



UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE

Ecole Doctorale des Génomes Aux Organismes

Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules  
Normales et Pathologiques – INSERM/UEVE U829

NNT : 2013EVRY0008

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2013

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

**LUCIE HUYNH**

---

**« Etude structurale de monocouches lipidiques  
par simulations de dynamique moléculaire »**

---

### COMPOSITION DU JURY

<b>Rapporteur</b>	Pr Agnès GIRARD-EGROT	<i>Université Claude Bernard Lyon</i>
<b>Rapporteur</b>	Pr Tâp HA DUONG	<i>Université Paris Sud</i>
<b>Examineur</b>	Pr Véronique ROSILIO	<i>Université Paris Sud</i>
<b>Examineur</b>	Dr Véronica BESWICK	<i>Université d'Evry Val d'Essonne</i>
<b>Examineur</b>	Dr Nadège JAMIN	<i>CEA Saclay, iBiTec-S</i>
<b>Examineur</b>	Dr Patrick CURMI	<i>Université d'Evry Val d'Essonne</i>







*A mes proches*



## Cadre de la Thèse

---

Cette thèse a été financée par une entreprise de biotechnologie, BioQuanta SA, dans laquelle j'étais employée en tant qu'ingénieur recherche et développement en bio-informatique et modélisation moléculaire. J'ai ainsi participé à des projets de recherche pluridisciplinaires et au développement d'une plateforme de prestation de service en toxicologie prédictive. Cette expérience dans l'industrie pharmaceutique m'a permis d'acquérir une vision transversale de la recherche et des applications de la bio-informatique, qui a constitué un atout déterminant dans la conduite de ces travaux de thèse.







# Publications Scientifiques

---

Durant ces quatre années, ce travail de thèse a permis la parution de deux publications scientifiques :

Huynh L., Masereeuw R., Friedberg T., Ingelman-Sundberg M., Manivet P. « In silico platform for xenobiotics ADME-T pharmacological properties modeling and prediction. Part I: beyond the reduction of animal model use ». *Drug Discovery Today*, 14(7-8) ; 401–405 2009.

Huynh L., Beswick V., Rosilio V., Curmi P., Sanson A., Jamin N. « Structural properties of POPC monolayers under lateral compression: computer simulations analysis ». *Soumise au journal Langmuir (ACS)*.

# Remerciements

---

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire Structure et Activités des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP) de l'Université Evry Val d'Essonne, en partenariat avec la société BioQuanta et en partie dans le laboratoire de protéines membranaire de l'iBiTec-S au CEA Saclay. Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée, soutenue et encouragée au cours de ces quatre années de collaboration scientifique.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir évalué mon travail et plus particulièrement aux Professeurs Agnès Girard-Egrot et Tâp Ha Duong pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Véronique Rosilio pour sa disponibilité, sa compréhension, son soutien, son aide tout au long de ce travail et pour m'avoir fait découvrir les expériences de compression des monocouches lipidiques en balance de Langmuir. Merci pour les riches échanges que nous avons eues et pour les précieux conseils prodigués.

J'adresse mes remerciements et ma profonde gratitude au directeur du SABNP, Patrick Curmi, pour son accueil dans son laboratoire mais aussi pour ses encouragements, son soutien indéfectible ainsi que ses conseils qui m'ont été d'une aide si précieuse dans l'aboutissement de ce travail. Merci pour son ouverture d'esprit et sa rigueur scientifique.

Je tiens à remercier Nadège Jamin, responsable de l'équipe Protéines membranaires de l'iBiTec-S CEA, qui a accepté de co-encadrer cette thèse et qui a su me guider dans mes travaux, pour sa disponibilité et sa patience, même dans les moments les plus difficiles. Je souhaite la remercier pour son aide et ses conseils autant sur les aspects techniques que sur l'interprétation des résultats et la rédaction.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Alain Sanson, pour m'avoir fait confiance et pour sa bienveillance. Je le remercie pour avoir partagé son expérience et sa passion pour les sciences avec moi.

Merci à vous deux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

## REMERCIEMENTS

---

Merci également à Véronica pour ses conseils, pour nos échanges, pour son dynamisme et son optimisme communicatif.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Flavio Toma, mon ancien professeur et directeur du GBI. Merci pour votre investissement tout au long de mes études et pour avoir continué à être là après, et pour votre soutien aux moments clés de cette aventure.

Merci à Claudius, les inséparables Pierrick et Karim, AiXiao et Cyril (d'autres inséparables), Joseph A., Guillaume, Joseph R., mes collègues et amis, avec qui j'ai tant partagé. Je les remercie pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements indispensables tout au long de ces années. En particulier, Claudius, Joseph A. et Véro, qui sont là depuis le début et qui le restent malgré la distance. Merci particulier aux Evryens pour les nombreux moments partagés autour d'expériences culinaires ! Merci à Guigui pour ses encouragements continus de ces derniers mois.

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma famille qui m'a soutenue et encouragée pendant ce périple de quatre ans.

Enfin, merci à Alex pour son soutien quotidien, merci pour tout...

# Résumé

---

Les membranes biologiques jouent un rôle essentiel dans la vie cellulaire. Afin d'étudier leur comportement et leurs interactions avec des molécules, des modèles de monocouches lipidiques ont été développés. Leur compression sur balance de Langmuir permet d'obtenir une isotherme pression de surface-aire moléculaire permettant de caractériser notamment les transitions de phase et le comportement interfacial des monocouches. Seules les études de simulations de dynamique moléculaire permettent d'obtenir les propriétés structurales des lipides organisés en monocouche à l'échelle atomique.

Nous avons modélisé une monocouche de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC), phospholipides majoritaires des membranes, puis réalisé une série de dynamiques moléculaires à différentes tensions de surface en utilisant GROMACS et le champ de force tout atome GAFF. Une isotherme de compression de POPC a été obtenue pour la première fois par simulation de dynamique moléculaire.

L'analyse structurale des POPC a mis en évidence des variations conformationnelles avec l'augmentation de la pression ainsi qu'une distribution bimodale de l'orientation des têtes polaires. L'analyse des angles dièdres a permis d'identifier les torsions responsables de cette flexibilité. Un comportement indépendant des chaînes hydrophobes a été observé et corrélé à un assemblage préférentiel des chaînes oléoyle d'une part et palmitoyle d'autre part.

La connaissance des propriétés structurales et organisationnelles des monocouches de POPC est essentielle à la caractérisation des interactions mises en jeu dans la cohésion des films lipidiques et fournit une base à l'étude de leur perturbation par des molécules.

Mots clés : Monocouche lipidique, simulations de dynamique moléculaire, pression de surface, Isotherme de POPC, propriétés structurales

# Abstract

---

Biomembranes play an essential role in many relevant processes in cellular biology. In order to gain insight into their behaviour and interactions with molecules, models such as lipid monolayers have been developed. Monolayer compression on Langmuir trough provides surface pressure – molecular area isotherms, and allows characterisation of phase and interfacial properties of the monolayer. Such a characterisation can be completed by atomistic study of the monolayer phospholipids and molecular interactions from molecular dynamic simulations.

Our work is focused on 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), a lipid comprising a saturated and an unsaturated acyl chain, major lipids in eukaryotic cell membranes. We performed MD simulations at 293 K and 300 K at different surface pressures using the all-atom general amber force field (GAFF). Simulated surface pressure-area isotherms were obtained for the first time, and a good agreement was found with experimental isotherms.

Based on the structural analyses, two orientations of the head groups clearly appear. We propose that the conformational variations around the bonds connecting the phosphorus atom to the adjacent oxygen are involved in these specific orientations. Both acyl chains have distinct structural properties upon compression and suggest an independent behavior of the saturated and unsaturated chains that could be correlated with the formation of chain-type clusters observed along the simulated trajectories.

Molecular insight in structural properties of POPC monolayer provides essential clues for the study of membrane-molecule interaction.

Key words: phospholipid monolayer, molecular modeling, surface pressure, POPC isotherm, structural properties

---

# Sommaire

---

<b>SOMMAIRE</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>24</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>26</b>
<hr/>	
<b>1. CONTEXTE INDUSTRIEL</b>	<b>26</b>
<b>2. ADME-TOX</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre I. GENERALITES SUR LES MEMBRANES BIOLOGIQUES ET LES LIPIDES MEMBRANAIRES</b>	<b>29</b>
<hr/>	
<b>1. STRUCTURE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES</b>	<b>30</b>
1.1. Historique	30
1.2. Composition des membranes	31
<b>2. ROLES DES MEMBRANES BIOLOGIQUES</b>	<b>33</b>
2.1. Mécanismes de signalisation	33
2.2. Mécanismes d'échange	34
<b>3. LIPIDES MEMBRANAIRES</b>	<b>35</b>
3.1. Auto-agencement et état d'organisation ou « Packing »	37
3.2. Composition en lipides	39
<b>4. ASPECTS DYNAMIQUES DE LA MEMBRANE</b>	<b>40</b>
4.1. Dynamique membranaire	40

---

4.2.	Fluidité	41
4.3.	Transition de phase	41
4.4.	Equivalence bicouche - monocouche	42
<b>Chapitre II. PHENOMENES DE SURFACE</b>		<b>44</b>

---

<b>1.</b>	<b>BREF HISTORIQUE SUR LES FILMS DE LANGMUIR</b>	<b>45</b>
<b>2.</b>	<b>QUELQUES NOTIONS DE CHIMIE DE SURFACE</b>	<b>46</b>
2.1.	Définition d'une interface	46
2.2.	Tension de surface	46
2.3.	Tensioactif	48
2.3.1.	Composition et structure	48
2.3.2.	Applications des tensioactifs	48
2.4.	Monocouches insolubles	49
2.5.	Pression de surface et cuve de Langmuir	50
2.6.	Isotherme Pression de surface – Aire moléculaire	53
<b>Chapitre III. METHODES D'ETUDE DE LA PERMEABILITE ET MODELES DE MEMBRANES</b>		<b>55</b>

---

<b>1.</b>	<b>METHODES EXPERIMENTALES</b>	<b>56</b>
1.1.	LogP	56
1.2.	Modèle d'épithélium	56
1.3.	Modèle de bicouche lipidique	57
1.4.	Modèle de bicouche lipidique supportée	58
1.5.	Systèmes vésiculaires ou liposomes	59
1.6.	Micelles, bicelles et nanodisques	59
1.7.	Modèle de monocouche de lipides : films de Langmuir et de Langmuir-Blodgett	60
<b>2.</b>	<b>METHODES DE SIMULATION</b>	<b>61</b>
2.1.	Méthodes empiriques	62
2.2.	Méthodes statistiques - QSAR, QSPR	63
2.3.	Modèle pharmacocinétique physiologique	63
2.4.	Méthodes de fouille de données	63
2.5.	Méthodes de modélisation moléculaire	64
2.5.1.	Modélisation de bicouches lipidiques	64
2.5.2.	Modélisation de monocouches lipidiques	67

---

---

<b>Chapitre IV. MODELISATION MOLECULAIRE</b>	<b>69</b>
<hr/>	
<b>1. GENERALITES</b>	<b>70</b>
1.1. Historique	70
1.2. Applications	70
1.3. Performances et limites	71
<b>2. MECANIQUE MOLECULAIRE</b>	<b>71</b>
2.1. Modélisation de l'énergie potentielle	72
2.1.1. Energie liante d'élongation	72
2.1.2. Energie liante d'angle	72
2.1.3. Energie liante de torsion	73
2.1.4. Energie non-liante de van der Waals	73
2.1.5. Energie non-liante électrostatique	74
2.2. Champs de forces	75
2.2.1. Diversité des champs de forces	75
2.2.2. Champs de force utilisés	76
2.2.3. Champ de force GAFF – « General Amber Force Field »	76
2.2.4. Champ de force CHARMM	77
2.2.5. Types d'atomes, charges et paramétrisation	78
2.3. Modèles d'eau	79
2.4. Minimisation de l'énergie	80
<b>3. DYNAMIQUE MOLECULAIRE</b>	<b>82</b>
3.1. Principes	82
3.2. Intégrateurs	83
3.3. Ensembles statistiques	85
3.4. Contrôle de la température et de la pression	87
3.4.1. Contrôle de la température	87
3.4.2. Contrôle de la pression	88
3.5. Conditions périodiques aux limites et taille du système	89
3.6. Evaluation des interactions non liées	90
3.6.1. Méthode de la valeur seuil	90
3.6.2. Méthode de la sommation d'Ewald	91
3.6.3. Méthode Particle Mesh Ewald	92
<b>Chapitre V. METHODOLOGIE</b>	<b>93</b>
<hr/>	
<b>1. MODELES DE MONOCOUCHE DE POPC</b>	<b>94</b>

---



---

1.1.	Modèle de POPC	94
1.2.	Modèle de monocouche	95
<b>2.</b>	<b>PROTOCOLE DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE</b>	<b>97</b>
2.1.	Pré-équilibration de la structure initiale NPAT	99
2.2.	Simulations à différentes valeurs de pression de surface $NP \gamma T$	99
<b>3.</b>	<b>ANALYSES DES SIMULATIONS</b>	<b>101</b>
3.1.	Equilibration de la dynamique moléculaire	101
3.2.	Validation du protocole de dynamique moléculaire par rapport aux données expérimentales	101
3.3.	Analyse des dynamiques moléculaires	102
3.4.	Aire moléculaire et isotherme de compression	102
3.5.	Profils de densité électronique	103
3.6.	Angle d'inclinaison du glycérol, des têtes polaires et des chaînes hydrophobes	104
3.7.	Paramètre d'ordre des chaînes lipidiques $S_{CD}$	106
3.8.	Fonction de distribution radiale	106
3.9.	Distribution des angles dièdres des têtes polaires et des chaînes hydrophobes	108
3.10.	Analyse infographique	108
3.11.	Influence de la taille du système	109
3.12.	Influence du champ de force	109
<b>Chapitre VI.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>110</b>

---

<b>1.</b>	<b>EQUILIBRATION DES SYSTEMES</b>	<b>111</b>
<b>2.</b>	<b>ISOTHERME DE COMPRESSION ET VALIDATION DU PROTOCOLE DE DM</b>	<b>112</b>
<b>3.</b>	<b>PROPRIETES MACROSCOPIQUES ET ORGANISATIONNELLES</b>	<b>118</b>
<b>4.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DES TETES POLAIRES- ORIENTATION DES TETES POLAIRES</b>	<b>125</b>
<b>5.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DES TETES POLAIRES- DIEDRES DES TETES POLAIRES</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>HYDRATATION DES TETES POLAIRES</b>	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DU GLYCEROL</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DES CHAINES HYDROPHOBES - ANGLES D'INCLINAISON</b>	<b>135</b>
<b>9.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DES CHAINES HYDROPHOBES – PARAMETRES D'ORDRE</b>	<b>138</b>
<b>10.</b>	<b>ETUDE CONFORMATIONNELLE DES CHAINES HYDROPHOBES –DIEDRES DES CHAINES</b>	<b>140</b>

---

<b>11. ETUDE CONFORMATIONNELLE DES CHAINES HYDROPHOBES – SEGREGATION DES CHAINES</b>	<b>144</b>
<b>12. INFLUENCE DE LA TAILLE DU SYSTEME</b>	<b>146</b>
<b>13. INFLUENCE DES CHAMPS DE FORCES</b>	<b>152</b>
<b>Chapitre VII. AUTRES TRAVAUX</b>	<b>214</b>
<hr/>	
<b>1. MODELISATION DES TUNNELS DE SORTIE DE LA PROGESTERONE DU CYTOCHROME P450 3A4</b>	<b>215</b>
<b>2. DEVELOPPEMENT D’UN PROCEDE DE CRIBLAGE VIRTUEL DE TOXICITE</b>	<b>217</b>
<b>Chapitre VIII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>224</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>232</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>247</b>

---

---

# Liste des Figures

---

Figure I-1 – Représentation schématique du modèle en sandwich de Danielli et Davson	30
Figure I-2 – Image de microscopie électronique de la structure trilamellaire d’une bicouche d’érythrocyte [Robertson 1981].	31
Figure I-3 – Modèle de la mosaïque fluide proposée par Singer et Nicolson	31
Figure I-4 – Représentation schématique d’une coupe de membrane plasmique et de ses constituants	32
Figure I-5 – Schéma des différents types de passage transmembranaire	34
Figure I-6 – Principaux phospholipides membranaires (adapté de « <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 5 <sup>ème</sup> Edition »)	36
Figure I-7 – Structure du cholestérol (extrait de « <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 5 <sup>ème</sup> Edition »)	36
Figure I-8 – Agencement du cholestérol dans les phospholipides (adapté de « <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 5 <sup>ème</sup> Edition »)	37
Figure I-9 – Distribution asymétrique des phospholipides et des glycolipides dans la bicouche lipidique. En plus de la nomenclature des phospholipides et du code couleur utilisé dans la Figure I-6, les glycolipides sont représentés ici par les têtes polaires hexagonales bleues (extrait de « <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 5 <sup>ème</sup> Edition »).	40
Figure I-10 – Transition de phases des bicouches (Adapté de « Biomembranes – Molecular Structure and Function » de Robert B. Gennis, 1989, Springer-Verlag)	42
Figure I-11 – Transition de phases des monocouches en fonction de la température	43
Figure II-1 – Illustration schématique de la tension de surface, les flèches représentent l’attraction intermoléculaire	47
Figure II-2 – Illustration schématique de la force de tension	47
Figure II-3 – Structure d’un phospholipide	48
Figure II-4 – Schéma d’une monocouche insoluble	50
Figure II-5 – Schéma de la cuve de Langmuir	50
Figure II-6 – Schéma de la plaque de Wilhelmy	52
Figure II-7 – Schéma théorique d’une isotherme de phospholipides	53
Figure III-1 – Modèle de Film Noir ( <i>Black Lipid Membrane</i> , BLM)	58
Figure IV-1 – Représentation schématique des différents termes énergétiques d’un champ de force	74
Figure IV-2 – Représentation schématique d’un phospholipide selon un champ de force tout-atome (A), atome-unifié (B) et gros-grain (C) (Figure adaptée de Marrink <i>et al.</i> 2009)	75
Figure IV-3 – Molécule d’eau considéré dans les modèles simples, définie par sa géométrie (longueur de liaison OH et angle HOH)	79
Figure IV-4 – Forme générale des modèles d’eau de 3 à 6 points	79
Figure IV-5 – Minimum global et local d’une courbe d’énergie potentielle suivant la conformation adoptée	81

LISTE DES FIGURES

---

Figure IV-6 – Principe de l’algorithme de « Leap-Frog »	84
Figure IV-7 – Schémas d’une interface eau/lipide (haut), des profils de densité (centre) et de pressions (bas). $\rho_1$ et $\rho_2$ les densités des lipides et de l’eau, $P_n$ et $P_t$ les pressions normale et tangentielle à l’interface et $\delta$ l’épaisseur approximative de l’interface. Figure adaptée de Zhang <i>et al.</i> 1995 et Feller <i>et al.</i> 1995.	87
Figure IV-8 – Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques aux limites	89
Figure IV-9 – Représentation des méthodes de troncature de l’énergie de van der Waals	91
Figure IV-10 – Schématisation des différentes étapes du calcul PME	92
Figure V-1 – Structure 2D et 3D du POPC ainsi que sa nomenclature atomique	94
Figure V-2 – Modélisation du système symétrique de monocouche	95
Figure V-3 – Représentation schématique et tridimensionnelle des modèles de bicouche et monocouche symétriques. Les molécules d’eau sont représentées par des points rouges, les phospholipides apparaissent sous forme de bâtonnets avec les chaînes carbonées colorées en cyan, les atomes d’oxygène des groupements phosphates en rouge et les phosphores en ocre, les atomes d’azote des groupements choline sont bleu.	96
Figure V-4 – Application des PBC au système symétrique de monocouche de POPC. La boîte centrale est représentée en pointillé.	98
Figure V-5 – Compressions latérales du système	99
Figure V-6 – Représentation des vecteurs utilisés pour les calculs d’angle d’inclinaison : en bleu, le vecteur des têtes polaires, en rouge le vecteur du glycérol, en oranges les vecteurs des chaînes alkyles	105
Figure V-7 – Angles d’inclinaison des chaînes carbonées des acides gras utilisés dans les calculs	105
Figure VI-1 – Evolution de l’aire moléculaire au cours des trajectoires pour différentes pressions de surface : 7,5 mN/m (rouge), 10 mN/m (bleu), 15 mN/m (vert foncé), 20 mN/m (magenta), 30 mN/m (cyan), 40 mN/m (orange) and 43 mN/m (vert clair).	111
Figure VI-2 – Comparaison des isothermes simulées avec l’isotherme expérimentale de référence	114
Figure VI-3 – Comparaison d’isothermes expérimentales issues de la littérature à l’isotherme expérimentale de référence obtenue par le groupe du Pr Rosilio utilisée ici et aux isothermes simulées.	114
Figure VI-4 – Instantanés montrant l’organisation des monocouches de POPC après 200 ns de dynamique moléculaire à 300 K et à différentes pressions de surface. En haut sont représentés les systèmes symétriques en vue latérale et en bas, les mêmes systèmes en vue de dessus, avec en rouge les molécules d’eau, en cyan les lipides et en bleu foncé l’azote des têtes polaires	117
Figure VI-5 – Profil de densité électronique aux différentes pressions de surface. En gris le pic global du système, en bleu l’eau, en orange les POPC, en rouge les chaînes hydrophobes et en cyan les têtes polaires	119
Figure VI-6 – Profils de densité électronique des chaînes hydrophobes. En jaune les pics globaux des chaînes, en vert et vert foncé les chaînes palmitoyle et oléoyle, et leurs méthyles terminaux rose et violet respectivement	121
Figure VI-7 – Profils de densité électronique des têtes polaires. En jaune les pics globaux des chaînes, en vert et vert foncé les chaînes palmitoyle et oléoyle, et leurs méthyles terminaux rose et violet respectivement	122
Figure VI-8 – Distributions radiales des atomes de phosphore (A), d’azote (B), carbone C1 du glycérol (C), carbone C2 du glycérol (D) et carbone C3 du glycérol (E).	124

LISTE DES FIGURES

---

Figure VI-9 – Distribution des angles d’inclinaison des vecteurs PN pour différentes pressions de surface	125
Figure VI-10 – Différentes orientations du vecteur PN	127
Figure VI-11 – Distribution des angles dièdres des têtes polaires à 30 mN/m	129
Figure VI-12 – Distribution des angles dièdres pour différentes pressions de surface	129
Figure VI-13 – Distribution radiale des atomes d’oxygène des molécules d’eau autour des atomes de phosphore (A) et d’azote (B)	131
Figure VI-14 – Nombre d’hydratation des atomes de phosphore P et d’azote N	132
Figure VI-15 – Distribution des angles d’inclinaison du glycérol pour différentes pressions de surfaces	134
Figure VI-16 – Influence de l’inclinaison du glycérol sur la conformation des chaînes	135
Figure VI-17 – Distributions des angles d’inclinaison des chaînes hydrophobes. Premier segment A et deuxième segment B de la chaîne oléoyl, premier segment C et deuxième segment D de la chaîne palmitoyl.	136
Figure VI-18 – Paramètres d’ordre des chaînes hydrophobes à différentes pressions de surface	139
Figure VI-19 – Distributions moyennes des angles dièdres des chaînes hydrophobes aux différentes pressions de surface	141
Figure VI-20 – Distribution des angles dièdres en fonction de leurs positions sur chaque chaîne	142
Figure VI-21 – Pourcentages des conformations des dièdres en fonction de leurs positions dans chaque chaîne	143
Figure VI-22 – Ségrégation des chaînes hydrophobes en clusters « palmitoyl » et clusters « oléoyl » observée sur des instantanés pris toutes les 2 ns sur les 50 dernières nanosecondes de la trajectoire à 30 mN/m. Vue du dessus de la monocouche, avec en cyan les chaînes palmitoyles, en orange les chaînes oléoyles et en bleu un cluster « palmitoyl » pris au hasard.	144
Figure VI-23 – Système de la monocouche à 132 POPC / feuillet ( <i>mnc4x</i> ) construite à partir de la monocouche initiale à 33 POPC / feuillet ( <i>mnc</i> )	146
Figure VI-24 – Comparaison des aires moléculaires pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i>	147
Figure VI-25 – Comparaison des distributions de densités électroniques pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i> . En gris le pic global du système, en bleu l’eau, en orange les POPC, en rouge les chaînes hydrophobes et en cyan les têtes polaires	147
Figure VI-26 – Comparaison des distributions des angles d’inclinaison des vecteurs PN et du glycérol pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i>	148
Figure VI-27 – Comparaison des inclinaisons des chaînes alkyle pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i> . Premier segment A et deuxième segment B de la chaîne oléoyl, premier segment C et deuxième segment D de la chaîne palmitoyl.	148
Figure VI-28 – Comparaison des paramètres d’ordre pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i>	149
Figure VI-29 – Comparaison des torsions des chaînes hydrophobes pour les systèmes <i>mnc</i> et <i>mnc4x</i>	149
Figure VI-30 – Ségrégation des chaînes hydrophobes en clusters « palmitoyl » et clusters « oléoyl » observées sur des instantanés pris toutes les 2 ns sur les 50 dernières nanosecondes de la trajectoire à 30 mN/m. En cyan les chaînes palmitoyles, en orange les chaînes oléoyles	150

Figure VI-31 – SCD d’un seul POPC moyenné sur les 50 (A), 100 (B), 150 (C) et 200 (D) premières nanosecondes de simulation de dynamique moléculaire	151
Figure VI-32 – SCD d’un seul POPC moyenné sur différentes tranches de 50 ns. A de 0 à 50 ns, B de 50 à 100 ns, C de 100 à 150 ns et D de 150 à 200 ns.	152
Figure VI-33 – Comparaison des systèmes simulés avec les différents champs de force. De gauche à droite, GAFF, <i>Charmm27</i> , <i>Charmm36</i>	153
Figure VI-34 – Comparaison des aires moléculaires obtenues expérimentalement et avec les champs de force GAFF, <i>Charmm27</i> et <i>Charmm36</i>	154
Figure VI-35 – Comparaison des angles d’inclinaisons des vecteurs PN et du glycérol selon le champ de force	155
Figure VI-36 – Comparaison de la dispersion en z des atomes P et N selon le champ de force	156
Figure VI-37 – Comparaison des angles d’inclinaison des chaînes alkyles selon le champ de force avec A le premier segment de la chaîne oléoyle C22-C29, B le second segment de la chaîne oléoyle C29-C217, C premier segment de la chaîne palmitoyle C32-C39 et D le second segment de la chaîne palmitoyle C39-C315	157
Figure VI-38 – Comparaison des paramètres d’ordre des chaînes alkyles selon le champ de force	158
Figure VI-39 – Comparaison des torsions des chaînes alkyles selon le champ de force, A système 33 POPC avec GAFF, B système 132 POPC avec GAFF, C système 132 POPC avec <i>Charmm27</i> et D système 132 POPC avec <i>Charmm36</i>	159
Figure VII-1 – Visualisation du CYP3A4 (structure en hélice) et des tunnels de sortie des xénobiotiques transformés (surfaces transparentes bleu, rose et orange). La cavité active est définie au-dessus du plan du noyau hème (bâtonnet).	215
Figure VII-2 – Visualisation du CYP3A4 complexé avec 2 molécules de substrats naturels de progestérone (orange et jaune) entourées d’eau. La flèche indique le passage du ligand au niveau d’un cluster hydrophobe.	216
Figure VII-3 – Représentation vue du dessus de la surface du CYP3A4 libre (à gauche) et complexé avec des ligands (à droite). Pour plus de clarté les ligands ont été supprimés pour distinguer le canal d’entrée qui lui donne accès à la cavité active.	216
Figure VIII-1 – Illustration de l’adaptation du <i>packing</i> des phospholipides en fonction de la pression de surface. Au centre, les instantanés pris à la fin des simulations aux différentes pressions de surface. Pour plus de clarté, seuls quelques lipides sont représentés, les chaînes carbonées sont colorées en cyan, les atomes de phosphores en ocre et les oxygènes en rouges. A gauche, les schémas des <i>packings</i> .	226
Figure VIII-2 – Schéma de l’interdépendance des conformations des têtes polaires et des chaînes alkyles. A basse pression, l’aire occupée par les chaînes est grande et la tête polaire est parallèle à l’interface. A haute pression, l’aire occupée par les chaînes est faible et la tête polaire est perpendiculaire à l’interface.	228

---

# Liste des Tableaux

---

Tableau I-1 – Structure de l’assemblage spontané en fonction de la forme des molécules amphiphiles	38
Tableau I-2 – Composition en lipides de différents types cellulaires	39
Tableau III-1 – Propriétés moléculaires et valeurs critiques définies dans la règle des 5 de Linpinski	62
Tableau IV-1 – Quelques paramètres pour les modèles TIP3P et SPC/E	80
Tableau VI-1 – Aires moléculaires mesurées et calculées à différentes pressions de surface	116
Tableau VI-2 – Combinaison des angles dièdres	130
Tableau VI-3 – Nombre d’hydratation des atomes de phosphore P et d’azote N	132
Tableau VI-4 – Maxima des angles d’inclinaison des chaînes hydrophobes	137
Tableau VI-5 – Pourcentage des conformations des dièdres des chaînes pour différentes pressions de surface	142
Tableau VI-6 – Valeurs des aires moléculaires obtenues expérimentalement et avec les champs de force GAFF, <i>Charmm27</i> et <i>Charmm36</i>	154

# Abréviations

2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
ADME-Tox	Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination et Toxicité
AMM	Autorisation de mise sur le marché
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CG	Conjugate Gradient
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
CPL	Conditions Périodiques aux Limites
CYP	Cytochrome P450
DM	Dynamique Moléculaire
GAFF	General Amber Force Field
GROMACS	GRONingen MACHine for Chemical Simulations
HLA	Human Leucocyte Antigen
LC	(Phase) Liquide Condensée
LE	(Phase) Liquide Expansée
MSD	Mean Square Displacement
NPT	Ensemble Isobare-Isotherme
NPγT	Ensemble Isotherme à tension de surface constante
NVE	Ensemble Microcanonique
NVT	Ensemble Canonique
PBC	Periodic Boundaries Condition
PME	Particle Mesh Ewald
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of CHEMicals
RMSD	Root Mean Square Deviation
RDF	Radial diffusion function
SD	Steepest Descent
TIP3P	Transferable Intermolecular Potential 3 Points
VMD	Visual Molecular Dynamics



# Préambule

---

Cette thèse s'est déroulée en partie dans une entreprise de biotechnologie. Les domaines de compétences des équipes dans lesquelles j'ai pu évoluer m'ont conduit à m'intéresser à l'apport de la modélisation dans les problématiques liées à la recherche pharmaceutique et plus généralement à la santé humaine.

L'industrie pharmaceutique fait face actuellement à de profonds changements liés à l'évolution des facteurs socio-économiques. Les réglementations de plus en plus strictes, tendent à favoriser le développement de nouvelles approches théoriques et informatiques. Ces méthodes allient rapidité, faibles coûts, performances et complémentarité avec les procédés déjà en vigueur dans la R&D pharmaceutique.

La modélisation assistée par ordinateur permet d'améliorer le processus de découverte de nouvelles molécules thérapeutiques grâce à une intervention très en amont du cycle de développement. La modélisation moléculaire en particulier, permet une approche à l'échelle moléculaire et atomique non accessible par les méthodes expérimentales et en fait un outil puissant dans le développement et l'optimisation des phases de recherche.

# INTRODUCTION GENERALE

---

## 1. Contexte industriel

L'industrie pharmaceutique est l'un des secteurs industriels le plus important économiquement au monde, le marché mondial du médicament s'élevant à 820 milliards de dollars (\$ U.S.) en 2009 [LEEM 2010]. Elle regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments pour la médecine humaine ou vétérinaire. La stratégie de développement d'un médicament depuis la découverte d'une molécule active jusqu'à sa mise sur le marché s'étend sur une période d'une dizaine d'années et représente un investissement de plusieurs centaines de millions d'euros. Avant son autorisation de mise sur le marché (AMM), le futur médicament franchit plusieurs phases critiques de recherches précliniques consistant en une série de tests *in vitro*, *in vivo* suivis d'essais cliniques sur volontaires sains humains et malades. Sur plusieurs milliers de molécules candidates, seules quelques unes arriveront aux phases ultimes de développement.

## 2. ADME-Tox

De nombreux tests que l'on peut considérer comme des filtres sont appliqués tout au long de ce parcours pour garantir la conformité aux normes de sécurité, de qualité, d'efficacité et d'innocuité des médicaments sélectionnés. Ces filtres plus ou moins puissants et sélectifs permettent donc de réduire le temps de développement et les coûts de mise sur le marché, ce qui représente une économie notable réalisée dans la phase de commercialisation. L'une des méthodes de filtrage la plus importante afin de s'assurer du bon comportement d'une molécule dans l'organisme est la prédiction des paramètres pharmacologiques d'Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination et Toxicité (ADME-Tox) [van de Waterbeemd and Gifford 2003]. La mesure de ces paramètres permet ainsi d'orienter le choix des voies d'administration et de la forme galénique de la substance active ou bien d'en optimiser la biodisponibilité [Showell and Mills 2003].

Cependant, aujourd'hui encore un nombre conséquent de molécules échouent à des stades avancés du cycle de développement, notamment lors des essais cliniques de Phase 2 en raison d'échecs lors de l'étape de l'absorption. Si l'on prend l'exemple des molécules administrées par voie orale (mode d'administration le plus utilisé), l'absorption intestinale, qui permet le passage de la substance active ingérée vers le sang à travers l'épithélium intestinal, est une étape critique qui participe à la

détermination de la biodisponibilité d'un médicament. L'absorption intestinale se fait par passage passif, transport facilité et transport actif. La diffusion passive est le mécanisme majoritairement mis en jeu dans le passage des médicaments à travers les membranes cellulaires et dépend principalement de leur hydrophobicité.

Cette problématique nous a amené à nous intéresser à l'étude des membranes biologiques qui occupent un rôle essentiel dans l'organisation cellulaire. En effet, elles assurent la compartimentalisation cellulaire et participent à de nombreux mécanismes tels que l'adhésion ou les échanges cellulaires ainsi que la fusion membranaire. Ces fonctions essentielles font des bicouches lipidiques des systèmes d'étude de grand intérêt. La complexité de leur composition a poussé au développement de modèles biomimétiques afin d'étudier les propriétés structurales des membranes ainsi que leurs interactions avec des protéines, peptides ou molécules thérapeutiques ou toxiques.

### **3. Objectifs de la thèse**

L'objectif de mes travaux est d'étudier et de comprendre au niveau moléculaire les propriétés structurales du phospholipide 1-palmitoyl-2-oléoyl-glycérophosphatidylcholine (POPC), constituant principal des bicouches biologiques [Tattre *et al.* 1968]. Pour cela, j'ai développé des modèles de monocouches de POPC pour simuler leur comportement et leur dynamique. Les résultats de ces modélisations ont été confrontés à des résultats expérimentaux obtenus parallèlement dans le groupe du Professeur Véronique Rosilio qui a étudié le comportement de lipides au travers de l'expérience de compression de monocouche de lipides en cuve de Langmuir. Cette expérience est la seule qui permette de mesurer l'évolution de la tension de surface du film lipidique en réponse à une variation de l'aire moléculaire, sous la forme d'une isotherme de compression. La tension de surface permet l'étude de la cohésion des films lipidiques et la compression donne l'accès à leur dynamique. Il est important de noter que pour les systèmes de bicouches lipidiques, les paramètres de tension de surface et d'aire moléculaire ne sont pas accessibles directement. De plus, le modèle d'étude des lipides par compression de monocouche sur balance de Langmuir peut directement être appliqué à l'étude des interactions entre monocouche de lipides et d'autres molécules, telles que d'autres lipides, des petites molécules ou des protéines. Différentes méthodes optiques, de diffraction de la lumière ou microscopie, permettent de visualiser la topographie de la surface des monocouches. Cependant, ce niveau d'observation reste macroscopique et ne permet pas de comprendre l'agencement structural des lipides conduisant à cette organisation.

L'étude des films de POPC que j'ai menée par modélisation moléculaire a donc pour objectif d'apporter un éclairage à l'échelle atomique sur la structure et l'organisation des phospholipides POPC organisés en monocouches. En effet, malgré leur abondance, très peu de simulations par

dynamique moléculaire de monocouche de POPC ont été réalisées, la majorité des études par simulation étant consacrée aux dipalmitoyl-phosphatidylcholines (DPPC), constituants du surfactant pulmonaire [Kaznessis *et al.* 2002 ; Baoukina, Monticelli, Marrink, and Tieleman 2007a ; Baoukina, Monticelli, Marrink, and Tieleman 2007b ; Duncan and Larson 2008 ; Duncan *et al.* 2011].

Pour atteindre un niveau de précision moléculaire, j'ai modélisé un système de monocouche de POPC à l'interface eau/vide. J'ai ensuite cherché à reproduire la compression de cette monocouche par une série de simulations de dynamique moléculaire à différentes pressions de surface. L'isotherme de monocouche de POPC mesurée expérimentalement par le groupe du Professeur Rosilio a été utilisée comme référence afin de valider l'isotherme calculée.

Enfin, une exploration des propriétés structurales des phospholipides en fonction de la pression de surface a été entreprise pour comprendre le comportement dynamique des POPC organisés en monocouche.

Les travaux de cette thèse illustrent l'intérêt et les avantages de combiner la modélisation moléculaire et les techniques expérimentales pour l'étude des lipides en monocouche et s'insèrent dans la perspective d'études des interactions lipides/molécules thérapeutiques pour la compréhension de la perméabilité des monocouches à certaines molécules.

Les premières parties de ce manuscrit rappellent des généralités sur les membranes et les phénomènes de surface avant une description des modèles d'étude de la perméabilité et des systèmes membranaires. Le manuscrit s'articule ensuite autour d'une présentation de l'outil de modélisation moléculaire, suivi de la description de la méthodologie choisie. Les propriétés structurales des phospholipides organisés en monocouche mises en évidence au cours de ces travaux sont ensuite présentées et discutées. Enfin, je terminerai par une conclusion générale résumant les travaux menés au cours de cette thèse et en apportant des perspectives d'études futures.

# Chapitre I.

## GENERALITES SUR LES MEMBRANES BIOLOGIQUES ET LES LIPIDES MEMBRANAIRES

*Les membranes biologiques sont des structures omniprésentes qui délimitent les cellules, les noyaux et les organites intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi...). Organisées en double feuillet composé de lipides, de protéines et de sucres, elles séparent la cellule de son environnement et délimitent le cytoplasme cellulaire. Elles permettent le maintien de compositions différentes entre le cytosol et le milieu extracellulaire (membranes plasmiques), entre le cytosol et le noyau. Elles jouent le rôle de barrière à la perméabilité sélective et assurent ainsi un contrôle des échanges. Ces propriétés ont suscité quantité de recherches depuis de nombreuses années.*

*L'étude de systèmes membranaires vise à comprendre les relations entre l'organisation dynamique de la membrane et les fonctions biologiques qui y sont accomplies. Cela permet également d'analyser les mécanismes à l'échelle moléculaire qui régissent le phénomène de perméabilité d'un composé.*

*Dans les sections suivantes seront détaillés la structure et les rôles ainsi que les caractéristiques des lipides membranaires.*

# 1. Structure des membranes biologiques

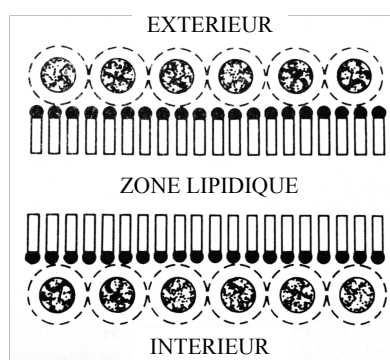
## 1.1. Historique

La notion de membrane plasmique délimitant les cellules est apparue avec l'invention du microscope et les premières observations de cellules végétales par Robert Hook vers 1655.

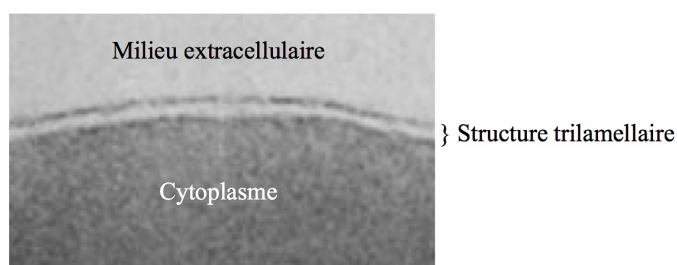
A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le botaniste anglais Charles Ernest Overton remarqua, lors d'une expérience, une corrélation entre le caractère hydrophobe de molécules et leur taux d'absorption dans les cellules végétales. L'hypothèse d'une nature lipidique de la membrane cellulaire se confirma, au début du 20<sup>ème</sup> siècle, avec les travaux d'Overton [Overton 1901] et de Hans Horst Meyer [Meyer 1899], pharmacologue allemand, sur les anesthésiques. Il en résulta la loi de Meyer-Overton qui stipule une corrélation directe entre le pouvoir anesthésiant d'une molécule et sa solubilité dans l'huile d'olive autrement dit son hydrophobicité.

En 1925, Evert Gorter et son assistant François Grendel [Gorter 1924] étudient pour la première fois les lipides membranaires et font l'hypothèse d'une structure membranaire en bicouche. En effet, en isolant les lipides d'érythrocytes, ils ont observé, grâce à la balance de Langmuir, que la surface occupée était deux fois plus grande que la surface des cellules estimée par microscopie.

James Danielli et Hugh Davson [Danielli and Davson 1935] proposent, en 1935, un modèle de membrane en bicouche lipidique recouverte de protéines (Figure I-1). Jusque dans les années 1970, ce modèle dit du "sandwich" a été accepté et confirmé par l'observation d'une structure trilamellaire au microscope électronique, décrivant deux bandes sombres encadrant une bande claire (Figure I-2) [Robertson 1981].

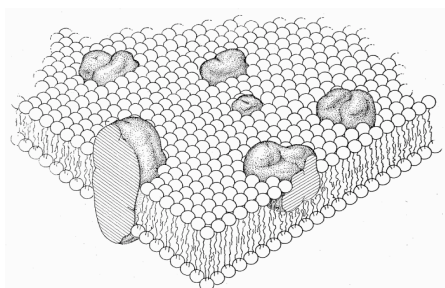


**Figure I-1** – Représentation schématique du modèle en sandwich de Danielli et Davson



**Figure I-2** – Image de microscopie électronique de la structure trilamellaire d'une bicouche d'érythrocyte [Robertson 1981].

En 1972, Jonathan Singer et Garth Nicolson [Singer and Nicolson 1972] décrivent le modèle de la mosaïque fluide que l'on connaît aujourd'hui. La membrane est ainsi composée de deux feuillets de lipides, dont les têtes polaires sont orientées vers la phase aqueuse et qui se font face par leurs parties hydrophobes. Les protéines membranaires ne sont plus disposées en monocouche mais sont des protéines globulaires enchassées, traversant un feuillet ou les deux (Figure I-3). Les observations par microscope électronique après cryofracture ont montré des particules parsemées sur la bicouche, correspondant aux protéines globulaires. La confirmation de cette composition hétérogène a contribué à la notion de mosaïque. La notion de fluidité est due à la nature hydrophobe des contacts entre lipides et avec les protéines.



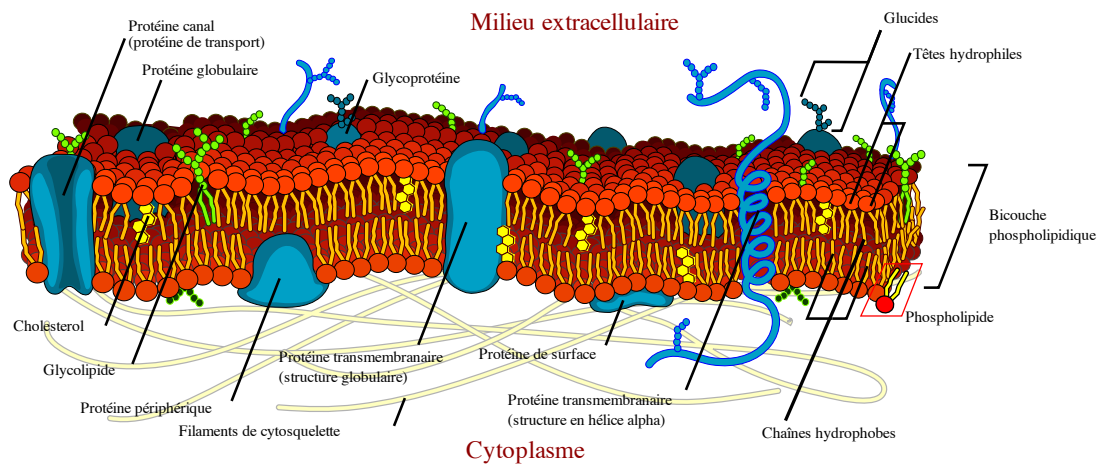
**Figure I-3** – Modèle de la mosaïque fluide proposée par Singer et Nicolson

## 1.2. Composition des membranes

La membrane plasmique, épaisse d'environ 7 nm, forme une barrière continue délimitant les cellules. Elle est composée de lipides, de protéines périphériques intra ou extracellulaires, de protéines transmembranaires et de glucides (Figure I-4).

Les proportions massiques sont de 49% de protéines, 43% de lipides et de 8% de glucides. La proportion des protéines et des lipides est sensiblement la même en terme de masse. Cependant si on considère les proportions moléculaires, les lipides sont environ 50 fois plus nombreux.

La variété de distribution en lipides et en protéines et la présence du glycocalix ou cell-coat (manteau de polymères osidiques présent dans tous les types cellulaires eucaryotes jouant un rôle dans la protection, la reconnaissance et l'adhésion cellulaire et dans les processus infectieux) déterminent l'asymétrie de composition entre les 2 feuillets membranaires, responsable de fonctionnalités spécifiques aux milieux extra et intracellulaire.



**Figure I-4** – Représentation schématique d'une coupe de membrane plasmique et de ses constituants

Les lipides sont les constituants essentiels des bicouches membranaires. Il existe un grand nombre de types lipidiques et leur distribution dans les membranes est très variable selon le type cellulaire notamment. Leur composition sera détaillée dans une partie consacrée.

Comme les lipides, le type de protéine varie selon les cellules et leurs fonctions mais aussi selon leur emplacement dans la membrane.

On distingue deux classes de protéines membranaires selon leur agencement :

- Les protéines extrinsèques ou périphériques, sont à la surface des feuillets. Elles sont liées aux parties polaires des lipides ou aux protéines intrinsèques par des liaisons faibles de type van der Waals, ionique ou hydrogène.
- Les protéines intrinsèques sont enchassées dans la membrane sur un des deux feuillets ou sur toute son épaisseur. Elles sont alors dites transmembranaires et leur chaîne polypeptidique peut traverser une ou plusieurs fois la membrane. Leur partie apolaire est en contact avec la partie hydrophobe des lipides et leur partie polaire avec les têtes polaires lipidiques. Leur ancrage peut être consolidé par des liaisons covalentes avec un acide gras comme par



exemple, la palmitoylation de la partie cytosolique C-terminale de certaines protéines à 7 domaines membranaires ou encore certaines protéines cytosoliques qui peuvent s'associer avec la membrane par ce biais de façon conditionnelle.

- Les glucides représentent une faible proportion massique et moléculaire mais jouent un rôle essentiel dans l'antigénicité notamment. Sous forme de chaînes oligosidiques, les sucres se lient par covalence soit aux protéines, soit aux lipides. Les polysaccharides se fixant uniquement aux protéines de la face extracellulaire forment le manteau cellulaire ou cell coat. Spécifique d'une espèce et d'un individu, ils peuvent ainsi être reconnus par des anticorps. Ils permettent également de concentrer et retenir les molécules du milieu extracellulaire.

## 2. Rôles des membranes biologiques

Cette barrière physique sert premièrement de compartimentalisation des cellules et des organites intracellulaires. Le fonctionnement cellulaire et la communication intercellulaire se font par des échanges ioniques et moléculaires. Pour assurer ces échanges tout en garantissant l'équilibre cytosolique, les membranes biologiques telle que la membrane plasmique sont le siège de systèmes moléculaires qui participent à des mécanismes bien spécifiques.

### 2.1. Mécanismes de signalisation

Comme décrit plus haut la présence de certains sucres à la surface des membranes plasmiques est à l'origine de la reconnaissance cellulaire. Ces marqueurs sont spécifiques de l'individu et jouent un rôle antigénique. Ainsi l'antigène HLA (*Human Leucocyte Antigen*) permet la reconnaissance des cellules du soi par le système immunitaire. Les chaînes oligosidiques des globules rouges sont notamment responsables du système antigénique ABO des groupes sanguins.

La communication passe également par la réception et la transmission d'information. C'est le cas par exemple de la transmission de l'influx nerveux. Au niveau de la synapse, la transmission de l'influx nerveux se fait à sens unique d'une cellule à une autre. La terminaison axonique pré-synaptique libère, sous l'influence du potentiel d'action, des neuromédiateurs dans la fente synaptique. Ils sont ensuite capturés par les récepteurs spécifiques situés à la surface de la cellule post-synaptique, entraînant ainsi la propagation du potentiel d'action. Sur ce même schéma de nombreuses autres voies permettent la transmission de signaux intra et intercellulaires.

Enfin, la membrane plasmique est le siège des jonctions cellulaires qui mettent en jeu des protéines transmembranaires, le cytosquelette et les membranes plasmiques des cellules concernées. On distingue trois types de jonctions selon leur structure et leur rôle. Les jonctions serrées obturent

l'espace intercellulaire des *epithelia* et des *endothelia* du système nerveux et jouent un rôle dans la perméabilité paracellulaire empêchant les molécules de passer dans cet espace. Les jonctions d'ancrage permettent l'association de cellules entre elles ou de cellules à la matrice extracellulaire et les jonctions communicantes forment des tubes transmembranaires assurant la continuité du cytoplasme entre deux cellules voisines.

## 2.2. Mécanismes d'échange

La membrane plasmique est le lieu d'échange entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Les deux modes d'échange sont les échanges cytotiques par déformation de la membrane et les échanges transmembranaires. Nous avons choisi de ne pas détailler les échanges cytotiques regroupant les mécanismes d'endocytose et d'exocytose, pour nous focaliser sur la perméabilité transmembranaire.

Comme mentionné plus haut, les membranes biologiques ont un rôle d'échange mais aussi de protection. Elles assurent les échanges entre l'intérieur de la cellule ou des organites avec l'extérieur tout en maintenant la composition propre de ces derniers. La membrane plasmique est par exemple dite semi-perméable. Certaines molécules peuvent passer d'autre non, c'est la perméabilité sélective. On distingue deux types principaux de passage à travers la membrane plasmique : le transport passif ne consommant pas d'énergie et le transport actif qui en consomme (Figure I-5).

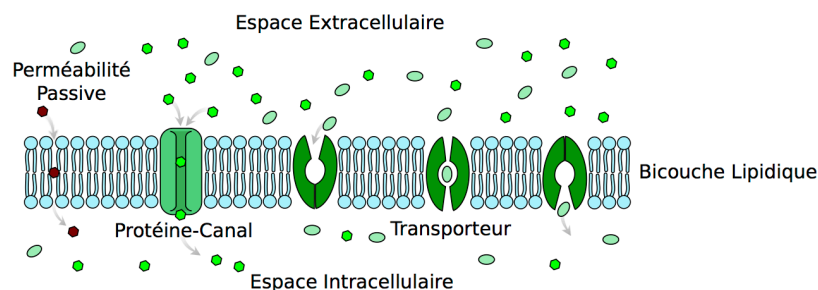


Figure I-5 – Schéma des différents types de passage transmembranaire

Le transport passif est régi par les lois de la diffusion, selon des gradients de concentration.

Les molécules passent à travers la membrane du milieu le plus concentré au milieu le moins concentré. Pour des molécules chargées, la diffusion se fait selon un gradient électrochimique, le gradient électrique s'ajoutant au gradient de concentration.

Dans le cadre du transport passif, on distingue la diffusion simple de molécules à travers la bicouche lipidique, le transport passif par des canaux et le transport facilité par des transporteurs.

La diffusion simple des molécules à travers la bicouche lipidique dépend principalement de leur affinité pour les lipides, mais aussi de leur taille et de leur charge. Ainsi, les molécules hydrophobes non polaires auront un passage facile et rapide, tandis que les petites molécules hydrophiles non chargées passeront plus lentement.

Les molécules chargées traverseront par des canaux selon un gradient électrochimique. Les canaux ne restent pas constamment ouverts et leur ouverture ou fermeture peut être voltage, ligand ou pression-dépendante.

Enfin, le transport facilité est effectué par des protéines spécifiques à certaines molécules comme le glucose. La fixation du glucose sur son récepteur va induire un changement de conformation de celui-ci qui va faire passer le glucose du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire.

Le transport actif n'est pas régi par les lois de la diffusion mais va nécessiter la consommation d'énergie sous forme d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour transporter des molécules contre des gradients chimiques ou électriques. La prise en charge des molécules est assurée par des protéines pompes, symports ou antiports.

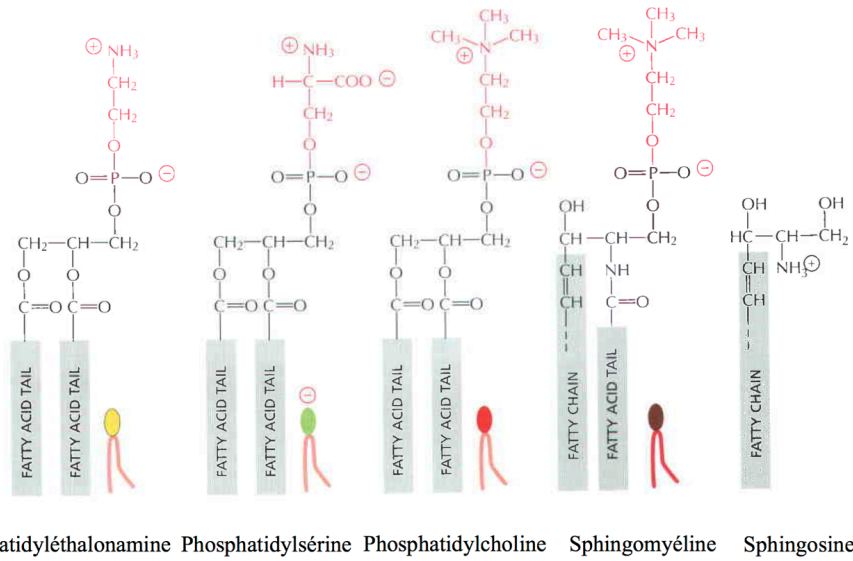
### **3. Lipides membranaires**

Les lipides sont organisés en bicouche et représentent environ 43% de la masse membranaire d'une cellule animale. Il existe trois types principaux de lipides membranaires : les phospholipides, les sphingolipides et le cholestérol.

Les lipides membranaires les plus abondants sont les phospholipides. Ce sont des molécules amphiphiles, constituées d'une tête hydrophile et de deux chaînes hydrocarbonées hydrophobes. La tête hydrophile est composée d'un glycérol estérifié par un acide phosphorique, qui est lui-même estérifié par un alcool aminé, choline, éthanolamine ou sérine, à l'origine de têtes polaires plus ou moins chargées. La partie hydrophobe est constituée de deux chaînes d'acides gras liées par une liaison ester au glycérol. Chez les animaux, les plantes et les bactéries, ces acides gras ont une composition variant entre 14 et 24 atomes de carbone. Généralement, un acide gras est saturé et l'autre porte une insaturation.

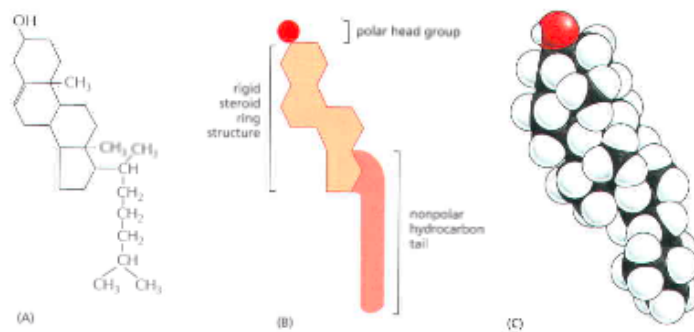
Pour les sphingolipides, le glycérol est remplacé par une sphingosine. Elle est constituée d'une longue chaîne carbonée avec un groupement amine et deux groupes hydroxyles. Pour former un sphingolipide, un acide gras estérifie la fonction amine et un groupement phosphocholine estérifie le groupement hydroxyle de la sphingosine.

Les phospholipides phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, et phosphatidylsérine, ainsi que les sphingomyélines constituent plus de 50% de la masse totale des lipides membranaires (Figure I-6).

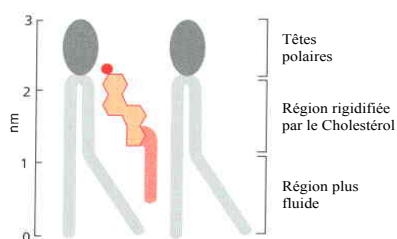


**Figure I-6** – Principaux phospholipides membranaires (adapté de « *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>ème</sup> Edition »)

Constitué d'un noyau hydrophobe rigide, d'un groupement hydroxyle et d'une chaîne courte hydrocarbonée, le cholestérol est le stérol le plus représenté (Figure I-7). Le groupement hydroxyle s'oriente naturellement vers les têtes polaires laissant le corps rigide dans la partie hydrophobe des chaînes phospholipidiques. A l'échelle des molécules de lipides, il consolide la membrane (Figure I-8) et la fluidifie à l'échelle macroscopique de la bicouche. Sa capacité à ordonner les chaînes lipidiques peut réduire la perméabilité de la membrane aux petites molécules [Ferreira *et al.* 2013].



**Figure I-7** – Structure du cholestérol (extrait de « *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>ème</sup> Edition »)



**Figure I-8** – Agencement du cholestérol dans les phospholipides (adapté de « *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>ème</sup> Edition »)

Le taux de cholestérol est variable selon les cellules et sa répartition n'est pas homogène. Souvent associé aux sphingolipides comme la sphingomyéline, le cholestérol forme des domaines rigides dans la membrane. Ces clusters riches en cholestérol apparaissent comme des domaines ordonnés et rigides capables de diffuser dans la membrane. Cette composition et cette organisation caractéristiques en font l'objet de nombreuses études. Les premiers travaux mentionnant l'existence de tels domaines sous le nom de radeaux lipidiques datent seulement de 1997 par K. Simons et E. Ikonen [Simons and Ikonen 1997]. Ces micro-domaines de lipides peuvent inclure certaines protéines (ce sont le siège d'accumulation de protéines) et occupent un rôle essentiel dans le transport par endocytose et dans la transmission des signaux intracellulaires.

### 3.1. Auto-agencement et état d'organisation ou « Packing »

Les lipides dans l'eau sont capables de s'auto-organiser de manières différentes donnant au mélange un aspect polymorphe. L'agencement préférentiel dépend de l'état d'organisation géométrique ou « *packing* » des lipides, de leur concentration, des conditions de température, pression, pH et d'ionisation. On distingue 4 organisations principales [Gennis 1989] :

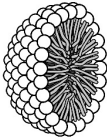

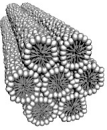
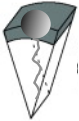
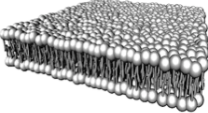
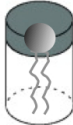
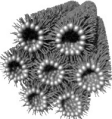
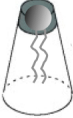
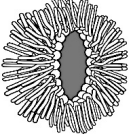
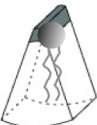
- Phase lamellaire liquide cristalline : les lipides sont organisés en bicouche avec des chaînes très désordonnées.

- Phase lamellaire gel : les lipides sont organisés en bicouche avec des chaînes très ordonnées.

- Phase hexagonale 1 : les lipides sont organisés sous forme de cylindre où les têtes polaires sont orientées vers la phase aqueuse. Les cylindres ainsi formés s'organisent eux-mêmes en un motif hexagonal.

- Phase hexagonale 2 : les lipides sont organisés sous forme de cylindre mais les têtes polaires sont orientées vers l'intérieur, emprisonnant ainsi la phase aqueuse. Les cylindres ainsi formés s'organisent eux-mêmes en un motif hexagonal.

La notion de *packing* correspond à la forme moléculaire générale d'un lipide [Israelachvili and Mitchell 1975 ; Israelachvili *et al.* 1980]. Cette forme est caractéristique d'une organisation. Ainsi, une organisation en micelle ou phase hexagonale 1 est un assemblage de lipides en forme de cône inversé, une bicouche ou phase lamellaire contient des lipides cylindriques, alors que la phase hexagonale 2 est composée de lipides en cône. Ce *packing* est quantifiée par le paramètre d'assemblage critique (PAC) défini par :  $PAC = \text{volume de la partie hydrophobe} / (\text{Aire minimale de la tête polaire} * \text{Longueur des chaînes hydrophobes})$ . Le *packing* étant dépendant de la structure des lipides, on retrouvera préférentiellement certains types de lipides dans certaines structures plutôt que d'autres (Tableau I-1).

PHASE	FORME MOLECULAIRE	PARAMETRE D'ASSEMBLAGE CRITIQUE
 <i>Micelle</i>		< 1/3
 <i>Hexagonal H1</i>		1/3 – 1/2
 <i>Lamellaire</i>		~ 1
 <i>Hexagonal H2</i>		> 1
 <i>Micelle inversée</i>		> 1

**Tableau I-1** – Structure de l'assemblage spontané en fonction de la forme des molécules amphiphiles

### 3.2. Composition en lipides

La composition en lipide est très variable en fonction du type et de la fonction cellulaire (Tableau I-2). En effet, les propriétés de chaque lipide et de leur agencement entre eux vont donner des propriétés propres aux différentes cellules et selon leur localisation.

Seuls les lipides principaux ont été présentés précédemment mais d'après des analyses en spectrométrie de masse, on compte entre 500 et 1000 espèces de lipides différentes (*Molecular Biology of the Cell, 5ème Edition*). Cette complexité provient notamment de la variabilité combinatoire entre les groupements polaires, la longueur des chaînes hydrocarbonées ainsi que de leur degré d'insaturation.

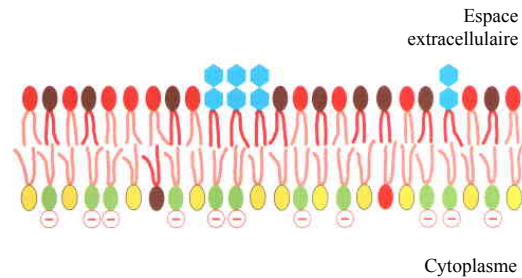
LIPIDE	% DE LA MASSE TOTALE DE LIPIDE					
	Hépatocytes	Erythrocytes	Myéline	Mitochondries (Membrane interne externe)	Réticulum Endoplasmique	E. coli
Cholestérol	17	23	25	3	6	0
Phosphatidyléthanolamine	7	18	15	28	17	70
Phosphatidylsérine	4	7	9	2	5	0
Phosphatidylcholine	24	17	19	44	40	0
Sphingomyéline	19	18	8	0	5	0
Glycolipides	7	3	28	0	0	0
Autres	22	14	8	23	27	30

**Tableau I-2** – Composition en lipides de différents types cellulaires

Cette diversité de composition confère certaines propriétés aux membranes d'un certain type cellulaire. Les membranes bactériennes sont par exemple dépourvues de cholestérol, leur stabilité mécanique étant assurée différemment chez les Gram<sup>+</sup> et les Gram<sup>-</sup> : la bicouche lipidique est entourée principalement de peptidoglycane chez les Gram<sup>+</sup>, alors que les Gram<sup>-</sup> présentent une couche de peptidoglycane plus fine mais recouverte d'une deuxième bicouche lipidique où s'ancrent diverses protéines.

De même, la composition des deux feuilletts de la membrane plasmique peut varier (Figure I-9). Les érythrocytes portent sur le feuillet externe essentiellement des phosphatidylcholines et des sphingomyélines alors que leur feuillet interne est composé majoritairement de phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine. La charge négative du groupement de la sérine rend

le feuillet cytosolique négatif. Cette asymétrie de charge est essentielle pour beaucoup de fonctions et propriétés [Israelachvili 1973], telles que les transmissions de signaux cellulaires.



**Figure I-9** – Distribution asymétrique des phospholipides et des glycolipides dans la bicouche lipidique. En plus de la nomenclature des phospholipides et du code couleur utilisé dans la **Figure I-6**, les glycolipides sont représentés ici par les têtes polaires hexagonales bleues (extrait de « *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>ème</sup> Edition »).

## 4. Aspects dynamiques de la membrane

### 4.1. Dynamique membranaire

En l'absence de liaisons covalentes, les interactions entre l'ensemble des constituants membranaires sont faibles. Souvent comparée à un fluide à deux dimensions, la membrane est très dynamique de part les mouvements des lipides et des protéines. L'étude des mouvements individuels des lipides par marquage fluorescent, révèle trois types de mouvements : les translations latérales au sein d'une même monocouche, les rotations des lipides autour de leur axe et les « *flip-flop* » permettant de passer d'un feuillet à un autre.

Les translations latérales sont nombreuses et donnent lieu à un coefficient de diffusion latérale élevé (environ  $10 \text{ e}^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ) (*Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>ème</sup> Edition). Le flip flop spontané est un phénomène plus rare pour les phospholipides que pour le cholestérol. Cependant cette diffusion interfeuillet est essentielle au maintien de la composition asymétrique de la membrane. Des protéines flippases assurent cette translocation des phospholipides. La rotation des lipides est rapide et accompagnée d'une grande flexibilité des chaînes hydrocarbonées.

Outre les mouvements des lipides, les protéines sont également animées de mouvement comme l'ont montré Frye et Edidin en 1970 avec l'expérience de l'hétérocaryon [Frye and Edidin 1970]. Le marquage par anticorps fluorescents des protéines de surface d'une cellule humaine d'une part et



d'une cellule murine d'autre part a montré la diffusion des protéines suite à la fusion de ces deux cellules.

## 4.2. Fluidité

La propriété de fluidité est principalement due à deux composantes : la composition et la température. En effet, le cholestérol contribue à la stabilité et au maintien de la structure des membranes plasmiques. Plus la membrane a un fort taux de cholestérol, plus les espaces entre les phospholipides vont être comblés par cette molécule rigide et moins la membrane sera perméable aux molécules hydrosolubles.

Le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées est également un facteur important. Plus la chaîne comporte de doubles liaisons, plus les chaînes vont être désordonnées les unes par rapport aux autres [A. Seelig and Seelig 1977]. Elles seront donc liées de manière moins stable, ce qui augmente la fluidité de la membrane. Il en est de même avec la longueur des chaînes. Plus les chaînes seront courtes, plus la fluidité sera grande.

Enfin, la température est un facteur essentiel car l'agitation thermique augmente le mouvement des molécules. Ainsi, à faible température lorsque les chaînes lipidiques sont rigides, le cholestérol va fluidifier la membrane alors qu'à des températures plus élevées, où les chaînes lipidiques sont fluides, le cholestérol va avoir tendance à rigidifier la membrane.

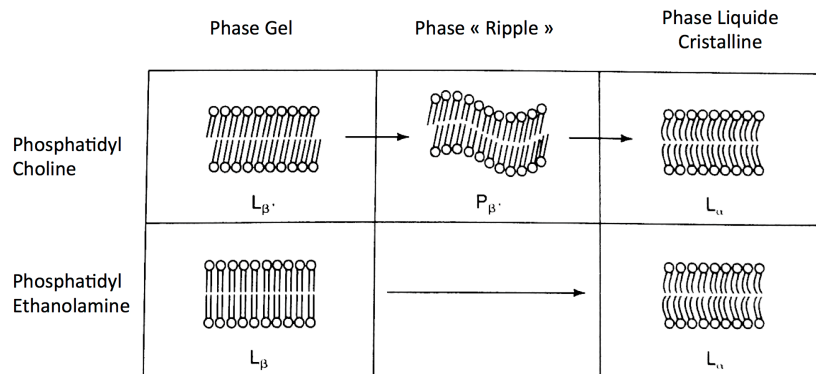
## 4.3. Transition de phase

La structure et les propriétés physiques des bicouches lipidiques se modifient radicalement à des températures caractéristiques. On parle alors de transition de phases principalement dues à des changements de conformation et d'organisation des chaînes carbonées.

On distinguera une phase dite solide ou gel et une phase dite liquide ou liquide cristalline. Le passage de l'état solide à l'état liquide est appelé transition principale. La température seuil à laquelle intervient ce passage est la température de transition de phase ou  $T_m$  (*Temperature of Melting*). Elle est spécifique de la structure de chaque lipide.

La température de transition varie selon la longueur des chaînes et le degré d'insaturation des lipides, ainsi que la nature de leur groupement polaire [Leekumjorn and Sum 2007a ; Leekumjorn and Sum 2006a ; Blume 1979] (Figure I-10). Pour une même tête polaire, plus les chaînes sont longues, plus les interactions van der Waals seront fortes et donc plus la température de fusion sera élevée.

Les insaturations vont perturber les interactions entre les chaînes. Pour une même longueur de chaîne, les lipides portant des insaturations ont une température de fusion plus basse.



**Figure I-10** – Transition de phases des bicouches (Adapté de « Biomembranes – Molecular Structure and Function » de Robert B. Gennis, 1989, Springer-Verlag)

Ainsi, pour une même température, selon la longueur des chaînes et le degré d'insaturation, on peut trouver des lipides à l'état solide et d'autres à l'état liquide. La température de transition pour un mélange de lipides miscibles sera intermédiaire entre celle des lipides pris individuellement.

Enfin, selon le groupement polaire, les températures de transition varient et peuvent entraîner des phases intermédiaires telle que la phase dite « ripple » ou de pré-transition observée pour les phosphatidylcholines (Figure 1-10).

#### 4.4. Equivalence bicouche - monocouche

Le modèle d'étude de cette thèse étant une monocouche de phospholipides, il est important de rappeler que ces transitions de phases existent aussi bien pour les lipides de la bicouche membranaire que pour les lipides arrangés en monocouche [Albrecht *et al.* 1978].

En 1992, Kajiyama *et al.* ont mis en évidence l'existence de différentes phases, amorphe et cristalline, au sein de monocouches d'acide gras, à différentes pressions de surface et températures [Kajiyama *et al.* 1992].

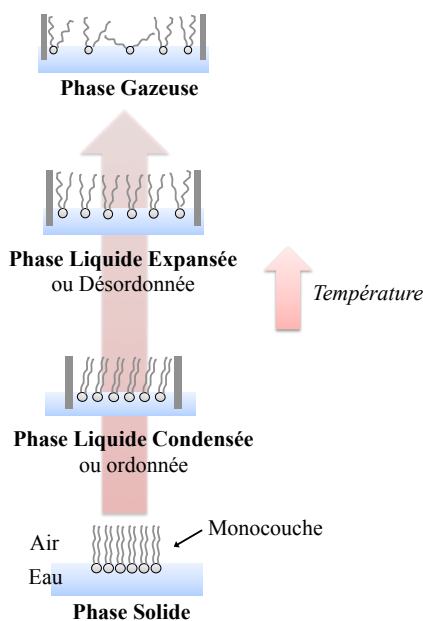
Alors que les températures de transition des bicouches sont mesurées par des méthodes de calorimétrie, les transitions de phases des monocouches sont mesurées par des méthodes de balance de Langmuir en traçant l'évolution de l'aire moléculaire en fonction de la pression de surface (isotherme pression-surface) ou de la température (isobare surface-température). Les isothermes de Langmuir seront détaillées dans le chapitre consacré aux phénomènes de surface.

On distinguera une phase dite gazeuse aux hautes températures (ou faibles pressions), une phase dite liquide cristalline aux températures (ou pressions) intermédiaires et une phase dite solide ou gel aux

basses températures (ou forte pressions). Dans la phase liquide cristalline, on distingue la phase liquide condensé (LC), dans laquelle les chaînes sont ordonnées et la phase liquide expansé (LE), dans laquelle les chaînes sont désordonnées, lorsque la température augmente (ou la pression diminue). Ces différentes phases étant caractérisées par une morphologie particulière des phospholipides, la transition de phase LC - LE des monocouches est comparable à la transition de phase observée pour les bicouches. C'est ainsi que l'on détermine une température de transition à 43°C pour les bicouches de DPPC, et une pression de transition à 10 mN/m pour les monocouches de DPPC à 25°C. [Albrecht *et al.* 1978]

Le désordre observé aux faibles pressions de surface participe à l'augmentation du volume et de l'aire occupée par lipide. Chaque phase peut donc être définie par des aires moléculaires spécifiques.

Les travaux d'Alfred Blume en 1979 [Blume 1979], ont montré qu'à une pression latérale de 30 mN/m, les aires moléculaires et leurs variations en fonction de la transition de phase étaient les mêmes pour le système bicouche et monocouche. Les monocouches de phospholipides étant un modèle de membrane largement utilisé, il est essentiel d'établir les conditions expérimentales permettant la comparaison des deux systèmes. Afin de transférer les observations faites sur les systèmes de monocouche aux systèmes de bicouche, la pression de 30 mN/m a été retenue comme pression d'équivalence bicouche-monocouche.



