

Pilotage de la diffusion effective des molécules

Une étape vers le contrôle du mouvement moléculaire orienté

Damien Alcor, Jean-François Allemand, Isabelle Aujard, Thomas Barilero, Jean-Bernard Baudin, Chouaha Benbrahim, David Bensimon, Anne Bourdoncle, Sandrine Charier, Emmanuelle Cogné-Laage, Vincent Croquette, André Estevez-Torres, Nathalie Gagey, Ludovic Jullien, Annie Lemarchand, Hervé Lemarchand, Adrien Meglio, Pierre Neveu et Odile Ruel

Résumé « Contrôler » le mouvement désordonné des molécules n'appartient pas aux songes. Les êtres vivants en apportent une évidente démonstration : au sein du mélange réactif qu'est le cytoplasme cellulaire, des molécules exécutent un ballet orienté. L'étonnement du chimiste ne devrait pas surgir de l'existence du mouvement, mais de son orientation et de sa sélectivité. Il y a ici matière à analyser et à comprendre ce qui est manifeste. Nous cherchons ainsi à reproduire certaines caractéristiques fondamentales des moteurs moléculaires biologiques à l'aide de « cargos moléculaires » plus simples ; cet objectif est difficile. Nous avons donc choisi d'exercer tout d'abord un contrôle analogue du mouvement moléculaire dans un cadre moins contraignant, celui de la diffusion : l'orientation du mouvement est perdue, la sélectivité est en revanche conservée. Nous avons récemment démontré qu'il est possible de « pêcher » n'importe quelle molécule réactive dans un mélange lorsque celui-ci est soumis à l'action d'un champ approprié, spatialement uniforme et périodique dans le temps. Il suffit pour cela de synchroniser les durées de vie des états en interconversion et la période du champ. Dans ces conditions, la diffusion apparente des réactifs est en effet exacerbée et il devient possible de réaliser sélectivement leur extraction.

Mots-clés **Complexité, mouvement moléculaire orienté, chromatographie haute performance sous contrôle cinétique, dispersion.**

Abstract **Tuning the effective molecular diffusion: a step toward control over oriented molecular motion**
« Control » over disordered molecular motion is not a dream as clearly evidenced by living beings. In the reactive mixture of cell cytoplasm, molecules perform an oriented ballet. Astonishment of the chemist should not here originate only from the motion, but much more from its orientation as well as from its selectivity. Much has to be analyzed and a lot has to be imagined to account for this observation. We attempt to reproduce a few basic features of biological motors in simpler « molecular cargos ». This goal is difficult. We first chose to exert an analogous control over molecular motion in a less compelling situation, that of diffusion: the orientation of motion is lost, in contrast selectivity is maintained. We recently demonstrated that it is possible to « fish » any reactant in a mixture submitted to the action of an appropriate uniform and time-periodic field when its period is matched to the lifetimes of the interconverting states of the desired reactant. Under such conditions, the effective diffusion of the latter can be considerably increased and it becomes possible to selectively perform its extraction.

Keywords **Complexity, oriented molecular motion, high performance chromatography under kinetic control, dispersion.**

Depuis 200 ans, la chimie a été efficace. L'accumulation de données expérimentales et l'existence d'outils théoriques rendent aujourd'hui possibles la synthèse et la prévision des propriétés physico-chimiques de molécules et d'assemblages supramoléculaires, même compliqués : à l'échelle de l'atome et de la molécule, les relations structure/propriétés semblent bien établies. Beaucoup d'aspects du monde vivant sont devenus ainsi intelligibles au chimiste. Les voies métaboliques principales de la biologie sont connues [1] ; elles impliquent des molécules dont la structure

et la réactivité se conforment aux règles canoniques de la chimie [2]. Les structures de nombreuses macromolécules et assemblages supramoléculaires biologiques (acides nucléiques, protéines, bicouches lipidiques...) ont été résolues et certaines propriétés fonctionnelles de ces objets sont comprises, au moins qualitativement (catalyse, transfert d'énergie au cours de la photosynthèse...) [3].

Dans ce contexte, le chimiste peut désormais avoir pour objectif des « propriétés » plutôt que des (supra)molécules spécifiques : la cible n'est plus une structure, mais un

comportement. Plusieurs fonctions des systèmes biologiques ont ainsi été reproduites par les « chimistes supramoléculaires » [4]. Certaines fonctions essentielles des êtres vivants résistent cependant à leur art et à leur entendement : les transductions d'énergie libre (énergie chimique en travail mécanique par exemple) [5], l'émergence de phénomènes tels que l'autocatalyse, la catalyse croisée, l'autoreproduction, la compétition, la synergie...

Plus que de notre incapacité à synthétiser des molécules aussi grosses et « compliquées » que des catalyseurs enzymatiques ou des acides nucléiques, les limites de notre compréhension pourraient résulter d'une lecture trop « locale » des phénomènes du monde vivant. Il ne s'agirait pas alors d'examiner séparément les structures des biomolécules ou les réactions du métabolisme, mais de les considérer de façon globale à l'échelle du système dans son ensemble. Il resterait alors à établir un lien entre les structures/métabolismes/fonctions élémentaires des constituants de la matière vivante et les fonctions résultant de leur intégration, souvent qualifiés de « complexes » [6] : un nouveau type de relation structure/propriétés de la matière est peut-être à construire à un niveau de description plus vaste que celui de l'atome et de la molécule (figure 1).

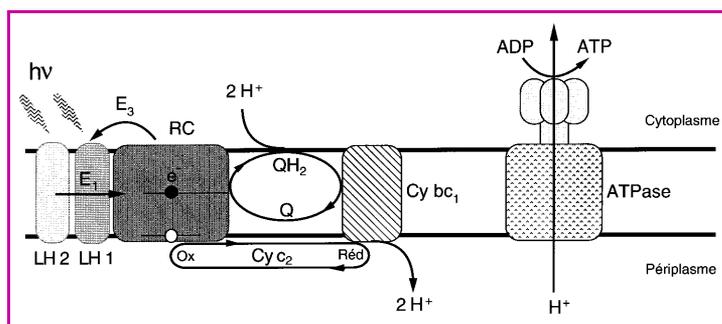


Figure 1 - Schéma de l'appareil photosynthétique de la bactérie pourpre.

