



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Vectorisation de peptides et de fonctionnelles à visées thérapeutiques à travers des membranes biologiques

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 29 Novembre 2013

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(mention Chimie)

par

Daniel Bonhenry

Composition du jury

Rapporteurs : Pr. Nathalie Reuter, Université de Bergen, Norvège
Dr. Luca Monticelli, Université Claude Bernard Lyon I, France (CR INSERM – HDR)

Examineurs : Dr. Nicolas Muzet, Sanofi, Strasbourg, France
Pr. Xavier Assfeld, UMR SRSMC, Université de Lorraine, France
Dr. François Dehez, UMR SRSMC, Université de Lorraine, France (CR CNRS)
Dr. Mounir Tarek, UMR SRSMC, Université de Lorraine, France (DR CNRS – HDR)

Remerciements

Je remercie cordialement le Professeur Nathalie Reuter et le Dr. Luca Monticelli d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je souhaite adresser également mes remerciements au Professeur Xavier Assfeld et au Dr. Nicolas Muzet pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Toute ma reconnaissance et mon estime vont envers mes deux directeurs de thèse, François Dehez et Mounir Tarek, qui m'ont dirigé durant ce travail. Je leur suis reconnaissant pour leurs encouragements, leur enthousiasme et leur confiance, ainsi que pour la correction de ce mémoire.

Je voudrais également remercier tous mes collègues doctorants et chercheurs que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces trois dernières années.

Je n'oublie pas non plus ma famille et mes amis pour les continuels encouragements et soutien au cours de ces trois dernières années.

Table des matières

Introduction générale	vii
------------------------------	------------

Chapitre 1 La membrane cellulaire
--

1.1	Structure d'une cellule biologique	2
1.2	La membrane cellulaire	4
1.2.1	Propriétés physico-chimiques - Composition en lipides	6
1.2.2	Asymétrie dans la distribution des lipides de la membrane	8
1.2.3	Propriétés mécanistiques	9
1.2.4	Propriétés électrostatiques	16
1.3	Influence du pH sur l'internalisation de peptides	21
1.4	Problématique	24

Bibliographie	27
----------------------	-----------

Chapitre 2 Méthodes numériques

2.1	La Dynamique moléculaire	36
2.1.1	Concept	36
2.1.2	Conditions aux limites périodiques	40
2.1.3	Champs de force	40
2.1.4	Traitement des interactions à courtes et longues portées	42
2.1.5	Intégration et pas de temps	45
2.1.6	Dynamique moléculaire dans différents ensembles	47

2.2	Calculs d'énergie libre	53
2.2.1	Rappels de physique statistique	53
2.2.2	Transformation alchimique	56
2.2.3	Force de biais adaptative - Adaptive Biasing Force (ABF)	64
2.2.4	Métadynamique	70
2.2.5	Méthodes adiabatiques et dérivées	71
2.3	Estimation du pK_a dans les simulations	80
2.4	Cinétique	83
2.4.1	Diffusion	83
2.4.2	Perméabilité	85
2.4.3	Taux de réaction et temps de passage moyen	89
	Bibliographie	93

Chapitre 3 Résultats

3.1	Transfert de molécules à travers des membranes en simulations	104
3.2	Résultats préliminaires - Interface hydrophile/hydrophobe	108
3.3	Paramètres de simulations	111
3.4	Protonation et cinétique du transfert d'un peptide titrable à travers une membrane de POPC	
3.4.1	Détermination du pK_a	122
3.4.2	Cinétique du transfert	127
3.5	Influence de la composition en phospholipides sur le transfert de peptide cationique	131
3.5.1	Influence des chaînes aliphatiques : DPhPC-ester, POPC	132
3.5.2	Influence des branchements glycérols et des carbonyles : DPhPC-éther, DPhPC-ester	
3.5.3	Conclusion	141
3.6	Profils multidimensionnels	142
3.6.1	Définition des variables collectives	143
3.6.2	Production des surfaces d'énergie libre	144
3.6.3	Profils de pK_a multidimensionnel	147
3.7	Conclusion générale	148

Bibliographie	153
----------------------	------------

Annexes

Annexe

1	Calculs des profils électrostatiques et de pressions le long de la normale à la membrane	169
1.1	Théorie	169
1.2	Résultats	172
2	Profils de diffusion	173
3	Convergence	174
3.1	Profil à une dimension	174
3.2	Profils multidimensionnels	175
	Bibliographie	177
	Conclusion générale et perspectives	179
	Bibliographie	183

Introduction générale

Un des nombreux axes de recherche de la médecine et des sciences pharmaceutiques est la découverte de médicaments pouvant s'accumuler de manière spécifique dans les tissus. Durant ces dernières décennies, de nombreux groupes se sont focalisés sur la recherche de molécules visant à améliorer la pharmacodynamique des principes actifs. Ces molécules peuvent être basées sur des substances biologiques existantes au sein des organismes vivants ou faire intervenir des molécules artificielles synthétisées dans l'optique d'améliorer le transport de médicaments. Un nombre important d'expériences *in-vivo* et *in-vitro* ont déjà été menées afin de comprendre comment ces systèmes d'administration fonctionnent et de déterminer leurs impacts sur les organismes vivants. L'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs a permis l'émergence d'un nouvel outil pour explorer le fonctionnement, à l'échelle moléculaire, des processus biologiques par le biais d'expériences dites *in-silico* en ayant recours à des simulations numériques.

Des simulations antérieures à cette thèse ont démontré la possibilité pour des molécules possédant des sites de titration, c'est à dire pouvant changer leurs états de protonation en fonction de leurs environnements, de traverser la membrane cellulaire. Cette dernière est une structure délimitant la cellule dans l'espace et agissant comme une barrière contre la majorité des molécules. Il a été supposé alors que ces molécules,

habituellement chargées en milieux aqueux changeaient leurs états de protonation à l'interface, devenant ainsi électriquement neutres et pouvaient alors passer à travers la membrane. Compte tenu de la grande variété de molécules thérapeutiques dont la taille peut devenir relativement importante, cette thèse porte sur l'interaction entre une fonctionnelle titrable pouvant se retrouver dans une grande variété de principes actifs et de cargos et la membrane. Cette dernière, étant un assemblage complexe de différentes molécules, sera modélisée par une bicouche lipidique. Il sera ainsi possible d'étudier l'influence des propriétés de la membrane sur le transfert de molécules et plus particulièrement sur le transfert d'espèces titrables en changeant les phospholipides la composant. Des simulations de dynamique moléculaire qui permettent d'étudier ces systèmes à l'échelle de la molécule, ont été couplées à des calculs d'énergie libre afin de déterminer des quantités thermodynamiques et d'évaluer de la faisabilité du processus de transport. Ces résultats sont utilisés pour estimer le pK_a de la molécule en fonction de la profondeur de pénétration dans la membrane. La connaissance du pK_a permet de déterminer la proportion d'espèces sous forme neutre (déprotonée) par rapport à la proportion d'espèces sous forme chargée (protonée) et donc de définir une zone où le changement d'état de protonation est susceptible de se produire. Afin de décrire pleinement ce processus, nous avons estimé la perméabilité, grandeur cinétique qui renseigne sur la vitesse de transfert lorsque celui ci a lieu. Au final toutes ces données ont permis d'obtenir une vue complète du changement d'état de protonation lors du passage de l'espèce titrable à travers la membrane.

Les derniers travaux entrepris pendant cette thèse ont consisté à considérer le transfert selon un processus plus complexe prenant en compte non seulement la position de la molécule mais également son hydratation. Des surfaces d'énergie libre multidimensionnelles ont donc été estimées et ont mis en lumière de nouvelles possibilités de changement d'état de protonation en fonction du nombre de molécules d'eau hydratant la fonction titrable.

Dans un premier chapitre, les membranes cellulaires seront présentées. Je montrerais également comment les propriétés physico-chimiques des membranes sont modulées par le type de lipides qui les composent et je discuterais de l'impact potentiel de ces variations sur la perméabilité. Un aperçu des impacts potentiels sur la perméabilité y sera également présenté. Le deuxième chapitre se focalise sur les méthodes numériques utilisées au cours de ces travaux pour étudier le passage et la protonation du peptide. La dynamique moléculaire y est présentée suivit par les différentes méthodes pouvant être utilisées pour estimer l'énergie libre associée au transfert. À partir de cette quantité, je montre comment des valeurs de pK_a peuvent en être déduites pour finir le chapitre par les modèles cinétiques. Finalement, la dernière partie détaille les résultats obtenus au cours de cette thèse, l'énergie libre associée au transfert, les profils de pK_a dans différentes membranes avec les constantes cinétiques pour finir par les profils d'énergie libre multidimensionnelles.

Chapitre 1

La membrane cellulaire

Sommaire

1.1	Structure d'une cellule biologique	2
1.2	La membrane cellulaire	4
1.2.1	Propriétés physico-chimiques - Composition en lipides	6
1.2.2	Asymétrie dans la distribution des lipides de la membrane	8
1.2.3	Propriétés mécanistiques	9
1.2.4	Propriétés électrostatiques	16
1.3	Influence du pH sur l'internalisation de peptides	21
1.4	Problématique	24

Les molécules à visées thérapeutiques sont des espèces d'origine naturelle ou synthétique ayant des propriétés curatives et/ou préventives à l'égard des maladies. La complexité des milieux biologiques rend difficile la rationalisation des interactions entre le produit actif, son site d'action et le reste de l'organisme. Comme chaque organisme vivant est constitué de cellules, comprendre l'action d'une molécule thérapeutique sur ces dernières est de première importance pour la recherche de futurs principes actifs. Une molécule à visée thérapeutique doit donc être capable de passer les barrières susceptibles d'être rencontrées afin d'arriver à son site d'action. Parmi ces barrières, une

se trouve être les membranes biologiques. Ces dernières sont des parties importantes des cellules délimitant leur expansion dans l'espace. Leur perméabilité est un critère important dans l'étude de la pharmacocinétique d'un médicament. La première partie de ce chapitre est consacrée à la description succincte de la structure de la cellule, suivie plus particulièrement par la présentation de sa membrane. Les deux dernières parties porteront sur l'influence des propriétés de la membrane sur le passage de molécules.

1.1 Structure d'une cellule biologique

La cellule (figure 1.1) est considérée comme l'unité de base du vivant et il en existe une grande variété. Cette biodiversité résulte de l'adaptation des organismes à leur environnement. Pour permettre leur survie, l'évolution des espèces a conduit à l'émergence de cellules biologiques pouvant être très spécialisées au sein d'un être vivant. Afin de classer les organismes vivants, une division en trois différents domaines a été proposée par Woese en se basant sur des caractéristiques moléculaires plutôt que phylogénétiques [1, 2] et plus particulièrement sur de la structure de la cellule. Ces trois grandes familles sont les eucaryotes (possédant un noyau renfermant le matériel génétique), les bactéries (ne possédant pas de noyau) et les archaebacteries (se différenciant des bactéries par la composition et l'organisation de leur membrane cellulaire). Avant cette classification en trois domaines, un organisme vivant n'était classé que soit dans le domaine des eucaryotes soit dans celui des procaryotes. L'existence de micro-organismes ne rentrant dans aucune de ces catégories, et l'apparente ancienneté liée à sa composition et sa capacité à se développer dans des conditions rappelant celles se trouvant 3 à 4 milliards d'années auparavant a conduit à nommer ces organismes *les archées* ou *archaebacteria*.

Bien qu'appartenant à des domaines différents, des similitudes existent entre ces domaines, archées et eucaryotes ont des protéines et des mécanismes de réplication très

proches. Globalement, la membrane des cellules (figure 1.1) de ces trois domaines possèdent des constituants communs à savoir des lipides, des sucres et des protéines. Les lipides sont majoritairement des phospholipides, ce sont des molécules amphiphiles, avec une tête polaire hydrophile et deux chaînes carbonées hydrophobes, qui en milieu aqueux s'associent naturellement en structures organisées comme des bicouches, des micelles ou des liposomes. Ces molécules vont ainsi former une matrice permettant l'ancrage et le fonctionnement des protéines. La présence de sucres et d'autres molécules de lipide (comme le cholestérol) va lui jouer un rôle dans les processus biologiques et sur les propriétés physico-chimiques de la membrane. La proportion de ces différentes molécules entrant dans la constitution de la membrane varie grandement suivant le type de micro-organisme considéré.

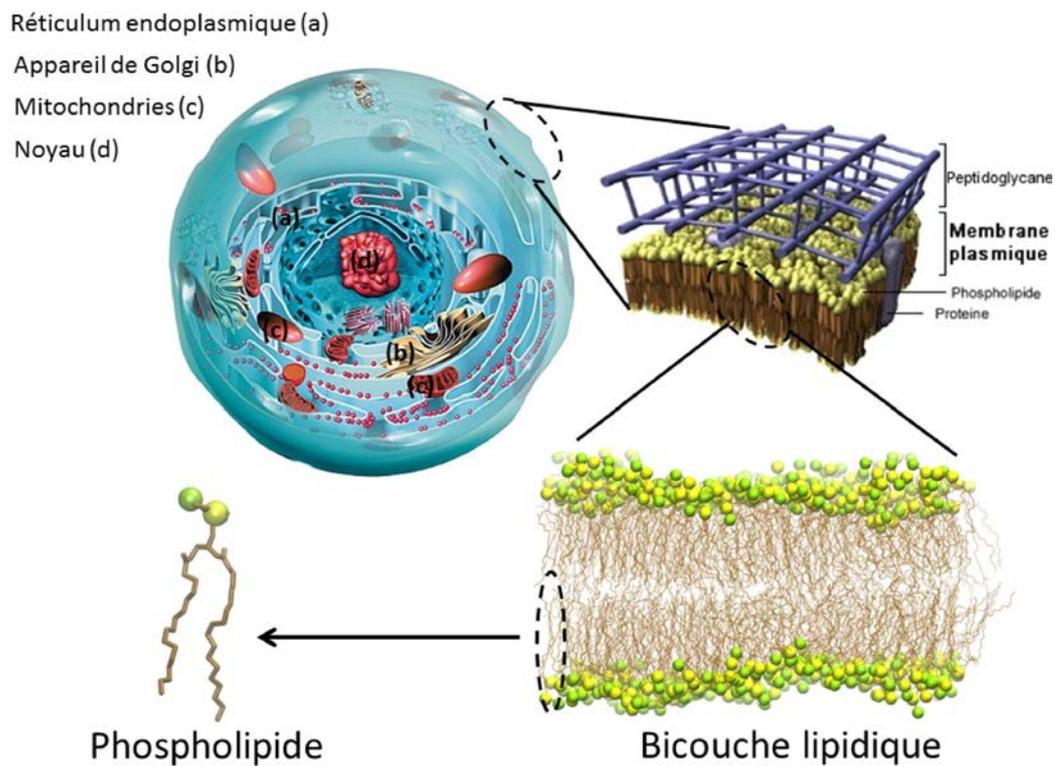


FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'une cellule et de ses constituants.

1.2 La membrane cellulaire

La membrane est la structure entourant non seulement les cellules et les différents organites présents à l'intérieur de cette dernière et marque sa frontière avec le milieu extérieur. Elle possède une organisation complexe et varie selon le type de micro-organismes considérés. Elle assure des rôles divers et variés allant de la signalisation inter-cellulaire au transport de nutriments et de molécules entre le milieu intra-cellulaire et le milieu extra-cellulaire. Elle est un organe vital pour le fonctionnement de la machinerie cellulaire. En plus de fournir une interface pour la communication avec les autres cellules et le milieu extérieur, la membrane assure également un rôle protecteur.

En effet, elle agit comme une barrière contre les éléments indésirables et se révèle être un obstacle dans le transfert de molécules vers l'intérieur des cellules. La connaissance de sa composition, de ses propriétés et de ses interactions avec d'autres molécules est donc primordiale dans le domaine pharmacologique. Cette section a pour but de décrire les propriétés physico-chimiques de la membrane afin d'appréhender au mieux la compréhension des phénomènes se produisant à son interface ainsi que les interactions entre ses constituants et les molécules visant à la franchir.

Les premières cellules ont dû rencontrer deux problèmes liés aux propriétés de leur membrane. Les molécules amphiphiles de lipides ont eu besoin de posséder des chaînes carbonées suffisamment longues pour pouvoir former des bicouches stables mais aussi rester assez perméables aux nutriments pour assurer la croissance et le fonctionnement de la cellule [3]. Les membranes formées de lipides ne sont pas reliées entre elles de manière covalente mais sont maintenues entre elles uniquement par des interactions électrostatiques, des forces de van der Waals et des interactions hydrophobes.

- Interactions électrostatiques : Les molécules de phospholipides possèdent souvent des charges au niveau de leurs têtes polaires (phosphate et groupements acide ou amine) et sont en contact avec une concentration ionique présente dans

les milieux biologiques. L'interaction de molécules de phospholipides avec des cations en solution peut donc moduler la formation, la structure et les propriétés de la membrane. Par exemple, dans un milieu possédant une concentration importante en cations divalents, les molécules amphiphiles ont tendance à précipiter.

- Forces de van der Waals : ce sont les seules forces agissant entre les parties non-polaires des molécules amphiphiles, c'est à dire les chaînes aliphatiques. Ces forces résultent de la corrélation entre le mouvement des électrons dans le nuage électronique des atomes. Bien que faibles, elles sont toujours attractives et s'additionnent avec la longueur de la chaîne, devenant de plus en plus importantes. Comme les membranes doivent rester stables et fluides pour fonctionner, il en résulte que les lipides doivent avoir une certaine longueur. Les phospholipides constituant les membranes des cellules actuelles possèdent une longueur de chaîne comprise entre 14 et 24 atomes de carbone, longueur suffisante pour assurer à la fois la fluidité et une barrière efficace contre la perméabilité de molécules. Dans des conditions physiologiques, les chaînes longues peuvent néanmoins former des phases solides. Pour cette raison, les cellules eucaryotes possèdent des lipides présentant une ou plusieurs insaturations (double liaisons *cis*), pouvant aller jusqu'à six par chaîne. Ces défauts diminuent sensiblement la température de fusion des lipides. Dans les archées, incapables de synthétiser les lipides insaturés, les chaînes possèdent des groupements méthyles et parfois des cycloalcanes répartis le long des chaînes aliphatiques ayant les mêmes effets que les insaturations sur la température de fusion [4].
- Interactions hydrophobes : Les membranes biologiques s'assemblent en bicouche par les interactions entre les chaînes carbonées de molécules de lipides et par des interactions entre les molécules d'eau et les têtes polaires sous l'action d'effets hydrophobes. Les origines de cet effet proviennent de la rupture de la structure

des chaînes des lipides et du réseau des liaisons hydrogènes des molécules d'eau lorsque ces derniers sont insérées dans un milieu aqueux ce qui implique un coût énergétique [5]. Afin de minimiser la perte d'énergie, les molécules hydrophobes ont tendance à s'associer entre elles de manière à minimiser le contact avec la phase aqueuse. Dans le cas de molécules amphiphiles, comme les phospholipides, la tête polaire hydrophile s'oriente en direction du milieu aqueux et des molécules d'eau alors que les chaînes aliphatiques, hydrophobes, se regroupent entre elles donnant lieu à la formation de micelles ou de bicouches.

1.2.1 Propriétés physico-chimiques - Composition en lipides

Les propriétés de la membrane proviennent en partie de la structure chimique des phospholipides la constituant comme la longueur des chaînes carbonées, le nombre d'insaturations, la fonction reliant les queues aux têtes polaires et les fonctions chimiques constituants ces dernières (voir figure 1.2).

Les membranes biologiques sont constituées seulement de quelques types de lipides parmi la vaste variété de molécules que comportent cette famille. Il est possible de les classer en deux sous catégories, ceux jouant un rôle structural et ceux jouant principalement un rôle fonctionnel. Au premier groupe appartiennent le cholestérol, les cérébrosides et les quatre molécules de phospholipides les plus abondantes : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylserine (PS) et la sphingomyéline (SPHM). Dans le deuxième groupe se retrouvent le phosphatidylinositol jouant un rôle important dans la signalisation cellulaire, l'acide phosphatidique et le phosphatidylglycerol (intermédiaire dans la synthèse des lipides) et d'autres gangliosides intervenant dans le transport d'antigènes. Les cérébrosides sont des molécules analogues aux SPHM mais avec le groupement phosphocholine chargé remplacé par un groupement neutre de sucre comme le galactose et le glucose.

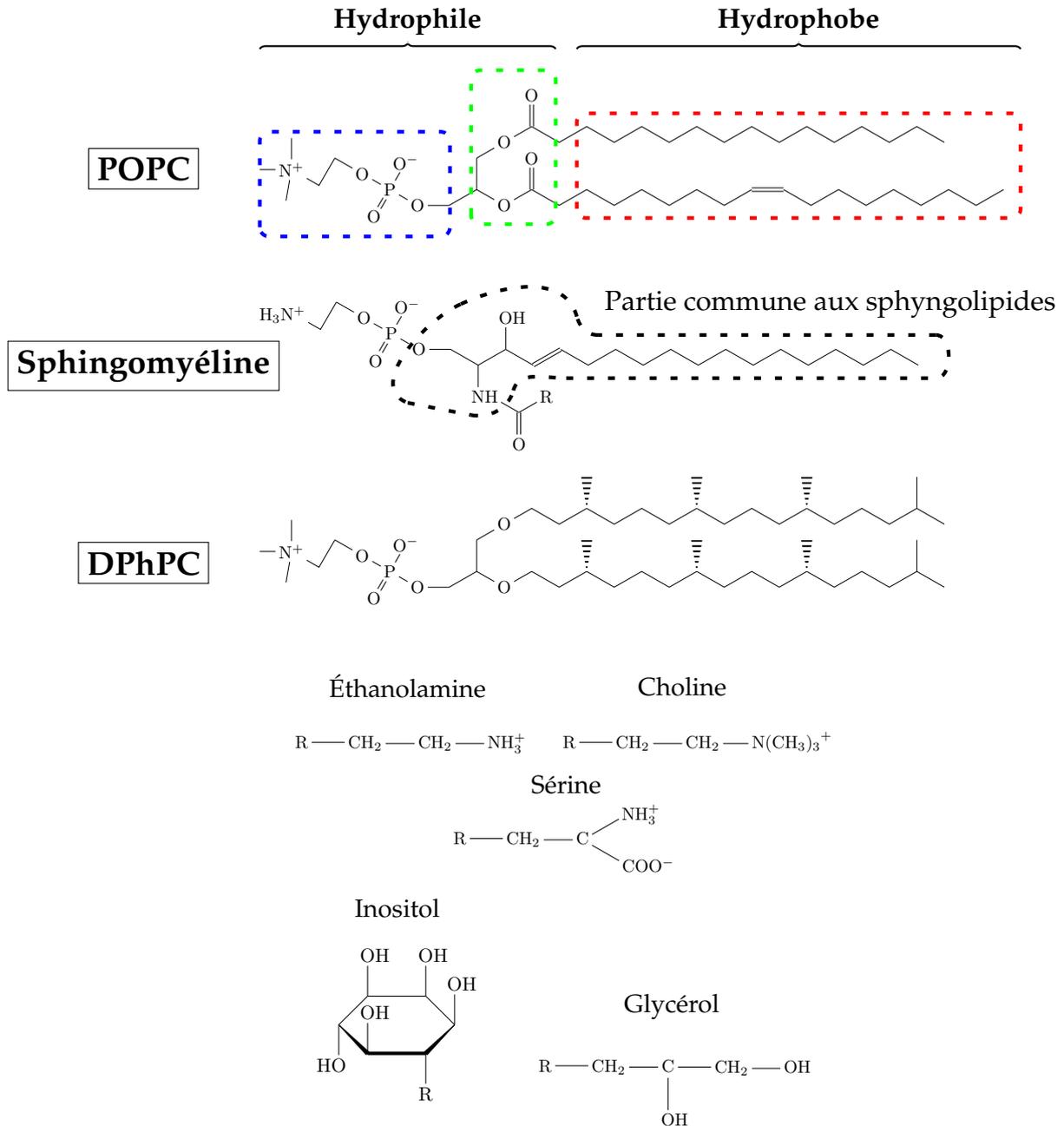


FIGURE 1.2 – Différentes topologies de molécules de lipides existantes dans les membranes cellulaires. La molécule de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), en haut, est un des phospholipides les plus abondant dans les cellules. En encadré avec des tirets bleus correspond à la tête polaire, la partie après le groupement phosphate peut être interchangeable avec les fonctions présentées en bas de la page. Entouré avec des tirets verts, le groupement glycérol estérifié relie les têtes polaires aux chaînes aliphatiques, ces dernières entourées par un cadre en tirets rouges présentent une insaturation. Sous la molécule de POPC, est représentée une SPHM (sphingomyéline) avec entouré en noir, la partie commune aux sphingolipides. Encore en dessous est représenté une molécule de DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) avec le glycérol non-estérifié et les chaînes branchées.

Israelachvili [6] a proposé d'associer à chaque lipide une forme géométrique lorsque ceux-ci se retrouvent dans la membrane. Trois représentations sont possibles, la forme cylindrique, la forme conique dont la base est soit située dans les têtes polaires soit dans les queues. Ces deux derniers groupes conduisent à des membranes possédant une courbure intrinsèque non nulle (courbure positive ou négative) pouvant créer des invaginations quand ces lipides se retrouvent dans des membranes planes. La molécule de DPhPC, par exemple, possède deux chaînes hydrophobes identiques avec quatre groupements méthyles répartis régulièrement le long de la chaîne. Cette molécule tend à adopter une forme cylindrique lorsqu'elle est placée dans une membrane par la formation de structures interdigitées. Ceci a pour conséquence de réduire le déplacement latéral et la rotation comparé à d'autres molécules de lipides PC. Les molécules de DPhPC forment des membranes très stables, ordonnées où les molécules sont grandement regroupées entre elles. Les molécules de PS et de PE quand à elles ont plus tendance à induire une courbure au sein d'une bicouche plane.

1.2.2 Asymétrie dans la distribution des lipides de la membrane

Certains lipides impliqués dans la signalisation, comme les polyphosphoinositides, ne semblent être présents qu'à la surface de la membrane donnant sur le cytoplasme. Au contraire, le cholestérol, présent en grande quantité dans les membranes biologiques est plus abondant sur la couche extérieure (donnant vers le milieu extracellulaire). Cette asymétrie n'est pas strictement conservée et les différents types de cellules pouvant être retrouvés chez les organismes vivants peuvent changer leur distribution en lipides suivant leur activité. Elle a pour conséquence de séquestrer les phospholipides acides sur la couche intérieure de la membrane, caractéristique différenciant les cellules eucaryotes des cellules procaryotes.

Au sein de la bicouche lipidique, le niveau de désordre est maintenu par les différentes longueurs de chaînes des lipides et leurs degrés d'insaturation. Ce désordre

modifie les propriétés physiques de la membrane. La distribution des lipides au sein de la bicouche revêt également une importance fondamentale, ces derniers peuvent être aléatoirement distribués ou rassemblés en domaines.

L'asymétrie de la membrane est entretenue par le réseau trans-golgien et au niveau de la membrane plasmique par différentes protéines fonctionnant par hydrolyse de l'ATP. Par exemple, les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) sont capables de faire passer les molécules de phospholipides de la couche intérieure à la couche extérieure. Certaines protéines, appartenant à la famille des P-type ATPases semblent capables de ramener les lipides de la couche externe vers la couche interne. De nombreuses protéines avec des propriétés similaires, spécifiques à des lipides particuliers, ont été identifiées dans des levures [7]. Une autre catégorie de protéines dissipe l'asymétrie, il s'agit des scramblases [8].

Un changement dans la composition de la membrane affecte la croissance cellulaire, les interactions avec les autres cellules ainsi que le fonctionnement des protéines présentes dans la membrane. Le système immunitaire dépend des interactions entre les différents types de cellules, ces dernières étant modulées par la composition des membranes. Une perte de l'asymétrie au sein de la membrane avec apparition de phospholipides PS à la surface est signe de blessure ou de dysfonctionnement de la cellule et provoque l'activation de mécanismes immunitaires, notamment leur phagocytose. Cet arrangement se retrouve également à la surface des cellules cancéreuses. De plus, la présence de phospholipides acides en surface offre un environnement propice à la formation de fibres d'amyloïdes [9].

1.2.3 Propriétés mécanistiques

Jusqu'à présent, la membrane n'a été présentée qu'en terme de ces constituants. Durant cette partie, les propriétés macroscopiques provenant de l'assemblage de ces constituants seront abordées. Les membranes biologiques possèdent des propriétés mé-

caniques et électrostatiques particulières qui sont dépendantes des molécules formant la membrane et sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Réciproquement, l'application de contraintes mécaniques sur la membrane peut altérer sa composition.

Tension liées à la taille des composants de la membrane

L'épaisseur de la membrane est déterminée par la longueur de la partie hydrophobe des lipides, c'est à dire des chaînes carbonées. Leurs degrés d'insaturation et l'angle de déviation par rapport à la normale de la membrane de ces chaînes sont des facteurs prépondérants. La transition vers une membrane plus fine induit une perturbation dans le regroupement des lipides augmentant de ce fait son élasticité.

Les protéines transmembranaires, entrant dans la composition des membranes biologiques, possèdent des parties hydrophobes dont la longueur spécifique ne correspond pas toujours à l'épaisseur de la partie hydrophobe de la membrane à laquelle elles sont ancrées. Ce défaut comprime ou étire la membrane et induit également un stress mécanique sur la protéine afin d'accommoder les parties hydrophobes de l'ensemble.

En raison de l'hétérogénéité des lipides constituant les membranes biologiques, il est possible d'observer la formation de domaine au sein desquels les lipides d'une même famille ont tendance à se regrouper entre eux, on parle alors de raft. En bordure, la différence des interactions entre lipides conduit généralement à déformer les molécules afin d'éviter toute exposition des parties hydrophobes au milieu aqueux. Cette déformation possède un certain coût énergétique, difficilement mesurable, mais contribue aux paramètres déterminant la taille des domaines et leur stabilité.

Pression latérale

Dans le cas d'une membrane auto-assemblée, constituée uniquement de phospholipides, la bicouche est libre d'ajuster son aire par lipide, c'est à dire de s'étendre ou de

se contracter latéralement. Une fois l'équilibre atteint, la résultante des forces agissant sur la membrane est nulle, y compris les forces agissant dans le plan, à l'intérieur de la bicouche. Cependant, la composante de ces forces peut être différente selon la profondeur dans la membrane et même si, dans son ensemble, elle apparaît stable, ses composants peuvent être soumis à des contraintes particulièrement importantes, les contributions positives étant contrebalancées par les contributions négatives. Au niveau des têtes polaires la pression est légèrement positive, suivi par un large pic négatif dans la région des glycérols tandis que à l'intérieur, la pression est positive.

Les tensions à l'interface proviennent majoritairement des interactions hydrophiles et hydrophobes ayant pour conséquence de réduire l'aire par lipide en forçant les molécules à se rapprocher les une des autres et, pour des chaînes saturées, à s'aligner toutes dans des conformations *trans*. Cet effet est contrebalancé par le désordre des chaînes des lipides, plus précisément, par l'entropie associée aux conformations adoptées par les queues et aux répulsions entre les têtes polaires. La pression dans le cœur de la membrane est d'autant plus importante que l'aire par lipide diminue. Lorsque les chaînes sont très ordonnées, une faible variation dans l'aire par lipide conduit à une importante augmentation de liberté conformationnelle pour ces dernières. Cet effet devient plus faible lorsque l'aire par lipide est déjà grande, le désordre des chaînes étant déjà important, le gain entropique est de ce fait moins important.

Durant l'expansion de la membrane, le volume occupé par les lipides varie peu notamment suite à l'énorme coût énergétique pour créer des poches de volumes inoccupés (augmentation de l'énergie de van der Waals au sein des chaînes carbonées). Ainsi, la bicouche a tendance à devenir de plus en plus fine au fur et à mesure de l'expansion. Pour s'adapter à cette contrainte, les chaînes deviennent de plus en plus entremêlées et tordues pour remplir l'espace à l'intérieur de la bicouche tout en gardant une densité constante.

Les forces induites par ces variations de pression sont localisées dans des zones

de quelques ångtröms et peuvent être suffisantes pour influencer la structure et le fonctionnement des protéines transmembranaires [10, 11, 12].

Volume libre à l'intérieur d'une membrane phospholipidique

Dans le cadre du transfert de molécules au travers de membrane biologique, il est intéressant de mentionner l'existence de volume libre, espace non-occupé par des molécules de lipides, pouvant avoir un lien avec la diffusion d'espèce dans les bicouches. La théorie de la percolation est souvent utilisée pour décrire la distribution de ces poches de volumes libres au sein d'une bicouche de lipides.

Théorie de la percolation

Cette théorie se focalise sur l'étude de la connectivité et de la probabilité d'occupation d'un site par des grappes distribuées aléatoirement et indépendamment les unes des autres sur un réseau. Elle permet d'étudier des phénomènes ayant lieu sur des échelles importantes tout en étant indépendante des détails du système.

La distribution de la taille des poches (de volume libre) à l'intérieur d'une membrane, $n(s, p)$, telle que prédite par la théorie de la percolation est donnée par

$$n(s, p) \propto s^{-\tau} f(Z) \quad (1.1)$$

où s est la taille des poches, p la fraction de volume libre et Z définie telle que,

$$Z = (p - p_c) s^\sigma \quad (1.2)$$

La fonction Z décrit la transition du système entre un état critique et un état non-critique. Le paramètre p_c correspond au seuil de percolation. Ce seuil décrit la formation de longues poches de vide étendues dans le système, notamment lorsque plusieurs petites cavités deviennent assez nombreuses pour s'associer entre elles. Pour des sys-

tèmes où $|Z| \rightarrow 0$, la distribution s'écrit

$$n(s, p) = s^{-\tau} \quad (1.3)$$

Cette limite s'applique pour des systèmes proches de la limite de percolation ou pour des poches très petites. Dans le cas où Z devient très grand

$$n(s, p) \propto s^{-\theta} \exp(-c''s) \quad (1.4)$$

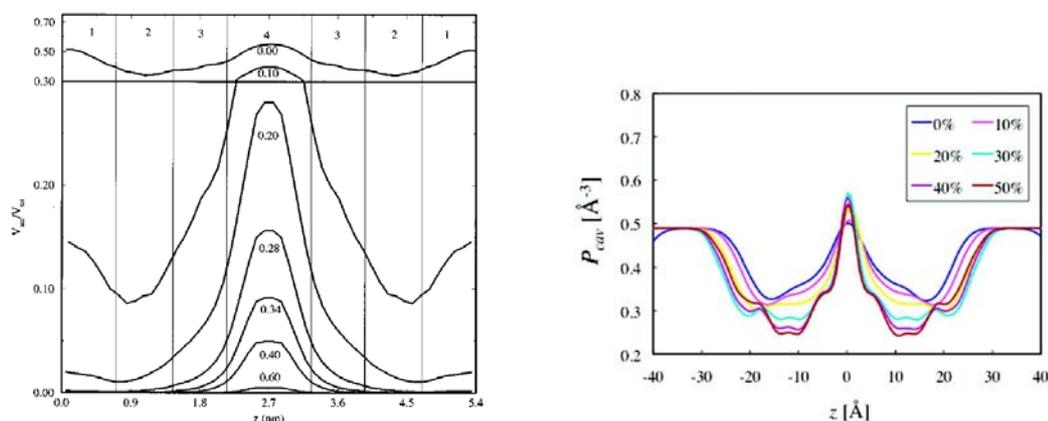
Cette dernière équation est valide pour des cavités plus grandes que la longueur de corrélation, celle-ci pouvant être vue comme la distance moyenne entre deux points de volume libre appartenant au même groupe. Lorsque le seuil de percolation est atteint, cette longueur devient infinie. Les paramètres θ , τ sont dépendants de la dimensionnalité du problème et en trois dimensions valent $\theta = 3/2$ et $\tau = 2.18$. c'' est une constante dépendante du système.

Deux types de volume libre peuvent être distingués. Le premier, le volume libre vide peut être estimé comme la fraction de point de la grille résidant en dehors du rayon de van der Waals de tous les atomes de la boîte. La deuxième catégorie, le volume libre accessible, est calculé de la même manière en ne prenant cependant pas en compte le rayon de van der Waals de la molécule de soluté. Pour obtenir la distribution de volume libre le long de la membrane, soit l'information locale sur la distribution des poches, plusieurs grilles dans le plan de la membrane peuvent être moyennées dans une tranche particulière le long de la normale à la membrane [13].

Distribution du volume libre au sein d'une bicouche lipidique – Implications sur la diffusion

Plusieurs groupes [13, 14, 15] ont ainsi estimé la distribution des poches de volume libre à l'intérieur d'une bicouche de phospholipides. Cette distribution est complémentaire à la densité d'électron du système, cette observation pouvant se comprendre comme le volume vide ne peut exister qu'en l'absence de particules (voir figure 1.3).

Les modèles utilisés consistent à diviser la membrane en 4 régions distinctes [64] où la région 1 correspond aux cholines en faible interactions avec les molécules d'eau, la densité dans cette région restent assez faible. Dans la région 2, la densité des têtes polaires est la plus élevée et les molécules d'eau sont fortement liées entre elles et aux groupements phosphates. Cette région comprend également la majorité des glycérols. La région 3 comprend la partie la plus ordonnée des chaînes lipidiques et la densité y est par correspond plus élevée que dans un alcane liquide. Finalement, la région 4 correspond à la terminaison des chaînes aliphatiques, beaucoup moins ordonnées et où la densité est plus faible (figure 1.3a).



(a) Volume libre accessible au sein d'une bicouche constituée de molécules de DPPC pour différentes tailles de cavités, de 0,0 nm à 0,6 nm [13].

(b) Volume libre accessible pour une cavité de 0,5 nm de diamètre dans une membrane de DPPC pour différentes concentrations en cholestérol [15].

FIGURE 1.3 – Répartition du volume libre accessible dans une membrane constituée de phospholipides estimée par des simulations de dynamique moléculaire.

Les régions 1 et 2 ont pu être caractérisées comme un fluide constitué de petites molécules. La région 1 n'est pas vraiment différente du milieu aqueux et reste isotrope. Le volume libre dans cette région est distribué en plusieurs petites cavités sphériques. La densité y étant relativement importante, cette région est loin du seuil de percolation et il existe très peu de chance pour observer des cavités de tailles importantes. Même si

la région 2 est plus complexe, avec une variété d'atomes plus riche et des interactions plus fortes, mise à part une diminution du volume libre, la distribution et les propriétés se rapprochent de celle de la région 1.

La région 3 se comporte comme un polymère souple, la densité, le volume libre et la distribution des poches y sont similaires [17]. La raison de cette similarité avec les polymères plus qu'avec les alcanes est due en partie à la corrélation existante entre les chaînes et aux fortes interactions entre les têtes polaires responsables de la densité importante dans cette région et donc de la rareté du volume libre. L'anisotropie de cette région conduit à des poches plus asphériques que dans les régions 1 et 2 et préférentiellement orientées le long de la normale à la membrane, conséquence directe de l'orientation des chaînes.

