

# THÈSE

PRÉSENTÉE À

**L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE**

Par **Céline ESCRIVE**

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE**

SPÉCIALITÉ : Chimie des biomolécules

**ÉTUDE PAR DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE DES  
INTERACTIONS DE PEPTIDES AVEC DES MODÈLES  
DE MEMBRANES PHOSPHOLIPIDIQUES**

Soutenue le 30 Octobre 2001

**JURY:**

M. DESBAT B.

M. DUFOURCQ J. *Rapporteur*

M. HIBERT M. *Rapporteur*

M. LAGUERRE M

M. LALLEMAND J.Y. *Président*



ÉTUDE PAR DYNAMIQUE  
MOLECULAIRE DES INTERACTIONS  
DE PEPTIDES AVEC DES MODÈLES  
DE MEMBRANES  
PHOSPHOLIPIDIQUES

CÉLINE ESCRIVE

IECB-Ecole polytechnique

ENSCP

16, Avenue Pey Berland 33607 Pessac Cedex

30 Octobre 2001



*A mon père, à Christian et à la petite Jeanne*



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Yves Lallemand pour m'avoir permise d'effectuer cette thèse avec le soutien financier de l'Ecole Polytechnique de Palaiseau.

Ce travail n'aurait sans doute pas pu être effectué sans les idées, le soutien, les conseils et les connaissances de Michel Laguerre qui m'a fait découvrir la simulation numérique. Je le remercie aussi pour sa disponibilité et sa patience.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Messieurs Jean Dufourcq et Marcel Hibert qui ont bien voulu juger ce travail en acceptant la charge de rapporteur.

Je remercie le directeur administratif Joseph Wagner ainsi que les chefs de pôle de l'IECB.

Je tiens à associer ces remerciements à Véronique Chassaing qui a toujours été disponible pour résoudre mes petits problèmes administratifs avec le sourire.

Quand le compte à rebours a débuté, il y a trois ans, nous n'étions que deux dans les starting-blocks. Pour cette aventure, j'ai une pensée très spéciale pour Maya Belghazi qui a su m'épauler, me supporter et me critiquer et dont l'amitié, la lucidité et les conseils avisés m'ont permise d'atteindre la ligne d'arrivée à temps. Maya, bon courage pour l'avenir que je te souhaite brillant et plein de succès.

Je remercie aussi Isabelle Pianet et Filippo Rusconi pour nos discussions autant scientifiques que de la vie quotidienne.

Je ne peux pas oublier les doctorants de l'IECB : Nordine Koliaï, Régis Nguyen, Céline Franc, François Baurain, Fabien Aussenac et les autres qui garderont toujours, j'espère leur humour et leur bonne humeur.

Une pensée particulière à ma mère, mon frère et Stéphanie qui m'ont aidée tout au long de mes études et sans qui rien n'aurait été possible.

Enfin, un petit clin d'œil à Stéphane et ma petite Mathilde qui ensoleillent mes journées par leurs rires et leurs sourires.







## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>9</b>
<b>Abbréviations .....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>17</b>
<b>I. La simulation par dynamique moléculaire (DM)</b>	<b>21</b>
A. Le champ de force (CVFF).....	25
B. Mise en solution du système simulé .....	28
C. Distance de troncature ou Cut-Off (CFF) des interactions non- liées	29
D. Périodicité .....	31
E. Solvants explicites : l'eau et le chloroforme .....	33
F. Minimisation .....	34
G. Dynamique moléculaire.....	35
1. Introduction.....	35
2. Intégration par la méthode de Verlet .....	37
3. Les différentes méthodes de dynamique moléculaire.....	37
4. "Un petit pas de dynamique moléculaire dans un champ de Discover" .....	40
5. Méthodes d'analyses .....	41
H. Construction des systèmes et méthode de calculs .....	44
1. Construction des molécules .....	44
2. Construction des couches phospholipidiques .....	47
<b>II. Etude de paramètres dynamiques et structuraux de bicouches phospholipidiques modèles .....</b>	<b>53</b>
A. Les phospholipides .....	59
1. Structure moléculaire.....	60
2. Les phospholipides zwitterioniques.....	61
3. Les phospholipides chargés négativement ou anioniques .....	62
B. Les bicouches phospholipidiques .....	64

1.	Présentation des systèmes .....	66
2.	Aire de surface.....	71
3.	Epaisseur hydrophobe $D_{pp}$ .....	75
4.	Les têtes polaires .....	78
5.	Localisation du sodium au sein des bicouches chargés négativement DMPS et DMPG.....	84
6.	Moment dipolaire .....	87
7.	Isomérisation trans-gauche.....	91
8.	Coefficient de diffusion latérale .....	95
9.	Conclusion.....	105
<b>III. Etude des interactions peptides/membranes lipidiques .....</b>		<b>107</b>
A.	Interaction Peptides amphipathiques/Membranes modèles ....	116
1.	Les peptides idéalement amphipathiques .....	116
2.	Les films de peptides idéalement amphipathiques à l'interface eau/air.....	120
3.	Insertion de peptides idéalement amphipathiques dans des membranes modèles.....	132
4.	Interaction d'un peptide naturel, la temporine A avec des monocouches modèles.....	172
B.	Etude dynamique de l'orientation de la protéine SP-C.....	182
1.	La protéine SP-C du surfactant pulmonaire .....	182
2.	Interactions et orientation de la protéine SP-C dans des membranes modèles	187
<b>IV. Etude de la dynamique de l'homodimère Neu et Neu* dans une interface eau/chloroforme .....</b>		<b>205</b>
A.	Hypothèse de départ .....	208
1.	Intérêt d'une interface eau/chloroforme.....	211
2.	Neutraliser ou ne pas neutraliser pas les charges de Neu ? .....	212
B.	Résultats des simulations.....	213
1.	Distances hélice-hélice .....	214
2.	Stacking .....	220
3.	Hélicité .....	223
4.	Liaisons Hydrogène interpeptidiques.....	227
5.	Conclusion.....	230
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>233</b>

<b>ANNEXES</b> .....	<b>237</b>
<b>ANNEXE A</b> .....	<b>239</b>
<b>Construction des bicouches</b> .....	<b>239</b>
<b>ANNEXE B</b> .....	<b>241</b>
<b>Construction des films de peptides</b> .....	<b>241</b>
<b>ANNEXE C</b> .....	<b>243</b>
<b>Systèmes peptides/membranes phospholipidiques</b>	<b>243</b>
<b>ANNEXE D</b> .....	<b>255</b>
<b>Systèmes des formes dimères de Neu et Neu* dans une interface eau/chloroforme</b> .....	<b>255</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>257</b>



## Abbreviations

DSC (*anglais*) Differential Scanning Calorimetry  
DMPC DiMyristoylPhosphatidylCholine  
DMPE DiMyristoylPhosphatidylEthanolamine  
DMPG DiMyristoylPhosphatidylGlycérol  
DMPS DiMyristoylPhosphatidylSérine  
DPPC DiPalmitoylPhosphatidylCholine  
DPPG DiPalmitoylPhosphatidylGlycérol  
DSPC DiStearoylPhosphatidylCholine  
FRAP (*anglais*) Fluorescence Recovery After PhotoBleaching  
IQENS (*anglais*) Incoherent QuasiElastic Neutron Scattering  
IR Infra-Rouge  
MSD (*anglais*) Mean Square Deviation  
ns nanoseconde  
PMIRRAS (*anglais*) Polarized Modulation Infra-Red Reflexion Absorption Spectroscopy  
RDF (*anglais*) Radial Distribution Function  
RMSD (*anglais*) Root Mean Square Displacement  
RMN Résonance Magnétique Nucléaire  
RX Rayons X



# Introduction générale

Parmi les différentes approches numériques actuelles j'ai utilisé la "dynamique moléculaire" comme outil de travail. Elle consiste à construire des modèles détaillés au niveau atomique de systèmes macromoléculaires. Ensuite après avoir décrit les forces microscopiques avec une fonction d'énergie potentielle, on utilise l'équation classique de Newton,  $F=ma$ , pour simuler les mouvements de tous les atomes en fonction du temps. La trajectoire ainsi calculée, bien qu'elle ne soit qu'une approximation de la réalité, fournit une information détaillée au cours du temps du mouvement des atomes, ce qui n'est pas accessible par l'expérience. Cette méthode nous a permis d'appréhender des problèmes biologiques à un niveau microscopique et atomique. Ainsi nous avons traité des sujets tels que l'insertion de peptides amphipathiques dans des modèles de membranes phospholipidiques, simulant au niveau microscopique le phénomène de la piqûre par le venin d'abeille, puis l'orientation préférentielle de la plus petite protéine du surfactant pulmonaire SP-C, importante pour prévenir une éventuelle détresse respiratoire chez l'enfant prématuré, ainsi que la dynamique de la forme dimère de Neu sauvage et de Neu muté qui jouerait un rôle dans certains processus de cancérisation. Pour étudier ces systèmes, il nous a fallu construire des membranes phospholipidiques explicites ou des interfaces mimant un milieu lipidique (ex : eau/chloroforme pour l'étude concernant Neu). Les membranes naturelles sont constituées en majorité de phospholipides très variés c'est pourquoi dans le but de se rapprocher au mieux de la réalité nous avons construit des membranes classiques (DMPC et DMPE) et plus originales chargées négativement (DMPG et DMPS). La durée de simulation suffisante (2 ns) de ces membranes a fourni de bons modèles qui ont permis de retrouver avec exactitude des paramètres intéressants parmi lesquels l'aire par surface des lipides, le coefficient de diffusion latérale ou le taux de conformères gauches qui est un paramètre de fluidité.



Dans l'étude qui va suivre nous décrirons dans un premier temps notre outil de travail : la dynamique moléculaire. Ensuite nous présenterons l'étude de paramètres structuraux et dynamiques de membranes modèles zwitterioniques (DMPC et DMPE) et chargées (DMPG et DMPS). Cette étude ne se veut pas exhaustive mais a été effectuée dans le but d'avoir des couches équilibrées pouvant servir de modèles pour des interactions peptides/membranes. Ces interactions peptides/membranes font l'objet d'une troisième partie qui se partage en deux sous-parties : l'étude de l'insertion de peptides amphipathiques primaires, secondaires, naturels et synthétiques dans des monocouches modèles chargées ou non chargées et l'étude de l'orientation de la protéine SP-C dans le surfactant pulmonaire qui présente la particularité d'être une membrane constituée d'une monocouche suivie d'un empilement de bicouches. Dans une quatrième partie, nous utiliserons une interface eau/chloroforme comme milieu phile/phobe pour suivre la dynamique d'une éventuelle stabilisation de la forme homo-dimère de Neu natif ou de son mutant.





# I. La simulation par dynamique moléculaire (DM)



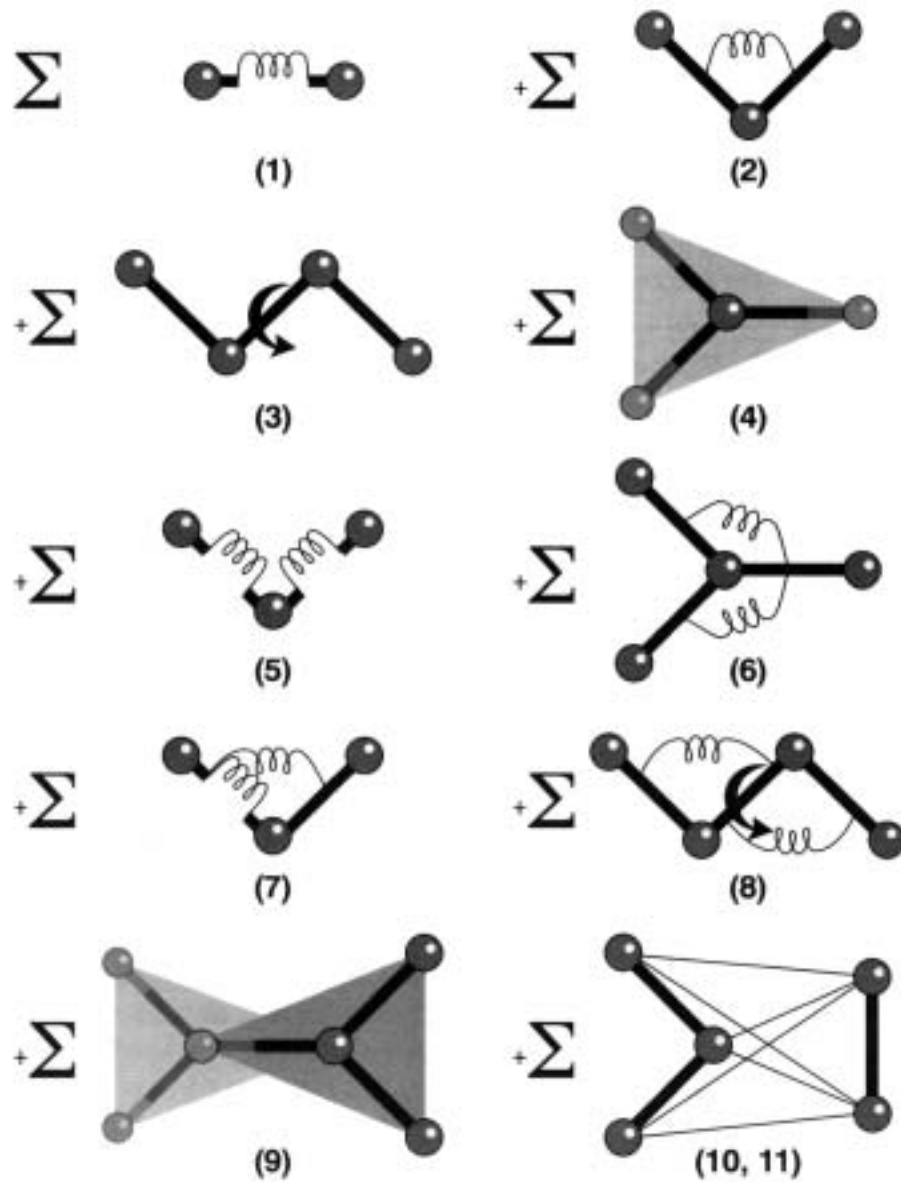
Un nouvel outil permettant à tout chimiste, physico-chimiste et biologiste de mieux appréhender les problèmes liés au domaine moléculaire est apparu : la modélisation moléculaire. La modélisation moléculaire utilise des méthodes de calcul théorique (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique *ab-initio* ou semi-empirique) et permet d'interpréter des phénomènes physico-chimiques et biologiques, de suggérer des nouvelles expériences et d'analyser des résultats d'une façon plus critique que les expériences classiquement utilisées : ces deux approches expérimentales ou purement théoriques deviennent alors complémentaires. Toutefois pour obtenir des résultats cohérents et fiables, il est nécessaire de confronter les données obtenues à d'autres informations se rapportant au système étudié. La dynamique moléculaire a été la méthode de calcul que nous avons choisie pour nos systèmes complexes. Dans cette partie nous allons décrire les bases de la dynamique moléculaire et les méthodes d'analyse qui nous permettront d'étudier les systèmes complexes des II, III et IV.



## A. Le champ de force (CVFF)

La dynamique moléculaire est une méthode d'étude des mouvements et de l'évolution de la configuration spatiale des systèmes moléculaires. Ceci se fait par résolution des équations classiques du mouvement de Newton étant donné une fonction d'énergie potentielle et son champ de force associé. Le mouvement des atomes est inhérent à tout système chimique et les vibrations atomiques dépendent de la température. Au niveau moléculaire, cet effet se traduit par une compression/extension des liaisons ou par la variation des angles de valence ou de torsion. Ainsi une molécule est considérée comme un ensemble d'atomes dont les interactions mutuelles peuvent être décrites par une fonction d'énergie potentielle ou champ de forces. Les atomes représentés par des sphères sont reliés dans le cas d'une liaison covalente par des ressorts. Les ions ne sont rattachés par aucune liaison covalente aux autres molécules. La distribution des électrons, considérée comme implicite, est localisée sur les liaisons du système et représentée par la distribution de charges sur les atomes de chaque molécule. Ces charges peuvent être calculées de façon à reproduire le moment dipolaire de la molécule ou la surface de potentiel électrostatique obtenue par calcul *ab-initio*. Les premiers calculs de dynamique moléculaire (DM) ont été faits pour des biomolécules complexes puis pour des peptides, des protéines et des biopolymères non peptidiques. Le logiciel de dynamique moléculaire utilisé pour ce travail est DISCOVER (Molecular Simulations Inc.) et le champ de force est CVFF (Consistent Valence ForceField). Ce champ de force est un champ de force généraliste (Dauber-Osguthorpe, 1988) paramétré pour les acides aminés, l'eau, et une variété d'autres groupes fonctionnels. La forme fonctionnelle de CVFF de l'énergie potentielle est donnée par l'équation de la Figure I.1.





**Figure I.1** Illustration graphique des termes du champ de force CVFF. Les atomes sont représentés par des sphères et les liaisons par des ressorts.

$$\begin{aligned}
E_{\text{pot}} = & \sum_b D_b [1 - e^{-\alpha(b-b_0)}] + \sum_{\theta} H_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + s \cos(n\phi)] \\
& \sum_{\chi} H_{\chi} [1 + \cos(n\chi)] + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) \\
& + \sum_b \sum_{\theta} F_{b\theta} (b - b_0)(\theta - \theta_0) + \sum_{\phi} F_{\phi\theta\theta'} \cos\phi (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_{\chi} \sum_{\chi'} F_{\chi\chi'} \chi\chi' \\
& + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum q_i q_j / \varepsilon r_{ij}
\end{aligned}$$

(1)
(2)
(3)

(4)
(5)
(6)

(7)
(8)
(9)

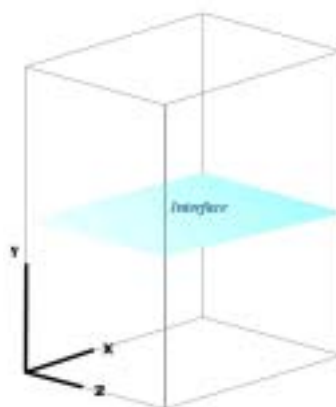
(10)
(11)

**Figure I.2** Forme analytique de l'expression de l'énergie dans CVFF.

- Les termes de 1 à 4 sont les termes diagonaux du champ de force et représentent les énergies de déformations des longueurs de liaison, des angles de valence, des angles de torsion et des interactions en dehors du plan. Le terme 1 est le potentiel de Morse utilisé pour le terme d'étirement de liaison.
- Les termes de 5 à 9 sont les termes d'énergie croisés et représentent les couplages entre les liaisons, les angles de valence, les liaisons et les angles de valence, les angles de valence et les angles de torsion et entre les angles en dehors du plan. Ces termes sont requis pour reproduire avec précision les fréquences vibrationnelles expérimentales et les propriétés dynamiques des molécules. De plus ils prennent en compte les déformations structurales.
- Les termes 10 et 11 représentent les interactions non liées : les interactions de van der Waals avec le potentiel de Lennard-Jones (en  $1/r^6$  et  $1/r^{12}$ ), le terme en  $1/r^6$  représente la dispersion attractive de London entre deux atomes et le terme en  $1/r^{12}$  la répulsion due à l'exclusion de Pauli (Weiner, 1984). Le terme 11 est l'équation bien connue de Coulomb dans laquelle  $\varepsilon$  représente la constante diélectrique. Dans CVFF, les

liaisons Hydrogène sont la conséquence naturelle des paramètres de Van der Waals et électrostatique.

## B. Mise en solution du système simulé



**Figure I.3 Position d'une boîte dans le repère orthogonal.**

Pour éviter une dynamique moléculaire avec de trop fortes répulsions pouvant entraîner une dislocation du soluté, nous le minimisons d'abord dans le vide avant de l'introduire dans une boîte de solvant. Il est aussi courant et utile de simuler une dynamique moléculaire dans le vide pour pouvoir trouver une ou plusieurs conformations intéressantes à solvater. Une configuration issue d'une telle dynamique moléculaire est ensuite minimisée avant d'être introduite en tant que soluté dans une boîte de solvant. Les minimisations ou la dynamique moléculaire dans le vide sont faites avec le logiciel Macromodel version 6.5 (Columbia University, New-York) (Mohamadi, 1990). La taille de la boîte et le nombre de molécules de solvant dépendent du système, de son orientation dans la boîte, des distances minimales (suivant les trois axes  $x$ ,  $y$  et  $z$ ) entre le système et les molécules de solvant, et des distances du système aux bords de boîte.

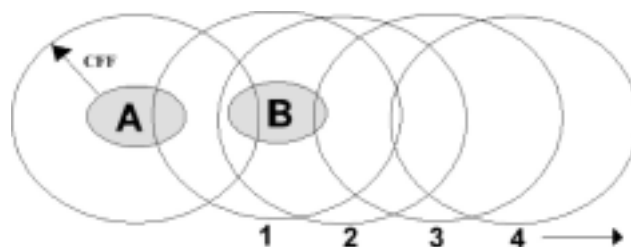
La boîte de simulation est fabriquée dans un repère orthonormé xyz. La Figure I.4 montre la position de la boîte dans le repère orthogonal. Ainsi on peut voir que la verticale de la boîte est parallèle à l'axe Oy et l'horizontale est dans le plan xOz. Le plan noté "interface" est parallèle au plan xOz. La boîte obtenue a les dimensions  $a \times b \times c \text{ \AA}^3$ , ce qui correspond à une concentration de l'ordre de  $[N \times (a \times b \times c) \cdot 10^8]^{-1}$  (N= nombre d'Avogadro).

### **C. Distance de troncature ou Cut-Off (CFF) des interactions non-liées**

Le nombre de paires d'atomes à considérer augmente avec la taille du système étudié. En effet, si le système étudié comporte 1 000 atomes, la somme des interactions non-liées est ~ 500 000 termes. Une distance de troncature ou "Cut-Off " (notée CFF) est utilisée pour limiter les temps de calcul et réduire ce nombre. Une revue regroupant plusieurs méthodes de Cut-Off a été publiée par Brooks *et al.* (Brooks, 1985).

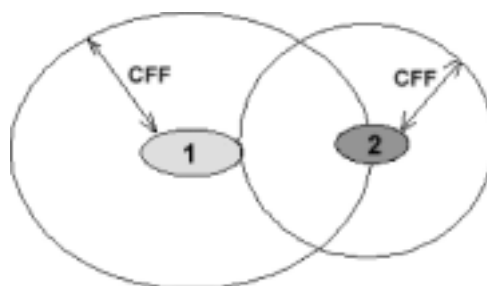
Le Cut-Off est une distance limite au-delà de laquelle les interactions "non-liées" (van der Waals et électrostatiques) sont ignorées. Le Cut-Off peut être défini par paire d'atomes ou par groupe. Avec un Cut-Off défini par paire d'atomes, ne sont calculées que les interactions d'un atome X avec les autres atomes contenus dans la sphère centrée sur X et ayant le Cut-Off pour rayon.

Dans ce travail, nous avons utilisé un Cut-Off de groupe. Lors de la construction des molécules, elles ont été divisées en un ou plusieurs sous-ensembles : les groupes. Quand un groupe contient plusieurs atomes, l'espace délimité par le Cut-Off est le même pour chacun de ces atomes. Il est égal à l'union des sphères autour de chaque atome du groupe.



**Figure I.5 Recouvrement du Cut-Off autour de deux groupes.**

Ainsi comme le montre la Figure I.5, deux entités (ion, molécule) A et B sont à proximité, chacune appartient à un groupe distinct. Si l'entité B s'éloigne de l'entité A, ses interactions avec chacun des atomes de A seront calculées tant qu'il se trouvera dans une zone délimitée autour de A par le Cut-Off (Positions 1 et 2), même si les atomes de A ne sont pas tous à une distance inférieure au Cut-Off de l'entité B. Au-delà du Cut-Off de A (Positions 3 et 4) ces interactions ne sont plus calculées. Si les entités A et B sont placées dans un même groupe, les interactions entité/entité seront toujours calculées, quelle que soit la distance les séparant. Donc tant que deux entités sont proches l'une de l'autre, la différence entre le Cut-Off défini autour d'un seul groupe pour tout le système ou de deux groupes est négligeable, mais elle ne l'est plus quand ils s'éloignent et que les interactions restent importantes.

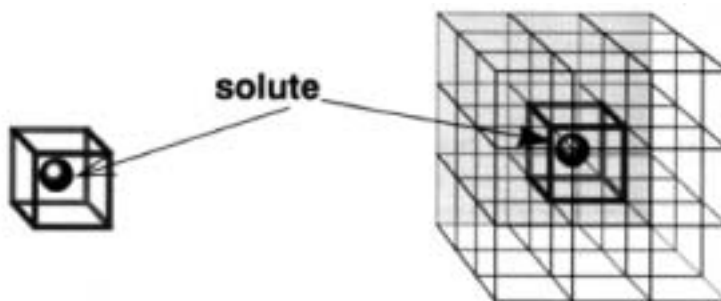


**Figure I.6 Intersection entre deux Cut-Off**

Un autre aspect concerne un système comprenant une entité 1 de taille proche de celle du Cut-Off et une entité 2 dans une boîte de solvant (Figure I.6). Tant que l'entité 2 se trouve à une distance de l'un des atomes de l'entité 1 inférieure au Cut-Off, l'ensemble des interactions entre l'entité 2 et les atomes de l'entité 1 est calculé. En revanche, les molécules de solvant

(constituant chacune un groupe) proche de l'entité 2, mais à une distance de l'entité 1 supérieure au Cut-Off, n'interagiront qu'avec l'entité 2. Si l'entité 2 est définie dans le même groupe que l'entité 1, leurs interactions réciproques seront toujours calculées, même au-delà du Cut-Off, cependant certaines molécules de solvant se trouvant à proximité de l'un d'eux n'interagit plus avec l'autre. Pour les simulations dans le vide, un Cut-Off de 100 Å a été utilisé afin que toutes les interactions soient calculées. Pour les simulations effectuées dans l'eau, un Cut-Off de groupe de 13 Å a été choisi.

#### D. Périodicité



**Figure I.7 Soluté entouré par le solvant.** Un soluté entouré par un cube de solvant est répliqué périodiquement dans les 3 dimensions pour bien représenter un environnement cristallin.

Les conditions périodiques limites (Periodic Boundary Conditions notées PBC) permettent de simuler l'aspect infini d'une solution, l'influence d'un solvant ou un environnement cristallin et d'éliminer les problèmes de bords de boîte. La Figure I.7 montre une molécule de soluté dans assez de solvant pour occuper le volume du cube. Une simulation de ce système cubique isolé ne serait qu'une mauvaise approximation de ce qui pourrait se passer dans un solvant réel puisque le soluté peut diffuser sur la surface ou les molécules de solvant peuvent s'évaporer. Pour remédier à ceci, sur la

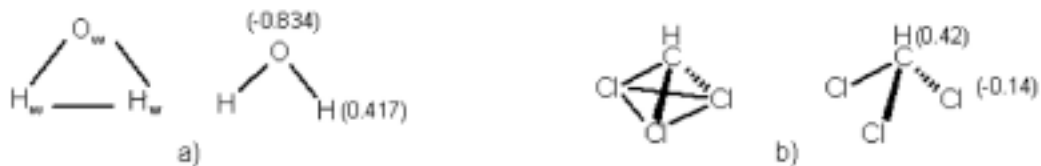
Figure I.7, le cube est répliqué dans les trois dimensions de l'espace pour former un réseau 3×3×3 de cubes identiques. De cette façon, les molécules proches de la surface peuvent maintenant interagir avec le solvant des cubes adjacents. De plus quand une molécule 1 sort de la boîte centrale et qu'elle pénètre dans la boîte voisine A', elle est remplacée par son image 1' provenant de la boîte A" qui pénètre dans la boîte A (Figure I.8)



**Figure I.8 Périodicité de la boîte suivant 2 dimensions.**

La périodicité permet aux molécules proches du bord de la boîte d'être complètement entourées d'autres molécules de solvant. Elles interagiront donc avec les molécules ou l'une de leurs images, se trouvant dans la limite du Cut-Off. La distance de Cut-Off utilisée doit être inférieure à la moitié de la plus petite des dimensions de la boîte de sorte que ni le soluté ni une molécule de solvant n'interagisse avec aucune de ses images présentes dans les boîtes voisines. Le Cut-Off devant être raisonnable, il en résulte que les dimensions de la boîte de solvant doivent être suffisamment grandes.

## E. Solvants explicites : l'eau et le chloroforme



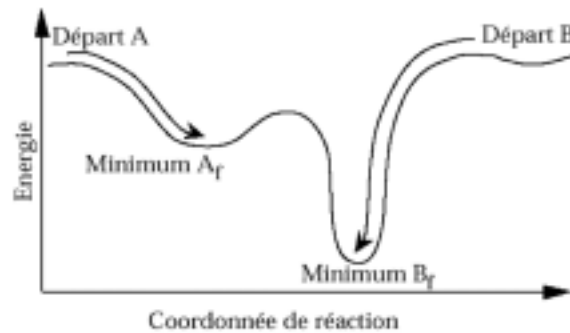
**Figure I.9** Modèles de solvant. a) L'eau et b) le chloroforme

**Le modèle de l'eau.** L'eau utilisée comme solvant explicite dans nos simulations est le modèle rigide à trois points et trois liaisons : TIP3P (Jorgensen, 1983, 1998) (Figure I.9). Les caractéristiques telle que la densité et le RDF (Radial Distribution Function : fonction de distribution radiale) sont reproduites de façon satisfaisante. Ce modèle est souvent utilisé parce qu'il mime bien la solvation de systèmes de différentes tailles, chargés ou neutres. L'équilibration des molécules d'eau a été effectuée par Jorgensen (Jorgensen, 1983) dans une boîte de 216 molécules avec une méthode de type Monte Carlo.

**Le chloroforme.** Le modèle de chloroforme utilisé a été fabriqué comme le modèle d'eau (Jorgensen, 1983). C'est un modèle flexible à quatre points et six liaisons (Figure I.9).



## F. Minimisation



**Figure I.10** Hypersurface énergétique.

Pour ne pas obtenir une trajectoire simulée aberrante avec des forces initiales trop grandes, il est préférable de relaxer la géométrie du système, ceci s'appelle : minimiser le système. La minimisation s'effectue en coordonnées cartésiennes et conduit au minimum local le plus proche du point de départ (Figure I.10). Les minima atteints après minimisation dépendent de la géométrie de départ. Ceci est dû à la complexité des systèmes étudiés et à la multitude de minima de l'hypersurface de l'énergie potentielle qui en résulte. Le logiciel DISCOVER permet entre autres deux méthodes de minimisation que nous avons également utilisées : la méthode des gradients par "steepest descent" (SD) (littéralement "à descente rapide") (Biosym, 1995, Jacoby, 1972) ou celle des gradients conjugués (CG) (Conjugate Gradient) (Biosym, 1995, Fletcher, 1964). Dans notre travail, nous avons combiné les deux méthodes : la première (SD) avec un petit nombre d'itérations pour atteindre rapidement un minimum local puis la seconde (CG) avec un plus grand nombre d'itérations pour affiner le calcul. La méthode par gradients "steepest descent" est une minimisation du premier ordre qui utilise la dérivée de l'énergie potentielle  $V$  par rapport aux coordonnées. Cette méthode permet de descendre rapidement vers un minimum local mais elle ne permet pas de converger. En outre elle permet à partir des structures initiales de rétablir les longueurs de liaisons ainsi que les angles dièdres aux valeurs standards et d'éliminer les interactions fortes à distance. La méthode par les gradients conjugués (CG) (Biosym, 1995, Fletcher, 1964) permet d'affiner le

calcul. Ici le gradient calculé à chaque itération, est conjugué au précédent. La taille du pas est cette fois-ci déterminée en prenant en compte le gradient de l'itération précédente. Ceci permet une optimisation du pas. Cette méthode est une méthode de choix pour les gros systèmes, le temps d'intégration est plus long que par SD car la minimisation se fait pour toutes les directions, cependant cette perte est compensée par une meilleure convergence vers un minimum. La minimisation s'arrête lorsqu'un critère de convergence RMS (Root Mean Square : racine des moindres carrés) du gradient de l'énergie potentielle  $V$  atteint une valeur inférieure à celle définie par l'utilisateur ou le nombre d'itérations défini par l'utilisateur est atteint. Pour chaque système, une série de petites minimisations est utilisée et décrite dans la partie Annexes.

## G. Dynamique moléculaire

### 1. Introduction

La simulation en dynamique moléculaire (DM) utilise la seconde loi de Newton pour décrire le mouvement d'une molécule en fonction du temps :

$$F_i(t) = m_i a_i \quad \text{Équation 1 Equation de Newton}$$

Où  $F_i$  est la force,  $m_i$  est la masse, et  $a_i$  est l'accélération de l'atome  $i$ . Comme le montre l'équation de Newton (Équation 1), la vitesse et le sens du mouvement atomique dépendent des forces qui s'exercent entre les atomes. En pratique, les atomes possèdent une vitesse initiale propre qui se conforme à l'énergie cinétique totale du système. Cette énergie dépend elle-même de la température de simulation désirée. Elle est habituellement obtenue en élevant lentement la température d'un système moléculaire placé initialement au zéro absolu et en amenant ainsi progressivement les atomes qui le constituent à l'énergie d'équilibre. La dynamique moléculaire permet de calculer la force exercée sur chaque atome et de déterminer les différentes informations liées à la

connaissance de cette donnée (vitesse et position des atomes pendant un intervalle de temps spécifique, de l'ordre de 1 ps à quelques ns suivant les systèmes moléculaires). La force  $F_i$  qui s'exerce sur un atome  $i$  peut être directement calculée depuis la dérivée de l'énergie potentielle  $V$  en fonction des coordonnées  $r_i$  :

$$\frac{\delta V}{\delta r_i} = m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2} \quad \text{Équation 2}$$

L'énergie potentielle du système  $V$  se calcule en utilisant les techniques de la mécanique moléculaire ou de la chimie quantique. La mécanique moléculaire ne permet de calculer l'énergie que pour des applications n'induisant pas de modifications importantes de la structure électronique (ex : rupture/formation d'une liaison). La chimie quantique donne une valeur de l'énergie permettant d'étudier des processus dynamiques entraînant des changements chimiques mais cette application est d'utilisation limitée compte-tenu de la durée des calculs nécessaires à la détermination de la fonction énergie. La dynamique moléculaire permet d'étudier la trajectoire des atomes à partir de la connaissance des forces s'exerçant sur chaque atome et des masses atomiques. Cependant, les trajectoires ne sont pas directement déterminées par la résolution de l'équation de Newton précédente. Une approche différente est utilisée. Elle consiste à calculer :

- les accélérations atomiques à partir des forces s'exerçant sur chaque atome et des masses atomiques :

$$a_i = \frac{F_i}{m_i} = -\frac{1}{m_i} \frac{\delta V}{\delta r_i} \quad (i = 1 \dots 3n) \quad \text{Équation 3}$$

- les vitesses de chaque atome à partir de la connaissance des accélérations atomiques :

$$v_i(t + \Delta t / 2) = v_i(t - \Delta t / 2) + a_i \Delta t \quad \text{Équation 4}$$

- les positions des atomes à partir des vitesses atomiques :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i \Delta t \quad \text{Équation 5}$$

## 2. Intégration par la méthode de Verlet

La méthode de Verlet permet l'intégration de ces équations en subdivisant la trajectoire en une série d'états séparés par des intervalles de temps très courts dont la longueur définit le pas d'intégration  $\Delta t$ .

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2} \Delta t) \quad \text{Équation 6}$$

$$a(t + \Delta t) = \frac{f(t + \Delta t)}{m} \quad \text{Équation 7}$$

$r(t)$ ,  $v(t-\Delta t/2)$ , et  $a(t)$  sont respectivement la position, la vitesse, et l'accélération au temps  $t$  et  $t-\Delta t/2$ .  $f(t+\Delta t)$  est calculé à partir  $-dV/dr$  à  $r(t+\Delta t)$ . La répétition de cette procédure à des intervalles de temps en fonction de la vitesse aboutit à l'identification de la trajectoire. L'intervalle de temps  $\Delta t$  choisi devra être plus petit que la période du mouvement de la plus haute fréquence, celle-ci est la conséquence des vibrations des liaisons de type X-H ( $\sim 10^{-14}$ s). Son ordre de grandeur sera donc en général de l'ordre de 1 à 2 fs, ce qui permet de simuler correctement les mouvements des hydrogènes. Nous avons utilisé  $\Delta t=1,5$  fs qui semble fournir de bons résultats, la plupart des calculs actuels se font avec  $\Delta t=2$  fs mais avec des algorithmes tels que SHAKE ou RATTLE qui permettent de contraindre les longueurs de liaisons de type X-H à des valeurs standards.

## 3. Les différentes méthodes de dynamique moléculaire

Les équations de Newton se résolvent en conservant l'énergie totale du système (système adiabatique) et s'il n'y a pas de variation de volume, la simulation générera un système canonique (NVE). Pour mimer des conditions expérimentales, on peut vouloir simuler les systèmes à température et/ou pression constantes. Le programme DISCOVER permet de

générer cinq ensembles en fonction des variables suivantes E l'énergie, V le volume, T la température, P la pression et N le nombre de particules pour contrôler la température et la pression. La transformation et la relation entre les cinq différents systèmes sont détaillées et décrites par Allen et Tildesley (Allen, 1987) et par Tieleman *et al.*(Tieleman, 1997). Succinctement, voici les cinq ensembles générés par DISCOVER, le nombre de particules N est conservé :

- Energie et Volume constants (NVE): ensemble microcanonique.
- Volume et Température constants (NVT) : ensemble canonique.
- Température et Pression constantes (NPT) : cet ensemble est choisi quand une pression, un volume et une densité corrects sont importants pour la simulation.
- Température et tension (stress) constantes (NST) : cet ensemble est une extension du précédent. La constante de tension permet de contrôler les composantes du tenseur de tension.
- Pression et enthalpie constantes NPH : cet ensemble est un analogue de l'ensemble microcanonique.

**Contrôle de la température.** La température est calculée à partir de l'énergie cinétique totale et le nombre total de degrés de liberté. Pour un système périodique, l'expression est telle que :

$$\frac{(3N-3)k_B T}{2} = \frac{\sum_{i=1}^N m_i v_i^2}{2} \quad \text{Équation 8}$$

(Les trois degrés de liberté translationnels sont ignorés,  $k_B$  est la constante de Boltzmann). Discover utilise la méthode de Berendsen (Berendsen, 1984). Après équilibration, un échange de l'énergie thermique entre le système et un bain thermique chaud peut être introduit à travers la méthode de Berendsen (Berendsen, 1984) dans laquelle chaque vitesse est multipliée par un facteur  $\lambda$  qui est donné par :

$$\lambda = \left( 1 + \frac{\Delta t}{\tau} (T - T_0) \right)^{1/2} \quad \text{Équation 9}$$

Où  $\Delta t$  est le temps d'intégration,  $\tau$  est un temps de relaxation caractéristique,  $T_0$  est la température désirée, et  $T$  est la température instantanée. Cette méthode présente l'avantage de bien contrôler l'ensemble à température constante en ajustant la température désirée et en changeant simultanément le temps de relaxation  $\tau$  (entre 0.1 et 0.4 ps). Les systèmes que nous étudions présentant des caractéristiques différentes, cette méthode nous a permis de fixer la température pour chacun d'eux.

**Contrôle de la pression.** Le contrôle de la pression constante se fait sur le même principe que pour le contrôle de la température mais la correction est cette fois-ci appliquée aux positions des atomes au lieu des vitesses. La pression, la température, le volume et le viriel interne peuvent être reliés par l'expression suivante :

$$PV = Nk_B T + \frac{3}{2} \langle W \rangle \quad \text{Équation 10}$$

Les changements de pression peuvent être effectués en changeant les coordonnées des particules et la taille de la boîte dans les conditions périodiques limites (PBC). Le logiciel DISCOVER utilise la méthode de Berendsen (Berendsen, 1984) qui couple le système à un bain de pression pour maintenir la pression constante. La force du couplage est déterminée à la fois par la compressibilité du système (variable définie par l'utilisateur  $\gamma$ ) et par une constante de temps de relaxation (variable  $\tau$  définie par l'utilisateur). A chaque itération, les coordonnées cartésiennes  $x$ ,  $y$ ,  $z$  de chaque atome sont remises à l'échelle par le facteur  $\mu$  dont l'expression est la suivante :

$$\mu = \left(1 + \frac{\Delta t}{\tau} \gamma [P - P_0]\right)^{1/3} \quad \text{Équation 11}$$

Où  $P$  est la pression instantanée et  $P_0$  la pression désirée. Pour tous les systèmes simulés à pression constante, la pression  $P_0$  a été fixée à 1 bar.

## 4. "Un petit pas de dynamique moléculaire dans un champ de Discover"

L'illustration algorithmique suivante est inspirée de l'algorithme du travail de thèse de Laurent Toxler (Toxler, 1995). Cet algorithme est basé sur le schéma d'intégration "sautemouton" ("leap-frog") capable d'intégrer un couplage à des bains de Température (T) et de Pression (P). Il se décrit en 9 étapes :

- 1) La position  $r_i(t)$  et la vitesse  $v_i(t-\Delta t/2)$  pour chaque atome  $i$ , les dimensions de boîte ( $a \times b \times c$ ) et son volume  $V_{xyz}$  sont fournis à l'instant  $t$ .
- 2) Calcul de la force appliquée sur l'atome  $i$  par l'ensemble des autres atomes, défini par le Cut-Off et par les conditions périodiques :

$$F_i(t) = \delta E / \Delta r_i \quad \text{.Équation 12}$$

- 3) Calcul de l'énergie cinétique :  $E_c(t + \Delta t/2)$  :

$$E_c = \frac{1}{2} m_i v_i^2(t + t/2) \quad \text{Équation 13}$$

- 4) A ce stade deux choix sont possibles, soit :
  - calcul à pression constante (Berendsen, 1984), la pression est calculée en fonction de cette nouvelle énergie cinétique et du viriel de forces :

$$P = \frac{2}{3V_{xyz}} \left[ E_c + \frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} F_{ij} \right] \quad \text{Équation 14}$$

- calcul à volume constant (ensemble microcanonique).

- 5) Calcul de la température suivant l'équipartition de l'énergie cinétique :

$$T(t - \Delta t/2) = \frac{2E_c(t - \Delta t/2)}{Nk_B} \quad \text{Équation 15}$$

$N$  étant le nombre de degré de liberté du système et  $k_B$  la constante de Boltzmann.

- 6) Calcul des vitesses à l'instant  $t + \Delta t/2$  :

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t - \Delta t) + \frac{\Delta t \cdot F_i(t)}{m_i} \quad \text{Équation 16}$$

- 7) La température du système est maintenue constante en le couplant à un bain thermique (Berendsen, 1984) de température  $T_0$ . Les vitesses  $v_i(t+\Delta t/2)$  sont alors multipliées par le facteur de correction  $\lambda$  (Equation 9) :

$$v_i(t + \Delta t) = \lambda v_i(t + \Delta t) \quad \text{Équation 17}$$

- 8) Calcul des positions à l'instant  $t+\Delta t$  :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t + \Delta t)\Delta t \quad \text{Équation 18}$$

A pression constante  $P_0$ , les coordonnées  $r_i(t+\Delta t)$  sont corrigées par le facteur multiplicatif  $\mu$  (Equation 11) ainsi que les dimensions et le volume de la boîte :

$$(a, b, c)(t + \Delta t)_{\text{corrigé}} = \mu(a, b, c)(t + \Delta t)_{\text{corrigé}} \quad \text{Équation 19}$$

$$V_{xyz}(t + \Delta t)_{\text{corrigé}} = \mu^3 V_{xyz}(t + \Delta t)_{\text{corrigé}} \quad \text{Équation 20}$$

## 5. Méthodes d'analyses

Les modules "Analysis" et "DeCipher" de InsightII développés par Molecular Simulations Inc. nous ont permis d'exploiter la quantité importante de résultats issus des simulations par dynamique moléculaire. Ces modules permettent de suivre l'évolution des coordonnées d'un système au cours du temps. Dans ce travail, les coordonnées sont sauvegardées toutes les 1,5 ps. Deux types d'analyses sont possibles : une analyse énergétique du système à partir des coordonnées internes (énergie totale, énergie cinétique, énergie potentielle, température, pression, pression latérale, volume, dimensions de boîte) et une analyse géométrique du système avec les coordonnées cartésiennes.

### a) Fluctuations des systèmes

Les fluctuations des systèmes simulés peuvent être suivies par le "Root-Mean Square Displacement" (RMSD). Le RMSD d'une particule  $i$  (résidus, monomères, molécules ou ensemble d'atomes) est défini par :



$$RMSD_i = \sqrt{\left\langle \frac{(r_a - r_{aref})^2}{a} \right\rangle} = \sqrt{\left\langle \frac{(\Delta r_a)^2}{a} \right\rangle} \quad \text{Équation 21}$$

Où  $\Delta r_a = r_a - r_{aref}$  représente les vecteurs de déplacement atomiques. La configuration de référence peut soit être une moyenne d'une trajectoire, une configuration choisie arbitrairement, ou une structure de référence (RX ou RMN). D'un autre point de vue, la stabilité d'une boîte (phase d'équilibration) peut être déduite de l'évolution de l'énergie totale du système ou d'une partie du système en fonction du temps. Comme nous le verrons, nous pouvons aussi suivre les fluctuations des systèmes en observant les images ou les clichés à des instants choisis.

## b) Analyses géométriques des systèmes

Les modules d'analyse d'InsightII permettent d'avoir les coordonnées cartésiennes atomiques instantanées, de générer des plans, des vecteurs, des angles définis par l'utilisateur ainsi les distances interatomiques intra ou intermoléculaires. Suivre l'évolution des coordonnées dans les trois axes xyz se révélera importante dans le cas de l'insertion des peptides dans des membranes modèles, ainsi on pourra déterminer la profondeur de l'insertion du peptide dans la couche phospholipidique (suivant l'axe Y, normale aux interfaces). De plus les coordonnées dans le plan xOz permettront dans le cas de l'étude des bicouches modèles phospholipidiques d'illustrer par des images stroboscopiques le coefficient de diffusion latérale.

### *(1) Diffusion latérale $D_{lat}$ liée au Déplacement quadratique Moyen (MSD : Mean Square Displacement)*

Le MSD (Mean Square Displacement) donne le déplacement quadratique moyen des positions des particules en fonction du temps. Son expression est la suivante :

$$MSD(m) = \langle |r(t) - r|^2 \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |r(m+i) - r(i)|^2 \quad \text{Équation 22}$$

Où m=nombre maximum de points permis pour le calcul du MSD, n=nombre de points utilisés pour moyenner, i=incrément, k=nombre total d'images lues et m+n=k >0. Et ainsi le coefficient de diffusion latérale D peut être directement obtenu à partir du MSD (Mean Square Displacement) en fonction du temps :

$$D = \frac{1}{6Nt} \langle |r(t) - r|^2 \rangle \quad \text{Équation 23 Equation d'Einstein}$$

Où N=nombre d'atomes, r=position de l'atome, t=temps. Les modules d'analyse permettant d'accéder au MSD des atomes ou d'un ensemble d'atomes (molécule ou partie d'une molécule), le coefficient de diffusion latérale  $D_{lat}$  peut être calculé pour un atome de la molécule ou pour la molécule entière. Ceci s'avère très important car, comme nous le verrons plus tard, expérimentalement deux coefficients de diffusion sont déterminés pour les phospholipides de bicouche, un pour la tête polaire et l'autre pour le lipide total.

## (2) Fonctions de Distribution Radiale (RDF)

La distribution radiale par paire  $g(r_{ij})$  représente la probabilité de trouver une particule j à une distance comprise entre r et r+dr d'une particule i en fonction de la distance r. Les particules considérées peuvent être intra ou intermoléculaires. Les fonctions de distribution par paire ou aussi appelées fonctions de corrélation par paire, sont d'une importance fondamentale pour la théorie des propriétés d'équilibre des fluides moléculaires (Egelstaff, 1975). Leur application permet l'étude des modifications de la structure des solvants induites par la présence des solutés (détermination des couches d'hydratation autour de têtes phospholipidiques), et aussi des modifications structurales de systèmes denses. Son expression est la suivante :

$$g_{ij}(r) = \frac{d \langle N_{ij}(r) \rangle}{\rho_{ij} dV(r)} \quad \text{Équation 24}$$

où  $d \langle N_{ij}(r) \rangle$  est le nombre moyen de particules i ou j avec la distance comprise entre r-Δr et r de la particule i ou j ;  $\rho_{ij}$  est la densité des particules de type i et j (pour les systèmes périodiques),  $\rho_{ij}$  est le rapport  $(N_i + N_j / V_{boite})$  ;  $d \langle N_{ij}(r) \rangle / dV(r)$  est la densité locale

moyenne des particules de type i et j dans un volume  $dV(r)$ , entre  $r-\Delta r$  et  $r$  de la particule i ou j.

### **(3) Nombre de coordination $N_{ij}(r)$**

Le nombre de coordination  $N_{ij}(r)$  représente le nombre de particules i autour de la particule j plus le nombre d'atomes j autour d'un atome de type i à une distance r. Il est lié à la fonction de corrélation par paire par l'expression :

$$\langle N_{ij}(r) \rangle = \rho_{ij} \int_0^r g(r) 4\pi r^2 dr \quad \text{Équation 25}$$

Avec le nombre de coordination, on obtient une information supplémentaire quantitative et de distance concernant l'environnement d'une entité par rapport à une autre. Ainsi, ce nombre de coordination nous aidera à déterminer le nombre de molécules d'eau entourant les têtes polaires des phospholipides et aussi le nombre de proches voisins des atomes des têtes polaires dans l'étude des bicouches phospholipidiques modèles.

## **H. Construction des systèmes et méthode de calculs**

Nous utiliserons de façon abusive le verbe "dynamiser" pour "effectuer une dynamique". Un nombre aléatoire attribué aux vitesses initiales est différent pour chaque système et choisi arbitrairement par l'ordinateur pour chaque simulation ; cependant pour recréer les conditions initiales, ce nombre peut être conservé dans le cas de plusieurs simulations successives à pression ou volume constants.

### **1. Construction des molécules**

#### **a) Construction des lipides**

Une molécule de DMPC (1,2-dimyristoylphosphatidylcholine) a été construite dans Macromodel en utilisant la structure déterminée par diffraction de Rayons X (Pascher, 1992) et minimisée dans le champ de force MM2\* (paramètre 1989) (Allinger, 1977). A partir de cette structure, on a pu fabriquer les autres phospholipides DMPE, DMPG et DMPS en substituant la tête choline par les autres groupements : éthanolamine (E), glycérol (G), sérine (S). Ils ont été ensuite importés dans InsightII, soumis à un calcul de charge MOPAC/MNDO et partitionnés en groupe. Les DSPC, DPPC et DPPG ont été obtenus en allongeant les chaînes d'acides gras des méthylènes correspondants puis soumis à un calcul de charge par méthodes quantiques semi-empiriques MOPAC/MNDO et partitionnés en groupes. La nomenclature des chaînes grasses des lipides étudiés est rappelée dans le Tableau 2.

## b) Construction des peptides

Nom	Composition	Séquence	S <sub>mol</sub> (Å <sup>2</sup> )
LK <sub>9</sub> <sup>(+4)</sup>	L <sub>4</sub> K <sub>5</sub>	Ph-CO-KLKLKLKLK-COO <sup>-</sup> (2 brins)	288
L <sub>8</sub> K <sub>4</sub> <sup>(+3)</sup>	L <sub>8</sub> K <sub>4</sub>	Ph-CO-LLLLLLLLLKKKK-CO-NH <sub>2</sub>	216
LK <sub>15</sub> <sup>(+4)</sup>	L <sub>10</sub> K <sub>5</sub>	Ph-CO-KLLKLLLKLLKLLK-COO <sup>-</sup>	270
L <sub>10</sub> K <sub>5</sub> <sup>(+4)</sup>	L <sub>10</sub> K <sub>5</sub>	Ph-CH <sub>2</sub> -CO-LLLLLLLLLKKKK-COO <sup>-</sup>	270
LK <sub>22</sub> <sup>(+6)</sup>	L <sub>15</sub> K <sub>7</sub>	Ph-CO-KLLKLLLKLLKLLKLLKLLK-COO <sup>-</sup>	396
Tempo A <sup>(+2)</sup>	Temporine A	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	234
SP-C <sup>(+3)</sup>	SP-C	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -LKRLIVVVVVVLIVVVIVGALLMGL-NH <sub>2</sub>	468
dpSP-C <sup>(+2)</sup>	SP-C dipalmitoylée	(CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COS)C-(CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COS)C- PVNLKRLIVVVVVVLIVVVIVGALLMGL-NH <sub>2</sub>	~530
Neu <sup>(+3)</sup>	Neu	H <sub>2</sub> N-EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVVGILIKRRCOO <sup>-</sup>	612
Neu* <sup>(+3)</sup>	Neu muté	H <sub>2</sub> N-EQRASPVTFIATVEGVLLFLILVVVVGILIKRRCOO	612

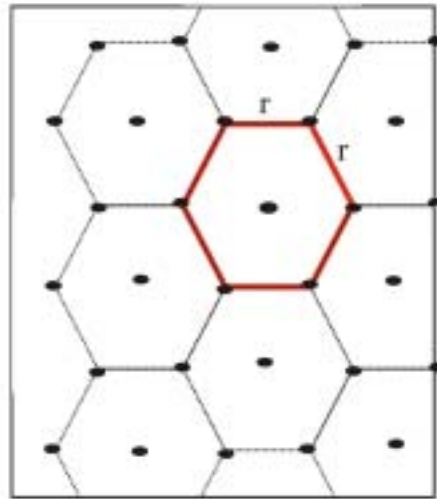
**Tableau 1 Séquence des peptides étudiés.** S<sub>mol</sub> = Surface moléculaire occupée par les peptides. A l'exception du peptide LK<sub>9</sub> structuré en feuillets β antiparallèles, tous les autres sont structurés en hélice α.

Tous les peptides étudiés sont construits dans Macromodel version 6.5 (Mohamadi, 1990) puis transférés dans InsightII et Discover version 97.0 ou version 98.0 (Molecular

Simulations Inc.). A cette fin, nous avons utilisé le champ de force AMBER\* avec l'option "united atom". Tous les peptides sont construits en hélice  $\alpha$  à l'exception de LK<sub>9</sub>, structuré en double brins  $\beta$  antiparallèles. Leur séquence est donnée dans le Tableau 1. Les structures des peptides de la série LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> ont été minimisées jusqu'à un RMS  $\sim 0.01$  kJ.Å<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup> via la méthode Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG), si le nombre d'atomes est  $\sim 750$  (1000 cycles). Un CFF étendu a été sélectionné (électrostatique = 25 Å, vdW = 25 Å, H-bond = 5 Å) et un modèle de solvation virtuelle GB/SA a été utilisé avec l'eau comme solvant (Still, 1990). Les structures minimisées correspondantes sont ensuite exportées dans InsightII après addition de tous les hydrogènes. Les autres peptides ont été construits dans Macromodel sans minimisation préalable puis exportés dans InsightII après addition de tous les hydrogènes. Neu muté (Neu\*) est obtenu par substitution de V<sup>664</sup> en E<sup>664</sup> dans la séquence de Neu sauvage en utilisant le module Homology d'InsightII (Molecular Simulations Inc.).

## 2. Construction des couches phospholipidiques

### a) Construction d'une monocouche



**Figure I.11 Réseau hexagonal.** Chaque rond noir représente un phosphore d'un lipide, les chaînes d'acides gras sont parallèles à l'axe Y.

Les phospholipides sont en général arrangés dans un réseau hexagonal centré : un phospholipide est à une distance identique  $r$  des 6 plus proches voisins (Figure I.11). Connaissant l'aire de surface  $A$  des couches phospholipidiques, on dispose les phosphores de  $N$  lipides suivant le réseau hexagonal centré précédent sur une surface  $S$  ( $S = N \times A$ ) du plan  $xOz$ . On précise que les queues hydrophobes des lipides sont parallèles à l'axe  $y$ . Nous utilisons une aire de surface de départ légèrement supérieure à celle trouvée expérimentalement. Ainsi nous obtenons les paramètres suivants :

$$S = (\sqrt{3}/2) r^2/N$$

avec  $r$  = distance entre deux phosphores du plan de la couche et  $N$  = nombre total de lipides par couche. La surface des couches hétérogènes est calculée à partir de la somme des fractions de phospholipides contenus dans la couche, on a ainsi :

$$S = (xA + yB)/N$$

avec  $x$  = nombre de phospholipides de type A et  $y$  = nombre de phospholipides de type B. Les monocouches ainsi construites sont ensuite placées en haut d'une boîte de paramètres :  $a = 5r$ ,  $b > 1,5$  fois la longueur du phospholipide,  $c = 3\sqrt{3}r$  et  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ . Le bas de la boîte est ensuite remplie d'eau explicite de type TIP3P (Jorgensen, 1983, 1998) pour obtenir des systèmes entièrement hydratés. L'hydratation est complète quand le nombre de molécules d'eau par lipide  $n_w$  est d'environ 24. Les phospholipides chargés négativement (PG et PS) sont neutralisés par addition de contre-ion de sodium  $\text{Na}^+$  ( $1\text{Na}^+/\text{lipide}$ ). Une série de minimisation avec Steepest Descent (100 cycles) puis Conjugate Gradient (15000 cycles) est ensuite utilisée jusqu'à obtenir un  $\text{RMS} \sim 10^{-2} \text{ kJ} \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Les monocouches peuvent alors être utilisées.

## **b) Construction des bicouches**

### ***(1) Construction des bicouches homogènes ou pures***

La bicouche est construite à partir de deux monocouches placées à une distance interfeuillelet Phosphate-Phosphate de 35 à 36 Å (=  $D_{pp}$ ) pour les DMPx, 39-40 Å pour DPPx et 43-44 Å pour DSPx ( $x$  = tête polaire). Chaque bicouche est composée de 60 phospholipides soit 30 par feuillet. Les bicouches sont minimisées par gradients conjugués jusqu'à une valeur de  $\text{RMS} \sim 10^{-2} \text{ kJ} \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Les systèmes ainsi minimisés sont dynamisés à volume constant pendant 500 ps (333 000 cycles) puis à pression constante pendant 2 ns (1 334 000 cycles). La température de simulation, de 10 à 20 K supérieure à la température de transition de phase gel/fluide des phospholipides (Chowdhry, 1984, Demel, 1987, Lipka, 1984, Van Dijck, 1976, Van Dijck, 1978) est constante et les conditions périodiques limites (PBC) sont utilisées.

### ***(2) Construction des bicouches hétérogènes ou mixtes***

Les mélanges hétérogènes tel que DMPx/DMPy ( $x, y$  = têtes polaires) sont construits à partir de lipides déjà dynamisés pendant 2 ns. Pour ces mélanges, la température utilisée durant la

simulation est calculée suivant une fonction linéaire des températures de transition ( $T_c$ ) des composés purs et de fraction molaire ( $X_n$ ) tel que :

$$X_1 T_{c1} + X_2 T_{c2} = T_{\text{cmelange}} \text{ (Findlay, 1978).}$$

Les phases de minimisation et de dynamique sont les mêmes que pour les bicouches pures. Les bicouches, pures et hétérogènes, sont dynamisées à volume constant pendant 500 ps puis à pression constante de 1 à 2 ns. La phase d'équilibration de chaque simulation est estimée à 200 ps à pression constante quand l'énergie totale des systèmes est stabilisée, les mesures sont effectuées durant la seconde ns. Le Tableau A. 1 résume le type de couches fabriquées, les paramètres de construction de la boîte et la durée de simulation (cf Annexe A).

### **c) Construction des films de peptides**

Des films de trois peptides possédant des structures secondaires idéalement amphipathiques LK<sub>9</sub>, LK<sub>15</sub> et LK<sub>22</sub> ont été réalisés. Les peptides sont placés au centre d'une boîte remplie à moitié d'eau de telle sorte que la partie hydrophile des peptides soit immergée dans l'eau. Les charges des peptides sont neutralisées en ajoutant des ions chlorures et des ions sodiums dans l'eau. La construction des films de peptides est présentée dans la partie VI Annexe B.

### **d) Construction des systèmes peptides/membranes**

**Méthode générale.** Il a été montré (Dickerson, 1969) que, à l'interface eau/membrane lipidique, la surface moléculaire  $S_{\text{mol}}$  d'un peptide peut être évaluée de la façon suivante: un feuillet de 2 brins  $\beta$  antiparallèles placé parallèle au plan de l'interface occupe une surface de  $n \times 3,4 \text{ \AA} \times 4,7 \text{ \AA} = 16 n \text{ \AA}^2$ , où  $n$  est le nombre de résidus (Dickerson, 1969), alors qu'une hélice  $\alpha$  de même orientation occupe une surface de  $n \times 1,5 \text{ \AA} \times 12 \text{ \AA} = 18 n \text{ \AA}^2$  (Dickerson, 1969, Reynaud, 1993). Les surfaces moléculaires des peptides ont été estimées ainsi et se trouvent dans le Tableau 1.

Un nombre suffisant de lipides  $x$  ( $x = S_{\text{mol}}/A$ ) est retiré au centre des couches pour permettre l'insertion du peptide. Ensuite le peptide est placé dans le trou juste à l'interface



eau/monocouche. Il est placé de telle sorte que sa partie hydrophobe soit vers le milieu lipidique et sa partie hydrophile vers l'eau. L'axe de l'hélice  $\alpha$  ou le plan des  $C_\alpha$  des feuilletts  $\beta$  sont parallèles au plan de la couche (plan xOz). On remplit ensuite la boîte d'eau et le système entier est traité dans des conditions périodiques limites (PBC : Periodic Boundary Conditions). L'ensemble subit les minimisations successives suivantes :

1. 100 cycles en SD avec le peptide et les lipides fixés,
  2. 100 cycles en SD avec le peptide fixé,
  3. 100 cycles en CG avec le peptide fixé,
  4. 1000 cycles CG avec le squelette du peptide fixé (les chaînes latérales sont libres),
  5. 500 cycles avec le squelette du peptide fixé avec une force de 200 kcal/Å<sup>2</sup>,
  6. 500 cycles avec le squelette du peptide fixé avec une force de 100 kcal/Å<sup>2</sup>
  7. 500 cycles avec le squelette du peptide fixé avec une force de 50 kcal/Å<sup>2</sup>,
  8. 500 cycles avec le squelette du peptide fixé avec une force de 25 kcal/Å<sup>2</sup> jusqu'à une valeur de RMS  $\sim 0.05 \text{ kJ.Å}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ .
  9. Ensuite toutes les contraintes sont éliminées et la minimisation se poursuit jusqu'à une valeur de RMS  $\sim 0.03 \text{ kJ.Å}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  ( $\sim 15000$  cycles par gradients conjugués).
- ♥ Les systèmes sont ensuite dynamisés à pression constante ( $P = 1 \text{ bar}$ ) ou à volume constant (volume de boîte constant) sans contrainte à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide utilisé dans les conditions limites périodiques (PBC). La construction de tous les systèmes étudiés est présentée dans l'annexe C.

### **e) Construction des formes dimères de Neu et Neu\* dans une interface eau/chloroforme**

**Méthode générale.** Une interface eau/chloroforme est utilisée pour mimer une interface eau/membrane. L'épaisseur de la couche de chloroforme est de 36 Å comme la partie hydrophobe d'une bicouche de DMPC. Les hélices sont placées à une distance comprise entre 11 et 13 Å l'une de l'autre, leur axe est parallèle à l'axe y, normal à l'interface eau/chloroforme. Le système est ensuite placé au centre d'une boîte  $(60 \times 70 \times 40) \text{Å}^3$  ( $V =$

168000Å<sup>3</sup>) qui est remplie d'eau. Les charges portées par les peptides sont neutralisées par des ions chlorures et sodium. Le système est minimisé plusieurs fois par Steepest Descent (100 cycles) avec les peptides fixés, puis par la méthode des gradients conjugués (1000 cycles) avec les peptides fixés, on rajoute après chaque minimisation du chloroforme pour augmenter sa densité un peu trop faible au moment de la construction. Pour terminer, le système est minimisé par la méthode des gradients conjugués (10000 cycles) avec le squelette des peptides fixés (RMS ~ 0,02). On fait ensuite une dynamique à volume constant pendant 1 ou 1,5 ns à 300K ( $\Delta t=1,5\text{fs}$ , CFF=13Å). La construction des systèmes des formes dimères de Neu et Neu\* est présentée dans l'annexe D.



## II. Etude de paramètres dynamiques et structuraux de bicouches phospholipidiques modèles



Les membranes biologiques sont constituées d'une matrice lipidique (la bicouche lipidique) dans laquelle des molécules, tels que le cholestérol et des protéines sont impliqués. Les bicouches lipidiques composées d'une seule espèce de lipide conduisent à plusieurs types de transitions de phase (Geve, 1987, Mouritsen, 1993). Cette transition de phase fait passer la membrane de la phase gel à basse température, caractérisée par un ordre conformationnel au sein des chaînes d'acides gras, à une phase fluide de température plus élevée caractérisée par un désordre conformationnel et une diffusion latérale rapide. Ce comportement de phase est plutôt compliqué quand la bicouche n'est plus homolipidique. Il est sensible aux interactions moléculaires existant dans la bicouche lipidique, aux fluctuations temporelles des lipides, aussi bien qu'à la présence d'hétéromolécules. Les simulations au niveau atomique de bicouches lipidiques de DPPC et d'autres bicouches lipidiques ont été menées par différents groupes à travers le monde durant ces quinze dernières années (Venable, 1993; Egberts, 1994; Feller, 1995; Chiu, 1995; Tu, 1995, Tieleman, 1996; Berger, 1997; Feller, 1997). Plusieurs revues décrivant des méthodes de simulations et des résultats ont été publiés (Merz, 1996, Pastor, 1993, Tieleman, 1997). James Davis et son équipe (Belohorcova, 2000) montrent que bien que les échelles de temps ne soient pas toujours les mêmes, les simulations par dynamique moléculaire et la RMN (Résonance magnétique nucléaire) sont des techniques complémentaires pour analyser la structure moléculaire, l'ordre orientationnel et les dynamiques de la membrane biologique. Les performances informatiques et l'amélioration constante et efficace des champs de force de la mécanique moléculaire permettent d'obtenir des résultats structuraux et dynamiques qui se révèlent en parfait accord avec les résultats expérimentaux de diverses techniques comme les méthodes de diffraction de neutrons et de rayons X, les spectroscopies RMN, IR/Raman, ESR ou les mesures de fluorescence. Dans la revue intitulée "*A computer perspective of membranes : molecular dynamics studies of lipid bilayer systems*", Tieleman *et al.* (Tieleman, 1997) décrivent la dynamique moléculaire appliquée à des systèmes complexes tels que les bicouches lipidiques et des systèmes hétérogènes lipides-protéines. Ils montrent aussi les limitations et les possibilités de la dynamique moléculaire appliquée à des systèmes complexes. Ils illustrent l'étude des bicouches lipidiques par dynamique moléculaire avec l'exemple d'une bicouche modèle phospholipidique de DPPC en phase cristalline. Cet exemple permet de voir que la

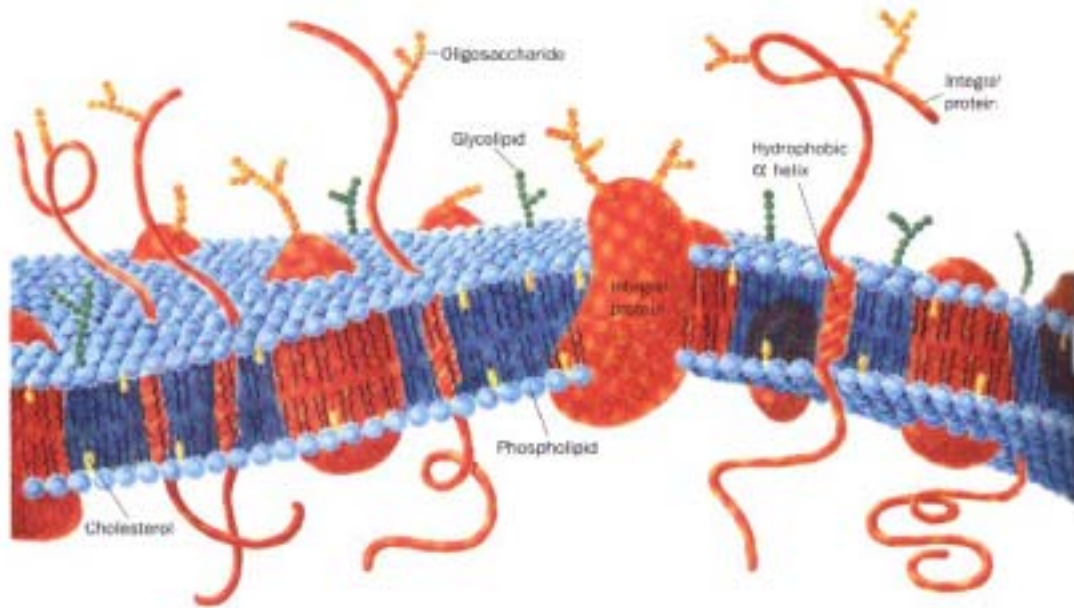
dynamique moléculaire atteint le niveau atomique qui n'est accessible que par deux techniques de diffraction : celle des rayons X et celle des neutrons. De plus ils montrent que la dynamique moléculaire permet d'accéder aux trois dimensions de l'espace (les coordonnées cartésiennes xyz) instantanément ce qui permet d'évaluer les mouvements à l'intérieur des lipides et au sein d'un assemblage lipidique tel qu'une bicouche. Cependant l'échelle de temps de la dynamique moléculaire de systèmes complexes qui est de l'ordre de quelques ns ne permet pas de reproduire tous les mouvements des lipides, notamment le phénomène de "flip-flop" de l'ordre de l'heure qui ne peut pas être évalué par dynamique moléculaire. Cependant nous montrerons que des paramètres tel que la valeur du coefficient de diffusion latérale des phospholipides, est mesurée de façon très précise par la dynamique moléculaire. Ainsi nous montrerons que la technique de dynamique moléculaire est bien adaptée à l'étude des bicouches phospholipidiques modèles de membranes biologiques. A la date de parution de la revue de Tieleman *et al.*, il y avait une dizaine de simulations concernant des bicouches de DPPC, et environ la moitié sur des bicouches de DMPC. Ces deux phospholipides sont les plus étudiés expérimentalement et numériquement. A ce jour ils font l'objet d'au moins une à deux publications mensuelles de simulation numérique. Expérimentalement, les bicouches modèles les plus utilisées pour des études structurales, dynamiques ou d'interactions avec des peptides sont composées en général de phospholipides zwitterioniques tels que la PhosphatidylCholine (PC) ou la PhosphatidylEthanolamine (PE). Dans le souci de reproduire des bicouches "naturelles", les modélisateurs s'intéressent de plus en plus à l'étude des bicouches de lipides à chaînes insaturées tels que POPC (Heller, 1993), DOPC, DOPE et DLPE (Berkowitz, 1991, Damodaran, 1995, Essmann, 1995, Huang, 1995, Perera, 1996, Raghavan, 1992, Zhang, 1995). En ce qui concerne les têtes polaires chargées seule une bicouche de DPPS a été simulée (Lopez Cascales, 1996a, 1996b) mais la durée de la simulation reste faible (544 ps). Notre travail est donc original puisque nous allons présenter l'étude de paramètres dynamiques et structuraux de quatre bicouches d'espèces phospholipidiques différentes. A défaut de faire varier la longueur ou l'insaturation des chaînes acyles, quatre têtes polaires différentes seront exploitées : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylglycérol (PG). Les deux dernières sont des têtes chargées négativement et le phosphatidylglycérol n'a jamais été étudié en dynamique moléculaire. Le manque de données

expérimentales sur les phospholipides négativement chargés rend l'exploitation des résultats difficile, c'est pourquoi le DMPC étudié nous servira de référence. Nous présenterons des paramètres structuraux en déterminant des distances interatomiques intramoléculaires et intermoléculaires, les couches d'hydratation, les orientations préférentielles de certaines parties des têtes comme le dipôle P...N, l'aire de surface, et des paramètres dynamiques tels que le taux de fluidité représenté par le taux de conformères gauches et le coefficient de diffusion latérale des lipides ainsi que les moments dipolaires.