**Figure I-11** – Transition de phases des monocouches en fonction de la température

# Chapitre II.

## PHENOMENES DE SURFACE

*Ces phénomènes relèvent des sciences de surface qui regroupent la chimie et la physique des surfaces. Les phénomènes de surface sont décrits par un ensemble d'observations physiques et chimiques caractéristiques de la surface d'une phase.*

*Au sein d'une phase, l'environnement moléculaire est homogène et les interactions inter-moléculaires sont uniformément distribuées sur chaque molécule. A la surface d'un liquide par contre, l'environnement moléculaire change et l'ensemble des forces d'attraction et de répulsion s'exerce de façon anisotrope sur les molécules de surface. Ces interactions inter-moléculaires de surface sont responsables des phénomènes de surface, tels que la tension de surface.*

*Ces phénomènes, également appelés phénomènes d'interface, sont généralement appliqués aux interfaces liquide/liquide, liquide/solide ou liquide/gaz.*

## 1. Bref historique sur les films de Langmuir

La mise au point des films de Langmuir et de Langmuir-Blodgett résulte d'une série d'observations de Benjamin Franklin concernant l'étalement d'une cuillère à soupe d'huile sur une surface d'eau [B. Franklin 1773]. Il remarqua que le recouvrement de l'eau par l'huile était un phénomène presque instantané, s'accompagnant d'une modification de la surface qui devient extrêmement lisse. La formation de cette flaque d'huile le poussa à écrire en 1773 à la *British Royal Society* :

*« ... I fetched out a cruet of oil, and dropped a little of it on the water. I saw it spread itself with surprising swiftness upon the surface.. the oil, though not more than a teaspoonful, produced an instant calm over a space several yards square, which spread amazingly and extended itself gradually until it reached the leaside, making all that quarter of the pond, perhaps half an acre, as smooth as a looking glass. »*

Un siècle après, Lord Rayleigh émettait l'hypothèse de l'existence de films lipidiques monomoléculaires. Il reproduisit l'expérience de Benjamin Franklin en versant de l'huile sur une surface d'eau et en divisant le volume d'huile par la surface d'étalement, il en déduisit que la taille d'une molécule d'huile était de l'ordre du nanomètre. Ses travaux sur les couches minces lui ont permis d'émettre l'hypothèse que l'étalement particulier de l'huile sur l'eau et la surface recouverte répondrait à l'organisation des molécules d'huile en un film d'une seule molécule d'épaisseur.

C'est avec l'aide de ce dernier que l'Allemande Agnès Pockels publia en 1891 dans *Nature* ses travaux sur la conception de la toute première balance de mesure de surface [Pockels 1891]. Cette balance, fabriquée artisanalement dans son évier de cuisine, lui a permis de mesurer la surface d'eau recouverte par différentes huiles. Agnès Pockels décrit l'expérience qui lui a permis de modifier la surface recouverte avec des barrières et introduit la notion de tension de surface qui influe sur la surface d'huile répandue.

Les travaux de Pockels servirent de base à Irving Langmuir qui poursuivit l'étude des films d'huile répandus sur une surface d'eau [Langmuir 1917]. Pour cela, il perfectionna la balance de mesure de surface, qui porte aujourd'hui son nom. Grâce à la mesure systématique de différentes monocouches d'huile, il observa que la longueur des chaînes de lipides n'influe pas sur la surface couverte par le film d'huile et que les molécules d'huile s'organisaient donc verticalement à la surface de l'eau. Les nombreuses isothermes obtenues lui permettent d'étudier la relation surface de recouvrement et degré de compression. Il en déduit une théorie sur la tension de surface qui serait dépendante de l'orientation et de la structure des molécules qui s'adsorbent à la surface de l'eau.

Dans les années 1920, avec l'aide de son assistante Katharine Blodgett, alors qu'ils travaillaient sur les films de recouvrement des surfaces chez *General Electric*, les deux collègues ont réussi le transfert de molécules d'acides gras de surfaces liquides sur des surfaces solides.

En 1932, Irving Langmuir remporta le Prix Nobel pour ses travaux en chimie des surfaces et en 1935, Katharine Blodgett publie pour la première fois la méthode de transfert des monocouches sur support solide [Blodgett 1935]. Les monocouches flottant sur des surfaces liquides sont depuis appelées films de Langmuir et les monocouches transférées sur support solide sont les films de Langmuir-Blodgett.

Une des premières applications du principe du film de Langmuir-Blodgett a été son utilisation en revêtement multicouche sur le verre pour la production des premiers verres anti-reflet transparents.

## 2. Quelques notions de chimie de surface

Les notions abordées dans les paragraphes suivants font références aux ouvrages « *Biomembranes – Molecular Structure and Function* » de R. B. Gennis chez *Springer-Verlag* et « *An introduction to the principles of surface chemistry* » de R. Aveyard et D. A. Haydon chez *Cambridge Chemistry Texts*.

### 2.1. Définition d'une interface

Une interface peut être décrite simplement comme une zone séparant deux phases bien distinctes, et qui, du fait de sa très faible épaisseur, est considérée comme un système à deux dimensions. Alors qu'au sein de chacune des phases les interactions inter-moléculaires sont les mêmes, à la surface de chaque phase, ces interactions changent et caractérisent l'interface. On distingue les interfaces liquide/liquide, solide/liquide, solide/gaz (et/ou vide), liquide/gaz. Lorsque l'une des deux phases est un gaz, on parle communément de surface. Dans le cadre des films de Langmuir, nous nous intéresserons uniquement à l'interface liquide/gaz où l'interface est constituée d'un film monomoléculaire de phospholipides.

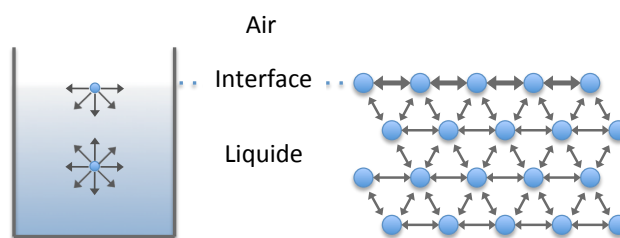
### 2.2. Tension de surface

La tension de surface ou tension superficielle s'applique à la surface d'un liquide. Elle peut être définie comme la force de cohésion entre les molécules à la surface de celui-ci.

En effet, la force de cohésion ou d'attraction inter-moléculaire est différente selon qu'on la considère au sein du liquide ou à la surface. Au sein d'un liquide composé d'un seul type de molécules, les

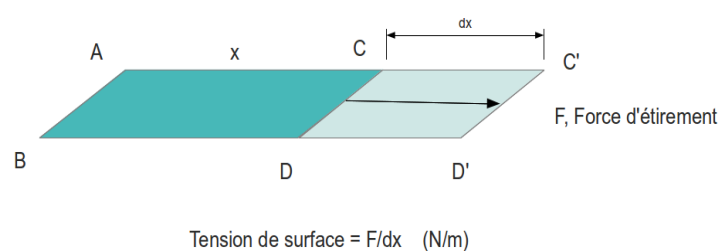
molécules subissent l'attraction des molécules voisines de manière isotrope. Les molécules à l'intérieur du liquide sont soumises à cette attraction dans toutes les directions, la résultante des forces est donc nulle.

A l'interface eau/air, les molécules de surface subissent cette attraction de manière anisotrope. Les molécules en contact avec l'air ne sont soumises qu'à l'attraction des molécules de l'intérieur du liquide, alors que du côté air, aucune force d'attraction ne s'exerce (Figure II-1). La résultante est donc un excès d'énergie qui tend la surface du liquide de façon à minimiser la surface de contact du liquide avec l'air et qui est propre à la substance qui compose le liquide.



**Figure II-1** – Illustration schématique de la tension de surface, les flèches représentent l'attraction intermoléculaire

La tension de surface peut être définie comme la force à appliquer pour étendre une interface sur une distance donnée. De ce fait, elle s'exprime comme une force par unité de longueur, N/m, dans le système international ou en dyne/cm (Figure II-2).



**Figure II-2** – Illustration schématique de la force de tension

La tension de surface est donc une tension existant à la surface d'un liquide qui est notamment responsable de la capacité de certains insectes à marcher sur l'eau. Cette propriété est également responsable de la forme sphérique des gouttes. En effet, la sphère est la forme géométrique offrant la plus petite superficie extérieure pour un volume donné.

## 2.3. Tensioactif

Un tensioactif est un composé amphiphile. Il possède une affinité pour chacune des deux phases en présence et s'adsorbe à l'interface qui les sépare. Il réduit ainsi la tension de surface. Dans le cas de l'interface eau/air, un tensioactif est un composé qui comporte une partie hydrophile ou polaire et une partie hydrophobe ou apolaire.

### 2.3.1. Composition et structure

Le caractère amphiphile des tensioactifs leur permet de s'associer de manière caractéristique en solution pour former des structures telles que des micelles, des vésicules ou des films interfaciaux ou monocouches constituées de molécules orientées.

La partie hydrophobe est généralement constituée de chaînes hydrocarbonées tandis que la partie hydrophile est formée de groupes polaires tels que OH, COOH,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{PO}_4^-$ , etc. (Figure II-3)

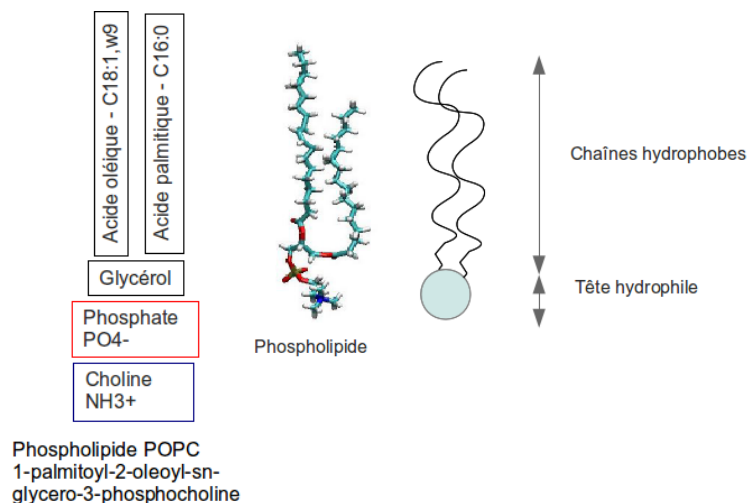


Figure II-3 – Structure d'un phospholipide

### 2.3.2. Applications des tensioactifs

La capacité à abaisser la tension superficielle peut être déterminée par le rapport entre les parties hydrophiles et, hydrophobes appelé balance HLB (Hydrophile Lipophile Balance). Plus le rapport hydrophile/hydrophobe est grand, plus le tensioactif est soluble dans l'eau. Cet indice présente



l'avantage d'être additif. Ainsi, plusieurs tensioactifs peuvent facilement être mélangés pour atteindre une HLB optimale pour la phase considérée [Griffin 1949].

Les agents de surface capables de rendre solubles des substances normalement insolubles sont dits solubilisants. Ils sont caractérisés par une concentration micellaire critique, au dessus de laquelle les molécules tensioactives s'agrègent en micelles. Ces organisations micellaires forment des agrégats plus ou moins sphériques enfermant les parties hydrophobes à l'intérieur et présentant les parties hydrophiles à l'extérieur, en contact avec l'eau. Le pouvoir solubilisant consiste en l'emprisonnement des substances non solubles hydrophobes dans les micelles.

De cette capacité solubilisante, dérive également des propriétés détergentes. En effet, les détergents vont être capables d'extraire les molécules à éliminer d'une surface solide, pour les enfermer dans des micelles solubles dans l'eau, pour être éliminées avec l'eau de rinçage.

Les agents moussants sont capables de renforcer les interfaces eau/air pour former et stabiliser les bulles d'air constituant la mousse.

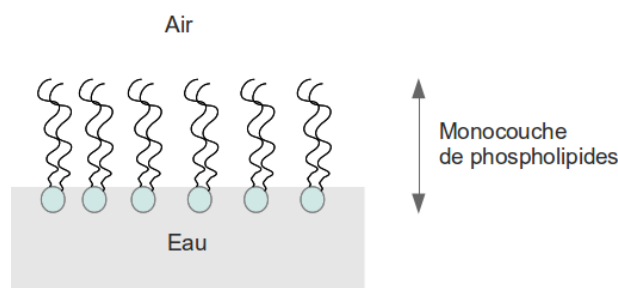
Les agents mouillant favorisent l'étalement d'un liquide sur un solide. En effet, en diminuant la tension de surface de l'interface solide/liquide, la surface de contact entre les deux phases va pouvoir augmenter et le liquide s'étaler davantage sur le solide.

Enfin certains agents de surface sont utilisés pour leur pouvoir bactéricide. Ces tensioactifs sont souvent des sels cationiques d'ammonium, capables de déstabiliser la paroi bactérienne entraînant des dysfonctionnements létaux pour les bactéries.

## **2.4. Monocouches insolubles**

Lorsque la balance HLB est faible, les tensioactifs deviennent insolubles dans l'eau. Il devient alors possible avec l'aide d'un solvant volatil et non miscible à l'eau de déposer les molécules de tensioactifs à la surface du liquide (alors appelé sous-phase), formant ainsi un film insoluble à l'interface eau/air après évaporation (Figure II-4).

Le film est composé d'agents de surface organisés de manière orientée (tête hydrophile dans l'eau et chaîne hydrophobe vers l'air) et en monocouche, c'est-à-dire que l'épaisseur du film est de la taille d'une molécule de surfactant. Cette monocouche qui sépare les deux phases, est alors appelée film monomoléculaire insoluble ou encore film de Langmuir.

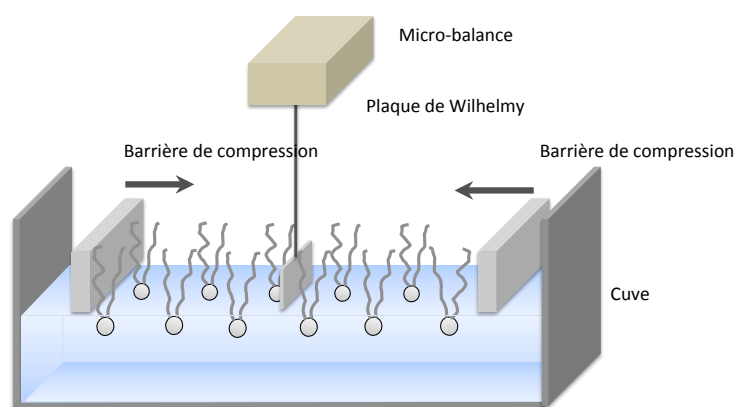


**Figure II-4** – Schéma d'une monocouche insoluble

## 2.5. Pression de surface et cuve de Langmuir

Les monocouches insolubles ont un comportement dépendant du type de lipides qui les composent et qui leur confèrent un comportement interfacial caractéristique.

La cuve de Langmuir est un dispositif expérimental permettant de mesurer la pression de surface d'une monocouche en fonction de l'aire occupée par les molécules, à l'aide d'une lame de Wilhelmy. Elle est constituée par une cuve remplie d'eau sur laquelle le film de phospholipides est déposé, d'une ou de deux barrières mobiles permettant la compression latérale du film et d'un capteur de force pour la mesure de la tension de surface (tensiomètre ou baromètre ou microbalance) (Figure II-5).



**Figure II-5** – Schéma de la cuve de Langmuir

La cuve est construite dans un matériau inerte et hydrophobe, comme le Téflon, afin d'éliminer toute interaction avec les molécules déposées.

Les molécules sont solubilisées dans un solvant ou un mélange de solvants organiques volatiles (chloroforme, méthanol, hexane, etc.), puis sont déposées délicatement à la surface de l'eau à l'aide d'une micro-seringue. La solution s'étale pour couvrir toute la surface disponible et après l'évaporation du solvant les molécules s'orientent avec leur tête polaire immergée dans l'eau, et leur(s) chaîne(s) hydrophobe(s) orientée(s) « dans l'air ».

Au début de l'expérience, lorsque les barrières se situent aux extrémités opposées de la cuve, les molécules de tensioactifs sont très espacées et leurs interactions sont faibles. Dans cet état « gazeux », la monocouche n'a pas d'effet sur la tension de surface de l'eau. En comprimant les molécules par les barrières mobiles, la surface disponible à l'interface se réduit et les molécules se rapprochent les unes des autres. Les interactions intermoléculaires deviennent mesurables.

Les molécules de tensioactifs abaissent la tension de surface de l'eau. La pression de surface est définie comme la différence entre la tension de surface de la sous-phase pure  $\gamma_0$  et la tension de surface de la même sous-phase recouverte par la monocouche de tensioactif d'intérêt  $\gamma_{\text{monocouche}}$ .

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_{\text{monocouche}} \quad (\text{II-1})$$

La tension de surface de l'eau est de 73 mN/m à 20°C. C'est une des tensions de surface les plus élevées comparativement à des liquides composés d'alcool, d'acétone ou de glycérol. Les tissus biologiques étant principalement constitués d'eau, l'eau a été choisi comme sous-phase pour les études des monocouches de phospholipides membranaires.

Les manipulations expérimentales utilisées comme référence mesurent la tension de surface avec la méthode de la lame de Wilhelmy (Figure II-6). Cette lame très fine et partiellement immergée est happée par la surface de l'eau. La micro-balance qui y est reliée mesure la force d'attraction vers le bas exercée sur la lame par les molécules interfaciales à travers le phénomène de mouillage. Par capillarité, les molécules de l'interface s'adsorbent à la lame, formant ainsi un ménisque, dont la hauteur dépend des forces intermoléculaires de l'interface, soit de la tension de surface.

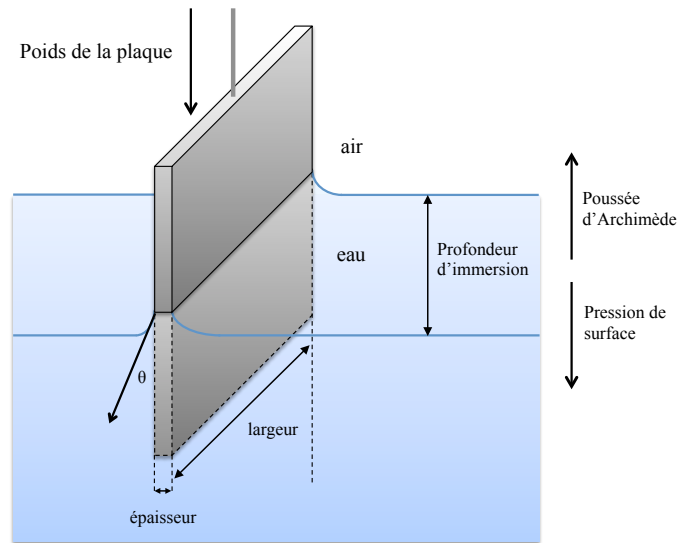


Figure II-6 – Schéma de la plaque de Wilhelmy

La lame est soumise à trois forces : la gravité, la tension de surface et la poussée d'Archimède. La force résultante mesurée peut donc être définie par l'équation suivante:

$$\text{Force mesurée} = \text{poids de la plaque} + \text{pression de surface} - \text{poussée d'archimède} \quad (\text{II-2})$$

$$\text{Force mesurée} = (m \cdot g) + 2(e + l) \cdot \gamma \cdot \cos \theta - (\rho \cdot V \cdot g) \quad (\text{II-3})$$

Avec :

- $m$  masse de la plaque en g
- $g$  gravité  $m/s^2$
- $e$  épaisseur de la plaque (cm)
- $l$  largeur de la plaque (cm)
- $\gamma$  tension de surface
- $\rho$  densité de l'eau
- $V$  volume de la plaque immergée

Si on considère que le poids de la lame peut être négligé en remettant la balance à zéro pour ne mesurer que la composante de la force d'attraction et que la poussée d'Archimède peut être compensée par la force qui tire la lame afin de la remonter, l'équation précédente devient :

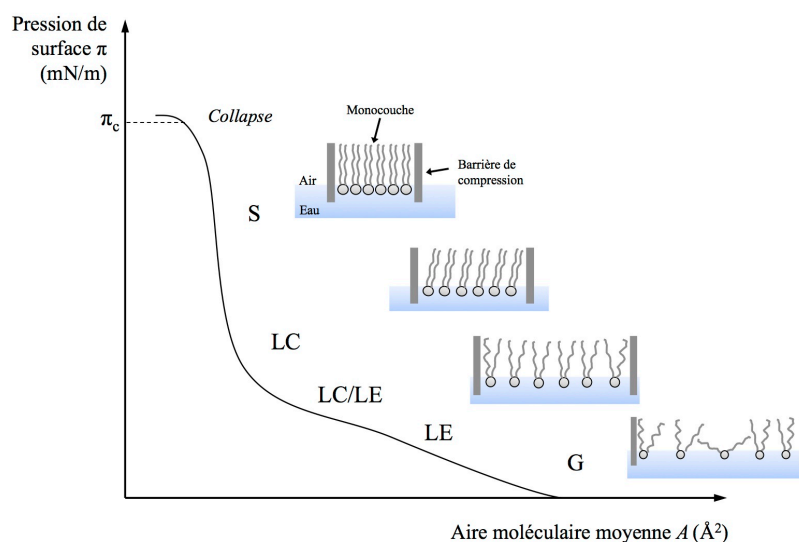
$$F = 2(e + l) \gamma \cos (\theta) \quad (\text{II-4})$$

## 2.6. Isotherme Pression de surface – Aire moléculaire

Le suivi de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire moyenne permet d'obtenir l'indicateur principal décrivant les propriétés des monocouches de molécules amphiphiles à l'interface eau/air.

L'aire moléculaire est définie comme la surface occupée par chaque molécule de la monocouche et est caractéristique du type de molécule. Dans le cas des phospholipides, la longueur et la nature (saturée ou non) des chaînes d'acides gras, ainsi que la nature des têtes polaires vont influencer sur l'aire moléculaire selon la conformation des molécules à une température et une pression de surface données.

L'isotherme Pression de surface - Aire moléculaire ou simplement isotherme  $\pi$ -A est donc obtenue par la mesure de la pression de surface à température constante. La réduction de l'aire du film est obtenue par compression latérale. La compression est suffisamment lente pour permettre aux molécules de se réarranger à la surface de l'eau et de distinguer différentes phases selon leur organisation (Figure II-7).



**Figure II-7** – Schéma théorique d'une isotherme de phospholipides

À de grandes aires moléculaires, lorsque la pression de surface est très faible, le comportement de la monocouche est assimilé à celui d'un gaz à deux dimensions. Les molécules sont couchées sur l'interface et se répartissent aléatoirement à la surface. Elles sont très éloignées les unes des autres et il

n'existe pas d'interaction significative entre elles. La phase gazeuse est caractérisée par une variation quasi nulle de la pression de surface en fonction de la diminution de l'aire.

A mesure que la surface du film se réduit les molécules se rapprochent et leurs interactions augmentent. Cette phase est appelée phase liquide expansée. Les molécules peuvent être couchées à la surface ou s'orienter plus ou moins verticalement. Les chaînes carbonées des molécules de lipides interagissent par des forces de van der Waals.

A des aires encore plus réduites, les molécules sont toutes inclinées par rapport à la surface de l'eau pour former la phase liquide condensée. Le degré d'ordre des molécules augmente encore et les lipides s'organisent parallèlement les uns aux autres. Les molécules de phospholipides interagissent par liaisons hydrophobes (chaînes carbonées) et dipôle-dipôle ou électrostatiques (tête polaires).

La transition entre ces deux phases est appelée transition principale et il existe une zone de l'isotherme où l'état liquide expansé et liquide condensé coexistent.

Aux petites aires, les molécules sont toutes orientées verticalement à la surface de l'eau. Le degré d'ordre est très important et l'organisation des molécules s'apparente à celle d'une phase solide. A de petites variations d'aire correspondent de forte augmentation de la pression de surface.

Enfin, au dessus d'une valeur de pression propre à chaque type de lipide, la surface n'est plus assez grande pour contenir toutes les molécules, la monocouche est alors désorganisée. Certaines sont expulsées soit en sous-phase, soit au-dessus de la monocouche selon le degré de solubilité du tensioactif, c'est le collapse.

# Chapitre III.

## METHODES D'ETUDE DE LA PERMEABILITE ET MODELES DE MEMBRANES

*La perméabilité membranaire est un phénomène complexe mettant en jeu les propriétés physico-chimiques des systèmes membranaires ainsi que des composés capables de les traverser. L'hydrophobicité est largement reconnue comme le descripteur principal de la capacité des composés à traverser les membranes. La structure et l'organisation de ces dernières sont complexes du fait de leur grande fluidité et de la diversité de leur composition en lipides. De ce fait, les systèmes membranaires font l'objet de nombreuses études visant la compréhension de leur comportement au travers de différents modèles.*

*De nombreuses méthodes expérimentales ont été développées, notamment dans l'objectif d'identifier de façon extensive les composés les plus perméables. D'un autre côté, les progrès technologiques améliorant les performances de calcul ont orienté les méthodes vers des finalités de plus en plus prédictives et ont fait naître le large champ des méthodes de conception assistées par ordinateur (CAO).*

## 1. Méthodes expérimentales

Relativement faciles à mettre en place, les méthodes expérimentales offrent l'avantage de la rapidité d'analyse et mettent en jeu des systèmes relativement proches des systèmes membranaires [Mälkiä *et al.* 2004]. Les systèmes les plus simples s'intéressent aux propriétés physico-chimiques des composés, alors que d'autres s'intéressent au processus de perméabilité en lui-même en testant la capacité des composés à traverser des modèles de membranes. Ces modèles peuvent être plus ou moins complexes comme des cultures de cellules épithéliales ou des bicouches et monocouches composés de lipides.

### 1.1. LogP

La lipophilicité est la plus commune de ces propriétés et permet d'évaluer la capacité des composés à traverser les membranes compte tenu de leur affinité pour les lipides qui composent cette dernière.

Le LogP ou coefficient de partage octanol/eau ou logK<sub>ow</sub> permet de quantifier cette affinité. Intrinsèque au composé étudié, ce coefficient est déterminé par le ratio entre la concentration du composé dans l'octanol par rapport à sa concentration dans une phase aqueuse. Plus le coefficient est grand, plus l'affinité du composé pour l'eau est faible, plus il sera lipophile. Cette mesure de l'affinité du composé soit pour l'eau, soit pour l'octanol, sert de principal descripteur indiquant la tendance d'un composé à passer dans les membranes.

### 1.2. Modèle d'épithélium

Cette technique consiste en la reproduction du passage de composés à travers un épithélium [Matsson *et al.* 2005]. Un épithélium peut être défini comme une barrière constituée d'une seule couche de cellules polarisées, séparant l'organisme du milieu extérieur. On compte ainsi l'épithélium intestinal, oculaire, cutané, rénal ou génital. Comme la membrane plasmique elle-même, les épithéliales sont également le siège d'échanges avec le milieu extérieur.

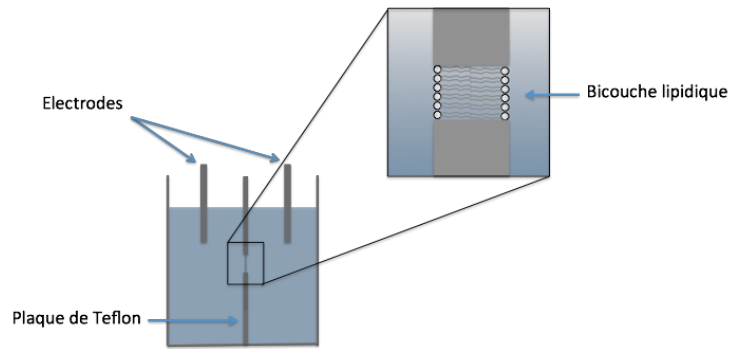
L'étude du passage de composés au travers de monocouches de cellules en culture sur filtre fait très souvent appel aux cellules *Caco2* d'origine colorectale qui ont la capacité de se polariser lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu spécifique. Ce système mime ainsi l'épithélium intestinal, composé d'une monocouche d'entérocytes. Cependant, dans ce modèle, les trois voies de perméabilité sont mises en jeu sans distinction possible. En effet, les composés peuvent passer à travers la membrane plasmique des cellules, c'est le passage passif transcellulaire, soit passer par les jonctions intercellulaires, c'est le transport paracellulaire facilité, ou enfin emprunter la voie du transport actif par les protéines de transport [Artursson *et al.* 2001 ; Daugherty and Mrsny 1999].



Afin d'étudier la perméabilité membranaire, un grand nombre d'études se sont penchées sur des modèles visant à reproduire un système de barrière biologique. Cependant la complexité des membranes tant dans leur composition que leur comportement ne permet pas de reproduire artificiellement un système permettant d'inclure toutes les caractéristiques de la membrane. Les modèles de systèmes membranaires qui permettent de mimer les bicouches lipidiques, vont de bicouches planes à des monocouches en passant par des systèmes vésiculaires et présentent chacune des avantages et inconvénients.

### **1.3. Modèle de bicouche lipidique**

Les plus anciens modèles de membrane sont des modèles de bicouche plane appelés « Modèle de Film Noir » (*Black Lipid Membrane, BLM*) du fait de la couleur sombre observée au microscope [Winterhalter 2000] (Figure III-1). En effet, l'interférence entre les rayons réfléchis par les deux feuillettes est responsable de l'absence de réflexion. Ce système est également appelé « *painted lipid membrane* » du fait de sa méthode de production. Sur une plaque de matériau hydrophobe comme le Téflon<sup>®</sup>, on perce une ouverture d'une dizaine de micromètres de diamètre. On applique alors une solution de lipides à l'aide d'un pinceau ou d'une seringue. Une bicouche lipidique se forme dans l'ouverture. Pour faciliter l'incorporation de protéines membranaires un procédé utilisant la cuve de Langmuir a été mis au point. Au lieu de "peindre" l'ouverture, on trempe la plaque dans la cuve [Montal and Mueller 1972]. La plaque est plongée dans une cuve la séparant en deux chambres. L'élévation du niveau de l'eau va permettre la formation de la bicouche. En plaçant des électrodes dans chaque compartiment, il est facile d'étudier les propriétés électriques, le passage de composés chargés à travers la membrane. Le principal inconvénient de ce système est sa faible stabilité dans le temps qui n'autorise pas son utilisation au delà d'environ une heure, ainsi que la présence de solvants qui peuvent interagir et dénaturer les protéines.



**Figure III-1** – Modèle de Film Noir (*Black Lipid Membrane, BLM*)

## 1.4. Modèle de bicouche lipidique supportée

Les bicouches sur support solide offrent une grande stabilité. Le transfert se fait généralement par la méthode de Langmuir-Blodgett [Blodgett 1935] sur un support solide de mica ou de verre. L'asymétrie de composition entre les deux feuillets peut être contrôlée puisque les deux monocouches sont déposées sur le support l'une après l'autre. Les têtes polaires de l'un des feuillets sont en contact avec le solide tandis que les chaînes hydrophobes sont en contact avec le deuxième feuillet.

Ajoutée à une durée de vie de plusieurs semaines, le support solide permet une immobilisation suffisante pour l'utilisation de nombreuses techniques d'analyse telles que la microscopie à force atomique [El Kirat *et al.* 2010]. L'utilisation de cette technique est impossible sur des cellules ou des systèmes membranaires flottants.

Ils sont très utilisés pour la prédiction des phases et l'organisation moléculaire des membranes.

Un des inconvénients de ce modèle est la proximité avec le support qui peut parfois affecter les propriétés membranaires telle que la mobilité des constituants ou l'incorporation de protéines.

Pour éloigner d'avantage la bicouche de son support des couches de polymères ou de lipides modifiés peuvent être ajoutées [Rossi and Chopineau 2007].

Un exemple d'application des bicouches sur support solide est la méthode « *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* » (*PAMPA*) développée par Kansy *et al.* [Kansy *et al.* 1998], qui permet l'étude exclusive de la perméabilité transcellulaire passive. En effet, cette expérience consiste en la constitution d'une membrane de lipides du type bicouche sur un filtre. Ainsi, ce modèle de membrane ne comporte ni jonction cellulaire, ni pore, ni système de transport actif [Sugano *et al.* 2003]. Cette technique présente l'avantage de pouvoir utiliser une grande variété de lipides. Cette bicouche lipidique bio-mimétique, très maniable, permet d'obtenir une composition proche de la membrane des

entérocytes ou d'autres types cellulaires. Cette grande maniabilité fait de la méthode *PAMPA* une technique de choix pour la prédiction de la perméabilité intestinale à haut débit.

## 1.5. Systèmes vésiculaires ou liposomes

Les structures vésiculaires ou liposomes sont des bicouches lipidiques sphériques enfermant un volume de solvant. Beaucoup de lipides forment ces structures naturellement. Les liposomes sont d'ailleurs présents dans les processus de transports vésiculaires de la cellule ou dans l'endocytose.

On distingue plusieurs types de liposomes selon leurs tailles et leurs compositions [Cullis and Hope 1985] :

- MLV *MultiLamellar Vesicles* sont multilamellaires et ont un diamètre compris entre 0,5 et 10 micromètres,

- LUV *Large Unilamellar Vesicles* sont formés d'une seule bicouche et leur diamètre varie de 100 à 500 nanomètres,

- SUV *Small Unilamellar Vesicles* sont formés d'une seule bicouche et leur diamètre est généralement inférieur à 50 nm,

- GUV *Giant Unilamellar Vesicles* sont formés d'une seule bicouche et leur diamètre varie de 5 et 100 micromètres.

Formées à partir de lipides en solution [Lapinski *et al.* 2007] ou isolées à partir de cellules en culture, ces vésicules sont faciles à obtenir et leurs propriétés dynamiques sont similaires à celles des membranes. Elles sont notamment très utilisées pour l'étude des phénomènes de fusion membranaire ou de transport de composés en pharmacologie et cosmétologie. Leur principal inconvénient est que la composition exacte de chaque vésicule ne peut pas être contrôlée. La composition finale est souvent différente de la solution initiale et le comportement des membranes est très sensible aux variations de composition.

## 1.6. Micelles, bicelles et nanodisques

Les micelles sont des agrégats sphériques de lipides qui se forment spontanément en solution aqueuse à partir d'une certaine concentration dite Concentration Micellaire Critique (CMC) [Seddon *et al.* 2004]. La surface des micelles est composée des têtes polaires (en contact avec l'eau) et l'intérieur est composé par les chaînes hydrophobes. Bien qu'elles ne représentent pas de formation en bicouche, ces structures sont couramment utilisées pour la purification et l'étude des protéines membranaires.

Dans un solvant organique, il peut se former des micelles dites inverses. Les extrémités lipophiles des lipides sont tournées vers l'extérieur alors que les têtes polaires sont tournées vers l'intérieur.

Les bicelles sont caractérisées par une structure en bicouche lipidique entourée par des molécules de détergent, qui permettent d'enfouir la partie hydrophobe de la structure en bicouche à l'intérieur des bicelles [De Angelis and Opella 2007]. Des lipides de *packing* plutôt cylindrique forment la partie bicouche, qui est entourée par des lipides de *packing* conique. Les bicelles sont une alternative entre les micelles et les liposomes dont le principal avantage est de présenter une structure en bicouche qui peut être étudiée en spectroscopie RMN en solution ou du solide.

Enfin, les nanodisques ont une structure en bicouche entourée par une ceinture de protéines amphiphiles et sont ainsi plus stables que les bicelles et les micelles à faibles concentrations [Borch and Hamann 2009]. Leur petite taille leur permet d'être utilisables en spectroscopie RMN en solution.

## **1.7. Modèle de monocouche de lipides : films de Langmuir et de Langmuir-Blodgett**

L'avantage du modèle en monocouche est la maîtrise de la composition lipidique, leur état d'organisation ou *packing*, la densité superficielle des molécules, la composition de la sous-phase, ainsi que la température et la pression latérale.

Cette méthode consiste à déposer un film de lipide à la surface de l'eau contenue dans une cuve dite de Langmuir.

Des barrières mobiles affleurant la surface de l'eau compriment latéralement le film. La surface disponible pour les molécules de lipide diminue, ce qui entraîne leur réarrangement. Un capteur de force permet de mesurer la variation de pression de surface (différence entre la tension superficielle de l'eau pure et celle de l'eau surmontée de la monocouche de lipide) tout au long de la compression. La variation de la pression de surface est corrélée à la diminution de l'aire disponible pour les molécules. Cette corrélation permet de décrire l'isotherme Pression de surface-Aire moléculaire qui est caractéristique de chaque lipide à une température donnée [Langmuir 1917]. Sous l'effet de la compression, la monocouche insoluble adopte les différents états physiques gazeux, liquide expansé, liquide condensé ou solide. On peut alors observer la conformation des lipides à ces différentes phases ainsi que la tension de surface. Les films de Langmuir représentent le seul modèle permettant une telle analyse thermodynamique de lipides.

Cette méthode permet également de mesurer la capacité de molécules médicamenteuses à interagir avec des membranes de cellules cibles, tels que les agents photosensibilisants utilisés dans les photothérapies ou des peptides antimicrobiens [Desroches *et al.* 2004 ; Maget-Dana 1999].

Les changements de conformation et d'agencement des lipides sous l'influence de l'adsorption d'un composé tensioactif peuvent être observés par microscopie de fluorescence (si les molécules étudiées sont fluorescentes) ou par microscopie à l'angle de Brewster. Ces techniques ne permettent pas de visualiser les propriétés de phase à haute résolution comme la microscopie à force atomique pourrait le faire. L'utilisation de cette technique nécessite le transfert de la monocouche flottante sur support solide selon la méthode de Langmuir-Blodgett [Blodgett 1935]. Ces films supportés sont appelés films de Langmuir-Blodgett. La technique de transfert est telle que les films supportés sont représentatifs de la monocouche insoluble même si les conséquences de la proximité du support sur la diffusion et la réorganisation des molécules peuvent être discutées.

D'autres travaux ont montré la possibilité d'étudier par microscopie à force atomique les monocouches sans transfert préalable sur support solide [Dubreuil *et al.* 2003].

Cependant, ces méthodes expérimentales présentent chacune des avantages et des inconvénients, dont les principaux sont la difficulté de mise en œuvre et la stabilité des modèles d'étude. De même, les observations expérimentales sont très variables et dépendantes des méthodes employées.

Ainsi, des méthodes de simulation se sont développées en complément des méthodes expérimentales. Les outils mathématiques et informatiques permettent la simulation de certaines expériences en incluant des paramètres supplémentaires ou en offrant des observables de différentes dimensions. La virtualisation des expériences représente un avantage certain mais surtout, les modèles utilisés sont paramétrables et adaptables aux différents systèmes biologiques.

## 2. Méthodes de simulation

La simulation de phénomènes vise à approcher l'organisation et l'évolution dynamique d'un système sans réaliser d'expérience. Pour cela, il faut reproduire le système observé au travers d'objets modèles et l'expérience elle-même, c'est à dire le comportement élémentaire que l'on souhaite observer, au moyen de descripteurs formalisés au travers d'équations mathématiques.

Les méthodes de simulation ont des fondements théoriques et s'appuient aussi sur les observables expérimentaux afin des les mettre en commun pour en tirer une corrélation. Dans le cadre de la perméabilité, cette corrélation permet de trouver des points communs entre les composés perméables d'un côté et à ceux qui ne passent pas les barrières membranaires de l'autre. Elle permet ainsi de faire ressortir des paramètres qui vont dessiner le modèle d'une molécule perméable et de faire des prédictions de perméabilité. Dans le cadre de l'étude de la structure et des propriétés membranaires,

les observables expérimentales vont calibrer les modèles et la simulation va permettre une exploration du phénomène à différentes échelles telle que l'échelle moléculaire ou atomique.

## 2.1. Méthodes empiriques

Les premières méthodes empiriques étaient basées sur de simples observations expérimentales. Les composés répondant à ces observations étaient prédits comme perméables. Ainsi, Christopher Lipinski établi en 1997 dans « la règle des 5 », les critères nécessaires à une bonne absorption des médicaments, correspondant en général, à des petites molécules lipophiles [Lipinski *et al.* 2001].

Cette règle décrit 4 paramètres associés à la perméabilité et à la solubilité : le poids moléculaire, le LogP, le nombre de donneurs de liaison hydrogène et le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène. Leur valeur critique est un multiple de 5, ce qui a donné le nom de « règle des cinq de Lipinski » (« *Lipinski's rule of five* »).

D'après la règle des 5, une mauvaise absorption correspondrait aux valeurs suivantes indiquées dans le Tableau III-1.

Propriété moléculaire	Valeur Critique (Dalton)
Poids moléculaire	> 500
LogP	5
Nombre de donneurs de liaison hydrogène	5
Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène	> 10

**Tableau III-1** – Propriétés moléculaires et valeurs critiques définies dans la règle des 5 de Linpinski

La règle des 5 est la plus répandue pour l'ADME. Les composés présentant les valeurs de propriétés moléculaires définies sont considérés comme des candidats médicament actifs par voie orale.

Avec l'explosion de la chimie combinatoire, le nombre et le volume des bibliothèques de molécules croissant a permis une exploration de l'espace chimique et conformationnel plus approfondie [Lipinsky and Hopkins 2004].

Certains critères comme le poids moléculaire sont peu à peu critiqués notamment par l'exemple des molécules antibactériennes, dérivés de produits naturels.

Ces dérivés sont dans un autre espace chimique que celui décrit par la règle des 5 de Lipinski et sont néanmoins des molécules efficaces [Hopkins and Bickerton 2010 ; Kubinyi 2003].

## 2.2. Méthodes statistiques - QSAR, QSPR

Les méthodes statistiques consistent à mettre en équation la corrélation entre la structure des molécules et leur activité QSAR [Moda *et al.* 2007] (Quantitative Structure-Activity Relationship) ou leurs propriétés QSPR [Fan *et al.* 2010] (Quantitative Structure-Property Relationship). Plusieurs paramètres structuraux et/ou physico-chimiques, tels que ceux de la règle des 5 de Lipinski, définis comme décrivant l'activité ou la propriété des molécules sont collectés à partir des observations expérimentales. Une relation linéaire est ensuite établie avec les paramètres structuraux et physico-chimiques des composés. Ces équations linéaires sont calibrées avec un ensemble de molécules dont l'activité ou la propriété est bien connue, puis testée en incorporant des composés tests. La robustesse du modèle tient à l'amplitude de distribution des points autour de la droite de régression linéaire [Nakao *et al.* 2009 ; Akamatsu *et al.* 2009] et la qualité du modèle est fortement dépendante des descripteurs de l'activité qui y sont intégrés.

## 2.3. Modèle pharmacocinétique physiologique

Outre les descripteurs structuraux, les descripteurs physico-chimiques tels que la surface polaire, l'électropolarité, les interactions van der Waals, électrostatiques, les liaisons hydrogène sont utilisés avec des observables expérimentaux de physiologie, de pharmacocinétique et pharmacodynamique tels que les coefficients de diffusion, les taux ou fractions d'absorption... Les modèles pharmacocinétique physiologique (« *Physiologically based pharmacokinetic* » ou *PBPK*) reposent sur des paramètres structuraux issus de tests sur cellules ou organes isolés, sur des observables physiologiques testés sur de petits organismes ou sur sujets humains. Elles modélisent l'organisme comme un ensemble de compartiment représentant chaque organe afin de prédire le devenir de composés dans l'organisme. Ces méthodes fournissent donc des données différentes du niveau moléculaire et permettent une approche plus globale à l'échelle de l'organe voir de l'organisme [Buck *et al.* 2007 ; Sugano 2009]. L'absorption intestinale peut ainsi être modélisée mais comme tout modèle, le modèle PBPK est fortement dépendant des données physiologiques intégrées et des molécules choisies pour le calibrage [Varma *et al.* 2010 ; Thygesen *et al.* 2009].

## 2.4. Méthodes de fouille de données

La fouille de données (ou « *data mining* ») est une discipline de traitement mathématique de données permettant de manipuler une quantité conséquente de données que l'on peut classer selon des critères spécifiés.

Le principe est simple : un échantillon dit d'entraînement va servir à établir le modèle mathématique de corrélation le plus adapté à la problématique, puis un échantillon test va servir à mesurer l'efficacité du modèle développé.

Plusieurs types d'algorithmes de classification existent pour trier les molécules en fonction de nombreux paramètres tels que des descripteurs physico-chimiques, structuraux ou de pharmacocinétique ou physiologique, afin de déterminer des groupes de ressemblance [Hou, Wang, Zhang, *et al.* 2007].

Les plus connus sont les réseaux de neurones, les arbres de décision, les algorithmes génétiques, les cartes auto-organisatrices de Kohonen, les machines à vecteurs de support (« *Support Vector Machine* » ou *SVM*) [Hou, Wang, and Li 2007]. La fouille de données est très proche des méthodes statistiques mais n'établit pas de corrélation linéaire et permet ainsi la gestion de modèles multiparamétriques. Cette méthode semble être une méthode de choix pour le traitement de données de masse en fonction de critères nombreux et complexe rencontrés en biologie.

## **2.5. Méthodes de modélisation moléculaire**

La modélisation moléculaire a pour but de simuler la structure et le comportement des molécules par le biais de l'intégration informatique de lois physiques mises en équation. La mécanique moléculaire utilise les lois de mécanique classique pour décrire la structure atomique des molécules et l'intégration des équations de mouvement va permettre la simulation de dynamique moléculaire.

Cette méthode va permettre une exploration à l'échelle moléculaire et atomique du phénomène de perméabilité d'un composé à travers une membrane dans l'espoir d'identifier les interactions du composé avec les lipides. La structure et l'organisation des lipides peuvent être visualisées et suivies en fonction du temps.

### **2.5.1. Modélisation de bicouches lipidiques**

La modélisation moléculaire a d'abord été appliquée aux systèmes protéiques où l'on simule une ou plusieurs protéines solvatées dans une boîte d'eau. La deuxième moitié des années 90 a vu apparaître la mise au point de modèles pour la simulation de systèmes interfaciaux [Y. Zhang *et al.* 1995 ; Feller *et al.* 1995]. Ces modèles simulent la dynamique des bicouches en reproduisant des propriétés structurales et physico-chimique expérimentales telles que la conformation et la flexibilité des chaînes hydrocarbonées, leur ordonnancement, l'orientation des têtes polaires ou encore la diffusion latérale des lipides [Egberts *et al.* 1994]. A chaque nouvel algorithme de simulation, les résultats de dynamique sont confrontés aux résultats expérimentaux et les simulations sont à ce jour généralement



représentatives des caractéristiques structurales et physicochimiques des membranes biologiques [Poger *et al.* 2010 ; Vermeer *et al.* 2007].

De nombreuses études par dynamique moléculaire ont été conduites pour la compréhension des propriétés structurales des membranes. Simplifiées en bicouche lipidique, l'organisation des lipides en bicouche [Essmann and Berkowitz 1999], leur paramètre d'ordre [Petrache *et al.* 1999], l'évolution de leur structure en fonction de l'aire moléculaire [Feller *et al.* 1997] ont pu être étudiés. Les caractéristiques structurales de lipides saturés et insaturés en fonction des phases d'état ont également pu être mises en évidence [Leekumjorn and Sum 2007a ; Leekumjorn and Sum 2007b], ainsi que l'impact de molécules comme les stérols ou des tensioactifs sur la structure de la bicouche [Cournia *et al.* 2007 ; Leekumjorn and Sum 2006b ; Izmitli *et al.* 2011].

Des études sur le comportement macroscopique ont également pu être menées sur les phénomènes d'ondulation [Lindahl and Edholm 2000] ou de fusion membranaire [Marrink and Tieleman 2002 ; Tieleman and Bentz 2002 ; Baoukina and Tieleman 2010].

Forts des observables, algorithmes et résultats obtenus de la simulation des bicouches lipidiques, nombre d'études se sont penchées sur le passage de petites molécules à travers les membranes [Marrink and Berendsen 1994 ; Bemporad *et al.* 2004]. Ainsi, plusieurs modèles découpant la bicouche en plusieurs régions ont été établis.

Le modèle solubilité-diffusion est resté longtemps le modèle de prédiction de la perméabilité de composé à travers les membranes [Missner and Pohl 2009]. Egalement connu sous le nom de loi d'Overton ou d'Overton-Meyer, ce modèle décrit la perméabilité comme le rapport du produit du coefficient de partition d'un soluté dans la région hydrophobe d'une bicouche lipidique et de son coefficient de diffusion, sur l'épaisseur de la bicouche. Suivant ce modèle représentant la membrane comme un unique feuillet homogène, les paramètres d'intérêt ont longtemps été restreints aux coefficients de diffusion et de partage.

Les premières simulations de passage de petites molécules à travers les membranes ont consisté en la dynamique de molécule de benzène placée dans la région hydrophobe d'une bicouche de Dimyristoyl-glycéro-phosphocholine ou DMPC [Bassolino-klimas *et al.* 1993]. En mesurant le coefficient de diffusion, Alper *et al* [Alper and Stouch 1995] ont montré que la diffusion était plus importante au centre de la bicouche que dans les régions proches des têtes polaires. Ils ont également mis en évidence les changements de l'orientation des composés ainsi que la différence comportementale et structurale entre des lipides en bicouche et des lipides en solution tels qu'on les trouve dans les flasques utilisées pour la détermination des coefficients de partition eau/octanol [Bassolino-klimas *et al.* 1995].

Un modèle de compartimentation de la membrane a été développé pour représenter l'hétérogénéité des bicouches lipidiques [Marrink and Berendsen 1994]. Il se définit comme un modèle à quatre régions comprenant :

- Région1, de faible densité en tête polaire: région où l'eau et le début des têtes polaires ont la même densité
- Région2, de forte densité en tête polaire: l'eau est pratiquement absente
- Région3, de forte densité en chaînes hydrophobes
- Région4, de faible densité en chaînes hydrophobes

Cette compartimentation est considérée comme identique d'un feuillet à l'autre.

Marrink et Berendsen [Marrink and Berendsen 1996] ont procédé à des dynamiques moléculaires de composés dans chacun des compartiments en utilisant un algorithme, dit de « *z-constraint* », qui fixe la profondeur de bicouche accessible aux composés. Ils ont ainsi calculé le coefficient de diffusion dans chacun de ces compartiments ainsi que l'énergie libre de transfert entre ces compartiments pour en déduire un coefficient de perméabilité transbicouche.

Sur ce même modèle, de nombreuses simulations ont été réalisées en testant divers composés. Une étude comparative de petites molécules et de composés de taille plus conséquentes a permis de mettre en évidence une orientation préférentielle des solutés quelque soit leur taille. Ils auraient tous tendance à s'aligner perpendiculairement à la membrane [Bemporad *et al.* 2005]. De précédents travaux ont corrélé le comportement du soluté avec celui des lipides et ont mis en évidence l'importance de la taille et le volume du soluté mais aussi de la structure et l'organisation de la bicouche [Bemporad *et al.* 2004].

Un autre modèle de compartiment propose trois régions correspondant à une région hydrophobe encadrée par deux couches de têtes polaires [Nagle *et al.* 2008]. La part de l'aire par lipide et l'aire par tête polaire sont considérées comme déterminante pour le passage de composés. Il est en effet suggéré que l'encombrement stérique des têtes polaires représente une première barrière pour le passage de la région aqueuse à la région hydrophobe.

Enfin dans des travaux plus récents, le coefficient de diffusion et les énergies libres de transfert sont calculées dans quatre nouveaux compartiments (eau, têtes polaires, glycérol, chaînes hydrophobes) avec l'algorithme de contrainte sur l'axe *z* [Orsi and Essex 2010]. Une nouvelle méthode de prédiction de perméabilité est alors dérivée de la loi d'Overton en incluant les termes d'énergies de transfert. L'hypothèse d'une orientation préférentielle est confirmée et la notion de perturbation de la membrane au niveau des têtes polaires par le passage de molécules est à nouveau évoquée.

## 2.5.2. Modélisation de monocouches lipidiques

La modélisation moléculaire des monocouches de lipides est appliquée d'une part à l'étude du surfactant pulmonaire qui forme une monocouche à la surface des cellules épithéliales alvéolaires, et d'autre part pour l'étude des phénomènes de surface des membranes.

La majorité des simulations concernent donc les phospholipides constituant du surfactant pulmonaire, les di-palmitoyl-glycero-phosphocholines ou DPPC. Les caractéristiques structurales et organisationnelles des lipides [Baoukina, Monticelli, Amrein, *et al.* 2007 ; Duncan *et al.* 2011 ; Rose *et al.* 2008] sont étudiées mais aussi les comportements macroscopiques de la structure en monocouche [Baoukina *et al.* 2008].

La corrélation entre la thermodynamique et les propriétés de monocouche est directe et les valeurs de tension de surface ou d'aire moléculaire sont mesurables directement avec les balances de Langmuir. Ainsi les interactions entre lipides et protéines peuvent être caractérisées par la différence de tension de surface de la monocouche en présence et en absence de protéine [Rosilio *et al.* 1997].

La correspondance monocouche/bicouche est capitale pour l'utilisation correcte des systèmes monocouche en modélisation moléculaire en tant que modèle de membrane. Kaznessis *et al.* ont mis en évidence la sensibilité des monocouches aux variations de densité de surface, de groupement polaires et de l'environnement ionique [Kaznessis *et al.* 2002].

L'équivalence monocouche/bicouche est largement étudiée et les propriétés de transition de phase semblent être similaires dans les deux systèmes [Baoukina *et al.* 2010 ; Baoukina, Monticelli, Amrein, *et al.* 2007 ; Blume 1979 ; Duncan and Larson 2008].

Le développement des algorithmes spécialisés dans la reproduction des phénomènes de surface [Y. Zhang *et al.* 1995 ; Feller *et al.* 1995], les simulations moléculaires permettent d'obtenir des caractères structuraux en bonne corrélation avec l'expérimental [Shushkov *et al.* 2010 ; Lucas *et al.* 2011 ; Mohammad-ghaie *et al.* 2010].

Les bicouches ne peuvent pas être simplement assimilées à deux monocouches se faisant face. En effet, les interactions interfeuillettes ne peuvent être négligées et la force du couplage entre les deux monocouches n'est pas encore connue. Les monocouches sont donc reconnues comme modèle de membrane satisfaisant pour l'étude de l'interaction des molécules avec les têtes polaires. Elles permettent un contrôle de nombreux paramètres tels que la température la pression ou l'aire moléculaire. Ainsi la perturbation de la structure lipidique par l'insertion d'une molécule pourra être mesurable par une variation de pression de surface et les effets structuraux sur les lipides pourront être analysés à l'échelle atomique.

La nature des molécules pouvant être amenées à interagir avec les membranes est variable du fait de l'omniprésence des systèmes membranaires dans l'organisme. Les molécules tensioactives telle que

des peptides antimicrobiens [Maget-Dana 1999], des photosensibilisants [Desroches *et al.* 2004], des agent cryoprotecteurs utilisés pour la conservation des cellules [Skibinsky *et al.* 2005], des médicaments neuroleptiques [Pickholz 2006 ; Pickholz *et al.* 2007], des substrats de coenzyme d'oxydo-réduction [Martini *et al.* 2012] ou encore des peptides issus du clivage protéolytique dont l'agrégation serait en cause dans la maladie d'Alzheimer [Izmitli *et al.* 2011].

La complexité des systèmes membranaires rend leur étude, ainsi que celle du phénomène de perméabilité membranaire, difficile de façon expérimentale. Les méthodes de modélisation moléculaire tentent d'apporter un éclairage supplémentaire au niveau atomistique et structural. Au vu des études déjà menées, beaucoup se concentrent sur l'étude du comportement de composés dans un compartiment de la bicouche.

Or le mécanisme de perméabilité est décrit comme le passage de l'eau vers la membrane, suivi de sa traversée, puis de sa sortie. La première étape peut être considérée comme une adsorption des composés à l'interface eau/lipide et la seconde étape comme une diffusion [Balaz 2000].

Notre étude propose donc de considérer les interactions moléculaires responsables des phénomènes de surface impliqués dans l'organisation des phospholipides en monocouches.

Les propriétés structurales et organisationnelles ainsi décrites permettront d'identifier les interactions moléculaires mises en jeu lors de l'adsorption d'un composé tensioactif à une interface eau/phospholipide et d'étudier les effets du composé sur cette interface.

Les films de Langmuir sont le seul moyen d'étude d'interface offrant le suivi d'observables physiques telle que la tension de surface, la pression de surface ou encore l'aire moléculaire. Le système choisi pour nos simulations ne sera donc pas une bicouche lipidique mais une monocouche à l'interface eau/vide.

Les simulations de monocouches de lipides pourront être validées par la corrélation de ces mesures expérimentales avec les valeurs calculées ainsi que par la corrélation des caractéristiques structurales telles que le paramètre d'ordre des chaînes hydrophobes. Par la suite, l'effet d'un composé sur cette interface pourra alors être étudié.

De même, l'étude de la monocouche permettra de comparer son comportement à celui d'une bicouche. Outre l'intérêt purement fondamental de cette comparaison, ceci permettra d'argumenter au sujet de l'utilisation de la monocouche comme modèle de bicouche.

# Chapitre IV.

## MODELISATION MOLECULAIRE

*La modélisation moléculaire s'appuie sur un ensemble de méthodes pour décrire, analyser et prédire le comportement moléculaire au travers d'expériences simulées définies. Ces méthodes permettent ainsi une liberté d'expérimentation en évitant l'altération de l'objet d'étude mais aussi d'accéder à des observables d'échelles très variables.*

*La modélisation moléculaire intervient à l'échelle subcellulaire en décrivant les molécules et leurs comportements par un ensemble de méthodes mathématiques et informatiques. Cette description permet d'accéder à des informations à l'échelle atomique, complémentaires à celles obtenues par les méthodes expérimentales.*

*La mécanique moléculaire s'appuie sur une représentation mathématique de structures moléculaires. L'agencement des atomes de la molécule est décrit par les coordonnées tridimensionnelles et leurs interactions au sein de la molécule sont décrites par un ensemble d'équations mathématiques et de paramètres physiques spécifiques au système à représenter. L'intégration de ces équations dans le temps va ensuite permettre de simuler la dynamique du système. Cette méthode permet donc d'accéder aux mouvements individuels de chaque atome d'une molécule, ce qui n'est pas possible avec une technique expérimentale.*

*Dans ce chapitre, les principes de la mécanique et de la dynamique moléculaire seront décrits après un rappel sur l'apparition et l'évolution de la modélisation moléculaire.*

# 1. Généralités

## 1.1. Historique

Initialement développée dans le domaine de la chimie pour la description des molécules, la modélisation moléculaire s'est étendue à la biologie pour l'étude des protéines, des acides nucléiques et des systèmes membranaires.

La modélisation moléculaire est apparue avec la nécessité de représenter les structures chimiques. Vers le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, les chimistes Archibald Scott Couper [Couper 1858] et Friedrich August Kekulé von Stradonitz [Kekulé 1865] introduisirent les règles générales de valences de la chimie organique leur permettant de décrire pour la première fois les structures chimiques comme groupes fonctionnels reliés entre eux par des lignes représentant les liaisons entre atomes. La description des premières structures chimiques du benzène et de centaines de composés aromatiques a ouvert l'ère de la chimie moderne.

Le concept de conformation moléculaire est apparu dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle en s'appuyant sur les contributions antérieures de Pasteur, des chimistes Derek Harold Richard Barton et Odd Hassel. Grâce aux avancées technologiques de cette époque, de nouvelles techniques d'analyses telles que la diffractométrie aux rayons X ont permis la découverte de structures beaucoup plus complexes. Ainsi, la structure en hélice alpha a été décrite pour la première fois en 1951 par Linus Pauling [Pauling *et al.* 1951]. Peu de temps après, en 1953, la structure en double hélice de l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) a été caractérisée par les chercheurs américains et anglais James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins et Rosalind Elsie Franklin [Watson and Crick 1953 ; Wilkins 1953 ; R. E. Franklin 1953].

A la même époque, les premiers algorithmes d'analyses informatiques sont apparus. Des équations permettent de représenter les systèmes moléculaires en intégrant un nombre croissant de propriétés physiques, telles que les propriétés quantiques. Les capacités de calcul croissantes ont permis l'intégration d'équations de mouvements nécessaires à la simulation de la dynamique de ces structures moléculaires.

## 1.2. Applications

La modélisation moléculaire est couramment utilisée en physique de la matière condensée. Un des champs d'application le plus important est l'étude des biomolécules comme les protéines, les acides nucléiques et les systèmes membranaires. Ce nos jours, la modélisation moléculaire permettant de corréler la chimie et la physique à la biologie occupe une place incontournable de la recherche

fondamentale aux applications pour la santé et dans le domaine de la recherche pharmaceutique. La description des interactions des protéines avec de petites molécules ligands ou substrats a ouvert la voie à la conception de molécules assistée par ordinateur et à l'optimisation de molécules thérapeutiques. Les clés de l'activation d'un récepteur peuvent être approchées par l'identification des acides aminés responsables de la reconnaissance de la molécule agoniste. De même, les méthodes de modélisation moléculaire permettent d'identifier et de prédire les mutations responsables de changement de conformations dans une protéine.

### **1.3. Performances et limites**

L'augmentation des puissances de calcul permet de simuler des systèmes de plus en plus complexes, interaction de protéines, enzymes et co-facteurs, protéines membranaires et systèmes membranaires. Dans le cas des systèmes membranaires, un fait capital est qu'il s'agit d'assemblages multimoléculaires (lipides, protéines, sucres) en interaction non covalente. Cela confère un degré de liberté très important à ces systèmes, nécessitant des temps de simulation très importants.

On comprend alors que l'un des facteurs limitant de la modélisation des membranes biologiques est la puissance de calcul qui conditionne la taille du système étudié mais aussi la durée des simulations. En effet, un échantillonnage suffisamment grand est nécessaire à une représentation statistiquement significative de l'état modélisé. Par ailleurs, la qualité des modèles peut limiter leur capacité à reproduire le système d'intérêt.

En effet, pour chaque système étudié, il apparaît nécessaire de vérifier la pertinence des simulations en comparant les données avec les résultats expérimentaux afin de s'assurer de la qualité du modèle et de l'optimiser afin d'approcher le plus possible des paramètres mesurés.

## **2. Mécanique moléculaire**

La mécanique moléculaire a pour objectif d'approximer l'énergie potentielle d'une molécule par les lois de la mécanique classique. Les modèles atomistiques de la mécanique moléculaire considèrent l'atome comme la plus petite unité. Les molécules sont considérées comme un assemblage d'atomes et de liaisons représentées par des sphères compactes et incompressibles liées entre elles par des ressorts. Les sphères sont définies par des rayons, des charges fixes et des propriétés différentes selon le type d'atomes et les ressorts par des longueurs et constantes de raideur différentes selon le type d'interaction.

Les caractéristiques de ces sphères, leurs liaisons et interactions sont traduites sous la forme d'une équation tenant compte des liaisons liantes et non liantes, appelée « champ de force », dont les

variables ou paramètres (longueurs de liaison, valeurs d'angle...) sont issus de données expérimentales de spectrométrie, cristallographie aux rayons X ou de méthodes *ab initio* telles que la mécanique quantique. Le choix d'un champ de force adéquat pour la modélisation d'un système moléculaire donné est la principale difficulté de la mécanique moléculaire, du fait de leur caractère paramétrable.

## 2.1. Modélisation de l'énergie potentielle

Un champ de force est défini comme un ensemble d'équations mathématiques et de paramètres permettant de décrire l'énergie potentielle d'un système de particules à partir de sa structure. Cette énergie est une somme de termes énergétiques harmoniques représentant les liaisons liantes ou covalentes telles que les liaisons, les angles et les torsions, et les interactions non liantes telles que les interactions de van der Waals et les interactions électrostatiques (Figure IV-1).

$$E_{totale} = E_{liante} + E_{non-liante} \quad (IV-1)$$

$$E_{liante} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion} \quad (IV-2)$$

$$E_{non-liante} = E_{van\ der\ Waals} + E_{électrostatique} \quad (IV-3)$$

### 2.1.1. Energie liante d'élongation

Cette énergie correspond à l'élongation de la liaison entre deux atomes liés. Elle est décrite comme le comportement d'un oscillateur harmonique de longueur idéale  $r_0$  et de constante de rappel  $k$ . Chacune de ces deux valeurs dépend de la nature de l'atome (Figure IV-1). Pour des atomes  $i$  et  $j$ , on a :

$$E_{ij}^{liaison}(r_{ij}) = k_{ij}^r (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad (IV-4)$$

Avec :

$r_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en  $\text{Å}$

$r_{ij}^0$  distance d'équilibre en  $\text{Å}$

$k_{ij}^r$  constante de force en  $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$

### 2.1.2. Energie liante d'angle

Trois atomes successifs liés de façon covalente forment un angle décrit lui aussi par un oscillateur harmonique. Les valeurs des angles entre les atomes, des angles d'équilibre et des constantes de



forces dépendent également du type de chacun des trois atomes (Figure IV-1). Pour trois atomes  $i, j$  et  $k$  on a :

$$E_{ijk}^{angle}(\theta_{ijk}) = k_{ijk}^{\theta}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (IV-5)$$

Avec :

$\theta_{ijk}$  angle entre les atomes  $i, j$  et  $k$  en degré

$\theta_{ijk}^0$  angle à l'équilibre en degré

$k_{ijk}^{\theta}$  constante de force en  $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$

### 2.1.3. Energie liante de torsion

Quatre atomes  $i, j, k$  et  $l$ , séparés par trois liaisons  $ij, jk$  et  $kl$  forment un angle dièdre  $\phi$  dont la déformation ou énergie de torsion correspond à la rotation autour de la liaison  $jk$  (Figure IV-1). Cette énergie dépend de :

- la multiplicité  $n$  (le nombre de minima d'énergie),
- la phase  $\gamma$  (angle par lequel l'énergie est la plus basse),
- la barrière énergétique de rotation  $V$  d'ordre  $n$  (écart entre le minimum et le maximum énergétique),
- la valeur de l'angle dièdre entre les plans  $ijk$  et  $jkl$ ,

et est définie par l'équation suivante:

$$E_{ijkl}^{dièdres}(\phi_{ijkl}) = V_n(1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \gamma)) \quad (IV-6)$$

Avec :

$\phi_{ijkl}$  angle dièdre entre les plans formés par les atomes  $i, j, k$  et  $j, k, l$ , en degré

$n$  multiplicité

$\gamma$  angle de phase

$V_n$  barrière énergétique en  $\text{kcal.mol}^{-1}$

### 2.1.4. Energie non-liante de van der Waals

Les interactions de van der Waals représentent les interactions électriques de faibles intensités notamment les interactions dipôle-dipôle et dipôle induits. Elles ont été mises en évidence par les travaux du chercheur éponyme sur l'argon en phase gazeuse. La force de van der Waals dépend de la distance entre les atomes. Elle est décrite par un potentiel de Lennard-Jones 6-12 (Figure IV-1) :

$$E_{ij}^{vdW}(r_{ij}) = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (IV-7)$$

Avec :

- $r_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en  $\text{Å}$
- $\epsilon$  paramètre de Lennard-Jones en  $\text{kcal.mol}^{-1}$
- $\sigma$  rayon de Lennard-Jones en  $\text{Å}$

### 2.1.5. Energie non-liante électrostatique

Les interactions électrostatiques s'appuient sur les distributions électroniques considérées comme implicites, localisées sur les liaisons et représentées par des charges partielles atomiques. Ces charges peuvent être ajustées afin de reproduire au mieux le moment dipolaire de la molécule ou la surface de potentiel électrostatique obtenu initialement par des calculs de mécanique quantique *ab initio*, ces méthodes se limitant à de petits systèmes de l'ordre d'une centaine d'atomes (Figure IV-1).

Pour des atomes  $i$  et  $j$ , les interactions coulombiennes sont représentées par un potentiel en  $r_{ij}^{-1}$ , définit par l'équation suivante :

$$E_{ij}^{elec}(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi} \left( \frac{q_i q_j}{\epsilon_{el} r_{ij}} \right) \quad (IV-8)$$

Avec :

- $r_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en  $\text{Å}$
- $\epsilon_{el}$  constante diélectrique
- $q$  charge atomique

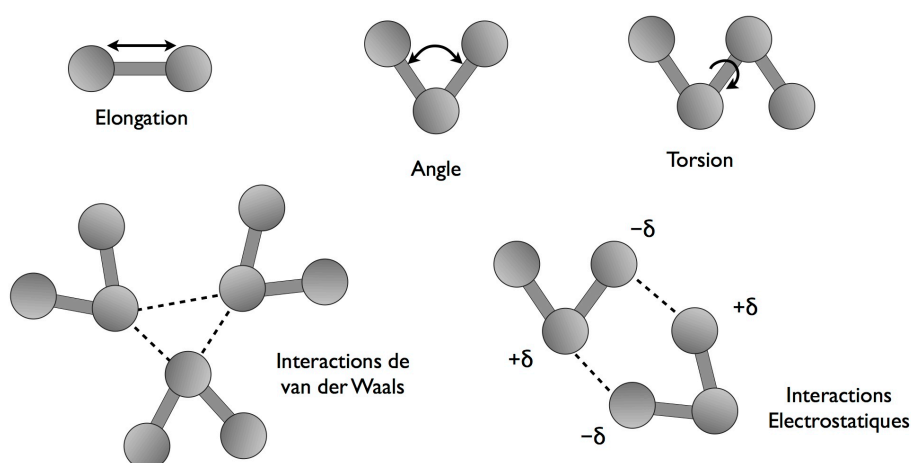


Figure IV-1 – Représentation schématique des différents termes énergétiques d'un champ de force

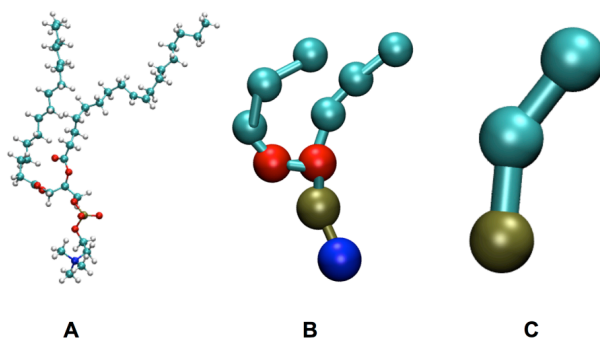
## 2.2. Champs de forces

### 2.2.1. Diversité des champs de forces

De nombreux champs de forces ont été développés par différentes équipes de modélisation. Parmi les plus utilisés aujourd'hui, nous pouvons citer AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) développé par le groupe de Peter Kollman et d'abord réservé aux protéines et acides nucléiques, puis appliqué à l'ensemble des macromolécules biologiques [Weiner *et al.* 1984 ; Cornell *et al.* 1995], CHARMM (*Chemistry at HARvard Molecular Mechanics*) d'abord développé pour les protéines, puis étendu à l'ensemble des macromolécules biologiques [Brooks *et al.* 2004], GROMOS (*GROningen MOlecular Simulation package*) [Scott *et al.* 1999] ou encore MARTINI développé spécialement pour les simulations de dynamique moléculaire de lipides [Marrink *et al.* 2004 ; Marrink *et al.* 2007].

Les deux premiers champs de forces considèrent tous les atomes du système, ils sont dits « tout-atome » (« *all-atom* »). GROMOS est un champ de force « atomes unifiés » (*united-atom*). Il ne considère pas les atomes d'hydrogène (par exemple, les carbones et hydrogènes des groupements méthyles sont traités comme un centre unique), simplifiant ainsi les modèles et permettant une économie en ressource de calcul.

MARTINI est un champ de force dit « gros grain » (*coarse grain*), qui regroupe plusieurs atomes d'un groupe fonctionnel en un seul point. Ces méthodes sont couramment utilisées pour les simulations longues ou par exemple pour de grands systèmes de membranes lipidiques afin d'accéder à des phénomènes macroscopiques tels que la formation de vésicules ou de pores, les fusions membranaires [Marrink and Tieleman 2013] (Figure IV-2).



**Figure IV-2** – Représentation schématique d'un phospholipide selon un champ de force tout-atome (A), atome-unifié (B) et gros-grain (C) (Figure adaptée de Marrink *et al.* 2009)

### 2.2.2. Champs de force utilisés

Afin d'étudier les interactions fines lipides/lipides et lipides/eau, j'ai choisi de modéliser ces différents systèmes à l'aide de champs de forces « tout-atome ». Parmi les champs de forces tout-atome, deux sont très couramment utilisés pour la simulation de molécules de phospholipides: AMBER et CHARMM. Les simulations initiales ont été réalisées avec le champ de force général d'AMBER (*General Amber Force Field, GAFF*), qui n'est pas spécifique à un type de molécule (protéine, acide nucléique ou lipide). Performant dans la simulation de molécules lipidiques, il est aussi particulièrement adapté aux petites molécules organiques en général. Nous l'avons donc choisi pour son caractère général qui permet l'étude de l'insertion de molécules dans les monocouches lipidiques [Siu *et al.* 2008]. Le champ de force GAFF est utilisé pour les principales simulations réalisées et comparé avec deux versions (*c27* et *c37*) du champ de force CHARMM, spécialement optimisées pour la simulation des lipides, pour quelques simulations seulement. Les particularités de chacun des deux champs de forces utilisés sont décrites dans les parties suivantes.

### 2.2.3. Champ de force GAFF – « General Amber Force Field »

Le champ de force GAFF est dérivé du champ de force AMBER, reconnu pour ses performances pour les simulations de protéines et d'acides nucléiques. GAFF a été développé dans le but d'apporter une importante collection de paramètres permettant de traiter un grand nombre de molécules pharmaceutiques, généralisant de ce fait son utilisation dans les étapes de création de molécules (*drug design*) ou d'optimisation de « *lead* » (« *lead optimization* »). Son utilisation pour simuler des systèmes lipidiques est récente mais a déjà montré des résultats satisfaisants dans la simulation de dynamique moléculaire de bicouche de POPC [Jóhárt and Martinek 2007] (mais pas pour les monocouches) et de DOPC [Siu *et al.* 2008].

Similaire au champ de force AMBER, la forme fonctionnelle du champ de force GAFF pour une paire d'atomes est décrite par l'équation suivante :

$$E_{\text{paire}} = \sum_{\text{liaisons}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dièdres}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i>j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{kq_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (\text{IV-9})$$

Avec :

$r_0, \theta_0$  paramètres des structures à l'équilibre

$K_r, K_\theta, V_n$  constantes de force

$n$  multiplicité

$\phi$  angle dièdre

$\gamma$  angle de phase

$A, B, q$  paramètres des potentiels non liants

$R_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en Å

$\epsilon$  constante diélectrique

## 2.2.4. Champ de force CHARMM

Le champ de force CHARMM est largement utilisé en dynamique moléculaire. Initialement développé pour les protéines, plusieurs versions de CHARMM ont été développées avec chacune des optimisations spécifiques : *Charmm27 (c27)* pour la modélisation des ADN, ARN et des lipides [Yin and Mackerell 1998 ; Feller and Mackerell 2000], *Charmm36 (c36)* pour la modélisation de bicouches lipidiques [Klada *et al.* 2008 ; Klada *et al.* 2010].