La région 4, pour finir, est riche en volume libre dû à la présence des terminaisons des chaînes aliphatiques. Le volume libre y est distribué de manière plus isotrope et en poches plus grandes où des solutés de taille relativement importante ($\varnothing \approx 0,5$ nm) sont capables de s'insérer sans déranger la conformation des lipides. Cette région ressemble à celle d'un fluide d'alcane comme le décane.

La distribution étudiée ici vaut pour une membrane modèle constituée uniquement de phospholipides. La répartition du volume libre au sein d'une membrane cellulaire peut être différente compte tenu de la présence de molécules de cholestérol, d'autres peptides et de protéines. Par exemple, l'étude par dynamique moléculaire de l'ajout de cholestérol dans une membrane constituée de phospholipides avec une concentration allant de 0 % à 50 % a montré que le volume libre décroissait avec l'augmentation de cholestérol [14, 15].

La distribution des poches de volume libre à l'intérieur d'une membrane est parfois avancée pour expliquer la diffusion de molécules traversant les bicouches lipidiques [67]. La présence de ces poches a remis en question [13] la validité du modèle de solubilité-diffusion tel qu'exprimé par Meyer et Overton [63, 62] où la membrane est considérée

comme étant homogène. D'après la distribution du volume libre au sein de la membrane, le comportement du soluté va être très dépendant de sa taille et donc différents types de mécanismes peuvent avoir lieu. De ce fait, il est pratiquement impossible d'établir une théorie générale de la diffusion concernant le volume libre.

Cependant, les profils de volume libre et de diffusion à l'intérieur d'une bicouche phospholipidique montrent une certaine corrélation et laissent supposer un mécanisme de saut de poche en poche pour la diffusion d'une molécule de petite taille ($\varnothing < 0,6 \text{ nm}$) dans des membranes biologiques mais d'autres mécanismes ou phénomènes doivent être présents pour expliquer la diffusion de molécules de tailles plus importantes.

1.2.4 Propriétés électrostatiques

Les phénomènes électrostatiques jouent un rôle important dans les processus biologiques comme dans les processus d'adhésion, les interactions entre les cellules ou les métabolites entourant ou présent à l'intérieur de la cellule. De plus, les milieux biologiques possèdent toujours une concentration ionique créant ainsi un équilibre entre les ions en solution et la surface chargée ou polaire des membranes. Ces dernières attirent les ions vers elles pour former une couche d'électrolytes et contrebalancer les charges négatives présentes, créant de ce fait une couche de charges positives à l'interface. La distribution des charges est liée à la compétition entre les interactions électrostatiques avec la membrane et la contribution entropique des ions en solution ayant tendance à les disperser. Cette couche d'ions, de cations plus précisément, influence les propriétés électrostatiques globales de la cellule et les propriétés intrinsèques de la membrane.

Toutes les membranes cellulaires possèdent un potentiel électrostatique. Ce dernier est spécifique à chaque type de cellules ou représentatif d'un stade de ces dernières. Par exemple, lors d'une liaison des tissus suite à une blessure, les cellules se reproduisent et prolifèrent afin de remplacer les cellules mortes ou abîmées. Une caractéristique de ces

cellules est que leur potentiel membranaire est plus faible que celui des cellules saines au repos. Une fois la réparation terminée, la multiplication des cellules s'arrêtent et leur potentiel membranaire revient à la normal. Cette observation est vraie également dans le cas de cellules cancéreuses, ayant la particularité de proliférer et de se reproduire de manière anarchique, le potentiel est maintenu à son niveau faible.

Origine des différentes contributions au potentiel total

Le potentiel électrique à travers une membrane biologique est une somme de trois potentiels différents provenant des divers éléments constituant la membrane [21, 22]

- *Le potentiel transmembranaire* est dû à une différence de concentrations en électrolytes de chaque côté de la membrane provenant d'une sélectivité dans les transports des ions dû aux pompes et aux canaux ioniques. Il est mesurable expérimentalement à l'aide d'électrodes positionnées de part et d'autre de la membrane
- *Le potentiel de surface* est créé par les charges des têtes polaires et les ions attirés en surface par ces dernières. Ce dernier décroît de manière exponentielle lorsque l'on s'éloigne de la surface.
- *Le potentiel dipolaire* provient de l'orientation des dipôles de certaines parties des lipides et des molécules présentes à l'interface, notamment des molécules d'eau. Ce dernier est l'objet de beaucoup d'attention car susceptible d'influencer plusieurs processus biologiques comme la perméabilité des molécules, l'activation de canaux ioniques ou les fonctions de protéines membranaires.

Les deux premières contributions ont été les premières à être identifiées. La contribution du potentiel dipolaire est arrivée plus tard avec Liberman et Topaly [23] en observant que le passage d'anions hydrophobes augmentait la conductivité électrique par 10^5 comparée à des cations hydrophobes. Pour expliquer le coefficient de partition des anions plus important que les cations, l'idée a été d'introduire la présence de charges

positives à l'intérieur de la membrane. Plus tard Haydon [24] attribua cette particularité aux dipôles des molécules d'eau présents à la surface de la membrane, s'orientant et apportant une contribution positive au potentiel transmembranaire. Cette déduction fut possible car les lipides utilisés ne présentaient aucune charge en surface, éliminant la contribution provenant du potentiel surfacique.

Les origines de ce potentiel proviennent de l'orientation des dipôles associés aux différents résidus constituant les lipides [25], comme les têtes polaires, ces dernières sont porteuses de charges, négatives et/ou positives, les glycérols esterifiés ou non assurant la liaison entre les queues lipidiques et les têtes polaires. Même si les atomes formant ces liaisons ne possèdent pas de charges électriques entières, ils possèdent néanmoins des électronégativités différentes et donc des charges partielles différentes et de signes opposés, formant ainsi un dipôle. À cela s'ajoute l'orientation des molécules d'eau à l'interface dû à la structuration induite par les têtes polaires. La contribution provenant de ces dernières est contrebalancée par le dipôle des molécules d'eau.

La contribution des queues lipidiques au potentiel dipolaire reste minoritaire. Peterson et Al. [26] ont étudié le changement dans le potentiel dipolaire Ψ_D induit par la mutation d'un atome de carbone en un atome de soufre à différentes positions dans la chaîne carbonée. L'introduction de ce genre de défaut, ou de singularité, dans les chaînes lipidiques conduit à une augmentation de la densité, induite par le regroupement des lipides dû au soufre et a été pris en compte lors de l'étude. Les membranes ainsi étudiées furent constituées de molécules de DPPC (1,2 - dipalmitylphosphatidylcholine) non-labélisées ou labélisées par un atome de soufre. Il en ressort que la contribution des chaînes lipidiques au potentiel dipolaire ne revêt qu'un aspect stérique. Un changement dans la densité de lipide induit naturellement un changement dans la densité de dipôle et donc du moment dipolaire. Aucune autre contribution provenant des groupements méthylènes n'a été confirmée.

Le potentiel électrostatique montre deux minima à l'interface de la membrane et une barrière à l'intérieur de la membrane. Un exemple est donné sur la figure 1.4.

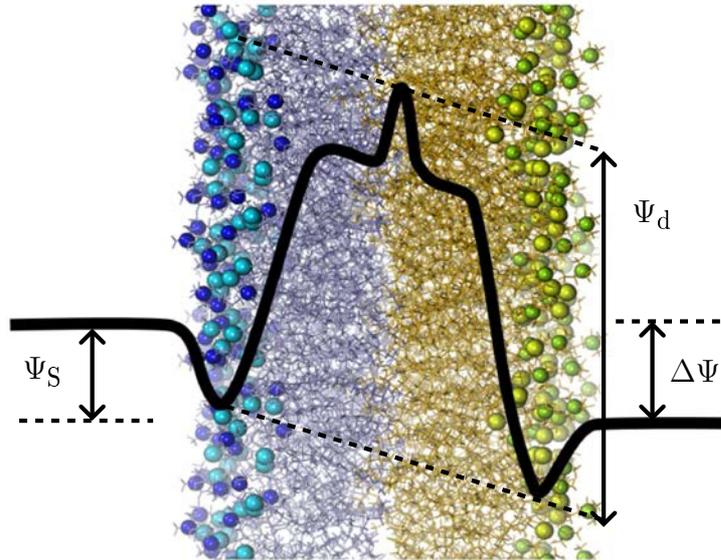


FIGURE 1.4 – Représentation du potentiel électrostatique associé à la membrane. Où $\Delta\Psi$ est le potentiel transmembranaire, Ψ_S est le potentiel de surface et Ψ_d est le potentiel dipolaire.

L'interaction de différentes molécules avec la membrane montre une variation dans le potentiel dipolaire. Une des molécules la plus étudiée est le cholestérol, présent en importante quantité dans les cellules eucaryotes, jusqu'à 30 % de la composition en lipides [27]. Généralement, lorsque du cholestérol est ajouté dans une membrane de phospholipides, le potentiel dipolaire est augmenté (jusqu'à 100 mV). Cette augmentation est principalement due à un changement au niveau des têtes polaires du taux d'hydratation, plus précisément dans la région des carbonyles et des interactions dipôle-dipôle entre les molécules de lipides et les molécules de cholestérol [28].

Importances physiologiques

Le potentiel dipolaire joue un rôle crucial dans les membranes biologiques, à titre d'exemple, l'amplitude du potentiel au centre de la membrane peut atteindre de 200 à 500 mV, le champ électrique ainsi généré atteignant $10^8 - 10^9 \text{ V.m}^{-1}$, bien supérieur au champ généré par un potentiel transmembranaire de 100 mV ($\approx 2.5 \times 10^7 \text{ V.m}^{-1}$) [29]. Cependant, l'intensité du potentiel dipolaire provient de la faible valeur de la constante diélectrique associée à la partie hydrophobe de la membrane et doit être relativisée lors de la présence de protéines membranaires pouvant avoir des cavités remplies d'eau, ces dernières possédant une constante diélectrique bien supérieure.

Du fait de son intensité, le potentiel dipolaire revêt un aspect important dans le cas du transfert d'ion ou de molécules polaires à travers la membrane et peut agir sur le passage de composés.

Certaines molécules possèdent la propriété de réduire le potentiel dipolaire. C'est le cas de la pregnanolone, un stéroïde utilisé comme anesthésiant [30]. Après ajout d'un composé diminuant le potentiel dipolaire, la perméabilité des molécules se voit également réduite, ce phénomène pouvant s'expliquer par l'interaction dipôle-dipôle entre la molécule perméante et sa membrane et les molécules d'eau associées.

De cette manière, il est possible d'affecter la perméabilité de la peau en traitant la surface de cette dernière par des composés faisant diminuer le dipôle membranaire, le transfert d'un anesthésique local est 3 à 5 fois plus efficace. Des résultats similaires ont été obtenues avec un antibiotique [31]. Cette diminution de potentiel serait due à un resserrement des lipides entre eux et par la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires entre les phosphates des têtes polaires et la molécule en question.

1.3 Influence du pH sur l'internalisation de peptides

Il a été depuis longtemps suggéré que la forme neutre des acides ou des bases faibles était capable de traverser les membranes de manière beaucoup plus efficace que la forme chargée. Ces études ont été conduites sur des membranes de globules rouge, de mitochondries, et des chloroplastes et ont montré une rapide accumulation de la forme neutre de divers acides carboxyliques et d'amines. Lorsque qu'un gradient de pH est appliqué [32], la perméation de la forme neutre induit un gradient transmembranaire de concentration de la base ou de l'acide faible.

Soit la concentration totale d'un acide et d'une base à l'intérieur et à l'extérieur du liposome

$$\begin{cases} \text{Pour l'acide} & \left\{ \begin{array}{l} [\text{AH}]_i^{\text{tot}} = [\text{AH}]_i + [\text{A}^-]_i \text{ à l'intérieur} \\ [\text{AH}]_o^{\text{tot}} = [\text{AH}]_o + [\text{A}^-]_o \text{ à l'extérieur} \end{array} \right. \\ \\ \text{Pour la base} & \left\{ \begin{array}{l} [\text{B}]_i^{\text{tot}} = [\text{BH}^+]_i + [\text{B}]_i \text{ à l'intérieur} \\ [\text{B}]_o^{\text{tot}} = [\text{BH}^+]_o + [\text{B}]_o \text{ à l'extérieur} \end{array} \right. \end{cases}$$

Dans le cas d'un liposome où le gradient de pH ne varie pas en fonction du temps, l'internalisation continue jusqu'à ce que les concentrations en composés à l'intérieur et l'extérieur deviennent égales $[A]_i = [A]_o$, où $[A]_o$ et $[A]_i$ sont les concentrations relatives à la forme neutre d'une molécule acide ou basique A à l'extérieur et l'intérieur du liposome, respectivement. La relation entre la constante de dissociation K_d à l'intérieur et l'extérieur $K_d(\text{int}) = K_d(\text{ext})$ permet de déduire

$$\frac{[\text{A}^-]_i}{[\text{A}^-]_o} = \frac{[\text{H}^+]_o}{[\text{H}^+]_i} \quad \text{et} \quad \frac{[\text{BH}^+]_i}{[\text{BH}^+]_o} = \frac{[\text{H}^+]_i}{[\text{H}^+]_o} \quad (1.5)$$

Il en suit qu'à l'équilibre, le gradient de concentration transmembranaire de l'espèce est corrélé au gradient de la concentration en proton. En exprimant cette dernière équation

en fonction du gradient de pH (ΔpH) grâce à la définition $\text{pH} = -\log_{10}(a_{\text{H}^+})$, où a_{H^+} est l'activité du proton, il vient

$$\frac{[\text{A}^-]_{\text{i}}}{[\text{A}^-]_{\text{o}}} = 10^{\text{pH}_{\text{i}} - \text{pH}_{\text{o}}} = 10^{\Delta\text{pH}} \quad \text{et} \quad \frac{[\text{BH}^+]_{\text{o}}}{[\text{BH}^+]_{\text{i}}} = 10^{\text{pH}_{\text{i}} - \text{pH}_{\text{o}}} = 10^{\Delta\text{pH}} \quad (1.6)$$

Ainsi, à l'équilibre, la concentration en espèce à l'intérieur du liposome comparée à la concentration à l'extérieur est la même que le gradient de concentration en proton. Un gradient de pH de 3 correspond à une concentration 1000 fois plus importante à l'intérieur de la vésicule comparé à l'extérieur.

La quantité d'espèces pouvant être accumulée à l'équilibre en réponse au gradient ΔpH est fortement dépendante de la capacité du tampon à l'intérieur du liposome à maintenir ce gradient, considérant que pour chaque molécule basique internalisée un proton H^+ va être absorbé, augmentant ainsi le pH intérieur et inversement pour des espèces acides. Des molécules possédant plusieurs pK_{a} correspondant à plusieurs groupes ionisables (comme le citrate) sont alors utilisées comme bain de proton pour contrebalancer l'absorption ou le relâchement de proton dans le milieu intérieur.

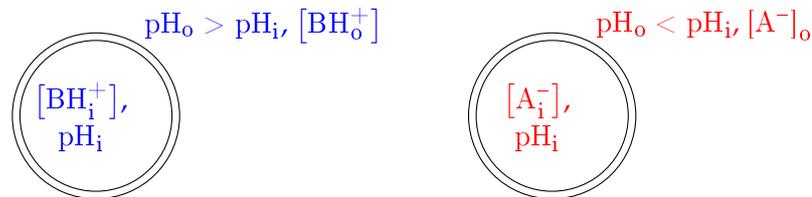


FIGURE 1.5 – Gradient de pH pour l'internalisation de molécules basiques (gauche, bleu) et de molécules acides (droite, rouge) dans des liposomes.

Il est à noter que la concentration en base faible à l'intérieur comparée à l'extérieur suit le gradient de concentration en protons tandis que la concentration en acide faible reflète l'opposé. À partir des relations précédentes, il apparaît, que dans le cas d'une

base, la concentration en proton dans le liposome doit être plus faible qu'à l'extérieur, $pH_i < pH_o$, pour pouvoir charger le liposome en espèce basique. De ce fait, dans le cas d'un acide, la relation est inversée $pH_i > pH_o$ (voir figure 1.5).

Certains composés pharmaceutiques ont un caractère lipophile et se retrouvent à l'interface de la membrane, pouvant augmenter sensiblement la concentration en molécules comparé au milieu aqueux. La constante de réaction associée à l'internalisation de la molécule augmente avec son coefficient de partition eau – membrane. Ce partitionnement à l'interface a pour effet d'augmenter l'accumulation de molécules à l'intérieur en réponse au gradient de pH. Un effet similaire est attendu dans le cas où le composé viendrait à précipiter après internalisation. Dans le cas de la doxorubicine, l'accumulation dans des liposomes géants unilamellaires en réponse à un ΔpH atteint des concentrations de 4M (14 mM dans le milieu extérieur des liposomes) bien supérieures à sa solubilité dans le milieu aqueux [33]. Dans ce cas, cette concentration anormalement élevée est due à un partitionnement des molécules à l'interface de la membrane augmentant le nombre de molécules internalisées au-delà des prédictions faites avec la présence du gradient de pH uniquement.

Les premières expériences montrant qu'un gradient de pH puisse exister, être maintenu et mesuré dans des liposomes ont été conduites par Deamer et Al. [34]. L'internalisation de molécule-sondes fluorescentes a permis d'observer l'accumulation de ces molécules à l'intérieur de petits liposomes unilamellaires constitués de phospholipides PC. Cette découverte fut suivie de plusieurs expériences utilisant des techniques expérimentales différentes conduisant aux mêmes observations [35, 36].

L'accumulation de médicaments à l'intérieur des liposomes donne des résultats thérapeutiques intéressants. Des souris possédant des tumeurs traitées avec la même molécule administrée de manière différente (injectée libre ou encapsulée dans des liposomes par un gradient de pH) ont montré de meilleurs taux de guérison dans le cas de médicaments encapsulés dans les liposomes [37]. Plusieurs autres composés pharma-

ceutiques ont put être internalisés dans des liposomes par la suite [38]. Cette évidence de l'internalisation de molécules à visées thérapeutiques permet d'ouvrir de nouvelles voies pour le traitement de cellules tumorales où ces zones sont caractérisées par un pH plus faible que les cellules saines.

1.4 Problématique

Le transport de molécules biologiquement actives à l'intérieur des cellules peut se révéler problématique, notamment à cause de la barrière représentée par la membrane. Une grande variété de stratégies a été développée afin de pouvoir transférer des molécules à visées thérapeutiques à travers la membrane cellulaire.

Ces méthodes peuvent inclure une action mécanique locale comme l'électroporation, la microinjection ou la sonication, ou alors utiliser la synergie entre différentes propriétés physico-chimiques de plusieurs molécules comme le greffage du produit actif à un transporteur pouvant traverser les membranes biologiques ou cibler un type de cellule particulière du fait des interactions spécifiques entre les propriétés de la membrane et celles de la molécule cargo, chacune de ces méthodes ayant leurs avantages et leurs inconvénients.

Bien que de nombreuses méthodes existent d'ores et déjà pour transférer un composé actif, le diagnostic et le traitement des maladies suscitent toujours la recherche de nouvelles technologies pour le transport et la délivrance de médicaments. Différentes voies sont actuellement empruntées dans la recherche et le développement de molécules thérapeutiques

- *La thérapie ciblée* - le vecteur ou la molécule thérapeutique est conçue dans l'objectif de se concentrer sur la zone à traiter et limiter la dispersion dans l'organisme et l'accumulation dans les tissus sains.
- *L'amélioration du transport* - l'isolement dans des liposomes ou le greffage du prin-

cipe actif sur des nanostructures pour améliorer sa stabilité et ses propriétés pharmacocinétiques.

- *L'activation locale* - la molécule thérapeutique est activée à distance une fois arrivée sur la cible par une excitation électromagnétique ou chimique.
- *La synergie* - différentes molécules sont associées ensemble afin de tirer partie de leur spécificité (imagerie + traitement)

Ces différentes voies de recherche ont permis d'établir une vaste collection de peptides et de molécules organiques capables de franchir la membrane cellulaire, qu'elle soit d'origine naturelle ou purement synthétique. La manière dont ces molécules sont capable de traverser la membrane est dépendante de leur structure et de leurs propriétés physico-chimiques. Elles peuvent déstabiliser la membrane en créant des pores au sein de cette dernière [39], utiliser les mécanismes naturelles de la cellule [40] (par exemple l'endocytose) ou encore perturber localement la matrice lipidique pour passer à travers et se retrouver dans le cytoplasme ou une combinaison de ces approches [41].

Parmi les possibilités existantes pour ces molécules de passer à l'intérieur d'une cellule, une hypothèse émise est de considérer une déprotonation des sites titrables, c'est à dire des fonctions pouvant changées leur état de protonation, à leur arrivé au niveau de l'interface de la membrane [42, 43, 44]. Un exemple de ces molécules est donné sur la figure 1.6.

L'état de protonation d'une molécule est sensible à son environnement. L'étude des acides aminés titrables dans les protéines offre d'ailleurs des exemples types de l'importance de leur état de protonation et de leur influence sur la conformation et le fonctionnement des protéines [45, 46, 47]. La même problématique se pose donc pour des molécules ayant des fonctions pouvant changer leur état de protonation et traversant les différents environnements offert par une bicouche lipidique. La question se pose donc de savoir si l'état de protonation peut être modulé par la membrane biologique, ses propriétés pouvant être changées en modifiant la composition en lipide de la mem-

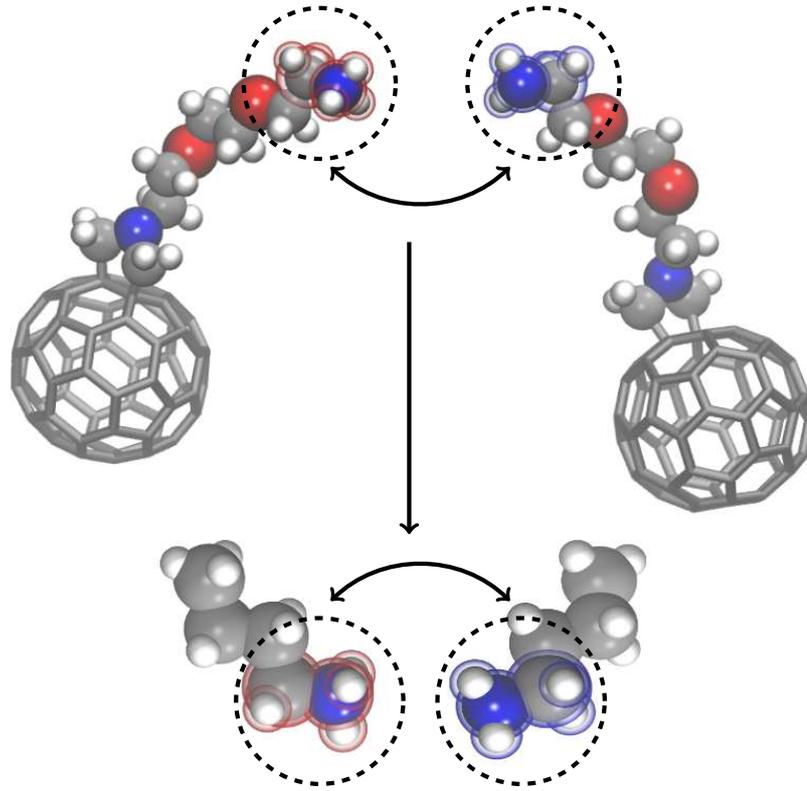


FIGURE 1.6 – Fullerène fonctionnalisé par un peptide titrable, cette macromolécule a montré des propriétés pharmaceutiques et est capable d’être internalisée dans les cellules. À gauche, forme protonée (rouge) et à droite forme déprotonée (bleue). Les molécules de de butylamine, analogue d’une lysine, représente une simplification des fonctionnelles reliées au fullerène. Le pK_a de ces molécules étant connu, il peut être utilisé comme approximation pour celui de molécules plus complexes.

brane. Cette hypothèse sera au cœur des investigations conduites durant cette thèse.

Bibliographie

- [1] C. R. Woese and G. E. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 :5088–5090, 1977.
- [2] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis. Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 :4576–4579, 1990.
- [3] A. Pohorille and D. Deamer. Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Res. Microbiol.*, 160 :449–456, 2009.
- [4] A. Jacquemet, J. Barbeau, L. Lemiègre, and T. Benvegnu. Archaeal tetraether bipolar lipids : Structures, functions and applications. *Biochimie*, 91 :711–717, 2009.
- [5] D. Chandler. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, 437 :640–647, 2005.
- [6] J. N. Israelachvili and D. J. Mitchell. A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 389 :13–19, 1975.
- [7] P. Natarajan, J. Wang, Z. Hua, and T. R. Graham. Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :10614–10619, 2004.

- [8] R. F. A. Zwaal, P. Comfurius, and E. M. Bevers. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 :971–988, 2005.
- [9] H. Zhao, A. Jutila, T. Nurminen, S. A. Wickström, J. Keski-Oja, and P. K. J. Kinnunen. Binding of endostatin to phosphatidylserine-containing membranes and formation of amyloid-like fibers. *Biochemistry*, 44 :2857–2863, 2005.
- [10] N. Dan and S. A. Safran. Effect of lipid characteristics on the structure of transmembrane proteins. *Biophys. J.*, 75 :1410–1414, 1998.
- [11] D. Marsh. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys. J.*, 93 :3884–3899, 2007.
- [12] T. K. M. Nyholm, S. Özdirekcan, and J. A. Killian. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry*, 46 :1457–1465, 2007.
- [13] S. J. Marrink, R. M. Sok, and H. J. C. Berendsen. Free volume properties of a simulated lipid membrane. *J. Chem. Phys.*, 104 :9090–9099, 1996.
- [14] E. Falck, M. Patra, M. Karttunen, M. T. Hyvönen, and I. Vattulainen. Lessons of slicing membranes : Interplay of packing, free area, and lateral diffusion in Phospholipid/Cholesterol bilayers. *Biophys. J.*, 87 :1076–1091, 2004.
- [15] H. Saito and W. Shinoda. Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers : A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B*, 115 :15241–15250, 2011.
- [16] S. -J. Marrink and H. J. C. Berendsen. Simulation of water transport through a lipid membrane. *J. Phys. Chem.*, 98 :4155–4168, 1994.
- [17] L. R. Pratt and A. Pohorille. Theory of hydrophobicity : Transient cavities in molecular liquids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :2995–2999, 1992.
- [18] D. Bemporad, C. Luttmann, and J. W. Essex. 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 :1–13, 2004.
- [19] H. Meyer. Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 42 :109–118, 1899.
- [20] E. Overton. *Studien über die Narcose Zugleich ein Reitrage zur allgemeinen Pharmakologie ...* G. Fischer, Jena, 1901.
- [21] B. H. Honig, W. L. Hubbell, and R. F. Flewelling. Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 15 :163–193, 1986.
- [22] S. McLaughlin. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18 :113–136, 1989.
- [23] E. A. Liberman and V. P. Topaly. Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions. *Biofizika*, 14 :452–461, 1969.
- [24] S. B. Hladky and D. A. Haydon. Membrane conductance and surface potential. *Bba - Biomemb.*, 318 :464–468, 1973.
- [25] K. Gawrisch, D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, R.P. Rand, and N. Fuller. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.*, 61 :1213–1223, 1992.
- [26] U. Peterson, D. A. Mannoock, R. N. A. H. Lewis, P. Pohl, R. N. McElhaney, and E. E. Pohl. Origin of membrane dipole potential : Contribution of the phospholipid fatty acid chains. *Chem. Phys. Lipids*, 117 :19–27, 2002.
- [27] W. Dowhan. Functional roles of lipids in membranes. In Gordon C. K. Roberts, editor, *Encyclopedia of Biophysics*, 868–875. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [28] T. Starke-Peterkovic, N. Turner, M. F. Vitha, M. P. Waller, D. E. Hibbs, and R. J. Clarke. Cholesterol effect on the dipole potential of lipid membranes. *Biophys. J.*, 90 :4060–4070, 2006.

- [29] L. Wang. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annu. Rev. Biochem.*, 81 :615–635, 2012.
- [30] J. -M. I. Alakoskela, T. Söderlund, J. M. Holopainen, and P. K. J. Kinnunen. Dipole potential and head-group spacing are determinants for the membrane partitioning of pregnanolone. *Mol. Pharmacol.*, 66 :161–168, 2004.
- [31] F. Lairion and E. A. Disalvo. Effect of phloretin on the dipole potential of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylglycerol monolayers. *Langmuir*, 20 :9151–9155, 2004.
- [32] P. R. Cullis, M. J. Hope, M. B. Bally, T. D. Madden, L. D. Mayer, and D. B. Fenske. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Bba - Rev. Biomemb.*, 1331 :187–211, 1997.
- [33] P. R. Harrigan, K. F. Wong, T. E. Redelmeier, J. J. Wheeler, and P. R. Cullis. Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, 1149 :329–338, 1993.
- [34] D. W. Deamer, R. C. Prince, and A. R. Crofts. The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 274 :323–335, 1972.
- [35] D. S. Cafiso and W. L. Hubbell. Estimation of transmembrane pH gradients from phase equilibria of spin-labeled amines. *Biochemistry*, 17 :3871–3877, 1978.
- [36] T. E. Redelmeier, L. D. Mayer, K. F. Wong, M. B. Bally, and P. R. Cullis. Proton flux in large unilamellar vesicles in response to membrane potentials and pH gradients. *Biophys. J.*, 56 :385–393, 1989.
- [37] N. L. Boman, M. B. Bally, P. R. Cullis, L. D. Mayer, and M. S. Webb. Encapsulation

-
- of vincristine in liposomes reduces its toxicity and improves its anti-tumor efficacy. *J. Liposome Res.*, 5 :523–541, 1995.
- [38] T. D. Madden, P. R. Harrigan, L. C. Tai, M. B. Bally, L. D. Mayer, T. E. Redelmeier, H. C. Loughrey, C. P. Tilcock, L. W. Reinish, and P. R. Cullis. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient : A survey. *Chem. Phys. Lipids*, 53 :37–46, 1990.
- [39] V. Teixeira, M. J. Feio, and M. Bastos. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.*, 51 :149–177, 2012.
- [40] M. A. Munoz-Morris, F. Heitz, G. Divita, and M. C. Morris. The peptide carrier pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355 :877–882, 2007.
- [41] P. Säälük, A. Elmquist, M. Hansen, K. Padari, K. Saar, K. Viht, U. Langel and M. Pooga. Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. a comparative study. *Bioconjugate Chem.*, 15 :1246–1253, 2004.
- [42] O. A. Andreev, D. M. Engelman, and Y. K. Reshetnyak. Targeting acidic diseased tissue : New technology based on use of the pH (low) insertion peptide (pHLIP). *Chim. Oggi*, 27 :34–37, 2009.
- [43] S. Kraszewski, M. Tarek, and C. Ramseyer. Uptake and translocation mechanisms of cationic amino derivatives functionalized on pristine C60 by lipid membranes : A molecular dynamics simulation study. *ACS Nano*, 5 :8571–8578, 2011.
- [44] A. Montellano, T. Da Ros, A. Bianco, and M. Prato. Fullerene C60 as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*, 3 :4035–4041, 2011.
- [45] M. J. Harms, J. L. Schlessman, M. S. Chimenti, G. R. Sue, A. Damjanović, and B. García-Moreno. A buried lysine that titrates with a normal pKa : Role of conformational flexibility at the protein–water interface as a determinant of pKa values. *Protein Sci.*, 17 :833–845, 2008.

- [46] M. J. Harms, C. A. Castañeda, J. L. Schlessman, G. R. Sue, D. G. Isom, B. R. Cannon, and B. García-Moreno. The pKa values of acidic and basic residues buried at the same internal location in a protein are governed by different factors. *J. Mol. Biol.*, 389 :34–47, 2009.
- [47] A. Warshel and A. Dryga. Simulating electrostatic energies in proteins : Perspectives and some recent studies of pKas, redox, and other crucial functional properties. *Proteins*, 79 :3469–3484, 2011.
- [48] S. G. Itoh, A. Damjanović, and B. R. Brooks. pH replica-exchange method based on discrete protonation states. *Proteins*, 79 :3420–3436, 2011.
- [49] J. Mongan, D. A. Case, and J. A. McCammon. Constant pH molecular dynamics in generalized born implicit solvent. *J. Comput. Chem.*, 25 :2038–2048, 2004.
- [50] R. Burgi, P. A. Kollman, and W. F. Van Gunsteren. Simulating proteins at constant pH : An approach combining molecular dynamics and monte carlo simulation. *Proteins*, 47 :469–480, 2002.
- [51] A. M. Baptista, V. H. Teixeira, and C. M. Soares. Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *J. Chem. Phys.*, 117 :4184–4200, 2002.
- [52] U. Borjesson and P. H. Hunenberger. pH-Dependent stability of a decalysine alpha-helix studied by explicit-solvent molecular dynamics simulations at constant pH. *J. Phys. Chem. B*, 108 :13551–13559, 2004.
- [53] A. Onufriev, D. A. Case, and G. M. Ullmann. A novel view of pH titration in biomolecules. *Biochemistry*, 40 :3413–3419, 2001.
- [54] W. Chu, Y. Wu, J. Zhang, Q.-C. Zheng, L. Chen, Q. Xue, and H.-X. Zhang. Constant pH molecular dynamics (CpHMD) and mutation studies : Insights into AegOBP1 pH-induced ligand releasing mechanism. *Bba - Proteins Proteom.*, 1824 :913–918, 2012.

-
- [55] K. Bhattacharya, F. T. Andon, R. El-Sayed, and B. Fadeel. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity : Focus on pulmonary inflammation. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, doi : 10.1016/j.addr.2013.05.012, 2013.
- [56] A. Ben-Shimon, D. E. Shalev, and M. Y. Niv. Protonation states in molecular dynamics simulations of peptide folding and binding. *Curr. Pharm. Des.*, 19 :4173–4181, 2013.
- [57] B. H. Morrow, P. H. Koenig, and J. K. Shen. Atomistic simulations of pH-dependent self-assembly of micelle and bilayer from fatty acids. *J. Chem. Phys.*, 137 :194902–194908, 2012.
- [58] W. Bennett, A. Chen, S. Donnini, G. Groenhof, and P. Tieleman. Constant pH simulations with the coarse-grained MARTINI model : Application to oleic acid aggregates. *Can. J. Chem.*, doi : 10.1139/cjc-2013-0010, 2013.
- [59] M.P. Allen and D.J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, USA, 1989.
- [60] T. B. Woolf and B. Roux. Conformational flexibility of o-phosphorylcholine and o-phosphorylethanolamine : A molecular dynamics study of solvation effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 :5916–5926, 1994.
- [61] G. Hummer. Position-dependent diffusion coefficients and free energies from bayesian analysis of equilibrium and replica molecular dynamics simulations. *New J. Phys.*, 7 :34–48, 2005.
- [62] E. Overton. *Studien über die Narcose Zugleich ein Reitrage zur allgemeinen Pharmakologie ...* G. Fischer, 1901.
- [63] H. Meyer. Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Arch. Exp. Path. Pharm.*, 42 :109–118, 1899.
- [64] S. J. Marrink and H. J. C. Berendsen. Simulation of water transport through a lipid membrane. *J. Phys. Chem.*, 98 :4155–4168, 1994.

- [65] A. Missner and P. Pohl. 110 years of the meyer-overton rule : predicting membrane permeability of gases and other small compounds. *Chemphyschem*, 10 :1405–1414, 2009.
- [66] D. Bassolino-Klimas, H. E. Alper, and T. R. Stouch. Solute diffusion in lipid bilayer membranes : An atomic level study by molecular dynamics simulation. *Biochemistry*, 32 :12624–12637, 1993.
- [67] D. Bemporad, C. Luttmann, and J. W. Essex. 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 :1–13, 2004.
- [68] A. V. Thomae, T. Koch, C. Panse, H. Wunderli-Allenspach, and S. D. Krämer. Comparing the lipid membrane affinity and permeation of drug-like acids : The intriguing effects of cholesterol and charged lipids. *Pharm. Res.*, 24 :1457–1472, 2007.
- [69] J. de Gier, J. G. Mandersloot, and L. L. van Deenen. Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 150 :666–675, 1968.
- [70] M. C. Blok, E. C. van der Neut-Kok, L. L. van Deenen, and J. de Gier. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 406 :187–196, 1975.
- [71] J. Gier, L. L. M. Deenen, and K. G. Senden. Glycerol permeability of erythrocytes. *Experientia*, 22 :20–21, 1966.
- [72] A. Szabo, K. Schulten, and Z. Schulten. First passage time approach to diffusion controlled reactions. *J. Chem. Phys.*, 72 :4350, 1980.
- [73] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7 :284–304, 1940.
- [74] H. Wang, C. S. Peskin, and T. C. Elston. A robust numerical algorithm for studying biomolecular transport processes. *J. Theor. Biol.*, 221 :491–511, 2003.

Chapitre 2

Méthodes numériques

Sommaire

2.1	La Dynamique moléculaire	36
2.1.1	Concept	36
2.1.2	Conditions aux limites périodiques	40
2.1.3	Champs de force	40
2.1.4	Traitement des interactions à courtes et longues portées	42
2.1.5	Intégration et pas de temps	45
2.1.6	Dynamique moléculaire dans différents ensembles	47
2.2	Calculs d'énergie libre	53
2.2.1	Rappels de physique statistique	53
2.2.2	Transformation alchimique	56
2.2.3	Force de biais adaptative - Adaptive Biasing Force (ABF)	64
2.2.4	Métadynamique	70
2.2.5	Méthodes adiabatiques et dérivées	71
2.3	Estimation du pK_a dans les simulations	80
2.4	Cinétique	83
2.4.1	Diffusion	83
2.4.2	Perméabilité	85

Ce chapitre est dédié aux techniques utilisées au cours de cette thèse pour étudier le transfert d'espèces titrables à travers des membranes biologiques. La première partie de ce chapitre se focalisera sur la dynamique moléculaire, méthode numérique de choix pour modéliser des systèmes en phase condensée à l'échelle moléculaire. Une deuxième partie permettra de traiter les méthodes utilisées dans le but d'estimer l'énergie libre, grandeur thermodynamique importante pour l'étude des systèmes biologiques, lors d'une simulation de dynamique moléculaire. Au cours de cette partie, chaque méthode sera illustré par un exemple de calcul. La troisième partie explicitera l'estimation du pK_a afin de connaître la proportion d'espèces neutres par rapport à la proportion d'espèces chargées. La quatrième et dernière partie présentera les méthodes pour estimer les constantes cinétiques afin d'étudier la rapidité du transfert.

2.1 La Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire permet « d'observer » des systèmes à l'échelle moléculaire par le biais de simulations numériques. Dans cette partie, le principe de base sera exposé suivit de notions plus spécifiques comme le champs de force, les ensembles thermodynamiques...

2.1.1 Concept

La dynamique moléculaire est une technique de simulation utilisée pour générer des configurations successives d'un système dans le temps en intégrant les équations classiques du mouvement. Le résultat de cette simulation est appelé une trajectoire, où les positions des atomes et leurs vitesses sont enregistrées en fonction du temps. Cette trajectoire, en physique statistique, correspond à un échantillonnage dans l'espace des phases du système simulé et permet ensuite d'en déduire des grandeurs thermody-

namiques et d'autres propriétés relatives au système (diffusion, densité...). Cette technique est particulièrement adaptée lorsque l'on souhaite simuler le comportement à l'échelle moléculaire d'un système (organique ou inorganique) tant que les effets quantiques du système ne deviennent pas prépondérants.