## A. Les phospholipides



**Figure II.1** Représentation d'une membrane cellulaire.

La membrane plasmique (Figure II.1) est constituée d'une bicouche qui renferme des lipides et différentes sortes de protéines. Les lipides membranaires (30 à 50 % de la masse) sont en majorité des lipides amphiphiles : on appelle molécule amphiphile ou amphipathique une molécule constituée d'une zone hydrophobe et d'une zone hydrophile. Parmi ces lipides amphiphiles, on rencontre majoritairement les phospholipides, le cholestérol ainsi que des sphingolipides. Ces trois molécules présentent une partie hydrophile appelée tête polaire, glycérophospholipide pour les phospholipides, sucres pour les sphingolipides, hydroxyle pour le cholestérol et une partie hydrophobe ou queue hydrophobe souvent formée de chaînes aliphatiques saturées ou non ou de cycles, pour le cas du cholestérol. Les phospholipides sont les

composants majeurs des membranes lipidiques et en constituent ainsi de bons modèles.

## 1. Structure moléculaire

Les phospholipides sont composés d'un squelette glycérol dont les fonctions alcools en position 1 et 2 sont estérifiées par deux chaînes d'acides gras (Figure II.2). La nature des phospholipides peut varier par leur longueur (10 à 24 carbones), le degré d'insaturation des chaînes d'acide gras (Tableau 2) et par la nature du groupe polaire fixé sur le phosphate estérifiant la position 3 du glycérol de la tête polaire.

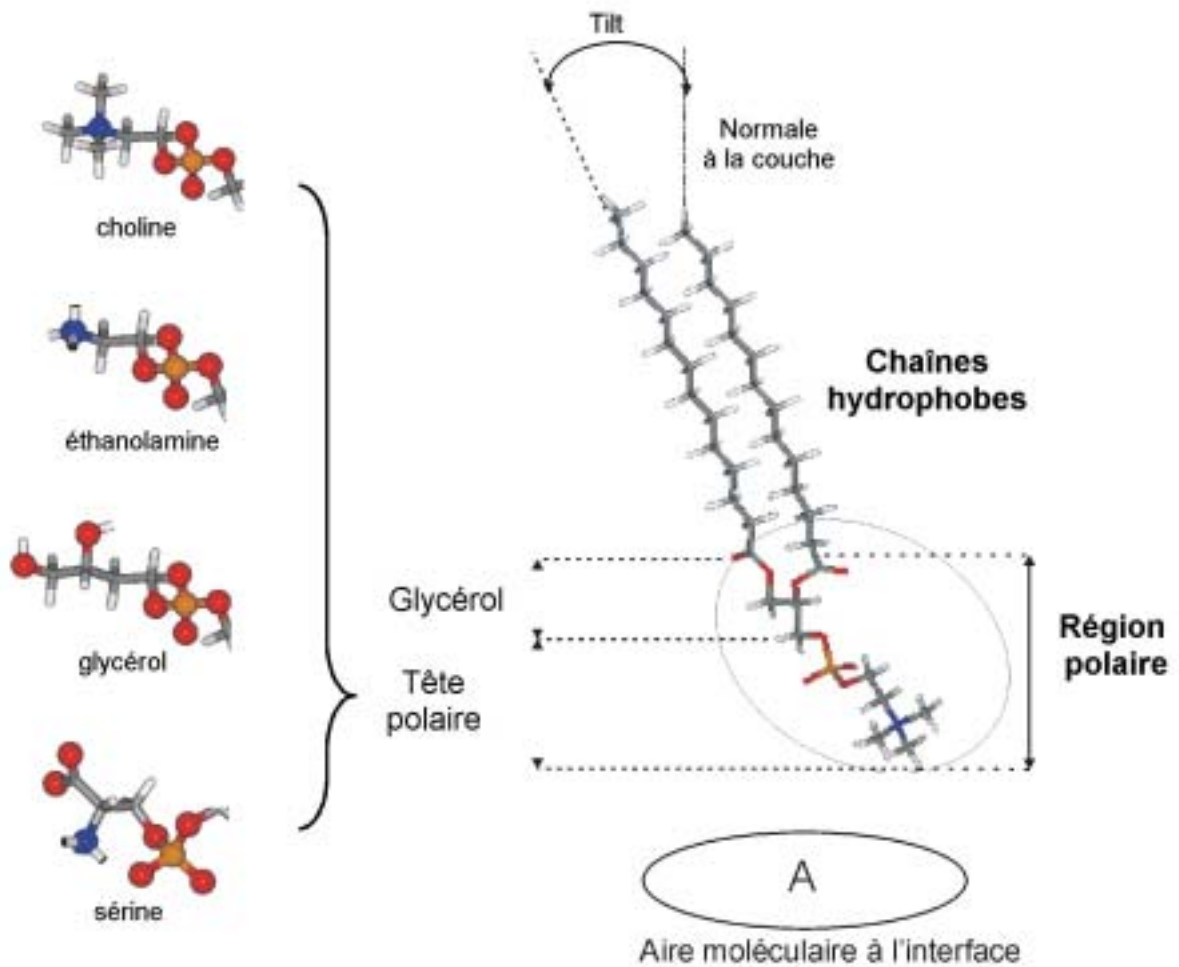
Préfixe usuel	Symbole numérique	Structure
caproyl	10 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{-COO-}$
lauroyl	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{-COO-}$
myristoyl	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{-COO-}$
palmitoyl	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{-COO-}$
palmitoléoyl	16 : 1(9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{-COO-}$
stéaroyl	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{-COO-}$
oléoyl	18 : 1(9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{-COO-}$
linoléoyl	18 : 2(9,12)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{-COO-}$
archidoyl	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{-COO-}$
behenoyl	22 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{-COO-}$
lignoceroyl	24 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{-COO-}$

**Tableau 2 Noms usuels des chaînes d'acides gras des glycérophospholipides selon leur longueur et leur insaturation. (Marsh, 1990)**

Le symbole numérique indique le nombre de carbones des chaînes suivi du nombre d'insaturations. Leur position est notée entre parenthèses.

La tête polaire est la région qui porte la charge éventuelle du phospholipide. Parmi les diverses têtes existantes dans le vivant quatre sont fréquemment rencontrées dans les membranes cellulaires, les zwitterioniques : la PhosphatidylCholine (PC) et la

PhosphatidylEthanolamine (PE), et deux chargées négativement : la PhosphatidylSérine (PS) et le PhosphatidylGlycérol (PG).



**Figure II.2** Représentation d'un phospholipide et des différentes têtes polaires utilisées.

## 2. Les phospholipides zwitterioniques

On parle de phospholipides zwitterioniques quand le phospholipide est électriquement neutre mais qu'il porte une charge négative et une charge positive. En général, la charge négative est portée par le groupe phosphate et la charge positive se situe sur le groupe estérifiant.

### **a) Phosphatidylcholine (PC)**

C'est le plus abondant des phospholipides membranaires, on le rencontre chez les animaux et aussi souvent chez les plantes et les levures. Il contient une tête choline, un éthyl-(triméthylammonium)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ , estérifiant l'acide phosphorique. Sa structure cristalline a été déterminée par diffraction des rayons X par Pascher *et al.* (Pascher, 1992). Il a été montré que le groupement glycérol peut adopter quatre conformations différentes qui entraînent toutes un parallélisme des axes longs des deux chaînes aliphatiques. Le DMPC et le DPPC sont les deux phospholipides les plus étudiés d'un point de vue physicochimique et par simulation numérique mais aussi les plus utilisés pour fabriquer des membranes modèles. Du point de vue de la simulation par dynamique moléculaire, ces deux molécules sont pratiquement semblables, les seules différences significatives sont la longueur des chaînes acyles qui conduit à un déplacement de la température de transition de phase d'environ -30K pour le plus court (DMPC).

### **b) PhosphatidylEthanolamine (PE)**

Il est en général le second phospholipide le plus abondant dans les membranes des cellules eucaryotes et apparaît comme étant le phospholipide majoritaire des bactéries (Chowdhry, 1984, Rothman, 1977). Il ressemble à la phosphatidylcholine mais avec un simple groupe ammonium  $\text{NH}_3^+$  à la place du triméthylammonium. Il cristallise dans un réseau monoclinique déterminé par diffraction RX (Hauser, 1981). Dans la revue de Tieleman *et al.* (Tieleman, 1997), huit articles dont le sujet est le DLPE sont répertoriés. Les simulations de ce type de bicouche modèle ont été effectuées pour tenter d'expliquer essentiellement les problèmes d'hydratation de la couche (Berkowitz, 1991, Raghavan, 1992).

## **3. Les phospholipides chargés négativement ou anioniques**

Un phospholipide anionique ou chargé négativement porte systématiquement une charge négative sur le groupement phosphate et on peut trouver d'autres charges sur le groupe

estérifiant ce phosphate (cas de la phosphatidylsérine). D'un point de vue biologique, il est intéressant d'introduire des lipides chargés dans des systèmes de lipides neutres avec une basse concentration de lipides chargés. A cause des temps d'équilibration lents des ions, les simulations à des échelles de temps plus longues seront plus enrichissantes. Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, le seul lipide chargé négativement qui a été simulé (Lopez Cascales, 1996a, 1996b) est la phosphatidylsérine (PS). Dans ce travail, nous avons étudié deux espèces différentes : la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylglycérol (PG).

### **a) Phosphatidylsérine (PS)**

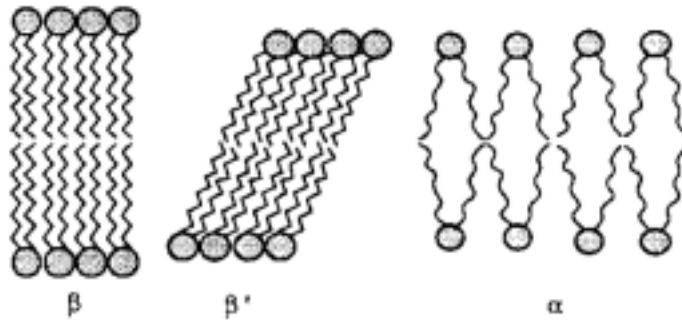
C'est un composant habituel et prédominant des membranes des érythrocytes. On le retrouve aussi chez les animaux, les plantes et les cellules bactériennes (Hauser, 1982). Le phosphate est estérifié par un résidu sérine qui porte un ammonium et une fonction acide carboxylique. Ce phospholipide porte donc deux charges négatives, une sur le phosphate, l'autre sur la fonction acide de la sérine et une charge positive sur l'ammonium de la sérine. Lopez Cascales *et al.* (Lopez Cascales, 1996a, 1996b) ont étudié une bicouche de DPPS par dynamique moléculaire pour comparer les problèmes d'hydratation de ces phospholipides chargés négativement avec ceux du DPPC.

### **b) PhosphatidylGlycérol (PG)**

Il est fréquemment rencontré en petites quantités dans les tissus des animaux. C'est un composant courant des membranes bactériennes. Il est très abondant dans la membrane plasmique des microorganismes (Unitt, 1985) et dans la membrane chloroplastique des plantes. Dans le système humain, les PG apparaissent en quantité minoritaire dans le poumon et les surfactants cancéreux (Hallman, 1985, Rooney, 1974) ainsi que dans les membranes mitochondriales (Pascher, 1987). Il contient une autre molécule de glycérol qui estérifie le phosphate. La seule charge négative est localisée sur le groupe phosphate. Sa structure cristalline a été résolue (Pascher, 1987). Ce lipide n'a jamais été simulé numériquement et est très peu étudié expérimentalement, mais du fait de sa présence importante dans de nombreuses membranes cellulaires, il est intéressant de l'étudier.

## B. Les bicouches phospholipidiques

Les phospholipides sont donc des molécules amphiphiles. En présence d'eau, ils forment des bicouches multilamellaires avec les chaînes hydrophobes placées entre les têtes hydrophiles.



**Figure II.3 Les différentes conformations des chaînes hydrocarbonées lipidiques dans une bicouche.**

La phase lamellaire est une phase cristal-liquide de type smectique. Elle est constituée d'un empilement de bicouches séparées par des couches d'eau. La phase lamellaire gel notée  $L_{\beta}$  est une phase ordonnée dans laquelle les lipides forment un réseau hexagonal, les chaînes hydrocarbonées sont presque en contact à cause des interactions de Van der Waals, elles sont inclinées (tilt) d'environ  $35^{\circ}$  par rapport à la normale à la bicouche (Jansson, 1990), elles sont parallèles et en conformation tout-trans donc étirées au maximum. La phase lamellaire fluide  $L_{\alpha}$  est le résultat d'une augmentation de la température sur une phase  $L_{\beta}$  (Figure II.3). Cette phase est plus désordonnée, les chaînes sont statistiquement perpendiculaires à l'interface, plus courtes que celles en phase  $L_{\beta}$ . Cette transition est provoquée par une augmentation du taux d'isomérisation trans-gauche des chaînes hydrocarbonées qui entraîne une diminution de l'épaisseur hydrophobe des bicouches, une expansion latérale des bicouches et donc un accroissement de l'aire de surface d'environ 20%. Dans cette conformation, les chaînes oscillent autour d'une orientation moyenne perpendiculaire au plan de la bicouche (Figure II.19) et la structure des chaînes d'acides gras est très désordonnée au sein de la bicouche. Le contact entre les chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. La

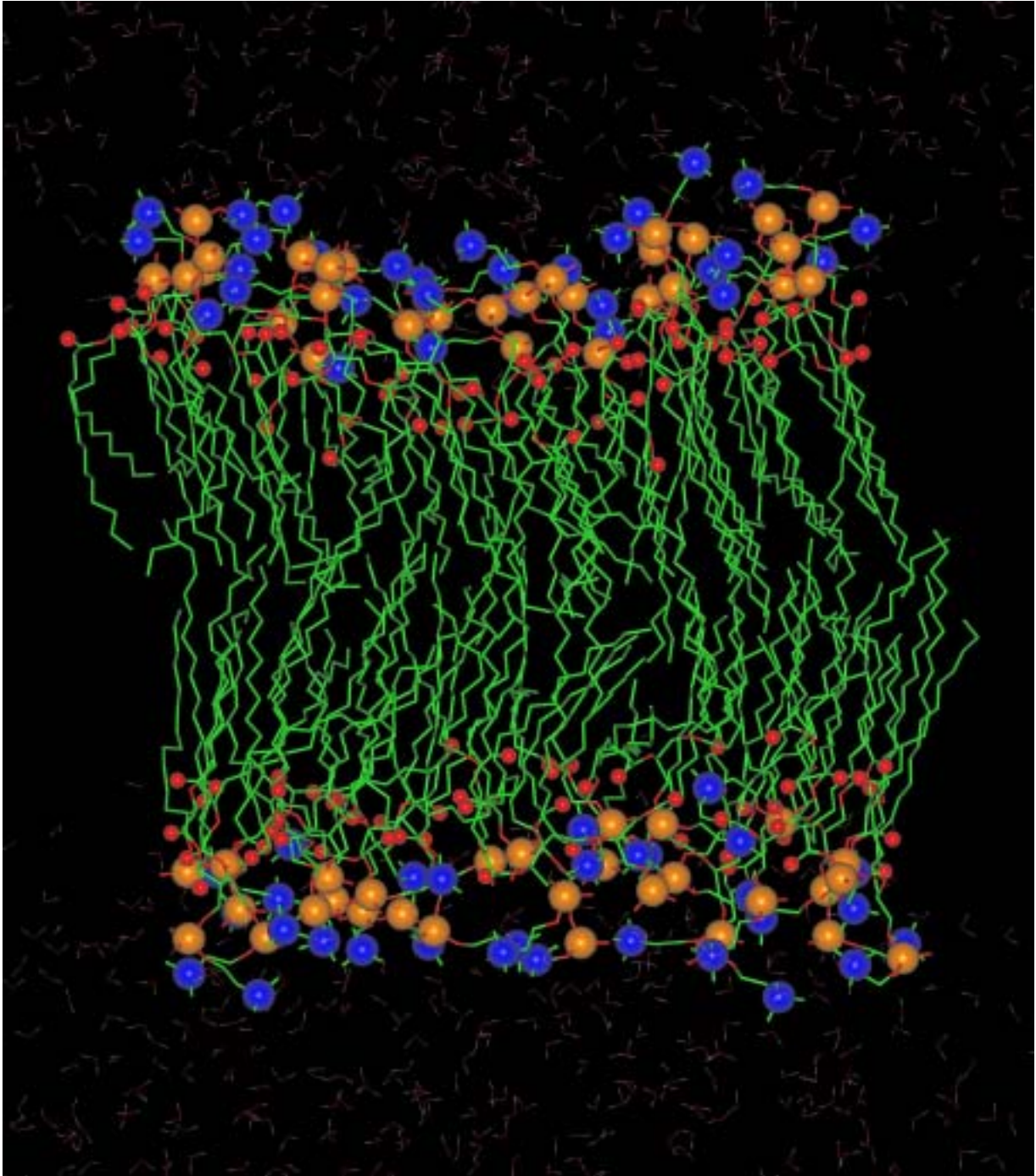
RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et la DSC (Differential Scanning Calorimetry) sont deux techniques qui permettent de mesurer les températures de transition des phases. Nous étudierons la plus simple des deux phases  $L\alpha$ . Les bicouches membranaires complexes sont composées de deux feuillettes asymétriques qui les rendent difficiles à modéliser. Une façon simple de les mimer est de fabriquer des bicouches homogènes, composées d'un seul type de lipide. Cependant des études concernant des couches mixtes contenant des phospholipides et du cholestérol ont été menées par dynamique moléculaire (Léonard, 2001, Smondyrev, 2001). Comme on l'a vu, les phospholipides chargés négativement sont présents dans les membranes cellulaires. Il est donc important de pouvoir les modéliser. D'un point de vue expérimental, la modélisation de systèmes phospholipidiques chargés négativement reste encore difficile à mettre en oeuvre. Une très grande littérature décrit l'étude physico-chimique des bicouches phospholipidiques de type phosphatidylcholine (DPPC et DMPC) tant du point de vue expérimental que par des méthodes numériques, les bicouches de phosphatidyléthanolamines semblent quant à elles plus difficiles à manipuler ainsi que les bicouches de phospholipides chargés négativement de type PS. Il faut souligner qu'aucune simulation numérique sur les bicouches de phospholipides PG n'avait encore été entreprise avant ce travail. Ce travail présente donc l'étude complète de quatre bicouches pures DMPC, DMPE, DMPS et DMPG qui ont toutes des chaînes d'acides gras identiques saturées à 14 carbones dites 1,2-dimyristoyl. Chaque charge négative des phospholipides de DMPG et DMPS est neutralisée par un ion sodium  $\text{Na}^+$  pour obtenir une boîte de simulation électriquement neutre. Le DMPC étant le phospholipide le plus étudié, il est pris comme référentiel car il faut souligner que les phospholipides chargés négativement (DMPG et DMPS) sont très peu étudiés expérimentalement. D'autre part pour les quelques données expérimentales trouvées dans la littérature aucune incertitude de la mesure n'est précisée. L'échelle de temps de la simulation de bicouches modèles par dynamique moléculaire s'étend de quelques dizaines de picosecondes à quelques dizaines de nanosecondes et permet ainsi de déterminer certains paramètres spécifiques et de mouvement des bicouches phospholipidiques ou des phospholipides individuels. Le but de ce travail, est d'obtenir des modèles de bicouches équilibrées pour les utiliser pour la partie III. Etude des interactions peptides/membranes lipidiques. Le but originel n'était pas d'obtenir des couches parfaites



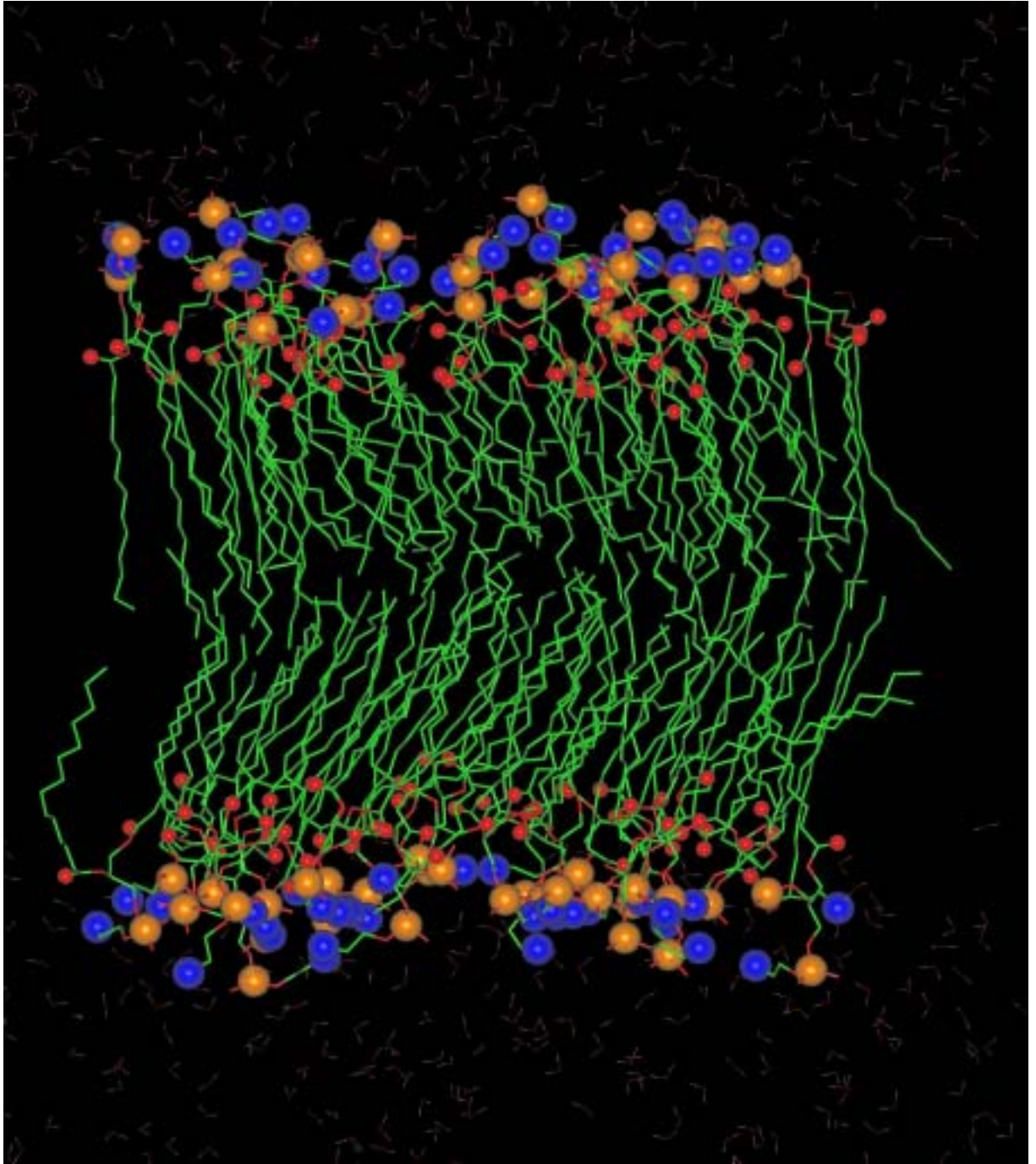
cependant comme nous allons le voir, les durées des simulations (2 ns) sont suffisantes pour déterminer avec fiabilité certains paramètres structuraux et dynamiques.

## **1. Présentation des systèmes**

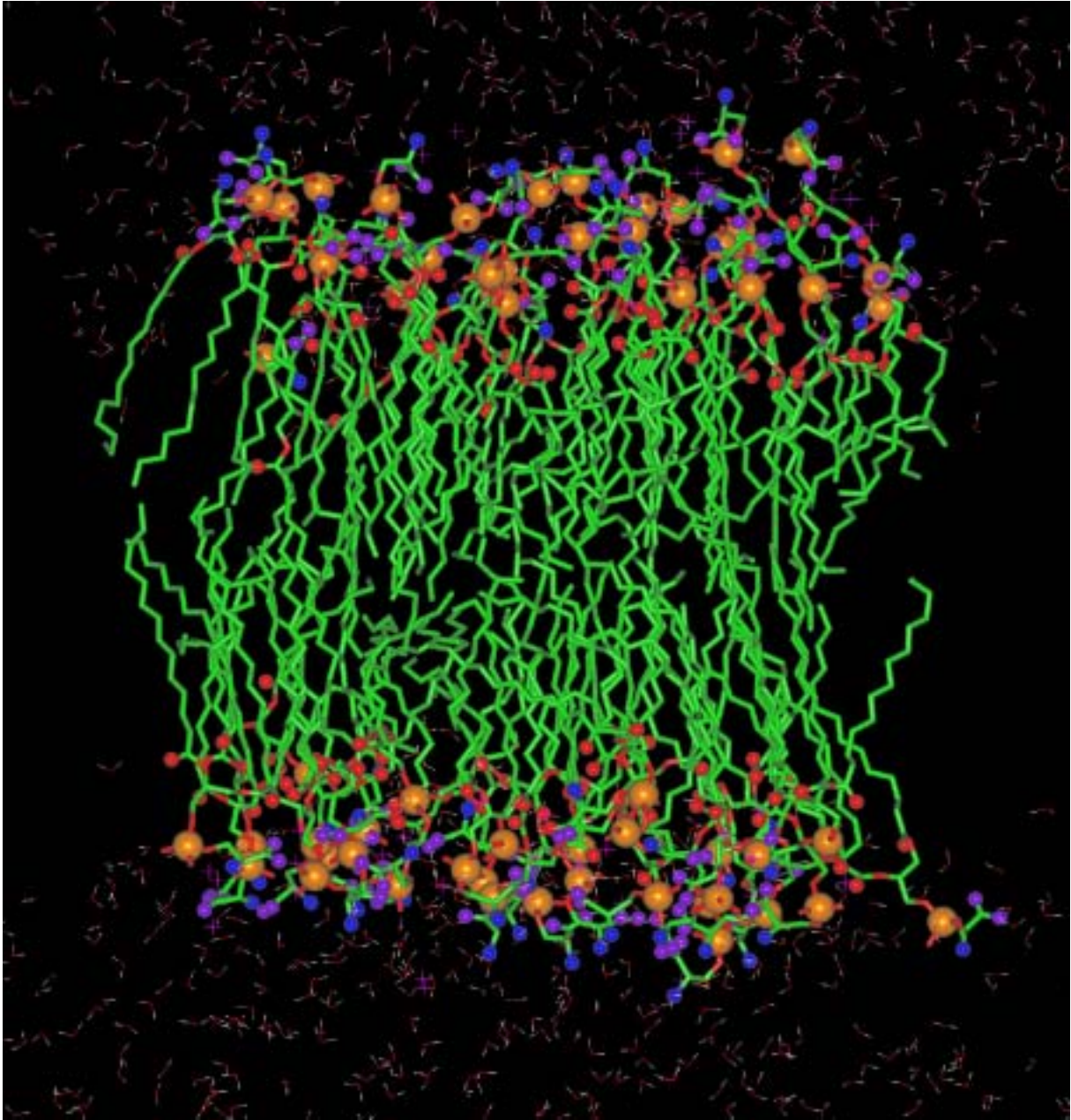
Sur les Figures 14-17 sont représentés des clichés des bicouches équilibrées à 2 ns. Les analyses sont effectuées sur la seconde ns de la simulation. On peut remarquer immédiatement à l'interface eau/lipides que la surface des têtes polaires semble nettement plus lisse pour la bicouche DMPE que pour toutes les autres couches et tout particulièrement pour la couche de DMPG qui apparaît très désordonnée. D'autre part nous montrerons plus tard que la première couche d'hydratation autour des têtes est plus grande dans le cas du DMPC que dans le cas du DMPE, ce qui montre une meilleure organisation de l'eau autour des têtes éthanolamines que des têtes cholines. Nous verrons que d'autres facteurs tels que le nombre moyen de conformation gauche et que l'angle du vecteur PN par rapport à la normale à la bicouche participent aussi à cette meilleure organisation de la bicouche de DMPE.



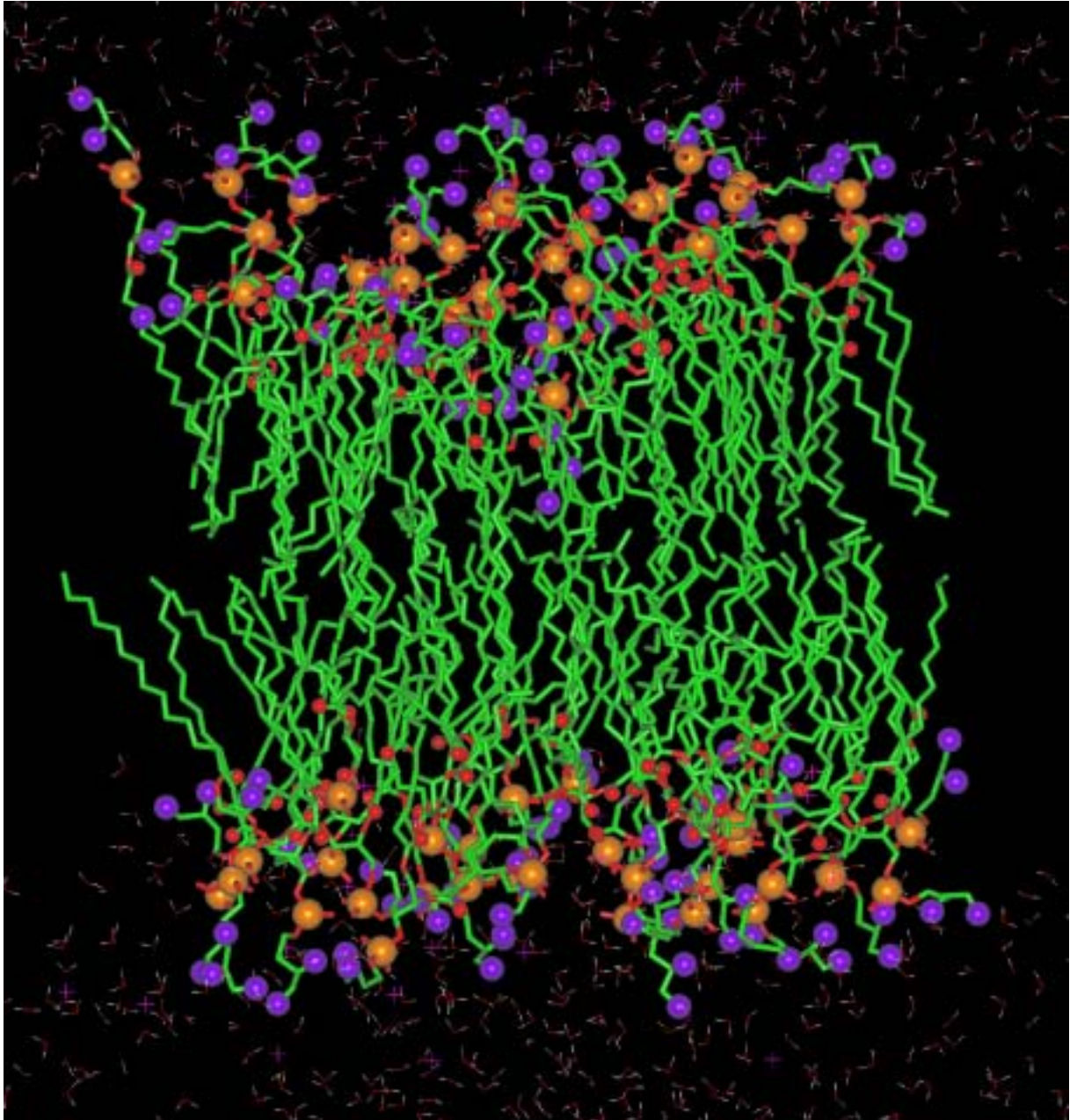
**Figure II.4** Cliché du système eau-bicouche DMPC à 2 ns. Les sphères rouges représentent les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras, les bleues les azotes, les oranges les phosphores et les tiges vertes les carbones. Pour simplifier les images, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPC n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygène) et blanc (hydrogènes).



**Figure II.5** Cliché du système eau-bicouche DMPE à 2 ns. Les sphères rouges représentent les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras, les bleues les azotes, les oranges les phosphores et les tiges vertes les carbones. Pour simplifier les images, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPE n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygène) et blanc (hydrogènes).



**Figure II.6** Cliché du système eau-bicouche DMPS à 2 ns. Les sphères rouges représentent les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras, les bleues les azotes, les oranges les phosphores, les violettes les oxygènes des Carboxyls de la Sérine de la tête polaire, les tiges vertes les carbones et les croix roses les ions sodium. Pour simplifier les images, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPS n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygène) et blanc (hydrogènes).



**Figure II.7** Cliché du système eau-bicouche DMPG à 2 ns. Les sphères rouges représentent les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras, les bleues les azotes, les oranges les phosphores, les violettes les oxygènes du Glycérol de la tête polaire, les tiges vertes les carbones et les croix roses les ions sodium. Pour simplifier les images, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPG n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygène) et blanc (hydrogènes).

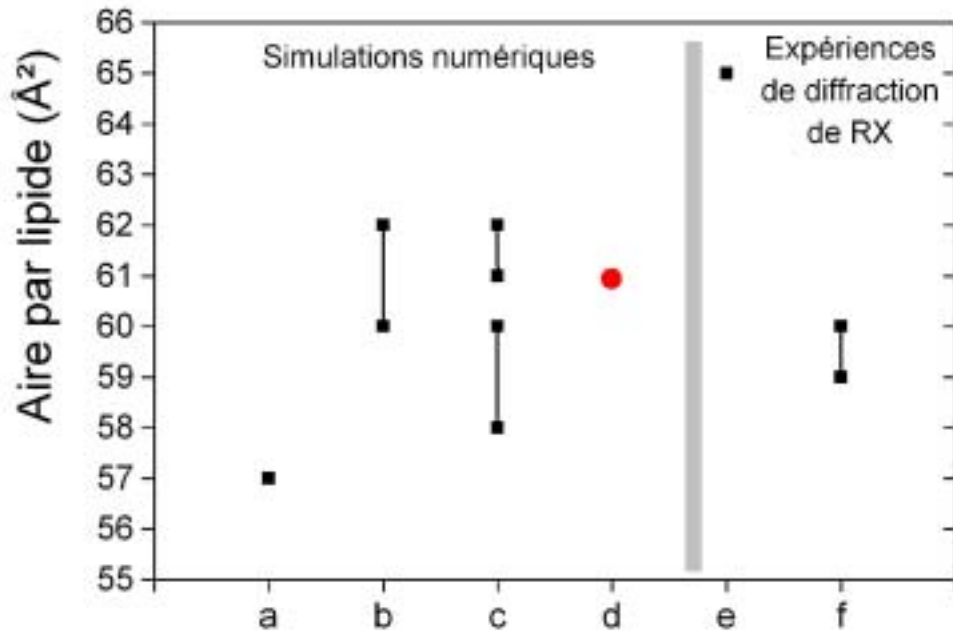
## 2. Aire de surface

L'aire spécifique ou aire de surface  $A$ , exprimée en  $\text{\AA}^2/\text{lipide}$  est la surface moyenne occupée par un lipide dans une couche. Elle est en général bien définie pour une bicouche phospholipidique et peut varier pour une monocouche avec la pression latérale. Les aires de surface des phospholipides usuels peuvent être trouvées dans la littérature et servent de point de départ à la construction des couches lipidiques par dynamique moléculaire. Ce paramètre est important pour la validité des résultats de dynamique moléculaire. Il sert donc :

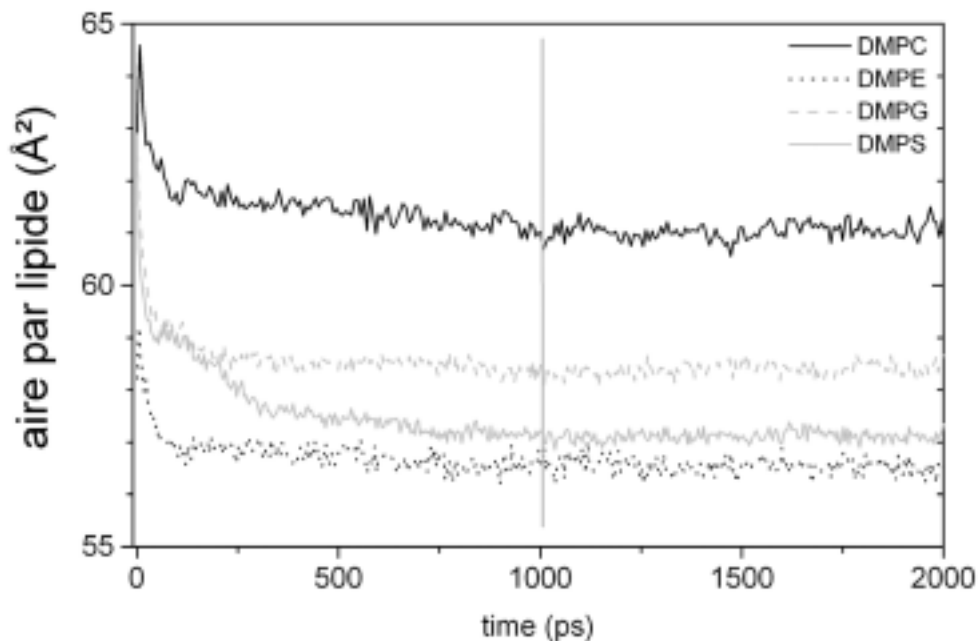
- de point de départ à la construction des couches : on calcule les paramètres du réseau hexagonal à partir de l'aire de surface sachant que  $A = \sqrt{3}/2) a^2/N$  avec  $a$ =distance entre deux phosphores du plan de la couche et  $N$ =nombre de lipide par couche
- à valider la conformité de la couche en fin de simulation. L'aire de surface de chaque bicouche est calculée en divisant le produit des deux dimensions de boîte  $a$  et  $c$  (respectivement suivant  $Ox$  et  $Oz$ ) par le nombre de molécules de phospholipides dans un feuillet.

Sur la Figure II.8, sont rappelés les valeurs expérimentales et de simulation de l'aire de surface de la bicouche de DMPC. Sur cette figure, on remarque l'étalement des résultats expérimentaux (de 59 à 65  $\text{\AA}^2$ ) et théoriques (de 57 à 62  $\text{\AA}^2$ ).

De plus on a tracé le graphe de la Figure II.9, sur lequel on peut suivre l'évolution de ce paramètre de toutes les bicouches étudiées en fonction du temps, on considère qu'au bout de 1 ns les systèmes sont équilibrés et on effectue les mesures entre 1 ns et 2 ns. Ainsi nous avons estimé l'aire de surface du DMPC à  $61,0 \pm 0,15 \text{\AA}^2$  (Figure II.9) ce qui s'inscrit parfaitement dans l'intervalle expérimental (Rand, 1989, Petrache, 2000) (Figure II.8).



**Figure II.8** Comparaison des aires de surface de la bicouche de DMPC obtenue par plusieurs simulations et expérimentalement. (a) Chiu, 1995; (b) Pasenkiewicz-Gierula, 1997; (c) Petrache, 2000; (d) Notre simulation ;(e) Rand and Parsegian, 1989; (f) Petrache, 1999

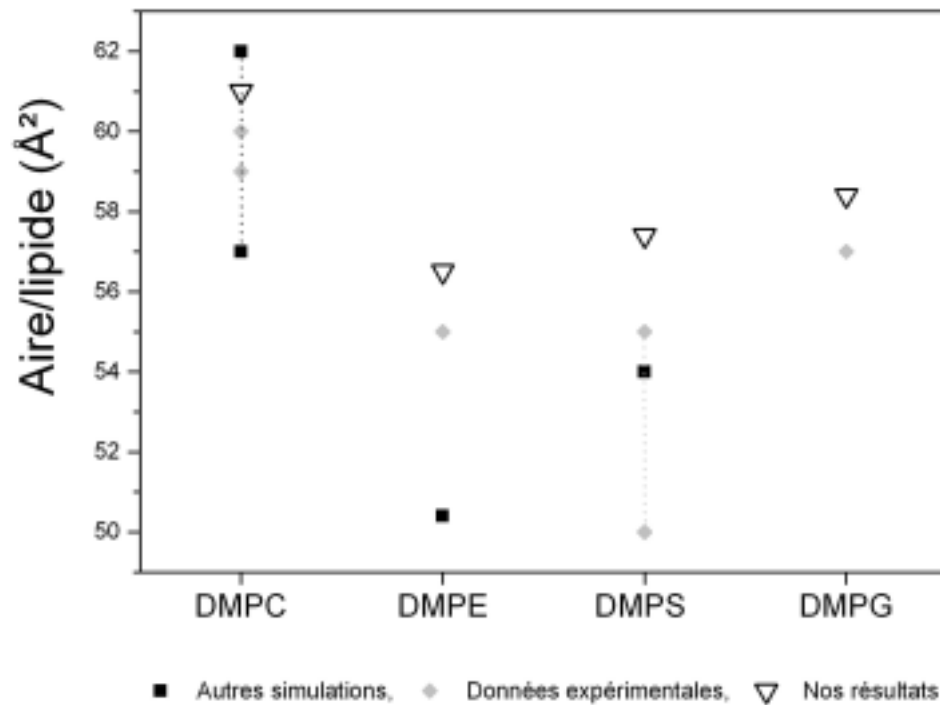


**Figure II.9** Evolution des aires de surface des bicouches phospholipidiques modèles au cours des simulations.

Pour la bicouche de DMPE, la valeur de l'aire a été calculée à  $56,5 \pm 0,14 \text{ \AA}^2$  et a été trouvée expérimentalement supérieure à  $55 \text{ \AA}^2$  par diffraction de rayons X (Seddon, 1984) et mesurée autour de  $50,4 \text{ \AA}^2$  par dynamique moléculaire pour le DLPE (Perera, 1996). Les aires de surface des phospholipides chargés négativement varient suivant la nature du contre-ion, dans notre cas nous avons utilisé du sodium pour neutraliser la charge négative portée par le DMPG et le DMPS. Pour les bicouches de DPPS, la littérature fournit des valeurs expérimentales de  $50$  à  $55 \text{ \AA}^2$  (Cevc, 1981, Demel, 1987, MacDonald, 1987) et par simulation de  $54 \text{ \AA}^2$  (Lopez Cascales, 1996a). Pour notre part nous avons trouvé une valeur de  $57,4 \pm 0,65 \text{ \AA}^2$  pour la bicouche de DMPS, cette valeur est supérieure aux valeurs de DPPS. Dans le cas de la bicouche de DMPG, nous n'avons trouvée qu'une seule référence (Ranck, 1977) dans laquelle la valeur expérimentale de l'aire de surface est à  $57 \text{ \AA}^2$  sans aucune précision sur l'intervalle d'incertitude. La valeur trouvée est légèrement supérieure, avec  $58,4 \pm 0,11 \text{ \AA}^2$ . Les résultats obtenus pour ces deux phospholipides sont néanmoins corrects et s'inscrivent bien dans l'intervalle des données expérimentales. De plus, il faut souligner que l'on utilise les mêmes dimensions initiales de boîte (a et c) pour les trois cas, DMPC, DMPG et DMPS.



Après 200 ps d'équilibration, les dimensions a et c atteignent des valeurs constantes qui conduisent à des aires de surface qui corroborent les données expérimentales.

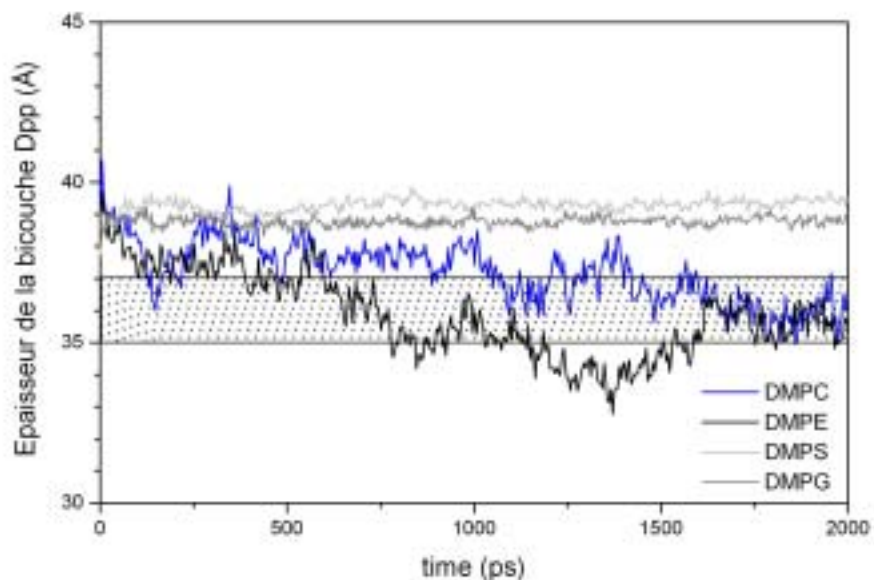


**Figure II.10** Comparaison des aires de surface des bicouches phospholipidiques étudiées.

Sur la Figure II.10, nous avons rassemblé les valeurs issues des données expérimentales, d'autres simulations et de nos résultats. Nos résultats sont en moyenne toujours à peu près supérieurs de 1 Å aux valeurs expérimentales. Cependant, excepté pour le DMPS, ils sont plus proches des valeurs expérimentales que ne le sont les simulations des autres équipes. Ceci est peut être la conséquence d'un temps de simulation un peu court (2 ns) et on peut penser qu'une simulation un peu plus longue permettrait d'obtenir un résultat encore plus proche.

### 3. Epaisseur hydrophobe $D_{PP}$

Le niveau atomique accessible par la simulation par dynamique moléculaire permet de mesurer n'importe quelle distance interatomique inter ou intramoléculaire. Les distances intramoléculaires expérimentales sont en général mesurées par diffraction de neutrons ou par RMN du Deutérium. La distance  $D_{PP}$ , distance entre les phosphores d'un feuillet et ceux de l'autre feuillet, est intéressante à mesurer car elle permet d'évaluer l'épaisseur "hydrophobe" des bicouches phospholipidiques.



**Figure II.11 Evolution de l'épaisseur hydrophobe des bicouches phospholipidiques modèles au cours du temps. La zone hachurée représente l'intervalle expérimental (Chiu, 1995).**

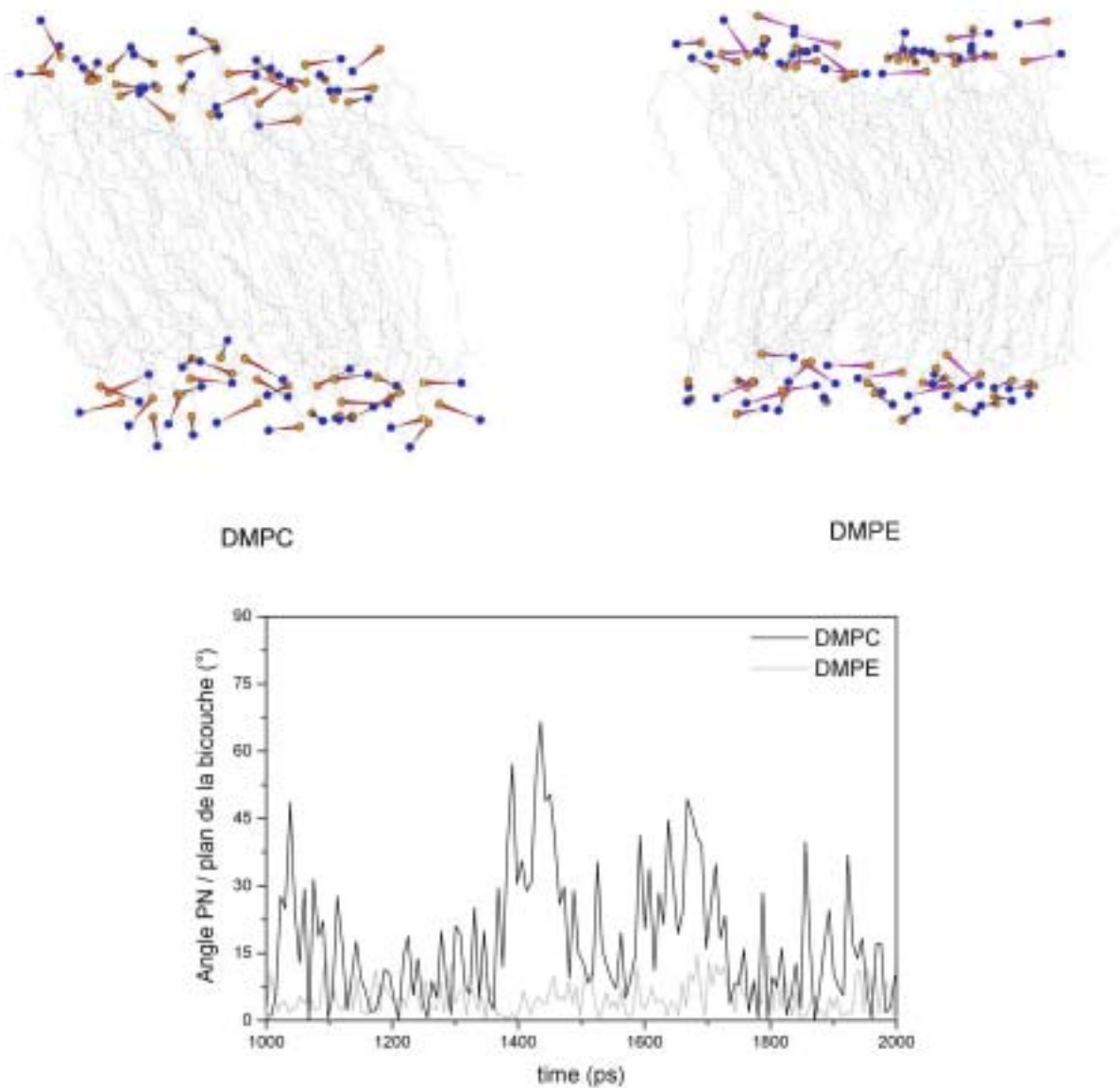
La Figure II.11 permet de suivre l'évolution de l'épaisseur hydrophobe des bicouches phospholipidiques étudiées au cours du temps. Ce paramètre est correctement et très précisément déterminé par dynamique moléculaire mais peu étudié expérimentalement, à l'exception de la bicouche de DMPC. Pour cette dernière, l'épaisseur varie de 35 Å à 37 Å

(Chiu, 1995). Comme on peut le voir sur la Figure II.11, au cours de la première ns, la courbe de l'épaisseur de la bicouche de DMPC en fonction du temps est décroissante jusqu'à atteindre une valeur stable pour la seconde ns. Les résultats corroborent les données expérimentales, en effet, on trouve au cours de la seconde ns une valeur moyenne de  $36,8 \pm 0,20$  Å qui s'inscrit dans l'intervalle expérimental trouvé par Chiu *et al.* (Chiu, 1995). La courbe de la bicouche de DMPE montre le même profil jusqu'à 1350 ps où elle atteint une valeur très basse d'environ 33 Å pour ensuite se stabiliser sur un plateau à  $35,7 \pm 0,47$  Å durant les 400 dernières ps. Le fait que ce plateau se trouve dans l'intervalle expérimental de l'épaisseur de la bicouche de DMPC mais avec une valeur inférieure est en bon accord avec la composition très proches des deux espèces. Si on relie l'épaisseur de la bicouche de DMPE et l'aire de surface, il semble que la tête éthanolamine, malgré sa composition chimique très proche de celle de la choline, ait tendance à condenser la bicouche. En ce qui concerne les bicouches chargées négativement, on remarque immédiatement que comparées aux courbes analogues des phospholipides de DMPC et DMPE, les courbes de l'évolution de l'épaisseur hydrophobe des bicouches de DMPG et DMPS sont constantes durant les deux ns de simulation et ne présentent aucune variation importante. Elles fournissent des valeurs supérieures à celles des phospholipides non chargés,  $38,8 \pm 0,14$  Å pour DMPG et  $39,3 \pm 0,21$  Å pour DMPS. Expérimentalement, Ranck *et al.* par des profils de densité électronique (Ranck, 1977) avaient trouvé 40 Å pour la bicouche de DMPG en phase fluide, cependant aucune précision n'était indiquée sur les éléments délimitant la zone hydrophobe mesurée. De plus, des études expérimentales (Hauser, 1982, Ranck, 1977) sur les phosphatidylglycérols et les phosphatidylsérines ont montré que le contre-ion influence de façon importante l'épaisseur de la bicouche et conduit à de grandes variations. Ces valeurs plus grandes dans le cas de ces phospholipides peuvent être la conséquence des groupements portés par les têtes polaires de ces lipides. En effet, les phosphatidylglycérols portent deux groupes hydroxyles en libre rotation autour des phosphates, ils peuvent former des liaisons Hydrogène avec l'eau de la première couche d'hydratation ainsi on peut supposer qu'un mouvement d'étirement des glycérols vers le milieu aqueux perturbe la bicouche et augmente l'épaisseur hydrophobe, la détermination du nombre de coordination entre ces groupes hydroxyles et l'eau nous permettra de renforcer cette hypothèse. Dans le cas des phosphatidylsérines, il a déjà été observé que les bicouches contenant ce lipide perturbe de façon importante la structure de

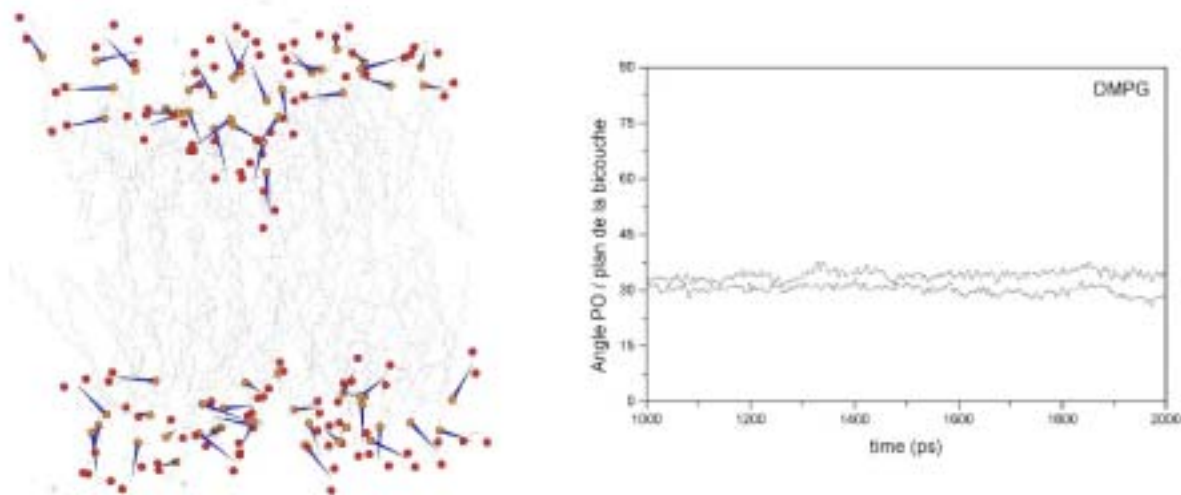
l'eau (Lopez Cascales, 1996a) et il se pourrait que cet effet ait une influence sur l'épaisseur de la bicouche. D'autre part, la mécanique moléculaire ne permet pas de distinguer réellement les différents ions car on perd effectivement tous les effets des orbitales et des électrons et il ne reste que le volume.

## 4. Les têtes polaires

### a) Distances hétéroatomiques



**Figure II.12** Angle du vecteur (PN) avec le plan de la bicouche] Angle du vecteur (PN) avec le plan de la bicouche de DMPC et DMPE. Sur la figure du haut sont représentés les dipôles PN en rouge pour le DMPC et en violet pour le DMPE. La partie des têtes polaires est représentée par les sphères oranges (phosphores) et bleues (azotes) et la partie hydrophobe des bicouches est en gris. Sur le graphe du bas, le trait en noir bicouche de DMPC, le trait en gris la bicouche de DMPE.



**Figure II.13 Angle du vecteur (PO) avec le plan de la bicouche de DMPG.** Sur la figure à gauche est représenté en bleu le dipôle PO résultant du DMPG. La partie des têtes polaires est représentée par les sphères oranges (phosphores) et bleues (azotes) et la partie hydrophobe des bicouches est en gris. Sur le graphe à droite on a représenté le dipôle de chacun des hydroxyles de la tête polaire.

Les distances phosphore-azote PN, pour le DMPC et le DMPE, phosphore-oxygène des hydroxyles POH pour le DMPG ont été mesurées, en revanche aucune distance hétéroatomique n'a été mesurée pour la tête sérine de DMPS car il est très difficile de trouver un référentiel intéressant à cause de la complexité de la tête polaire. La distance phosphore-oxygène des hydroxyles POH du DMPG est mesurée à partir du vecteur résultant des deux hydroxyles. Toutefois si les distances restent constantes au cours des simulations, l'angle entre ces vecteurs et le plan à la bicouche présente des valeurs intéressantes. Sur la Fig. II.12, sont représentés les vecteurs PN et les angles moyens correspondants aux deux bicouches de DMPC et de DMPE, le vecteur PN est défini du phosphore (sphères oranges) vers l'azote (sphères bleues). Si on compare le DMPC et le DMPE (Fig. II.12), le vecteur PN du DMPE oscille autour de l'angle droit ( $5,2 \pm 3,6^\circ$ ) avec le plan de la bicouche, alors que le même angle pour le DMPC a une valeur moyenne de  $17,6 \pm 14,4^\circ$ . Ceci confirme la première observation concernant la surface de la bicouche de DMPE qui est plus lisse que celle de DMPC. On remarque sur la Fig. II.12 que l'on peut trouver quelques vecteurs qui pointent

vers le cœur hydrophobe de la bicouche de DMPC mais peu dans la bicouche de DMPE. Dans le cas du DMPG (Fig. II.13), on remarque immédiatement une très grande variation dans les orientations et surtout certains vecteurs dirigés vers le centre de la bicouche conduisent à des valeurs moyennes de l'angle des vecteurs POH comprises entre  $30^\circ$  à  $36^\circ$ . Ceci montre la grande mobilité des têtes de glycérols.

### b) RDF, nombre de coordination, couches d'hydratation

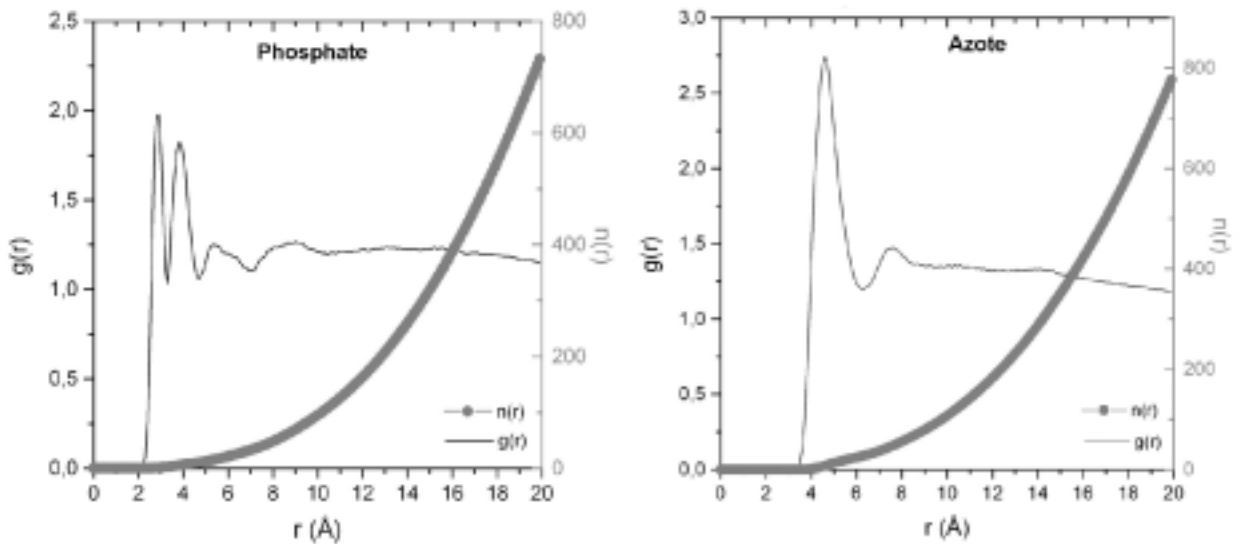


Figure II.14 Couches d'hydratation du phosphate et de l'azote du DMPC.

	DMPC			DMPE		
	r(Å)	g(r)	n(r)	r(Å)	g(r)	n(r)
$\text{PO}_4^- \text{-H}_2\text{O}$	2.6	2.4	1	2.7	0.9	0.8
	3.9	1.55	3.6	4.1	1.1	2.8
	5.0	1.6	7	5.1	1.0	6
$\text{PO}_4^- \text{-O}_{\text{H}_2\text{O}}$	2.6	2.4	-	2.6	0.75	-
	3.9	1.55	-	3.8	0.8	-
	5.0	1.6	-	5.0	0.7	-
$\text{PO}_4^- \text{-H}_{\text{H}_2\text{O}}$	2.9	1.8	-	2.9	0.8	-
	4.2	1.5	-	4.2	0.7	-
	5.3	1.3	-			-
$\text{N-H}_2\text{O}$	4.6	2.9	9	3.4	1.6	2.6
	7.5	1.5	27	5.6	1.1	10.4
$\text{N- O}_{\text{H}_2\text{O}}$	4.6	3.0	-	2.9	3.3	-
	7.4	1.5	-	5.1	1.2	-
$\text{N- H}_{\text{H}_2\text{O}}$	4.6	2.7	-	3.5	1.8	-
	7.7	1.5	-	5.7	1.1	-

**Tableau 3 Couches d'hydratation du phosphate et de l'azote du triméthylammonium des phospholipides zwitterioniques.**

	DMPG			DMPS			
	r(Å)	g(r)	n(r)	r(Å)	g(r)	n(r)	
$\text{PO}_4^- \text{-H}_2\text{O}$	2.8	1.4	0.5	$\text{PO}_4^- \text{-H}_2\text{O}$	2.7	1.1	0.9
	4.1	1.4	2.3		4.1	1.2	3.2
	5.1	1.25	5		5.1	1.2	6
$\text{PO}_4^- \text{-O}_{\text{H}_2\text{O}}$	2.6	2.2	-	$\text{PO}_4^- \text{-O}_{\text{H}_2\text{O}}$	2.7	1.5	-
	3.9	1.4	-		3.9	1.33	-
	5.1	1.4	-		5	1.4	-
$\text{PO}_4^- \text{-H}_{\text{H}_2\text{O}}$	2.9	1.7	-	$\text{PO}_4^- \text{-H}_{\text{H}_2\text{O}}$	3	1.25	-
	4.2	1.5	-		4	1.4	-
	5.4	1.2	-				
$\text{OH(hydroxyle)-H}_2\text{O}$	3.1	1.2	2	$\text{COO}^- \text{(serine)- H}_2\text{O}$	3.7	2.1	2
	5.7	1.3	12.4		4.8	16.6	5.5
				$\text{N(sérine)-H}_2\text{O}$	2.9	2.5	2.2
					4.5	1.8	5

**Tableau 4 Couches d'hydratation du phosphate et des éléments des têtes des phospholipides chargés négativement**



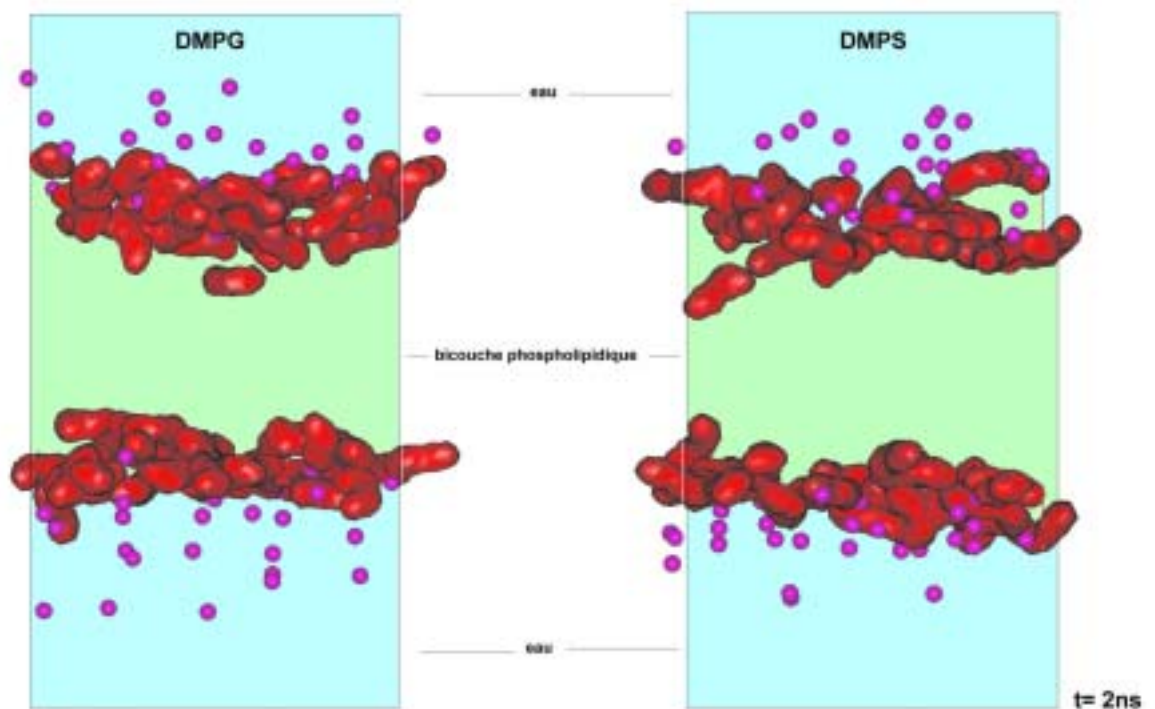
Pour calculer les couches d'hydratation des différents groupements de la tête hydrophile des lipides, nous avons utilisé le calcul par la fonction de distribution radiale (RDF). On rappelle que cette fonction représente la probabilité de trouver une particule  $j$  à une distance comprise entre  $r$  et  $r+\delta r$  d'une particule  $i$  en fonction de la distance  $r$  (une équation plus détaillée est présentée dans la Section 7.5.4 Fonctions de Distribution Radiale (RDF)). Ainsi les calculs de RDF ont permis de trouver un point commun à tous les systèmes des bicouches.