En effet, non seulement il n'existe pas de méthode expérimentale permettant la mesure directe de la tension de surface des bicouches lipidiques, mais certaines données de la littérature confèrent une tension de surface proche de 0 aux bicouches planes [Klada *et al.* 2010].

Le champ de force CHARMM prend en compte un terme supplémentaire par rapport à GAFF, le terme d'Urey Bradley.

Les énergies liantes de torsions impropres correspondent à la déformation des angles dièdres hors du plan. Le potentiel de torsion impropre est principalement utilisé pour maintenir la planarité des structures moléculaires.

Le potentiel Urey-Bradley est une fonction additionnelle au potentiel angulaire visant à restreindre le mouvement des liaisons impliquées dans les angles.

$$\begin{aligned}
V = & \sum_{\text{liaisons}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{dièdres}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
& + \sum_{\text{impropres}} K_\omega (\omega - \omega_0)^2 \\
& + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_u (u - u_0)^2 \\
& + \sum_{\text{non liantes}} \left[ \left( \frac{R_{\text{min}_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{\text{min}_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
\end{aligned} \tag{IV-10}$$

Avec :

$r_0, q_0, \theta_0, \omega_0, u_0$  paramètres des structures à l'équilibre

$K_r, K_\theta, K_\omega, K_u$  constantes de force

$\phi$  angle dièdre

$n$  multiplicité

$\gamma$  angle de phase

$R_{\text{min}_{ij}}$  diamètre de collision (distance à laquelle le potentiel est nul)

$r_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en Å

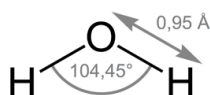
$q_i q_j$  charge des atomes  $i$  et  $j$

## 2.2.5. Types d'atomes, charges et paramétrisation

Les types d'atomes pris en charge par le champ de force GAFF couvrent une plus grande partie de l'espace chimique des molécules organiques que le champ de force AMBER. La méthode d'assignation des charges utilisée par défaut dans GAFF est l'approche *en mécanique quantique RESP (Restrained Electrostatic Potential) à un niveau HF/6-31G\** [Bayly *et al.* 1993]. Il existe une méthode alternative semi-empirique d'assignation des charges, le modèle AM1-BCC (*bond charge correction*) [Jakalian *et al.* 2002], qui requiert moins de ressources de calculs que la méthode RESP HF/6-31G\*. L'approche AM1-BCC consiste à calculer les charges Mulliken, suivie d'une correction de charge BCC pour obtenir des résultats compatibles avec le potentiel électrostatique calculé en mécanique quantique pour un niveau HF/6-31G\*. Les caractéristiques complètes de ce champ de force sont disponibles dans la publication de l'équipe de Case et Kollman, à l'origine de son développement [Wang *et al.* 2004].

## 2.3. Modèles d'eau

Il existe de nombreux modèles d'eau utilisés pour la simulation de dynamique moléculaire en solvant explicite. Ces modèles sont généralement classés en fonction du nombre de points utilisés pour les définir, de la rigidité ou flexibilité de la molécule d'eau ou encore de l'intégration des effets de la polarisation.



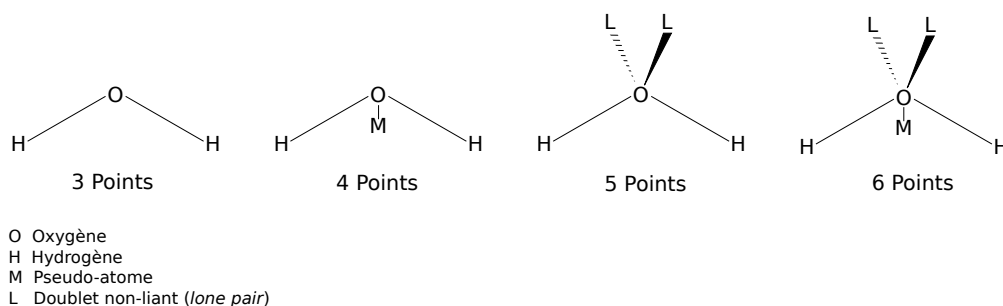
**Figure IV-3** – Molécule d'eau considérée dans les modèles simples, définie par sa géométrie (longueur de liaison OH et angle HOH)

Les modèles d'eau simples utilisés dans cette thèse considèrent la molécule d'eau comme rigide et se basent sur les interactions non-liantes. Les interactions électrostatiques sont modélisées par la loi de Coulomb et les forces de dispersion/répulsion par le potentiel de Lennard-Jones :

$$E_{ab} = \sum_i^a \sum_j^b \frac{q_i q_j e^2}{r_{ij}} + \frac{A}{r_{OO}^{12}} - \frac{B}{r_{OO}^6} \quad (\text{IV-11})$$

Les points chargés peuvent se situer sur les atomes de la molécule d'eau, sur d'autres pseudo-atomes (qu'on notera M) ou sur des sites spécifiques comme les paires non-liées (notées L). Le terme de Lennard-Jones est ici appliqué de manière restreinte aux atomes d'oxygène.

Les modèles d'eau couramment utilisés sont de 3 à 6 points, les paramètres de longueurs de liaisons OH et les valeurs des angles HOH, l'ajout de correction de polarisation varient selon les modèles.



**Figure IV-4** – Forme générale des modèles d'eau de 3 à 6 points

Le modèle retenu pour les différentes simulations de cette thèse est le modèle à trois points TIP3P (« *Transferable Intermolecular Potential 3 Points* »), développé par Jorgensen et collègues [Jorgensen *et al.* 1983]. Ce modèle est très répandu dans les simulations de dynamique moléculaire car il représente un bon compromis entre simplicité, temps computationnel et efficacité. Il comprend trois sites (ou points) d'interaction, correspondant aux trois atomes de la molécule d'eau. Chaque atome a une charge ponctuelle et l'atome d'oxygène possède des paramètres de Lennard-Jones. Tous les modèles à trois points utilisent une géométrie rigide correspondant à la géométrie connue de la molécule d'eau (à l'exception du modèle SPC et SPC/E qui utilise une géométrie tétraédrique). Le modèle SPC/E, également très utilisé pour l'étude des solvants, ajoute une correction de polarisation moyenne à la fonction d'énergie potentielle. Le champ de force GAFF, totalement compatible avec la plupart des modèles d'eau utilisés comme TIP3P, TIP4P, SPC, SPC/E, etc. a déjà montré une bonne reproduction des paramètres structuraux des POPC en bicouche avec le modèle TIP3P [Jójárt and Martinek 2007].

Paramètres	TIP3P	SPC/E
Distance $r_{\text{OH}}$ (Å)	0,9572	1,0
Angle $\widehat{\text{HOH}}$ (degré)	104,52	109,47
$A$ ( $10^{-3}$ kcal Å <sup>12</sup> /mol)	582,0	629,4
$B$ (kcal Å <sup>6</sup> /mol)	595,0	625,5
Charge $q_{\text{O}}$	-0,834	-0,8476
Charge $q_{\text{H}}$	+0,417	+0,4238

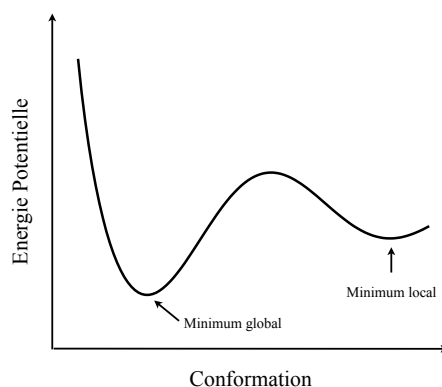
Tableau IV-1 – Quelques paramètres pour les modèles TIP3P et SPC/E

## 2.4. Minimisation de l'énergie

Les molécules peuvent adopter plusieurs conformations spatiales qui ont une certaine probabilité d'existence associée à une énergie et décrite par un champ de force.

La fonction d'énergie totale présente de nombreux minima et maxima locaux. Le minimum global de cette fonction est cependant impossible à déterminer par des méthodes algorithmiques. Néanmoins, il existe des méthodes d'analyses numériques permettant de déterminer des minima locaux correspondant aux structures énergétiquement les plus stables. Ces méthodes de minimisation d'énergie appelées minimiseurs sont des algorithmes qui modifient itérativement la géométrie d'une conformation moléculaire afin de converger vers un état stable.





**Figure IV-5** – Minimum global et local d'une courbe d'énergie potentielle suivant la conformation adoptée

A partir d'une structure de départ  $x_0$  les algorithmes de minimisation d'énergie génèrent une séquence d'itération  $\{x_k\}_0^\infty$  qui s'arrête lorsqu'un minimum a été trouvé. L'algorithme détermine le pas d'une itération à une autre en utilisant les informations sur l'énergie  $E$  à l'itération  $x_k$ . Les minimiseurs utilisent en général une stratégie dite de recherche en ligne (« *line search* »), l'algorithme choisit une direction  $p_k$  et une recherche est faite le long de cette direction dans le but de trouver un point d'énergie inférieure à celle de l'itération précédente.

Les méthodes de minimisation d'énergie sont d'ordres 0, 1 ou 2, selon leur degré de dérivation de la fonction d'énergie. Les plus courantes sont :

- i. **L'algorithme de plus grande pente** (« *steepest descent* », SD), d'ordre 1, utilise la dérivée première de la fonction d'énergie. La direction de recherche  $p_k$  est :

$$-g_k = g(x_k) \quad (\text{IV-12})$$

où  $g_k$  est le gradient au point  $k$ . L'algorithme SD applique à chaque itération un incrément aux coordonnées, la condition d'arrêt étant soit la convergence vers un minimum soit lorsque l'on a atteint un nombre d'itérations déterminé à l'avance par l'utilisateur. Tant que l'énergie potentielle diminue, le pas d'incrément des coordonnées augmente et diminue lorsque l'énergie décroît. Performante pour des structures éloignées d'un minimum local, l'algorithme SD converge vite mais devient peu efficace à l'approche du minimum local :  $(x_k)$  oscillant autour de la valeur minimale. La méthode SD est généralement suivie par une étape de minimisation utilisant une méthode plus performante à l'approche du minimum local telle que la méthode du gradient conjugué.

- ii. **L'algorithme du gradient conjugué** (« *conjugate gradient* », CG), d'ordre 1, utilise également la dérivée première de la fonction d'énergie. Similaire à l'algorithme SD, à la différence près que le gradient est calculé entre les énergies de deux conformations

successives, sans déplacement de coordonnées. Le pas de la minimisation est adapté par rapport au gradient d'itération précédent. La direction est déterminée par le vecteur conjugué :

$$p_{k+1} = -g_{k+1} + \beta_{k+1} p_k \quad (\text{IV-13})$$

$$\text{avec :} \quad \beta_{k+1} = \frac{g_{k+1}^T g_{k+1}}{g_k^T g_k} \quad \text{Fletcher-Reeves}$$

$$\beta_{k+1} = \frac{g_{k+1}^T (g_{k+1} - g_k)}{g_k^T g_k} \quad \text{Polak-Ribière}$$

### 3. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire (DM) consiste en la représentation de l'évolution temporelle des mouvements d'un ensemble fini de particules ou de molécules, appelée trajectoire, en intégrant de façon numérique les équations du mouvement de la mécanique classique. Ainsi, elle permet d'étudier les propriétés dépendantes du temps telles que les forces, vitesses et positions ou d'étudier des propriétés en fonction du temps telles que la température, la pression, les fluctuations de topologie.

Connaissant les positions et certaines de leurs dérivées au temps  $t$ , un algorithme d'intégration itérative des équations de Newton permet de calculer les nouvelles positions et vitesses au temps  $t+dt$ . Le pas d'intégration  $dt$  doit être suffisamment petit pour garantir la conservation de l'énergie totale du système et est généralement de 1 à 2 femtosecondes (fs).

Enfin, le temps de calcul nécessaire est directement proportionnel au pas d'intégration  $\Delta t$ , qui doit rester petit par rapport à la période de vibration la plus courte du système pour pouvoir représenter ce mouvement. En général ce sont les vibrations X-H qui limitent le pas  $\Delta t$  à  $10^{-15}$  s (1 fs).

#### 3.1. Principes

Les principes de la DM reposent sur la résolution numérique des équations de mécanique classique de Newton. Elle dépend de deux choses, la connaissance de la position  $r(t)$  et de son accélération  $d^2r/dt^2$ . Les vitesses initiales sont assignées au hasard par une distribution de type Maxwell-Boltzmann à une température donnée. L'intégration temporelle et itérative de l'équation du mouvement des particules en interaction va donc permettre de calculer les positions et les vitesses des atomes au cours du temps (appelées « trajectoires »).

La seconde loi de Newton associe la force  $\vec{F}_i$  appliquée à un objet à une accélération  $\vec{a}$  s'appliquant à chaque atome  $i$  de masse  $m_i$  le composant :

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i \quad (\text{IV-14})$$

Les dérivées première et seconde des positions  $r$  de chaque atome  $i$  en fonction de la force  $\vec{F}_i$  subie à chaque instant  $t$ , permettent de calculer respectivement les vitesses  $\vec{v}_i$  et les accélérations  $\vec{a}$  :

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i = m_i \cdot \frac{\partial \vec{v}_i}{\partial t} = m_i \cdot \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (\text{IV-15})$$

Par ailleurs, d'après le champ de force, on sait que la force appliquée à une molécule est fonction de la position de ses atomes. On a donc :

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial E_{pot}(\vec{r})}{\partial \vec{r}_i} \quad (\text{IV-16})$$

L'intégration de la force permet donc d'obtenir la position en fonction du temps :

$$\int \int \vec{F} dt^2 = \int \int m d^2 \vec{r} \quad (\text{IV-17})$$

Cependant, il n'existe pas de méthodes analytiques permettant de déterminer directement les trajectoires par résolution de l'équation de Newton. Pour cela, des algorithmes d'intégration ont donc été développés.

## 3.2. Intégrateurs

Il existe plusieurs approches pour intégrer numériquement les équations du mouvement de Newton.

Les algorithmes d'intégration décomposent le temps en une série d'intervalles très courts, définissant le pas d'intégration  $\Delta t$ . A partir des coordonnées et des vitesses initiales au temps  $t$ , les positions et les vitesses au temps  $t+\Delta t$  sont calculées.

Il existe plusieurs algorithmes couramment utilisés en simulation de dynamique moléculaire : l'algorithme de « *Position Verlet* », « *Velocity Verlet* » ou encore « *Leap Frog* ».

L'algorithme « *Position Verlet* » proposé par Loup Verlet en 1967 est historiquement l'un des premiers introduit. Il doit son appellation au fait qu'il calcule la vitesse à l'instant  $t$  et la position à l'instant  $t + \Delta t$  à partir de la force et des positions à  $t$  et  $t - \Delta t$ . L'algorithme « *Velocity Verlet* » calcule la position et la vitesse au même instant  $t + \Delta t$ . Cet algorithme, plus simple que le précédent, est néanmoins plus coûteux en mémoire puisqu'il nécessite le stockage des vitesses aux temps  $t + \Delta t$ .

L'algorithme du « *Leap-Frog* » ou du « saute-mouton » calcule la vitesse et la position à des temps alternés, de la manière suivante :

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)}{\Delta t} \quad (\text{IV-18})$$

Et

$$\vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad (\text{IV-19})$$

Pour obtenir :

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (\text{IV-20})$$

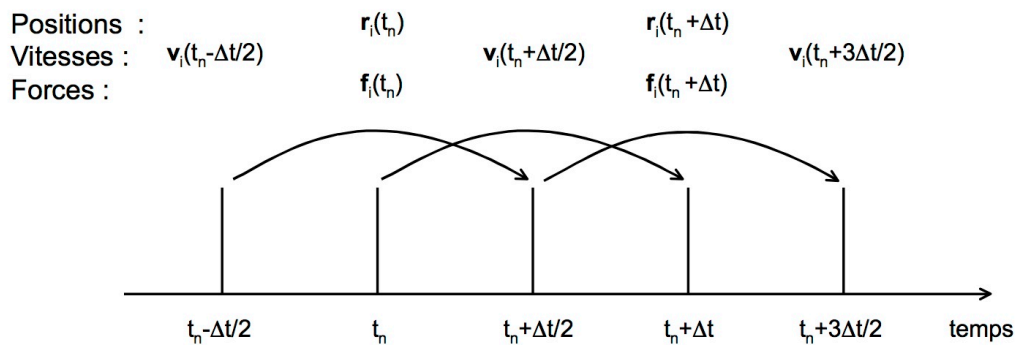
Et

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (\text{IV-21})$$

En remplaçant certains termes on obtient :

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}(t)}{m} \Delta t \quad (\text{IV-22})$$

La vitesse de chaque atome est calculée au demi-intervalle  $t+\Delta t/2$  d'après la force à l'instant  $t$  et la vitesse au demi-intervalle précédent  $t-\Delta t/2$ . L'algorithme débute donc en donnant la position de chaque atome au temps  $t=0$ , la force est calculée à partir des positions initiales et la vitesse est donnée à l'instant demi-entier précédent  $-\Delta t/2$ .



**Figure IV-6** – Principe de l'algorithme de « Leap-Frog »

C'est cet algorithme que nous avons utilisé pour nos simulations car il a pour particularité de ne pas prendre en compte explicitement la vitesse instantanée au temps  $t$ , mais avec une désynchronisation par rapport à la position due au décalage de  $\Delta t/2$ . Cette particularité permet un couplage avec un bain thermique par ajustement des vitesses.

### 3.3. Ensembles statistiques

Le comportement et l'évolution de systèmes physiques macroscopiques sont étudiés par la physique statistique à partir des caractéristiques et des propriétés de leurs constituants microscopiques. Ainsi, la description de ces systèmes physiques par le biais d'ensembles statistiques permet d'associer la totalité des configurations possibles à leur probabilité de réalisation. Chaque ensemble possède des grandeurs thermodynamiques définies par des fonctions de partitions. On distingue trois types d'ensemble, du plus simple au plus complexe : l'ensemble *microcanonique*, *canonique* et *grand-canonique* (ce dernier ne sera pas traité ici). La modélisation moléculaire permet d'imposer des observables macroscopiques thermodynamiques telles que la pression, l'enthalpie ou encore l'énergie libre à partir de simulations à l'échelle microscopique, respectant ces ensembles statistiques. Les simulations de dynamique moléculaire les plus simples fixent des conditions de nombre d'atomes  $N$ , de volume  $V$  et d'énergie  $E$  constants (ensemble NVE), correspondant à l'ensemble *microcanonique*. Pour étudier le comportement de systèmes biologiques telles que des ligands ou protéines solvatés, il peut être nécessaire de réaliser des simulations où le volume  $V$  et la température  $T$  sont constants et l'énergie variable, correspondant à l'ensemble *canonique* (ensemble NVT). Nous avons utilisé pour la plupart de nos systèmes l'ensemble *isobare-isotherme* (ensemble NPT) où la pression est fixée. Ces deux derniers ensembles sont très couramment utilisés pour modéliser des systèmes biologiques car les conditions externes qui déterminent le comportement macroscopique du système sont plus facilement reproductibles expérimentalement.

L'ensemble NPT utilise un couplage isotropique de la pression permettant un contrôle uniforme dans toutes les directions. Aucune pression particulière n'est donc appliquée à l'interface, ce qui provoque une contraction de la surface conduisant à des aires moléculaires faibles, caractéristiques de la phase gel. En effet, la tension de surface étant nulle, aucune force ne compense l'application isotrope de la pression [Klauda *et al.* 2008].

Deux variantes de l'ensemble NPT ont été développées et permettent un contrôle plus fin de la pression en faisant appel à un couplage semi-isotropique de la pression, selon  $z$  et le plan  $xy$  séparément.

La première variante est l'ensemble NPAT permet de réaliser des simulations de dynamique moléculaire à aire constante. Cette approche est utilisée pour la simulation des bicouches lipidiques dont on connaît l'aire moléculaire des lipides qui la composent. En effet, il n'existe pas de méthode expérimentale permettant de mesurer directement la tension de surface des bicouches lipidiques. Cependant, une gamme d'aire moléculaire caractéristique de chaque phospholipide peut être établie à partir des données de la littérature. Pour le POPC par exemple, l'aire moléculaire en monocouche peut varier de 58 Å<sup>2</sup> [Yun *et al.* 2003] à 65 Å<sup>2</sup> [Weis *et al.* 2000 ; Gramlich *et al.* 2001] selon les températures de mesure ou de 60-63 Å<sup>2</sup> [Hennere *et al.* 2009 ; Leekumjorn and Sum 2007a] à 68,5 Å<sup>2</sup> [Kucerka *et al.* 2005] en bicouche simulée et expérimentale respectivement.

L'aire est maintenue constante par un couplage semi-isotropique de la pression, qui permet de maintenir constantes les dimensions  $x$  et  $y$  tout en autorisant des ajustements dans la composante  $z$ .

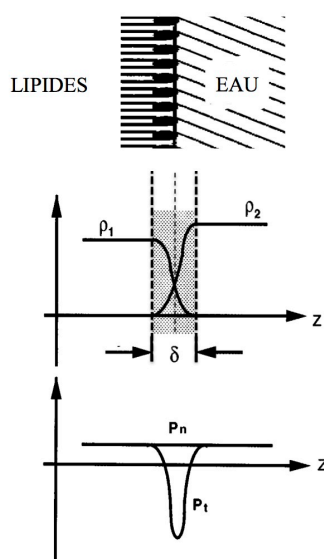
L'ensemble NPγT permet, quant à lui, de réaliser des simulations de dynamique moléculaire à tension de surface constante, ce qui en fait un ensemble souvent utilisé pour la simulation de systèmes interfaciques tels que les bicouches et monocouches lipidiques lorsque la valeur de tension de surface est connue. L'intérêt de l'étude des bicouches au travers des modèles de monocouche a poussé à établir les équivalences entre ces deux systèmes. En particulier, une pression de surface de 30 mN/m est considérée dans la littérature comme la pression de surface d'équivalence permettant l'étude comparative entre des bicouches et des monocouches [Blume 1979 ; Marsh 1996].

En mécanique statistique la tension de surface  $\gamma$  est calculée, à partir des trajectoires des atomes, selon la formule de Kirkwood et Buff [Kirkwood and Buff 1949] adaptée aux systèmes symétriques de type bicouche lipidique [Y. Zhang *et al.* 1995]. Cette formule consiste à intégrer la différence entre les pressions normale  $P_N$  et tangentielle à la surface  $P_\tau$  sur toute la hauteur  $z$  du système (Figure IV-7) :

$$\gamma = \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{\infty} [P_N(z) - P_\tau(z)] dz \quad (\text{IV-23})$$

Il est admis en simulation que la surface de l'interface est parallèle au plan  $xy$  et que la normale à la surface correspond à l'axe  $z$ .

L'intégration est faite sur des tranches d'épaisseur  $dz$  dans lesquelles les interactions entre toutes les paires d'atomes  $i$  et  $j$  sont calculées. Le facteur 1/2 est dû aux deux interfaces lipide/eau considérées dans la simulation.



**Figure IV-7** – Schémas d’une interface eau/lipide (haut), des profils de densité (centre) et de pressions (bas).  $\rho_1$  et  $\rho_2$  les densités des lipides et de l’eau,  $P_n$  et  $P_t$  les pressions normale et tangentielle à l’interface et  $\delta$  l’épaisseur approximative de l’interface. Figure adaptée de Zhang *et al.* 1995 et Feller *et al.* 1995.

### 3.4. Contrôle de la température et de la pression

L’application des ensembles statistiques nécessite le contrôle de la température et de la pression d’un système au cours d’une dynamique moléculaire. Seules les méthodes utilisées pour ces travaux seront détaillées dans ce paragraphe.

#### 3.4.1. Contrôle de la température

##### Thermostat de Berendsen

Le thermostat de Berendsen consiste en un faible couplage du système par un bain thermique (« *weak coupling method* »). L’équation de mouvement des atomes est modifiée afin d’obtenir une relaxation du premier ordre de la température  $T$  vers la température de référence  $T_0$ , avec  $\tau$  comme constante de temps :

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (\text{IV-24})$$

Le contrôle de la température peut s'effectuer par une modification des vitesses des atomes par un facteur de correction  $\lambda(t)$ . La vitesse de relaxation de la température est contrôlée par le temps de relaxation de la température  $\tau_T$ .

$$\lambda = \left[ 1 + \frac{n_{TC}\Delta t}{\tau_T} \left\{ \frac{T_0}{T\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right)} - 1 \right\} \right]^{1/2} \quad (\text{IV-25})$$

### Thermostat « *velocity rescaling* »

Le thermostat de recalibrage des vitesses ou « *velocity rescaling* » [Bussi *et al.* 2007] est un thermostat de Berendsen avec un terme stochastique additionnel qui assure une redistribution correcte de l'énergie cinétique.

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + \sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (\text{IV-26})$$

Avec :

$K$       énergie cinétique

$N_f$      nombre de degré de liberté

$dW$      processus de Wiener (terme stochastique du mouvement brownien)

Cet algorithme possède les avantages de celui de Berendsen, avec une relaxation de la température du premier ordre, mais pas l'inconvénient des oscillations de l'énergie cinétique.

## 3.4.2.      Contrôle de la pression

De la même manière, la pression du système peut être régulée au cours du temps à l'aide d'un « réservoir » de pression ou « Barostat de Berendsen ».

Comme pour la méthode de couplage à un bain thermique, l'équation de mouvement des atomes est modifiée afin d'obtenir une relaxation du premier ordre de la pression  $P$  par rapport à la pression de référence  $P_0$  :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau} \quad (\text{IV-27})$$



L'algorithme de Berendsen remet à l'échelle les coordonnées à chaque étape à l'aide de la matrice de passage  $\mu$ , avec  $\beta$  comme compressibilité isotherme, afin d'obtenir cette relaxation de premier ordre :

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (\text{IV-28})$$

### 3.5. Conditions périodiques aux limites et taille du système

La simulation de systèmes de taille finie nécessite de considérer le traitement des bords du système étudié. En effet, si l'on se contente de construire et simuler un système microscopique complètement dans le vide, les atomes en périphérie du système vont alors avoir tendance à s'éloigner les uns des autres à moins d'être maintenus ensemble par une force restrictive externe. Cependant, cette technique introduit des forces parasites dans la simulation, pouvant donc entraîner des approximations supplémentaires.

Afin de réduire ces effets de bord, les conditions périodiques sont souvent utilisées. Le système est placé dans une boîte, cubique (ou n'importe quelle forme permettant de remplir l'espace périodiquement telle que le prisme rectangulaire, hexagonal, ou l'octaèdre tronqué), entourée de boîtes images identiques dans les trois dimensions. Ainsi, l'ensemble du système est représenté comme un système périodique, dans lequel les six bords du cube sont en contact avec leurs bords opposés. Une molécule sortant du cube central par un côté, y entre de nouveau par le côté opposé avec la même vitesse, permettant de simuler un système virtuellement infini. On appelle ce modèle de représentation les conditions périodiques aux limites (CPL) ou en anglais *Periodic Boundary Condition* (PBC). (Figure IV-8)

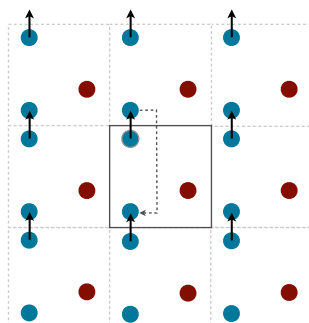


Figure IV-8 – Représentation bidimensionnelle de conditions périodiques aux limites

Un atome ou une particule  $i$  interagit avec l'image la plus proche d'une particule  $j$ . En revanche, un atome ou une particule ne doit pas interagir avec elle-même. Cela implique que la valeur seuil (décrite au paragraphe suivant) soit inférieure à la moitié de la plus petite dimension de la boîte.

La boîte choisie dans les simulations décrites dans ce manuscrit est de forme rectangulaire car celle-ci s'accommode parfaitement avec la forme d'un système de monocouche lipidique à l'interface eau/air, décrit dans le Chapitre V METHODOLOGIE.

## 3.6. Evaluation des interactions non liées

### 3.6.1. Méthode de la valeur seuil

L'évaluation des interactions de van der Waals est extrêmement coûteuse en calcul puisqu'elle se fait entre chaque paire d'atomes. Cependant, ces interactions sont dominées par le terme en  $r^6$  et convergent donc rapidement. Il est nécessaire, pour limiter le temps de calcul, de réduire cette sommation aux contributions les plus importantes. Une des méthodes pour limiter le temps de calcul est de prendre en compte seulement les atomes situés à une distance inférieure à une valeur seuil. Pour cela, une distance (ou rayon) de troncature (« *cutoff* » ou « *cut-off* ») est définie, au-delà de laquelle les énergies d'interactions non-liées sont ignorées (Figure IV-9). Le *cutoff* peut être défini par paire d'atomes ou par résidu. Le calcul de l'énergie de van der Waals pour un atome donné nécessite la recherche préalable de ses atomes voisins. Les déplacements des atomes dans une simulation de dynamique moléculaire étant relativement lents, la liste des atomes voisins peut-être mise à jour à des intervalles de temps plus grands que les pas de dynamique moléculaire ou de minimisation, ce qui permet d'accélérer le calcul de l'énergie potentielle. Cette méthode a été longtemps critiquée car elle introduit des discontinuités importantes dans le calcul du potentiel, générant des forces importantes à proximité du *cutoff*. Pour pallier à cet inconvénient majeur, des fonctions de lissages ont été développées : les méthodes « *potential switch* » et « *potential shift* ». La fonction *shift* ou fonction de déplacement du potentiel décale la courbe d'énergie de façon à ce qu'elle croise l'axe des abscisses, représentant l'énergie, à une valeur de troncature. La fonction *switch* ou permutation du potentiel nécessite une valeur de troncature à laquelle l'énergie de van der Waals sera nulle et une autre valeur, inférieure à la première, entre lesquelles la courbe d'énergie sera atténuée. C'est la méthode la plus adaptée pour gérer les interactions de van der Waals et celle que nous avons utilisée.

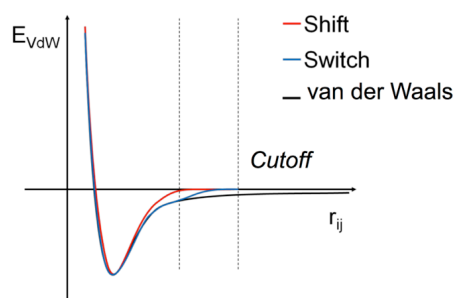


Figure IV-9 – Représentation des méthodes de troncature de l'énergie de van der Waals

### 3.6.2. Méthode de la sommation d'Ewald

Développée en 1921 pour l'étude des cristaux ioniques, la méthode d'Ewald s'est peu à peu imposée dans le domaine de la modélisation moléculaire pour le traitement de l'énergie électrostatique en conditions périodiques. En effet, celle-ci permet de calculer le potentiel électrostatique perçu par une molécule dans un cristal infini. Cependant, cela implique de calculer les interactions d'une particule avec les autres particules de la boîte principale, des boîtes voisines et des autres boîtes du cristal infini. Si l'on considère la contribution électrostatique de  $n$  boîtes images sur la boîte principale composée de  $N$  atomes,

$$E_{ij}^{elec}(r_{ij}) = \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{4\pi} \left( \frac{q_i q_j}{\varepsilon_{el} |r_{ij+n}|} \right) \quad (IV-29)$$

Avec :

- $r_{ij}$  distance entre les atomes  $i$  et  $j$  en  $\text{\AA}$
- $\varepsilon_{el}$  constante diélectrique, généralement égale à 1
- $q$  charge atomique
- $i \neq j$

La composante énergétique électrostatique varie en  $1/r$  et converge difficilement. La conversion de l'équation en une somme de deux termes convergeant rapidement a été proposée par Ewald.

$$\varphi(r) = \varphi_{sr}(r) + \varphi_{lr}(r) \quad (IV-30)$$

Avec :

- $\varphi_{sr}(r)$  terme à courte distance (« short-range »)
- $\varphi_{lr}(r)$  terme à longue distance (« long-range »)

Le terme  $\varphi_{sr}(r)$  est dans l'espace réel, appliqué à courte distance et l'autre terme  $\varphi_{lr}(r)$  est complexe dans l'espace imaginaire (espace de Fourier), appliqué aux longues distances.

Physiquement cela revient à considérer que chaque charge est entourée par une distribution de charges neutralisantes d'intensité égale. De signe opposé elle permet d'obtenir une convergence rapide à courte distance en écrantant les charges. A ceci vient s'ajouter une distribution de charge qui annule la précédente afin que le potentiel global soit identique à l'original. Nous avons utilisé au cours de nos simulations la méthode « *Particle Mesh Ewald* », une adaptation plus récente de la sommation d'Ewald aux simulations numériques.

### 3.6.3. Méthode Particle Mesh Ewald

La méthode « *Particle Mesh Ewald* » (PME) est issue de la méthode de la sommation d'Ewald. Elle offre la possibilité de calculer l'intégralité du potentiel électrostatique tout en étant relativement peu coûteuse en temps de calcul. A la différence de la méthode de la sommation d'Ewald, le système est ici découpé selon un maillage régulier où chaque nœud correspond à une charge partielle. Le calcul dans l'espace réciproque peut se faire à l'aide d'une transformée de Fourier, ce qui augmente considérablement la vitesse de calcul. Ce gain de vitesse est dû au passage d'une fonction exponentielle décroissante à une fonction Lorentzienne grâce à la transformée de Fourier. La Figure IV-10 représente les différentes étapes du calcul PME. Sur la Figure IV-10 (A), les particules chargées sont représentées par des sphères bleues, en (B) le système est découpé selon un maillage régulier dans lequel les charges partielles sont interpolées, en (C) les forces sont calculées sur les points de la grille à l'aide d'une transformée de Fourier, enfin en (D) les forces sont interpolées vers les particules et les coordonnées des particules sont mises à jour. L'algorithme se termine par un retour au point (A). Par rapport à la méthode des valeurs seuils, elle permet de prendre en compte l'effet de l'énergie électrostatique à longue distance tout en étant informatiquement peu coûteuse.

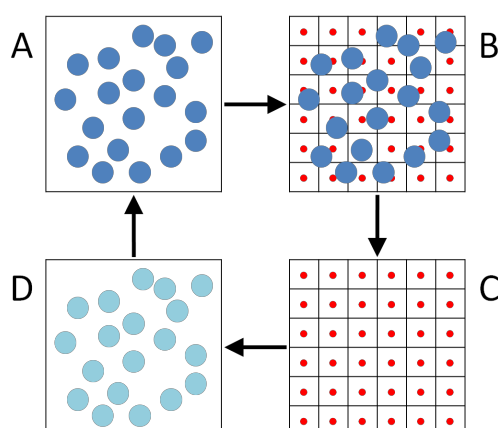


Figure IV-10 – Schématisation des différentes étapes du calcul PME

# Chapitre V.

## METHODOLOGIE

*Dans ce chapitre nous allons illustrer ce qu'apporte la modélisation dans la description et la compréhension des phospholipides organisés en monocouche et comment elle est complémentaire aux méthodes expérimentales classiques d'étude des phospholipides.*

*La construction des systèmes simulés sera explicitée et le protocole de dynamique moléculaire ayant permis la reproduction de la compression de la monocouche sera détaillé.*

*Enfin, les principaux paramètres choisis ainsi que l'application des analyses de dynamique moléculaire à l'étude structurale des lipides sera décrite.*

# 1. Modèles de monocouche de POPC

## 1.1. Modèle de POPC

Les 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholines (*sn* : « *stereochemical numbering* ») sont des glycérophospholipides composés de 3 parties : un squelette glycérol portant d'une part, une tête polaire zwitterionique et d'autre part les chaînes hydrophobes (Figure V-1).

Le squelette glycérol est la partie la plus rigide du phospholipide, sur laquelle la fonction alcool en position 1 est estérifiée par le groupement phosphate de la tête polaire, la fonction alcool en position 2 par l'acide gras oléique et la fonction alcool en position 3 par l'acide gras palmitique.

La tête polaire est composée d'un groupement phosphate chargé négativement et d'une choline chargée positivement.

L'acide gras oléique est composé d'une chaîne alkyle de 18 carbones portant une insaturation entre les carbones 9 et 10, notée C18 :1,  $\omega$ 9. L'acide gras palmitique est composé d'une chaîne alkyle saturée de 16 carbones, notée C16 :0.

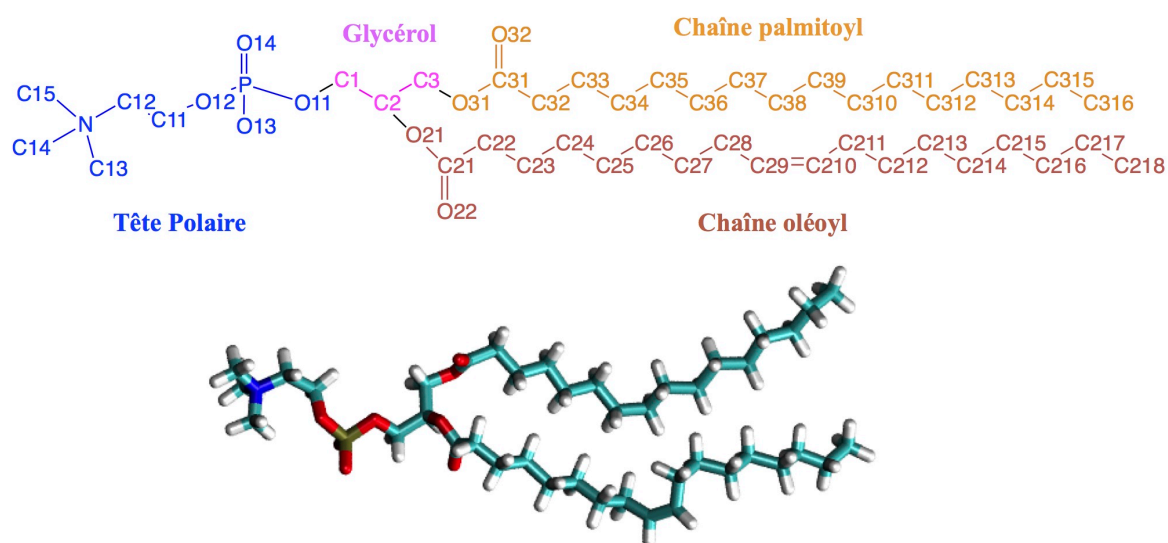
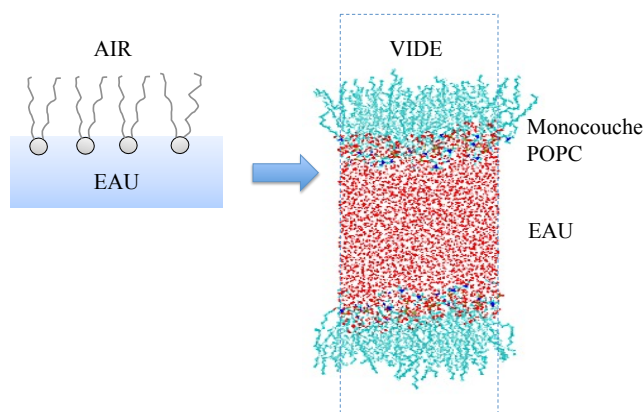


Figure V-1 – Structure 2D et 3D du POPC ainsi que sa nomenclature atomique

La numérotation des atomes reportée sur la Figure V-1 est couramment choisie pour les simulations de dynamique moléculaire des POPC et reprend celle utilisée par Sundaralingam et collègues [Sundaralingam 1972]. Toutes les références aux atomes des parties suivantes se rapportent à cette numérotation.

## 1.2. Modèle de monocouche

Nous avons construit un système symétrique de monocouche à l'interface eau/vide (Figure V-2) à partir d'une bicouche, selon le modèle proposé par Feller *et al* [Feller *et al.* 1995].



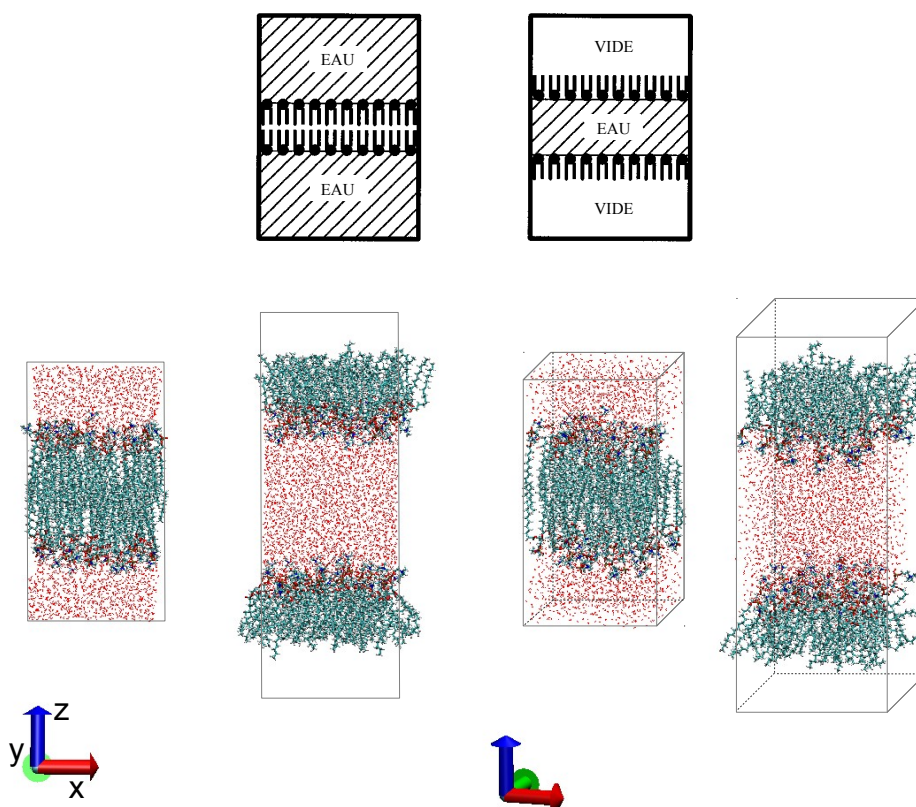
**Figure V-2** – Modélisation du système symétrique de monocouche

Il est composé de 2 compartiments de vide (correspondant à l'air) et de 2 monocouches lipidiques disposées de manière symétrique de chaque coté d'un compartiment d'eau, avec les têtes polaires orientées vers l'eau (Figure V-3). La densité de l'air étant négligeable par rapport à celle de l'eau, on ne considère pas les molécules des gaz composant l'air dans notre modélisation du système.

Nous avons tout d'abord construit un système composé d'une bicouche de POPC générée avec le plugin « *Membrane Builder* » du logiciel VMD. La bicouche a ensuite été solvatée en z via le plugin « *Solvation Box* » de VMD. Les deux feuilletts de cette bicouche ont ensuite été séparés pour former 2 monocouches opposées. Le feuillet supérieur accompagné de sa couche de solvation a été translaté selon l'axe z, dans les valeurs négatives, de façon à juxtaposer les compartiments d'eau.

Chaque monocouche comporte 33 molécules de POPC, dont les têtes polaires se font face, séparées par un compartiment d'eau de 20 Å d'épaisseur (3 457 molécules d'eau). L'épaisseur de la couche d'eau a été choisie de sorte qu'il n'y ait pas d'interaction entre les têtes polaires des 2 monocouches opposées afin de garantir leur indépendance comme il a été recommandé par Feller *et al* [Feller *et al.* 1995]. La géométrie symétrique est la plus répandue à travers la littérature pour simuler une monocouche [Lucas *et al.* 2011 ; Duncan and Larson 2008 ; Baoukina *et al.* 2008 ; Skibinsky *et al.* 2005 ; Song *et al.* 2011].

Dans le modèle, les chaînes hydrophobes sont directement en contact avec le vide. La hauteur des compartiments de vide a été fixée à 30 Å afin d'éviter toute interaction avec les feuilletts des boîtes images supérieures et inférieures (Figure V-3).



**Figure V-3** – Représentation schématique et tridimensionnelle des modèles de bicouche et monocouche symétriques. Les molécules d’eau sont représentées par des points rouges, les phospholipides apparaissent sous forme de bâtonnets avec les chaînes carbonées colorées en cyan, les atomes d’oxygène des groupements phosphates en rouge et les phosphores en ocre, les atomes d’azote des groupements choline sont bleu.

De plus, la tension de surface a initialement été implémentée pour les simulations de bicouches lipidiques, qui présentent 3 compartiments : eau / lipide / eau. On distingue alors 2 interfaces lipide/eau sur lesquelles la tension de surface est appliquée.

Le calcul de la tension de surface moyennée dans le temps  $\gamma(t)$  dans GROMACS prend en compte toutes les interfaces du système, d’après la formule suivante :

$$\begin{aligned} \gamma(t) &= \frac{1}{n} \int_0^{Lz} \left\{ P_{zz}(z, t) - \frac{P_{xx}(z, t) + P_{yy}(z, t)}{2} \right\} dz \\ &= \frac{Lz}{n} \left\{ P_{zz}(t) - \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right\} \end{aligned} \tag{V-1}$$



Où  $n$  est le nombre d'interfaces du système,  $L_z$  est la hauteur de la boîte de simulation,  $P_{zz}$  est la pression en  $z$ ,  $P_{xx}$  et  $P_{yy}$  les composantes de la pression latérale.

Pour 2 interfaces, il faudra alors doubler la valeur de la tension de surface.

Pour une bicouche, on compte 2 interfaces eau/lipide et pour le système de monocouche symétrique on ne compte également que les 2 interfaces eau/lipide. Tout comme l'interface lipide/lipide n'est pas prise en compte dans le système bicouche, les interfaces lipide/vide ne sont pas prises en compte dans le système de monocouche pour le calcul de la tension de surface [Y. Zhang *et al.* 1995 ; Feller *et al.* 1995 ; Rose *et al.* 2008].

Une aire moléculaire initiale de  $110 \text{ \AA}^2$  a été choisie afin de se rapprocher de l'aire moléculaire de « l'onset » expérimentale, c'est à dire l'aire moléculaire à partir de laquelle une tension de surface est mesurée en début de compression.

Les dimensions du système sont de  $60 \text{ \AA} * 60 \text{ \AA} * 150 \text{ \AA}$  ( $x*y*z$ ), pour un total de 19 215 atomes dont 8 844 atomes de lipides (66 molécules de POPC) et 10 371 atomes d'eau.

Nous avons choisi une taille de système réduite afin d'optimiser les temps de calcul. En effet, les POPC sont des molécules très flexibles, et, leur organisation supramoléculaire ne fait intervenir aucune liaison covalente. De ce fait, la dynamique de la monocouche dépendra majoritairement des liaisons non liantes. Les temps de calculs et d'équilibration du système s'en trouvent considérablement allongés par rapport à un système de protéine solvatée.

## 2. Protocole de dynamique moléculaire

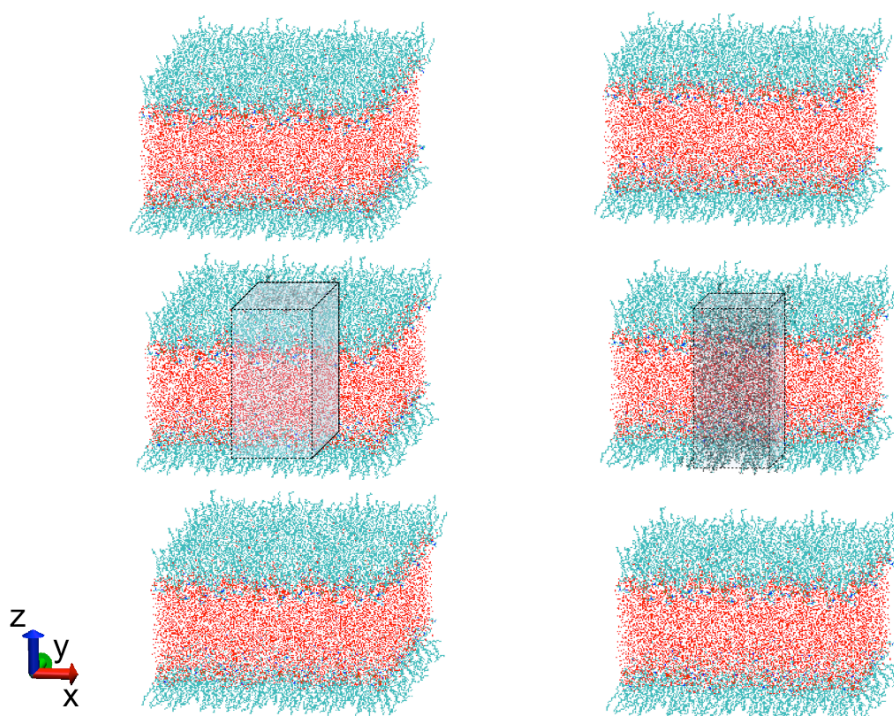
Les fichiers de topologie, paramètres et de coordonnées ont été créés avec le programme LEaP du package AmberTools 1.5.4 [Salomon-Ferrer *et al.* 2012 ; Case *et al.* 2012]. Ces fichiers ont ensuite été convertis du format Amber au format GROMACS à l'aide de l'outil ACPYPE [Sousa da Silva and Vranken 2012].

Tous les calculs de dynamique moléculaire ont été réalisés avec le logiciel de simulation GROMACS version 4.5.5 [Hess *et al.* 2008]. Le champ de force tout-atome général d'Amber GAFF et le modèle d'eau TIP3P ont été utilisés pour modéliser les molécules de POPC et les molécules d'eau.

Nous avons choisi de réaliser les simulations de dynamique moléculaire à une température de 300 K, couramment utilisée en simulation, afin de pouvoir comparer les résultats de nos analyses structurales aux données de la littérature.

Le couplage de la pression est réalisé avec le barostat de Berendsen et la température moyenne est maintenue par le thermostat « velocity rescaling », présentés au Chapitre IV Modélisation Moléculaire 3.4.

Les conditions périodiques aux limites (PBC) ont été appliquées dans les 3 dimensions, avec  $z$ , direction normale à l'interface. Etant donné les compartiments de vide, la périodicité du système n'est effective que sur le plan  $xy$  comme le montre la Figure V-4.



**Figure V-4** – Application des PBC au système symétrique de monocouche de POPC. La boîte centrale est représentée en pointillé.

Les interactions électrostatiques longues distances ont été calculées par la méthode PME avec un *cut-off* de 11 Å. Le calcul des énergies de van der Waals a été effectué avec le potentiel de Lennard-Jones 6-12 et la fonction *switch* appliquée sur 1 Å à partir d'une distance de 8 Å.

Les coordonnées du système ont été enregistrées tous les 5 000 pas (chaque 5 ps). Les valeurs moyennes décrites dans le chapitre Résultats correspondent à la valeur moyennée sur l'ensemble des lipides et sur l'ensemble des coordonnées enregistrées au cours de la trajectoire.

## 2.1. Pré-équilibration de la structure initiale NPAT

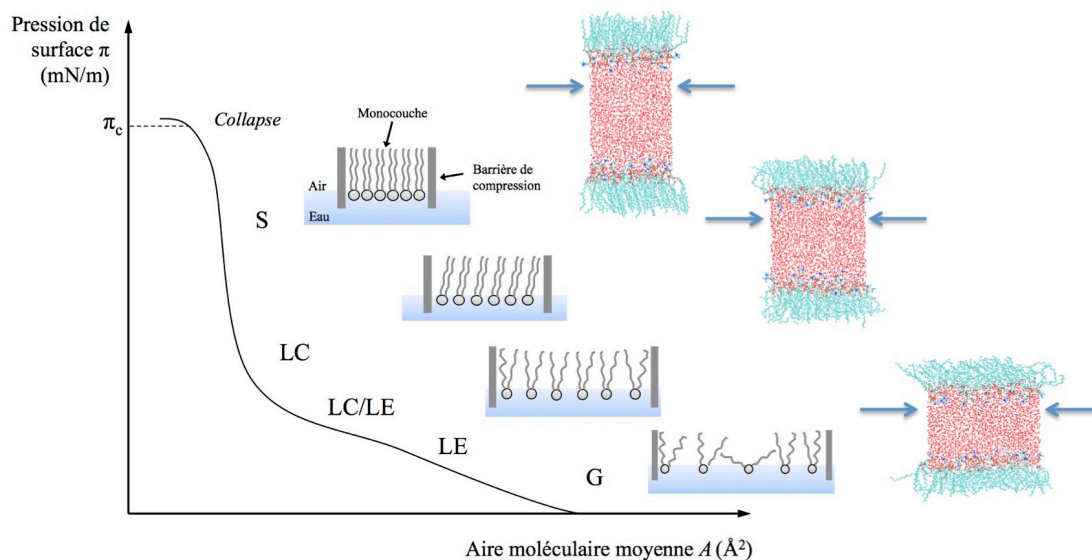
Le système initial a été pré-équilibré à une aire constante de  $110 \text{ \AA}^2$ , une température de 300 K pendant une durée de 20 ns. Cette étape permet d'échantillonner l'espace conformationnel du système selon la température et la pression définies sans modifier la densité moléculaire surfacique.

L'algorithme *leap-frog* a été employé pour l'intégration des équations aux mouvements, avec un pas de 1 fs pendant ces 20 ns. La pression en z a été définie à 1 bar et les dimensions en x et y ont été maintenues constantes par un couplage semi-isotropique de la pression et une attribution nulle de la compressibilité en x et y.

Le système résultant de cette pré-équilibration a ensuite été utilisé comme système de départ des simulations décrites ci-après.

## 2.2. Simulations à différentes valeurs de pression de surface NPyT

Afin de reproduire l'isotherme de compression de la monocouche de POPC, nous avons calculé 7 points avec 7 simulations de dynamique moléculaire de 200 ns aux pressions de surface suivantes : 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 et 43 mN/m.



La tension de surface  $\gamma$  est calculée d'après la pression de surface  $\pi$  selon la relation :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{V-2})$$

Où  $\gamma_0$  est la tension de surface de l'eau pure 71,8 mN/m à 298 K [Desroches *et al.* 2004] et  $\gamma$  la tension de surface mesurée en présence de la monocouche.

Chacune de ces dynamiques a été effectuée suivant l'ensemble NP $\gamma$ T, à une température constante de 300 K et à tension de surface constante à partir du système pré-équilibré décrit précédemment et pour une durée de 200 ns.

Sur les 7 dynamiques, seules les simulations à 20 et 30 mN/m ont convergé au terme des 200 ns de simulation. Nous avons donc repris la fin de ces dynamiques comme point de départ des autres simulations :

- à partir de la topologie obtenue en fin de simulation à 20 mN/m, nous avons relancé une simulation de dynamique moléculaire à 15 mN/m. La fin de cette dynamique a été ensuite utilisée comme point de départ de la dynamique à 10 mN/m, enfin, la fin de cette dernière comme point de départ de la dynamique à 7,5 mN/m.
- à partir de la topologie obtenue en fin de simulation à 30 mN/m, nous avons relancé une simulation de dynamique moléculaire à 40 mN/m et la fin de cette dynamique a ensuite été utilisée pour relancer une dynamique à 43 mN/m.

Seules les dynamiques dont les pressions de surface proches des pressions de surface d'équivalence des bicouches (30 mN/m) [Marsh 1996] ont convergé directement au bout de 200 ns. Ceci paraît lié à ce que les pressions inférieures à 20 mN/m, correspondant à des phases très expansées, imposent de trop grandes fluctuations d'aire surfacique, et inversement, les pressions au dessus de 30 mN/m imposent une forte compression latérale telle que les systèmes sont soumis à des fluctuations d'énergie nécessitant des phases d'équilibration plus longues et graduelles : de 30 mN/m à 40 mN/m puis à 43 mN/m et de 20 mN/m à 15 mN/m, à 10 mN/m, à 7,5 mN/m.

Toutes les mentions aux trajectoires de dynamique à 300 K dans les parties d'analyses suivantes font références à cette série de simulations.

Enfin, afin de corrélérer l'isotherme calculée avec l'isotherme expérimentale de référence (obtenue par le groupe du Pr Rosilio), nous avons poursuivi les simulations précédemment décrites avec 200 ns supplémentaires à 293 K, température utilisée pour obtenir l'isotherme expérimentale de référence.

La mise au point des calculs a d'abord été réalisée sur une station de travail octo-CPU, puis sur un cluster de calcul HPC (High Performance Computing) à 192 CPU. La majorité des calculs qui ont servis aux analyses ont été réalisés sur le supercalculateur du Centre de Calcul Recherche et Technologie (CCRT) du CEA.

### **3. Analyses des simulations**

Les données issues des simulations de dynamique moléculaire sont enregistrées à intervalles réguliers pendant la durée de simulation. Il est donc possible d'évaluer certains paramètres le long de la trajectoire ou alors d'en calculer une valeur moyenne sur un intervalle choisi de la trajectoire.

#### **3.1. Equilibration de la dynamique moléculaire**

On dit qu'un système est équilibré quand les fluctuations observées sur la topologie, ou les paramètres de simulation tels que l'énergie ou la température n'évoluent plus par rapport à une moyenne et sur une durée significative. Un ensemble de paramètres est utilisé pour vérifier le bon respect des conditions de simulation ainsi que pour s'assurer que le système a atteint un état d'équilibre, c'est à dire un état stable qui répond à un ensemble de contraintes que l'on s'est fixé (par exemple la température, la pression, la tension de surface, ...) et non pas un état de transition.

Le suivi de l'évolution de l'énergie du système permet une première évaluation de son équilibration. Le suivi de la fluctuation des structures simulées permet d'avoir des informations complémentaires pour déterminer si le système est équilibré. Pour les simulations de protéines, une analyse classique consiste à mesurer la déviation standard des moindres carrés (RMSD *Root Mean Square Displacement*) des coordonnées du système. Cette analyse n'est pas applicable aux systèmes lipidiques du fait de leur grande dynamique qui entraîne des fluctuations beaucoup trop importante pour que la RMSD soit instructive.

On utilise ainsi pour les systèmes de phospholipides, la stabilisation de l'aire moléculaire comme paramètre pour l'évaluation de l'équilibre d'un système.

#### **3.2. Validation du protocole de dynamique moléculaire par rapport aux données expérimentales**

De même, une série de paramètres calculés doit idéalement être comparée à des observables expérimentaux, afin de s'assurer d'une corrélation satisfaisante entre le calcul et l'expérimental. La validation de la pertinence de la simulation est un préalable nécessaire avant l'analyse des paramètres

d'intérêt, à partir desquels des conclusions sur le comportement du système étudié pourront être élaborées. Nous allons comparer les isothermes obtenues par simulation avec l'isotherme expérimentale de référence.

### **3.3. Analyse des dynamiques moléculaires**

Les propriétés structurales des systèmes de bicouche ou monocouche de lipides couramment analysées sont des données macroscopiques telles que l'aire moléculaire, la densité électronique, la distribution radiale des lipides, le paramètre d'ordre... La méthode de calcul de chaque analyse sera détaillée dans chacune des parties résultats.

Les données issues des simulations de dynamique moléculaire ont été traitées au moyen des outils d'analyses de GROMACS, les systèmes et trajectoires ont été visualisés avec le logiciel de visualisation VMD [Humphrey *et al.* 1996].

### **3.4. Aire moléculaire et isotherme de compression**

L'aire moléculaire  $A$  est définie par l'aire disponible pour un lipide.

Elle fait partie des propriétés structurales les plus employées dans la caractérisation des phospholipides pour une phase donnée [Leekumjorn and Sum 2007a]. Ce paramètre est couramment utilisé pour évaluer l'équilibration des simulations de systèmes de bicouches ou monocouches lipidiques [Poger and Mark 2010 ; Hennere *et al.* 2009 ; Siu *et al.* 2008 ; Mohammad-ghaie *et al.* 2010 ; Skibinsky *et al.* 2005]. L'aire moléculaire est obtenue par le rapport de la surface du système, divisée par le nombre de molécules de lipides présents par monocouche.

Les isothermes de compression permettent d'évaluer l'évolution de l'aire moléculaire en fonction de la variation de pression de surface. Le calcul de l'aire moléculaire moyenne pour chaque dynamique à différentes pressions de surface permet de retracer une isotherme simulée.

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées sur 200 ns au total. Le suivi de l'évolution de l'aire moléculaire au cours de la trajectoire, montre une fluctuation importante qui se stabilise après 50 ns et permet donc de déterminer un temps d'équilibration minimum de 50 ns. Ainsi, toutes les analyses ont été faites sur les 150 dernières ns des trajectoires.

L'isotherme de compression permet de suivre l'évolution de la pression de surface  $\pi$  au sein de la monocouche en fonction de la diminution de l'aire moléculaire  $A$ . Nous noterons les isothermes de compression : isotherme  $\pi$ - $A$ , ou simplement isotherme. Ces valeurs fournissent des indications sur le comportement des lipides soumis à une compression et caractérisent chaque type de lipide. En effet,

la compression du film de phospholipide à température constante permet de reproduire les changements d'état de phase, caractérisés par des changements structuraux et organisationnels des lipides composant la monocouche.

L'isotherme des DPPC est la plus étudiée et les transitions de phase y sont les plus caractéristiques [Kaganer *et al.* 1999]. L'isotherme de POPC ne présente pas les mêmes pentes que l'isotherme de DPPC et sa composition mixte en acides gras entraîne un comportement particulier. En effet, la présence d'une chaîne insaturée entraîne un désordre dans les chaînes qui abaisse considérablement la température de transition à 268 K [J. Seelig and Waespe-sareevit 1978] au lieu de 314 K pour les DPPC. Les POPC sont donc en phase liquide-cristal de 268 K à 343 K [Lafleur *et al.* 1990]. Cet état rend les mesures à température expérimentale (293 K) plus délicates que pour des lipides comme DPPC ayant les deux chaînes identiques et saturées. Cette absence d'ordre rend également difficile les observations par diffraction et peu de données sont accessibles pour les POPC.

L'étude par simulation de dynamique moléculaire des monocouches de POPC soumises à compression latérale a donc pour objectif d'apporter une vision à l'échelle moléculaire des propriétés structurales et organisationnelles de ces lipides au sein de la monocouche.

Afin de valider les modèles de monocouches obtenus par simulation DM, nous avons calculé l'aire moléculaire à chaque pression de surface (7,5, 10, 15, 20, 30, 40, 43 mN/m) afin de tracer les isothermes simulées et de les comparer à l'isotherme expérimentale.

### 3.5. Profils de densité électronique

Le calcul de la densité électronique définit le nombre moyen d'électron d'un système par unité de volume et selon un axe prédéfini. Également mesurable expérimentalement par diffraction des rayons X, la densité électronique permet une représentation de la distribution des atomes du système.

Dans le cas d'un système eau/monocouche lipidique/vide, l'axe  $z$  est choisi afin d'approcher la distribution des atomes dans l'interface.

Connaissant le nombre d'électron par atome, le programme va calculer la densité partielle d'électron le long de l'axe  $z$  et cette valeur pourra être moyennée sur la trajectoire. Le système est divisé en tranches de surface  $xy$  et d'épaisseur  $dz$ , définie par l'utilisateur. Notre système de 150 Å de haut a été divisé en 300 tranches de 0,5 Å d'épaisseur chacune. Il est alors possible de suivre la distribution de tous les atomes du système et de les visualiser par groupe d'atomes : têtes polaires, POPC entiers, chaînes hydrophobes, etc. Une augmentation de l'amplitude des pics correspond à une augmentation de la densité électronique alors qu'un élargissement des pics signifie une distribution des atomes plus large en  $z$ .

La densité électronique est calculée par le programme *g\_density* de GROMACS.

### 3.6. Angle d'inclinaison du glycérol, des têtes polaires et des chaînes hydrophobes

Le glycérol constitue le groupement central des glycérophospholipides. Composé d'un squelette à 3 carbones, il relie la tête polaire, composée du groupement phosphate et choline, d'une part (sur son C1), et les deux chaînes hydrophobes d'autre part (C2 et C3). Il apparaît évident que son orientation a une influence importante sur l'orientation de ces deux parties des glycérophospholipides.

L'angle d'inclinaison du glycérol est défini par l'angle mesuré entre la normale à la surface de l'eau et le vecteur C1-C3 reliant le premier et le dernier atome de carbone du glycérol.

Un angle proche de  $0^\circ$  signifie que le vecteur C1-C3 du glycérol est perpendiculaire à la monocouche, et un angle de  $90^\circ$  signifie qu'il en est parallèle (Figure V-6).

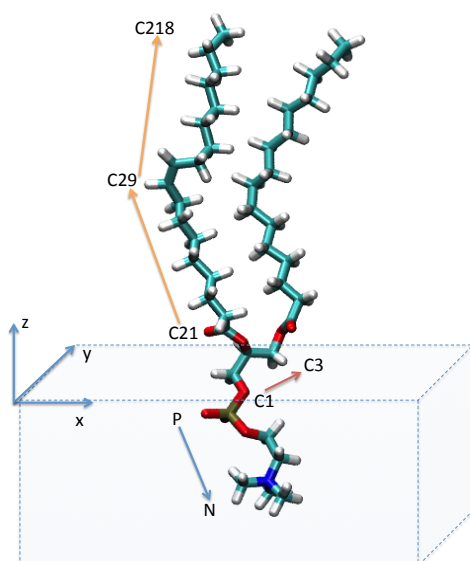
La tête polaire des POPC est un groupement zwitterionique, portant un moment dipolaire le long du vecteur P-N, reliant les atomes de phosphore et d'azote. Les interactions électrostatiques sont, avec les interactions hydrophobes, les composantes de la force de cohésion entre les lipides et l'orientation des têtes polaires est responsable du potentiel électrostatique de la monocouche. De plus, selon un modèle de *packing* de lipides développé à la fin des années 1970, l'orientation des têtes polaires par rapport à l'interface influence l'inclinaison des chaînes hydrophobes [Nagle 1976 ; McIntosh 1980].

L'angle d'inclinaison des têtes polaires est défini par l'angle entre la normale à la surface de l'eau et le vecteur P-N. Un angle de  $90^\circ$  signifie que le vecteur PN est parallèle à la monocouche, alors qu'un angle supérieur à  $90^\circ$  signifie que le vecteur est orienté perpendiculairement à la monocouche, le groupement choline pointant vers le solvant (Figure V-6).

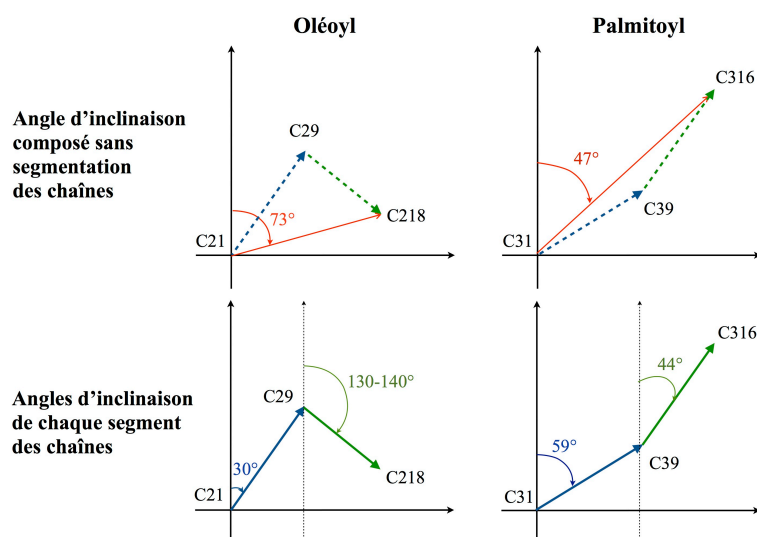
Les chaînes hydrophobes d'acides gras oléoyle et palmitoyle sont branchées, respectivement, aux carbones 2 (sn-2) et 3 (sn-1) du glycérol par une liaison ester. Les interactions interchaînes sont la composante principalement observée dans l'étude des transitions de phases des lipides. En effet, les chaînes hydrophobes sont plus sensibles à la température que les têtes. C'est pourquoi les changements de phases sont principalement causés par des changements de conformation et d'orientation des chaînes alkyles. La présence de l'insaturation entre les carbones 9 et 10 de la chaîne oléoyle entraîne une grande flexibilité permettant parfois des repliements de la chaîne. La définition de l'angle d'inclinaison des chaînes entre la normale à la surface de l'eau et un vecteur reliant les premiers carbones des chaînes aux derniers n'est pas pertinente. Nous avons donc considéré 2 angles d'inclinaison par chaîne : un premier avant l'insaturation entre les premiers carbones et le carbone 9 de chaque chaîne et un second vecteur reliant le carbone 9 au dernier carbone de chaque chaîne (Figure V-7).



Un angle d'inclinaison de  $0^\circ$  correspond à des chaînes perpendiculaires à la monocouche, un angle proche de  $90^\circ$  correspond à des chaînes couchées sur la monocouche (Figure V-6).



**Figure V-6** –Représentation des vecteurs utilisés pour les calculs d'angle d'inclinaison : en bleu, le vecteur des têtes polaires, en rouge le vecteur du glycérol, en oranges les vecteurs des chaînes alkyles



**Figure V-7** –Angles d'inclinaison des chaînes carbonées des acides gras utilisés dans les calculs

Toutes les analyses d'angle d'inclinaison ont été réalisées avec le programme *g\_bundle* de GROMACS.

### 3.7. Paramètre d'ordre des chaînes lipidiques $S_{CD}$

Les monocouches (et les bicouches) lipidiques sont considérées comme un liquide cristallin, état intermédiaire entre solide cristal et liquide.

Les lipides sont répartis sans ordre comme dans un liquide mais leur caractère amphiphile leur permet de se maintenir orientés (par rapport à l'interface) comme dans un cristal. Les têtes polaires sont enfouies dans l'eau alors que les chaînes hydrophobes s'orientent dans la phase air de manière plus ou moins coordonnée. On parle alors d'ordre d'orientation des chaînes palmitoyle et oléoyle dans la monocouche, qui peut être estimé par le paramètre d'ordre.

Les états de phases sont alors caractérisés par un ordre particulier : les lipides sont moins ordonnés dans l'état liquide-expansé que dans un état liquide-condensé, où le paramètre d'ordre sera plus élevé.

Il est mesuré expérimentalement par spectroscopie RMN du deutérium tenant compte de l'orientation des vecteurs carbone-deutérium (CD) le long de la chaîne hydrocarbonée par rapport à un axe de référence.

Le paramètre d'ordre est calculé selon l'équation suivante :

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (\text{V-3})$$

où  $\theta$  est l'angle entre l'axe de référence, la normale à la surface de la monocouche et le vecteur CD.

Les crochets indiquent que cette valeur est moyennée sur le temps et pour toutes molécules de lipides.

Le paramètre d'ordre peut varier entre 1 (les lipides sont tous alignés perpendiculairement à la monocouche) et  $\frac{1}{2}$  (les lipides sont tous parallèles à la monocouche). Une valeur nulle indique une orientation isotropique, où aucune direction n'est privilégiée.

Afin de calculer le paramètre d'ordre des monocouches aux différentes pressions de surface, j'ai utilisé le programme *g\_order* de GROMACS.

### 3.8. Fonction de distribution radiale

Pour décrire la position moyenne des particules en solution, il est possible d'utiliser la fonction de distribution radiale (en anglais « *radial distribution function* », RDF), le cas particulier qui nous

intéresse étant le calcul normalisé par paires (*pair distribution function*)  $g_{AB}(r)$  entre deux particules  $A$  et  $B$ , décrite par l'équation suivante :

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (V-4)$$

Avec :

$\langle \rho_B(r) \rangle$  densité des particules de type  $B$  à une distance  $r$  autour des particules  $A$

$\langle \rho_B \rangle_{local}$  densité des particules de type  $B$  moyennées sur toutes les sphères autour de  $A$

Cette fonction représente la probabilité de trouver une particule  $A$  à la position  $i$  et une particule  $B$  à la position  $j$ , séparée par une distance  $r_{ij}$ . En pratique, l'espace est discrétisé en intervalle  $dr$  et  $g_{AB}(r)$  est tracée sous forme d'histogramme correspondant à la densité de particule  $B$  dans les écorces à la distance  $r$  et d'épaisseur  $dr$  autour des particules  $A$  et moyennée sur la durée de la trajectoire.

Dans le cas d'une molécule solvatée, les pics de RDF décrivent la structure des couches de solvation ou de coordination autour de la particule  $A$ . L'intégration de  $g_{AB}(r)$  permet d'obtenir le nombre moyen d'atomes  $B$  présents à une distance  $r$  de  $A$  et d'en déduire les nombres de coordination ou de solvation. Ainsi, l'hydratation des têtes polaires est quantifiée par la distribution radiale des atomes d'oxygène des molécules d'eau (Ow) autour des atomes de phosphore (P) et d'azote (N) des têtes polaires.

Egalement mesurable expérimentalement par diffraction aux rayons X, la fonction de distribution radiale permet également de caractériser les propriétés structurales d'un milieu, gaz, solide ou liquide plus particulièrement. Un gaz n'est caractérisé par aucune structure ordonnée, même locale, du fait de sa composition en molécules largement séparées les unes des autres et présentant une très faible densité. Un solide présente un degré d'ordre très élevé voire proche 1 dans le cas d'un cristal solide. L'immobilité des molécules permet de prédire la localisation des molécules du solide à partir de la position d'une molécule (ou d'un atome) et des paramètres de symétrie du cristal. L'état liquide est un état intermédiaire caractérisé par des molécules entourées de voisines en mouvement, permettant la formation d'un ordre local. Cet ordre se caractérise par le nombre moyen des plus proches voisins, des seconds plus proches voisins et ainsi de suite, pour chaque molécule ou atome du liquide.

La distribution radiale des lipides sur le plan  $xy$  permet d'évaluer l'ordre à grande distance au sein de la monocouche. Les chaînes hydrophobes étant particulièrement flexibles, nous avons choisi de ne considérer que les hétéroatomes de la tête polaire dans le calcul de la distribution radiale. J'ai utilisé au cours de mes travaux le programme  $g\_rdf$  de GROMACS pour réaliser toutes les analyses de distribution radiale.