Cette usine chimique nanométrique incorporée dans la paroi membranaire bactérienne réalise la conversion d'énergie libre initialement contenue dans des photons solaires ($h\nu$) en énergie chimique (synthèse de l'ATP à partir d'ADP). Cette conversion implique plusieurs milliers de molécules. Les antennes LH1 et LH2 collectent les photons, jouant le rôle de source primaire d'énergie, et assurent leur transfert vers le centre réactionnel (RC). C'est à son niveau qu'intervient une séparation de charge menant au transport de protons au travers de la membrane grâce à la médiation de catalyseurs d'oxydoréduction : quinones (Q) et cytochromes (Cy). L'orientation de l'appareil photosynthétique est fixe vis-à-vis du compartiment interne bactérien de sorte que l'illumination détermine un flux orienté de protons de l'intérieur vers l'extérieur de la bactérie. Il se crée ainsi une situation de hors-équilibre : la concentration de proton du milieu interne devient inférieure à celle du milieu externe. Au cours de l'évolution, des systèmes moléculaires ont réussi à utiliser ce gradient transmembranaire de protons, agissant comme une source secondaire d'énergie libre, pour réaliser des opérations de synthèse chimique. L'ATP synthase (ATPase) incorporée dans la paroi bactérienne catalyse ainsi la relaxation du gradient de protons et la couple à la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Cette opération de catalyse s'accompagne d'un mouvement de rotation moléculaire (voir figure 2). Au bilan, l'illumination maintient l'avancement de la réaction $ADP + P_i = ATP$ à une valeur stationnaire différente de sa valeur d'équilibre (P_i désigne une source de phosphore inorganique). La situation stationnaire de hors-équilibre ainsi créée se révèle cruciale en biologie. Considérée en soi, elle est complexe : le chimiste ignore *a priori* quelle approche mettre en œuvre pour maintenir une réaction quelconque dans un état stationnaire de hors-équilibre. La nature fournit une solution dont l'intelligibilité nécessite la prise en compte simultanée de la structure individuelle des composants élémentaires, de leur assemblage supramoléculaire, des propriétés thermodynamiques et cinétiques de l'ensemble, et des contraintes extérieures (pH, concentration en réactifs...).

Dans ce dernier contexte, notre consortium de chimistes et de physiciens s'intéresse à la conception, à la synthèse et à l'étude de systèmes modèles artificiels reproduisant certaines des fonctions mal comprises rencontrées en biologie. Il s'agit d'évaluer jusqu'à quel point les structures biologiques ainsi que les réactions dans lesquelles elles sont engagées constituent des unités chimiques minimales

destinées à remplir les fonctions pour lesquelles elles semblent avoir été sélectionnées au cours de l'évolution (notion de contingence). Au-delà, nous estimons que ce cadre synthétique nouveau ouvre d'inédites et fécondes perspectives dans différents domaines de la chimie.

Un cadre théorique pour la complexité chimique : l'assemblage de modules chimiques sous contraintes physiques

Plusieurs modèles mathématiques rendant compte de comportements complexes ont été proposés au cours des années 1970 [7-8]. Leurs propriétés dynamiques permettent de faire émerger bistabilité, oscillations, chaos... effectivement observés en biologie. Malheureusement, ces modèles macroscopiques ne correspondent à aucune loi cinétique chimique simple couramment observée en chimie ; la réaction de Belousov-Zhabotinsky demeure une singularité. Nous ne disposons en fait aujourd'hui d'aucune clé permettant de définir les structures microscopiques (types de molécules ou de réactions chimiques) qui pourraient donner lieu à de tels comportements dynamiques. Ceci est tout particulièrement frustrant en chimie organique sur laquelle repose la formation des métabolites biologiques.

Nous abordons l'ingénierie moléculaire de comportements complexes selon une approche inverse. Au lieu de rechercher des systèmes dont les propriétés dynamiques obéiraient aux modèles précédents, nous étudions des classes de structures et de réactions chimiques « classiques » faisant apparaître des comportements « complexes » après une réduction mécanistique [9] du système dynamique complet qui implique des valeurs particulières des constantes cinétiques sous contraintes externes (contact avec des réservoirs de matière ou des potentiels d'interaction par exemple). Dans notre approche, la complexité macroscopique se résout aux échelles inférieures de description.

Pour attaquer ce problème, nous effectuons l'hypothèse que les règles ayant gouverné l'évolution moléculaire sont essentiellement identiques à celles impliquées dans le « bricolage évolutif de la biologie » [10] ; en particulier, nous considérons que les fonctions complexes de la chimie résultent de l'assemblage heureux de modules élémentaires constitués de structures moléculaires et/ou de réactions chimiques [11-14]. Deux conclusions majeures émergent de nos analyses théoriques : i) un petit nombre de processus microscopiques spécifiques est souvent suffisant pour reproduire des phénomènes complexes à l'échelle macroscopique ; ii) la maîtrise de la cinétique chimique joue un rôle essentiel dans l'ingénierie de phénomènes complexes. Les valeurs des constantes cinétiques de réaction doivent le plus souvent se situer dans des domaines étroits.

L'exemple du mouvement moléculaire orienté

Convertir de l'énergie chimique en travail constitue l'un des buts majeurs de la chimie. Les batteries, les cellules électrolytiques... sont des objets familiers couramment utilisés pour réaliser cette fonction. En revanche, les conversions directes d'énergie chimique en travail mécanique sont rares en chimie. Le mouvement moléculaire orienté est cependant couramment observé chez de nombreux organismes vivants.

L'ATP synthase impliquée dans la conversion d'un gradient de proton transmembranaire en synthèse d'ATP

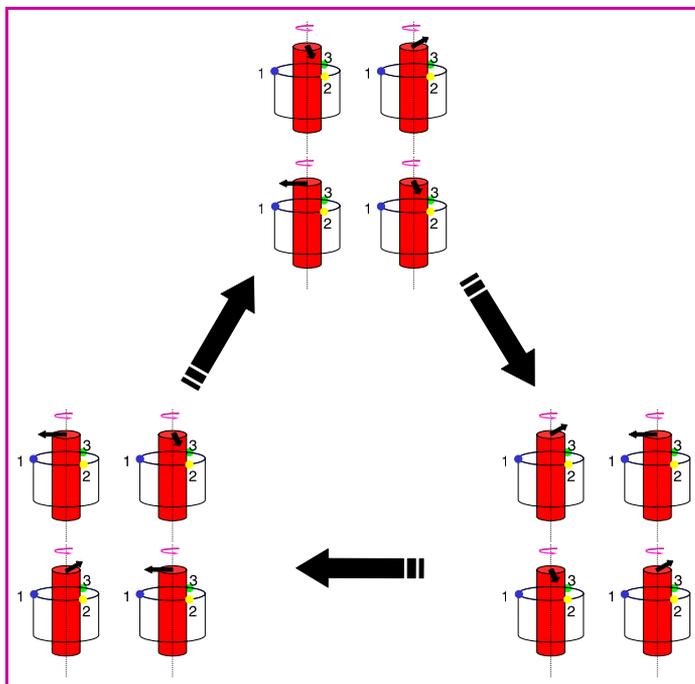


Figure 2 - Illustration du contrôle du mouvement orienté à l'échelle de la molécule individuelle.