En effet l'eau pénètre seulement jusqu'aux carbonyles des esters de la tête polaire, cependant la quantité d'eau trouvée à ce niveau est très faible ( $< 0.33$  molécules d'eau). Sur la Fig. II.14 sont représentés les graphes des RDF et du nombre de coordination du phosphate et de l'azote du triméthylammonium du DMPC. Sur le Tableau 4 sont résumées les valeurs des couches d'hydratation des différents éléments des têtes. On remarque que le phosphate présente plusieurs couches d'hydratation, une première couche d'hydratation à  $2,6 \text{ \AA}$  avec une seule molécule d'eau puis une deuxième couche à  $3,9 \text{ \AA}$  avec  $3,6$  molécules d'eau et une troisième couche à  $5,0 \text{ \AA}$  avec  $7$  molécules d'eau. Dans ces couches, l'eau est très structurée et orientée en effet lorsqu'on refait le calcul en différenciant l'oxygène et les hydrogènes de l'eau (Tableau 4), on s'aperçoit que les trois couches n'engagent que l'oxygène de l'eau. Quant aux hydrogènes, ils apparaissent à chaque fois à  $+0.3 \text{ \AA}$  des couches de l'oxygène, donc il est raisonnable de penser que l'oxygène pointe vers le phosphate et les hydrogènes vers l'extérieur. Le cas de l'azote du triméthylammonium est différent. Tout d'abord le graphe présente deux couches d'hydratation plus éloignées que dans le cas du phosphate. De plus quand les calculs sont refaits pour différencier l'oxygène et les hydrogènes de l'eau, on voit que la participation de ces atomes est exactement la même (Tableau 4). Ainsi à  $7,5 \text{ \AA}$  de l'azote on a une sphère d'eau comprenant plus de  $25$  molécules d'eau sans aucune orientation préférentielle, on a typiquement un "clathrate". Pour expliquer la différence volumique des couches d'hydratation de ces deux entités, on peut appliquer la théorie HSAB (Pearson, 1987) ainsi le phosphate

est un groupement dur car il est plus petit que le triméthylammonium et sa charge est plus localisée ce qui entraîne des couches d'hydratation peu éloignées de ce groupement. Au contraire, le triméthylammonium est un gros groupement avec une charge fortement délocalisée et donc est considéré comme mou et conduit à des couches beaucoup moins structurées. De plus nos valeurs sont en accord avec celles de Marrink et Berendsen (Marrink, 1994) qui trouvaient 12,5 molécules d'eau pour la première couche d'hydratation de l'azote. Si on compare les valeurs d'hydratation du DMPE et celles de DMPC (Tableau 3), on remarque que les rayons des couches d'hydratation ainsi que le nombre de molécules d'eau ( $n(r)$ ) autour du phosphate du DMPE sont très proches de ceux du DMPC avec cependant moins d'eau pour le DMPE. En revanche, le groupe ammonium du DMPE présente des valeurs inférieures à celles du DMPC car son diamètre est considérablement plus petit. De plus quand on différencie l'oxygène et les hydrogènes de l'eau, on ne retrouve pas la même structuration de l'eau autour du phosphate ou autour de l'ammonium. Cette différence est la conséquence de la "dureté" relative du groupement ammonium par rapport au triméthylammonium ce qui entraîne une compétition entre les deux entités phosphate et ammonium et donc le phosphate s'en trouve "ramolli". L'eau ne peut plus ni s'organiser ni s'orienter comme dans le cas du DMPC. Dans le Tableau 4 sont résumées les valeurs des couches d'hydratation des différents éléments des têtes du DMPG et du DMPS. On remarque que les rayons des couches d'hydratation autour du phosphate du DMPG sont très proches de ceux trouvés pour les phospholipides zwitterioniques. Cependant le phosphate du DMPG est moins hydraté que ceux du DMPC et du DMPE. L'examen du Tableau 4 semble montrer qu'il y a une organisation plus faible autour du DMPG. Quant aux groupes hydroxyles, ils présentent deux couches d'hydratation qui sont très proches en rayon et en nombre de molécules d'eau de celles de l'ammonium du DMPE. Le phosphate du DMPS présente les mêmes rayons et les mêmes taux d'hydratation que ceux des phospholipides zwitterioniques mais toujours avec une faible orientation de l'eau. Le taux de la première couche d'hydratation du résidu sérine, acide carboxylique et

ammonium confondus, est très proche de celui des hydroxyles du DMPG et l'ensemble se compare parfaitement bien avec l'ammonium du DMPE mais la deuxième couche présente un taux inférieur.

### 5. Localisation du sodium au sein des bicouches chargés négativement DMPG et DMPS



**Figure II.15 Localisation des ions sodium par rapport aux carbonyles des esters des chaînes aliphatiques des phospholipides DMPG et DMPS.** La surface rouge délimite les oxygènes des Carbonyles des esters des chaînes aliphatiques des phospholipides, les sphères roses les ions sodium, la zone colorée en bleue est la partie aqueuse, et la zone verte représente les bicouches phospholipidiques.

DMPG			DMPS		
Na/x	r(Å)	n(r)	Na/x	r(Å)	n(r)
H <sub>2</sub> O	3.0	4.3	H <sub>2</sub> O	2.3	1.01
	5.6	19.1		2.9	2.7
				4.8	11.2
OH (glycerol)	6.2	0.89	COO <sup>-</sup> (serine)	4.1	1.01
	7.8	1.98			
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5.2	0.87	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4.4	0.59
	7.4	3.79			
COO (ester)	5.0	0.99	COO (ester)	4.5	0.5
	7.2	2.52			

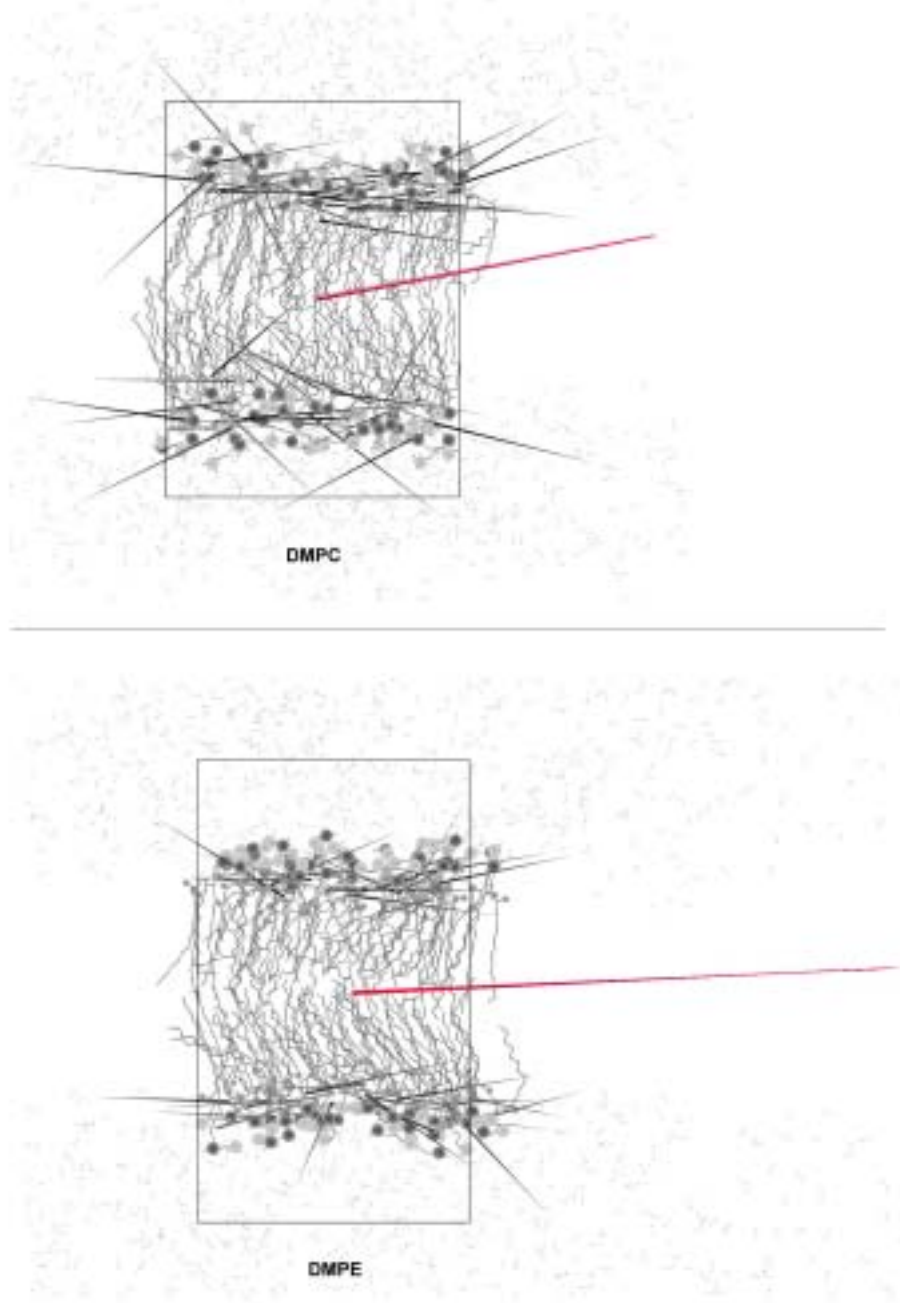
**Tableau 5 Fonction de diffusion radiale des ions sodiums pour les phospholipides DMPG et de DMPS.**

Sur la Figure II.15, on remarque que la localisation du sodium au sein des deux différentes bicouches DMPS et DMPG est très différente. En général, l'hydratation du sodium est très structurée avec quatre molécules d'eau formant un tétraèdre autour du sodium (les oxygènes pointant vers le sodium et les hydrogènes à l'extérieur du polyèdre). Sur le Tableau 5, on peut voir que l'ion sodium du DMPG est totalement hydraté : à 3,0 Å on a 4,3 molécules d'eau. La première couche d'hydratation est alors totalement satisfaite par l'eau et ce résultat est parfaitement confirmé par des distances de l'ordre de 6 Å entre le sodium et les hydroxyles du glycérol, soit au mieux au niveau d'une éventuelle seconde couche d'hydratation. En revanche, on peut remarquer qu'au niveau de cette éventuelle seconde couche on trouve systématiquement un carbonyle des esters des chaînes d'acides gras du DMPG.

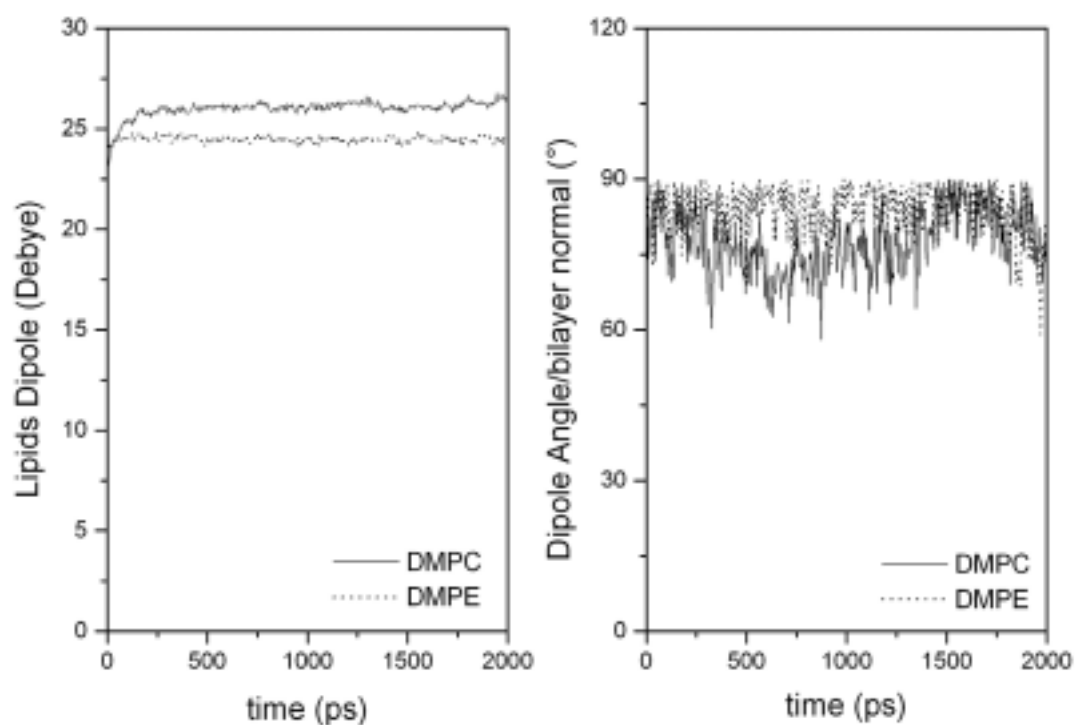
Le sodium adopte une coordination différente avec le DMPS. Comme on le voit dans le Tableau 4, l'hydratation de l'ion sodium n'est pas complète dans ce cas avec

seulement 2,7 molécules d'eau sur la première couche d'hydratation. On retrouve un ion sodium qui crée une liaison ionique avec la fonction acide carboxylique du résidu sérine. Cette dernière liaison complète ainsi la valence du sodium à environ quatre. De plus, on ne détecte qu'un "demi" ion sodium au niveau des phosphates et des carbonyles des esters du DMPS, donc, le sodium pénètre moins profondément la bicouche de DMPS car il est "capté" systématiquement par le carboxylate de la sérine positionnée dans la partie aqueuse.

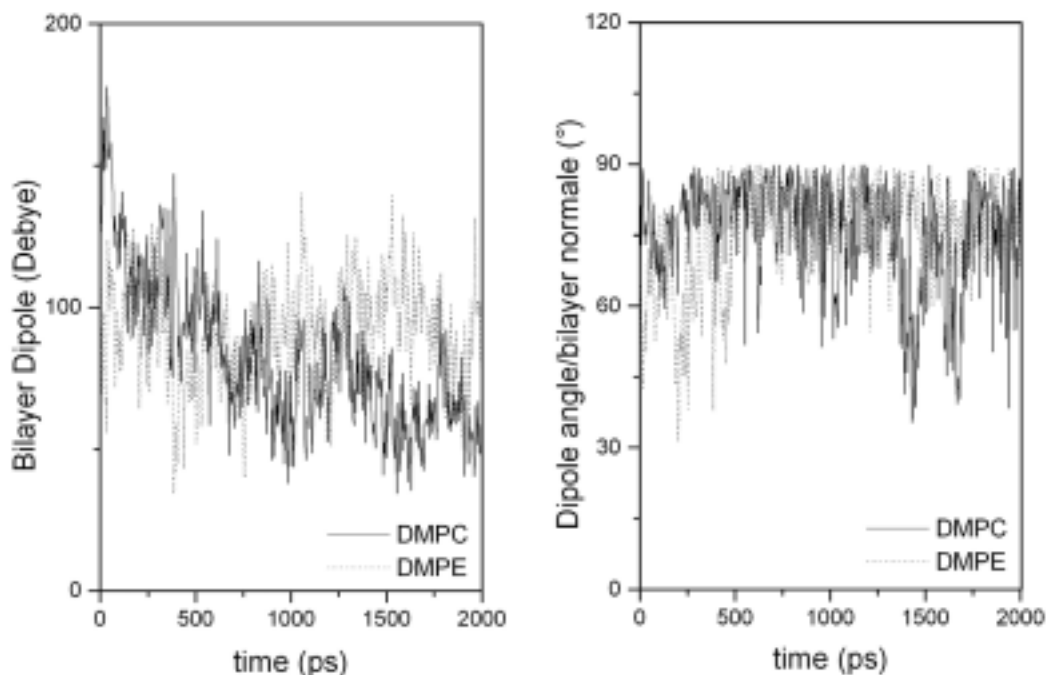
## 6. Moment dipolaire



**Figure II.16 Représentation des dipôles des lipides de DMPC et de DMPE et des bicouches.** Les flèches noires représentent les dipôles des lipides et les flèches rouges représentent les dipôles des bicouches.



**Figure II.17 Valeurs des dipôles des phospholipides pour chaque bicouche et angles correspondants.** En trait continu noir bicouche DMPC, en trait pointillé noir bicouche DMPE, en trait continu gris bicouche DMPS et en trait pointillé gris bicouche DMPG.



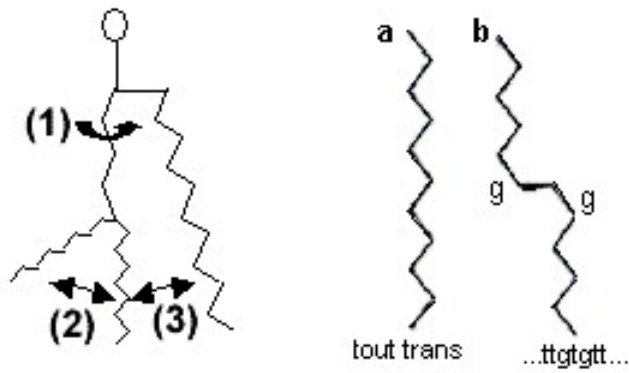
**Figure II.18 Valeurs des dipôles des différentes bicouches et angles correspondants.** En trait continu noir bicouche DMPC, en trait pointillé noir bicouche DMPE, en trait continu gris bicouche DMPS et en trait pointillé gris bicouche DMPC. Le vecteur du moment dipolaire est orienté le long de l'axe défini du centre de la charge négative vers le centre de la charge positive et son module est exprimé en Debyes (D).

Ainsi on a pu déterminer les valeurs des moments dipolaires des deux phospholipides zwitterioniques DMPC et DMPE, ce calcul est interdit pour le DMPC et le DMPS avec leur sodium associé car ce sont des paires d'ions libres. La dynamique moléculaire permet de définir le moment dipolaire du phospholipide individuel ou de l'ensemble de la bicouche. Sur la Figure II.17, nous présentons les graphes des dipôles de chaque phospholipide pendant la simulation ainsi que l'angle entre ces dipôles et la normale à la bicouche. Quand on observe les graphes (Figure II.17), on peut voir que les dipôles des lipides DMPE et de DMPC ont sensiblement le même



module soit 26,0 Debye pour les phospholipides de DMPC et 24,5 Debye pour les phospholipides de DMPE. On peut supposer que cette différence de valeur provient de la charge plus délocalisée sur le triméthylammonium du DMPC que sur l'ammonium du DMPE. Quand on regarde les clichés pris à 2 ns des dipôles des différentes bicouches, on peut voir la direction des vecteurs-dipôle (Fig. II.16). Quant aux dipôles des bicouches, on peut suivre leur évolution en fonction du temps sur les graphes de la Figure II.18 ainsi que l'évolution de l'angle entre le dipôle des bicouches et la normale à la bicouche. Les valeurs des dipôles des bicouches des deux phospholipides zwitterioniques varient autour de 82,6 Debye pour la bicouche de DMPC et de 90,4 Debye pour la bicouche de DMPE avec une variation moyenne de  $\pm 22$  Debye. Ces valeurs représentent environ 6% du total de tous les dipôles des lipides, elles sont faibles mais intéressantes car au total, le dipôle résiduel de la bicouche devrait être nul puisque les deux feuillets sont identiques cependant on observe un dipôle résiduel pour les bicouches résultant des fluctuations permanentes et non symétriques des deux feuillets. On remarque en fin de simulation que le moment dipolaire est orienté parallèlement à l'interface ( $\pm 30^\circ$ ) donc il y a un moment résiduel non négligeable. Ce résultat, s'il n'est pas dû à un artefact de calcul, est très intéressant puisqu'il indiquerait une corrélation entre les deux feuillets.

## 7. Isomérisation trans-gauche



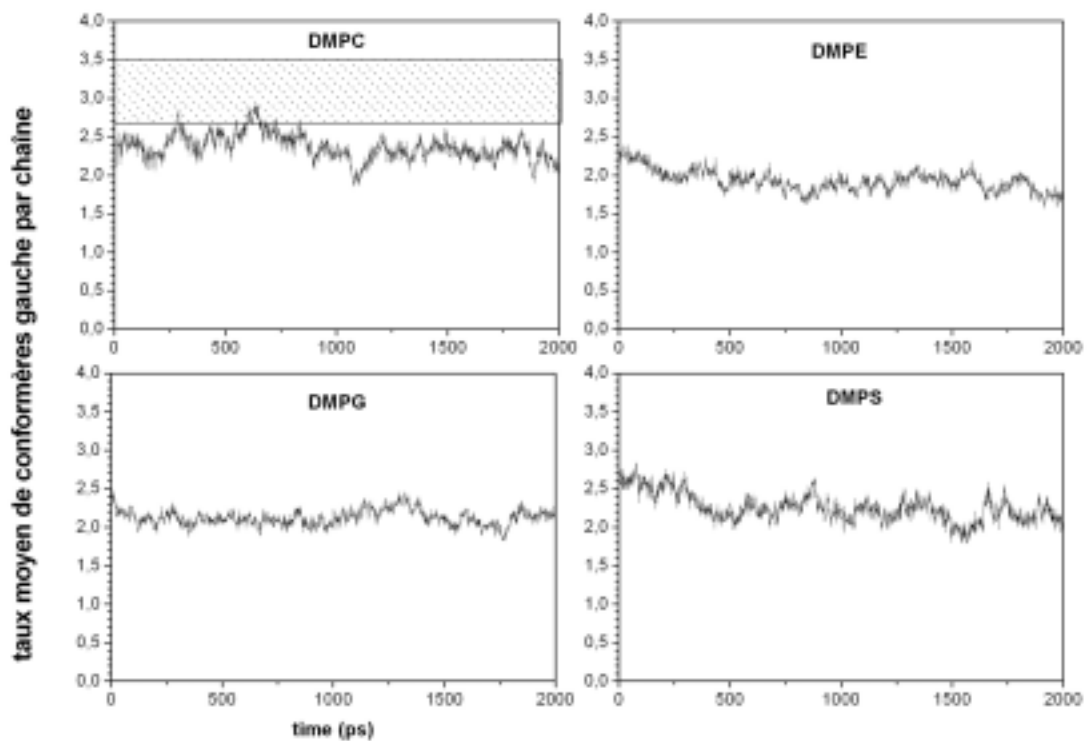
**Figure II.19 Les différentes conformations d'une chaîne hydrocarbonée saturée.**

Les lipides peuvent avoir des mouvements intramoléculaires, c'est le cas des mouvements de rotation autour des liaisons C-C des chaînes aliphatiques qui sont très rapides avec des fréquences allant de  $10^{-14}$  à  $10^{-13}$  s (soit de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  ns) (Figure II.19 (1)) et des mouvements de balancier et d'oscillation (Figure II.19 (2) et (3)).

De plus dans les chaînes carbonées, il existe une libre rotation autour des liaisons C-C appelée isomérisation trans-gauche de fréquence entre  $10^{-10}$  à  $10^{-8}$  s (ou 0,1 à 10 ns) représentée sur la Figure II.19-a et -b) (Gennis, 1989). La configuration la plus stable est la configuration trans (t). Dans une situation où les configurations autour de toutes les liaisons sont de type trans, la chaîne est étirée au maximum ; on a une configuration "tout-trans", cas des phases lamellaires gel  $L_{\beta'}$  ou  $L_{\beta}$  (Figure II.19 -a). Au-delà d'une température donnée on observe une transition coopérative, les chaînes passant d'une conformation ordonnée à une conformation désordonnée (conformation  $\alpha$ ). Le passage d'une configuration trans (t) à une configuration gauche autour d'une liaison C-C nécessite un peu d'énergie (quelques kJ). L'agitation thermique peut

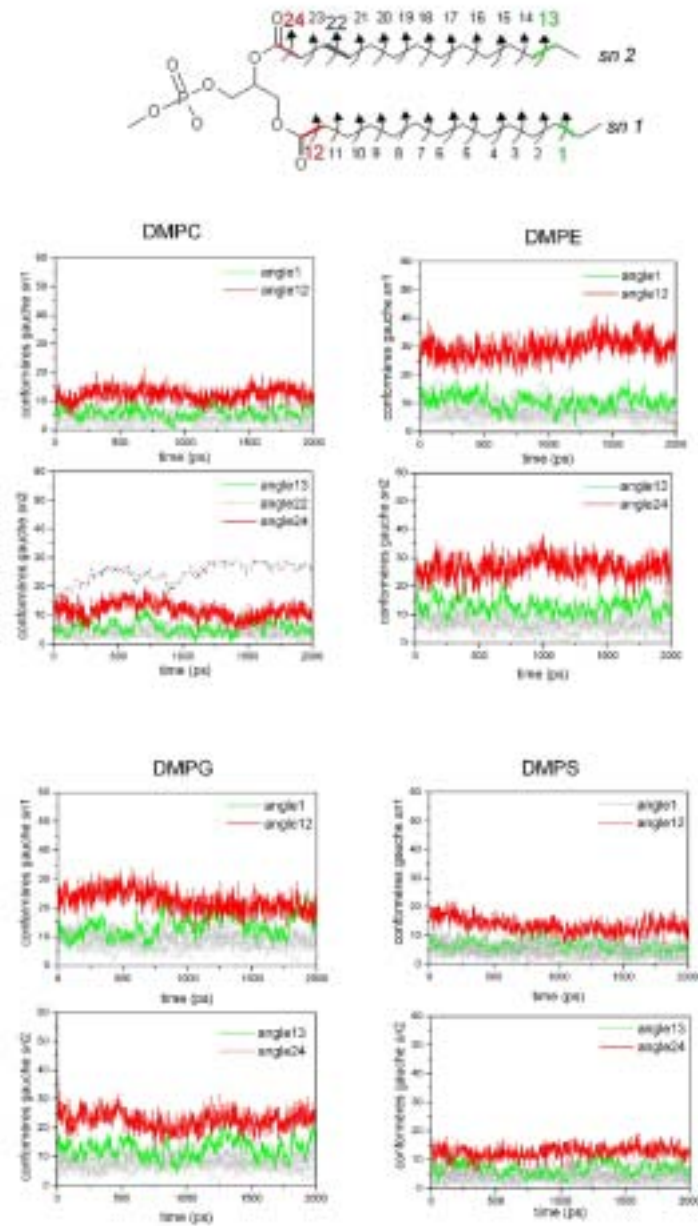
suffire à y pourvoir. Une séquence de configurations `..ttgtgtt..` entraîne (Figure II.19-b) au-delà de la configuration gauche un changement de direction de la chaîne. Dans une bicouche lipidique, ceci rend plus difficile un parallélisme des chaînes. On peut relier le taux de conformères gauches à la fluidité de la membrane : plus ce taux est élevé plus la membrane est fluide. Nous proposons de déterminer, à l'aide d'un programme FORTRAN écrit par Gilles Moreau, le taux de conformations gauches le long de chacune des chaînes aliphatiques ainsi que le taux moyen par chaîne.

Sur la Fig. II.20, nous avons représenté le taux moyen de conformères gauches par chaîne aliphatique des quatre bicouches DMPC, DMPE, DMPG et DMPS.



**Figure II.20 Taux moyen de conformères gauches par chaîne aliphatique des bicouches pures.** La zone hachurée représente l'intervalle expérimental pour une bicouche de DMPC (Ben-Tal, 1997).

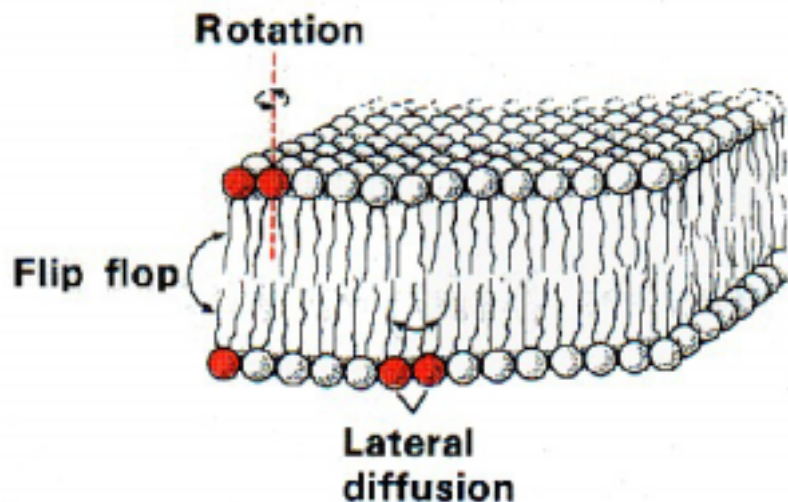
Dans la littérature on peut trouver un intervalle compris entre 2,7 et 3,5 pour le taux de conformères gauches par chaîne pour le lipide de DMPC (Ben-Tal, 1997). Nous trouvons (Fig. II.20)  $2,4 \pm 0,17$  pour DMPC,  $1,9 \pm 0,14$  pour DMPE,  $2,1 \pm 0,10$  pour DMPG et  $2,25 \pm 0,18$  pour DMPS. Globalement, nous avons des valeurs toujours inférieures à l'intervalle expérimental ceci est vraisemblablement la conséquence directe de la durée trop courte des simulations. De plus, le faible taux de conformères gauches du DMPE indique que la couche tend vers une structure beaucoup plus "cristalline" et donc vers une couche très compacte et plus ordonnée que les autres. Sur la Fig. II.21, nous montrons la numérotation adoptée pour les angles dièdres le long des chaînes acyles des différents lipides ainsi que l'évolution des conformères gauches au cours du temps pour chaque angle dièdre des deux chaînes acyles *sn1* et *sn2*.



**Figure II.21 Nombre de conformères gauches de chaque chaîne aliphatique des différentes bicouches.** Les taux de conformères gauches sont calculés sur une base des 60 lipides contenus dans les bicouches. En rouge sont représentés les angles 12 (*sn*1) et 24 (*sn*2), en vert les angles 1 (*sn*1) et 13 (*sn*2), en gris les autres angles.

La mesure de l'angle  $\theta$  qui engage le carbonyle de l'ester de la chaîne *sn1* est délicate car dès le départ sa valeur est environ de  $100^\circ$  et à cause de sa conformation elle ne peut jamais être à  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ . Le même angle sur la chaîne *sn2* (angle  $\theta'$ ) a plus de liberté. Globalement, pour tous les phospholipides ces graphes montrent que les conformations gauches sont repoussées vers les bouts de chaînes c'est à dire vers les méthyles. C'est effectivement les extrémités des chaînes qui sont les plus "liquides".

## 8. Coefficient de diffusion latérale



**Figure II.22** Les différents mouvements des lipides à l'intérieur d'une bicouche.

Les données expérimentales sur la morphologie, la biochimie et la physiologie des membranes cellulaires ont permis à Singer et Nicolson de proposer, en 1971, un modèle moléculaire suggérant l'arrangement des lipides et des protéines au sein des

biomembranes. Il décrit la matrice lipidique fondamentale comme une bicouche de lipides amphiphiles qui doit être envisagée de façon dynamique, en effet les lipides membranaires sont en perpétuel mouvement. Les mouvements des lipides au sein d'une bicouche décrits sur la Figure II.22 sont les suivants :

- Le mouvement de rotation autour de l'axe du lipide de l'ordre de 1 à 10 ns (Gennis, 1989);
- Le mouvement de diffusion latéral le long du plan de la membrane le plus rapide est de l'ordre de  $l^2/\text{ns}$ ;
- Le mouvement de Flip-Flop ou de diffusion transversale très lent de l'ordre de  $10^1$  à  $10^6$  s (Gennis, 1989);
- Le dernier mouvement, non représenté, est celui de la protusion qui est très rapide (environ 10 ps). Il s'agit d'un mouvement vibratoire vertical dans le même feuillet de la bicouche qui est la conséquence de l'attraction de la tête par le milieu aqueux ce qui entraîne les queues hydrophobes dans le mouvement sur une longueur de deux à trois liaisons C-C.

A l'échelle de la simulation par dynamique moléculaire, le mouvement le plus facile à déterminer sera celui de la diffusion latérale quantifié par son coefficient de diffusion latérale  $D_{\text{lat}}$  ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ). L'intérêt de la dynamique moléculaire est qu'elle permet de déterminer ce coefficient pour n'importe quel type d'atome ou de groupe d'atomes du système étudié. Dans le cas qui nous préoccupe et compte tenu des méthodes expérimentales de mesure, il est plus particulièrement pertinent de calculer ce coefficient pour la tête polaire (symbolisée par son phosphore) d'une part et pour le lipide dans sa globalité d'autre part. En effet les techniques utilisées expérimentalement sont soit le FRAP soit la méthode IQENS soit dans une moindre mesure la RMN  $^1\text{H}$ . Dans la technique du FRAP (Fluorescence Recovery After Photo-Bleaching), on introduit un fluorophore dans une bicouche

lipidique, puis après équilibration on "tue" la fluorescence d'une petite zone à la surface de la bicouche par une puissante irradiation (bleaching) et on mesure la remontée de la fluorescence apportée par la diffusion libre. Dans cette technique il est évident que le facteur limitant est la diffusion à la surface de la bicouche donc essentiellement celle des têtes polaires. IQENS (Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering) (Pfeiffer, 1989) et la RMN  $^1\text{H}$  (Karakatsanis, 1996) sont deux autres méthodes qui permettent de mesurer le même paramètre. La méthode IQENS présente les avantages de pouvoir déterminer le mouvement de certaines parties des molécules par deutériation partielle et d'autre part de différencier les divers mouvements des lipides dans une bicouche (Figure II.22) en évaluant un facteur dynamique de structure. Dans la plupart des cas, on obtient une diffusion globale du lipide. Par dynamique moléculaire, comme on l'a vu dans la section 7.5.6, le coefficient de diffusion latérale peut être directement obtenu à partir du graphe du MSD (Mean Square Displacement) en fonction du temps. Et ainsi le coefficient de diffusion latérale  $D_{\text{lat}}$  est obtenu en utilisant la relation d'Einstein.

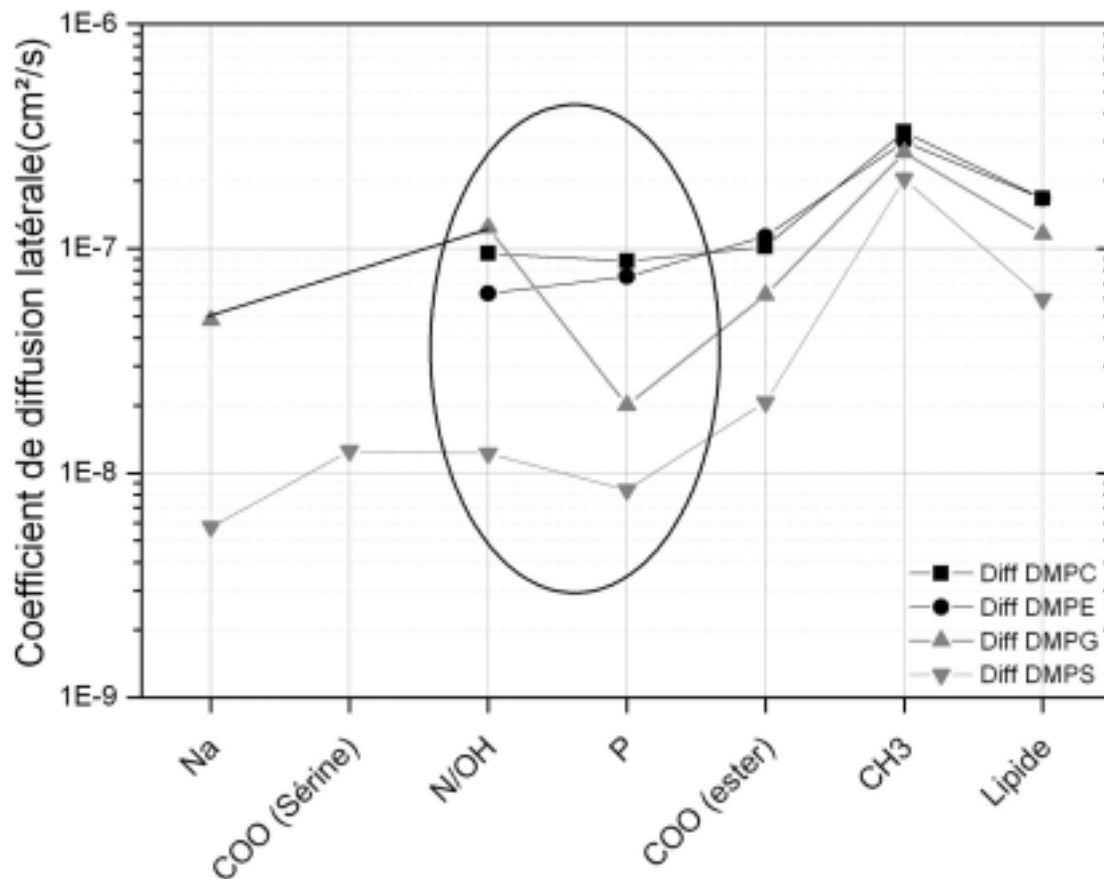
### **a) Coefficient de diffusion latérale des lipides**

La température de simulation pour chaque bicouche lipidique est supérieure à la température de transition de phase gel/fluide de façon à avoir des bicouches lipidiques fluides, ainsi, chaque phospholipide diffuse sur la surface bidimensionnelle  $xz$  de la membrane ( $\sim 1 \text{ \AA}^2/\text{ns}$ ). L'utilisation de la dynamique moléculaire est pertinente, en effet elle permet d'évaluer les deux coefficients de diffusion latérale celui de la tête polaire et celui du lipide entier.



Bicouche	Élément du phospholipide	$D_{lat}$ (cm <sup>2</sup> /s)
DMPC	Phosphore	$8,8.10^{-8}$ (a)
	Lipide entire	$1,7.10^{-7}$ (b)
	H <sub>2</sub> O	$1,5.10^{-5}$
DMPE	Phosphore	$7,5.10^{-8}$
	Lipide entire	$1,7.10^{-7}$
	H <sub>2</sub> O	$2,8.10^{-5}$
DMPG	Phosphore	$2,0.10^{-8}$
	Lipide entire	$1,2.10^{-7}$
	H <sub>2</sub> O	$1,6.10^{-5}$
DMPS	Phosphore	$0,84.10^{-8}$
	Lipide entire	$6,0.10^{-8}$
	H <sub>2</sub> O	$1,6.10^{-5}$

**Tableau 6 Coefficient de diffusion latérale (cm<sup>2</sup>/s)**  
(a) de  $7,6$  à  $9.10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s (D. Marsh); (b)  $1,8.10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s (Pfeiffer, 1989)



**Figure II.23 Coefficient de diffusion latérale  $D_{lat}$  ( $cm^2/s$ ) des différents éléments des lipides dans les bicouches.** La partie entourée représente  $D_{lat}$  de la tête lipidique. (Na : ion sodium, COO (Sérine) : groupe carboxylique de la tête sérine de DMPS, N : azote du triméthylammonium pour DMPC, de l'ammonium pour DMPE et DMPS, OH : groupe hydroxyle pour la tête glycérol de DMPG, P : phosphore des phosphates, COO (ester) : groupe carbonyle des esters des têtes polaires, CH3 : méthyles des queues des chaînes acyles. Les carrés noirs représentent les lipides de DMPC, les losanges noirs les lipides de DMPE, les triangles gris vers le haut les lipides de DMPG, les triangles gris vers le bas les lipides des DMPS. La partie entourée en noir représente la partie des têtes polaires.

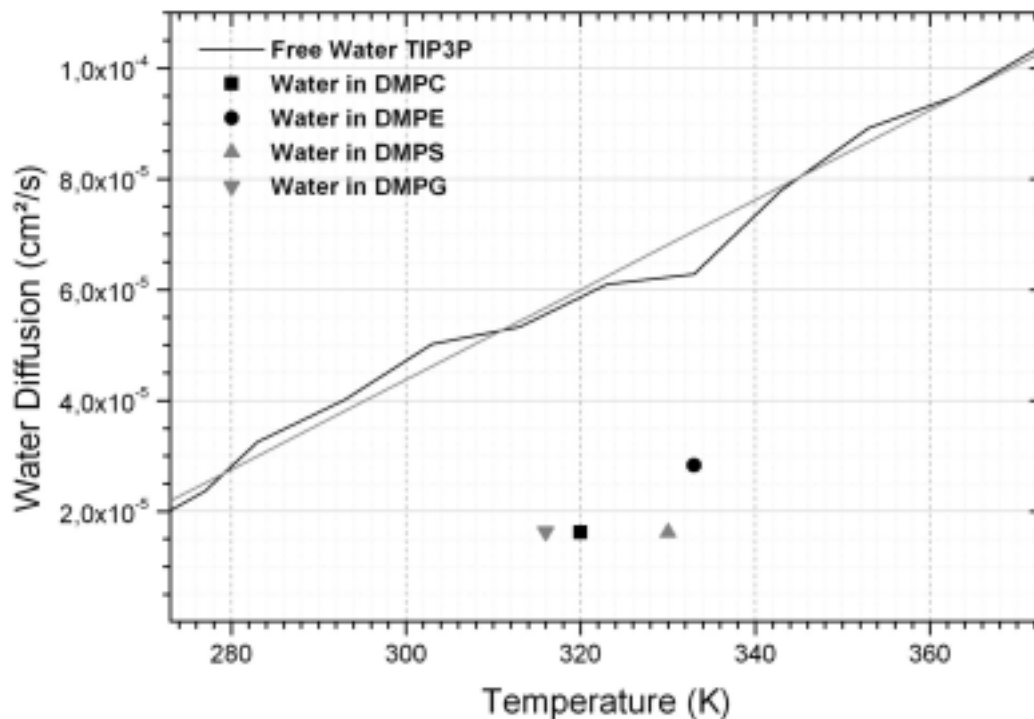
Les valeurs de  $D_{lat}$  pour la tête lipidique sont calculées en fonction du déplacement du phosphore, mais la Fig. II.23 permet de suivre ce coefficient pour chaque différente

partie des phospholipides. Les valeurs trouvées pour DMPC corroborent l'expérience puisqu'on trouve  $8,8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  pour la tête lipidique et la littérature fournit une valeur comprise entre  $7,6$  à  $9 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ . En ce qui concerne le lipide dans sa globalité on trouve  $1,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  et la méthode IQENS a permis de mesurer un coefficient de  $1,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Si on compare les valeurs trouvées pour les autres lipides, on peut voir que la tête polaire de DMPE a un coefficient de diffusion latérale légèrement inférieur à celui du DMPC mais on retrouve la même valeur globale pour les deux phospholipides zwitterioniques. En ce qui concerne les phospholipides chargés négativement DMPG et DMPS, ils semblent moins rapides que le DMPC et le DMPE. En effet, dans le cas des lipides zwitterioniques, le phospholipide qui se déplace est électriquement neutre par définition, alors que pour le DMPG et le DMPS, déplacer un lipide revient à déplacer une charge (DMPG) ou trois charges (DMPS) dans un "océan" de charges et il y a donc de fortes interactions électrostatiques mises en jeu qui vont ralentir le processus de diffusion latérale.

### **b) Coefficient de diffusion latérale de l'eau d'hydratation**

Sur la Figure II.24, on peut suivre la diffusion du modèle d'eau TIP3P au sein des bicouches en fonction de la température. Comme référence, nous avons au préalable construit une courbe d'étalonnage en mesurant le coefficient de diffusion de l'eau dans une boîte de  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$  remplie de 902 molécules d'eau à une température comprise entre 273 à 373 K. Jorgensen *et al.* (Jorgensen, 1983) ont montré que les coefficients de tous les modèles d'eau utilisés en mécanique moléculaire sont plus rapides que dans la réalité qui est d'environ  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Pour toutes les bicouches étudiées, l'eau est considérablement ralentie par rapport à la courbe d'étalonnage qui n'est que de l'eau libre ou de "bulk". En fait, nous utilisons un taux d'hydratation

minimum ( $n_w \sim 24$ ) et donc l'eau de "bulk" est quasi inexistante (10 à 15%). Ainsi le processus d'hydratation ralentit fortement l'eau présente.

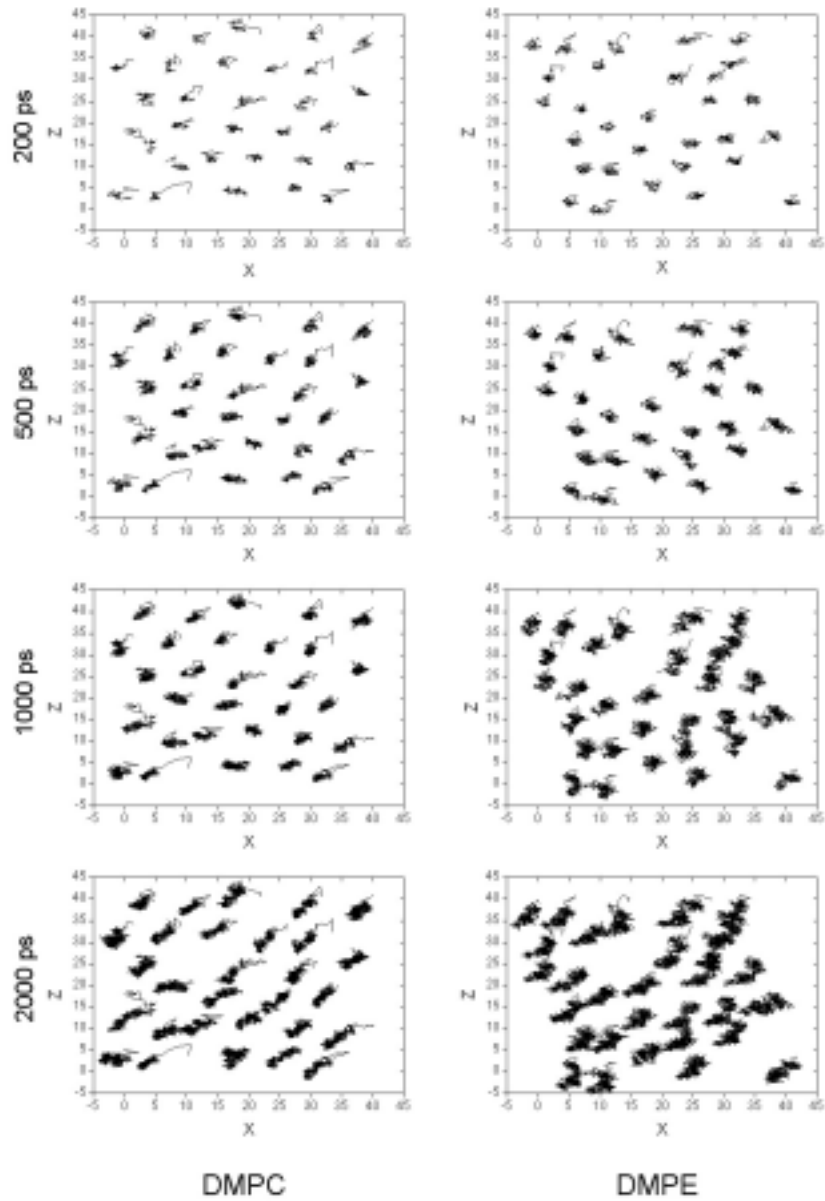


**Figure II.24 Coefficient de diffusion de l'eau TIP3P en fonction de la température.**

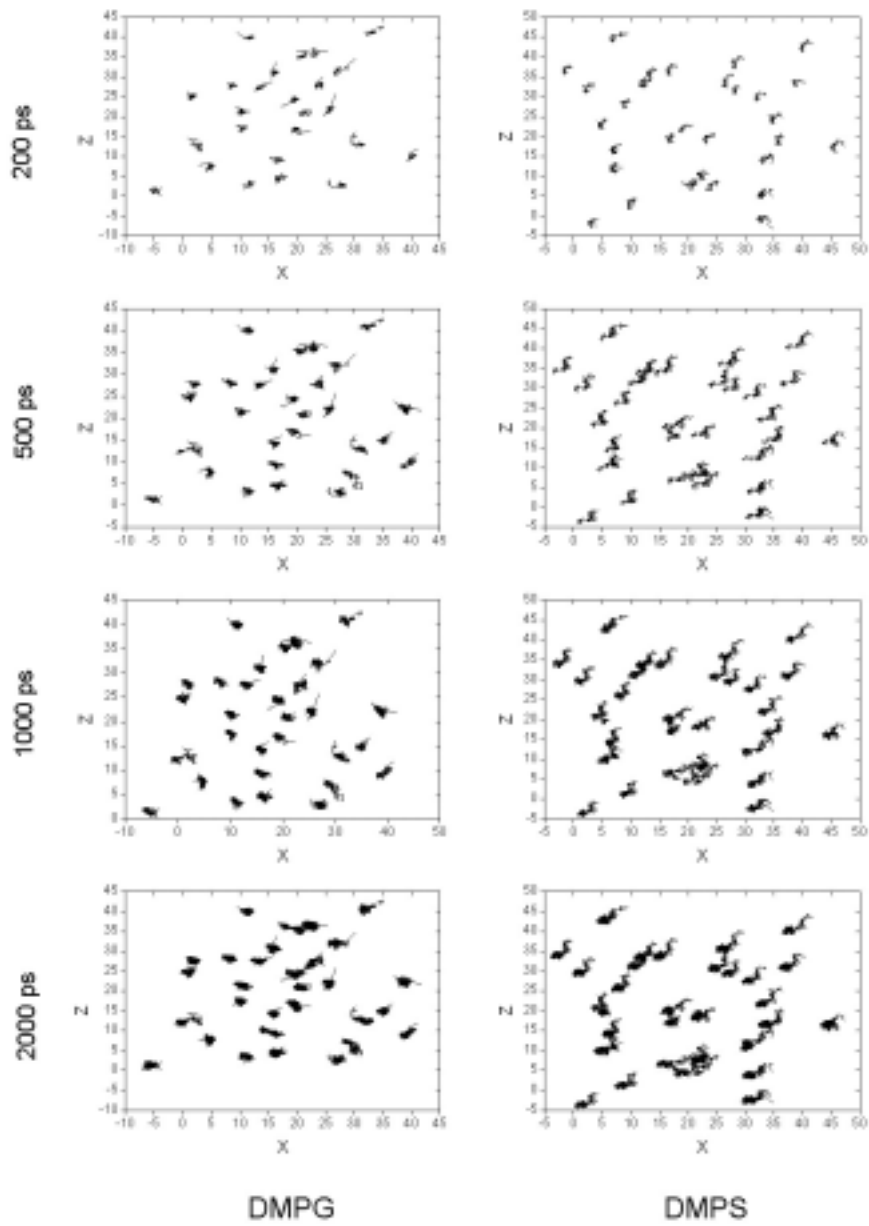
(Les carrés, les losanges et les triangles représentent le coefficient de diffusion de l'eau d'hydratation des différentes bicouches aux températures de simulation. Cette courbe d'étalonnage a été calculée pour le logiciel utilisé et pour le modèle d'eau utilisé pour nos simulations.)

Pour illustrer le coefficient de diffusion de l'ensemble des dynamique nous avons réalisé les images stroboscopiques du déplacements des phosphores des têtes polaires dans le plan xz à  $t=200, 500, 1000$  et  $2000$  ps (Figure II.25-Figure II.26) des bicouches étudiées. De plus, nous avons représenté les images stroboscopiques d'une

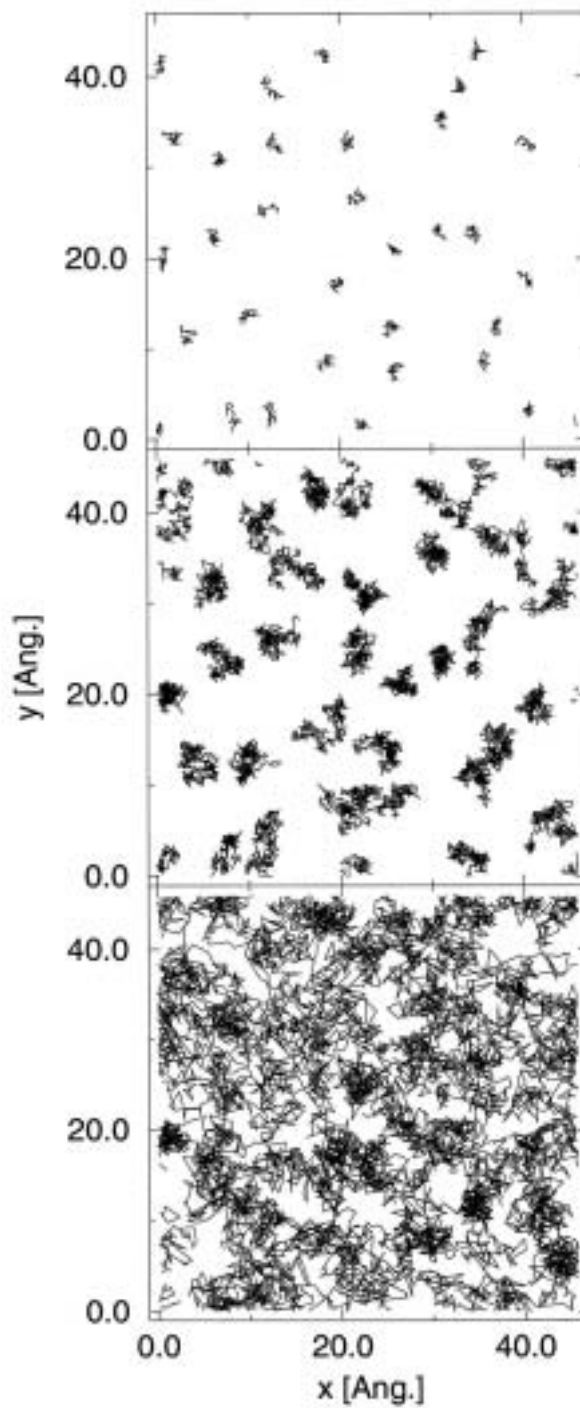
bicouche de DPPC simulée pendant 10 ns par Essman et Berkowitz (Essman, 1999)  
(Figure II.27).



**Figure II.25** Images stroboscopiques de DMPC et de DMPE dans un feuillet, déplacement des phosphores des lipides zwitterioniques dans le plan xz.



**Figure II.26** Images stroboscopiques de DMPG et de DMPS dans un feuillet, déplacement des phosphores des lipides chargés négativement dans le plan xz.



**Figure II.27 Images stroboscopiques de DPPC d'après Essman et Berkowitz.** Images stroboscopiques des trajectoires des phosphores sur un feuillet d'une bicouche de 64 DPPC. (En haut  $t= 100$  ps, au milieu  $t= 1$  ns, en bas  $t= 10$  ns.) (Essman, 1999).

Quand on compare nos images stroboscopiques à celles de Essman et Berkowitz, on voit d'abord qu'à 1 ns les résultats sont parfaitement identiques mais surtout qu'à 2 ns nos phospholipides, zwitterioniques ou chargés, n'ont parcouru environ que 10% de la surface de la boîte alors qu'au bout de 10 ns, ils en recouvrent environ 75%. Il faudrait donc des simulations d'au moins 15 à 20 ns pour espérer avoir une aire complètement couverte. De plus la différence de diffusion latérale entre les lipides zwitterioniques et les lipides chargés apparaît ainsi de façon frappante sur les images (Figure II.25, Figure II.26) à 2 ns.

## 9. Conclusion

En conclusion, bien que la durée des simulations reste courte (2 ns), la dynamique moléculaire nous a permis d'obtenir des résultats pertinents. Parmi ces résultats, les coefficients de diffusion latérale ont été déterminé en parfait accord avec les données expérimentales, les autres paramètres tels que l'aire de surface, l'épaisseur hydrophobe  $D_{PP}$ , le taux de conformères gauche ont été trouvés toujours supérieurs ou inférieurs d'environ 5 à 10 % aux intervalles expérimentaux. La dynamique moléculaire est donc un outil performant pour les systèmes complexes même pour des durées de simulation courtes. De plus, on rappelle que cette étude a été effectuée pour préparer des couches équilibrées prêtes à utiliser dans l'étude des peptides en interaction avec des membranes phospholipidiques (Partie III). Cette étude se voulait prospective et se poursuivra dans un travail ultérieur.





### III. Etude des interactions peptides/membranes lipidiques



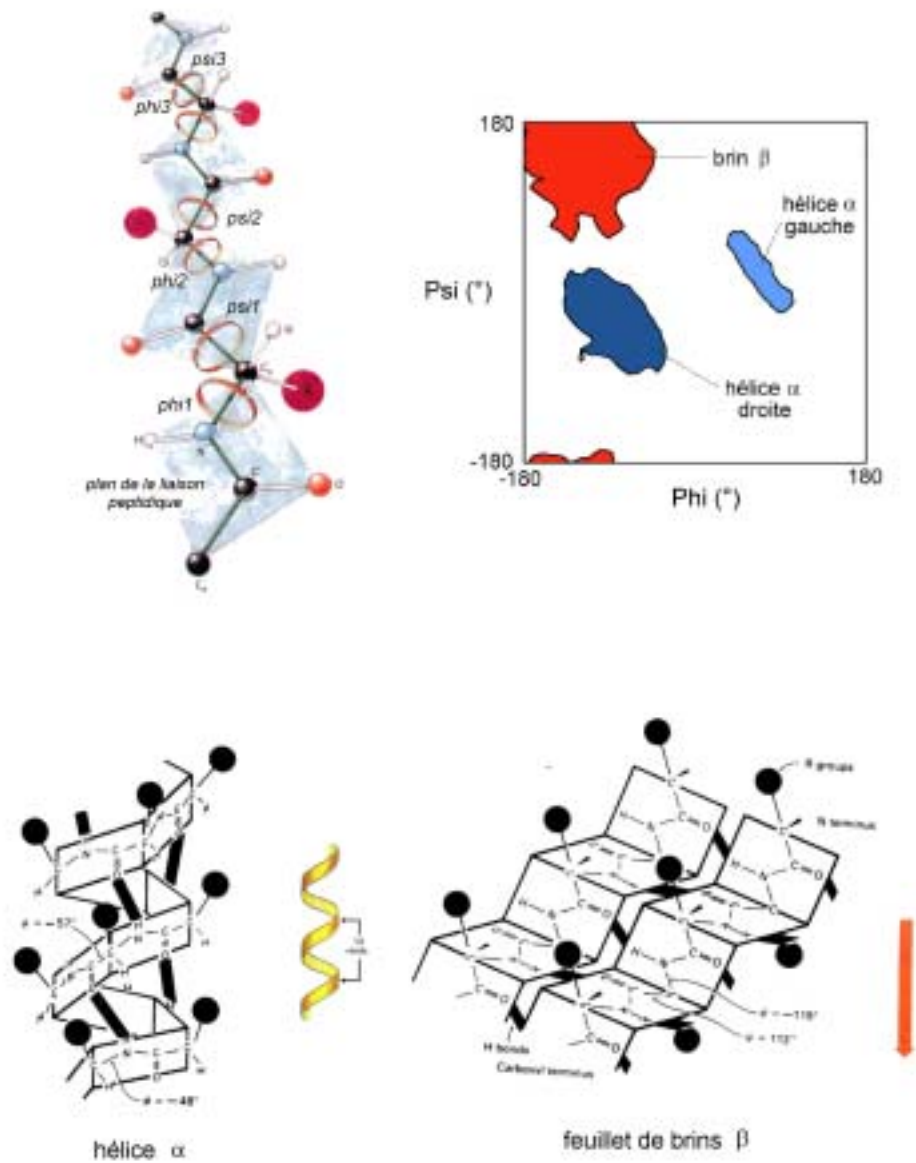
La membrane est un système complexe formé de plusieurs molécules amphiphiles parmi lesquelles on trouve les lipides qui forment la bicouche membranaire et les protéines qui peuvent être transmembranaires, de surface ou monotopiques. La simulation numérique de protéines ou de peptides est de plus en plus courante. En effet, les progrès informatiques constants et croissants permettent d'augmenter l'échelle de temps des simulations : ainsi il a été possible de mimer le folding d'une protéine pendant 1  $\mu$ s (Duan, 1998). D'autre part, l'intérêt des modélisateurs s'est porté sur les interactions protéines/membranes qui sont très étudiées expérimentalement. La diversité des protéines de tailles différentes constitue un réservoir inépuisable de possibilités de simulations (folding de protéine, drug design, prédiction de structure, interactions peptide/membrane...).

Les simulations de protéines ou de peptides complètent ou fournissent le point de départ à des études expérimentales. Quand une protéine ou un peptide est incorporé dans une membrane lipidique, ils peuvent influencer le comportement de la membrane, en affectant la dynamique de la membrane et en modifiant ses fonctions biologiques. Les interactions des peptides avec les matrices lipidiques est un sujet d'un grand intérêt, d'un point de vue biomédical et biophysique. Petits, 10 à 30 acides aminés, les peptides de surface actifs qui se lient et affectent l'ordre fluide des membranes peuvent conduire à la lyse de la cellule et détruire des microorganismes parasites (Epanand, 1999) et inhiber (Damodaran, 1995) ou favoriser (Epanand, 1999) la fusion membranaire. Les peptides peuvent être des agresseurs des cellules saines mais leur mécanisme d'action sert de modèle pour l'élaboration de nouveaux médicaments. Des études détaillées d'interactions peptides/membrane peuvent fournir des informations sur les phénomènes vitaux et biologiques tels que les interactions protéine/membrane, la formation de canaux et le transport non-spécifique de molécules à travers la matrice cellulaire. Bien que des techniques expérimentales telles que la RMN (Opella, 1997, Seelig, 1977), la diffraction par rayons X (Wallace,

1991), la diffraction de neutrons (Jacobs, 1989, King, 1986), la spectroscopie Infra Rouge (Castano, 1999a, 1999b, Cornut, 1996) et la calorimétrie (Seelig, 1997) produisent une abondante quantité de données sur les interactions peptides/membranes, il reste toutefois un besoin d'informations détaillées au niveau atomique sur la structure et les énergies des complexes peptides/membranes. La façon la plus directe d'obtenir de telles informations microscopiques est accessible par les techniques de simulation numérique. En particulier, la dynamique moléculaire est devenue une méthode usuelle pour étudier les systèmes peptides/membrane. Ces systèmes sont constitués en général de 10 000 à 20 000 atomes et les outils informatiques dont nous disposons nous permettent d'effectuer des simulations de une à quelques ns et donc d'avoir un regard sur les premières étapes de certains processus biologiques. La littérature offre un très grand nombre de simulations des interactions peptides ou protéines et lipides par dynamique moléculaire : comportements dynamiques d'un mélange d'un peptide poly-alanine/lipides (Shen, 1997), mélanges gramicidine A/lipides (Woolf, 1994, 1996; Chiu, 1995), protéine bactériophage pfl (Roux, 1996), canaux d'alaméthicine (Tieleman, 1999a, 1999b), mélittine (Bernèche, 1998), porine OmpF d'*Escherichia coli* (Tieleman, 1998), domaine transmembranaire de la protéine du virus M2 de l'influenza A (Sansom, 1996; Zhong, 1998; Forrest, 1999), bactériorhodopsine (Edholm, 1995, Woolf, 1998), domaine transmembranaire de Erb-B2 (Duneau, 1999) et autres mélanges peptides/lipides (Belohorcova, et al., 2000, Damodaran, 1995, Huang, 1995, Shepherd, et al., 2001, Wymore, 1999). Après avoir défini les peptides étudiés dans ce travail, nous présenterons les simulations par dynamique moléculaire de l'insertion de petits peptides lytiques synthétiques ( $L_iK_j$  ( $i=2j$ )) et naturel (temporine A) dans des membranes modèles de monocouches zwitterioniques ou chargées négativement. Nous pourrons alors, en nous appuyant sur des résultats expérimentaux de spectroscopie Infra-Rouge, étudier en plus du mécanisme d'insertion de ces peptides, l'influence des têtes polaires lipidiques chargées négativement sur ce processus. Par une approche différente, nous étudierons

l'orientation préférentielle d'une des protéines du surfactant pulmonaire (SP-C) dans une monocouche ou dans une bicouche phospholipidique.





**Figure III.1 Principales structure secondaires des peptides.** Représentation graphique des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  définis dans une chaîne peptidique (en haut à gauche), graphe de Ramachandran (en haut à droite), hélice  $\alpha$  (en bas à gauche), feuillets  $\beta$  antiparallèles (en bas à droite). Sur le graphe de Ramachandran, la zone en rouge représente les feuillets  $\beta$ , la zone bleue foncée, les hélices  $\alpha$  droites et en bleu clair les hélices  $\alpha$  gauches.



Les peptides et les protéines sont des constituants majeurs du système vivant. Ils sont synthétisés à partir des acides aminés liés par des liaisons peptidiques dans une chaîne polypeptidique. Il existe 20 acides aminés naturels qui se distinguent par leur charge électrique (neutre, acide ou basique) et par l'existence d'une chaîne polaire ou non. Ces 20 acides aminés offrent un très grand nombre de combinaisons d'enchaînements polypeptidiques. On appelle "peptide" les petites protéines (~50 acides aminés) ne comportant pas plus de deux entités structurées. Le long d'une chaîne polypeptidique, chaque résidu est associé à deux angles de conformation  $\Phi$  et  $\Psi$  (Figure III.1). Puisque ce sont les seuls degrés de liberté de la chaîne polypeptidique, la conformation de la totalité de la chaîne est complètement déterminée lorsque les angles  $\Phi$  et  $\Psi$  de chaque acide aminé sont définis. En général, on représente les paires des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  en fonction l'un de l'autre dans un graphe appelé diagramme de Ramachandran. Ce diagramme montre des combinaisons permises des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  qui délimitent des régions représentant les structures secondaires en hélice  $\alpha$  ou en feuillets  $\beta$ . L'hélice  $\alpha$  est l'un des éléments les plus importants des structures secondaires des protéines et des peptides. La longueur des hélices  $\alpha$  varie considérablement, elle peut varier de 4 à 5 résidus jusqu'à plus de 40 résidus, dans les protéines globulaires. Elle est stabilisée par des liaisons Hydrogène intramoléculaires entre le groupe carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+4$  (notée  $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+4}$ ), elle est caractérisée par une période de 3.6 résidus par tour d'hélice, une distance de 1.5 Å entre deux résidus consécutifs le long de l'axe principal et un diamètre moyen de l'hélice de 12 Å (Barker, 1971, Dickerson, 1969, Schulz, 1979). Il existe d'autres hélices plus rares et énergétiquement moins stables. Parmi elles, l'hélice  $\pi$  stabilisée par des liaisons Hydrogène intramoléculaires entre le groupe carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+5$  (notée  $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+5}$ ), diamétralement plus large, mais plus courte (comparée à une hélice  $\alpha$  d'un même nombre de résidus) ; on trouve aussi l'hélice  $3_{10}$  stabilisée par des liaisons Hydrogène intramoléculaires entre le groupe carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu

$i+3$  (notée  $CO_i-NH_{i+3}$ ), diamétralement plus étroite et plus longue toujours comparée à une hélice  $\alpha$  similaire. La distinction de ces hélices dans le diagramme de Ramachandran s'avère difficile puisqu'elles s'inscrivent dans la même zone que les hélices  $\alpha$ , il est donc nécessaire de faire une observation très fine des liaisons Hydrogène intramoléculaires pour les identifier. Le feuillet  $\beta$  est le deuxième élément de structure secondaire des protéines et des peptides. Les brins  $\beta$  sont composés en général de 5 à 10 résidus, de période de répétition de 2, la distance entre deux brins est d'environ 4,7 Å. Quand les acides aminés dans les brins successifs ont des directions opposées, extrémité amino-terminale vers carboxy-terminale suivie de carboxy-terminale vers amino-terminale, on parle de feuillets  $\beta$  antiparallèles. Les groupements NH et C=O de la chaîne principale sont liés par des liaisons Hydrogène. Ces structures secondaires se replient sur elles-mêmes en générant des coudes et des zones désordonnées. Quand plusieurs de ces structures secondaires coexistent entre elles, on parle de structure tertiaire de protéine. Des propriétés fonctionnelles dépendent de cette structure tridimensionnelle. Les protéines membranaires (périphériques ou intégrées) peuvent être des enzymes très diverses, des transporteurs de cations, d'anions ou de métabolites divers, des récepteurs hormonaux, des supports pour la fixation des pigments. Ces protéines, en interaction avec les lipides qui les entourent, sont parmi les acteurs majeurs de la physiologie des membranes.

