé en $x = -(x_1 + x_2)$. La vitesse de l'espèce chargée non réactive est donc nulle si le champ E_2 vérifie la relation suivante :

$$E_2 = \frac{x_2 - x_1}{2\mu T_2^R} \tag{2.24}$$

3.5 Expression de la concentration effective de B

L'hypothèse d'une concentration uniforme de l'espèce B n'est pas correcte. L'espèce B subit le potentiel en dents de scie durant le temps T_1^R, le profil de concentration se concentre dans les minima du potentiel, puis s'élargit sous l'action de la diffusion durant le temps T_2^R : il subit des battements en fonction du temps. Une des difficultés du traitement analytique est la non linéarité des équations différentielles due aux variations de $B(x,t)$. On introduit une concentration effective B_{eff} pour l'espèce B permettant de linéariser les équations. La concentration B_{eff} correspond à la quantité d'espèce B vue par l'espèce chargée résonnante A^R pendant le temps T_1^R :

$$B_{eff} = \frac{1}{T_1^R \int_{-\infty}^{+\infty} A^R(x,t)dx} \int_0^{T_1^R} dt \int_{-\infty}^{+\infty} A^R(x,t)B(x,t)dx. \tag{2.25}$$

Initialement, le milieu contient l'espèce B à une concentration uniforme B_0. On choisit l'origine des abscisses dans un minimum du potentiel. Le couple résonnant (A^R,C^R) est déposé à l'équilibre chimique, sur le maximum le plus proche de l'origine, en $x = x_2$. Après l'application du potentiel en dents de scie pendant le temps T_1^R, l'espèce B est située dans les minima du potentiel et sa distribution est la suivante : $\sum_n B_0(x_1+x_2)\delta(x-n(x_1+x_2))$, avec n entier. L'espèce A^R reste située en $x = x_2$, son profil de concentration est donné par $\frac{\frac{4D\ln(2)}{x_2^2}}{\frac{\mu\Delta\psi}{x_1^2}+\frac{4D\ln(2)}{x_2^2}}\delta(x - x_2)$. En considérant l'élargissement de ces profils dû à la diffusion et leur translation sous l'action du champ uniforme E_2 durant le temps T_2^R, on obtient les conditions initiales permettant de déterminer B_{eff}. Durant l'application suivante du potentiel $\psi_1(x)$ durant le temps T_1^R et sous l'effet du champ constant le plus fort $-\Delta\psi/x_2$, les expressions des profils de concentration des espèces A^R et B sont les suivantes :

$$A^R(x,t) = \frac{\frac{4D\ln(2)}{x_2^2}}{\left(\frac{\mu\Delta\psi}{x_1^2} + \frac{4D\ln(2)}{x_2^2}\right) 2\sqrt{\pi D T_2^R}} \exp\left[-\frac{(x - x_2 + \mu E_2 T_2^R - \mu\Delta\psi t/x_2)^2}{4DT_2^R}\right] \tag{2.26}$$

$$B(x,t) = \frac{B_0(x_1 + x_2)}{2\sqrt{\pi D T_2^R}} \exp\left[-\frac{(x - \mu E_2 T_2^R + \mu\Delta\psi t/x_2)^2}{4DT_2^R}\right] \tag{2.27}$$

On introduit ces expressions dans la définition de B_{eff} donnée dans l'Eq. (2.25), et on obtient :

$$B_{eff} = \frac{B_0(x_1 + x_2)x_2}{4\mu\Delta\psi\left(\frac{x_1^2}{\mu\Delta\psi} + \frac{x_2^2}{4D\ln(2)}\right)} \left[1 - \mathrm{erf}\left(-\frac{\mu E_2 x_2}{2D\sqrt{2\ln(2)}} + \sqrt{\frac{\ln(2)}{2}}\right)\right] \tag{2.28}$$

où la fonction erf est la fonction erreur.
Pour un potentiel en dents de scie de géométrie donnée, la valeur de la concentration effective B_{eff} est calculée pour une concentration initiale $B_0 = 1$ de B, en utilisant l'Eq. (2.28), et le profil de concentration $B(x,t)$ de l'espèce B est déduit de l'intégration numérique des Eqs. (2.5-2.7). Ces résultats sont représentés dans la fig. 7.2. La concentration effective B_{eff} est 100 fois plus faible que la concentration initiale B_0.

4 Validation numérique du protocole

Dans cette section, nous évaluons la pertinence des expressions proposées pour les différents paramètres du problème. Nous résolvons numériquement les Eqs. (2.5-2.7) en utilisant la méthode d'Euler. Les variables spatiales et temporelles sont discrétisées en introduisant les variables $i = x/\Delta x$ et $s = t/\Delta t$ où Δx est la longueur d'une cellule spatiale et Δt est le pas de temps. La concentration de l'espèce A dans la cellule i à l'instant s est notée $A_i(s)$. On considère un canal contenant 40 périodes du potentiel en dents de scie, i. e. $40(x_1 + x_2)/\Delta x$ cellules. Afin de s'affranchir d'éventuelles instabilités numériques, le potentiel est légèrement lissé et les profils initiaux de concentration des espèces A et C ne sont pas des distributions de Dirac mais des gaussiennes de variance égale à 10 cellules et centrées sur la cellule centrale associée à $i = 20(x_1 + x_2)/\Delta x$. On impose une concentration initiale de l'espèce B constante $B_i(0) = B_0$ et les espèces A et C sont introduites à leur concentration d'équilibre, i. e. $\sum_i A_i(0) = k_2/(k_1 B_0 + k_2)$ et $\sum_i C_i(0) = k_1 B_0/(k_1 B_0 + k_2)$.
La discrétisation des Eqs. (2.5-2.7) conduit à :

$$\begin{aligned} A_i(s+1) &= A_i(s) - k_1' A_i(s) B_i(s) + k_2' C_i(s) + D'(A_{i+1}(s) + A_{i-1}(s) - 2A_i(s)) \\ &\quad -\frac{\mu'}{2}\Big[(A_{i+1}(s) + A_i(s))(\psi_{i,i+1} - \psi_{i,i}) - (A_{i-1}(s) + A_i(s))(\psi_{i,i} - \psi_{i,i-1})\Big] \quad (2.29) \\ B_i(s+1) &= B_i(s) - k_1' A_i(s) B_i(s) + k_2' C_i(s) + D'(B_{i+1}(s) + B_{i-1}(s) - 2B_i(s)) \\ &\quad +\frac{\mu'}{2}\Big[(B_{i+1}(s) + B_i(s))(\psi_{i,i+1} - \psi_{i,i}) - (B_{i-1}(s) + B_i(s))(\psi_{i,i} - \psi_{i,i-1})\Big] \quad (2.30) \\ C_i(s+1) &= C_i(s) + k_1' A_i(s) B_i(s) - k_2' C_i(s) + D'(C_{i+1}(s) + C_{i-1}(s) - 2C_i(s)) \quad (2.31) \end{aligned}$$

après l'introduction des variables adimensionnées $k_1' = k_1\Delta t$, $k_2' = k_2\Delta t$, $D' = D\Delta t/(\Delta x)^2$, $\mu' = \mu\Delta t/(\Delta x)^2$.
Nous nous intéressons particulièrement à la position moyenne $\overline{x}$ et à la variance σ^2 de la position x des profils de concentration des espèces A et C :

$$\begin{aligned} \overline{x} &= \sum_i i\Delta x(A_i(s) + C_i(s)) \quad (2.32) \\ \sigma^2 &= \sum_i (i\Delta x - \overline{x}(s))^2 (A_i(s) + C_i(s)) \quad (2.33) \end{aligned}$$

La figure 7.2.a représente le potentiel $\psi_1(x)$, la concentration $B(x,t)$, la concentration effective B_{eff} et la concentration initiale B_0 de l'espèce B. Les profils de concentration $(A^R(x,t) + C(x,t)^R)$ et $A_{nr}(x,t)$ du couple (A,C) et de l'espèce non réactive A_{nr} dans le cas d'absence de champ durant le temps T_2^R et de l'application du champ E_2 durant le temps T_2^R sont représentés figure 7.2.b et 7.2.c respectivement. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution des équations (2.29-2.31).