La dynamique moléculaire se réfère au deuxième principe de Newton, qui est le principe fondamentale de la dynamique

$$\frac{d\mathbf{p}}{dt} = m \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{f}(\mathbf{r}) \quad (2.1)$$

Cette équation décrit le mouvement d'une particule de masse m le long d'une coordonnée r soumise à une force f . Dans une simulation de dynamique moléculaire ces forces sont dérivées d'un potentiel. Ce dernier est décrit par un champ de force regroupant un ensemble de paramètres et de fonctions permettant de définir l'énergie d'un système en fonction de la position des particules. La définition de l'énergie potentielle peut être formulée de nombreuses façons. Une description plus détaillée sera faite plus loin dans ce chapitre.

Les premières expériences de simulation de dynamique moléculaire remontent à 1957 avec la simulation d'un système en phase condensée constituée de boules rigides [1]. Les vitesses des particules étaient constantes et la seule force introduite dans le système dérivait d'un potentiel de sphère dure, les particules subissaient une collision élastique lorsque ces-dernières se rencontraient, correspondant à un potentiel infini lorsque la distance par rapport aux centres entre les deux sphères était égale au diamètre.

Cette première simulation contenait 32 particules et durait le temps de 200 000 collisions. À la date de rédaction de cette thèse, l'état de l'art des simulations comprend des systèmes contenant plusieurs millions d'atomes sur des échelles de temps allant jusqu'à la ms [2].

Un algorithme de dynamique moléculaire est structuré de la manière suivante. Tous

les paramètres définissant les conditions dans lesquelles la dynamique aura lieu sont d'abord donnés en début de simulation, comme la température, le pas de temps d'intégration, la durée de la simulation. . . La simulation s'initialise alors en donnant les positions initiales des atomes, définissant la configuration du système au temps t_0 , ainsi que les vitesses initiales, v_0 de chaque atome. L'étape suivante consiste à calculer les forces agissantes sur chaque atome en utilisant l'énergie potentielle décrite par le champ de force. Viens ensuite la résolution des équations du mouvement : connaissant les positions, les vitesses et les forces au temps t , les positions et vitesses des atomes sont calculées au temps suivant puis les forces sont de nouveau évaluées. Cette dernière étape est répétée autant de fois que nécessaire pour calculer la trajectoire sur le temps de simulation désiré.

Une simulation est habituellement conduite sur un échantillon de taille macroscopique contenant un grand nombre de particules, N , et de ce fait possédant un espace des phases particulièrement étendu. En mécanique statistique, les moyennes correspondant à des observables expérimentales sont définies en terme de moyennes d'ensemble. Une moyenne d'ensemble d'une observable A correspond à une moyenne faite sur un grand nombre de conformations du système et est définie comme

$$\langle A \rangle_{\text{ensemble}} = \int \int dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N) \quad (2.2)$$

où l'intégration est faite sur l'ensemble des positions r et des impulsions p et avec ρ , la densité de probabilité. Cette intégrale est généralement extrêmement difficile à calculer car elle nécessite la connaissance de tous les états du système. Lors d'une simulation de dynamique moléculaire, les points de cette ensemble sont estimés de manière séquentielle dans le temps. Une simulation devrait donc en principe passer par tout les états relatifs au système simulé moyennant un temps de calcul suffisamment long.

Une autre possibilité pour estimer la moyenne d'un ensemble est de faire une moy-

enne temporelle, plus courante en dynamique moléculaire. De cette manière, la moyenne d'une observable est donnée par

$$\langle A \rangle_{\text{temporelle}} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t)) dt \approx \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M A_i(p^N, r^N) \quad (2.3)$$

où t est le temps de simulation, M est le nombre de pas de temps dans la simulation et $A(p^N(t), r^N(t))$ est la valeur instantanée de A . Un problème apparaît cependant, lors d'une expérience « classique » en laboratoire, la moyenne de l'observable obtenue correspond à une moyenne d'ensemble tandis que celle obtenue lors d'une expérience de dynamique moléculaire correspond à une moyenne temporelle. La solution à ce problème provient d'une hypothèse fondamentale en mécanique statistique, *l'hypothèse ergodique*. Cette dernière permet d'avancer que la moyenne temporelle d'une observable est égale à une moyenne d'ensemble

$$\langle A \rangle_{\text{temporelle}} = \langle A \rangle_{\text{ensemble}} \quad (2.4)$$

Sur un temps infini, un système évoluant librement aura échantillonné la totalité de ses états. Le but d'une simulation de dynamique moléculaire est de générer assez de conformations représentatives d'un système de manière à pouvoir justifier que ce principe est bien respecté. Si tel est le cas, les informations obtenues par l'expérience concernant la structure, la dynamique ou les propriétés thermodynamiques peuvent être également obtenues via des simulations en supposant que suffisamment de temps y soit accordé. Comme les simulations ont une durée déterminée, il est nécessaire de s'assurer d'avoir échantillonné une quantité suffisamment représentative de conformations de l'espace des phases.

2.1.2 Conditions aux limites périodiques

La taille des systèmes simulés est finie et limitée au mieux à quelques dizaines de millions d'atomes pour les plus grosses simulations. Pour s'affranchir des effets de bords et pouvoir calculer des grandeurs macroscopiques à partir d'un nombre limité d'atomes, des conditions aux limites périodiques sont utilisées lors des simulations. Elles permettent de simuler un nombre restreint d'atomes comme si ces derniers se trouvaient dans un matériau de volume infini. Considérons le cas simple d'une boîte de simulation cubique, celle-ci sera entourée de 26 répliques constituant ses plus proches voisins. Quand une particule quitte la boîte de simulation initiale elle est remplacée par une image de celle-ci entrant du côté opposé, le nombre de particules restant constant au cours de la simulation.

2.1.3 Champs de force

Les propriétés physico-chimiques des molécules sont liées à la répartition des électrons autour du noyau. Ces derniers étant des particules obéissant aux lois de la mécanique quantique, l'équation de Schrödinger pour chaque électron devrait en théorie être résolue. Cependant, il est impossible, du moins à l'heure actuelle, de pouvoir traiter quantiquement les électrons des atomes dans des systèmes de la taille de ceux utilisés en dynamique moléculaire et sur les échelles de temps correspondant.

Pour cette raison, les champs de force sont utilisés en mécanique moléculaire afin de décrire les interactions entre les particules présentes dans la boîte de simulation [3, 4] où les atomes sont représentés par des sphères indéformables. Dans le cas d'un système de N particules en interactions, l'énergie potentielle s'écrit

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_i V_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} V_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} V_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) \quad (2.5)$$

Où $V_1(\mathbf{r}_i)$ représente le potentiel intramoléculaire, $V_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$ le potentiel d'interaction

entre deux particules et les termes d'ordres supérieurs correspondent à la polarisation et à la création de multipôles induit par d'autres multipôles. Généralement, toutes ces interactions sont simplifiées par un potentiel d'interaction effectif entre deux particules. L'énergie potentielle peut prendre alors la forme suivante [5, 6]

$$V(\mathbf{r}^N) \simeq \sum_i V_1(\mathbf{r}_i) + \sum_{i < j} V'_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) \quad (2.6)$$

où V_1 représente le potentiel intramoléculaire et V'_2 le potentiel intermoléculaire effectif pour un système composé de N particules. Les contributions à l'énergie potentielle sont donc séparées en deux sous parties. D'un côté les interactions intramoléculaires (ou terme liés) décrivant les interactions entre les atomes liés chimiquement (V_1) et les interactions intermoléculaires décrivant les interactions à courtes et longues portées (V'_2). À partir de cette approximation, différentes fonctions peuvent être utilisées pour décrire l'énergie potentielle dans le système. Le champs de force utilisé pour les travaux au cours de cette thèse prend la forme suivante [7]

$$\begin{aligned} V(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{liaisons}} k_{l_i} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} k_{\theta_i} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{diedre}} A_n \sum_n (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ & + \sum_{\text{impropre}} k_{\xi_i} (\xi_i - \xi_{i,0})^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \end{aligned} \quad (2.7)$$

Le premier terme décrit la liaison entre deux atomes par un modèle d'oscillateur harmonique où $l_{i,0}$ représente la longueur de cette liaison à l'équilibre et k_{l_i} la constante de force de ce ressort dont les valeurs sont issues de l'expérience et caractérisant la liaison. Il en est de même pour le terme suivant qui décrit l'angle entre deux liaisons par un modèle harmonique où $\theta_{i,0}$ et k_{θ_i} sont des paramètres et représentent respectivement l'angle à l'équilibre et sa rigidité. Le terme en cosinus décrit les variations de l'énergie lorsque la molécule subit une rotation autour d'une de ses liaisons. L'entier

n correspond à la multiplicité et permet de reproduire le plus correctement possible le changement de conformations dans les molécules. Le terme de phase, γ , détermine où l'angle de torsion passe par son minimum. Le quatrième terme décrit les angles de torsions impropres, ce sont les déformations hors du plan où ξ représente l'angle entre le plan formé par trois atomes dont un lié avec un quatrième atome hors du plan (géométrie sp^2) et permet de maintenir 4 atomes dans un plan. Le dernier terme avec la double sommation correspond aux interactions non-liées, dans ce cas les interactions électrostatiques et de Van der Waals. Cette sommation se fait sur des paires d'atomes entre un atome i avec ses atomes voisins j . Les interactions électrostatiques sont décrites par la loi de Coulomb tandis que les interactions de dispersion-répulsion peuvent être décrites à l'aide d'un potentiel de Lennard-Jones.

2.1.4 Traitement des interactions à courtes et longues portées

Le calcul des interactions provenant du nombre de paires d'atomes non-liées est l'étape nécessitant le plus de temps. Ce nombre est une fonction quadratique du nombre de particules présentes dans la simulation, $N(N - 1)/2$. Ces interactions devraient être en principe évaluées pour toutes les paires d'atomes présentes dans la simulation. En pratique, il est possible de limiter le nombre d'interactions à calculer.

Pour ce faire, on introduit *un rayon de coupure*, où au-delà d'une certaine distance, le potentiel n'est plus calculé et seulement les atomes se trouvant dans la sphère de ce rayon sont prises en compte au mieux une fois (*convention de l'image minimum*), y compris ceux se trouvant dans les boîtes périodiques. Pour cette raison, le rayon de coupure ne doit pas être trop grand afin de ne pas prendre en compte deux fois le même atome limitant la distance à la moitié de la taille de la boîte au maximum.

L'utilisation du rayon de coupure conduit néanmoins à certains inconvénients, notamment l'introduction d'une discontinuité dans le potentiel et dans la force pouvant conduire à des instabilités lors de la simulation. Afin de remédier à ce problème, il ex-

iste différentes solutions possibles comme la modification du potentiel de manière à ce que les interactions soit nulles une fois la distance de coupure atteinte ou faire diminuer le potentiel à partir d'une distance définie, inférieure au rayon de coupure. Le potentiel garde sa valeur telle qu'initialement paramétrée dans le champs de force, une fois le premier rayon de coupure atteint, il est atténué jusqu'au deuxième rayon de coupure où sa valeur est 0.

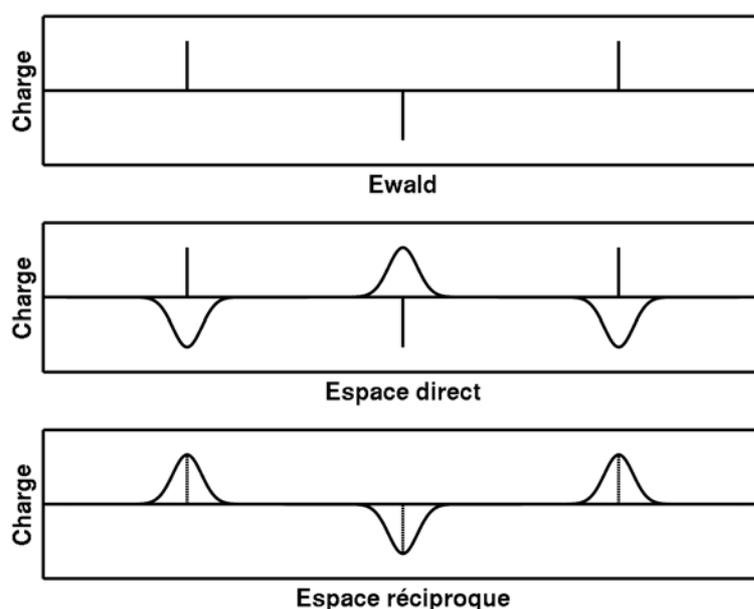


FIGURE 2.1 – Représentation schématique de la méthode d'Ewald avec des charges ponctuelles représentées dans une dimension. Haut : Résultat de la sommation. Milieu : Sommation dans l'espace directe où les charges ponctuelles sont écrantées par des distributions gaussiennes de signes opposés. Bas : Distributions gaussiennes de charges pour contrebalancer les gaussiennes introduites dans l'espace direct [10].

Ces méthodes se révèlent être insuffisantes pour traiter les interactions électrostatiques en r^{-1} qui sont à plus longues portées. Pour la simulation de système biologique, la méthode de la sommation d'Ewald est considérée comme étant correcte pour les interactions électrostatiques longues portées [69]. La variante de cette méthode, «Particle Mesh Ewald» [9], est plus souvent utilisée. Soit la contribution électrostatique à l'énergie

ergie potentielle du système avec les conditions périodiques aux limites

$$V_{\text{Coulomb}} = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij,\mathbf{n}}} \quad (2.8)$$

Où $r_{ij,\mathbf{n}}$ est la distance entre un atome dans la boîte de simulation et un atome dans une des répliques de la boîte, $r_{ij,\mathbf{n}} = |r_i - r_j + \mathbf{n}L|$, L est la dimension de la boîte supposée cubique et \mathbf{n} les vecteurs traduisant la périodicité du réseau. Cette somme ne converge que sous certaines conditions. L'idée d'Ewald a été de diviser cette sommation en deux parties, une dans l'espace réel et l'autre dans l'espace réciproque

$$\sum_{\mathbf{n}} \frac{1}{|\mathbf{n}|} F(\mathbf{n}) + \sum_{\mathbf{m}} \frac{1}{|\mathbf{m}|} (1 - F(\mathbf{m})) \quad (2.9)$$

Où \mathbf{n} et \mathbf{m} sont, respectivement, les vecteurs du réseau réel et du réseau réciproque. Ces deux séries convergent rapidement car pour $\mathbf{n} \rightarrow \infty$, la fonction $F(\mathbf{n})$ décroît rapidement et la somme converge donc rapidement. Pour le second terme, c'est la transformée de Fourier qui décroît rapidement. Dans cette formulation, toute charge ponctuelle est entourée par une distribution de charge sous forme de gaussienne correspondant à une charge équivalente mais de signe opposée (figure 2.1)

$$\rho_i(\mathbf{r}) = q_i \alpha^3 \exp(-\alpha^2 \mathbf{r}^2) / \sqrt{\pi^3} \quad (2.10)$$

Où α est un paramètre déterminant la largeur de la distribution et \mathbf{r} est la position du centre de cette distribution. Cette dernière va écranter les interactions avec les charges ponctuelles avoisinantes les réduisant à des interactions courtes portées. La somme, portant sur l'ensemble des charges du système, dans l'espace réel va de ce fait converger rapidement. Une seconde distribution gaussienne, correspondant à la même charge initiale et de même signe est introduite pour chaque charge ponctuelle afin de contrebalancer celles introduites auparavant. Il s'agit de la somme faite dans l'espace

réci-proque qui utilise des transformations de Fourier pour résoudre l'équation de Poisson [10] comme indiqué sur la figure 2.1.

2.1.5 Intégration et pas de temps

L'énergie potentielle est fonction de la position ($3N$) de tous les atomes du système. Compte tenu de la complexité de cette fonction, les équations du mouvement doivent être résolues numériquement. Il existe de nombreux algorithmes afin d'intégrer ces équations comme l'algorithme de Verlet, l'algorithme *leap-frog* ou encore l'algorithme *velocity Verlet*. Le choix de l'un de ces algorithmes est basé sur différents critères comme la conservation du moment et de l'énergie, l'efficacité et le pas de temps d'intégration.

D'une manière générale, les intégrateurs se basent sur un développement en série de Taylor de la position, de la vitesse et de l'accélération

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^3)\dots \quad (2.11)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \mathbf{a}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{b}(t)\delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^3)\dots \quad (2.12)$$

$$\mathbf{a}(t + \delta t) = \mathbf{a}(t) + \mathbf{b}(t)\delta t + \mathcal{O}(\delta t^3)\dots \quad (2.13)$$

où \mathbf{r} est la position, \mathbf{v} est la vitesse et \mathbf{a} est l'accélération...

Pour obtenir l'algorithme de Verlet, le développement en série à l'ordre 2 des positions s'écrit

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^3) \quad (2.14)$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^3) \quad (2.15)$$

En additionnant ces deux équations, on obtient

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \mathbf{a}(t)\delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^3) \quad (2.16)$$

Cette algorithmme utilise les positions et les accélérations au temps t et les positions au temps $t - \delta t$ pour calculer les nouvelles positions au temps $t + \delta t$ et de ce fait n'utilise pas explicitement les vitesses. Il est relativement simple à implémenter et ne consomme pas beaucoup de ressources informatiques, sa précision reste néanmoins modérée.

Dans l'algorithme de *leap-frog*, la vitesse est d'abord calculée au temps $t + 1/2\delta t$ et ensuite utilisée pour calculer la position, \mathbf{r} , à un temps $t + \delta t$. Le calcul des vitesses et des positions s'alternent ainsi l'un en fonction de l'autre. Contrairement à l'exemple précédent, les vitesses sont calculées explicitement mais malheureusement à des temps différents de celui de la position. Les vitesses correspondant aux positions à un temps t peuvent être obtenues *a posteriori*

$$\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2} \left[\mathbf{v} \left(t - \frac{1}{2}\delta t \right) + \mathbf{v} \left(t + \frac{1}{2}\delta t \right) \right] \quad (2.17)$$

L'algorithme de *velocity-verlet* permet d'obtenir les positions, les vitesses et les accélérations pour un même temps t sans compromis dans la précision

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 \quad (2.18)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} [\mathbf{a}(t) + \mathbf{a}(t + \delta t)] \delta t \quad (2.19)$$

Outre l'algorithme, la valeur du pas de temps utilisé possède également son importance. Trop petit, la trajectoire ne pourra explorer qu'une petite partie de l'espace des phases à l'opposé, si le pas de temps est trop grand, des instabilités apparaissent (due aux termes $\mathcal{O}(\delta t^3)$) et la conservation de l'énergie n'est plus respectée provoquant l'arrêt de la simulation. Le pas de temps maximum est généralement limité par les plus petites périodes d'oscillations présentes dans le système. Ces dernières sont liées aux atomes d'hydrogènes, les plus légers présents dans la simulation. Une solution est de contraindre les liaisons de ces atomes à leur position d'équilibre au cours de la simula-

tion à l'aide d'algorithmes comme SHAKE [11], SETTLE [12], LINCS [13]... permettant de passer d'un pas d'intégration de 1 fs à 2 fs.

2.1.6 Dynamique moléculaire dans différents ensembles

Les équations de Newton donnent des systèmes dans l'ensemble NVE, le nombre de particules, le volume et l'énergie du système est constant. Cependant pour certaines simulations, il est préférable de pouvoir contrôler la température et la pression.

Dynamique moléculaire à température constante - Ensemble NVT

De nombreuses méthodes ont été développées afin de pouvoir effectuer des simulations de dynamique moléculaire à température constante. Le plus évident est de se rendre compte que la température d'un système est liée à son énergie cinétique

$$E_{\text{cin}} = \frac{3}{2} N k_B T \quad (2.20)$$

Une méthode simple et directe est donc de réajuster les vitesses des atomes dans la boîte de simulations [16] par un facteur $\sqrt{T_{\text{sim}}/T_{\text{inst}}}$ où T_{sim} est la température à laquelle la simulation doit être maintenue et T_{inst} est la température instantanée. L'inconvénient de cette approche est que l'énergie totale n'est pas conservée. Les équations du mouvement doivent être réécrites en faisant apparaître un terme de friction ξ forçant la température instantanée à être constante ($\dot{T}_{\text{inst}} = 0$). Ce terme est de la forme

$$\xi(\mathbf{r}; \mathbf{p}) = \frac{\sum_i \mathbf{p}_i \cdot \mathbf{F}_i}{\sum_i |\mathbf{p}_i|^2} \quad (2.21)$$

Où \mathbf{p}_i est l'impulsion de la particule i et \mathbf{F}_i la force agissant sur la particule i . Cette méthode ne génère pas à proprement parler un ensemble thermodynamique car la dis-

tribution des vitesses ne correspond pas à une distribution de Maxwell-Boltzmann mais peut être utilisée durant une phase d'équilibration.

Une autre méthode consiste à coupler le système à un bain de température fixé à la température désirée, il s'agit du thermostat de Berendsen [17]. Un certain nombre d'atomes sont choisis à chaque pas de temps et leurs impulsions sont réajustées en utilisant une distribution gaussienne à la température désirée

$$P(\mathbf{p}) = \left(\frac{\beta}{2\pi m} \right)^{3/2} e^{-\beta \mathbf{p}^2 / 2m} \quad (2.22)$$

Cette méthode ne permet pas de générer des trajectoires dans l'ensemble NVT. De plus, un point important à noter, le thermostat de Berendsen ne conserve pas le moment des particules dû aux vitesses redistribuées aléatoirement à chaque pas de temps. La quantité de mouvement n'est pas conservée au cours du temps et la détermination de la viscosité ou de la constante de diffusion d'un fluide ont de fortes chances d'être mal estimées.

Un ensemble NVT peut être obtenu également en introduisant un terme de friction et une force aléatoire dépendante du temps dans les équations du mouvement

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla V(\mathbf{r}_i) + \mathbf{f}_i(t) - m_i b_i \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} \quad (2.23)$$

Où $\mathbf{f}_i(t)$ est la force aléatoire provenant d'une distribution gaussienne dont la valeur moyenne est nulle $\langle \mathbf{f}_i(t) \rangle = 0$ et satisfaisant la condition $\langle \mathbf{f}_i(t) \mathbf{f}_i(0) \rangle = 2k_B T_{\text{sim}} b_i m_i \delta(t)$. Cette dernière condition permet de garder la simulation à la température souhaitée. La friction est introduite par le coefficient b_i , T_{sim} est la température à laquelle le système est simulé et δt le pas de temps.

Dans une approche novatrice, Nosé [18] associa aux équations du mouvement un degré de liberté supplémentaire, s possédant une énergie cinétique $T_s(\mathbf{r})$ et potentielle

$U_s(\mathbf{r})$ propre. L'hamiltonien d'un tel système est

$$H_{\text{Nose}}(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = T(\mathbf{p}) + U(\mathbf{p}) + T_s(p_s) + U_s(s) \quad (2.24)$$

$$H_{\text{Nose}}(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \sum_i^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + U(\mathbf{r}) + \frac{\xi^2 Q}{2} + L \frac{\ln s}{\beta} \quad (2.25)$$

Où \mathbf{p}_i est la quantité de mouvement de la particule i , m_i sa masse, ξ est un coefficient de friction, Q est une masse effective associée à s . Les nouvelles équations du mouvement s'écrivent

$$\dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} \quad \dot{p}_i = -\frac{\partial V(\mathbf{r})}{\partial r_i} - p_i \frac{p_s}{Q} \quad (2.26)$$

$$\dot{s} = \frac{p_s}{Q} \quad \dot{p}_s = \sum_i^N \frac{p_i^2}{m_i} - Nk_B T \quad (2.27)$$

Ces équations font apparaître les deux variables non-physiques associées au degré de liberté supplémentaire introduit s et p_s . La détermination du paramètre Q est particulièrement importante et sa valeur influe grandement l'efficacité du thermostat. Une valeur trop grande ne permet pas de contrôler efficacement la température. D'après 2.26, lorsque $Q \rightarrow \infty$, la variable s est trop amortie et l'on retrouve une dynamique moléculaire classique générant ainsi un ensemble microcanonique. Le choix d'une masse trop importante permet donc d'obtenir un ensemble canonique uniquement après des temps de simulations longs. À l'opposé, une masse trop légère conduit à des fluctuations de température importantes et la variable s sera découplée du système physique n'assurant plus correctement son rôle de thermostat. Cette formulation permet de conserver une température constante tout en assurant une fluctuation de température nécessaire à l'obtention d'un ensemble canonique, dans la plupart des cas.

Malheureusement, il est possible que sur certains système le thermostat de Nosé-Hoover ne présente pas un caractère ergodique et ne génère pas une distribution canon-

ique [19, 20]. Tuckerman et Al. ont ainsi démontré l'existence de lois de conservation supplémentaires dont le non respect conduit le système à adopter un comportement non-ergodique [21]. Afin de s'assurer que la variable s donne bien un ensemble canonique, l'idée à été de coupler ce thermostat à un autre thermostat lui même couplé à un autre thermostat... donnant ainsi le nom de chaîne de Nosé-Hoover [22]. Cette solution permet de corriger les défauts lorsque un seul thermostat est présent.

La dernière méthode présentée ici à été introduite par Liu et Tuckerman, dénommée *Generalized Gaussian moment thermostating* (GGMT) [23]. Le thermostat GGMT est assez proche des chaînes de Nosé-Hoover en cela que les équations du mouvement sont couplées à un jeu de M variables supplémentaires à qui sont associées M impulsions ajoutant en tout $2M$ variables au système. L'idée étant de générer un certain nombre d'impulsions et de les coupler ensuite à un nombre arbitraire de particules, les quantités de mouvement ainsi générées étant assurées d'être distribuées selon une gaussienne à la température de simulation souhaitée. Liu et Tuckerman ont démontré que cette nouvelle approche thermostatée de manière plus efficace que les chaînes de Nosé-Hoover tout en évitant les problèmes liés aux règles de conservation cachées.

Dynamique moléculaire à température et pression constantes - Ensemble NPT

À l'instar de nombreuses expériences en laboratoire, il est parfois préférable de conduire des expériences *in-silico* à pression constante plutôt que à volume constant. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit de vouloir estimer l'enthalpie libre G . Cette dernière quantité n'étant définie uniquement que dans l'ensemble NPT. Cet ensemble est obtenu en appliquant une pression constante P , une température constante T et un nombre de particules fixes N . Le volume V est donc modifié au cours de la simulation et pourra ainsi être utilisé comme une variable dynamique dans les équations du mouvement. Ici aussi, différents barostats ont été développés afin de pouvoir effectuer des simulations dans l'ensemble isotherme-isobare. La pression peut-être directement

estimée en utilisant le théorème du viriel $E_{\text{cin}} = -1/2 \sum \overline{\mathbf{r} \cdot \mathbf{f}}$

$$\mathbf{P} = \frac{2}{V}(\mathbf{E}_{\text{cin}} - \Theta) \quad (2.28)$$

Où V est le volume de la boîte, E_{cin} est l'énergie cinétique et Θ le tenseur du viriel

$$\Theta = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij} \quad (2.29)$$

La pression instantanée, P_{inst} , est ainsi déduite de la trace du tenseur de pression $P_{\text{inst}} = \text{Tr}(\mathbf{P})/3$. Cependant, cette méthode n'est pas valide pour des systèmes périodiques, car les particules ne sont pas confinées par des murs ni soumises à des forces extérieures.

Une approche proposée par Berendsen [17] consiste à relaxer la pression instantanée vers une pression de référence P_{ref} . Cette approche est une variante de celle utilisée pour simuler un thermostat, souvent référencée comme *weak coupling*.

$$\frac{dP_{\text{inst}}(t)}{dt} = \frac{P_{\text{ref}} - P_{\text{inst}}}{\tau_P} \quad (2.30)$$

où τ_P est le temps de relaxation associé aux fluctuations de pression. Comme le volume de la boîte est modifié de manière à avoir une pression constante, $\Delta V = 3\alpha V$, les équations du mouvement sont modifiées pour prendre en compte ce changement de volume. Avec cette variation de volume, s'accompagne une variation de pression

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{\beta_P V} \frac{dV}{dt} = -\frac{3\alpha}{\beta_P} \quad (2.31)$$

Où β_P est la compressibilité isotherme. Les équations du mouvement modifiées sont donc au final

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{v} - \frac{\beta(P_{\text{ref}} - P_{\text{inst}})}{3\tau_P} \mathbf{x} \quad (2.32)$$

Tout comme son analogue pour la température, ce barostat ne permet pas de générer une trajectoire dans un ensemble défini.

Un autre barostat qui lui conduit à une distribution isotherme-isobare, utilisée dans le code NAMD, combine une dynamique de Langevin pour maintenir la température à une valeur voulue [24] et une méthode de pression constante dérivée du modèle de Nosé-Hoover [25] dans lequel le degré de liberté supplémentaire est appliqué à la pression.

Les équations du mouvement pour la position et le moment sont donc

$$\dot{\mathbf{r}}_i = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} + \frac{p_\epsilon}{W} \mathbf{r}_i \quad (2.33)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = \mathbf{f}_i - \left(1 + \frac{d}{dN}\right) \frac{p_\epsilon}{W} \mathbf{p}_i - \frac{p_{\xi,1}}{Q_1} \mathbf{p}_i \quad (2.34)$$

Le barostat est introduit via les variables ϵ , p_ϵ et W . Le paramètre ϵ est défini comme le logarithme du volume V du système

$$\epsilon = \ln(V/V(0)) \quad (2.35)$$

Où $V(0)$ est le volume à $t = 0$, W est la masse associée à ϵ et p_ϵ est la quantité de mouvement associée à ϵ . Ces équations sont complétées par des équations associées au volume

$$\dot{V} = \frac{dV p_\epsilon}{W} \quad (2.36)$$

$$\dot{p}_\epsilon = dV(P_{\text{int}} - P_{\text{ext}}) + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{m_i} - \frac{p_{\xi,1}}{Q_1} p_\epsilon \quad (2.37)$$

Où P_{ext} est la pression extérieure imposée par le barostat et P_{int} est la pression interne

et peut être estimée au cours de la simulation

$$P_{\text{int}} = \frac{1}{dV} \left[\sum_{i=1}^N \left(\frac{\mathbf{p}_i^2}{m_i} + \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{f}_i \right) - dV \frac{\partial U(V)}{\partial V} \right] \quad (2.38)$$

Où U est le potentiel. Cette méthode, dérivée de celle de Nosé-Hoover, permet de générer un ensemble NPT.

2.2 Calculs d'énergie libre

La section précédente a introduit la dynamique moléculaire. Cette dernière permet d'explorer l'espace des phases d'un système au cours d'une simulation. Cependant, certains processus biologiques se déroulent sur une échelle de temps allant de la μs à la ms et ne peuvent de ce fait pas être « vu » lors de la simulation. En général, les conformations associées à ces régions de l'espace des phases sont séparées par des barrières hautes en énergie. Des méthodes ont donc été élaborées pour franchir ces barrières et aller explorer une région de l'espace plus étendue. Les informations liées à cette échantillonnage permet la détermination de grandeurs thermodynamiques et fera l'objet de la première partie de cette section. Les parties suivantes serviront à présenter les différentes méthodes d'énergie libre utilisées au cours de cette thèse, chacune accompagnée d'un exemple pour illustrer la méthode.

2.2.1 Rappels de physique statistique

La physique statistique fournit les outils nécessaires pour établir le lien entre les propriétés macroscopiques d'un système, composé d'un grand nombre de particules ($N > \mathcal{N}_a$, \mathcal{N}_a étant le nombre d'Avogadro), à partir de grandeurs microscopiques. Il est généralement impossible de pouvoir caractériser l'état microscopique de chacune de ces particules mais par le biais de moyennes faites sur une partie infime des ces

particules, il est possible de prédire le comportement macroscopique du système en question.

On distingue en physique statistique différents modèles afin de rendre compte de principes thermodynamiques. L'ensemble micro-canonique décrit un système isolé où l'énergie totale (E), le nombre de particules (N) et le volume (V) sont conservés. L'ensemble canonique est un modèle qui décrit un système en interaction avec un thermostat à la température T_{thermo} , la température (T), le nombre de particules (N) et le volume (V) sont les grandeurs conservées. Et finalement, l'ensemble grand-canonique qui lui décrit un système pouvant échanger de l'énergie et des particules avec un réservoir.

Les résultats obtenus dans l'ensemble canonique seront utilisé ici et sont suffisant pour ensuite développer les méthodes d'énergie libre. L'une des grandeurs les plus importantes en physique statistique est certainement la fonction de partition Z (parfois dénommé Q). Cette fonction contient toutes les informations relatives au système en équilibre thermodynamique avec un thermostat à la température T_{thermo} . Pour un système à N particules ayant chacune l'énergie potentielle $V(\mathbf{r}_i)$, elle est définie dans l'ensemble canonique de la manière suivante

$$Z = \frac{1}{N!h^{3N}} \int d^3r_1 \int d^3r_2 \dots \int d^3r_{i-1} \int d^3r_i e^{-\beta H(\mathbf{r}_i, \mathbf{p}_i)} \quad (2.39)$$

Où h est la constante de Planck et l'intégration porte sur l'ensemble de l'espace des phases avec l'Hamiltonien

$$H(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m} + V(\mathbf{r}_i) \quad (2.40)$$

Toutes les grandeurs thermodynamique peuvent s'exprimer à l'aide de cette fonc-

tion. L'énergie moyenne \bar{E} du système dans l'ensemble canonique s'exprime

$$\bar{E} = \frac{1}{Z} \sum_i E_i e^{-\beta E_i} = \frac{1}{Z} \left[-\frac{\partial}{\partial \beta} \sum_i e^{-\beta E_i} \right] = -\frac{\partial}{\partial \beta} \ln Z \quad (2.41)$$

On introduit alors

$$F = -k_B T \ln Z \quad (2.42)$$

La grandeur F est appelée énergie libre (ou énergie de Helmholtz dans les ouvrages anglo-saxons). Sa différentielle permet d'exprimer la différence d'énergie libre pour une transformation au cours de laquelle la température peut varier et où le travail provient uniquement d'un changement de volume. Elle s'écrit

$$dF = -SdT - pdV - \mu dN \quad (2.43)$$

Où S est l'entropie, T la température, p et V la pression et le volume, μ le potentiel chimique et N le nombre de particules. Elle est fonction des variables d'état T , V et N .

Comme il est généralement plus commode pendant les expériences de travailler à pression constante plutôt qu'à volume constant, une nouvelle fonction est alors définie, l'enthalpie libre, ou énergie de Gibbs, qui est fonction des variables T , p et N . Il faut donc ré-exprimer F non plus en fonction du volume V mais en fonction de sa variable conjuguée la pression $p = -\left(\frac{\partial F}{\partial V}\right)_{T,N}$. Cette nouvelle fonction d'état, G , est définie par

$$G = F + pV = U + pV - TS \quad (2.44)$$

Sa différentielle s'écrit

$$dG = -SdT + Vdp + \mu dN \quad (2.45)$$

Les variables naturelles de cette nouvelle fonction d'état sont T , p et N . Cette dernière relation permet de connaître la différence d'énergie libre entre deux états thermody-

namiques où la transformation a lieu avec une température et une pression fluctuantes.

C'est cette dernière grandeur qui sera estimée au cours des calculs d'énergie libre. Cette fonction est utile pour prédire le sens des réactions dans les équilibres chimiques et déterminer si un processus est probable ou non, au sens thermodynamique. Si $\Delta G < 0$, le processus est favorisé et le contraire si $\Delta G > 0$.

Dans les sections suivantes, il sera question de l'estimation de l'énergie libre dans les simulations de dynamique moléculaire.

2.2.2 Transformation alchimique

La transformation alchimique [27] est une méthode de calcul d'énergie libre notamment utilisée pour déterminer l'énergie de liaison d'un ligand avec une protéine, l'effet d'une mutation d'un des acides aminés dans une protéine ou encore pour estimer l'énergie de solvatation d'une molécule [28, 29, 30]. Au cours de cette thèse, la transformation alchimique a été utilisée pour calculer la différence d'énergie libre entre une molécule sous sa forme acide et sa forme basique à des endroits spécifiques dans une membrane.

Durant une transformation alchimique, un atome ou un jeu d'atomes va être amené à disparaître au cours de la simulation tandis qu'un autre groupe composé d'un ou plusieurs atomes va quand à lui apparaître en utilisant une série d'états intermédiaires à l'instar des réactions alchimiques où un composé est muté en un autre. Le reste des atomes ne subissant aucune perturbation. Finalement, il est aussi possible de considérer le cas où un groupe d'atome est annihilé ou inversement crée sans forcément faire apparaître ou disparaître un autre groupe (fig 2.2).

Considérons alors un groupe d'atomes A présents dans la boîte de simulation et un autre groupe d'atomes différents B. En pratique, l'Hamiltonien du système dual relie l'Hamiltonien du groupe à disparaître « A » avec l'Hamiltonien du groupe « B » naissant grâce à l'utilisation d'un paramètre de couplage λ . Ce dernier variera de 0 à

1 au cours de la transformation. L'état où $\lambda = 0$ correspond à la configuration où le groupe de départ est complètement présent dans la simulation et quand λ sera égale à 1, le groupe A aura complètement disparu et le groupe d'atomes B sera présent dans la simulation. Ce processus est décrit par l'Hamiltonien suivant

$$H(\mathbf{r}, \mathbf{p}; \lambda) = H_0(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + \lambda H_B(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + (1 - \lambda)H_A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \quad (2.46)$$

Où H_A décrit le système disparaissant au cours de la transformation, H_B le système apparaissant et H_0 le reste du système, c'est à dire non modifié. Partant de ce principe, il existe différentes manières de calculer l'énergie libre associée à cette transformation. Durant cette thèse, la méthode des perturbations fut utilisée et sera donc décrite, bien que d'autres méthodes existent. Citons notamment l'intégration thermodynamique ou l'utilisation des densités de probabilité. Ces deux dernières seront décrites plus tard dans ce chapitre.

On cherche à estimer la différence d'énergie libre $\Delta G_{A \rightarrow B}$ entre le système dans son état initial A et le système dans son état final B. En reprenant les rappels de la section précédente, cette différence s'écrit

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = G_B - G_A = -k_B T \ln(Z_B/Z_A) \quad (2.47)$$

Où G_B et G_A sont les énergies libres associées aux états A et B et Z_B et Z_A leurs fonctions de partition respectives. Cependant, il est difficile d'obtenir ces dernières à partir de simulations. En utilisant la définition de la fonction de partition, il est possible d'exprimer $\Delta G_{A \rightarrow B}$ en fonction des Hamiltoniens de A et B pour obtenir la formule de perturbation d'énergie libre.

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = -\frac{1}{\beta} \langle \exp\{-\beta[H_A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) - H_B(\mathbf{r}, \mathbf{p})]\} \rangle_A = -\frac{1}{\beta} \langle \exp(-\beta \Delta U) \rangle_A \quad (2.48)$$

Où $\beta = 1/k_B T$ avec k_B la constante de Boltzmann et T la température. $H_A(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ et $H_B(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ sont, respectivement les Hamiltoniens décrivant la molécule A et la molécule B. Les crochets représentent une moyenne sur les configurations représentatives de la molécule A. L'expression de $\Delta G_{A \rightarrow B}$ devient fonction de $\Delta U = U_B - U_A$, la différence d'énergie potentielle entre les deux états, en considérant que les contributions provenant de l'énergie cinétique dans l'état A et l'état B sont égales et disparaissent lors de la différence entre les deux Hamiltoniens.