Parmi les peptides, il existe les peptides cytotoxiques qui sont des substances naturelles fabriquées par les organismes vivants pour lutter contre les agressions extérieures. Un grand nombre de ces peptides a pu être isolé chez différentes espèces, on trouve chez les champignons, l'alaméthicine (Hall, 1984), chez les microorganismes, les trichorzianines (El Hajji, 1987), chez les bactéries, la  $\delta$ -toxine (Freer, 1986), chez les insectes, la mélittine (Habermann, 1972), la cabroline (Argolias, 1984), la bombolittine (Argolias, 1985), la cécropine (Steiner, 1981), le mastoparane (Argolias, 1983), chez les batraciens, les magainines (Zasloff, 1987), (Bevins, 1990), les temporines (Simmaco, 1996), chez les poissons les pardaxines

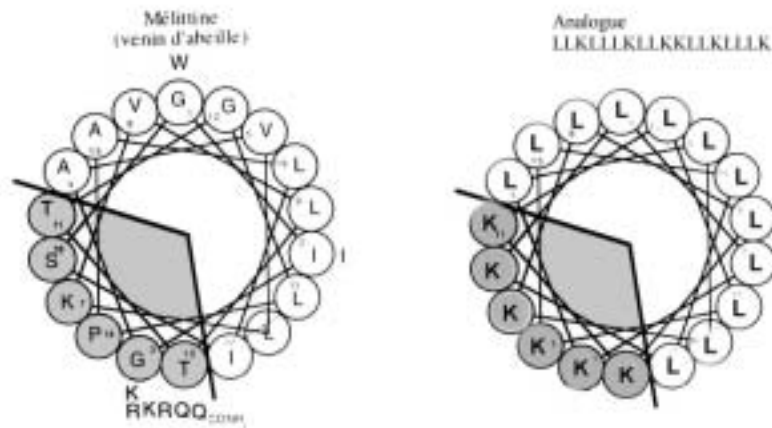
(Thompson, 1986) et chez les mammifères les défensines (Lehrer, 1991). Ces peptides sont en général basiques et amphipathiques (amphiphiles) et leur caractère amphipathique leur permet de s'intégrer dans un milieu membranaire. De plus, ils sont caractérisés en général soit par une hélice  $\alpha$  soit par des feuillettes  $\beta$ . Le mécanisme d'action de ces peptides comme moyen de défense, très étudié ces quinze dernières années, semble être assez complexe et s'expliquerait par une perméabilisation de la membrane cellulaire qui conduit à la lyse de la cellule. Quant à l'action lytique de ces peptides, elle ne serait pas influencée par la structure secondaire. C'est ainsi que l'observation fine du caractère amphipathique de ces peptides a permis d'élaborer des séries minimalistes d'analogues de synthèse pour la création de nouveaux médicaments. Un chapitre de cette partie sera consacré à l'insertion de ces analogues de synthèse issus des séries minimalistes ainsi que d'un peptide lytique naturel, la temporine A dans des monocouches modèles. Dans un nouveau chapitre, nous présenterons une autre façon d'appréhender les interactions peptide/membrane en montrant l'orientation préférentielle de la protéine SP-C dans les deux types de couches de la membrane alvéolaire du poumon humain, le surfactant pulmonaire. Cette petite protéine SP-C est indispensable au fonctionnement de la respiration et son orientation semble jouer un rôle vital dans le processus de la respiration.

## **A. Interaction Peptides amphipathiques/Membranes modèles**

### **1. Les peptides idéalement amphipathiques**

Une toxine particulière courante, le peptide du venin d'abeille, la mélittine est connue pour causer l'hémolyse (DeGrado, 1982) et pour induire la fuite de fluorophore des vésicules lipidiques (Schwarz, 1992). Le mécanisme de la lyse cellulaire par la

mélicitine s'avérant très complexe et d'un grand enjeu pour l'industrie du médicament, la première étape a été de simplifier la séquence de ce peptide en gardant son activité lytique. C'est ainsi que des analogues ont été synthétisés.



**Figure III.2 Roues de Schiffer-Edmunson de la Mélicitine et son analogue.** Le secteur grisé représente la zone et les résidus hydrophiles.

La structure secondaire de la mélicitine en hélice  $\alpha$  a bien été établie par diffraction de rayons X (Dempsey, 1990, Terwilliger, 1982). Le caractère amphipathique de sa structure secondaire semblait plus important pour son activité que sa séquence d'acides aminés (Blondelle, 1991, De Grado, 1981). Quand on projette son hélice sur la roue de Schiffer-Edmunson (Schiffer, 1967) (Figure III.2), deux zones distinctes de caractère amphipathique opposé apparaissent : une zone d'environ  $100^\circ$  est totalement hydrophile, le reste est totalement hydrophobe. L'idée des séries minimalistes est de substituer la zone hydrophile par l'acide aminé le plus polaire et le plus hydrophile, la lysine (K), et la zone hydrophobe par le résidu le plus hydrophobe la leucine (L). Ainsi quand on "déroule" la roue de Schiffer-Edmunson, une séquence alternant des Leu et des Lys est obtenue. C'est ainsi que la série minimaliste de peptides idéalement amphipathiques secondaires  $LiK_j$  ( $i=2j$ ) telle que  $(KLLLKLL)_n$  a été obtenue à partir de la mélicitine. Castano *et al.* (Castano, 1999a) ont montré que, à l'interface air/eau ou

eau/film phospholipidique, les peptides de cette série LiK<sub>j</sub> (i=2j) se structurent soit en hélice  $\alpha$  idéalement amphipathique lorsque  $i+j > 15$  résidus soit en feuillets  $\beta$  antiparallèles idéalement amphipathiques si  $i+j < 15$  résidus. Dans le cas des peptides amphipathiques secondaires c'est la structure secondaire en hélice ou en feuillets qui présente le caractère amphipathique alors que dans le cas des peptides amphipathiques primaires, c'est la structure primaire qui se divise en deux zones de caractère amphipathique distinct. Ainsi, la même série de séquence LiK<sub>j</sub> (i=2j) a été utilisée pour obtenir des peptides amphipathiques primaires ou diblocs pour lesquels la séquence est une succession de Leu suivie d'une succession de Lys (ex : LLLLLLLLKKKK). Pour cette série, Castano *et al.* (Castano, 1999a) ont montré que les peptides se structurent en hélice  $\alpha$  pour  $i+j > 12$  et en feuillets  $\beta$  pour  $i+j < 12$ . Cependant l'activité lytique des peptides idéalement amphipathiques primaires est inférieure à celle de leurs homologues secondaires respectifs. Dans le cas des feuillets  $\beta$  antiparallèles, pour conserver le caractère amphipathique secondaire, une nouvelle série minimaliste alternant Leu et Lys telle que -(LK)<sub>n</sub>- a été conçue. Cette alternance de Leu et de Lys permet d'obtenir la zone hydrophobe (Leu) d'un côté du plan médian des feuillets et la zone hydrophile (Lys) de l'autre côté. Pour tous ces peptides artificiels, l'activité lytique a été mesurée et s'est révélée de 10 à 100 fois supérieure à celle des produits naturels.

La technique PMIRRAS (Polarization Modulation Infra-Red Reflexion Absorption Spectroscopy) a permis d'étudier l'insertion de ces peptides idéalement amphipathiques dans des monocouches et des bicouches de phospholipides de DMPC. Cette technique spectroscopique permet d'obtenir *in-situ* des informations structurales et orientationnelles sur des molécules composant les monocouches déposées à l'interface air/eau (Blaudez, 1996, Cornut, 1996). Elle permet d'extraire les absorptions anisotropes polarisées des molécules orientées en surface des absorptions isotropes intenses de l'eau vapeur et liquide en sous-phase. Elle combine diverses techniques : la réflectivité sur substrat diélectrique en lumière polarisée, la

modulation rapide de la polarisation du faisceau incident à l'aide d'un modulateur photoélastique, le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique (Transformée de Fourier) de l'intensité détectée. L'intérêt principal de cette technique réside dans la possibilité de déterminer les orientations des molécules dans la monocouche grâce à l'anisotropie du champ électrique résultant (Castano, 1998). Expérimentalement le peptide est injecté dans la phase aqueuse et s'insère dans le film phospholipidique. Ainsi, le phénomène s'articule en deux temps : l'approche du peptide vers la monocouche, suivie de l'insertion dans cette dernière. La seconde étape implique la formation d'une cavité et donc une augmentation de la surface moléculaire du film. Castano *et al.* (Castano, 1999b) ont montré que, quelque soit la série minimaliste LiK<sub>j</sub> (i=2j) ou LiK<sub>i</sub> et le caractère amphipathique (secondaire ou primaire), l'insertion de ces peptides se fait plutôt à plat (angle d'inclinaison ~ 30°) dans des films et des bicouches de DMPC, que la structure secondaire globale est conservée pendant le processus d'insertion, que les peptides structurés en hélice  $\alpha$  semblent s'insérer plus profondément que les peptides en feuillet  $\beta$  et que l'épaisseur du film phospholipidique diminue sous l'influence de l'insertion. Toutefois cette technique n'apporte aucune indication sur le phénomène d'approche du peptide vers la couche phospholipidique. Les auteurs ont aussi montré que des films composés de peptides amphipathiques à l'interface eau/air étaient stables, formant une membrane imperméable à l'eau.

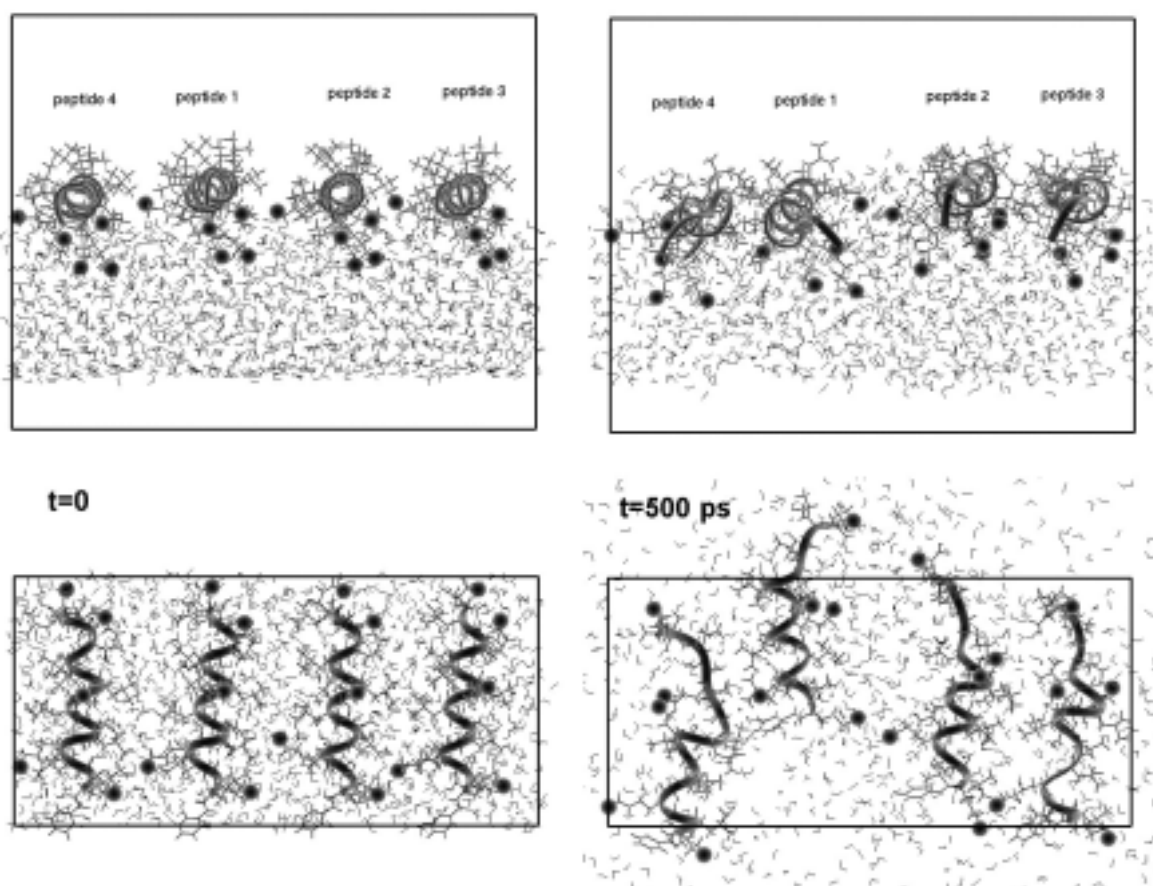
Ce chapitre traite du mécanisme d'insertion des peptides lytiques idéalement amphipathiques issus des séries minimalistes telles que LiK<sub>j</sub> (i=2j) et LiK<sub>i</sub> dans des monocouches phospholipidiques zwitterioniques (DMPC) ou chargées négativement (DMPG) et de longueurs de chaînes variables (DSPC). L'échelle de temps (1 à 2 ns) et les dimensions des boîtes simulées ( $10^5 \text{ \AA}^3$ ) ne permettent pas de voir la formation d'un trou dans la monocouche phospholipidique. Un des principaux problèmes de la dynamique moléculaire est dû à la limitation de l'échelle de temps du processus de perméabilisation : l'insertion d'un simple ion à travers un canal s'effectue en ~ 1  $\mu\text{s}$ .

Nous nous bornerons à simuler seulement deux situations différentes. Tout d'abord nous étudierons la stabilité de films de peptides seuls à l'interface eau/air et dans un deuxième temps, afin d'observer les premiers instants du processus d'insertion, un peptide sera placé à l'interface eau/film phospholipidique.

## **2. Les films de peptides idéalement amphipathiques à l'interface eau/air**

Dans son travail de thèse Sabine Castano a montré que les films de peptides des séries amphipathiques  $LiK_j$  ( $i=2j$ ) et  $LiK_i$  en hélice  $\alpha$  ou en feuillets  $\beta$  restent stables à l'interface eau/air, formant une membrane entièrement imperméable à l'eau dont la structure secondaire est globalement conservée. Nous allons illustrer ces résultats expérimentaux en construisant les films de trois peptides idéalement amphipathiques :  $LK_{15}$  et  $LK_{22}$  structurés en hélice  $\alpha$  et le peptide  $LK_9$  structuré en feuillets  $\beta$  antiparallèles. La construction des systèmes est décrite dans l'annexe B "Construction des films de peptides". On a donc construit quatre systèmes : système film  $LK_{15}$  (1), système film  $LK_{15}$  (2), système film  $LK_{22}$  et système film  $LK_9$  (Figure III.6). L'orientation des peptides est différente dans les deux premiers systèmes : dans le premier système, système film  $LK_{15}$  (1) (Figure III.3), les peptides sont parallèles et aucun contre-ion ne neutralise les charges portées par les peptides, dans le deuxième système, système film  $LK_{15}$  (2) (Figure III.4), les peptides sont antiparallèles deux à deux et les charges sont neutralisées par des contre-ions chlorure et sodium. Les peptides du système Film  $LK_{22}$  sont antiparallèles (Figure C.5), tous les brins  $\beta$  sont antiparallèles et placés à une distance suffisante pour que l'ensemble des 16 brins puisse former des liaisons Hydrogène entre eux et ainsi obtenir un feuillet  $\beta$  antiparallèle géant.

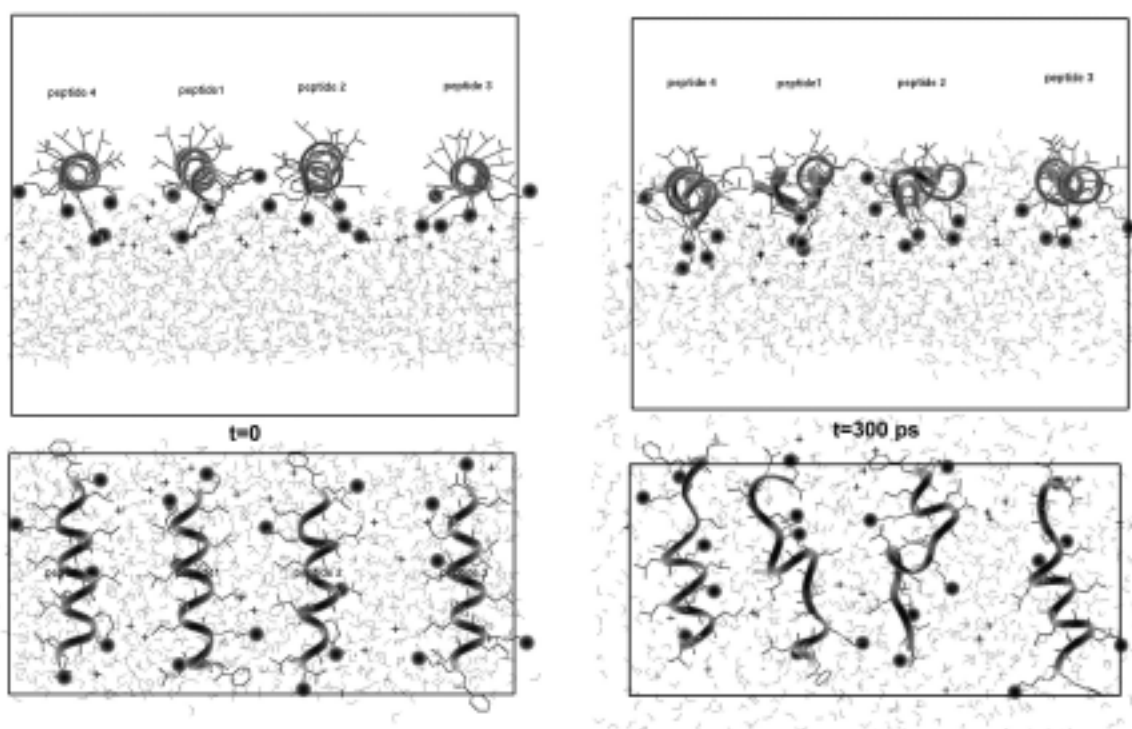
### Film de peptides LK15 parallèles



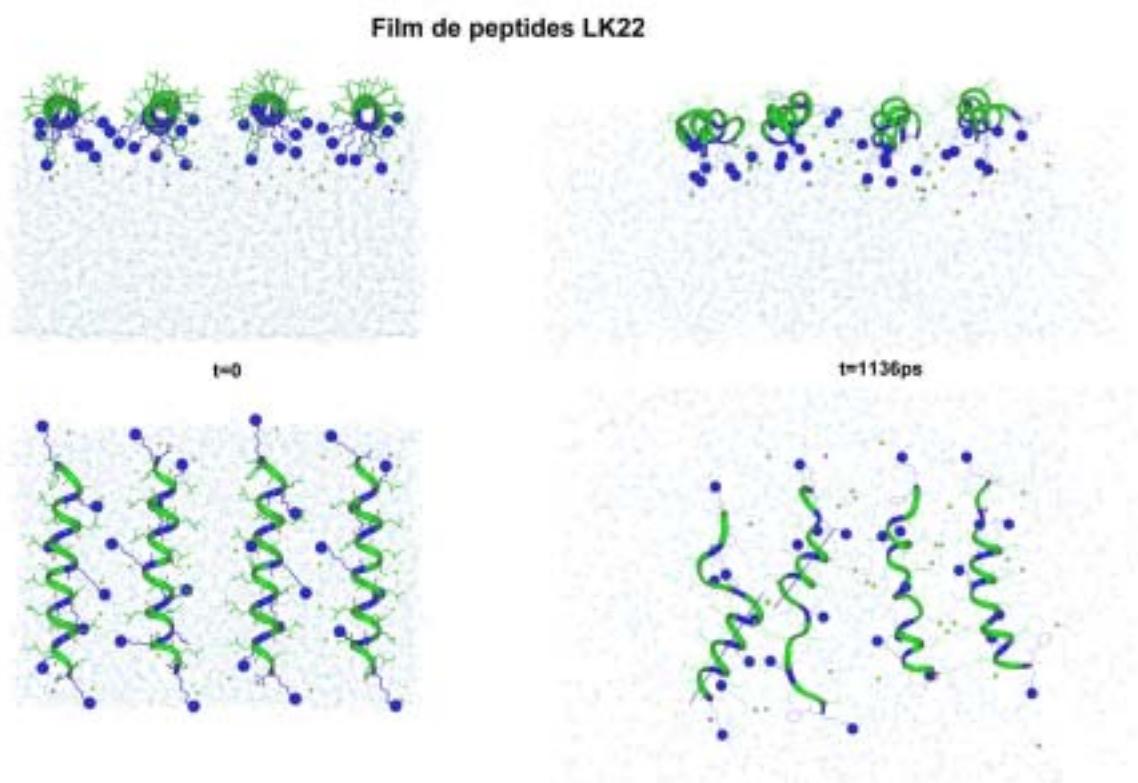
**Figure III.3 Images des films peptidiques LK<sub>15</sub> en position parallèle en hélice à t= 0 et en fin de simulation.** A gauche, t= 0 ps et à droite, t= 500 ps. Les images du haut représentent une vue de face de la boîte dans le plan xOy, et les images du bas une vue de dessus dans le plan xOz. Les sphères noires représentent les azotes des ammoniums des lysines.



### Film de peptides LK15 antiparallèles

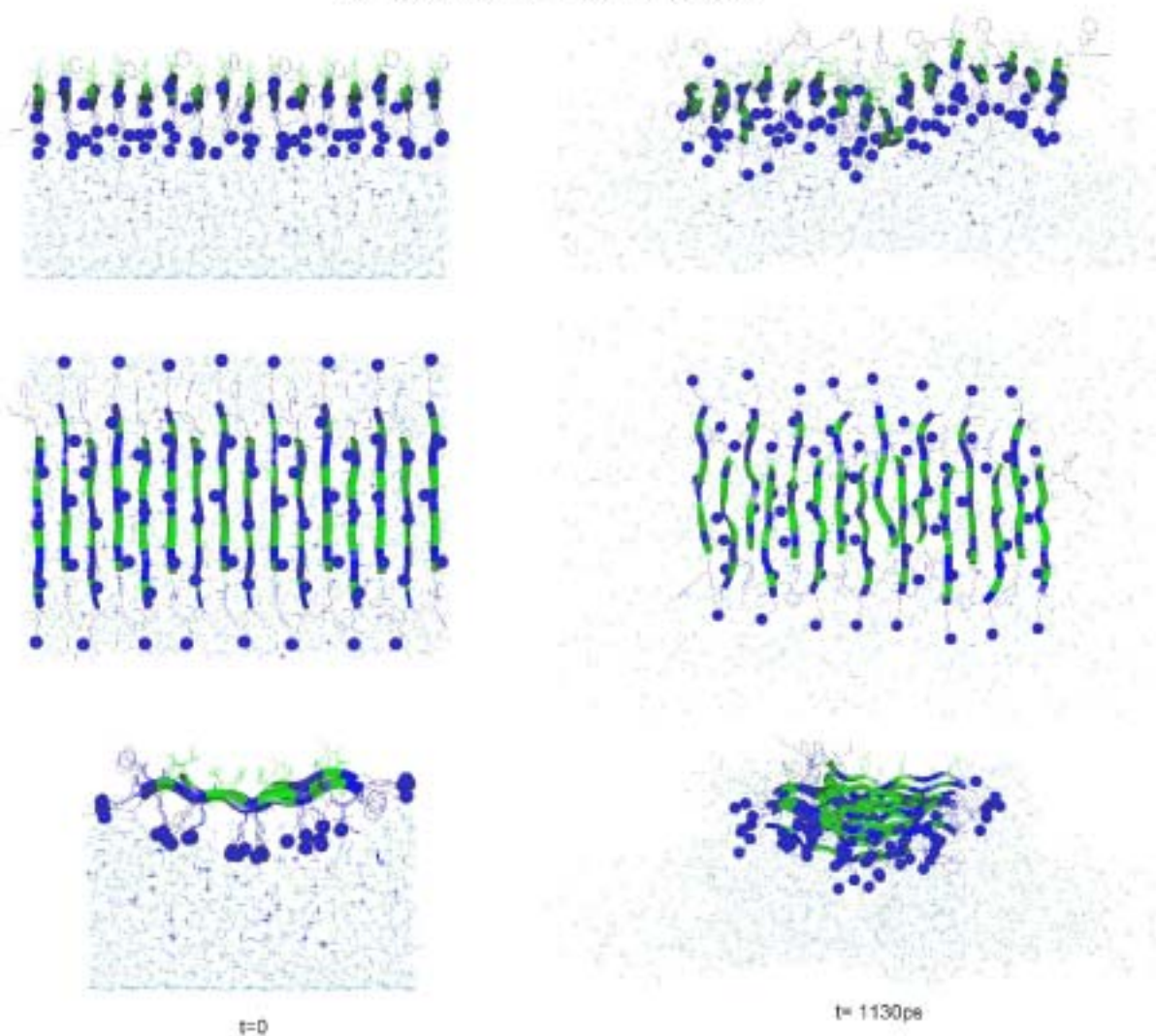


**Figure III.4 Images des films peptidiques LK<sub>15</sub> en position parallèle en hélice à  $t=0$  et en fin de simulation.** A gauche,  $t=0$  ps et à droite,  $t=300$  ps. Les images du haut représentent une vue de face de la boîte dans le plan xOy, et les images du bas une vue de dessus dans le plan xOz. Les sphères noires représentent les azotes des ammoniums des Lysines.



**Figure III.5 Images des films peptidiques LK<sub>22</sub> en hélice à  $t= 0$  et en fin de simulation.** A gauche,  $t= 0$  ps et à droite,  $t= 1136$  ps. Les images du haut représentent une vue de face de la boîte dans le plan xOy, et les images du bas une vue de dessus dans le plan xOz. La partie hydrophile du peptide est colorée en bleu et les ammoniums sont représentés par des sphères bleues, la partie hydrophobe est colorée en vert.

### Film de peptides LK9 antiparallèles



**Figure III.6 Images du film peptidique LK<sub>9</sub> en feuillet  $\beta$  à  $t=0$  et en fin de simulation.** A gauche,  $t=0$  ps et à droite,  $t=1130$  ps. Les images du haut représentent une vue de face de la boîte dans le plan  $xOy$ , et les images du milieu une vue de dessus dans le plan  $xOz$ , et les images du bas une vue du côté de la boîte dans le plan  $zOy$ . La partie hydrophile du peptide est colorée en bleu et les ammoniums sont représentés par des sphères bleues, la partie hydrophobe est colorée en vert.

### **a) Stabilité**

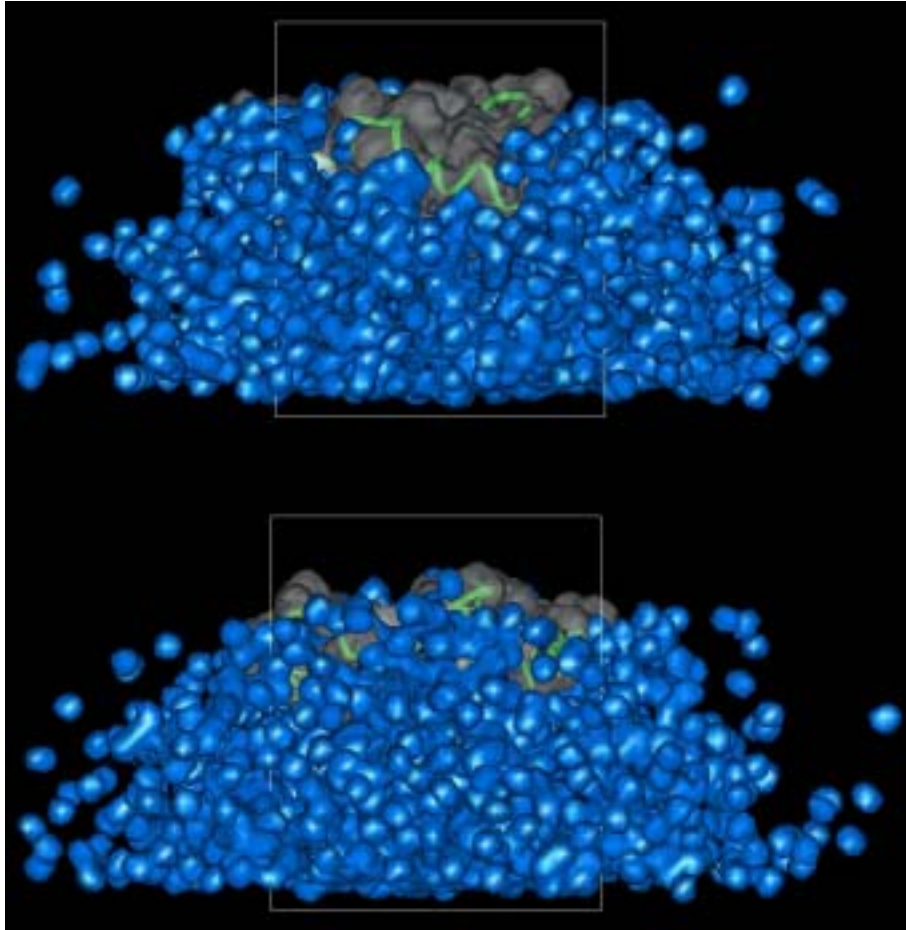
Parmi les méthodes d'analyses utilisées, Section 7.5.1, on peut suivre la stabilité des systèmes simulés en traçant l'évolution du RMSD en fonction du temps. Nous avons donc utilisé cette méthode. Les graphes des RMSD des peptides ne fournissent que des valeurs faibles avec quelques fluctuations ponctuelles dans le cas d'un des peptides du feuillet géant de LK<sub>9</sub> qui se trouve en bord de boîte. Dans tous les autres cas, les valeurs n'excèdent pas  $1 \pm 0,15$  Å pour le feuillet géant. Dans le cas des peptides en hélice  $\alpha$ , le RMSD moyen des quatre peptides LK22 a une valeur de  $1,8 \pm 0,6$  Å ; ceux des quatre peptides LK<sub>15</sub> ont une valeur oscillant autour de  $2,8 \pm 0,7$  Å pour la position parallèle et  $1,5 \pm 0,4$  Å pour la position antiparallèle, les valeurs de fluctuations pour ces systèmes (0,6, 0,7 et 0,4 Å) sont faibles et montrent que ces systèmes sont stables. Le système le plus perturbé est le système film LK<sub>15</sub>(1) (Fig. III.3) pour lequel il n'y a pas de contre-ion. La perturbation peut être la conséquence de la position très défavorable des hélices parallèles. Toutefois la constance des valeurs de RMSD de tous les systèmes confirment la stabilité des films au moins pendant la durée de la simulation.

### **b) Les films de peptides comme une barrière imperméable**

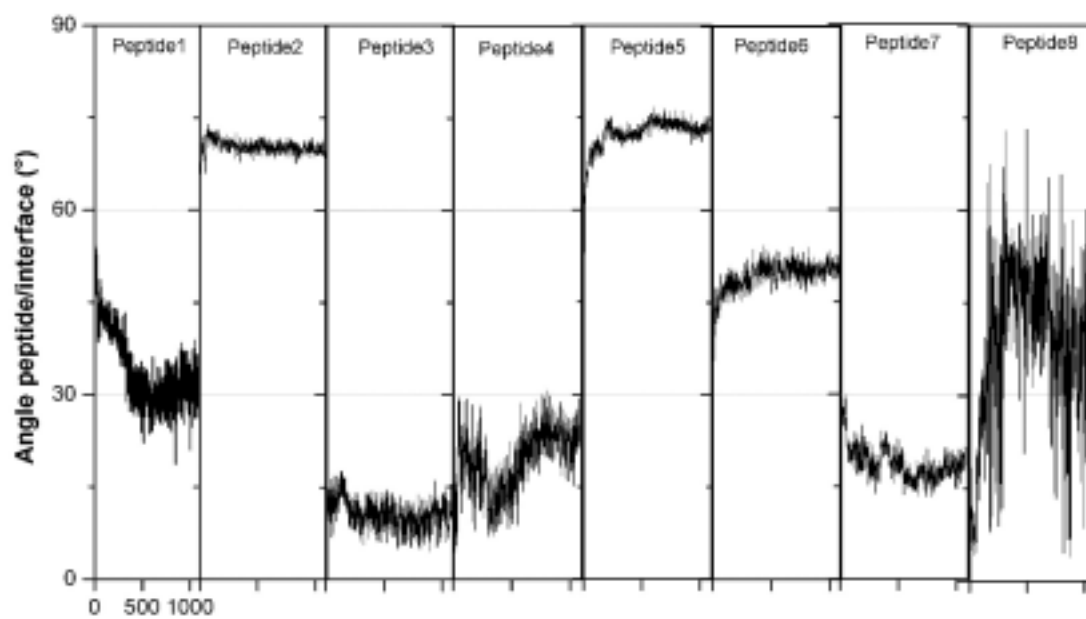
Comme nous l'avons vu dans l'introduction, Sabine Castano a montré dans son travail de thèse que les films de peptides idéalement amphipathiques forment une barrière imperméable à l'eau. Les Fig. III.3 à III.6 décrivent les systèmes à  $t=0$  et en fin de simulation. Ces figures montrent que les films forment une barrière totalement imperméable à l'eau. Ceci est renforcé par le calcul de la surface d'accessibilité

(Connolly, 1983) du système Film LK22 (Fig. III.7). Sur cette figure, on voit très bien qu'aucune molécule d'eau ne passe au delà du film peptidique.

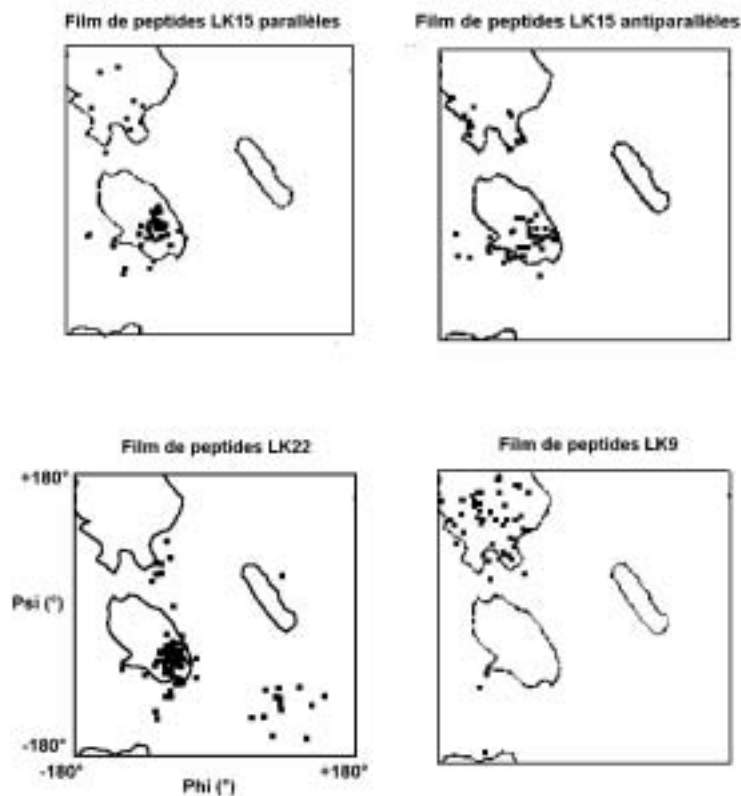
De plus, les axes des hélices restent dans le plan de l'interface eau/air et on n'observe aucune inclinaison. Le caractère amphipathique de ces peptides permet d'assurer l'imperméabilité des films.



**Figure III.7 Surface d'accessibilité du film de peptides LK22(Connolly, 1983).** La surface bleue représente les molécules d'eau, la surface grise les peptides, et les hélices des peptides sont colorées en vert.



**Figure III.8** Angles entre le plan du peptide LK<sub>9</sub> et l'interface eau/air.



**Figure III.9 Graphes de Ramachandran des peptides des films.**

### **c) Structure secondaire des peptides**

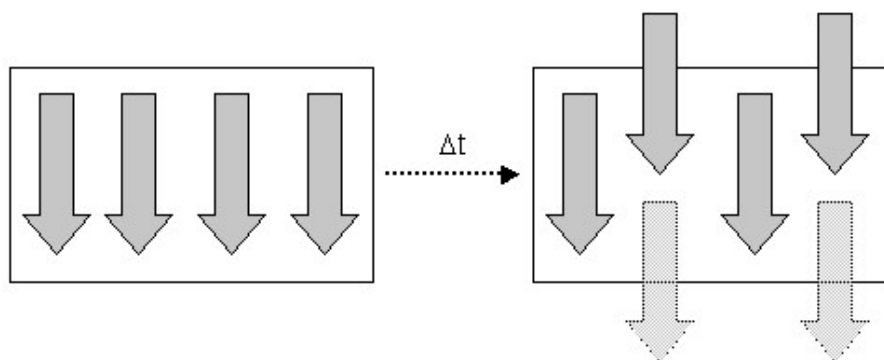
Les Fig.III.3 à III.6 et les graphes de Ramachandran (Fig. III.9) montrent que la structure en hélice  $\alpha$  est conservée partiellement pour certains peptides. Toutefois la présence des contre-ions ne semble pas intervenir dans la conservation de la structure en hélice. En effet dans le système Film LK<sub>15</sub>(1), les deux peptides centraux ne gardent qu'un seul tour d'hélice alors que la pression latérale semble participer à la conservation de la structure des deux autres peptides en bord de boîte (plus de 50%). Le système Film LK<sub>15</sub>(2) ne présente pas cette symétrie : les structures sont conservées à plus de 50% pour tous les peptides. Dans les deux cas, les graphes de



Ramachandran montrent des conformations permises en feuillets  $\beta$  qui correspondraient davantage à des conformations désordonnées. Pour le film de LK22, la structure en hélice  $\alpha$  est globalement conservée pour tous les peptides et on observe quelques conformations dans des zones non structurées. L'agencement en feuillet géant ne modifie pas la structure secondaire des brins  $\beta$  antiparallèles, la totalité des feuillets se retrouvent dans le graphe de Ramachandran.

#### d) Structure globale des films

##### (1) Film de peptides LK<sub>15</sub> parallèles



**Figure III.10** Représentation schématique du film de peptides LK<sub>15</sub>.

Sur la Fig. III.3, on observe qu'initialement tous les peptides sont alignés parallèlement et qu'en fin de simulation un peptide s'est déplacé dans le plan xOz. Nous avons schématisé le phénomène observé sur la Figure III.10. Ainsi, sur cette figure, on peut voir que pour compenser la position défavorable due aux interactions dipolaires parallèles, les peptides auraient tendance à s'intercaler comme sur la figure et ainsi les dipôles des peptides seraient dans une position moins défavorable.

### ***(2) Film de peptides LK22***

A la fin de la simulation du film de peptides LK22, on observe un alignement des dipôles des hélices de deux peptides du film (Fig. III.5 en bas à droite). Ce phénomène très intéressant a déjà été observé par diffraction de rayons X pour une protéine (Code PDB 1EK9) (Koronakis, 2000) dans laquelle on peut remarquer que certaines très grandes hélices présentes dans la structure sont en fait formées de plusieurs petites hélices mises bout à bout sans que leurs séquences ne soient continues.

### ***(3) Film de peptides LK<sub>9</sub>***

Dans le cas du feuillet géant LK<sub>9</sub>, on observe la formation d'une "vague". La mesure de l'angle entre le plan passant par tous les C $\alpha$  du feuillet et le plan de l'interface eau/air pour chaque double brin permet de quantifier cette vague. Sur la Fig. III.8, on peut suivre l'évolution de cet angle au cours de la simulation. On observe que l'angle du double brin 1 se stabilise autour d'une valeur de 32° alors que le double brin 8 montre de grandes fluctuations de l'ordre  $\pm 10^\circ$  autour de 42°. Trois doubles brins 2, 5 et 6 atteignent des valeurs respectives de 70, 73 et  $50 \pm 1^\circ$ . Les trois doubles brins restants, 3, 4 et 7 fournissent des angles respectifs de  $10 \pm 2^\circ$ ,  $19,5 \pm 5^\circ$  et  $18 \pm 2^\circ$ . Ces différentes valeurs montrent que certains doubles brins ne restent pas complètement à plat à l'interface eau/air. De plus nous avons vérifié l'existence de liaisons Hydrogène entre chaque brin tout au long de la simulation qui confirme bien la stabilité du feuillet géant stable.

## e) Conclusion

Malgré des durées de simulation courtes, les résultats obtenus montrent que les peptides amphipathiques secondaires forment des films stables et imperméables à l'eau. Ces résultats corroborent les données expérimentales obtenues par spectroscopie Infra-Rouge qui montraient la conservation globale de la structure secondaire et l'orientation à plat de ces peptides à l'interface eau/air. De plus, les peptides en hélice  $\alpha$  agissent comme des cylindres lisses qui glissent sur l'interface eau/air sans contraintes (exemples de l'alignement des axes des hélices des peptides LK<sub>22</sub> et de l'arrangement des dipôles parallèles des peptides LK<sub>15</sub>) alors que le feuillet en brins  $\beta$  antiparallèles s'accroche plus facilement et reste dans la configuration de départ. En revanche il est évident que des temps de calcul plus longs pourraient s'avérer intéressants pour observer la restructuration en hélice  $\alpha$  des peptides longs LK<sub>22</sub> et courts LK<sub>15</sub>, l'évolution de l'alignement des axes des hélices des peptides LK<sub>22</sub> observé ainsi que le réarrangement des dipôles au sein du film de peptides LK<sub>15</sub> et également l'évolution de la vague dans le macrofeuillet.

## 3. Insertion de peptides idéalement amphipathiques dans des membranes modèles

**Remarque sur le modèle de la monocouche phospholipidique.** La monocouche monomoléculaire de phospholipides à l'interface eau/air est un modèle simple permettant de mimer les propriétés physico-chimiques de base d'une demi-membrane et d'étudier les interactions intermoléculaires peptides/lipides. Cependant la monocouche ne représente pas un modèle parfait de membrane biologique car elle n'est pas exactement la moitié d'une bicouche. Cependant elle est parfaitement adaptée

à l'étude par PMIRRAS de l'orientation et de la structure des interactions peptides/membrane.

### **a) Insertion de peptides amphipathiques secondaires LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub>**

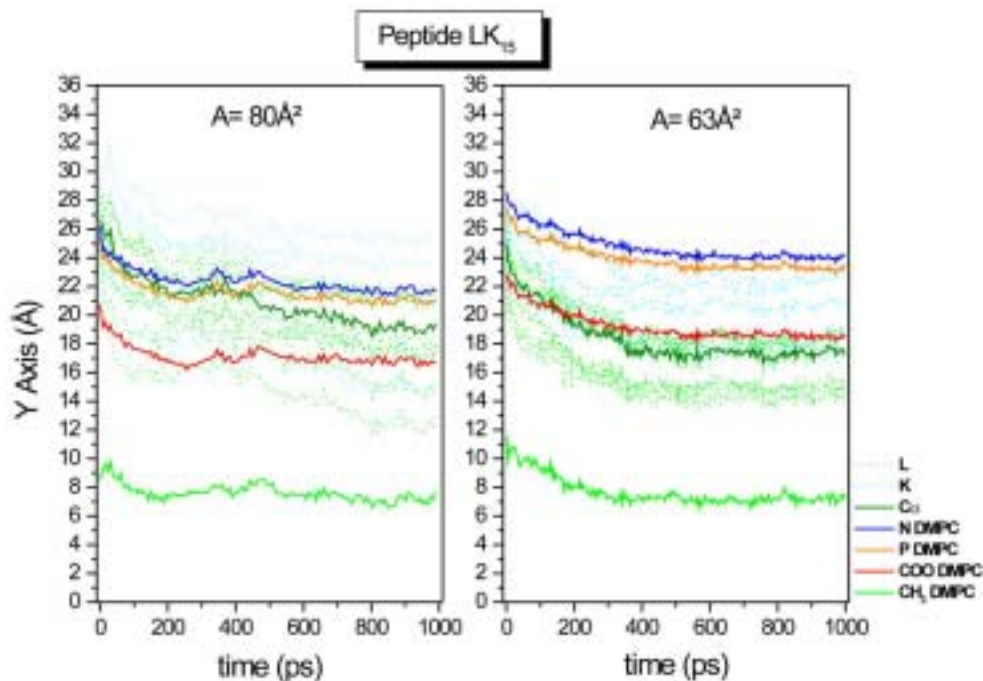
La simulation de peptides caractéristiques LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> de structure secondaire respectivement en hélice  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$  antiparallèles, placés à l'interface eau/film lipidique de DMPC va permettre d'étudier la phase d'insertion au niveau atomique. Nous avons donc construit les systèmes 1a, 1b, 2a, 2b, 6a, 6b et 7 (cf. Annexe C), pour lesquels une dynamique à pression constante a été effectuée pendant 1 ns.

#### ***(1) Dans des monocouches de DMPC***

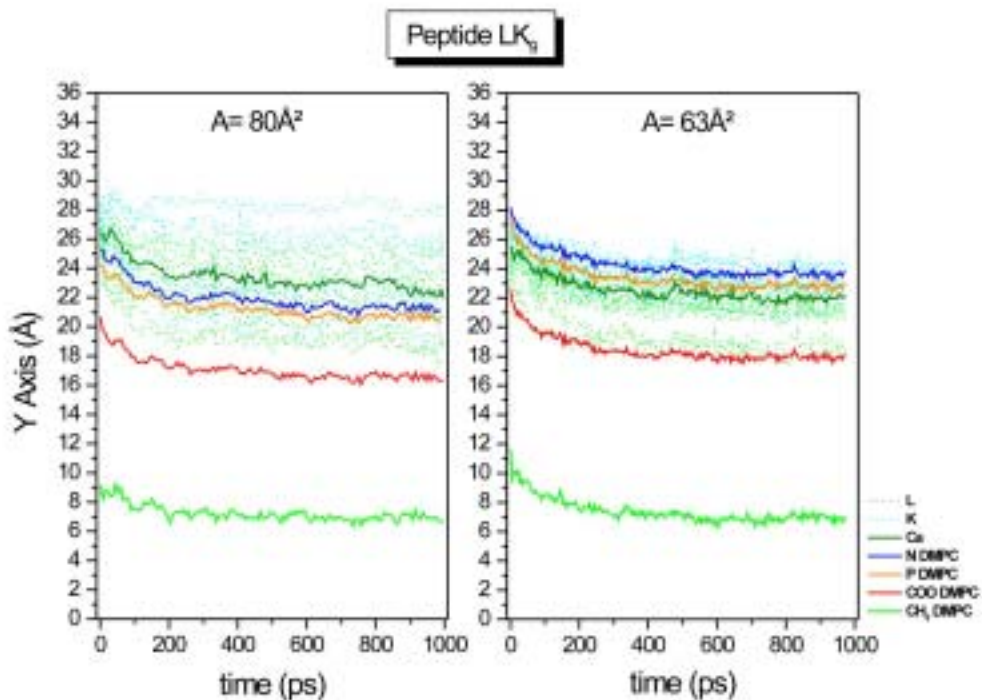
Pour étudier l'influence de la pression latérale exercée par la monocouche lipidique sur la structure secondaire des peptides, deux aires spécifiques de la monocouche de DMPC ont été considérées. Ainsi pour simuler une basse pression latérale, nous utiliserons une monocouche d'aire  $A = 80 \text{ \AA}^2$  (Systèmes 1a et 2a), et pour une forte pression latérale, une monocouche d'aire  $A = 63 \text{ \AA}^2$  qui est la valeur expérimentale des bicouches de DMPC (Systèmes 1b et 2b).

#### **(a) Insertion**

La dynamique moléculaire permet d'accéder instantanément aux coordonnées cartésiennes de tous les atomes. Dans ce cas de figure elle va nous permettre d'évaluer la profondeur d'insertion du peptide dans le film phospholipidique. Ainsi nous avons tracé l'évolution de la profondeur de l'insertion des peptides dans les films de DMPC en fonction du temps sur les graphes (Fig. III.11 et III.12)



**Figure III.11 Insertion du peptide en hélice  $\alpha$  LK<sub>15</sub> dans une monocouche de DMPC.** Trajectoires des différents éléments du peptide et des lipides en fonction du temps. A gauche, système 1a (pression latérale basse); à droite, système 1b (pression latérale élevée). Les trajectoires des différents groupements du peptide et des lipides sont colorées de la façon suivante : pour les lipides de DMPC : les azotes sont représentés en bleu, les phosphores en orange, les carbonyles des esters des chaînes en rouge et les méthyles de bout de chaînes en vert clair. Pour le peptide, le barycentre des C $\alpha$  est représenté en trait continu vert foncé, les résidus Lys en pointillé bleu, et les résidus Leu en pointillé vert.

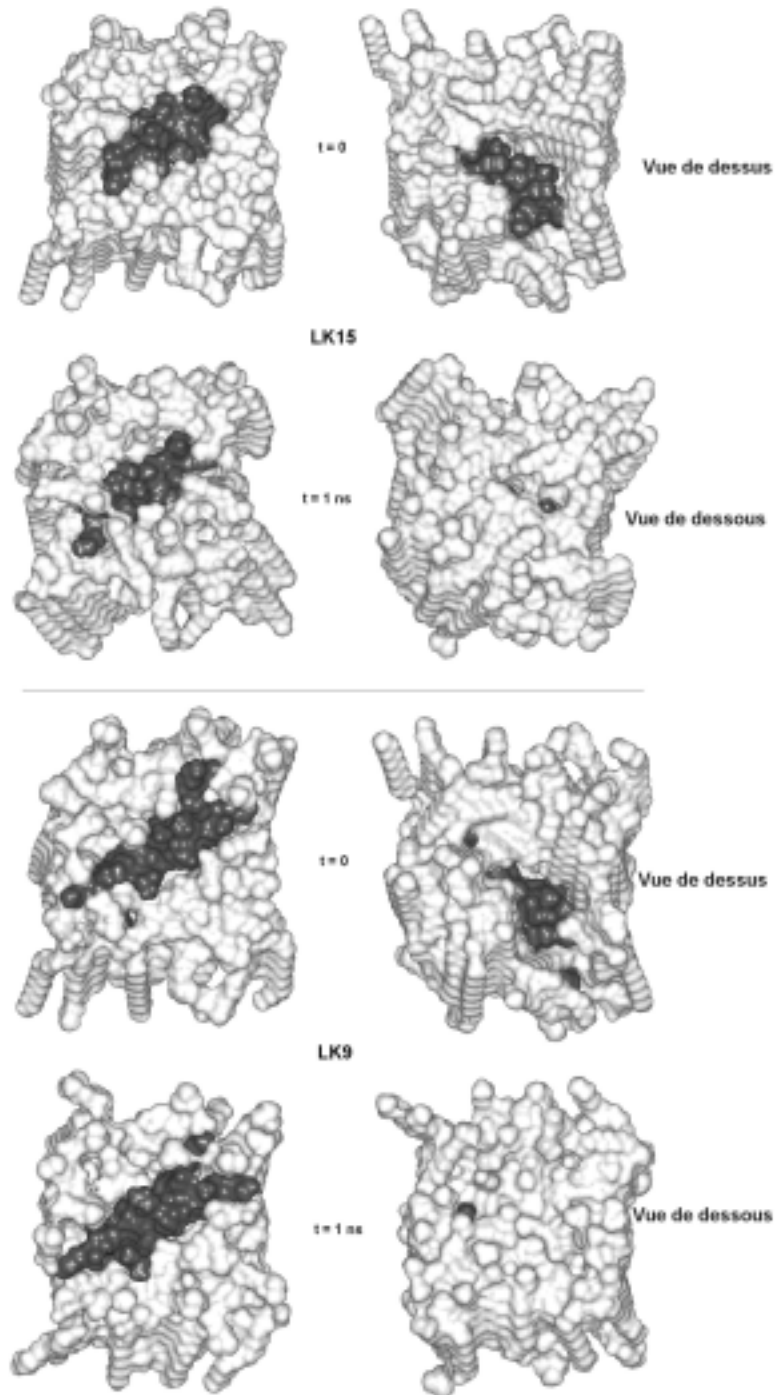


**Figure III.12 Insertion du peptide en feuillet  $\beta$  antiparallèles  $LK_9$  dans une monocouche de DMPC.** A gauche, système 2a (pression latérale basse); à droite, système 2b (pression latérale élevée). Les trajectoires des différents groupements du peptide et des lipides sont colorées de la façon suivante : pour les lipides de DMPC : les azotes sont représentés en bleu, les phosphores en orange, les carbonyles des esters des chaînes en rouge et les méthyles de bout de chaînes en vert clair. Pour le peptide, le barycentre des  $C\alpha$  est représenté en trait continu vert foncé, les résidus Lys en pointillé bleu, et les résidus Leu en pointillé vert.

Les études PMIRRAS (Castano, 1999a) ont montré que le peptide en feuillet  $\beta$  ne s'insère pas en profondeur dans le film de DMPC et ne perturbe seulement que les groupements phosphates des lipides alors que les peptides en hélice  $\alpha$  perturbent fortement les groupes carbonyles des esters des lipides. D'autre part, les mêmes auteurs (Castano, 1999b) ont noté un amincissement du film phospholipidique. Dans le système à basse pression latérale, ( $A= 80 \text{ \AA}^2$ ) le peptide est initialement placé juste

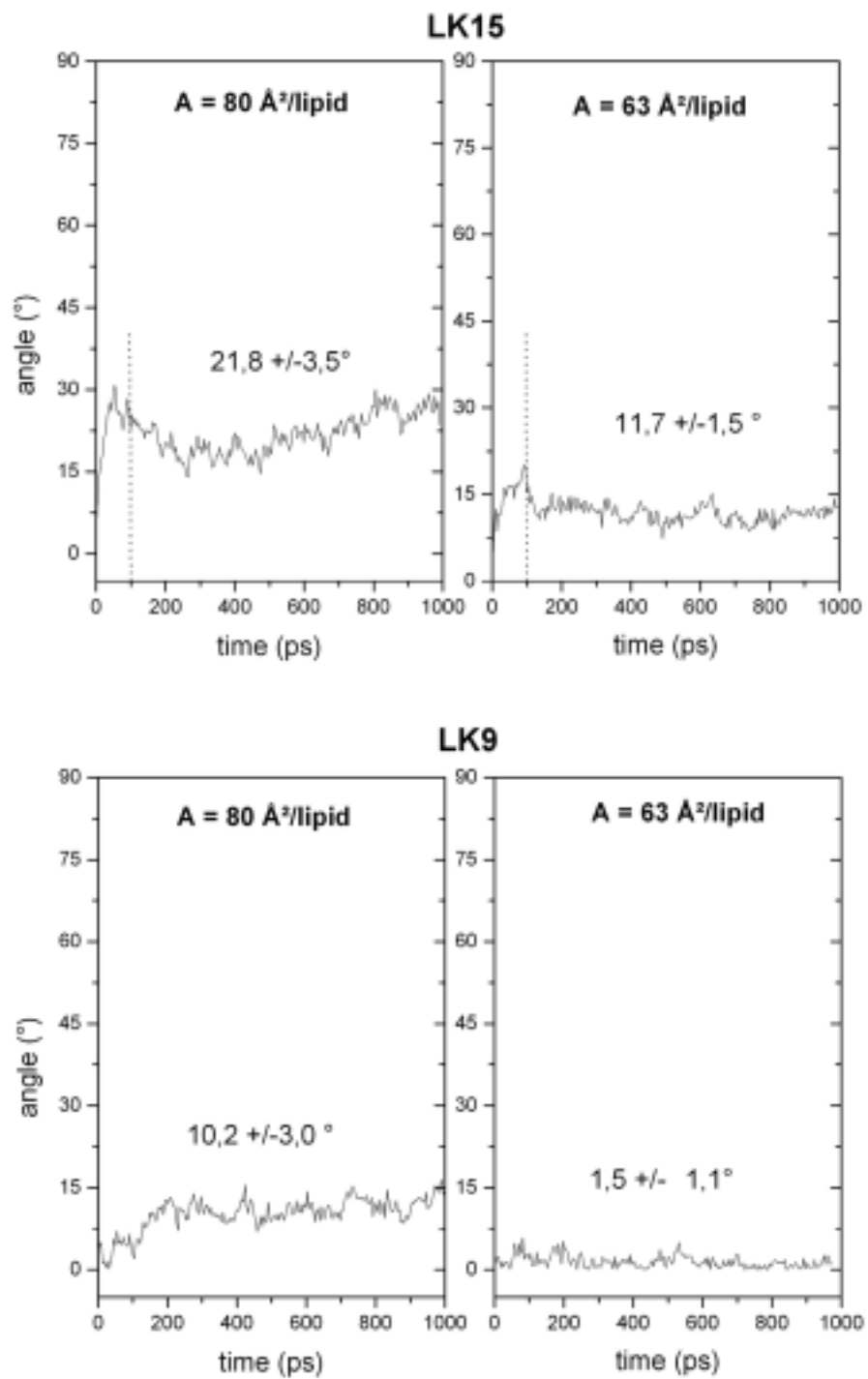
au-dessus (d'environ 1 Å) des têtes polaires des lipides (phosphates et ammoniums). Dans le cas du système à forte pression latérale, ( $A=63 \text{ \AA}^2$ ), le même positionnement n'est plus possible car les lipides remplissent rapidement la cavité dans lequel le peptide doit se loger et l'insertion est alors impossible. Donc dans ce système, le peptide est placé légèrement au-dessous des têtes polaires (environ 2 Å). Le graphe de la Fig. \ref{fig :ca1a1b} montre que le peptide LK<sub>15</sub> en hélice  $\alpha$  s'insère rapidement dès les 300 premières ps et profondément (environ 5-6 Å) dans la monocouche lipidique jusqu'aux carbonyles des esters, puis le processus devient plus lent durant le reste de la simulation (environ 1 Å). Dans le cas du peptide en feuillet  $\beta$ , le graphe de la Fig. III.12 montre qu'il reste juste à la surface en perturbant seulement la région polaire phosphate-choline des têtes polaires. De plus l'écart entre les traces des méthyles des chaînes et celles des têtes polaires montrent que l'épaisseur de la monocouche diminue sous l'effet de l'insertion du peptide seulement dans les cas des pressions latérales faibles ( $A= 80 \text{ \AA}^2$ ) avec respectivement un amincissement de 3,5 Å dans le cas du peptide en hélice  $\alpha$  et 1,9 Å dans le cas du feuillet  $\beta$ .

Pour visualiser ce phénomène d'amincissement du film phospholipidique, nous proposons de construire les surfaces d'accessibilité du peptide et du film phospholipidique calculée d'après des travaux effectués par Connolly (Connolly, 1983). Ainsi les images de la Fig. III.13 représentent cette surface d'accessibilité et montrent que les peptides sont totalement immergés dans la " mer " de lipides. Si on examine la vue de dessous, le peptide est complètement dissimulé par les chaînes d'acides gras des lipides du DMPC ceci est la conséquence de très fortes interactions de Van der Waals entre les chaînes aliphatiques lipidiques et les chaînes latérales hydrophobes des deux peptides. En revanche la vue de dessus montre que la forme hydrophile du peptide (et donc les lysines) garde un accès privilégié à l'eau.

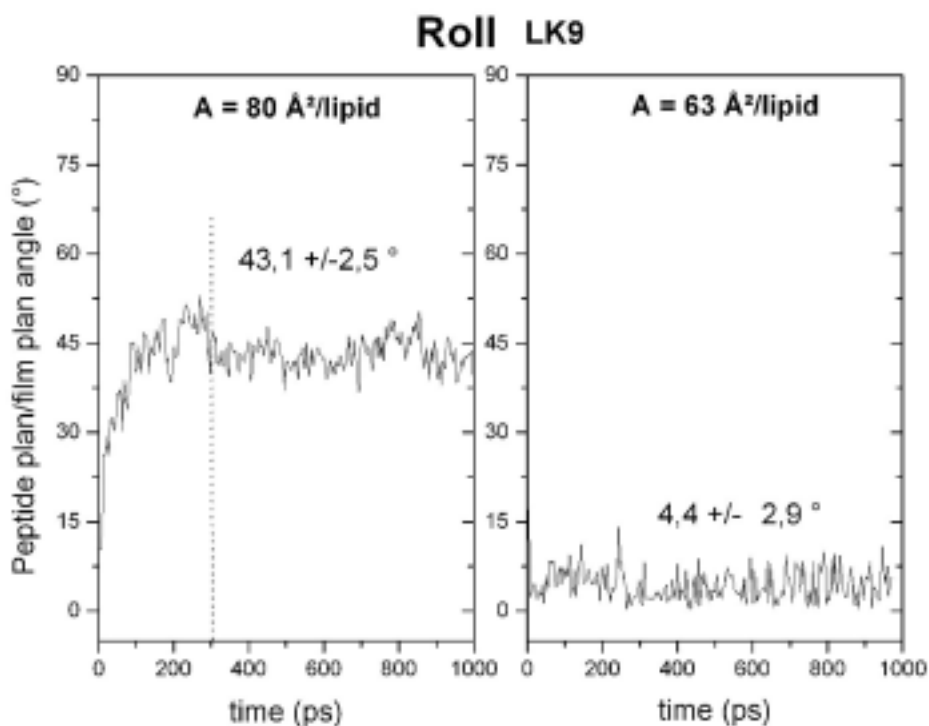


**Figure III.13** Surface d'accessibilité des peptides **LK<sub>15</sub>** et **LK<sub>9</sub>** dans la monocouche de DMPC ( $A= 63 \text{ \AA}^2$ ) (Connolly, 1983). La surface d'accessibilité de la monocouche lipidique est colorée en gris et celle du peptide est colorée en noir.





**Figure III.14** Tilt du peptide LK<sub>15</sub> dans des monocouches de DMPC. A droite Système 1a, à gauche Système 1b.

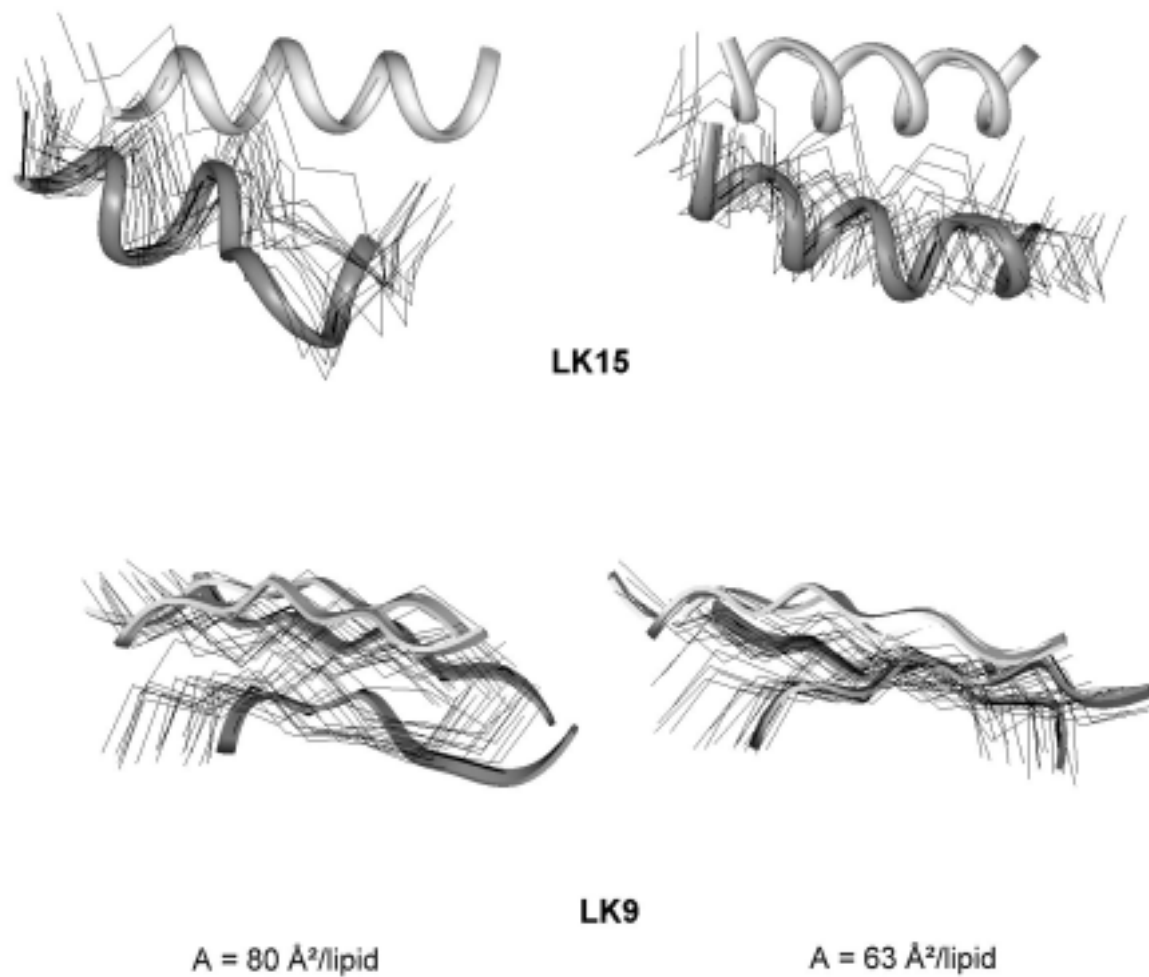


**Figure III.15 Roll du peptide LK<sub>9</sub> dans des monocouches de DMPC.** A droite Système 2a, à gauche Système 2b.

### (b) Orientation

Pour suivre l'orientation des peptides pendant la simulation, nous avons représenté les images stroboscopiques prélevées chaque 50 ps (Fig. III.16) des deux peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub>. De plus pour quantifier cette orientation, nous avons défini deux angles : le "tilt" (inclinaison) et le "roll" (roulis) (Fig. III.14 et III.15) que nous avons tracé en fonction du temps. Le tilt est l'angle d'inclinaison défini entre le vecteur corrélant tous les C $\alpha$  du peptide et le plan de la monocouche. Le roll est l'angle de roulis mesuré entre le plan passant par tous les C $\alpha$  des brins  $\beta$  et le plan de la monocouche. Le tilt est mesuré pour les deux peptides (en hélice et en feuillet) alors que le roll ne peut

être mesuré que pour le peptide en feuillet  $\beta$ . Les images stroboscopiques montrent que dans le cas du peptide en hélice  $\alpha$  LK<sub>15</sub>, le changement d'orientation et l'insertion sont très rapides dès les 100 premières ps.



**Figure III.16 Images stroboscopiques des traces des peptides dans la monocouche de DMPC.** Les images stroboscopiques sont prises toutes les 50 ps. Les peptides sont colorées en gris à  $t= 0$  et en noir à  $t= 1000$  ps. En haut à gauche : système 1a, en haut à droite : système 1b, en bas à gauche : système 2a, en bas à droite : système 2b.