4.1 Absence de champ E_2 durant T_2

Nous évaluons la pertinence des définitions proposées dans le cas où l'on n'applique aucun champ au système durant le temps T_2. On étudie d'abord la vitesse v en fonction des constantes cinétiques (k_1, k_2) pour des valeurs optimisées de $T_1 = T_1^R$ et $T_2 = T_2^R$ définies dans les Eqs. (2.18,2.22).

Le phénomène de résonance persiste malgré l'arrêt du potentiel et la valeur de la vitesse maximum v^R est inférieure de seulement 1 % à la valeur trouvée dans le cas de l'application permanente du même potentiel $\psi_1(x)$. Ce résultat montre la pertinence de la définition des temps T_1^R et T_2^R respectivement comme le temps de migration le long de la distance x_1 et le temps de diffusion sur la longueur x_2.

La vitesse maximale v^R est atteinte pour un couple d'espèces réactives associé à des constantes cinétiques de valeurs différant d'un facteur 3 seulement des valeurs analytiques k_1^R et k_2^R données dans les Eqs. (2.11, 2.12). Ce bon accord entre les valeurs numériques et analytiques valide la définition proposée pour la concentration effective B_{eff} de B donnée dans l'Eq. (2.28). En effet, les valeurs des constantes résonnates définies dans les Eqs. (2.3, 2.4) dans le cas de l'application permanente du potentiel en dents de scie et d'une concentration uniforme de l'espèce cible B différent déjà des résultats numériques d'un facteur 3. Le tableau 7.1 compare le rapport $\frac{v}{v^R}$ de la vitesse v de certains couples sur la vitesse maximale v^R dans le cas d'une coupure du potentiel $\psi_1(x)$ pendant un temps T_2^R et dans le cas de l'application permanente de $\psi_1(x)$.

Ce tableau montre une diminution de la sélectivité de la méthode de séparation due à la coupure du potentiel $\psi_1(x)$. Le rapport des vitesses est systématiquement plus grand dans le cas de l'arrêt du potentiel. En particulier, les couples associés à une constante thermodynamique $K = \frac{k_1}{k_2}$ de valeur plus faible que la constante thermodynamique du couple résonnant $K^R = \frac{k_1^R}{k_2^R}$ et les espèces chargées non réactives A_{nr} deviennent particulièrement génants. L'observation de ce phénomène nous incite à introduire un champ constant E_2 durant le temps T_2^R afin de ralentir les couples réactifs existant principalement sous l'état chargé et ainsi améliorer la sélectivité du protocole.

On étudie l'influence de la valeur des paramètres T_1 et T_2 sur la position du maximum

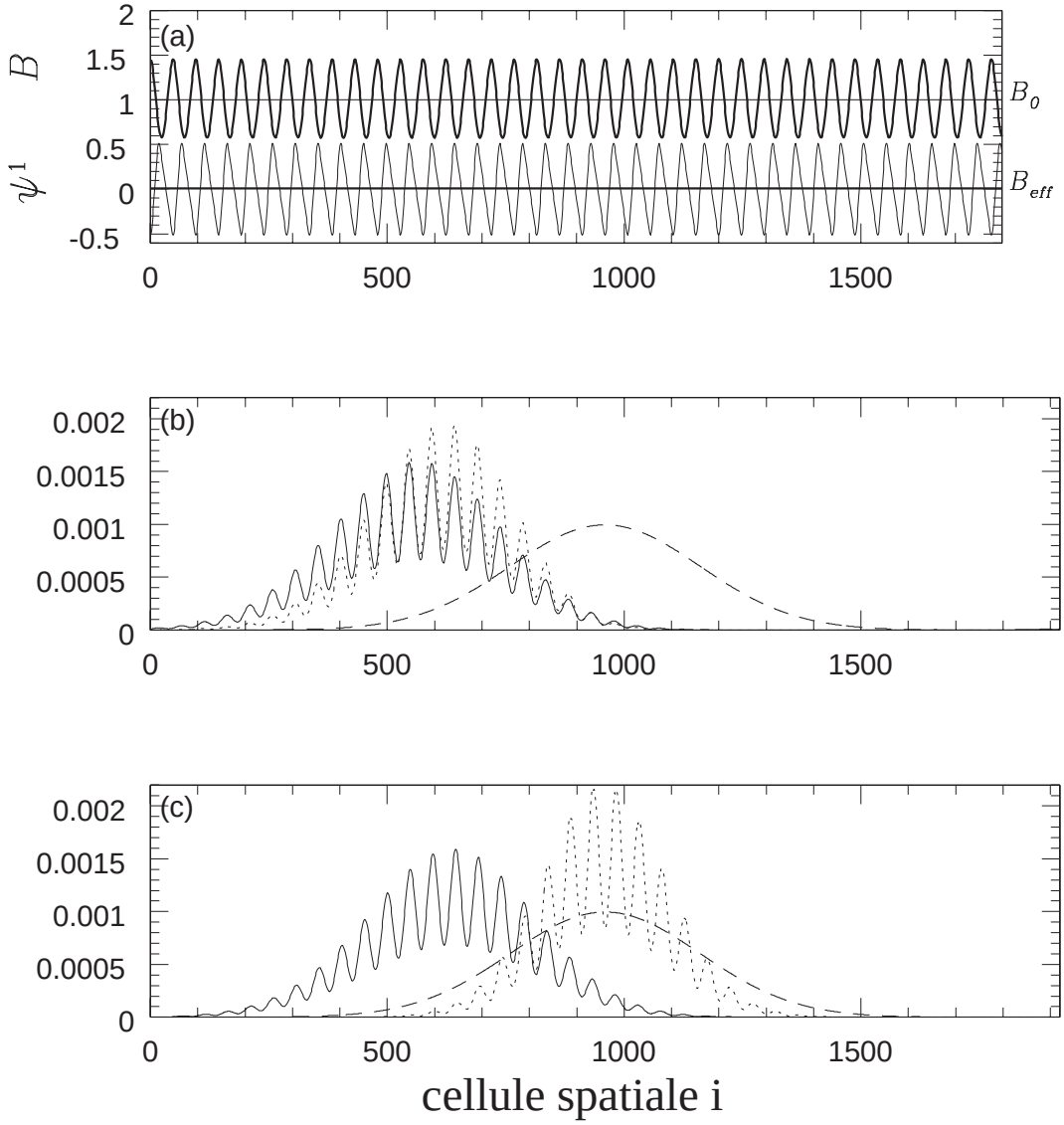


FIG. III–2.2 – **a** : Variation spatiale du potentiel en dents de scie (trait fin) de la concentration de l'espèce B après 100 périodes (trait gras), concentration uniforme initiale de $B_0 = 1$ (trait fin) et concentration effective de B, $B_{eff} = 0.015$ (trait gras) **b** : Profil de concentration du couple résonnant $A^R + C^R$ (trait continu) de l'espèce chargée non réactive A_{nr} (trait pointillé court) et de l'espèce neutre non réactive C_{nr} (trait pointillé long) après 100 périodes. Les paramètres sont : $\mu' = 1$, $\Delta\psi = 1, x'_1 = 32, x'_2 = 16, B_0 = 1, D' = 0.01, T_1^R = 11000\Delta t, T_2^R = 9000\Delta t$ et $E_2 = 0$; **c** : Mêmes résultats qu'en **b** avec $E_2 = 6.25 \times 10^{-4}$. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution numérique des équations différentielles (2.29-2.31).