On utilise ici l'exemple de l'ATPase (voir figure 1). Dans cette structure protéique incorporée en milieu membranaire, un rotor (unité F_1 représentée en rouge) est animé d'un mouvement de rotation au sein d'un stator (unité F_0 symbolisée par un cylindre incolore). Trois conformations de l'ATPase sont privilégiées ; elles sont repérées grâce à la position relative de la flèche portée par le rotor avec les positions 1, 2 et 3 du stator. Toutes les ATPases bactériennes (quatre sur la figure) décrivent en régime stationnaire les trois états privilégiés dans la direction unique : $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$: le mouvement est orienté à l'échelle individuelle.

fournit un bel exemple de mouvement moléculaire orienté [15]. Dans ce système biologique, la rotation d'une unité protéique mobile, le rotor F_1 -ATPase, s'effectue à l'état permanent dans une bague protéique fixe, le stator F_0 -ATPase, par pas de 120° dans une direction unique (figure 2).

La nature ne contrôle pas ici la composition d'un mélange constitué d'un ensemble de molécules comme on peut classiquement l'effectuer en chimie au cours d'une transformation cyclique (figure 3) [16], mais elle contrôle de façon spectaculaire le mouvement moléculaire à l'échelle individuelle.

Les mécanismes responsables de l'orientation du mouvement individuel des molécules biologiques demeurent largement inconnus. Plusieurs approches théoriques ont été explorées. L'un des mécanismes proposés les plus satisfaisants est une généralisation du « cliquet thermique » (« thermal ratchet ») de R. Feynman [17]. Il rend vraisemblablement compte du comportement de systèmes naturels tels que l'ARN polymérase/ADN. Dans ce modèle (« moteur moléculaire brownien »), le mouvement moléculaire orienté résulte de l'assemblage de trois modules chimiques : deux éléments structuraux (deux molécules ou bien deux parties d'une même molécule) – le *cargo* et le *rail* – et une réaction chimique. Le *cargo* constitue l'élément mobile et le *rail* – l'élément qui interdit son échappement par l'existence d'une interaction attractive (analogue à une locomotive qui reste dans ses rails sous l'action de la pesanteur). La réaction chimique, hors-équilibre, provoque l'interconversion du *cargo moléculaire* entre deux états interagissant différemment avec le potentiel localement asymétrique créé par le rail. Dans des circonstances favorables, les étapes de diffusion

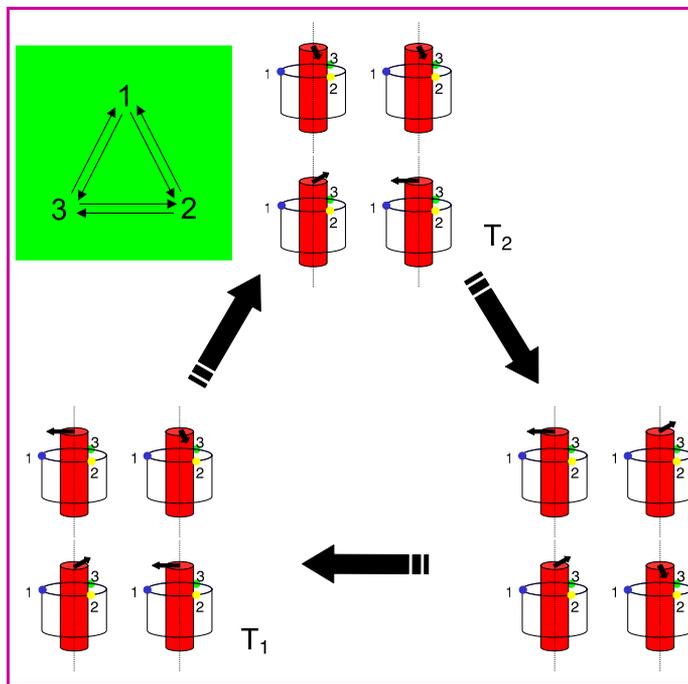


Figure 3 - La transformation cyclique d'un ensemble de molécules n'implique pas le contrôle du mouvement orienté à l'échelle de la molécule individuelle.

On s'intéresse à un système constitué de quatre molécules identiques. Chacune s'échange entre trois formes : 1, 2 et 3 (par exemple trois conformères ; on symbolise ces molécules comme sur la figure 2 afin de faciliter la comparaison : la flèche est dirigée vers 1, 2 ou 3 afin de préciser la forme dans laquelle se trouve la molécule considérée). On impose au système une transformation cyclique, par exemple de la température : $T_1 \rightarrow T_2 \rightarrow T_3 \rightarrow T_1$ avec $T_3 > T_2 > T_1$ (on suppose que l'équilibre est atteint avant toute nouvelle modification de la température). A une température donnée, par exemple T_1 , la composition d'équilibre du système dépend des valeurs des constantes d'équilibre associées aux réactions d'interconversion représentées dans l'encadré vert. Le dessin du système à T_1 doit ici être interprété statistiquement : en moyenne, le système contient deux molécules dans l'état 1, une dans l'état 2 et une dans l'état 3. A l'échelle de chaque molécule du système, cela signifie que la probabilité d'être dans l'état 1 vaut $\frac{1}{2}$, dans l'état 2, $\frac{1}{4}$ et dans l'état 3, $\frac{1}{4}$. Au cours du cycle thermodynamique, la dépendance des trois constantes d'équilibre avec la température détermine l'évolution de la composition. Dans l'exemple choisi, l'espèce majoritairement présente décrit le cycle $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$ dans une direction unique. A l'échelle de la molécule individuelle, ce cycle contraint l'évolution de la loi de probabilité d'occupation des trois formes 1, 2 et 3. En revanche, l'orientation du cycle thermodynamique à l'échelle du système n'implique nullement que chaque molécule décrit les trois formes considérées dans la direction unique : $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$; un nombre gigantesque de trajectoires individuelles sont par exemple compatibles avec le passage de l'état du système de la température T_1 à la température T_2 . Le contrôle de la direction du mouvement individuel de la figure 2 implique nécessairement des aspects cinétiques seuls à même de contrôler les mécanismes d'interconversion (voir figure 4).

et migration résultantes déterminent l'orientation du mouvement (figure 4).