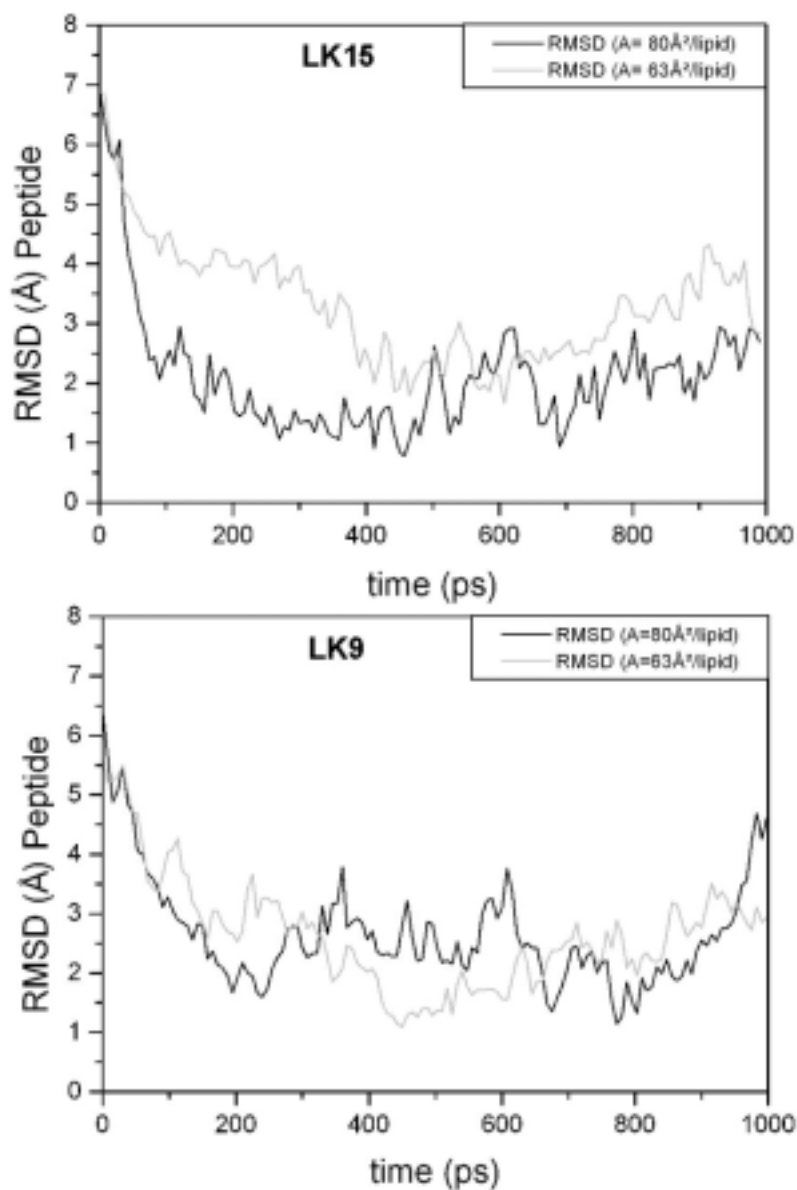
Sur la Fig. III.14, des valeurs de tilt élevées sont rapidement atteintes après 100 ps et restent globalement constantes pendant la simulation; en revanche elles restent inférieures à  $30^\circ$  ce qui montre que l'insertion de ce peptide en hélice  $\alpha$  se fait essentiellement à plat. Ceci est particulièrement évident dans les conditions standard de pression latérale ( $A= 63 \text{ \AA}^2$ ) où le tilt dépasse à peine  $10^\circ$  ce qui prouve bien une insertion à plat.

Dans le cas du peptide en feuilletts  $\beta$  antiparallèles (Fig. III.14 et III.15), les valeurs stables de tilt et de roll montre qu'il n'y a pas de changement brusque d'orientation. Néanmoins pour le système simulant une basse pression latérale, on note une forte valeur de roll ( $43,1 \pm 2,5^\circ$ ) atteint après 300 ps alors que dans la monocouche de DMPC avec  $A= 63 \text{ \AA}^2$  cette valeur est négligeable ( $4,4 \pm 2,9^\circ$ ). Ceci est vraisemblablement la conséquence directe de la pression latérale basse qui laisse de nombreux degrés de liberté aux peptides. De plus, les faibles valeurs de tilt mesurées (Fig. III.14) à  $10,2^\circ$  ( $A=80 \text{ \AA}^2$ ) et  $1,5^\circ$  ( $A = 63 \text{ \AA}^2$ ) corroborent les résultats de PMIRRAS qui montraient que l'insertion de ce type de peptide en feuillet  $\beta$  se fait en général à plat (avec un angle d'inclinaison  $\sim 30^\circ$ ). Il faut noter que dans les deux simulations du LK<sub>15</sub> la partie qui pénètre la monocouche est la terminaison Lys<sup>15</sup>-CO-Ph ce qui prouve que la présence du fluorophore est loin d'être sans conséquence sur le comportement du peptide global. L'influence du fluorophore CO-Ph est équilibrée dans le cas du LK<sub>9</sub> car chaque feuillet en porte un sur la terminaison Cterm et les feuilletts sont antiparallèles. Cette particularité du feuillet  $\beta$  explique bien l'angle de tilt quasi nul dans les conditions standard de pression latérale.

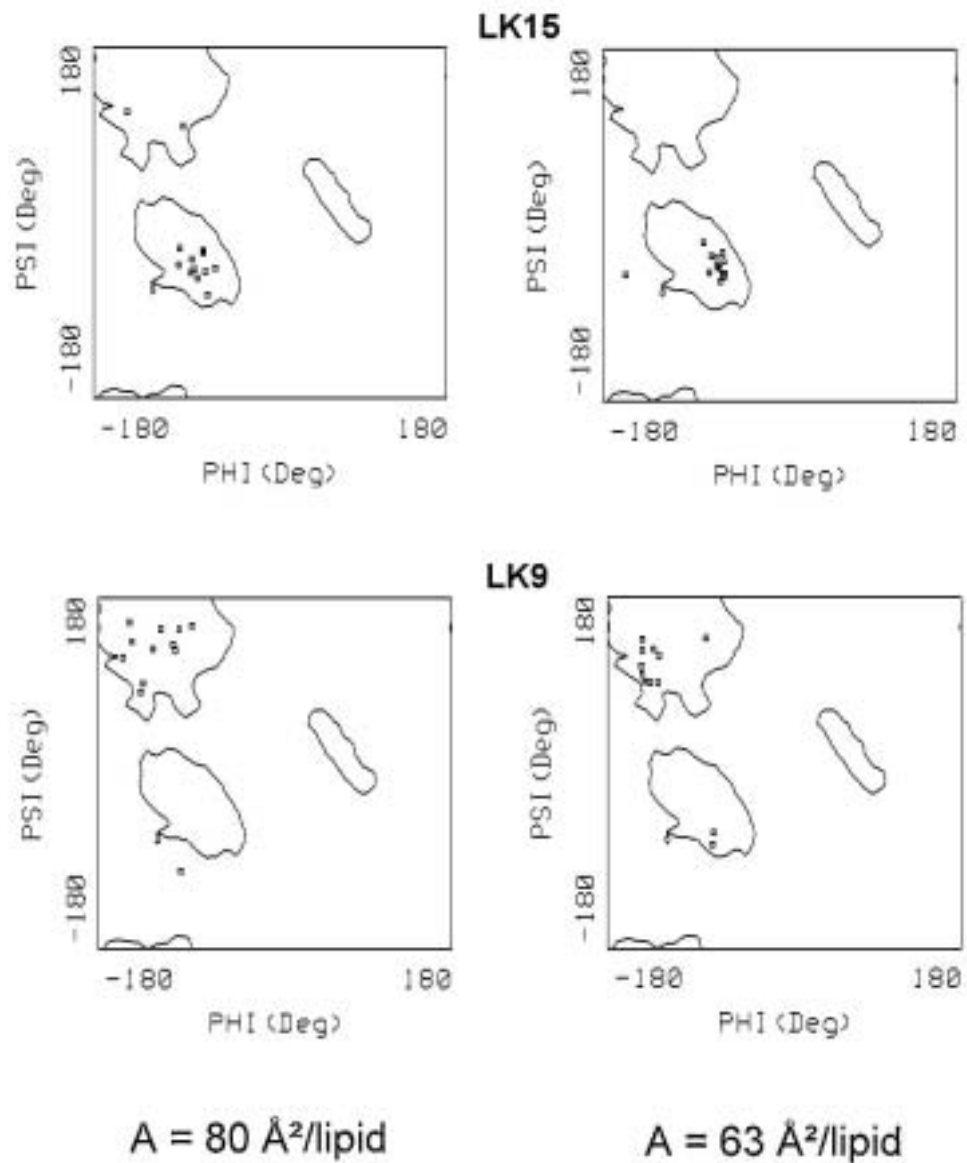
**(c) Structure secondaire des peptides en hélice  $\alpha$   
et en feuillets  $\beta$  antiparallèles**

L'observation du graphe du RMSD des  $C\alpha$  en fonction du temps (Figure III.17) permet, pour les quatre systèmes 1a, 1b, 2a, 2b, d'attribuer les 200 premières ps de simulation à une phase d'équilibration.

Après celle-ci, les deux graphes fluctuent d'un minimum de 0,5 Å à un maximum de 2 Å avec une valeur moyenne de 1 Å, ce qui montre que durant l'insertion dans le film de DMPC, les deux peptides différents conservent leur structure secondaire. Pour chaque système, les graphes de Ramachandran (Fig. III.18) ont été tracés pour vérifier la structure secondaire en fin de simulation. Il s'avère qu'on retrouve globalement la même structure secondaire pour chaque peptide quelque soit la pression latérale utilisée. De plus la structure secondaire semble être mieux conservée dans les modèles à haute pression latérale que dans les modèles à basse pression latérale ce qui montre encore une fois l'importance primordiale de ce paramètre. Les graphes de  $(\Phi, \Psi)$  en fonction des résidus, (Fig. III.18), en fin de simulation le confirme.



**Figure III.17 RMSD des C $\alpha$  des peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> dans des monocouches de DMPC.** Les traits continus gris représentent les RMSD des peptides dans des systèmes dont l'aire est A= 63 Å<sup>2</sup>/lipide, et les noirs ceux pour lesquels A= 80 Å<sup>2</sup>/lipide.



**Figure III.18** Graphes de Ramachandran des peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> dans des monocouches de DMPC en fin de simulation.

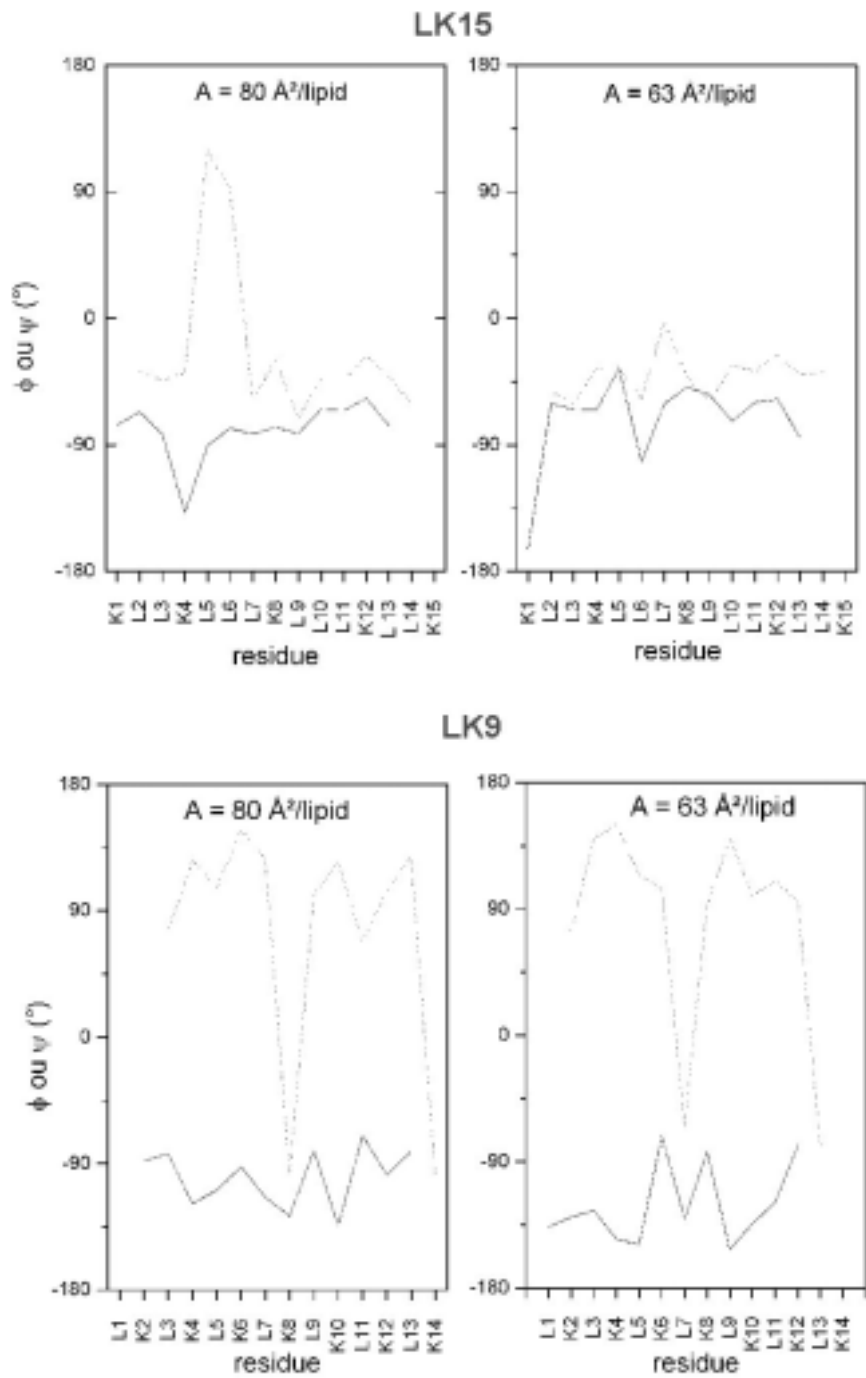


Figure III.19 Graphes ( $\Phi, \Psi$ ) en fonction du temps du peptide LK<sub>15</sub> dans des monocouches de DMPC.



Dans le cas du modèle à grande surface spécifique, les résidus Leu<sup>5</sup> et Leu<sup>6</sup> montre une interruption de l'hélice parfaite avec des angles  $\Phi$  et  $\Psi$  atteignant des valeurs 140°, +120° pour Leu<sup>5</sup> et -90°, +100° pour Leu<sup>6</sup>. On ne retrouve pas le même résultat pour son homologue dans la monocouche à plus faible surface. D'autre part, le peptide en feuillets  $\beta$  antiparallèles LK<sub>9</sub> semble moins sensible à la pression latérale exercée par la monocouche lipidique. Cependant dans les deux modèles une perturbation importante apparaît autour de Lys<sup>8</sup> ou Leu<sup>7</sup> pour ce peptide. Il s'agit d'une perturbation très localisée correspondant à une inversion du feuillet sans destruction de la structure globale. Finalement, les deux peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> gardent globalement leur structure secondaire initiale quand ils s'insèrent dans une monocouche phospholipidique de DMPC ce qui est en parfait accord avec les données expérimentales. De plus, le calcul du réseau de liaison Hydrogène entre les carbonyles d'un résidu et les azotes d'un autre résidu indique que le peptide LK<sub>15</sub> reste en hélice  $\alpha$  pendant l'insertion, comme cela a été trouvé expérimentalement et qu'aucune hélice  $3_{10}$  ou  $\pi$  n'apparaît.

#### (d) Conclusion

D'un point de vue des dimensions des boites de simulation, les lipides n'ont pas la place d'effectuer des mouvements de translation dans le plan xOz (plan de la monocouche) et donc ne permettent pas au peptide de s'insérer totalement. Toutefois le mécanisme d'insertion simulée pour ces deux peptides semblent réaliste puisqu'il est en parfait accord avec les données expérimentales issues des études PMIRRAS. Il apparaît clairement que l'insertion s'effectue différemment selon la structure

secondaire du peptide. Avec la structure en hélice  $\alpha$ , le peptide s'insère très profondément dans la monocouche jusqu'aux carbonyles des esters des DMPC qui sont très perturbés ce qui a aussi été vu par spectroscopie IR (Castano, 1999b), d'autre part avec la structure en feuillets  $\beta$  antiparallèles, le peptide reste à la surface de la monocouche, perturbant essentiellement la zone ammoniums-phosphates des lipides. Cependant quelque soit la structure secondaire, les peptides restent globalement parallèles au plan horizontal (plan de la monocouche). Tout ceci est en excellent accord avec les données expérimentales qui ont déjà été publiées (Castano, 1999b). En dépit des différences de comportement, un phénomène commun qui peut contribuer à l'efficacité lytique identique de ces deux séries de peptides, apparaît : à cause de très fortes interactions Van der Waals des chaînes alkyles des acides gras avec la partie hautement lipophile "la plus basse" du peptide inséré, ce dernier est presque totalement immergé à l'intérieur de la phase lipidique. Ceci conduit à un local mais notable amincissement de la monocouche, le même comportement a été mis en évidence par Benoît Roux *et al.*(Bernèche, 1998) durant une simulation par dynamique moléculaire de la mélittine dans une bicouche de DMPC. Les auteurs trouvaient que le coeur hydrophobe de la membrane était réduit d'environ 30% de son épaisseur initiale sous l'effet de l'insertion de la mélittine. Dans nos systèmes, à l'endroit précis où l'insertion des peptides apparaît, l'amincissement global peut être de 3,5 à 6 Å pour une monocouche simple. Ceci peut grandement contribuer aux propriétés lytiques de ces peptides, notamment s'il est raisonnable de penser que les peptide ne s'insèrent que rarement seuls mais forment plutôt des radeaux de peptides. D'autre part il apparaît qu'une pression latérale correcte (par exemple, la surface spécifique correcte de la monocouche lipidique) est essentielle pour obtenir un comportement physiquement raisonnable des peptides. Avec les modèles à basse pression latérale, systèmes 1a et 2a, il apparaît des comportements irréalistes. Il est donc évident que la simulation par dynamique moléculaire est hautement sensible aux

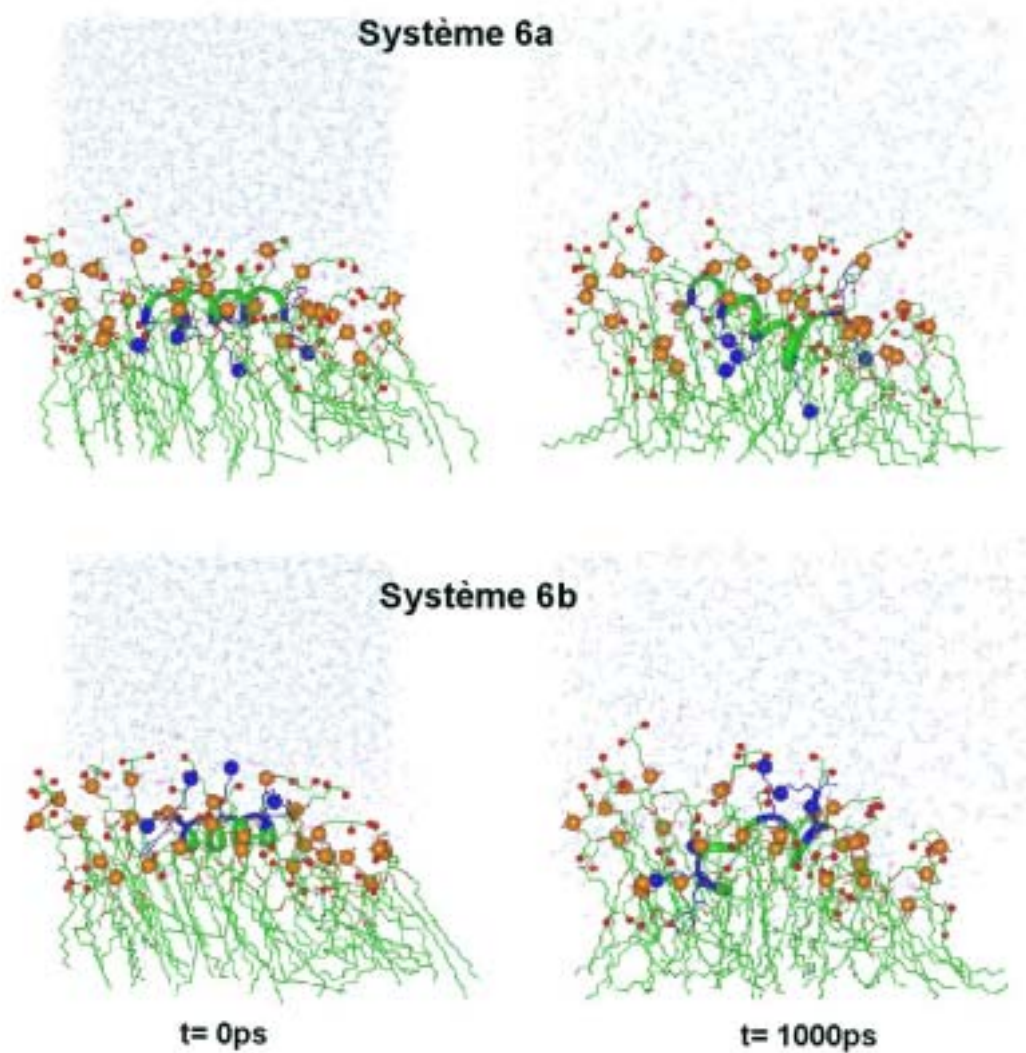
paramètres initiaux et qui peut conduire à des trajectoires (et des résultats) très différents même avec des temps de simulation aussi courts que 1 ns.

## ***(2) Dans des monocouches de DMPG***

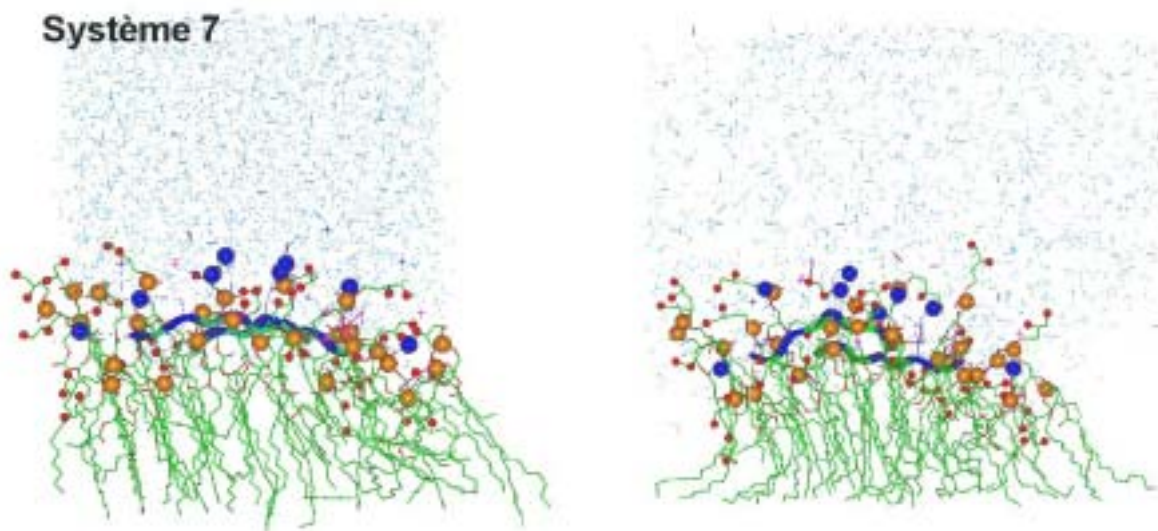
Parce que les peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> sont fortement chargés par la présence des Lysines, il est intéressant d'étudier leur comportement face à des couches chargées. Dans une approche différente de la précédente, une monocouche phospholipidique de DMPG (chargée négativement) ( $A = 58,8 \text{ \AA}^2$ ) est utilisée pour étudier l'influence de la nature des têtes polaires sur le processus d'insertion des peptides en hélice  $\alpha$  (LK<sub>15</sub>) et en feuillets  $\beta$  (LK<sub>9</sub>). On a vu précédemment que les couches chargées ne se comportent pas comme les couches zwitterioniques et donc on peut s'attendre à ce que la charge portée par le lipide DMPG ait une influence sur l'insertion des peptides. Les résultats obtenus ne pourront être comparés avec aucun résultat expérimental puisque aucune étude n'a été publiée à ce jour. La différence entre les systèmes 6a et 6b est la position du peptide en hélice  $\alpha$  à l'interface eau/monocouche lipidique. En effet, dans le système 6a, la partie hydrophobe est placée en face du milieu aqueux et donc sa partie hydrophile se trouve immergée dans la partie polaire du film lipidique. A l'opposé, dans le système 6b, la partie hydrophobe de l'hélice est immergée dans la zone polaire des lipides et la partie hydrophile est en contact avec le milieu aqueux. Le système 7 décrit le peptide LK<sub>9</sub> à l'interface eau/monocouche chargée dans la position favorable à l'insertion. Les trois systèmes 6a, 6b et 7 ont subi des simulations à pression constante de 1 ns.

### **(a) Insertion**

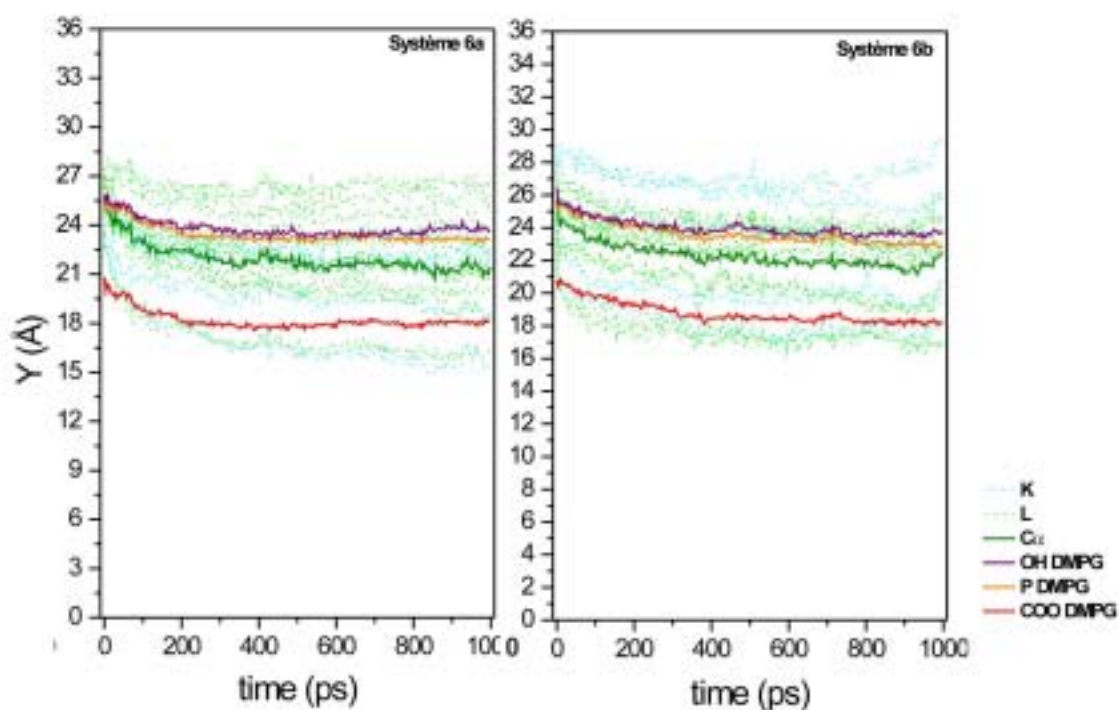
Les images des Fig. III.20 et III.21 montrent des clichés des systèmes 6a, 6b et 7 à  $t=0$  et  $t=1000$  ps. Sur ces images, on voit que dans le cas du système 6a, le peptide s'insère suivant le même mode que dans une monocouche de DMPC cependant il n'est pas positionné de la même façon. En effet, comme nous l'avons dit dans l'introduction, la partie hydrophobe du peptide LK<sub>15</sub> est dirigé vers le milieu aqueux et sa partie hydrophile vers le milieu lipidique. Dans le cas opposé, Système 6b, le peptide perd sa structure secondaire et ne s'insère pas.



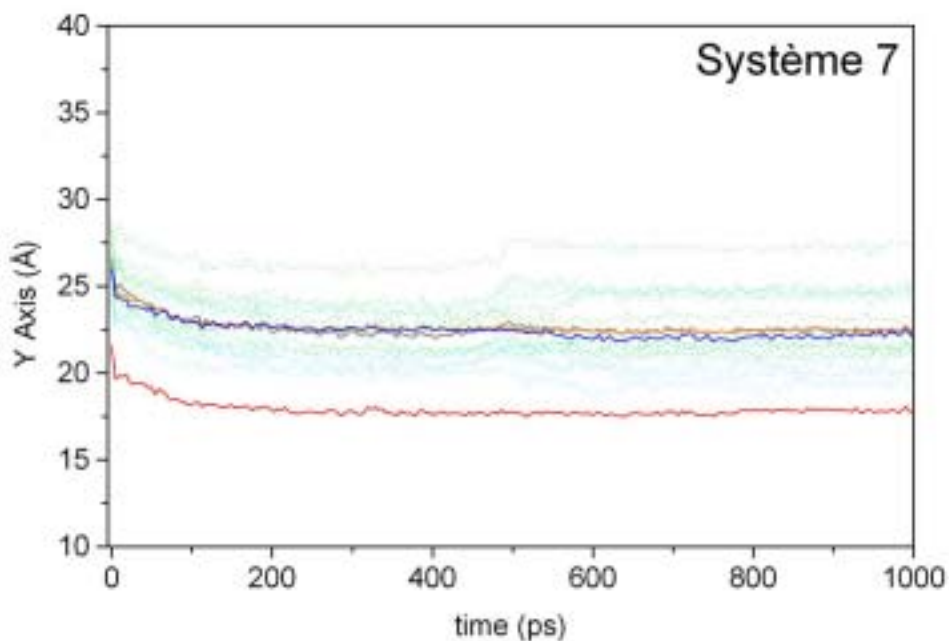
**Figure III.20** Clichés de l'insertion de LK<sub>15</sub> dans la monocouche de DMPG. L'hélice du peptide est coloré en bleu pour les résidus hydrophiles Lys et en vert pour les résidus hydrophobes Leu, les sphères bleues représentent les azotes des Lys, les sphères oranges, les phosphores des phosphates des DMPG, les sphères rouges les hydroxyles des glycérols des têtes polaires, les carbones des lipides sont colorés en vert. L'eau est représentée en bleu.



**Figure III.21 Clichés de l'insertion de LK<sub>9</sub> dans la monocouche de DMPG.** Le feuillet  $\beta$  est coloré en bleu pour les résidus hydrophiles Lys et en vert pour les résidus hydrophobes Leu, les sphères bleues représentent les azotes des Lys, les sphères oranges, les phosphores des phosphates des DMPG, les sphères rouges les hydroxyles des glycérols des têtes polaires, les carbones des lipides sont colorés en vert. L'eau est représentée en bleu.



**Figure III.22 Insertion du peptide en hélice  $\alpha$  LK<sub>15</sub> dans une monocouche de DMPG.** Les trajectoires des différents groupements du peptide et des lipides sont colorées de la façon suivante : pour les lipides de DMPC : les hydroxyles de la tête glycérol sont représentés en violet, les phosphores en orange, les carbonyles des chaînes en rouge. Pour le peptide, le barycentre des C $\alpha$  est représenté en trait continu vert foncé, les résidus Lys en pointillé bleu, et les résidus Leu en pointillé vert.



**Figure III.23 Insertion du peptide LK<sub>9</sub> dans une monocouche de DMPG.** Les trajectoires des différents groupements du peptide et des lipides sont colorées de la façon suivante : pour les lipides de DMPC : les hydroxyles de la tête glycérol sont représentés en bleu, les phosphores en orange, les carbonyles des esters des chaînes en rouge. Pour le peptide, le barycentre des C $\alpha$  est représenté en trait continu gris, les résidus Lys en pointillé bleu, et les résidus Leu en pointillé vert.

Sur les graphes de la Fig. III.22, on peut suivre l'évolution de l'insertion à travers la monocouche de DMPG en fonction du temps. Le peptide LK<sub>15</sub> présente une faible insertion du peptide (d'environ 1,7 Å) seulement pour le système 6a. L'insertion se stabilise au bout d'une centaine de ps et perturbe la région phosphore-carbonyle des esters des lipides. Pour le système 6b, les trajectoires des barycentres des C $\alpha$  des peptides se superposent sur celles des phosphores et des hydroxyles des glycérols. Sur la Fig. III.22, il est intéressant de noter que les trajectoires des phosphores et des



hydroxyles au bout de 450 ps s'inversent comme si les hydroxyles passaient au-dessous des phosphores c'est à dire l'angle P-OH avec le plan de la couche passe d'une valeur positive à une valeur négative et ainsi la tête polaire pointe vers l'intérieur hydrophobe. De plus, dans le système 6a, les Lysines du peptide sont éloignées des phosphates et il n'y a donc pas d'interactions ioniques et le peptide garde sa structure en hélice, ce qui n'est pas le cas du système 6b. En effet dans ce dernier système, les lysines interagissent immédiatement avec les phosphates des lipides ce qui entraîne la destruction rapide de la structure. Le peptide LK<sub>9</sub> (Système 7) conserve sa structure en feuillets  $\beta$  antiparallèles (Fig. III.21) mais ne s'insère pas (Fig. III.23), il reste à l'interface eau/têtes polaires des lipides, comme dans le cas du DMPC.

**(b) Structure secondaire des peptides en hélice  $\alpha$   
et en feuillets  $\beta$  antiparallèles**

Pour suivre la conservation de la structure secondaire, nous avons tracé sur la Figure III.24 les graphes de Ramachandran. Sur ces graphes, on voit très bien que la structure en hélice  $\alpha$  est conservée pour le système 6a mais est perdue dans le système 6b. De plus ce graphe permet de confirmer que le peptide en feuillets  $\beta$  LK<sub>9</sub> conserve sa structure secondaire à environ 70%. En outre, on note que la structure secondaire en feuillet présente les mêmes irrégularités ponctuelles que dans le cas de l'insertion dans le film de DMPC.

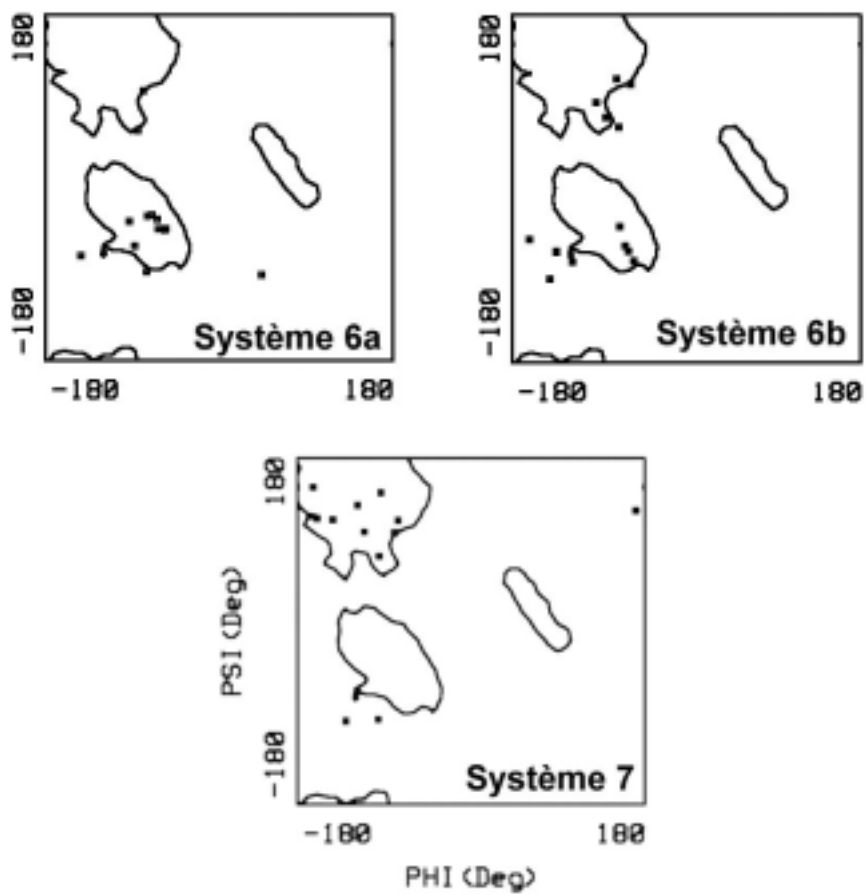
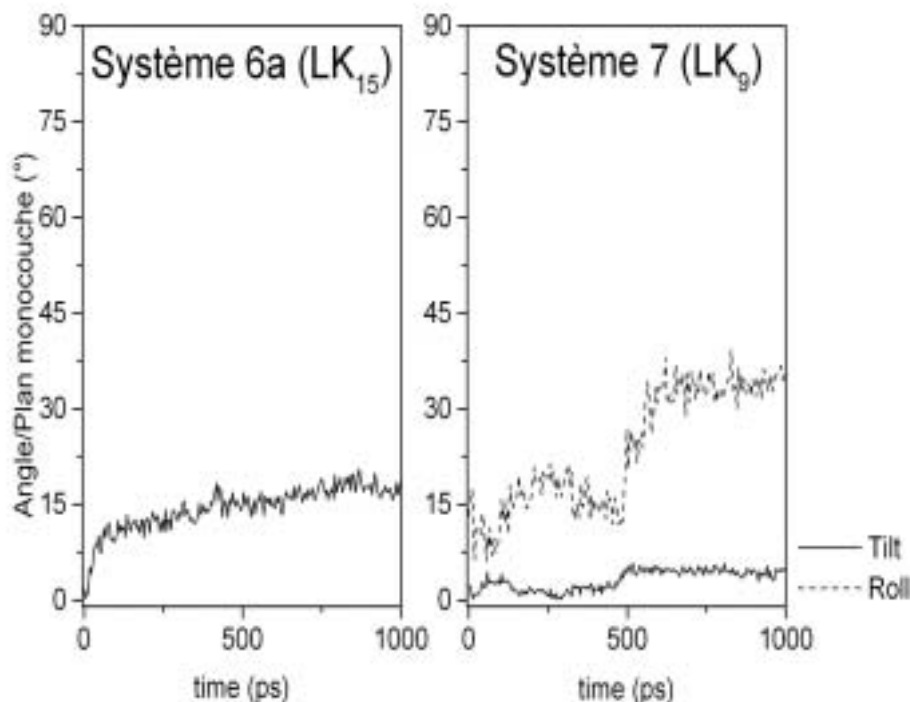


Figure III.24 Graphes de Ramachandran à t=1000 ps des peptides LK<sub>15</sub> et LK<sub>9</sub> dans une monocouche de DMPG.

(c) Orientation



**Figure III.25 Tilt et Roll des peptides  $LK_{15}$  et  $LK_9$  dans des monocouches de DMPC.** Le trait en continu représente l'évolution de l'angle de tilt des peptides en fonction du temps et en pointillé, celle du roll.

Dans cette étude, nous avons utilisé le tilt et le roll défini précédemment (pour les systèmes dans les monocouches de DMPC), nous avons mesuré l'angle de tilt pour les deux structures et l'angle de roll seulement pour le peptide en feuillets  $\beta$ . La structure en hélice du peptide du système 6b étant perdue, aucune mesure d'angle n'a pu être effectuée. Sur les graphes de la Fig. III.25, nous pouvons suivre l'évolution de ces angles au cours du temps. Dans le cas du système 6a, dès les 100 premières ps le peptide  $LK_{15}$  s'incline rapidement puis progresse lentement jusqu'à  $18,7^\circ$  à  $t=1000$  ps et se stabilise.

Quant au feuillet  $\beta$ , les courbes de tilt et de roll présentent deux plateaux, le premier durant les 450 premières ps et le second pour le reste de la simulation. L'angle de tilt n'atteint pas de valeurs élevées ( $1,7 \pm 0,8^\circ$  pour le premier plateau et  $4,4 \pm 0,7^\circ$  pour le second) alors que l'angle de roll atteint  $15,3 \pm 3,5^\circ$  pour le premier plateau et  $32,5 \pm 3,4^\circ$  pour le second. Les valeurs de tilt obtenues pour chaque structure, inférieures à  $30^\circ$ , montrent que l'insertion se fait à plat dans les monocouches de DMPG.

#### **(d) Conclusion**

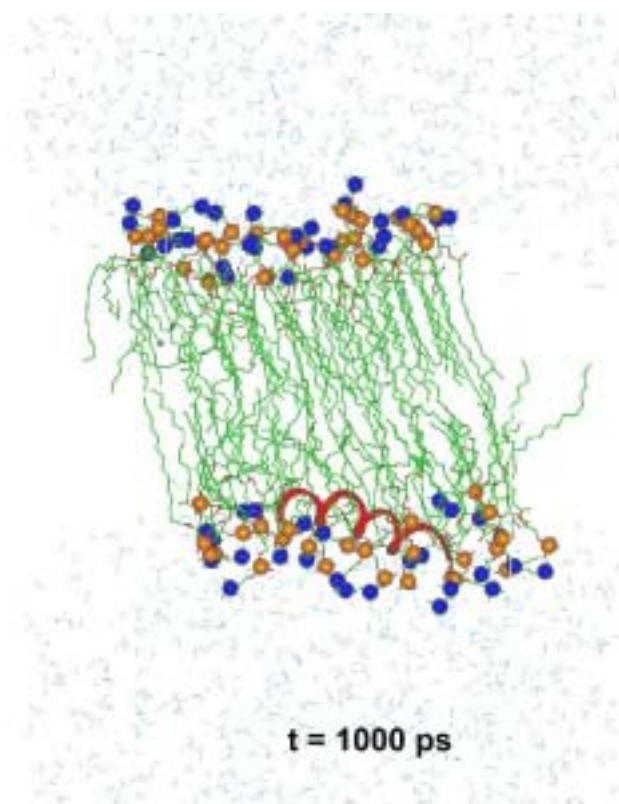
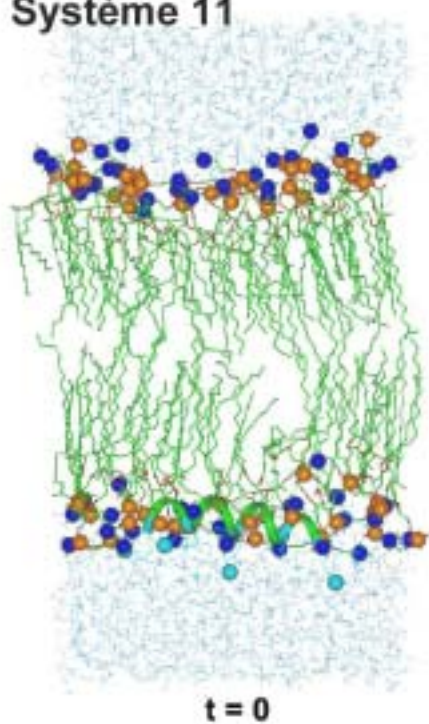
Il apparaît dans tous les cas, au moins dans le temps très court de la dynamique, que l'interaction des Lysines avec les phosphates provoque la destruction instantanée de la structure secondaire. Ceci n'est pas le cas dans le système 6a dans lequel, à cause de l'insertion "inverse", les Lysines enfouies dans les couches hydrophobes échappent au moins momentanément aux interactions et la structure secondaire est conservée. Dans ce cas, il serait particulièrement intéressant de faire des dynamiques plus longues pour observer une destruction de la structure secondaire dans le cas du système 6a ou une restructuration éventuelle dans le cas du système 6b.

### ***(3) Insertion de $LK_{15}$ dans une bicouche de DMPC***

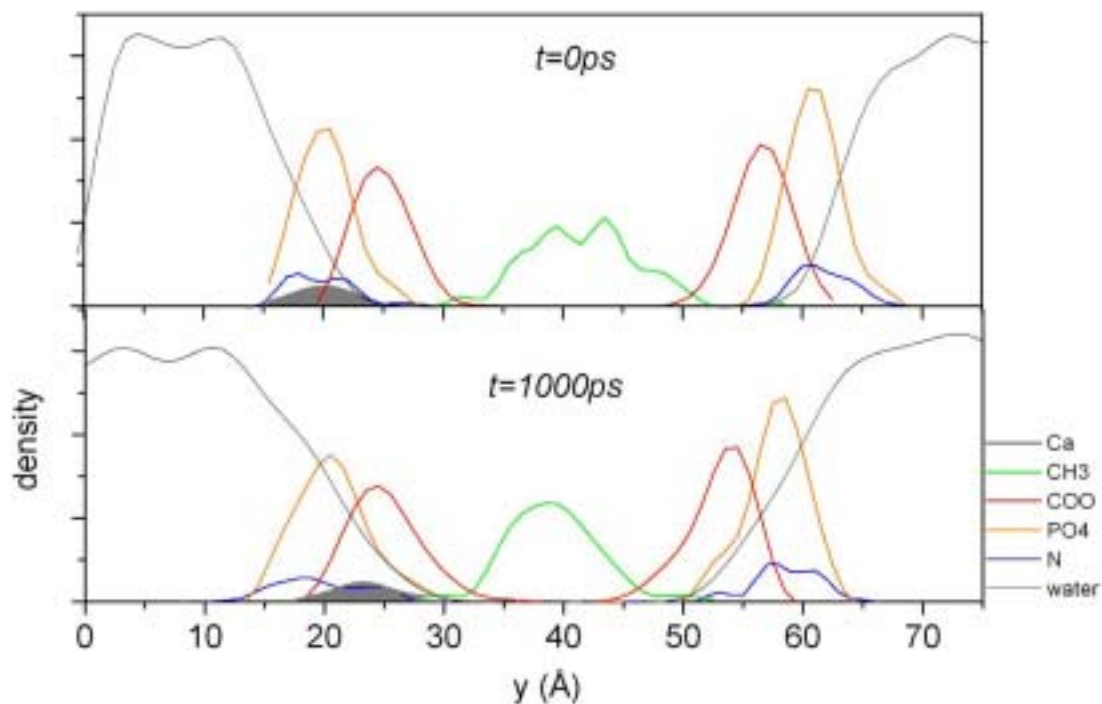
Après avoir étudié, l'insertion dans des monocouches phospholipidiques, nous présentons ici l'étude de l'insertion du peptide  $LK_{15}$  dans un des feuilletts d'une bicouche de DMPC (Système 11). Ce système a été étudié par PMIRRAS et les résultats sont similaires à ceux trouvés pour les monocouches.

(a) Insertion

Système 11



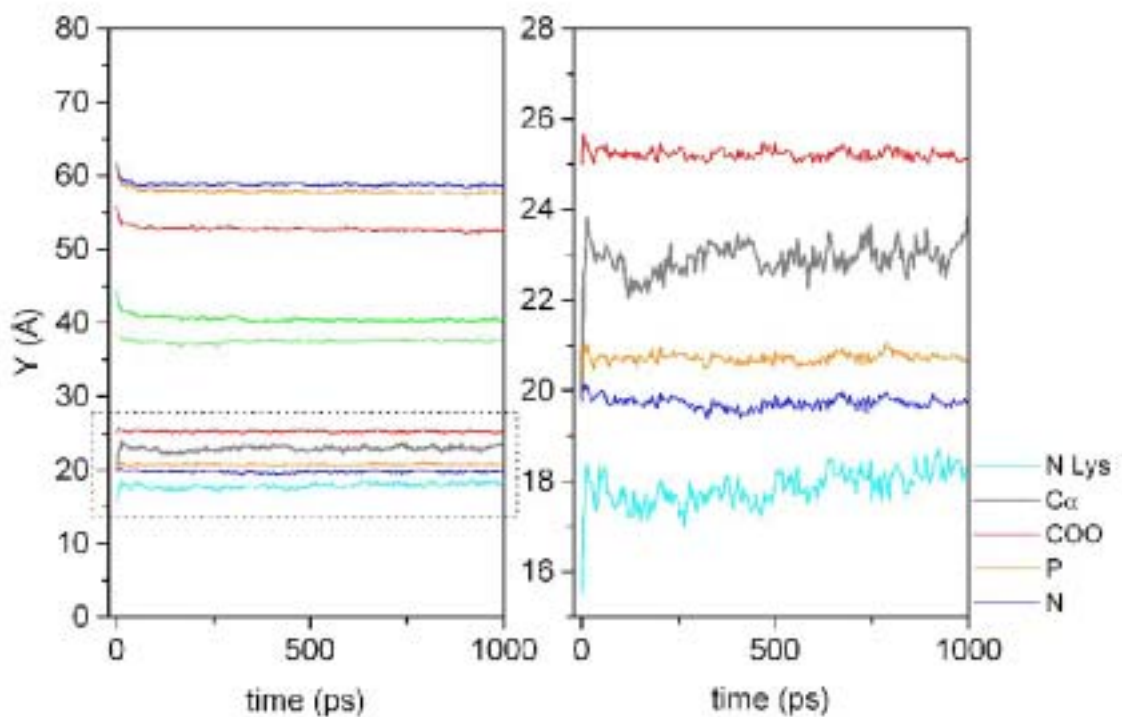
**Figure III.26 Clichés de l'insertion de LK<sub>15</sub> dans la bicouche de DMPC.** La partie polaire de la bicouche est délimitée par les sphères oranges (phosphores) et bleues (azotes des triméthylammoniums) et la partie hydrophobe est colorée en vert. L'eau est représentée en bleu. L'hélice du peptide est colorée initialement en bleu pour sa partie hydrophile et en vert pour sa partie hydrophobe, après la simulation l'hélice est colorée entièrement en rouge.



**Figure III.27 Profil de densité atomique de l'insertion du peptide LK15 dans la bicouche de DMPC à  $t=0$  et  $t=1000$  ps.** La zone grisée représente le peptide, le trait vert la densité des méthyles des bouts de chaînes des lipides, le trait rouge celle des carbonyles des esters des lipides, le trait orange celle des phosphates des lipides, le trait bleu celle des ammoniums des lipides et la densité de l'eau est colorée en noir.

On peut suivre l'évolution du système 11 sur la Fig. III.26 en fonction du temps à  $t=0$  et  $t=1000$  ps et sur les profils de densité atomique Fig. III.27. Sur la la Fig. III.26, on peut voir qu'à  $t=0$ , le peptide est parallèle au plan de la bicouche et qu'au bout de 1000 ps le peptide semble s'être incliné mais a gardé sa structure en hélice  $\alpha$ . Sur la Fig. III.26 et le profil de densité atomique (la Fig. III.27), on note que les méthyles des bouts de chaînes lipidiques se sont rapprochés. Sur ce même profil de densité atomique, le peptide (partie grisée), initialement localisé au niveau de la partie

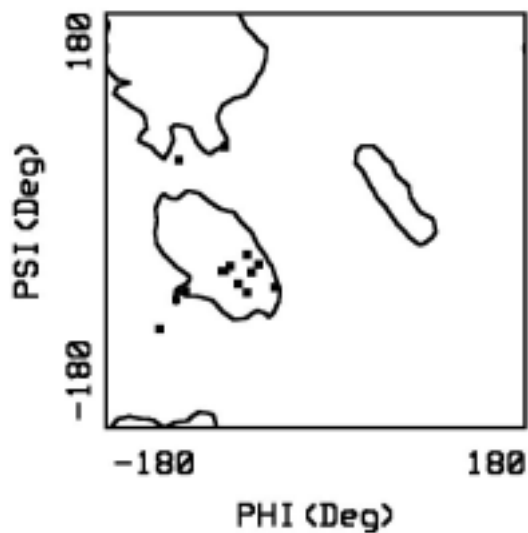
triméthylammonium-phosphate subit un déplacement vers l'intérieur hydrophobe de la couche, de plus on observe que l'ensemble de sa structure est complètement immergé dans l'eau. D'autre part, la profondeur de l'insertion au sein de la bicouche en fonction du temps est présentée sur les graphes de la Fig. III.28.



**Figure III.28 Insertion du peptide LK<sub>15</sub> dans une bicouche de DMPC.** Sur le premier graphe (à gauche), les deux feuillets de la bicouche sont représentés, sur le second graphe (à droite), on a un zoom du feuillet dans lequel se fait l'insertion. La trajectoire des C $\alpha$  du peptide est colorée en gris, celle des ammoniums des Lysines en bleu clair, celle des phosphores des DMPC en orange, celle des ammoniums des DMPC en bleu, celle des carbonyles des esters en rouge, et celle des méthyles des bouts de chaînes des DMPC en vert.

Sur cette figure, on note que l'insertion est immédiate (quelques dizaines de ps), que le peptide perturbe la tête polaire au delà des phosphates des lipides et que les Lysines du peptides restent globalement dans le milieu aqueux. Cependant durant les 250 dernières ps, la trajectoire des Lysines semble légèrement se rapprocher des têtes polaires phospholipidiques. L'insertion du peptide est d'environ 4 Å (la Fig. III.28). Il faut souligner que l'épaisseur de la bicouche phospholipidique diminue (~3 à 4 Å). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'insertion du peptide crée une cavité qui est comblée par les lipides de l'autre feuillet.

(b) Structure secondaire



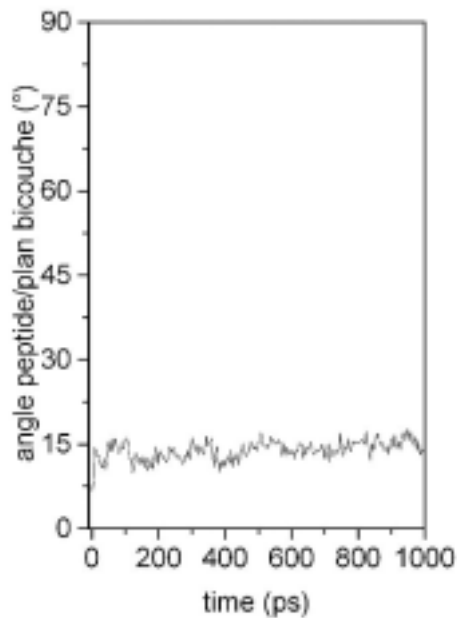
**Figure III.29** Graphe de Ramachandran à  $t=1000$  ps du peptide  $LK_{15}$  dans la bicouche de DMPC.

La Fig. III.26 montre que la structure en hélice  $\alpha$  est globalement conservée. Ceci est confirmé par le graphe de Ramachandran (Figure III.29) dans lequel on compte un taux de 75 % de conservation de l'hélice. Etant donné que cette structure en hélice  $\alpha$  est conservée au long de la simulation, on peut suivre l'évolution de l'angle de tilt du



peptide en fonction du temps et ainsi déterminer approximativement l'orientation de l'insertion.

(c) Orientation



**Figure III.30 Tilt du peptide LK<sub>15</sub> dans la bicouche de DMPC.**

La Figure III.30 montre l'évolution de l'angle de tilt du peptide en fonction du temps. L'analyse de ce graphe permet d'observer que le peptide s'incline en même temps qu'il s'insère (quelques dizaines de ps) puis atteint une valeur stable ( $14,0 \pm 1,5^\circ$ ) qu'il conserve jusqu'à la fin de la simulation. L'évolution de cet angle en fonction du temps est homogène avec l'évolution de la trajectoire des C $\alpha$  du peptide.

#### (d) Conclusion

Avec cette nouvelle étude d'insertion de peptide dans une bicouche de DMPC, nous avons observé un amincissement de la bicouche, qui a déjà observé dans l'étude des monocouches et dans l'étude de Benoît Roux *et al.* (Bernèche, 1998) qui durant une simulation par dynamique moléculaire de la mélittine dans une bicouche de DMPC trouvaient que le coeur hydrophobe de la membrane est réduite d'environ 30% de son épaisseur initiale. En revanche il est évident encore une fois qu'une durée de simulation plus grande permettrait peut-être de voir d'autres phénomènes intéressants.

#### **b) Insertion de peptides diblocs ou primaires L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> et L<sub>8</sub>K<sub>4</sub>**

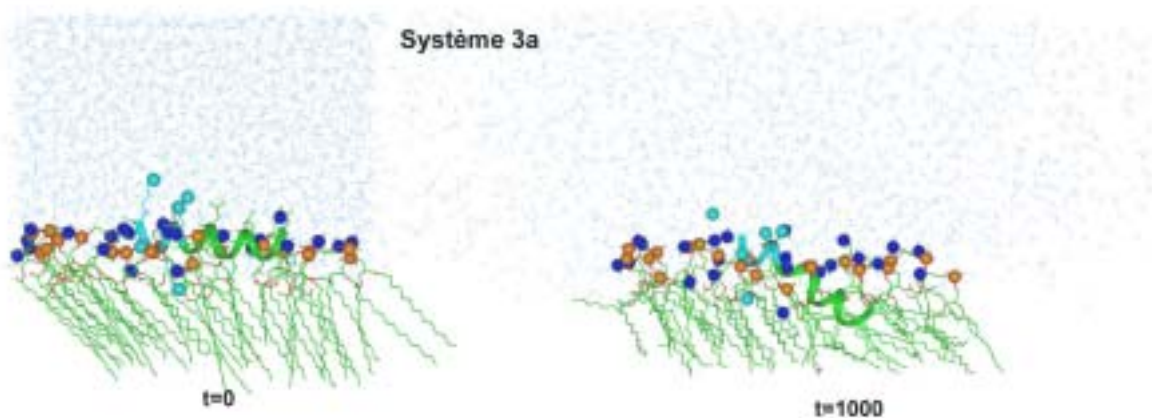
Dans le cas des peptides amphipathiques primaires, trois types d'études ont été menées. Les systèmes étudiés sont rappelés ci-dessous :

- un peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans des monocouches de DMPC ( $A = 80 \text{ \AA}^2$ ) : système 3a;
- -un peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans des monocouches de DMPC ( $A = 62 \text{ \AA}^2$ ) : système 3b;
- un peptide L<sub>8</sub>K<sub>4</sub> dans une monocouche de DMPC : système 4;
- un peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans une monocouche de DMPG : système 8;
- un peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans une monocouche de DSPC : système 5.

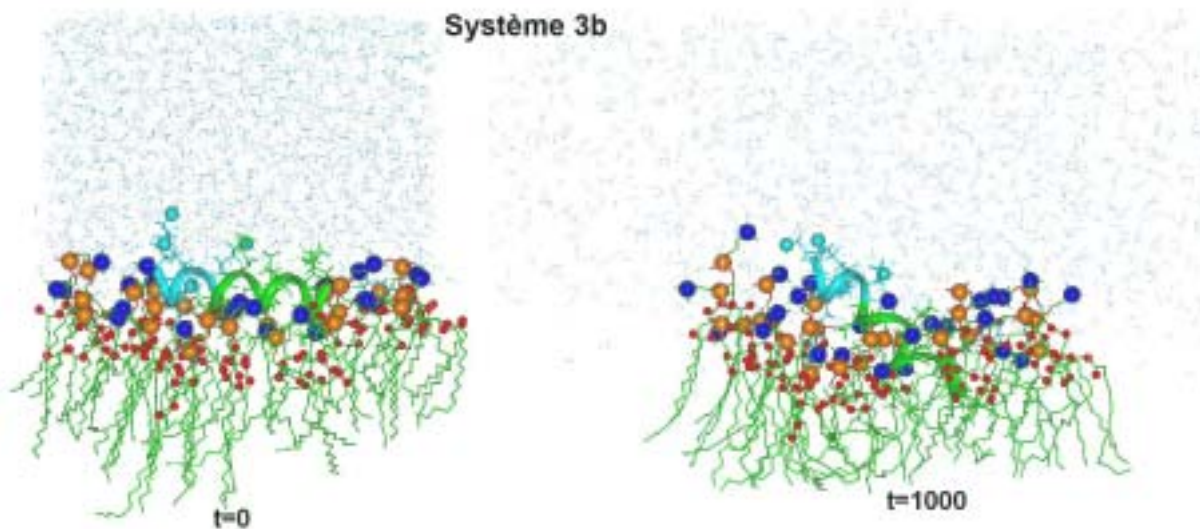
Pour étudier l'influence de la pression latérale exercée par une monocouche lipidique sur la structure secondaire des peptides, deux aires spécifiques d'une monocouche de DMPC ont été utilisées. Ainsi pour simuler une faible pression latérale, nous avons utilisé une monocouche d'aire  $A = 80 \text{ \AA}^2$ , système 3a, et pour la forte pression latérale, une monocouche d'aire  $A \sim 62 \text{ \AA}^2$  qui est la valeur standard pour les bicouches de DMPC, Systèmes 3b et 4. Une monocouche phospholipidique chargée négativement de DMPG d'aire standard ( $A = 58,8 \text{ \AA}^2$ ) a été utilisée pour étudier l'influence de la

nature des têtes polaires sur l'insertion du peptide en hélice  $\alpha$  L<sub>10</sub>K<sub>5</sub>, Système 8. La troisième étude concerne, l'influence de la longueur des chaînes hydrocarbonées des phospholipides, dans ce cas un film de phospholipides de DSPC (18 : 0) a été utilisé, Système 5.

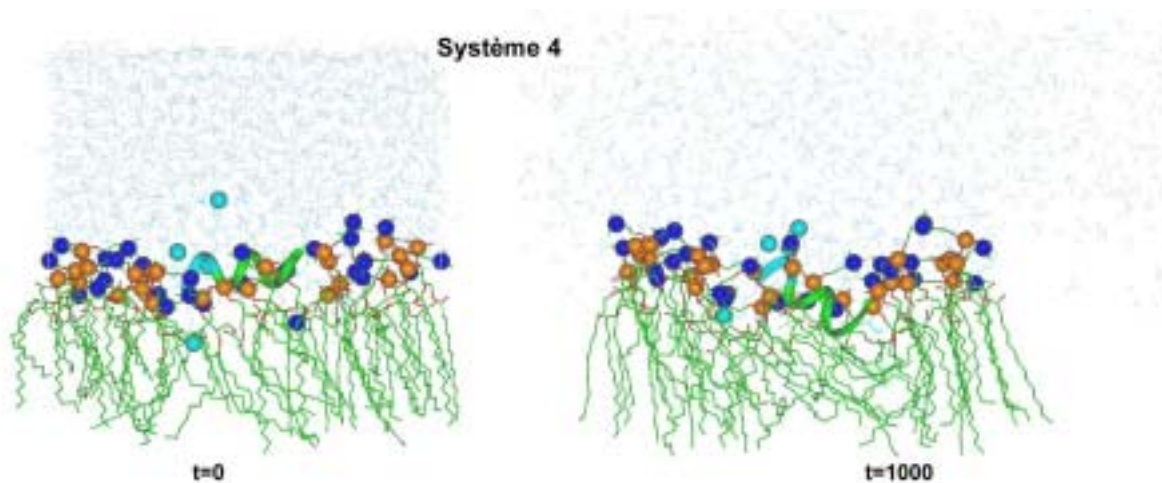
### *(1) Présentation des systèmes*



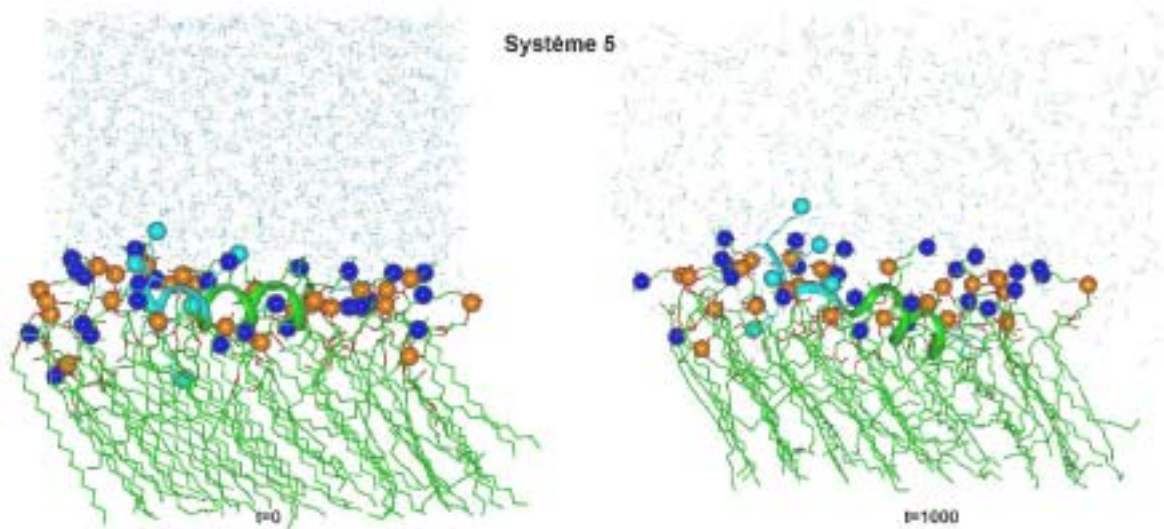
**Figure III.31 Clichés de l'insertion du peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> d'une monocouche de DMPC ( $A=80 \text{ \AA}^2$ ).** La partie polaire du film est délimitée par les sphères oranges (phosphores) et bleues (azotes des triméthylammoniums) et la partie hydrophobe est colorée en vert. L'eau est représentée en bleu. La zone hydrophile du peptide est colorée en bleu clair, les sphères représentent les ammoniums des lysines, la zone hydrophobe est colorée en vert.



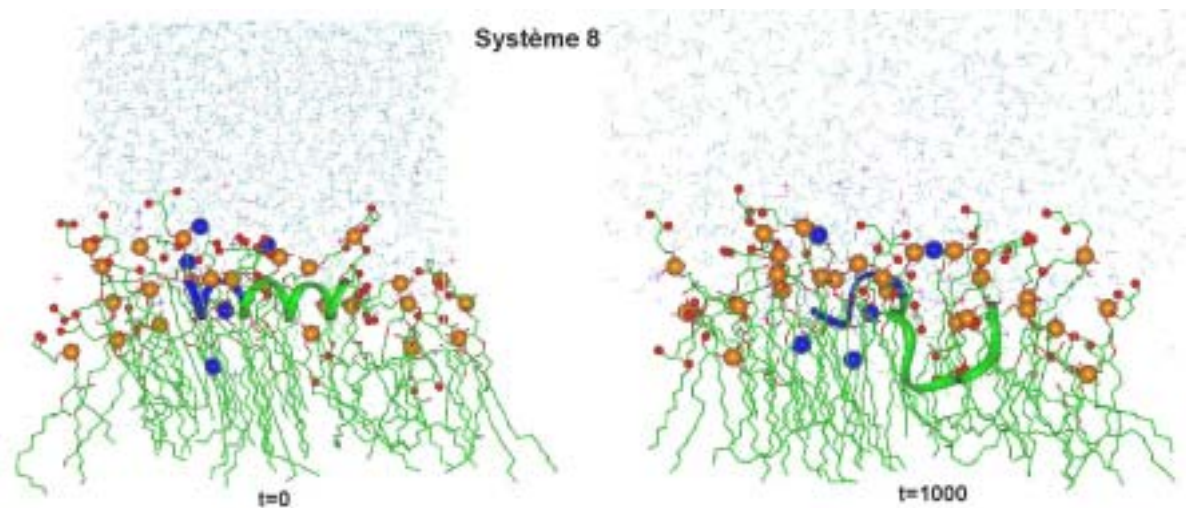
**Figure III.32** Clichés de l'insertion du peptide  $L_{10}K_5$  d'une monocouche de DMPC ( $A=62 \text{ \AA}^2$ ). On a utilisé le code couleur de la Figure III.31.



**Figure III.33** Clichés de l'insertion du peptide  $L_8K_4$  d'une monocouche de DMPC. On a utilisé le code couleur de la Figure III.31.



**Figure III.34** Clichés de l'insertion du peptide  $L_{10}K_5$  d'une monocouche de DSPC. On a utilisé le code couleur de la Figure III.31.

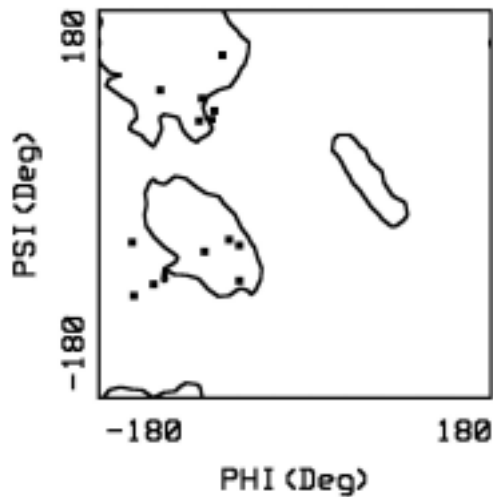


**Figure III.35** Clichés de l'insertion du peptide  $L_{10}K_5$  d'une monocouche de DMPG. On a utilisé le code couleur de la Figure III.31 avec les hydroxyles représentés par des sphères rouges.

Les images (Fig. III.31 à III.35) décrivent les systèmes à  $t=0$  et  $t=1000$  ps. On observe que la partie des peptides qui s'insèrent majoritairement dans les différentes monocouches est la partie lipophile (en vert) et que l'angle de tilt de ces peptides semble supérieur à celui des peptides amphipathiques secondaires. De plus, ces images montrent que la structure secondaire en hélice  $\alpha$  est globalement conservée dans les monocouches zwitterioniques mais que le résultat est totalement différent dans la monocouche chargée de DMPG. En effet dans cette couche de DMPG, la structure secondaire en hélice est perdue et les lipides semblent fortement perturbés. Cependant, on remarque que la partie lipophile du peptide s'insère profondément dans cette couche.