### 3.9. Distribution des angles dièdres des têtes polaires et des chaînes hydrophobes

L'analyse des dièdres des têtes polaires permet d'apporter d'avantage de précision sur la flexibilité et l'orientation de ces groupements. Nous avons considéré les quatre dièdres localisés entre l'oxygène reliant le glycérol au groupement phosphate et l'azote de la choline. Les angles dièdres sont définis par les vecteurs C1O11 et PO12, O11P et O12C11, PO12 et C11C12, O12C11 et C12N.

Les angles dièdres sont considérés comme *cis* entre  $-30^\circ$  et  $+30^\circ$ , *gauche+* entre  $30^\circ$  et  $90^\circ$ , *gauche-* entre  $-90^\circ$  et  $-30^\circ$  et *trans* pour les angles supérieurs à  $150^\circ$  et inférieurs à  $-150^\circ$ .

La distribution des angles dièdres est calculée sur tous les lipides, de  $-180$  à  $+180^\circ$ , à la pression de surface d'équivalence monocouche-bicouche de valeur  $30 \text{ mN/m}$  [A. Seelig 1987 ; Chiu *et al.* 1995 ; Feller and Pastor 1999 ; Blume 1979].

La conformation des chaînes hydrophobes est habituellement étudiée pour comprendre les transitions de phase des phospholipides. En effet, les chaînes sont considérées comme les acteurs principaux responsables des changements structuraux des systèmes lipidiques [Murzyn *et al.* 2001 ; Leekumjorn and Sum 2007c ; Israelachvili and Mitchell 1975]. L'analyse des dièdres des chaînes alkyles permet une étude approfondie de leur conformation. Pour chaque chaîne, nous avons considéré les 13 dièdres de la chaîne palmitique et les 15 dièdres de la chaîne oléique.

Dans un premier temps, nous avons étudié la distribution totale des dièdres de chaque chaîne pour les 7 pressions de surface étudiées. Dans un deuxième temps, nous avons calculé la distribution angulaire pour chaque dièdre le long de chaque chaînes à une pression de  $30 \text{ mN/m}$ , valeur de pression de surface considérée comme valeur d'équivalence entre les monocouche et les bicouches.

La fonction *g\_angle* de GROMACS permet de calculer la distribution des valeurs d'angle dièdre au cours du temps et sur la totalité des lipides.

L'angle dièdre existant entre 4 atomes A, B, C, D consécutifs est calculé entre 2 vecteurs définis par les atomes AB et CD. Par convention, l'angle *cis* correspond à AB et CD orientés dans le même sens, et un angle *trans* correspond à AB et CD orientés dans des sens opposés.

### 3.10. Analyse infographique

L'observation des trajectoires à chaque pression de surface a permis de montrer un changement d'organisation de la monocouche au cours de la compression. Une diminution de la surface occupée par les lipides, accompagnée d'un ordonnancement des chaînes hydrophobes ont pu être mis en

évidence. Nous avons suivi l'évolution des systèmes de monocouche au cours de la trajectoire avec le logiciel de visualisation VMD.

### 3.11. Influence de la taille du système

Nous avons souhaité évaluer l'influence de la taille du système sur les résultats des nos simulations. Pour cela nous avons construit une monocouche de POPC 4 fois plus grande. La petite monocouche (*mnc*) a été répliquée dans le plan *xy* pour former une grande monocouche (*mnc4x*) composée de 132 molécules de POPC par feuillet.

Etant donné l'augmentation conséquente de la taille des systèmes à simuler, nous avons d'abord effectué nos calculs à la pression d'équivalence monocouche/bicouche, 30 mN/m et à 300 K. L'aire moléculaire à 40 mN/m a été obtenue mais la comparaison des deux systèmes *mnc* et *mnc4x* s'est faite à 30 mN/m sur la série d'analyses suivante :

- Aire moléculaire et allure de l'isotherme,
- Densité électronique,
- Inclinaison PN et glycérol,
- Paramètre d'ordre,
- Inclinaison et angles dièdres des chaînes hydrophobes.

### 3.12. Influence du champ de force

Rappelons que GAFF et CHARMM sont les principaux champs de force « tout-atome » utilisés pour la simulation des lipides [Klauda *et al.* 2010]. CHARMM ayant été paramétré directement à partir de molécules de lipides nous avons souhaité comparer les résultats obtenus à partir d'un champ de force général et un champ de force spécialisé.

Les paramètres et topologies GAFF ont été convertis au format *Charmm27* et *Charmm36* à l'aide de scripts de conversion développés à cet effet (langage *Bash* et *Awk*).

Nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire avec le grand système de monocouche *mnc4x* et reproduit les principales analyses conduites sur ce même système avec le champ de force GAFF. En suivant les mêmes paramètres de dynamique moléculaire que ceux décrits précédemment, nous avons réalisé des simulations à 300 K avec les champs de force CHARMM *c27*, premier champ de force adapté aux lipides [Feller and Mackerell 2000] et *c36*, dérivé du précédent et optimisé pour les simulations de bicouches lipidiques [Klauda *et al.* 2010].

---

# Chapitre VI.

## RESULTATS

*L'objectif de ces travaux est d'apporter des éléments pour comprendre l'organisation et les propriétés structurales des monocouches de POPC. Nous avons réalisé pour cela des simulations de dynamique moléculaire pour approcher à un niveau moléculaire les changements structuraux de lipides organisés en monocouche à l'interface eau/vide. Ces lipides sont soumis à une compression latérale variable pour mettre en évidence les éventuels changements conformationnels et d'organisation des POPC en monocouche.*

*Le développement de ces simulations s'est fait de façon parallèle à des expériences réalisées par le groupe du Pr Rosilio concernant la compression de monocouches de POPC en balance de Langmuir qui permettent de mesurer les variations de pression de surface en fonction de la variation d'aire moléculaire, sous le nom d'isotherme de compression. Cette courbe est propre à chaque type de lipide et permet de caractériser le comportement de ces lipides en monocouche.*

*Nous avons enfin tenté de reproduire l'isotherme expérimentale, en simulant la monocouche à sept pressions de surface : 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 et 43 mN/m.*

*Les changements structuraux mis en évidence seront comparés avec les données de la littérature ou résultant d'expérimentation et relatives à la simulation des monocouches. La pression de surface d'équivalence entre monocouche et bicouche étant définie aux alentours de 30mN/m, les résultats obtenus ici pour des monocouches seront également discutés en regard des données de la littérature concernant les bicouches.*

*Dans cette partie, la comparaison des isothermes simulées et expérimentale sera présentée comme élément de validation des simulations. Une analyse de l'organisation globale de la monocouche sera ensuite discutée. Enfin, l'analyse de l'orientation des têtes polaires sera détaillée, suivie d'une analyse conformationnelle des chaînes hydrophobes et l'observation d'une ségrégation des chaînes au sein de la monocouche sera également présentée.*

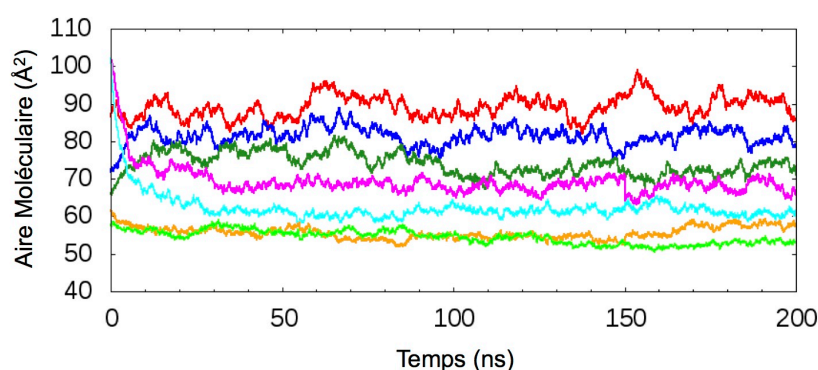
# 1. Equilibration des systèmes

La simulation de la dynamique des systèmes modélisés consiste en l'attribution de vitesses sur les atomes. Connaissant les coordonnées de la structure de départ, l'intégration par itération des équations au mouvement permet d'accéder à la dynamique du système.

La répartition homogène des vitesses nécessite un certain temps pour s'établir sur l'ensemble des atomes du système. Ce temps, entre l'assignation initiale des vitesses et l'équilibration du système peut être très variable et ne correspond pas à un état représentatif des conditions de simulation. L'analyse des simulations ne peut donc se faire que sur la partie « équilibrée » de la trajectoire.

L'énergie totale de même que l'énergie cinétique et l'énergie potentielle sont toutes stables au cours des trajectoires (Annexe 1). Cependant, comme déjà évoqué dans le chapitre précédent, l'aire moléculaire est le paramètre préférentiellement utilisé pour évaluer l'équilibre des systèmes de monocouches.

Nous avons suivi de l'évolution de l'aire moléculaire au cours de 200 ns de trajectoire. Les aires moléculaires pour toutes les pressions de surface sont reportées sur la Figure VI-1.



**Figure VI-1** – Evolution de l'aire moléculaire au cours des trajectoires pour différentes pressions de surface : 7,5 mN/m (rouge), 10 mN/m (bleu), 15 mN/m (vert foncé), 20 mN/m (magenta), 30 mN/m (cyan), 40 mN/m (orange) and 43 mN/m (vert clair).

L'aire moléculaire fluctue de manière importante au cours de la trajectoire et se stabilise après 50 ns. L'évolution des aires moléculaires et leur valeur moyenne pour chaque pression de surface, sont reportées sur l'Annexe 2.

Le temps nécessaire à l'équilibration est considérable mais pas surprenant pour des systèmes lipidiques. Le temps moyen d'équilibration des aires moléculaires est entre 20 et 50 ns [Mohammad-ghaie *et al.* 2010 ; Duncan and Larson 2008].

La déviation standard a été calculée sur les 150 dernières nanosecondes et varie entre 1 et 3 Å<sup>2</sup> selon la pression de surface appliquée. Ces valeurs sont comparables à celles d'autres simulations de dynamique moléculaire de bicouche de POPC [Lindahl and Edholm 2000 ; Jójárt and Martinek 2007] ou de monocouche de DPPC [Duncan and Larson 2008]. De plus, nous observons également, que l'ampleur des fluctuations de l'aire moléculaire varie de façon inversement proportionnelle à la pression de surface [Mohammad-ghaie *et al.* 2010].

### Synthèse de l'équilibration des systèmes de monocouche de POPC :

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées sur 200 ns au total. La stabilité de l'énergie au cours du temps permet de conclure à une bonne répartition des énergies. Le suivi de l'évolution de l'aire moléculaire au cours de la trajectoire, montre une fluctuation importante qui se stabilise après 50 ns et permet donc de déterminer un temps d'équilibration minimum de 50 ns. Ainsi, toutes les analyses ont été faites sur les 150 dernières ns des trajectoires.

## **2. Isotherme de compression et validation du protocole de DM**

Les isothermes  $\pi$ - $A$  simulées et expérimentale sont représentées sur la Figure VI-2. Les isothermes simulées montrent une bonne corrélation avec l'isotherme expérimentale.

Très expansée aux faibles pressions de surface (de l'ordre de 100 Å<sup>2</sup>), l'aire moléculaire diminue sous l'effet de l'augmentation de la pression de surface. Pendant la compression, la monocouche passe dans un état condensé jusqu'à atteindre une aire moléculaire minimale de 50 Å<sup>2</sup> avant le collapse.

L'isotherme à 293 K démontre une bonne corrélation avec l'isotherme expérimentale, pour les pressions de 10 à 43 mN/m. De 15 à 43 mN/m, les pressions simulées sont légèrement inférieures à l'expérimental. Pour la pression de surface à 10 mN/m, l'aire moléculaire est légèrement au-dessus des valeurs expérimentales : 81 (+/- 2) Å<sup>2</sup> au lieu de 80 (+/-3,5) Å<sup>2</sup>.

Bien que les monocouches et les bicouches de lipides soient des systèmes différents, une pression de surface 30 mN/m est considérée dans la littérature comme la pression d'équivalence pour laquelle ces deux systèmes peuvent être comparés [Blume 1979 ; Marsh 1996]. A cette pression de surface, l'aire moléculaire calculée est de 59 (+/-1) Å<sup>2</sup>, valeur proche de la valeur expérimentale révélée dans la



---

littérature [Kucerka *et al.* 2005] et correspondant aux valeurs issues d'autres simulations de DM [Leekumjorn and Sum 2007a ; Hennere *et al.* 2009].

Ces observations nous permettent de conclure à une bonne corrélation de l'isotherme simulée à 293 K avec l'isotherme expérimentale mesurée à la même température.

L'isotherme à 300 K semble également présenter une bonne corrélation avec l'isotherme expérimentale, en particulier pour les pressions de 10 et 40 mN/m. Pour des pressions de surface les plus basses et les plus hautes, 7,5 et 43 mN/m, l'aire moléculaire est légèrement au dessus des valeurs expérimentales : 90 (+/- 3) Å<sup>2</sup> au lieu de 84 (+/-2) Å<sup>2</sup> à 7,5 mN/m et 54 (+/-1) Å<sup>2</sup> au lieu de 51 (+/-3) Å<sup>2</sup> à 43 mN/m.

A 30 mN/m, l'aire moléculaire calculée est de 61 (+/-1) Å<sup>2</sup> contre 62 (+/-3) Å<sup>2</sup> mesurés sur l'isotherme référence mais cette valeur reste proche de la valeur expérimentale de la littérature [Kucerka *et al.* 2005] et correspondant aux valeurs issues de simulations DM [Leekumjorn and Sum 2007a ; Hennere *et al.* 2009].

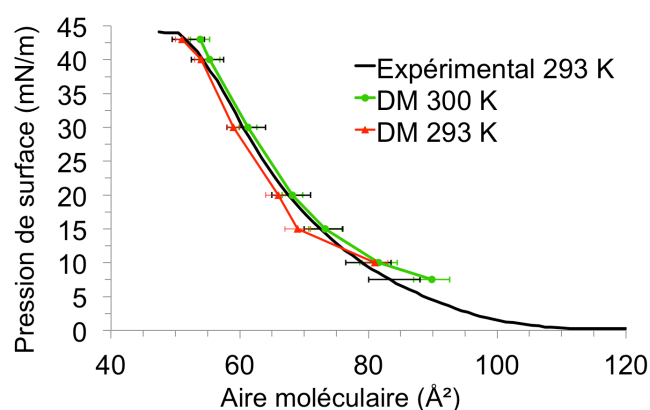
Ces observations nous permettent de conclure à une bonne corrélation de l'isotherme simulée à 300 K avec l'isotherme expérimentale mesurée à 293 K.

Comparons maintenant les deux isothermes simulées à 293 K et 300 K.

L'allure générale de ces isothermes est proche et parallèle à l'isotherme expérimentale. Les isothermes simulées présentent une déviation attendue : l'isotherme à 300 K est décalée vers des aires moléculaires plus grandes alors que l'isotherme calculée à température plus basse est décalée vers des aires plus petites.

L'effet de la température est également visible sur les fluctuations des aires moléculaires qui sont plus grandes à 300 K qu'à 293 K. En effet, les déviations standard à 300 K oscillent entre 2 et 3 Å<sup>2</sup> alors qu'elles ne sont que de 1 à 2 Å<sup>2</sup> à 293 K.

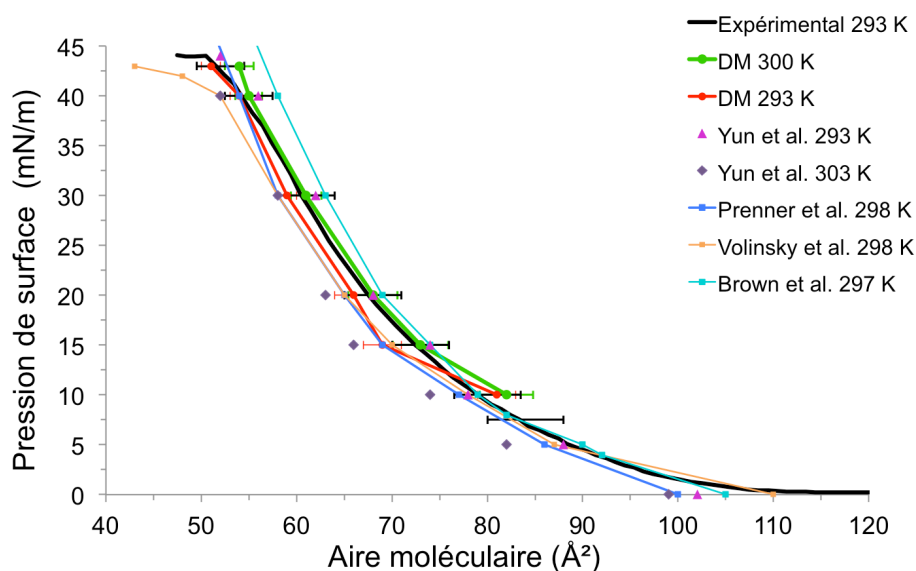
Considérant les déviations standard de chaque isotherme, le décalage des aires moléculaires entre 300 K et 293 K est compris dans les valeurs de fluctuation. Nous pouvons donc conclure qu'une différence de température de 7 K n'est pas significative pour l'isotherme de POPC. Une étude précédente par DM avait proposé pour la bicouche de POPC que les changements de conformation significatifs intervenaient à des températures proches de la température de transition, autour de 270 K [Leekumjorn and Sum 2007a].



**Figure VI-2** – Comparaison des isothermes simulées avec l'isotherme expérimentale de référence

La comparaison d'isothermes expérimentales mesurées à différentes températures révèle la difficulté à caractériser avec précision le comportement des monocouches de POPC.

Nous avons reporté sur la Figure VI-3 des isothermes expérimentales relevées dans la littérature et concernant des monocouches de POPC. Ces isothermes ont été obtenues dans des conditions très similaires à l'isotherme expérimentale de référence mesurée à 293 K par le groupe du Pr Rosilio : compression continue, sur balance de Langmuir, mesure de la tension de surface avec lame de Wilhelmy, eau pure utilisée comme sous-phase et chloroforme comme solvant de dépôt.



**Figure VI-3** – Comparaison d'isothermes expérimentales issues de la littérature à l'isotherme expérimentale de référence obtenue par le groupe du Pr Rosilio utilisée ici et aux isothermes simulées.

Pour une même température de 293 K, Yun *et al.* [Yun *et al.* 2003] obtiennent une isotherme très proche de l'isotherme de référence (Pr Rosilio). Ces auteurs ont également fait une mesure à 303 K, pour laquelle ils obtiennent une isotherme présentant la même allure mais décalée vers les petites aires. Ce décalage est surprenant dans la mesure où une augmentation de la température devrait entraîner une augmentation des aires moléculaires.

Prenner *et al.* [Prenner *et al.* 2007] ont mesuré une isotherme à 298 K dont l'allure générale est plus proche de l'isotherme à 300 K de Yun que de celle à 293 K, mais présente également ce décalage vers les petites aires plutôt que vers les grandes aires.

Bien que la sous-phase utilisée par Volinsky *et al.* [Volinsky *et al.* 2012] soit un tampon phosphate salin, alors que Prenner *et al.* utilisent l'eau pure, leurs isothermes obtenues à 298 K sont comparables. Leur allure diffère des isothermes obtenues par Yun *et al.* à 300 K pour les pressions de surface inférieures à 20 mN/m.

Enfin, l'isotherme obtenue par Brown *et al.* [Brown and Brockman 2007] à 297 K présente une allure particulière mais la composition de la sous-phase n'est pas clairement précisée.

La comparaison des isothermes expérimentales est délicate, malgré des conditions expérimentales très similaires. Les données de la littérature montrent que les isothermes à 298 K ou 300 K sont légèrement plus décalée à gauche que l'isotherme de référence mesurée à 293 K. Cette observation est inattendue : une augmentation de la température devrait conduire à des aires moléculaires plus grandes du fait de l'augmentation de l'agitation thermique. Ces résultats semblent refléter un faible effet de la température sur les isothermes entre 293 K et 300 K.

Cette variabilité expérimentale qui rend la comparaison calcul / expérimental délicate a également été observée et longuement discuté dans les travaux de Duncan & Larson sur les monocouches de DPPC [Duncan and Larson 2008].

Enfin, la déviation standard des aires moléculaires, qui ont conduit à l'isotherme expérimentale de référence et aux isothermes simulées, montre des déviations de 1 à 4 Å<sup>2</sup> (Tableau VI-1). En comparant ainsi les valeurs d'aires moléculaires, expérimentale et simulées, nous pouvons conclure à un recouvrement des trois valeurs. A 30 mN/m, l'aire moléculaire expérimentale est de 62 (+/-3) Å<sup>2</sup>, alors que l'aire calculée à 293 K est de 59 (+/-1) Å<sup>2</sup> et celle calculée à 300 K est de 61 (+/-1) Å<sup>2</sup>.

Compte tenu du recouvrement des déviations standard expérimentales et simulées, nous pouvons conclure à une différence non significative des trois isothermes présentées sur la Figure VI-2.

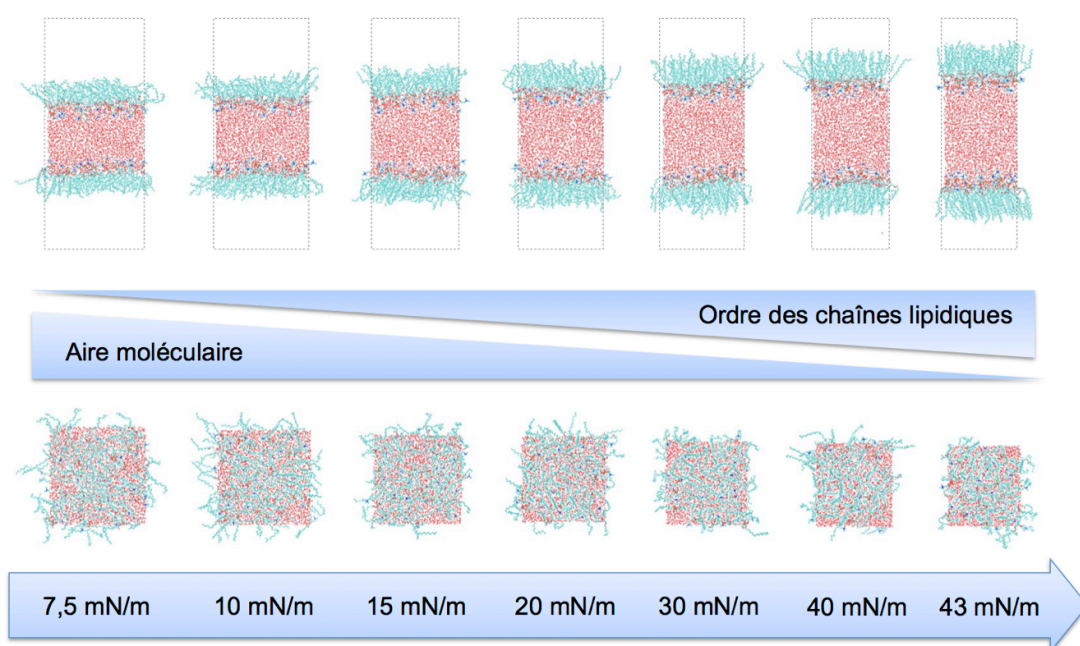
Pression de surface (mN/m)	Aire moléculaire expérimentale	Aire moléculaire simulée	Aire moléculaire simulée
	à 293 K (Å <sup>2</sup> )	à 293 K (Å <sup>2</sup> )	à 300 K (Å <sup>2</sup> )
7,5	84 (+/- 4)		90 (+/- 3)
10	80 (+/- 3.5)	81 (+/- 2)	82 (+/- 2)
15	74 (+/- 3)	69 (+/- 2)	73 (+/- 3)
20	68 (+/- 3)	66 (+/- 2)	68 (+/- 2)
<b>30</b>	<b>62 (+/- 3)</b>	<b>59 (+/- 1)</b>	<b>61 (+/- 1)</b>
40	55 (+/- 2.5)	54 (+/- 1)	55 (+/- 2)
43	51 (+/- 2.5)	51 (+/- 1)	54 (+/- 2)

**Tableau VI-1** – Aires moléculaires mesurées et calculées à différentes pressions de surface

Afin de visualiser la structure des monocouches le long de l'isotherme, des vues latérales et de dessus des systèmes modélisés sont représentées sur la Figure VI-4.

Les instantanés ont été pris à la fin des dynamiques aux sept tensions de surface. Cette figure illustre clairement l'influence de la pression de surface sur l'aire moléculaire et l'ordre des chaînes lipidiques. La diminution des dimensions  $x$  et  $y$  est clairement visible avec la compression. Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'épaisseur de la couche d'eau, qui passe de 2 nm à 4 nm. La monocouche étant simulée en NP $\gamma$ T, le nombre de particules est constant. La surface de la monocouche diminuant avec l'augmentation de la pression de surface, l'épaisseur de la couche d'eau augmente pour conserver le nombre de particule constant.

L'ordre dans les chaînes lipidiques augmente également de façon significative avec l'augmentation de la pression de surface. Cette augmentation est accompagnée d'une augmentation de l'épaisseur apparente de la couche de lipides.



**Figure VI-4** – Instantanés montrant l’organisation des monocouches de POPC après 200 ns de dynamique moléculaire à 300 K et à différentes pressions de surface. En haut sont représentés les systèmes symétriques en vue latérale et en bas, les mêmes systèmes en vue de dessus, avec en rouge les molécules d’eau, en cyan les lipides et en bleu foncé l’azote des têtes polaires

#### Synthèse sur les isothermes de compression obtenues par simulation

Nous avons simulé une monocouche de POPC à sept pressions de surface croissante afin de reproduire une isotherme de compression.

Deux températures ont été utilisées. Nous avons choisi la température 293 K afin de comparer directement notre isotherme avec l’isotherme expérimentale.

Or, la compression en balance de Langmuir ne permet pas l’accès à des informations structurales au niveau moléculaire, comme le permet les analyses de dynamiques moléculaires.

De plus, compte tenu de la nature mixte des chaînes POPC, les données structurales issues de l’expérimental et des simulations sont rares. Les quelques paramètres structuraux déterminés expérimentalement, tels que le paramètre d’ordre des POPC obtenu pour les bicouches, ont été obtenus à des températures proches de 300 K [J. Seelig and Waespe-sareevit 1978], température à laquelle la plupart des études de systèmes lipidiques par simulation de DM ont été faites [Jórárt and Martinek 2007 ; Hennere *et al.* 2009]. Ainsi, afin de faciliter la comparaison de nos résultats de simulation obtenus ici avec les données de la littérature, nous avons choisi de faire les analyses de conformations des lipides à partir de nos simulations à 300 K.

De plus, les aires moléculaires calculées sont très fluctuantes (de 1 à 3 Å<sup>2</sup>), de même que les déviations expérimentales: de 2 à 4 Å<sup>2</sup>. Compte tenu de ces déviations, nous avons conclu à une influence non significative d'une différence de 7 K de la température sur les isothermes de POPC calculées.

La bonne corrélation entre la simulation et l'expérimental constitue une première validation de la méthodologie et du protocole de simulation de DM utilisés ici, qui permettent de reproduire de manière satisfaisante une isotherme expérimentale de monocouche de POPC.

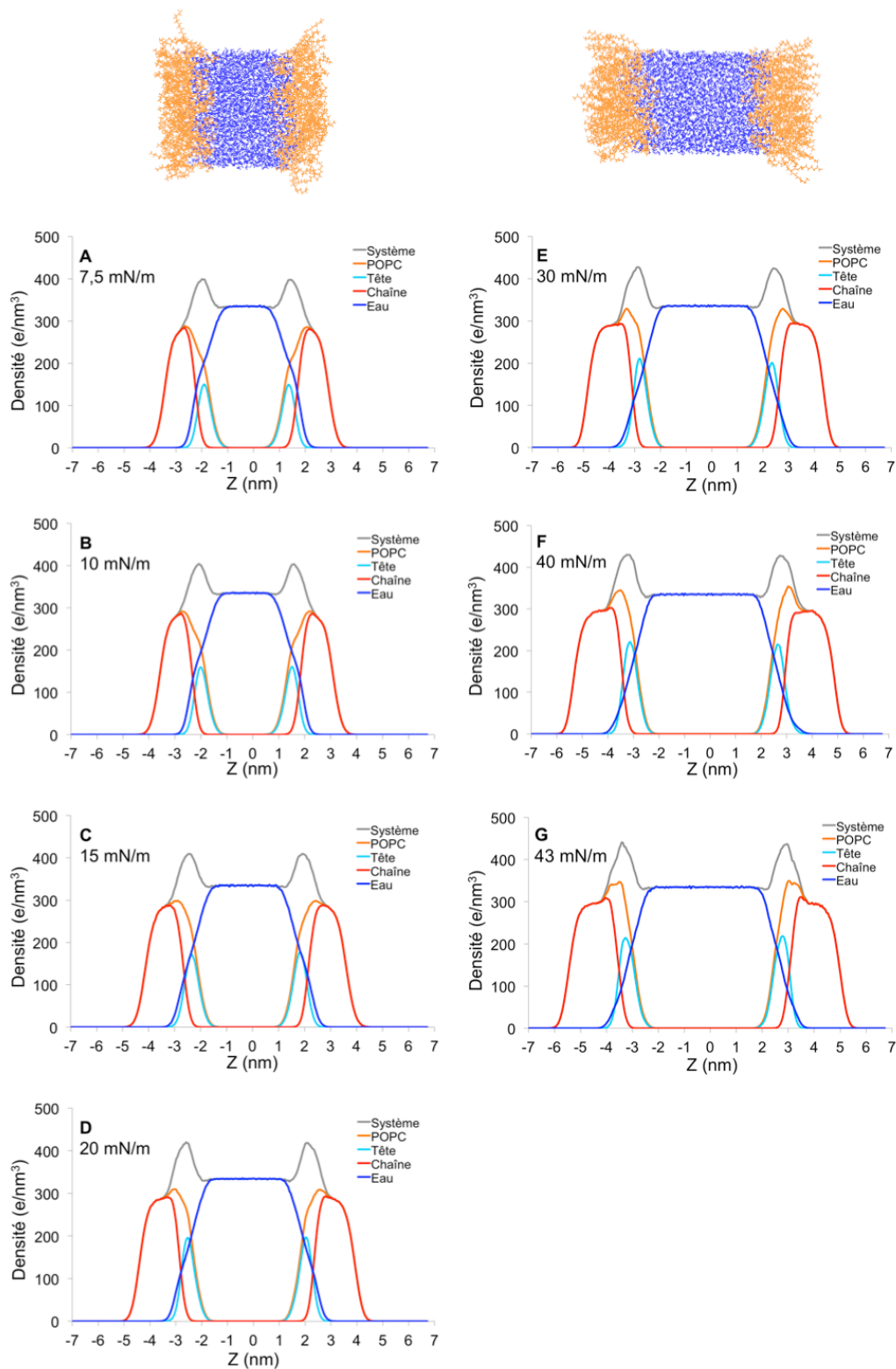
### **3. Propriétés macroscopiques et organisationnelles**

Les modèles simulés sont évalués selon plusieurs propriétés macroscopiques : l'aire moléculaire, la densité électronique et l'ordre à grande distance.

L'isotherme de compression a montré une réponse organisationnelle de la monocouche en fonction de la pression de surface. Or, l'organisation collective des lipides est responsable du comportement de la monocouche au niveau macroscopique. Nous proposons donc de descendre graduellement dans l'étude des lipides organisés en monocouche avec une étude de l'organisation globale des lipides au sein de la monocouche, avant d'entrer dans une exploration structurale et conformationnelle des phospholipides de la monocouche.

Le calcul de la densité électronique permet une cartographie des différents composants de la monocouche en fonction de l'axe z alors que le calcul de la distribution radiale des têtes lipidiques va permettre un aperçu de l'organisation des lipides sur le plan xy de l'interface.

Les profils de densité électronique calculés pour chaque pression sont reportés sur la Figure VI-5. L'évolution régulière de la distribution des atomes de l'interface par rapport à la variation de pression de surface est clairement visible.



**Figure VI-5** – Profil de densité électronique aux différentes pressions de surface. En gris le pic global du système, en bleu l’eau, en orange les POPC, en rouge les chaînes hydrophobes et en cyan les têtes polaires

La distribution des atomes peut être facilement repérée. Le pic gris englobe tous les atomes sans notion de groupe.

Deux distributions orange correspondant aux POPC encadrent le bloc d'eau central. Les POPC sont divisés en deux parties distinctes, les têtes polaires en bleu clair et les chaînes hydrophobes en orange. Les têtes hydrophiles sont entièrement solvatées, ainsi que le début des chaînes alkyles. La densité des têtes polaires augmente avec la pression, traduisant leur rapprochement sous l'effet de la compression. La diminution de la surface des monocouches avec la compression est accompagnée d'une augmentation de l'épaisseur de la couche d'eau et du décalage des monocouches de manière symétrique de part et d'autre de la couche d'eau.

L'augmentation de l'amplitude des pics « POPC » et des pics « système » est principalement due à la contribution des densités électroniques de têtes polaires qui passent de 150 e/nm<sup>3</sup> à 210 e/nm<sup>3</sup>.

Un élargissement du pic « POPC » est également remarquable et est principalement dû à une distribution plus large des chaînes hydrophobes en z. Cet élargissement de la distribution peut être attribué à l'extension des chaînes qui passent de ~2 nm à ~3 nm.

Une décomposition plus fine de la partie hydrophobe des POPC permet de distinguer la distribution des deux chaînes hydrophobes palmitoyle et oléoyle en orange et vert, respectivement et de leurs méthyles terminaux magenta et bleu respectivement (Figure VI-6).

La distribution des chaînes hydrophobes s'élargit sous l'effet de la compression traduisant une élongation des chaînes en z, qui peut entraîner une augmentation de l'ordre des chaînes lipidiques.

Une analyse plus fine des groupes d'atomes des chaînes hydrophobes montre que l'amplitude des pics des chaînes est plus grande pour l'oléoyle que pour la palmitoyle et cette différence augmente sous l'effet de la compression.

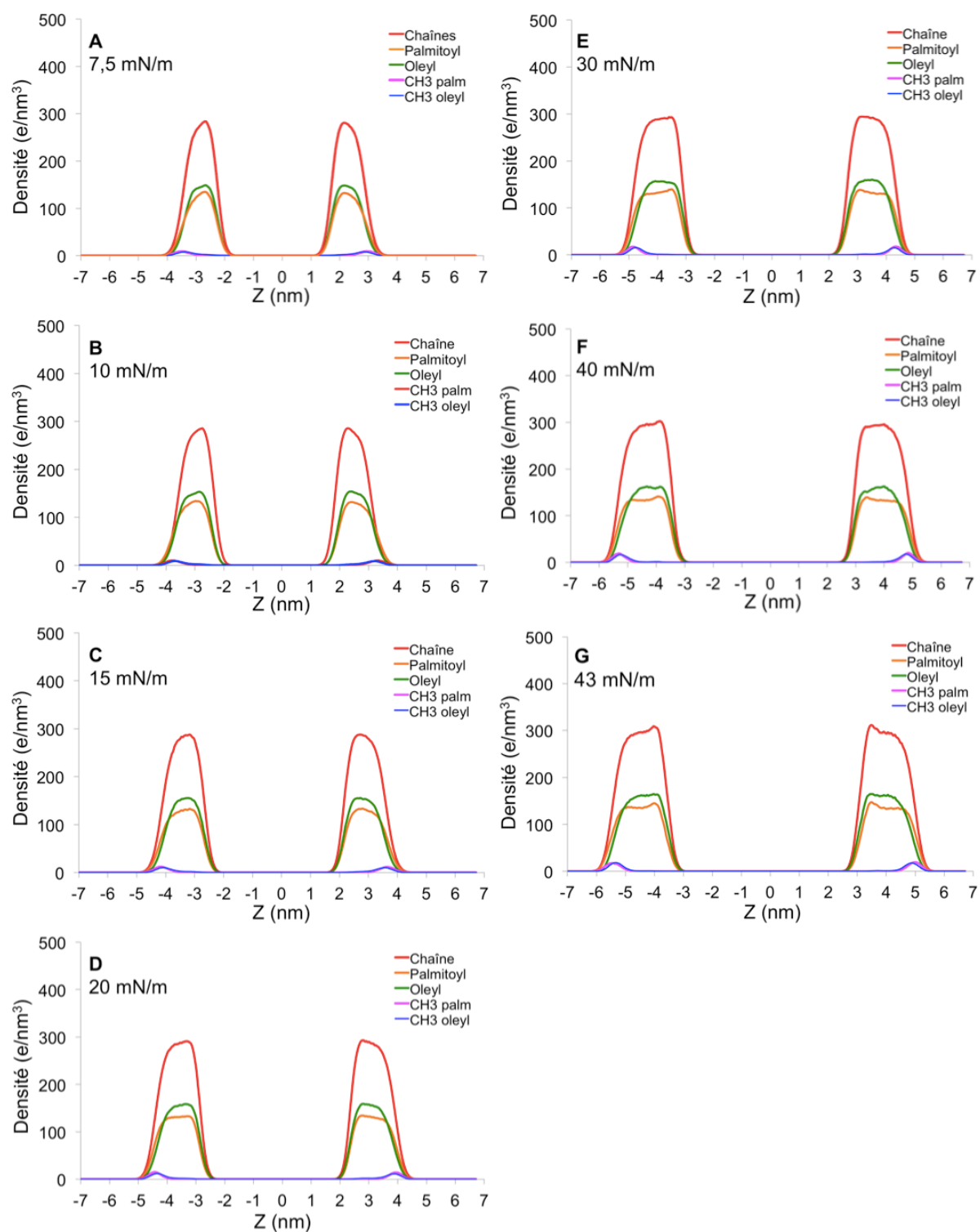
L'amplitude des profils de densité de la chaîne oléoyle est plus grande que pour la chaîne palmitoyle.

La largeur des pics est également différente pour les deux chaînes et l'écart augmente avec la pression.

La chaîne palmitoyle présente une distribution plus étalée le long de z caractérisant des chaînes plus allongées. La présence de l'insaturation sur la chaîne oléoyle pourrait expliquer cette différence. Elle entraînerait davantage de repliement des chaînes en z, d'où une distribution moins étalée mais plus dense. Aux basses pressions, les deux chaînes sont désordonnées et potentiellement repliées. Aux hautes pressions, l'ordre augmente et la chaîne palmitoyle présente moins de repliements que la chaîne oléoyle.

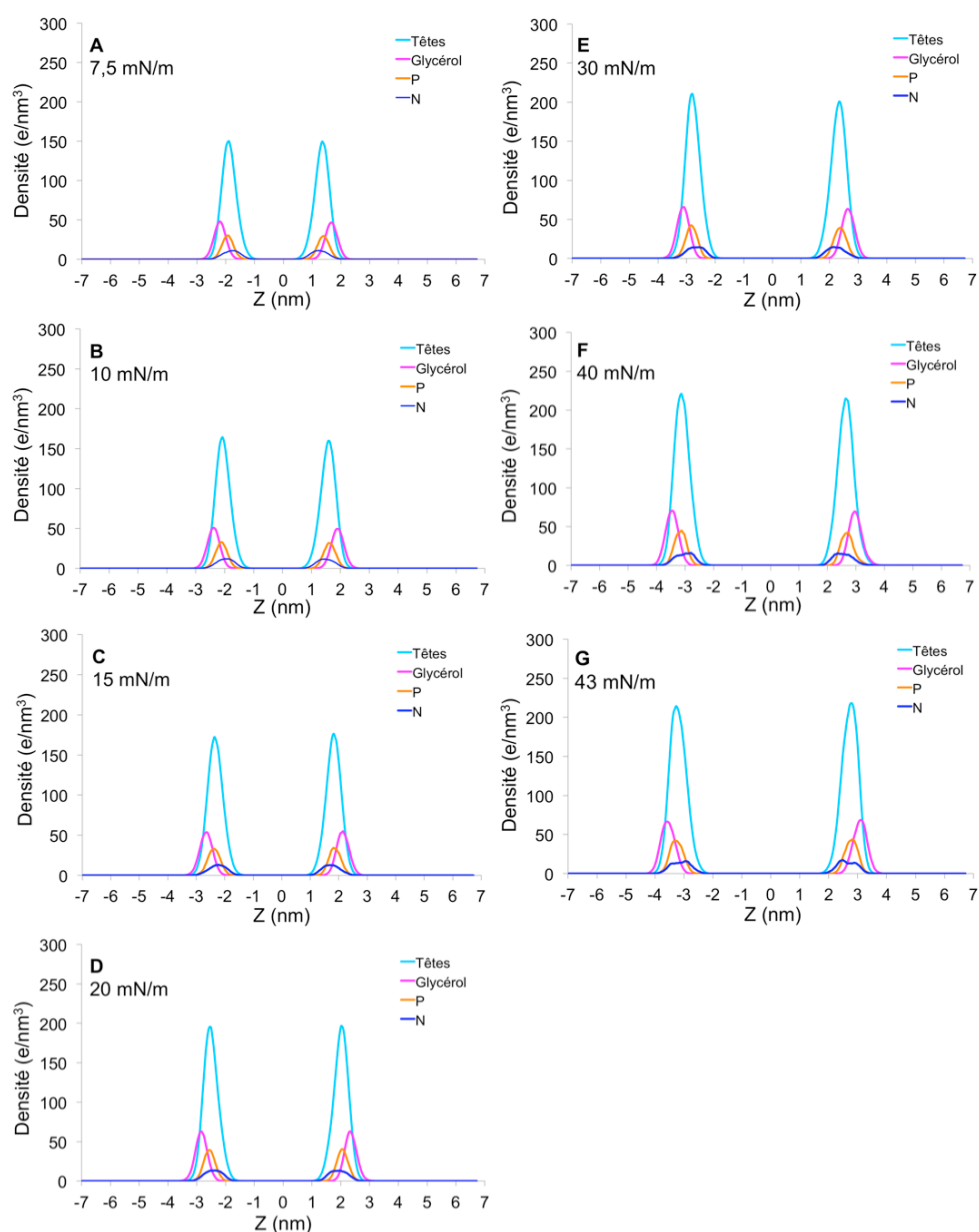
Les profils de densité des carbones terminaux des deux chaînes confirment l'hypothèse de davantage de repliements pour la chaîne oléoyle : les pics de densité des CH<sub>3</sub> oléiques sont décalés vers les têtes polaires alors que les pics des CH<sub>3</sub> palmitiques sont bien à l'extrémité des chaînes.





**Figure VI-6** – Profils de densité électronique des chaînes hydrophobes. En jaune les pics globaux des chaînes, en vert et vert foncé les chaînes palmitoyl et oléoyl, et leurs méthyles terminaux rose et violet respectivement

Nous avons remarqué l'augmentation de l'amplitude des pics de densité des têtes polaires au cours de la compression. Cette observation traduit la mise à niveau des têtes polaires dans le plan des monocouches. Une analyse plus détaillée de la distribution des atomes des têtes polaires permet de distinguer le groupement glycérol en magenta de l'atome de phosphore en orange et de l'atome d'azote de la choline en bleu foncé (Figure VI-7).



**Figure VI-7** – Profils de densité électronique des têtes polaires. En jaune les pics globaux des chaînes, en vert et vert foncé les chaînes palmitoyle et oléoyle, et leurs méthyles terminaux rose et violet respectivement

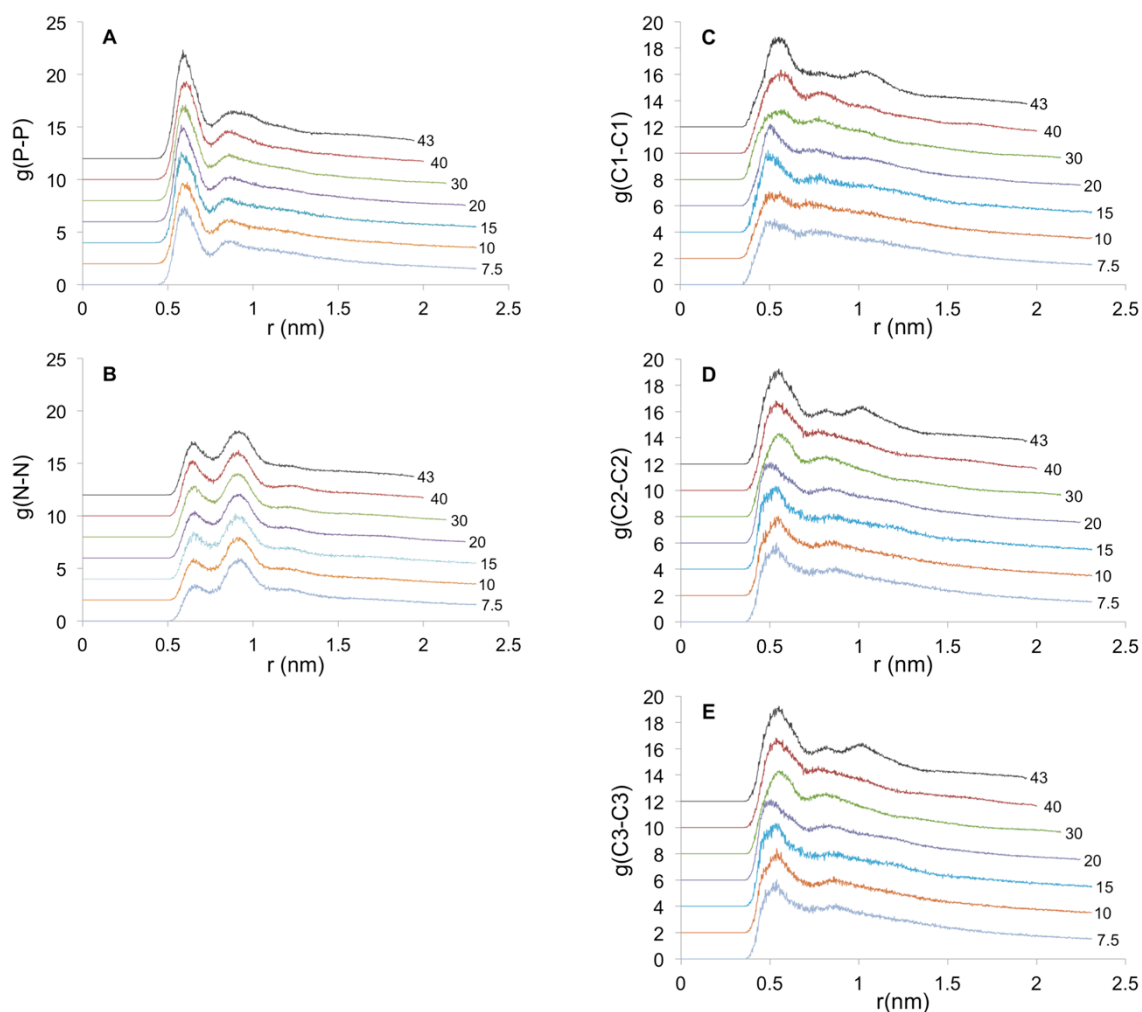
La contribution majeure à cette augmentation est due au phosphore dont l'amplitude passe de 30 à plus de 40 e/nm<sup>3</sup>. L'amplitude du pic augmente avec la compression et traduit le rapprochement des têtes polaires sous l'effet de la pression de surface.

La largeur ne varie pas beaucoup et permet de supposer une distribution large (10 Å) des atomes de phosphores selon  $z$ .

L'amplitude des pics de l'azote augmente sensiblement jusqu'à 40 mN/m. La largeur des pics augmente de 1 à 1,5 nm, avec un dédoublement du pic à 43 mN/m. La distribution des azotes du groupement choline est donc dispersée selon  $z$ , avec potentiellement deux populations préférentielles.

L'amplitude du pic du groupement glycérol augmente également avec la pression, traduisant le rapprochement des lipides entre eux, et sa largeur passe de 1 à 1,5 nm. Cette distribution plus large en  $z$  peut caractériser une distribution moins plane des glycérol ou une diminution de l'inclinaison du groupement par rapport à  $z$ .

Les distributions radiales autour des atomes de phosphore, d'azote et des 3 carbones du glycérol à chaque pression de surface sont reproduites sur la Figure VI-8.



**Figure VI-8** – Distributions radiales des atomes de phosphore (A), d’azote (B), carbone C1 du glycérol (C), carbone C2 du glycérol (D) et carbone C3 du glycérol (E).

L’ordre à grande distance ne peut pas être caractérisé par les atomes de la tête polaire.

Le groupement glycérol étant la partie la moins flexible des phospholipides, les distributions radiales sont davantage représentatives de l’ordre des lipides organisés en monocouche. Les distributions des 3 carbones sont équivalentes. Pour les pressions de surface de 7,5 à 40 mN/m, les distributions ne présentent qu’un seul pic distinct. Seule la pression à 43 mN/m permet de voir une 2<sup>e</sup> puis une 3<sup>e</sup> sphère de carbone voisins, qui traduirait un début d’ordre à grande distance. L’ordre à grande distance caractérise les phases condensées. Il semble donc qu’une pression de 43 mN/m induise un début de condensation de la monocouche de POPC qui reste en phase liquide-expansée sur la majeure partie de la compression.

### Synthèse des propriétés macroscopiques et organisationnelles

L'analyse de l'isotherme avait montré une variation de l'aire moléculaire en fonction de la compression. Plus la pression latérale est forte, moins la tension de surface est élevée, plus l'aire occupé par les lipides est faible. A l'inverse, moins la compression est forte, plus la tension de surface au sein de la monocouche est forte, plus les lipides occupent de surface.

Ces variations d'aire moléculaire sont souvent attribuées aux seules conformations des chaînes.

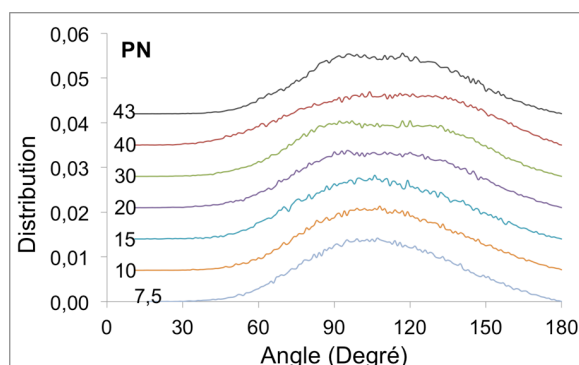
La distribution électronique des atomes autour de l'interface a montré que l'adaptation de l'organisation de la monocouche de POPC an fonction de la variation de pression dépend à la fois des chaînes mais aussi des têtes polaires. De plus, le comportement des chaînes palmitoyle et oléoyle semble être différent.

La distribution radiale des atomes de carbone du glycérol a montré que la monocouche de POPC reste en phase liquide-expansée tout au long de la compression et ne montre un début d'ordre à grande distance qu'à la pression la plus élevée, proche du collapse.

## 4. Etude conformationnelle des têtes polaires- Orientation des têtes polaires

Les distributions angulaires de l'inclinaison du vecteur PN à chaque pression de surface sont reportées sur la Figure VI-9. Pour plus de clarté, les courbes ont successivement été décalées de 0,07 en y.

Les distributions sont larges avec un maximum centré autour d'une valeur d'angle d'inclinaison de 110° et une largeur à mi-hauteur d'environ 60°. Le vecteur PN peut donc adopter des orientations radicalement différentes. Le groupement choline peut être soit orienté vers les chaînes lipidiques quand l'angle d'inclinaison est compris entre 45° et 80°, soit parallèle à la monocouche pour des valeurs d'angle entre 80° et 110°, ou encore orienté vers le solvant quand l'angle est compris entre 120° et 180°.



**Figure VI-9** – Distribution des angles d'inclinaison des vecteurs PN pour différentes pressions de surface

Les histogrammes de distribution sont très similaires pour les faibles pressions de surface de 7,5 à 15 mN/m. Les angles d'inclinaison s'étendent de 45° à 170° pour atteindre une population maximum à environ 110°. Aux basses pressions, la majorité des vecteurs PN est orientée parallèlement à la surface de l'eau. Au dessus de ces pressions, les distributions s'élargissent et deux populations de distributions similaires apparaissent clairement centrées sur 90° et 130° à 20 mN/m. Une deuxième orientation apparaît avec un groupement choline pointant davantage vers le solvant. Pour une pression de surface de 30 mN/m, la distribution s'élargit vers les grands angles, indiquant une augmentation de l'inclinaison des vecteurs PN sous l'effet d'une augmentation de la pression de surface.

A 40 mN/m, la distribution se décale encore vers les grands angles, avec une population maximum à 140° et qui semble être davantage peuplée que la distribution autour de 90°. A 43 mN/m, pression du collapsus, la distribution se resserre autour de 110°.

L'inclinaison autour de 90° est proche des valeurs de la littérature qui décrit un vecteur PN orienté de façon presque parallèle à la surface de la bicouche de POPC [Buldt and Wohlgemuth 1981 ; Poger *et al.* 2010 ; Leekumjorn and Sum 2007a]. La population à 130° indique quant à elle la présence d'une population supplémentaire correspondant à des vecteurs PN plongeant leur groupement choline dans le solvant.

Nous avons aussi analysé la distribution angulaire des vecteurs PN au cours de la simulation à 30 mN/m (Annexe 3). Les résultats mettent en évidence une fluctuation importante des distributions au cours de la trajectoire. De même, l'analyse de l'orientation de 4 vecteurs PN choisis au hasard dans la monocouche montre une évolution rapide en fonction du temps.

La distribution des angles d'inclinaison à des temps donnés ainsi qu'au cours du temps montre des fluctuations importantes des angles, avec des temps de résidence de plusieurs dizaine de nanosecondes, confirmant l'existence de plusieurs populations dans la distribution angulaire.

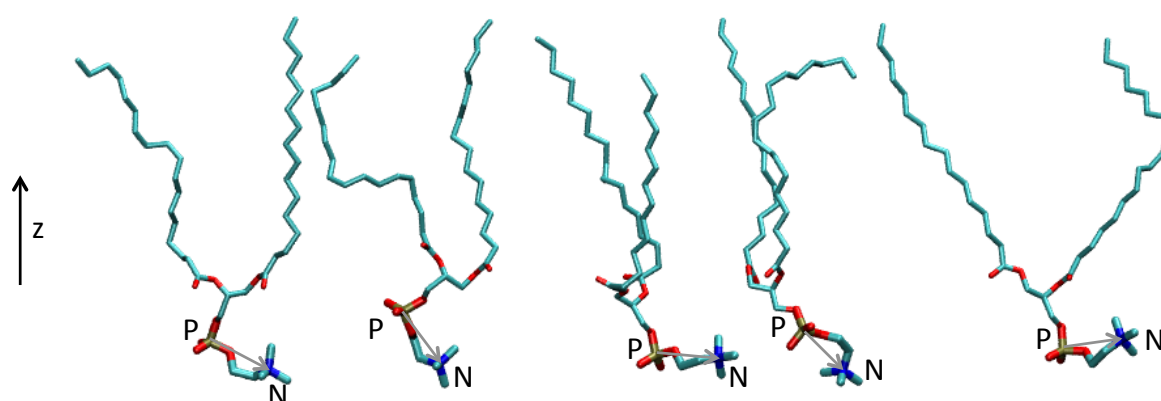
La question d'une distribution bimodale du vecteur PN des phosphatidylcholines a déjà fait l'objet de précédentes études expérimentales [Buldt *et al.* 1979 ; Brumm *et al.* 1994] et de simulations de DM [Shushkov *et al.* 2010 ; Mohammad-agmaie *et al.* 2010]. Les données expérimentales de diffraction de Rayons-X, spectroscopie RMN et diffraction de neutrons concernant l'orientation des têtes polaires par rapport à l'interface sont contradictoires [A. Seelig and Seelig 1977 ; Buldt *et al.* 1979 ; Brumm *et al.* 1994 ; Ma and Allen 2006]. Brumm *et al.* ont étudié l'orientation des têtes polaires des DPPC en monocouche en fonction d'une variation de pression de surface par réflexion de neutron. Ces derniers ont montré que le vecteur PN était préférentiellement parallèle à l'interface en phase liquide-expansée et s'orientait perpendiculairement en phase liquide-condensée. Le vecteur PN peut adopter deux orientations différentes selon l'état de compression de la monocouche. Ce comportement en réponse à

une augmentation de la pression de surface est comparable à nos observations. Aux faibles pressions, l'aire moléculaire est large et permet aux vecteurs PN d'adopter une orientation majoritairement parallèle à l'interface. Pour des pressions plus élevées, 20 mN/m dans notre cas, les vecteurs s'orientent perpendiculairement à l'interface en réponse à la diminution de l'aire moléculaire. Ce phénomène corrobore l'observation de Shushkov qui a montré une tendance du vecteur PN à s'orienter perpendiculairement par rapport à la monocouche de DPPC pour des aires moléculaires faibles [Shushkov *et al.* 2010].

Or la transition de phase LE-LC n'est pas observée pour la monocouche de POPC. Nous avons cependant observé une coexistence des deux types d'orientations. Au vu des histogrammes de distributions, les populations sont équivalentes aux pressions de 20 et 30 mN/m. L'orientation préférentielle à 130° n'est observée que pour les fortes compressions (40 mN/m). La distribution à 43 mN/ est à considérer avec précaution étant donné sa proximité avec le collapsé.

#### Synthèse sur l'orientation des vecteurs PN

Nous avons montré une distribution bimodale de l'orientation du vecteur PN par rapport à la surface de la monocouche (Figure VI-10). Ces résultats confirment l'existence d'une orientation perpendiculaire du vecteur PN par rapport à la surface de la monocouche. Nous avons montré la coexistence de cette orientation avec l'orientation parallèle plus connue pour les systèmes bicouche. Il ne semble pas y avoir d'orientation unique à basse pression ou LE et à haute pression ou LC pour POPC. L'orientation pointant le groupement choline vers le solvant, serait cependant préférentiellement adoptée en réponse à une augmentation de pression de surface ou une diminution de l'aire moléculaire (ou en serait l'origine). Si l'orientation de la tête influence l'inclinaison des chaînes hydrophobes [Nagle 1976 ; McIntosh 1980], on pourrait penser que l'orientation perpendiculaire du vecteur PN sera accompagnée de leur redressement.



**Figure VI-10** – Différentes orientations du vecteur PN

## 5. Etude conformationnelle des têtes polaires- Dièdres des têtes polaires

Afin de vérifier l'existence d'une orientation prépondérante du vecteur PN perpendiculaire à la surface de la monocouche, nous avons souhaité approfondir l'étude de la conformation des têtes polaires, en analysant les dièdres des têtes polaires. Cette analyse permet d'apporter davantage de précision sur la flexibilité et l'orientation de ces groupements.

Les distributions des angles dièdres PO12C11C12 et O12C11C12N des têtes polaires à 30 mN/m sont présentées sur la Figure VI-11.

On observe deux populations, une *gauche* centrée sur  $-75^\circ$  et  $+75^\circ$ , et l'autre *trans* centrée sur  $-180^\circ$  et  $+180^\circ$  (Figure VI-11 C et D). Le dièdre PO12C11C12 est majoritairement en conformation *trans* alors que le dièdre O12C11C12N présente davantage de défauts *gauche*.

La distribution du dièdre C1O11PO12 montre deux maxima centrés en  $-120^\circ$  et  $+120^\circ$  mais aussi une population entre ces deux valeurs (Figure VI-11 A). Ce dièdre n'adopte jamais de conformation *trans* et sa distribution est restreinte entre  $-150^\circ$  et  $+150^\circ$ . Il peut prendre toutes les valeurs d'angle entre  $-150^\circ$  et  $+150^\circ$ , en passant par des configurations *gauche* et *cis*.

Le dièdre O11PO12C11 montre quant à lui une distribution restreinte définie entre  $-60^\circ$  et  $+60^\circ$  (Figure VI-11 B). Elle présente deux maxima centrés sur  $-40^\circ$  et  $+40^\circ$ , ainsi qu'une population entre ces deux valeurs. Ce dièdre n'adopte jamais une conformation *trans*. Il oscille entre des conformations *gauche* – et *gauche* + et avec une prédominance des conformères *gauche* par rapport aux conformations *cis*.



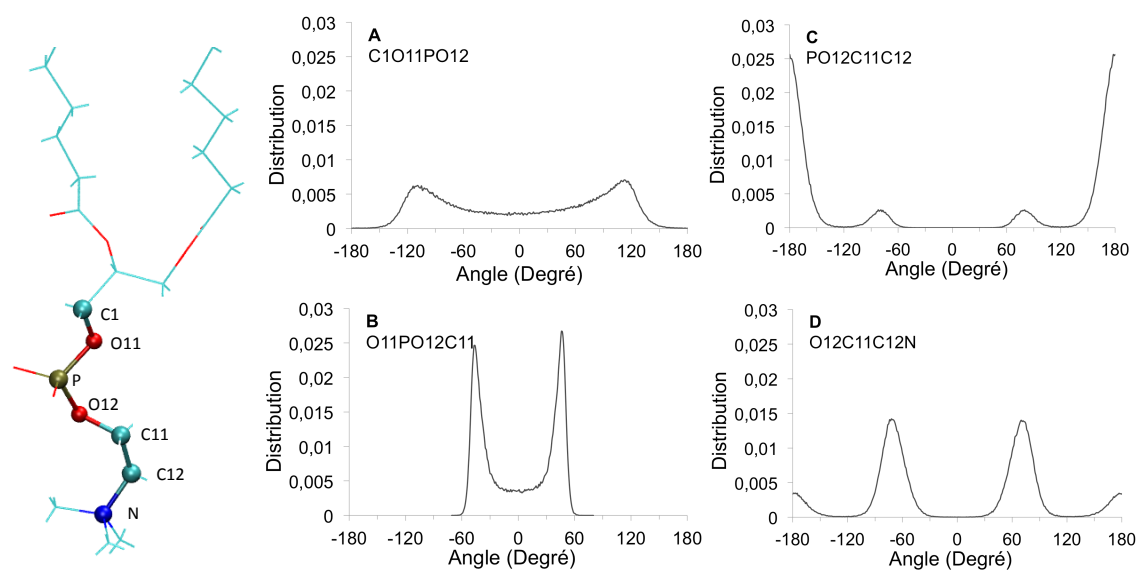


Figure VI-11 – Distribution des angles dièdres des têtes polaires à 30 mN/m

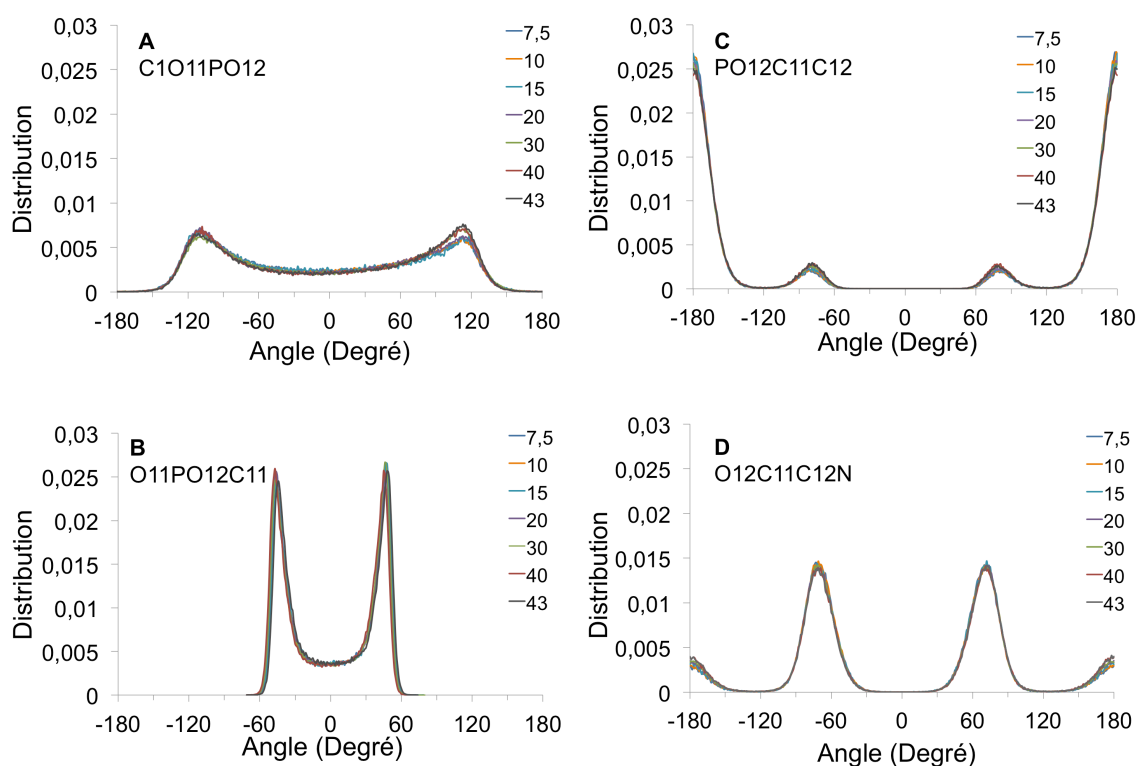


Figure VI-12 – Distribution des angles dièdres pour différentes pressions de surface

Ces distributions sont en accord avec les résultats obtenus par Robinson *et al.* pour les DMPC en monocouche [Robinson *et al.* 1994]. En effet, les auteurs ont également attribué aux dièdres C1O11PO12 (Figure VI-12 A) et O11PO12C11 (Figure VI-12 B) une majorité de conformères *gauche* et une prédominance de conformères *trans* pour le dièdre PO12C11C12 (Figure VI-12 C). Akutsu *et al.* [Akutsu 1981] avait déterminé par spectroscopie Raman, que le dièdre O12C11C12N (Figure VI-12 D) était majoritairement de conformation *gauche*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus ici en DM.

L'analyse de la distribution des dièdres révèle que les torsions encadrant l'atome de phosphore ont une conformation restreinte, qui laisse supposer de leur implication dans l'orientation de la tête polaire.

De plus, l'analyse sur les sept pressions de surface ne montre qu'une très faible variation de leur distribution. La variation du dièdre C1O11PO12 pour les hautes pressions 40 et 43 mN/m est la seule visible. La distribution particulière des dièdres observée à ces pressions d'après la Figure VI-12 peut être attribuée à la variation de distribution du dièdre C1O11PO12.

Le dièdre C1O11PO12 peut adopter des conformations *cis* et  $\sim 120^\circ$  préférentiellement. Le dièdre O11PO12C11 adopte des conformations *cis* et *gauche* ( $40-60^\circ$ ) préférentiellement.

En listant les combinaisons possibles de ces deux dièdres, on peut conclure que plusieurs combinaisons de conformation peuvent conduire à la même orientation du vecteur PN. Les données obtenues par Brumm *et al.* [Brumm *et al.* 1994] pour la DPPC par réflexion de neutron ne leur avaient pas permis d'assigner le site de la rotation des têtes polaires avec exactitude mais les auteurs avaient déjà soupçonné l'implication de plusieurs liaisons dans le changement d'orientation de ces têtes. D'après des données de diffraction aux Rayons-X, ils avaient écarté l'implication de l'atome de phosphore et proposaient une localisation des torsions entre cet atome et le méthyle de la choline.

Inclinaison du vecteur PN résultante	C1O11PO12 ( $60^\circ-120^\circ$ ) – Trans	C1O11PO12 ( $-60^\circ$ à $60^\circ$ ) – Cis
O11PO12C11 $40^\circ-60^\circ$ – <i>gauche</i>	110°	110°
O11PO12C11 ( $-40^\circ$ à $40^\circ$ )– <i>cis</i>	90°	90°

Tableau VI-2 – Combinaison des angles dièdres

### Synthèse sur la conformation des têtes polaires

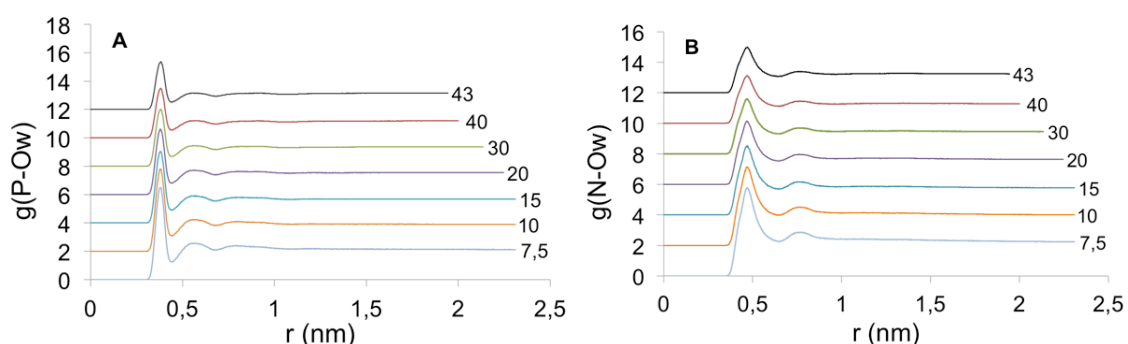
Nous supposons que les torsions autour de l'atome de phosphore étaient impliquées dans la flexibilité d'orientation du vecteur PN. L'analyse détaillée de ces dièdres a permis d'identifier les angles encadrant le phosphore présentant une distribution remarquable.

Les résultats que nous avons obtenus étant en accord avec de précédentes données expérimentales de la littérature, nous pouvons conclure que le comportement des têtes polaires a été correctement reproduit par DM.

La combinaison des distributions angulaires des dièdres permet d'identifier les angles encadrant le phosphore comme étant responsable de la torsion de la tête polaire.

## 6. Hydratation des têtes polaires

La distribution radiale des atomes d'oxygène des molécules d'eau autour de l'atome de phosphore  $g_{P-O_w}(r)$  et de l'atome d'azote  $g_{N-O_w}(r)$  est calculée pour chaque pression de surface (Figure VI-13)



**Figure VI-13** – Distribution radiale des atomes d'oxygène des molécules d'eau autour des atomes de phosphore (A) et d'azote (B)

La première sphère d'hydratation de l'atome de phosphore possède un rayon d'environ 4 Å, tandis que celle concernant l'atome d'azote est à environ 4,5 Å. L'atome de phosphore est donc plus accessible au solvant que l'atome d'azote. L'intégration de ces premiers pics qui permet le calcul du nombre de solvation montre que l'azote est davantage solvate que le phosphore (Tableau VI-3 et Figure VI-14). En effet, l'accessibilité de l'atome d'azote par les molécules d'eau est écartée par les groupements méthyles de la choline, qui est cependant davantage plongée dans le solvant.

A 30 mN/m de pression de surface, le nombre de molécules d'eau autour du phosphore et de l'azote de la tête polaire est respectivement de 5,4 et 20,9. Ces valeurs sont similaires aux valeurs issues de la littérature pour des bicouches de POPC à la même température [Hennere *et al.* 2009] ou à des températures voisines mais avec le même champ de force et le même modèle d'eau [Jójárt and Martinek 2007].

Pression de surface (mN/m)	Nombre de molécules d'eau autour des atomes :	
	P	N
7,5	6,2	23,6
10	6	23,1
15	5,8	22,3
20	5,6	21,9
30	5,4	20,9
40	5,2	20,1
43	5,1	19,7

Tableau VI-3 – Nombre d'hydratation des atomes de phosphore P et d'azote N

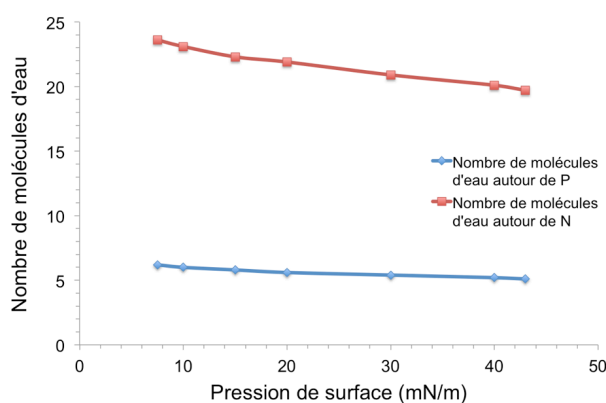


Figure VI-14 – Nombre d'hydratation des atomes de phosphore P et d'azote N

La comparaison des distributions montre une distribution similaire des molécules d'eau autour des tête polaire quelle que soit la pression de surface. Le calcul du nombre de solvatation révèle une

diminution sensible du nombre d'hydratation en fonction de l'augmentation de la pression de surface. Le pourcentage de diminution est identique pour les deux atomes observés.

La diminution du taux d'hydratation au cours de la compression est un phénomène déjà observé pour les monocouches de DPPC lors du passage de la phase liquide-expansée à liquide-condensée [Ma and Allen 2006]. Ces auteurs ont démontré une déshydratation des têtes polaires au cours de la compaction des lipides passant de LE à LC, sans changement d'orientation des vecteurs PN contrairement à d'autres travaux montrant une inclinaison de PN quasi perpendiculaire à l'interface en phase LC.

La diminution du nombre de solvation étant très faible au cours de la compression, nous l'attribuons à la flexibilité des POPC qui ne démontrent pas de transition de phase au cours de l'isotherme de compression. Si l'on tente de corrélérer les transitions de phase au taux d'hydratation des lipides, nous pouvons considérer que la déshydratation observée pour les POPC n'est pas assez importante pour induire un changement de phase.

#### Synthèse sur l'hydratation des têtes polaires

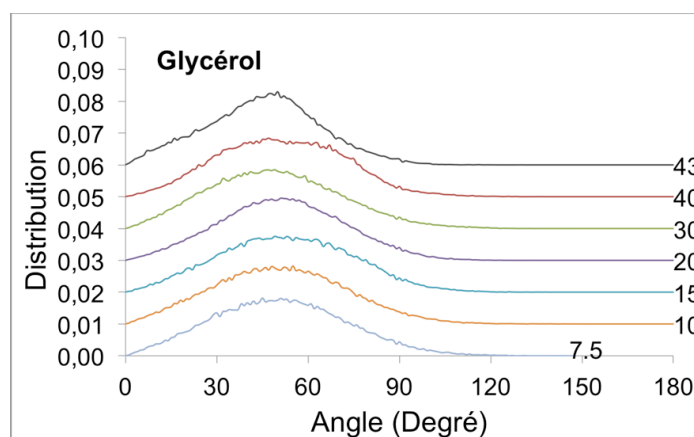
Nous avons montré un taux d'hydratation similaire à celui des POPC en bicouches. De même, nous avons observé une diminution, bien que sensible, de l'hydratation des têtes polaires au cours de la compression. Ces résultats sont en accord avec des données existantes pour les bicouches de POPC ou des monocouches de DPPC, ce qui nous laisse penser à une bonne reproduction de ce paramètre par nos simulations de DM. Les forces électrostatiques dépendent essentiellement des têtes polaires chargées et sont partiellement écrantées par les molécules d'eau avoisinantes. La diminution du nombre d'hydratation à mesure que la compression augmente favoriserait les énergies électrostatiques. Aux basses pressions, les charges des dipôles sont écrantées, permettant une distribution aléatoire de leur conformation. A des plus fortes pressions, elles sont moins écrantées, les dipôles s'organisent selon 2 conformations : une parallèle et l'autre perpendiculaire à l'interface, correspondant aux 2 populations distinguées sur la Figure VI-9.