de la vitesse v dans l'espace (k_1, k_2) et la valeur de ce maximum. Pour chaque couple de valeurs (T_1, T_2), on détermine numériquement les constantes cinétiques $k_1^{max}(T_1, T_2)$ et $k_2^{max}(T_1, T_2)$, associées à la vitesse maximale $v^{max}(T_1, T_2)$, que l'on compare à la vitesse

k_1, k_2	K/K^R	$\frac{v}{v^R}$ avec E_2=0 durant T_2	Application permanente de $\psi_1(x)$
k_1^R, k_2^R	1	1.00	1.00
k_1^R, $10k_2^R$	0.1	0.89	0.05
$10k_1^R$, k_2^R	10	0.55	0.31
k_1^R, $0.1k_2^R$	10	0.36	0.03
$0.1k_1^R$, k_2^R	0.1	0.95	0.51
$10k_1^R$, $10k_2^R$	1	0.75	0.19
$0.1k_1^R$, $0.1k_2^R$	1	0.47	0.30
$0.1k_1^R$, $10k_2^R$	0.01	0.87	0.01
$10k_1^R$, $0.1k_2^R$	100	0.25	0.03
A_{nr}	0	0.85	0.00

TAB. III–2.1 – Rapport des vitesses $\frac{v}{v^R}$ pour différentes valeurs des constantes cinétiques (k_1,k_2) pour un jeu de paramètres donné : $\Delta\psi = 1, x_1' = 32, x_2' = 16, B_0 = 1, D' = 0.01, T_1^R = 11000\Delta t, T_2^R = 9000\Delta t$. dans le cas d'un arrêt périodique du potentiel et d'une application permanente du potentiel avec la concentration B maintenue constante.

maximale $v^R(T_1^R, T_2^R)$ obtenue pour le couple de valeur (T_1^R, T_2^R). Le résultat de cette étude est présenté dans le tableau 7.2.

On voit que la valeur des constantes cinétiques $k_1^{max}(T_1, T_2)$ et $k_2^{max}(T_1, T_2)$ associées au couple ayant la vitesse la plus grande varient avec les temps T_1 et T_2.

Le cas $T_1/T_2 > T_1^R/T_2^R$ favorise les couples (A,C) associés à une constante thermodynamique K plus grande que la constante thermodynamique K^R, qui sont principalement dans l'état neutre C. Si $T_1 > T_1^R$ et $T_2 = T_2^R$, ces couples ont assez de temps pour atteindre le maximum du potentiel $\psi_1(x)$ et une plus grande possibilité de franchir la barrière de potentiel par diffusion. Dans ce cas, $v^{max}(T_1, T_2)$ est plus faible que $v^R(T_1^R, T_2^R)$ parce que la même distance est parcourue durant un temps plus long. Si $T_1 = T_1^R$ et $T_2 < T_2^R$, le temps de coupure du potentiel est trop faible pour permettre le franchissement de la barrière par diffusion et cela doit se faire également durant le temps T_1. La vitesse $v^{max}(T_1, T_2)$ est inférieure à $v^R(T_1^R, T_2^R)$ car le mouvement est principlement diffusif.

Le cas contraire, $T_1/T_2 < T_1^R/T_2^R$, favorise les couples (A,C) associés à une constante thermodynamique K de valeur plus faible que K^R qui sont principalement dans leur état chargé. Si $T_1 = T_1^R$ et $T_2 > T_2^R$, franchir la barrière durant le temps T_1 en étant sous forme neutre n'est plus un avantage car le temps T_2 est suffisant pour que le couple (A,C) la franchisse pendant l'arrêt du potentiel. La diffusion prend une part considérable dans le mouvement orienté et la vitesse $v^{max}(T_1, T_2)$ est inférieure à $v^R(T_1^R, T_2^R)$. Si $T_1 < T_1^R$ et $T_2 = T_2^R$, atteindre un maximum du potentiel en dents de scie durant le temps T_1 nécessite de passer en moyenne plus de temps dans l'état chargé que le couple (A^R,C^R). Lorsque l'on diminue le temps d'application du potentiel en dents de scie, on augmente la vitesse maximale puisque la même distance est parcourue pendant un temps plus court.

$\frac{T_1}{T_1^R}$	$\frac{T_2}{T_2^R}$	$\frac{k_1^{max}(T_1,T_2)}{k_1^R(T_1^R,T_2^R)}$	$\frac{k_2^{max}(T_1,T_2)}{k_1^R(T_1^R,T_2^R)}$	$\frac{K^{max}(T_1,T_2)}{K^R(T_1^R,T_2^R)}$	$\frac{v^{max}(T_1,T_2)}{v^R(T_1^R,T_2^R)}$
1	1	1.00	1.00	1.00	1.00
1	10	0.013	20.3	0.0006	0.28
10	1	5.6	0.16	35	0.24
1	0.1	5	0.16	31.25	0.45
0.1	1	0^a	0^a	0^a	1.65

[a] L'espèce la plus rapide est l'espèce chargée non réactive A_{nr}.

TAB. III–2.2 – T_1 et T_2 pour un jeu donné de paramètres ($\Delta\psi = 0.6, x_1 = 32, x_2 = 16, B_0 = 1, D = 0.01, T_1^R = 11000, T_2^R = 9000$) avec $E_2 = 0$. $k_1^{max}(T_1,T_2)$, $k_2^{max}(T_1,T_2)$, $K^{max}(T_1,T_2)$, $v^{max}(T_1,T_2)$ (respectivement $k_1^R(T_1^R,T_2^R)$, $k_2^R(T_1^R,T_2^R)$, $K^R(T_1^R,T_2^R)$, $v^R(T_1^R,T_2^R)$) désignent les constantes cinétiques, la constante thermodynamique et la vitesse associées au couple d'espèce se déplaçant avec la vitesse la plus grande pour des temps d'application et de coupure du champ (T_1,T_2) (respectivement (T_1^R,T_2^R)).

Cependant, ce phénomène est limité par le temps de migration de l'espèce chargée non réactive sur une distance x_1, $T_1^{lim} = \frac{x_1^2}{|\mu|\Delta\psi}$. Pour un temps T_1 d'application du champ plus court que T_1^{lim} le mouvement de toutes les espèces cesse. Les Figures 7.3.a et 7.3.b représentent la vitesse v de l'espèce résonnante et de l'espèce non réactive A_{nr} en fonction de $\log_{10} T_1$ ($\log_{10} T_2$ respectivement) pour $T_2 = T_2^R$ (et $T_1 = T_1^R$ respectivement).

On voit que les valeurs choisies pour T_1^R et T_2^R permettent d'obtenir la vitesse la plus grande possible pour le couple résonnant sans que les espèces non réactives ne le doublent. Les études numériques présentées dans ce paragraphe montrent l'influence des valeurs des temps T_1 et T_2 sur le couple présentant une vitesse maximale. et valident la définition proposée. Il est important de respecter la définition donnée dans les Eqs. (2.18, 2.22) pour les temps T_1 et T_2. Une variation d'un facteur 10 induit une erreur significative sur la position du maximum.

Pour finir, nous déterminons le rapport $\frac{D_{app}}{D}$ du coefficient de diffusion apparent D_{app} sur le coefficient de diffusion D pour un ensemble de couples réactifs. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.3 Les valeurs de ce rapport ne divergent pas et sont essentiellement inférieures à 1. On vérifie ainsi l'absence de phénomène de dispersion.

4.2 Présence d'un champ E_2 durant le temps T_2

Le paragraphe précédent met en évidence une diminution de la sélectivité de la méthode de séparation lors de l'arrêt périodique du potentiel. Celui-ci entraîne un déplacement des espèces chargées non réactives et des couples principalement sous forme chargée à une vitesse proche de la vitesse résonnante v^R, ce qui affecte l'efficacité de la séparation.