Le modèle du moteur moléculaire brownien a déjà été évalué expérimentalement. Dans les études correspondantes, l'échange entre les états libre et lié résulte, non pas de la réalisation d'une réaction chimique, mais de l'application d'un champ externe périodique [18-20]. Nous avons évalué le modèle du moteur moléculaire brownien dans un contexte expérimental plus proche de celui des systèmes biologiques, par exemple celui qui relie l'hydrolyse de l'ATP au mouvement [11]. En effet, dans ce cas, l'échange entre l'état libre et l'état lié du *cargo* moléculaire résulte bien d'une réaction chimique hors-équilibre. Du point de vue de l'ingénierie, nous concluons qu'il est difficile de mettre en œuvre cette stratégie par une conception raisonnée si le *cargo* moléculaire doit se déplacer dans le champ nanoscopique créé par un rail moléculaire, comme dans les systèmes naturels. Il est en effet difficile d'évaluer *a priori* tous les potentiels

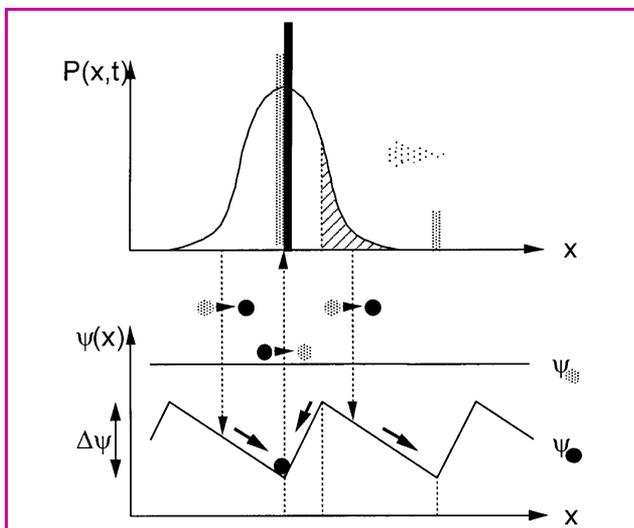


Figure 4 - Une réaction chimique « pilote », hors-équilibre (équivalente à la réaction $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ dans le cas du système ARN polymérase/ADN), contrôle l'échange d'un *cargo moléculaire* (l'ARN polymérase dans l'exemple considéré) qui présente deux états distincts interagissant différemment avec un potentiel périodique et localement asymétrique, ψ , créé par un rail (ADN dans le système ARN polymérase/ADN, ou par un réseau de micro-électrodes comme ce que nous envisageons de réaliser).

Le *cargo moléculaire*, initialement dans l'état lié qui « voit » le potentiel périodique (disque noir localisé en un point donné ; la fonction de probabilité de présence correspondante est une fonction de Dirac) passe à l'état libre qui « voit » le potentiel plat (disques gris), du fait d'une réaction chimique (fixation d'un résidu phosphate sur la surface du cargo résultant de l'hydrolyse de l'ATP par exemple) ; il commence alors à diffuser (la fonction de probabilité devient plus large). Si la durée de vie de l'état libre est suffisamment grande, le *cargo moléculaire* peut franchir la barrière de potentiel. De retour à l'état lié (par perte du résidu phosphate par hydrolyse par exemple), le *cargo moléculaire* « ressent » à nouveau l'action du champ (on obtient finalement un profil de concentration bi-modal après un cycle). L'asymétrie du profil de potentiel est à l'origine du mouvement orienté (ici vers la droite pour un état lié positivement chargé). L'optimisation de la durée de vie moyenne des deux états du cargo moléculaire s'exprime par des relations de résonance impliquant la cinétique chimique, la diffusion et les caractéristiques du champ. Seules les molécules satisfaisant à ces relations de résonance se mettent en mouvement orienté ; la création du mouvement est un phénomène sélectif.

d'interactions moléculaires nécessaires. Il s'agit par ailleurs d'éviter que le cargo ne quitte son rail et de maintenir le système hors-équilibre afin d'obtenir un mouvement orienté en régime stationnaire. L'intégration de l'ensemble de ces contraintes nous amène actuellement à privilégier l'évaluation du cadre théorique du moteur moléculaire brownien au travers de la mise en mouvement de molécules réactives dans un champ microscopique obtenu à l'aide d'un réseau de micro-électrodes. Du point de vue de la contingence biologique, le mouvement moléculaire orienté est un phénomène extraordinaire si l'on considère attentivement les contraintes impliquées dans son émergence.

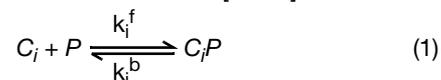
Séparation sous contrôle de la diffusion en champ alternatif

Afin d'observer l'un des comportements complexes que nous avons prédits [11-14], il est possible de concevoir un système qui obéit au mécanisme recherché, de mesurer les constantes cinétiques des réactions chimiques dont il est l'objet, puis d'amener les valeurs de ces constantes cinétiques dans la gamme désirée en modifiant la structure des constituants. Malheureusement, une telle démarche est

difficile à mettre en œuvre en pratique. Il faudrait par exemple contrôler les valeurs de plus de dix constantes cinétiques pour observer certains phénomènes dont nous avons prédit l'existence dans la catalyse bi-site hors-équilibre [12-13].

Nous nous sommes donc engagés dans une démarche d'ingénierie inverse : nous développons des protocoles de chromatographie permettant d'extraire d'un mélange des espèces chimiques réagissant avec un mécanisme et des constantes cinétiques prédéfinis. Nous avons développé pour cela un cadre théorique voisin de celui qui est mis en œuvre dans l'ingénierie d'un moteur moléculaire brownien. La chromatographie exploite en effet mise en mouvement et sélectivité, deux caractéristiques du modèle exposé au paragraphe précédent. En raison de l'analogie des modèles théoriques, la validation expérimentale du protocole de chromatographie présenté ci-dessous peut être en fait considérée comme une première étape de l'obtention du mouvement moléculaire orienté. Néanmoins, nous nous appuyons ici sur une propriété de la diffusion des espèces en l'absence de déplacement moyen. La sélectivité de la méthode de séparation repose sur un phénomène de résonance stochastique considérée dans sa définition la plus générale : la variation non monotone d'une grandeur en fonction de paramètres associés à un processus aléatoire. Nous allons montrer ici que le coefficient de diffusion apparent des constituants d'un mélange passe par un maximum en fonction des constantes cinétiques des réactions chimiques dont les constituants sont les objets.