## **7. Etude conformationnelle du glycérol**

Très peu d'études font état de l'inclinaison de cette partie des phospholipides. En effet, elle est considérée comme étant la partie la plus rigide des phospholipides [Buldt and Wohlgemuth 1981].

De plus les données obtenues à partir des cristaux de DMPC ont montré une orientation perpendiculaire à la surface [Pearson and Pascher 1979]. Cette observation a ensuite été étendue à l'ensemble des phosphocholines [Gennis 1989].

Les distributions des angles d'inclinaisons du glycérol selon la pression de surface sont représentées sur la Figure VI-15. Les courbes ont été décalées de une unité en y pour une meilleure lecture.



**Figure VI-15** – Distribution des angles d'inclinaison du glycérol pour différentes pressions de surfaces

Les distributions sont larges et globalement centrée sur 50°. Cette valeur est un peu différente de la valeur rapportée pour les bicouches de DPPC, où le glycérol est décrit perpendiculaire à la surface de la bicouche [Buldt and Wohlgemuth 1981 ; Gennis 1989].

Aux faibles pressions, les distributions vont de ~30° à 70° et s'élargissent jusqu'à 80° à 15 et 20 mN/m. Le glycérol tend à se coucher à la surface de la monocouche avec l'augmentation de la pression de surface. A plus haute pression, 30 mN/m, la population des petits angles augmente.

A 40 mN/m, la distribution s'élargit: la population des grands angles augmente à son tour alors qu'à 43 mN/m elle est particulièrement étroite autour de 50° et présente une population à 20°.

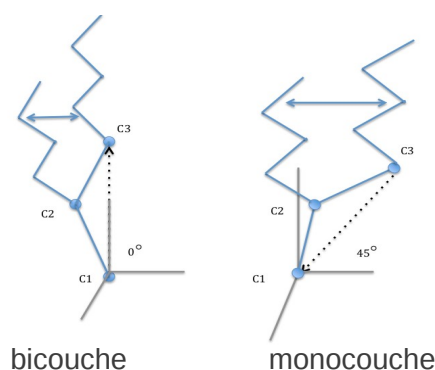
L'évolution de l'angle d'inclinaison du glycérol indique une adaptation importante selon la pression de surface. Il semblerait que le glycérol soit plus ou moins incliné par rapport à la normale à la monocouche selon la pression de surface et son inclinaison a tendance à diminuer aux fortes pressions.

#### Synthèse sur l'orientation du glycérol

Nous supposons que l'orientation du glycérol avait un impact sur l'orientation de la tête polaire et des chaînes hydrophobes, étant donnée sa position centrale dans la structure du POPC.

L'analyse détaillée de l'angle d'inclinaison du glycérol a permis de mettre en évidence une distribution large allant de  $20^\circ$  à  $80^\circ$ . Les distributions ont tendance à se décaler vers les petits angles avec l'augmentation de la pression de surface et montre un glycérol davantage incliné par rapport à la normale de la monocouche que dans la bicouche.

Cette orientation est supposée avoir un impact non négligeable sur l'organisation des chaînes hydrophobes, qui font l'objet des parties suivantes (Figure VI-16).



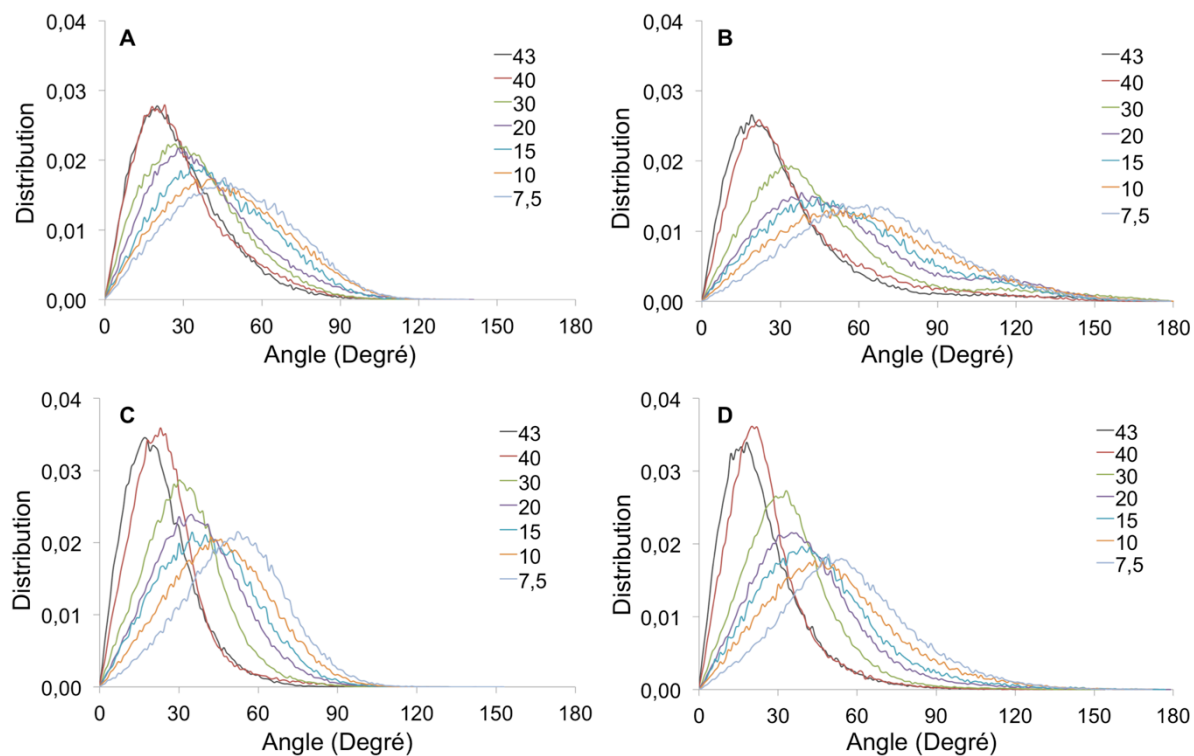
**Figure VI-16** – Influence de l'inclinaison du glycérol sur la conformation des chaînes

## 8. Etude conformationnelle des chaînes hydrophobes - Angles d'inclinaison

Les distributions des angles d'inclinaison des deux segments de chaque chaînes sont représentées sur la Figure VI-17. La tendance globale des quatre segments est très similaire : l'inclinaison des chaînes diminue quand la pression de surface augmente.

On peut noter une différence notable entre la distribution des angles d'inclinaison des premiers et des seconds segments. Alors que les premiers ne dépassent pas les  $90^\circ$ , les seconds segments montrent une population non négligeable d'angle supérieur à  $90^\circ$  aux faibles pressions, et ce particulièrement pour la chaîne oléoyle. Ces valeurs d'angles correspondent à des repliements des chaînes hydrophobes. La présence de l'insaturation sur la chaîne oléoyle explique la forte population d'angles supérieurs à  $90^\circ$  pour cette chaîne (présente à toutes les pressions) alors qu'elle disparaît à partir de  $30 \text{ mN/m}$  pour la chaîne saturée.

Une similitude de comportement est remarquable entre les pressions 7,5 et 10, 15 et 20, 30, 40 et 43 mN/m pour la chaîne palmytoyle.



**Figure VI-17** – Distributions des angles d'inclinaison des chaînes hydrophobes. Premier segment A et deuxième segment B de la chaîne oléoyle, premier segment C et deuxième segment D de la chaîne palmytoyle.

Les maxima des distributions sont reportés sur le Tableau VI-4.

La valeur de tous les angles décroît avec l'augmentation de la pression de surface. Les premiers segments de chaque chaîne ont des valeurs d'inclinaison similaires et varient de la même manière en fonction de l'augmentation de la pression de surface : de  $\sim 50^\circ$  à 7,5 mN/m à  $\sim 20^\circ$  pour une pression de 43 mN/m.

L'inclinaison des seconds segments est très différente selon la chaîne. Le second segment de la chaîne insaturée est plus incliné que celui de la chaîne saturée de  $10^\circ$ . Cette différence d'inclinaison diminue avec l'augmentation de la pression de surface, pour être équivalente à partir de 30 mN/m.



Tension de surface (mN/m)	<i>inclinaison Oléoyl</i> (degré)		<i>inclinaison Palmitoyl</i> (degré)	
	C22C29	C29C218	C32C39	C39C316
7.5	47	64	50	54
10	46	58	48	51
15	40	48	40	40
20	33	43	35	35
30	30	35	30	30
40	21	25	22	21
43	20	22	20	20

**Tableau VI-4** – Maxima des angles d’inclinaison des chaînes hydrophobes

A la pression de surface 30 mN/m, l’inclinaison moyenne des segments est de 30°. Cette valeur est en accord avec la valeur d’inclinaison reportée pour les bicouches de phosphocholine [Robinson *et al.* 1994 ; Tardieu *et al.* 1973].

Selon un modèle de *packing* de lipide développé à la fin des années 1970, l’orientation des têtes polaires par rapport à l’interface est responsable de l’inclinaison des chaînes hydrophobes [Nagle 1976 ; McIntosh 1980]. Les résultats obtenus sur l’orientation des têtes polaires au cours de la compression laissent donc penser à une corrélation entre pression de surface, inclinaison des chaînes et des têtes polaires.

Nous avons montré que l’inclinaison du glycérol diminue avec l’augmentation de la pression de surface. Nous avons également montré que le vecteur PN pouvait être orienté perpendiculairement à la monocouche. Enfin nous avons également montré que l’inclinaison des chaînes hydrophobes diminue avec l’augmentation de la pression de surface.

En corrélant l’évolution de l’angle d’inclinaison de chaque partie du phospholipide, pour des pressions de surface en dessous de 30 mN/m, PN est orienté parallèlement à la monocouche et le glycérol est incliné de 50° par rapport à la normale à la monocouche. Selon la théorie mentionnée plus haut, l’importance de l’aire occupée par la tête polaire entraîne l’inclinaison des chaînes hydrophobes d’un angle de 30°.

Pour des pressions plus hautes, 30 à 43 mN/m, le vecteur PN s’oriente perpendiculairement à la monocouche entraînant une diminution de l’aire occupée par la tête polaire. Cette diminution est

accompagnée d'une diminution de l'inclinaison des chaînes hydrophobes, qui corrobore la théorie mentionnée précédemment.

#### Synthèse sur l'inclinaison des chaînes alkyles au cours de la compression

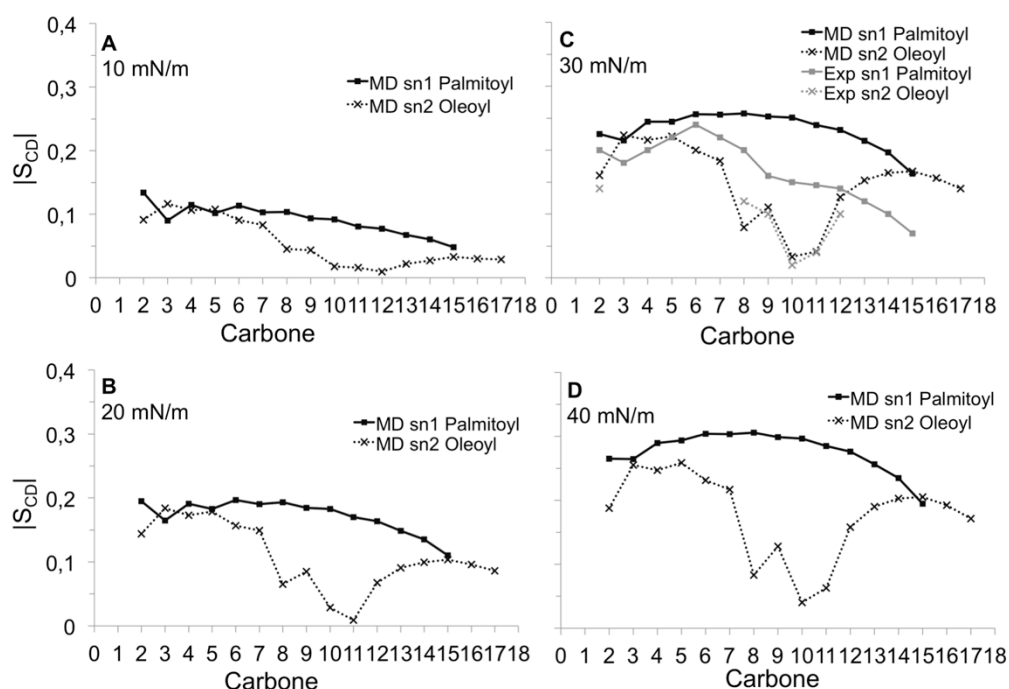
L'analyse des angles d'inclinaison des chaînes hydrophobes a montré une diminution de l'inclinaison des chaînes par rapport à la normale à l'interface, en réponse à une augmentation de la compression. L'analyse détaillée a révélé un comportement similaire des premiers segments de chaque chaîne et une inclinaison plus importante du second segment de la chaîne insaturée alors qu'aucune distinction n'est visible entre les deux segments de la chaîne saturée.

De plus, l'existence de repliements de la chaîne insaturée a été détectée aux faibles pressions de surface, ce qui est sans doute la composante principale des grandes aires observées à ces valeurs de pressions.

La corrélation des résultats obtenus pour l'orientation des têtes polaires, l'inclinaison du glycérol et celle des chaînes permet de conclure à une vérification de la théorie selon laquelle il est énergétiquement plus favorable pour les phospholipides de s'incliner lorsque la surface occupée par les têtes est plus large que celle occupée par les chaînes. Le *packing* des chaînes hydrophobes dépend de celui des têtes polaires et du glycérol.

## **9. Etude conformationnelle des chaînes hydrophobes – Paramètres d'ordre**

Le degré d'ordre des chaînes palmitoyle (sn-1) et oléoyle (sn-2) est évalué expérimentalement pour les bicouches par le paramètre d'ordre  $S_{CD}$  de la liaison carbone-deutérium (CD) obtenu par spectroscopie RMN du deutérium, en fonction de la position du carbone sur les chaînes aliphatiques. La simulation de ce paramètre est présentée sur les profils des monocouches aux pressions 10, 20, 30 et 40 mN/m de la Figure VI-18.



**Figure VI-18** – Paramètres d'ordre des chaînes hydrophobes à différentes pressions de surface

L'augmentation de la pression de surface entraîne une augmentation des paramètres d'ordre, indiquant une augmentation de l'ordre dans les chaînes hydrophobes au cours de la compression. A 10 mN/m, le paramètre d'ordre n'excède pas 0,15, indiquant un grand désordre des chaînes à faible pression de surface. A 20 mN/m, les paramètres d'ordre sont plus élevés. Un plateau se dessine sur le profil de la chaîne saturée sn-1 entre les carbones 2 et 11, alors que le profil de la chaîne sn-2 présente le creux caractéristique de la double liaison *cis* autour des carbones 7 et 12.

A la pression d'équivalence monocouche / bicouche, 30 mN/m, le profil calculé pour la chaîne sn-2 est en excellente corrélation avec le profil expérimental obtenu par RMN pour la bicouche de POPC [J. Seelig and Waespe-sareevit 1978]. Le profil de la chaîne sn-1 est beaucoup plus ordonné et présente une allure différente du profil expérimental. Le plateau caractéristique des débuts de chaîne n'est pas visible car la fin de chaîne n'est pas caractérisée par une diminution graduelle de l'ordre jusqu'à des valeurs inférieures à 0,07. Au contraire, le profil issu de la simulation présente une allure en cloche concave, avec une évolution parallèle au profil expérimental du carbone 2 au carbone 6, puis un maintien continu de l'ordre jusqu'au carbone 10 et enfin une diminution faible et régulière jusqu'à 0,18.

Une bonne corrélation des débuts de chaînes est à noter, en particulier le carbone C2. Jojart *et al.* avaient déjà remarqué la bonne reproduction du paramètre de ce carbone 2 dans la simulation d'une bicouche de POPC avec le même champ de force GAFF [Jójárt and Martinek 2007].

Enfin, à 40 mN/m, les profils de paramètre d'ordre conservent la même forme avec des valeurs plus élevées.

Le profil à 30 mN/m laisse supposer un degré d'ordre plus important de la chaîne saturée en monocouche qu'en bicouche. De même l'absence de décroissance de  $S_{CD}$  à partir du carbone 7, suggère un comportement indépendant de la chaîne saturée qui ne subirait aucune influence de l'insaturation de la chaîne voisine.

### Synthèse sur l'ordre d'organisation des chaînes alkyles

Les profils de paramètre d'ordre obtenus par simulation de DM pour la monocouche de POPC montrent une bonne corrélation avec les données expérimentales obtenue de la bicouche de POPC, pour les débuts de chaînes et la partie insaturée de la chaîne oléoyale.

Le profil de la chaîne saturée est plus régulier avec des valeurs plus élevées que la bicouche. Cette particularité suggère un comportement plus indépendant et à une organisation plus ordonnée des chaînes en monocouche.

La conformation des POPC en monocouche serait différente de celle adoptée dans la bicouche et conduirait à un paramètre d'ordre élevé et un comportement quasi indépendant des chaînes.

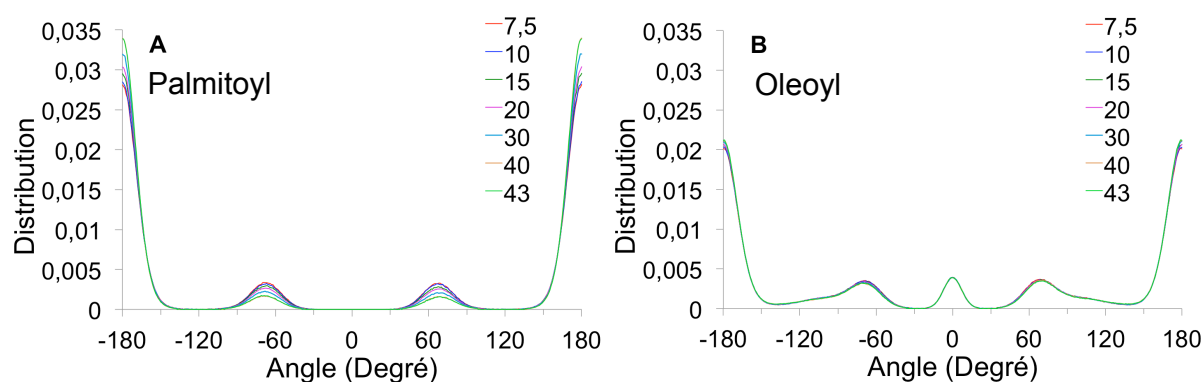
## **10. Etude conformationnelle des chaînes hydrophobes –Dièdres des chaînes**

Suite aux résultats obtenus avec le calcul du paramètre d'ordre des chaînes hydrophobes, nous avons souhaité approfondir leur étude conformationnelle. En explorant la distribution des angles dièdres moyens de chaque chaîne (Figure VI-19).

La chaîne palmitoyale présente deux populations *trans* et *gauche*, avec une prédominance de conformères *trans* : 81% de dièdres sont en conformation *trans* à 7,5 mN/m. La distribution angulaire est clairement dépendante de la variation de pression de surface. Le nombre de conformères *trans* augmente avec l'augmentation de la pression (92% à 43 mN/m), tandis que le nombre de conformères *gauche* diminue de 19% à 7,5 mN/ à 9% à 43 mN/m. Ce résultat est comparable à l'étude d'une monocouche de DPPC par Duncan *et al.* qui avaient observé une extension maximale des chaînes aux petites aires moléculaires [Duncan and Larson 2008]. L'augmentation de la pression de surface

entraîne une isomérisation *trans* des chaînes palmitiques, s'accompagnant ainsi d'une augmentation de l'ordre dans ces chaînes.

La chaîne insaturée oléoyle présente une population autour de 0° correspondant à la double liaison *cis* ainsi qu'une population de conformations *trans* beaucoup moins importante (65%). La conformation de la chaîne oléoyle semble beaucoup moins perturbée par la variation de pression de surface que la chaîne saturée. Le pourcentage de *trans* varie de 65% à 7,5 mN/m à 67% à 43 mN/m, et le pourcentage de *gauche* varie de 23% à 21% pour les mêmes pressions de surface.



**Figure VI-19** – Distributions moyennes des angles dièdres des chaînes hydrophobes aux différentes pressions de surface

Le pourcentage de chaque conformation pour toutes les pressions de surface est reporté sur le Tableau VI-5.

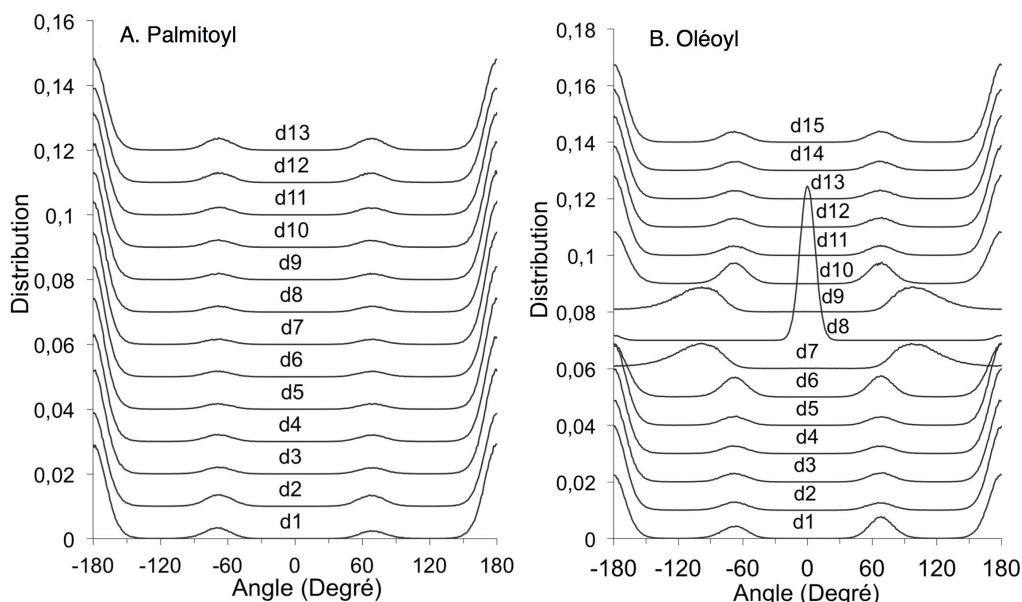
A titre de comparaison, dans le cas d'une bicouche de POPC, de précédents travaux de DM (à 310 K et à 30 mN/m) ont conclu à 75% et 64% de conformations *trans* pour les chaînes palmitoyle et oléoyle respectivement, ainsi que 25% et 29% de conformations *gauche*, respectivement [Beswick *et al.* 2012].

Cette comparaison suggère que la chaîne insaturée adopte une conformation plus étendue dans la monocouche que dans la bicouche. De plus, en comparaison avec la distribution des dièdres de la chaîne saturée, la distribution de la chaîne insaturée présente une population supplémentaire comprise entre 90° et 250°.

Pression de surface (mN/m)	Palmitoyl		Oléoyl		
	% <i>trans</i>	% <i>gauche</i>	% <i>trans</i>	% <i>gauche</i>	% <i>cis</i>
7.5	81	19	65	23	7
10	82	19	66	23	7
15	84	17	66	22	7
20	86	15	66	22	7
30	89	13	67	22	7
40	92	9	67	21	7
43	92	9	67	21	7

**Tableau VI-5** – Pourcentage des conformations des dièdres des chaînes pour différentes pressions de surface

Afin d’identifier ces dièdres, nous avons calculé la distribution de chaque dièdre le long de chacune des chaînes à 30 mN/m. (Figure VI-20) La chaîne palmitoyle comportant 16 carbones et la chaîne oléoyle comportant 18 carbones, 13 et 15 dièdres sont décrits, respectivement. Les dièdres sont nommés d1 à d13/16, le premier dièdre étant défini par les vecteurs C1C2 et C3C4 de chaque chaîne, le second, par les vecteurs C2C3 et C4 C5, etc...

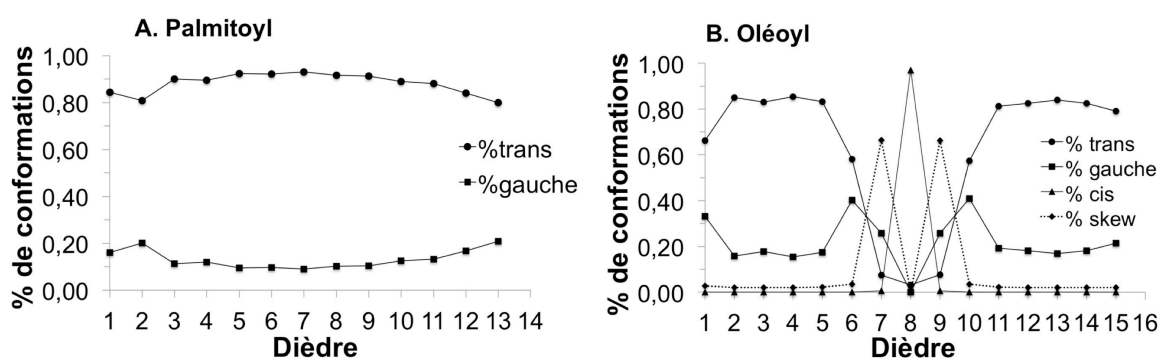


**Figure VI-20** – Distribution des angles dièdres en fonction de leurs positions sur chaque chaîne

Les chaînes saturées sont clairement très étendues puisqu'elles ne comportent que 10% de défaut *gauche* ( Figure VI-21). Les dièdres des débuts et fins de chaîne présentent des défauts gauches plus importants. Ces pourcentages de défaut *gauche* sont comparables à ceux obtenus pour la bicouche de POPC [Leekumjorn and Sum 2007a].

Les chaînes insaturées présentent 85% de conformères *trans* à 30 mN/m. Pratiquement tous les dièdres sont en conformation *trans*, excepté le dièdre d8 portant l'insaturation, ainsi que les dièdres d6, d7, d9, d10 et le dièdre d1 qui présente davantage de défauts gauches (30%).

Les dièdres d6 et d10 présentent également davantage de défauts gauches (26% et 40% respectivement), tandis que les dièdres encadrant la double-liaison, ont des distributions centrées autour de  $-120^\circ$  et  $+120^\circ$ . La population supplémentaire détectée précédemment entre  $90^\circ$  et  $150^\circ$  (et  $-90^\circ$  et  $150^\circ$ ) est attribuée à ces deux dièdres. Ces valeurs de dièdres, dénommées « *skew* », sont caractéristiques des dièdres voisins d'insaturation, avec un maximum à  $120^\circ$  [Saiz and Klein 2001 ; Martinez-Seara *et al.* 2008].



**Figure VI-21** – Pourcentages des conformations des dièdres en fonction de leurs positions dans chaque chaîne

### Synthèse sur la conformation des chaînes alkyles

L'analyse des dièdres des chaînes hydrophobes a montré une sensibilité des conformations à la variation de pression nettement plus importante pour la chaîne saturée que la chaîne insaturée et confirme une certaine indépendance de comportement des deux chaînes, évoquée dans la partie précédente.

L'augmentation de la pression de surface entraîne clairement une isomérisation *trans* des chaînes.

En comparaison avec les données de la bicouche, nos résultats laissent penser que les chaînes adoptent une conformation plus étendue dans la monocouche. A haute pression, la chaîne palmitoyl est pratiquement en conformation *all-trans*. L'analyse de chaque dièdre le long de chacune des chaînes confirme les distributions très semblables le long de la chaîne saturée. Cette conformation des

dièdres le long de la chaîne confirme le caractère très ordonné observé avec le profil de paramètre d'ordre.

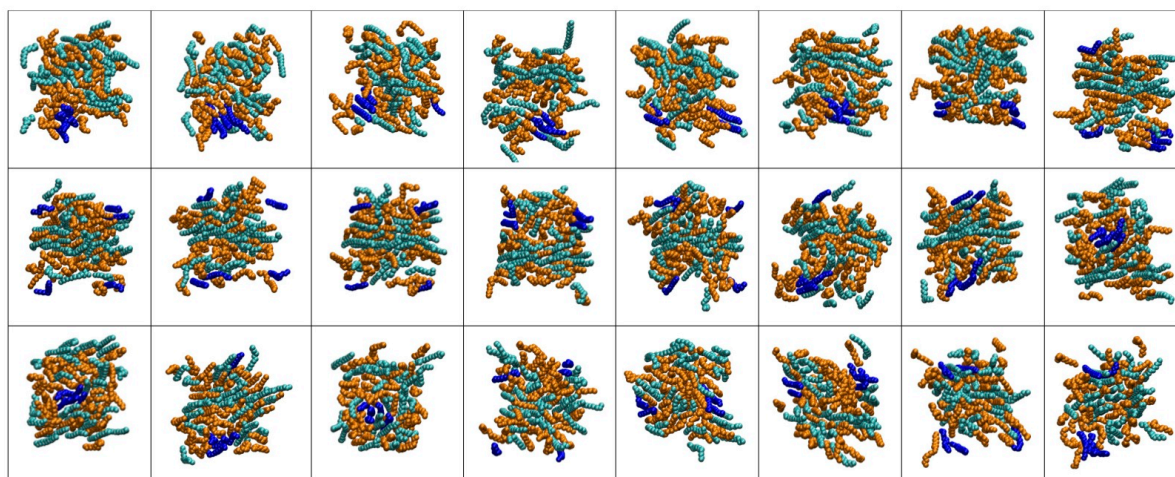
La chaîne insaturée est moins étendue et présente une population de dièdre autour de  $120^\circ$  caractéristique de la présence d'une double liaison. L'analyse détaillée permet de conclure que le défaut apporté par l'insaturation se répercute à distance, aux deux dièdres avoisinants.

La comparaison avec des données de la bicouche, permet de conclure à des différences significatives des conformations entre monocouche et bicouche.

## 11. Etude conformationnelle des chaînes hydrophobes – Ségrégation des chaînes

Le suivi des chaînes hydrophobes au cours des trajectoires à chaque pression de surface a permis l'observation d'arrangements locaux des chaînes alkyle. Nous avons reporté sur la Figure VI-22 des représentations de la vue du dessus des monocouches prises toutes les 2 ns sur les 50 dernières ns de la trajectoire de simulation à 30 mN/m. Les chaînes sont représentées par les sphères de van der Waals de leurs atomes. Les chaînes palmitoyles sont colorées en cyan et les chaînes oléoyles en orange.

Cette visualisation de la trajectoire a permis de montrer la tendance des chaînes à s'assembler entre elles selon leur type saturé ou insaturé.



**Figure VI-22** – Ségrégation des chaînes hydrophobes en clusters « palmitoyl » et clusters « oléoy » observée sur des instantanés pris toutes les 2 ns sur les 50 dernières nanosecondes de la trajectoire à 30 mN/m. Vue du dessus de la monocouche, avec en cyan les chaînes palmitoyles, en orange les chaînes oléoyles et en bleu un cluster « palmitoyl » pris au hasard.



L'apparition de cluster de chaînes palmitoyles ou de chaînes oléoyles a pu être observée. Ces clusters se forment de manière aléatoire dans la monocouche et disparaissent pour se reformer aléatoirement au cours de la trajectoire.

L'évolution très rapide des systèmes de monocouches de lipides (dans le plan  $xy$ ), et les fluctuations des chaînes selon l'axe  $z$  ne permettent pas une quantification directe de ce phénomène.

Sur la Figure VI-22, nous avons coloré en bleu un cluster de chaînes palmitoyles afin de faciliter son suivi au cours de la trajectoire. Le temps de vie de cet agrégat est ainsi estimé à environ 4 à 6 ns.

La ségrégation spontanée des chaînes entre elles peut être corrélée au profil de paramètre d'ordre particulièrement élevé des POPC en monocouche. En effet, la formation de clusters de chaînes palmitoyles entraîne une organisation coordonnée de ces chaînes expliquant ainsi le degré d'ordre observé.

Aucune donnée sur une ségrégation des chaînes en bicouche n'a été reportée à notre connaissance mais une étude de bicouche de composition mixte DPPC/DOPC par MD a montré une formation spontanée de clusters hydrophobes [Pyrkova *et al.* 2011]. Les auteurs ont calculé et comparé les  $S_{CD}$  des lipides sur toute la bicouche et seulement dans les clusters. Ils ont ainsi mis en évidence l'augmentation des  $S_{CD}$  des lipides au sein des clusters. De plus, l'augmentation des  $S_{CD}$  calculés pour les DOPC en fonction de l'ajout de DPPC leur a permis de conclure à un effet structurant des DPPC. Ceci peut être directement corrélé à la ségrégation des chaînes palmitoyles et à leur valeur de  $S_{CD}$  élevée.

L'assemblage en cluster de chaînes palmitoyles ou de chaînes oléoyles a pu être observée au sein de la monocouche de POPC, à toutes les pressions de surface (Annexe 4). La formation d'agrégats par type de chaîne ne semble donc pas être dépendante de la tension de surface. Elle paraît cependant, influencer sur leur temps de vie, plus court aux basses pressions qu'aux pressions plus élevées où la dynamique est davantage restreinte. L'annexe 4 permet également de visualiser l'inclinaison beaucoup plus importante des chaînes aux basses pressions. Les clusters apparaissent plus diffus qu'aux hautes pressions (à partir de 20 mN/m) pour lesquelles les chaînes sont davantage compactes.

#### Synthèse sur la ségrégation des chaînes alkyles

Nous attribuons l'ordre particulièrement élevé illustré par le profil de paramètre d'ordre de la chaîne palmitoyle à cette tendance à l'agrégation.

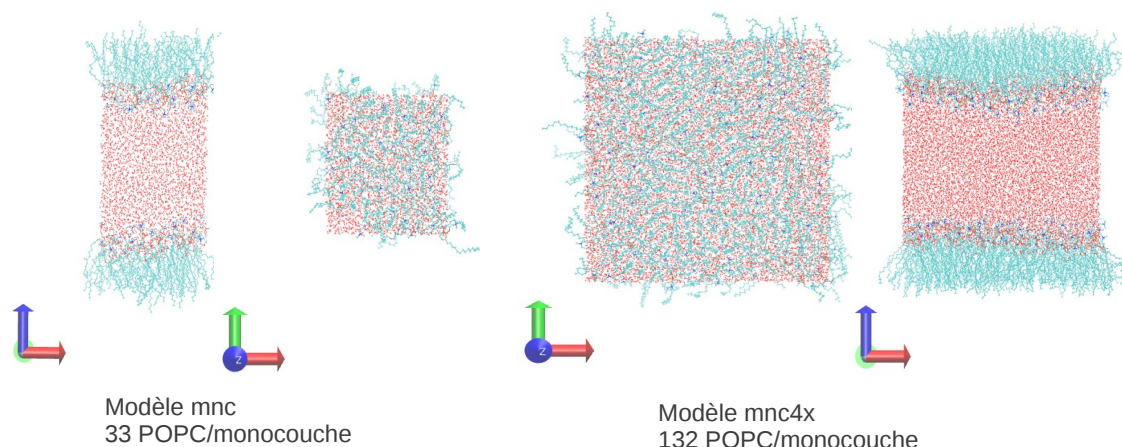
Nous proposons l'hypothèse que l'orientation du vecteur PN, l'inclinaison du glycérol par rapport à la normale à la monocouche et l'absence d'interaction des chaînes avec un second feuillet entraîne des conformations et des organisations des chaînes énergétiquement favorables qui seraient à l'origine d'un agencement des lipides plus ordonné en monocouche qu'en bicouche.

Le comportement spécifique des chaînes hydrophobes a un impact direct sur les propriétés structurales des lipides et apporte des indices clés pour la compréhension de l'organisation des lipides en monocouche. De plus, il pourrait avoir un rôle évident dans le mécanisme de la perméabilité membranaire. En effet, le passage d'un composé est principalement dépendant de l'organisation des chaînes alkyles du cœur hydrophobe de la membrane.

De même, une étude plus approfondie de cet agencement latéral spontané permettrait d'appréhender la question de la formation et de la dynamique des radeaux lipidiques. En effet, l'analyse de l'influence d'autres types lipidiques, de longueur de chaînes différentes ou de l'incorporation de molécule au sein des monocouches permettrait de mieux caractériser le comportement des clusters de chaînes.

## 12. Influence de la taille du système

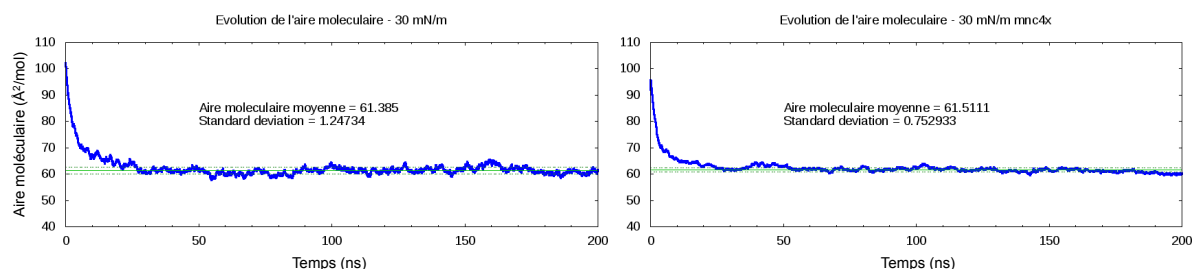
Nous avons souhaité évaluer l'influence de la taille du système sur les résultats des nos simulations. Pour cela nous avons construit une monocouche de POPC quatre fois plus grande. La monocouche composée de 33 molécules de POPC par feuillet (*mnc*) a été répliquée dans le plan xy pour former une grande monocouche (*mnc4x*) composée de 132 molécules de POPC par feuillet (Figure VI-23).



**Figure VI-23** – Système de la monocouche à 132 POPC / feuillet (*mnc4x*) construite à partir de la monocouche initiale à 33 POPC / feuillet (*mnc*)

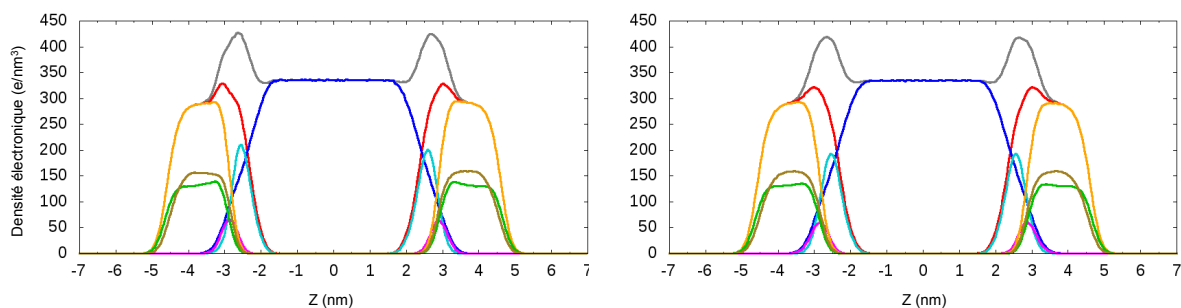
Les analyses comparatives des deux systèmes ont été faites à partir des simulations de dynamique moléculaire à 30 mN/m (correspondant à la pression d'équivalence monocouche/bicouche) et à 300

K. La comparaison des résultats obtenus montre une parfaite reproduction des propriétés structurales des POPC. Les aires moléculaires obtenues pour les systèmes *mnc* et *mnc4x* sont similaires, avec 61 (+/-1) Å<sup>2</sup> et 62 (+/-1) Å<sup>2</sup> respectivement (Figure VI-24).

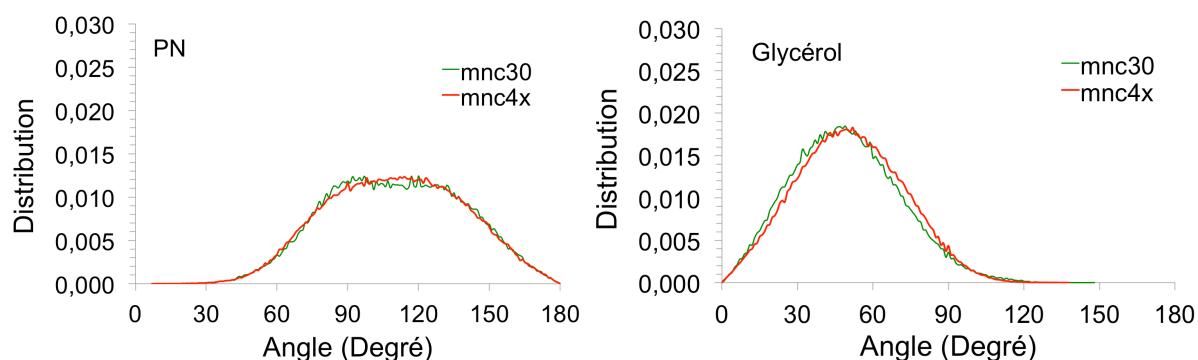


**Figure VI-24** – Comparaison des aires moléculaires pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*

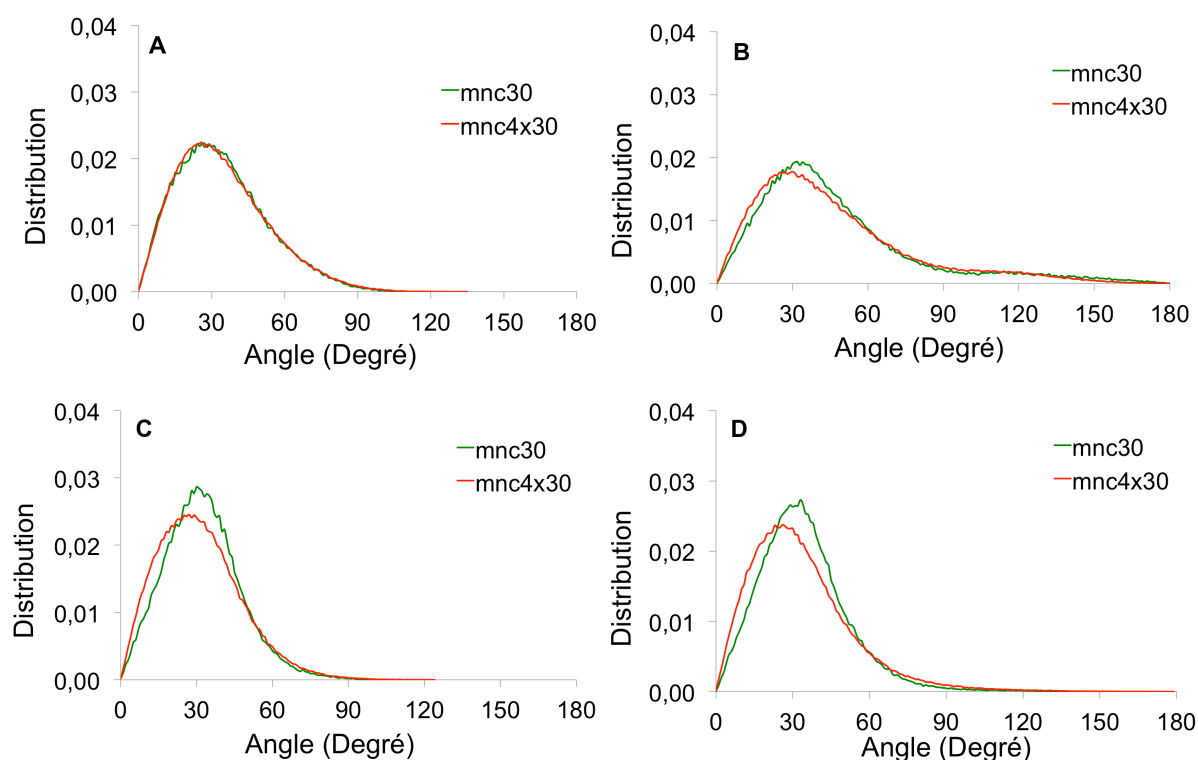
Les propriétés macroscopiques comme la distribution des densités électroniques sont équivalentes (Figure VI-25), de même que les propriétés structurales telles que les angles d'inclinaison des têtes polaires (Figure VI-26) et des chaînes hydrophobes (Figure VI-28). Un léger décalage des distributions des angles d'inclinaison des chaînes saturées peut être noté mais les maxima sont centrés sur la même valeur (30°). Les paramètres d'ordre des chaînes (Figure VI-28) et la distribution de leurs angles dièdres (Figure VI-29) sont très similaires et on observe également une ségrégation spontanée des chaînes en fonction de leurs types (Figure VI-30).



**Figure VI-25** – Comparaison des distributions de densités électroniques pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*. En gris le pic global du système, en bleu l'eau, en orange les POPC, en rouge les chaînes hydrophobes et en cyan les têtes polaires



**Figure VI-26** – Comparaison des distributions des angles d’inclinaison des vecteurs PN et du glycérol pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*



**Figure VI-27** – Comparaison des inclinaisons des chaînes alkyle pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*. Premier segment A et deuxième segment B de la chaîne oléoyle, premier segment C et deuxième segment D de la chaîne palmitoyle.

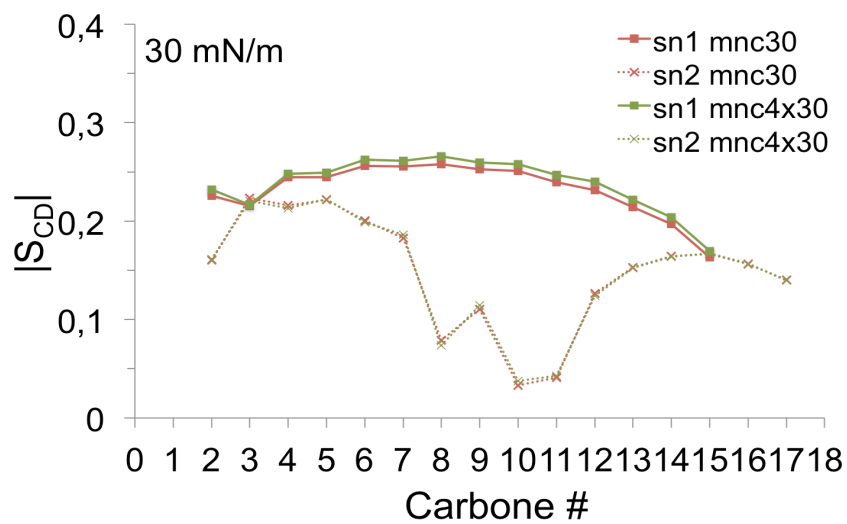


Figure VI-28 – Comparaison des paramètres d'ordre pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*

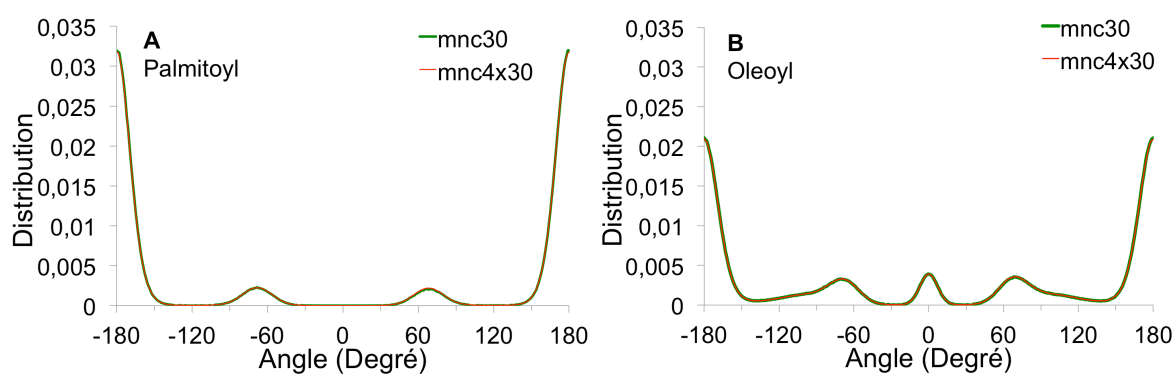
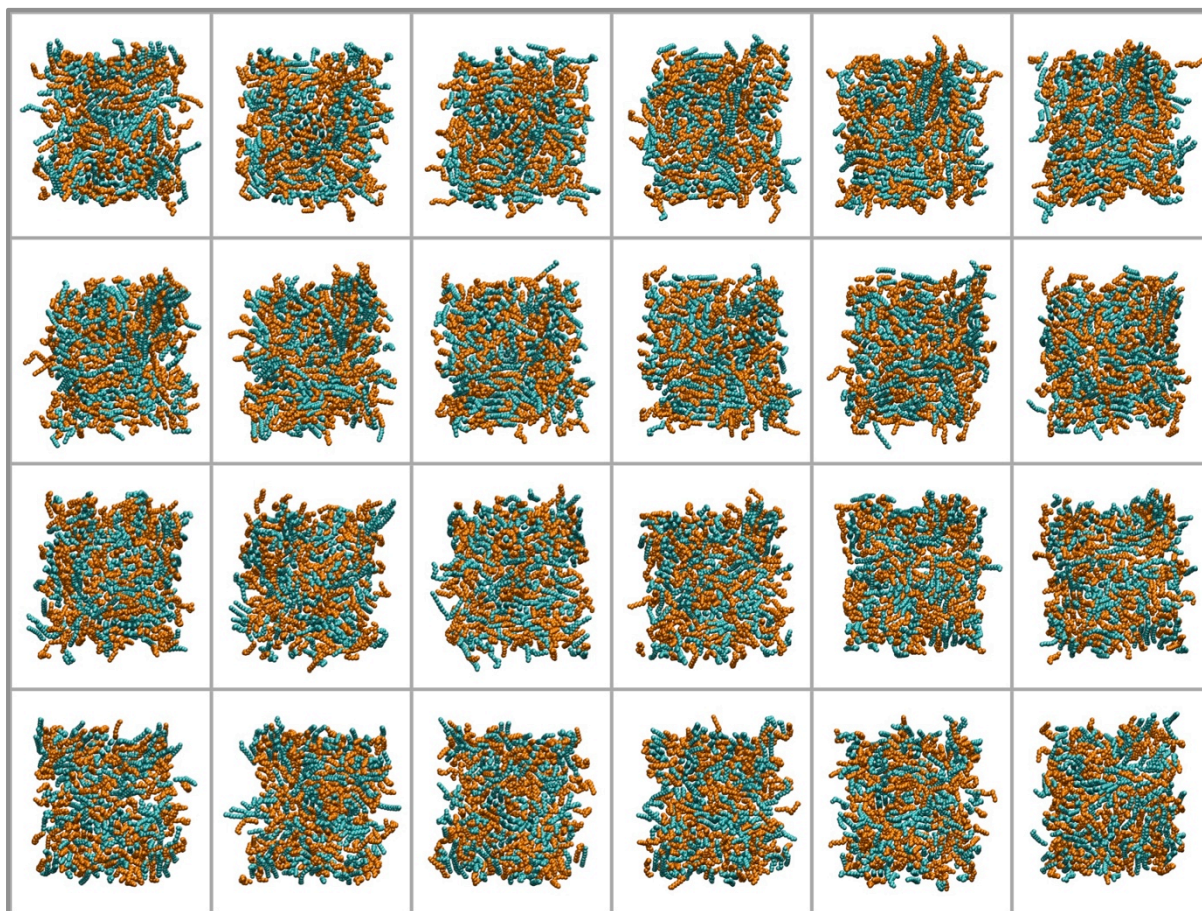


Figure VI-29 – Comparaison des torsions des chaînes hydrophobes pour les systèmes *mnc* et *mnc4x*



**Figure VI-30** – Ségrégation des chaînes hydrophobes en clusters « palmitoyl » et clusters « oléoyl » observées sur des instantanés pris toutes les 2 ns sur les 50 dernières nanosecondes de la trajectoire à 30 mN/m. En cyan les chaînes palmitoyles, en orange les chaînes oléoyles

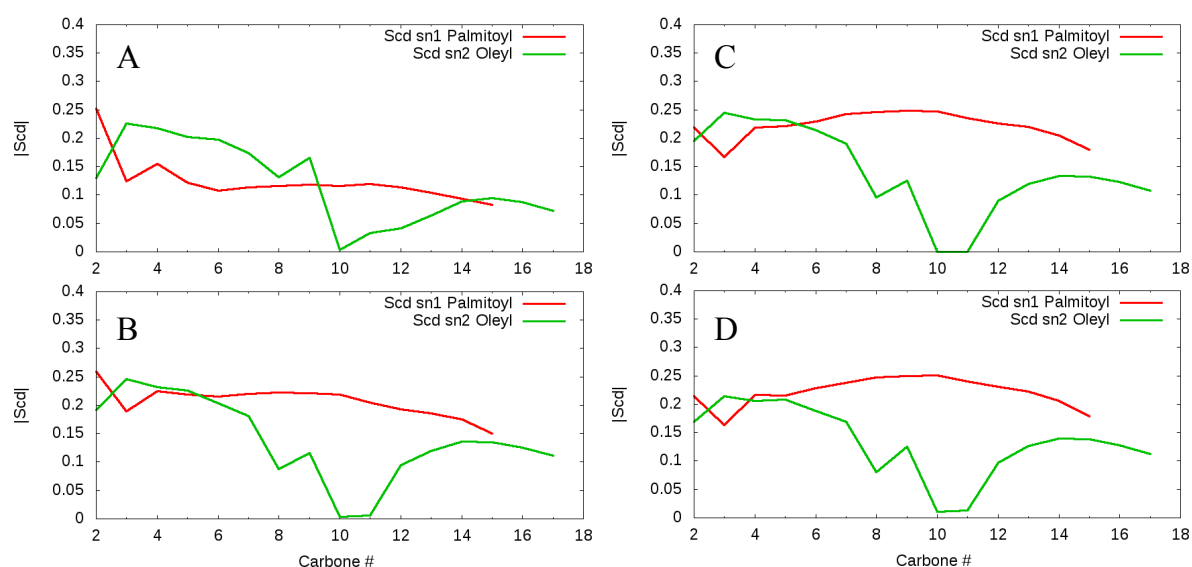
Nous avons choisi une taille de système réduite afin d'optimiser les temps de calculs. En effet, les POPC sont des molécules très flexibles, de plus, leur organisation en monocouche ne fait intervenir aucune liaison covalente entre les molécules. La dynamique de la monocouche dépend principalement des liaisons non liantes, très coûteuses en temps et en puissance de calcul.

Cependant, une taille trop petite peut entraîner une mauvaise reproduction du comportement des lipides en monocouche malgré l'application des conditions périodiques et des calculs des interactions électrostatiques à longue distance. Un manque d'échantillonnage statistique peut également fausser les résultats obtenus par simulation de dynamique moléculaire.

L'effet de la taille du système sur les simulations de lipides en bicouche et monocouche a donc déjà été abordé. Ainsi, les travaux de Lucas *et al.* [Lucas *et al.* 2011] et Duncan & Larson [Duncan and Larson 2008] sur les monocouches de DPPC font mention d'études ayant conclu à une influence très limitée de la taille des systèmes simulés. De Vries *et al.* comparent dans leur article des simulations

de bicouches de DPPC faites à partir de systèmes de taille différente : 1, 4, 9, 16, 36, 64 lipides par feuillet. Ils montrent que les paramètres structuraux expérimentaux tels que le paramètre d'ordre sont correctement reproduits pour des systèmes à partir de 16 lipides par feuillet [Vries *et al.* 2005]. Ces résultats sont confirmés par Klauda *et al.* qui ont également observé des résultats satisfaisants avec un système de 72 DPPC en bicouche [Klauda *et al.* 2006]. Compte tenu de ces observations et des résultats obtenus, il semble que 33 lipides par monocouche soient suffisants pour une reproduction correcte des propriétés structurales des lipides par dynamique moléculaire.

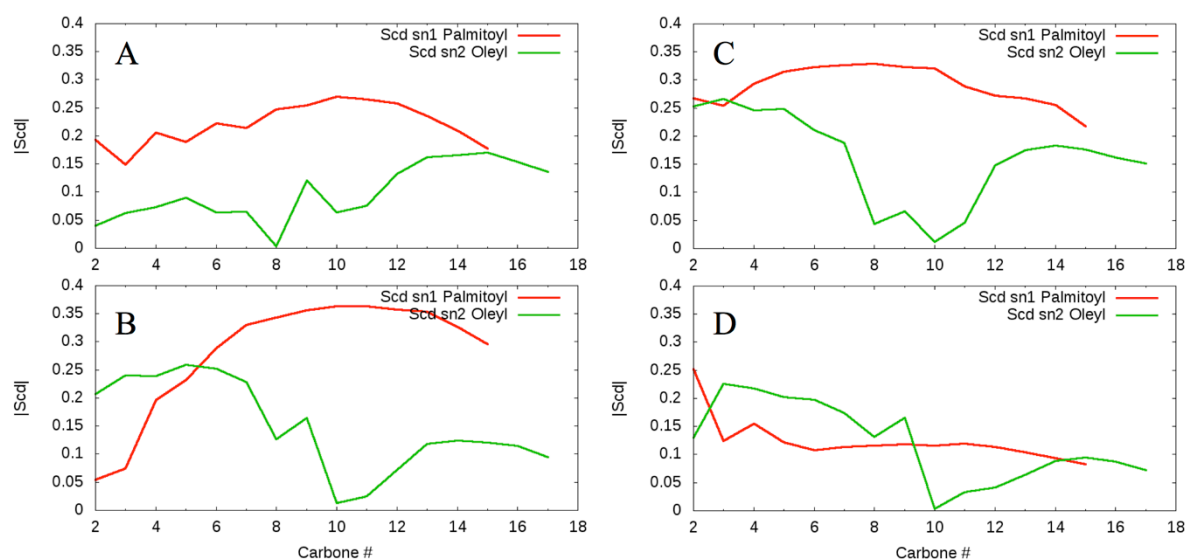
Afin d'évaluer l'impact de l'échantillonnage statistique, nous avons procédé à l'analyse du  $S_{CD}$  d'un seul POPC pris au hasard dans la monocouche. On peut voir sur la Figure VI-31 les profils de paramètres d'ordre moyennés sur des durées différentes : 50, 100, 150 et 200 ns.



**Figure VI-31** –  $S_{CD}$  d'un seul POPC moyenné sur les 50 (A), 100 (B), 150 (C) et 200 (D) premières nanosecondes de simulation de dynamique moléculaire

Le calcul du  $S_{CD}$  sur les 50 premières nanosecondes ne permet pas d'obtenir un profil significatif alors qu'à partir de 100 ns, l'échantillon est suffisant pour produire un profil caractéristique. Le calcul d'un paramètre d'ordre moyen sur 100 ns semble être suffisant et nécessaire, puisque les profils obtenus à 100, 150 et 200 ns sont très semblables.

Afin de s'assurer que cette observation est due à la durée et non pas ponctuellement à un moment de la trajectoire, nous avons donc calculé le  $S_{CD}$  moyen sur différentes tranches de 50 ns au cours de la trajectoire (Figure VI-32). Il semble que quel que soit le moment de la trajectoire, le calcul de  $S_{CD}$  sur 50 ns n'est pas significatif. La longueur des trajectoires permet également d'augmenter l'échantillon statistique.



**Figure VI-32** – SCD d’un seul POPC moyenné sur différentes tranches de 50 ns. A de 0 à 50 ns, B de 50 à 100 ns, C de 100 à 150 ns et D de 150 à 200 ns.

Les aires moléculaires sont identiques, les propriétés macroscopiques sont équivalentes, de même que les propriétés structurales telles que le paramètre d’ordre ou les angles d’inclinaison des têtes polaires. Nous pouvons donc conclure que 33 POPC par monocouche, analysés sur les 150 dernières nanosecondes des trajectoires, soient suffisant pour un bon échantillonnage statistique. La reproductibilité des résultats montre également l’efficacité des conditions périodiques qui permettent de simuler des systèmes infinis. Les observables macroscopiques, les phénomènes de dynamique collective des monocouches ou bicouches telles que les ondulations, sont cependant tributaires de la grande taille des systèmes simulés. C’est pourquoi ils sont majoritairement étudiés en « gros-grain » ou en « atome-unifié ».

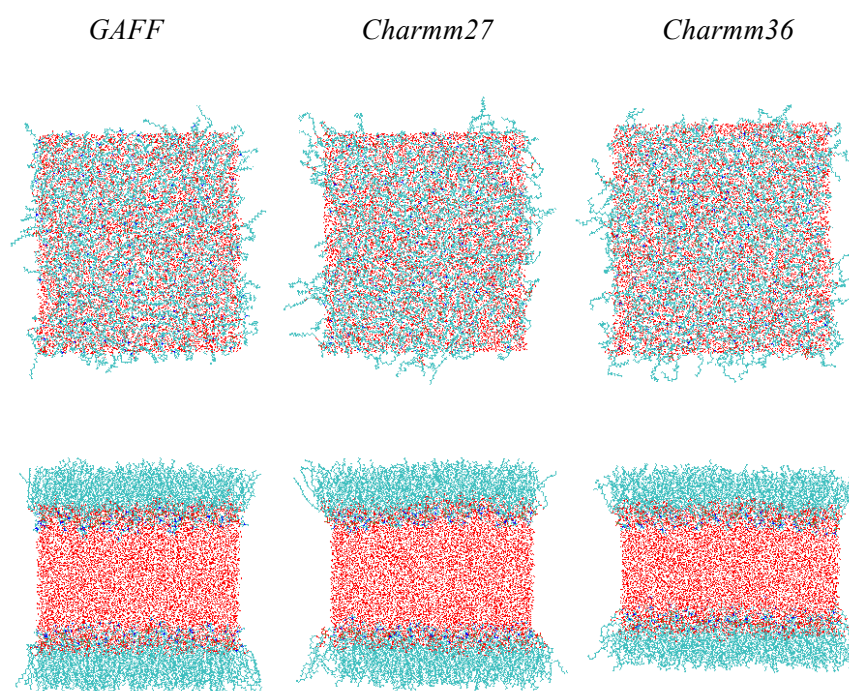
Enfin, nos résultats confirment qu’une monocouche de taille réduite est suffisante pour observer les propriétés structurales des phospholipides. Ce résultat est essentiel puisqu’il permet de réduire considérablement le temps et la puissance de calcul nécessaires à la simulation des systèmes de monocouche lipidiques.

### 13. Influence des champs de forces

La comparaison des dynamiques réalisées avec différents champs de forces s’est faite sur le grand modèle de monocouche *mnc4x*. Les aires moléculaires ont été obtenues pour les pressions 30 et 40 mN/m, mais les analyses comparatives n’ont été faites que pour la valeur de pression 30 mN/m.



Les représentations des dernières nanosecondes des systèmes simulés avec les trois champs de force montrent une différence notable du système simulé avec la version *Charmm36* du champ de force CHARMM (*c36*) (Figure VI-33). En effet, les dimensions en x et y ont augmenté, rendant la surface totale de la monocouche plus grande, alors que la dimension en z semble avoir été davantage comprimée.

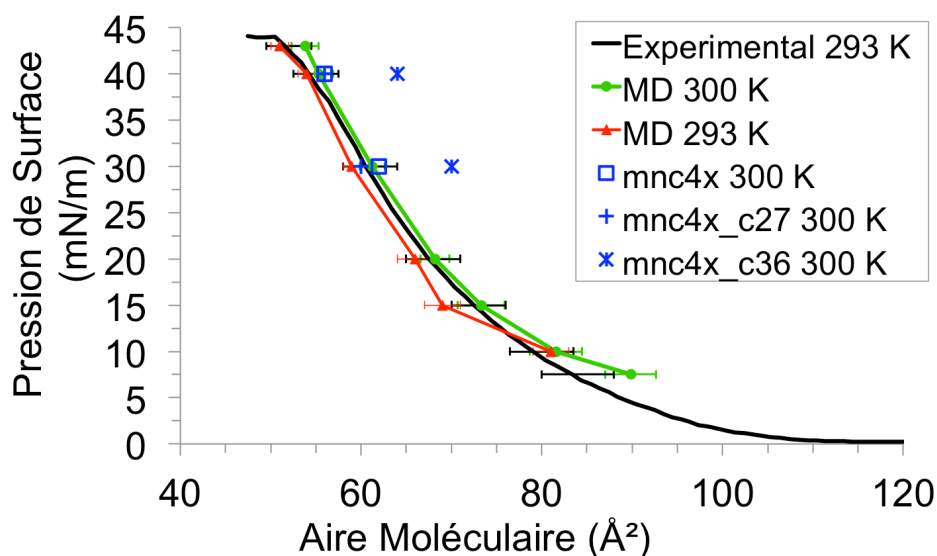


**Figure VI-33** – Comparaison des systèmes simulés avec les différents champs de force. De gauche à droite, GAFF, *Charmm27*, *Charmm36*

D'après les observations faites sur le système à 33 POPC *mnc*, la surface agrandie du système simulé avec *c36* devrait entraîner un degré d'ordre moins élevé dans les chaînes hydrophobes, comme semble l'indiquer la Figure VI-33. De même, le degré d'ordre des chaînes semble plus élevé pour le système simulé avec GAFF que dans le système simulé avec *Charmm27* (*c27*). Les analyses suivantes vont permettre de confirmer ces observations et l'analyse détaillée des têtes et des chaînes va permettre de déterminer la composante principale de cette différence d'aire moléculaire.

L'analyse principale consiste à comparer la capacité des champs de force à reproduire l'isotherme expérimentale de référence. En effet, rappelons que l'aire moléculaire est le paramètre caractéristique

d'un type de lipide pour une phase donnée. Nous avons donc reporté sur les isothermes précédemment présentées, les points obtenus avec les nouvelles simulations (Figure VI-34 et Tableau VI – 6).



**Figure VI-34** – Comparaison des aires moléculaires obtenues expérimentalement et avec les champs de force GAFF, *Charmm27* et *Charmm36*

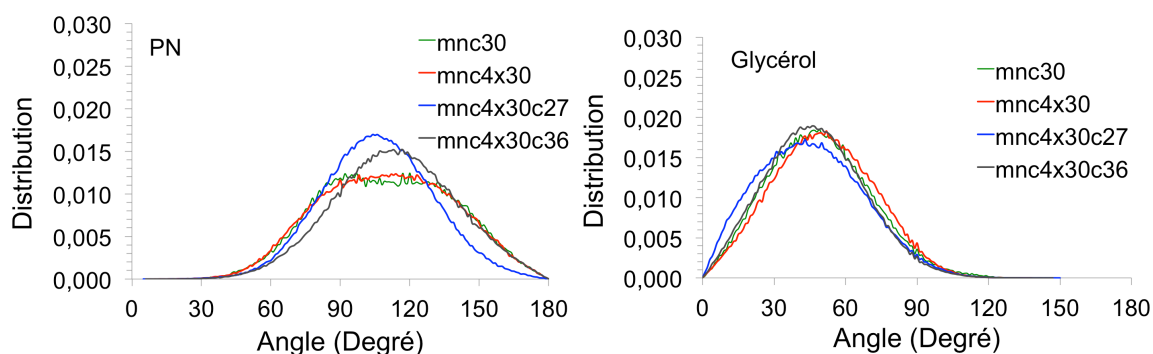
Pression de surface (mN/m)	Aire moléculaire mesurée (Å)	Aire moléculaire calculée (50-200 ns) (Å)	Aire moléculaire calculée (50-200 ns) (Å)	Aire moléculaire calculée (50-200 ns) (Å)	Aire moléculaire calculée (50-200 ns) (Å)
		<i>mnc</i>	<i>mnc4x</i>	<i>mnc4x Charmm27</i>	<i>mnc4x Charmm36</i>
30	62	61 (+/- 1)	62 (+/- 1)	60 (+/- 1)	70 (+/- 1)
40	55	55 (+/- 2)	56 (+/- 1)	56 (+/- 1)	64 (+/- 1)

**Tableau VI-6** – Valeurs des aires moléculaires obtenues expérimentalement et avec les champs de force GAFF, *Charmm27* et *Charmm36*

La comparaison des isothermes à 30 mN/m montre que les champs de forces GAFF et *Charmm27* reproduisent des aires moléculaires comparables : 62 +/- 1 Å<sup>2</sup> et 60 +/- 1 Å<sup>2</sup>, respectivement. L'aire moléculaire calculée avec *Charmm36* est par contre largement surestimée de ~10 Å<sup>2</sup>.

La comparaison à 40 mN/m permet de confirmer cette tendance.

Nous avons poursuivi les analyses dans la perspective d'identifier les paramètres structuraux impactés par le changement de champ de force. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'inclinaison des têtes polaires (Figure VI-35).



**Figure VI-35** – Comparaison des angles d'inclinaisons des vecteurs PN et du glycérol selon le champ de force

La distribution des angles d'inclinaison du glycérol et du PN de *c27* présente une allure différente de celles obtenues avec GAFF.

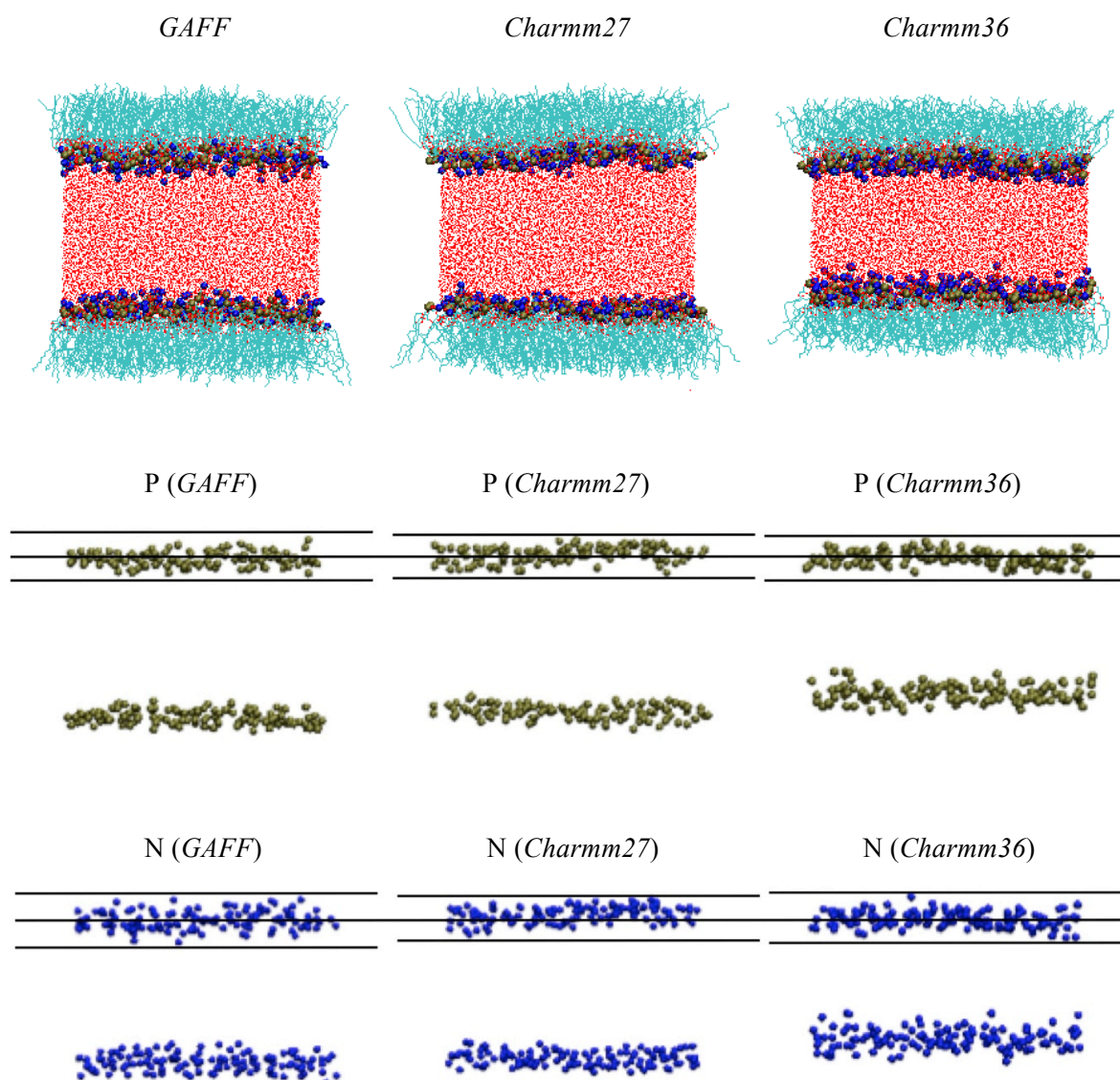
La version *c27* de CHARMM entraîne une population plus importante des petits angles d'inclinaison pour le glycérol. Davantage de glycérol seraient donc orientés perpendiculairement à la monocouche. Cependant, la distribution est aussi étalée que celle de GAFF et la valeur moyenne est approximativement la même, autour de 50°.

La distribution des angles d'inclinaison du vecteur PN est beaucoup plus étroite que la distribution obtenue avec GAFF et ne présente qu'une seule population centrée autour de 110°. L'orientation des vecteurs PN est donc majoritairement perpendiculaire à la surface de la monocouche.

*C27* permet de simuler un comportement plus proche de celui de la bicouche : les vecteurs PN parallèles à la surface de l'interface et le glycérol orienté plutôt perpendiculairement.