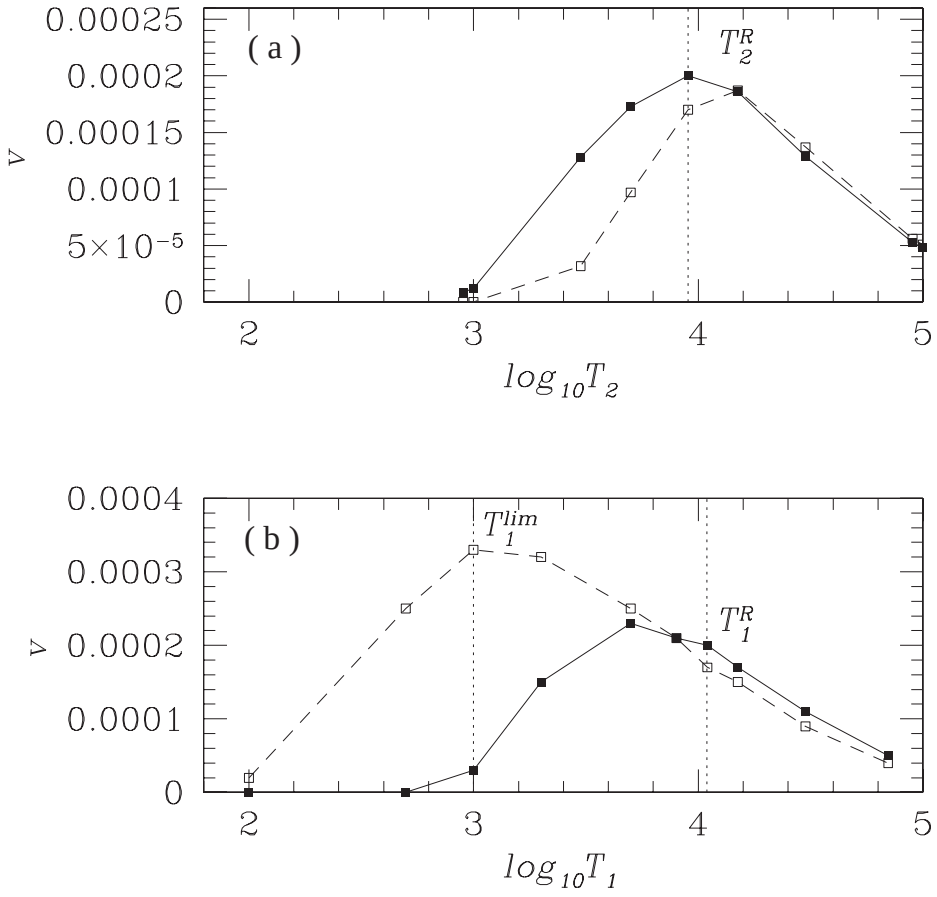


FIG. III–2.3 – **a** Vitesse v en fonction de $\log_{10} T_1$ pour le couple résonnant (k_1^R, k_2^R) (en trait continu) et pour l'espèce chargée non réactive A_{nr} (trait pointillé) ($\Delta\psi = 0.6, x_1' = 32, x_2' = 16, B_0 = 1, D' = 0.01, T_2^R = 9000\Delta t$). Les lignes pointillées verticales indiquent les prédictions analytiques de T_1^R et T_1^{lim}. **b** Vitesse v en fonction de $\log_{10} T_1$ pour le couple résonnant (k_1^R, k_2^R) (en trait continu) et pour l'espèce chargée non réactive A_{nr} (ligne pointillée) ($\Delta\psi = 0.6, x_1' = 32, x_2' = 16, B_0 = 1, D' = 0.01, T_1^R = 11000\Delta t$). Les lignes pointillées verticales indiquent les prédictions analytiques de T_1^R et T_1^{lim}. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution numérique des équations différentielles (2.29-2.31).

k_1, k_2	K/K^R	$\frac{D_{app}}{D}$
k_1^R, k_2^R	1	0.78
k_1^R, $10k_2^R$	0.1	0.57
$10k_1^R$, k_2^R	10	0.77
k_1^R, $0.1k_2^R$	10	1.03
$0.1k_1^R$, k_2^R	0.1	0.68
$10k_1^R$, $10k_2^R$	1	0.55
$0.1k_1^R$, $0.1k_2^R$	1	0.97
$0.1k_1^R$, $10k_2^R$	0.01	0.55
$10k_1^R$, $0.1k_2^R$	100	1.03
0, 0 ($\mathbf{A}_{nr}$)	0	0.55

TAB. III–2.3 – Rapport du coefficient de diffusion apparent sur le coefficient de diffusion $\frac{D_{app}}{D}$ pour quelques couples réactifs caractérisés par des constantes cinétiques (k_1,k_2) dans le cas d'un arrêt de potentiel durant le temps T_2^R. Mêmes paramètres que pour le tableau 7.1.

On impose donc un champ constant E_2 durant le temps T_2^R, choisi pour annuler le déplacement des espèces non réactives A_{nr}. On résout numériquement les équations (2.5-2.7) dans ce cas. La figure 7.4 montre que la vitesse v atteint un maximum v^R : le phénomène de résonance persiste malgré l'arrêt du potentiel et l'application d'un champ constant.

La valeur de la vitesse résonnante v^R est 20% plus faible que dans le cas de l'application permanente d'un potentiel en dents de scie. La diminution de la vitesse est due à l'application de la rampe de potentiel durant le temps T_2^R. La sélectivité du protocole ne dépend pas de la valeur de la vitesse résonnante. La vitesse maximale v^R est atteinte pour un couple d'espèces réactives associé à des constantes cinétiques de valeurs différant d'un facteur 3 seulement des valeurs analytiques k_1^R et k_2^R données dans les Eqs. (2.11, 2.12). La valeur du champ E_2 déduite de la résolution numérique des Eqs. (2.29-2.31) ne diffère que de 30% de la prédiction analytique donnée dans l'Eq. (2.24).
On s'intéresse à la sélectivité du protocole de séparation. La figure 7.5.a (et respectivement 7.5.b) représente la vitesse v/v^R en fonction de $\log_{10}(k_1/k_1^R)$ pour $k_2 = k_2^R$ (respectivement $\log_{10}(k_2/k_2^R)$ pour $k_1 = k_1^R$) en l'absence de champ durant T_2^R et en présence d'un champ constant. Contrairement aux résultats obtenus dans le cas de l'application permanente d'un potentiel en dents de scie, la vitesse n'est pas une fonction symétrique dans l'espace (k_1,k_2). L'application du potentiel E_2 diminue la vitesse de l'ensemble des couples mais plus spécifiquement de ceux qui sont principalement sous forme chargée et augmente ainsi la sélectivité. L'application d'un champ E_2 constant durant le temps T_2^R modifie la valeur des constantes cinétiques résonnantes : la valeur de k_2^R ne dépend que de la géométrie du potentiel en dents de scie et reste donc inchangée, par contre la valeur de k_1^R est modifiée à cause de la modification de la valeur de la concentration effective B_{eff} de l'espèce B.