Nous avons choisi de « pêcher » tout d'abord le mécanisme le plus simple de la chimie en cherchant à extraire d'un mélange de molécules réactives C_i , celle(s) qui réagirai(en)t avec des constantes cinétiques particulières vis-à-vis d'une cible P selon la réaction [21-22] :



Dans le système expérimental étudié, il s'est agi d'extraire sous contrôle cinétique d'un mélange de constituants similaires, un colorant C_i donnant un complexe d'inclusion C_iP avec une molécule creuse P : l' α -cyclodextrine (figure 5).

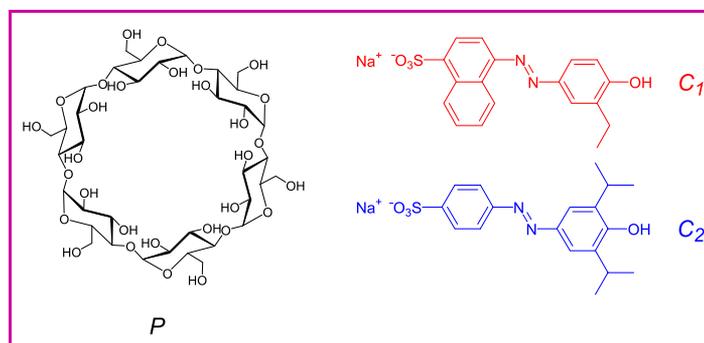


Figure 5 - Système expérimental utilisé au cours de cette étude.

P est l' α -cyclodextrine et C_1 et C_2 sont deux colorants diazoïques similaires portant deux charges négatives à $\text{pH} = 12$ et pouvant donner un complexe d'inclusion avec l' α -cyclodextrine.

Dans une chromatographie d'affinité « classique » mettant en œuvre la réaction (1), la distance parcourue par une molécule de constituant C_i dépend du temps passé en moyenne dans les états en interconversion : C_i et C_iP . La vitesse moyenne $\langle v_i \rangle$ de la population des molécules C_i est ainsi gouvernée par la constante de l'équilibre d'association

$K_i = k_i^f/k_i^b$ où les constantes cinétiques k_i^f et k_i^b sont respectivement associées aux réactions directe et inverse de (1) : les espèces présentant le moins d'affinité pour le support chromatographique sont les premières éluées.

Afin de réaliser l'extraction d'un constituant prédéfini par son mécanisme et sa cinétique au sein d'un mélange, nous avons imaginé un nouveau protocole reposant sur les cinétiques d'association et de dissociation, décrites par k_i^f et k_i^b . Pour mettre en valeur les propriétés cinétiques du système tout en induisant un déplacement moléculaire, nous appliquons un champ uniforme périodique de valeur moyenne nulle dont la période est accordée à la dynamique de la réaction (1). Ce peut être un champ électrique si, comme dans l'exemple représenté à la figure 5, l'un au moins des états C_i et C_iP est sensible à ce type de champ. Dans de telles conditions, les constituants C_i ne se déplacent pas en moyenne, mais ils présentent un comportement analogue à une diffusion [21]. Le coefficient de diffusion effectif correspondant, $D_{\text{eff},i}$, est la somme de deux contributions : $D_{\text{diff},i}$ qui caractérise le couplage stationnaire entre la diffusion et la réaction (1), et $D_{\text{disp},i}$ qui résulte de la modulation du champ.

Le terme associé à la diffusion $D_{\text{diff},i} = p_{C_i}D_{C_i} + p_{C_iP}D_{C_iP}$ correspond à la moyenne pondérée des coefficients de diffusion de C_i et de C_iP , D_{C_i} et D_{C_iP} . Les coefficients de pondération $p_{C_i} = 1/(K_i[P] + 1)$ et $p_{C_iP} = K_i[P]/(K_i[P] + 1)$ désignent respectivement les proportions relatives stationnaires de C_i et C_iP qui ne dépendent que de la constante thermodynamique K_i et de la concentration $[P]$. Pour des valeurs suffisamment grandes du champ, la contribution de $D_{\text{diff},i}$ à $D_{\text{eff},i}$ est négligeable.

Le terme dispersif $D_{\text{disp},i}$ résulte du couplage entre la réaction (1) et le champ modulé lorsque les mobilités de C_i et de C_iP sont différentes. C'est le cas considéré à la figure 5 : avec une charge identique mais des formes et dimensions distinctes, les colorants C_i et leurs complexes C_iP possèdent des mobilités électrophorétiques différentes, μ_{C_i} et μ_{C_iP} . Pour un champ périodique sinusoïdal d'amplitude a et de pulsation ω , $D_{\text{disp},i}$ s'écrit :

$$D_{\text{disp},i} = \frac{[a(\mu_{C_i} - \mu_{C_iP})]^2 k_i^f k_i^b}{2(k_i^f + k_i^b)} \times \frac{1}{[(k_i^f + k_i^b)^2 + \omega^2]} \quad (2)$$

avec $\kappa_i^f = k_i^f[P]$. Le premier facteur de l'expression (2) existe déjà lors du couplage de la réaction (1) avec un champ constant. Il manifeste à l'échelle macroscopique le caractère aléatoire de la réaction (1) : au cours de la migration dans le support chromatographique, les trajectoires individuelles des molécules d'un type donné C_i/C_iP ne sont pas identiques ; on observe une dispersion de la population autour de la position moyenne $\langle x_i \rangle$. La vitesse de dispersion envisagée comme une fonction des constantes cinétiques est maximisée quand $\kappa_i^f = k_i^b$, et maximale pour les réactions associées aux plus petites constantes cinétiques de réaction. Ce résultat découle de la loi des grands nombres : le comportement de l'ensemble converge vers le comportement moyen lorsque la fréquence d'échange augmente selon la réaction (1). Le second facteur de l'expression (2) est une fonction de coupure qui s'annule lorsque la réaction devient suffisamment lente par rapport au temps d'inversion du champ électrique. Il traduit que, pour que la dispersion se manifeste, la réaction (1) doit se produire alors que les profils de concentration de C_i et de C_iP ne sont pas superposés : le temps de relaxation de la réaction (1), $\tau_{\text{rxn},i} = 1/(k_i^f + k_i^b)$, évaluant la durée caractéristique du retour du système vers l'équilibre chimique [23], doit donc être plus petit qu'une