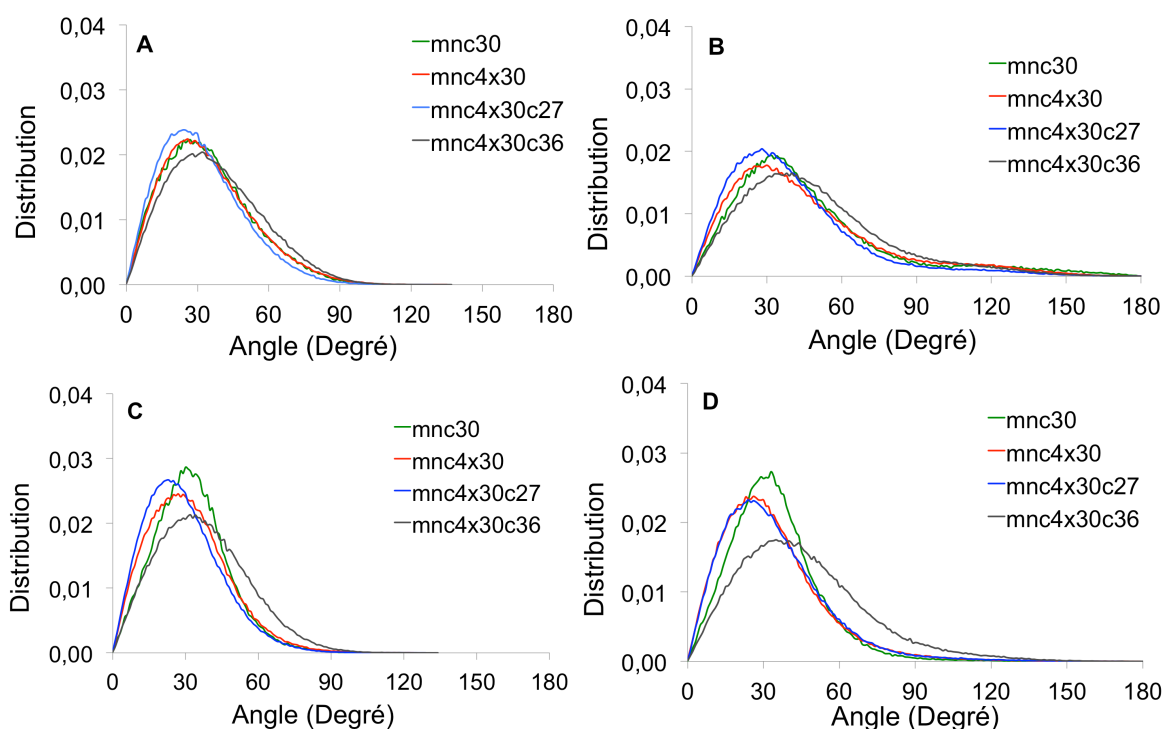
La distribution des angles d'inclinaison du glycérol de *c36* a une allure similaire à celle obtenue avec GAFF et présente donc les mêmes différences par rapport à *c27*. La distribution des angles d'inclinaison du vecteur PN est par contre différente des résultats obtenus avec GAFF. Tout comme la distribution obtenue avec *c27*, la distribution obtenue avec *c36* ne présente qu'une seule population centrée autour de 110°. Cependant la largeur à mi-hauteur montre une dispersion plus importante des angles dont le maximum est davantage décalé vers les grands angles. Ce qui laisse penser que les vecteurs PN sont davantage tournés vers le solvant que dans le système *c27*.

La Figure VI-36 représente les atomes de phosphore en ocre et les atomes d'azote en bleu. La dispersion en z des atomes de phosphore est similaire pour les trois champs de force alors que la dispersion des atomes d'azote est différente. Dans l'ordre croissant, la dispersion la plus faible apparaît avec *c27*, puis elle augmente avec *c36* pour être maximale avec GAFF. Cette observation est cohérente avec les distributions des angles d'inclinaison et confirme un repliement de la tête choline autour du groupement phosphate.



**Figure VI-36** – Comparaison de la dispersion en z des atomes P et N selon le champ de force

Comme pour les têtes polaires, nous avons souhaité comparer l'inclinaison des chaînes alkyle en fonction des champs de forces (Figure VI-37).

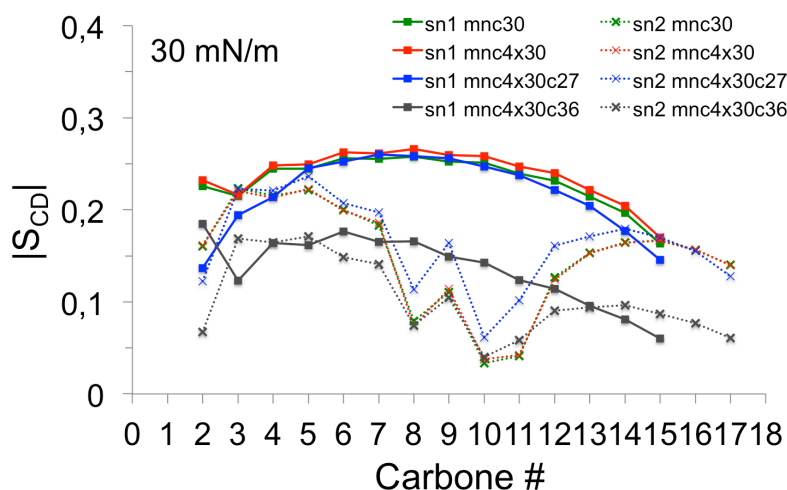


**Figure VI-37** – Comparaison des angles d’inclinaison des chaînes alkyles selon le champ de force avec A le premier segment de la chaîne oléoyle C22-C29, B le second segment de la chaîne oléoyle C29-C217, C premier segment de la chaîne palmitoyle C32-C39 et D le second segment de la chaîne palmitoyle C39-C315

Les distributions des angles d’inclinaison des chaînes hydrophobes insaturées sont très semblables pour les trois champs de force. Les maxima sont tous centrés autour de 30°. Les distributions obtenues avec *c36* sont cependant légèrement décalées vers les grands angles et semblent plus étendues. L’inclinaison des chaînes insaturées semble peu dépendante du champ de force utilisé.

Les distributions des angles d’inclinaison des chaînes saturées sont plus dissimilaires. Les résultats obtenus avec *mnc4x30* GAFF et *c27* sont similaires. La différence avec le système à 33 POPC (*mnc30*) est attribuée à un échantillonnage plus faible. Les simulations avec *c36* entraînent une inclinaison plus importante des chaînes dès le premier segment. Les populations d’angles supérieures à 90° sont également plus élevées. Ce qui signifie une probabilité plus élevée de trouver des repliements dans les chaînes simulées avec *c36*. Ces observations sont en accord avec le désordre plus important repéré dans les chaînes et avec l’aire moléculaire accrue calculée pour les simulations *c36*.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'organisation des chaînes par le calcul de leur paramètre d'ordre (Figure VI-38).

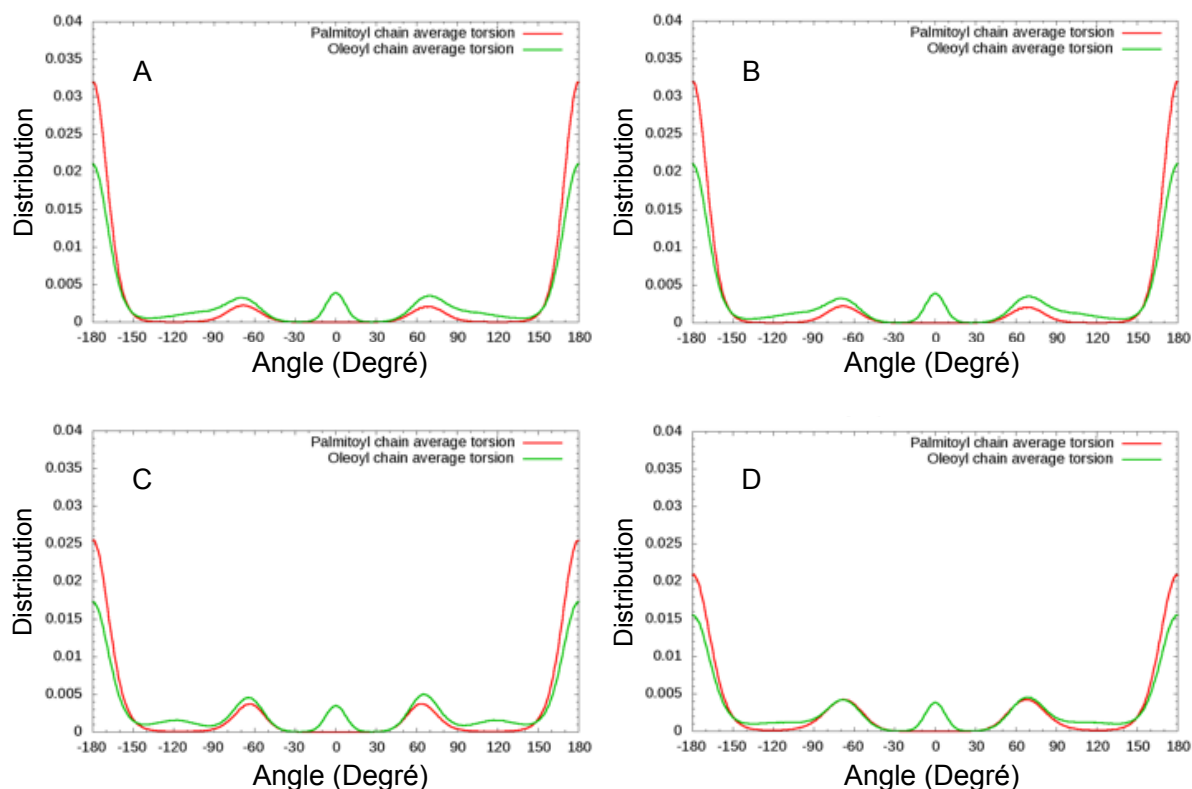


**Figure VI-38** – Comparaison des paramètres d'ordre des chaînes alkyles selon le champ de force

Le profil de paramètre d'ordre calculé avec *c27* est très similaire aux profils calculés avec GAFF, particulièrement pour la chaîne saturée. Elle est caractérisée par une forme « en cloche » et des valeurs de paramètres d'ordre élevées. Les valeurs en début de chaîne (carbones 2 à 4) sont néanmoins beaucoup plus basses que les valeurs calculées avec GAFF et le plateau caractéristique des débuts de chaîne n'est pas représenté. Le profil de la chaîne insaturée est très similaire aux profils obtenus avec GAFF mais est décalé vers des valeurs d'ordre plus importantes. Néanmoins, le caractère indépendant et très ordonné du comportement des chaînes est conservé.

Le profil de paramètre d'ordre calculé avec *c36* est nettement différent des profils calculés avec les autres champs de force. Les valeurs sont globalement plus faibles et le profil de la chaîne saturée est plus proche du profil de la chaîne insaturée. Le caractère très ordonné et indépendant de la chaîne palmitoyle est très atténué avec *c36*. Ce désordre est à corrélérer directement avec la sur-estimation de l'aire moléculaire et les distributions d'angles plus larges.

L'analyse de la distribution totale des dièdres des chaînes hydrophobes a été faite sur les deux chaînes séparément à 30 mN/m. Les résultats obtenus avec GAFF pour les systèmes *mnc* et *mnc4x* sont comparés aux résultats obtenus avec les deux versions de CHARMM (Figure VI-39).



**Figure VI-39** – Comparaison des torsions des chaînes alkyles selon le champ de force, A système 33 POPC avec GAFF, B système 132 POPC avec GAFF, C système 132 POPC avec *Charmm27* et D système 132 POPC avec *Charmm36*

Les profils de distribution sont fortement dépendants du champ de force utilisé. Pour les deux chaînes, la conformation *trans* est largement préférentielle avec GAFF, tandis que ces populations diminuent avec *c27* et *c36*. Cette tendance est particulièrement marquée pour les chaînes palmitoyles et indique que les chaînes qui étaient pratiquement en conformation *all-trans*, sont beaucoup moins étendues avec *c36*. Cette diminution des populations *trans* est compensée par une augmentation des populations *gauche*.

De plus, la population *gauche* est plus importante pour les chaînes oléoyles avec GAFF et *c27*, alors qu'elles sont similaires pour les deux chaînes avec *c36*. Ces observations sont en accord avec le degré de désordre des systèmes *c36*.

De même, la population de dièdre *skew* est beaucoup plus marquée avec *c27*. Ces populations ont des maxima centrés en  $-120^\circ$  et  $120^\circ$  alors que *c36* entraîne des populations beaucoup plus étendues similaires à celles obtenues avec GAFF.

La version *c27* de CHARMM a été optimisée pour les lipides avec des paramètres de torsion redéfinis pour les chaînes alkyles [Yin and Mackerell 1998] et la version *c36* a apporté des ajustements dans les

---

énergies de torsion et précisément sur les liaisons C-C adjacentes aux doubles liaisons C=C [Klauda *et al.* 2010].

Enfin, la ségrégation des chaînes hydrophobes est observée pour les simulations à 30mN/m avec les deux versions du champ de force CHARMM (Annexes 5 et 6). Cet agencement latéral particulier semble être indépendant des jeux de paramètres utilisés pour les simulations. Une recherche de clusters de chaîne au sein de systèmes bicouches permettrait de déterminer si cette tendance à l'agrégation est spécifique des phospholipides organisés en monocouche.

### Synthèse de l'influence du champ de force

Les champs de force GAFF et CHARMM *c27* reproduisent des isothermes pratiquement identiques. Les aires moléculaires calculées sont très similaires à l'aire moléculaire mesurée expérimentalement à la même pression. *C27* a été optimisé pour les lipides en particulier pour les chaînes alkyles. Les analyses structurales des chaînes ont montré des différences très sensibles entre ces deux champs de force. Le point important à souligner est la performance du champ de force GAFF, qui, bien que général, montre une capacité très satisfaisante à reproduire les propriétés structurales et organisationnelles des POPC organisés en monocouche et ce pour différentes pressions de surface.

La version *c36* présente davantage de différences avec GAFF que *c27*. L'aire moléculaire est largement supérieure et l'orientation du vecteur PN semble être exclusivement tournée vers le solvant. Cette version du champ de force CHARMM a été développée dans le but de simuler des systèmes de bicouche lipidiques sans imposer de tension de surface. Les modifications majeures de *c36* sont une nouvelle distribution des charges partielles et des LJ de la liaison ester, ainsi qu'une nouvelle définition des énergies de torsions. La modification de ces paramètres ont un réel impact sur la conformation des têtes polaires et entraîne un changement visible de l'organisation des lipides de la monocouche.

Les résultats peu satisfaisants de *c36* pour la simulation des monocouches vont dans le sens de l'inconsistance de la tension de surface bicouche/monocouche qui a été mentionné par Klauda *et al.* 2010 [Klauda *et al.* 2010]. Les auteurs concluent à une sous-estimation de la tension de surface des monocouches par *c36* et l'attribue à l'absence de prise en compte des interactions Lennard-Jones à grande distance. *C36* semble optimisé pour la simulation de bicouches mais ne semble pas adapté à la simulation de monocouches. Ceci renforce l'hypothèse d'une différence de comportement des lipides selon qu'ils sont organisés en bicouche ou en monocouche.



1           **Structural properties of POPC monolayers under lateral**  
2           **compression: computer simulations analysis**

3

4

5 Lucie Huynh<sup>1</sup>, Veronica Beswick<sup>2</sup>, Véronique Rosilio<sup>3</sup>, Patrick A. Curmi<sup>1</sup>, Alain  
6 Sanson<sup>2</sup> et Nadège Jamin<sup>2\*</sup>

7

8 <sup>1</sup>INSERM U829, Laboratoire Structure – Activité des Biomolécules Normales et  
9 Pathologiques, Université d'Evry-Val-d'Essonne, Evry, F-91025,ÂÂ France

10 <sup>2</sup>CEA, iBiTec-S, UMR8221, Laboratoire des Protéines Membranaires, 91191 Gif-sur-  
11 Yvette, Cedex, France

12 <sup>3</sup>Université Paris-Sud, CNRS UMR8612, Physico-chimie des surfaces, Châtenay-  
13 Malabry

14 \*To whom correspondence should be addressed

15

16

17 **ABSTRACT**

18 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), a lipid comprising a  
19 saturated and an unsaturated acyl chain, belongs to the class of  
20 glycerophosphatidylcholines, major lipids in eukaryotic cell membranes. To get  
21 insight into the structural properties of this lipid within monolayers as membrane  
22 models, we performed molecular dynamics (MD) simulations of POPC monolayers  
23 under compression at air/water interface. We performed MD simulations at 293 K  
24 and 300 K at different surface pressures using the all-atom general amber force field  
25 (GAFF). Simulated surface pressure-area isotherms were obtained for the first time,  
26 and a good agreement was found with experimental isotherms. At surface pressures  
27 higher than 15 mN/m, two orientations of the head groups clearly appear: nearly  
28 parallel to the monolayer interface and pointing toward the water. Based on the  
29 analysis of dihedral angles of the head groups, we propose that the conformational  
30 variations around the bonds connecting the phosphorus atom to the adjacent oxygen  
31 are involved in these specific orientations of the head group. The glycerol group is  
32 characterized by a large distribution of its orientations centered around 50° with  
33 respect to the normal of the monolayer. The acyl chains are predominantly in trans  
34 configuration from 7.5 to 43 mN/m surface pressures, but have distinct structural  
35 properties. The saturated chains are more affected by surface pressure than the  
36 unsaturated chains. Moreover, the calculated order parameter profiles of both chains  
37 suggest an independent behavior of the saturated and unsaturated chains that could  
38 be correlated with the formation of chain-type clusters observed along the simulated  
39 trajectories.

40

41 **1. INTRODUCTION**

42

43 Biological membranes are dynamic structures of vital importance for the cell  
44 as they are involved in numerous cellular functions such as compartmentalization,  
45 signaling and transport. They are complex assemblies of proteins, carbohydrates and  
46 lipids. Facing such a complexity, and in order to get insight into the role of the  
47 different components of membranes, models have been developed for in vitro studies  
48 of biological processes.<sup>1</sup> These models have well-defined lipid composition and can  
49 be studied under controlled conditions by a large range of biophysical techniques.

50 Among membrane models that are currently used to investigate the properties  
51 of membrane lipids, phospholipid monolayers, which consist of only one layer of  
52 lipids deposited at the air/water interface are widely used. The main advantages of  
53 such models are the control of experimental conditions as well as the control of  
54 different surface parameters such as lipid composition, physical state, lateral  
55 pressure and molecular packing. Such controls are not possible with multilamellar or  
56 unilamellar spherical membrane models formed in bulk phases. Moreover,  
57 phospholipid monolayers allow the determination of physico-chemical parameters of  
58 membrane lipids like phase transition, lateral diffusion, and interactions affecting lipid  
59 ordering and compressibility, or promoting the coexistence of lateral domains.<sup>2,3</sup>

60 Monolayers are characterized by surface pressure-area isotherms obtained by  
61 compression of the lipid films on a Langmuir trough. These compression isotherms  
62 are signatures of monolayer phase behavior and characterize interfacial properties of  
63 film forming components.<sup>4</sup> Measurement of changes in area of a monolayer upon  
64 surface pressure, lipid composition or insertion of proteins or small molecules  
65 provides indicators of lipid-lipid or lipid-molecule interactions.<sup>5,6</sup>

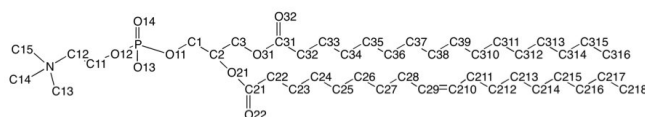
66 Such experimental characterizations can be completed by atomistic study of  
67 molecular interactions from molecular dynamic (MD) simulations. This technique  
68 provides structural details that cannot be obtained by any experimental technique  
69 and that are crucial for the understanding of interactions involving lipids, proteins  
70 and/or small molecules<sup>7-10</sup>.

71 Using an atomistic approach, MD simulations of  
72 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers showed for the first time that its  
73 phase behavior in particular, the transition from a liquid condensed phase to a liquid  
74 expanded phase can be investigated at a molecular level.<sup>11,12</sup>

75 Most of the lipid monolayer studies deal with lipids composed of two identical  
76 chains. For example, monolayers of DPPC, a lipid which comprises two saturated  
77 acyl chains and which is the major lipid component in lung surfactant has been  
78 studied in details.<sup>13</sup> Surface-pressure area isotherms of DPPC show distinct regions  
79 corresponding to the different phases at room temperature. Few studies concern  
80 mixed-acyl chains lipids, comprising a saturated and an unsaturated chain such as 1-  
81 palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC, Figure 1), the most  
82 abundant lipid in mammalian membranes<sup>14</sup>. Contrary to the DPPC isotherm, the  
83 POPC isotherm shows a liquid expanded behavior without any clear indication of a  
84 transition from a liquid-expanded to a liquid condensed phase during compression  
85 before collapse at room temperature.

86 In the present study, in order to fully characterize the conformations and  
87 organization of POPC within monolayers under compression, we perform for the first  
88 time all-atom MD simulations of POPC monolayers at different surface pressures  
89 with the general Amber force field (GAFF).

90 We first compare our calculated average surface area per lipid under  
 91 compression at seven different values of the surface pressure with experimental data  
 92 obtained for Langmuir POPC monolayers. Then, we present a detailed  
 93 conformational analysis of POPC lipids within monolayer under compression. This  
 94 analysis includes the orientation, dihedral angles and hydration of the head groups,  
 95 the orientation of the glycerol group as well as the orientation, order parameter,  
 96 dihedral angles and conformations of the acyl chains. Finally, we describe the  
 97 clustering of the acyl chains within the monolayers.



98

99

100 **Figure 1.** Chemical structure of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine  
 101 (POPC). The atom numbering scheme used is that defined by Sundaralingam<sup>15</sup>.

102

## 103 2. METHODS

104

105 **2.1. Experimental isotherm.** POPC was provided by Avanti Polar Lipids. Chloroform  
 106 and methanol used for monolayer spreading were analytical grade from VWR  
 107 International.

108 A homemade auto-recording Langmuir trough coupled to a R&K Wilhelmy  
 109 device (Riegler and Kirstein, GmbH, Germany), and enclosed in a plexiglas box was  
 110 used to record compression isotherms of POPC monolayers<sup>16</sup>. In these experiments,  
 111 a chloroform solution containing the phospholipids was deposited onto ultrapure  
 112 water (160 cm<sup>3</sup>, 217.2 cm<sup>2</sup>) by means of a micropipet (Microman Gilson). The  
 113 ultrapure water (pH = 5.5 and a value of 72.0 mN/m of the surface tension  $\gamma$  at 295 K)  
 114 was produced by a Synergy 185 Millipore apparatus coupled with RiOs5, with a

115 resistivity of 18.2 M $\Omega$ /cm. Prior to each experiment, the water surface was swept with  
116 a capillary pipette connected to a vacuum pump. After deposition of the solution, the  
117 solvents were allowed to evaporate for 15 min. Compression of the monolayer (9.57  
118 cm<sup>2</sup>/min) was then performed at 293  $\pm$  1 K.

119

120 **2.2. Simulation systems.** The symmetric system setup is composed of two POPC  
121 monolayers separated by a water slab, with a vacuum space above each monolayer  
122 as proposed by Feller and coworkers<sup>17</sup> and shown in Figure 2. The monolayers are  
123 composed of 33 lipids each and the area per lipid was set initially to 110  $\text{\AA}^2$ . This  
124 value corresponds to the value of the experimental area at the beginning of the  
125 compression process. The head groups are facing each other and are initially  
126 separated by a  $\sim$  2 nm thick water slab (3457 water molecules). The lipid chains are  
127 separated across a periodic boundary by a  $\sim$ 3 nm thick vacuum space.

128 **2.3 Simulation protocols.** The system previously described was pre-equilibrated in  
129 the NPAT ensemble (constant number of molecules, constant pressure, area and  
130 temperature) at 300 K for 20 ns (see details in section 2.4) and the resulting system  
131 was used as the starting point for the simulations described below.

132 In order to calculate different points of the surface pressure-area isotherm,  
133 seven molecular dynamics simulations were then performed in the NP $\gamma$ T ensemble  
134 (constant number of molecules, constant pressure, surface tension and temperature)  
135 at 300 K for 200 ns and at different surface tension values. For each surface  
136 pressure (7.5, 10, 15, 20, 30, 40 and 43 mN/m), the surface tension  $\gamma$  applied to the  
137 system was calculated from  $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ , where  $\Pi$  is the surface pressure and  $\gamma_0$  the  
138 surface tension of pure water at the air/water interface (71.8 mN/m at 298 K)<sup>5</sup>.

139 The systems converged from the initial configuration to an equilibrated  
140 configuration only for the MD simulations performed at values of surface pressure of  
141 20 and 30 mN/m. Therefore, for the MD simulations performed at 15, 10 or 7.5 mN/m,  
142 the starting point was the configuration of the system at the end of the MD simulation  
143 performed at a surface pressure value of 20, 15 or 10 mN/m, respectively. For the  
144 MD simulations performed at 40 and 43 mN/m, the starting point was the  
145 configuration at the end of the MD simulations performed at 30 mN/m and 40 mN/m,  
146 respectively.

147 For each surface pressure (10 to 43 mN/m), we also performed MD  
148 simulations at 293 K. The starting point was the configuration at the end of the MD  
149 simulations performed at 300 K and at the same surface pressure.

150 **2.4. Simulation details.** Topology, parameter and coordinate input files were created  
151 using the LEaP program from the AmberTools 1.5.4. package<sup>18,19</sup> and were  
152 converted into GROMACS format using AcPype.<sup>20</sup>

153 Molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS  
154 simulation package (version 4.5.5.)<sup>21</sup> with the GAFF all-atom potential energy set for  
155 POPC<sup>22</sup>, and TIP3P water model. Newton's equations of motion were integrated  
156 using the leap-frog algorithm with a 1 fs time step and with the neighbour list updates  
157 every 5 fs. The NPAT and the NP $\gamma$ T simulations were carried out for 20 and 200 ns,  
158 respectively and, the coordinates were saved every 50 ps. Simulations were carried  
159 out with periodic boundary conditions with an orthogonal lattice and with the z axis  
160 normal to the interface. Electrostatic interactions were calculated via the particle  
161 mesh Ewald (PME) method<sup>23</sup> and a 11 Å cut-off. Van der Waals interactions were  
162 calculated with a 6-12 Lennard-Jones potential and were switched off over a distance  
163 of 1 Å, between 8 and 9 Å.<sup>24</sup>

164           During all MD simulations, temperature was maintained at 300 K or 293 K.  
165   Temperature coupling uses velocity rescaling with a stochastic term<sup>25</sup> and with a time  
166   constant for coupling of 0.1 ps. Water and POPC were included in separate  
167   temperature coupling groups.

168           For the NPAT simulation, the z pressure was set to 1 bar and semiisotropic  
169   coupling of pressure maintained the x and y dimensions constant. The Berendsen  
170   pressure coupling was used with a 5 ps time constant and the value of the  
171   compressibility was set to  $4.5 \times 10^5 \text{ bar}^{-1}$  in the z dimension and to  $0 \text{ bar}^{-1}$  in the x  
172   and y directions.

173           For the NP $\gamma$ T simulations, a surface tension was applied to the monolayers  
174   with a surface tension coupling which uses normal pressure coupling for the z  
175   direction, while the surface tension is coupled to the x and y dimensions of the  
176   simulated box. This semiisotropic coupling of pressure maintained z dimension  
177   constant while the ratio of the x and y dimensions remain constant as the lateral  
178   pressure varied. For all simulations, the z pressure was fixed to 1 bar. The  
179   Berendsen pressure coupling was used with a 5 ps time constant and the  
180   compressibility values were set to  $0 \text{ bar}^{-1}$  in the z dimension and to  $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  in  
181   the x and y dimensions.

182           All the calculations were performed with the supercomputing resources  
183   available at the CCRT (Centre de Calcul Recherche et Technologie, CEA, France).

184   **2.5. Analysis.** The value of the molecular area per lipid (A) is used to evaluate the  
185   equilibration of simulations of lipid bilayer or monolayer and it is characteristic of a  
186   lipid at a given phase. The area per lipid was calculated at different values of the  
187   surface pressure by dividing the product of the x and y dimensions of the simulated  
188   box by the number of POPC per monolayer.



189           The simulations at each surface tension were performed for 200 ns. The  
190 molecular area per lipid reached equilibrium during the first 50 ns (Figure S1).  
191 Therefore, considering this long equilibration time, all the analyses of the trajectories  
192 were calculated over the last 150 ns of the trajectories. These analyses were  
193 performed using the GROMACS analysis tools. Graphical representations of the  
194 system were achieved with VMD software.<sup>26</sup>

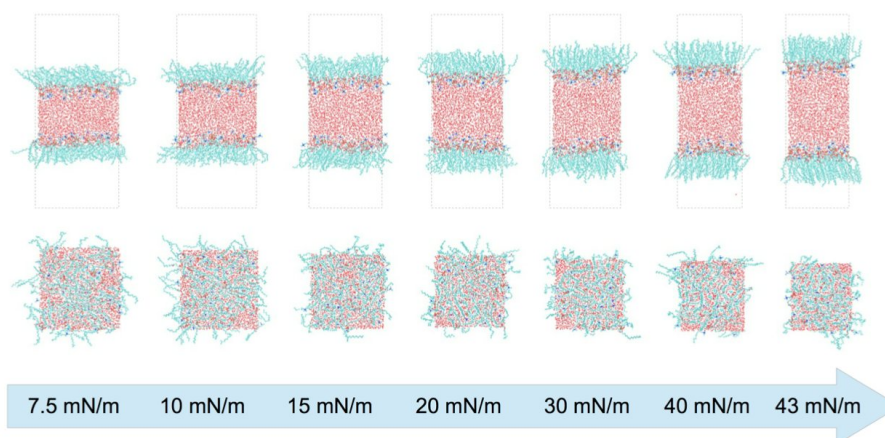
195

### 196 **3. RESULTS**

197

198           To illustrate the monolayer structures at different surface pressures,  
199 snapshots of the different systems are shown in Figure 2. These snapshots were  
200 taken at the end of the 200 ns simulation runs at surface pressure values of 7.5, 10,  
201 15, 20, 30, 40 and 43 mN/m. They illustrate the decrease of the x and y dimensions  
202 as the surface pressure increases. This decrease comes with an increase of the z  
203 dimension of the water slab (from 2 to 4 nm as the pressure surface varies from 7.5  
204 to 43 mN/m) because the system was simulated at constant particle number N,  
205 constant normal pressure P, constant surface tension  $\gamma$  and constant temperature T  
206 (NP $\gamma$ T). These snapshots also clearly show the variations of the lipid conformations  
207 with the surface pressure, in particular the lipid hydrophobic chains seem to  
208 straighten with increasing compression.

209



210

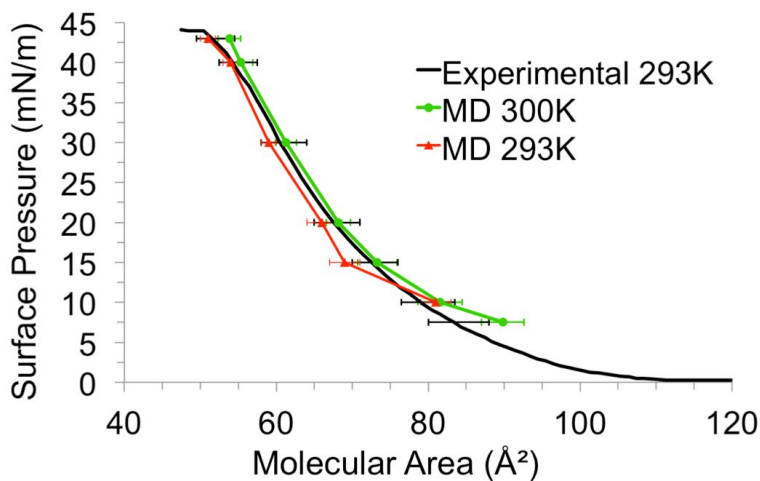
211 **Figure 2.** Snapshots of POPC monolayers at different surface pressures and at 300  
212 K. Lateral views (top) and top views (bottom) of the symmetric monolayer system.  
213 Oxygen atoms are colored in red, carbon in cyan and nitrogen in blue.

214

215 **3.1. Surface pressure-Area isotherm.** The experimental surface pressure –  
216 area isotherms provide a straightforward characterization of physico-chemical  
217 properties of phospholipid monolayers. The experimental surface pressure - area  
218 isotherm of POPC monolayers recorded at 293 K is reported in Figure 3. At high  
219 molecular areas, the monolayers are nearly in a gas phase. Upon increasing surface  
220 pressure, molecular areas decrease, and POPC monolayers in the liquid expanded  
221 state can be compressed up to the lateral pressure of 44 mN/m, corresponding to an  
222 area of about  $50 \text{ \AA}^2$  per lipid before collapse occurs.

223

10 / 45



224

225 **Figure 3.** Comparison of simulated and experimental surface pressure-area  
 226 isotherms for pure POPC monolayers. The black line corresponds to the average  
 227 experimental isotherm calculated as the mean values of four isotherms recorded at  
 228 293 K. Red (▲) and green (●) points correspond to simulated data at 293 K and 300  
 229 K, respectively. Lines connecting the calculated values are guides to eyes to facilitate  
 230 the reading of the graph.

231

232 To validate our monolayer models obtained from molecular dynamics  
 233 simulations, we calculated the average surface area per lipid at different values of the  
 234 surface pressure and compared them with the experimental ones. The average  
 235 surface area per lipid along the simulation runs at different surface pressure values  
 236 are reported in the Supporting Information S1. As a matter of fact, by monitoring the  
 237 surface area per lipid along the 200 ns simulated trajectories, we observed that the  
 238 first 50 ns of the simulations must be discarded from the analysis as the system has  
 239 not yet reached its equilibrated state.

240 As shown in Figure 3 (see also Table S1 in the Supporting Information), the  
241 calculated surface areas per lipid at 293 K agree well with the experimental data for  
242 surface pressures from 10 to 43 mN/m.

243 Although monolayers and bilayers are quite different lipid systems, the surface  
244 pressure of 30 mN/m has been considered in the literature as the pressure at which  
245 comparison of the two systems could be done.<sup>2,27</sup> At this surface pressure, the  
246 calculated surface area per lipid is 59 (+/- 1) Å<sup>2</sup>, a value within the range of  
247 experimental value (58 Å<sup>2</sup> at 303 K and 65 Å<sup>2</sup> at 297 K for POPC monolayer<sup>28,29</sup> and  
248 68.5 Å<sup>2</sup> at 303 K for POPC bilayer<sup>30</sup>) found in the literature and, also within the range  
249 of calculated values, 60 Å<sup>2</sup> at 300 K and 63 Å<sup>2</sup> at 303 K, obtained from POPC bilayer  
250 simulations<sup>31,32</sup>.

251 Therefore, we can consider that for surface pressure from 10 to 43 mN/m, our  
252 simulated data are in agreement with the experimental data at the same temperature.

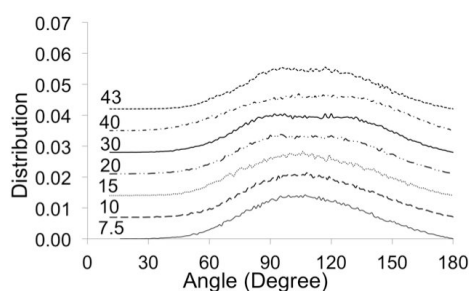
253 As shown in Figure 3 (see also Table S1), the surface areas calculated at 300  
254 K are also consistent with the experimental data at 293 K, especially for surface  
255 pressures from 10 to 40 mN/m. At the lowest and highest surface pressures i.e. 7.5  
256 and 43 mN/m respectively, the surface areas per lipid are slightly greater than the  
257 experimental values, 90 (+/- 3) Å<sup>2</sup> instead of 84 (+/- 2) Å<sup>2</sup> at 7.5 mN/m and, 54 (+/- 2)  
258 Å<sup>2</sup> instead of 51 (+/- 2.5) Å<sup>2</sup> at 43 mN/m. At 30 mN/m and at 300 K, the calculated  
259 surface area per lipid is 61 (+/- 1) Å<sup>2</sup>, a value within the range of experimental values  
260 found in the literature for bilayer<sup>30</sup> and similar to the value at 293 K measured  
261 experimentally (62 (+/- 3) Å<sup>2</sup>).

262 The calculated molecular areas are slightly larger at higher temperature (300  
263 K) than at lower temperature (293 K). Their fluctuations also follow the same trend: 2-

264 3 Å<sup>2</sup> at 300 K compared to 1-2 Å<sup>2</sup> at 293 K. Therefore, if we take into account these  
265 fluctuations then the shift between the two isotherms is negligible.

266 All the detailed analyses of the conformations of the lipids were performed on  
267 the system simulated at 300 K in order to facilitate the comparison of our results with  
268 data reported in the literature.

269 **3.2. Head group orientation.** POPC head group is zwitterionic and has a dipole  
270 moment along the PN vector, defined as the vector connecting the phosphorus atom  
271 P and the nitrogen atom N. The orientation of phospholipid head groups contributes  
272 to the electrostatic potential across the lipid monolayer. This orientation is defined by  
273 the angle between the monolayer normal and the P–N vector such that a PN tilt  
274 angle value of 90° corresponds to the orientation of the PN vector lying on the  
275 monolayer surface and a PN tilt angle greater than 90° corresponds to a PN vector  
276 pointing toward the solvent. The PN tilt angle was calculated for each phospholipid  
277 over the last 150 ns of the simulated trajectories. The distributions of the PN tilts are  
278 large and centered around 110° (Figure 4). At surface pressures greater than 15  
279 mN/m, two distributions with similar population clearly appear centered around 90°  
280 and 130°. The first value, 90°, is consistent with the values found in the literature for  
281 the orientation of the PN vector of POPC bilayers, mentioning an orientation of the  
282 PN vector nearly parallel to the interface.<sup>31,33,34</sup> The second distribution centered  
283 around 130° indicates the presence of an additional population having their choline  
284 groups pointing toward the water.



285

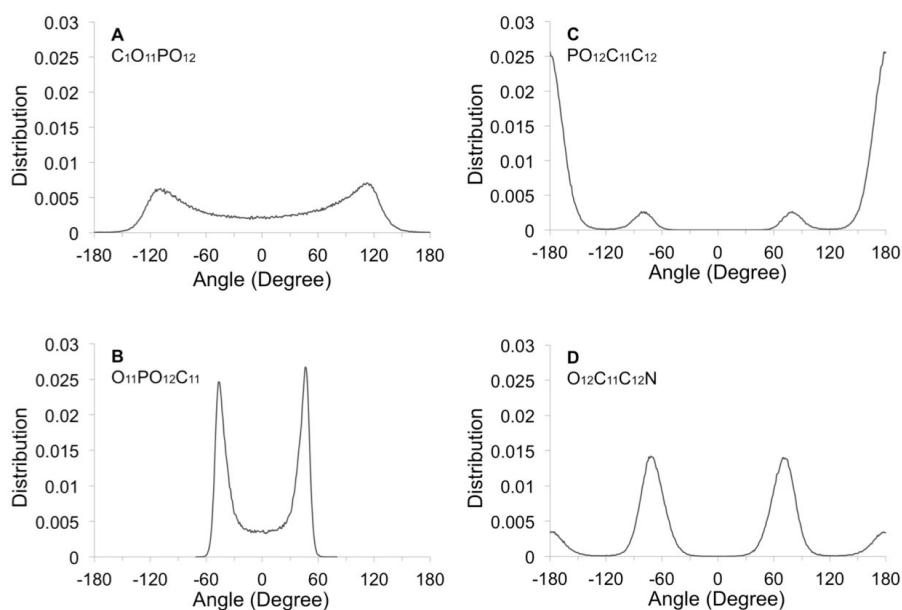
286 **Figure 4.** PN tilt angle distribution at different surface pressures. The PN tilt angle is  
287 defined by the angle between the monolayer normal and the P-N vector. The P-N  
288 vector connects the phosphorus and the nitrogen atoms of the phosphocholine  
289 group. The temperature is 300 K. For better clarity, the distributions at surface  
290 pressure greater than 7.5 mN/m have been vertically shifted from each other by  
291 0.007 unit.

292

293 **3.3. Head group dihedral angles.** In order to gain insight into the conformations  
294 responsible for the bimodal distribution of the PN tilts, we performed an analysis of  
295 the dihedral angles of the head group for the monolayers at a surface pressure of 30  
296 mN/m. We calculated the distributions of four dihedral angles of the polar head  
297 group: the torsion angles defined by the vectors  $C_1O_{11}$  and  $PO_{12}$  (noted  $C_1O_{11}PO_{12}$ ,  
298 Figure 5 A), the vectors  $O_{11}P$  and  $O_2C_{11}$  (noted  $O_{11}PO_{12}C_{11}$ , Figure 5 B), the vectors  
299  $PO_{12}$  and  $C_{11}C_{12}$  (noted  $PO_{12}C_{11}C_{12}$ , Figure 5 C) and the vectors  $O_{12}C_{11}$  and  $C_{12}N$   
300 (noted  $O_{12}C_{11}C_{12}N$ , Figure 5 D).

301

302



303

304 **Figure 5.** Distributions of head group dihedral angles. A: torsion angle defined by the  
 305 vectors  $C_1O_{11}$  and  $PO_{12}$ . B: torsion angle defined by the vectors  $O_{11}P$  and  $O_{12}C_{11}$ . C:  
 306 torsion angle defined by the vectors  $PO_{12}$  and  $C_{11}C_{12}$ . D: torsion angle defined by the  
 307 vectors  $O_{12}C_{11}$  and  $C_{12}N$ .

308

309 The distributions of these four dihedral angles have well defined maxima but  
 310 for two of these dihedral angles, an additional large distribution of angle values can  
 311 be found. These additional distributions could be correlated to the bimodal  
 312 distribution of the PN tilts. As a matter of fact, the distributions of the dihedral angles  
 313  $PO_{12}C_{11}C_{12}$  and  $O_{12}C_{11}C_{12}N$  show two populations of dihedral angles: a gauche  
 314 population centered at about  $-60^\circ$  and  $60^\circ$  and a trans population centered at  $-180^\circ$   
 315 and  $180^\circ$  (Figure 5 C and 5 D). The distribution of the dihedral angle  $C_1O_{11}PO_{12}$  has  
 316 two maxima centered around  $-120^\circ$  and  $+120^\circ$  and, an additional distribution of

317 conformations with dihedral angles spread between  $-120^\circ$  and  $+120^\circ$  (Figure 5 A).  
318 The distribution of the dihedral angle  $O_{11}PO_{12}C_{11}$  has two maxima around  $-50^\circ$  and  
319  $+50^\circ$  and also a secondary population with dihedral angles spread between  $-40^\circ$  and  
320  $+40^\circ$  (Figure 5 B).

321 **3.4. Glycerol tilt.** The glycerol group of the lipid links the head group, constituted by  
322 the phosphate group and the choline group, to the hydrophobic tails. Thus, the  
323 orientation of this group impacts the orientation of both the head group and the acyl  
324 tails. The distribution of the glycerol tilts with respect to the interface normal,  
325 calculated as the angles between the vector connecting the carbon atoms C1 and C3  
326 and the monolayer normal, is plotted for each surface pressure in Figure 6. The  
327 distributions are large and centered around  $50^\circ$ . This is quite different from the  
328 results for a DPPC bilayer where glycerol are described as parallel with respect to  
329 the bilayer normal<sup>33</sup>, an orientation that was proposed for other phospholipids<sup>35</sup>. It  
330 should be noticed that the distribution of the glycerol tilt is particularly large at 40  
331 mN/m. Moreover, at 43 mN/m, the profile of the glycerol tilt distribution is quite  
332 distinguishable from the profiles obtained at the other values of surface pressure. As  
333 a matter of fact, a distribution centered around  $20^\circ$  seems to co-exist with the  
334 distribution centered at about  $50^\circ$ .

335

336

337

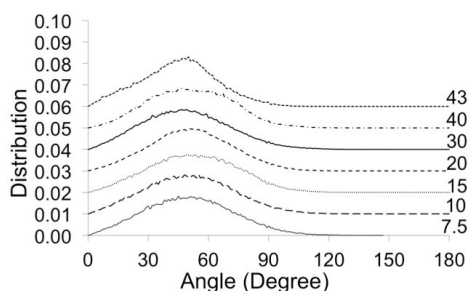
338

339

340

341





342

343 **Figure 6.** Glycerol tilt angle distribution at different surface pressures. The glycerol tilt  
 344 angle is defined by the angle between the vector  $C_1C_3$  and the monolayer normal.  
 345 The vector  $C_1C_3$  connects the first and the third carbon atoms of the glycerol group.  
 346 The temperature is 300 K. For better clarity, the distributions at surface pressure  
 347 greater than 7.5 mN/m have been vertically shifted from each other by 0.01 unit.

348

349 **3.5. Head group hydration.** The hydration of the head group is quantified by the  
 350 radial distribution of the water oxygen atoms around the phosphorus and nitrogen  
 351 atoms of the head group.

352 The radial distribution function  $g(r)$  is defined as:

353 
$$g(r) = \frac{N(r)}{4 \pi^2 \rho d(r)}$$

354 where  $N(r)$  is the number of water oxygen atoms in a spherical shell at the distance  $r$   
 355 of a phosphorus or nitrogen atoms,  $d(r)$  is the thickness of the shell and  $\rho$  the density  
 356 calculated as the ratio of the number of atoms to the volume of the computing box.

357 The radial distribution of oxygens of water molecules around phosphorus ( $g_{P-OW}(r)$ )  
 358 and nitrogen atoms ( $g_{N-OW}(r)$ ) were calculated for each surface pressure. The first  
 359 coordination peak of the radial distribution functions  $g_{P-OW}(r)$  and  $g_{N-OW}(r)$  were at  
 360 0.40 nm and 0.45 nm respectively (data not shown) and, the integration of these  
 361 peaks gives the number of water molecules of the first hydration shell of the

362 phosphorus and nitrogen atoms respectively (Table 1). This number is greater for  
 363 the first hydration shell of nitrogen atoms than for the first hydration shell of  
 364 phosphorus atoms. This is in agreement with the fact that the ammonium groups are  
 365 much more exposed to solvent than phosphate groups although they are screened  
 366 by the presence of the bulky methyl groups. The first coordination peak of the radial  
 367 distribution functions  $g_{N-OW}(r)$  is much larger than that of  $g_{P-OW}(r)$  (data not shown).  
 368 Therefore, nitrogen atoms are more hydrated but with less specific interactions than  
 369 the hydrogen-bonded hydration first shell around phosphorus atoms<sup>36</sup>.  
 370

Surface Pressure (mN/m)	Averaged number of water molecules around	
	P	N
7.5	6.2	23.6
10	6	23.1
15	5.8	22.3
20	5.6	21.9
30	5.4	20.9
40	5.2	20.1
43	5.1	19.7

371  
 372 Table 1 – Head group hydration. Averaged number of water molecules of the first  
 373 hydration shell of the phosphorus and nitrogen atoms at different surface pressures.  
 374 The temperature is 300 K.

375  
 376 The increase of the surface pressure leads to a smaller number of water  
 377 molecule around the phosphorus and nitrogen atoms as reported in Table 1. There is  
 378 a dehydration of the POPC head group as the surface pressure increased.

379 At 30 mN/m, the number of water molecules around phosphorus and nitrogen  
380 atoms is respectively 5.4 and 20.9. These numbers are similar to the number of  
381 water molecules found around these atoms for POPC bilayers at the same  
382 temperature.<sup>32</sup>

383 **3.6. Acyl chain tilt.** We evaluated the orientation of the acyl chains with respect to  
384 the monolayer normal at different surface pressures. Because the presence of the cis  
385 double-bond between the carbon atoms C<sub>9</sub> and C<sub>10</sub> of the oleoyl chain enables this  
386 chain to adopt a large number of conformations, we considered the orientation of two  
387 vectors of the acyl chains: the vector C<sub>22</sub>C<sub>29</sub> (or C<sub>32</sub>C<sub>39</sub>) connecting the C<sub>22</sub> (or C<sub>32</sub>)  
388 and C<sub>29</sub> (or C<sub>39</sub>) atoms and the vector C<sub>29</sub>C<sub>218</sub> (C<sub>39</sub>C<sub>216</sub>) connecting the C<sub>29</sub> (or C<sub>39</sub>)  
389 and C<sub>218</sub> (or C<sub>316</sub>) atoms. Therefore, we calculated the distribution of the angles of  
390 these two vectors with respect to the monolayer normal along the last 150 ns  
391 simulation runs performed at different surface pressures. The maximum of these  
392 distributions for different surface pressures are reported in Table 2. All the tilts  
393 decrease when the surface pressure increases. The values of the tilts of the C<sub>22</sub>C<sub>29</sub>  
394 and C<sub>32</sub>C<sub>39</sub> vectors with respect to the monolayer normal and their variation upon  
395 increasing the surface pressure are similar: the tilt values decrease from about 50°  
396 for a surface pressure of 7.5 mN/m to about 20° at a surface pressure value of 43  
397 mN/m. The value of the angle of the C<sub>29</sub>C<sub>218</sub> vector of the oleoyl chain with respect to  
398 the monolayer normal is higher than the value of the angle of the C<sub>39</sub>C<sub>316</sub> vector of  
399 the palmitoyl chain at low surface pressure. This difference decreases when the  
400 surface pressure increases, from 10° at a surface pressure of 7.5 mN/m to 2° at a  
401 surface pressure of 43 mN/m.

402

403

404

405

Surface pressure (mN/m)	Palmitoyl tilt (degree)		Oleoyl tilt (degree)	
	C32C39	C39C316	C22C29	C29C218
7.5	50	54	47	64
10	48	51	46	58
15	40	40	40	48
20	35	35	33	43
30	30	30	30	35
40	22	21	21	25
43	20	20	20	22

406

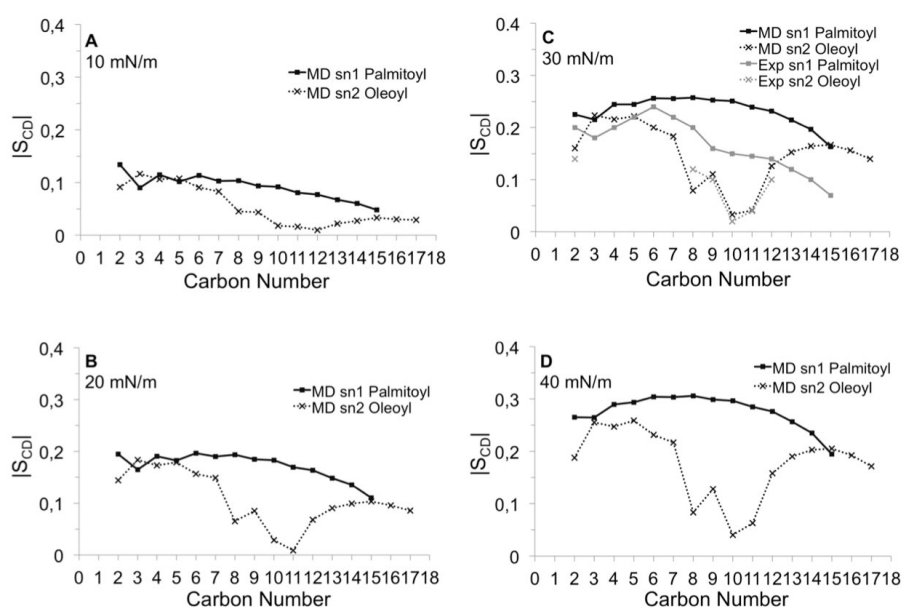
407 Table 2 – Acyl chain tilts.  $C_{32}C_{39}$  and  $C_{39}C_{316}$  are the angles between the vector  
 408 connecting  $C_{32}$  and  $C_{39}$  and,  $C_{39}$  and  $C_{316}$ , respectively, for the palmitoyl chain with  
 409 respect to the monolayer normal.  $C_{22}C_{29}$  and  $C_{29}C_{218}$  are the angles between the  
 410 vector connecting  $C_{22}$  and  $C_{29}$  and,  $C_{29}$  and  $C_{218}$ , respectively, for the oleoyl chain  
 411 with respect to the monolayer normal.

412

413 **3.7. Acyl chain order parameters.** The ordering of the palmitoyl (*sn*-1) and oleoyl  
 414 (*sn*-2) acyl chains in the monolayers can be illustrated by the deuterium order  
 415 parameters,  $S_{CD}$ , as a function of the carbon position along the aliphatic chain. The  
 416 order parameter  $S_{CD}$  of a deuterated methylene group is a measure of the  
 417 orientational mobility of the CD vector connecting the carbon and deuterium atoms  
 418 and is defined as

419 
$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$$

420 where  $\theta$  is the angle between the CD vector and a reference axis i.e. the monolayer  
 421 normal. The angular brackets indicate an ensemble average for all molecules and  
 422 time. The  $|S_{CD}|$  profiles of the *sn*-1 and *sn*-2 acyl chains of POPC in the monolayers  
 423 at surface pressure values of 10, 20, 30 and 40 mN/m are presented in Figure 7. The  
 424 experimental  $|S_{CD}|$  profiles based on deuterium NMR measurements of a POPC  
 425 bilayer at 300 K<sup>37</sup> is also reported in Figure 7 C for comparison.



426  
 427 **Figure 7.** Deuterium order parameter  $|S_{CD}|$  profiles of the *sn*-1 (■) and *sn*-2 (x) acyl  
 428 chains at various surface pressures. Panel C: the experimental  $|S_{CD}|$  profile<sup>37</sup> is  
 429 colored in grey. The temperature is 300 K. Lines connecting each values of  $|S_{CD}|$  are  
 430 guides to eyes to facilitate the reading of the graph.

431  
 432 As shown in Figure 7, when the surface pressure increases, the  $|S_{CD}|$  values  
 433 increase indicating that the acyl chains get more ordered with compression. At a low  
 434 surface pressure value of 10 mN/m, the  $|S_{CD}|$  values of both chains are lower than

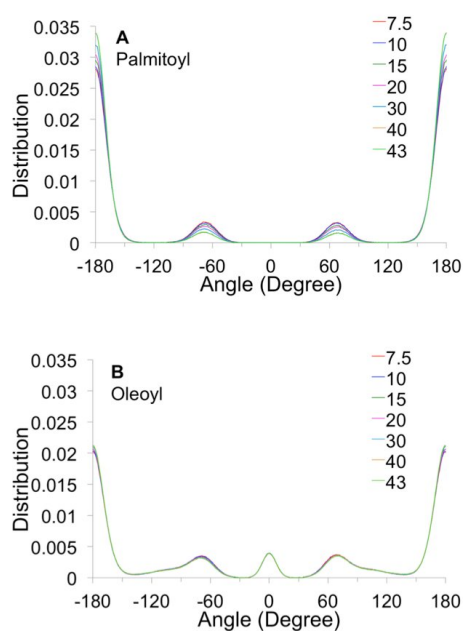
435 0.15 which indicates that the acyl chains are widely disordered (Figure 7 A). At 20  
436 mN/m surface pressure, the  $|S_{CD}|$  values are greater compared to their values at 10  
437 mN/m surface pressure and, the  $|S_{CD}|$  profile of the *sn-1* chain shows a plateau for  
438 carbons number 2 to 11. Moreover, the  $|S_{CD}|$  profile of the *sn-2* chain clearly shows  
439 its characteristic profile for carbons number 9 to 12, around the cis double bond  
440 (Figure 7 B).

441 At 30 mN/m surface pressure (monolayer-bilayer equivalence pressure), a  
442 very good agreement is found between the experimental  $|S_{CD}|$  values of the *sn-2*  
443 chain in a POPC bilayer and the calculated  $|S_{CD}|$  values of this chain (Figure 7 C).  
444 For the *sn-1* chain, all the calculated  $|S_{CD}|$  values are greater than the experimental  
445 ones. The  $|S_{CD}|$  profile of the *sn-1* chain has the same shape as the experimental  
446 one up to carbon number 6 and then, for the chain tail (carbon numbers > 7) the two  
447 profiles greatly differ.

448 At 40 mN/m and 30 mN/m surface pressures, the  $|S_{CD}|$  profile have the same  
449 shape but the  $|S_{CD}|$  values are greater at 40 mN/m than at 30 mN/m surface pressure  
450 (Figure 7 D).

451 **3.8. Acyl chain dihedral angles.** To get insight into correlations between the  
452 ordering and the conformations of the acyl chains, we calculated the dihedral angles  
453 of the lipid tails. For each value of the surface pressure, the average values of each  
454 dihedral angle of the oleoyl or palmitoyl chains were calculated every 50 ps along the  
455 last 150 ns of the trajectory and the distribution of these averaged values is reported  
456 in Figure 8. For the saturated palmitoyl chain, the dihedral angle distribution shows  
457 two peaks corresponding to trans and gauche conformers with a predominant  
458 distribution of trans conformer. This dihedral angle distribution is clearly dependent  
459 on the value of the surface pressure. As a matter of fact, the number of gauche

460 conformers decreases with the increase of the surface pressure, (from 19% at 7.5  
 461 mN/m to 9% at 43 mN/m) while the number of trans conformers increases (from 81%  
 462 at 7.5 mN/m to 92% at 43 mN/m) (Table S2). This variation is in agreement with  
 463 previous data showing that saturated chains tend to maximal extension upon  
 464 decreasing the molecular area.<sup>38</sup>



465

466

467 **Figure 8.** Acyl chain dihedral angle distributions at different surface pressures. A:  
 468 Distribution of palmitoyl chain dihedral angles. B: Distribution of oleoyl chain dihedral  
 469 angles. The distribution of dihedral angles was calculated at 7.5 mN/m (red),  
 470 10mN/m (blue), 15 mN/m (green), 20mN/m (magenta), 30 mN/m (cyan), 40 mN/m  
 471 (orange), 43 mN/m (light-green). The temperature is 300 K.

472

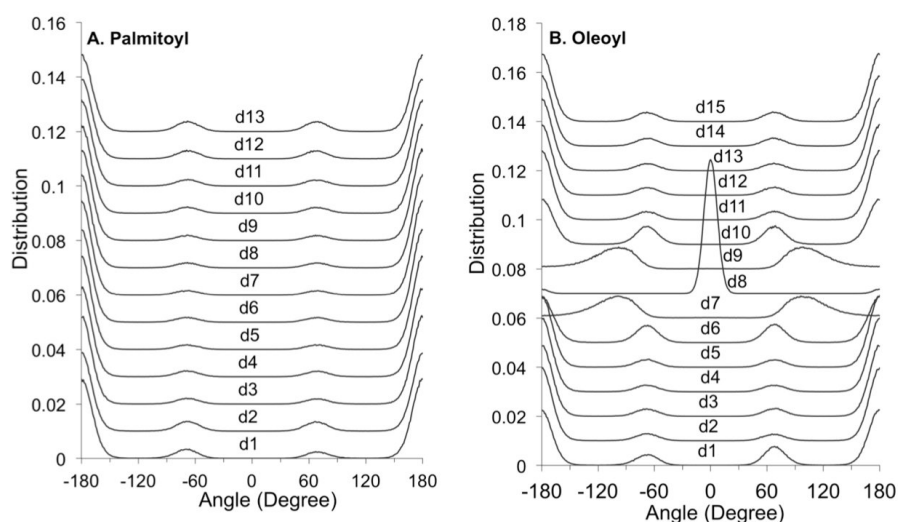
473 For the unsaturated oleoyl chain, the dihedral angle distribution presents a cis  
474 population corresponding to the cis carbon double-bond. The percentage of trans  
475 conformers varies slightly from 65% at 7.5 mN/m to 67% at 43 mN/m and, the  
476 percentage of gauche conformers from 23% at 7.5 mN/m to 21% at 43 mN/m. For  
477 comparison, in the case of a simulated POPC bilayer the percentage of trans  
478 conformers is 75 % and 64 % for the palmitoyl and oleoyl chain, respectively and, the  
479 percentage of gauche conformers is 25% and 29 % for the palmitoyl and oleoyl  
480 chain, respectively, at 310 K<sup>39</sup>. Therefore, this comparison suggests that POPC acyl  
481 chains adopt a more extended conformation in monolayer than in bilayer. Moreover,  
482 compared to the palmitoyl dihedral angle distribution, the oleoyl dihedral angle  
483 distribution shows an additional population of torsional angle with values between 90°  
484 and 150°.

485 The plots of the distributions of each dihedral angle for both acyl chains (13  
486 and 15 dihedrals for the palmitoyl and oleoyl chains, respectively) at 30 mN/m  
487 surface pressure provide a more detailed description of dihedral angles as reported  
488 in Figure 9. The first dihedral angle between the first segments (C<sub>21</sub>C<sub>22</sub>C<sub>23</sub>C<sub>24</sub> or  
489 C<sub>31</sub>C<sub>32</sub>C<sub>33</sub>C<sub>34</sub> torsion angle between the C<sub>21</sub>C<sub>22</sub> and C<sub>23</sub>C<sub>24</sub> or C<sub>31</sub>C<sub>32</sub> and C<sub>33</sub>C<sub>34</sub>  
490 vectors of oleoyl and palmitoyl chain, respectively) of each chain is named d1 and  
491 the following dihedrals are named d2 (C<sub>22</sub>C<sub>23</sub>C<sub>24</sub>C<sub>25</sub> or C<sub>32</sub>C<sub>33</sub>C<sub>34</sub>C<sub>35</sub>), d3....

492 Palmitoyl chains are in an extended conformation as only about 10 % of  
493 gauche conformers are present for all the dihedral angles except for the first (d1 and  
494 d2) and last (d12 and d13) ones for which the percentages of gauche conformers are  
495 15 +/- 3 % and 20 +/- 3 % for d1 and d2, respectively, and 17 % and 21 % for d12  
496 and d13, respectively (see Figure S2). These percentages of gauche defaults along



497 the chain are comparable to what has been observed in a previous work on POPC  
 498 bilayer<sup>31</sup>.  
 499



500

501 **Figure 9.** Distribution of the different dihedral angles of the acyl chains at 30 mN/m  
 502 surface pressure. The temperature is 300 K. The palmitoyl chain has 13 dihedrals  
 503 (named d1 to d13, d13 is the dihedral angle at the end of the chain). The oleoyl chain  
 504 has 15 dihedrals (d1 to d15, d15 is dihedral angle at the end of the chain). For better  
 505 clarity, the distributions have been vertically shifted from each other by 0.01 unit.

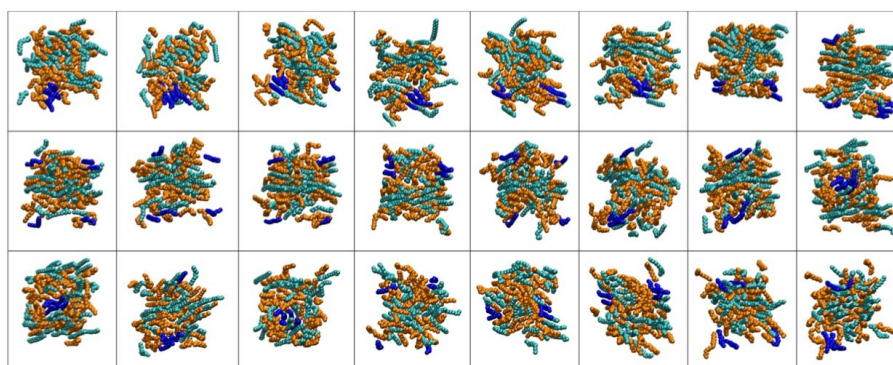
506

507 For the oleoyl chains, all the dihedral angles have about 85 % of trans  
 508 conformers except for d8 whose values are characteristic of a cis conformation and  
 509 also for the dihedral angles next to the double bond (d6, d7, d9, d10). Moreover, the  
 510 first dihedral angle presents more gauche defaults (33%). d6 and d10 present larger  
 511 amount of gauche defaults (26 % and 40 % for d6 and d10, respectively) than the  
 512 other dihedral angles (See figure S2). d7 and d9, next to the cis double bond have

513 distributions centered around  $120^\circ$  and  $-120^\circ$ , corresponding to skew conformers<sup>40</sup>  
514 and contribute to the additional torsion angle population with angle values between  
515  $90$  and  $150^\circ$  (and  $-90^\circ$  and  $-150^\circ$ ) depicted in Figure 8.

516

517 **3.9. Acyl chain clusters.** Monitoring of the acyl chains during the time evolution of  
518 the simulations at all the surface pressure leads to the observation of preferred local  
519 arrangements of the acyl chains. In order to provide a visualization of this  
520 observation, snapshots taken every 2 ns during the last 50 ns of the simulation  
521 performed at 30 mN/m surface pressure, are displayed in Figure 10. These  
522 snapshots reveal that palmitoyl chains on one hand and oleoyl chains on the other  
523 hand, assemble separately forming palmitoyl or oleoyl chain clusters. These clusters  
524 appear randomly along the trajectory, have a lifetime of about 4-6 ns, disappear and  
525 reform again along the trajectory (see movie S1).



526

527 **Figure 10.** Clusters of acyl chains. Top views of the POPC monolayer using van der  
528 Waals graphical representation of VMD. Both acyl chains are represented with the  
529 VDW drawing method. Palmitoyl and oleoyl chains are colored in cyan and in orange,  
530 respectively. Snapshots were taken every 2 ns within the last 50 ns of the trajectory  
531 at 30 mN/m surface pressure. A cluster of palmitoyl chains has been randomly

532 chosen and highlight in blue to facilitate its monitoring along the trajectory.

#### 533 **4. DISCUSSION**

534 **4.1. Pressure-area isotherm.** As already mentioned for the comparison of simulated  
535 and experimental surface pressure – area isotherms of DPPC monolayer<sup>38</sup>, the  
536 comparison is not straightforward due to variations observed in the different  
537 experimental isotherms. The experimental conditions can strongly influence the  
538 surface pressure – area isotherms. We first compare our experimental pressure-area  
539 isotherms of pure POPC in water at 293 K with published experimental pressure-area  
540 isotherms of pure POPC measured at different temperatures. Our isotherm is similar  
541 to the isotherm obtained by Yun et al.<sup>28</sup> in water, at the same temperature and using  
542 similar experimental conditions (see Figure S3). The isotherms of POPC obtained at  
543 298 K in water and in saline phosphate buffer by Prenner et al.<sup>41</sup> and Volinsky et  
544 al.<sup>42</sup>, respectively, are also similar, except for slightly different shapes at surface  
545 pressures below 20 mN/m compared to the isotherm obtained at 303 K by Yun et  
546 al.<sup>28</sup>. Conversely, the isotherm obtained by Brown et al. at 297 K is rather different  
547 from ours and from the published isotherms that we already mentioned. However in  
548 their work, the described experimental conditions lack information concerning the use  
549 of buffer or not. The published isotherms recorded at 298 K or 300 K are slightly  
550 more condensed than our experimental isotherm measured at 293 K. This probably  
551 reflects the small effect of the temperature on the isotherms in this temperature range  
552 293 – 300 K and the precision that can be obtained when comparing different  
553 experimental isotherms. Indeed, our different measurements at 293 K show standard  
554 deviations of molecular area from 1 to 4 Å<sup>2</sup> (Table S1). The differences between the  
555 experimental isotherms recorded at 293 K and 298 K or 300 K could be indicative of  
556 the typical spread that can be obtained from experimental data.

557 Furthermore, for our simulated isotherms at 293 K and 300 K, the standard  
558 deviations of the molecular areas vary from 1 to 2 Å<sup>2</sup> and 1 to 3 Å<sup>2</sup>, respectively.  
559 These deviations are similar to the differences in experimental molecular areas  
560 between 293 K and 300 K (1 to 4 Å<sup>2</sup>). A temperature variation of 7 K does not  
561 significantly affect the POPC molecular area in the temperature range 283 K- 300 K.  
562 For comparison, Leekumjorn et al.<sup>31</sup> performed MD simulations of a POPC bilayer at  
563 290 K and 300 K and found a variation of 0.9 (+/- 2.5) Å<sup>2</sup>. These authors also  
564 showed that most significant changes in POPC organization occur between 270 K  
565 and 280 K i.e. in the vicinity of its phase transition temperature (270 K).

566 Our calculated surface areas per lipid are similar to the experimental values at  
567 293 K for surface pressure from 10 to 43 mN/m. At 300 K, they deviate more at 7.5  
568 and 43 mN/m. We noticed larger fluctuations of the molecular areas at lower surface  
569 pressure from 15 to 7.5 than at higher values. This could be due to the fact that at  
570 low surface pressure, the molecular area per lipid is greater and the lipids undergo  
571 larger conformational fluctuations<sup>9</sup>. Therefore, at low surface pressure longer  
572 simulation times are most probably required. Large area fluctuations can also be  
573 attributed to molecular interactions leading to collective movement such as  
574 undulation of the monolayer.<sup>43</sup>

575 **4.2. Head groups.** The polar head groups are responsible for the electrostatic  
576 interactions at the interface and play an important role in the hydration properties of  
577 monolayers and bilayers. In direct contact with water molecules, the polar head  
578 groups are also considered as playing a crucial role for the first step of the passive  
579 diffusion through the membrane.<sup>44</sup> Despite the important role of the interface, most of  
580 the studies focus on the phase transition of lipids, where hydrocarbon chain  
581 interactions play the principal role.<sup>45,46</sup> A few structural studies of phospholipids

582 indicate that head group packing also affect the conformation and tilt of the acyl  
583 chains.<sup>47-49</sup>

584         The PN vectors in POPC monolayers tend to adopt two orientations, one  
585 similar to its orientation found in bilayer<sup>33</sup> (PN tilts  $\sim 90^\circ$ ) corresponding to an  
586 orientation nearly parallel to the membrane and, the other orientation (PN tilts  $\sim 130^\circ$ )  
587 corresponding to PN vectors pointing toward the solvent. This latest orientation  
588 appears in monolayer at pressure value above 20 mN/m.

589         Similar bimodal distribution of PN vectors has been found for a POPC bilayer  
590 at different temperatures using MD simulations<sup>31</sup>. At low temperature most choline  
591 groups are pointing toward the water (distribution peak around  $40^\circ$  relative to the  
592 normal of the bilayer) while at high temperature the PN vector angle distribution is  
593 about  $100^\circ$  relative to the normal of the bilayer. Thus, the PN vector angle distribution  
594 provides a qualitative measure of the fluid state of the bilayer. No experimental data  
595 is available for POPC. Experimental data (neutron reflection, X-ray and sum  
596 frequency generation spectroscopy) are available for DPPC monolayers but  
597 conflicting results have been reported concerning the dependence of the orientation  
598 of the head group with respect to the monolayer plane with the packing  
599 density<sup>50,51,52,53</sup>. Brumm et al.<sup>52</sup> used neutron reflectivity to assess the change of lipid  
600 head group conformation of DPPC monolayer at air/water interface, at various  
601 surface pressures and at 293 K. They found a large change in the thickness of the  
602 monolayer in going from the liquid-condensed (LC) to liquid-expanded (LE) phase.  
603 They interpret their data in terms of a parallel orientation of PN vectors with respect  
604 to DPPC monolayer in LE phase and a perpendicular orientation in LC phase. More  
605 recently, using sum frequency generation spectroscopy, Ma et al.<sup>53</sup> concluded that  
606 the head group orientation is not significantly different in the LE and LC phases. MD

607 simulations of DPPC monolayers at different temperature and pressure reveal a  
608 bimodal distribution of PN vectors,<sup>9</sup> one centered at 50° and the other at 100°, for  
609 DPPC monolayer in the LC phase at 293 K. We found similar difference between the  
610 two PN vector angles distribution i.e. about 40° for POPC monolayers. In more  
611 expanded phases, i.e at large molecular areas, the PN vectors adopt a parallel  
612 orientation with respect to the interface and upon the increase of the pressure the PN  
613 vectors tilt toward the solvent.

614 We propose that the dihedral angles around the bonds connecting the  
615 phosphorus atom to the adjacent oxygen atoms are responsible of the specific  
616 orientations of the PN vector. As a matter of fact, we found a restricted angle  
617 distribution for C<sub>1</sub>O<sub>2</sub>PO<sub>1</sub> and O<sub>2</sub>PO<sub>1</sub>C<sub>15</sub> dihedral angles from -150 to 150° and from -  
618 60 to 60°, respectively.

619 Concerning the other dihedral angles distribution, we calculated a preferential  
620 gauche conformation for the dihedral O<sub>1</sub>C<sub>15</sub>C<sub>11</sub>N in agreement with experimental  
621 Raman spectroscopy data obtain for DPPC.<sup>54</sup>

622 Our calculations showed that the glycerol vectors in POPC monolayer tilt by  
623 ~50° relative to the normal to the interface, whereas these vectors are often found  
624 perpendicular to the interface in bilayers.<sup>33,35</sup> Because the glycerol group links the  
625 head group to the acyl chains, it is expected that its orientation will influence the  
626 conformation of both the phosphocholine group and the acyl chains.

627 We have shown that, upon surface pressure increase, the averaged glycerol  
628 tilt decrease and PN vectors tend to point toward solvent. We also found that acyl  
629 chains tilts diminish with the increase of surface pressure.

630 At surface pressure smaller than 30 mN/m, PN vectors are almost parallel to  
631 the interface and the averaged glycerol tilts are about 50° with respect to the

632 interface normal. These conformations correspond to large cross-section areas for  
 633 the polar head and are associated to acyl chain tilts greater than 30°.

634 For surface pressure from 30 to 43 mN/m, PN vectors are nearly  
 635 perpendicular to the interface and the averaged glycerol tilts are small. These  
 636 conformations correspond to smaller cross-section area for the polar head and are  
 637 associated to small acyl chain tilts.

638 These observations are in agreement with the hypothesis that the polar head  
 639 group conformations affect the hydrophobic chain conformations.<sup>48,49</sup> The lipid  
 640 packing model proposed that it is energetically favorable for molecules to tilt because  
 641 the glycerol backbone has a larger excluded area in the plane of the bilayer than the  
 642 hydrocarbon chains.