## ***(2) Structure secondaire***

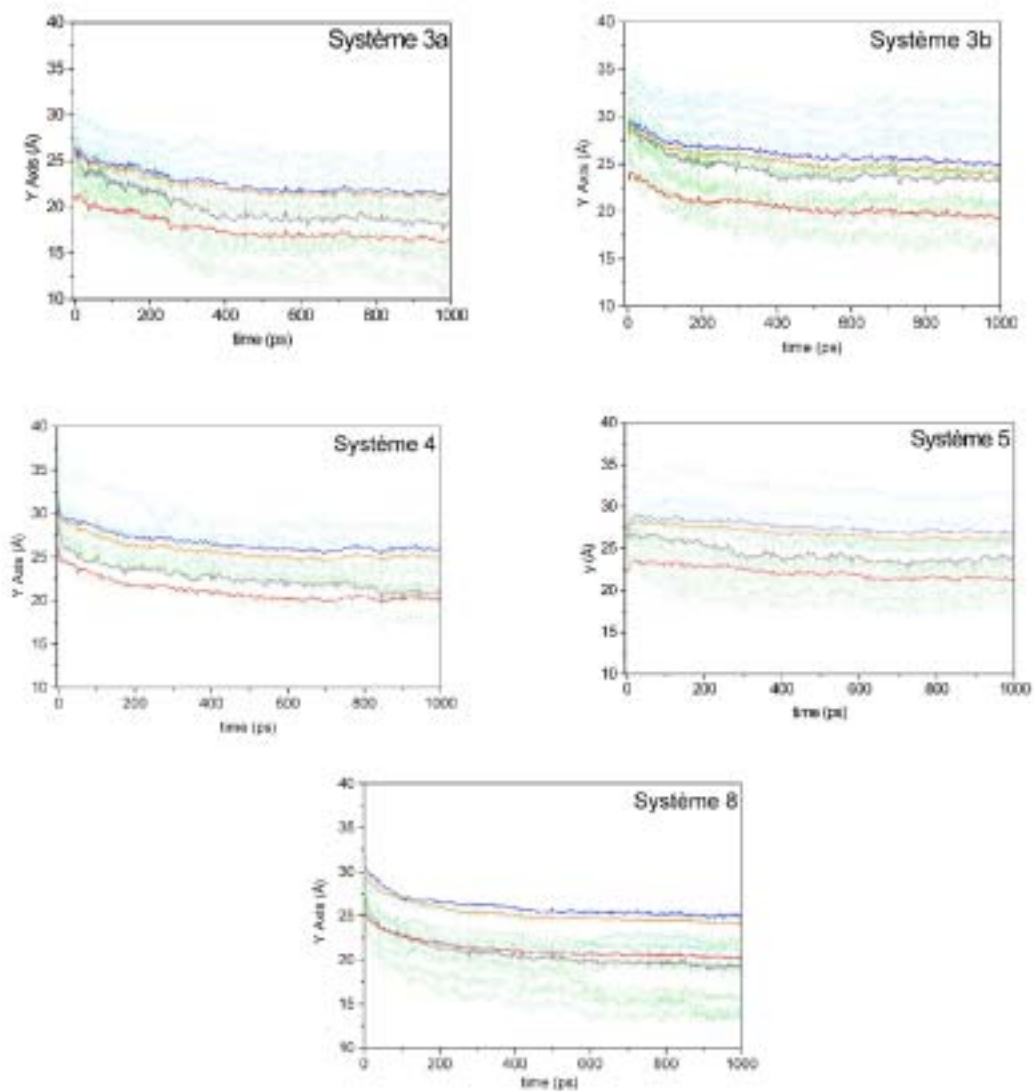
Le graphe de Ramachandran pour le système 8 (Figure III.36) permet de vérifier la perte de la structure secondaire en hélice du peptide  $L_{10}K_5$  en insertion dans une monocouche chargée de DMPG. Ce graphe permet de voir qu'au bout de 1 ns de simulation le peptide  $L_{10}K_5$ , garde sa structure en hélice  $\alpha$  pour environ 30%, en feuillet  $\beta$  (d'environ 46%) et aléatoirement (le reste). Ceci est la conséquence de la nature des lipides composant la monocouche puisque pour les deux couches zwitterioniques DSPC et DMPC, la structure en hélice est parfaitement conservée durant les simulations. Toutefois, malgré la non-conservation de la structure secondaire, le peptide semble s'insérer dans le film chargé négativement et fortement perturber les lipides de DMPG. De plus il n'est pas interdit de penser que la structure en hélice se reformerait lentement sur des échelles de temps qui nous sont malheureusement inaccessibles.



**Figure III.36** Graphe de Ramachandran du peptide  $L_{10}K_5$  inséré dans une monocouche de DMPG.

### *(3) Insertion*

L'évolution de l'insertion des peptides  $L_{10}K_5$  et  $L_8K_4$  dans les trois couches différentes est suivie sur les graphes de la Fig. III.37. L'insertion semble évoluer très lentement dans la monocouche de DSPC alors qu'elle semble ne plus évoluer après 250 ps pour la monocouche de DMPG et de DMPC pour les deux peptides  $L_{10}K_5$  et  $L_8K_4$ . Sur ces courbes, on peut évaluer la profondeur d'insertion des peptides dans les monocouches. On rappelle que, initialement, le barycentre des  $C\alpha$  des peptides est superposé au barycentre des phosphores des lipides de la monocouche utilisée. En fin de simulation on obtient les valeurs de profondeur d'insertion suivantes : 2,0 Å (Système 3a), 0,5 Å (Système 3b), 2,0 Å (Système 4) et 5,2 Å (Système 8). De plus les deux peptides semblent perturber essentiellement la zone polaire phosphore-carbonyles des esters des couches zwitterioniques alors que le peptide  $L_{10}K_5$  s'enfonce au delà des carbonyles des esters de la couche lipidique de DMPG.

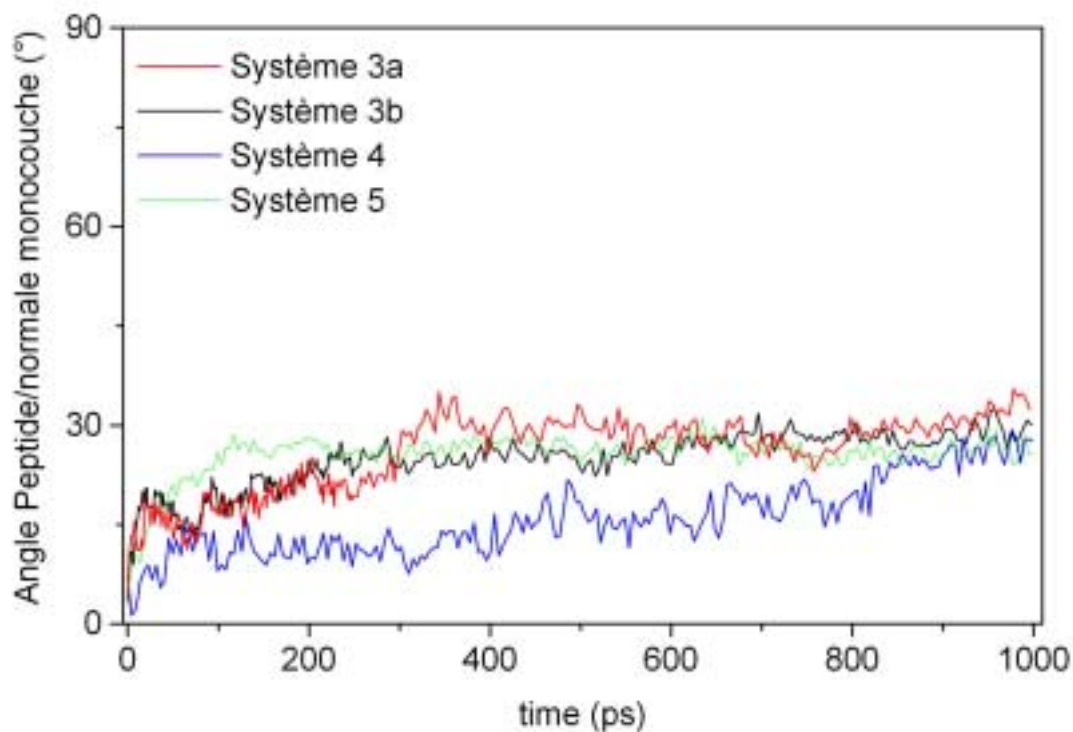


**Figure III.37 Insertion des peptides  $L_{10}K_5$  et  $L_8K_4$ .** La trajectoire du barycentre des  $C\alpha$  du peptide est colorée en gris, celles des  $C\alpha$  des Lysines en trait pointillé bleu, celles des  $C\alpha$  des Leucines en trait pointillé vert. Les trajectoires de la tête polaire des lipides sont représentées en orange (phosphore), en bleu (ammonium du DMPC ou hydroxyle du DMPG), en rouge (carbonyles des esters).



#### **(4) Orientation**

Nous avons mesuré l'angle de tilt pour évaluer l'orientation de ces peptides dans des films lipidiques. Cet angle (Figure III.38) nous permet de suivre l'orientation du peptide durant la simulation excepté pour le système 8 pour lequel aucun vecteur du peptide n'a pu être défini car la structure secondaire en hélice n'est pas conservée. On observe sur ce graphe (Figure III.38) que, quel que soit la longueur du peptide et/ou la longueur des chaînes acyles des lipides, la valeur de l'angle de tilt est la même en fin de simulation soit environ  $30^\circ$  ( $30,1^\circ$  (3b),  $27,6^\circ$  (4) et  $25,9^\circ$  (5)). De plus de 850 ps à 1000 ps, les courbes semblent avoir atteint un plateau. La comparaison entre les systèmes 3a et 3b montrent que dans le cas d'une surface lipidique plus importante mimant une basse pression latérale, le peptide s'incline plus rapidement, conséquence d'un plus grand nombre de degrés de liberté. Le peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> en insertion dans un film de lipides à chaînes longues (système 5) s'incline rapidement et au bout de 250 ps il a déjà atteint sa valeur finale. Les autres courbes évoluent plus lentement.



**Figure III.38** Angle de tilt des peptides amphipathiques primaires dans les couches zwitterioniques.

### *(5) Conclusion*

Les résultats de PMIRRAS (Castano, 1998) ont montré que le seuil de transition de la structure secondaire en fonction de la longueur se situe pour cette série de peptides amphipathiques primaires à 12 résidus. "Cette longueur correspond à 8 Leu suivis de 4 Lys qui ont sûrement tendance à stabiliser des feuillettes par répulsion électrostatique". De plus, ils ont montré que "le peptide  $L_{10}K_5$  adoptait une

orientation plus oblique lors de son insertion dans un film de DMPC avec un angle d'environ 20° par rapport à l'interface". Nos valeurs de tilt corroborent les données spectroscopiques. Cependant nous ne pouvons pas observer la transition de structure secondaire car nos systèmes n'engagent qu'un peptide à la fois.

#### 4. Interaction d'un peptide naturel, la temporine A avec des monocouches modèles

##### a) La Temporine A, peptide lytique naturel

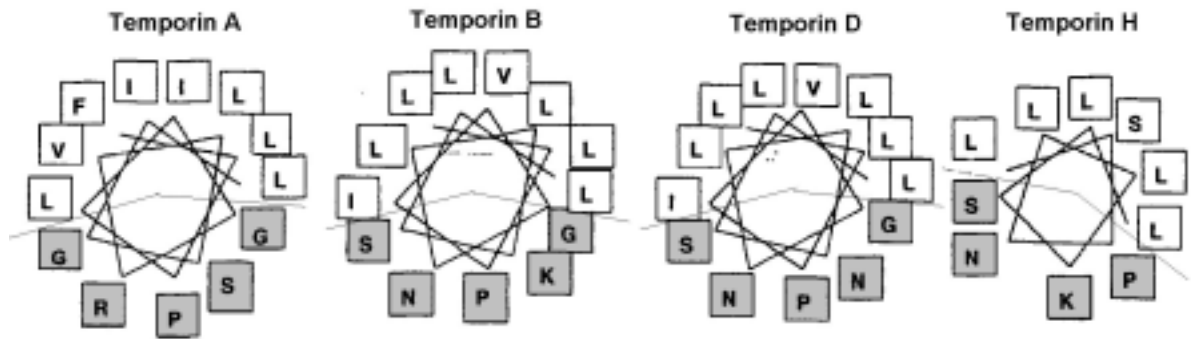


Figure III.39 Roues de Schiffer-Edmunson des temporines. (Mangoni, 2000) La partie grisée représente les résidus hydrophiles.

Les temporines (temporines A-G, H, K, L) sont un groupe de 10 petits peptides hydrophobes basiques qui portent toutes une fonction amide sur le C<sub>term</sub> (13 acides aminés, charge nette à pH7 = +1, +2). Ils ont été isolés de la peau de la grenouille européenne rouge *Rana temporaria* (Simmaco, 1996). Ils font partie des plus petits peptides antibactériens qui ont été isolés du règne animal et ne sont pas toxiques pour les globules rouges de l'être humain. Le faible nombre de charges positives (+1, +2)

des temporines entraîne une perte de sélectivité. Bien que les temporines ne contiennent que 13 résidus avec une exception pour la temporine H qui est constituée de 10 résidus, des études de dichroïsme circulaire indiquent que ces molécules adoptent une structure en hélice  $\alpha$  dans un environnement hydrophobe (Mangoni, 2000). De plus les projections des hélices  $\alpha$  de ces peptides sur la roue de Schiffer-Edmunson (Schiffer, 1967) montrent un caractère amphipathique prononcé (Figure III.389). Leur activité lytique et leur mécanisme d'action ont été étudiés par dichroïsme circulaire et perméabilisation de membrane (Harjunpää, 1999, Mangoni, 2000). Les études de perméabilisation de vésicules de lipides ont démontré que l'activité lytique des temporines A, B, D et H n'est pas affectée par la composition des membranes ce qui n'est pas le cas des magainines (Matsuzaki, 1997) et d'autres peptides antimicrobiens (Oren, 1996), qui présentent une plus faible affinité vis-à-vis des membranes composées de lipides zwitterioniques que des lipides chargés. De plus les temporines A et B permettent de libérer les grosses molécules des cellules bactériennes. La temporine A (FLPLIGRVLSGIL-NH<sub>2</sub>) a été synthétisée en phase solide par la méthode Fmoc (Harjunpää, 1999, Mangoni, 2000). Parmi les nombreux peptides antibactériens isolés à partir des insectes, la temporine A est dix fois moins lytique que la mélittine mais cent fois plus que la Cécropine A (Boman, 1995, Simmaco, 1996).

### **b) Insertion de la temporine A dans des monocouches de DMPC et de DMPG**

Des études de PMIRRAS actuellement en cours semblent montrer que l'orientation de la temporine A, structurée en hélice  $\alpha$ , est différente à l'interface eau/monocouche lipidique chargée négativement ou monocouche non chargée. Pour essayer de comprendre cette différence, nous proposons dans ce chapitre de placer la temporine

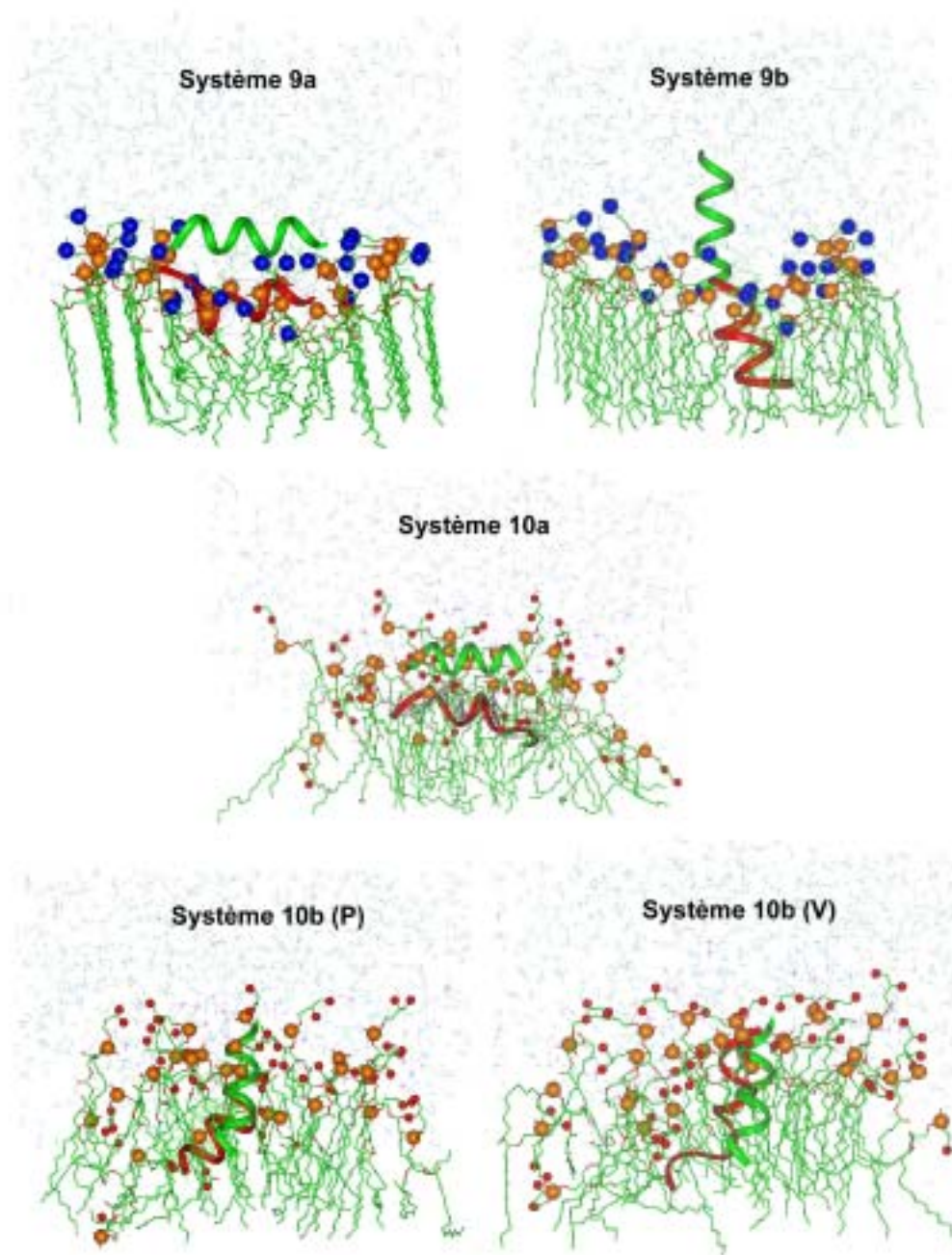
A à l'interface d'un film de DMPC ou d'un film de DMPG. Deux situations seront simulées : le peptide sera placé parallèlement ou perpendiculairement à la normale à la monocouche. D'autre part pour éliminer tout artefact dû aux calculs des dynamiques à pression constante, une simulation à volume constant sera effectuée dans le cas de la monocouche chargée négativement. Nous avons construit quatre systèmes dans lesquels l'axe de l'hélice de la temporine A est placée soit :

- parallèlement au plan d'une monocouche de DMPC : système 9a;
- perpendiculairement au plan d'une monocouche de DMPC : système 9b;
- parallèlement au plan d'une monocouche de DMPG : système 10a;
- perpendiculairement au plan d'une monocouche de DMPG : système 10b.

Les systèmes 9a et 9b sont dynamisés à pression constante pendant 1 ns, le système 10a est dynamisé à pression constante pendant 1,6 ns et le système 10b est dynamisé à pression et à volume constants pendant 1 ns pour chaque simulation.

### **c) Présentation des systèmes**

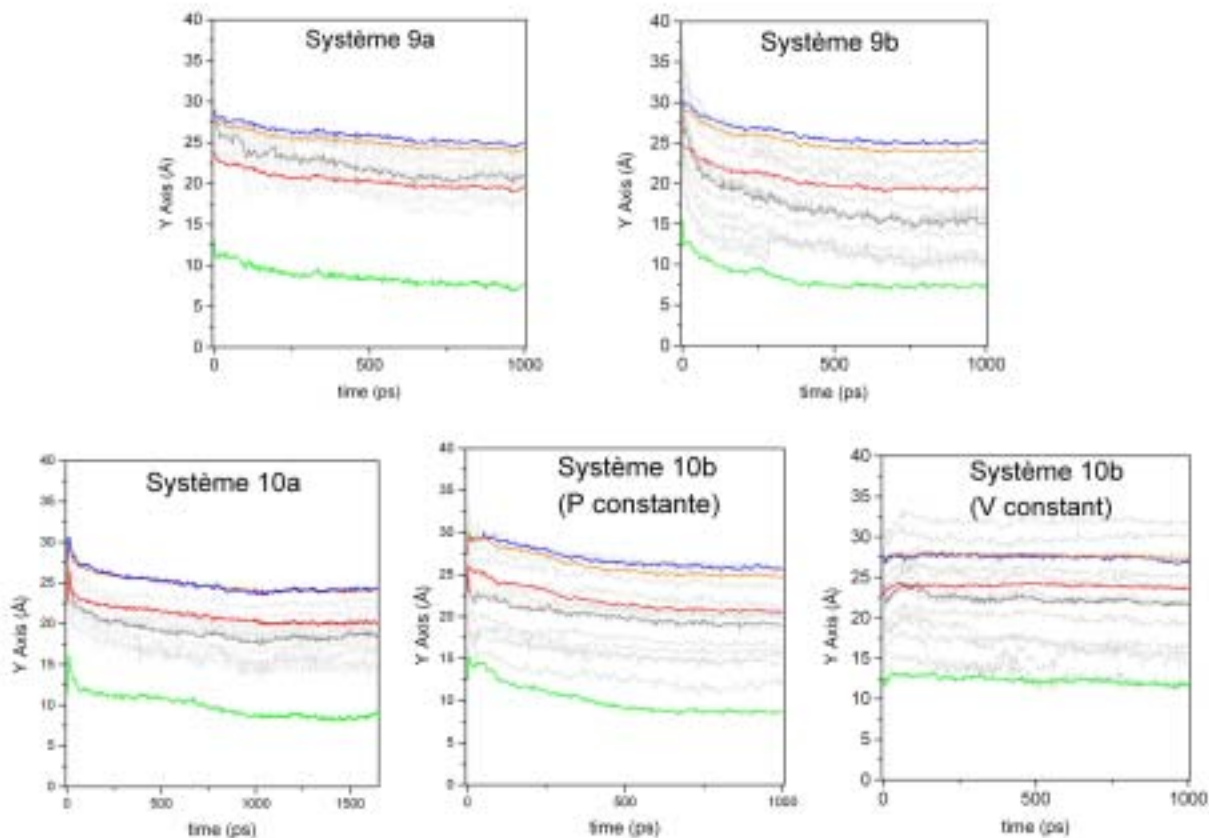
Sur les images de la Fig. III.40 sont présentés les clichés des cinq simulations. L'hélice de la temporine A a été colorée en vert à  $t=0$  et en rouge en fin de simulation. Les monocouches sont représentées en fin de simulation. On remarque que, dans tous les systèmes, la position finale est très peu différente de la position initiale, excepté pour le système 9b, et que la structure secondaire en hélice  $\alpha$  est globalement conservée. D'autre part, la couche de DMPG semble perturbée par la Temporine A. Toutefois, on ne note aucune différence d'insertion quelle que soit la tête lipidique mais la temporine A semble perturber la zone des têtes polaires.



**Figure III.40** Clichés de l'insertion de la temporine A dans les monocouches de DMPC et de DMPG. La partie polaire des lipides est délimitée par les sphères oranges (phosphores), les sphères bleues (ammoniums du DMPC), les sphères rouges (hydroxyles du DMPG) et la partie hydrophobe est colorée en vert. L'hélice est représentée en vert à  $t=0$  et en rouge en fin de simulation.

#### **d) Insertion**

Pour évaluer la profondeur de l'insertion du peptide dans les différents systèmes, nous avons tracé les trajectoires des C $\alpha$  et de la tête polaire des lipides pendant la simulation. Ainsi, on peut suivre l'insertion du peptide dans les films phospholipidiques sur les graphes de la Figure III.41. Initialement, le barycentre des C $\alpha$  du peptide est superposé au barycentre des phosphores des lipides de la monocouche à l'exception du système 10a pour lequel le peptide est en dessous du barycentre des phosphores (environ 3 Å). Nous tenons compte de cette différence pour interpréter la profondeur de l'insertion en fin de simulation. A l'exception du système 9a, cas de la monocouche zwitterionique avec la temporine en position horizontale, toutes les trajectoires des C $\alpha$  du peptide se trouvent en dessous des têtes polaires et des carbonyles des esters des lipides. Dans le système 9a, le barycentre des C $\alpha$  du peptide reste entre les phosphores et les carbonyles des esters des DMPC. Dans ce cas, l'insertion est d'environ 3,3 Å, pour la même monocouche avec la temporine verticale, elle est de 8,6 Å. Pour les monocouches chargées de DMPG, l'insertion est d'environ 5,7 Å pour le système 10a, 2,8 Å pour le système 10b à pression constante et 2,6 Å à volume constant. Pour le système 10b, la différence d'insertion est négligeable suivant l'ensemble utilisé pour effectuer la dynamique (microcanonique ou NPT).



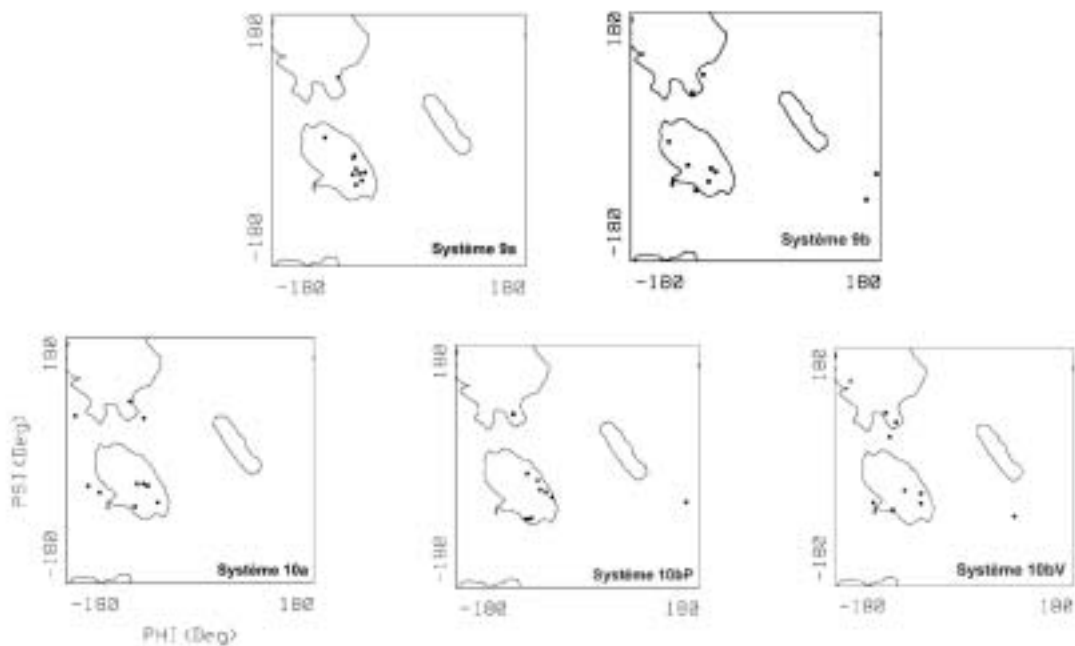
**Figure III.41 Insertion de la temporine A dans les monocouches de DMPC et DMPG.** La trajectoire du barycentre des C $\beta$  du peptide est représentée en trait plein gris et celles des C $\alpha$  des résidus sont représentées en pointillé gris. La trajectoire des phosphores est représentée en orange, celles des ammoniums du DMPC et des hydroxyles du DMPG en bleu, celle des carbonyles des esters en rouge et celle des méthyles en vert.

Globalement pour tous les systèmes les trajectoires des C $\alpha$  des résidus du peptide (Figure III.41 en pointillé gris clair) montrent que le peptide est entièrement immergé dans les têtes polaires de la monocouche à l'exception du système 10b. Ce phénomène d'immersion est immédiat dans le cas des systèmes 9a et 10a et est complet au bout de



250 ps dans le cas du système 9b. Le système 10b est différent selon le mode de dynamique utilisée. En effet, on observe un microcomportement différent suivant les deux modes de dynamique avec des formes de courbes très différentes (Figure III.41) : quand on utilise le mode à pression constante, le peptide est presque totalement immergé mais les résidus Phe<sup>1</sup> et Leu<sup>2</sup> restent au niveau des phosphates et des glycérols ; quand on utilise le mode à volume constant, ces deux résidus Phe<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup> restent largement dans le milieu aqueux sans pénétrer les têtes polaires. Dans le cas où la temporine A est verticale, il peut être intéressant de regarder la position des résidus par rapport aux méthyles des bouts de chaînes : seul le résidu du C<sub>term</sub>, Leu<sup>13</sup>, du peptide du système 10b à volume constant perturbe cette zone hydrophobe. Dans ce cas le peptide semble plus long (environ 20 Å) que son homologue à pression constante (environ 13 Å), ceci est dû à une perte de structure de la partie C<sub>term</sub>.

### e) Structure secondaire

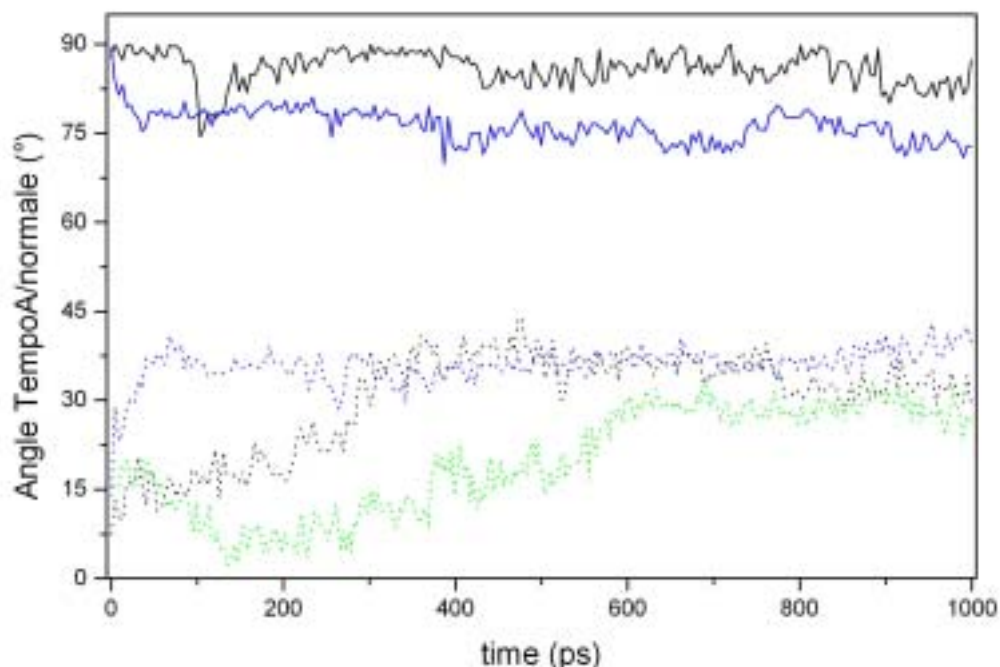


**Figure III.42 Graphes de Ramachandran de la temporine A en insertion dans des monocouches de DMPC et de DMPG.**

Les graphes de Ramachandran (Fig. III.42) montrent que la structure secondaire est globalement conservée pour les systèmes 9a et 10b à pression constante alors qu'elle n'est conservée qu'à moitié pour les trois autres cas, systèmes 9b, 10a et 10b à volume constant. L'autre moitié de la structure secondaire en hélice non conservée, systèmes 9b et 10a, se partage entre la région des feuillets  $\beta$  et des structures désordonnées.

### **f) Orientation**

Sur le graphe de la Figure III.43, on peut suivre les angles de tilt de l'axe de l'hélice du peptide par rapport à la normale à la couche en fonction du temps. On remarque que quelque soit la composition lipidique de la monocouche les valeurs finales de tilt ne dépendent que de la position initiale du peptide. Ainsi on note que l'hélice du peptide reste quasiment perpendiculaire à la normale au plan de la monocouche pour les systèmes 9a et 10a, alors qu'elle s'incline d'environ  $30^\circ$  par rapport à la normale à la couche dans les systèmes 9b et 10b.



**Figure III.43 Angles de tilt en fonction du temps de la temporine A en insertion dans des monocouches de DMPC ou de DMPG.** Le système 9a est en trait continu, le système 9b en trait pointillé noir, le système 10a en trait continu bleu, le système 10b à pression constante en trait pointillé bleu et le système 10b à V constant en pointillé vert.

### g) Conclusion

Un temps de simulation plus long permettrait sans doute de voir d'autres phénomènes tels que une réorientation éventuelle du peptide ou l'influence du peptide sur les lipides de DMPG. De plus, bien que l'axe de l'hélice de la temporine ne privilégie aucune position quelle que soit la monocouche chargée ou zwitterionique, on note une différence majeure due à l'influence de l'espèce phospholipidique utilisée : la structure secondaire en hélice semble plus stable quand son axe est parallèle au plan

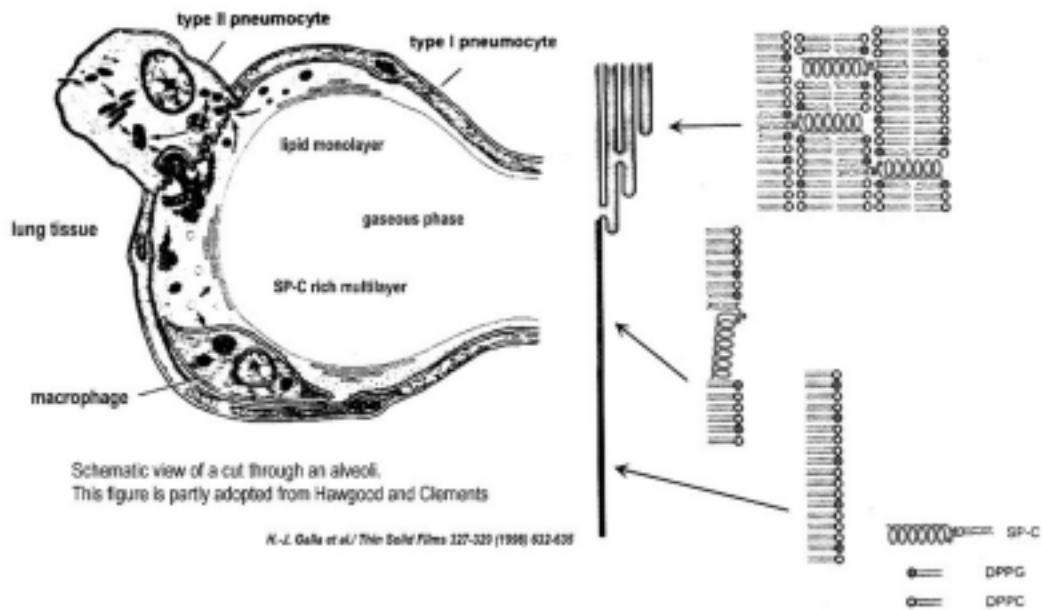
de la monocouche zwitterionique de DMPC, système 9a, et perpendiculaire à ce plan de la monocouche chargée de DMPG, système 10b à pression constante. L'insertion de la temporine semble se faire à plat dans la monocouche de DMPC (environ  $86^\circ$  par rapport à la normale à la couche c'est à dire un angle bien inférieur à  $30^\circ$  par rapport au plan de la couche) comme les peptides amphipathiques de la série minimaliste LiKj étudiée précédemment. De plus en se basant sur l'hypothèse que les peptides lytiques conserveraient leur structure secondaire lors de l'insertion dans les membranes, le système le plus favorable à l'insertion de la temporine dans la monocouche chargée serait celui dans lequel l'axe de l'hélice est placé perpendiculairement au plan à la monocouche chargée. De plus il semble que les lipides réagissent à la présence de la temporine A mais que le peptide reste insensible au milieu (chargé ou non chargé).

## B. Etude dynamique de l'orientation de la protéine SP-C

### 1. La protéine SP-C du surfactant pulmonaire

On ne peut pas étudier le surfactant pulmonaire sans citer A. Clements qui est le pionnier de l'étude du surfactant pulmonaire. Il a écrit une revue dans *Journal Annual Review of Physiology* en 1997 (Clements, 1997) sur une réflexion personnelle à ce sujet.

Qu'est-ce que le surfactant pulmonaire? Le surfactant pulmonaire constitue l'interface air/eau des alvéoles pulmonaires.







**Figure III.44 Représentation schématique du surfactant pulmonaire.** A gauche, représentation schématique d'une coupe d'alvéole pulmonaire, à droite, représentation du surfactant pulmonaire, la monocouche suivie de l'empilement de bicouches et protéine SP-C insérée (Galla, 1998).

Il est composé d'une monocouche lipidique suivi d'un empilement de bicouches (Figure III.44), il contient approximativement 90 % de lipides pour 10 % de protéines. Veldhuizen *et al.* (Veldhuizen, 1998) décrivent le rôle des lipides dans le surfactant pulmonaire. Le surfactant pulmonaire est le seul endroit du corps humain dans lequel on trouve une monocouche de lipides, les membranes cellulaires étant en général constituées de bicouches. La régulation de la tension de surface du poumon se fait par ce film lipidique. Le contenu lipidique est essentiellement phospholipidique (Hawgood, 1990), le principal et très actif composant du surfactant pulmonaire est un mélange de DPPC/DPPG (environ 4 : 1) dans le poumon humain (Rooney, 1974). D'autres phospholipides et lipides sont aussi présents en petites quantités : PC, PG, PE et PI mono insaturés, des acides gras libres, des triglycérides et du cholestérol (King, 1982). Selon Hallman *et al.* (Hallman, 1985), la présence des phospholipides chargés négativement DPPG dans la monocouche augmente la stabilité du surfactant pulmonaire pour les faibles tensions de surface en prévenant le collapsus du film phospholipidique de DPPC apparaissant durant la compression. De plus des expériences ont été effectuées (Hallman, 1985) pour démontrer que le phospholipide chargé négativement DPPG est absent lors de la détresse respiratoire chez l'enfant prématuré et donc que ce phospholipide augmente la qualité du surfactant pulmonaire. D'autre part, les apoprotéines sont aussi importantes dans le processus de la régulation de la fonction de tension superficielle (Galla, 1998, Johansson, 1998, Johansson, 1997, Krüger, 1999, McCormack, 1998, Pastrana-Rios, 1995, Perkins, 1996, Ruano, 1999). Le rôle physiologique des apoprotéines est d'augmenter la tension de surface au niveau du film phospholipidique. Le surfactant pulmonaire montre une composition morphologiquement et fonctionnellement hétérogène et les différences dans la forme et l'activité sont corrélées avec le contenu des apoprotéines. Quatre protéines sont comptabilisées dans le surfactant pulmonaire : SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (Johansson, 1997). Le tableau de la Figure III.45 décrit les principales

caractéristiques de ces quatre protéines (Pérez-Gil, 1998), de plus S. Hawgood et J. Clements les ont détaillées (Hawgood, 1990). Les principales caractéristiques de SP-A peuvent être trouvées dans une revue écrite par Francis McCormack (McCormack, 1998).

SP-A est la plus abondante et la mieux caractérisée des glycoprotéines hydrosolubles superficielles spécifiques du poumon. Elle constitue 3 % du surfactant pulmonaire et son poids est d'environ 28 kDa avec 248 résidus. Sa fonction serait de réguler le "turnover" du surfactant pulmonaire mais son effet d'adsorption phospholipidique semble être moins important que SP-B et SP-C, toutefois elle agit avec SP-B en formant un gros complexe lipoprotéinique. En outre, les protéines SP-A et SP-B génèrent des structures de type myéline à partir des phospholipides du surfactant pulmonaire. SP-B et SP-C sont des lipoprotéines qui sont trouvées dans les mêmes proportions dans le surfactant pulmonaire (environ 1%). SP-B contient 79 résidus dont la distribution d'acides aminés chargés positivement et hydrophobes le long de la protéine lui confère un caractère amphipathique. SP-C est la plus petite des protéine du surfactant pulmonaire, d'un poids de 4,2 kDa avec seulement 36 résidus. Elle est fortement lipophile avec juste une petite région hydrophile sur le Nterm. Cette petite protéine est présente soit dans les bicouches soit dans la monocouche du surfactant pulmonaire. Les deux protéines hydrophobes SP-B et SP-C sont constamment associées à des lipides (Johansson, 1997). SP-B et SP-C accélèrent la vitesse de formation des films phospholipidiques à l'interface air/eau (Galla, 1998). Les données de spectroscopie RMN (Johansson, 1994) montre que la protéine SP-C forme une hélice  $\alpha$  longue de 37 Å et d'un diamètre d'environ 10 Å. Sa séquence peut être trouvée dans la base de données de la Swiss-Prot Data Bank (code P11686) et est la suivante : LRIP(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COS)C-(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COS)CPVNL<sup>8</sup>KRLIVVVVVV-LIVVVIVGALLMGL-NH<sub>2</sub>.

				
	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D
	Hydrophilic	Hydrophobic	Hydrophobic	Hydrophilic
<b>MW/monomer</b>	26-38 KDa	8.7 KDa	4.2 KDa	43 KDa
<b>quaternary structure</b>	hexadecamer	dimer	monomer	dodecamer
<b>pI</b>	4-5	8-9	8-9	4-5
<b>structural motifs</b>	collagenous, disulfide-linked triple-helical rods  alpha-helical coiled-coil neck domain  globular, glycosylated lectin domain	"triple"-like folding  cationic amphipathic alpha-helical segments  3 intra-, 1 inter-molecular disulfide bonds	hydrophobic transbilayer regular alpha-helix  N-terminal diacylated positively-charged segment	collagenous, disulfide-linked triple-helical rods  alpha-helical coiled-coil neck domain  globular, glycosylated lectin domain
<b>homologies</b>	COLLECTINS  mannose-binding protein  C1q	saposins  rik-lysin	signal-peptides	COLLECTINS  conglutinin

**Figure III.45 Principales caractéristiques structurales des protéines du surfactant pulmonaire (Pérez-Gil, 1998).**

Nous avons utilisé deux séquences simplifiées de la précédente :

- la première et la plus courte que l'on appellera SP-C commence au résidu 8 (Leu8) jusqu'au Nterm;



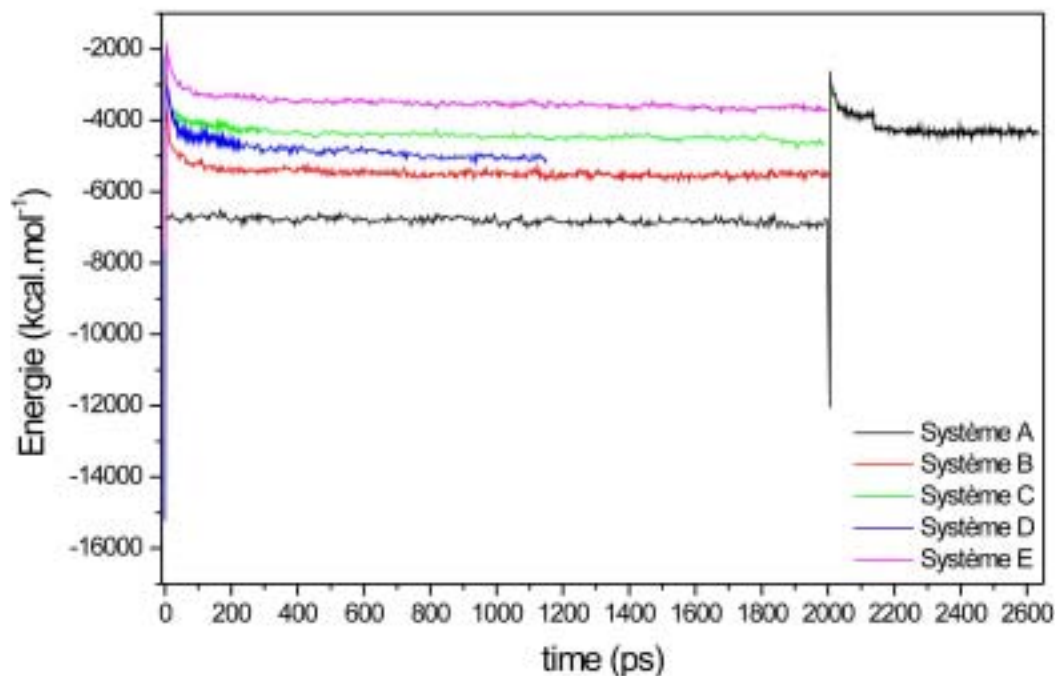
- la seconde que l'on appellera dpSP-C est plus longue puisque nous n'avons enlevé de la séquence complète que les quatre premiers résidus LRIP.

Un travail récent (Gustafsson, 2000) montre l'influence des parties palmitoylées de la protéine SP-C sur la stabilité mécanique du film lipidique du surfactant pulmonaire. La structure secondaire et l'orientation de la protéine SP-C ont été étudiés par spectroscopie IR et RMN du deutérium dans des couches modèles de DPPC. D'un point de vue de la simulation numérique, Kovacs *et al.* (Kovacs, 1995) ont étudié par dynamique moléculaire l'effet de l'environnement sur la stabilité de l'hélice  $\alpha$  de SP-C. Ils ont montré que l'hélice  $\alpha$  est stable dans le chloroforme et perd sa structure secondaire dans un milieu aqueux tel que l'eau et le méthanol. Nous présentons ici une étude originale en introduisant le peptide SP-C dans des membranes explicites constituées de deux monocouches de composition phospholipidique différente, une "artificielle" à base de DSPC uniquement et une "naturelle" constituée d'un mélange DPPC/DPPG ainsi qu'une bicouche phospholipidique "naturelle". Cinq systèmes différents ont été étudiés : dans les deux premiers, systèmes A et B, nous avons étudié le comportement de la protéine SP-C insérée dans une monocouche neutre zwitterionique à chaînes longues DSPC (18 : 0) pour immerger au maximum l'hélice  $\alpha$  de la protéine. Dans ces deux systèmes SP-C est initialement placée parallèlement à la normale à l'interface eau/lipides. Le troisième système, système C, est constitué de la protéine SP-C dans la même orientation mais dans une monocouche phospholipidique constituée d'un mélange DPPC/DPPG (4 : 1) mimant l'environnement naturel du surfactant pulmonaire. Le quatrième système, système D, est constitué de la protéine SP-C immergée dans une bicouche mixte DPPC/DPPG (4 : 1) avec l'axe de l'hélice placé parallèlement à la normale à l'interface. Enfin le dernier système, système E, reproduit un environnement naturel complet, en effet la protéine dpSP-C est placée dans une monocouche mixte DPPC/DPPG (4 : 1). Dans ce dernier cas, nous avons ajouté à l'hélice  $\alpha$  lipophile une courte hélice amphipathique de surface contenant NVP et les deux cystéines palmitoylées (16 : 0) consécutives pour illustrer

l'influence des chaînes sur la stabilité du surfactant pulmonaire (Flach, 1999, Gustafsson, 2000). La différence entre les deux systèmes A et B et les trois C, D et E est l'utilisation de lipides anioniques DPPG qui stabiliseraient le peptide SP-C (Hawgood, 1990). Ce travail illustrera par une simulation en dynamique moléculaire des résultats expérimentaux (Clercx, 1995, Galla, 1998, Pastrana, 1991, Vandebussche, 1992) qui révèlent que "l'axe de l'hélice  $\alpha$  de la protéine SP-C est orientée presque parallèlement aux chaînes acyles dans une bicouche", que "les résidus histidine, lysine, arginine (positions 9, 11 et 12 de la séquence humaine) interagissent avec les têtes polaires lipidiques" et que "les interactions électrostatiques entre ces résidus chargés et le lipide DPPG chargé négativement peuvent stabiliser la structure". En ce qui concerne la protéine SP-C dans une monocouche, Galla *et al.* (Galla, 1998) supposent que "contrairement à la protusion, l'axe de l'hélice  $\alpha$  de la protéine SP-C devrait être orientée perpendiculairement aux chaînes acyles "; de plus Flach *et al.* (Flach, 1999) ont montré par IRRAS que l'angle d'inclinaison de la protéine SP-C dans les monocouches de DPPC varie dans un intervalle compris entre  $70^\circ$  à  $80^\circ$  par rapport à la normale à la couche et ceci quelle que soit la composition palmitoylée ou dépalmitoylée de la protéine SP-C.

## **2. Interactions et orientation de la protéine SP-C dans des membranes modèles**

**Remarque :** nous considérons que tous les systèmes sont stables après 200 ps lorsque l'énergie totale des systèmes a atteint un plateau. On note une exception pour le système A (Figure III.46) pour lequel une variation de l'énergie apparaît à 2001 ps, ceci a été causé par le changement du volume du système (cf. la construction du système Annexe C) : le nombre d'atomes devient plus grand ce qui conduit à une augmentation mécanique de l'énergie du système.



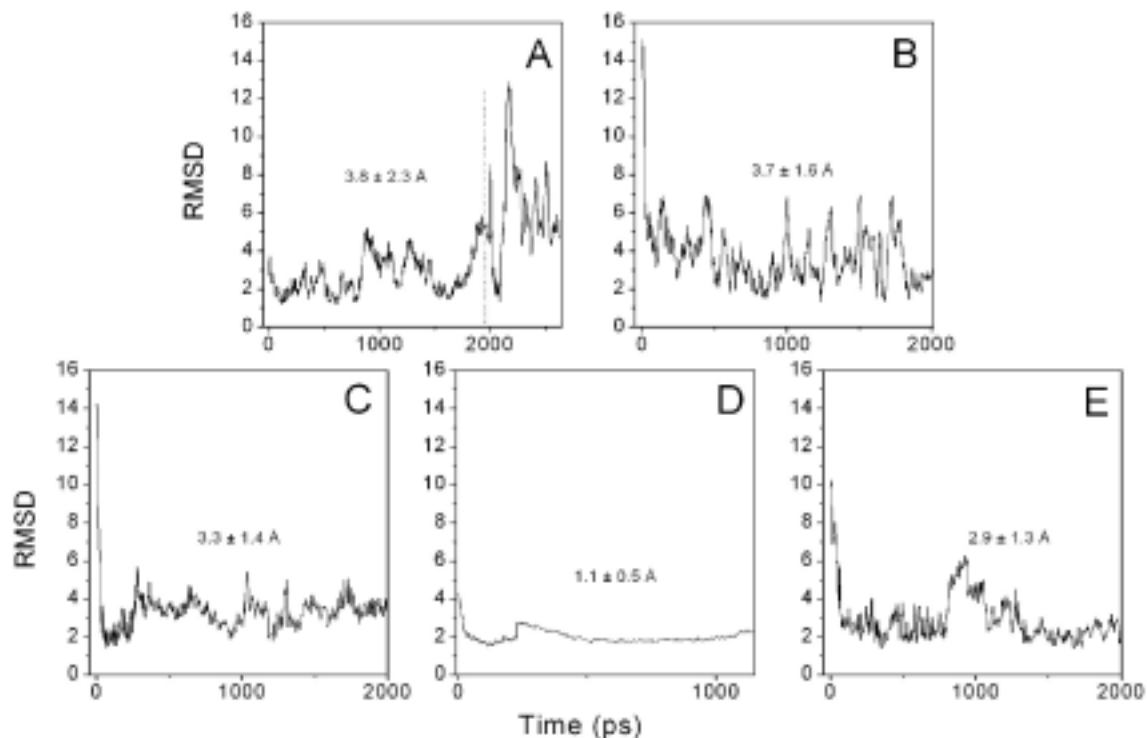
**Figure III.46** Energies totales des systèmes de SP-C dans les différentes couches en fonction du temps. En noir système A, en rouge système B, en vert système C, en bleu système D, en violet système E.

### a) Stabilité des systèmes étudiés, RMSD

Pour vérifier la stabilité des hélices dans chaque système nous avons tracé le RMSD du peptide en fonction du temps (Figure III.47).

Quand on compare les RMSD de la protéine SP-C des différents systèmes A, B, C, D et E, le système D ne montre que de très légères variations avec une faible valeur moyenne de  $1,1 \pm 0,5 \text{ \AA}$ . Ce système mimant la protéine SP-C dans la bicouche DPPC/DPPG apparaît très stable avec seulement d'infimes fluctuations. A l'opposé,

les systèmes A, B, C et E, mimant la protéine SP-C dans des monocouches montrent de grandes fluctuations du RMSD pouvant atteindre des valeurs entre 3,3 et 3,8 Å.



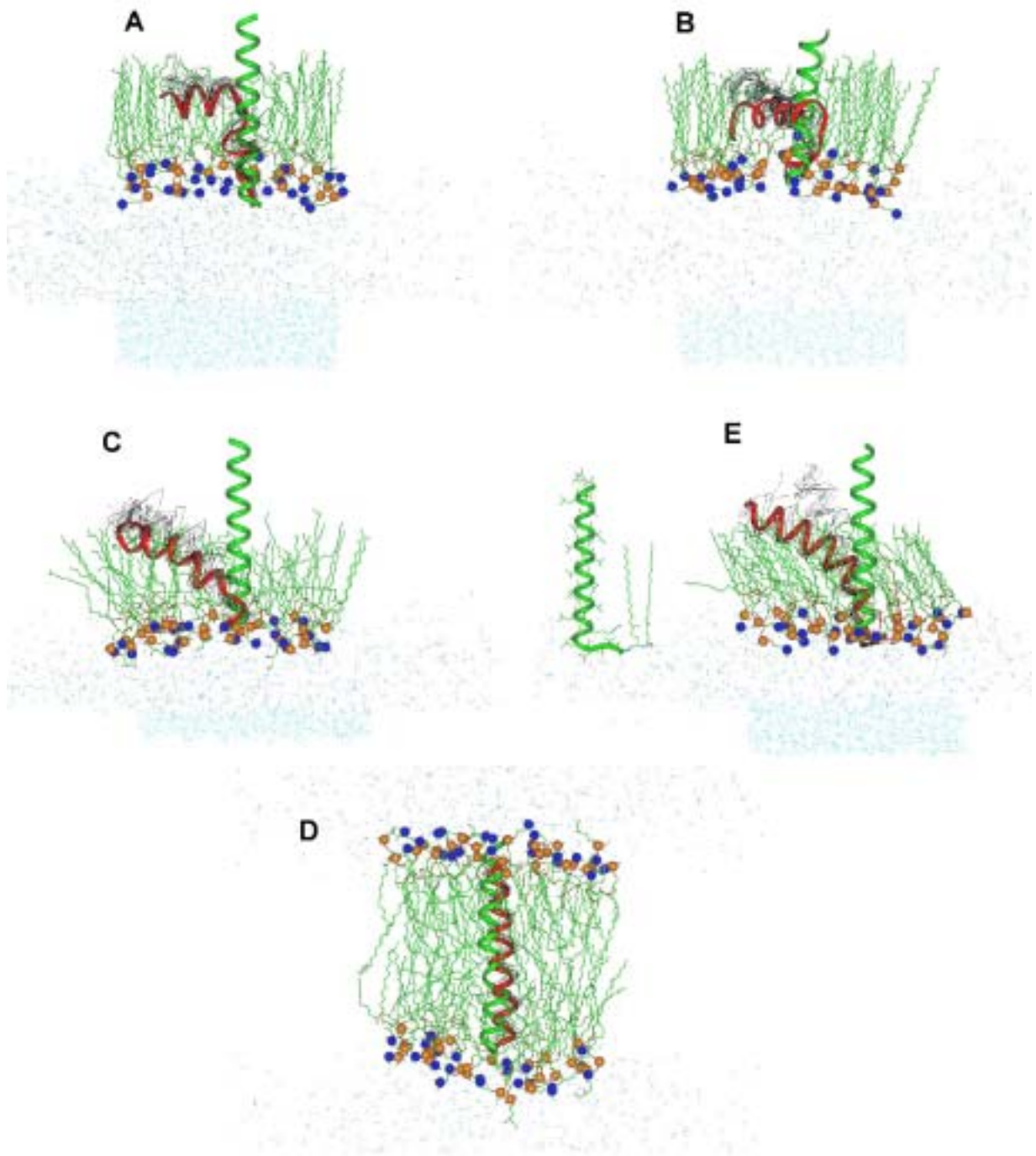
**Figure III.47** Graphes des RMSD de la protéine SP-C dans les différents systèmes.

Ces fluctuations importantes sont à souligner notamment pour les systèmes mettant en jeu la monocouche de DSPC (systèmes A et B). Les plus grandes fluctuations dans le système A apparaissent après 2 ns, ce qui correspond au changement des dimensions de la boîte. Le même phénomène de fluctuation n'est pas retrouvé pour le système B, dans lequel la boîte est inchangée durant la simulation ce qui semble indiquer des difficultés d'adaptation aux nouveaux paramètres de boîte pour le

système A. Il est intéressant de noter que le remplacement de la monocouche "artificielle" de DSPC par la monocouche "naturelle" DPPC/DPPG conduit immédiatement à de plus faibles fluctuations. De plus, ces fluctuations montrent des variations de fréquences plus faibles que dans le système A. La monocouche mixte de DPPC/DPPG absorbe efficacement les fluctuations majeures du système par comparaison avec la monocouche de DSPC. Cette différence est due à la présence du lipide chargé négativement DPPG. Cette observation est confirmée par l'observation du système E, mimant la protéine SP-C dipalmitoylée, dans lequel le RMSD est sensiblement plus faible que dans le système C, SP-C non palmitoylée :  $2,9 \pm 1,3$  Å contre  $3,3 \pm 1,4$  Å. Donc la présence des chaînes palmitoylées contribue positivement à l'absorption des fluctuations déjà exercées par le mélange lipidique.

### **b) Fluctuations des systèmes**

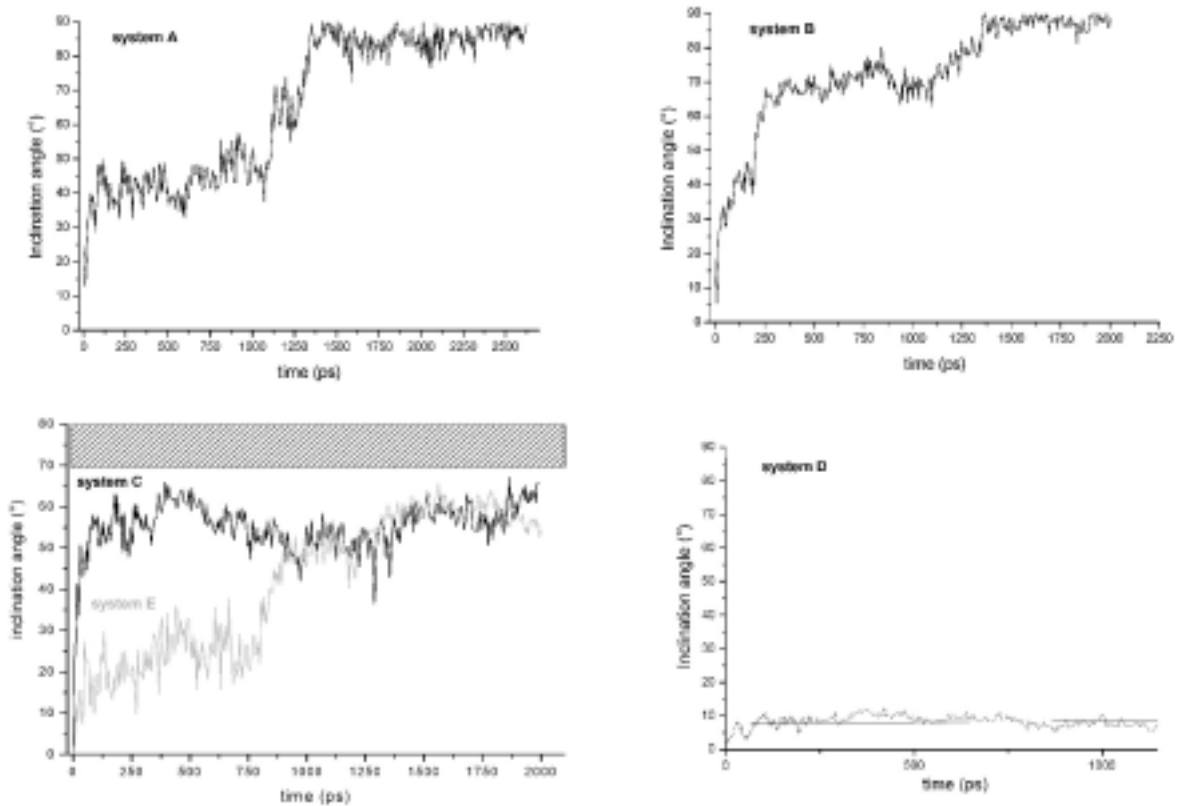
De façon complémentaire, on peut suivre les fluctuations des systèmes sur la Figure III.48 qui montrent des clichés des cinq systèmes et notamment la trace des C $\alpha$  du peptide toutes les 100 ps.



**Figure III.48 Clichés de la protéine SP-C dans les différentes couches.** En vert, position du peptide en hélice à  $t=0$  et en rouge position du peptide en fin de simulation. La partie polaire des couches lipidiques est délimitée par les sphères oranges (phosphores) et bleues (ammoniums), la partie hydrophobe est colorée en vert.

Il apparaît clairement que pour les systèmes A, B et C, la protéine SP-C revient spontanément à une position plus ou moins horizontale et que la région polaire est bien ancrée dans les têtes polaires lipidiques durant l'ensemble de la simulation. D'autre part, le système D, SP-C dans la bicouche, apparaît comme une exception avec un peptide particulièrement stable qui reste parallèle aux chaînes d'acides gras. Les résultats obtenus corroborent encore une fois les données expérimentales.

Il est possible de suivre le comportement du squelette du peptide en traçant l'angle de tilt entre l'axe de l'hélice  $\alpha$  du peptide et la normale à la surface des couches lipidiques. Initialement, le peptide est parallèle à la normale à la couche : l'angle de tilt est donc proche de  $0^\circ$ . Sur la Figure III.48 et seulement pour les systèmes A et B, il apparaît que le squelette du peptide se courbe rapidement à un niveau correspondant au coeur des chaînes acyles, mais on ne retrouve pas le même phénomène pour les trois autres systèmes C, D, E. Pour ces derniers systèmes (Fig. III.49), nous utilisons un vecteur corrélant tous les atomes  $C\alpha$  du peptide. Pour le système A, le vecteur a été construit à partir de la rupture de la structure à savoir du résidu en position 10 jusqu'au  $C_{\text{term}}$ , pour le système B, du résidu en position 6 jusqu'au  $C_{\text{term}}$ .



**Figure III.49** Angles de tilt de SP-C dans les différents systèmes. La partie grisée sur les graphes des systèmes C et E représentent les valeurs expérimentales.

Le système D, SP-C dans la bicouche, apparaît alors comme une exception avec un angle d'inclinaison quasi constant et proche de  $0^\circ$  : il fluctue autour de  $8,0 \pm 1,9^\circ$  avec une valeur finale de  $6,9^\circ$  et donc la protéine SP-C peut être considérée comme parallèle à la normale à la bicouche et donc parallèle aux chaînes acyles, ceci corrobore parfaitement les données expérimentales (Clercx, 1995, Galla, 1998, Pastrana, 1991, Vandenbussche, 1992).

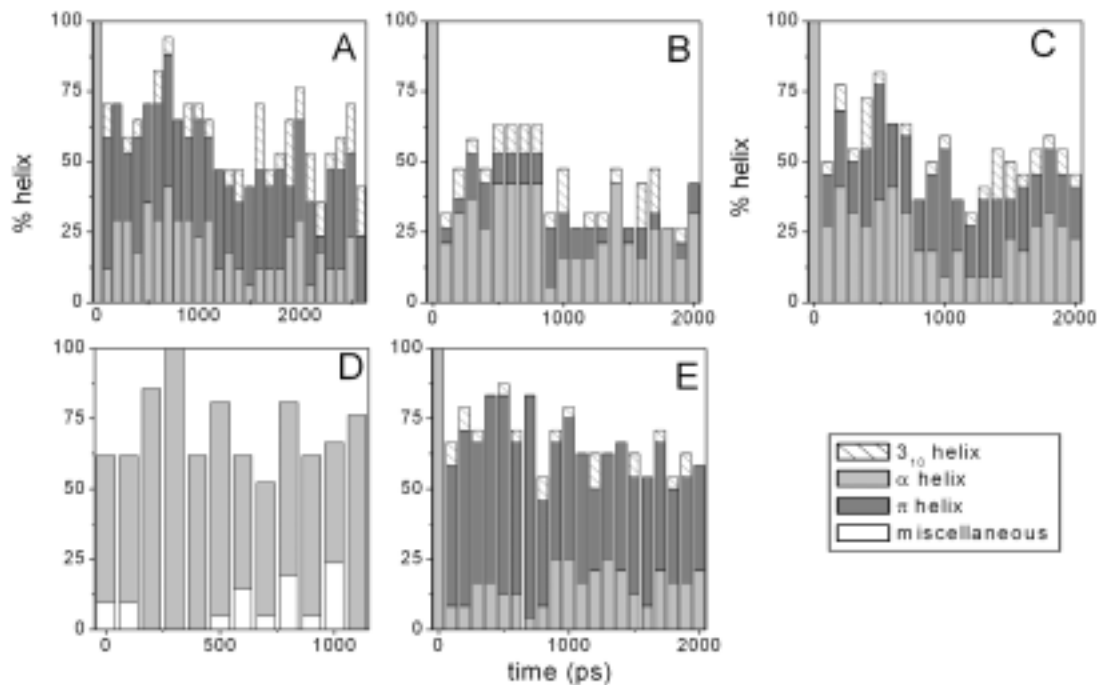
Au bout de 1,5 ns, les systèmes A et B, SP-C dans une monocouche de DSPC, atteignent des valeurs d'angle d'inclinaison du peptide de  $85 \pm 5^\circ$  puis restent stables. Cependant la valeur finale est atteinte par paliers. Pour le système A, on peut



observer une augmentation brusque à  $40^\circ$  en moins de 100 ps, puis une longue stagnation (1 ns) autour de  $45^\circ$  juste avant une montée rapide (150 ps) jusqu'à la valeur finale qui reste inchangée durant 1,3 ns (étant insensible au changement d'environnement à  $t = 2\text{ ns}$ ). Le système B montre un comportement presque identique mais le premier plateau est aux environs de  $65^\circ$ . Ces deux systèmes sont caractérisés par la présence du lipide DSPC, un lipide avec deux chaînes très longues (18 : 0) ce qui serait très vraisemblablement la raison de cette brutale rupture de la structure du squelette peptidique. L'inclinaison du peptide affecte seulement la partie  $C_{\text{term}}$  de la protéine SP-C dans les deux cas : à partir du résidu en position 10 pour le système A ou à partir du résidu en position 6 pour le système B, donc avec une différence d'un pas d'hélice  $\alpha$ . On ne retrouve pas le même résultat pour les systèmes C et E pour lesquels le lipide DSPC est remplacé par le mélange DPPC/DPPG. Dans ces deux cas, l'inclinaison du peptide affecte uniformément la structure globale du squelette juste après le troisième résidu polaire ancrant la partie Nterm dans la monocouche. La valeur finale de  $60 \pm 5^\circ$  est atteinte presque immédiatement, en moins de 100 ps et reste inchangée avec quelques petites variations. Pour le système naturel complet E, la valeur finale est la même,  $60 \pm 5^\circ$ , mais elle est atteinte après un long plateau (800 ps) autour de  $25 \pm 5^\circ$  juste avant une lente augmentation vers la valeur finale. L'hélice du peptide subit une inclinaison qui affecte le squelette entier juste après les trois résidus polaires ancrant la protéine SP-C dans la monocouche, exactement comme pour le système C. Les valeurs d'angle d'inclinaison pour les systèmes A et B ( $85 \pm 5^\circ$ ) sont légèrement plus hautes que les résultats expérimentaux (de  $70$  à  $80^\circ$ ) (Flach, 1999) mesurés sur des couches de DPPC. Les systèmes C et E plus proches des conditions expérimentales fournissent des valeurs ( $60 \pm 5^\circ$ ) plus proches des données expérimentales. La différence de longueur de deux carbones peut induire une telle différence de comportement. La composition lipidique apparaît largement plus importante que la présence ou non des parties palmitoyles servant d'ancrages, comme l'ont montré Flach *et al.* (Flach, 1999). En fait le comportement dans la monocouche

de DSPC apparaît comme un mélange du comportement dans une monocouche de DPPC et une bicouche de DPPC : la moitié interne du peptide est stable à l'intérieur de la monocouche de lipides à chaînes longues DSPC mais la moitié externe devient instable et se courbe vers les chaînes acyles ; ceci n'est pas le cas quand le peptide est immergé dans la bicouche dans le système D où la position initiale verticale reste stable.