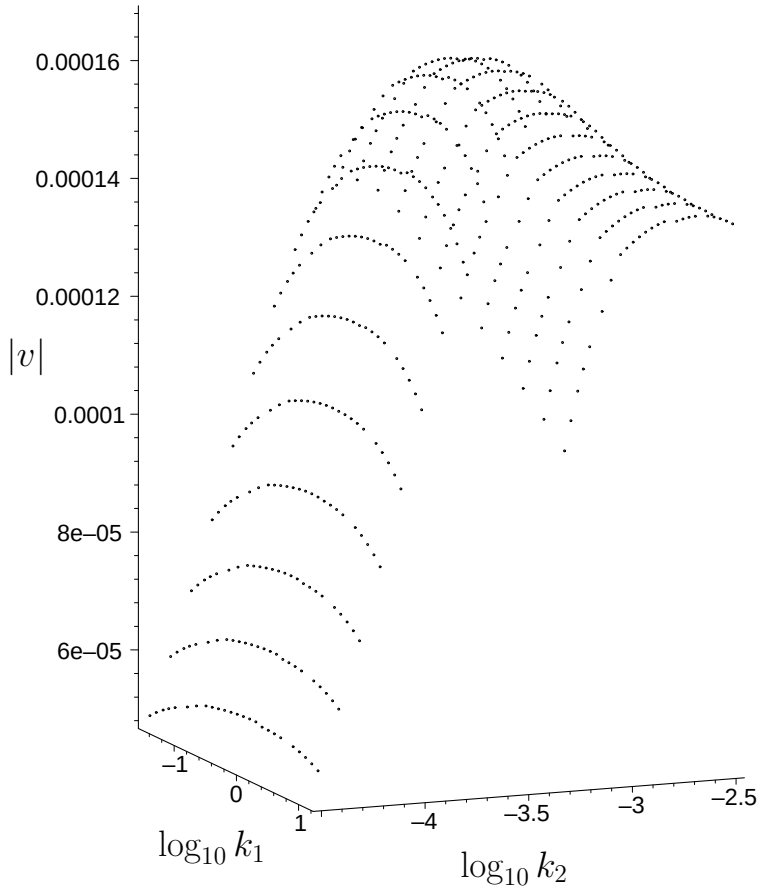


FIG. III–2.4 – Valeur absolue de la vitesse $|v|$ en fonction de $\log_{10} k_1$ et $\log_{10} k_2$. Mêmes paramètres que pour la figure 7.2 avec $E_2 = 6.25 \times 10^{-4}$. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution numérique des équations différentielles (2.29-2.31).

Le tableau 7.4. présente la vitesse normalisée v/v^R de certains couples en fonction des constantes cinétiques (k_1,k_2) auxquelles ils sont associés.

k_1, k_2	K/K^R	$T_1^R + T_2^R$	Potentiel permanent en dents de scie
k_1^R, k_2^R	1	1.00	1.00
k_1^R, $10k_2^R$	0.1	0.81	0.05
$10k_1^R$, k_2^R	10	0.92	0.31
k_1^R, $0.1k_2^R$	10	0.36	0.03
$0.1k_1^R$, k_2^R	0.1	0.95	0.51
$0.01k_1^R$, k_2^R	0.01	0.80	0.30
$10k_1^R$, $10k_2^R$	1	0.45	0.19
$0.1k_1^R$, $0.1k_2^R$	1	0.33	0.30
$0.1k_1^R$, $10k_2^R$	0.01	0.25	0.01
$10k_1^R$, $0.1k_2^R$	100	0.31	0.03
A_{nr}	0	0	0.00

TAB. III–2.4 – Vitesse normalisée $\frac{v}{v^R}$ en fonction des constantes cinétiques k_1 and k_2 pour un jeu de paramètres donné : $(\Delta\psi = 1, x_1 = 32, x_2 = 16, B_0 = 1, D = 0.01, T_1^R = 11000\Delta t, T_2^R = 9000\Delta t)$ dans le cas de l'application alternée d'un potentiel en dents de scie et une rampe de potentiel ($E_2 = 6.25 \times 10^{-4}$) où dans le cas d'une application permanente d'un potentiel en dents de scie et d'une concentration uniforme de l'espèce cible $B(x,t) = B_0$.

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que la sélectivité du procédé est moins bonne que dans le cas de l'application permanente du potentiel mais reste très satisfaisante. En particulier, la vitesse des couples (A,C) associés à des constantes cinétiques (k_1,k_2), dont chacune des valeurs diffèrent des constantes cinétiques résonnantes (k_1^R, k_2^R), est faible. La figure 7.5 représente la vitesse v en fonction de $\log_{10}(k_1/k_1^R)$ pour des couples associés à une même constante thermodynamique K^R. Ainsi, grâce à cette méthode, il est possible de séparer des couples associés à une même constante thermodynamique K^R mais à des constantes cinétiques différentes.

5 Mise en oeuvre de la séparation

Nous pouvons maintenant définir un protocole expérimental permettant l'extraction d'un mélange d'un composé choisi A^R associé à des constantes cinétiques connues (k_1, k_2). On s'intéresse d'abord aux paramètres caractérisant la géométrie du potentiel en dents de scie : $\Delta\psi$, x_1 et x_2. La valeur de la constante cinétique k_2 et du coefficient de diffusion D imposent la valeur de la plus courte longueur x_2. En effet, on détermine x_2 à partir de l'Eq. (2.12) :

$$x_2 = 2\sqrt{\frac{\ln(2)D}{k_2}}. \tag{2.34}$$

Les Eqs. (2.11, 2.28) imposent une relation entre la longueur x_1, la hauteur de la barrière de potentiel $\Delta\psi$ et la concentration initiale de l'espèce cible B_0. Pour un potentiel en dents de scie donné, i. e. pour x_1 et $\Delta\psi$ fixés, on détermine la valeur de la concentration B_0 permettant de maximiser la vitesse du couple choisi :

$$B_0 = \frac{4\mu\Delta\psi\left(1+\frac{\mu\Delta\psi}{x_1^2 k_2}\right)}{(x_1+x_2)x_2 k_1\left\{1-\mathrm{erf}\left[\frac{(x_1-x_2)}{2}\sqrt{\frac{k_2}{2D}}+\sqrt{\frac{\ln(2)}{2}}\right]\right\}} \tag{2.35}$$

On peut donc définir le protocole suivant : on introduit le mélange de couples réactifs dans un canal contenant l'espèce B à la concentration B_0 donnée par l'Eq. (2.35) et on applique alternativement le potentiel en dents de scie ψ_1 durant un temps T_1, déduit de l'Eq. (2.19) et un champ constant E_2 dont la valeur est donnée dans l'Eq. (2.24), durant un temps T_2 , défini par l'Eq. (2.23). Par exemple, on considère l'extraction d'un simple brin d'ADN associé aux paramètres suivants : k_1=10^3 $\mathrm{M^{-1}s^{-1}}$, k_2=1 $\mathrm{s^{-1}}$, D=10^{-9} $\mathrm{m^2s^{-1}}$, et μ=4 10^{-8} $\mathrm{m^2s^{-1}V^{-1}}$. Cela impose x_2=50 μm. On choisit ensuite x_1=100 μm et $\Delta\psi$= 1 V, on obtient $T_1 \approx T_2$=1 s, B_0 = 1.025 M, et E_2=625 $\mathrm{Vm^{-1}}$. De telles valeurs sont compatibles avec la réalisation de l'expérience dans un microdispositif, où l'on utiliserait par exemple des microélectrodes pour créer le champ électrique.

6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons adapté une méthode de séparation fondée sur le principe des moteurs moléculaires. Nous avons proposé une nouvelle façon de maintenir le milieu hors équilibre en coupant périodiquement le potentiel en dents de scie. La sélectivité de la méthode ainsi obtenue est satisfaisante et sa mise en oeuvre expérimentale est *a priori* plus simple que celle de la méthode initiale, qui imposait un jeu compliqué de pompes et de réservoirs locaux afin de maintenir la concentration d'une espèce réactive et chargée constante dans un potentiel en dents de scie.