643 Our simulations showed that the hydration number decrease with the increase  
 644 of the surface pressure. This trend is expected as the available volume of head group  
 645 decrease with the increase of surface pressure and, it is consistent with a previous  
 646 MD analysis of POPC bilayer hydration, which demonstrated an increasing number  
 647 of water molecule as the surface pressure decreases.<sup>55</sup>

648 We found ~5 water molecules around the phosphorus atom and ~20 water  
 649 molecules around the nitrogen atom at 30 mN/m surface pressure. The hydration  
 650 number around the phosphorus atom is in agreement with results of previous MD  
 651 simulations of a POPC bilayer.<sup>32</sup> The number of water molecules around the nitrogen  
 652 atom is higher than the number found in the MD simulations of a POPC bilayer: 20  
 653 instead of 17.<sup>32</sup> The total hydration number is slightly greater than the experimental  
 654 value obtained for DOPC (11-16 water molecules) from NMR experiments<sup>56</sup> and,  
 655 than the number of water molecules per DMPC (~14) obtained from MD simulations  
 656 performed at 325 K<sup>57</sup>. The presence of large conformational distributions for the

657 head group dihedral angles around the chemical bonds involving the phosphorus  
658 atom could be correlated with the greater value of the hydration number around the  
659 nitrogen atom that we found for monolayer compared to bilayer.

#### 660 **4.3. Acyl chain order and conformation**

661 The order parameter is currently used in MD simulations to assess the correct  
662 phospholipid behavior within bilayer, as it can be calculated from NMR  
663 experiments.<sup>37</sup> Although no experimental evaluation of this parameter is possible for  
664 monolayers, its calculation gives precious indication of acyl chain order.

665 Upon increase of the surface pressure, the order parameters increase, the  
666 acyl chains get more ordered. At 30 mN/m surface pressure, the order parameter  
667 profile of the oleoyl chain showed a very good agreement with the experimental  
668 profile of POPC bilayer.<sup>37</sup> On contrary, the order parameter profile of the palmitoyl  
669 chain differs from the experimental order parameter profile of this chain in POPC  
670 bilayer. The order parameters values of the palmitoyl chain are greater in monolayer  
671 than in bilayer. Palmitoyl chains are more ordered in monolayer at 30 mN/m surface  
672 pressure than in bilayer. Moreover, the concave shape of its order parameter profile  
673 is similar to the shape of the profile of acyl chains in DPPC monolayer found by Rose  
674 et al<sup>58</sup>. This suggests that the unsaturated chain does not affect the behavior of the  
675 saturated chain significantly. This trend is also present at 10, 20 and 40 mN/m  
676 surface pressure. This hypothesis of "independent behavior" of the acyl chains is  
677 reinforced by the analysis of the dihedral angles. As a matter of fact, the palmitoyl  
678 chains are more affected by pressure variation than the oleoyl chains.

679 Our simulations showed different glycerol tilts in POPC monolayer and bilayer.  
680 While previous experiments and MD simulations have described glycerol backbone  
681 perpendicular to the bilayer surface, we calculated large distribution of glycerol tilt



682 angle from 30° to 80° for POPC monolayer. Therefore, we first hypothesize that in  
 683 POPC monolayer, this large distribution of glycerol tilts will allow more conformational  
 684 variations of the tails and thus promote independent behavior of the chains. As a  
 685 matter of fact, Seelig and Seelig<sup>59</sup> showed that the conformations of DPPC acyl  
 686 chains depends on their position on the glycerol backbone: the *sn1* and *sn2* chains  
 687 demonstrate different orientations that lead to different conformational fluctuations  
 688 and, a more conformational constrained *sn2* chain. It was also described that the  
 689 glycerol backbone of DMPC which is oriented almost perpendicular to the interface,  
 690 favor a perpendicular orientation of the *sn-1* chain whereas the *sn-2* chain has its first  
 691 segment oriented in a direction parallel to the bilayer and then bend sharply at the  
 692 second carbon atom.<sup>33</sup> Moreover, distinct  $S_{CD}$  profiles for both acyl chains of POPC  
 693 have been obtained and, it was proposed that the *sn1* chain is oriented perpendicular  
 694 to the bilayer and the *sn2* chain is bent, with its first segment being parallel to the  
 695 bilayer surface.<sup>46</sup>

696         Constraint exerted on the first tail segment by a perpendicular glycerol is  
 697 thought to be responsible of the strong interdependence of both chains, illustrated in  
 698 the POPC bilayer  $S_{CD}$  profile. Seelig et al. concluded that the presence of the  
 699 unsaturation in oleoyl chain induces more restraint in the vicinity of the double bond  
 700 than further away from it.<sup>46</sup>

701         Besides, for both acyl chains, the probability of trans conformations is greater  
 702 in monolayer than in bilayer<sup>39</sup>. *Gauche* defaults are predominantly located at the acyl  
 703 chain ends but in a less proportion than in bilayer. The first and last dihedral angles  
 704 present more *gauche* defaults than the other chain dihedral angles. They have fewer  
 705 *gauche* defaults than the first and last dihedral angles of palmitoyl chains in bilayer.<sup>31</sup>  
 706 Despite the presence of *gauche* defaults for d1, d6, d7, d9, d10, in the oleoyl chain,

707 there is no particular default in the first segment of this chain. These observations  
708 support the hypothesis that the glycerol tilt in POPC monolayer will favor  
709 conformational variations of the *sn2* chain. Its first segment is not constraint to lie  
710 parallel to the interface.

711         At least, the limited percentage of gauche defaults in monolayer compared to  
712 bilayer can also be due to the absence of a second leaflet that will allow the acyl  
713 chains to freely adopt energetically favorable conformation.

714

715 **4.4. Acyl chain ordering and clusters.** Visualization of the POPC monolayer  
716 trajectory at 30 mN/m reveals the presence of clusters of palmitoyl and oleoyl chains.  
717 These assemblies formed by different number of lipids have an average life-time of 4  
718 - 6 ns and can assemble and dis-assemble upon simulation time, emphasizing the  
719 random aspect of these clusters. The glycerol tilt allows palmitoyl chains to adopt not  
720 only a nearly all-trans torsional conformation but also to self-assemble. As a  
721 consequence, palmitoyl chains are particularly well ordered as shown by the order  
722 parameter profiles. Hydrophobic clusters have been described for mixed  
723 DPPC/DOPC bilayers depending on the ratio of the two lipids, using MD  
724 simulations.<sup>60</sup>  $S_{CD}$  calculations demonstrated an increase of ordering within the  
725 clusters and the DPPC phospholipids compared to the DOPC.<sup>60</sup>

726         In POPC monolayers, the self-assembly of acyl chains favors the formation of  
727 clusters, chain ordering and apparent independent behavior of acyl chains.

728         We propose that the orientation of PN vectors, the tilt of glycerol with respect to  
729 monolayer normal and the absence of contact between chain ends of two  
730 phospholipid leaflets allow free adaptation to energetically favored conformation and

731 assemblies of the acyl chains, which contribute to a more order organization of lipids  
732 in monolayer compared to bilayer.

733         This specific behavior of the hydrocarbon chains is of significant importance in  
734 term of structural properties and thus provides interesting clues for monolayer  
735 behavior. It could play a role in the permeability mechanism for which the ability of a  
736 compound to pass through the hydrophobic core of the membrane strongly depends  
737 on the organization of the acyl chains, but also in the dynamics of lateral  
738 arrangements in membrane.

739

740

741

742 **5. CONCLUSIONS**

743           POPC monolayers under compression have been simulated for the first time and, a  
744 good agreement was found between our simulated data and experimental surface  
745 pressure – area isotherms. These simulated data allow a detailed analysis of the structural  
746 properties of POPC monolayers at different surface pressures. This structural analysis  
747 contributes to a better knowledge of the specific properties of POPC in these membrane  
748 models at a molecular level.

749           Further studies on monolayers composed of lipids having two acyl chains of various  
750 lengths and position of unsaturation are needed to decipher whether these properties, in  
751 particular the formation of acyl chains clusters, are specific to POPC or general to lipids  
752 composed of one saturated and one unsaturated chain.

753

754 **Acknowledgements**

755 We thank Katia Daghdjian (UMR CNRS 8612) for the experimental surface pressure  
756 measurements.

757

758 **Supporting Information Available:**

759 Time evolution of the averaged lipid molecular area at different surface pressures;  
760 Comparison of experimental isotherms at various temperatures with our experimental  
761 isotherm measured at 293 K on pure water and with our simulated isotherms; Percentage  
762 of the different conformers along the two acyl chains at 30mN/m; Comparison of the  
763 evolution of molecular areas at the various surface pressures; Experimental and simulated  
764 molecular areas obtained at different surface pressures; Percentage of trans and gauche  
765 conformer populations of the acyl chains at different surface pressures and at a

36/45

766 temperature of 300 K. This material is available free of charge via the Internet at  
767 <http://pubs.acs.org>.

768 **REFERENCES**

769

770 (1) Eeman, M.; Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes.  
771 *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, *14*, 719–736.

772 (2) Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 183–  
773 223.

774 (3) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. Structure and phase transitions in Langmuir  
775 monolayers. *Reviews of Modern Physics* **1999**, *71*, 779–819.

776 (4) McConnell, H. M. Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water  
777 Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171–195.

778 (5) Desroches, M.-C.; Kasselouri, A.; Meyniel, M.; Fontaine, P.; Goldmann, M.;  
779 Prognon, P.; Maillard, P.; Rosilio, V. Incorporation of glycoconjugated porphyrin  
780 derivatives into phospholipid monolayers: a screening method for the evaluation of  
781 their interaction with a cell membrane. *Langmuir* **2004**, *20*, 11698–11705.

782 (6) Maget-Dana, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial  
783 properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with  
784 lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 109–140.

785 (7) Skibinsky, A.; Venable, R. M.; Pastor, R. W. A molecular dynamics study of the  
786 response of lipid bilayers and monolayers to trehalose. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4111–  
787 4121.

- 788 (8) Baoukina, S.; Monticelli, L.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Pressure-area isotherm  
 789 of a lipid monolayer from molecular dynamics simulations. *Langmuir* **2007**, *23*,  
 790 12617–12623.
- 791 (9) Mohammad-agmaie, D.; Mace, E.; Sennoga, C. A.; Seddon, J. M.; Bresme, F.  
 792 Molecular Dynamics Simulations of Liquid Condensed to Liquid Expanded  
 793 Transitions in DPPC Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1325–1335.
- 794 (10) Shushkov, P.; Tzvetanov, S.; Velinova, M.; Ivanova, A.; Tadjer, A. Structural Aspects  
 795 of Lipid Monolayers : Computer Simulation Analyses. *Langmuir* **2010**, *26*, 8081–  
 796 8092.
- 797 (11) Egberts, E.; Marrink, S.; Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics simulation of a  
 798 phospholipid membrane. *Eur. Biophys. J.* **1994**, *22*, 423–436.
- 799 (12) Tieleman, D. P.; Marrink, S. J.; Berendsen, H. J. C. A computer perspective of  
 800 membranes : molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys.*  
 801 *Acta* **1997**, 235–270.
- 802 (13) Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E.; Ili, E.; Ulm, U.; Eselsberg, O.; Germany, D.-  
 803 U. D. Polymorphism of phospholipid monolayers. *Le Journal de Physique* **1978**, *39*,  
 804 301–313.
- 805 (14) Tattrie, N. H.; Bennett, J. R.; Cyr, R. Maximum and minimum values for lecithin  
 806 classes from various biological sources. *Can. J. Biochem.* **1968**, *46*, 819–824.
- 807 (15) Sundaralingam, M. Discussion paper: molecular structures and conformations of the  
 808 phospholipids and sphingomyelins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1972**, *195*, 324–55.

- 809 (16) Ambike, A.; Rosilio, V.; Stella, B.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Couvreur, P. Interaction of  
810 self-assembled squalenoyl gemcitabine nanoparticles with phospholipid-cholesterol  
811 monolayers mimicking a biomembrane. *Langmuir* **2011**, *27*, 4891–4899.
- 812 (17) Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W. Computer simulation of liquid/liquid interfaces.  
813 II. Surface tension-area dependence of a bilayer and monolayer. *J. Chem. Phys.*  
814 **1995**, *103*, 10267–10276.
- 815 (18) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.;  
816 Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular  
817 simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- 818 (19) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke,  
819 R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.;  
820 Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.;  
821 Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Lui, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.;  
822 Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.;  
823 Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.;  
824 Kovalenko, A.; Kollman, P. A. AmberTools 12 **2012**.
- 825 (20) Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE-Antechamber python parser  
826 interface. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 1–8.
- 827 (21) Hess, B.; Kutzner, C.; Van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4 : Algorithms for  
828 Highly Efficient , Load-Balanced , and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem.*  
829 *Theory Comput.* **2008**, *4*, 435–447.
- 830 (22) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and  
831 Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.



- 832 (23) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald : An N -log ( N ) method for  
 833 Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- 834 (24) Siu, S. W. I.; Vácha, R.; Jungwirth, P.; Böckmann, R. a Biomolecular simulations of  
 835 membranes: physical properties from different force fields. *J. Chem. Phys.* **2008**,  
 836 *128*, 125103–125112.
- 837 (25) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling.  
 838 *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101–014107.
- 839 (26) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol.*  
 840 *Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- 841 (27) Blume, A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and  
 842 monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 32–44.
- 843 (28) Yun, H.; Choi, Y.; Kim, N. J.; Sohn, D. Physicochemical Properties of  
 844 Phosphatidylcholine (PC) Monolayers with Different Alkyl Chains, at the Air/Water  
 845 Interface. *Bull. Korean Chem. Soc* **2003**, *24*, 377–383.
- 846 (29) Gramlich, G.; Zhang, J.; Winterhalter, M.; Nau, W. M. A long-lived amphiphilic  
 847 fluorescent probe studied in POPC air-water monolayer and solution bilayer  
 848 systems. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *113*, 1–9.
- 849 (30) Kucerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase  
 850 lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* **2005**, *208*, 193–202.
- 851 (31) Leekumjorn, S.; Sum, A. K. Molecular characterization of gel and liquid-crystalline  
 852 structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*,  
 853 6026–6033.

- 854 (32) Henneré, G.; Prognon, P.; Brion, F.; Nicolis, I. Molecular dynamics study of a  
 855 phospholipid monolayer at a water/triglyceride interface: towards lipid emulsion  
 856 modelling. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *157*, 86–93.
- 857 (33) Büldt, G.; Wohlgemuth, R. Topical Review The Headgroup Conformation of  
 858 Phospholipids in Membranes. *J. Membr. Biol.* **1981**, *58*, 81–100.
- 859 (34) Poger, D.; Mark, A. E. On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of  
 860 Saturated and cis-Monounsaturated Phosphatidylcholine Lipid Bilayers : A  
 861 Comparison with Experiment. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 325–336.
- 862 (35) Gennis, R. *Biomembranes: molecular structure and function*; Librairie Lavoisier,  
 863 1989.
- 864 (36) Shinoda, W.; Shimizu, M.; Okazaki, S. Molecular Dynamics Study on Electrostatic  
 865 Properties of a Lipid Bilayer : Polarization , Electrostatic Potential , and the Effects  
 866 on Structure and Dynamics of Water near the. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *5647*, 6647–  
 867 6654.
- 868 (37) Seelig, J.; Waespe-sareevit, N. Molecular Order in Cis and Trans Unsaturated  
 869 Phospholipid Bilayers? *Biochemistry* **1978**, *17*, 3310–3315.
- 870 (38) Duncan, S. L.; Larson, R. G. Comparing experimental and simulated pressure-area  
 871 isotherms for DPPC. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2965–2986.
- 872 (39) Beswick, V.; Perrot, N.; Nedellec, P.; Sanson, A.; Isvoran, A.; Jamin, N. Comparison  
 873 of DPC micelle and POPC bilayer : MD simulations. *Poster at GEM 15 2012, Paris*.
- 874 (40) Saiz, L.; Klein, M. L. Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer  
 875 from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 204–216.

- 876 (41) Prenner, E.; Honsek, G.; Hönig, D.; Möbius, D.; Lohner, K. Imaging of the domain  
 877 organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys.*  
 878 *Lipids* **2007**, *145*, 106–118.
- 879 (42) Volinsky, R.; Paananen, R.; Kinnunen, P. K. J. Oxidized phosphatidylcholines  
 880 promote phase separation of cholesterol-sphingomyelin domains. *Biophys. J.* **2012**,  
 881 *103*, 247–254.
- 882 (43) Lindahl, E.; Edholm, O. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid  
 883 bilayers from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 426–433.
- 884 (44) Marrink, S.-J.; Berendsen, H. J. C. Simulation of water transport through a lipid  
 885 membrane. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4155–4168.
- 886 (45) Murzyn, K.; Róg, T.; Jezierski, G.; Takaoka, Y.; Pasenkiewicz-Gierula, M. Effects of  
 887 phospholipid unsaturation on the membrane/water interface: a molecular simulation  
 888 study. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 170–183.
- 889 (46) Seelig, A.; Seelig, J. Effect of a Single Cis Double Bond on the Structure of a  
 890 Phospholipid Bilayer ? *Biochemistry* **1977**, *16*, 45–50.
- 891 (47) Hauser, H.; Pascher, I.; Pearson, R.; Sundell, S. Preferred conformation and  
 892 molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Biochim.*  
 893 *Biophys. Acta* **1981**, *650*, 21–51.
- 894 (48) Nagle, J. F. Theory of Lipid Monolayer and Bilayer Phase Transitions: Effect of  
 895 Headgroup Interactions Experimental Results for Monolayers. *J. Membr. Biol.* **1976**,  
 896 *250*, 233–250.

- 
- 897 (49) McIntosh, T. J. Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated  
898 phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing  
899 model. *Biophys. J.* **1980**, *29*, 237–245.
- 900 (50) Seelig, J.; Gally, H.; Wohlgemuth, R. Orientation and flexibility of the choline head  
901 group in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *467*, 109–119.
- 902 (51) Büldt, G.; Gally, H.; Seelig, J.; Zaccai, G. Neutron Diffraction Studies on  
903 Phosphatidylcholine Model Membranes. *J. Mol. Biol.* **1979**, *134*, 673–691.
- 904 (52) Brumm, T.; Naumann, C.; Sackmann, E.; Bayed, T. M. Conformational changes of  
905 the lecithin headgroup in monolayers at the air/water interface. *Eur. Biophys. J.*  
906 **1994**, *23*, 289–295.
- 907 (53) Ma, G.; Allen, H. C. DPPC Langmuir monolayer at the air-water interface: probing  
908 the tail and head groups by vibrational sum frequency generation spectroscopy.  
909 *Langmuir* **2006**, *22*, 5341–5349.
- 910 (54) Akutsu, H. Direct determination by Raman scattering of the conformation of the  
911 choline group in phospholipid bilayers. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7359–7366.
- 912 (55) Jojart, B.; Martinek, T. Performance of the General Amber Force Field in Modeling  
913 Aqueous POPC Membrane Bilayers. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 2051–2058.
- 914 (56) Borle, F. O. I. S.; Seelig, J. Hydration of Escherichia coli lipids. Deuterium T1  
915 relaxation time studies of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and  
916 phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *735*, 131–136.

- 917 (57) Chiu, S. W.; Clark, M.; Balaji, V.; Subramaniam, S.; Scott, H. L.; Jakobsson, E.  
 918 Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface:  
 919 a fluid phase lipid bilayer membrane. *Biophys. J.* **1995**, 69, 1230–1245.
- 920 (58) Rose, D.; Rendell, J.; Lee, D.; Nag, K.; Booth, V. Molecular dynamics simulations of  
 921 lung surfactant lipid monolayers. *Biophys. Chem.* **2008**, 138, 67–77.
- 922 (59) Seelig, A.; Seelig, J. Bilayers of dipalmitoyl-3-sn-phosphocholine conformational  
 923 differences between the fatty acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 406, 1–5.
- 924 (60) Pyrkova, D. V.; Tarasova, N. K.; Pyrkov, T. V.; Krylov, N. a.; Efremov, R. G. Atomic-  
 925 scale lateral heterogeneity and dynamics of two-component lipid bilayers composed  
 926 of saturated and unsaturated phosphatidylcholines. *Soft Matter* **2011**, 7, 2569–2579.
- 927
- 928

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**SUPPORTING INFORMATION**

**Structural properties of POPC monolayers under lateral compression:  
computer simulations analysis**

Lucie Huynh<sup>1</sup>, Veronica Beswick<sup>2</sup>, Véronique Rosilio<sup>3</sup>, Patrick A. Curmi<sup>1</sup>, Alain Sanson<sup>2</sup>  
and Nadège Jamin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U829, Laboratoire Structure – Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, Université d'Evry-Val-d'Essonne, Evry, F-91025, France

<sup>2</sup>CEA, iBiTec-S, UMR8221, Laboratoire des Protéines Membranaires, 91191 Gif-sur-Yvette, Cedex, France

<sup>3</sup>Université Paris-Sud, CNRS UMR8612, Physico-chimie des surfaces, Châtenay-Malabry

\*To whom correspondence should be addressed

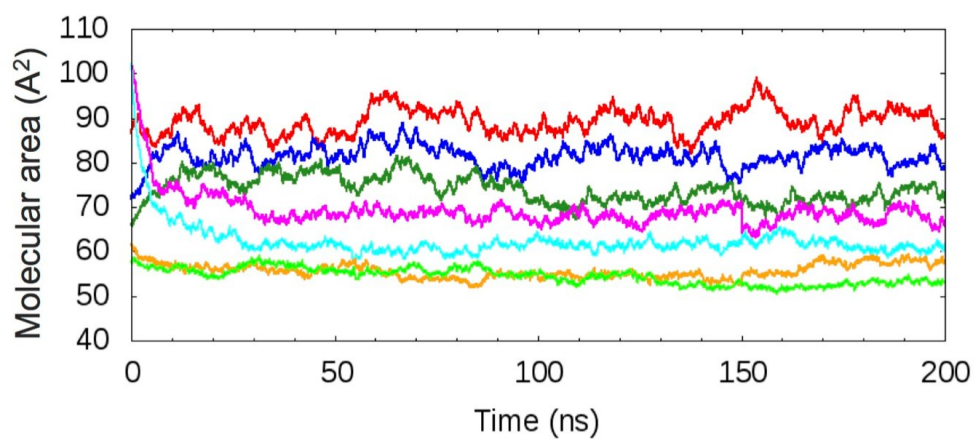
26

## SUPPORTING INFORMATION

27

28 **Figure S1.** Time evolution of the averaged lipid molecular area at different surface  
29 pressures: 7.5 mN/m (red), 10 mN/m (blue), 15 mN/m (dark-green), 20 mN/m (magenta),  
30 30 mN/m (cyan), 40 mN/m (orange) and 43 mN/m (light-green). The temperature is 300 K.

31



32

33

34 The fluctuations of the averaged molecular areas along the last 150 ns of the trajectories  
35 vary from 1 to 3 Å<sup>2</sup> for the 43 and 15 mN/m surface pressures, respectively. These  
36 fluctuations are similar to those calculated from molecular dynamics simulations of POPC  
37 bilayers<sup>1,2</sup> or DPPC monolayer<sup>3</sup>.

38

39

40

41

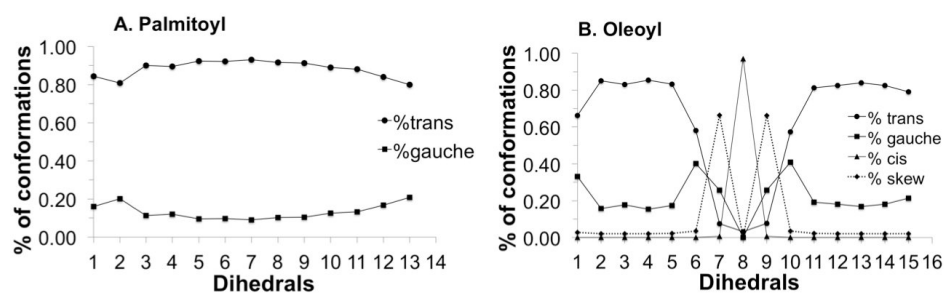
42

43

44

45 **Figure S2.** Acyl chain dihedral angles. Percentage of the different conformers along  
 46 the two acyl chains at 30 mN/m. The temperature is 300 K. (A) palmitoyl chain, (B) oleoyl  
 47 chain. The palmitoyl and the oleoyl chains contain 16 and 18 carbons, and thus 13 and 15  
 48 dihedrals are defined, respectively. The first dihedral angle between the first segments  
 49 ( $C_{21}C_{22}C_{23}C_{24}$  or  $C_{31}C_{32}C_{33}C_{34}$  torsion angle between the  $C_{21}C_{22}$  and  $C_{23}C_{24}$  or  $C_{31}C_{32}$  and  
 50  $C_{33}C_{34}$  vectors of oleoyl and palmitoyl chain, respectively) of each chain is named d1 and  
 51 the following dihedrals are named d2 ( $C_{22}C_{23}C_{24}C_{25}$  or  $C_{32}C_{33}C_{34}C_{35}$ ), d3...

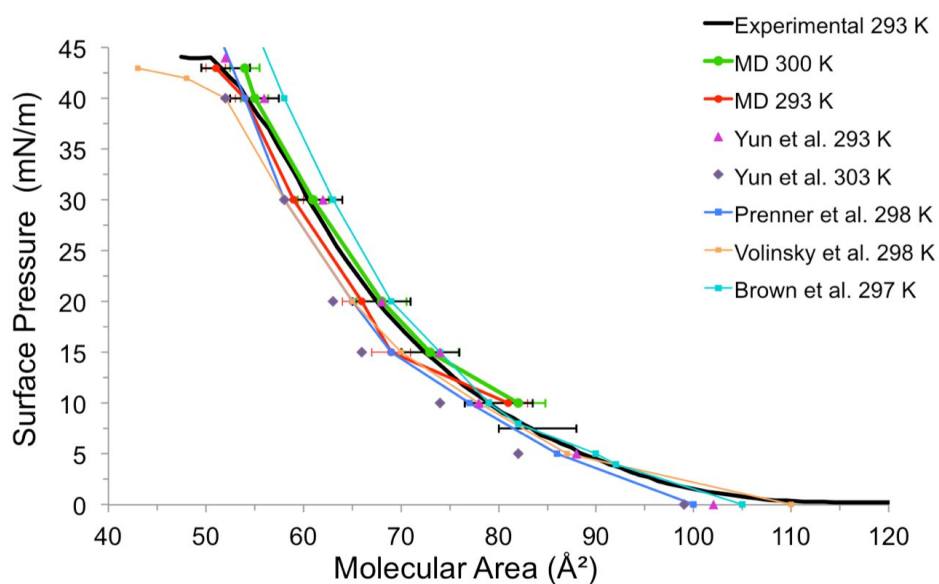
52 Percentage of trans (●) and gauche (■) conformers are represented for both  
 53 chains. Percentage of cis (▲) and skew (◆) conformations are represented for the  
 54 unsaturated chain.



55



56 **Figure S3.** Comparison of experimental isotherms at various temperatures.  
 57 Experimental isotherm measured at 293 K in pure water (black line), this work.  
 58 Simulated isotherms at 293 K (red ●) and at 300 K (green ●), this work.  
 59 Experimental isotherms measured in pure water at 293 K (magenta ▲) and 303 K (purple  
 60 ◆) by Yun et al..<sup>4</sup>  
 61 Experimental isotherm measured in pure water at 298 K (blue ■) by Prenner et al..<sup>5</sup>  
 62 Experimental isotherm measured in saline phosphate buffer at 298 K (orange ■) by  
 63 Volinsky et al..<sup>6</sup>  
 64 Experimental isotherm measured at 297 K (light blue ■) by Brown et al..<sup>7</sup>



65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70

71

72 **MOVIE LEGEND**

73 Top views of POPC monolayer at 30 mN/m surface pressure and at 300 K. Snapshots are  
74 taken every 2 ns along the last 50 ns of the trajectory. Lipids are represented using van  
75 der Waals graphical representation of VMD. Palmitoyl chains are colored in cyan, oleoyl  
76 chains are colored in orange. A cluster of palmitoyl chains has been randomly chosen and  
77 highlighted in blue to facilitate its monitoring along the trajectory.

78

79

80

81  
82  
83  
84  
85

Surface pressure (mN/m)	Experimental molecular area at 293 K (Å <sup>2</sup> )	Simulated molecular area at 293 K (Å <sup>2</sup> )	Simulated molecular area at 300 K (Å <sup>2</sup> )
7,5	84 (+/- 4)		90 (+/- 3)
10	80 (+/- 3.5)	81 (+/- 2)	82 (+/- 2)
15	74 (+/- 3)	69 (+/- 2)	73 (+/- 3)
20	68 (+/- 3)	66 (+/- 2)	68 (+/- 2)
30	62 (+/- 3)	59 (+/- 1)	61 (+/- 1)
40	55 (+/- 2.5)	54 (+/- 1)	55 (+/- 2)
43	51 (+/- 2.5)	51 (+/- 1)	54 (+/- 2)

86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94

**Table S1.** Experimental and simulated molecular areas obtained at different surface pressures. The value of the experimental surface pressure deviation is 0.2 mN/m. The simulated molecular area standard deviation is calculated over the last 150 ns of the trajectories.

95

96

97

98

99

100

101

102

Surface pressure (mN/m)	PALMITOYL		OLEOYL		
	% trans	% gauche	% trans	% gauche	% cis
7.5	81	19	65	23	7
10	82	19	66	23	7
15	84	17	66	22	7
20	86	15	66	22	7
30	89	13	67	22	7
40	92	9	67	21	7
43	92	9	67	21	7

103

104

105 **Table S2.** Percentage of trans and gauche conformer populations of the acyl chains at  
106 different surface pressures and at a temperature of 300 K. These percentages were  
107 evaluated for all the dihedral angles of each chain and averaged over all the lipids and the  
108 trajectories.

109

110 **REFERENCES**

111

- 112 (1) Lindahl, E.; Edholm, O. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers  
113 from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 426–433.
- 114 (2) Jojart, B.; Martinek, T. Performance of the General Amber Force Field in Modeling Aqueous  
115 POPC Membrane Bilayers. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 2051–2058.
- 116 (3) Mohammad-ghaie, D.; Mace, E.; Sennoga, C. A.; Seddon, J. M.; Bresme, F. Molecular  
117 Dynamics Simulations of Liquid Condensed to Liquid Expanded Transitions in DPPC  
118 Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1325–1335.
- 119 (4) Yun, H.; Choi, Y.; Kim, N. J.; Sohn, D. Physicochemical Properties of Phosphatidylcholine  
120 (PC) Monolayers with Different Alkyl Chains, at the Air/Water Interface. *Bull. Korean*  
121 *Chem. Soc* **2003**, *24*, 377–383.
- 122 (5) Prenner, E.; Honsek, G.; Hönig, D.; Möbius, D.; Lohner, K. Imaging of the domain  
123 organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys. Lipids*  
124 **2007**, *145*, 106–118.
- 125 (6) Volinsky, R.; Paananen, R.; Kinnunen, P. K. J. Oxidized phosphatidylcholines promote  
126 phase separation of cholesterol-sphingomyelin domains. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 247–254.
- 127 (7) Brown, R.; Brockman, H. L. Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral  
128 Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *398*, 41–58.

129

# Chapitre VII.

## AUTRES TRAVAUX

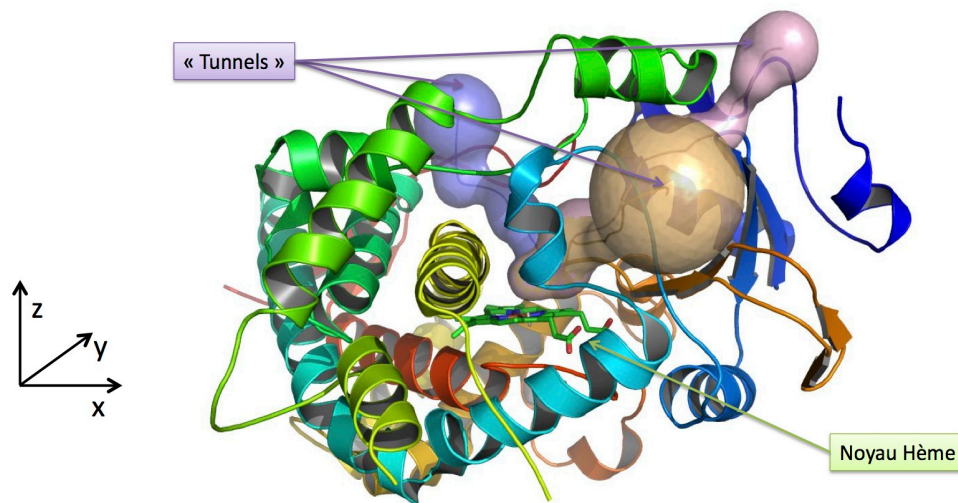
*Les travaux précédents se sont déroulés en partie dans une entreprise de biotechnologies, et de ce fait, s'inscrivaient dans une problématique industrielle visant à étudier des paramètres ADME-Tox dont fait partie la perméabilité membranaire. En parallèle à ces travaux sur l'étude des propriétés structurales des phospholipides POPC, j'ai eu l'occasion de participer de façon secondaire à deux projets de recherche et développement ciblant les phases de métabolisation et de toxicité de petites molécules (ou de xénobiotiques). Un résumé succinct de ces projets est présenté ci-dessous.*

# 1. Modélisation des tunnels de sortie de la progestérone du cytochrome P450 3A4

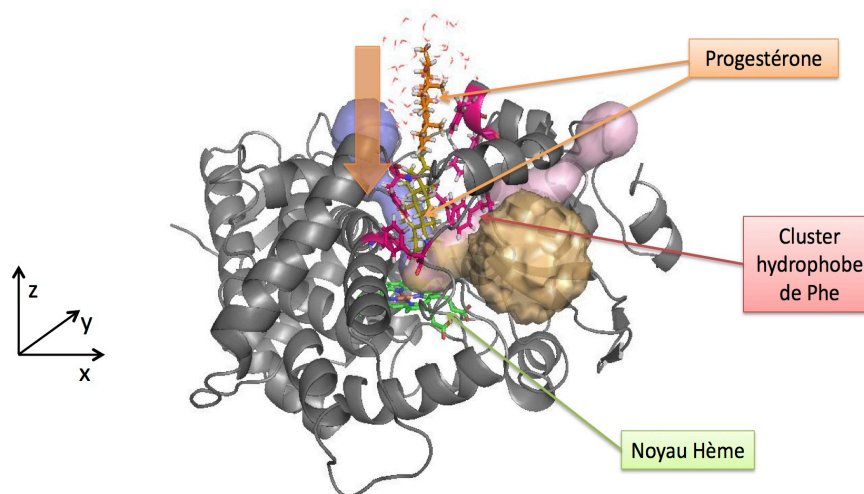
Les cytochromes P450 (CYP450) sont des enzymes de métabolisation particulièrement exprimées dans le foie. Ils portent un noyau hème autour duquel est définie une cavité active, site de fixation de ligands agonistes et antagonistes. Les CYP450 du sous-type 3A4 (CYP3A4) sont impliqués dans la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et d'autres lipides, ils sont également responsables de la biotransformation de la majorité des xénobiotiques (substances organiques exogènes).

Cette diversité de reconnaissance est possible car ces enzymes possèdent une cavité centrale large, dont la flexibilité permet un fonctionnement coopératif homotrope ou allostérique.

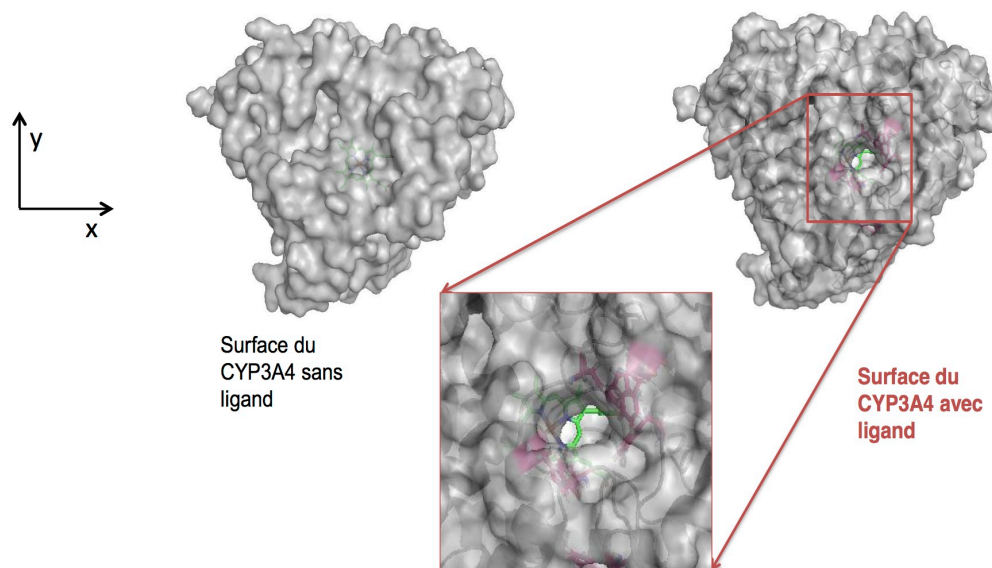
Des clusters hydrophobes ont été identifiés comme site d'entrée des substrats. Les chemins de sortie étant moins connus, j'ai participé à l'identification de tunnels potentiels à partir des structures libres et complexée avec un substrat naturel, la progestérone [Williams *et al.* 2004]. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la flexibilité de la protéine. Les tunnels détectés en présence de ligand, sont absents de la forme libre.



**Figure VII-1** – Visualisation du CYP3A4 (structure en hélice) et des tunnels de sortie des xénobiotiques transformés (surfaces transparentes bleu, rose et orange). La cavité active est définie au-dessus du plan du noyau hème (bâtonnet).



**Figure VII-2** – Visualisation du CYP3A4 complexé avec 2 molécules de substrats naturels de progestérone (orange et jaune) entourées d’eau. La flèche indique le passage du ligand au niveau d’un cluster hydrophobe.



**Figure VII-3** – Représentation vue du dessus de la surface du CYP3A4 libre (à gauche) et complexé avec des ligands (à droite). Pour plus de clarté les ligands ont été supprimés pour distinguer le canal d’entrée qui lui donne accès à la cavité active.



## 2. Développement d'un procédé de criblage virtuel de toxicité

Ce procédé s'appuie sur la comparaison d'un modèle tridimensionnel pharmacophorique de molécules à évaluer avec un ensemble de molécules connues, elles aussi décrites sous forme de pharmacophore 3D et pour lesquelles nous disposons d'information sur leur profil de toxicité.

La procédure va ainsi s'articuler en 3 parties, 1/ la création d'un pharmacophore 3D de la molécule à évaluer, 2/ une description tridimensionnelle des propriétés physico-chimiques de composés chimiques connus et constitution d'un entrepôt de données stockant ces descriptions ainsi que les données toxicologiques qui leur sont associées, et enfin 3/ une méthode de criblage virtuel s'appuyant sur la recherche de similitude pharmacophorique.

Pour une molécule dont on souhaiterait connaître ou prédire les propriétés toxiques (molécule requête), on parcourt l'entrepôt de données à la recherche de molécules similaires dont on connaît le profil toxicologique. La toxicité de la molécule requête est alors évaluée en fonction du degré de similitude détecté avec les molécules répertoriées dans la base de données.

Cet outil d'aide à la décision permet d'avoir différents éléments permettant d'étudier la toxicité potentielle d'un composé.

J'ai contribué à la conception des algorithmes de criblage et à l'évaluation de la diversité des bases de données employées. Enfin, j'ai participé à la mise au point de l'offre de prestation de service, principalement axée vers les industriels soumis à la réglementation européenne (REACH enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques) sur l'étiquetage des produits chimiques et vers les professionnels de la cosmétique. Ma participation aux remises des résultats aux clients m'a permis de mieux appréhender leurs besoins et d'orienter les optimisations de notre offre.

J'étais en charge de l'intégration dans la base de données des tests et critères toxicologiques. Pour cela, j'ai travaillé en collaboration avec des toxicologues afin de mieux appréhender les tests de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) en vigueur concernant l'organotoxicité, l'écotoxicité et la sensibilisation cutanée.

Ces travaux m'ont apporté une vision très enrichissante de l'apport de l'outil de modélisation et de prédiction des propriétés ADME-Tox dans l'industrie. En effet, la réglementation REACH et CLP (*Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures*) ont imposé des restrictions dès 2007 sur les produits chimiques produits ou importés en grand volume. De même, les industriels de la cosmétique ont été amenés à s'intéresser aux méthodes alternatives d'évaluation de la toxicité, puisque les tests sur animaux ont été interdits en 2013.

Ces trois projets illustrent le besoin et l'intérêt grandissant de l'étude et du développement d'outils permettant la modélisation voire la prédiction des processus biologiques. Ces approches sont discutées dans la publication parue dans *Drug Discovery Today* en 2008.

La contribution à ces différents projets m'ont permis d'avoir un aperçu des possibilités d'application de l'outil bioinformatique et plus particulièrement de la modélisation moléculaire.

J'ai collaboré avec des équipes hétérogènes et complémentaires (pharmaciens, toxicologues, chimistes, informaticiens, biologistes, bioinformaticiens, commerciaux, clients) et d'abordé des domaines d'activité variés tels que la biologie, la chimie, la biophysique, l'informatique et la toxicologie.



# *In silico* platform for xenobiotics ADME-T pharmacological properties modeling and prediction. Part I: beyond the reduction of animal model use

Reviews • INFORMATICS

Lucie Huynh<sup>1</sup>, Rosalinde Masereeuw<sup>2</sup>, Thomas Friedberg<sup>3</sup>, Magnus Ingelman-Sundberg<sup>4</sup> and Philippe Manivet<sup>5,6,7,8</sup>

<sup>1</sup> Division of Structural Biology, ADME-T Modeling Platform, BioQuanta, Paris 05, France

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, The Netherlands

<sup>3</sup> Biomedical Research Centre, Cancer Research UK Molecular Pharmacology Unit Level 5, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Scotland, United Kingdom

<sup>4</sup> Section of Pharmacogenetics, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>5</sup> APHP, Hôpital Lariboisière, Service de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Unité de Biologie clinique structurale, Paris 10, France

<sup>6</sup> Université Paris Descartes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris 06, France

<sup>7</sup> Franco-Thai Molecular Modeling Unit (FTMMU), Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

<sup>8</sup> INSERM U829, Université d'Evry-Val d'Essonne, Evry, France

There is an urgent need for efficient *in silico* ADME-T prediction tools for the selection of potent therapeutic drugs as well as the elimination of toxic compounds. This is particularly important in view of the high costs and ethical issues inherent to the use of animal models for drugs filtering. To achieve this mission, not only does the accuracy of *in silico* tools need to be improved, but also new experts in the field with skills in theoretical chemistry, clinical and fundamental biology have to be trained. Similarly, clinical biologists committed to the obligation of means and legally responsible for the results they generate could establish a legal framework that defines legal responsibilities when performing *in silico* predictions.

## Introduction

Since 1993 the European Union, through the Scientific Advisory Committee of European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), has been promoting the scientific and regulatory acceptance of alternative methods to animal experimentation. They are of importance to biosciences as they can 'reduce, refine or replace the use of laboratory animals'. Recommendations were made about the best ways to use various types of *in vitro* tests for evaluating toxicity of xenobiotics. Besides *in vitro* tests, *in silico* methods have been recently proposed as an alternative. The recently published REACH regulation mentions QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) techniques for 'predictive toxicology'. The scope of REACH<sup>1</sup> principles application concerns

the chemical industry. It requires the registration, over a period of 11 years, of some 30,000 chemical substances in use today, 'a process which will allow to fill information gaps on the hazards of substances and to identify appropriate risk management measures to ensure their safe use'. In 2007, the REACH principles induced the emergence of a comparable regulation in the USA from the U.S. Environmental Protection Agency named ToxCast.<sup>2</sup> It concerns 'the safeguard of public health and the environment from harmful effects that may be caused by exposure to pollutants in the air, water, soil, and food'. ToxCast also promotes 'the application of *Computational Toxicology* to assess the risk chemicals poses to human health and environment'. Besides the chemical industry, the application of REACH principles can be extended to the pharmaceutical industry, which also has an urgent need for new *in silico* 'solutions' to generate new, active and nontoxic

Corresponding author: Manivet, P. (philippe.manivet@lrb.aphp.fr)

<sup>1</sup> REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) system, proposed by the Commission's White Paper on a Future Chemicals Policy ([http://ec.europa.eu/enterprise/reach/reach/archives/white\\_paper/introduction/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/reach/archives/white_paper/introduction/index_en.htm)).

<sup>2</sup> ToxCast (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) predicting hazard, characterizing toxicity pathways, and prioritizing the toxicity testing of environmental chemicals (<http://www.epa.gov/comptox/toxcast/>).



guide molecular modelers on how accurately to model 'the body' through the summation of three-dimensional models and the pharmacophores of drugs and protein targets involved in ADME parameters. This multidisciplinary platform would help 'refresh' old concepts used in conventional molecular modeling, data mining and QSAR studies to model biological processes and ADMET properties, like octanol-water partition coefficient, similarity measures based on molecular 2D-fragments or crude distance matrix-based pharmacophore definition.

#### REACH or not REACH: that is not the question

We already mentioned the obvious necessity to design realistic and pragmatic *in silico* tools combined with *in vitro* experiments within a multi-technology platform, especially in view of a possible reduction of animals used for toxicity assays. Pressure on regulatory authorities from politicians, public opinion, media and the scientific community underpins REACH principles, which were designed for, and are directly applicable to, all industries using chemicals. Everyone agrees that the reduction of animal use is an important matter and the main argument addressed by REACH. Another one is equally, if not more, important: human health. Chemicals are often found in the 'customers' plate'. Drugs and chemicals can have side effects on human beings, which nowadays is difficult to ignore. Thus, it is obvious and logical for any chemical to be subjected to toxicological investigations and controlled in ways similar to drug compounds in the pharmaceutical industry. Xenobiotics can be released in the environment, taken up by animals and finally by humans, eventually metabolized, resulting in active and/or toxic metabolites. Hence media and authorities often report about dangerous chemical components in various consumer goods, such as toys, wallpaper or many housewares. Checks exerted by authorities on chemicals should force the chemical industry to move toward 'clean chemistry'.

Another interesting impact of REACH and *in silico* methods concerns drug development. Toxicity prediction made for, or by, the chemical industry can be taken up by the pharmaceutical or cosmetic industries. Indeed, some of the chemicals used are carcinogenic or cytotoxic and therefore generate human diseases. Yet, those poisons can be a source of inspiration for drug designers. For example, some chemicals can be used again after modifications for pathology treatments: some pesticides on the market were found to be potential anticancer drugs [2]. Though such a strategy may not appear very popular, it could help both the pesticide industry to become cleaner and the pharmaceutical industry to increase the diversity of its lead compounds' pipeline. Further, the pharmaceutical industry could extend the application of *in silico* methods to the numerous libraries that were rejected to the 'trash bin' for toxicity reasons and to save a good portion of the multi-billion dollar expenses on drugs for which toxicity was revealed during clinical phases. Even if there is still a debate on the pertinence of REACH principles and their concrete applicability, their impact goes beyond the simple regulatory anecdote toward a public health issue. This revolution has already started. *In silico* is one of the alternative technologies promoted by ECVAM. *In silico* methods and technologies have here the opportunity to win their spurs; however, it is not so simple. There is a lack of complete *in silico* solutions adapted to the requirements for the safety evaluation of chemicals and drugs. Even the pharmaceutical industry

cannot provide any real solution to the current need. Three main issues need to be addressed: the standardization of *in silico* approaches for modeling ADME-T properties of any compound; the choice of *in vitro* models and experiments designed to achieve the validation of the predictability power of *in silico* tools, and, finally, what position do *in silico* specialists want to adopt with respect to their responsibility on the results they provide from their *in silico* tools? This latter point is most crucial because it influences the two first parameters and opens the debate. As long as *in silico* sciences are viewed secondary to biological results as the main thrust supporting decisions and journal publications, wide acceptance as a really valuable tool will be difficult.

Contract Research Organization investigators provide controlled and standardized clinical results to their clients, the pharmaceutical industry. In a similar fashion, diagnostics equipment and kit manufacturers, committed to product liability, have set up relevant quality control procedures run by adequately trained personnel, and their supplies are also being checked by healthcare professionals. Clinical biologists (physicians) or healthcare professionals also pledge their civil and criminal responsibilities in the course of their daily professional activity. No error is acceptable when diagnosing an inherited genetic disease or when a prognosticator, vital to a patient is threatened. Similarly, *in silico* specialists should take on risks and responsibilities, should they wish to be considered as evaluators. For this purpose, *in silico* technology should be subject to the same evaluation as clinical biology: standardization, reproducibility, precision, accuracy, detection limit, and so on. In our proposed multidisciplinary platform, *in silico* investigations are performed by the people at the interface of biology and chemistry (see the accompanying article: '*In silico* platform for xenobiotics ADME-T pharmacological properties modeling and prediction. Part II: the body in a Hilbertian space'). It is thus easy for the clinical biologist with skills in quantum chemistry and drug design to transfer standardization technology from hospital to *in silico* tools, raising their level of accuracy. Structural biology and clinical biology are merged together; Structural Clinical Biology is born.

#### State of the art of ADME-T *in silico*

Modeling the ADME-T pharmacological parameters of a drug is a complex task. Difficulty emanates from the large number of enzymes, transporters and regulatory mechanisms involved in biotransformation, toxicity and inter-relationships existing between each ADME-T property. Phase I metabolizing enzymes are the most frequently studied by molecular modeling and to a lesser extent Phase II conjugating ones. However, Phase 0 and Phase III transporters involved in the modulation of the cellular entry and exit, respectively, of the parent or metabolized compounds are always neglected [3,4]. Besides the toxicity of a parent compound, in some cases, toxicity of a drug can be influenced by a transporter by concentrating, for instance, a drug or one of its metabolites in tissues.

Metabolism of a drug may take place virtually immediately in intestinal cells or during its first passage through the liver. Drug metabolites can be reabsorbed after their elimination in the bile and can become toxic by intra-organ accumulation. ADME-T is a schematic and convenient concept, but, in fact a too rapid shortcut for classifying a large number of integrated processes concerning many

tissues where drugs are partitioned and undergo chemical transformations; where each metabolite, in turn, may act in a distant organ after diffusion from the previous one. This concept finally increases the difficulty of interpreting and predicting drug biotransformation and toxicity rather than simplifying it. Two main strategies are currently used for modeling virtually each ADME parameter and predicting toxicity. The first one is based on PBPK data obtained from *in vivo* or *in vitro* experiments in animals. These make use of the simulations of the actual measurements of ADME-Tox properties in animals. Software currently used for biokinetics, include WinNonlin [5,6], GastroPlus [7], COSMOfrag [8] and OraSpotter [9]. Organs or groups of organs are considered as discrete interconnected compartments with physiological volumes and blood flows. These models account for physiological influences and are used to estimate internal tissue concentration, allowing extrapolation between species, doses and routes. In particular, physiological parameters include species dependence of tissue volumes and blood flows. Chemical-specific parameters include intrinsic clearance, enzyme affinity and rate of reaction, plasma membrane permeability, renal and biliary excretion clearances, plasma protein binding, tissue-to-plasma partition coefficients and absorption parameters. Data on these metabolic parameters are obtained from *in vitro* studies (e.g. using hepatocytes and/or subcellular fractions like microsomes). Though widely used, these software applications are limited by the nature and physical dimensions of dependent variables (biological descriptors) upon which they are based. Finally, they give only general information on the biological behavior of an organ or a tissue. They are also limited by the mathematical formalism of PBPK equations that ignore structural and physical properties of drug compounds. In spite of a good predictability obtained with biokinetics algorithms, they fail correctly to classify a large number of drugs, cannot predict their ADME-T properties and cannot direct lead optimization.

The second *in silico* strategy for studying ADMET properties relies on molecular modeling and quantum chemistry techniques. This is a great progress toward prediction of the ADME-T properties of drugs, because those techniques have an edge on PBPK software: they allow the simulation of interactions between drugs and macromolecules acting along the ADME-T pathway at the atomic or molecular level. They are, however, limited by a lack of standardization and reproducibility and require further improvement before they can be considered acceptable for the prediction of ADME-T properties [10]. Hence, the number of scientific publications dedicated, for instance, to molecular dynamics (MD) study of cytochrome (CYP) inhibitor and substrate interactions or the study of interactions between a drug and the heme/iron ion complex with quantum chemistry, still remains modest although growing. In the case of MD simulation of drug/cytochrome interactions, force fields used for simulations, like those proposed by CHARMM [11] or AMBER [12], lack a correct mathematical term for modeling metal/ligand interactions (soft anharmonic potential for modeling iron coordination, induced polarization and anisotropic hydrogen bond terms, explicit and free water internal coordinates) needed to simulate the heme/iron complex, whether or not embedded in water solvent. Those simulations only permit the production of crude results, potentially leading to false interpretation of drug transformation mechanisms. No study using MD techniques is dedicated to the clear understanding of the allosteric activation

of CYP, a prerequisite for the simulation of drug/CYP complexes and of putative reaction mechanisms involved in substrate transformation. All CYP/drug studies concern CYP/inhibitors (see [13] as an example) and very rarely CYP/substrate or inducer. It is well-known in structural pharmacology that modeling interactions between a targeted protein (receptor, transporter and enzyme) and an antagonist or an inhibitor is easier than modeling its interactions with an agonist or an allosteric change inducer. MD techniques are rarely well-documented with any information relating to the used force field and homology modeling methods of CYP are crudely performed. Furthermore, many improvements are needed in quantum mechanics (QM). For instance, most investigations performed on porphyrin-type structures as models for heme in cytochromes use very low levels of calculations with nonaccurate basis sets, which are recommended for describing very weak interactions, like charge transfers. Those calculations are usually performed on the whole tetrapyrrolic molecule. Using an accurate level of calculations and extended quantum basis sets is hindered by the size of the system. Moreover, water solvent is always neglected in all calculations. Finally, QSAR, MD and QM are always focused on a single CYP or transporter involved in ADME-T.

Molecular fragments-based *in silico* methods [14] lead to unsatisfactory drug toxicity predictions. They show poor accuracy, because they are based on 2D molecular fragments that are not representative of the whole molecule's physical and electronic properties. Hence, toxicity data generally concerns one tissue. Moreover, no information is available on the enzyme, transporter or receptor responsible for the toxic mechanism in the tissue concerned. No structural data can thus be extracted from those studies, and multidimensional mathematical space is reduced to 2D or 1D with substantial losses of information.

Yet, the physical background of those techniques is excellent in that they have already proven their accuracy in other topics. The level of theory has, however, to be correctly adapted to the needs of pharmaceutical industry and the regulatory requirements of the European Union for ADME-T prediction. These methods need to be integrated inside a multidisciplinary platform including *in silico* and experimental assays. The results obtained have to be interpreted in the context of the whole process of drug biotransformation after mathematical integration. Hence, *in silico* methods must be standardized like *in vitro* biological experiments, their accuracy and reproducibility being validated by a clear protocol.

#### Understanding cell physiology transposed to simple *in vitro* models: the grail of ADME-T *in silico* prediction

*In silico* ADME-T predictive models exist thanks to biological or physicochemical data. *In silico* models must be validated by *in vitro* experimental assays. The availability of exploitable and reliable experimental data is a real bottleneck for building efficient *in silico* ADME-T predictive models. Many criticisms focus on transfected cells arguing that *in vitro* cell lines do not reflect the physiological situation. It is well-known that transfected cells overexpressing a protein of interest, like a receptor or a transporter, are useful for obtaining molecular information about the interaction of substrates with this protein of interest. Hence, it is an artificial system that requires information of endogenous expression levels for accurate *in silico* predictions. This is particularly true for transmembrane transporters using ionic gradients which are sensitive to the regulation

exerted by cell signaling cross-talks or *trans*-activations. Note that phosphorylation is only one way of regulation, proteins can also be glycosylated, inserted or subtracted from the membrane by various mechanisms. Therefore, caution must be taken when choosing cell type. For example, in a serotonin (5-HT) uptake study [15], we successfully used blood platelets naturally expressing the 5-HT transporter. Molecular modelers do not, however, intend to re-examine the cell signaling already described by others or to bypass *in vivo* assays. They use the cell as a tool for validating their *in silico* models. In this regard, they must have a complete understanding of the cell models. Experimental validation of *in silico* 3D or QSAR models is in fact a two-pronged strategy: (i) for instance, accuracy of the 3D-homology model or a crystal structure of a transmembrane receptor has to be checked for the rational design of ligand affinity prediction. Important residues for the ligand binding selected by molecular modeling are then mutated in the receptor and mutants are transfected in a cell line. Then radio-ligand binding assays (or uptake measures for any transporter) are performed and ligand affinity is measured in transfected cells. Finally, the 3D model is refined or rejected. Transfection is achieved in cells that do not naturally express the wild-type protein and do not contain additional coupling with the cytosolic proteins altering the natural function of the protein of interest. (ii) Once the 3D model is validated, predictability accuracy is tested *in vivo* with a new set of molecules. Predicted values of *in vivo* effects are finally confronted with *in vivo* experiments in animal models.

### Conclusion

In the present review, we showed that the recent emergence of REACH principles gives the opportunity to *in silico* methods to win their spurs. It is clear that applicability of *in silico* methods goes beyond the chemical industry and can be extended to pharmaceutical, cosmetics and food industries. Although pharmaceutical industry claims to have already used efficient ADME-T prediction tools through 'scientists who possess both biological intuition and computational skills' [16], current tools need to be improved

because failures in clinical phases are frequently met because of unpredicted late toxicity of leads, leading to billions of dollars wasted in abandoned drug development programs. Existing solutions are thus inadequate. A large gap exists between current *in silico* techniques and real adapted methods directly applicable for ADME-T prediction. Weaknesses relate to scientific background and *in silico* results interpretation. A revolution is needed in researchers mentalities to wash out old obsolete surviving dogma in physicochemistry and drug design that prevent rapid evolution of modeling techniques. Hence, scientists who use and develop *in silico* ADME-T modeling tools must have more than a biological intuition of human body organ functions. They need to collaborate and share knowledge with experts in fundamental biology and specialists of protein families involved in xenobiotics biotransformation in organs where metabolism and transport are intense. In addition, they also have to practice clinical biology 'close to the patient' to grasp the essence of clinical biology and interpret multidimensional information of xenobiotics biotransformation in the patient's body context. Experience grasped on cells, tissues or small animals are good, but ADME-T concerns human beings. In this way, it seems logical to get closer to the patient for ADME-T interpretation and to guide development of accurate and adapted *in silico* tools. People with skills in both theoretical chemistry and clinical biology are rare. A strong partnership between pharmaceutical and chemical industries, biotechnology companies, universities, hospitals and regulatory bodies will be necessary for training the new type of professionals in our schools, and allowing them to work in the framework of 'clinical structural biology'. All partners will benefit from this new born 'translational science'. Another important question we address in our review is the legal responsibility that molecular modelers will have to accept to assume if they want their methods to be considered as equivalent to *in vitro* ones. Official recognition of the *in silico* tools value is a great chance. However, this means a higher level of constraints in evaluating quality of results and a complete acceptance from molecular modelers in assuming the legal consequences.

### References

- 1 Tetko, I.V. *et al.* (2006) Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions? *Drug Discov. Today* 11, 700–707
- 2 Clément, M.-J. *et al.* (2008) Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin. *Biochemistry* 47, 13016–13025
- 3 Giacomini, K.M. and Sugiyama, Y. (2005) *Membrane transporters and drug response*. In Brunton L. (11th edn) (McGraw-Hill Professional New York, eds), pp 41–70
- 4 Szakács, G. *et al.* (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13, 379–393
- 5 Metzler, C.M. (1989) *PCNONLIN Version 3.0. Software for the statistical analysis of nonlinear models on micros*. SCI Software, Lexington, KY, USA
- 6 Campos Moreno, E. *et al.* (2007) Population modelling to describe pharmacokinetics of amiodarone in rats: relevance of plasma protein and tissue depot binding. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 190–197
- 7 De Buck, S.S. *et al.* (2007) The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metab. Dispos.* 35, 649–659
- 8 Honiq, M. and Klamt, A. (2005) COSMOfrag: a novel tool for high-throughput ADME property prediction and similarity screening based on quantum chemistry. *Chem. Inf. Model.* 45, 1169–1177
- 9 Svava Ósk, J. *et al.* (2005) Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics* 21, 2145–2160
- 10 Boobis, A. *et al.* (2002) *In silico* prediction of ADME and pharmacokinetics: report of an expert meeting organised by COST B 15. *J. Pharm. Sci.* 17, 183–193
- 11 Brooks, B.R. *et al.* (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4, 187–212
- 12 Weiner, S.J. *et al.* (1986) An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comput. Chem.* 7, 230–252
- 13 Afzelius, L. *et al.* (2001) Competitive CYP2C9 inhibitors: enzyme inhibition studies. Protein homology modelling and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *Mol. Pharmacol.* 59, 909–919
- 14 Hulzebos, E. *et al.* (2005) Validity and validation of expert (QSAR) systems. *SAR QSAR Environ. Res.* 16, 385–401
- 15 Pratuangdejkul, J. *et al.* (2005) Definition of an uptake pharmacophore of the serotonin transporter through 3D-QSAR analysis. *Curr. Med. Chem.* 12, 2393–2410
- 16 Kumar, N. *et al.* (2006) Applying computational modelling to drug discovery and development. *Drug Discov. Today* 11, 806–811

# Chapitre VIII.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

*Ce dernier chapitre clôt ce manuscrit de thèse en résumant le travail qui a été mené, et en donnant un regard plus personnel sur ces quatre années de thèse.*

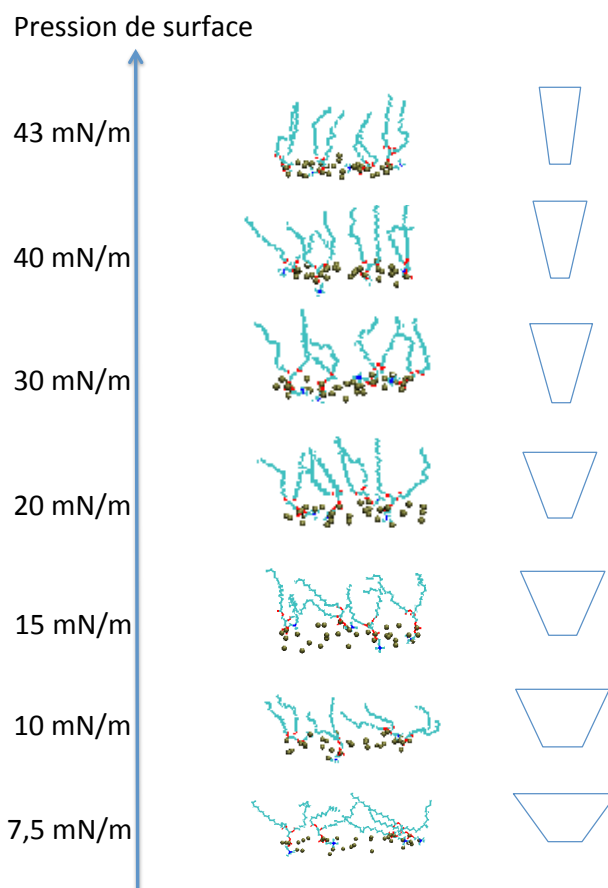
---



Le travail effectué durant cette thèse a porté sur l'étude au niveau moléculaire des propriétés structurales et organisationnelles des phospholipides 1-palmitoyl-2-oléoyl-glycérophosphatidylcholine (POPC), phospholipides majoritaires dans les bicouches biologiques. Afin d'accéder aux détails des phénomènes se déroulant à une échelle atomique, j'ai développé des modèles de monocouches de POPC par modélisation moléculaire et simulé leur comportement par dynamique moléculaire à différentes valeurs de pression de surface, dans le but de reproduire une isotherme de compression de monocouche de POPC. Celle-ci a été confrontée à une isotherme expérimentale, qui a été réalisée parallèlement par le groupe du Professeur Rosilio, spécialisé dans l'étude de la physico-chimie des interfaces. Le comportement des POPC a été étudié expérimentalement par la compression de monocouche de POPC en balance de Langmuir. En effet, les monocouches lipidiques sont des modèles très utilisés pour l'étude des membranes biologiques car ils permettent un contrôle précis de paramètres tels que la nature des lipides, leur nombre, la température ou la pression. Leur compression sur balance de Langmuir permet d'accéder à l'isotherme de compression qui trace l'évolution de la pression de surface en fonction d'une variation de l'aire moléculaire, deux paramètres non mesurables directement pour une bicouche. C'est un modèle d'étude qui permet également l'étude d'interaction des lipides de la monocouche avec d'autres molécules thérapeutiques ou toxiques. Les variations de l'aire moléculaire et de la pression de surface fournissent, en effet, des indicateurs des interactions lipides-lipides ou lipides-molécules. Cependant, l'étude de l'organisation structurale des molécules n'est accessible que par des techniques de modélisation moléculaire.

Nous avons donc modélisé une monocouche de POPC à l'interface eau/vide. Des simulations de dynamique moléculaire à différentes valeurs de tension de surface à 293 K et 300 K nous ont permis de reproduire pour la première fois une isotherme de compression de monocouche de POPC par dynamique moléculaire. La comparaison des isothermes simulées avec une isotherme mesurée expérimentalement par le groupe du Professeur Véronique Rosilio montre une bonne corrélation. L'obtention d'isothermes de compression n'est pas triviale, la fluctuation des aires moléculaires aussi bien expérimentales que simulées en témoigne. Cependant, les variations d'aires moléculaires que nous avons simulées sont du même ordre de grandeur que les variations expérimentales. De plus, les paramètres macroscopiques calculés tels que le profil de densité électronique, le nombre d'hydratation sont cohérents avec les valeurs relevées dans la littérature et ont montré une évolution cohérente avec l'augmentation de la pression de surface. Ceci permet une validation du modèle utilisé ainsi que du protocole de dynamique moléculaire mis en œuvre dans ces travaux de thèse.

Nous avons ainsi pu poursuivre avec des analyses plus détaillées de la structure des POPC en fonction de la variation de pression de surface. Les résultats obtenus montrent une adaptation du *packing* des POPC en réponse à la compression (Figure VIII-1).



**Figure VIII-1** – Illustration de l'adaptation du *packing* des phospholipides en fonction de la pression de surface. Au centre, les instantanés pris à la fin des simulations aux différentes pressions de surface. Pour plus de clarté, seuls quelques lipides sont représentés, les chaînes carbonées sont colorées en cyan, les atomes de phosphore en ocre et les oxygènes en rouges. A gauche, les schémas des *packings*.

Les lipides se rapprochent les uns des autres sous l'effet de la compression entraînant des changements structuraux et organisationnels. Les études de transition de phase attribuent les changements structuraux essentiellement aux chaînes hydrophobes (Murzyn 2001, Seelig & Seelig 1977). Les résultats de nos analyses ont permis de montrer que les têtes polaires comme les chaînes hydrophobes adoptent leur conformation en fonction de la tension de surface.

#### Etude de la tête polaire

Nous avons mis en évidence une distribution bimodale de l'orientation du vecteur PN par rapport à la surface de la monocouche. Les résultats que nous avons obtenus confirment la coexistence d'une

orientation perpendiculaire à la monocouche avec l'orientation parallèle plus connue pour les systèmes de bicouches. Bien qu'il ne semble pas y avoir d'orientation unique à basse pression ou à haute pression pour les POPC, l'orientation pointant le groupement choline vers le solvant, serait cependant préférentiellement adoptée en réponse à une augmentation de pression de surface ou une diminution de l'aire moléculaire.

L'analyse détaillée des dièdres des têtes polaires a ensuite mis en évidence une distribution particulière des angles encadrant l'atome de phosphore. La comparaison des résultats que nous avons obtenus avec de précédentes données expérimentales de la littérature, permet de conclure que le comportement des têtes polaires a été correctement reproduit par DM. Ainsi nous avons pu identifier les angles encadrant le phosphore comme étant responsables de la torsion des têtes polaires.

### Etude du glycérol

Nous avons également mis en évidence une distribution large de l'angle d'inclinaison du glycérol (de 20° à 80°), indiquant qu'il est davantage incliné par rapport à la normale de la monocouche que dans la bicouche. L'augmentation de la pression de surface tend à favoriser le décalage des distributions des angles vers des inclinaisons plus faibles. Etant donnée sa position centrale dans la structure du POPC, nous avons supposé que l'orientation du glycérol a un impact non négligeable sur l'organisation des chaînes hydrophobes.

### Etude des chaînes alkyles

L'inclinaison des chaînes hydrophobes par rapport à la normale à l'interface diminue en réponse à une augmentation de la compression. Plus la pression augmente, plus les chaînes adoptent une orientation verticale.

De même, les profils de paramètre d'ordre ont montré l'augmentation de l'ordre au cours de la compression. A la pression de surface de 30 mN/m, pression d'équivalence entre bicouche et monocouche, le profil de la chaîne insaturée simulé est en bonne corrélation avec le profil expérimental obtenu pour la bicouche. Cependant, le profil simulé de la chaîne saturée en monocouche est nettement différent de celui obtenu expérimentalement pour la bicouche. Les valeurs de paramètre d'ordre sont élevées et varient faiblement selon la position du carbone. Cela semble indiquer une certaine indépendance dans le comportement des deux chaînes d'acide gras. Nous avons montré que les dièdres de la chaîne saturée étaient davantage sensibles à la variation de pression que ceux de la chaîne insaturée.

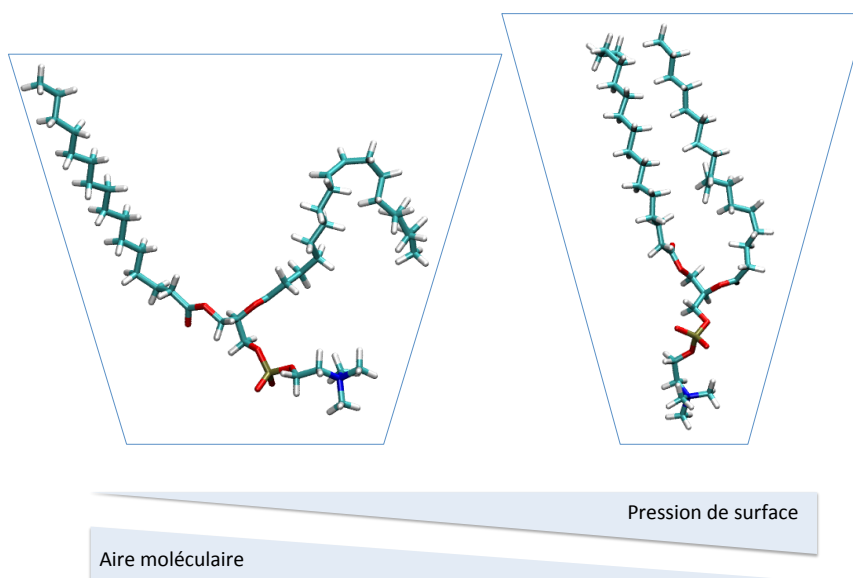
Nous avons corrélé ce comportement indépendant à l'inclinaison plus forte du glycérol dans la monocouche par rapport à la bicouche mais aussi à l'observation d'une ségrégation spontanée des

chaînes entre elles, conduisant à la formation de clusters. Nous attribuons le caractère ordonné et indépendant des deux chaînes à cette organisation préférentielle par type de chaînes.

L'analyse structurale des POPC a mis en évidence des changements de conformation en fonction de la pression de surface conduisant à une diminution de l'aire moléculaire au cours de la compression.

La corrélation des résultats obtenus pour l'orientation des têtes polaires, l'inclinaison du glycérol et celle des chaînes montre que les phospholipides ont tendance à s'incliner lorsque la surface occupée par les têtes est grande et à se redresser lorsque les têtes plongent davantage dans le solvant à haute pression (Figure VIII-2). Ceci tend à confirmer la théorie de *packing* selon laquelle la conformation des têtes à l'interface pousse les chaînes à s'organiser d'une manière énergétiquement favorable.

Si l'influence d'une partie sur l'autre ne peut être déterminée, leur interdépendance a clairement pu être mise en évidence.



**Figure VIII-2** – Schéma de l'interdépendance des conformations des têtes polaires et des chaînes alkyles. A basse pression, l'aire occupée par les chaînes est grande et la tête polaire est parallèle à l'interface. A haute pression, l'aire occupée par les chaînes est faible et la tête polaire est perpendiculaire à l'interface.

De plus, les résultats que nous avons obtenus suggèrent une différence de conformation des phospholipides selon qu'ils sont organisés en monocouche ou en bicouche.

On aurait pu penser que l'interaction entre les deux feuillettes des bicouches réduit le degré de liberté de mouvement des fins de chaînes, induisant ainsi un ordre dans les lipides et que l'absence de cette interaction dans les monocouches conduirait à un désordre des chaînes.

L'absence d'un second feuillet laisserait en fait davantage de liberté aux phospholipides pour s'organiser et adopter les conformations les plus énergétiquement favorables. L'organisation en monocouche conduirait donc à un ordre plus élevé que dans un assemblage en bicouche.

Une étude comparative par dynamique moléculaire des paramètres d'ordre de modèles de bicouches permettrait de vérifier ou infirmer cette hypothèse.

Les travaux que nous avons réalisés sur des systèmes de monocouches 4 fois plus grandes ont montré que des systèmes réduits à une trentaine de lipides comportaient suffisamment de molécules pour atteindre un échantillonnage significatif pour évaluer les propriétés organisationnelles des phospholipides en monocouche. Compte tenu de la puissance de calcul nécessaire pour la simulation des systèmes membranaires, l'optimisation de la taille des systèmes est un paramètre important dans la mise en œuvre de leur étude par modélisation moléculaire. Elle permet d'établir un bon compromis entre ressource et temps de calcul. De même, les champs de force spécialisés que nous avons testés ont montré des résultats très dépendants des paramètres utilisés. Ceci souligne l'importance du choix du champ de force en fonction de ce que l'on souhaite simuler.

Pour conclure, les résultats obtenus de nos simulations durant ces travaux ont été confrontés à des données expérimentales et des données de simulation issues de la littérature. La bonne corrélation de ces données permet de conclure à un modèle correct de monocouche ainsi qu'à une reproduction satisfaisante des propriétés structurales des POPC organisés en monocouche par dynamique moléculaire. L'utilisation du champ de force général d'AMBER GAFF a montré une capacité à reproduire comportement dynamique des POPC (non seulement les propriétés structurales mais aussi les propriétés macroscopiques telles que l'aire moléculaire). Il offre ainsi la perspective de transférer ce protocole de dynamique à l'étude de l'incorporation de molécules organiques dans les monocouches.