**c) Structure secondaire de la protéine SP-C dans les différentes membranes modèles**



**Figure III.50** Evolution de l'hélice  $\alpha$  de la protéine SP-C en fonction du temps.

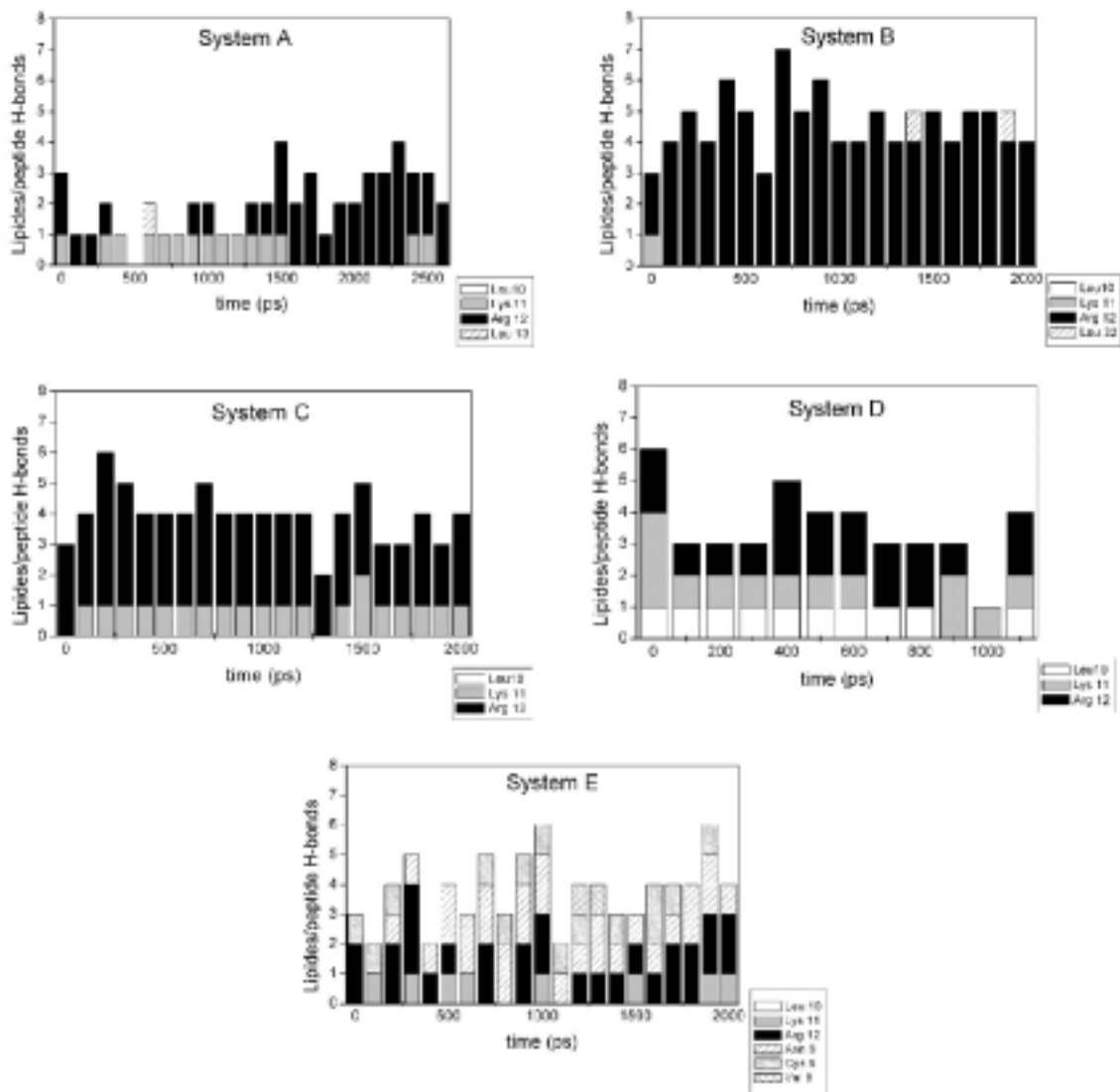
Les graphes de la Figure III.50 permettent de suivre l'évolution de l'hélice  $\alpha$  en fonction du temps. En fait, la structure en hélice est conservée durant les simulations en dépit des transitions  $\alpha \rightarrow \pi$ . Pour les quatre systèmes dans les monocouches, l'hélice  $\alpha$  se mélange avec l'hélice  $\pi$  et cette hélice  $\pi$  est trouvée localisée essentiellement sur les résidus de la fin à partir de la Val<sup>10</sup> pour le système A, V<sup>16</sup> pour le système B et V<sup>12</sup> pour le système C. On peut remarquer que la modification commence toujours à partir d'une Valine. L'hélice  $\alpha$  est conservée à 23% pour le système A, 30% pour le système B et 27% pour le système C; l'hélice  $\pi$  est présente à 31% pour le système A, 9% pour le système B et 23% pour le système C, le reste étant des liaisons Hydrogène entre les résidus  $i$  et  $i+3$  ou moins et représente approximativement 7% pour le système B. La partition entre hélice  $\alpha$  et hélice  $\pi$  dans les systèmes des monocouches est moitié-moitié pour le système C. La conversion  $\alpha \rightarrow \pi$  est localisée sur les Valines V<sup>10</sup>, V<sup>16</sup> ou V<sup>12</sup>, et l'hélice  $\pi$  part des Valines jusqu'à la fin du peptide SP-C et cette partie est perpendiculaire aux chaînes acyles. Pour le système D (bicouche), l'hélice  $\alpha$  est conservé au trois quart et aucune conversion en hélice  $\pi$  n'apparaît. Le reste est essentiellement constitué de liaisons Hydrogène ponctuelles et discontinues entre les résidus  $i$  et  $i+3$  et moins. Ceci montre encore une fois que l'hélice  $\alpha$  de la protéine SP-C est stable dans la bicouche. Johansson et Curstedt (Johansson, 1997) ont montré qu'il y a une perte de 20% de l'hélicité dans le cas de SP-C dipalmitoylée, on trouve, en moyenne 46% d'hélice  $\alpha$  et 20% d'hélice  $\pi$  soit une perte d'environ 34%. Cette conversion  $\alpha \rightarrow \pi$  a été démontrée expérimentalement par l'équipe RMN de notre laboratoire lors de la résolution structurale de Neu, partie transmembranaire d'un récepteur à tyrosine kinase (Goetz, 2001). En effet, ils ont trouvé que dans un solvant de type TFE (Trifluoroéthanol), une partie de l'hélice est de type  $\alpha$  et le reste est de type  $\pi$ . De plus ils ont trouvé que l'hélice  $\pi$  était essentiellement localisée dans une région de l'hélice riche en valines. D'autre part, Sajot *et al.* (Sajot, 2000) montraient le même phénomène par modélisation d'une hélice de erbB2, analogue humain de Neu, dans le vide. La

comparaison entre le système de bicouche D et les systèmes monocouches C et E permet d'avancer une hypothèse pour expliquer ces différents comportements. Dans le système D il n'apparaît pas d'hélice  $\pi$ , or dans ce système l'hélice se trouve de façon continue enfouie dans un système à forte pression latérale (membrane avec une surface standard faible comme dans le cas des LiKj vu précédemment) et apparemment la forme d'hélice stable est la forme classique  $\alpha$ . Dans les systèmes C et E la partie qui se structure en hélice  $\pi$  est la partie terminale qui se trouve plongée dans un environnement extrêmement liquide (la partie terminale des chaînes grasses juste à l'interface du vide) et est donc soumise à une très faible pression. Un moyen simple de pallier cette situation défavorable est de "fabriquer" une hélice plus courte (pour échapper à la proximité du vide) et plus large (pour regagner des interactions Van der Waals) ce qui est précisément la définition d'une hélice  $\pi$ . Ceci peut expliquer pourquoi dans un solvant comme le TFE (peu de pression latérale) et a fortiori dans le vide on observe souvent des hélices  $\pi$  vers les extrémités des hélices, alors que ces arrangements sont peu observés sur des structures cristallines.

#### **d) Importance du mélange lipidique DPPC/DPPG**

##### ***(1) Quantité de liaisons Hydrogène lipides/SP-C.***

La Figure III.51 montre que les résidus de SP-C qui semblent être favorables au partage des liaisons Hydrogène avec les lipides de la couche sont, comme on peut s'y attendre les premiers résidus du Nterm : L<sup>10</sup>, K<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> dans les systèmes A à D et N<sup>9</sup>, R<sup>12</sup> pour le système E, avec une forte préférence dans toutes les simulations pour le résidu R<sup>12</sup> (Figure III.51). Ce dernier résidu présente une charge fortement délocalisée sur le groupe guanidinium et est un site très favorable aux liaisons Hydrogène.



**Figure III.51 Evolution des liaisons Hydrogène entre les résidus de SP-C et les lipides des membranes modèles en fonction du temps.** En noir, liaisons Hydrogène engagées par R12, en gris par K11, en blanc par L10 et en hachuré avec d'autres tels que N9, C5 et V8.

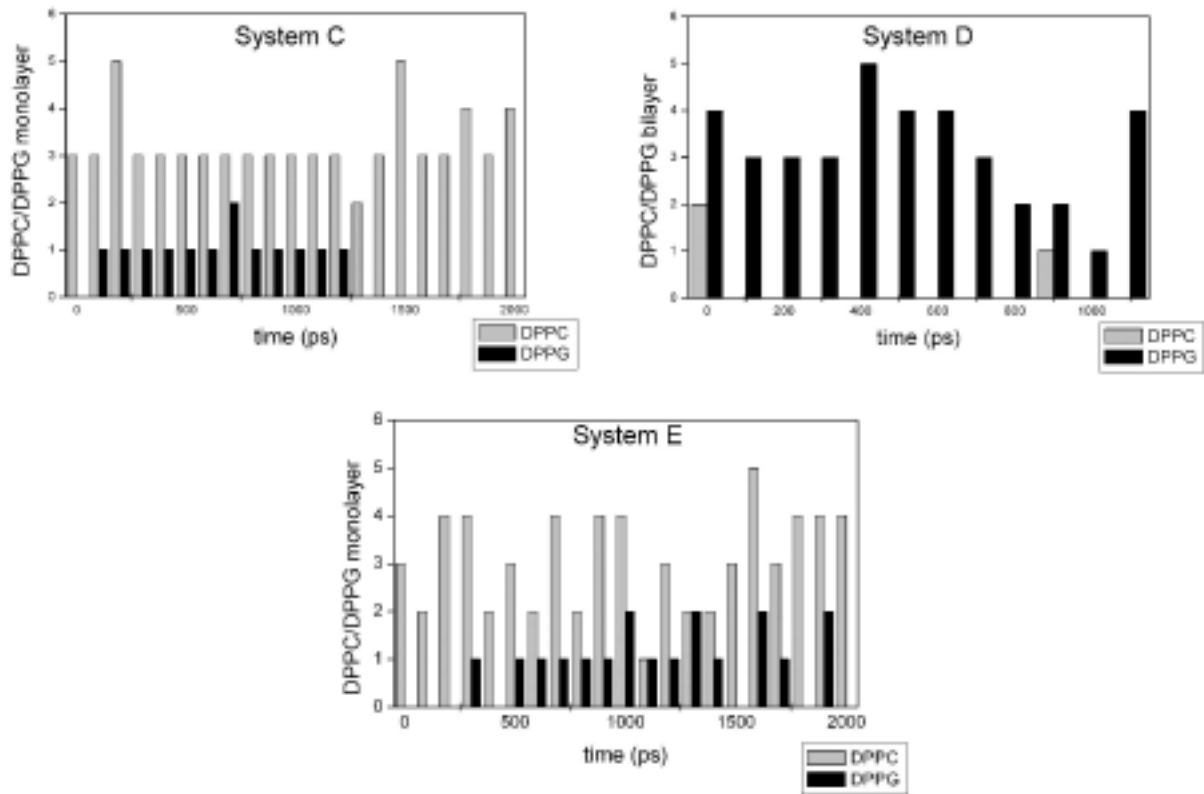
Le résidu arginine apparaît clairement comme la force conductrice de l'ancrage du peptide à l'interface eau/lipides. Ce comportement existe aussi pour les azotes de la Lysine K<sup>11</sup> (ou N<sup>9</sup> pour le système E) mais est moins prononcée. Pour les systèmes A

et B, globalement toutes les liaisons Hydrogène sont échangées entre le peptide et les oxygènes des groupements phosphates et carbonyles des esters de DSPC. Dans le système B, le nombre total des liaisons Hydrogène semble plus grand que dans le système A : 4-6 contre 3-4. De plus, dans le système B, la plupart des liaisons Hydrogène sont échangées avec l'arginine R<sup>12</sup> pendant toute la simulation, alors que ceci n'apparaît qu'en fin de simulation pour le système A. Mais finalement, les 500 dernières ps des deux simulations sont dans l'ensemble identiques avec seulement une liaison Hydrogène supplémentaire pour le système B (quatre liaisons pour le système B contre trois pour le système A). Dans le système B, en fin de simulation, la leucine L<sup>32</sup> échange une liaison Hydrogène avec les groupements carboxyliques de DSPC. En fait et même si ce résidu est situé dans la terminaison Cterm du peptide, le très grand tilt trouvé en fin de simulation pour la protéine SP-C amène cette Leucine dans un environnement proche de l'interface eau/lipides. Le système C apparaît très homogène avec une moyenne de quatre liaisons Hydrogène échangées principalement avec l'arginine R<sup>12</sup>, le reste étant toujours avec le résidu K<sup>11</sup>. Le système E produit un schéma plus compliqué (Figure III.51-E) dû à la grande partie supplémentaire N-term. Le résidu R<sup>12</sup> est toujours le résidu le plus important mais maintenant la lysine K<sup>11</sup> a disparu et a été remplacé par N<sup>9</sup> qui échange des liaisons Hydrogène avec les groupements phosphates du DPPC mais aussi occasionnellement avec les groupements hydroxyles des têtes polaires du DPPG. La lysine K<sup>11</sup> échange seulement des liaisons Hydrogène avec les carboxylates des esters des chaînes d'acides gras du DPPC alors que R<sup>12</sup> préfère échanger des liaisons Hydrogène avec les groupements phosphates malgré leur proximité de l'interface aqueuse en comparaison avec les carboxylates. Ceci est la conséquence d'une meilleure affinité des Lysines pour des environnements hydrophobe par rapport aux arginines : l'azote chargé de la lysine K<sup>11</sup> est plus proche de 1 à 2 Å du coeur hydrophobe que les azotes correspondants de l'arginine R<sup>12</sup>. Pour le reste des liaisons Hydrogène, un nouveau résidu apparaît : la cystéine C<sup>5</sup>, le premier de la partie N-term palmitoylée, qui échange des liaisons Hydrogène avec toujours le DPPG via sa fonction thioester.

Dans ce cas, le groupe accepteur de liaison Hydrogène est toujours le groupe carbonyle excepté entre  $t=0,8$  et  $t=1$  ns où c'est la fonction thioéther qui joue ce rôle. Une fois encore, le système D est totalement différent avec une répartition très harmonieuse des liaisons Hydrogène avec les trois premiers résidus Nterm (Figure III.51-D). C'est le seul système dans lequel les liaisons Hydrogène sont échangées avec le résidu le plus hydrophobe L<sup>10</sup>. En fait c'est la terminaison Nterm chargée qui est impliquée dans le réseau de liaisons Hydrogène avec un des DPPG du feuillet.

Il faut souligner que pour chaque système (A à E), il y a toujours un lipide qui est constamment lié à la protéine SP-C durant toute la simulation (Figure III.52). Dans le système C, c'est un DPPC avec plusieurs liaisons Hydrogène engagées avec la partie membranaire de l'hélice de la protéine. Ponctuellement un lipide DPPG peut être lié durant la première partie de la simulation. Cependant, en dépit de la présence initiale de trois DPPG autour du peptide, le seul lipide toujours lié à la protéine est un DPPC. Pour le système E, on observe exactement le même phénomène, excepté en tout début de simulation, mais maintenant deux lipides sont concernés avec un DPPG qui est aussi constamment lié à la cystéine C<sup>5</sup> de l'hélice de surface amphipathique.

Dans tous les cas la molécule de DPPC est lié via son groupe phosphate et rarement via ses fonctions carboxylates. Quant au DPPG, il préfère échanger des liaisons Hydrogène via un de ses groupements hydroxyles de la partie externe du glycérol. Le système D apparaît une fois encore complètement différent avec maintenant un DPPG (et non plus un DPPC) lié constamment au peptide, le DPPC étant lié de façon ponctuelle au cours de la simulation. De plus, ce DPPG échange des liaisons Hydrogène seulement via ses groupements phosphates et non plus via les hydroxyles des glycérols.

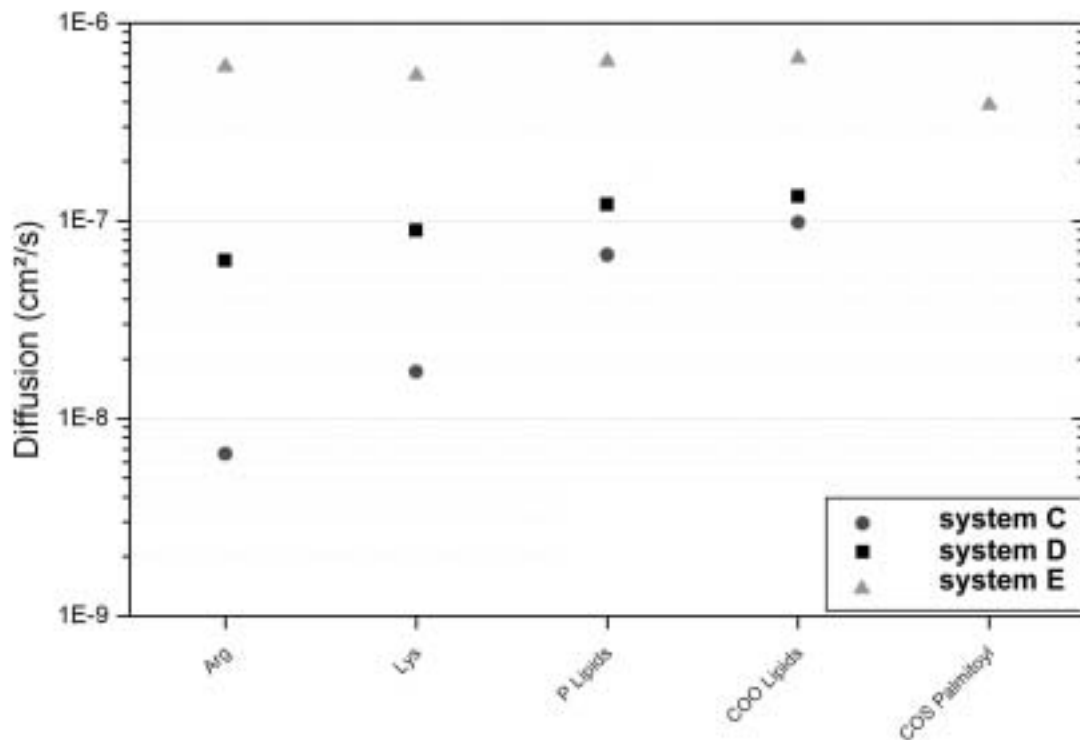


**Figure III.52** Nombre de lipides DPPC ou DPPG engageant des liaisons Hydrogène avec SP-E en fonction du temps. En gris liaisons échangées avec les lipides de DPPC, en noir avec les lipides de DPPG.

## *(2) Cas particulier de la protéine dipalmitoylée dpSP-C*

Sur la Figure III.53 est tracé le coefficient de diffusion latérale des groupements de têtes polaires des lipides (atomes de phosphore et groupements carboxylates) ainsi que les deux résidus hydrophiles de la protéine SP-C reposant juste à l'interface (l'arginine ( $R^{12}$ ) et la lysine ( $K^{11}$ )) pour le modèle de bicouche, système D et le modèle de monocouche avec ou sans les chaînes palmitoyles, systèmes C et E.





**Figure III.53 Coefficient de diffusion latérale de différentes parties de SP-C dans les systèmes "naturels".** Les ronds représentent les éléments du système C, les carrés le système D et les triangles le système E.

Il apparaît clairement que le comportement de la partie la plus hydrophile de l'interface est fortement influencée par le modèle utilisé dans la simulation : dans la monocouche sans les thioéthers palmitoylés, les coefficients de diffusion latérale apparaissent extrêmement hétérogènes avec des valeurs très basses pour les résidus polaires chargés K<sup>11</sup> et R<sup>12</sup>, d'un ordre de grandeur au-dessus des têtes polaires et des groupements esters des lipides. Ce phénomène est ment modéré avec le modèle de bicouche qui apparaît ment homogène mais est complètement éliminé dans le modèle palmitoylé. Dans ce dernier modèle tous les paramètres de diffusion latérale

fournissent la même valeur comme si le peptide se comportait comme un bloc rigide avec la monocouche lipidique. Ces observations sont en bon accord avec les récents travaux de Gustafson *et al.* (Gustafson, 2000) qui montrent que la palmitoylation sur le Nterm joue un important rôle dans la stabilité mécanique du film lipidique mais a une faible influence globale sur le contenu hélicoïdal du peptide. Il est important de noter que la valeur calculée pour les têtes polaires (phosphores) du modèle de bicouche ( $1,21 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) peut être favorablement comparée aux données expérimentales : à la même température le coefficient de diffusion latérale du DPPC pur a été mesuré par la technique FRAP à  $1,40 \pm 0,19 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Vaz, 1985). La technique FRAP a été présentée dans la partie II Section 11.8. Cet accord quasi parfait entre les coefficients de diffusion latérale simulés et expérimentaux pour des phases lipidiques pures fluides a été récemment observé dans le cas du DMPC (Léonard, 2001) : à 310K, la valeur calculée ( $8,8 \cdot 10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) se retrouve exactement dans l'intervalle expérimental : 7,9 à  $9,3 \cdot 10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Marsh, 1990). De plus, dans le cas particulier du système D, la présence du faible pourcentage du lipide DPPG le moins diffusif peut contribuer à expliquer une valeur calculée légèrement trop basse.

### **e) Conclusion**

Les cinq systèmes simulés permettent d'obtenir des détails très précis en ce qui concerne le système du surfactant pulmonaire et de son comportement. De plus ils expliquent très bien les particularités du système naturel : la conformation horizontale dans les systèmes de monocouches et la conformation verticale dans le système en bicouche. La force motrice du changement de conformation de l'hélice de SP-C dans les systèmes de monocouches peut s'expliquer par le manque d'interactions de Van der Waals favorables de la partie hydrophobe extérieure du peptide à l'interface air/lipides. Comme les chaînes d'acides gras sont proches, le peptide se courbe vers l'interface eau/lipides pour récupérer des interactions de Van der Waals favorables.

Avec les lipides naturels (longueur : 16 carbones), on trouve la même courbure, atteignant  $60 \pm 5^\circ$  au bout de 2 ns, c'est à dire juste  $5^\circ$  au-dessous des valeurs expérimentales connues (Flach, 1999). Avec des lipides plus longs (longueur : 18 carbones) la partie interne du peptide est suffisamment stable pour conserver sa conformation verticale, alors que la partie externe devient instable et s'incline rapidement vers les chaînes d'acides gras ayant pour résultat une rupture de la structure secondaire et une conformation horizontale de l'extrémité externe de la protéine SP-C. Dans le système de bicouche, toutes les interactions de Van der Waals étant satisfaites le long de la structure entière, la position verticale est constamment stable. La conséquence directe de l'addition des 20% de lipides chargés DPPG dans le mélange lipidique est une absorption efficace des majeures fluctuations du système. D'autre part, la présence de lipides chargés DPPG semble avoir une autre influence mineure sur les systèmes de monocouches en opposition avec le système de bicouche pour lequel on peut trouver une molécule de DPPG constamment liée à la partie hélicoïdale du peptide. La palmitoylation de la protéine SP-C renforce l'absorption des fluctuations du système ce qui avait déjà été réalisé par la présence des molécules de DPPG. L'ancrage du peptide à l'interface eau/lipides qui est assuré dans les systèmes raccourcis de monocouches A à C par le couple  $K^{11}/R^{12}$  est étendu dans le système complet palmitoylé E à  $N^9$  et aussi à  $C^5$  qui se lie à un DPPG. Par conséquent, le peptide entier réagit comme un bloc rigide avec les lipides et ceci contribue en grande partie à la stabilité mécanique expérimentalement observée. Pour terminer et comme il a aussi trouvé expérimentalement, la palmitoylation n'a pas d'influence sur le contenu hélicoïdal du peptide. Les résultats obtenus concernant l'orientation de la protéine SP-C dans une bicouche ou dans une monocouche illustrent avec un excellent accord les données expérimentales obtenues par spectroscopies IR et RMN.

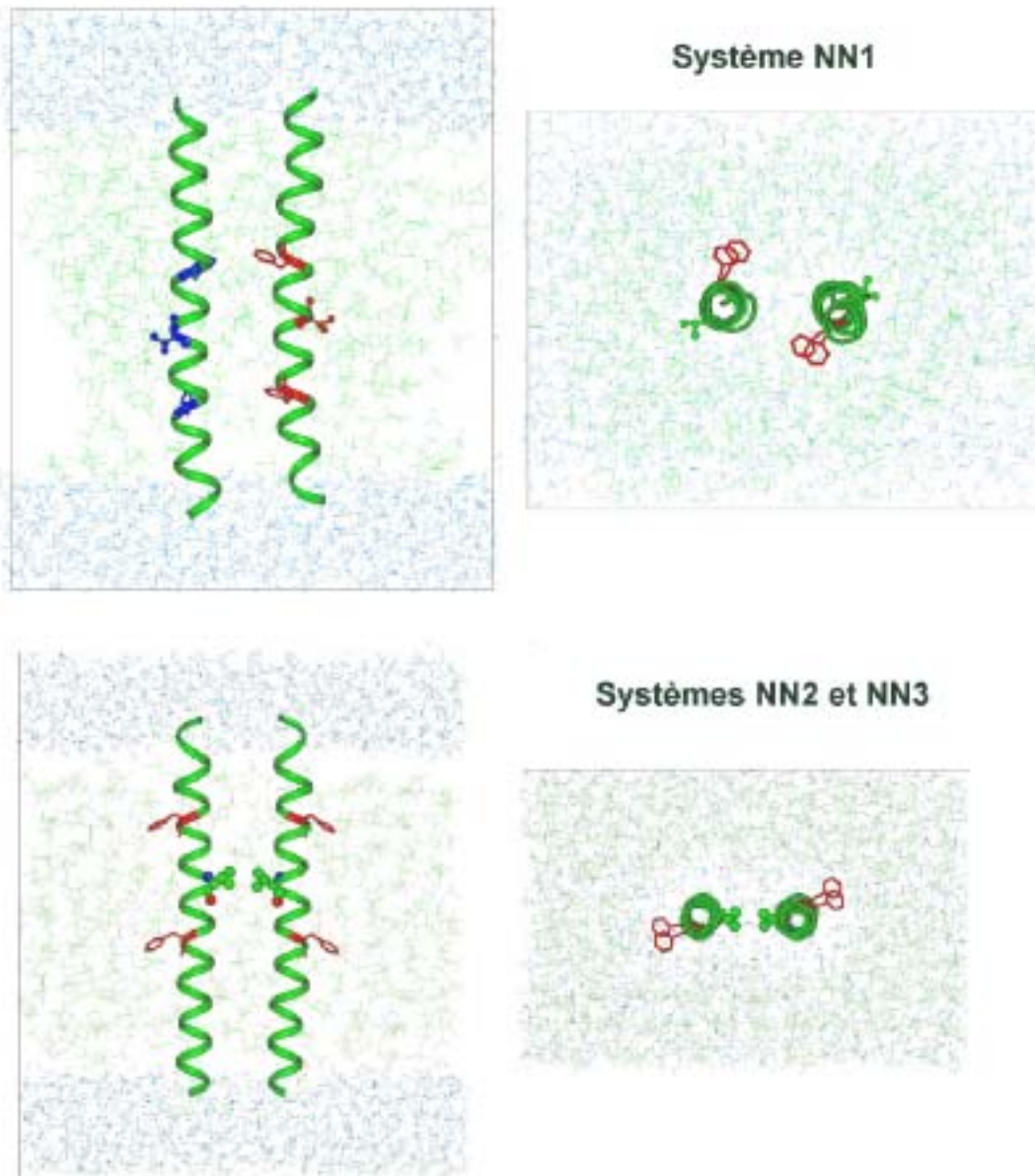
# IV. Etude de la dynamique de l'homodimère Neu et Neu\* dans une interface eau/chloroforme



Le proto-oncogène neu/erbB-2 code pour un récepteur tyrosine kinase homologue de la famille de l'EGFR ne possédant qu'un seul segment transmembranaire. Neu est l'analogue chez le rat de erbB-2 humain. Sa masse moléculaire est de 185 kDa (1260 acides aminés) et il est impliqué dans la transduction de signal à travers la membrane cellulaire (Bargmann, 1986). Sous l'influence d'un signal extracellulaire inconnu, le récepteur se met sous forme dimère et le signal intracellulaire qui en résulte entraîne la division cellulaire puis la forme dimère se défait. En revanche si la partie membranaire du récepteur est mutée en position 664 par l'acide glutamique alors la forme dimère est stable ce qui conduit à une multiplication cellulaire désordonnée et ensuite engage le processus de cancérisation. La séquence de Neu sauvage est la suivante  $\text{H}_2\text{N-EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVVGILIKRRCOO}-(\text{Neu}^{(+3)})$ . Il peut être transformé en oncogène par une mutation ponctuelle en remplaçant la Valine en position 664 ( $\text{V}^{664}$ ), dans la zone hydrophobe transmembranaire, par un résidu acide glutamique  $\text{E}^{664}$  ( $\text{Neu}^{(+3)}$ ). Cette substitution est supposée stabiliser les dimères du récepteur et représente le premier exemple d'une mutation dans le domaine transmembranaire d'un récepteur de facteur de croissance qui conduit à l'activation du récepteur et donc à la transformation cellulaire, en absence de ligand (Bargmann, 1986). La stabilisation serait assurée par liaisons Hydrogène entre les deux acides glutamiques des hélices transmembranaires des récepteurs (Smith, 1996). Le phénomène d'homodimérisation de Neu et Neu\* représente un enjeu important dans la compréhension du processus de cancérisation.

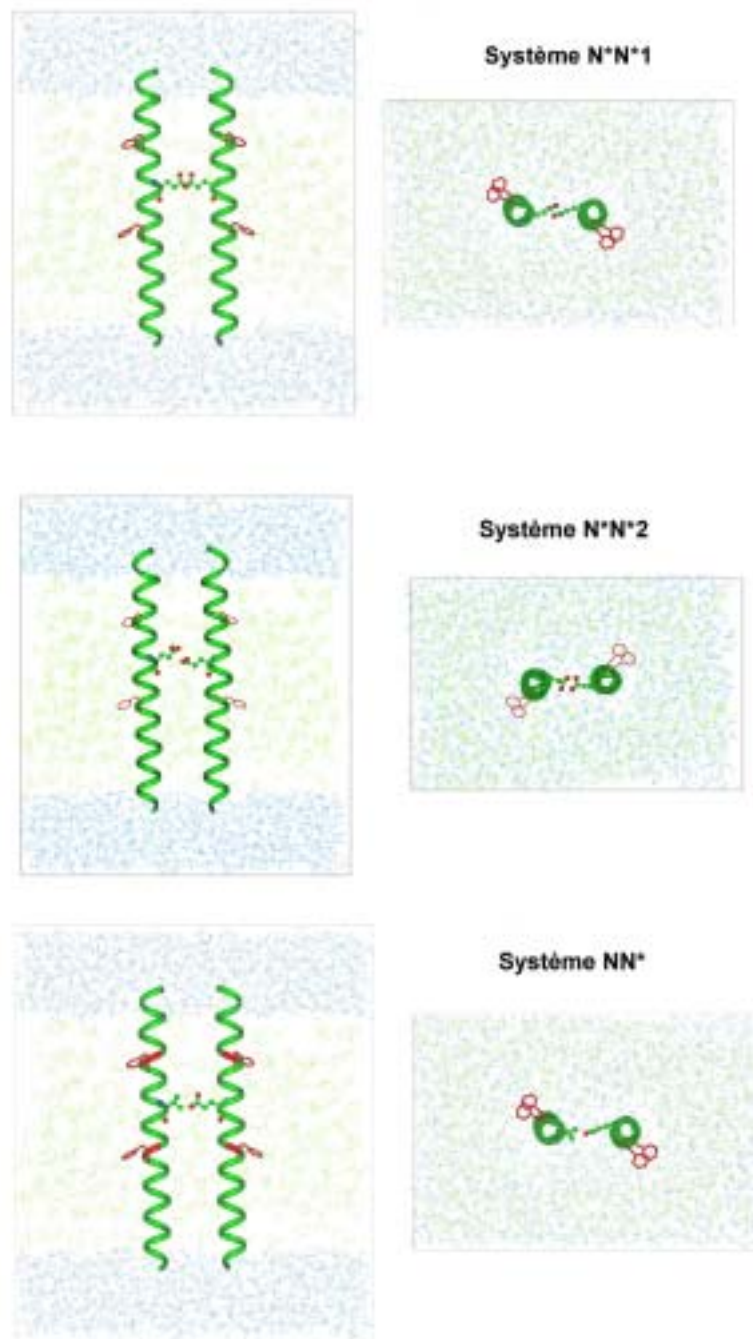
## A. Hypothèse de départ

Le phénomène de dimérisation de Neu et Neu\* représente un enjeu dans la compréhension du processus de cancérisation. L'équipe de Monique Genest du Centre de Biophysique moléculaire d'Orléans a simulé Neu dans le vide sous forme monomère ou sous forme homodimère en mutant certains sites, autres que la position 664, pour étudier d'éventuelles stabilisations de dimérisation, ainsi que le monomère de ErbB-2 (analogue de Neu chez l'homme) dans une membrane explicite de DLPE (Duneau, 1999) et sous forme homodimère muté dans une membrane de DMPC. Les résultats obtenus ont montré des conversions d'hélice  $\alpha \rightarrow \pi$  ainsi que la formation d'une superhélice pour la forme homodimère. Sachant que le diamètre des hélices varie de 10 à 12 Å, et la diffusion latérale des phospholipides ayant été déterminé à 1 Å/ns, les systèmes complets {homodimères + membrane phospholipidique explicite} ne permettraient pas de voir des interactions hélice-hélice dans des temps raisonnables ainsi pour faciliter le calcul nous avons choisi de travailler dans une interface chloroforme/eau avec les homodimères Neu et Neu\*. L'hypothèse de notre travail est basée sur la possible stabilisation de la forme homodimère des deux hélices Neu\* par liaison Hydrogène interpeptidique. Six simulations de dynamique moléculaire sont présentées ici. Trois décrivent l'homodimère Neu natif à l'interface eau/chloroforme dans deux positions différentes : les valines en position 664 ( $V^{664}$ ) seront soit placées l'une en face de l'autre, systèmes (NN2) et (NN3), soit elles seront opposées, système (NN1)(Figure IV.2) ; deux décrivent l'homodimère de Neu muté à l'interface eau/chloroforme dans des positions privilégiant ou non les liaisons Hydrogène entre les acides glutamiques  $E^{664}$ , systèmes (N\*N\*1-N\*N\*2) (Figure IV.2) ; et enfin le dernier système décrira le cas éventuel hétérozygote d'un hétérodimère natif + muté, système (NN\*)(Figure IV.2), les hélices seront alors placées de façon à avoir les deux résidus en position 664 l'un en face de l'autre.



**Figure IV.1** Images des systèmes de l'homodimère de Neu sauvage à  $t=0$ . Le chloroforme est représenté en vert et l'eau en bleu. Sur les hélices vertes des peptides, on a représenté les atomes des résidus en position 664 par des sphères vertes (carbones) et rouges (oxygènes) et les phénylalanines 659 et 669 en rouge.





**Figure IV.2** Images des systèmes de Neu sauvage/Neu muté à  $t=0$ . Le chloroforme est représenté en vert et l'eau en bleu. Sur les hélices vertes des peptides, on a représenté les atomes des résidus en position 664 par des sphères vertes (carbones) et rouges (oxygènes) et les phénylalanines 659 et 669 en rouge.

Nous montrerons dans cette étude que des liaisons Hydrogène interpeptidiques se forment au cours des dynamiques mais aussi que d'autres interactions dites faibles de type stacking  $\pi$ - $\pi$  ou  $\sigma$ - $\pi$  peuvent aussi apparaître. Pour les systèmes homodimères de Neu muté, on place les deux acides glutamiques face à face, dans un cas initialement elles ne forment pas de liaison Hydrogène entre elles, dans l'autre cas, une liaison Hydrogène existe au départ entre les deux acides glutamiques.

## 1. Intérêt d'une interface eau/chloroforme

La structure et la dynamique des interfaces liquides sont des problèmes d'un grand intérêt pour les physiciens, les chimistes et les biologistes. Par exemple, les électrochimistes sont intéressés par les réactions chimiques sur une électrode, les chimistes par les mécanismes des réactions catalysées sur une surface solide, et les biochimistes par le mécanisme d'insertion des protéines dans les membranes. Toutes ces études requièrent la connaissance de la structure et de la dynamique des interfaces liquides à un niveau atomique.

Les difficultés expérimentales à construire des interfaces qui restent difficiles à interpréter et à mesurer, ont poussé les théoriciens à élargir leurs études aux interfaces liquides. Zhang *et al.* (Zhang, 1995) ont écrit deux articles sur les simulations des interfaces liquide/liquide, dans lesquels ils décrivent la genèse de l'étude théorique et numérique des interfaces liquide/liquide. Ils proposent quatre modèles de géométrie de simulation des interfaces liquide/liquide et des méthodes générales pour les simuler avec les ensembles appropriés à chaque cas, par exemple un système eau/huile est en général bien simulé avec un ensemble adiabatique, à nombre de particules constant, pression constante et aire de surface constante. Des interfaces simplifiées telles que eau/chloroforme (Wipff, 1994), eau/acétonitrile (Troxler, 1998),

eau/1,2-Dichloroéthane (Schweighofer, 1995), eau/1,2-Diméthoxyéthane (Bedrov, 1998) et eau/octane (Zhang, 1995) ont été utilisées et il a été montré qu'elles sont très stables en simulation numérique (Guilbaud, 1993, Lauterbach, 1998, 1995, Troxler, 1994, Wipff, 1994).

"Au milieu d'une mer de lipides, les protéines intégrées flottent comme des icebergs et se déplacent également dans le plan de la membrane, mille fois plus lentement cependant que les molécules de lipides." : une molécule de chloroforme  $\text{CHCl}_3$  est plus facile à déplacer qu'un lipide entier puisque son coefficient de diffusion latérale est 300 fois plus élevé ( $5,57 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) que celui du DMPC ( $1,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  pour DMPC déterminé par dynamique moléculaire et par IQENS) (cf. Partie II Section 11.8.1) (Pfeiffer, 1989). De plus on élimine aussi les interactions peptides/lipides tout en conservant un environnement moléculaire raisonnable. Les interactions intermoléculaires sont importantes dans les processus biologiques. Et les modélisateurs préfèrent de plus en plus utiliser des milieux explicites tels que les interfaces eau/espace hydrophobe pour mimer des environnements membranaires plutôt que d'utiliser des potentiels électriques. D'un point de vue du nombre d'atomes les systèmes d'homodimère Neu ou Neu\* dans une bicouche lipidique hydratée de type DMPC s'avère lourd (~14000 atomes) en revanche les mêmes systèmes dans une interface eau/chloroforme ne sont composés que d'environ 10 300 atomes.

## **2. Neutraliser ou ne pas neutraliser pas les charges de Neu ?**

Un essai préalable sur la forme homodimère Neu\* a été réalisé sans neutraliser les charges portées par le peptide. Il s'est avéré qu'au cours de la simulation, les deux hélices se sont éloignées d'une distance supérieure à 13 Å alors que lorsque des contre-ions ont été ajoutés, les hélices sont restées à des distances correctes, et dans certains cas elles se sont rapprochées. Nous ne considérerons donc que des systèmes

électriquement neutres, si nous avons travaillé dans un milieu lipidique les interactions électrostatiques auraient sans doute compensé ces charges alors que dans le chloroforme, on ne retrouve pas ce type d'interaction.

## **B. Résultats des simulations**

Nous avons voulu suivre le comportement des hélices l'une par rapport à l'autre. Pour cela nous avons observé différents aspects : les distances interpeptidiques, l'angle entre les deux axes des hélices, les éventuelles stabilisations, l'hélicité du point de vue de sa conservation et des conversions  $\alpha \rightarrow \pi$  ou  $\alpha \rightarrow 3_{10}$  et les liaisons interpeptidiques.

## 1. Distances hélice-hélice

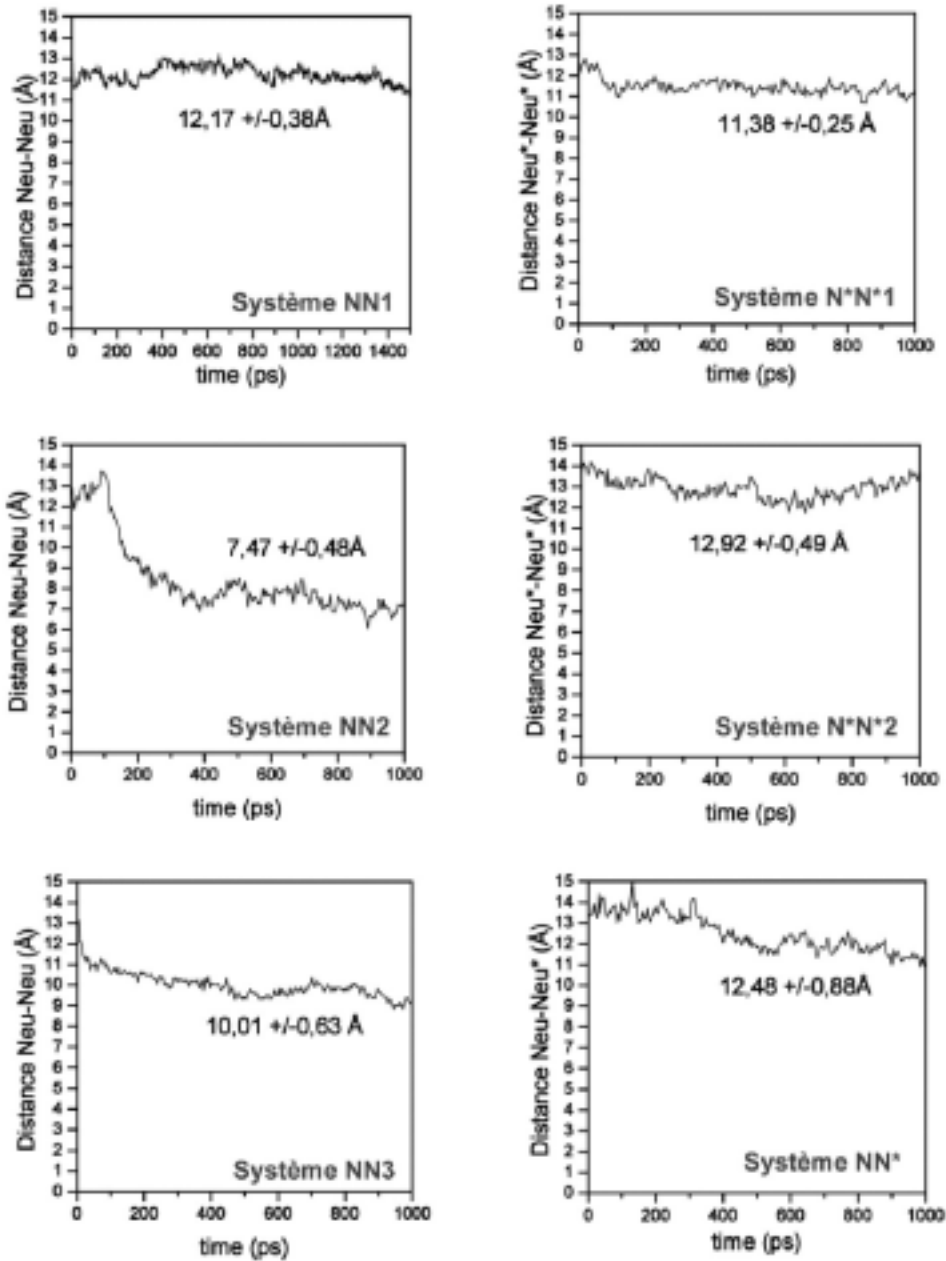
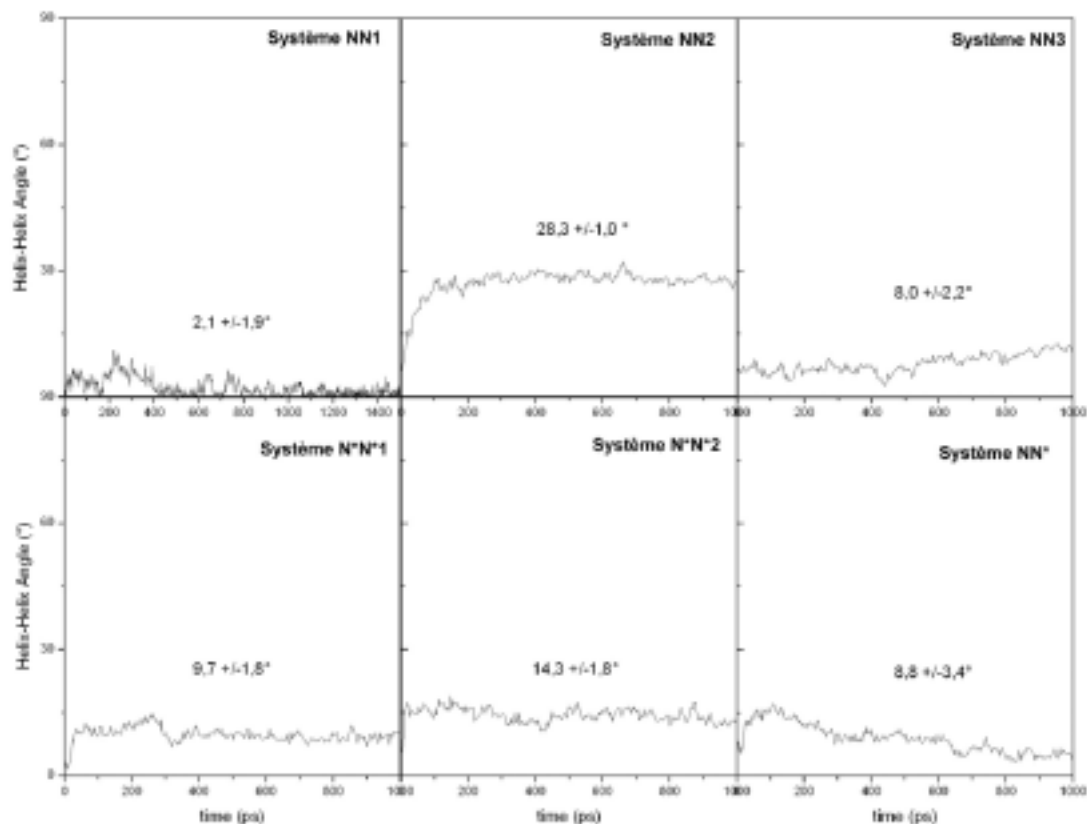


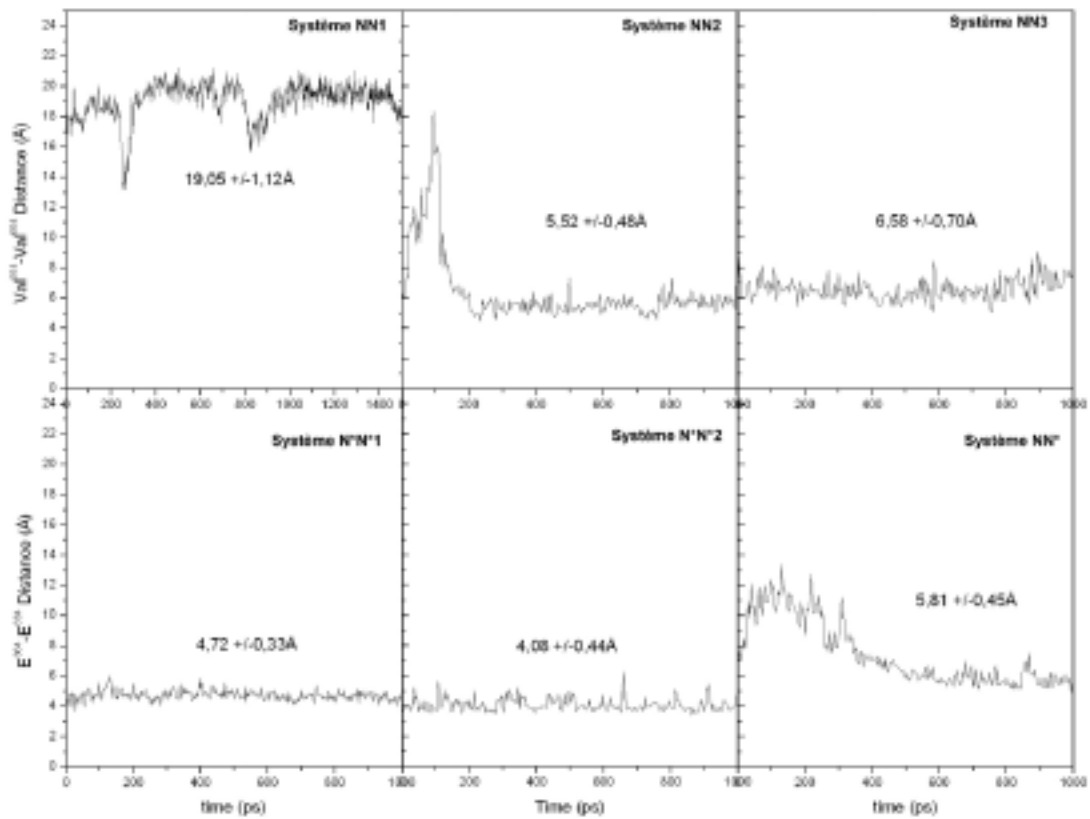
Figure IV.3 Evolution de la distance entre les deux hélices des formes dimères de Neu sauvage ou de Neu muté durant les simulations.

La Figure IV.3 présente la distance interpeptidique entre les barycentres de chaque hélice en fonction du temps. On observe que les hélices se rapprochent ou restent à une distance constante au cours des simulations. Les hélices qui se rapprochent le plus sont les cas des systèmes NN2 et NN3 avec consécutivement 7,47 Å et 10,01 Å. La distance interpeptidique entre les positions 664 interpeptidiques a été mesurée (Fig. IV.5). Les résidus en position 664 semblent rester ou atteindre des distances constantes tout comme les barycentres, deux rapprochements légers sont observés pour les systèmes NN1 et NN\*. Pour les deux systèmes NN2 et NN3, les Valines en position 664 sont placées l'une face à l'autre. Pour les autres systèmes, les hélices restent à des distances autour de 12 à 13 Å. Malgré le rapprochement des barycentres des hélices des systèmes NN2 et NN3, les hélices ne sont plus parallèles et semblent former une double hélice gauche. Quand on suit l'angle au cours du temps que font les deux axes des hélices l'un par rapport à l'autre (Fig. IV.4), on mesure une valeur assez élevée dans le cas du système NN2 et du système N\*N\*2 avec respectivement 28,3° et 14,3°.



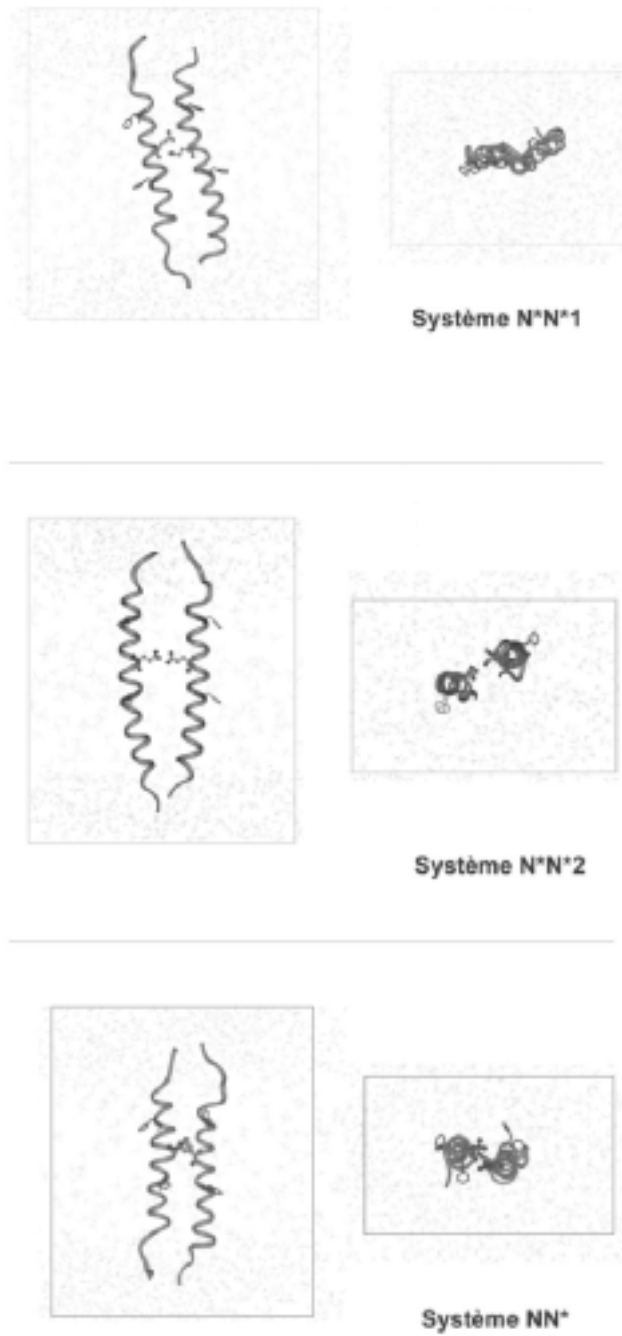
**Figure IV.4** Angles entre les deux hélices de la forme dimère de Neu sauvage et Neu muté.

Cependant quand on regarde les clichés à différents temps des simulations on peut voir la formation d'une double hélice dans les autres systèmes tels que les systèmes NN3, N×N×1 et NN× (Fig. IV.6 et IV.7), ce phénomène de formation de double hélice  $\alpha$  déjà été observé par Sajot *et al.* (Sajot, 2000) dans d'autres simulations.

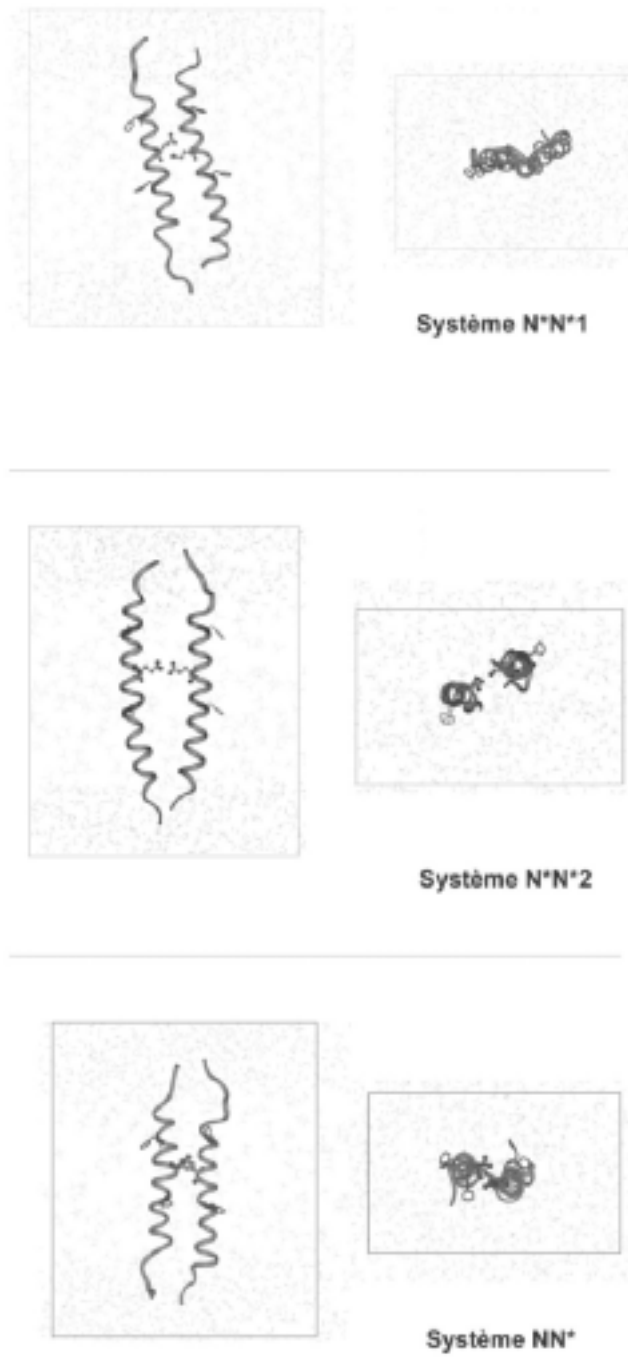


**Figure IV.5** Distances des résidus en position 664 des deux hélices Neu ou Neu muté.





**Figure IV.6 Images des systèmes de Neu natif en fin de simulation.** A gauche, vue de face et à droite vue de dessus des boîtes.

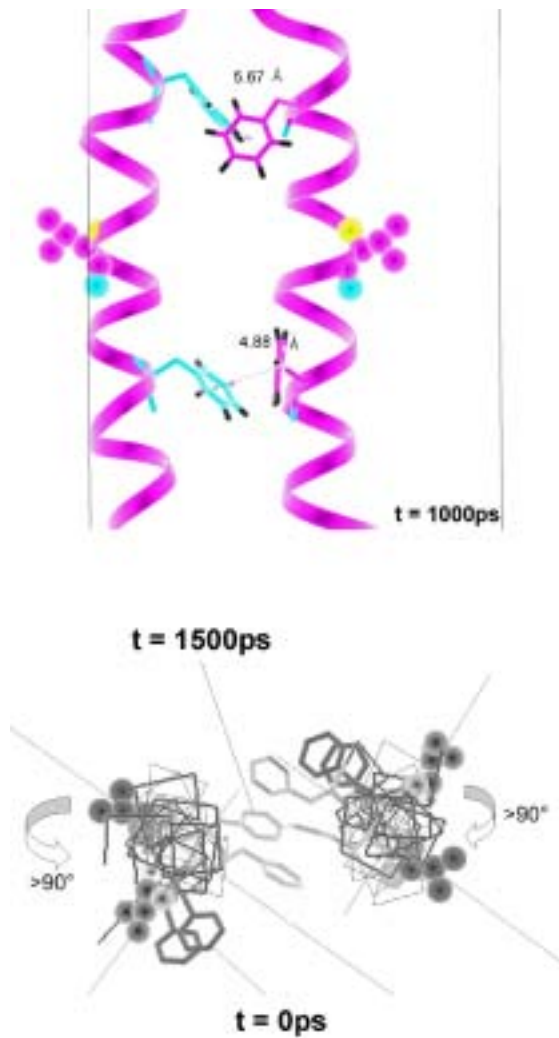


**Figure IV.7 Images des systèmes de Neu muté en fin de simulation.** A gauche, vue de face et à droite vue de dessus des boîtes.

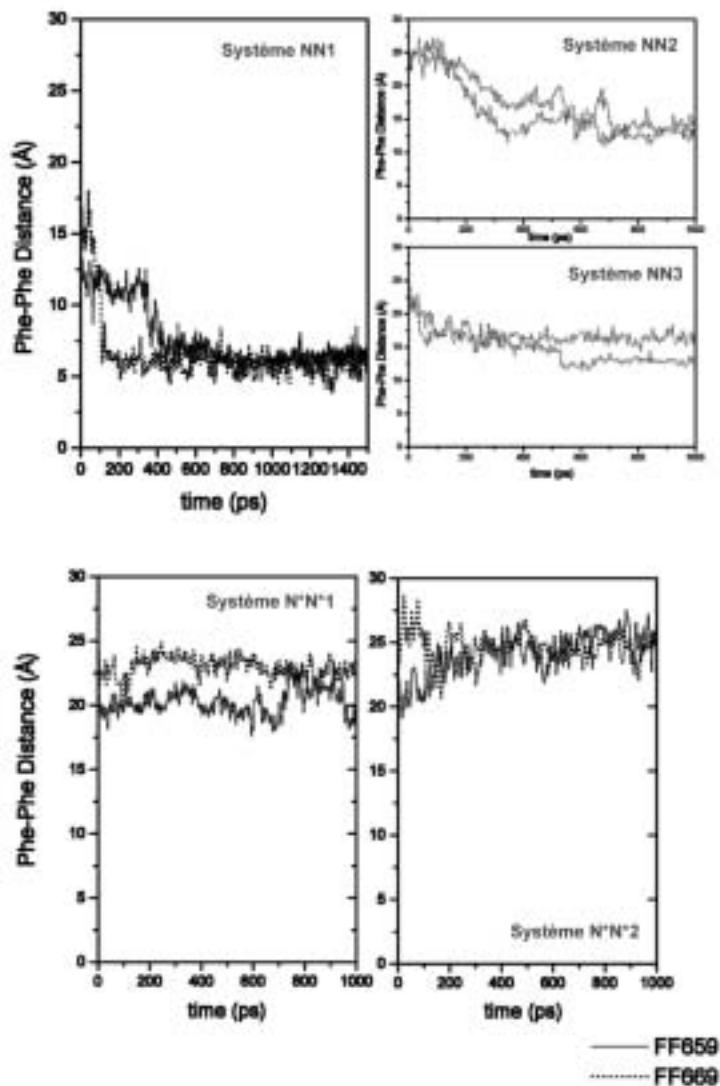
## 2. Stacking

Au cours de la simulation du système NN1, on observe la formation d'interactions faibles de type stacking interpeptidique des deux phénylalanines Phe 659 et 669 (Fig. IV.8). Sur cette figure, on peut voir deux interactions par stacking une  $\pi \rightarrow \pi$  (5,67Å) (Burley, 1985) et l'autre  $\sigma \rightarrow \pi$  (4,88Å).

Si la distance au cours du temps entre ces phénylalanines est représentée, (Figure IV.9), on observe qu'après 200 ps les deux phénylalanines ont trouvé une position stable à environ 5 Å qui correspondrait à une stabilisation par stacking, d'autre part quand on compare la position initiale du système NN1 et la position finale, les deux hélices semblent avoir tourné dans le même sens autour de l'axe de l'hélice d'un angle supérieur à 90° de façon à ce que les phénylalanines se retrouvent l'une en face de l'autre et forment ces interactions par stacking (Fig. IV.8).



**Figure IV.8** Image du stacking de la forme homodimère de Neu sauvage. En haut, image du stacking de la forme homodimère de Neu sauvage. En bas, superposition des hélices à  $t=0$  (en gris foncé) et  $t=1500$  ps (en gris clair) et sens de rotation.



**Figure IV.9** Distance Phe-Phe des deux hélices de l'homodimère Neu sauvage. En trait continu, distance  $F^{659}$ - $F^{659}$ , en trait pointillé  $F^{669}$ - $F^{669}$ .

Sur les systèmes NN2 et NN3 les phénylalanines se rapprochent aux alentours de 10 Å mais ne semblent pas pouvoir interagir entre elles. Dans ces deux cas les hélices tournent sur elles-mêmes autour de l'axe de l'hélice et ainsi s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice gauche. Ce phénomène est plus marqué dans le

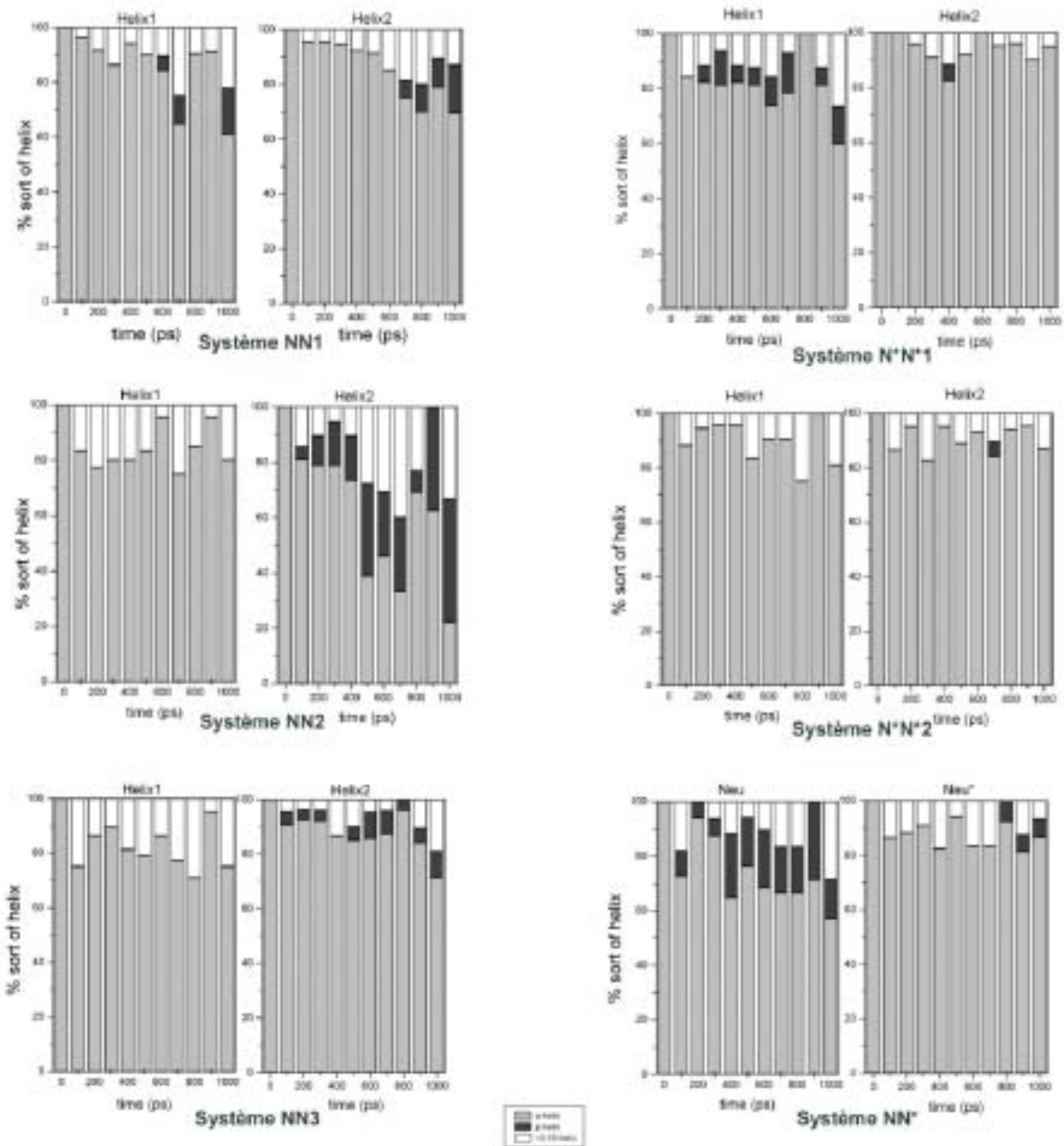
système NN2. Il faut rajouter que dans ce système les hélices ne tournent pas dans le même sens, donc le sens de rotation n'est pas forcément le même dans tous les cas. L'observation pour les systèmes de Neu muté est totalement différente, car les distances interpeptidiques entre les phénylalanines restent constantes au cours des simulations avec des valeurs supérieures à 20 Å pour les deux cas. Dans le cas du dimère Neu sauvage, on a l'impression que les hélices se comportent comme deux cylindres lisses tournant librement l'un autour de l'autre. Il semble ne pas y avoir de réelles affinités entre elles et en fait le moindre "accident" (présence des phénylalanines) suffit à provoquer une légère stabilisation. Ceci semble indiquer que la partie transmembranaire n'a aucune influence sur la stabilisation du dimère.