Un inconvénient de cette approche peut provenir de la différence entre les espaces des phases correspondant aux systèmes A et B. Si les micro-états ayant le poids de Boltzmann le plus élevés dans l'espace des phases du système A sont très différents de ceux de l'espace des phases du système B alors la différence $U_B - U_A$ deviendra importante se traduisant dans le terme en exponentiel $\exp(-\beta \Delta(U_B - U_A))$ qui tendra vers 0 rendant la convergence des calculs impossible ou alors, au mieux, très lente.

La méthode de perturbation s'applique donc à des cas où les espace des phases des systèmes considérés sont proches. Le cas idéal étant où le système d'arrivé B est un sous espace du système A. Une possibilité de remédier à ce problème est d'introduire une série d'étapes intermédiaires entre le système A et le système B afin de pouvoir maximiser le recouvrement des espaces des phases entre le système initial et le système final. En pratique, ceci se traduit par

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = -\frac{1}{\beta} \sum_{i=1}^N \ln \langle \exp(-\beta \Delta U_{i,i+1}) \rangle_i \quad (2.49)$$

Où N représente le nombre d'état intermédiaires. Suivant le même principe, le paramètre de couplage λ prendra une série de valeurs comprises entre 0 et 1 dans le but de faciliter la convergence du calcul. Ceci se traduit en pratique dans la simulation par l'extinction progressive de l'énergie potentielle correspondant aux atomes du groupe A et l'introduction graduelle de l'énergie potentielle correspondant aux atomes du groupe

B.

Dans les simulations conduites durant les travaux de thèse, les topologies des atomes apparaissant et disparaissant étaient présentes, amenant à parler de « topologie duale » et expliquer comment les interactions entre atomes perturbés sont traitées durant la simulation. La topologie duale [31, 32] (en opposition à la simple topologie [33], non traitée ici) fait coexister les topologies des deux structures en même temps durant la simulation sans que l'un ressente la présence de l'autre.

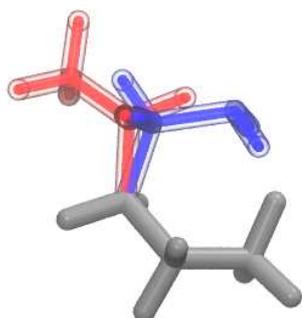


FIGURE 2.2 – Analogie d'une lysine décrite dans sa topologie duale où la fonction amine protonée (rouge) et la fonction amine déprotonée (bleue) sont présentes. Durant la transformation, les paramètres associés au champs de force de l'un sont lentement couplés à la simulation tandis que les paramètres de l'autre sont lentement éteints. La partie du peptide représentée en gris est celle ne subissant aucune perturbation durant la transformation alchimique.

Les interactions des atomes du groupe A sont totalement prises en compte dans la simulation pour $\lambda = 0$ et inversement les atomes du groupe B ne font pas encore parti de la simulation. C'est le cas inverse pour $\lambda = 1$. L'introduction de ce type de traitement des interactions a conduit à observer des instabilités dans les simulations là

où les valeurs prises par λ étaient proche de 0 ou 1, soit en début ou en fin de calcul. D'où l'appellation dans la littérature de ce comportement « end-point catastrophes ». Ces instabilités proviennent lors de l'apparition des atomes dans la boîte de simulation là où d'autres atomes sont déjà présents. Compte-tenu de la forme des interactions telle que décrite par les champs de force, lorsque la distance entre ces atomes apparaissant et ceux déjà présents devient proche de 0, l'énergie potentielle, elle, tend à devenir infinie ou du moins très grande.

Une manière de remédier à ce problème est de ré-écrire le potentiel d'interaction inter-atomique (dispersion-répulsion et électrostatique) en introduisant un potentiel appelé « soft-core potential » [34, 35]. Le potentiel V utilisé ainsi est de la forme

$$V(r_{ij}) = \lambda_{LJ} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}^2 + \delta(1 - \lambda_{LJ})} \right)^6 - \left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}^2 + \delta(1 - \lambda_{LJ})} \right)^3 \right] + \lambda_{elec} \frac{q_i q_j}{\epsilon_1 r_{ij}} \quad (2.50)$$

Où r_{ij} est la distance entre deux atomes i et j , ϵ_{ij} est le minimum du puits et r_{ij}^{\min} sa position, ϵ_1 la permittivité diélectrique du milieu, q_i et q_j la charge des atomes. Les autres paramètres, δ , λ_{LJ} et λ_{elec} sont liés au potentiel soft-core. Le paramètre δ est un coefficient introduit afin de modifier les interactions de Van der Waals et de s'assurer que le potentiel ne possède plus de singularité pour les petites valeurs de λ . Les paramètres λ_{elec} et λ_{LJ} décrivent le couplage des interactions électrostatiques et de Van der Waals respectivement. Ces modifications apportées au potentiel d'interaction sont des artifices pour améliorer la convergence des calculs et la stabilité des simulations.

Exemple d'un calcul

Un exemple lié au calcul via la transformation alchimique est donné ici. Il s'agit de la transformation d'un analogue de lysine chargée (fonction amine protonée) vers un analogue de lysine neutre (fonction amine déprotoné) et inversement. Même si l'équation 2.48 est rigoureusement exacte d'un point de vue théorique, il est possible que son

application de soit pas toujours couronnée de succès.

ΔG ne dépend que de la différence d'énergie potentielle ΔU . Il est possible de ré-exprimer l'énergie libre uniquement en fonction de cette quantité

$$\Delta G = -\frac{1}{\beta} \int \exp(-\beta \Delta U) P_A(\Delta U) d\Delta U \quad (2.51)$$

où $P_A(\Delta U)$ est la distribution des probabilités de ΔU lors du calcul. Cette distribution est habituellement proche d'une distribution gaussienne. Bien que dans le cas d'une simulation, cette distribution décroît très vite de la valeur moyenne vers les valeurs de basses énergies ΔU . Ceci signifiant que ces dernières ne seront que peu ou pas échantillonnées et peut devenir problématique lorsque la partie en exponentielle vient à être considérée $\exp(-\beta \Delta U)$. Cette dernière augmente rapidement dans cette région et contribue grandement à l'intégrale de 2.51 et donc à la valeur de l'énergie libre.

Si la distribution des probabilité est assumée gaussienne, il est possible de démontrer que l'intégrante est également gaussienne et décalée vers les plus petites valeurs de ΔU . Plus ce décalage est important, plus il sera difficile d'échantillonner les états contribuant le plus à l'intégrale [36].

Les distributions présentées sur la figure 2.3 proviennent de la transformation d'une lysine à l'intérieur d'une membrane de POPC. Le graphique de droite présente la distribution des probabilités pour une fenêtre lors d'une transformation de la forme chargée vers la forme neutre (ou transformation dite « aller », un explication de ce terme est vu plus loin dans la discussion). L'intégrante (en rouge) est correctement recouverte par la distribution $P_A(\Delta U)$ (en bleu), un signe que ce calcul peut être considéré comme fiable.

Sur le graphique en bas à gauche de la figure 2.3 est présenté l'évolution de l'énergie pour une fenêtre $\delta\lambda$ parmi celles séparant l'état chargée ($\lambda = 0$) de l'état neutre ($\lambda = 1$). Dans le cas idéal, l'énergie libre évoluera vers un plateau signe que le calcul à atteint la convergence. Dans des cas où la simulation possède de nombreux événements

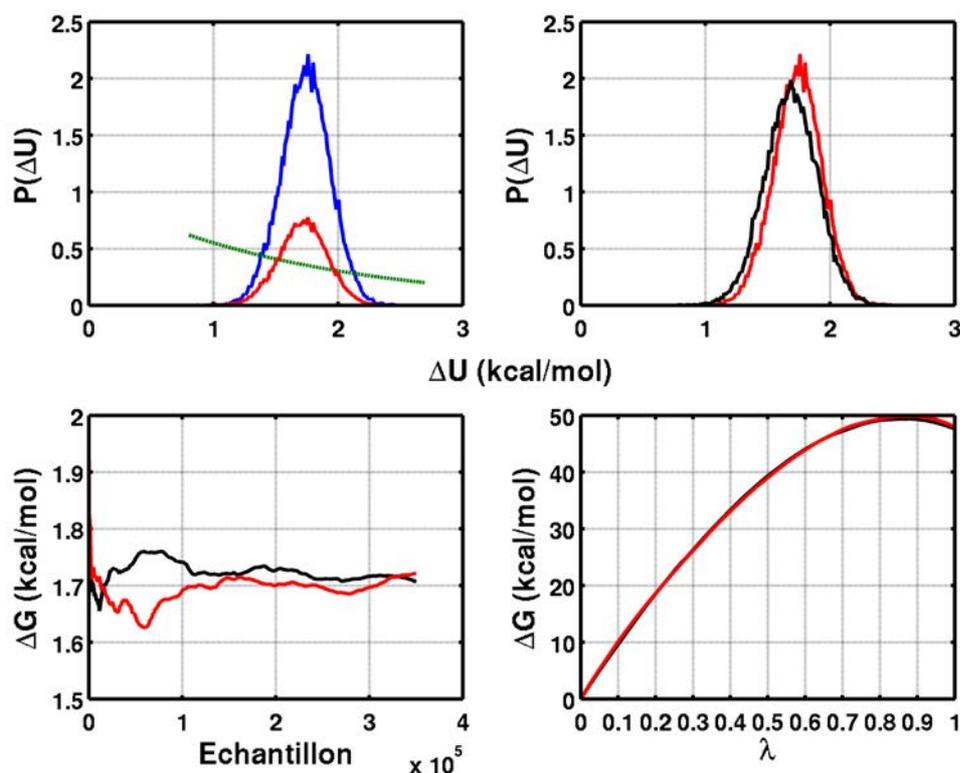


FIGURE 2.3 – Haut gauche : Intégrante (rouge) et probabilité de distribution (bleu). Poids de Boltzmann (vert). Haut droite : Distribution pour la transformation aller (noir) et retour (rouge). Bas gauche : Évolution de l'énergie libre moyennée en fonction du nombre de configuration Bas droite : Évolution de l'énergie libre en fonction de λ dans une transformation aller (noir) et retour (rouge), le faible hystérésis démontre que les conformations contribuant à l'énergie libre ont bien été échantillonnées dans les deux sens. Ces analyses sont réalisées via l'extension ParseFEP de VMD [37].

rare, ceux ci auront une contribution significative et le graphique montrant l'évolution de l'énergie en fonction du temps aura tendance à évoluer en dents de scie, signe que dans ce cas la convergence sera difficile à atteindre.

Pour améliorer la convergence statistique des calculs, il est important, lorsque cela est possible, de réaliser des transformations « aller-retour », c'est-à-dire que le système est transformé de A vers B et inversement. L'énergie libre ainsi calculée devrait être la même quelque soit le sens de la transformation. Cependant, dû à la nature du système

et au temps de simulation finis, l'échantillonnage dans un sens ou dans l'autre peuvent être différents et donc mener à une estimation de l'énergie libre différente. Faire une transformation « aller-retour » est donc conseillé afin de pouvoir s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus.

Les distributions présentées en haut à droite sur la figure 2.3 sont les distributions associées à une transformation « aller-retour » pour le même système que les distributions de droite et la même fenêtre de λ . La superposition des deux distributions est une assurance que l'échantillonnage a été correctement réalisé dans les deux sens. L'évolution de l'énergie libre en fonction de λ est donnée sur les courbes en bas à droite de la figure 2.3 pour une transformation aller (noir) et retour (rouge). La faible hystérésis témoigne de l'échantillonnage correct dans les deux sens.

Pour une transformation conduite dans les deux sens, une analyse statistique supplémentaire peut être conduite, l'énergie libre peut être estimée en combinant les résultats obtenus suivant ces deux directions en utilisant un calcul développé par C. H. Bennett [38] et dénommée « Bennett acceptance ratio » (BAR).

$$\exp(\beta\Delta G) = \frac{\langle f[-\beta(\Delta U - C)] \rangle_A}{\langle f[\beta(\Delta U - C)] \rangle_B} \exp(-\beta C) \quad (2.52)$$

$$C = \Delta G - \frac{1}{\beta} \ln \frac{N_A}{N_B} \quad (2.53)$$

Où la fonction f correspond à la distribution de Fermi-Dirac, $f(x) = 1/[1 + \exp(x)]$, N_A et N_B sont le nombre de configurations échantillonnées dans l'état de référence et l'état finale. La constante C est déterminée de manière itérative. La variance peut également être estimée

$$\sigma_{\Delta G}^2 \text{ BAR} = \frac{1}{N_0\beta} \left[\frac{\langle f^2(x) \rangle_0}{\langle f(x) \rangle_0^2} - 1 \right] + \frac{1}{N_1\beta^2} \left[\frac{\langle f^2(-x) \rangle_1}{\langle f(-x) \rangle_1^2} - 1 \right] \quad (2.54)$$

La différence d'énergie libre associée à la transformation présentée sur la figure 2.3 est $47,79 \pm 0,11$ kcal.mol⁻¹ d'après l'estimateur de Bennett.

2.2.3 Force de biais adaptative - Adaptive Biasing Force (ABF)

Cette partie est dédiée à la présentation de la méthode dite de force de biais adaptative [39, 40, 41] utilisée afin d'estimer le potentiel de force moyen le long d'une coordonnée de réaction ξ . Cette dernière peut correspondre à un ou plusieurs degrés de liberté du système, généralement exprimée à partir des coordonnées cartésiennes et pouvant être analysée individuellement au cours de la simulation ou utilisée afin de modifier la dynamique pour observer des phénomènes impossible à obtenir sur les échelles de temps d'une simulation de dynamique moléculaire standard.

Le potentiel de force moyen correspond au travail nécessaire pour ramener deux particules situées à une distance infinie au contact [42]

$$w(\mathbf{r}) = -\frac{1}{\beta} \ln g(\mathbf{r}) \quad (2.55)$$

Où $g(\mathbf{r})$ est la fonction de distribution radiale des deux particules. Cette définition a été étendue par la suite à toute forme de coordonnée de réaction. De ce fait, l'énergie libre est maintenant peut être reliée à la densité de probabilité $P(\xi)$ par la relation

$$G(\xi) = -k_B T \ln P(\xi) \quad (2.56)$$

Où G_ξ est l'énergie libre correspondante à une certaine valeur de ξ et $P(\xi)$ est la probabilité de trouver le système dans l'état ξ . Suivant cette relation, il apparaît qu'une augmentation de quelques $k_B T$ réduit la probabilité $P(\xi)$ et donc les conformations hautes en énergies ne seront pas ou peu échantillonnées au cours de la simulation.

Les premières solutions envisagées pour forcer le système à explorer ces régions ont été d'imposer des contraintes sur le système. Cependant, cette approche ne permet pas

d'échantillonner efficacement la coordonnée de réaction. En effet, même si l'utilisation de contraintes peut pousser le système dans des zones hautes en énergie, il n'est pas sûr pour autant que toutes les conformations importantes soit visitées à une valeur de ξ fixée. L'existence de plusieurs chemins séparant deux états A et B dans l'espace des phases ralentit la convergence des calculs, d'autant plus qu'il peut être difficile de passer sur un autre chemin en ayant déjà emprunté un chemin différent. L'existence de ces différents chemins et la possibilité plus ou moins importante de pouvoir sauter de l'un à l'autre conduit à des erreurs statistiques importantes et devient un processus limitant la convergence des calculs.

La méthode de force de biais adaptatif a été développée dans l'optique de réduire ces erreurs. L'idée étant de pouvoir échantillonner l'espace des phases d'un système, y compris les régions correspondantes aux conformations hautes en énergie, en faisant une dynamique moléculaire sans contrainte. Avant d'aborder la méthode ABF en elle-même, l'intégration thermodynamique sera présentée.

L'intégration thermodynamique est une approche différente de la méthode des perturbations vue à la section précédente. Dans ce cas, la différence d'énergie libre entre deux états, ΔG , s'écrit [43]

$$\Delta G = \int_{\xi} \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} d\xi = \int_{\xi} \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r})}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} d\xi \quad (2.57)$$

Où l'intégration se fait sur la coordonnée de réaction ξ . Cette équation relie la différence d'énergie entre deux états à la moyenne de la dérivée de l'énergie potentielle sur l'ensemble ξ . Cette dernière correspond à une force agissant sur la coordonnée de réaction. La méthode ABF utilise cette correspondance pour améliorer l'échantillonnage le long de ξ . Cette force n'est cependant pas une force mécanique, comme celle dérivée du champ de force, car elle agit sur une variable collective. Elle est une généralisation de la force agissant sur des variables construites à partir de la position des atomes.

Historiquement, une des première force \mathbf{F} obtenue était celle exercée par le solvant sur deux ions monoatomiques projetée sur la distance inter-ionique [44]. Une formulation générale de cette force apparue un peu plus tard et sera proposée par Carter et Al. [45]

$$\mathbf{F}(\xi, \mathbf{r}) = -\frac{\partial U(\xi, \mathbf{r})}{\partial \xi} + k_B T \frac{\partial \ln |J(\xi, \mathbf{r})|}{\partial \xi} \quad (2.58)$$

Cette expression relie bien la force à la dérivée de l'énergie potentielle et fait apparaître un terme correctif supplémentaire incluant le Jacobien lié au passage des coordonnées cartésiennes aux coordonnées généralisées. Une étude avec plusieurs variables collectives a été effectuée par den Otter et Briels quelques années plus tard [46].

À partir de l'expression de cette force, il est possible d'en déduire l'énergie libre d'après le formalisme de l'intégration thermodynamique

$$\frac{dG(\xi)}{d\xi} = \langle \mathbf{F}_\xi \rangle_\xi \quad (2.59)$$

Notons ici que l'estimation de l'énergie libre provient bien de la force moyennée et non de la force instantanée.

Dans un calcul de type ABF, la coordonnée de réaction choisit est divisée en une série de n petits intervalles, $\xi = \xi_{i \in [1, n]}$, dans lesquelles la force est évaluée et moyennée. La force opposée est ensuite appliquée pour franchir les éventuelles barrières d'énergie le long de ξ

$$\mathbf{F}^{\text{ABF}} = \nabla_\xi \tilde{A}(\xi) \quad (2.60)$$

Où $\nabla_\xi \tilde{A}(\xi)$ correspond au gradient instantané de l'énergie libre au point ξ . Cette force de biais introduite dans les équations du mouvement garantie que la force agissant dans chaque sous-espace de ξ est globalement nulle au cours du temps. À la fin du calcul, lorsque le profil de force est correctement convergé, le système diffuse librement le long de la variable collective ξ .

Exemple d'un calcul

Dans la pratique, la méthode ABF possède l'avantage de pouvoir diviser la coordonnée de réaction en plusieurs intervalles afin d'estimer la force séparément sur chaque segment. Une fois les calculs convergés, il est possible d'obtenir le profil le long de toute la coordonnée de réaction en combinant la force estimée dans chacun des segments puis en intégrant cette dernière pour obtenir le potentiel de force moyen sur l'ensemble de la coordonnée de réaction.

La convergence peut être suivie en calculant l'écart quadratique moyen Θ entre le profil estimé convergé au temps $t = t_{\text{conv}}$ et le profil à un temps $t < t_{\text{conv}}$.

$$\Theta = \sqrt{\sum_{\xi} (\Delta G(\xi, t) - \Delta G(\xi, t_{\text{conv}}))^2} \quad (2.61)$$

Lorsque le profil n'évolue plus en fonction de l'échantillonnage, l'évolution de Θ doit tendre vers un plateau montrant que le calcul est convergé sur le temps de simulation considéré. Sur les figures 2.4 et 2.5 sont présentés les résultats de calculs d'énergie libre conduits avec la méthode ABF pour deux systèmes différents. Le premier est un système très simple où un ion Na^+ est transféré au travers d'une interface hydrophile/hydrophobe (eau/octane). Le second système reprend la même interface mais avec une molécule de taille plus importante, un fullerène, où les temps de simulation ont de ce fait augmenté.

Sur la figure 2.4 est donc présenté le profil d'énergie libre d'un ion avec le profil de densité du système, ce dernier permettant de localiser la position des deux phases par rapport au profil. La coordonnée de réaction utilisée est la projection de la distance entre l'ion et le centre de la couche hydrophobe. La signification des profils sera discuté dans le dernier chapitre, l'idée ici étant de montrer les protocoles utilisés pendant cette thèse afin d'observer l'évolution de la convergence des profils. En bas du profil d'énergie libre sont donnés l'écart quadratique moyen calculé suivant la formule 2.61 avec l'évolution

finale de l'échantillonnage, c'est à dire des zones visitées par l'ion au sein du système le long de la coordonnée de réaction, ξ . Le plateau pris par l'écart quadratique doit témoigner de la stabilité du profil tout en continuant à aller visiter les conformations le long de ξ .

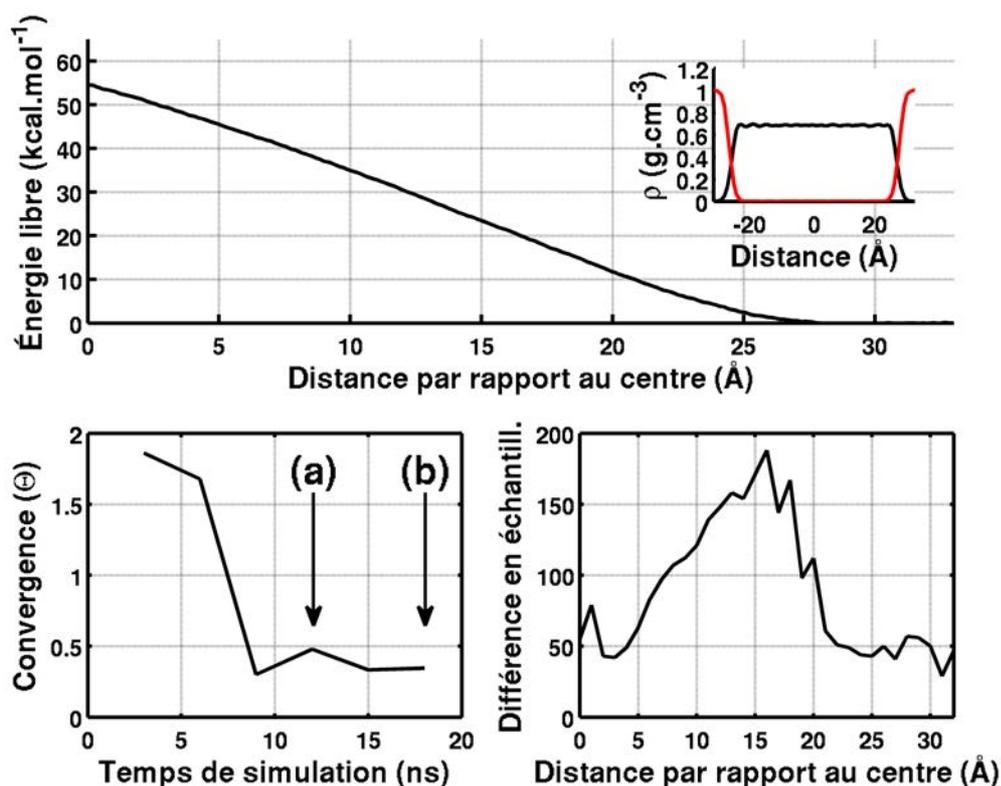


FIGURE 2.4 – Évolution de la convergence du profil d'énergie libre pour un ion sodium transféré à travers une interface eau(rouge)/octane(noir). Haut : profil d'énergie libre avec, en haut à droite de ce dernier, le profil de densité du système. Bas gauche : évolution de l'écart quadratique moyen du profil en fonction du temps de simulations. Bas droite : évolution de l'échantillonnage dans les dernières nanosecondes du calcul correspondant entre les points (a) et (b) sur la courbe de convergence à gauche.

Sur la figure 2.5 sont présentés les résultats d'un calcul pour un fullerène à l'interface d'un système hydrophile/hydrophobe. La coordonnée de réaction correspond à la projection de la distance entre le centre de masse du fullerène et le centre de masse de la couche hydrophobe sur la normale à l'interface. La figure 2.5 met en lumière la

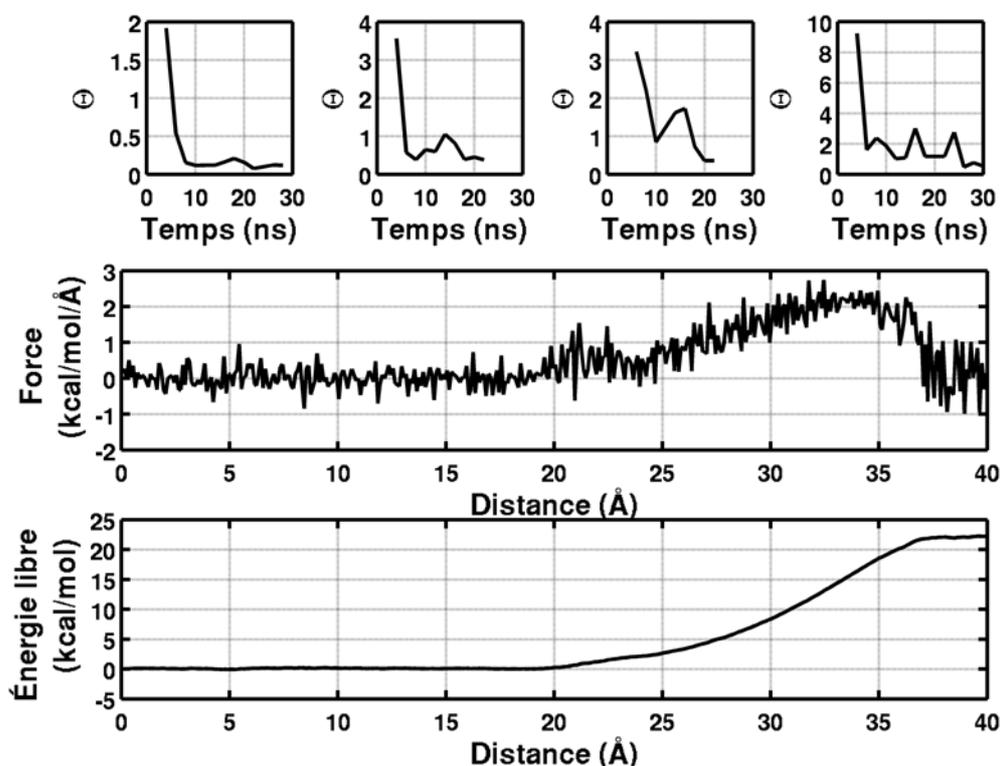


FIGURE 2.5 – Passage d'un fullerène à travers une interface eau/octane, la distance correspond au centre de la membrane. Haut : Évolution de la convergence du profil d'énergie libre dans les quatre sous espaces de la coordonnée de réaction correspondant de gauche à droite à 00-10 Å, 10-20 Å, 20-30 Å et 30-40 Å. Milieu : Profil de la force obtenu le long de la coordonnée de réaction. Bas : PMF obtenu après intégration de la force.

possibilité de diviser la coordonnée de réaction en sous-espaces plus petits afin de faire plusieurs calculs d'énergie libre sur le même système avec plusieurs simulations séparées. La variable collective a été divisée ici en quatre parties distinctes (ne se recouvrant pas). L'intérêt dans ce cas est de pouvoir accélérer l'estimation de l'énergie libre compte tenu de l'important espace pris par ξ . Dans d'autres cas, cette technique permet de concentrer les calculs sur des régions spécifiques du système demandant plus d'échantillonnage. L'énergie libre dans chacun de ces sous-espace a été considérée convergée comme pour le cas précédent, lorsque Θ tendait vers un plateau et que le système

diffusait librement le long de la variable collective, échantillonnant de manière uniforme ξ . Le profil d'énergie libre a été obtenu en intégrant le profil de force provenant des différents sous espaces. Comme la coordonnée de réaction peut être séparée en différents domaines où la force est évaluée, le recouvrement aux bornes des différentes régions doivent être continues et l'écart entre les forces ne devraient pas excéder une quantité supérieure à $k_B T$.

2.2.4 Métadynamique

La métadynamique [47] permet également d'évaluer le profil d'énergie libre le long d'une coordonnée de réaction en utilisant un potentiel de biais adaptatif. Là où la méthode ABF estime la force pour ensuite appliquer son opposée pour aller échantillonner les régions hautes en énergie, le potentiel de biais introduit en métadynamique est construit par ajout successif et régulier au cours de la simulation de potentiel modélisé par une gaussienne.

$$V_G(s(x), t) = w \sum_{\substack{t' = \tau_G, 2\tau_G, 3\tau_G \dots \\ t' < t}} \exp\left(-\frac{(s(x) - s(x_G(t')))^2}{2\delta s^2}\right) \quad (2.62)$$

Où w et δs correspondent à la hauteur et à l'épaisseur des gaussiennes, τ_G est l'intervalle de temps entre le dépôt de deux gaussiennes et $s(x_G(t'))$ correspond à la trajectoire du système sous l'action de la surface d'énergie libre et du potentiel de biais introduit soit $V + V_G$. La surface d'énergie, $F_G(s, t)$, est ainsi estimée par

$$F_G(s, t) = -V_G(s, t) = -w \sum_{\substack{t' = \tau_G, 2\tau_G, 3\tau_G \dots \\ t' < t}} \exp\left(-\frac{(s - s(x_G(t')))^2}{2\delta s^2}\right) \quad (2.63)$$

Un calcul de métadynamique reproduit une empreinte de la surface d'énergie par addition de «paquets de potentiel» le long de la coordonnée de réaction échantillonnée.

La résolution de la surface ainsi estimée est fonction de la taille et de la hauteur des gaussiennes déposées au cours de la simulation. Le taux de déposition des gaussiennes conditionne le temps nécessaire pour la convergence du profil. Des précautions sont cependant nécessaires, l'ajout de gaussiennes trop fréquemment peut conduire le système à se retrouver dans des états hors équilibre ou rendre la dynamique instable et pousser le système dans des configurations n'ayant aucun sens physique [48].

Tous ces paramètres sont définis par l'utilisateur et la qualité du profil est fortement dépendant du choix de ces paramètres. Ainsi, l'obtention d'une surface bien résolue nécessitera l'utilisation de gaussiennes de tailles modestes avec une amplitude assez faible et un taux de déposition faible pour laisser le système se rééquilibrer après l'introduction d'un nouveau potentiel de biais ceci pouvant augmenter de manière importante le temps de convergence du profil.

Une amélioration de cette méthode a été proposée où le potentiel construit au cours de la simulation contient en mémoire la surface déjà explorée, la « well-Tempered Metadynamics » [49]. Sous cette formulation, la taille des gaussiennes ajoutées durant le calcul est modulée en fonction de la surface d'énergie déjà estimée limitant le risque de sur-visiter les régions déjà correctement échantillonnées.

2.2.5 Méthodes adiabatiques et dérivées

Cette dernière section regroupe les méthodes d'énergie libre dites adiabatiques où l'échantillonnage de la surface d'énergie libre est réalisée par le biais d'un couplage entre la coordonnée de réaction et un degré de liberté fictif ou appartenant à un autre espace des phases que le système simulé et possédant une température et une masse plus élevée.

L'idée se retrouvant derrière les méthodes adiabatiques est de pouvoir accélérer l'échantillonnage de la ou des coordonnées de réaction en introduisant une température artificielle et supérieure à celle de la simulation [50, 51, 52, 53, 54]. L'inconvénient

majeur de cette méthode provient du fait que les coordonnées doivent être transformées en un jeu de coordonnées généralisées contenant explicitement la ou les variables collectives étudiées [50].

Afin d'éviter de ré-écrire les équations du mouvement en fonction des coordonnées de réaction, la stratégie utilisée est d'élargir le système de coordonnées initiales en couplant les variables collectives à des métavariabes dans un espace des phases différents. Le modèle consiste à associer à une variable q_α servant de coordonnée de réaction, fonction des coordonnées cartésiennes q , un autre degré de liberté s avec une masse μ . Les deux étant couplés à travers un potentiel $V(q, s)$. L'hamiltonien décrivant ce système s'écrit

$$H = \frac{p_q^2}{2m} + \frac{p_s^2}{2\mu} + V(q, s) \quad (2.64)$$

Les équations du mouvement associées sont

$$m\ddot{q} = -\nabla_q V_k(q, s) + \text{thermo}(\beta_q) \quad (2.65)$$

$$\mu\ddot{s} = -\nabla_s V_k(q, s) + \text{thermo}(\beta_s) \quad (2.66)$$

Les termes $\text{thermo}(\beta_q)$ et $\text{thermo}(\beta_s)$ sont présents pour indiquer que ces deux variables sont couplées à des thermostats différents avec pour températures respectives T_q et T_s telles que $T_s \gg T_q$. $V_k(q, s)$ est un potentiel effectif regroupant l'énergie potentielle du système physique $V(q)$ et un potentiel harmonique de couplage entre la coordonnée de réaction et la métavariable associée $V_\kappa = \frac{\kappa}{2}(q_\alpha - s)^2$, κ est une constante de couplage. Ce dernier peut être assimilé à un potentiel de biais dans le sens où la variable s plus massive va entraîner la variable q_α et pousser cette dernière dans les zones plus hautes en énergie. Ces dernières devenant accessibles à s car se déplaçant avec une température bien supérieure.

La séparation adiabatique est assurée par le paramètre μ . À nouveau, un parallèle peut être fait ici avec la méthode de Nosé-Hoover présentée dans la partie avec les

thermostats où la masse Q de la variable introduite déterminait le couplage entre le réservoir et le système réel et gouvernait les fluctuations de température. L'adiabaticité est conservée tant qu'il n'y a aucun transfert d'énergie entre les deux degrés de liberté couplés. Cette condition est obtenue en introduisant une différence importante entre les masses associées aux coordonnées de réaction du système physique et celles des variables associées dans l'espace étendue (découplage adiabatique).

Le profil d'énergie libre est directement obtenu grâce à la distribution de probabilité générée adiabaticquement,

$$G(s) = -\frac{1}{\beta_s} \ln P_{\text{adb}}(s) \quad (2.67)$$

On retrouve ainsi l'expression traditionnellement utilisée pour obtenir un potentiel de force moyen à partir de la densité de probabilité. La seule différence provient du fait que la température T_s de la variable s est utilisée.

Il est ainsi primordial de maintenir à une valeur donnée la température des deux degrés de liberté, ceci étant réalisé en couplant chacune de ces deux coordonnées à un thermostat. Les thermostats utilisés sont généralement, le thermostat basé sur les chaînes de Nosé-Hoover [55], le thermostat de Langevin ou encore le thermostat GGMT (Generalized Gaussian Moment Thermostat) [23].

Dans l'optique d'accélérer encore l'échantillonnage, Chen et Al. [56] ont proposé une méthode combinant les caractéristiques de plusieurs méthodes destinées à calculer l'énergie libre. Cette nouvelle approche reste basée sur la méthode adiabatique d'AFED. L'hamiltonien du système reste donc le même

$$\tilde{H}(\mathbf{r}, \mathbf{p}, s, \mathbf{p}) = H(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + \sum_{\alpha=1}^n \left[\frac{p_{\alpha}^2}{2\mu_{\alpha}} + \frac{\kappa_{\alpha}}{2} (q_{\alpha}(\mathbf{r} - s_{\alpha}))^2 \right] \quad (2.68)$$

Où α correspond à un jeu de variables collectives, s et \mathbf{p} correspondent à la position et à l'impulsion de la métavariable liée à la variable α , μ_{α} est la masse fictive associée et κ_{α} le paramètre de couplage entre la coordonnée de réaction q_{α} et la métavariable associée

s_α . On retrouve l'Hamiltonien avec un terme lié à la dynamique du système physique $H(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ et un autre lié à l'énergie cinétique de la métavariable et finalement le terme de couplage harmonique entre les deux.

La composante finale est l'introduction du potentiel de biais, semblable à celui introduit lors d'un calcul de métadynamique, pour réduire la fréquence des visites des bassins d'énergie déjà visités. Dans l'optique de maximiser la synergie entre le potentiel de biais et la température élevée, le biais est introduit dans l'espace des phases de la variable couplée s , cette dernière assurant l'échantillonnage. Ce biais est construit au cours de la simulation en ajoutant des potentiels d'énergie libre à intervalle réguliers

$$U_{\text{bias}}(s, t) = h \sum_{l, t_l < t} e^{-\|s-s(t_l)\|^2/2\sigma^2} \quad (2.69)$$

Où h est la hauteur des gaussiennes et σ leur largeur. Du à l'ajout de ce potentiel de biais, rien ne garantit que la surface d'énergie libre puisse être encore obtenue à partir de la distribution des probabilités dans l'espace étendue. À la place, il est possible d'estimer la force moyenne appliquée par le système physique le long de s . Cette dernière possède l'avantage de pouvoir être estimée localement contrairement à la densité de probabilité qui requiert la connaissance de la distribution sur toute la coordonnée de réaction

$$F_\alpha(s) = -\frac{\partial G}{\partial s_\alpha} = -\frac{\partial}{\partial s_\alpha} \ln P_\kappa(s) = \langle \kappa_\alpha(q_\alpha(\mathbf{r} - s_\alpha)) \rangle_s \quad (2.70)$$

Où la moyenne est faite sur une distribution canonique à différentes positions de s . La force ainsi évaluée est indépendante de la température et du potentiel de biais. À l'instar de ABF, cette force est ensuite intégrée pour obtenir le profil d'énergie libre correspondant. Comme pour estimer l'énergie à partir de la distribution des probabilités, la force moyenne peut être évaluée à partir des simulations temps que l'adiabaticité est respectée.

Il existe plusieurs possibilité pour s'assurer que l'adiabaticité soit bien respectée

durant la simulation. Une méthode consiste à suivre l'énergie totale liée à la variable s et contrôler que cette quantité reste bien constante au cours du temps. Si cette quantité n'était pas conservée, ce serait alors le signe qu'un échange de travail se produit entre le système physique et le système associé à la métavariation. Une autre façon est de calculer la température configurationnelle [57]

$$T_{\text{config}} = \frac{1}{k_B} \frac{\langle |\nabla U(\mathbf{r})|^2 \rangle}{\langle \nabla^2 U(\mathbf{r}) \rangle} = \frac{\kappa}{k_B} \langle (r-s)^2 \rangle \quad (2.71)$$

pour que l'adiabaticité soit respectée, la température configurationnelle doit être équivalente à la température du système physique. Si cette grandeur s'avérait supérieure alors cela serait la signature qu'un transfert de travail ou de chaleur aurait lieu entre les systèmes, brisant de ce fait l'adiabaticité.