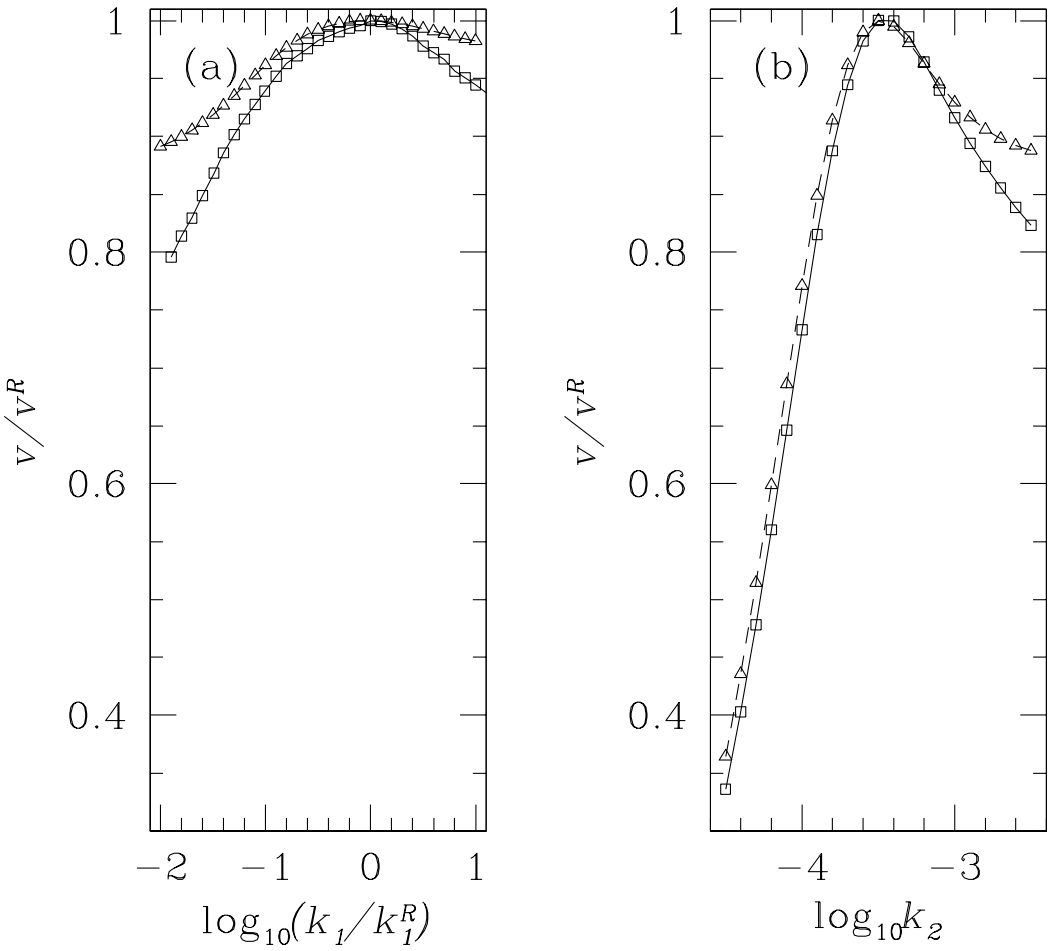


FIG. III–2.5 – Vitesse normalisée v/v^R en fonction de $\log_{10}(k_1/k_1^R)$ pour $k_2 = k_2^R$ (**a**) ou de $\log_{10}(k_2)$ pour $k_1 = k_1^R$ (**b**). Les triangles et la ligne pointillée correspondent à l'absence de rampe de potentiel ($E_2 = 0$) durant le temps T_2 ; les carrés et la ligne continue correspondent à l'application d'un champ $E_2 = 0.000625$ choisi pour annuler la vitesse des espèces non réactives A_{nr}. Mêmes paramètres que pour la figure 7.2. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution numérique des équations différentielles (2.29-2.31).

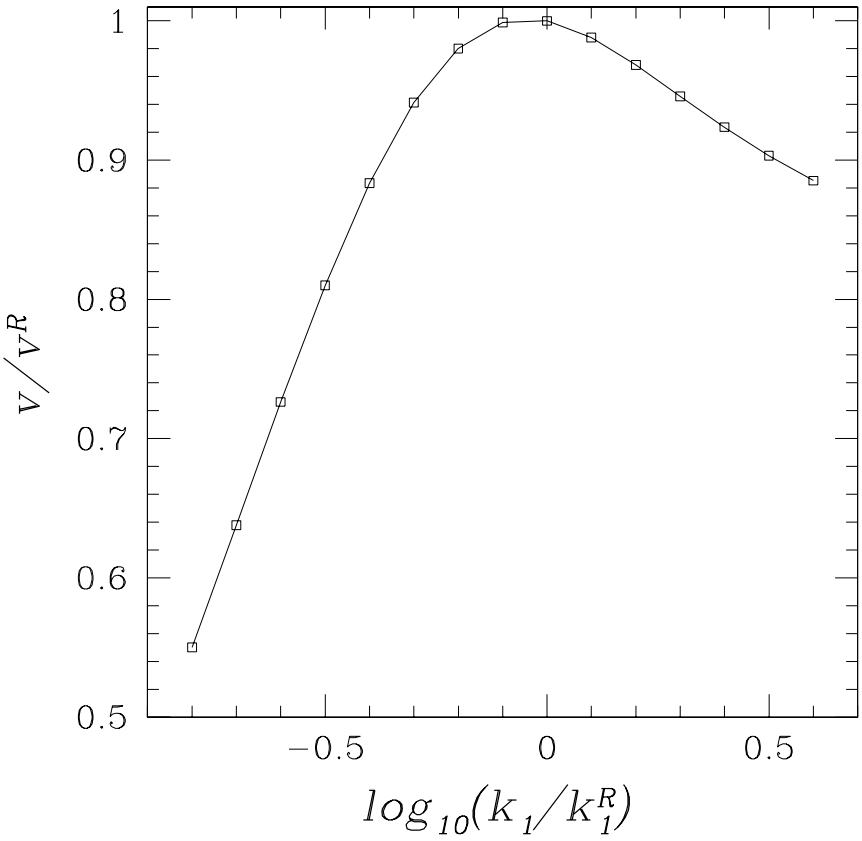


FIG. III–2.6 – Séparation de couples d'espèces réactives associées à la même valeur de constante d'équilibre $K^R = 5937,5$. Vitesse normalisée en fonction de $\log_{10}(k_1/k_1^R)$ pour $k_2 = k_1/K^R$. Mêmes paramètres qu'à la figure 7.3. Ces résultats sont obtenus à partir de la résolution numérique des équations différentielles (2.29-2.31).

Quatrième partie

Conclusion et perspectives

Dans la première partie du manuscrit, nous proposons une méthode, fondée sur un phénomène de résonance, permettant de caractériser la dynamique d'un réseau catalytique constitué de n espèces à partir de la réponse à une modulation de température de $n-1$ espèces du réseau. Cette méthode d'investigation peut être précédée par une méthode d'analyse nécessitant un balayage en fréquence mais ayant l'avantage de n'exiger l'acquisition de la réponse à la modulation de température que d'une seule espèce du réseau.

Dans la seconde partie du manuscrit, nous nous intéressons à une méthode théorique de séparation sur critères cinétiques fondée sur le principe des moteurs moléculaires qui a été précédemment développée dans l'équipe. Cette méthode présente des applications intéressantes en biologie, cependant sa mise en oeuvre expérimentale est difficile. Nous proposons une modification du protocole afin d'en faciliter la réalisation expérimentale.

La caractérisation de la dynamique d'un réseau de réactions chimiques grâce à la construction d'une fonction résonnante est une approche novatrice de l'étude de la cinétique des systèmes biologiques et les résultats obtenus sont encourageants. La méthode proposée s'applique à des réseaux catalytiques, i. e. linéaires, et à l'équilibre. Dans le cas de réseaux linéaires à trois espèces, nous envisageons les prolongements directs suivants :

- démonstration analytique de l'existence du maximum de la fonction réponse définie Eq. (3.25) dans l'espace des trois paramètres $(\lambda_+, \lambda_-, \theta_+)$ pour un réseau obéissant au bilan détaillé,
- recherche d'un maximum éventuel de la fonction réponse dans l'espace des cinq paramètres $(E^0, ES^0, \lambda_+, \lambda_-, \theta_+)$ pour un réseau obéissant au bilan détaillé,
- construction d'une fonction réponse pour des réseaux ne vérifiant pas l'équilibre détaillé.

Ces prolongements auront à être étendus au cas général de réseaux à n espèces. Le domaine d'utilisation de la méthode proposée se restreint dans l'état actuel aux réseaux linéaires et il serait souhaitable de l'étendre à des réseaux de réactions non linéaires. Ainsi, l'étude de l'effet d'une modulation de température sur un système non linéaire, présentant une bifurcation vers la bistabilité, a déjà été réalisée par des membres de l'équipe [85].