Cette étude a permis d'appréhender les propriétés conformationnelles des POPC à un niveau moléculaire et d'établir les bases d'un protocole d'étude des monocouches de phospholipides en combinant l'expérience de la compression en balance de Langmuir et la modélisation moléculaire. La partie expérimentale apportant les données qualitatives de la cohésion du film étudié par la mesure de la tension de surface et la modélisation moléculaire les complétant par des données structurales et conformationnelles des phospholipides, non accessibles autrement.

La flexibilité des têtes polaires mise en évidence ici est un paramètre important à prendre en compte dans une étude plus poussée des interactions électrostatiques participant à la tension de surface des films lipidiques. De même, les orientations des têtes polaires apportent un élément nouveau à l'étude des réseaux de liaisons hydrogène intervenant dans l'hydratation des lipides. Ces détails structuraux

permettent de mieux comprendre les interactions au niveau des têtes lipidiques et mieux appréhender la perturbation de ces interactions par un composé tensioactif.

Enfin l'organisation des têtes polaires est un paramètre essentiel dans la considération du passage de molécules à travers les membranes puisque les têtes constituent les zones les plus périphériques des membranes. De plus, alors que l'on attribue une grande flexibilité aux chaînes alkyles, les résultats de notre étude par dynamique moléculaire ont permis de mettre en évidence un certain ordre au sein de la zone hydrophobe. Les chaînes oléoyles portent une double-liaison *cis*, elles sont de ce fait, plus flexibles que les chaînes palmitoyles. Cependant, l'analyse des dièdres a montré une insensibilité de la chaîne insaturée à la variation de pression, contrairement à la chaîne palmitoyle saturée. Enfin l'analyse des trajectoires de simulation a permis l'observation de la formation de cluster par type de chaîne alkyle, qui corrobore un comportement très ordonné et indépendant des chaînes hydrophobes. L'existence de ces domaines hydrophobes apporte des éléments capitaux à la compréhension de l'organisation de la région hydrophobe et représente un paramètre important à considérer dans l'étude du passage de composé à travers le cœur hydrophobe des membranes.

Nous avons utilisé les techniques de modélisation moléculaire pour étudier à un niveau atomique les propriétés structurales des phospholipides POPC organisés en monocouche, dans le but de mieux comprendre leur comportement et leur organisation mais aussi dans une perspective de poursuivre ces travaux en variant et en complexifiant la composition des monocouches ou d'étudier la perturbation des monocouches par des molécules thérapeutiques ou toxiques.

Ainsi, la simulation d'autres types lipidiques permettra de savoir si les observations faites au cours de nos travaux sont spécifiques des POPC. L'étude de l'influence de la longueur des chaînes et de la position des insaturations permettrait d'évaluer si elles peuvent être généralisées à tous les phospholipides portant deux acides gras différents.

De même, des simulations de monocouches composées d'un mélange de lipides peuvent être réalisées afin de se rapprocher de la composition des membranes biologiques. La variation de la composition de monocouche constitue un modèle informatif du comportement de chaque feuillet des bicouches membranaires, particulièrement intéressant pour l'étude de protéines, peptides ou molécules n'interagissant qu'avec un seul feuillet. L'introduction de molécules de cholestérol permettrait la modélisation des rafts lipidiques et d'en mesurer la tension de surface offrant ainsi un indice sur le degré de compaction à laquelle sont soumises les protéines qui y sont enchâssées.

La modélisation moléculaire fournit une interprétation moléculaire de la perturbation de la tension de surface d'une monocouche par un composé tensioactif qui pourrait permettre de catégoriser ces molécules selon leur mode d'interaction avec les lipides.

La modélisation de bicouches lipidiques permettra l'étude de leur perméabilité aux molécules thérapeutiques, aux interactions protéines-membrane, molécules-membrane, et participer au développement de molécules ciblant les membranes ou destinées à les traverser.

L'ensemble des résultats permettra d'obtenir un système puissant de prédiction des mécanismes des interactions molécules-membranes biologiques pour évaluer *in silico* et prédire l'intérêt de différents types moléculaires en fonction de la composition des cellules ciblées.

Le domaine d'application s'étend à toutes les molécules tensioactives, impliquées dans la composition des surfactants pulmonaires, mais aussi les molécules cryoprotectrices, antimicrobiennes, anesthésiques, les xénobiotiques ou encore des molécules dérivées de porphyrine, utilisés comme photosensibilisateurs dans la photothérapie des cancers superficiels. L'étude de l'incorporation de ces molécules dans les monocouches de POPC fait l'objet d'un projet post-doctoral en collaboration avec 4 équipes du Pole de Recherche et d'Enseignement Paris Sud (PRES).

Enfin d'un point de vue plus personnel, ma formation en bioinformatique m'a permis d'appréhender des problématiques biologiques appliquées au domaine industriel telles que la prédiction de paramètres ADME-Tox.

Mes travaux sur l'étude du comportement des phospholipides organisés en monocouche s'insèrent dans la problématique de la perméabilité membranaire aux molécules thérapeutiques et toxiques.

La réalisation d'une partie de cette thèse dans l'industrie m'a permis de voir l'immense champ d'application de l'outil bioinformatique et plus particulièrement celui de la modélisation moléculaire. J'ai en effet participé à l'étude par dynamique moléculaire de protéines transmembranaires (récepteur et transporteur de la sérotonine) ou d'enzymes de métabolisation de xénobiotiques tels que les cytochromes P450.

J'ai également contribué au développement d'une plate forme de prédiction de toxicité par similarité pharmacophorique, non explicitée dans ce manuscrit. Ma participation à la mise en place de l'offre de service de prédiction de toxicité m'a permis de me rendre compte de la puissance qu'offre l'outil de la modélisation moléculaire. En permettant l'accès aux interactions moléculaires, elle fournit des informations cruciales à la compréhension des mécanismes biologiques que l'expérimentale ne permet pas et peut ainsi contribuer à l'optimisation des molécules thérapeutiques.

Ayant eu la chance de collaborer avec des personnes aux profils très hétérogènes, j'ai abordé des domaines variés tels que la biologie, la biophysique, la chimie et l'informatique qui touchent directement la santé humaine, dans un contexte industriel. Un travail collaboratif et transversal qui à mon sens constitue un moteur essentiel à la dynamique du travail de recherche

# Bibliographie



---

## Références bibliographiques

---

— A —

- Akamatsu, Miki, Masaaki Fujikawa, Kazuya Nakao, and Ryo Shimizu. 2009. "In Silico Prediction of Human Oral Absorption Based on QSAR Analyses of PAMPA Permeability." *Chemistry & Biodiversity* 6 [11] (November): 1845–1866.
- Akutsu, H. 1981. "Direct Determination by Raman Scattering of the Conformation of the Choline Group in Phospholipid Bilayers." *Biochemistry* 20 [26]: 7359–7366.
- Albrecht, O, H Gruler, E Sackmann, Experimentalphysik Iii, Universität Ulm, Oberer Eselsberg, and D- Ulm Donau Germany. 1978. "Polymorphism of Phospholipid Monolayers." *Le Journal De Physique* 39: 301–313.
- Alper, Howard E, and Terry R Stouch. 1995. "Orientation and Diffusion of a Drug Analogue in Biomembranes : Molecular Dynamics Simulations." *The Journal of Physical Chemistry* 99: 5724–5731.
- Artursson, P, K Palm, and K Luthman. 2001. "Caco-2 Monolayers in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport." *Adv. Drug Delivery Rev.* 46: 27–43.
- Aveyard R., Haydon D. A. 1973. "An Introduction to the Principles of Surface Chemistry" : Cambridge Chemistry Texts.

— B —

- Balaz, Štefan. 2000. "Lipophilicity in Trans-Bilayer Transport and Subcellular Pharmacokinetics - Springer." *Perspect. Drug Discovery Des.* 19 [1]: 157–177.
- Baoukina, Svetlana, and D Peter Tieleman. 2010. "Direct Simulation of Protein-Mediated Vesicle Fusion: Lung Surfactant Protein B.." *Biophys. J.* 99 [7]: 2134–2142.
- Baoukina, Svetlana, Luca Monticelli, H Jelger Risselada, Siewert J Marrink, and D Peter Tieleman. 2008. "The Molecular Mechanism of Lipid Monolayer Collapse." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 [31]: 10803–10808.
- Baoukina, Svetlana, Luca Monticelli, Matthias Amrein, and D Peter Tieleman. 2007a. "The Molecular Mechanism of Monolayer-Bilayer Transformations of Lung Surfactant From Molecular Dynamics Simulations." *Biophys. J.* 93 [11]: 3775–3782.
- Baoukina, Svetlana, Luca Monticelli, Siewert J Marrink, and D Peter Tieleman. 2007b. "Pressure-Area Isotherm of a Lipid Monolayer From Molecular Dynamics Simulations." *Langmuir* 23 [25]: 12617–12623.
- Baoukina, Svetlana, Siewert J Marrink, and D Peter Tieleman. 2010. "Lateral Pressure Profiles in Lipid Monolayers." *Faraday Discuss.*
- Bassolino-klimas, Donna, Howard E Alper, and Terry R Stouch. 1993. "Solute Diffusion in Lipid Bilayer Membranes: an Atomic Level Study by Molecular Dynamics Simulation." *Biochemistry* [32]: 12624–12637.

- 
- Bassolino-klimas, Donna, Howard E Alper, and Terry R Stouch. 1995. "Mechanism of Solute Diffusion Through Lipid Bilayer Membranes by Molecular Dynamics Simulation." *Journal of the American Chemical Society* 117: 4118–4129.
- Bayly, Christopher I, Piotr Cieplak, Wendy Cornell, and Peter A Kollman. 1993. "A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: the RESP Model." *Journal of the American Chemical Society* 97 [40] (October): 10269–10280.
- Bemporad, D, C Luttmann, and J W Essex. 2004. "Computer Simulation of Small Molecule Permeation Across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Sectional Area." *Biophys. J.* 87 [1]: 1–13.
- Bemporad, D, C Luttmann, and J W Essex. 2005. "Behaviour of Small Solutes and Large Drugs in a Lipid Bilayer From Computer Simulations." *Biochim. Biophys. Acta* 1718 [1-2]: 1–21.
- Beswick, V, N Perrot, P Nedellec, A Sanson, A Isvoran, and N Jamin. 2012. "Comparison of DPC Micelle and POPC Bilayer : MD Simulations." *Poster at GEM 15 Paris*.
- Blodgett, Katharine B. 1935. "Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface." *Journal of the American Chemical Society* 57 [6]: 1007–1022.
- Blume, Alfred. 1979. "A Comparative Study of the Phase Transitions of Phospholipid Bilayers and Monolayers." *Biochim. Biophys. Acta* 557 [1]: 32–44.
- Borch, Jonas, and Thomas Hamann. 2009. "The Nanodisc: a Novel Tool for Membrane Protein Studies." *Biological Chemistry* 390 [8]: 805–814.
- Brooks, B R, R E Bruccoleri, B D Olafson, S Swaminathan, and M Karplus. 2004. "CHARMM: a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations." *Journal of Computational Chemistry* 4 [2]: 187–217.
- Brown, Rhoderick, and Howard L Brockman. 2007. "Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral Interactions." *Methods Mol. Biol.* 398: 41–58.
- Brumm, Thomas, C Naumann, E Sackmann, and T M Bayed. 1994. "Conformational Changes of the Lecithin Headgroup in Monolayers at the Air/Water Interface." *Eur. Biophys. J.* 23: 289–295.
- Buck, Stefan S De, Vikash K Sinha, Luca A Fenu, Marjoleen J Nijsen, Claire E Mackie, and Ron A H J Gilissen. 2007. "Prediction of Human Pharmacokinetics Using Physiologically Based Modeling : a Retrospective Analysis of 26 Clinically Tested Drugs ABSTRACT :." *Drug Metab. Dispos.* 35 [10]: 1766–1780.
- Buldt, G, H U Gally, J Seelig, and G Zaccai. 1979. "Neutron Diffraction Studies on Phosphatidylcholine Model Membranes." *Journal of Molecular Biology* 134: 673–691.
- Buldt, Georg, and Roland Wohlgemuth. 1981. "Topical Review the Headgroup Conformation of Phospholipids in Membranes." *J. Membr. Biol.* 58: 81–100.
- Bussi, Giovanni, Davide Donadio, and Michele Parrinello. 2007. "Canonical Sampling Through Velocity Rescaling." *The Journal of Chemical Physics* 126 [1]: 014101–014107.
- Buznikov, G A, H W Lambert, and J M Lauder. 2001. "Serotonin and Serotonin-Like Substances as Regulators of Early Embryogenesis and Morphogenesis." *Cell and Tissue Research* 305 [2] (August): 177–186.

## — C —

- Case, D A, T A Darden, T E Cheatham, III, C L Simmerling, J Wang, R E Duke, *et al.* 2012. *AmberTools 12*. San Francisco: University of California.
- Chiu, S W, M Clark, V Balaji, S Subramaniam, H L Scott, and E Jakobsson. 1995. "Incorporation of Surface Tension Into Molecular Dynamics Simulation of an Interface: a Fluid Phase Lipid Bilayer Membrane." *Biophys. J.* 69 [4]: 1230–1245.
- Cornell, Wendy D, Piotr Cieplak, Christopher I Bayly, Ian R Gould, Kenneth M Merz, David M Ferguson, David C Spellmeyer, Thomas Fox, James W Caldwell, and Peter A Kollman. 1995. "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules." *Journal of the American Chemical Society* 117 [19] (May): 5179–5197.
- Couper A. S. 1858. "Sur une nouvelle théorie chimique". *Annales de chimie et de physique* 53: 488–489.
- Cournia, Zoe, G Matthias Ullmann, and Jeremy C Smith. 2007. "Differential Effects of Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membrane: a Molecular Dynamics Simulation Study." *The Journal of Physical Chemistry B* 111 [7]: 1786–1801.
- Cullis, Pieter R, and Michael J Hope. 1985. "Physical Properties and Functional Roles of Lipids in Membranes." *Biochemistry of Lipids and Membranes* 20: 1–40.

## — D —

- Danielli, James Frederic, and Hugh Davson. 1935. "A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5 [4] (February): 495–508.
- Daugherty, AI, and Rj Mrsny. 1999. "Transcellular Uptake Mechanisms of the Intestinal Epithelial Barrier Part One." *Pharm. Sci. Technol. Today* 4 [2]: 144–151.
- De Angelis, Anna A, and Stanley J Opella. 2007. "Bicelle Samples for Solid-State NMR of Membrane Proteins." *Nature Protocols* 2 [10] (October): 2332–2338.
- Desroches, Marie-Catherine, Athena Kasselouri, Michael Meyniel, Philippe Fontaine, Michel Goldmann, Patrice Prognon, Philippe Maillard, and V e ronique Rosilio. 2004. "Incorporation of Glycoconjugated Porphyrin Derivatives Into Phospholipid Monolayers: a Screening Method for the Evaluation of Their Interaction with a Cell Membrane.." *Langmuir* 20 [26]: 11698–11705.
- Dubreuil, Frédéric, Jean Daillant, and Patrick Guenoun. 2003. "Direct Topographic Measurement of Multilayers on Water by Atomic Force Microscopy." *Langmuir*.
- Duncan, Susan L, and Ronald G Larson. 2008. "Comparing Experimental and Simulated Pressure-Area Isotherms for DPPC.." *Biophys. J.* 94 [8]: 2965–2986.
- Duncan, Susan L, Indranil S Dalal, and Ronald G Larson. 2011. "Molecular Dynamics Simulation of Phase Transitions in Model Lung Surfactant Monolayers.." *Biochim. Biophys. Acta* 1808 [10]: 2965–2986.

## — E —

- Egberts, Egbert, Siewert-Jan Marrink, and Herman J C Berendsen. 1994. "Molecular Dynamics Simulation of a Phospholipid Membrane." *Eur. Biophys. J.* 22: 423–436.
- El Kirat, Karim, Sandrine Morandat, and Yves F Dufr e ne. 2010. "Nanoscale Analysis of Supported Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy.." *Biochim. Biophys. Acta* 1798 [4]: 750–765.
- Essmann, U, and M L Berkowitz. 1999. "Dynamical Properties of Phospholipid Bilayers From Computer Simulation." *Biophys. J.* 76 [4]: 2081–2089.

## — F —

- Fan, Yi, Rayomand Unwalla, Rajiah a Denny, Li Di, Edward H Kerns, David J Diller, and Christine Humblet. 2010. "Insights for Predicting Blood-Brain Barrier Penetration of CNS Targeted Molecules Using QSPR Approaches." *Journal of Chemical Information and Modeling* 50 [6]: 1123–1133.
- Feller, Scott E, and Alexander D Mackerell. 2000. "An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids." *The Journal of Physical Chemistry B* 104 [31]: 7510–7515.
- Feller, Scott E, and Richard W Pastor. 1999. "Constant Surface Tension Simulations of Lipid Bilayers : the Sensitivity of Surface Areas and Compressibilities." *The Journal of Chemical Physics* 111 [3]: 1281–1287.
- Feller, Scott E, Richard M Venable, and Richard W Pastor. 1997. "Computer Simulation of a DPPC Phospholipid Bilayer: Structural Changes as a Function of Molecular Surface Area." *Langmuir* 7463 [8]: 6555–6561.
- Feller, Scott E, Yuhong Zhang, and Richard W Pastor. 1995. "Computer Simulation of Liquid / Liquid Interfaces . II . Surface Tension-Area Dependence of a Bilayer and Monolayer." *The Journal of Chemical Physics* 103: 10267–10276.
- Ferreira, Tiago Mendes, Filipe Coreta-Gomes, O H Samuli Ollila, Maria Jo a o Moreno, Winchil L C Vaz, and Daniel Topgaard. 2013. "Cholesterol and POPC Segmental Order Parameters in Lipid Membranes: Solid State (1)H-(13)C NMR and MD Simulation Studies.." *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 [6]: 1976–1989.
- Franklin, Benjamin. 1773. *Of the Stilling of Waves by Means of Oil*. Philosophical Transactions. Letter to William Brownrigg and the Reverend Mr. Farish.
- Franklin, R E. 1953. "Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate." *Nature* 171: 740–741.
- Frye, L D, and M Edidin. 1970. "The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse Human Heterokaryons." *J. Cell. Sci.* 7: 319–336.

## — G —

- Gennis, Robert. 1989. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Librairie Lavoisier.
- Gorter, E. 1924. "On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromo- Cytes of the Blood.." *The Journal of Experimental Medicine* 41: 439–443.
- Gramlich, G, J Zhang, M Winterhalter, and W M Nau. 2001. "A Long-Lived Amphiphilic Fluorescent Probe Studied in POPC Air-Water Monolayer and Solution Bilayer Systems.." *Chem. Phys. Lipids* 113 [1-2]: 1–9.
- Griffin, W C. 1949. "CLASSIFICATION of SURFACE-ACTIVE AGENTS by "HLB" Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'." *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 [311]: 311–326.

## — H —

- Hennere, Gaelle, Patrice Prognon, Francoise Brion, Veronique Rosilio, and Ioannis Nicolis. 2009. "Molecular Dynamics Simulation of a Mixed Lipid Emulsion Model: Influence of the Triglycerides on Interfacial Phospholipid Organization." *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 901 [1-3]: 174–185.
- Hennere, Gaelle, Patrice Prognon, Francoise Brion, and Ioannis Nicolis. 2009. "Molecular Dynamics Study of a Phospholipid Monolayer at a Water/Triglyceride Interface: Towards Lipid Emulsion Modelling." *Chem. Phys. Lipids* 157 [2]: 86–93.
- Hess, B, C Kutzner, D van der Spoel, and E Lindahl. 2008. "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation." *Journal of Chemical Theory and Computation* 4 [3]: 435–447.
- Hopkins, Andrew L, and G Richard Bickerton. 2010. "Drug Discovery: Know Your Chemical Space." *Nat. Chem. Biol.* 6 [7]: 482–483.
- Hou, Tingjun, Junmei Wang, and Youyong Li. 2007. "ADME Evaluation in Drug Discovery. 8. the Prediction of Human Intestinal Absorption by a Support Vector Machine." *Journal of Chemical Information and Modeling* 47 [6]: 2408–2415.
- Hou, Tingjun, Junmei Wang, Wei Zhang, and Xiaojie Xu. 2007. "ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification." *Journal of Chemical Information and Modeling* 47 [1]: 208–218.
- Humphrey, W, A Dalke, and K Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *Journal of Molecular Graphics* 14 [1] (February): 33–8– 27–8.

## — I —

- Israelachvili, J N, S Marcela, and R G Horn. 1980. "Physical Principles of Membrane Organization." *Q. Rev. Biophys.* 13 [2] (May): 121–200.
- Israelachvili, Jacob N. 1973. "Theoretical Considerations on the Asymmetric Distribution of Charged Phospho-Lipid Molecules on the Inner and Outer Layers of Curved Bilayer Membranes." *Biochim. Biophys. Acta* 323: 659–663.
- Israelachvili, Jacob N, and D John Mitchell. 1975. "A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes." *Biochim. Biophys. Acta* 389: 13–19.
- Izmitli, Aslin, Carolina Schebor, Michael P McGovern, Allam S Reddy, Nicholas L Abbott, and Juan J De Pablo. 2011. "Effect of Trehalose on the Interaction of Alzheimer 'S A-beta-Peptide and Anionic Lipid Monolayers." *Biochim. Biophys. Acta* 1808 [1]: 26–33.

## — J —

- Jakalian, Araz, David B Jack, and Christopher I Bayly. 2002. "Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation." Ed by. Gernot Frenking and William L Jorgensen. *Journal of Computational Chemistry* 23 [16] (October 18): 1623–1641.
- Jorgensen, William L, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D Madura, Roger W Impey, and Michael L Klein. 1983. "Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water." *The Journal of Chemical Physics* 79 [2]: 926.
- Jórárt, Balázs, and Tamas Martinek. 2007. "Performance of the General Amber Force Field in Modeling Aqueous POPC Membrane Bilayers." *Journal of Computational Chemistry* 28: 2051–2058.

## — K —

- Kaganer, Vladimir M, Helmuth Möhwald, and Pulak Dutta. 1999. "Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers." *Reviews of Modern Physics* 71 [3]: 779.
- Kajiyama, T., Oishi, Y., Uchida, M., Tanimoto, Y., & Kozuru, H. 1992. "Morphological and structural studies of crystalline and amorphous monolayers on the water surface." *Langmuir* 8 [19]: 1563–1569.
- Kansy, Manfred, Frank Senner, and Klaus Gubernator. 1998. "Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes." *Journal of Medicinal Chemistry* 41 [7]: 1007.
- Kaznessis, Yiannis N, Sangtae Kim, and Ronald G Larson. 2002. "Simulations of Zwitterionic and Anionic Phospholipid Monolayers." *Biophys. J.* 82 [4]: 1731–1742.
- Kekulé, August. 1865. "Sur la constitution des substances aromatiques". *Bulletin de la Société Chimique de Paris* 3 (2): 98–110.
- Kirkwood, John G, and Frank P Buff. 1949. "The Statistical Mechanical Theory of Surface Tension." *The Journal of Chemical Physics* 17 [3]: 338.
- Klauda, Jeffery B, Bernard R Brooks, and Richard W Pastor. 2006. "Dynamical Motions of Lipids and a Finite Size Effect in Simulations of Bilayers." *The Journal of Chemical Physics* 125 [14]:

144710.

- Klauda, Jeffery B, Richard M Venable, and Richard W Pastor. 2008. "Considerations for Lipid Force Field Development." *Comput. Model. Membr. Bilayer* 60: 1.
- Klauda, Jeffery B, Richard M Venable, J Alfredo Freites, Joseph W O Connor, Douglas J Tobias, Carlos Mondragon-ramirez, Igor Vorobyov, Alexander D Mackerell, and Richard W Pastor. 2010. "Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids : Validation on Six Lipid Types." *The Journal of Physical Chemistry B* 114: 7830–7843.
- Kubinyi, Hugo. 2003. "Drug Research: Myths, Hype and Reality." *Nature Reviews Drug Discovery* 2 [8]: 665–668.
- Kucerka, Norbert, Stephanie Tristram-Nagle, and John F Nagle. 2005. "Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains." *J. Membr. Biol.* 208 [3]: 193–202.

## — L —

- Lafleur, M, R Cullis, and M Bloom. 1990. "Modulation of the Orientational Order Profile of the Lipid Acyl Chain in the L(Alpha) Phase." *Eur. Biophys. J.* 19: 55–62.
- Langmuir, Irving. 1917. "The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids." *Langmuir*: 1–30.
- Lapinski, Monique M, Angelines Castro-Forero, Aaron J Greiner, Robert Y Ofoli, and Gary J Blanchard. 2007. "Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore." *Langmuir* 23 [23]: 11677–11683.
- Leekumjorn, Sukit, and A K Sum. 2006a. "Molecular Investigation of the Interactions of Trehalose with Lipid Bilayers of DPPC, DPPE and Their Mixture." *Molecular Simulation* 32 [3-4]: 219–230.
- Leekumjorn, Sukit, and Amadeu K Sum. 2006b. "Molecular Simulation Study of Structural and Dynamic Properties of Mixed DPPC/DPPE Bilayers." *Biophys. J.* 90 [11] (June): 3951–3965.
- Leekumjorn, Sukit, and Amadeu K Sum. 2007a. "Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers." *The Journal of Physical Chemistry B* 111 [21]: 6026–6033.
- Leekumjorn, Sukit, and Amadeu K Sum. 2007b. "Molecular Studies of the Gel to Liquid-Crystalline Phase Transition for Fully Hydrated DPPC and DPPE Bilayers." *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 354–365.
- Leekumjorn, Sukit, and Amadeu K Sum. 2007c. "Supp-Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers.." *The Journal of Physical Chemistry B* 111 [21]: 6026–6033.
- LEEM. 2010. *L'industrie Du Médicament en France - Faits Et Chiffres 2009*. leem.org.
- Lindahl, Erik, and O Edholm. 2000. "Mesoscopic Undulations and Thickness Fluctuations in Lipid Bilayers From Molecular Dynamics Simulations.." *Biophys. J.* 79 [1]: 426–433.
- Lipinski, Christopher A, Franco Lombardo, Beryl W Dominy, and Paul J Feeney. 2001. "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings." *Adv. Drug Delivery Rev.* 46 [1-3] (March 1): 3–26.
- Lipinsky, Christopher, and Andrew L Hopkins. 2004. "Navigating Chemical Space for Biology and Medicine." *Nature*.
- Lucas, Timothy R, Brad a Bauer, Joseph E Davis, and Sandeep Patel. 2011. "Molecular Dynamics Simulation of Hydrated DPPC Monolayers Using Charge Equilibration Force Fields." *Journal of Computational Chemistry* 33 [2]: 141–152.

## — M —

- Ma, Gang, and Heather C Allen. 2006. "DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy.." *Langmuir* 22 [12]: 5341–5349.
- Maget-Dana, R. 1999. "The Monolayer Technique: a Potent Tool for Studying the Interfacial Properties of Antimicrobial and Membrane-Lytic Peptides and Their Interactions with Lipid Membranes.." *Biochim. Biophys. Acta* 1462 [1-2]: 109–140.
- Marrink, Siewert J, Alex H de Vries, and Alan E Mark. 2004. "Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations." *The Journal of Physical Chemistry B*.
- Marrink, Siewert J, and D Peter Tieleman. 2013. "Perspective on the Martini Model." *Chemical Society Reviews*: –.
- Marrink, Siewert J, and Herman J C Berendsen. 1996. "Permeation Process of Small Molecules Across Lipid Membranes Studied by Molecular Dynamics Simulations." *The Journal of Physical Chemistry* 100 [41]: 16729–16738.
- Marrink, Siewert J, H Jelger Risselada, Serge Yefimov, D Peter Tieleman, and Alex H de Vries. 2007. "The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations." *The Journal of Physical Chemistry B*.
- Marrink, Siewert-Jan, and D Peter Tieleman. 2002. "Molecular Dynamics Simulation of Spontaneous Membrane Fusion During a Cubic-Hexagonal Phase Transition." *Biophys. J.* 83 [5]: 2386–2392.
- Marrink, Siewert-Jan, and Herman J C Berendsen. 1994. "Simulation of Water Transport Through a Lipid Membrane." *Journal of Physical Chemistry* 98 [15]: 4155–4168.
- Marsh, Derek. 1996. "Lateral Pressure in Membranes." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1286 [3]: 183–223.
- Martinez-Seara, Hector, Tomasz Rog, Mikko Karttunen, Ramon Reigada, and Ilpo Vattulainen. 2008. "Influence of Cis Double-Bond Parametrization on Lipid Membrane Properties: How Seemingly Insignificant Details in Force-Field Change Even Qualitative Trends." *The Journal of Chemical Physics* 129 [10]: 105103–105107.
- Martini, Maira Florencia, Edgar Anibal Disalvo, and Monica Pickholz. 2012. "Nicotinamide and Picolinamide in Phospholipid Monolayers." *Int. J. Quantum Chem.*
- Matsson, Pär, Christel A S Bergström, Naoki Nagahara, Staffan Tavelin, Ulf Norinder, and Per Artursson. 2005. "Exploring the Role of Different Drug Transport Routes in Permeability Screening." *Journal of Medicinal Chemistry* 48 [2] (January): 604–613.
- Mälkiä, Annika, Lasse Murtomäki, Arto Urtti, and Kyösti Kontturi. 2004. "Drug Permeation in Biomembranes." *Eur. J. Pharm. Sci* 23 [1] (September): 13–47.
- McIntosh, T J. 1980. "Differences in Hydrocarbon Chain Tilt Between Hydrated Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Bilayers. a Molecular Packing Model.." *Biophysical Journal* 29 [2]: 237–245.
- Meyer, Hans. 1899. "Zur Theorie Der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft Der Anästhetica Bedingt Ihre Narkotische Wirkung?." *Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie* 42: 109–115.
- Missner, Andreas, and Peter Pohl. 2009. "110 Years of the Meyer – Overton Rule : Predicting Membrane Permeability of Gases and Other Small Compounds." *Chemphyschem* 10 [1]: 1405–



1414.

- Moda, Tiago L, Carlos a Montanari, and Adriano D Andricopulo. 2007. "Hologram QSAR Model for the Prediction of Human Oral Bioavailability.." *Bioorg. Med. Chem.* 15 [24]: 7738–7745.
- Mohammad-agmaie, Delara, Emilie Mace, Charles A Sennoga, John M Seddon, and Fernando Bresme. 2010. "Molecular Dynamics Simulations of Liquid Condensed to Liquid Expanded Transitions in DPPC Monolayers." *The Journal of Physical Chemistry B* 114 [3]: 1325–1335.
- Montal, M, and P Mueller. 1972. "Formation of Bimolecular Membranes From Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties.." *Proc Natl Acad Sci USA* 69 [12]: 3561–3566.
- Murzyn, K, T R o g, G Jezierski, Y Takaoka, and M Pasenkiewicz-Gierula. 2001. "Effects of Phospholipid Unsaturation on the Membrane/Water Interface: a Molecular Simulation Study." *Biophysical Journal* 81 [1]: 170–183.

## — N —

- Nagle, John F. 1976. "Theory of Lipid Monolayer and Bilayer Phase Transitions: Effect of Headgroup Interactions Experimental Results for Monolayers." *J. Membr. Biol.* 250: 233–250.
- Nagle, John F, John C Mathai, Mark L Zeidel, and Stephanie Tristram-Nagle. 2008. "Theory of Passive Permeability Through Lipid Bilayers." *J. Gen. Physiol.* 131 [1]: 77–85.
- Nakao, Kazuya, Masaaki Fujikawa, Ryo Shimizu, and Miki Akamatsu. 2009. "QSAR Application for the Prediction of Compound Permeability with in Silico Descriptors in Practical Use." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 23 [5]: 309–319.

## — O —

- Orsi, Mario, and Jonathan W Essex. 2010. "Passive Permeation Across Lipid Bilayers : a Literature Review": 76–90.
- Overton, Charles Ernest. 1901. *Studien Über Die Narkose; Zugleich Ein Beitrag Zur Allgemeinen Pharmakologie.* Fischer, Jena.

## — P —

- Pauling, L, R B Corey, and H R Brandson. 1951. "The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 37 [4]: 205–211.
- Pearson, Robert H, and Irmin Pascher. 1979. "The Molecular Structure of Lecithin Dihydrate." *Nature* 281 [5731] (October 11): 499–501.
- Petrache, Horia I, Kechuan Tu, and John F Nagle. 1999. "Analysis of Simulated NMR Order Parameters for Lipid Bilayer." *Biophys. J.* 76 [May]: 2479–2487.
- Pickholz, M o nica. 2006. "Molecular Dynamics Simulations of Neutral Chlorpromazine in Zwitterionic Phospholipid Monolayers." *The Journal of Physical Chemistry B*: 8804–8814.
- Pickholz, M o nica, Osvaldo N Oliveira, and Munir S Skaf. 2007. "Interactions of Chlorpromazine with Phospholipid Monolayers: Effects of the Ionization State of the Drug." *Biophys. Chem.* 125 [2-3]: 425–434.

- Pockels, Agnes. 1891. "Surface Tension." *Nature* 43 [1115]: 437–439.
- Poger, David, and Alan E Mark. 2010. "On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of Saturated and Cis-Monounsaturated Phosphatidylcholine Lipid Bilayers : a Comparison with Experiment." *J. Chem. Theory Comput.* 6: 325–336.
- Poger, David, Wilfred F V A N Gunsteren, and Alan E Mark. 2010. "A New Force Field for Simulating Phosphatidylcholine Bilayers." *Journal of Computational Chemistry* 31: 1117–1125.
- Prenner, Elmar, Gerlinde Honsek, Dirk H o nig, Dietmar M o bius, and Karl Lohner. 2007. "Imaging of the Domain Organization in Sphingomyelin and Phosphatidylcholine Monolayers.." *Chem. Phys. Lipids* 145 [2]: 106–118.
- Pyrkova, Darya V, Natalya K Tarasova, Timothy V Pyrkov, Nikolay a Krylov, and Roman G Efremov. 2011. "Atomic-Scale Lateral Heterogeneity and Dynamics of Two-Component Lipid Bilayers Composed of Saturated and Unsaturated Phosphatidylcholines." *Soft Matter (Royal Society of Chemistry)* 7 [6]: 2569–2579.

## — R —

- Robertson, J David. 1981. "Membrane Structure." *The Journal of Cell Biology* 91 [3]: 189–204.
- Robinson, Alan J, W Graham Richards, Pamela J Thomas, and Michael M Hann. 1994. "Head Group and Chain Behavior in Biological Membranes: a Molecular Dynamics Computer Simulation." *Biophys. J.* 67: 2345–2354.
- Rose, Doyle, Jennifer Rendell, Derrick Lee, Kaushik Nag, and Valerie Booth. 2008. "Molecular Dynamics Simulations of Lung Surfactant Lipid Monolayers.." *Biophys. Chem.* 138 [3]: 67–77.
- Rosilio, Véronique, Marie-Martine Boissonnade, Jiayun Zhang, Long Jiang, and Adam Baszkin. 1997. "Penetration of Glucose Oxidase Into Organized Phospholipid Monolayers Spread at the Solution/Air Interface." *Langmuir* 13 [17] (August): 4669–4675.
- Rossi, Claire, and Jo e l Chopineau. 2007. "Biomimetic Tethered Lipid Membranes Designed for Membrane-Protein Interaction Studies." *Eur. Biophys. J.* 36 [8]: 955–965.

## — S —

- Saiz, L, and M L Klein. 2001. "Structural Properties of a Highly Polyunsaturated Lipid Bilayer From Molecular Dynamics Simulations.." *Biophysical Journal* 81 [1]: 204–216.
- Salomon-Ferrer, Romelia, David A Case, and Ross C Walker. 2012. "An Overview of the Amber Biomolecular Simulation Package." *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* 3 [2]: 198–210.
- Scott, W R P, P H Hünenberger, I G Tironi, A E Mark, S R Billeter, J Fennen, A E Torda, T Huber, P Krüger, and W F van Gunsteren. 1999. "The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package." *The Journal of Physical Chemistry A* 103 [19]: 3596–3607.
- Seddon, Annela M, Paul Curnow, and Paula J Booth. 2004. "Membrane Proteins, Lipids and Detergents: Not Just a Soap Opera." *Biochim. Biophys. Acta.*
- Seelig, Anna. 1987. "Local Anesthetics and Pressure: a Comparison of Dibucaine Binding to Lipid Monolayers and Bilayers." *BBA - Biomembranes* 899 [2]: 196–204.
- Seelig, Anna, and Joachim Seelig. 1977. "Effect of a Single Cis Double Bond on the Structure of a Phospholipid Bilayer ?." *Biochemistry* 16 [1]: 45–50.
- Seelig, Joachim, and Nada Waespe-sareevit. 1978. "Molecular Order in Cis and Trans Unsaturated

- Phospholipid Bilayers?." *Biochemistry* 17 [16]: 3310–3315.
- Showell, Graham A, and John S Mills. 2003. "Chemistry Challenges in Lead Optimization: Silicon Isosteres in Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 8 [12]: 551–556.
- Shushkov, Philip, Stanislav Tzvetanov, Maria Velinova, Anela Ivanova, and Alia Tadjer. 2010. "Structural Aspects of Lipid Monolayers : Computer Simulation Analyses." *Langmuir* 26 [11]: 8081–8092.
- Simons, Kai, and Elina Ikonen. 1997. "Functional Rafts in Cell Membranes." *Nature* 387 (June): 569–572.
- Singer, S J, and Garth L Nicolson. 1972. "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." *Science* 175 [1]: 720–731.
- Siu, Shirley W I, Robert V a cha, Pavel Jungwirth, and Rainer a B o ckmann. 2008. "Biomolecular Simulations of Membranes: Physical Properties From Different Force Fields.." *The Journal of Chemical Physics* 128 [12]: 125103–125112.
- Skibinsky, Anna, Richard M Venable, and Richard W Pastor. 2005. "A Molecular Dynamics Study of the Response of Lipid Bilayers and Monolayers to Trehalose." *Biophys. J.* 89 [6]: 4111–4121.
- Song, Kevin C, Philip W Livanec, Jeffery B Klauda, Krzysztof Kuczera, and Robert C Dunn. 2011. "Orientation of Fluorescent Lipid Analogue BODIPY-PC to Probe Lipid Membrane Properties : Insights From Molecular Dynamics Simulations." *The Journal of Physical Chemistry B* 115: 6157–6165.
- Sousa da Silva, Alan W, and Wim F Vranken. 2012. "ACPYPE-Antechamber Python Parser Interface." *BMC Research Notes* 5 [367]: 1–8.
- Sugano, K, Yoshiaki Nabuchi, Minoru Machida, and Yoshinori Aso. 2003. "Prediction of Human Intestinal Permeability Using Artificial Membrane Permeability." *Int. J. Pharm.* 257 [1-2]: 245–251.
- Sugano, Kiyohiko. 2009. "Computational Oral Absorption Simulation for Low-Solubility Compounds." *Chemistry & Biodiversity* 6: 2014–2029.
- Sundaralingam, M. 1972. "Discussion Paper: Molecular Structures and Conformations of the Phospholipids and Sphingomyelins." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 195: 324–355.

## —— T ——

- Tardieu, a, V Luzzati, and F C Reman. 1973. "Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: a Study of Lecithin-Water Phases." *Journal of Molecular Biology* 75 [4]: 711–733.
- Tattre, Neil H, J R Bennett, and R Cyr. 1968. "Maximum and Minimum Values for Lecithin Classes From Various Biological Sources." *Can. J. Biochem.* 46: 819–824.
- Thygesen, Peter, Panos Macheras, and Achiel Van Peer. 2009. "Physiologically-Based PK/PD Modelling of Therapeutic Macromolecules." *Pharmaceutical Research* 26 [12]: 2543–2550.
- Tieleman, D Peter, and Joe Bentz. 2002. "Molecular Dynamics Simulation of the Evolution of Hydrophobic Defects in One Monolayer of a Phosphatidylcholine Bilayer: Relevance for Membrane Fusion Mechanisms." *Biophys. J.* 83 [3]: 1501–1510.

## — V —

- van de Waterbeemd, Han, and Eric Gifford. 2003. “ADMET in Silico Modelling: Towards Prediction Paradise?” *Nature Reviews Drug Discovery* 2 [3] (March): 192–204.
- Varma, Manthena V S, R Scott Obach, Charles Rotter, Howard R Miller, George Chang, Stefanus J Steyn, Ayman El-Kattan, and Matthew D Troutman. 2010. “Physicochemical Space for Optimum Oral Bioavailability: Contribution of Human Intestinal Absorption and First-Pass Elimination.” *Journal of Medicinal Chemistry* 53 [3]: 1098–1108.
- Vermeer, Louic S, Bert L de Groot, Val e rie R e at, Alain Milon, and Jerzy Czaplicki. 2007. “Acyl Chain Order Parameter Profiles in Phospholipid Bilayers: Computation From Molecular Dynamics Simulations and Comparison with 2H NMR Experiments.” *Eur. Biophys. J.* 36 [8]: 919–931.
- Volinsky, Roman, Riku Paananen, and Paavo K J Kinnunen. 2012. “Oxidized Phosphatidylcholines Promote Phase Separation of Cholesterol-Sphingomyelin Domains.” *Biophys. J.* 103 [2]: 247–254.
- Vries, Alex H De, Indira Chandrasekhar, Wilfred F Van Gunsteren, and Philippe H Hu. 2005. “Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers : Influence of Artificial Periodicity , System Size , and Simulation Time.” *The Journal of Physical Chemistry B* 109: 11643–11652.

## — W —

- Wang, Junmei, Romain M Wolf, James W Caldwell, Peter A Kollman, and David A Case. 2004. “Development and Testing of a General Amber Force Field.” *Journal of Computational Chemistry* 25 [9] (July 15): 1157–1174.
- Watson, J D, and F H C Crick. 1953. “A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.” *Nature* 171: 737–738.
- Weiner, Scott J, Peter A Kollman, David A Case, U Chandra Singh, Caterina Ghio, Guliano Alagona, Salvatore Profeta, and Paul Weiner. 1984. “A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins.” *Journal of the American Chemical Society* 106 [3]: 765–784.
- Weis, I, P B Welzel, G B a hr, and G Schwarz. 2000. “Equations of State for POPX Lipids at the Air/Water Interface. a Comprehensive Study..” *Chemistry and Physics of Lipids* 105 [1]: 1–8.
- Wilkins, M H F. 1953. “Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids.” *Nature* 171: 738–740.
- Williams, P A, Pamela A Williams, Jose Cosme, Dijana Matak Vinković, Alison Ward, Hayley C Angove, Philip J Day, Clemens Vornrhein, Ian J Tickle, and Harren Jhoti. 2004. “Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone.” *Science* 305 [5684] (July 30): 683–686.
- Winterhalter, Mathias. 2000. “Black Lipid Membranes.” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5 [3-4]: 250–255.

—— Y ——

- Yin, Daxu, and Alexander D Mackerell. 1998. "Combined Ab Initio / Empirical Approach." *Journal of Computational Chemistry* 19 [3]: 334–348.
- Yun, Heejung, Young-wook Choi, Nam Jeong Kim, and Daewon Sohn. 2003. "Physicochemical Properties of Phosphatidylcholine (PC) Monolayers with Different Alkyl Chains, at the Air/Water Interface." *Bull. Korean Chem. Soc* 24 [3]: 377–383.

—— Z ——

- Zhang, Yuhong, Scott E Feller, Bernard R Brooks, and Richard W Pastor. 1995. "Computer Simulation of Liquid / Liquid Interfaces . I . Theory and Application to Octane / Water." *The Journal of Chemical Physics* 103: 10252–10266.

---

## Références des logiciels utilisés

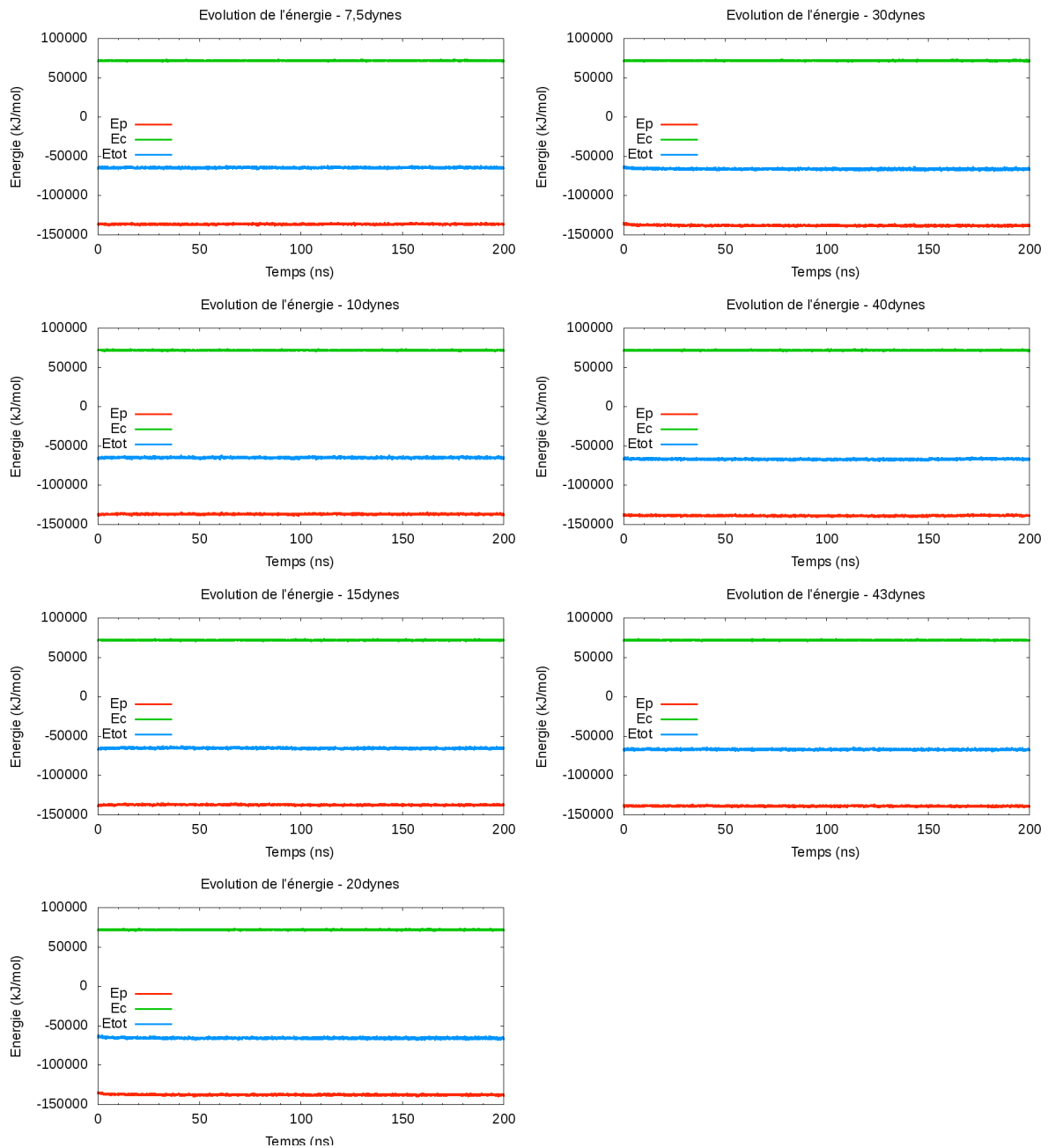
---

<b>ACPYPE</b>	Sousa da Silva A. W., Vranken W. F. « ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. ». <i>BMC Res Notes</i> . 2012. Vol. 5, p. 367. <a href="http://code.google.com/p/acpype/">http://code.google.com/p/acpype/</a>
<b>AmberTools</b>	Salomon Ferrer R., Case D. A., Walker R. C. « An overview of the Amber biomolecular simulation package ». <i>Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science</i> . 2012. <a href="http://ambermd.org/">http://ambermd.org/</a>
<b>CHARMM</b>	Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., Swaminathan S., Karplus M. « CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations ». <i>J. Comput. Chem.</i> 2004. Vol. 4, n°2, p. 187–217.
<b>GROMACS</b>	Hess B., Kutzner C., Van der Spoel D., Lindahl E. « GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation ». <i>Journal of chemical theory and computation</i> . 2008. Vol. 4, n°3, p. 435–447. <a href="http://www.gromacs.org/">http://www.gromacs.org/</a>
<b>Gnuplot</b>	Williams, T. and Kelley, C. (2011). Gnuplot 4.5: an interactive plotting program <a href="http://www.gnuplot.info/">http://www.gnuplot.info/</a>
<b>MAC OS X</b>	<a href="http://www.apple.com/fr/osx/">http://www.apple.com/fr/osx/</a>
<b>Mendeley</b>	<a href="http://www.mendeley.com/">http://www.mendeley.com/</a>
<b>Microsoft Office MAC 2011</b>	<a href="http://www.microsoft.com/France/mac">http://www.microsoft.com/France/mac</a>
<b>Papers 2</b>	<a href="http://www.mekentosj.com/papers/">http://www.mekentosj.com/papers/</a>
<b>PyMOL</b>	<a href="http://www.pymol.org/">http://www.pymol.org/</a>
<b>Ubuntu</b>	<a href="http://www.ubuntu-fr.org/">http://www.ubuntu-fr.org/</a>
<b>VMD</b>	Humphrey W., Dalke A., Schulten K. « VMD: visual molecular dynamics. ». <i>J Mol Graph</i> . Vol. 14, n°1, p. 33–8– 27–8. <a href="http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/">http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/</a>

# Annexes

# Annexe 1

Evolution des énergies totale, potentielle et cinétique des systèmes monocouches au cours des trajectoires simulées à différentes pressions de surface avec le champ de force GAFF.

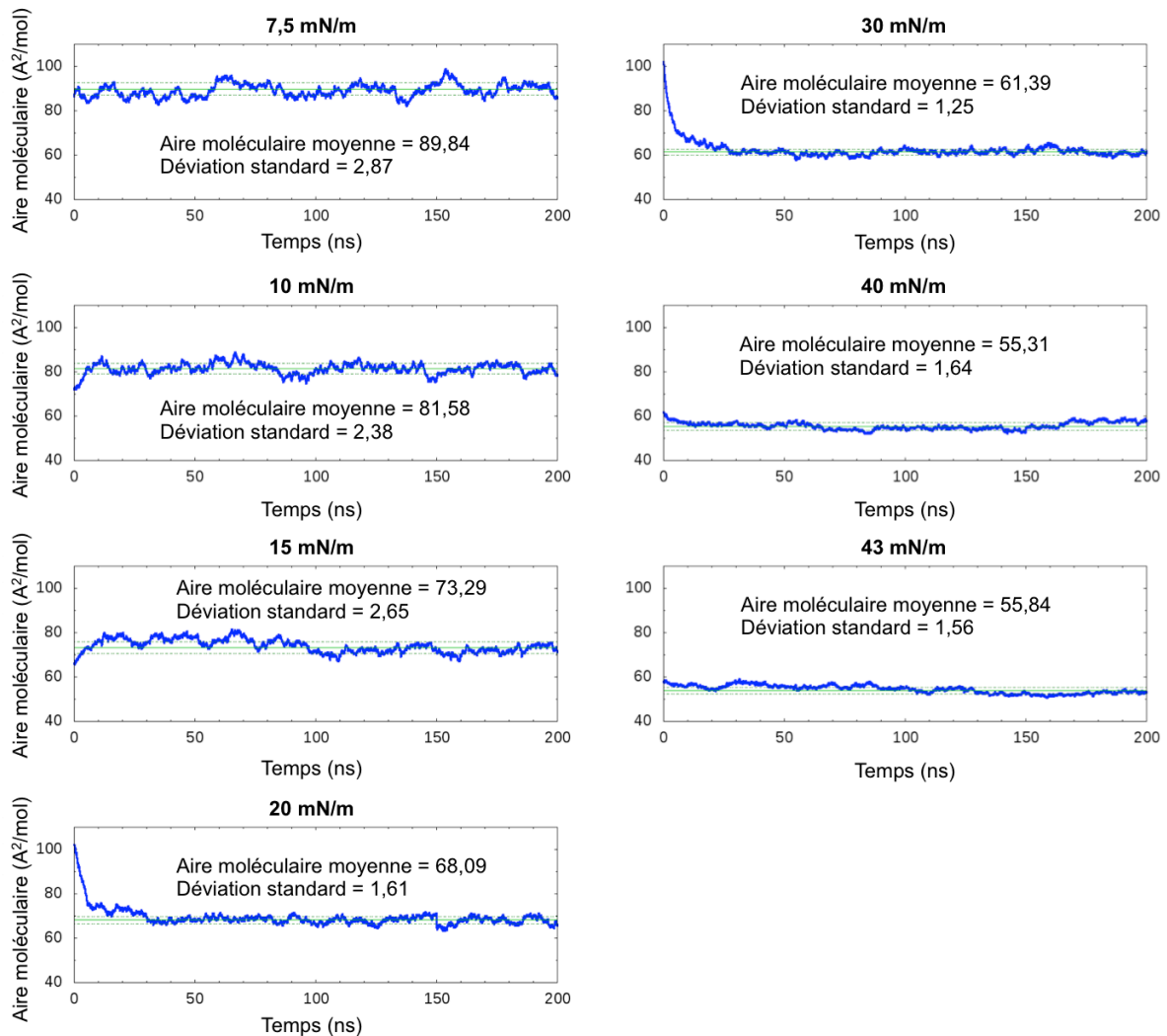




## Annexe 2

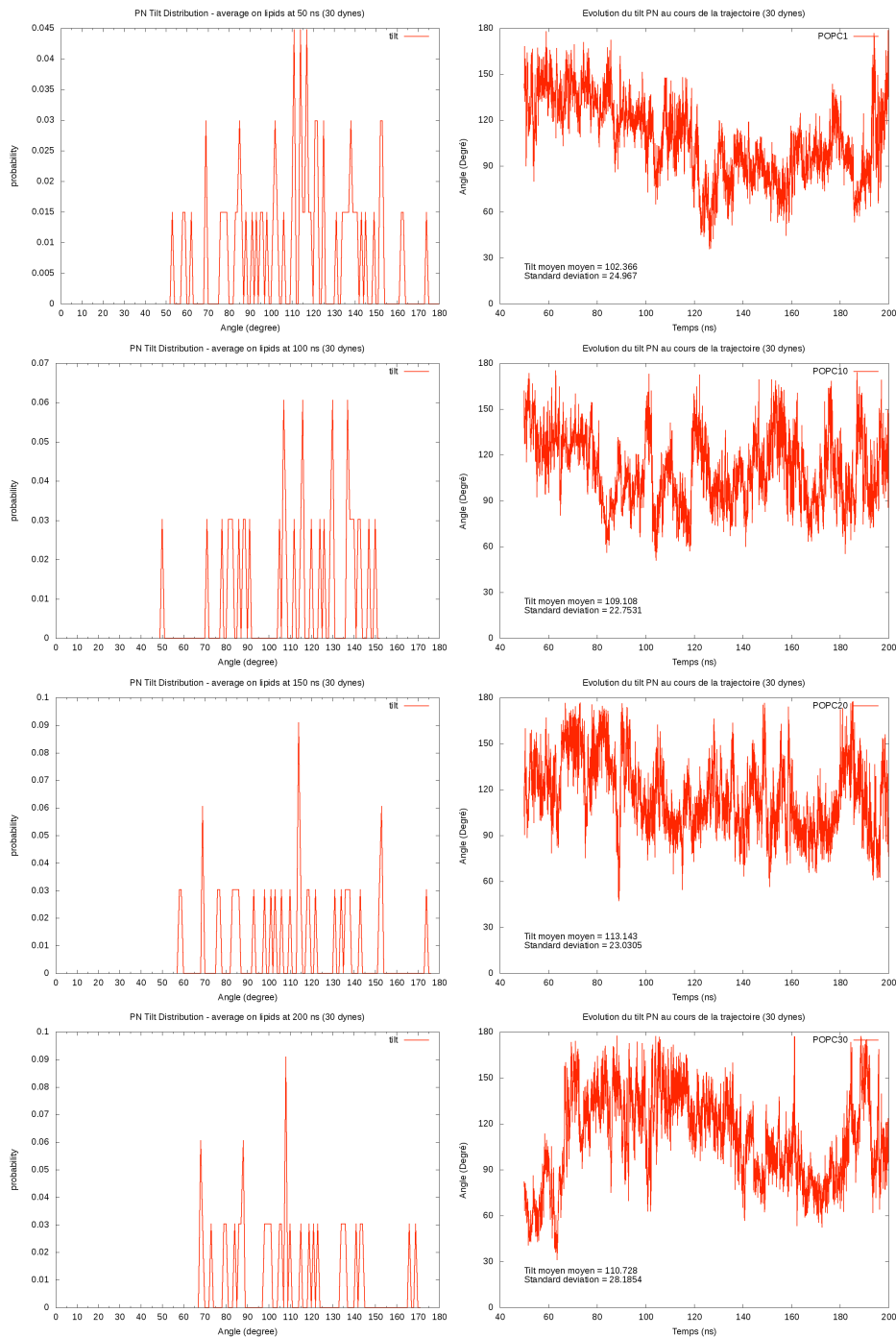
Evolution de l'aire moléculaire au cours des trajectoires simulées à différentes pressions de surface avec le champ de force GAFF.

L'aire moléculaire moyenne ainsi que la déviation standard sont calculées sur les 150 dernières nanosecondes des trajectoires.



# Annexe 3

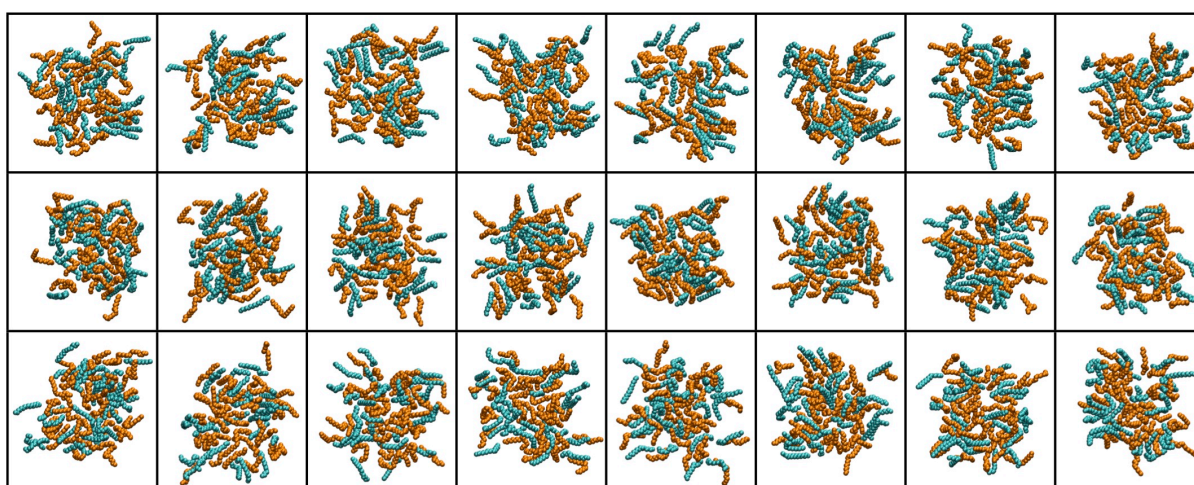
Distribution angulaire des vecteurs PN à 50, 100, 150 et 200 ns de simulation (colonne de gauche) et évolution de l'inclinaison de 4 vecteurs PN choisis au hasard dans la monocouche (colonne de droite).



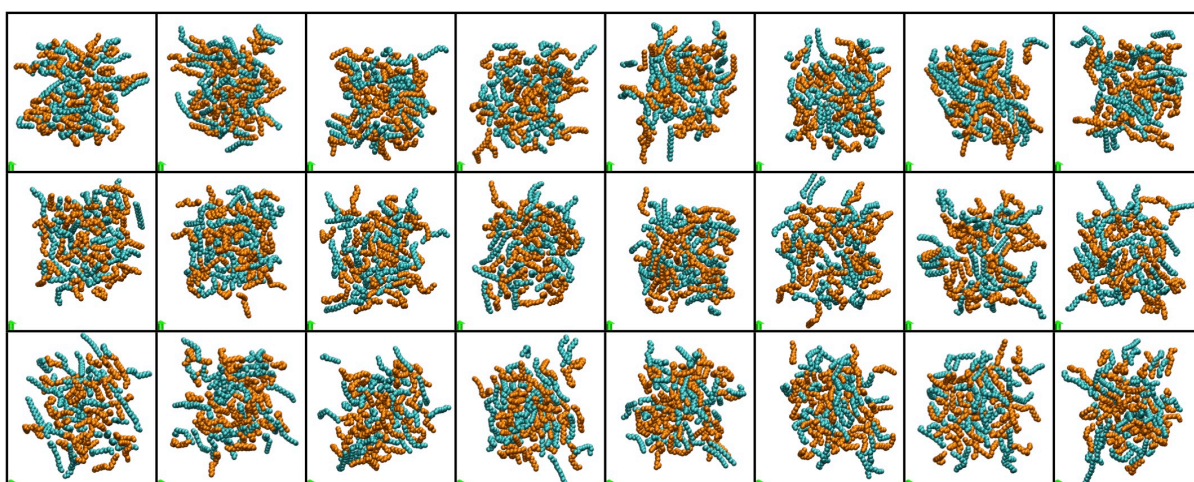
# Annexe 4

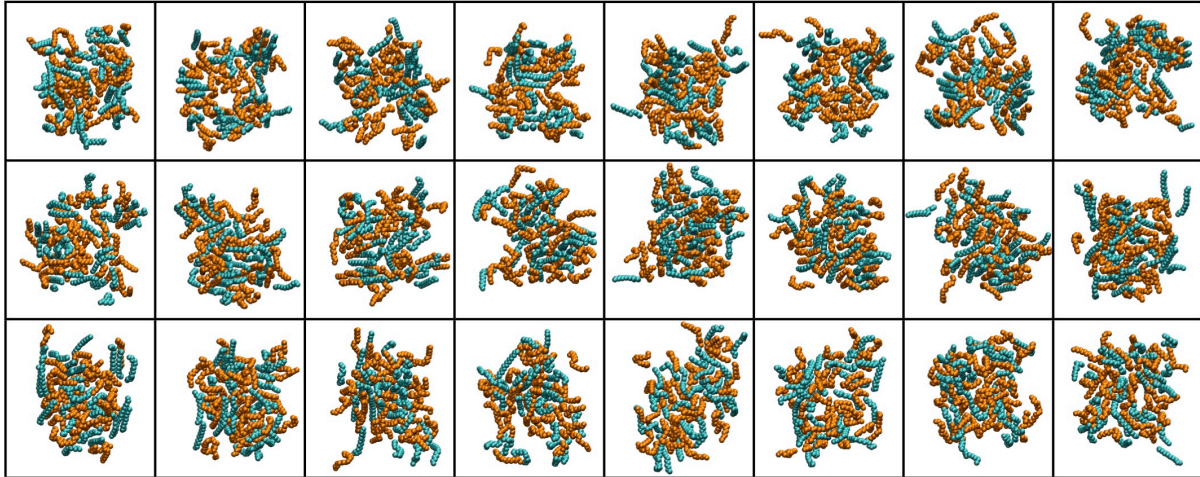
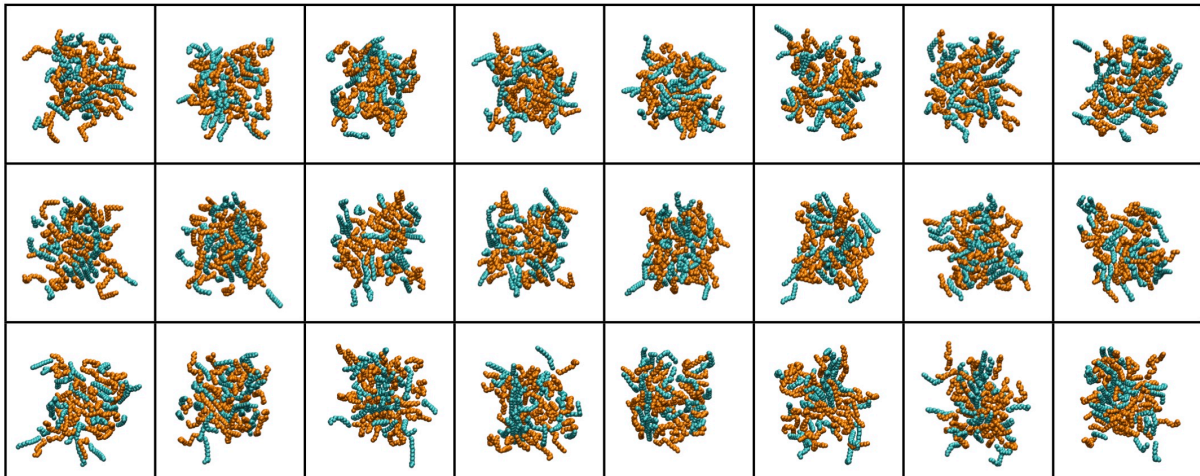
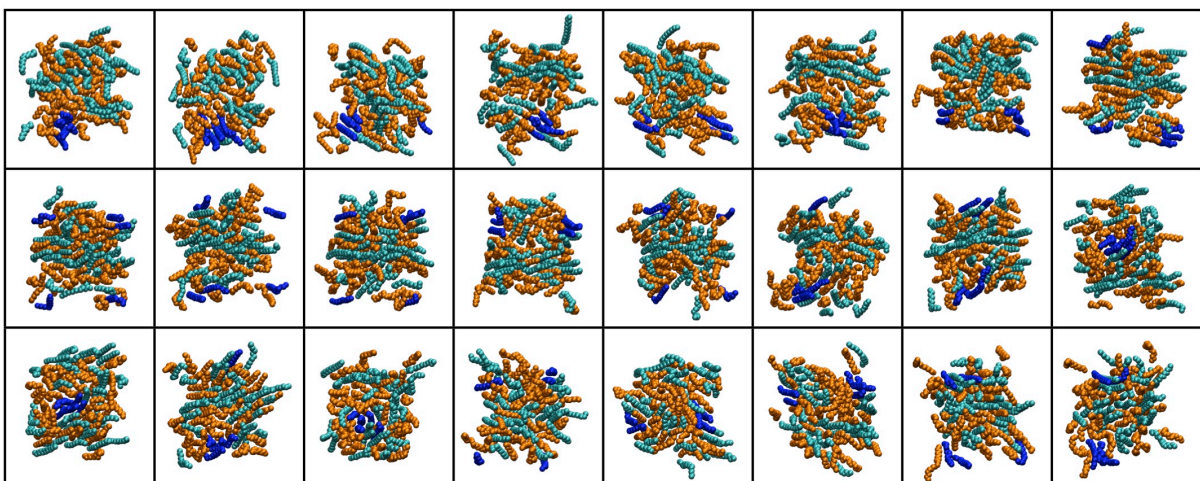
Ségrégation des chaînes hydrophobes des monocouches simulées avec le champ de force GAFF au pressions de surface 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 ; 43 mN/m (vues du dessus avec en cyan les chaînes palmitoyles et en orange les chaînes oléoyles). Les instantanés sont pris toutes les 2 ns au cours des 50 dernières nanosecondes de la simulation et illustrés de gauche à droite et de haut en bas.

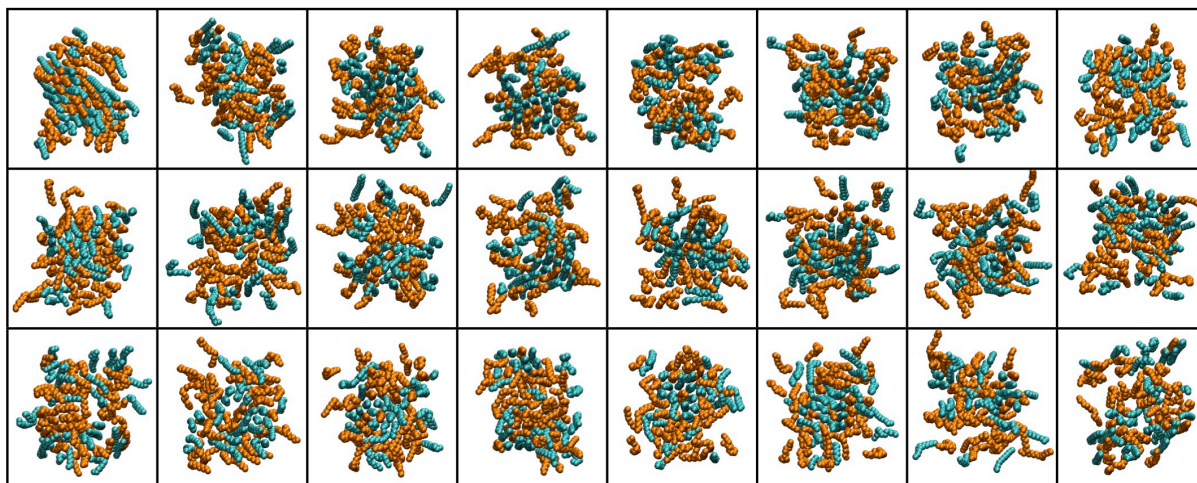
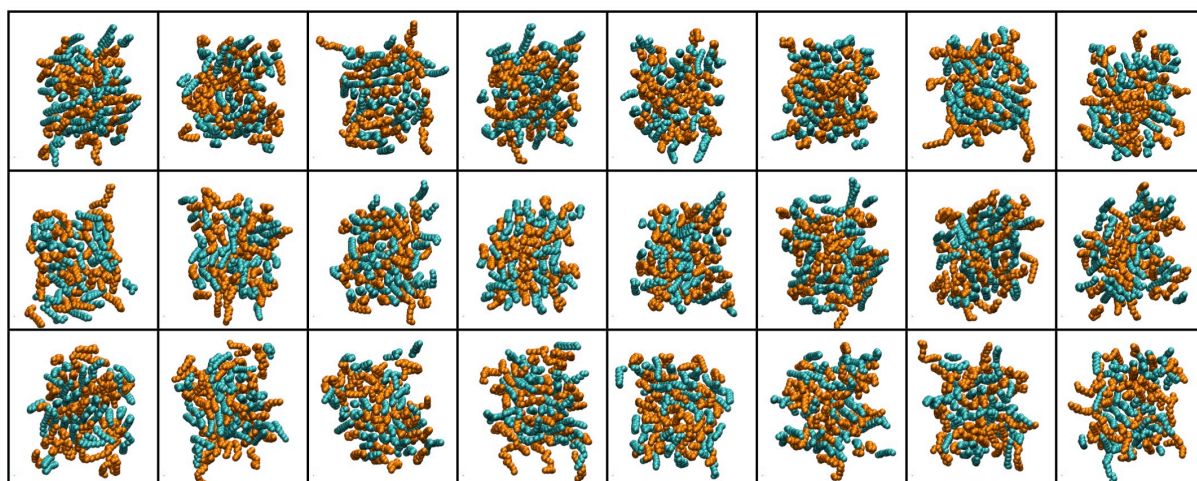
**7,5 mN/m**



**10 mN/m**

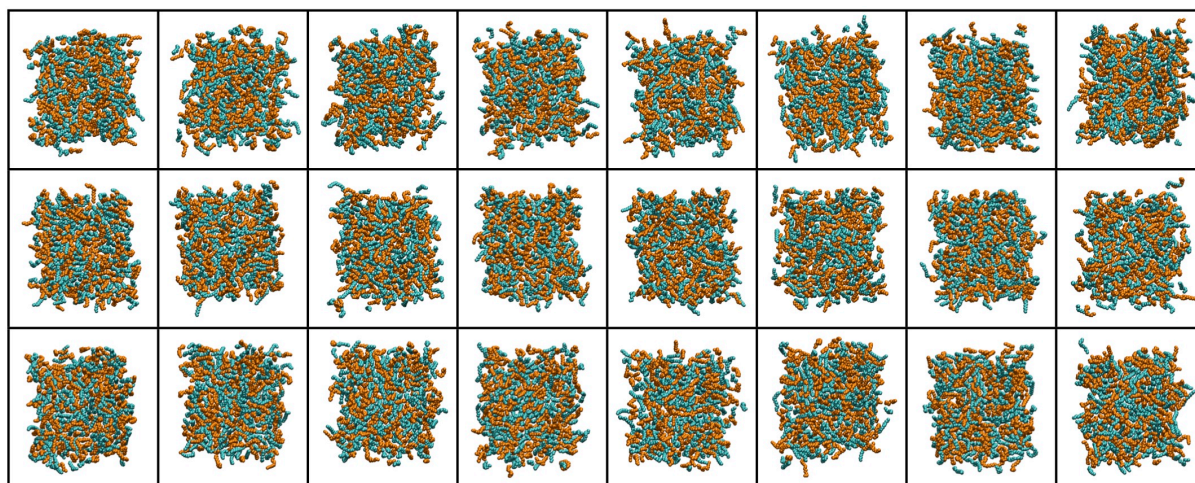


**15 mN/m****20 mN/m****30 mN/m**

**40 mN/m****43 mN/m**

# Annexe 5

Ségrégation des chaînes hydrophobes des monocouches simulées avec le champ de force *Charmm27* à 30 mN/m (vues du dessus avec en cyan les chaînes palmitoyles et en orange les chaînes oléoyles). Les instantanés sont pris toutes les 2 ns au cours des 50 dernières nanosecondes de la simulation et illustrés de gauche à droite et de haut en bas.



# Annexe 6

Ségrégation des chaînes hydrophobes des monocouches simulées avec le champ de force *Charmm36* à 30 mN/m (vues du dessus avec en cyan les chaînes palmitoyles et en orange les chaînes oléoyles). Les instantanés sont pris toutes les 2 ns au cours des 50 dernières nanosecondes de la simulation et illustrés de gauche à droite et de haut en bas.