Exemple de calcul

En pratique, cette méthode nécessite de choisir correctement la masse de la métavariation m_s et de la constante de couplage κ de telle manière à ce que la coordonnée de réaction q_α échantillonne plusieurs fois autour de la métavariation. Sur les figures 2.6 et 2.7 sont donnés plusieurs exemples d'évolution de l'échantillonnage en fonction des paramètres m_s et κ respectivement. Lorsque m_s est trop faible (figure 2.6), s fluctue beaucoup autour de q_α correspondant à l'effet opposé recherché. Ce n'est que pour des masses plus importantes que l'on commence à observer un échantillonnage correct de q_α autour d'une valeur constante de s , soit pour des masses m_s supérieures à 10^3 amu. De plus, lorsque la constante de couplage κ est trop faible (figure 2.7), q_α et s sont complètement décorrélés l'un de l'autre, ce n'est que pour des valeurs de κ supérieures à 10^5 kJ.mol⁻¹.nm⁻² que la coordonnée de réaction et la métavariation se comportent de manière correcte.

Comme la masse assure la condition d'adiabaticité, une masse trop faible conduit

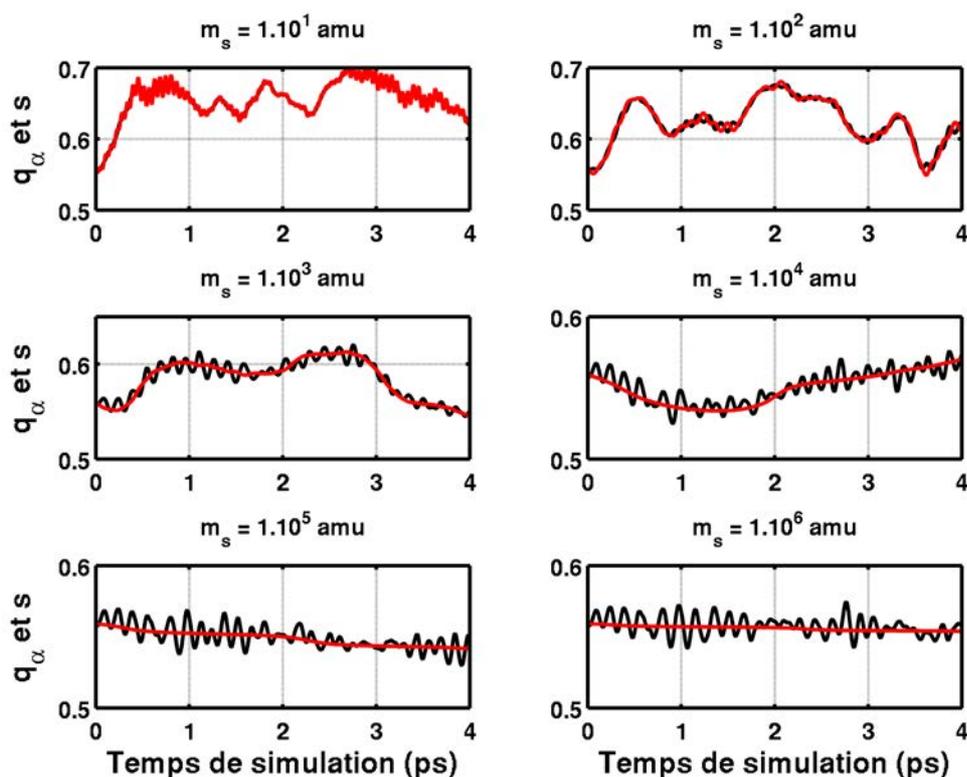


FIGURE 2.6 – Évolution de la variable collective q_α en noir et de la métavariable s en rouge associée pour une température $T_s = 400$ K et une constante de couplage $\kappa = 1,0 \times 10^5$ kJ.mol⁻¹.nm⁻² pour différentes valeurs de m_s

à la non conservation d'énergie comme montré sur la figure 2.8. Ceci n'est cependant pas repérable avec les constantes de couplage qui même trop faible n'influe pas sur la conservation de l'énergie.

Pour chaque calcul, il a été nécessaire de s'assurer de la conservation de l'énergie totale du système (coordonnée de réaction + métavariable, voir 2.9) et d'observer l'évolution de T_{config} , la température configurationnelle, cette dernière devant être égale à la température du système simulé.

La convergence des profils a été étudiée avec la même procédure utilisée pour les profils obtenues avec la méthode de force de biais adaptatif. La figure 2.10 montre le

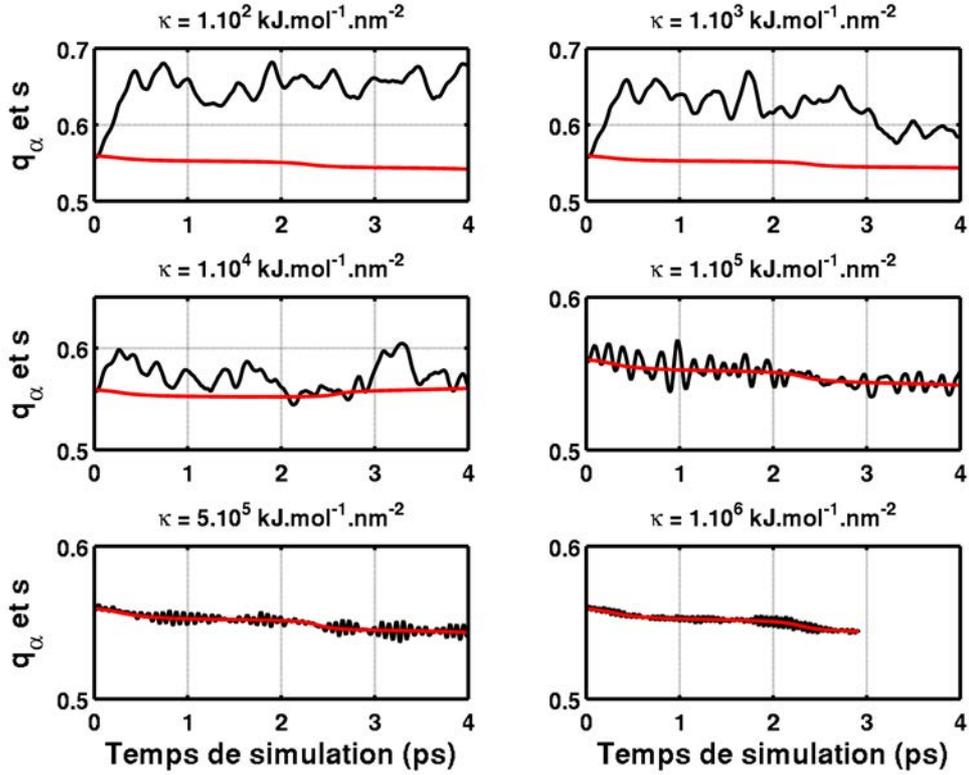


FIGURE 2.7 – Évolution de la variable collective q_α en noir et de la métavariable s en rouge associée pour une température $T_s = 400$ K et une constante de couplage $m_s = 1,0 \times 10^5$ amu pour différentes valeurs de κ

profil d'énergie libre obtenu avec la méthode UFED correspondant au cas d'une lysine chargée traversant une membrane de POPC. La température configurationnelle et le travail échangé restant constant au cours de la simulation témoigne que l'adiabaticité est bien respectée. Ces mêmes quantité ont été suivit pour chaque calcul d'énergie libre.

La convergence est mesurée comme

$$\Theta = \sqrt{\sum_{\xi} (\Delta G(\xi, t) - \Delta G(\xi, t_{\text{conv}}))^2} \quad (2.72)$$

Où t_{conv} est le temps correspond au profil estimé convergé.

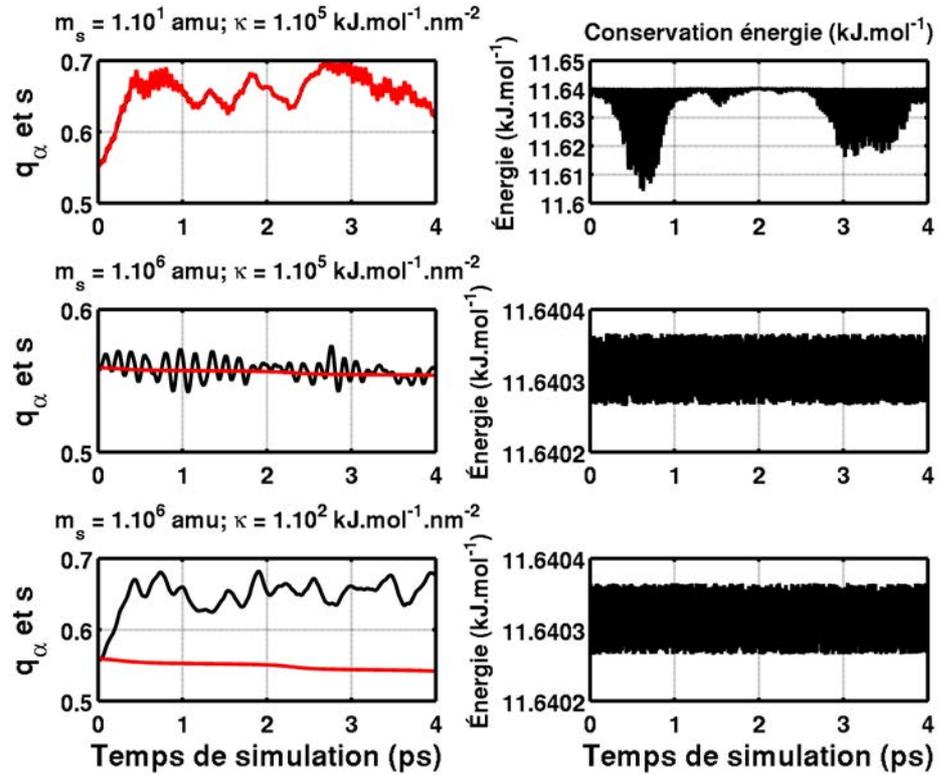


FIGURE 2.8 – Évolution de la variable collective q_α en noir et de la métavariable s en rouge associée pour une température $T_s = 400$ K avec évolution de la conservation de l'énergie pour différentes valeurs de la constante de couplage et de la masse m_s .

Comme pour les profils à une dimension, l'écart quadratique moyen par rapport à la dernière surface d'énergie libre estimée est calculée. La différence entre deux surfaces à deux instants différents est réalisée en sommant la différence d'énergie libre pour deux points équivalents

$$\Theta = \sqrt{\sum_i \sum_j (G_{i,j}(t) - G_{i,j}(t_{\text{final}}))} \quad (2.73)$$

Où $G_{i,j}(t)$ et $G_{i,j}(t_{\text{final}})$ sont les valeurs prises par l'énergie libre pour les coordonnées de réaction aux valeurs i et j aux instants t et t_{final} , fin de la simulation, respectivement.

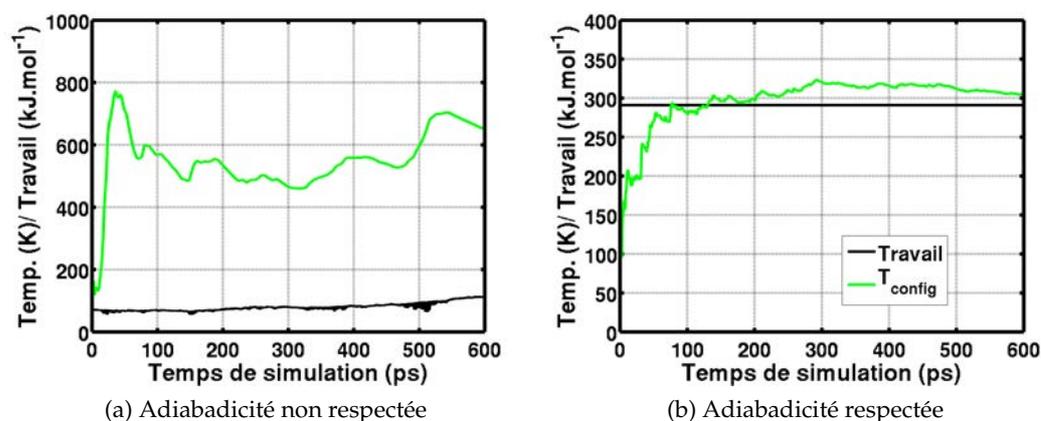


FIGURE 2.9 – Critères d'évaluation des paramètres pour l'estimation de profils d'énergie libre avec UFED

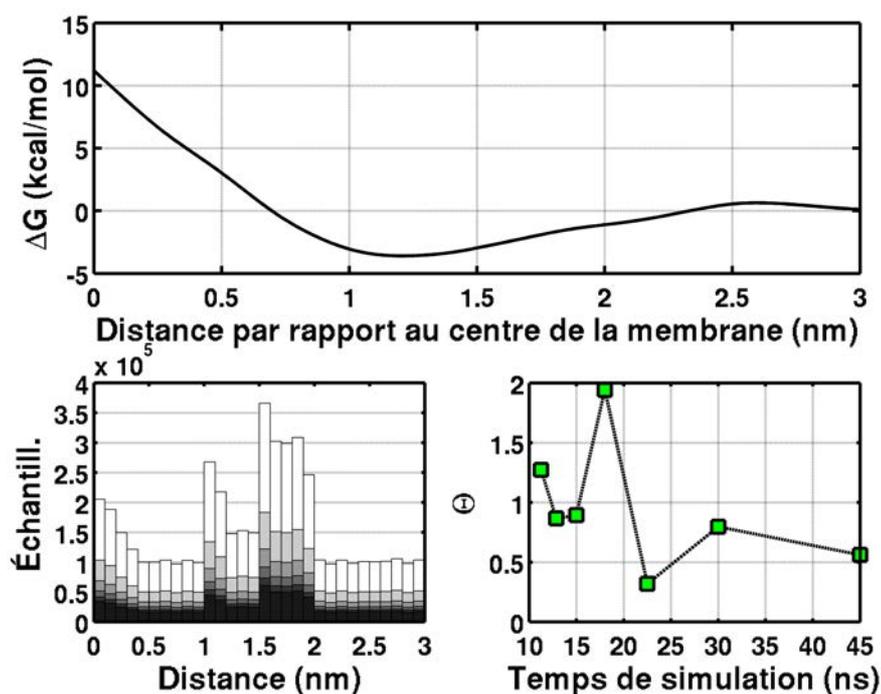


FIGURE 2.10 – Exemple d'un calcul avec la méthode UFED. Haut : Profil d'énergie d'une lysine chargée dans une membrane de POPC estimé avec la méthode UFED. Bas droite : Convergence du profil. Bas gauche : Échantillonnage correspondant à Θ .

2.3 Estimation du pK_a dans les simulations

Dans cette section, il sera montré comment, à partir de l'énergie libre déterminé dans les sections précédentes, il est possible de remonter à une estimation du pK_a d'une molécule titrable dans les simulations. Le pK_a étant une quantité communément utilisée pour décrire la proportion d'espèces sous forme chargée par rapport à la forme neutre. Lorsque qu'un composé acide AH est placé en solution, il se produit alors une réaction acido-basique au cours de laquelle la molécule subit une dissociation, conduisant à l'équilibre chimique suivant



où AH correspond à l'acide, A^- sa base conjuguée et H^+ est le proton libéré lors de la réaction. Lorsque les concentrations de ces trois entités n'évolue plus au cours du temps l'équilibre chimique est atteint et il est alors possible de définir une constante d'équilibre chimique propre au couple acide/base AH/ A^-

$$K_a = \frac{[A^-]_{aq}[H^+]_{aq}}{[AH]_{aq}} \quad (2.75)$$

Cette constante est définie à l'aide des concentrations des espèces impliquées dans l'équilibre $[A_{aq}^-]$, $[H_{aq}^+]$ et $[AH_{aq}]$. Cependant, cette grandeur peut prendre des valeurs plus ou moins élevée et il est plus commode de travailler avec le logarithme

$$pK_a = -\log_{10} K_a \quad (2.76)$$

Ainsi, plus le pK_a sera petit, plus l'acide aura tendance à se dissocier dans l'eau et plus l'acide sera qualifié de fort. Réciproquement, sa base conjuguée sera faible. Comme la constante d'acidité est la mesure de l'équilibre d'une réaction acido-basique, le pK_a est

une caractéristique propre à un couple acide/base.

Une molécule titrable est en équilibre entre sa forme ionisée et sa forme neutre, le rapport d'espèce entre ces deux états étant donné par le pK_a de la molécule et le pH de la solution. La connaissance du pK_a et de la concentration en espèces du couple acide/base permet de remonter à la valeur du pH de la solution. Inversement, la connaissance du pH, combinée à la valeur du pK_a du couple en question permet d'en déduire les concentrations à l'équilibre. Partant de la définition de la constante d'acidité et en utilisant la définition du pH, il est possible d'obtenir l'équation de Henderson-Hasselbach. Soit le pK_a l'équilibre acido-basique 2.74

$$pK_a = -\log \frac{[A^-]_{aq}[H^+]_{aq}}{[AH]_{aq}} \quad (2.77)$$

En utilisant la définition du pH, $pH = -\log[H^+]$, on en déduit l'équation de Henderson-Hasselbach

$$pK_a = -\log \frac{[A^-]_{aq}}{[AH]_{aq}} + pH \quad (2.78)$$

Cette équation relie le pK_a au pH ainsi qu'aux concentrations du couple acide/base. Il est possible d'exprimer cette équation de manière à ne plus travailler avec des concentrations. En effet, ces dernières sont reliées à l'énergie libre de leurs états associés, plus évident à manipuler en simulation

$$pK_a = -\log K_a = -\log \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} = \frac{(G_{A^-} + G_{H^+}) - G_{AH}}{2,303 \times RT} = \frac{\Delta G_{réaction}}{2,303 \times RT} \quad (2.79)$$

Où G_{A^-} , G_{AH} et G_{H^+} sont les énergies libre de formation associées aux molécules A^- et AH respectivement. L'énergie libre associée à la réaction acido-basique est donnée par $\Delta G_{réaction}$, R est la constante des gaz parfaits et T la température. Le pK_a d'un composé est sensible à son environnement. Dans le cas d'une bicouche constituée de phospholipides, l'environnement peut être considéré comme homogène dans le plan

perpendiculaire à la normale de la surface et le pK_a n'est supposé varié uniquement suivant z , la normale par rapport à la surface. Le pK_a peut être estimé comme étant dépendant de cette coordonnée

$$pK_a(z) = \frac{\Delta G_{\text{réaction}}(z)}{2,303 \times RT} \quad (2.80)$$

Dans des simulations de dynamique moléculaire classiques, le pH n'est pas un paramètre explicite et manipuler des quantités liées aux protons n'est pas évident. Pour cette raison, il est plus commode de travailler avec des ΔpK_a représentant la différence d'état de protonation entre deux environnements distincts. Ce ΔpK_a peut ensuite être ajouté à une valeur du pK_a déjà connue, comme dans un milieu aqueux, pour ensuite en déduire un profil de pK_a .

$$pK_a(z) = \frac{1}{2,303 \times RT} \Delta G(z) \quad (2.81)$$

$$= \frac{1}{2,303 \times RT} \left[\left(G_{A\bar{a}\text{aqueux}} + G_{H^+} \right) - G_{AH\text{aqueux}} \right] \\ + \left[\left(G_{A^-(z)} - G_{A\bar{a}\text{aqueux}} \right) - \left(G_{AH(z)} - G_{AH\text{aqueux}} \right) \right] \quad (2.82)$$

$$= \frac{1}{2,303 \times RT} \left[\Delta G_{\text{aqueux}} + \Delta \Delta G(z) \right] \quad (2.83)$$

$$= pK_{a\text{aqueux}} + \Delta pK_a(z) \quad (2.84)$$

où $\Delta \Delta G(z)$ est la différence d'énergie libre entre la réaction dans le milieu aqueux et une position z dans la membrane. Afin d'évaluer l'état de protonation du peptide, des calculs d'énergie libre seront conduits afin d'estimer la différence d'énergie libre en différents points le long de la normale à la membrane pour ensuite estimer le pK_a de ce peptide dans l'environnement associé à ces positions.

2.4 Cinétique

Une autre information intéressante pour la thématique du transfert d'espèces à travers des membranes biologiques est la cinétique associée à ce processus. L'énergie libre est une grandeur thermodynamique et donne des informations sur la faisabilité du processus ou de la réaction. Dans cette section, les théories permettant d'extraire des informations sur la cinétique, c'est à dire la rapidité du transfert, sont présentées. En premier, les méthodes permettant d'estimer la diffusion seront montrées pour ensuite passé aux modèles permettant d'estimer la perméation, la vitesse avec laquelle la molécule passe au travers de la membrane, et les taux de réaction.

2.4.1 Diffusion

Différentes méthodes existent pour estimer la constante de diffusion d'une molécule. L'application d'une méthode particulière dépend du système étudié. Deux méthodes seront présentées, la première repose sur l'estimation de l'écart quadratique moyen, comme cette méthode n'est adaptée que dans le cas de systèmes homogènes, la seconde méthode, moins commune, permet d'estimer le coefficient de diffusion à l'intérieur de la membrane à une profondeur donnée.

Relation d'Einstein, diffusion et écart quadratique moyen

En solution, la trajectoire d'une molécule est loin d'être balistique. Les collisions aléatoires avec les autres molécules présentes empêchent cette dernière de suivre une trajectoire rectiligne. Le chemin effectué par la molécule au cours du temps se rapproche plus d'une marche aléatoire. Ce comportement a été étudié par Einstein dans le cadre du mouvement brownien qui a démontré que l'écart quadratique moyen de la

trajectoire est proportionnel à sa durée

$$\langle \Delta \mathbf{r}_i(t)^2 \rangle = \langle (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0))^2 \rangle = 2NDt \quad (2.85)$$

Où N est la dimensionnalité, t le temps et D le coefficient de diffusion. Le vecteur $\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)$ mesure la distance parcourue par la molécule après un temps t . Dans le cas d'une trajectoire balistique (sans collisions), l'écart quadratique moyen évolue comme une puissance de deux au cours du temps. En phase condensée, le régime balistique ne tient que pour une très courte période, cette période correspond au temps moyen de collision. Au delà, l'écart quadratique moyen évolue de manière linéaire avec le temps. Quand ce régime est atteint, il est possible d'en déduire la constante de diffusion comme étant le coefficient de proportionnalité divisé par deux fois la dimensionnalité du système.

Autocorrélation de la position contrainte

Afin d'évaluer le coefficient de diffusion en fonction de la position le long de la membrane, cette dernière se trouvant être un milieu inhomogène, une formulation développée par Woolf et Roux [70] et simplifiée par Hummer [71] a été utilisée. Dans sa formulation originale, cette méthode consistait à évaluer la transformée de Laplace de la fonction d'autocorrélation des vitesses d'une coordonnée de réaction α restreinte par un potentiel harmonique.

$$\hat{D}(s) = \frac{-\hat{C}(s)\langle \delta\alpha^2 \rangle \langle \dot{\alpha}^2 \rangle}{\hat{C}(s)[s\langle \delta\alpha^2 + \langle \delta\dot{\alpha} \rangle / s] - \langle \delta\alpha^2 \rangle \langle \delta\dot{\alpha}^2 \rangle} \quad (2.86)$$

Où s est la variable associée à t dans l'espace des transformées de Laplace et \hat{C} la transformée de Laplace de la fonction d'autocorrélation des vitesses associée à la coordonnée α . Sous cette forme, elle servait notamment à évaluer la diffusion associée à un angle dièdre en haut des barrières d'énergie et avait l'avantage de pouvoir calculer l'énergie

libre et le coefficient de diffusion avec la même simulation. Hummer [71] la simplifia considérablement en utilisant à la place, la fonction d'autocorrélation des positions plutôt que celle des vitesses

$$D(\alpha) = \frac{\delta\alpha^2}{\tau} \quad \text{avec} \quad \tau = \frac{\int_0^\infty \langle \delta\alpha(t)\alpha(0) \rangle dt}{\langle \delta\alpha^2 \rangle} \quad (2.87)$$

Où τ est le temps de corrélation associée à la coordonnée de réaction.

2.4.2 Perméabilité

Le modèle de solubilité-diffusion est fréquemment utilisé dans le but de calculer des coefficients de perméabilité. Ce modèle fut proposé en 1901 par Overton [72], suite aux idées de Meyer [73], afin de prédire la perméabilité d'une molécule traversant une membrane biologique. Il ne tient pas compte de mécanismes assistés par des protéines membranaires comme les transporteurs, canaux ou pompes qui, à l'époque, n'étaient pas encore connus. De plus, dans sa formulation originale, la membrane est considérée homogène, assimilée à une couche d'huile, et les rafts sont donc ignorés.

Le modèle de Meyer et d'Overton

Dans ce modèle, la perméation est décrite comme un processus en trois étapes. Premièrement la molécule s'adsorbe à l'interface et rentre à l'intérieur de la membrane, passant d'un milieu aqueux à un milieu hydrophobe. Deuxièmement, la molécule diffuse dans le cœur hydrophobe. Troisièmement, la molécule se dissout ensuite dans le milieu aqueux de l'autre côté de la couche hydrophobe.

En suivant ce modèle, il est possible de relier la densité de flux transmembranaire, J , d'une molécule traversant la membrane à son coefficient de partition, K_p entre la phase

aqueuse et une phase organique. La loi de Fick s'écrit alors

$$J = -D_M \nabla c_m = -D_M \frac{c_{1m} - c_{2m}}{d} \quad (2.88)$$

$$J = P_M (c_{2w} - c_{1w}) \quad \text{avec} \quad P_M \equiv \frac{K_p D_M}{d} \quad (2.89)$$

Où D_M est la diffusion, c_{1m} , c_{2m} , c_{1w} , c_{2w} sont les concentrations en molécules passant à travers la membrane et à l'interface, respectivement de part et d'autre de la membrane. Les paramètres x et d sont la distance de la molécule dans la membrane par rapport à la première interface et l'épaisseur de la membrane. La perméabilité P_M est fonction de d l'épaisseur de la couche hydrophobe, D_M le coefficient de diffusion dans la membrane et K le coefficient de partition de la molécule entre la phase aqueuse et une phase hydrophobe, $K = \exp(-\Delta G/k_B T)$ où ΔG est l'énergie libre de solvation.

Afin de rendre compte du caractère inhomogène de la membrane, Marrink et Berendsen [74] ont modifié la formulation originelle de manière à décrire la perméation de manière à relier celle obtenue lors d'expériences, donc des propriétés macroscopiques, à celle obtenue lors de simulations de dynamique moléculaire.

Le flux de particules associé au passage à travers une membrane s'écrit

$$J = cu = -\frac{c}{\xi} \nabla \mu \quad (2.90)$$

Où ξ est le coefficient de friction, u est la vitesse moyenne de la particule, c la concentration et μ le potentiel chimique. Le coefficient ξ est relié à la constante de diffusion par

$$D = \frac{RT}{\xi} \quad (2.91)$$

Dans le cas d'une solution idéale, le potentiel chimique s'écrit $\mu = \mu^0 + RT \ln c$ et l'on retrouve la loi de Fick $J = -D \nabla c$. Dans le cas le cas d'une membrane biologique, où les

propriétés varient le long d'une coordonnée z , le flux s'écrit

$$J(z) = -\frac{c(z)D(z)}{RT} \frac{d\mu(z)}{dz} \quad (2.92)$$

Cette équation décrit le flux de particule à travers la membrane soumis à une force provenant de la variation du potentiel chimique le long de z due à l'inhomogénéité de la membrane. Dans le cas où le flux est stationnaire, i.e. ne dépend plus de la coordonnée z , la différence de potentiel chimique entre un côté z_1 de la membrane et le côté opposé z_2 s'écrit

$$\Delta\mu_i = \mu_i(z_2) - \mu_i(z_1) = -JRT \int_{z_1}^{z_2} \frac{dz}{c(z)D(z)} \quad (2.93)$$

Où $c(z)$ est la concentration en présence du gradient imposé. Si ce dernier est faible, la concentration peut être remplacée par sa valeur à l'équilibre $c_{eq}(z)$ comme si le gradient était inexistant. La résistance de la membrane à la diffusion de la molécule est définie alors comme

$$R^P = c_{aq} \int_{z_1}^{z_2} \frac{dz}{c_{eq}(z)D(z)} \quad (2.94)$$

Où c_{aq} est la concentration en molécules dans le milieu aqueux de chaque côté de la membrane. Le flux devient alors

$$J = -\frac{c_{aq}^* \Delta\mu}{R^P RT} \quad (2.95)$$

Pour établir l'équation 2.94 la membrane est considérée comme étant toujours à une température constante T , le gradient thermodynamique est considéré constant sur la distance de corrélation de la particule, le flux reste proportionnel au gradient (gradient faible) et la perméation ne concerne que des molécules isolées ne ressentant uniquement que la friction dû à la membrane. Les quantités apparaissant dans ces relations ne sont pas celles usuellement manipulées dans les simulations. L'équation 2.94 peut être réécrite en exprimant les concentrations $c_{eq}(z)/c_{aq}$ par la fonction de partition du

système. La concentration locale est donc reliée à la fonction de partition contrainte Z'

$$c_{\text{eq}}(z) Z'(z) = a \int d\mathbf{r} \delta(z - z_0) \exp(-U(\mathbf{r}/k_B T)) \quad (2.96)$$

Où a est une constante. Le rapport des concentrations $c_{\text{eq}}(z)/c_{\text{aq}}$ est donc donnée par le rapport des fonctions de partition à une position z_1 et une autre position située dans le milieu aqueux.

$$\Delta G(z) = -RT \ln \frac{Z'(z)}{Z'(z_1)} = -RT \frac{c_{\text{eq}}(z)}{c_{\text{aq}}} \quad (2.97)$$

La perméation se réécrit comme

$$P(z) = \frac{1}{R(z)} = \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{\Delta G(z)/k_B T}}{D(z)} dz \quad (2.98)$$

Où $P(z)$ est la perméabilité, $R(z)$ la résistivité, $\Delta G(z)$ l'énergie libre à une position z dans la membrane et $D(z)$ le coefficient de diffusion à la même position z . Les bornes de l'intégration z_1 et z_2 sont prises comme les positions dans le milieu aqueux de chaque côté de la membrane.

Perméation de molécules

La perméabilité tel que décrite dans la section précédente est une reformulation de la théorie introduite au début du XX^{ème} siècle par Meyer et Overton pour expliquer le transport de petites molécules organiques à travers la matrice lipidique des membranes biologiques. Depuis sa formulation, ce modèle a été utilisé pour étudier le transfert de nombreuses différentes molécules à travers des membranes phospholipidiques. Parmi ces molécules, un certains nombre d'entre elles semblent échapper à cette règle. Parmi ces dernières se trouve le proton, les molécules pouvant traverser les membranes par le biais de pores, certaines molécules aromatiques et les acides carboxyliques [75].

Pour les espèces chargées électriquement, la barrière d'énergie rencontrée lors du

passage à travers une membrane dû à la perte de son hydratation peut être estimée par l'équation

$$\Delta G_{\text{Born}} = -\frac{q^2}{8\pi\epsilon_0 a} \left(\frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_w} \right) \quad (2.99)$$

Où ϵ_w et ϵ_m sont respectivement la constante diélectrique de l'eau et celle de la membrane. Cette barrière étant importante (plusieurs dizaines de kcal), la membrane est de ce fait imperméable aux espèces chargées, la forme neutre d'une molécule est celle ayant une probabilité plus importante de diffuser à travers la membrane.

Les protons constituent un cas bien particulier, le transfert de ces particules se produirait par la formation de pores dans les membranes et serait à l'origine de leur perméabilité élevée par rapport aux autres espèces chargées. Si un tel mécanisme était effectivement à l'origine de ce taux élevé de perméation alors le modèle d'Overton est effectivement inadapté pour décrire ce passage à travers la membrane. Il en est de même pour toutes les espèces traversant les membranes par le biais de pores existant ou ayant été créés. Les acides carboxyliques, et d'autres acides aromatiques faibles, ont souvent fait l'état de rapport comme étant une exception au modèle d'Overton. En effet, la forme déprotonée, qui est alors la forme chargée, étant la forme dominante passant à travers la membrane en opposition avec la présence d'une barrière d'énergie importante due à l'énergie de Born.

2.4.3 Taux de réaction et temps de passage moyen

La cinétique d'une réaction est usuellement décrite par le taux de réaction. Cette dernière quantité permet d'estimer la rapidité avec laquelle une réaction se produit et peut être exprimé suivant la loi de Van't Hoff-Arrhenius

$$k = v \exp(-\beta E_b) \quad (2.100)$$

où k est le taux de réaction, v est un facteur pouvant dépendre de la température, $\beta = 1/k_B T$ et E_b est l'énergie d'activation, elle correspond à la barrière d'énergie séparant les réactifs des produits. Le temps de passage moyen peut être vu comme l'inverse d'un taux de réaction et correspond au temps mis par un système évoluant aléatoirement pour rejoindre une région donnée de l'espace. Szabo et al. [82] ont dérivé une formulation du temps de passage moyen en se basant sur l'équation de Smoluchowski

$$\frac{\partial}{\partial t} p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0) = L(\mathbf{r}) p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0) \quad (2.101)$$

Où $p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0)$ est la probabilité conditionnelle pour le système commençant à la position \mathbf{r}_0 d'être retrouvé à la position \mathbf{r} au temps t . $L(\mathbf{r})$ est l'opérateur de diffusion

$$L(\mathbf{r}) = \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} D(\mathbf{r}) \left(\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}} + \beta \frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}} \right) \quad (2.102)$$

Cette équation décrit l'évolution d'une particule sous l'action de deux processus, la diffusion et la convection. Kramers [83] se basa également sur cette équation pour obtenir le taux de réaction d'un système passant d'un point A à un point B séparé par une barrière. Dans le cas d'une particule diffusant le long d'une coordonnée de réaction présentant deux puits séparées par une barrière d'énergie potentielle, le temps de passage moyen devient

$$\tau(z_1 \rightarrow z_2) = \int_{z_1}^{z_2} \exp[\beta \Delta G(z)] D^{-1}(z) \times \left[\int_{z_1}^z \exp[-\beta \Delta G(\xi)] d\xi \right] dz \quad (2.103)$$

Où les bornes de l'intégration z_1 et z_2 sont prises comme étant le milieu aqueux de chaque côté de la membrane, ΔG est l'énergie libre le long de z et $D(z)$ le coefficient de diffusion.

Une autre formulation pour estimer les constantes cinétiques liées à des processus de transport a été développée par Wang et al. [84]. Le principe est basé sur une

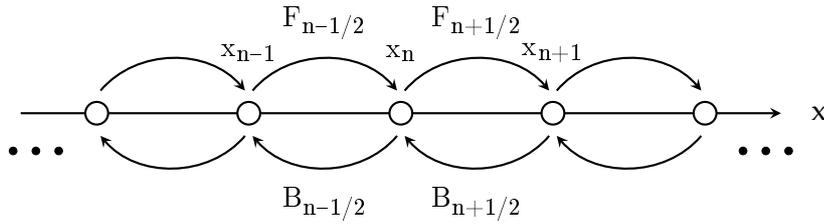


FIGURE 2.11 – Représentation de la discrétisation du processus de transfert le long de la coordonnée de réaction associé au saut entre différents sites selon la méthode de Wang et Al. [84].

représentation différentielle discrète de l'équation de Fokker-Planck, où la coordonnée de réaction est divisée en n sites (voir figure 2.11) et la diffusion est décrite par une chaîne de Markov (les états futurs ne dépendent que de l'état présent et sont finis).

Pour un ensemble d'état discret n tels que $x_n = x_0 + n\Delta x$,

$$\frac{dp_n}{dt} = -(B_{n-1/2} + F_{n+1/2})p_n + F_{n-1/2}p_{n-1} + B_{n+1/2}p_{n+1} \quad (2.104)$$

$$= (F_{n-1/2}p_{n-1} - B_{n-1/2}p_n) - (F_{n+1/2}p_n - B_{n+1/2}p_{n+1}) \quad (2.105)$$

$$= J_{n-1/2} + J_{n+1/2} \quad (2.106)$$

où $p_n(t)$ est la probabilité de trouver la molécule sur le site n au temps t . Les termes F , B et J sont, respectivement, les taux de transitions « aller », « retour » et le flux entre deux sites.

$$F_n = \frac{D_n}{\Delta x^2} \frac{-\alpha}{\exp(-\alpha) - 1} \quad (2.107)$$

$$B_n = \frac{D_n}{\Delta x^2} \frac{\alpha}{\exp(\alpha) - 1} \quad (2.108)$$

où $\alpha = -\Delta G/k_B T$, Δx est la distance entre deux sites et D_n est le coefficient de diffusion.

Bibliographie

- [1] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Phase transition for a hard sphere system. *J. Chem. Phys.*, 27 :1208–1209, 1957.
- [2] X. Wang, F. Xu, J. Liu, B. Gao, Y. Liu, Y. Zhai, J. Ma, K. Zhang, T. S. Baker, K. Schulten, D. Zheng, H. Pang, and F. Sun. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog.*, doi : 10.1371/journal.ppat.1003132, 2013.
- [3] A. Leach. *Molecular Modelling : Principles and Applications (2nd Edition)*. Prentice Hall, 2001.
- [4] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding molecular simulation : From algorithms to applications*. Academic Press, 2002.
- [5] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, and T. P. Straatsma. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, 91 :6269–6271, 1987.
- [6] F. Archambault. Vers une modélisation plus réaliste des systèmes biologiques. <http://www.theses.fr/154514772>, 2011
- [7] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R.L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E.

- Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102 :3586–3616, 1998.
- [8] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, USA, 1989.
- [9] T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh ewald : An $N \cdot \log(N)$ method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98 :10089–10092, 1993.
- [10] A. Y. Toukmaji and J. A. Board. Ewald summation techniques in perspective : A survey. *Comput. Phys. Commun.*, 95 :73–92, 1996.
- [11] J. -P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints : Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23 :327–341, 1977.
- [12] S. Miyamoto and P. A. Kollman. SETTLE : An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, 13 :952–962, 1992.
- [13] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G. E. M. Fraaije. LINCS : A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, 18 :1463–1472, 1997.
- [14] P. Bjelkmar, P. Larsson, M. A. Cuendet, B. Hess, and E. Lindahl. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS : Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. *J. Chem. Theory and Comp.*, 6 :459–466, 2010.
- [15] K. A. Feenstra, B. Hess, and H. J. C. Berendsen. Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *J. Comput. Chem.*, 20 :786–798, 1999.
- [16] L. V. Woodcock. Isothermal molecular dynamics calculations for liquid salts. *Chem. Phys. Lett.*, 10 :257–261, 1971.

-
- [17] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. Di Nola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81 :3684–3690, 1984.
- [18] S. Nosé. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.*, 81 :511–519, 1984.
- [19] W. G. Hoover. Canonical dynamics : Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A*, 31 :1695–1697, 1985.
- [20] S. Toxvaerd and O. H. Olsen. Canonical molecular dynamics of molecules with internal degrees of freedom. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 94 :274–278, 1990.
- [21] M. E. Tuckerman, Y. Liu, G. Ciccotti, and G. J. Martyna. Non-hamiltonian molecular dynamics : Generalizing hamiltonian phase space principles to non-hamiltonian systems. *J. Chem. Phys.*, 115 :1678–1702, 2001.
- [22] G. J. Martyna, M. L. Klein, and M. Tuckerman. Nosé–Hoover chains : The canonical ensemble via continuous dynamics. *J. Chem. Phys.*, 97 :2635–2643, 1992.
- [23] Y. Liu and M. E. Tuckerman. Generalized gaussian moment thermostating : A new continuous dynamical approach to the canonical ensemble. *J. Chem. Phys.*, 112 :1685–1700, 2000.
- [24] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks. Constant pressure molecular dynamics simulation : The langevin piston method. *J. Chem. Phys.*, 103 :4613–4621, 1995.
- [25] G. J. Martyna, D. J. Tobias, and M. L. Klein. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.*, 101 :4177–4189, 1994.
- [26] M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52 :7182–7190, 1981.
- [27] R. W. Zwanzig. High temperature equation of state by a perturbation method. 1. nonpolar gases. *J. Chem. Phys.*, 22 :1420–1426, 1954.