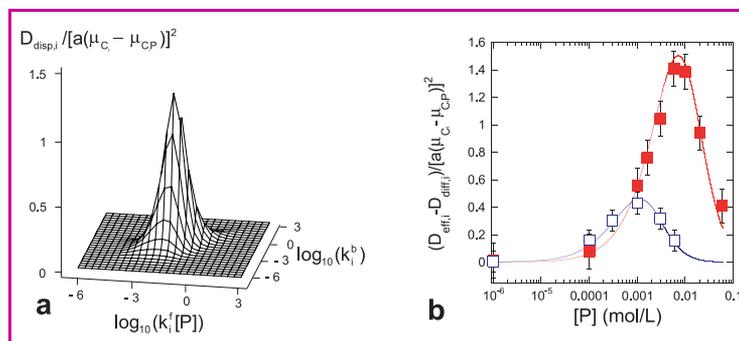


Figure 6 - Contribution dispersive normalisée au coefficient de diffusion effectif d'une espèce C_i soumise à la réaction (1) en présence d'un champ électrique périodique créneau.

a : Variation théorique avec $\kappa_i^f = k_i^f[P]$ et k_i^b (période du champ $T = 90$ s) ;
b : Variation expérimentale avec $[P]$ (carrés bleus pleins : C_1 , 298 K ; carrés vides rouges : C_2 , 283 K) ; la figure présente aussi les ajustements obtenus à partir de l'expression théorique. Solvant : tampon acide acétique, acide borique, acide phosphorique $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 12$.

demi-période du champ $T = 2\pi/\omega$. Pour un champ périodique sinusoïdal, il s'agit d'une fonction lorentzienne classique. Du fait de sa variation quadratique avec a , $D_{\text{disp},i}$ excède $D_{\text{diff},i}$ pour des valeurs suffisamment grandes de a . Dans un tel régime, la dispersion se manifeste comme une diffusion forcée. Comme le montre la figure 6a, $D_{\text{disp},i}$ est une fonction symétrique de κ_i^f et de k_i^b à période T fixée qui présente un maximum unique de coordonnées :

$$\kappa_i^f = k_i^b = \mathcal{N}T \quad (3)$$

où \mathcal{N} est un facteur numérique qui dépend de la nature de l'excitation périodique (sinusoïdale : $\mathcal{N} = \pi$; créneau : $\mathcal{N} \approx 3,212$).

Pour valider le comportement théorique prédit sur la figure 6a, nous avons mesuré le coefficient de diffusion effectif de C_1 et de C_2 pour différentes concentrations de P afin d'altérer la valeur de $\kappa_i^f = k_i^f[P]$; en fait, k_i^b est fixé pour un colorant donné et l'analyse de $D_{\text{disp},i}(\kappa_i^f, k_i^b)$ se réduit ici à l'étude de $D_{\text{disp},i}([P])$. Les valeurs de k_i^b de la littérature [24-25] ont été utilisées pour déterminer la période du champ électrique périodique créneau ($a \approx 3000 \text{ V.m}^{-1}$). Pour l'intégralité des expériences impliquant un colorant donné, elle a été fixée à la valeur spécifique $T = 3,212/k_i^b$ de l'équation (3) (90 s pour C_1 à 298 K et 31 s pour C_2 à 283 K). Afin de démontrer le caractère de type diffusion du mouvement et de mesurer $D_{\text{eff},i}$, nous avons effectué une analyse de Fourier des profils de concentration des colorants à partir d'une marche initiale et à différents instants. Ces profils ont été observés à l'aide d'une caméra dans une cellule électrophorétique transparente et thermostatée contenant un gel d'agarose à 1 % afin d'éviter les phénomènes d'électro-osmose. La figure 6b montre les contributions dispersives normalisées aux coefficients de diffusion effectifs ($D_{\text{eff},i} - D_{\text{diff},i})/[a(\mu_{C_i} - \mu_{C_iP})]^2$ en fonction de $[P]$. Les ajustements par la loi théorique en utilisant les constantes cinétiques κ_i^f et k_i^b comme seuls paramètres ajustables sont satisfaisants pour les deux colorants et fournissent des valeurs proches de celles de la littérature aux mêmes températures dans des conditions de pH similaires. En particulier, la position du maximum du coefficient de dispersion $D_{\text{disp},i}([P])$ obéit raisonnablement à la condition de résonance (3). On observe sur la figure 6b $[P]_1^{\text{Ddisp,max}} = 7,5 \text{ mM}$ et $[P]_2^{\text{Ddisp,max}} = 1,1 \text{ mM}$; $1/K_1 = 5,8 \text{ mM}$ et $1/K_2 = 1,0 \text{ mM}$ étaient respectivement attendus à partir des données de la littérature.

Ces résultats constituent la première observation en chimie du phénomène de dispersion en champ oscillant. Plus significativement, ils démontrent en validant notre cadre théorique qu'il est possible d'augmenter considérablement le coefficient de diffusion effectif de n'importe quel réactif bien au-delà de sa valeur intrinsèque $D_{\text{diff},i}$ en accordant la fréquence du champ d'excitation dans un régime de « résonance ».

Les équations (2) et (3) sont importantes afin de réaliser l'adressage et la séparation physique d'un constituant donné C_i^R dans un mélange sur des critères cinétiques. Tout d'abord, $D_{\text{disp},i}$ dépend explicitement des constantes cinétiques k_i^f et k_i^b , et non pas seulement de K_i . De plus, $D_{\text{eff},i}^R$ peut toujours être rendu le plus grand parmi les $D_{\text{eff},i}$ si C_i^R est « résonnant », c'est-à-dire si la concentration en P et la période du champ sont choisis de sorte que les constantes cinétiques associées à C_i^R obéissent aux conditions de résonance données dans l'équation (3). Un protocole de séparation peut dès lors être facilement conçu (figure 7) :

- i) déposer le mélange $\{C_i\}$ en un point du milieu contenant P à la concentration $[P]_i^R = 1/K_i^R = k_i^b/k_i^f$
- ii) appliquer un champ périodique uniforme avec $1/T_i^R = k_i^b/k_i^f$ et λ tels que $D_{\text{eff},i}^R \approx D_{\text{disp},i}^R$
- iii) et collecter l'espèce C_i^R ciblée dans les extrémités du profil de concentration.

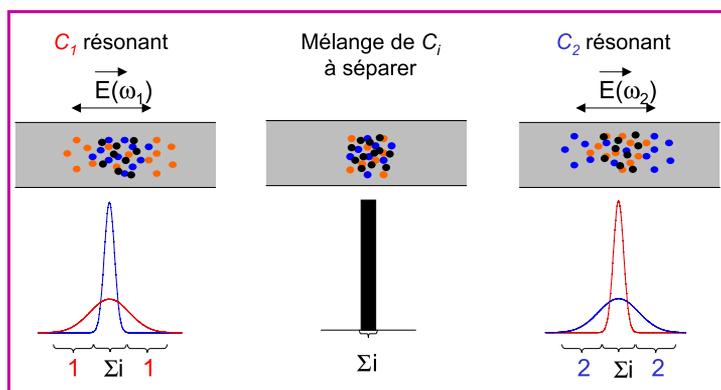


Figure 7 - Principe de la séparation sous contrôle de la diffusion en champ alternatif.