Un travail expérimental a été mené en parallèle de ce travail théorique par certains membres de l'équipe dans le but de valider les protocoles proposés. Ce dernier nécessite, d'une part, la conception d'un dispositif permettant d'imposer dans le milieu le champ de température ou le champ électrique souhaité et, d'autre part, le choix d'un système chimique dont les caractéristiques dynamiques sont connues et adaptées aux contraintes expérimentales.

La validation des méthodes présentées dans la partie 1 nécessite l'application d'une modulation de température à une fréquence bien définie. Le dispositif expérimental conçu pour cela est une cellule de Hélé-Shaw (deux plaques de verre très rapprochées l'une de

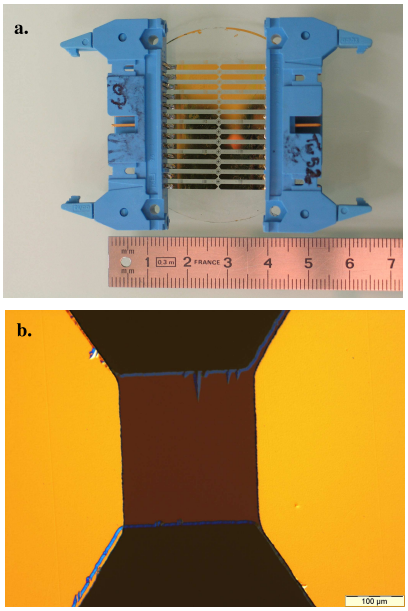


FIG. IV–2.7 – **a.** Photographie d'un ensemble de cellules de tailles différentes. Les cellules sont transparentes et situées au centre des pattes d'or. **b.** Photographie d'une cellule au microscope optique.

l'autre entre lesquelles on injecte un ou plusieurs fluide), la plaque inférieure étant décorée avec des motifs carrés d'un semi-conducteur transparent, l'oxyde d'indium et d'étain (ITO) [12]. Deux fines couches d'or sont déposées de part et d'autre du carré d'ITO et permettent de relier le système à un générateur. On fait traverser la résistance d'ITO par un courant alternatif à la fréquence souhaitée. Cette dernière chauffe ainsi la solution acqueuse contenue dans la cellule par effet Joule. Plusieurs photographies de la cellule sont présentées dans la figure 8.1. Plusieurs dispositifs associés à différentes tailles du carré d'ITO, de 10 à 1400 μm et différentes hauteurs de cellules, de 10 à 100 μm ont été réalisés. Ces dispositifs permettent d'imposer au milieu une oscillation à une fréquence pouvant atteindre 10^5 Hz dans l'eau. Il est envisagé dans un premier temps d'observer le déplacement hors de l'équilibre d'un système chimique induit par une modulation de température en fonction de la fréquence. Le système chimique choisi est la réaction d'appariement et de désappariement de deux brins d'ADN (acide désoxyribonucléique) courts marqués par une sonde fluorescente dont le signal est affecté par la réaction d'appariement. L'observation de la cellule est réalisée par microscopie de fluorescence grâce à un microscope d'épifluorescence et à une caméra [86].

La réalisation expérimentale du procédé d'extraction d'une molécule décrite dans la seconde partie du manuscrit nécessite l'application d'un potentiel électrique en dents de scie dont on contrôle la géométrie. Ce dernier pourrait être réalisé grâce à un microdispositif en polydiméthylsiloxane (PDMS) représenté figure 8.2. Ce dispositif est composé d'un

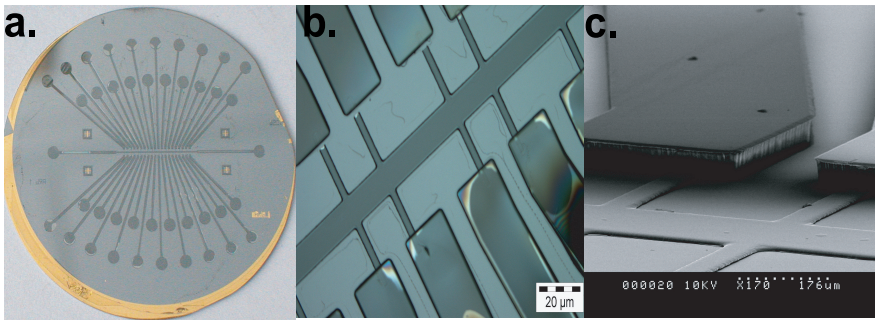


FIG. IV–2.8 – **a.** Photographie du moule en résine permettant de réaliser le microdispositif dédié à l'application d'un potentiel en dent de scie. **b.** Photographie d'un détail de la zone centrale au microscope. **c.** Photographie en trois dimensions prise au microscope à balayage électronique.

canal central de 20 μm de large, qui constitue le canal de séparation. Ce canal relie deux réservoirs qui peuvent contenir chacun une électrode grâce à laquelle on pourra générer la rampe de potentiel ψ_2. Un ensemble de canaux latéraux alternativement espacés d'une longueur x_1 et x_2 et alternativement reliés à 2 réservoirs maintenus à des potentiels différents V_+ et V_-, permettraient d'imposer au centre du canal un potentiel de géométrie voulue. Ce dispositif est actuellement à l'essai. Les systèmes chimiques avec lesquels il est envisagé de valider le protocole de séparation sont des couples acido-basiques fluorescents dérivés de la diOMe-Pipéridine, dont la cinétique a été caractérisée au sein de l'équipe [87].

Bibliographie

[1] R. Benzi, G. Parisi, A. Sutera, and A. Vulpiani. *Tellus*, 34 :10, 1982.

[2] C. Nicolis. *Solar Physics*, 74 :473, 1981.

[3] L. Gammataitoni, P. Hanggi, P. Jung, and F. Marchesoni. *Rev. Phys. Mod*, 70 :223, 1998.

[4] B. Nowakowski and A. Lemarchand. *Eurohys. Lett.*, 75 :530, 2005.

[5] B. Nowakowski and A. Lemarchand. *J. Phys. Condens. Matter*, 19 :065130, 2007.

[6] L. Jullien and A. Lemarchand. *J.Phys. Chem. B*, 105 :4415, 2001.

[7] L. Jullien, A. Lemarchand, and H. Lemarchand. *J. Chem. Phys.*, 112 :4970, 2000.

[8] A. Lemarchand and L. Jullien. *J. Phys. Chem. A.*, 109 :5770, 2005.

[9] D. Alcor, V. Croquette, L. Jullien, and A. Lemarchand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :8276, 2004.

[10] D. Alcor, J-F. Allemand, E. Cogné-Laage, V. Croquette, F. Ferrage, L. Jullien, A. Kononov, and A. Lemarchand. *J. Phys. Chem. B*, 109 :1318, 2005.

[11] J. T. Mettelal, D. Muzzey, C. Gomez-Uribe, and A. van Oudenaarden. *Science*, 128 :482, 2008.

[12] T. Barilero, P. O. Chapuis, D. Pujade, S. Guilet, V. Croquette, L. Jullien, S. Volz, and C. Gosse. *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*, page 1849, 2007.

[13] W. Kohn, A. D. Becke, and R. G. Parr. *J. Phys. Chem.*, 100 :12974, 1996.

[14] J. Gao and DG. Truhlar. *Ann Rev Phys Chem*, 53 :467–505, 2002.

[15] J. Pilmé, H. Berthoumieux, V. Robert, and P. Fleurat-Lessard. *Chem. Eur. J.*, 13 :5388, 2007.

[16] K. Wuthrich. *Science*, 243 :45–50, 1989.

[17] U. Alon. *An Introduction to Systems Biology.* Chapman and HAll, 2007.

[18] J. Gerhart and M. Kirschner. *Cells, Embryos and Evolution.* Blackwell Science, 1997.

[19] H. Kitano, A. Funahashi, Y. Matsuoka, and K. Oda. *Nat. Biotech*, 23 :961, 2005.

[20] J. Small and H. Kacser. *Eur. J. Biochem.*, 213 :613, 1993.