- [28] T. Simonson, G. Archontis, and M. Karplus. Free energy simulations come of age : Protein-ligand recognition. *Accounts Chem. Res.*, 35 :430–437, 2002.
- [29] J. Henin, B. Maigret, M. Tarek, C. Escrieut, D. Fourmy, and C. Chipot. Probing a model of a GPCR/Ligand complex in an explicit membrane environment : The human cholecystokinin-1 receptor. *Biophys. J.*, 90 :1232–1240, 2006.
- [30] W. Cai, T. Sun, P. Liu, C. Chipot, and X. Shao. Inclusion mechanism of steroid drugs into beta-cyclodextrins. insights from free energy calculations. *J. Phys. Chem. B*, 113 :7836–7843, 2009.
- [31] J. Gao, K. Kuczera, B. Tidor, and M. Karplus. Hidden thermodynamics of mutant proteins : A molecular dynamics analysis. *Science*, 244 :1069–1072, 1989.
- [32] S. Boresch and M. Karplus. The role of bonded terms in free energy simulations : 1. theoretical analysis. *J. Phys. Chem. A*, 103 :103–118, 1999.
- [33] C. L. Jorgensen and C. Ravimohan. Monte carlo simulation of differences in free energies of hydration. *J. Chem. Phys.*, 83 :3050–3054, 1985.
- [34] T. C. Beutler, A. E. Mark, R. C. van Schaik, P. R. Gerber, and W. F. van Gunsteren. Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations. *Chem. Phys. Lett.*, 222 :529–539, 1994.
- [35] M. Zacharias, T. P. Straatsma, and J. A. McCammon. Separation-shifted scaling, a new scaling method for lennard-jones interactions in thermodynamic integration. *J. Chem. Phys.*, 100 :9025–9032, 1994.
- [36] A. Pohorille, C. Jarzynski, and C. Chipot. Good practices in free-energy calculations. *J. Phys. Chem. B*, 114 :10235–10253, 2010.
- [37] P. Liu, F. Dehez, W. Cai, and C. Chipot. A toolkit for the analysis of free-energy perturbation calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, 8 :2606–2616, 2012.
- [38] C. H. Bennett. Efficient estimation of free energy differences from monte carlo data. *J. Comput. Phys.*, 22 :245–268, 1976.

-
- [39] D. Rodriguez-Gomez, E. Darve, and A. Pohorille. Assessing the efficiency of free energy calculation methods. *J. Chem. Phys.*, 120 :3563–3578, 2004.
- [40] E. Darve and A. Pohorille. Calculating free energies using average force. *J. Chem. Phys.*, 115 :9169–9184, 2001.
- [41] E. Darve, M. A. Wilson, and A. Pohorille. Calculating free energies using a scaled-force molecular dynamics algorithm. *Mol. Simulat.*, 28 :113–144, 2002.
- [42] D. Chandler. *Introduction to modern statistical mechanics*. Oxford university press, New York, Oxford, 1987.
- [43] J. G. Kirkwood. Statistical mechanics of fluid mixtures. *J. Chem. Phys.*, 3 :300–313, 1935.
- [44] G. Ciccotti, M. Ferrario, J. T. Hynes, and R. Kapral. Constrained molecular dynamics and the mean potential for an ion pair in a polar solvent. *Chem. Phys.*, 129 :241–251, 1989.
- [45] E. A. Carter, G. Ciccotti, J. T. Hynes, and R. Kapral. Constrained reaction coordinate dynamics for the simulation of rare events. *Chem. Phys. Lett.*, 156 :472–477, 1989.
- [46] W. K den Otter and W. J Briels. The calculation of free-energy differences by constrained molecular-dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 109 :4139–4146, 1998.
- [47] A. Laio and M. Parrinello. Escaping free-energy minima. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99 :12562–12566, 2002.
- [48] A. Laio, A. Rodriguez-Forteza, F. L. Gervasio, M. Ceccarelli, and M. Parrinello. Assessing the accuracy of metadynamics. *J. Phys. Chem. B*, 109 :6714–6721, 2005.
- [49] A. Barducci, G. Bussi, and M. Parrinello. Well-tempered metadynamics : A smoothly converging and tunable free-energy method. *Phys. Rev. Lett.*, 100 :20603–20607, 2008.

- [50] L. Rosso and M. E. Tuckerman. An adiabatic molecular dynamics method for the calculation of free energy profiles. *Mol. Simulat.*, 28 :91–112, 2002.
- [51] L. Rosso, P. Mináry, Z. Zhu, and M. E. Tuckerman. On the use of the adiabatic molecular dynamics technique in the calculation of free energy profiles. *J. Chem. Phys.*, 116 :4389–4402, 2002.
- [52] L. Maragliano and E. Vanden-Eijnden. A temperature accelerated method for sampling free energy and determining reaction pathways in rare events simulations. *Chem. Phys. Lett.*, 426 :168–175, 2006.
- [53] G. Ciccotti and S. Meloni. Temperature accelerated monte carlo (TAMC) : A method for sampling the free energy surface of non-analytical collective variables. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13 :5952–5959, 2011.
- [54] A.-P. E. Kunz, H. Liu, and W. F. van Gunsteren. Enhanced sampling of particular degrees of freedom in molecular systems based on adiabatic decoupling and temperature or force scaling. *J. Chem. Phys.*, 135 :104106–104127, 2011.
- [55] G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, and M. L. Klein. Explicit reversible integrators for extended systems dynamics. *Mol. Phys.*, 87 :1117–1157, 1996.
- [56] M. Chen, M. A. Cuendet, and M. E. Tuckerman. Heating and flooding : A unified approach for rapid generation of free energy surfaces. *J. Chem. Phys.*, 137 :24102–24113, 2012.
- [57] H. H. Rugh. Dynamical approach to temperature. *Phys. Rev. Lett.*, 78 :772–774, 1997.
- [58] S. G. Itoh, A. D., and B. R. Brooks. pH replica-exchange method based on discrete protonation states. *Proteins*, 79 :3420–3436, 2011.
- [59] J. Mongan, D. A. Case, and J. A. McCammon. Constant pH molecular dynamics in generalized born implicit solvent. *J. Comput. Chem.*, 25 :2038–2048, 2004.

-
- [60] R. Burgi, P. A. Kollman, and W. F. Van Gunsteren. Simulating proteins at constant pH : An approach combining molecular dynamics and monte carlo simulation. *Proteins*, 47 :469–480, 2002.
- [61] A. M. Baptista, V. H. Teixeira, and C. M. Soares. Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *J. Chem. Phys.*, 117 :4184–4200, 2002.
- [62] U. Borjesson and P. H. Hunenberger. pH-Dependent stability of a decalysine alpha-helix studied by explicit-solvent molecular dynamics simulations at constant pH. *J. Phys. Chem. B*, 108 :13551–13559, 2004.
- [63] A. Onufriev, D. A. Case, and G. M. Ullmann. A novel view of pH titration in biomolecules. *Biochemistry*, 40 :3413–3419, 2001.
- [64] W. Chu, Y. Wu, J. Zhang, Q.-C. Zheng, L. Chen, Q. Xue, and H.-X. Zhang. Constant pH molecular dynamics (CpHMD) and mutation studies : Insights into AaegOBP1 pH-induced ligand releasing mechanism. *Bba - Proteins Proteom.*, 1824 :913–918, 2012.
- [65] K. Bhattacharya, F. T. Andon, R. El-Sayed, and B. Fadeel. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity : Focus on pulmonary inflammation. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, doi : 10.1016/j.addr.2013.05.012, 2013.
- [66] A. Ben-Shimon, D. E. Shalev, and M. Y. Niv. Protonation states in molecular dynamics simulations of peptide folding and binding. *Curr. Pharm. Des.*, 19 :4173–4181, 2013.
- [67] B. H. Morrow, P. H. Koenig, and J. K. Shen. Atomistic simulations of pH-dependent self-assembly of micelle and bilayer from fatty acids. *J. Chem. Phys.*, 137 :194902–194908, 2012.
- [68] W. Bennett, A. Chen, S. Donnini, G. Groenhof, and P. Tieleman. Constant pH simulations with the coarse-grained MARTINI model : Application to oleic acid aggregates. *Can. J. Chem.*, doi : 10.1139/cjc-2013-0010, 2013.

- [69] M.P. Allen and D.J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, USA, 1989.
- [70] T. B. Woolf and B. Roux. Conformational flexibility of o-phosphorylcholine and o-phosphorylethanolamine : A molecular dynamics study of solvation effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 :5916–5926, 1994.
- [71] G. Hummer. Position-dependent diffusion coefficients and free energies from bayesian analysis of equilibrium and replica molecular dynamics simulations. *New J. Phys.*, 7 :34–48, 2005.
- [72] E. Overton. *Studien über die Narcose Zugleich ein Reitrag zur allgemeinen Pharmakologie ...* G. Fischer, 1901.
- [73] H. Meyer. Zur theorie der alkoholnarkose. *Arch. Exp. Path. Pharm.*, 42 :109–118, 1899.
- [74] S. J. Marrink and H. J. C. Berendsen. Simulation of water transport through a lipid membrane. *J. Phys. Chem.*, 98 :4155–4168, 1994.
- [75] A. Missner and P. Pohl. 110 years of the meyer-overton rule : Predicting membrane permeability of gases and other small compounds. *Chem. Phys. Chem.*, 10 :1405–1414, 2009.
- [76] D. Bassolino-Klimas, H. E. Alper, and T. R. Stouch. Solute diffusion in lipid bilayer membranes : An atomic level study by molecular dynamics simulation. *Biochemistry*, 32 :12624–12637, 1993.
- [77] D. Bemporad, C. Luttmann, and J. W. Essex. 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 :1–13, 2004.
- [78] A. V. Thomae, T. Koch, C. Panse, H. Wunderli-Allenspach, and S. D. Krämer. Comparing the lipid membrane affinity and permeation of drug-like acids : The intriguing effects of cholesterol and charged lipids. *Pharm. Res.*, 24 :1457–1472, 2007.

-
- [79] J. de Gier, J. G. Mandersloot, and L. L. van Deenen. Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 150 :666–675, 1968.
- [80] M. C. Blok, E. C. van der Neut-Kok, L. L. van Deenen, and J. de Gier. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 406 :187–196, 1975.
- [81] J. Gier, L. L. M. Deenen, and K. G. Senden. Glycerol permeability of erythrocytes. *Experientia*, 22 :20–21, 1966.
- [82] A. Szabo, K. Schulten, and Z. Schulten. First passage time approach to diffusion controlled reactions. *J. Chem. Phys.*, 72 :4350–4358, 1980.
- [83] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7 :284–304, 1940.
- [84] H. Wang, C. S. Peskin, and T. C. Elston. A robust numerical algorithm for studying biomolecular transport processes. *J. Theor. Biol.*, 221 :491–511, 2003.

Chapitre 3

Résultats

Sommaire

3.1	Transfert de molécules à travers des membranes en simulations	104
3.2	Résultats préliminaires - Interface hydrophile/hydrophobe	108
3.3	Paramètres de simulations	111
3.4	Protonation et cinétique du transfert d'un peptide titrable à travers une membrane de PO	
3.4.1	Détermination du pK_a	122
3.4.2	Cinétique du transfert	127
3.5	Influence de la composition en phospholipides sur le transfert de peptide cationique	131
3.5.1	Influence des chaînes aliphatiques : DPhPC-ester, POPC	132
3.5.2	Influence des branchements glycérols et des carbonyles : DPhPC-éther, DPhPC-ester	136
3.5.3	Conclusion	141
3.6	Profils multidimensionnels	142
3.6.1	Définition des variables collectives	143
3.6.2	Production des surfaces d'énergie libre	144
3.6.3	Profils de pK_a multidimensionnel	147
3.7	Conclusion générale	148
1	Calculs des profils électrostatiques et de pressions le long de la normale à la membrane	169
1.1	Théorie	169

1.2	Résultats	172
2	Profils de diffusion	173
3	Convergence	174
3.1	Profil à une dimension	174
3.2	Profils multidimensionnels	175

Ce chapitre présente les résultats centraux obtenus aux cours des travaux menés durant cette thèse. J'ai déjà présenté les protocoles utilisés pour s'assurer de la bonne conduite des calculs ont été déjà discutés au cours du chapitre 2. De ce fait, sauf exception, je m'attacherai plus à décrire ici la manière dont ces calculs ont été conduit, pour chacun d'eux. En premier lieu, l'état de l'art des simulations impliquant le transfert de molécules est présenté. La deuxième partie introduit les résultats obtenus sur une interface eau/hydrophobe simple pour ensuite passer, dans une troisième partie, à une membrane de POPC. La thermodynamique du processus de transfert y est étudiée ainsi que l'aspect cinétique. La partie suivante est consacrée à l'étude de l'influence de la composition en lipide de la bicouche sur l'état de protonation d'un peptide modèle. Les molécules de lipides utilisées pour les membranes biologiques modèles y seront présentées suivi par les propriétés physico-chimiques des membranes ainsi formées. Le résultat sur le transfert y sera discuté en utilisant les profils d'énergie libre obtenus à l'aide des méthodes présentées dans les chapitres précédents. Finalement, la dernière partie traitera de l'utilisation de profils d'énergie libre multidimensionnels afin d'étudier le transfert d'espèces titrables à travers des bicouches phospholipidiques.

3.1 Transfert de molécules à travers des membranes en simulations

Les premières simulations de modèles de membranes lipidiques menées par Van der Ploeg et Berendsen [1] impliquèrent 2 couches de 16 molécules surfactantes (dé-

canoate) et furent simulées sur 80 ps. Depuis, les systèmes membranaires simulés ont gagné en taille et en complexité. Associé au développement des méthodes de calcul d'énergie libre, les études thermodynamiques sur le transfert de molécules de complexité croissante à travers des membranes biologiques modèles deviennent de plus en plus courantes. L'une des premières molécules dont le transfert a été étudié est la molécule d'eau [3] suivit par les effets de molécules anesthésiantes sur des membranes et leurs interactions avec les molécules de lipides [4, 5, 6, 7], de l'estimation de l'énergie libre de transfert d'ions sodium et chlorure à travers une membrane constituée de glycérol monooléate [8] et de petites molécules dans une membrane de DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [9].

L'estimation de l'énergie libre de transfert de petites molécules (eau, dioxygène, monoxyde et dioxyde de carbone, chloroforme et monoxyde d'azote) dans une bicouche lipidique par différentes approches sont ensuite survenues [10]. Suivie par des simulations de molécules plus complexes comme des sucres tel que le ribose [11], le di-mannose [12] et le tréhalose [13], d'ions sous forme de paire ioniques [14] ou non [15, 16], des analogues d'acides aminés dans une couche hydrophobe [17] ou des membranes phospholipidiques [18, 19, 20] et avec estimation du profil de pK_a pour les espèces titrables [21]. Certaines de ces études utilisèrent un modèle de continuum électrostatique pour modéliser la membrane où les têtes polaires et les chaînes aliphatiques avaient des constantes diélectriques différentes ($\epsilon_{\text{eau}} = 80$, $\epsilon_{\text{têtes}} = 10$ sur 8 Å, $\epsilon_{\text{chaîne}} = 2$ sur 25 Å) [22]. Ces résidus, insérés seuls dans la membrane, ont également été reliés à une hélice- α dans le but de déterminer le coût de leur insertion dans la membrane [23] et des études similaires se sont uniquement focalisées sur un résidu, l'arginine, [24, 25] et en comparant avec la lysine [116]. Le coût énergétique lié à la mutation d'acides aminés appartenant à des protéines membranaires dans des membranes constituées de phospholipides a été exploré par des méthodes de transformations alchimiques [26]. L'effet de la composition en lipides sur l'insertion d'analogues d'acides am-

inés à l'intérieur d'une bicouche lipidique a également été étudié [27] ainsi que l'influence de la concentration en cholestérol et des insaturations des chaînes aliphatiques sur l'énergie de solvatation d'un analogue d'arginine par une approche FEP (Free energy perturbation) [28] et sur l'énergie libre de transfert de différentes molécules organiques [29, 30, 31].

Les estimations de l'énergie libre de transfert de plusieurs composés à visées pharmaceutiques ont été faites à travers des membranes de phospholipides comme l'acide valproïque à travers du DPPC [32], des molécules de cristaux liquides utilisées dans l'imagerie à l'intérieur du DPPC [33] ou des colorants sensibles à la tension dans du POPC [34], des groupements polaires de médicaments dans du DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [35], l'antibactérien fluoroquinolones à travers du DLPC (1,2-Dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [36], la coumarine et quelques-uns de ses dérivées [37, 38, 39], de l'ibuprofène, de l'aspirine et le diclofénac en fonction de la profondeur et de la conformation adoptée dans une membrane de DOPC [40], plusieurs variétés de molécules thérapeutiques et leurs métabolites en interactions avec des membranes de DOPC et POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) [41], l'utilisation d'un modèle polarisable pour de petits analogues de médicaments [42] et la perméation de molécules améliorant le transfert de médicaments comme le DMSO (diméthylsulfoxyde), l'éthanol ou l'acide oléique à travers des membranes modélisant l'épiderme et constituées de céramides [43].

Ce sont parfois des hydrocarbures [44] ou des molécules de lipides entières qui ont été transférées afin de comprendre les mécanismes liés au maintien de l'asymétrie dans les membranes [45, 46, 47, 48, 49].

Compte tenu des possibilités d'application et l'importance qu'ils occupent dans le domaine pharmaceutique, le transfert de CPP comme des polyarginines [50, 51] et de peptides antimicrobiens comme la magainine [52], de peptides synthétiques (WALP et LS3) [53], des amyloïdes- β [54], des β -peptides (peptides constitués d'acides aminés β)

[55], l'association de la protegrin-1 sur une membrane constituée de POPE-POPG [56], l'indolicine sur des modèles de membranes eucaryote et procaryote [57], l'adsorption de la mélitine [58] de la transportan [108] et diverses toxines [59] ont été étudiées.

En raison de l'importance des nanoparticules et des possibles effets toxiques sur la santé, plusieurs simulations ont été menées pour étudier le passage de différentes variétés de nanostructures, comme des fullerènes de différentes tailles [60, 61, 62, 63, 64, 65], des fullerols $C_{60}(OH_{20})$ [66], des fullerènes fonctionnalisés avec des molécules plus complexes [67, 68, 126] ou des dendrimères avec différentes terminaisons [69]. D'autres formes carbonées correspondant à des molécules de fullerènes malformées [70], des cages de carbone [71] et des molécules d'adamantanes fonctionnalisées [127] ont également été étudiées. Le cas de nanoparticules Janus (constituées par deux types d'atomes) a également été étudié [72].

Sur toutes ces études impliquant l'estimation de l'énergie libre de transfert à travers des modèles, plus ou moins complexes de membranes biologiques, relativement peu d'entre elles abordent la question de l'état de protonation des résidus titrables des molécules en fonction de leurs positions à l'intérieur de la membrane [32, 21, 20] et de l'influence des lipides sur ce dernier [27]. Pour cette raison, trois membranes, chacune constituée par un type de phospholipide, ont été étudiées dans cette thèse, POPC, DPhPC(ester) (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et DPhPC(éther) (diphytanoyl-phosphatidyl-choline). L'étude du transfert d'espèces titrables à travers deux de ces membranes particulières n'a encore jamais été étudiée. Considérant le nombre important de molécules thérapeutiques existantes, un résidu titrable cationique simple a été considéré car se retrouvant dans un certains nombre de molécules thérapeutiques afin d'étudier son état de protonation en fonction de son transfert à travers une membrane biologique.

3.2 Résultats préliminaires - Interface hydrophile/hydrophobe

Durant les chapitres précédents, les membranes phospholipidiques ont été décrites comme offrant différents environnements pour une molécule la traversant. Les premiers travaux de cette thèse concernant le transfert de différents composés ont de ce fait été réalisés sur un système simple constitué par une couche de molécules hydrophobes, des molécules d'octane, de quelques dizaines d'ångströms d'épaisseur. L'espèce la plus simple a été un ion sodium, ce dernier est une charge électrostatique ponctuelle, ce qui a permis d'éviter les problèmes liés à l'échantillonnage de conformations internes. Il s'en est suivi par un analogue d'acide aminé, la lysine. Cette dernière étant une butylamine, molécule possédant un site de protonation au niveau de l'amine. Les profils d'énergie libre obtenus par la méthode ABF sont donnés sur la figure 3.1. La convergence des profils dans ce système, eau/octane, ne présente aucune difficulté particulière. En effet, que ce soit avec des ions, des peptides neutres ou chargés, le temps de convergence pour les profils donnés sur la figure 3.1 est inférieur à 20 ns.

Il en a été de même pour les transformations alchimiques. Des conformations pour lesquelles l'ion sodium se retrouvait à l'intérieur de la phase hydrophobe avec les molécules d'eau reliant la charge au milieu aqueux ont été tirées des simulations ABF. Différentes simulations ont ensuite été conduites afin de pouvoir estimer le temps nécessaire de convergence pour les transformations alchimiques, c'est à dire les temps de simulations pour lesquels l'énergie libre associée à la disparition de l'ion sodium restait constante.

Dans le chapitre 2 sur les méthodes numériques, il a été question de l'introduction d'un potentiel de « soft-core » destiné à éviter toutes divergences dans les calculs en début ou en fin de transformation. Les interactions électrostatiques et de van der Waals peuvent de ce fait être éteintes avant la fin de la transformation ou apparaître durant cette dernière. Dans toutes les transformations faites durant cette thèse, ces interactions

ont été directement introduites dès le début de la simulation.

Il est possible de calculer le profil de densité d'un système simulé par dynamique moléculaire. Ce profil permet d'obtenir des informations sur la structure du système, et donc de l'environnement rencontré par une molécule, par rapport à la normale d'une interface dans le cas d'un système inhomogène. Le profil pour le système eau/octane est donné sur la figure 3.1 avec les profils d'énergie libre.

Une barrière d'énergie de plus en plus importante apparaît lorsque l'espèce chargée se dirige vers l'intérieur de la couche d'octane. La forme neutre possède un puits d'énergie libre à l'interface, représentant son caractère amphiphile. La différence d'énergie libre entre le milieu aqueux et la couche d'octane est négative ($\approx -0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) montrant que l'analogue de la lysine est acide aminé avec un caractère légèrement hydrophobe. Cette observation est en accord avec les données expérimentales de Radzicka et Wolfenden [109] où l'énergie libre de transfert (ΔG_{trans} de différents analogues d'acides aminés à travers différentes interfaces hydrophiles/hydrophobes ont été déterminées. Pour le cas de la chaîne latérale de la lysine, à pH=7, $\Delta G_{\text{trans}} = 0.08 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Lorsque le composé chargé arrive à une certaine distance de l'interface, une dizaine d'ångströms, le doigt d'eau reliant la charge et le milieu aqueux se rompt, laissant la charge avec quelques molécules d'eau comme déjà observé dans d'autres simulations avec une arginine dans du cyclohexane [17]. Dans cette conformation, l'échantillonnage du système par la méthode ABF reste localisé dans la zone proche du centre de la couche hydrophobe. Cet événement est représentatif du cas où le système possède un degré de liberté lent (formation/rupture d'un doigt d'eau) empêchant un échantillonnage correct et donc une estimation correcte de l'énergie libre du transfert de l'ion dans la phase d'octane. Tant que le doigt d'eau est présent, le système diffuse bien librement le long de la coordonnée de réaction. Une fois ce dernier rompu, le système se retrouve isolé dans la phase d'octane comme montré sur la figure 3.1.

Ce système simple a ensuite été utilisé pour estimer la diffusion d'un ion sodium

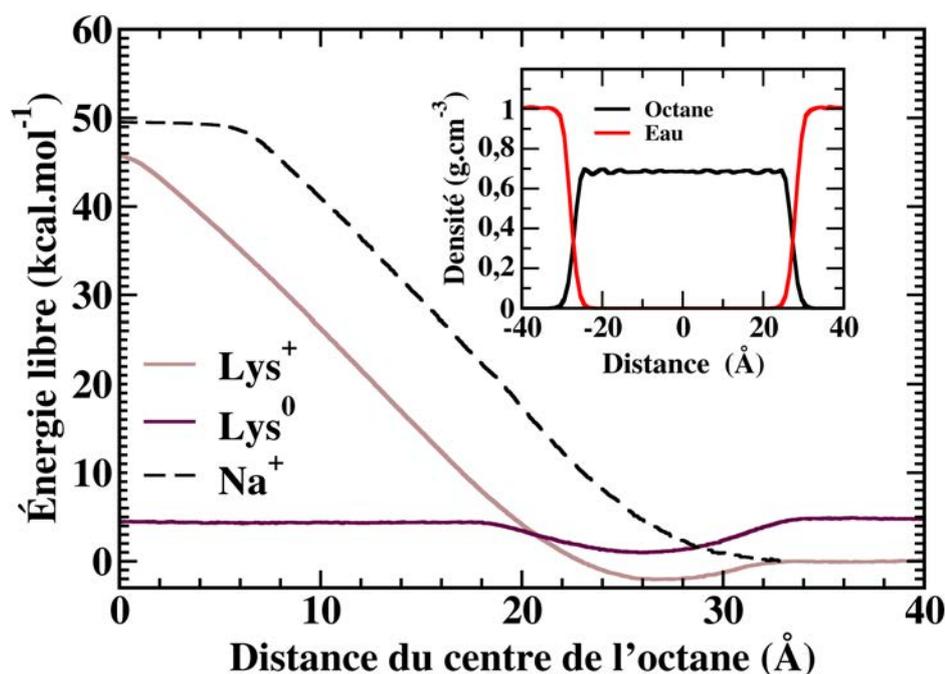


FIGURE 3.1 – Profils d'énergie libre obtenus par la méthode ABF dans une couche d'octane avec un analogue de lysine protonée (brun) et déprotonée (marron). Le profil de la forme neutre de l'analogue neutre est déplacé suivant l'axe des ordonnées par la quantité d'énergie libre requise pour la déprotonation de la butylamine en milieu aqueux. En tirets noirs, le profil d'énergie d'un ion sodium est donné, le plateau apparaissant à 6 Å du centre correspond à la zone où le doigt d'eau se rompt. Le profil de densité du système est donné en encadré en haut à droite des profils, en rouge la densité de l'eau et en noire celle de l'octane.

dans des conformations avec des doigts d'eau à l'intérieur de la couche d'octane. Le profil de diffusion a été construit en faisant une estimation de la diffusion tout les 0.5 Å, pour chaque position 0,5 ns d'équilibration suivi de 1 ns de calcul ont été simulé. Les résultats ont montré que le coefficient de diffusion de l'ion ne semble pas être affecté par la présence de structures d'hydratation. La valeur moyenne trouvée est proche de celle estimée pour la diffusion de l'ion sodium dans l'octane. La valeur estimée pour des ions sodium dans une boîte uniquement constituée uniquement de molécules d'octane

a été de $D_{\text{Na}^+, \text{octane}} = 0,14 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ contre $D_{\text{Na}^+, \text{eau}} = 0,09 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Une autre observation est la distribution importante des valeurs du coefficient de diffusion autour de la valeur moyenne.

3.3 Paramètres de simulations

Afin de rester consistant avec les autres études portant sur le transfert d'analogues d'acide aminé à travers des bicouches phospholipidiques, tous les systèmes sont constitués de lipides assemblés en bicouche de 32 molécules par couche de phospholipides complètement hydratées. Pour le peptide, le champs de force CHARMM27 [99] a été utilisé tandis que pour les lipides ce fut la dernière version CHARMM36 [93]. Cette dernière version ne nécessite plus l'utilisation de tension de surface pour obtenir une aire par lipide correcte et reproduit convenablement différentes propriétés des membranes. Le modèle d'eau utilisé a été le modèle TIP3P [100]. Pour les lipides dont les glycérols sont non-estérifiés, la version originale du champs de force ne possède pas les paramètres pour décrire cette partie des lipides. Pour ce faire, les paramètres dérivés par Shinoda et Al. [85] spécialement pour l'étude d'étherlipides ont donc été utilisés. Il existe bien un autre jeu de paramètres pour les fonctions éthers implémenté dans le champs de force CHARMM [101], mais ce dernier ne permet pas de reconstruire correctement une molécule de phospholipide car les paramètres reliant la fonction éther au phosphate est manquante. Tous les systèmes utilisés pour étudier l'influence de la composition en lipides sur la membrane comporte une concentration physiologique en chlorure de sodium (0,15 M).

Pour les trajectoires générées avec le code de dynamique moléculaire NAMD [102], toutes les simulations ont été conduites dans l'ensemble NPT à 1 atm et à 300 K en utilisant le piston et une dynamique de Langevin avec une constante de friction égale à 1 ps^{-1} . Les interactions électrostatiques longues portées ont été calculées en utilisant

la méthode de « *particle mesh Ewald* » [103]. Les forces longues et courtes portées ont été calculées respectivement toutes les 4 et 2 fs en utilisant l'intégrateur RESPA [104]. Les liaisons covalentes impliquant des atomes d'hydrogènes ont été restreintes avec l'algorithme SHAKE [105].

Les conformations initiales des systèmes ont été construites avec le logiciel PACKMOL [84]. Ce dernier positionne le nombre de molécules voulues dans une boîte en se basant sur des contraintes géométriques définies par l'utilisateur. Les systèmes ont été chauffés ($T = 380$ K) pendant une demi nanoseconde afin de briser la cohésion des queues liés aux interactions de van der Waals. Les systèmes ont ensuite été lentement refroidis à la température désirée en diminuant progressivement la température par paliers successifs (360 K, 320 K et 300 K) en réalisant 2 ns de simulation environ. Une fois la phase chauffage-refroidissement terminée, les systèmes ont été simulés jusqu'à l'équilibration de la bicouche en suivant l'évolution de l'aire par lipide. Lorsque cette dernière arrivait à une valeur proche de celle de la valeur expérimentale et devenait constante sur un dizaine de nanoseconde, le système a été considéré comme étant équilibré.

Pour les trajectoires générées avec Gromacs (version 4.5.5) [2], uniquement le système constitué de 2 couches de 32 lipides de POPC a été utilisé. La configuration de la membrane provient d'un des systèmes préalablement équilibrés. Dans le cas où le système comportait une lysine chargée, un contre ion chlorure a été introduit, dans le cas neutre aucun ion n'était présent. Le champs de force CHARMM36 [93] fut également utilisé pour les lipides et les paramètres pour le peptide sont issus de la version CHARMM27 [99]. Le programme de dynamique moléculaire GROMACS a été compilé avec l'extension PLUMED (version 1.3) [95] incluant les routines permettant d'utiliser les méthodes d'énergie libre d'AFED et UFED (version 0.7) [110]. Le pas de temps utilisé est de 2 fs. La méthode « *Fast Particle-Mesh Ewald* » [113] a été utilisé pour traiter les interactions électrostatiques avec une grille de dimension de 0,165 nm pour les trans-

formées de Fourier rapides (FFT). Le potentiel de Coulomb et de van der Waals ont été atténués à partir de 0.8 nm pour devenir nul à 1.2 nm. La température et la pression sont respectivement maintenues à 300 K et 1 atm en utilisant les chaînes de Nosé-Hoover [112] et le barostat de Parrinello-Rahman [111] avec des constantes de temps respectivement de 0,4 ps et 2,0 ps.

3.4 Protonation et cinétique du transfert d'un peptide titrable à travers une membrane de POPC

Dans cette section, les résultats obtenus dans le cas d'une membrane de POPC seront présentés. Une membrane constituée de molécules de phospholipides présente une interface bien plus complexe que la simple interface eau/octane de la partie précédente comme en témoigne la figure 3.2. Sur cette dernière, le profil de densité de différentes parties de la membrane ayant des propriétés chimiques différentes sont représentées. On y retrouve notamment les cholines, chargées positivement, les groupements phosphates, chargés négativement, les carbonyles puis les chaînes aliphatiques.

Le profil de la figure 3.2 est superposé à une capture de simulation de la membrane de POPC utilisée dans cette partie pour estimer les profils d'énergie libre de transfert et les constantes cinétiques présentées plus loin dans cette section.

Cette section se divise en deux grandes parties. La première est dédiée aux résultats relatifs à l'état de protonation du peptide et s'appuie sur l'estimation du profil de pK_a de ce dernier à travers la bicouche en se basant sur l'estimation de l'énergie libre de transfert. Cette dernière quantité a été estimée de deux manières différentes, les transformations alchimiques et la méthode de force de biais adaptative. La seconde partie se portera plus sur les grandeurs cinétiques liées au transfert comme la perméation et le temps de passage moyen. Les sous-sections suivantes abordent plus en détails les protocoles utilisés impliquant les transformations alchimiques et les profils d'énergie

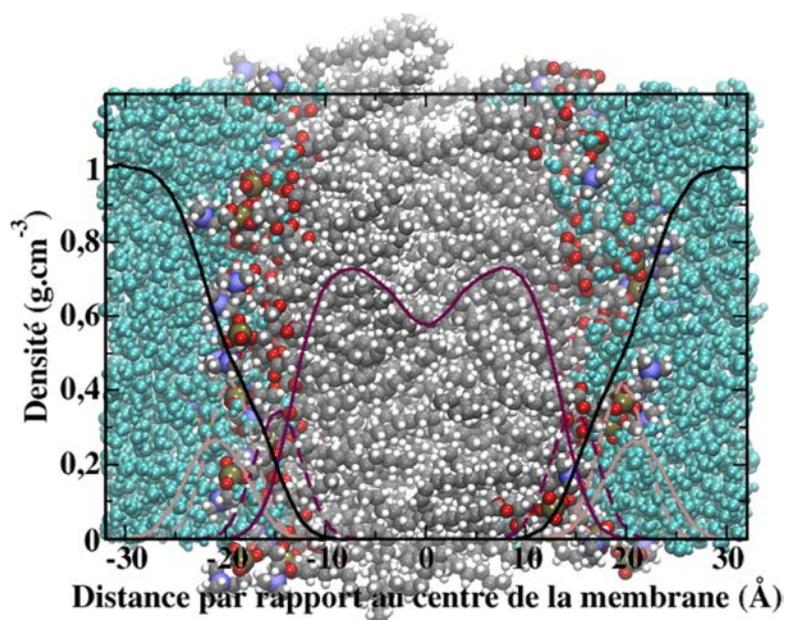


FIGURE 3.2 – Profil de densité pour la membrane de POPC. Légende : noir (trait plein) – eau, brun (trait plein) – choline, brun (tirets) – phosphate, marron (tirets) – glycérol, marron (trait plein) – chaînes aliphatiques. Pour la capture de simulation, cyan – molécules d’eau, bleu – azote des cholines, brun – phosphore des phosphates, rouge – oxygènes des phosphates et des glycérols, blanc – hydrogènes des lipides, gris – carbones des lipides

libre obtenus via la méthode de biais adaptatif.

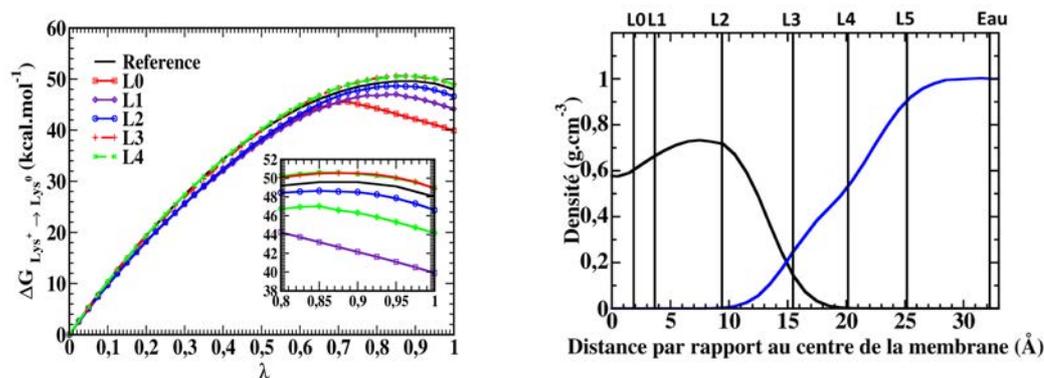
Transformations alchimiques

Pour cette méthode, la topologie duale (Chapitre 2 – section 2.2.2) a été utilisée. Aucun champs de force ne possède cette topologie dans ses archives, il est donc nécessaire de construire la topologie de la molécule où ses deux formes, neutre et chargée, sont représentées. Les transformations à l’intérieur de la membrane à différentes positions (tableau 3.1) ont nécessité la construction du système dans une nouvelle configuration.

Le passage d’une espèce chargée affecte particulièrement la structure de la bicouche avec la création de doigt d’eau permettant l’hydratation de la charge et par le biais d’interaction charge-charge avec les têtes polaires, plus spécialement les atomes de

phosphore des groupements phosphates portant une charge négative venant stabiliser la charge positive portée par le groupement amine de l'analogue de la lysine. Ces phénomènes ont également été observés dans d'autres études [21, 27, 77]. Pour la forme neutre, ces déformations sont plus discrètes et localisées sous la région des glycérols uniquement où une molécule d'eau est impliquée dans la formation d'une liaison hydrogène ($\approx 3 \text{ \AA}$ sous les oxygènes des esters) mais n'accompagne pas l'analogue de la lysine jusqu'au centre de la membrane. Des conformations issues de simulations avec la méthode ABF sont données sur la figure 3.4a pour la forme déprotonée et sur la figure 3.4b pour la forme protonée.

La création des doigts d'eau et la coordination des phosphates n'apparaît pas immédiatement au cours de la simulation lorsqu'une charge est placée dans la membrane, le temps d'apparition de ces phénomènes est d'autant plus long que la charge est éloignée de l'interface et peut prendre plusieurs dizaines de nanosecondes. Pour cette raison, les transformations « aller et retour » n'ont pas été conduites pour les positions les



(a) Évolution de l'énergie libre en fonction de λ pour les transformations présentées dans le tableau 3.1. (b) Positions des transformations marquées sur le profil de densité de la membrane (eau – courbe bleue, queues lipidiques – noire).