Le mélange $\{C_i\}$ est déposé en un point du milieu contenant P . Pour extraire sélectivement un constituant particulier C_i^R , il suffit de fixer la concentration en P à la valeur $[P]_i^R = 1/K_i^R = k_i^b/k_i^f$, et d'appliquer un champ périodique uniforme suffisamment intense de période $\lambda/k_i^b/k_i^f$. Il ne reste plus alors qu'à collecter l'espèce C_i^R ciblée dans les extrémités du profil de concentration. Il est ainsi possible d'extraire à volonté tout aussi bien C_1 que C_2 dans cette position privilégiée en choisissant des concentration en P et fréquence du champ appropriées.

Nous avons réalisé une série d'expériences à l'aide du système présenté à la figure 4 dans le but d'évaluer ce protocole. Nous avons pu ainsi montrer que l'on peut extraire C_1 ou C_2 à volonté à partir d'un mélange équimolaire de C_1 et de C_2 .

Ce nouveau protocole de séparation sous contrôle de la diffusion en champ alternatif présente plusieurs caractéristiques attractives :

- Il devrait être très sélectif. Dans notre approche, une molécule réactive est décrite par la donnée des réactions dont elle est l'objet (le mécanisme), ainsi que des constantes cinétiques des réactions mises en jeu. Séparer sous contrôle cinétique grâce à l'emploi d'une fréquence particulière revient ici à sélectionner les réactifs dont le mécanisme se réduit à l'échelle de temps considéré au schéma retenu (une seule réaction dans cet article ; noter que le mécanisme peut

impliquer plusieurs étapes élémentaires comme dans le système expérimental étudié) pour des valeurs particulières des constantes cinétiques. Il s'agit donc d'une « pêche au mécanisme » qui, bien entendu, se traduit *in fine* par celle d'un réactif. Dans le cas étudié, de nombreux C_i ne réagiront pas avec P ; pour ceux là, $D_{\text{eff},i} \approx D_{C_i} \ll D_{\text{eff},i}^R$. Pour les réactifs potentiels de P restants, la figure 6a montre qu'une différence des constantes de vitesse k_i^f et k_i^b d'un ordre de grandeur diminue $D_{\text{disp},i}$ d'un facteur supérieur à 3,5. D'une manière générale, il faut souligner ici que les constantes cinétiques diffèrent plus que les constantes thermodynamiques correspondantes au sein d'un mélange. Par exemple, les colorants C_1 et C_2 présentent une affinité similaire pour l' α -cyclodextrine : $K_1/K_2 = 0,34$ à 283 K. En revanche, $k_1^f/k_2^f = 0,021$ et $k_1^b/k_2^b = 0,063$ à la même température. Un protocole chromatographique fondé sur les différences de constantes cinétiques de réaction améliore ainsi la sélectivité de la séparation par rapport à celle obtenue par une approche traditionnelle basée sur les différences des constantes d'équilibre. Par exemple, la séparation de constituants présentant une même constante thermodynamique d'association, mais des constantes cinétiques distinctes devient possible.

- Ce protocole devrait faciliter la récupération du constituant désiré C_i^R qui, indépendamment de la valeur de K_i^R , se retrouve systématiquement situé dans la position la plus favorable au sein du profil d'« élution » : la première (ici les extrémités d'un profil gaussien, voir figure 7).

- Il ne demande qu'une faible quantité de support chromatographique du fait de l'absence de déplacement moyen du mélange au cours de la séparation. Cette caractéristique pourrait être particulièrement attractive lorsque P est une biomolécule disponible en faible quantité.

- Enfin, une séparation rapide peut être réalisée. Sa durée minimale est de l'ordre du temps de relaxation de la réaction (1) qui constitue la durée minimale de toute séparation reposant sur sa mise en œuvre. En particulier, cette durée demeure toujours inférieure au temps d'accès au régime thermodynamique lors de séparations à partir de mélanges inconnus. Ce protocole devrait ainsi pouvoir être utilisé pour détecter d'éventuelles mutations dans des acides nucléiques à l'aide de courtes séquences d'oligonucléotides sondes en quelques secondes au lieu des heures requises avec les approches actuellement disponibles. Nous travaillons actuellement dans cette direction en collaboration avec Charlie Gosse (CNRS UPR 20 Laboratoire de photonique et de nanostructures), Laurent Lacroix et Jean-Louis Mergny (Laboratoire de biophysique, Muséum national d'Histoire naturelle USM 0503, CNRS UMR 8646, Inserm UR 565).

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce travail dépassent l'ambition du projet initial. Afin de reproduire certains comportements complexes de la biologie tels que le mouvement moléculaire orienté, il s'est avéré nécessaire de mettre en place un outil de séparation conçu pour extraire des réactifs impliqués dans un mécanisme faisant intervenir des constantes cinétiques données. Nous avons ainsi proposé un protocole de chromatographie inédit et performant. Indépendamment de l'intérêt qu'elle présente pour réaliser des séparations, la validation expérimentale de ce protocole nous rend confiants quant à l'observation future des comportements que nous avons prédits ; le cadre théorique

utilisé tout au long de ce travail est en effet le même, qu'il s'agisse de complexité chimique, de mouvement orienté, ou encore de séparation sous contrôle de la diffusion en champ alternatif. Il nous reste désormais à améliorer notre protocole de séparation afin de parvenir à extraire avec une meilleure efficacité des réactifs soumis à des mécanismes plus élaborés qu'une simple réaction chimique. Les travaux en cours promettent d'autres fructueuses « parties de pêche ».