[21] C. Schilling, S. Shuster, B. Palsson, and R. Heinrich. *Biotechnol. Prog*, 15 :293, 1999.

[22] T. Yi, Y. Huang, M. I. Simon, and J. Doyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 :4649, 2000.

[23] H. Qian and E. Elson. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 101 :2828, 2004.

[24] G. Feher and M. Weissman. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 70 :870, 1973.

[25] D. Madge, E. Elson, and W. W. Webb. *Phys. Rev. Lett.*, 29 :705, 1972.

[26] E. L. Elson and W. W. Webb. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 4 :311, 1975.

[27] A. S. Torralba, K. Yu, P. Shen, P. J. Oefner, and J. Ross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 :1494, 2003.

[28] R. Diaz-Sierra, J. B. Lozano, and V. Fairen. *J. Phys. Chem. A*, 103 :337, 1999.

[29] F. C. Holstege et al. *Cell*, 95 :717, 1998.

[30] J. R. S. Newman, S. Ghaemmaghami, J. Ihmels, D. K. Breslow, M. Noble, J. L. DeRisi, and J. S. Weissman. *Nature*, 441 :840, 2006.

[31] H. Qian. *J. Phys. Chem. B*, 112 :8293–8301, 2006.

[32] R. A. Meyer, H. L. Sweeney, and M. J. Kushmerick. *AM. J. Physiol.*, 246 :365–377, 1984.

[33] S. Glasstone, K. J. Ladler, and H. Eyring. *The theory of rate processes : the kinetics of chemical reactions, viscosity, diffusion and electrochemical phenomena.* McGraw-Hill, New York, 1941.

[34] M. Eigen and L. DeMayer. *Techniques of organic chemistry, Vol. 8 - Investigation of rates and mechanism of reactions, part II.* Wiley Interscience, New York, 1963.

[35] T. Chevalier, I. Schreiber, and J. Ross. *J. Phys. Chem.*, 97 :6776, 1993.

[36] H. Schmidt, K.-H. Cho, and E. W. Jacobsen. *FEBS Journal*, 272 :2141, 2005.

[37] M. O. Vlad, A. Arkin, and J. Ross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :7223, 2004.

[38] R. Kisser, T. Nauser, P. Bugnon, PG. Lye, and WH Koppenol. *Chem. Res. Toxicol*, 10 :1285, 1997.

[39] C. M. Jones, E. R. Henry, Y. Hu, C. Chan, S. D. Luck, A. Bhuyan, H. Roder, J. Hofrichter, and W. A. Eaton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :11860, 1993.

[40] G. Bodenhausen and R. R. Ernst. *J. Am. Chem. Soc.*, 104 :1304, 1982.

[41] D. Madge, E. L. Elson, and W. W. Webb. *Biopolymers*, 13 :29, 1974.

[42] E. L. Elson and D. Madge. *Biopolymers*, 13 :1, 1974.

[43] E. L. Elson. *Traffic*, 11 :789, 2001.

[44] A. E. Kamholtz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson, and P. Yager. *Anal. Chem.*, 71 :5340, 1999.

[45] J. Maurer and P.Tabeling. *Europhys. Lett.*, 43 :29, 1998.

[46] D. Braun and A. Libchaber. *Appl. Phys. Lett.*, 83 :5554, 2003.

[47] E. V. Karnakova A. V. Karnaukov and J. R. Williamson. *Biophys. J.*, 92 :3459, 2007.

[48] C. G. Moles, P. Mendes, and J. R. Banga. *Genome Phys.*, 13 :2467, 2003.

[49] Y. D. Chen. *Adv. Chem. Phys.*, 37 :67, 1978.

[50] J. J. Burbaum, R. T. Raines, W. J. Albery, and J. R. Knowles. *Biochemistry*, 28 :9293, 1989.

[51] J. Wei and C.D. Prater. *Adv. Catalysis*, 13 :203, 1962.

[52] I. Remy and S. W. Michnick. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 :7678, 2001.

[53] X. Sunney, J. Yu, and W. Y. Yang. *Science*, 312 :228, 2006.

[54] W. Horsthemke and R. Lefever. *Noice-Induced Transition*. Springer, Berlin, 1984.

[55] E. D. Cera. *J. Chem. Phys.*, 265 :7260, 1991.

[56] H. Qian and M. Qian. *Phys. Rev. Lett.*, 84 :2271, 2000.

[57] A. Lemarchand and B. Nowakowski. *Physica A*, 331 :409, 2004.

[58] A. Lemarchand and B. Nowakowski. *Molecular Simulation*, 30 :773, 2004.

[59] R. D. Astumian, B. Robertson, R. S. Li, and J. Ross. *J. Chem. Phys.*, 96 :6536, 1992.

[60] M. Schell, K. Kundu, and J. Ross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :424, 1987.

[61] R. D. Astumian, P. B. Chock, T. Y. Tsong, and H. V. Westerhoff. *Phys. Rev. A*, 39 :6416, 1989.

[62] R. D. Astumian and B. Robertson. *J. Chem. Phys.*, 91 :4891, 1989.

[63] R. D. Astumian and B. Robertson. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :11063, 1993.

[64] V. S. Markin, D. Liu, M. D. Rosenberg, and T. Y. Tsong. *Biophys. J.*, 61 :1045, 1992.

[65] H. V. Westerhoff, T. Y. Tsong, P. B. Chock, Y.-D. Chen, and R. D. Astumian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :4734, 1986.

[66] D. Liu, R. D. Astumian, and T. Y. Tsong. *J. Biol. Chem.*, 265 :7260, 1980.

[67] H. Berthoumieux, L. Jullien, and A. Lemarchand. *Phys. Rev. E*, 76 :056112. Sélectionné par Virtual Journal of Biological Physics Research, Nov. 15, Vol. 14(10), 2007, 2007.

[68] A. Bourdoncle, A. Estevez Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, and J-L. Mergny. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :11094, 2006.

[69] Y. D. Chen. *Adv. Chem. Phys.*, 37 :67, 1978.

[70] M. Perutz. *Nature*, 228 :726, 1970.

[71] J. C. Giddings. *Unified Separation Science*. Wiley, New York, Chichester, 1991.

[72] C. L. Cantor and P. R. Schimmel. *Biophysical chemistry*. Freeman and co., San Francisco, 1980.

[73] K. J. Mysels. *J. Chem. Phys.*, 24 :371, 1956.

[74] J. C. Giddings. *J. Chem. Phys.*, 26 :1755, 1957.

[75] K. F. Bowden. *J. Fluid. Mech*, 21 :83, 1965.

[76] P. C. Chatwin. *J. Fluid. Mech*, 71 :513, 1975.

[77] C. Van Den Broeck. *Physica A*, 168 :677, 1990.

[78] I. Claes and C. Van Den Broeck. *Phys. Rev. A*, 71 :513, 1991.

[79] M. O. Magnaso. *Phys. Rev. Lett.*, 71 :1477, 1993.

[80] S. Leibler. *Nature*, 370 :412, 1994.

[81] J. Rousselet, L. Salome, A. Ajdari, and J. Prost. *Nature*, 370 :447, 1994.

[82] R. D. Astumian. *Science*, 276 :917, 1997.

[83] F. Julicher, A. Ajdari, and J. Prost. *Rev. Mod. Phys.*, 69 :1269, 1997.

[84] H. Berthoumieux, L. Jullien, and A. Lemarchand. *J. Phys. Chem. B*, 111 :2045, 2007.

[85] C. Antoine and A. Lemarchand. *J. Chem. Phys.*, 126 :104103, 2007.

[86] A. Estevez-Torres, C. Gosse, T. Le Saux, J-F. Allemand, V. Croquette, H. Berthoumieux, A. Lemarchand, and L. Jullien. *Anal. Chem.*, 79 :8222, 2007.

[87] J-B. Salmon, C. Dubrocq, P. Tabeling, S. Charier, D. Alcor, and L. Jullien. *Anal. Chem.*, 77 :3417, 2005.

Cinquième partie

Annexe : articles