FIGURE 3.3 – Résultats des transformations alchimiques conduites en différents points de la membrane de POPC.

plus proches (L0 et L1, voir tableau 3.1) du centre de la membrane. De plus, afin d'économiser les temps de calculs liés à la formation et à l'équilibration de ce type de structure lorsque la molécule protonée se trouve loin de l'interface, des conformations tirées de simulation faites avec ABF (voir section suivante 3.4) où les structures d'hydratation étaient déjà présentes ont été utilisées. L'analogie de la lysine chargée a simplement été remplacée par la molécule dans sa topologie duale. Le système a ensuite été équilibré pendant 2 à 3 ns avec la forme chargée complètement présente et la forme neutre éteinte. Compte tenu du fait que les positions à l'intérieur de la membrane ne sont pas forcément les positions les plus stables (cf figure 3.7), la molécule a donc été contrainte de rester à la position voulue en appliquant des barrières de part et d'autre de sa position d'origine (2 Å de chaque côté le long de la normale à la bicouche), aucune restriction ne fut appliquée directement sur les atomes de la molécule. Cette dernière était libre de diffuser dans le plan perpendiculaire à la normale. Les barrières sont appliquées le long d'une coordonnée de réaction se trouvant être ici la distance entre le centre de masse de la membrane et le centre de masse de la lysine. Lorsque la molécule sort de la zone où elle est supposée rester, un potentiel «semi-harmonique» est appliqué dont la constante de force vaut $10 \text{ kcal.Å.mol}^{-1}$.

Les déformations induites par la présence d'une charge dans le cœur hydrophobe de la membrane conduit à une augmentation des temps de calcul au fur et à mesure que la molécule se retrouve de plus en plus proche du centre de la membrane. En effet, une transformation alchimique faite dans le milieu aqueux ne nécessite que 2 ns de temps de calcul pour avoir une bonne convergence. Les positions au centre sont plus délicates, une transformation nécessite jusqu'à 80 ns de temps de simulation, la transformation est découpée en 40 $\delta\lambda$ chacune de 2 ns (0,8 ns d'équilibration et 1,2 ns de calcul). La région intermédiaire, offrant un environnement plus riche que le milieu aqueux, ne nécessite pas des temps de calculs aussi long, 10 ns dans la partie supérieure des têtes polaires (L5 et L4) et 20 ns dans la partie inférieure (L3 et L2). Ces variations des temps

Index	Positions (Å)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
L0	1.8 ± 0.4	39.77*
L1	4.6 ± 0.5	44.16*
L2	9.5 ± 0.5	47.79 ± 0.11**
L3	15.8 ± 0.7	48.78 ± 0.08**
L4	20.2 ± 1.3	48.77 ± 0.09**
L5	25.3 ± 1.2	48.26 ± 0.06**
Eau	32.1 ± 1.2	48.71 ± 0.05**

TABLE 3.1 – Résultats obtenus avec la transformation alchimique en différentes positions à l’intérieur de la membrane. Les positions sont données en fonction de l’éloignement par rapport au centre de la membrane. La position L0 est la plus proche du centre et la position L5 la plus éloignée. * Transformations ayant lieu uniquement de la forme chargée vers la forme neutre. ** Transformations dans les deux sens, erreurs statistiques évaluées avec ParseFEP et l’estimateur de Bennett [73] dans VMD.

de calcul sont principalement liées à la dynamique plus lentes des chaînes carbonées comparée à la dynamique des molécules d’eau dans le milieu aqueux. Pour toutes les transformations présentées dans ce chapitre, les mêmes paramètres ont été utilisés. La transformation est divisée en 40 fenêtres, pour chacune un tiers du temps de simulation est consacré à l’équilibration et le reste aux calculs d’énergie libre.

Lors d’une transformation alchimique, des erreurs sur l’estimation de l’énergie libre apparaissent lors de la mutation d’une molécule chargée vers une molécule électriquement neutre. Ces erreurs sont des artefacts introduits par l’utilisation de conditions aux limites périodiques. Ces artefacts sont dépendants de la façon dont les interactions à longues portées sont traitées [74, 75]. Dans le cas de simulation conduites avec des boîtes cubiques et avec la sommation d’Ewald, le terme de correction a été estimé comme étant $\xi_{\text{Ewald}} = -2,837/L$, où L correspond à la longueur d’un des côtés de la boîte [74]. Cette énergie supplémentaire est le résultat de l’interaction entre la particule chargée et ses différentes répliques dans les boîtes de simulations voisines. Pour des simulations ayant une taille similaire à celle utilisée durant cette thèse, c’est à dire des bicouches formées de 2×32 lipides, cette correction s’est avérée être négligeable

(inférieure à $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$) [76, 26].

Force de biais adaptatif

Contrairement à l'interface eau/octane, le temps de convergence des profils ABF pour la bicouche lipidique est nettement augmenté, allant jusqu'à 500 ns. Ce temps de simulation sera également équivalent pour les profils d'énergie libre ABF donnés dans le chapitre suivant. Ceci est notamment imputable aux nombreux degrés de liberté lents qu'offre la membrane, comme la réorganisation des chaînes aliphatiques et leurs changements de conformations, les molécules d'eau partiellement liées avec les

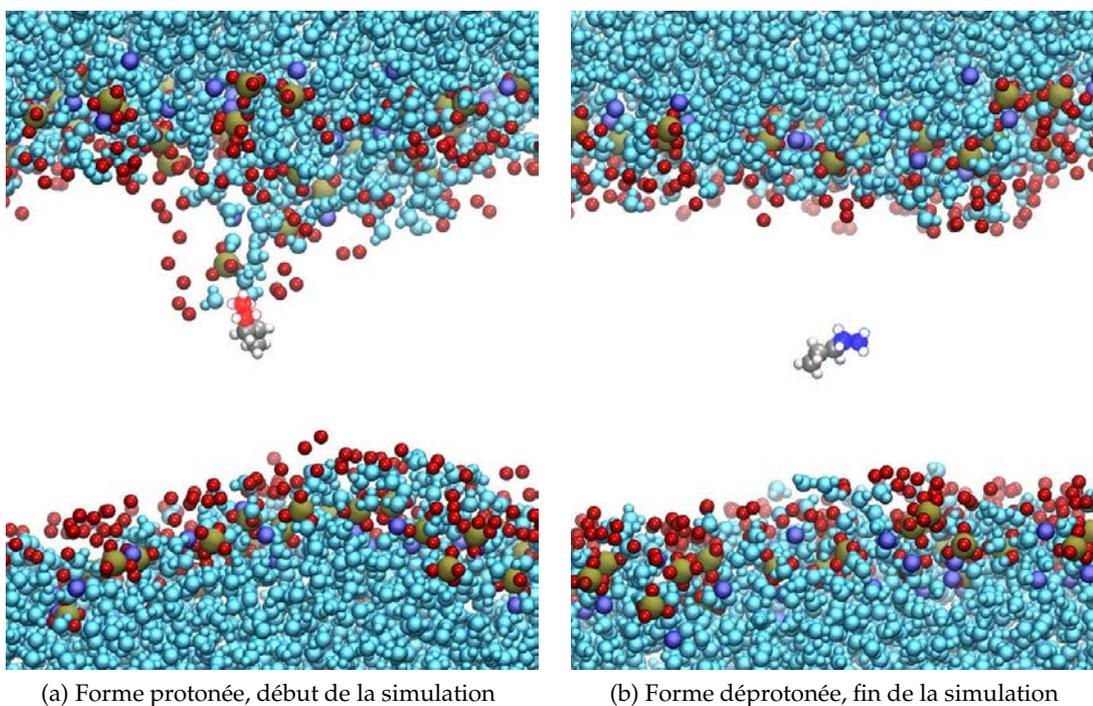


FIGURE 3.4 – Captures de simulation lors d'une transformation alchimique avec l'analogue de la lysine dans sa forme duale au début d'une transformation au centre de la membrane et à la fin. Les déformations observées lors du transfert de la forme chargée avec la méthode ABF ont été également reproduites avec les transformations alchimiques. La disparition de ces structures d'hydratation lors du changement vers la forme neutre sont apparentes.

têtes polaires à l'interface, les nombreuses possibilités de liaisons hydrogènes et la perturbation induite par le peptide lors de son passage au travers de la membrane [25, 77]. Pour chaque calcul ABF, la coordonnée de réaction a été divisée en trois parties, une couvrant le milieu aqueux et la partie supérieure des têtes polaires (22 Å à 33 Å), une autre correspondant à la partie inférieure (22 Å à 11 Å) et la dernière correspondant à la région où se trouve les queues des lipides (0 Å à 11 Å). Les profils d'énergie libre sont donnés sur la figure 3.5.

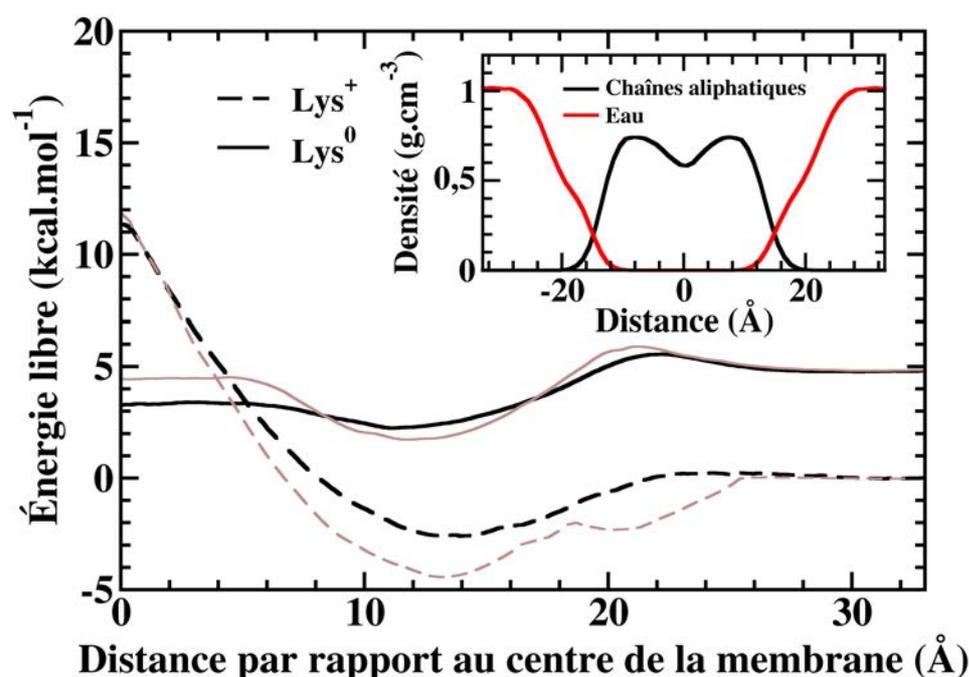


FIGURE 3.5 – Profils d'énergie libre ABF pour un analogue de lysine chargé (courbe noire en tirets) et neutre (courbe noire continue) en fonction de la distance par rapport au centre de la membrane. Le profil de l'espèce neutre est décalé de l'énergie libre équivalente pour déprotoner la lysine dans le milieu aqueux. Les profils en brun proviennent de [21] et ont été obtenus par la méthode umbrella sampling avec d'autres paramètres de champs de force pour les lipides et les acides aminés [114, 115] et dans une membrane constituée de lipides légèrement plus long (DOPC). Les profils de densité pour l'eau (rouge) et les queues des lipides (noir) sont donnés dans l'encadré en haut à droite pour la membrane de POPC.

L'analogue de la lysine utilisé est une butylamine, elle possède une fonction amine primaire et une chaîne carbonée relativement longue permettant à cette molécule de laisser la fonction amine, chargée, tendre vers l'interface et sa partie carbonée, hydrophobe, tendre vers la région des chaînes aliphatiques. Pour la forme neutre, ce comportement est moins respecté et les conformations adoptées par la molécule sont plus nombreuses.

La comparaison entre les résultats obtenus ici et ceux retrouvés dans la littérature permettent de discuter des erreurs systématiques provenant des champs de force. Le potentiel de force moyen associé à la forme neutre reste en accord avec d'autres résultats retrouvés dans la littérature [21, 20, 116]. Une barrière est présente à l'interface ($\approx 0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$) provenant de l'arrangement des têtes polaires dans cette région suivi par un puits de ($\approx 3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et finalement un plateau une fois arrivé dans la région des chaînes carbonées.

Les profils d'énergie libre obtenus pour deux champs de force différents sont en bon accord d'un point de vue qualitatif. Les barrières et les puits d'énergie sont reproduit aux les même positions. MacCallum *et al.* ont utilisé le champs de force de Berger *et al.* pour les lipides [114] et OPLS-AA pour les chaînes latérales des acides aminés [115]. Le lipide utilisé pour construire la membrane dans le système de MacCallum et Al. a des chaînes plus longues, deux groupement $-\text{CH}_2-$ de plus (deux chaînes C18 contre une chaîne C18 et une chaîne C16). Pour la forme neutre, les auteurs ont trouvé une barrière de $\approx 0,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à 23 \AA dans le début de la région des têtes polaires suivi par un puits d'énergie libre de $\approx -1,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ comparé au milieu aqueux situé à 13 \AA du centre de la membrane. Ce dernier est plus profond de $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ comparé a celui estimé durant ce travail. La différence d'énergie libre entre le centre de la membrane et la milieu aqueux est également plus important pour le POPC ($-1,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ici contre $-0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ [21]).

Le transfert de la forme chargée à l'intérieur de la membrane nécessite une quan-

tité d'énergie plus importante liée à l'hydratation de la charge une fois dans le milieu apolaire. La création de doigt d'eau et l'association avec les groupements phosphates permettent de réduire cette barrière d'énergie [25]. Cette observation reste consistante avec le transfert d'autres espèces chargées à travers une membrane phospholipidiques ou une interface eau/hydrophobe. La barrière d'énergie libre au centre est de $\approx -17,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ chez [21] contre $\approx -15,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour les calculs menés durant cette thèse, en prenant le haut de la barrière et le bas du puits dans la région des têtes polaires. Ce puits est localisé pratiquement à la même position (13 Å dans le DOPC et 14 Å dans le POPC. Une différence notable est visible dans la région des têtes polaires où le profil de MacCallum possède deux puits d'énergie consécutifs contre un seul grand puits pour les calculs menés durant cette thèse. Ces puits sont également plus profonds.

Des éléments de réponses peuvent être trouvés en regardant les différences entre les champs de force utilisés. Dans le champs de force développé par Berger et Al. [114], les charges partielles attribuées aux oxygènes des carbonyles sont plus importantes que pour le champs de force CHARMM36 [93] ($\delta_{\text{O}_{\text{Berger}}} = -0,70e$, $\delta_{\text{O}_{\text{CHARMM36}}} = -0,49e$ pour les oxygènes liés aux atomes de carbone et $\delta_{\text{O}_{\text{CHARMM36}}} = -0,63e$ pour les oxygènes des esters). Le champs de force OPLS [115] et CHARMM27 [99] assignent les même charges partielles pour la fonction amine de la lysine dans son état protonée. Cependant, pour la forme déprotonée, l'azote de la fonction amine est légèrement plus négatif dans le cas du champs de force CHARMM ($\delta_{\text{N}_{\text{OPLS}}} = -0,9e$ et $\delta_{\text{N}_{\text{CHARMM27}}} = -0,96e$). Ces différences dans les champs de force peuvent contribuer aux erreurs systématiques entre les profils montrés sur la figure 3.5, bien que la contribution des forces de Van der waals soit également à évaluer. Neale *et al.* ont montré quelques années plus tard que ces profils pouvaient de plus être soumis à des erreurs provenant d'un manque d'échantillonnage de conformations contribuant aux profils de force moyen et provenant de coordonnées de réaction lentes liées à la membrane et aux réorganisations des molécules de lipides [77].

Une fois l'énergie libre de transfert obtenu pour la lysine dans ses deux états de protonation, il est possible d'estimer l'évolution du pK_a de cette molécule en fonction de sa position dans la membrane. Il en sera question dans la prochaine partie.

3.4.1 Détermination du pK_a

Le pK_a peut se déduire des énergies libres estimées par les deux méthodes présentées dans les chapitres précédents : la transformation alchimique et la méthode de biais adaptatif seront utilisées pour calculer les différences d'énergie libre de transfert entre la forme protonée et la forme déprotonée ($\Delta\Delta G$) nécessaire pour l'obtention du pK_a (Chapitre 2 – section 2.3).

Dans notre cas, l'estimation de $\Delta\Delta G$ peut se faire en se basant sur un cycle thermodynamique comme celui présenté sur la figure 3.6. Ce genre de stratégie est plus particulièrement utilisé dans l'estimation de pK_a pour des résidus titrables dans les protéines [96].

Chaque étape du cycle est envisageable via une méthode d'énergie libre bien spécifique. Les chemins représentés par des flèches horizontales peuvent être envisageables via l'utilisation de transformations alchimiques. Dans ce cas, la quantité $\Delta\Delta G$ est obtenue via une différence d'énergie entre une transformation faite dans le milieu aqueux et une autre faite à une position bien spécifique dans la membrane, correspondant au protocole effectué précédemment (voir section 3.4). Cependant, l'énergie ainsi estimée ne correspond pas à l'énergie de réaction liée à la déprotonation car la création du proton et les ruptures de liaisons chimiques intervenant au cours de la réaction ne sont pas prises en compte. Les énergies, ΔG_{alch1} et ΔG_{alch2} , sont de ce fait reliées à la création d'une charge électrostatique dans l'eau ou dans la membrane respectivement et ne prennent pas en compte l'énergie de création du proton.

Les chemins représentés par les flèches verticales correspondent à un schéma impliquant la méthode de biais adaptatif. Le $\Delta\Delta G$ est calculé en faisant la différence entre

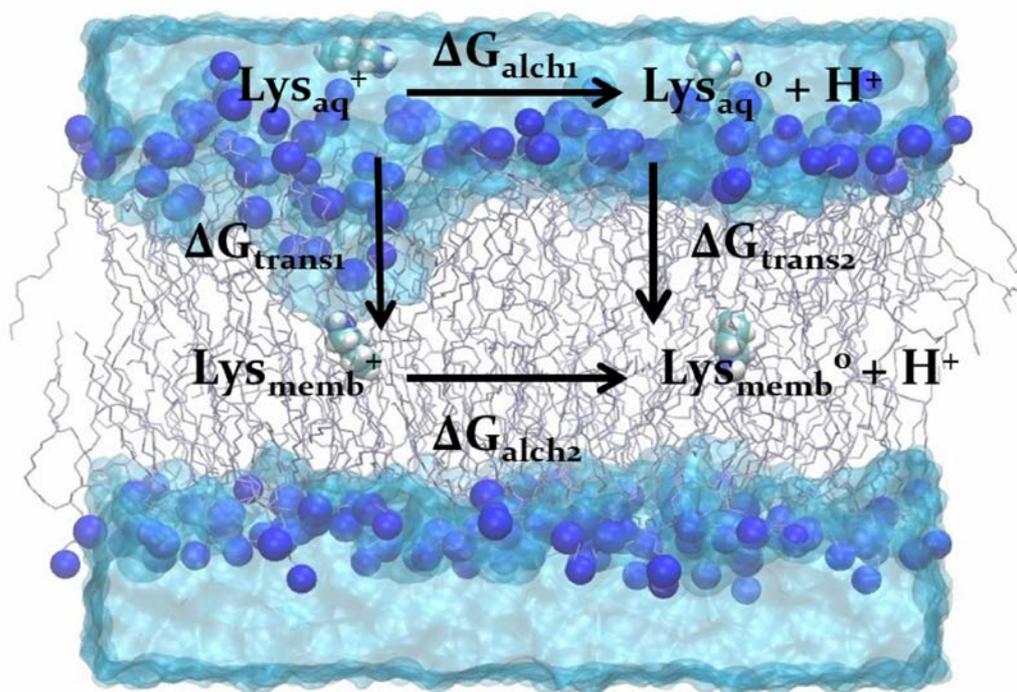


FIGURE 3.6 – Cycle thermodynamique utilisé pour estimer les profils de pK_a pour un analogue d'acide aminé a une certaine profondeur dans membrane. Le chemin horizontal peut être envisagé via l'utilisation de transformations alchimiques. Le chemin vertical correspond à l'estimation de l'énergie libre de transfert de la molécule du milieu aqueux au centre de la membrane le long de la normale à la membrane, soit dans sa forme chargée ou soit neutre.

l'énergie libre de transfert de la forme neutre et l'énergie libre de transfert de la forme chargée.

L'énergie libre étant une grandeur thermodynamique, elle ne dépend pas du chemin suivi et les résultats donnés par ces deux différents chemins doivent donc être, en théorie, identiques. Cette stratégie permet de passer d'un problème impliquant l'estimation d'un pK_a dans une bicouche lipidique à celui de l'estimation d'une différence d'énergie de solvation d'un composé chargé se trouvant dans un milieu aqueux à

un endroit à l'intérieur de la membrane [97]. Cette dernière quantité se traduit par un ΔpK_a s'additionnant à la valeur du pK_a de l'analogue de la lysine dans le milieu aqueux ($pK_a = 10,77$).

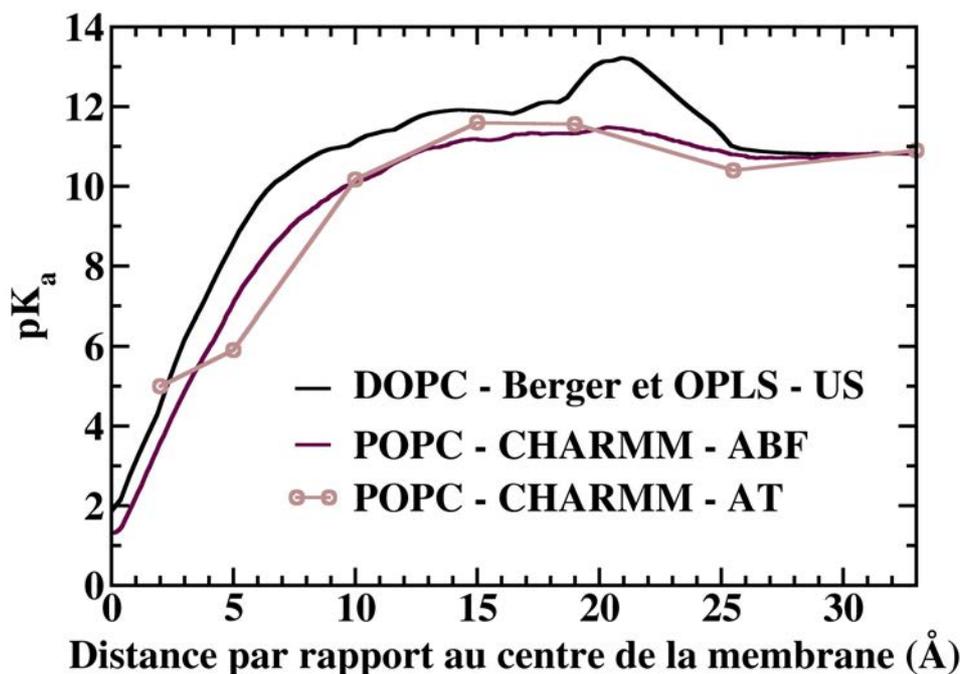


FIGURE 3.7 – Comparaison entre les profils de pK_a obtenus durant cette thèse avec des transformations alchimiques (AT – brun et cercles) et la méthode de biais adaptatif (ABF – marron) avec les résultats tirés de la littérature utilisant une méthode d'énergie libre différente, umbrella sampling (US – noir), un champs de force différent (OPLS pour la lysine et le champs de force de Bergeret Al. pour les lipides) et un lipide ayant des chaînes aliphatiques plus longues mais une tête polaire identique [21].

Les profils de pK_a obtenus par la méthode de transformation alchimique et la méthode ABF sont globalement en accord sauf en ce qui concerne la région proche du centre de la membrane. Ces différences sont principalement reliées à la difficulté d'échantillonner correctement l'espace des phases dans cette région dû aux nombreux degrés de liberté lents liés à la réorganisation des lipides [25, 28, 77]. Les deux méthodes donnent cependant des résultats similaires dans la région où la valeur du pK_a est aux alen-

tours de 7, où la population d'espèces neutres commence à devenir aussi importante que la population d'espèces chargées. Le pK_a de l'analogue de la lysine décroît lors de son avancé à l'intérieur de la bicouche. La population de lysine déprotonée devient de plus en plus importante à mesure que la molécule se rapproche du centre de la membrane. La région où la proportion de lysine protonée devient égale à celle de la lysine déprotonée se situe aux alentours de 6 Å selon l'équation de Henderson-Hasselbach en considérant le pH de la simulation comme étant neutre.

En prenant en compte les différences dans les profils d'énergie libre chez MacCallum et Al. [21] et ceux en rapport avec cette thèse, la zone où le changement d'état de protonation est possible se retrouve plus au centre de la membrane, 4 Å contre 5 Å dans cette étude. Ce dernier résultat est en accord avec des résultats expérimentaux sur l'état de protonation d'une lysine appartenant à une hélice- α ou se trouvant enfouie à l'intérieur d'une protéine. Isom *et al.* [106] ont étudié le pK_a de 25 différentes lysines enfouies à l'intérieur de mutants d'une protéine, la staphylococcal nuclease, et l'impact sur la stabilité et les conformations de la protéine. Les auteurs ont trouvé que le pK_a pour des espèces loin du milieu aqueux pouvait être plus faible de 6 unités par rapport à la valeur en milieu aqueux. Les environnements de ces résidus sont moins polaires, ne présentent pas de contre-ions pour former des ponts salins ou ne laissent pas de molécules d'eau diffuser. Une analogie peut être dressée avec la membrane où les phosphates des têtes polaires viennent s'associer avec l'amine de la lysine et où la membrane laisse rentrer une certaine quantité d'eau provenant du milieu aqueux afin de stabiliser la charge. Gleason *et al.* [98] ont eux étudié l'état de protonation d'arginines et de lysines attachées à une hélice- α transmembranaire, ces résidus se trouvant à différentes profondeurs dans une membrane faite de phospholipide. L'étude a révélée que l'arginine reste bien chargée même pour des positions proches du centre de la membrane tandis que la lysine pouvait changer d'état de protonation pour des valeurs de pH allant de 5 à 9.

Parmi les résidus titrables se trouvant dans les 20 acides aminés couramment rencontrés, l'arginine est celle qui a été certainement la plus intensivement étudiée [24, 25, 21, 120, 76, 20, 28, 116] notamment en raison de son importance dans les canaux sensibles à la tension (segment transmembranaire S4) mais aussi en raison de son abondance dans les peptides capables de traverser les membranes cellulaires comme le peptide TAT (TAT – Transactivator of transcription) ou la pénétratine. Elle est souvent comparé à un autre résidu cationique, la lysine. L'histidine, qui est également un résidu cationique titrable, est plus délicat à traiter étant donné les conjugaisons entre deux sites titrables possible.

Le peptide TAT est un peptide cationique possédant 6 arginines et 2 lysines. La substitution d'un de ces acides aminés par un résidu neutre conduit à une diminution de l'efficacité de pénétration à travers la membrane tandis que la substitution d'acide aminé neutre ne possède aucun effet, indiquant que les résidus cationiques sont à l'origine de la propriété de pénétration des membranes [117, 118]. Dans le cas de ces molécules, il a été montré que la capacité de passer à travers les membranes de phospholipides provenait principalement de l'ion guanidinium de l'arginine [121].

Les peptides possédant des arginines ou des lysines le long de leur séquence peptidique sont capables d'interagir avec les lipides de la membrane et de pouvoir courber cette dernière. L'apport de la dynamique moléculaire a été décisive à ce niveau car elle a permis de mettre en évidence les différences d'interactions entre l'ion guanidinium de l'arginine et la fonction amine de la lysine [21, 116]. Dans le cas de la lysine, ces études montrent que la présence d'une fonction amine en fin de chaîne latérale ne permet la formation que d'une liaison hydrogène et ne peut interagir qu'avec un seul lipide à la fois et ne peut de ce fait être impliqué que dans une seule liaison hydrogène. L'étude de la distribution radiale de la fonction amine en fonction de sa position à l'intérieure de la membrane ne montre pas de différence notable. L'interaction de l'arginine avec les têtes polaires est plus forte et conduit à une courbure beaucoup plus importante d'une

manière telle que la formation d'un pore devienne possible et facilitant le passage de peptide à travers la membrane [121, 107, 51].

Les résultats provenant de calculs d'énergie libre et de simulations de dynamique tendent à corroborer les résultats expérimentaux sur le fait que l'arginine est le seul résidu capable de maintenir sa forme chargée même au centre de la partie hydrophobe de la membrane. Contrairement à la lysine, où les simulations menées durant cette thèse ont montré que les déformations et la création de structure d'hydratation ne se produisaient uniquement que d'un seul côté de la membrane à la fois, l'arginine serait capable de perturber les deux interfaces en même temps et de créer des pores hydrophiles transmembranaires stables sur 20 ns de simulation [25, 116].

L'étude thermodynamique du passage du peptide via l'estimation de l'énergie libre de transfert a permis d'identifier la zone où le changement d'état de protonation est le plus probable. La lysine doit être amenée relativement loin du milieu aqueux, sous la région des carbonyles, pour passer de la forme chargée à la forme neutre. La suite consistera à calculer les constantes cinétiques telles que la perméation et le temps de passage moyen afin d'obtenir une idée sur la rapidité d'un tel transfert.

3.4.2 Cinétique du transfert

L'analyse détaillée du processus d'absorption du peptide ainsi que son transfert à travers la membrane reste impossible par voie expérimentale. Pour évaluer complètement le processus du transfert de la lysine, les perméabilités et les taux de réaction ont également été calculés (cf chapitre méthodes). L'évaluation des constantes cinétiques nécessitant la connaissance de la diffusion le long de la coordonnée de réaction utilisée, les profils de diffusion liés à la forme neutre et la forme chargée ont donc été calculés en utilisant la fonction d'autocorrélation des positions restreintes. Ces profils sont montrés en Annexe. Le coefficient de diffusion a été estimé chaque ångströms. Pour chaque point, une nanoseconde d'équilibration suivit de 4 ns de simulation servant aux anal-

yses ont été faites. La diffusion ne semble pas être affectée par l'état de protonation du composé et diminue brusquement en arrivant dans la région des têtes polaire. Les profils obtenus avec cette méthode sont très proches de ceux obtenus pour d'autres molécules organiques de tailles relativement modestes dans des membranes constituées de phospholipides. Pour des molécules similaires à la butylamine comme la méthylamine, l'éthane ou l'acétamide, le coefficient de diffusion chute à $1/10^{\text{ème}}$ de sa valeur dans le milieu aqueux à l'intérieur de la membrane [78, 79].

Avec une perméabilité de $P_{\text{neutre}} = 42,96 \text{ cm.s}^{-1}$ pour l'espèce déprotonée et $P_{\text{chargée}} = 6,8 \times 10^{-9} \text{ cm.s}^{-1}$ pour la forme protonée, la forme neutre est plus perméable à la membrane que la forme chargée comme de nombreux résultats expérimentaux et théoriques l'on déjà démontré. La perméabilité est une valeur très sensible à l'énergie libre dû au terme en exponentielle. De ce fait, les valeurs de la perméabilité retrouvées dans la littérature pour une même molécule peut varier sur une plage allant de 10 cm.s^{-1} à $10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$.

L'évolution de la résistance locale, correspondant à l'intégrante dans l'équation de la perméation, permet d'analyser les étapes limitantes dans le processus de perméation. Elle est donnée en fonction de la distance à l'intérieur de la membrane sur la figure 3.8a, pour la forme déprotonée et protonée. Pour la forme déprotonée, la région offrant le plus de résistance à la perméation du peptide correspond à la région des têtes polaires. Pour la forme protonée, le centre de la membrane est la région où la résistance y est la plus forte. Pour le profil recombinaison, la région sous les têtes polaires est celle où le peptide rencontre le plus de résistance de la part de la membrane avec une baisse significative de la perméabilité.

Les temps de passage moyen pour la lysine chargée et neutre sont montrés sur la figure 3.8b. Le temps mis par la molécule située initialement dans le milieu aqueux d'un côté de la surface pour passer à travers la membrane et se retrouver de l'autre côté dans le milieu aqueux est de l'ordre de la centaine de μs pour la forme neutre et va jusqu'à la

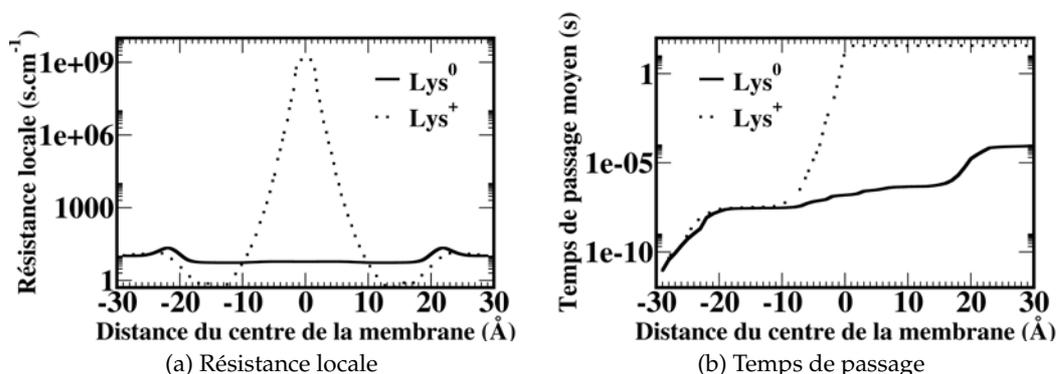


FIGURE 3.8 – Gauche : Résistance locale, correspondant à l'intégrante dans l'équation de la perméation pour le transfert de l'analogue de la lysine depuis un côté de la membrane à l'autre pour la forme protonée (noir – tirets) et déprotonée (noir – plein). Droite : Temps de passage moyen en fonction de la distance pour la forme protonée (noir – tirets) et déprotonée (noir – plein)

seconde pour la forme chargée, bien supérieur aux temps de simulation considérée ici.

Compte tenu de la barrière d'énergie importante retrouvée au centre de la membrane pour la forme protonée, le passage d'une espèce titrable avec une fonction amine primaire à travers une bicouche lipidique ne peut être envisagée directement. La forme neutre ne rencontrant qu'une barrière d'énergie modeste en comparaison peut laisser envisager une translocation suivant un mécanisme de déprotonation à l'interface et de reprotonation une fois la région hydrophobe de la membrane traversée. Connaissant les profils d'énergie libre pour les deux états de protonation de la forme neutre et la forme chargée et la zone où l'inversion de population de ces deux formes a lieu, un profil « hybride » du composé lors de son passage à travers la membrane a été construit comme une approche simpliste suivant un schéma déprotonation/protonation. Le changement d'état de protonation pouvant survenir sur une vaste zone avant ou après celle des 6 \AA , cette approche permet néanmoins d'estimer la perméabilité et le temps de passage moyen associé au transfert d'un analogue d'acide aminé basique à travers une membrane de phospholipides.

Concernant la perméabilité, les valeurs estimées sont $P_{\text{neutre}} = 42,96 \text{ cm.s}^{-1}$, $P_{\text{chargée}} = 6,8 \times 10^{-9} \text{ cm.s}^{-1}$ et $P_{\text{hybride}} = 2,6 \times 10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$ pour la forme neutre, chargée et en utilisant le profil reconstruit, respectivement. La perméabilité de la forme chargée est 10^{-10} fois plus faible que celle de la molécule sous sa forme neutre. Ce résultat est en accord avec les observations expérimentales où le même ordre de grandeur a été retrouvé entre des électrolytes et des molécules zwitterioniques et des molécules polaires n'ayant aucune charge électrique. Concernant la valeur estimée pour le profil reconstruit, elle se trouve être plus faible que celle estimée pour la forme neutre. Ce résultat est lié à la barrière d'énergie libre toujours présente, même en prenant le profil de la forme neutre dans le cœur de la membrane. Cette barrière étant nettement moins importante que pour la forme protonée de la lysine, la perméabilité obtenue avec le profil hybride est de ce fait plus importante.

À partir des équations des constantes cinétiques tels que dérivés par Wang [80] (cf chapitre méthodes), ces constantes ont été calculées dans les différentes régions sur la figure 3.9 et valent $k_{12} \approx 2,33 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, $k_{23} \approx 5,41 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_{34} \approx 2,74 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, $k_{54} \approx 2,75 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. L'étape limitant le transfert se trouvant être la zone où la déprotonation a le plus de probabilité d'avoir lieu et où la lysine passe de la région des têtes polaires à celle des chaînes carbonées.

La méthode ABF sera par la suite utilisée pour produire les profils d'énergie libre nécessaire à l'estimation du pK_a et des constantes cinétiques. Les deux méthodes convergent vers des résultats identiques mais la méthode de force de biais adaptative offre l'avantage d'obtenir des profils d'énergie libre « complets », c'est à dire plus continu que les transformations alchimiques pour un temps de calcul moindre.

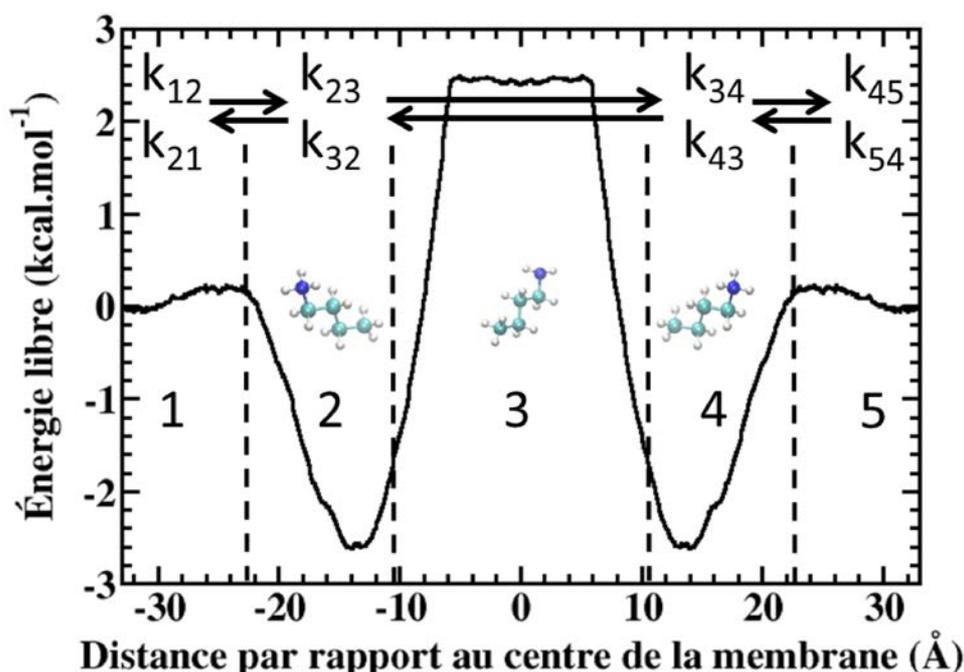


FIGURE 3.9 – Profil d'énergie libre "hybride" et constantes cinétiques associés aux différentes régions de transitions entre le milieu aqueux et la région des têtes polaires, les têtes polaires et le centre de la membrane, le centre et les têtes polaires et les têtes polaires et le milieu aqueux.

3.5 Influence de la composition en phospholipides sur le transfert de peptide cationique

La section précédente a permis de présenter en détails les résultats relatifs le passage de la lysine à travers une membrane. La zone dans laquelle le changement de protonation est susceptible d'avoir lieu a été identifiée ainsi que les étapes limitant le transfert. Dans cette section, je présenterai comment la composition en lipide peut moduler ces différentes observations. Pour ce faire, trois membranes différentes ont été construites, chacune par une des molécules de lipide présentées sur la figure 3.10.