Références

- [1] Pour une entrée bibliographique récente sur une vision globale du métabolisme, voir par exemple : Arita M., The metabolic world of Escherichia Coli is not small, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 1543.
- [2] Metzler D.E., Metzler C.M., Sauke D.J., *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells 1 & 2*, 2nd ed., Harcourt/Academic Press, San Diego, **2002**.
- [3] Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers, New York, **2000**.
- [4] Lehn J.-M., *La Chimie Supramoléculaire, Concepts et Perspectives*, De Boeck Université, Bruxelles, **1997**.
- [5] Hill T.L., *Free Energy Transduction in Biology: The Steady-State Kinetic and Thermodynamic Formalism*, Academic Press, New York, **1977**.
- [6] Whitesides G.M., Ismagilov R.F., Complexity in chemistry, *Science*, **1999**, *284*, p. 89.
- [7] Nicolis G., Prigogine I., *Self-Organization in Nonequilibrium Systems*, Wiley, New York, **1977**.
- [8] Eigen M., Schuster P., *The Hypercycle, A Principle of Natural Self-organization*, Springer-Verlag, Berlin, **1979**.
- [9] Cette réduction mécanistique repose par exemple sur l'utilisation de l'approximation des états stationnaires (on peut réduire aussi en supposant qu'une étape atteint un état d'équilibre avant les autres). Voir par exemple : Vidal C., Lemarchand H., *La réaction créatrice*, Hermann, Paris, **1988**.
- [10] Jacob F., *Le jeu des possibles*, Fayard, Paris, **1981**.
- [11] Jullien L., Lemarchand A., Evaluation of the separation efficiency of some processes based on interaction of reactive species with a static, periodic asymmetric potential, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, p. 4415.
- [12] Jullien L., Lemarchand A., Charier S., Ruel O., Baudin J.-B., Two-site molecules as a road for engineering complexity in chemical systems, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, p. 9905.
- [13] Lemarchand A., Jullien L., Tuning a reaction using two-site catalysis and far-from-equilibrium conditions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2004**, *6*, p. 398.
- [14] Lemarchand A., Jullien L., Competition and symbiosis in a chemical world, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, p. 11782.
- [15] Yasuda R., Noji H., Kinoshita K., Yoshida M., F1-ATP-ase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps, *Cell*, **1998**, *93*, p. 1117.
- [16] Pour un exemple de conclusion contestable sur la base du travail publié, voir par exemple : Koumura N., Geertsema E.M., Meetsma A., Feringa B.L., Light-driven molecular motor: Unidirectional rotation controlled by a single stereogenic center, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 12005.
- [17] Jülicher F., Ajdari A., Prost J., Modeling molecular motors, *Rev. Mod. Phys.*, **1997**, *69*, p. 1269.
- [18] Rousselet J., Salomé L., Ajdari A., Prost J., Directional motion of Brownian particles induced by a periodic asymmetric potential, *Nature*, **1994**, *370*, p. 446.
- [19] Fauchoux L.P., Libchaber A., Selection of Brownian particles, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1995**, *91*, p. 3163.
- [20] Bader J.S., Hammond R.W., Henck S.A., Deem M.W., McDermott G.A., Bustillo J.M., Simpson J.W., Mulhern G.T., Rothberg J.M., DNA transport by a micromachined Brownian ratchet device, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, p. 13165.
- [21] Jullien L., Lemarchand A., Lemarchand H., Diffusion of reactive species tuned by modulated external fields: Application to high performance chromatography, *J. Chem. Phys.*, **2000**, *112*, p. 8293.
- [22] Alcor D., Croquette V., Jullien L., Lemarchand A., Molecular sorting by stochastic resonance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 8276.
- [23] Eigen M., de Mayer L., *Relaxation Methods in Techniques of Organic Chemistry, vol. VIII, Part II*, S.L. Friess, E.S. Lewis, A. Weissberger (volume editors), 2nd ed., Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York, **1963**, p. 895-1054.
- [24] Cramer F., Saenger W., Spatz H.-C., Inclusion compounds: 19. Formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, p. 1.
- [25] Yoshida N., Seiyama A., Fujimoto M., Dynamic aspects in host-guest interactions. Mechanism for molecular recognition by α -cyclodextrin of alkyl-substituted hydroxyphenylazo derivatives of sulfanilic acid, *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, p. 4246.



De gauche à droite et de haut en bas : D. Alcor, J.-F. Allemand, I. Aujard, T. Barilero, J.-B. Baudin, C. Benbrahim, D. Bensimon, A. Bourdoncle, S. Charier, E. Cogné-Laage, V. Croquette, A. Estevez-Torres, N. Gagey, L. Jullien, A. Lemarchand, H. Lemarchand, A. Meglio, P. Neveu et O. Ruel.

Damien Alcor¹ et **Anne Bourdoncle**¹ sont post-doctorants, **Isabelle Aujard**² est ingénieure de recherches, **Thomas Barilero**¹, **Sandrine Charier**², **André Estevez Torres**¹ et **Nathalie Gagey**² sont doctorants, **Jean-Bernard Baudin**² est sous-directeur du Département de chimie, **Chouaha Benbrahim**² est technicienne de recherches, **Emmanuelle Cogné-Laage**¹ est professeur de classes préparatoires, **Ludovic Jullien**³ (auteur correspondant) est professeur à l'Université Paris VI, **Adrien Meglio**¹ est étudiant de master et **Odile Ruel**² est ingénieure de recherches au Département de chimie de l'École normale supérieure*.

Jean-François Allemand est maître de conférences ENS, **David Bensimon** et **Vincent Croquette** sont directeurs de recherches CNRS et **Pierre Neveu** est doctorant au Laboratoire de physique statistique de l'École normale supérieure**.

Annie Lemarchand est chargée de recherches CNRS et **Hervé Lemarchand** est professeur au Laboratoire de physique théorique des liquides de l'Université Pierre et Marie Curie***.

* Département de chimie, CNRS UMR 8640, École normale supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05. Fax : 01 44 32 33 25.

¹ Tél. : 01 44 32 24 06.

Courriels : Damien.Alcor@cancer.org.uk, Anne.Bourdoncle@ens.fr, Thomas.Barilero@ens.fr, Andre.Estevez.Torres@ens.fr, emmanuelle.laage@ac-amiens.fr, Adrien.Meglio@ens.fr

² Tél. : 01 44 32 34 05.

Courriels : Isabelle.Aujard@ens.fr, Sandrine.Charier@ens.fr, Nathalie.Gagey@ens.fr, Jean-Bernard.Baudin@ens.fr, Chouaha.Benbrahim@ens.fr, Odile.Ruel@ens.fr

³ Tél. : 01 44 32 33 33.

Courriel : Ludovic.Jullien@ens.fr

** Laboratoire de physique statistique, CNRS UMR 8550, École normale supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05.

Tél. : 01 44 32 34 92. Fax : 01 44 32 34 33.

Courriels : Jean-Francois.Allemand@ens.fr, David.Bensimon@ens.fr, Vincent.Croquette@ens.fr, Pierre.Neveu@ens.fr

*** Laboratoire de physique théorique des liquides, Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7600, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05.

Tél. : 01 44 27 72 92. Fax : 01 44 27 72 87.

Courriels : anle@lptl.jussieu.fr, hele@lptl.jussieu.fr