### 3. Hélicité

**Initialement, Neu (ou Neu\*) a été construit avec une structure en hélice  $\alpha$  idéale donc avec 30 liaisons Hydrogène intrapeptidiques entre les  $\text{CO}_i$  et  $\text{NH}_{i+4}$ . Le Tableau 7 présente le pourcentage moyen d'hélicité pour chaque hélice ou pour la moyenne des deux au cours des simulations. Ces pourcentages sont calculés par rapport au cas idéal de 30 liaisons Hydrogène intrapeptidiques et avec une imprécision de  $\pm 14\%$ . Il a été montré par Duneau *et al.* (Duneau, 1997) que une conversion d'hélice  $\alpha$  en hélice  $\pi$  ( $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+4} \rightarrow \text{CO}_i\text{-NH}_{i+5}$ ) peut se produire lors de simulation dans le vide. Nous avons déjà montré que ce phénomène pouvait être dû à un manque de pression latérale du milieu ambiant autour de l'hélice. Nous avons mesuré le pourcentage d'hélice  $\alpha$ ,  $\pi$  ou  $3_{10}$  pour chaque simulation ( Tableau 7).**

Systèmes	% Hélice1	% Hélice2	% moyen
NN1	73	72	73
NN2	72	56	64
NN3	71	80	76
N*N*2	59	72	65
N*N*3	73	69	71
NN*	59	62	61

**Tableau 7 Pourcentage moyen d'hélice  $\alpha$  de la forme homodimère de Neu**



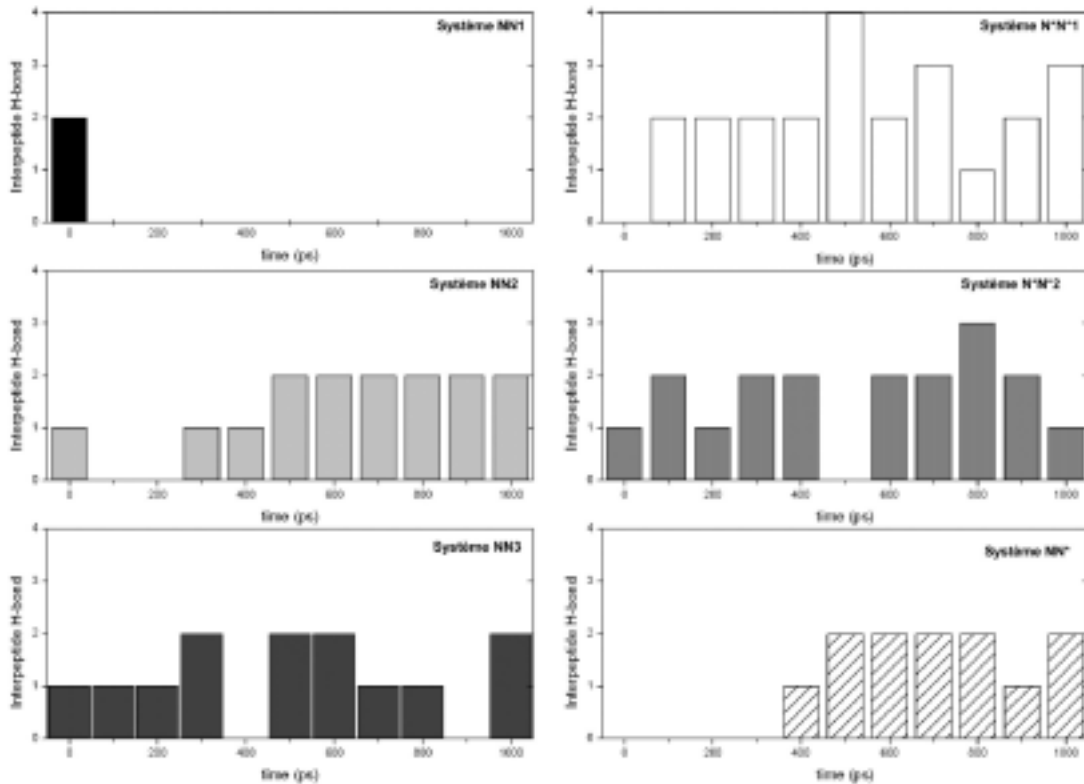
**Figure IV.10 Evolution des liaisons Hydrogène intrapeptidiques.** En gris hélice  $\alpha$ , en noir hélice  $\pi$  et en blanc hélice  $3_{10}$ .

Globalement, il apparaît que les hélices restent en hélice  $\alpha$  avec un pourcentage moyen au cours des simulations supérieur à 60% pour chaque système cependant des petites conversions  $\alpha \rightarrow \pi$  apparaissent dans certains cas, le plus marqué étant le



système NN2 et de façon moins prononcé le système NN3. En effet dans ces deux systèmes une seule hélice (hélice2) subit cette transformation, cette hélice  $\alpha$  a pu être attribué et il s'avère que c'est celle qui s'enroule le plus pour former la double hélice gauche au cours des dynamiques. Dans le système NN1, on retrouve cette transformation dans les deux hélices mais de façon plus ponctuelle et avec un pourcentage moins élevé. Pour les deux systèmes concernant Neu\*, le système N\*N\*1 semble plus affecté par cette transformation notamment sur une hélice (hélice1) alors que le même phénomène n'a pas été observé sur l'hélice correspondante du système N\*N\*2. Le système NN\*, quant à lui, présente une particularité puisqu'il engage l'hélice Neu et son mutant. Pour ce système, on observe seulement des hélices  $\pi$  pour l'hélice (hélice1) de Neu sauvage mais aucune pour l'hélice de Neu muté.

## 4. Liaisons Hydrogène interpeptidiques

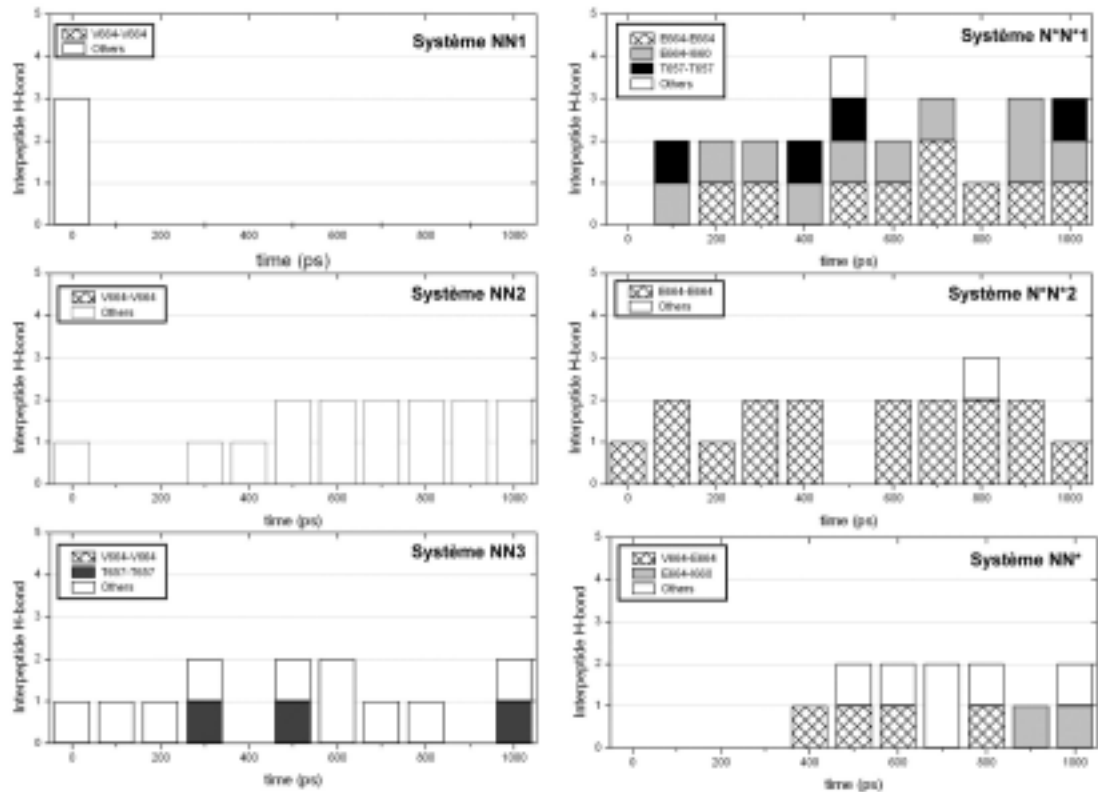


**Figure IV.11** Nombre de liaisons Hydrogène interpeptidiques de tous les systèmes homodimères de Neu.

L'hypothèse de départ repose sur la stabilisation de la forme homodimère du mutant Neu\* par des liaisons Hydrogène entre les deux acides glutamiques E<sup>664</sup>, nous avons donc mesuré le nombre de liaisons Hydrogène interpeptidiques pouvant se former au cours des simulations (Fig. IV.11).

Dans tous les systèmes, excepté le système NN1, au moins une liaison Hydrogène entre les deux hélices se forme. Cependant les résidus engagés dans ces liaisons ne

sont pas systématiquement en position 664 (site de mutation). Nous avons regardé plus en détails les résidus impliqués dans ces liaisons Hydrogène (Fig. IV.12)



**Figure IV.12 Résidus impliqués dans des liaisons Hydrogène interpeptidiques.** En hachuré interaction  $V^{664}-V^{664}$  ou  $E^{664}-E^{664}$ , en noir  $T^{657}-T^{657}$ , en gris  $E^{664}-I^{660}$ , en blanc interactions entre d'autres résidus aux extrémités des peptides.

Cette figure indique que, pour les systèmes NN2 et NN3, ce sont les résidus du  $N_{\text{term}}$  qui sont engagés dans ces liaisons notamment les résidus chargés tels que  $R^{682}$ , et  $G^{677}$  (système NN) et  $T^{657}$ ,  $I^{678}$ ,  $R^{682}$  et  $R^{683}$  (système NN3). Ces liaisons ne sont vraisemblablement pas à prendre en compte pour une éventuelle stabilisation de la

forme homodimère puisqu'il ne faut pas oublier que le reste du récepteur représente de part et d'autre des terminaisons du peptide de très grosses entités et que sans doute l'encombrement généré par ses deux parties du récepteur empêcherait ces liaisons de se former. Néanmoins, une liaison Hydrogène entre ces hélices peut être retenue comme une éventuelle stabilisation, celle qui se forme entre les deux T<sup>657</sup> pour le système NN3. En effet, on peut considérer que ce résidu n'est pas sur un bout de la chaîne peptidique, de plus on le retrouve engagé dans une autre liaison Hydrogène dans le système N\*N\*1. Donc la forme homodimère de Neu représentée par les systèmes NN1, NN2 et NN3 n'engendrent aucune stabilisation forte, la stabilisation par stacking restant une interaction faible. Pour la forme homodimère de Neu\*, il existe toujours ou presque une liaison Hydrogène entre deux résidus de la partie centrale de l'hélice notamment les résidus T<sup>657</sup>, I<sup>660</sup>, et E<sup>664</sup>. On observe, dans le cas du système N×N×1, une liaison Hydrogène entre E<sup>664</sup> et I<sup>660</sup> et on retrouve la liaison entre les deux T<sup>657</sup>. Il semblerait donc que la stabilisation puisse aussi se faire entre tout résidu susceptible de former des liaisons hydrogène et pas forcément entre les deux acides glutamiques en position 664. Dans ce cas particulier, on peut observer un rapprochement des deux hélices (Fig. IV.5) : chaque acide glutamique va engager des liaisons Hydrogène avec le squelette peptidique au niveau du résidu I<sup>660</sup>, ceci provoque un rapprochement des hélices suivi par la création d'autres liaisons hydrogène entre les résidus T<sup>657</sup>. La conséquence est donc un ensemble très conséquent de liaisons hydrogène échangées entre les deux hélices, ensemble vraisemblablement renforcé par des interactions de type Van der Waals entre résidus lipophiles. Cet ensemble semble finalement suffisant pour pouvoir expliquer la stabilisation du dimère et être ainsi la cause principale des effets délétères constatés. En effet il n'est pas nécessaire de stabiliser définitivement le dimère pour qu'un processus de cancérisation se mette en place, une modification du "turn-over" même faible peut suffire. Le cas du système N\*N\*2 ne donne pas le même résultat, sur le graphe de ce système il n'apparaît essentiellement que des liaisons Hydrogène entre

les deux acides glutamiques E<sup>664</sup> et presque deux chaque fois, mais il ne faut pas oublier que dès le départ ce système était contraint avec une liaison Hydrogène formée entre les deux acides glutamiques en position 664, ce qui montre que ces liaisons Hydrogène sont très fortes et pourraient stabiliser un système homodimère. Quand on examine le dernier système (système NN\*), il apparaît la formation de liaisons Hydrogène entre les deux résidus du site de mutation (position 664) mais aussi une liaison Hydrogène entre l'acide glutamique en position 664 et l'isoleucine en position 660, ce qui confirme encore une fois l'hypothèse précédente. En particulier, en l'absence de liaisons hydrogène préétablies, le résidu muté E<sup>664</sup> "accroche" rapidement le squelette peptidique du brin opposé, favorisant ainsi un rapprochement des hélices avec création de nouvelles liaisons hydrogène et interactions de type Van der Waals. Quant aux autres liaisons (en blanc sur les graphes de la Fig. IV.11), elles sont toutes situées sur les terminaisons Nterm et Cterm du peptide et peuvent être issues du rapprochement induit par la formation de la double hélice gauche et stabiliser cette double hélice. Il s'agit très vraisemblablement d'artefacts dus à la terminaison "anormale" de la chaîne peptidique conséquence de la construction du modèle. Les parties terminales sont peu structurées et donc susceptibles de former librement des liaisons interpeptidiques ce qui ne serait pas le cas si le squelette peptidique était complet.

## 5. Conclusion

Nos simulations ont été effectuées dans une interface eau/chloroforme qui confère aux dimères de peptides un environnement moléculaire avec les interactions de Van der Waals à défaut de conserver les interactions électrostatiques que l'on aurait pu avoir avec une membrane phospholipidique. Cependant cette interface a permis d'éliminer des phénomènes tels que la formation de liaisons peptides/lipides qui auraient alors ralenti considérablement le processus de stabilisation des formes

dimères. Tout comme l'équipe de Monique Genest qui simule erbB-2 dans le vide pour la majorité de ces simulations (Duneau, 1999, Duneau, 1997), nous avons trouvé mais aussi localisé la conversion  $\alpha \rightarrow \pi$  à travers l'hélice de Neu. Il s'est avéré que lors des résolutions des structures de Neu natif et de Neu muté l'équipe de RMN de notre laboratoire retrouvait comme nous que cette conversion se fait dans une région riche en valines. Ceci étant essentiellement à un relâchement de l'hélice conséquence d'un milieu peu contraignant. D'autre part, nous avons trouvé un processus de stabilisation pour chacune des formes dimères de Neu sauvage ou de Neu muté. Cependant, les liaisons Hydrogène sont des interactions plus fortes que les interactions par stacking. De plus nous avons bien montré, qu'un seul Neu muté suffit à créer des liaisons Hydrogène le peptide placé en face de lui. Il faut toutefois rester très prudent quant à conclure que seules ces liaisons Hydrogène seraient à l'origine de la stabilisation de la forme dimère et entraînerait le processus de cancérisation. En effet, la partie transmembranaire Neu considéré ne représente qu'une très petite partie du récepteur et les parties extramembranaires sont ment plus importantes et doivent participer grandement à ce processus, mais l'établissement de plusieurs liaisons Hydrogène comme on l'a vu dans le cas de l'homodimère muté peut perturber suffisamment le système pour provoquer des effets indésirables.



# Conclusion générale

Les simulations par dynamique moléculaire permettent maintenant d'étudier une assez variété de systèmes phospholipidiques ainsi que des systèmes avec des solutés, du cholestérol et des protéines membranaires. Nous avons montré dans les différentes parties de ce travail que dans la plupart des cas, les résultats obtenus par dynamique moléculaire corroborent les données expérimentales et que dans certains cas ces dernières sont retrouvées avec exactitude. De plus cette approche numérique a fourni des détails atomiques très intéressants sur la structure et la dynamique de nos systèmes complexes qui n'étaient pas accessibles par l'expérience. Nous avons aussi pu reproduire les premiers instants de phénomène biologique tel que l'insertion de peptides amphipathiques dans des membranes modèles.

## **Paramètres structuraux et dynamiques de bicouches phospholipidiques modèles**

On rappelle que l'étude des quatre bicouches DMPC, DMPE, DMPS et DMPG n'a été entreprise que pour fabriquer des couches équilibrées pour le thème général de ce travail : l'insertion de peptides dans des membranes modèles. Néanmoins une étude plus approfondie pourrait faire l'objet d'un travail plus complet, notamment concernant les phospholipides chargés négativement. En effet ce travail présente l'originalité d'étudier des phospholipides de DMPS et DMPG très présents dans les membranes naturelles et qui semblent jouer un rôle important dans certains processus physiologiques (ex : détresse respiratoire chez l'enfant prématuré). De plus il existe d'autres phospholipides très intéressants tels que les cardiolipines qui constituent la membrane mitochondriale et les lipopolysaccharides qui forment les membranes bactériennes dont nous avons construit des bicouches stables qui sont actuellement en



cours d'études et qui devraient permettre à terme d'étudier l'insertion de divers solutés (antibiotiques,...).

D'autre part, 2 ns de simulation semble être la durée minimale pour reproduire des phénomènes tels que la diffusion latérale. De la mesure du MSD des lipides, nous en avons déduit le coefficient de diffusion latérale à  $8,8 \cdot 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s pour la tête polaire et à  $1,7 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s pour le lipide entier du DMPC. Ces deux coefficients calculés sont en parfait accord avec les données expérimentales obtenues par des techniques comme le FRAP et IQENS. De plus les images stroboscopiques des différentes couches montrent que les lipides commencent seulement au bout de 2 ns à se répartir sur la surface disponible, mais cependant aucun échange de position entre deux lipides ne s'est produit (le minimum de temps est supérieur à 10 ns). Alors que le résultat précédent a été retrouvé avec exactitude, une durée de simulation plus importante serait nécessaire pour une détermination plus précise de paramètres structuraux tels que l'aire par lipide, de l'épaisseur hydrophobe et du paramètre de fluidité obtenu à partir du taux de conformères gauches. Bien que nos valeurs soient plus proches des données expérimentales que celles trouvées dans d'autres simulations, elles restent encore un peu élevées pour les aires de surface (+1 Å<sup>2</sup>) et avec une incertitude de 5 à 10% pour le taux de conformères gauches. Cependant tous ces résultats sont très intéressants et montrent que la dynamique moléculaire est un outil approprié à l'étude de tels systèmes et devient dans ce domaine complémentaire d'autres méthodes spectroscopiques (RMN, RX, PMIRRAS,...).

### **Interactions peptides/membranes modèles**

Les interactions peptides-membranes font l'objet de nombreuses études du point de vue expérimental mais aussi du point de vue de la simulation numérique. Dans ce travail, l'approche par la dynamique moléculaire nous a permis de décrire la stabilité de films de peptides amphipathiques synthétiques (L<sub>i</sub>K<sub>j</sub>) à l'interface eau/air mais

aussi de reproduire de façon très précise les premiers instants du phénomène d'insertion de ces peptides dans des films de DMPC. Comme nous l'avons montré les résultats de cette étude sont en parfait accord avec les données PMIRRAS, en effet nous avons pu décrire le mode d'insertion à plat de ces peptides dans des films de Langmuir et définir les zones plus ou moins perturbées de la tête polaire des lipides sous l'influence de la structure secondaire des peptides. D'autre part, l'introduction de la couche chargée négativement (DMPG) permet d'apporter de nouvelles perspectives sur des expériences en cours. Quant au peptide amphipathique naturel, la Temporine A, l'étude de son orientation suivant le type de couche phospholipidique utilisée, a conduit à penser que les lipides de DMPG étaient plus fortement perturbés par la présence de ce peptide que ne le sont les lipides de DMPC. L'étude de l'orientation préférentielle de l'hélice de la protéine SP-C dans les différentes couches (mono et bicouches) du surfactant pulmonaire a fourni des résultats très intéressants. En effet en s'appuyant sur les hypothèses et les données expérimentales, des simulations de 1 à 2 ns nous ont permis de montrer que dans une bicouche, l'axe de l'hélice reste pratiquement dans sa position initiale alors que, dans une monocouche, il s'incline pour atteindre une position stable à environ  $65^\circ$  par rapport à la normale à la couche. Cette valeur d'inclinaison a été retrouvée par plusieurs simulations et d'autre part elle est très proche de l'intervalle expérimental (de  $70^\circ$  et  $80^\circ$ ). Dans la dernière partie, une façon différente d'appréhender le problème a été utilisée. En effet, dans cette partie l'intérêt était focalisé essentiellement sur les interactions entre deux peptides placés dans un environnement membranaire. Donc pour conserver l'hydrophobie et l'environnement moléculaire d'un milieu membranaire mais en éliminer les interactions électrostatiques dues aux lipides, nous avons utilisé une interface eau/chloroforme. Les différentes simulations des formes homodimères de Neu sauvage, Neu muté et une forme hétérodimère des deux peptides ont permis de montrer que la présence d'un peptide muté suffit à créer une stabilisation par liaison Hydrogène. Dans le cas de la forme homodimère de Neu sauvage, aucune liaison

Hydrogène n'a pu être détectée et seule, une stabilisation faible par stacking a été observée.

### **De façon plus générale**

La comparaison entre les trajectoires calculées par simulation et les données expérimentales a conduit les groupes de recherche à montrer que la simulation par dynamique moléculaire fournit une bonne description des dynamiques de membranes modèles et de systèmes peptides/membranes. Les simulations par dynamique moléculaire tout atome de systèmes complexes tels que les membranes phospholipidiques apportent une description fiable et précise de ces systèmes à condition qu'ils aient été construits et équilibrés avec précaution. Bien qu'il soit vrai que sur une courte échelle de temps (inférieure à 1 ns), la construction des systèmes simulés, qui coïncide directement avec les propriétés expérimentales utilisées, puisse biaiser les résultats, l'accord entre des systèmes identiques simulés par différents groupes de recherche, utilisant des champs de force et des conditions limites différents, implique généralement que de telles simulations représentent fidèlement les résultats expérimentaux. Cet accord entre les systèmes simulés et l'expérience ainsi que l'avancée informatique permettant d'augmenter progressivement l'échelle de temps et la taille des systèmes améliorent les comparaisons pertinentes et détaillées. Finalement, grâce aux progrès continus de la puissance des ordinateurs, du travail continu effectué sur les champs de force et les algorithmes, mais grâce aussi à la quantité de résultats significatifs qui corroborent les mesures expérimentales, il sera bientôt possible, en dehors du "cercle des modélisateurs", de parler d'"expériences de simulation" au même titre que d'expériences RMN ou IR.

# ANNEXES



# ANNEXE A

## Construction des bicouches

Les couches de DSPC et de DPPC sont construites à partir de l'aire/lipide utilisé pour le DMPC.

Phospholipides	$a \times b \times c$ (Å)	$A_0$ (Å <sup>2</sup> /lipide)	$n_w$	N	$T_{sim}$ (K)	Durée <sub>sim</sub> (ps)
DMPC	42,5×60×44,4	62,9	21,5	10947	320	2 001,0
DMPE	41×70×42,6	58,22	28,9	11742	333	2 001,0
DMPS	42,5×60×44,4	62,9	27,7	11703	330	2 001,0
DMPG	42,5×70×44,4	62,9	27,8	11898	316	2 001,0
DPPC/DPPG (4 : 1)	42,5×70×44,4	62,9	27	11746	330	-

**Tableau A. 1 Paramètres de construction des boîtes et durée des simulations des bicouches.**

- $a \times b \times c$  : dimensions de la boîte;
- $A_0$  : aire de surface lipidique initiale;
- $n_w$  : nombre de molécules d'eau par lipide;
- N : nombre total d'atomes;
- $T_{sim}$  : température de la simulation;
- Durée<sub>sim</sub> : durée des simulations à pression constante



# ANNEXE B

## Construction des films de peptides

- **Film de peptides en hélice  $\alpha$**

- **Système Film LK<sub>15</sub>**

On utilise le peptide amphipathique secondaire LK<sub>15</sub> structuré en hélice  $\alpha$ . Quatre peptides LK<sub>15</sub> sont placés à l'interface eau/air, leurs hélices sont parallèles, leurs parties hydrophiles sont immergées dans l'eau et la distance interhélicoïdale est d'environ 14 Å. Deux cas ont été construits :

- **Système Film LK<sub>15</sub>(1)**

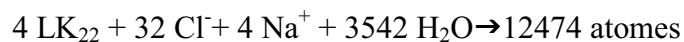
toutes les terminaisons N<sub>term</sub> sont du même côté. Les charges portées par le peptide sont neutralisées par 5 ions chlorures et 1 ion sodium. Le système est placé dans une boîte (63×50×30)Å<sup>3</sup>. Il est composé de 4964 atomes dont 1228 molécules d'eau. Une dynamique à volume constant est effectuée à 300K pendant 300 ps avec un potentiel répulsif sur le haut et le bas de la boîte.

- **Système Film LK<sub>15</sub>(2)**

on alterne les peptides de façon à ce qu'une terminaison N<sub>term</sub> soit entourée de deux terminaisons C<sub>term</sub>. Les charges des peptides ne sont pas neutralisées. Le système est placé dans une boîte (63×50×30)Å<sup>3</sup>. Il est composé de 4940 atomes dont 1228 molécules d'eau. Une dynamique à volume constant est effectuée à 300K pendant 500 ps avec un potentiel répulsif sur le haut et le bas de la boîte

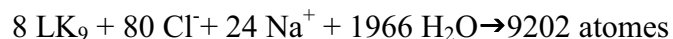


## - **Système Film LK22**



On utilise le peptide amphipathique secondaire LK<sub>22</sub> structuré en hélice  $\alpha$ . Quatre peptides sont placés à l'interface eau/air dans une boîte  $(64 \times 80 \times 45) \text{ \AA}^3$  : la partie hydrophile est immergée dans l'eau, l'axe des hélices est perpendiculaire à la normale à l'interface, et ils sont tous parallèles (tous les N<sub>term</sub> du même côté). Les charges du peptide sont neutralisées par 8 ions chlorures et un ion sodium. On obtient un système de 12474 atomes dont 3542 molécules d'eau. Une dynamique à volume constant est effectuée à 300K pendant 1136 ps avec un potentiel répulsif sur le haut et le bas de la boîte.

## • **Film de peptides en feuillets $\beta$ : Système Film LK<sub>9</sub>**



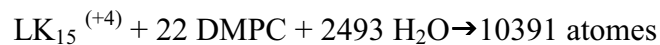
On utilise des feuillets  $\beta$  formés de deux brins antiparallèles de LK<sub>9</sub>, peptide amphipathique secondaire. Un premier système de 4 feuillets a été construit pour paramétrer les conditions initiales et la stabilité du système. Puis, le système de 8 peptides LK<sub>9</sub> en feuillets  $\beta$  a été construit. Les 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles soit 16 brins ont été placés sur le même plan qui passe par tous les C $\alpha$  des brins à une distance de 7  $\text{ \AA}$  les uns des autres. Ainsi chaque brin est entouré de deux autres brins antiparallèles et on a donc formé un feuillet géant de 16 brins antiparallèles. Ce feuillet géant est placé au centre d'une boîte de  $(63 \times 55 \times 45) \text{ \AA}^3$ , la partie hydrophile du "macrofeuillet" pointe vers le bas de la boîte. Le bas de boîte est rempli d'eau jusqu'au plan médian du feuillet. Pour neutraliser les charges portées par le peptide, 10 ions chlorures et 3 sodiums par peptide sont introduits dans l'eau. On obtient un système de 9202 atomes dont 1966 molécules d'eau. Une dynamique à pression constante est effectuée à 300K pendant 1080 ps avec un potentiel répulsif sur le haut et le bas de la boîte.

# ANNEXE C

## Systèmes peptides/membranes phospholipidiques

### 1. Insertion des peptides idéalement amphipathiques

- **Système 1a : Peptide LK<sub>15</sub> dans une monocouche de DMPC (A= 80 Å<sup>2</sup>)**



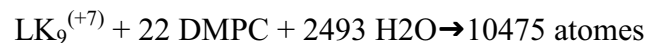
Une monocouche cristalline hexagonale de 50 DMPC a été construite (A= 40 Å<sup>2</sup>) et minimisée (RMS~0.01 kJ.Å<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>), ensuite la moitié des lipides sont retirés pour récupérer une monocouche de 25 DMPC (A = 80 Å<sup>2</sup>). Cette nouvelle monocouche est insérée dans le haut d'une boîte d'eau 52×65×38,5 Å<sup>3</sup> (V=130130 Å<sup>3</sup>). 3 DMPC sont retirés du centre de la monocouche et le peptide est ancré dans le trou juste à l'interface eau/monocouche. Dans le cas présent, l'aire par lipide de la monocouche a été choisie à 80 Å<sup>2</sup> pour mimer une pression latérale basse exercée sur la monocouche. Le système total est composé de 10 391 atomes, avec 2493 H<sub>2</sub>O (n<sub>w</sub>~ 113). Le peptide LK<sub>15</sub> porte une charge de +4e. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante (P= 1 bar) et à T= 310K pendant 1000,5 ps.

- **Système 1b : Peptide LK<sub>15</sub> dans une monocouche de DMPC (A= 62,9 Å<sup>2</sup>)**



La monocouche de DMPC utilisée pour ce système est prélevée dans une bicouche entièrement hydratée, minimisée et préalablement dynamisée pendant 2 ns à pression constante ( $P = 1$  bar) à une température de 320K (Ichimori, 1998), l'aire par lipide obtenue est alors de  $62,9 \text{ \AA}^2$ . 4 DMPC ( $S_{\text{mol}} \sim 250 \text{ \AA}^2$ ) ont été retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. Ce système est inséré dans une boîte ( $42,5 \times 65 \times 44,4 \text{ \AA}^3$ ) ( $V = 122655 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 9652 atomes avec 2088 molécules d'eau ( $n_w \sim 80$ ). Le peptide  $\text{LK}_{15}$  porte une charge de +4e neutralisées par 5 chlorures et un sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P = 1$  bar) et à  $T = 310\text{K}$  pendant 1000,5 ps.

- **Système 2a : Peptide  $\text{LK}_9$  dans une monocouche de DMPC ( $A = 80 \text{ \AA}^2$ )**



Le système 2a résulte de la substitution du peptide  $\text{LK}_{15}$  du système 1a par le peptide en feuillet  $\beta$  antiparallèles  $\text{LK}_9$ . On obtient ainsi un système total composé de 10 475 atomes avec 2493  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 113$ ). Le peptide  $\text{LK}_9$  porte une charge de +7e. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P = 1$  bar) et à  $T = 310\text{K}$  pendant 1000,5 ps.

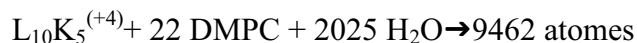
- **Système 2b : Peptide  $\text{LK}_9$  dans une monocouche de DMPC ( $A = 62,9 \text{ \AA}^2$ )**



Le système 2b résulte de la substitution du peptide  $\text{LK}_{15}$  du système 1b par le peptide en feuillet  $\beta$  antiparallèles  $\text{LK}_9$ . On a retiré l'eau avant de remplacer le peptide, puis on la rajoute. On obtient ainsi un système total composé de 9675 atomes avec 2069  $\text{H}_2\text{O}$

( $n_w \sim 80$ ). Le peptide LK<sub>9</sub> porte une charge de +7e. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante et à T= 310K pendant 1000,5 ps.

- **Système 3a : Peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans une monocouche de DMPC (A= 80 Å<sup>2</sup>)**



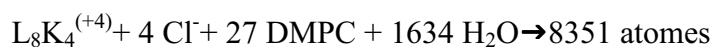
Le système 3a résulte de la substitution du peptide LK<sub>9</sub> du système 2a par le peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub>. On obtient ainsi un système total composé de 10389 atomes avec 2493 H<sub>2</sub>O ( $n_w \sim 114$ ) et une boîte (52×65×38,5)Å<sup>3</sup> (V= 130130Å<sup>3</sup>). Le peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> porte une charge de +4e. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante (P = 1 bar) et à T= 310K pendant 1000,5 ps.

- **Système 3b : Peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> dans une monocouche de DMPC (A= 62,9 Å<sup>2</sup>)**



Le système 3b résulte de la substitution du peptide LK<sub>9</sub> du système 2b par le peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub>. L'eau est retirée avant l'insertion du nouveau peptide, puis rajoutée. On obtient ainsi un système total composé de 9462 atomes avec 2025 H<sub>2</sub>O ( $n_w \sim 75$ ) et une boîte de (42,5×62×44,4)Å<sup>3</sup> (V= 116994Å<sup>3</sup>). Le peptide L<sub>10</sub>K<sub>5</sub> porte une charge de +4e neutralisée par 5 chlorures et un ion sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante (P = 1 bar) et à T= 310K pendant 1000,5 ps.

- **Système 4 : Peptide L<sub>8</sub>K<sub>4</sub> dans une monocouche de DMPC (A= 62,9 Å<sup>2</sup>)**



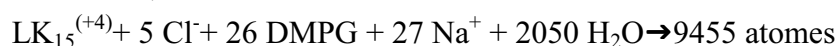
La monocouche de DMPC utilisée pour ce système est prélevée dans une bicouche entièrement hydratée, minimisée et préalablement dynamisée pendant 2 ns à pression constante ( $P= 1$  bar) à une température de 320K (Ichimori, 1998), l'aire par lipide ainsi obtenue est de  $62,9 \text{ \AA}^2$ . 3 DMPC ( $S_{\text{mol}} \sim 190 \text{ \AA}^2$ ) sont retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. Ce système est inséré dans une boîte ( $42,5 \times 60 \times 44,4$ ) $\text{\AA}^3$  ( $V= 122655 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 8351 atomes avec 1634 molécules d'eau ( $n_w \sim 60,5$ ). Le peptide  $L_8K_4$  porte une charge de +4e neutralisées par 4 chlorures. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante et à  $T= 310\text{K}$  pendant 1000,5 ps.

- **Système 5 : Peptide  $L_{10}K_5$  dans une monocouche de DSPC ( $A= 62,9 \text{ \AA}^2$ )**



La monocouche de DSPC est entièrement hydratée, et a été minimisée et dynamisée pendant 1 ns à pression constante ( $P= 1$  bar) à  $T= 340\text{K}$  (Ladbrooke, 1969, Lipka, 1984), l'aire par lipide ainsi obtenue est de  $62,9 \text{ \AA}^2$ . 4 DSPC ( $S_{\text{mol}} \sim 252 \text{ \AA}^2$ ) sont retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. Le barycentre des  $C\alpha$  du peptide est superposé à celui des phosphores des phospholipides. Ce système est inséré dans une boîte d'eau de ( $41,5 \times 60 \times 43,5$ ) $\text{\AA}^3$  ( $V= 108315 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 9135 atomes avec 1708 molécules d'eau ( $n_w \sim 66$ ). Le peptide  $L_{10}K_5$  porte une charge de +4e neutralisées par 5 chlorures et un ion sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante et à  $T= 340\text{K}$  pendant 1000,5 ps.

- **Système 6a : Peptide  $LK_{15}$  dans une monocouche de DMPG ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**



La monocouche de DMPG utilisée pour ce système a été dynamisée pendant 1 ns à pression constante ( $P= 1$  bar) à  $T= 316$ K (Findlay, 1978, Van Dijck, 1978), l'aire par lipide ainsi obtenue est de  $58,8 \text{ \AA}^2$ . 4 DMPG ( $S_{\text{mol}} \sim 234 \text{ \AA}^2$ ) sont retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. La partie hydrophile du peptide se trouve vers le milieu lipidique, et la partie hydrophobe vers l'eau. Ce système est inséré dans une boîte d'eau ( $41 \times 65 \times 42,7 \text{ \AA}^3$ ) ( $V= 113795,5 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 9455 atomes avec 2050  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 80$ ). Le peptide  $\text{LK}_{15}$  porte une charge de  $+4e$  neutralisées par 5 chlorures et un sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante et à  $T= 316$ K pendant 1000,5 ps.

- **Système 6b : Peptide  $\text{LK}_{15}$  dans une monocouche de DMPG ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**



Le système 6b est construit à partir du système 6a, par rotation de  $180^\circ$  autour de l'axe z pour avoir la partie hydrophobe du peptide vers le milieu lipidique, et la partie hydrophile vers l'eau. Ce système conserve les mêmes caractéristiques de boîte que le système (6a). Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante et à  $T= 316$ K pendant 1000,5 ps.

- **Système 7 : Peptide  $\text{LK}_9$  dans une monocouche de DMPG ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**



Le système 7 résulte de la substitution du peptide  $\text{LK}_{15}$  du système 6b par le peptide en feuillets  $\beta$  antiparallèles  $\text{LK}_9$ . On a retiré l'eau avant de replacer le peptide, puis on l'a rajoutée. On obtient ainsi un système total composé de 9446 atomes avec 2016  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 78$ ). Le peptide  $\text{LK}_9$  porte une charge de  $+7e$  neutralisée par 7 chlorures.

Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P=1$  bar) et à  $T=316$ K pendant 1000,5 ps.

- **Système 8 : Peptide  $L_{10}K_5$  dans une monocouche de DMPG**  
( $A=58,4 \text{ \AA}^2$ )



Le système (8) est construit à partir du système (6b), par substitution du peptide  $LK_{15}$ . Le système total est composé de 8455 atomes dont 1715  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 66$ ). Le peptide  $L_{10}K_5$  porte une charge  $+4e$  neutralisée par 5 chlorures et un sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P=1$  bar) et à  $T=316$ K pendant 1000,5 ps.

## 2. Insertion d'un peptide naturel, la Temporine A

- **Système 9a : Peptide TempoA dans une monocouche de DMPC**  
( $A=62,9 \text{ \AA}^2$ )



La monocouche de DMPC utilisée pour ce système est prélevée dans une bicouche entièrement hydratée, minimisée et dynamisée pendant 2 ns à pression constante ( $P=1$  bar) à  $T=320$ K (Ichimori, 1998) et dont l'aire par lipide est à  $62,9 \text{ \AA}^2$ . 3 DMPC ( $S_{\text{mol}} \sim 189 \text{ \AA}^2$ ) sont retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. L'axe de l'hélice du peptide est placé parallèlement au plan de la monocouche. Le barycentre des  $C\alpha$  est superposé au barycentre des phosphores des lipides de DMPC. Ce système est inséré dans une boîte d'eau ( $42,5 \times 60 \times 44,4 \text{ \AA}^3$ ) ( $V=113220 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 8463 atomes avec 1715  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w=64$ ). Le peptide TempoA porte une charge de  $+2e$  neutralisée par 2 chlorures. Après avoir minimisé le

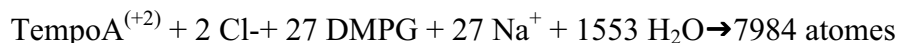
système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P= 1$  bar) et à  $T= 310K$  pendant 1000,5 ps.

- **Système 9b : Peptide TempoA dans une monocouche de DMPC ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**



Ce système est construit à partir du système 9a, par rotation du peptide autour de l'axe z, de telle sorte que l'axe de l'hélice du peptide soit perpendiculaire au plan de la monocouche (plan xOz) (longueur de l'hélice  $\sim$  diamètre de l'hélice). Ce système conserve les mêmes caractéristiques de boîte que le système (9a). Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P= 1$  bar) et à  $T= 310K$  pendant 1000,5 ps.

- **Système 10a : Peptide TempoA dans une monocouche de DMPG ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**

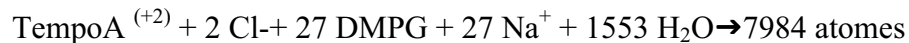


La monocouche de DMPG utilisée pour ce système est prélevée dans une bicouche entièrement hydratée, minimisée et dynamisée pendant 2 ns à pression constante ( $P=1$  bar) à  $T= 316$  K (Findlay, 1978, Van Dijck, 1978) et dont l'aire par lipide est de  $58,8 \text{ \AA}^2$ . 3 DMPG ( $S_{\text{mol}} \sim 177 \text{ \AA}^2$ ) sont retirés au centre de la couche pour créer un trou d'insertion. L'axe de l'hélice du peptide est placé parallèlement au plan de la monocouche. Le barycentre des  $C\alpha$  est superposé au barycentre des phosphores des lipides de DMPG. Ce système est inséré en haut d'une boîte ( $42 \times 60 \times 42 \text{ \AA}^3$ ) ( $V= 105840 \text{ \AA}^3$ ). Le système total est composé de 7984 atomes avec 1553  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 57,5$ ). Le peptide TempoA porte une charge  $+2e$  neutralisée par 2 chlorures. Après avoir



minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P= 1$  bar) et à  $T= 316$ K pendant 1000,5 ps.

- **Système 10b : Peptide TempoA dans une monocouche de DMPG ( $A= 58,4 \text{ \AA}^2$ )**



Ce système est construit à partir du système 10a, par rotation du peptide autour de l'axe z, de telle sorte que l'axe de l'hélice du peptide soit perpendiculaire au plan de la monocouche (plan xOz). Ce système conserve les mêmes caractéristiques de boîte que le système (10a). Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P= 1$  bar) et à  $T= 316$ K pendant 1000,5 ps

### 3. Insertion du peptide $\text{LK}_{15}$ dans une bicouche de DMPC

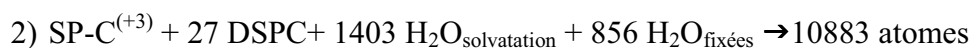
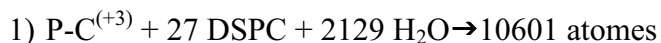
- **Système 11 : Peptide  $\text{LK}_{15}$  dans une bicouche de DMPC ( $A= 62,9 \text{ \AA}^2$ )**



4 DMPC sont retirées au centre d'un des deux feuilletts d'une bicouche de DMPC préalablement dynamisée pendant 2 ns à pression constante ( $P=1$  bar) ( $A= 62,9 \text{ \AA}^2$ ). Le peptide est inséré dans le trou, le barycentre des  $\text{C}\alpha$  du peptide  $\text{LK}_{15}$  étant superposé au barycentre des phosphores des phospholipides, l'axe de l'hélice  $\perp$  parallèle au plan de la couche. Le système est alors introduit dans une boîte d'eau ( $42 \times 80 \times 44 \text{ \AA}^3$ ) ( $V= 147840 \text{ \AA}^3$ ) qui est rempli d'eau. Le système total est composé de 13345 atomes avec 2139  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 38$ ). Le peptide  $\text{LK}_{15}$  porte une charge +4e neutralisée par 5 chlorures et un ion sodium. Après avoir minimisé le système, on effectue une dynamique à pression constante ( $P= 1$  bar) et à  $T= 310$ K pendant 1000,5 ps.

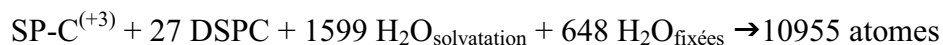
#### 4. Systèmes avec la protéine du surfactant pulmonaire SP-C

- **Système A : SP-C dans une monocouche de DSPC (A= 62,9 Å<sup>2</sup>)**



Une monocouche hexagonale de 30 DSPC a été construite ( $A = 62,9 \text{ Å}^2$ ) et minimisée ( $\text{RMS} \sim 0.01 \text{ kJ.Å}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ). 3 DSPC sont retirés du centre de la monocouche et l'axe de l'hélice du peptide SP-C est positionné dans le trou perpendiculairement au plan de la monocouche (plan xOz). Ce système est placé sur le haut d'une boîte d'eau ( $42,5 \times 70 \times 44,4 \text{ Å}^3$ ). Le peptide SP-C porte une charge +3e. Ce système est composé de 10 601 atomes dont 2139 H<sub>2</sub>O ( $n_w \sim 79$ ). Le système est ensuite minimisé suivant la méthode décrite dans la Section 9.3.1. Ce premier système subit une dynamique à pression constante de 2 ns avec un potentiel répulsif sur le haut et le bas de la boîte. L'eau est ensuite retirée et le système est placé au centre d'une boîte ( $41,7 \times 100 \times 43,6 \text{ Å}^3$ ). Une couche d'eau de solvation, 1403 H<sub>2</sub>O<sub>solvation</sub>, ( $n_w \sim 52$ ) est rajoutée et une deuxième couche d'eau (856 H<sub>2</sub>O<sub>fixées</sub>) est placée en haut de la boîte du côté de l'eau de solvation. Cette seconde couche sera fixe au cours des simulations pour mimer un fond de boîte et éliminer ainsi le potentiel répulsif sur le plan xOz. Ceci dans le but d'éviter un artefact de calcul. Ce second système sera dynamisé à volume constant pendant 631,5 ps.

- **Système B : SP-C dans une monocouche de DSPC (A= 62,9 Å<sup>2</sup>)**



Le système A avant minimisation est placé au centre d'une boîte  $42,5 \times 100 \times 44,4 \text{ \AA}^3$  puis hydraté avec 1599  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w \sim 59$ ) et une seconde couche d'eau de 648 molécules fixées d'environ  $10 \text{ \AA}$  d'épaisseur est placée en haut de la boîte du côté du milieu aqueux ; cette eau sera fixée durant la simulation. Le système est minimisé et dynamisé à volume constant pendant 2004 ps à  $T = 343 \text{ K}$ . Le système total est composé de 10 955 atomes dont 1599  $\text{H}_2\text{O}_{\text{solvation}}$  et 648  $\text{H}_2\text{O}_{\text{fixées}}$ . Le peptide SP-C porte une charge  $+3e$ .

- **Système C : SP-C dans une monocouche de DPPC/DPPG (4 : 1) ( $A = 62,9 \text{ \AA}^2$ )**

$\text{SP-C}^{(+3)} + 3\text{Cl}^- + 21 \text{ DPPC} + 6 \text{ DPPG} + 6\text{Na}^+ + 932\text{H}_2\text{O}_{\text{solvation}} + 339\text{H}_2\text{O}_{\text{fixées}} \rightarrow 7750$   
atomes

Le système C est obtenu à partir du système D (cf. ci-dessous) et en retirant le feuillet contenant les 5 DPPG (côté  $C_{\text{term}}$ ). Ce système est placé au centre d'une boîte ( $42,5 \times 70 \times 44,4 \text{ \AA}^3$ ) ( $V = 132090 \text{ \AA}^3$ ) puis remplie d'une première couche d'eau de solvation avec 932 molécules ( $n_w = 71,5$ ) et une seconde couche d'eau, 339 molécules fixées et placées en haut de la boîte du côté du milieu aqueux; cette eau sera fixe durant les simulations. Le système total est composé de 7750 atomes. Le peptide porte une charge  $+3e$  neutralisée par 3 chlorures. Le système est ensuite minimisé et dynamisé à volume constant pendant 1994,1 ps à  $T = 330 \text{ K}$ .

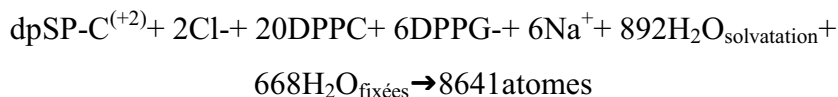
- **Système D : SP-C dans une bicouche de DPPC/DPPG ( $A = 62,9 \text{ \AA}^2$ )**

$\text{SP-C}^{(+3)} + 3\text{Cl}^- + 43 \text{ DPPC} + 11 \text{ DPPG} + 11\text{Na}^+ + 1438\text{H}_2\text{O} \rightarrow 11746$  atomes

La construction de la bicouche de DPPC/DPPG (4:1) ( $A = 62,9 \text{ \AA}^2$ ) est décrite dans la section 9.2.1 Construction des bicouches hétérogènes ou mixtes. 3 lipides sont retirés

au centre de chaque feuillet, pour créer le trou et l'asymétrie. Un feuillet, celui du haut, contiendra 21 DPPC et 6 DPPG, l'autre, celui du bas, 22 DPPC et 5 DPPG. Sur le feuillet du haut, le trou est entouré de 3DPPG, de l'autre côté il est entouré d'un DPPG et de 2 DPPC. Le peptide est ancré dans le trou, sa partie  $N_{\text{term}}$  (LKR-) entourée des 3 DPPG. Le système est placé dans une boîte  $(42,5 \times 70 \times 44,4) \text{ \AA}^3$  ( $V = 132090 \text{ \AA}^3$ ) puis remplie avec 1438  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n_w = 27$ ). Le système total est composé de 11 746 atomes. Le peptide SP-C porte une charge +3e neutralisée par 3 chlorures. Le système est minimisé puis dynamisé à pression constante ( $P = 1 \text{ bar}$ ) pendant 1152 ps à  $T = 330\text{K}$ .

- **Système E : dpSP-C dans une monocouche de DPPC/DPPG (4:1) ( $A = 62,9 \text{ \AA}^2$ )**



Le système (E) est obtenu à partir du système (C) en retirant 1 DPPC et en substituant le peptide par le nouveau peptide dipalmitoylé dpSP-C, les chaînes palmitoyles prenant la place du DPPC éliminé. Le nouveau système est placé dans une boîte  $(42,5 \times 80 \times 44,4) \text{ \AA}^3$  ( $V = 150960 \text{ \AA}^3$ ) puis remplie d'une première couche d'eau de solvation avec 892 molécules ( $n_w = 34,3$ ) et une seconde couche d'eau 668  $\text{H}_2\text{O}_{\text{fixées}}$ , d'environ 10  $\text{ \AA}$  d'épaisseur placée en haut de la boîte du côté du milieu aqueux ; cette eau sera fixe durant les simulations. Le système total est composé de 8641 atomes. Le peptide porte une charge +2e neutralisée par 2 chlorures. Le système est ensuite minimisé et dynamisé à volume constant pendant 1999,8 ps à  $T = 330\text{K}$ .



## ANNEXE D

# Systemes des formes dimères de Neu et Neu\* dans une interface eau/chloroforme

- **Systeme NN1 : Homodimere Neu dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



Les 2 V<sup>664</sup> ne sont pas placees l'une en face de l'autre mais diametralement opposees. Le systeme total est compose de 10 343 atomes, 497 CHCl<sub>3</sub> et 2232 H<sub>2</sub>O. Duree de la simulation : 1 500,0 ps.

- **Systeme NN2 : Homodimere Neu dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



Les 2 V<sup>664</sup> sont en face l'une de l'autre. Le systeme total est compose de 10150 atomes, 504 CHCl<sub>3</sub> et 2156 H<sub>2</sub>O. Duree de la simulation : 1 000,5 ps.

- **Systeme NN3 : Homodimere Neu dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



Les 2 V<sup>664</sup> sont en face l'une de l'autre. Le système total est composé de 10280 atomes, 530 CHCl<sub>3</sub> et 2156 H<sub>2</sub>O. Durée de la simulation: 1 000,5 ps.

- **Système N\*N\*1 : Homodimère muté Neu\* dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



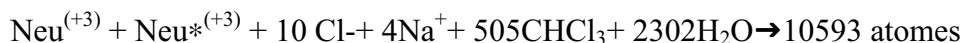
Les 2 E<sup>664</sup> sont placées l'une en face de l'autre en position favorable à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les 2 E. Le système total est composé de 10943 atomes avec 575 CHCl<sub>3</sub> et 2302 H<sub>2</sub>O. Durée de la simulation: 1 000,5 ps.

- **Système N\*N\*2 : Homodimère muté Neu\* dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



Les 2 E<sup>664</sup> sont placées l'une en face de l'autre et forment des liaisons Hydrogène intermoléculaires entre les 2 E. Le système total est composé de 10593 atomes avec 505 CHCl<sub>3</sub> et 2302 H<sub>2</sub>O. Durée de la simulation: 1 000,5 ps.

- **Système NN\* : Hétérodimère (Neu+Neu\*) dans une interface CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O**



On substitue un des 2 peptides Neu\* du système N\*N\*2 que l'on remplace par un peptide Neu sauvage. Les résidus V<sup>664</sup> et E<sub>664</sub> sont l'un en face de l'autre. Le système total est composé de 10593 atomes avec 505 CHCl<sub>3</sub> et 2302 H<sub>2</sub>O. Durée de la simulation : 1 000,5 ps.

# REFERENCES

Allen, M. P., Tildesley, D.J., "Computer Simulation of Liquids," Science Publications, Oxford, 1987.

Allinger, N. L., *JACS* **99**, 8127, 1977.

Argolias, A., Pisano, J.J., *J. Biol. Chem.* **258**, 13697, 1983.

Argolias, A., Pisano, J.J., *J. Biol. Chem.* **259**, 10106, 1984.

Argolias, A., Pisano, J.J., *J. Mol. Biol.* **260**, 1437, 1985.

Bargmann, *Nature* **319**, 226-230, 1986.

Barker, R., "Organic Chemistry of Biological Compounds," New Jersey, 1971.

Belohorcova, K., Qian, J. and Davis, J. H., *Biophys. J.* **79**, 3201-2857, 2000.

Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A., Haak, J., *J. Chem. Phys.* **81 (8)**, 3684-3690, 1984.

Berkowitz, M., Raghavan, K., *Langmuir* **7**, 1042-1044, 1991.

Bernèche, S., Nina, M., Roux, B., *Biophys. J.* **75**, 1603-1618, 1998.

Bevins, C. L., Zasloff M., *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 395, 1990.

Biosym, M. S., *in*, San Diego, 1995.



- Blaudez, D., Turllet, J. M., Dufourcq, J., Bard, D. Buffeteau, T., Desbat, B., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **92**, 525, 1996.
- Blondelle, S., Houghten, R., *Biochemistry* **30 (19)**, 4672-4678, 1991.
- Boman, H. G., *Annu. Rev. Immun* **13**, 61-92, 1995.
- Brooks, C. L., Montgomery, Pettitt, B., Karplus, M., *J. Chem. Phys.* **83**, 5897-5908, 1985.
- Castano, S., in "Université Bordeaux I," Bordeaux, 1998.
- Castano, S., Cornut, I., Büttner, K., Dasseux, J.L., Dufourcq, J., *Biochem. Biophys. Acta* **1416**, 161-175, 1999a.
- Castano, S., Desbat, B., Laguerre, M., Dufourcq, J., *Biochem. Biophys. Acta* **1416**, 176-194, 1999b.
- Cevc, G., Watts, A., Marsh, D., *Biochemistry* **20**, 4955-4965, 1981.
- Chiu, S.-W., *Biophys. J.* **69**, 1230-1245, 1995.
- Chowdhry, B., Lipka, G., Dalziel, A., Sturtevant, J., *Biophys. J.* **45**, 901-904, 1984.
- Clements, J., *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 1-21, 1997.
- Clercx, A., Vandebussche, G., Curstedt, T., Johansson, J., Jornvall, H., Ruyschaert, J.F., *Eur. J. Biochem.* **229**, 465-472, 1995.
- Connolly, M. L., *Science* **221**, 709-713, 1983.
- Cornut, I., Desbat, B., Turllet, J. M., Dufourcq, J., *Biophys. J.* **70**, 305-312, 1996.
- D. Marsh, L. H., *Biochem. Biophys. Acta* **1376**, 267-296, 1998.
- Damodaran, K., Merz, K., Gaber, B., *Biophys. J.* **69**, 1299-1308, 1995.

- Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M., Hagler, A. T., *Proteins: Structure, Function and Genetics* **4**, 31-47, 1988.
- De Grado, W. F., Kézdy, F.J., Kaiser, E.T., *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 679, 1981.
- Demel, R., Paltauf, F., Hauser H., *Biochemistry* **26**, 8659-8665, 1987.
- Dempsey, C. E., *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 143, 1990.
- Dickerson, R. E., Geis, I., "The structure and action of proteins," New York, 1969.
- Duan, Y., Kollman, P., *Science* **282 (5389)**, 740, 1998.
- Duneau, J. P., Crouzy, S., Garnier, N., Chapron, Y., Genest, M., *Biophysical Chemistry* **76**, 35-53, 1999.
- Duneau, J. P., Garnier, N., Genest, M., *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **15 (3)**, 1997, 1997.
- Edholm, O., Berger, O., Jahnig, F., *J. Mol. Biol.* **250**, 94-111, 1995.
- Egelstaff, P. A., Gray, C.G., Gubbins, K.E., "Molecular structure and properties," Butterworths, London, 1975.
- El Hajji, M., Rebuffat, S., Lecommandeur, D., Bodo, B., *Inter. J. Pept; Prot. Res.* **29**, 207, 1987.
- Epand, R., Vogel, H., *Biochem. Biophys. Acta* **1462**, 11-28, 1999.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M., *Langmuir* **11**, 4519-4531, 1995.
- Findlay, E., Barton, P., *Biochemistry* **17 (12)**, 2400-2450, 1978.
- Flach, C., Gericke, A., Keough, K., Mendelsohn, R., *BBA* **1416**, 11-20, 1999.
- Fletcher, R., Reeves, C.M., *Computer J.* **7**, 149, 1964.

- Freer, J. H., "Natural toxins," Oxford, 1986.
- Galla, H.-J., Bourdos, N., von Nahmen, A., Amrein, M., Sieber, M., *Thin Solid Films* **327-329**, 632-635, 1998.
- Gennis, R., *in*, New York, 1989.
- Geve, G., March, D., "Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models," New York, 1987.
- Guilbaud, P., Varnek, A., Wipff, G., *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8298, 1993.
- Gustafsson, M., Palmblad, M., Curstedt, T., Johansson, J., Schürch, S., *Biochem. Biophys. Acta* **1466**, 169-178, 2000.
- Habermann, E., *Science* **177**, 314, 1972.
- Hall, J. E., Vodyanov, I., Balasubramanian, T.M., Marshall, G.R., *Biophys. J.* **45**, 233, 1984.
- Hallman, M., Enhorning, G., Possmayer F., *Pediatric Research* **19 (3)**, 286-292, 1985.
- Harjunpää, I., Kuusela, P., Smoluch, M., Silberring, J., Lankinen, H., Wade, D., *FEBS Letters* **449**, 187-190, 1999.
- Hauser, H., Paltauf, F., Shipley, G., *Biochemistry* **21**, 1061-1067, 1982.
- Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R., Sundell, S., *Biochem. Biophys. Acta* **650**, 21-51, 1981.
- Hawgood, S., Clements, J., *J. Clin. Invest.* **86**, 1-6, 1990.
- Heller, H., Schaefer, M., Schulten, K., *J. Phys. Chem.* **97**, 8343-8360, 1993.

- Huang, P., Loew, G., *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **12**, 937-956, 1995.
- Ichimori, H., Hata, T., Matsuki, H., Kaneshina, S., *Biochem. Biophys. Acta* **1414**, 165-174, 1998.
- Jacobs, R., White, S., *Biochemistry* **28**, 3421-3437, 1989.
- Jacoby, S. L. S., Kowalik, J.S., Pizzo, J.T., "Iterative Methods for Nonlinear Optimization Problems," New Jersey, 1972.
- Jansson, M., R.L. Thurmand, T.P. Trouard, M.F Brown, *Chem. Phys. Lipids* **54**, 157-170, 1990.
- Johansson, J., *Biochem. Biophys. Acta* **1408**, 161-172, 1998.
- Johansson, J., Curstedt, T., *Eur. J. Biochem.* **244**, 645-693, 1997.
- Johansson, J., Szyperski, T., Curstedt, T., *Biochemistry* **33**, 6015-6023, 1994.
- Jorgensen, W., Chandrasekhar, J., Madura, J., Impey, R., Klein, M., *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935, 1983.
- Jorgensen, W., Jenson, C., *Journal of Computational Chemistry* **19 (10)**, 1179-1186, 1998.
- Karakatsanis, P., Bayerl, T., *Physical Review E* **54**, 1785-1790, 1996.
- King, G., White, S., *Biopolymers* **22**, 2577-2637, 1986.
- King, R., *J. Appl. Physiol.* **53**, 1, 1982.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., *Nature* **405**, 914, 2000.
- Kovacs, H., Mark, A., Johansson, J., van Gusteren, W., *J. Mol. Biol.* **247**, 808-822, 1995.

- Krüger, P., Schalke, M., Wang, Z., Notter, R., Dluhy, R., Lösche, M., *Biophys. J.* **77**, 903-914, 1999.
- Ladbrooke, B., Chapman, D., *Chem. Phys. Lipids* **3**, 304-367, 1969.
- Lauterbach, M., Engler, E., Muzet, N., Troxler, L., Wipff, G., *J. Phys. Chem.* **102**, 245, 1998.
- Lauterbach, M., Wipff, G., *Supramolecular Chemistry* **6**, 187, 1995.
- Lehrer, R. I., Ganz, T., Selsted, M.E., *Cell* **64**, 229, 1991.
- Léonard, A., Escrive, C., Laguerre, M., Pebay-Peyroula, E., Neri, W., Pott, T., Katsaras, J., Dufourc, E.J., *Langmuir* **17**, 2019-2030., 2001.
- Lipka, G., Chowdhry, B., Sturtevant, J., *J. Phys. Chem.* **88**, 5401-5406, 1984.
- Lopez Cascales, L., Garcia de la Torre, J., Marrink, J., Berendsen, H., *J. Chem. Phys.* **104**, 2713-2720, 1996a.
- MacDonald, R., Simon, S., Baer, E., *Biochemistry* **4**, 885, 1987.
- Mangoni, L., Rinaldi, A., Di Giulio, A., Mignogna, G., Bozzi, A., Barra, D., Simmaco, M., *Eur. J. Biochem.* **267**, 1447-1454, 2000.
- Marrink, S. J., Berendsen, H., *J. Phys. Chem.* **98**, 4155-4168, 1994.
- Marsh, D., Phil, D., "CRC Handbook of Lipid Bilayers," Boston, 1990.
- Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N., Miyajima, K., *Biochemistry* **36**, 1997.
- McCormack, F., *Biochem. Biophys. Acta* **1408**, 109-131, 1998.
- Merz, K., Roux, B., "Biological Membranes: a molecular Perspective from computatio and experiment," Boston, 1996.

- Mohamadi, F., Richards, N., Guida, W., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still, C., *Journal of Computational Chemistry* **11**, 440-467, 1990.
- Mouritsen, O., Jorgensen, K., Honger, T., *in Permeability and Stability of Lipid Bilayers* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1993.
- Opella, S. J., *Nat. Struct. Biol.* **4**, 845-848, 1997.
- Oren, Z., Shai, Y., *Eur. J. Biochem.* **237**, 303-310, 1996.
- Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm, P-G., Sundell, S., *Biochem. Biophys. Acta* **1113**, 339-373, 1992.
- Pascher, I., Sundell, S., Harlos, K., Eibl H., *Biochem. Biophys. Acta* **896**, 77-88, 1987.
- Pastor, R., Venable, R., *in "Computer Simulation of Biomolecular Systems: Theoretical and Experimental Applications,"* Escom Science Publishers, Leiden, 1993.
- Pastrana, B., Mautone, A., Mendelsohn, R., *Biochemistry* **30**, 10058-10064, 1991.
- Pastrana-Rios, B., Tavena, S., Keough, K., Mautone, A., Mendelsohn, R., *Biophys. J.* **69**, 2531-2540, 1995.
- Pearson, R. G., *J. Chem. Educ.* **64**, 1987.
- Perera, L., Essmann, U., Berkowitz, M., *Langmuir* **12**, 2625-2629, 1996.
- Pérez-Gil, J., Keough, K., *Biochem. Biophys. Acta* **1408**, 203-217, 1998.
- Perkins, W., Dause, R., Parente, R., Minchey, S., Neuman, K., Gruner, S., Tarashi, T., Janoff, A., *Science* **273**, 330-332, 1996.

- Pfeiffer, W., Henkel, T., Sackmann, E., Knoll, W., Richter, D., *Europhysics Letters* **8(2)**, 201-206, 1989.
- Raghavan, K., Reddy, M., Berkowitz, M., *Langmuir* **8**, 233-240, 1992.
- Ranck, J., Keira, T., Luzzati, V., *Biochem. Biophys. Acta* **488**, 432-441, 1977.
- Reynaud, J., Grivet, J., Sy, D., Trudelle, Y., *Biochemistry* **32**, 4997-4-5008, 1993.
- Rooney, S., Canavan, P., Motoyama, E., *Biochem. Biophys. Acta* **360**, 56-67, 1974.
- Rothman, J., Lenard, J., *Science* **195**, 743-753, 1977.
- Roux, B., *Biophys. J.* **71**, 1346-1347, 1996.
- Ruano, M., Nag, K., Casals, C., Pérez-Gil, J., Keough, K., *Biophys. J.* **77**, 1469-1476, 1999.
- Sajot, N., Genest, M., *Eur Biophys J* **28**, 648-662, 2000.
- Schiffer, M., Edmunson, A.B., *Biophys. J.* **7**, 121-135, 1967.
- Schulz, G. E., Schimer, R. H., "Principles of protein structure," New York, 1979.
- Seddon, J., Cevc, G., Kaye, R., Marsh, D., *Biochemistry* **23**, 2634-2644, 1984.
- Seelig, A., Seelig, J., *Biochemistry* **16**, 45-50, 1977.
- Seelig, J., *Biochem. Biophys. Acta* **1331**, 103-116, 1997.
- Shen, L., Bassolino, D., Stouch, T., *Biophys. J.* **73**, 3-20, 1997.
- Shepherd, C. M., Schaus, K. A., Vogel, H. J. and Juffer, A. H., *Biophys. J.* **80**, 579-596, 2001.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M.L., Barra, D., *Eur. J. Biochem.* **242**, 788-792, 1996.

- Smith, S., Smith, C., Bormann, B., *Nature Structural Biology* **3**, 252-258, 1996.
- Smondyrev, A., Berkowitz, M., *Biophys. J.* **80**, 1649-1658, 2001.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstroem, A., Bennick, H., Boman, H.G., *Nature* **292**, 246, 1981.
- Still, C., Tempczyk, A., Hawley, R., Hendrickson, T., *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127-6129, 1990.
- Terwilliger, T. C., Eisenberg, D., *J. Biol. Chem.* **257**, 6010, 1982.
- Thompson, S. A., Takabanak, K., Nakanishi, K., Kubota, I., *Science* **233**, 341, 1986.
- Tieleman, D., Berendsen, H., *Biophys. J.* **74**, 2786-2801, 1998.
- Tieleman, D., Marrink, S., Berensen, H., *BBA* **1331**, 235-270, 1997.
- Toxler, L., in *Université Louis Pasteur, Strasbourg*, 1995.
- Troxler, L., Wipff, G., *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1994.
- Unitt, M., Harwood, J., *Biochemical Journal* **228**, 707-711, 1985.
- Van Dijck, P., De Kruijff, B., Van Deenen, L., De Gier, J., Demel, R., *Biochem. Biophys. Acta* **455**, 576-587, 1976.
- Van Dijck, P., De Kruijff, B., Verkleij, A., Van Deenen, L., De Gier, J., *Biochem. Biophys. Acta* **512**, 84-96, 1978.
- Vandenbussche, G., Clercx, A., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H., Ruyschaert, J. M., *Eur. J. Biochem.* **203**, 201-209, 1992.
- Vaz, W., Clegg, R., Hallmann, D., *Biochemistry* **24**, 781-786, 1985.



- Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S., Possmayer, F., *Biochem. Biophys. Acta* **1408**, 90-108, 1998.
- Wallace, B., Janes, R., *J. Mol. Biol.* **217**, 625-627, 1991.
- Weiner, S. J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Weiner, P., *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765, 1984.
- Wipff, G., "Computational Approaches in Supramolecular Chemistry," Kluwer, 1994.
- Woolf, T., *Biophys. J.* **74**, 115-131, 1998.
- Wymore, T., Wong, T., *Biophys. J.* **76**, 1213-1227, 1999.
- Zasloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5449, 1987.
- Zhang, Y., *J. Chem. Phys.* **103**, 10252-10266, 1995.

## Résumé

Les peptides amphipathiques constituent une famille nombreuse de composés qui agissent sur les cellules du vivant via une perturbation de leurs membranes plasmiques. A travers eux, il existe des peptides cytotoxiques naturels comme la mélittine du venin d'abeille ou la toxine  $\Delta$  du *Staphylococcus aureus* mais aussi des peptides totalement synthétiques contenant seulement Leu ou Lys qui assurent une distribution topologique des acides aminés hydrophiles/hydrophobes similaires à ceux des toxines naturelles. En outre, le mécanisme moléculaire précis responsable de la perméabilité et de la fragmentation des biomembranes est loin d'être connu. A travers plusieurs techniques capables de fournir un renseignement de ce phénomène (du moins des premières étapes) il existe la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire. La première étape sera la construction et l'étude dynamique des modèles de mono et de bicouches de lipides (globalement neutres comme PC et PE ou chargés comme PG ou PS) avec des molécules d'eau explicites dans des conditions limites périodiques (Periodic Boundary Conditions) (boîtes en 3D). Alors les divers peptides naturels ou synthétiques seront introduits dans ces boîtes et l'interaction peptide/membrane sera étudiée par dynamique moléculaire.

Mots clé : lipides, peptides amphipathiques, interaction peptide/membrane, canal, peptide transmembranaire, modélisation moléculaire