Chacune de ces membranes ainsi construites a permis de comparer deux à deux les influences provenant des différentes parties des lipides. En premier il sera question d'é-

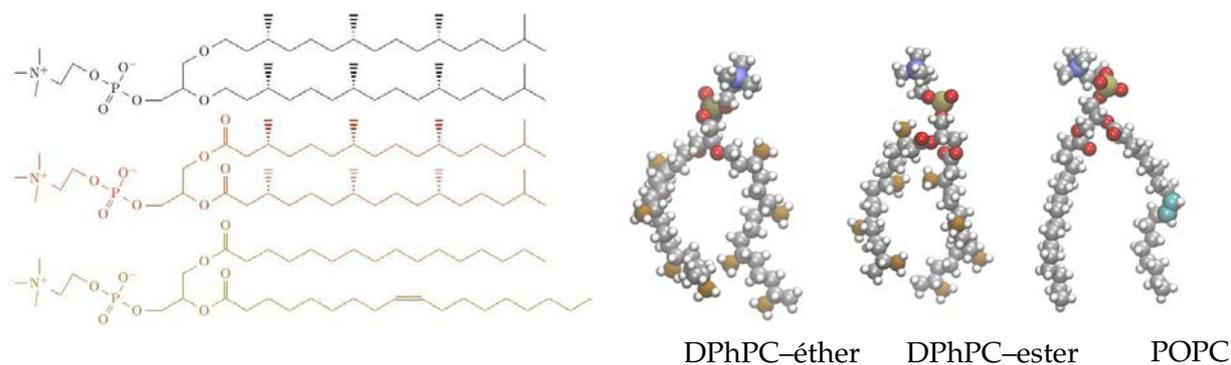


FIGURE 3.10 – Représentation des trois différentes molécules de lipides utilisées pour étudier l’influence de la composition en phospholipides de la membrane sur le transfert.

tudier l’influence chaînes aliphatiques en comparant les membranes de DPhPC-ester et de POPC. Puis ensuite, nous passerons aux carbonyles en comparant les membranes constituées de DPhPC-éther et de DPhPC-ester. Chacun de ces cas d’étude est construit sur le schéma de la section précédente. En premier les résultats concernant l’énergie libre seront présentés puis ceux obtenus sur la cinétique. Une discussion de ces résultats clôturera le cas d’étude à la fin de chaque sous-section.

3.5.1 Influence des chaînes aliphatiques : DPhPC-ester, POPC

Les résultats obtenus sur les effets liés aux branchements des chaînes aliphatiques avec des groupements méthyles sur l’état de protonation seront présentés ici.

Les profils d’énergie libre de transfert pour l’analogue de la lysine, neutre et chargée, dans les membranes constituées de DPhPC et de POPC sont donnés sur la figure 3.11. Pour la forme déprotonée de l’analogue, les profils sont assez similaires. Ces observations ont également été rapportées pour des molécules de tailles beaucoup plus modestes (dioxygène, molécule d’eau, dioxyde de carbone) [87].

Les profils d’énergie libre liés à la forme chargée montrent des différences plus in-

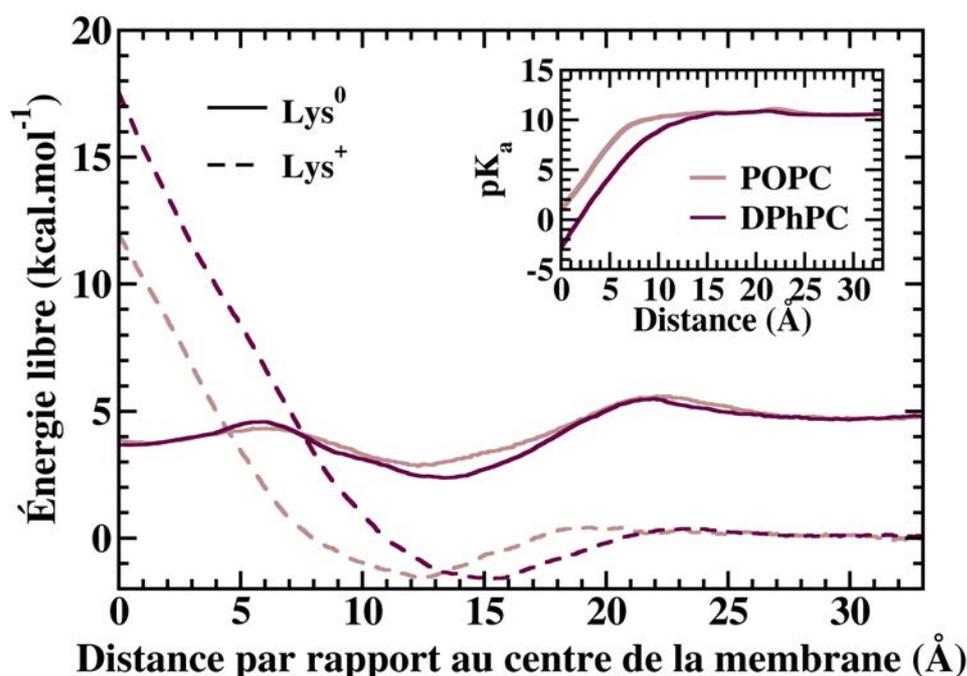


FIGURE 3.11 – Profils d'énergie libre de transfert pour la forme neutre (trait continu) et la forme chargée (tirets) de l'analogue de la lysine dans des membranes constituées de DPhPC-ester (marron) et de POPC (brun) dans 0,15M de NaCl. Le profil de l'espèce neutre est décalé de l'énergie libre équivalente pour déprotoner la lysine dans le milieu aqueux. Les profils de pK_a déduits de ces profils sont donnés en haut à droite en fonction de la distance par rapport au centre de la membrane pour du DPhPC ester (marron) et POPC (brun).

téressantes. Tandis que la barrière d'énergie libre rencontrée au centre de la membrane est de $\approx 13,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (hauteur prise du puits avant la barrière à $12,7 \text{ \AA}$) pour la membrane de POPC, celle pour la membrane de DPhPC est de $\approx 19,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en considérant de la même manière la hauteur de la barrière par rapport au puits se situant à 16 \AA). La pente liée à l'augmentation de la barrière d'énergie libre est la même dans les deux cas.

Ce résultat possède un impact majeur sur les profils de pK_a . Ces derniers montrent

qu'une espèce chargée ne peut visiblement pas être retrouvée trop enfouie à l'intérieur d'une membrane de DPhPC. La position à laquelle la population d'espèces chargées égale celle d'espèces protonées se situe aux alentours de 8 Å pour la membrane de DPhPC contre 5 Å pour la membrane de POPC.

Les perméabilités et temps de passage moyen évalués à partir des profils de diffusion et d'énergie libre hybrides tels que présentés dans la section précédente sont $P_{\text{DPhPC}} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$, $\tau_{\text{DPhPC}} = 546 \mu\text{s}$, $P_{\text{POPC}} = 2,5 \times 10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$ et $\tau_{\text{POPC}} = 240 \mu\text{s}$ pour la membrane de DPhPC et de POPC respectivement. La barrière d'énergie libre, plus importante dans le cas de la membrane de DPhPC, se reflète sur la cinétique et de ce fait, le transfert est plus rapide dans la membrane de POPC.

Dans le cas du POPC, l'aire par lipide ($\approx 64 \text{ \AA}^2$) est plus basse que pour la membrane de DPhPC ($\approx 79 \text{ \AA}^2$). Ce résultat se trouve être lié aux chaînes branchées ne s'orientant pas de manière aussi ordonnées et parallèles que des chaînes linéaires [82]. En estimant l'épaisseur de ces deux membranes, les résultats obtenus avec les profils d'énergie libre apparaissent surprenant compte tenu que la région hydrophobe dans la membrane de DPhPC est moins grande que pour la membrane de POPC (distance carbonyle-carbonyle, $d_{\text{POPC}} = 27,96 \pm 0,82 \text{ \AA}$, $d_{\text{ester}} = 26,94 \pm 0,5 \text{ \AA}$). De plus, la densité de l'eau à l'interface de la membrane est plus large dans la membrane de DPhPC comparée à celle de POPC (figure 3.12). Ces observations seraient le fait de la plus grande stabilité des membranes constituées de chaînes aliphatiques branchées pouvant supporter des contraintes mécaniques plus importantes et résister à des champs électriques plus importants que des membranes faites de chaînes carbonées linéaires [88]. La membrane de POPC serait donc plus enclin à supporter les déformations induites par le passage de la forme chargée de l'analogue que la membrane de DPhPC, dont les chaînes carbonées forment un réseau dense et fortement entremêlé.

L'introduction de groupements méthyles le long des queues lipidiques est le résultat de l'adaptation d'organismes vivants à des conditions environnementales particulières

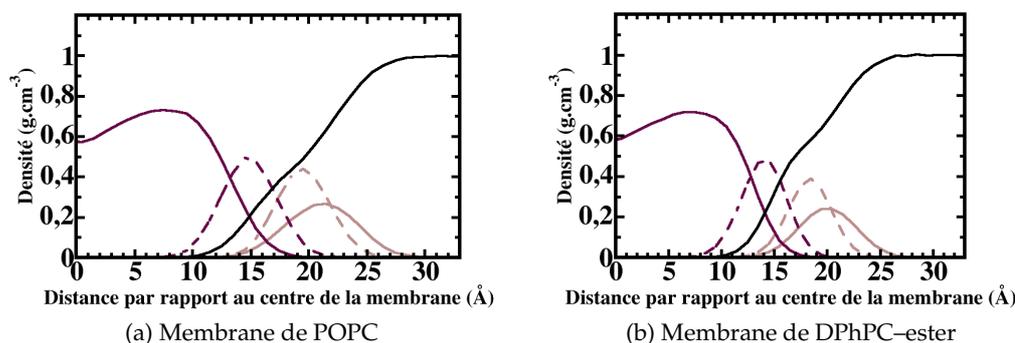


FIGURE 3.12 – Profils de densités pour la membrane de POPC (gauche) et la membrane de DPhPC-ester (droite). Légende : noir - eau, brun (trait plein) - choline, brun (tirets) - phosphate, marron (tirets) - glycérol, marron (trait plein) - chaînes aliphatiques.

(températures élevées, pH acides, ...). Les membranes constituées par ces lipides ont donc des spécificités bien différentes de membranes constituées par des lipides ayant des chaînes linéaires. Les conformations adoptées par les chaînes branchées diminuent la probabilité de trouver des chaînes parallèles au sein de la bicouche. De plus, les chaînes isopréniques ont tendance à s'intercaler avec les chaînes voisines résultant en un taux de changement de configuration gauche-trans beaucoup plus faible que les chaînes linéaires. Ainsi, les membranes constituées par des molécules de DPhPC forment des membranes beaucoup plus stables due à cette diminution du taux de conformations, les mouvements plus lents des chaînes branchées résultant de l'entremêlement des chaînes latérales avec leur voisines [82, 83] réduisant ainsi la perméation liée au passage d'espèce chargée.

Les résultats obtenus sur la thermodynamique et la cinétique du transfert de la forme chargée vont de pair avec les résultats expérimentaux [123]. Les énergies d'activation liées au passage du proton à travers une bicouche de DPPC (phase gel) et dans des membranes de faites de lécithines (phosphatidylcholine en phase liquide) ont été estimées respectivement à $E_{aDPPC} = 15 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $E_{a\text{lecithin}} = 14 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Paral-

lèlement, cette énergie a également été estimée dans des membranes de DPhPC–ether, $E_{a\text{DPhPC}} = 25 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Cette membrane se distingue en différents points d'une membrane de DPhPC–ester, comme nous le verrons la section suivante, mais la résistance de ce genre de membranes au passage d'espèces chargées est attribuée aux chaînes branchées et non aux glycérols des lipides [124]. La perméation du proton est de ce fait également réduite d'un facteur $1/10^{\text{ème}}$. La discussion quantitative de la comparaison de ces résultats expérimentaux avec les résultats théoriques n'est peut être pas relevante étant donné les différences de températures entre les expériences et les simulations ou les erreurs systématiques induites par le champs de force. Il est à noter que ces résultats sont quand même qualitativement en bon accord.

3.5.2 Influence des branchements glycérols et des carbonyles : DPhPC–ether, DPhPC–ester

Dans cette partie, la seule différence entre les molécules de phospholipides constituant la membrane se situe au niveau des glycérols. Une molécule possède des glycérols estérifiés (DPhPC–ester), l'autre non (DPhPC–ether). Cette modification induit de grands changements dans dans les propriétés physico-chimiques de la membrane que je présenterai dans la fin de cette section avec la discussion des résultats.

Les profils d'énergie libre associés à la forme neutre et la forme chargée dans les deux membranes ether et ester sont donnés sur la figure 3.13.

Pour la forme neutre, la barrière d'énergie ($\approx 0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$) libre située à l'entrée de la membrane est du même ordre de grandeur pour les deux membranes, comme dans le cas du POPC vu précédemment. Ces résultats apparaissent consistants, les têtes polaires étant les mêmes. Cette barrière apparaît autour de 24 \AA pour la membrane constituée de lipide ether et 22 \AA pour les lipides ester. Il en est de même pour les puits d'énergie libre survenant après ces barrières. Ce décalage le long de la normale à la membrane est dû à son épaisseur, la membrane constituée d'etherlipides étant plus

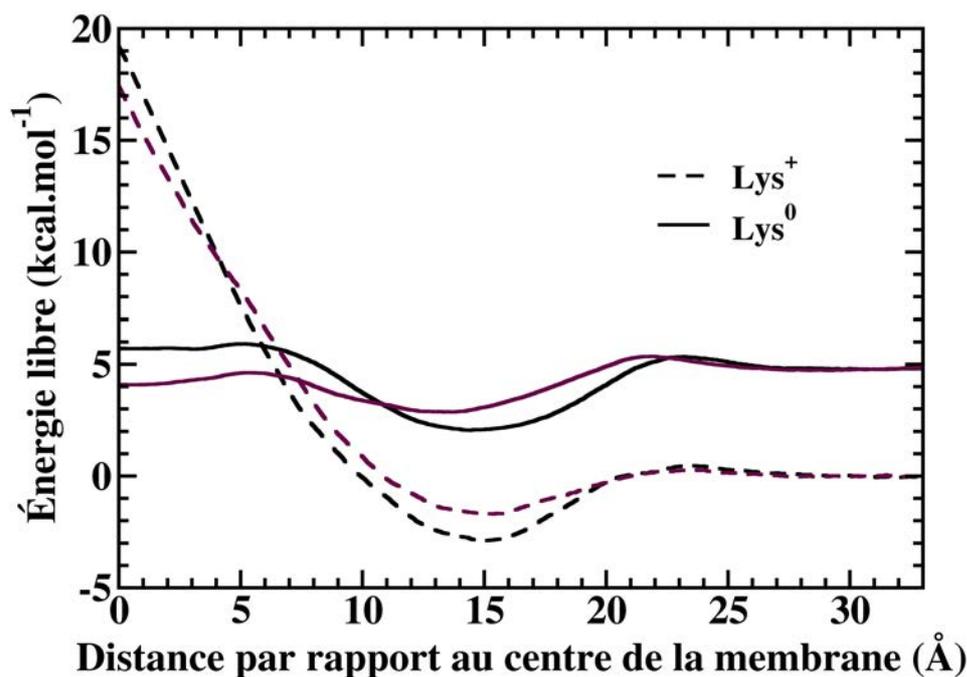


FIGURE 3.13 – Profils d'énergie libre de transfert pour la forme neutre (trait continu) et la forme chargée (tirets) de l'analogue de la lysine dans des membranes constituées de DPhPC-éther (noir) et de DPhPC-ester (marron) dans 0,15M de NaCl. Le profil de l'espèce neutre est décalé de l'énergie libre équivalente pour déprotomer la lysine dans le milieu aqueux.

épaisse que la membrane d'esterlipides ($d_{\text{ester}} = 36,84 \text{ \AA}$ et $d_{\text{ether}} = 38,89 \text{ \AA}$). Ces puits sont situés aux alentours de $13,7 \text{ \AA}$ et $13,0 \text{ \AA}$ et sont profonds de $-2,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $-2,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectivement pour l'éther et l'ester. De plus, le puits apparaît être plus réduit pour cette dernière. Au centre de la bicouche, la différence d'énergie libre entre le centre de la membrane et le milieu aqueux est négative pour la membrane d'ester ($-1,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et positive ($+0,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$) pour la membrane avec des étherlipides. Pour la forme chargée, les profils d'énergie libre sont assez similaires. Le puits d'énergie libre est légèrement plus profond dans la membrane constituée d'étherlipides ($-2,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $-1,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectivement).

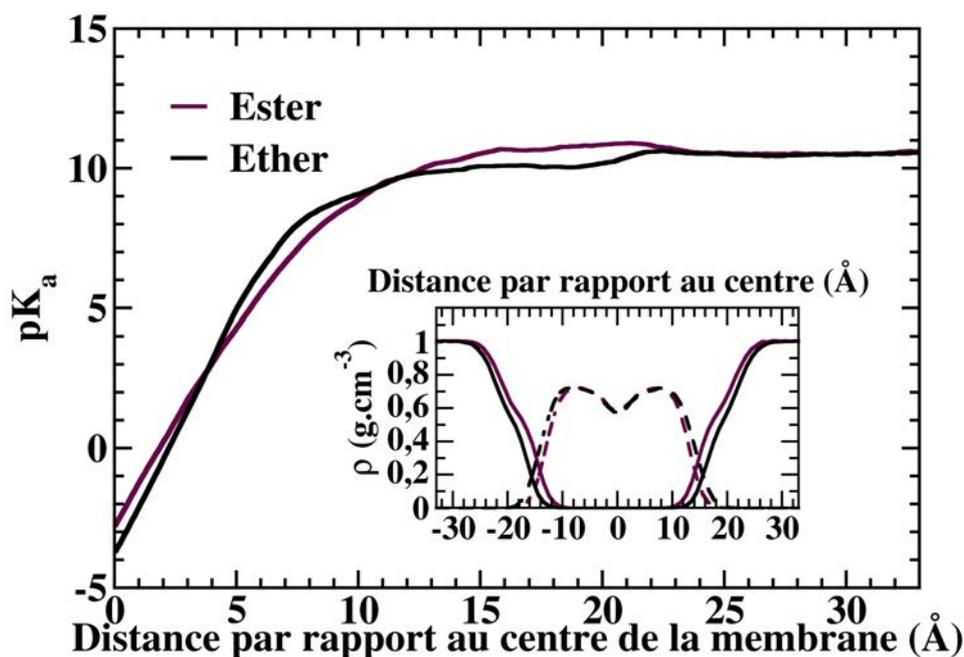


FIGURE 3.14 – Profils de pK_a déduit de l'énergie libre de transfert en fonction de la distance par rapport au centre de la membrane pour du DPhPC-éther (noir) et DPhPC-ester (marron). En bas à droite sont représentés les profils de densité avec en trait plein la densité de l'eau et en tirets les chaînes aliphatiques.

La comparaison des profils de pK_a obtenus à partir de ces calculs d'énergie libre (figure 3.14) indique que la déprotonation du peptide apparaîtrait avant dans le cas de la membrane de DPhPC-éther, aux alentours de 6 Å du centre pour cette dernière contre 8 Å du centre pour la membrane ester. Ce résultat est principalement la cause de l'épaisseur de la membrane, la position des têtes polaires est déplacée de 2 Å vers le centre dans la cas de la membrane de DPhPC-ester.

Les études expérimentales basées sur des méthodes de spectroscopie par fluorescence sur l'hydratation des têtes polaires entre des membranes constituées de DPPC et de DHPC (1,2-dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine), lipide identique en tout point au DPPC mais dont les glycérols ne sont pas estérifiés) ont montré les membranes

de DHPC possède une plus grande quantité d'eau à l'interface due à une plus grande pénétration des molécules d'eau. La réorientation de ces dernières à l'interface de la membrane de DPPC est plus faible que dans la membrane de DHPC, signe qu'elles sont plus liées aux oxygènes des carbonyles. Les molécules d'eau sont donc plus dynamiques à l'interface d'une membrane constituée d'étherlipides que de lipide estérifiés [122]. Les profils de densité donnés sur la figure 3.14 permettent d'observer que dans le cas de ces simulations, la membrane d'ester est plus hydratée avec une pénétration d'eau plus importante, ce qui est apparaît en contradiction avec les résultats expérimentaux. Cependant, cette observation a déjà été reportée par Shinoda *et al.* [85] et qui ont avancé l'hypothèse que ce résultat était dû à une plus grande hydrophilicité des groupements ester.

La détermination des constantes cinétiques nécessitant la connaissance de la diffusion le long de la coordonnée de réaction, les profils de diffusion ont donc été déterminés de la même manière que pour la membrane de POPC. Les perméabilités et temps de passage moyen associés au passage du peptide à travers la membrane sont $P_{\text{ester}} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$, $\tau_{\text{ester}} = 546 \mu\text{s}$ pour l'estermembrane et $P_{\text{ether}} = 2,3 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$, $\tau_{\text{ether}} = 2,6 \times 10^5 \mu\text{s}$ pour la membrane constituée d'étherlipide. Ces résultats ont été obtenus en considérant les profils hybrides comme dans le cas de la membrane de POPC. La perméation est plus faible dans le cas de la membrane d'étherlipide et le temps de passage moyen plus grand concordant avec des résultats expérimentaux sur la différence de perméation entre des membranes de DPPC et de DHPC [81]. Ce résultat est principalement la conséquence des barrières d'énergies plus hautes pour l'éthermembrane.

Il est également plus difficile de ramener une molécule polaire ou chargée dans le centre d'une membrane de DPhPC-éther comparé à une membrane DPhPC-ester ou de POPC. Les profils d'énergie libre associés au transfert de molécules non-polaires comme le dioxygène ne sont pas affectés par la mutation des glycérols éther en ester

[85]. Cette différence au centre est difficilement explicable uniquement en observant les profils de densité associés à ces deux membranes, ces derniers étant relativement similaires. Dans le cas de molécules polaires, comme des molécules d'eau, la barrière d'énergie rencontrée au centre de la membrane est plus basse dans des membranes constituées d'esterlipides en comparaison à celles constituées d'étherlipides. Le rôle des propriétés électrostatiques, dont les différences ont déjà été mentionnées auparavant dans la littérature [85, 86], ont donc servi à expliquer ce résultat en avançant que le potentiel électrostatique était deux fois plus important dans les membranes d'ester.

L'aire par lipide est plus basse dans le cas de glycérols non estérifiés ($\approx 73 \text{ \AA}^2$ pour des fonctions éther contre $\approx 79 \text{ \AA}^2$ pour des fonctions ester). Cette observation est imputable au resserrement entre les têtes polaires au niveau des oxygènes des glycérols afin de réduire le contact entre l'eau et le cœur hydrophobe de la membrane. Cet effet lié aux liaisons éthers et le resserrement entre les têtes polaires des lipides induit une pression latérale plus importante au centre de la membrane comme indiqué par les profils de pression donnés en annexe. Ces derniers montrent une augmentation très significative de la pression latérale dans le milieu de la membrane d'éther. La barrière d'énergie plus haute ressentie par la lysine au centre de la membrane provient en partie de ces deux contributions. Les profils de pression montrent que les effets électrostatiques ne sont pas les seuls à contribuer à la barrière expérimentée par le peptide à l'intérieur de la membrane.

Une autre conséquence est la diminution d'un facteur deux du potentiel électrostatique pour l'éthermembrane. Ce résultat est visible sur les courbes de potentiels données en annexe pour les trois membranes. Ce phénomène peut être expliqué par l'électronégativité importante des oxygènes des esters [85, 86].

Les effets électrostatiques sur la forme chargée apparaissent relativement peu importantes compte tenu du fait que l'énergie d'interaction entre une charge et un dipôle est généralement plus importante que l'énergie d'interaction entre deux dipôles. Ces in-

teractions électrostatiques sont modulées également par l'inverse de la constante diélectrique du milieu. Si dans le cas de la forme neutre, la constante diélectrique peut être ramenée à celle d'un milieu apolaire proche des hydrocarbures, le cas de la forme chargée peut en varier sensiblement. La création du doigt d'eau laissant la charge dans un état hydraté modifie la valeur de la constante diélectrique. Cette dernière doit être différente de celle prise par le milieu aqueux, étant donné que les molécules d'eau présentent dans la structure d'hydratation ne possède pas la même dynamique dû au confinement, la constante diélectrique doit cependant être plus élevée que celle correspondante aux queues des lipides, ce rapprochant de la valeur de celle de l'eau. De même, la pression latérale peut être modifiée par rapport à celle donnée sur les profils en annexe à cause des déformations de la membrane liées au passage de la forme chargée.

Les travaux menés ici mettent en lumière l'importance des propriétés physico-chimiques des membranes de phospholipides et comment ces propriétés peuvent moduler le passage de molécules. De manière surprenante, si des influences sur l'énergie libre de transfert ont été observées, le pK_a de la molécule semble être moins affecté. En effet, les profils de pK_a obtenus se sont retrouvés être assez similaire, le décalage de la zone de changement d'état de protonation pouvant être relié à un simple décalage dans la position des têtes polaires.

3.5.3 Conclusion

Durant cette section, j'ai présenté comment les membranes pouvaient influencer le passage de peptides polaires ou chargées. Les lipides à chaînes branchées se sont révélés être de bons isolants pour les espèces chargées. Même si les lipides de DPhPC-ester sont des lipides synthétiques et les lipides de DPhPC-éther ne se retrouve que chez les archées, à quelques exceptions près, leurs utilisation dans le domaine pharmaceutique pour la fabrication de liposomes vecteurs de médicaments nécessite une bonne stabilité vis-à-vis d'environnement acide. Notre étude montre qu'ils peuvent

mieux conserver les espèces titrables en leur sein.

Lors de la comparaison entre DPhPC–ester et DPhPC–éther, il est apparu que la différence dans les propriétés physico-chimiques de la membrane n’influe pas de manière significative l’état de protonation d’une molécule titrable. En revanche, ces propriétés sont bien à la base des différences de comportement dans le transfert de molécules à travers la membrane.

La prochaine partie abordera un aspect différent du passage de peptide. L’influence de l’hydratation de la molécule en fonction de la position à l’intérieur de la membrane sera étudiée. Nous reviendrons au lipide plus commun, le POPC et aborderons l’étude du pK_a d’une manière plus originale demandant l’utilisation d’une nouvelle technique d’énergie libre.

3.6 Profils multidimensionnels

L’utilisation d’autres degrés de liberté pour étudier le transfert de molécules à travers des membranes biologiques est ici envisagée. Dans le passé, l’utilisation de surface d’énergie multidimensionnelle a déjà été introduite pour quantifier le passage d’ions à travers des canaux ioniques [89]. Durant le déroulement de cette thèse, l’ajout de degrés de liberté supplémentaires pour étudier le transfert a été envisagé par d’autres groupes et commence à émerger. Par exemple, Ghaemi *et al.* [90] ont utilisé un modèle cinétique basé sur plusieurs variables collectives afin d’étudier le transfert d’une molécule d’éthanol au travers d’une bicouche de POPC. En plus de la position par rapport au centre de la membrane, les auteurs ont considéré la coordination de la molécule d’éthanol avec certains atomes des lipides et les molécules d’eau à des positions bien définies au sein de la membrane. Les auteurs ont utilisé des calculs de « bias-exchange metadynamics », une variation de la métadynamique originelle où plusieurs répliques sont simulées parallèlement et dont le potentiel de biais associé à chaque réplique est

interchangé de manière aléatoire entre réplique à intervalle régulier. L'estimation de l'énergie libre en fonction des autres variables n'a été faite qu'en des points bien précis du profil de transfert, au niveau des puits d'énergie libre et des états de transitions.

Contrairement aux premières études déjà publiées, l'approche envisagée dans ce travail a été l'utilisation de la coordination de l'amine avec les molécules d'eau présentes dans sa première sphère d'hydratation. Cette approche a notamment été motivée par l'importance de l'hydratation de la charge et par la création de structures typiques lors du passage d'espèces chargées au travers de milieux hydrophobes. Cette coordonnée de réaction, déjà utilisée, n'a pourtant pas encore été envisagée dans le cas du changement de protonation d'espèces titrables lors de leur transfert à travers une membrane biologique et l'estimation d'un profil de pK_a multidimensionnel.

3.6.1 Définition des variables collectives

Une des premières définition de la coordination comme coordonnée de réaction a été donné par Sprik [91] puis a été utilisée dans différents calculs d'énergie libres [92, 89, 94, 90]. La définition de la coordination est celle définie dans le programme PLUMED [95]

$$s = \sum_{i \in G_1} \sum_{j \in G_2} s_{ij} \quad (3.1)$$

où la somme a lieu sur un atome du groupe 1 (G_1) avec les autres atomes du groupe 2 (G_2). Les contributions individuelles s_{ij} sont définies par une fonction d'atténuation définie tel que

$$f(n) = \begin{cases} 1 & \text{pour } r_{ij} \leq 0 \\ 1 - \left(\frac{r_{ij}}{r_0}\right)^n & \text{pour } r_{ij} > 0 \\ \frac{1 - \left(\frac{r_{ij}}{r_0}\right)^n}{1 - \left(\frac{r_{ij}}{r_0}\right)^m} & \text{pour } r_{ij} > 0 \end{cases}$$

avec $r_{ij} = |r_i - r_j| - d_0$ où r_i et r_j sont la position des atomes i et j appartenant

respectivement aux groupes G_1 et G_2 . Les paramètres r_0 , d_0 , n et m sont définis de manière à ce que la fonction d'atténuation soit égale à zéro une fois la première sphère d'hydratation passée. Les paramètres utilisés ont été $d_0 = 0,32$, $r_0 = 0,035$, $n = 6$ et $m = 12$.

La méthode utilisée pour estimer des profils multidimensionnels est basée sur une des méthodes adiabatiques présentées au cours du chapitre sur les méthodes numériques, UFED (Unified Free Energy Dynamics) implémentée dans GROMACS [2]. La méthode UFED requiert différents paramètres qui sont notamment la masse de la métavariante associée à la coordonnée de réaction m_s , la constante de couplage κ et la température associée à cette métavariante T_s . Les paramètres utilisés pour estimer les surfaces d'énergie libre ont été $m_{s_{CV1}} = 5,0 \times 10^7$ amu, $m_{s_{CV2}} = 2,2 \times 10^3$ amu.nm² pour les masses, $\kappa_{CV1} = 1,0 \times 10^6$ kJ.mol⁻¹.nm⁻², $\kappa_{CV2} = 1,0 \times 10^3$ kJ.mol⁻¹ pour les constantes de couplage respectivement pour la distance (CV1) et la coordination (CV2) dans le cas de la forme chargée. Le potentiel de biais ajouté pour la métavariante est construit en ajoutant un paquet d'énergie potentiel de 1,0 kJ.mol⁻¹ toutes les 2 ps. Pour la forme neutre, ces paramètres sont légèrement modifiés, $m_{s_{CV1}} = 1,0 \times 10^9$ amu, $m_{s_{CV2}} = 2,2 \times 10^3$ amu.nm² pour les masses, $\kappa_{CV1} = 1,5 \times 10^6$ kJ.mol⁻¹.nm⁻², $\kappa_{CV2} = 1,0 \times 10^3$ kJ.mol⁻¹ pour les constantes de couplage respectivement pour la distance (CV1) et la coordination (CV2). Le potentiel de biais ajouté pour la métavariante est construit en ajoutant un paquet d'énergie de 0,5 kJ.mol⁻¹ toutes les 2 ps. La température utilisée pour les métavariantes associées à ces deux degrés de liberté est $T_s = 1400$ K pour les deux formes de l'analogue de la lysine.

3.6.2 Production des surfaces d'énergie libre

Plusieurs simulations, de courtes durées, ont été menées pour déterminer ces paramètres. Les critères retenus sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre 2 introduisant la section UFED/dAFED. Ces calculs ont été rendus possible grâce à un projet

grands challenges sur les nouveaux calculateurs de l’IDRIS. L’utilisation de nouveaux processeurs performants et la possibilité de lancer plusieurs répliques (jusqu’à 60 de manière optimum) parallèlement afin d’accélérer les calculs permettent théoriquement de produire une surface correctement échantillonnée en une journée de calcul, soit une microseconde et demi pour un système de 20 000 atomes.

Si l’intégration de la force pour les profils à une dimension peut être faite en utilisant une méthode d’intégration simple, estimer des forces pour les profils 2D et intégrer ces dernières est plus complexes. La force estimée à partir des données brutes obtenues lors des simulations est d’abord lissée en utilisant une méthode de régression non paramétrique dont la fonction de pondération est de type gaussienne. La force est ensuite intégrée en utilisant une méthode des moindres carrés. Ces routines sont disponibles avec l’addition de PLUMED pour les méthodes UFED et dAFED.

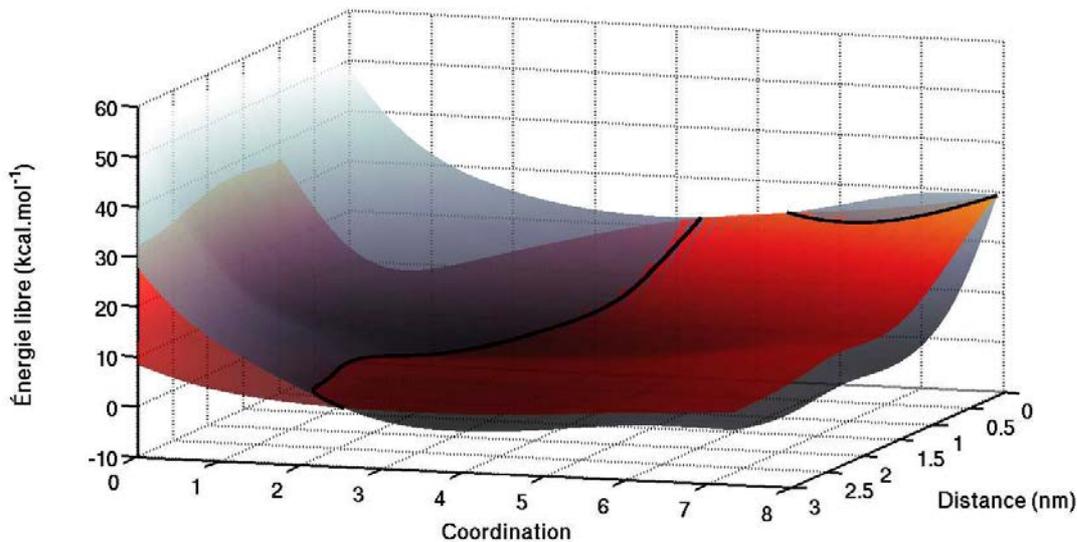


FIGURE 3.15 – Surfaces d’énergie libre pour la forme neutre (rouge) et la forme chargée (grise) de l’analogue de la lysine dans une membrane de POPC estimées par la méthode UFED.

Les surfaces d’énergie libre 2D obtenues reproduisent bien quelques aspects des

profils à une dimension. Pour la forme chargée, figure 3.16a, le puits se situant à l'interface est reproduit et localisé dans la région des têtes polaires entre 1,0 nm et 1,5 nm. La barrière d'énergie au centre est cependant plus haute de 2 kcal.mol^{-1} en prenant le minimum du puits à l'interface et le minimum de la barrière au centre comparé au profil à une dimension. Une barrière de 1 kcal.mol^{-1} est présente à l'interface, légèrement plus haute que dans le profil 1D. Le minimum d'énergie libre le long de la distance par rapport au centre de la membrane apparaît pour une valeur de la coordination égale à 4.

Pour la surface correspondante à la forme neutre, figure 3.16b, des similitudes peuvent également être retrouvées en la comparant au profil à une dimension. Dans la région correspondante aux cholines, entre 1,8 nm et 2,3 nm, une petite barrière d'énergie de $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ est retrouvée. De même, le puits à l'interface, entre 0,7 nm et 1,6 nm, est également reproduit, profondeur de $\approx -2,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ par rapport au milieu aqueux. Relativement en bon accord avec les profils à une dimension où la profondeur du puits est de $\approx -2,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Ce puits s'étend sur plusieurs valeurs de la coordination, allant de 1 à 3 molécules d'eau. La partie de la surface correspondante au centre de la membrane, entre 0,0 et 0,5 nm, se trouve être la partie la plus en désaccord avec le profil à une dimension. Dans ce dernier, l'énergie libre est caractérisée par un plateau. Sur la surface, le peptide rencontre une légère barrière d'énergie augmentant rapidement avec le nombre de coordination. Dans cette région, l'analyse de l'évolution de l'énergie libre en fonction du nombre de coordination est plus délicate. En effet, l'échantillonnage de la coordination pour des valeurs supérieures à une est faible voir inexistante, introduisant de ce fait des artefacts dans la surface lors de l'intégration de la force (voir Annexe sur la convergence des profils et l'échantillonnage des coordonnées de réaction). Cependant les régions aux interfaces, pour la molécule dans ses deux états, sont les zones les plus intéressantes pour étudier le changement d'état de protonation.

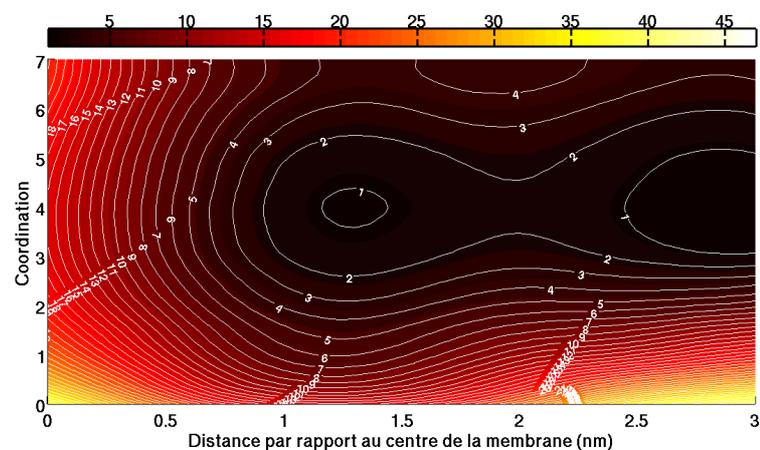
À partir des deux surfaces d'énergie libre déterminées, pour la forme protonée et

pour la forme déprotonée, une surface recombinaison a été construite en prenant le minimum de ces deux surfaces d'énergie libre. De manière similaire au cas à une dimension, la quantité d'énergie libre nécessaire pour déprotoner l'analogue de la lysine dans l'eau est ajouté à la surface correspondante à la forme neutre. Le résultat fait apparaître un vaste bassin d'énergie libre se situant à l'interface, entre 0,6 nm et 1,8 nm, s'étalant sur plusieurs valeurs de la coordination. Les deux bassins appartenant à la forme neutre et la forme chargée se situant dans la même région et n'étant séparés que par une barrière d'énergie inférieure à un kcal.mol^{-1} laisse envisager la possibilité d'un changement de protonation bien avant les 0,6 - 0,8 nm trouvé pour les profils 1D. En effet, suivant l'état d'hydratation du composé il est possible d'observer une déprotonation bien avant, à partir de la région des têtes polaires entre 0,6 nm et 1,8 nm.

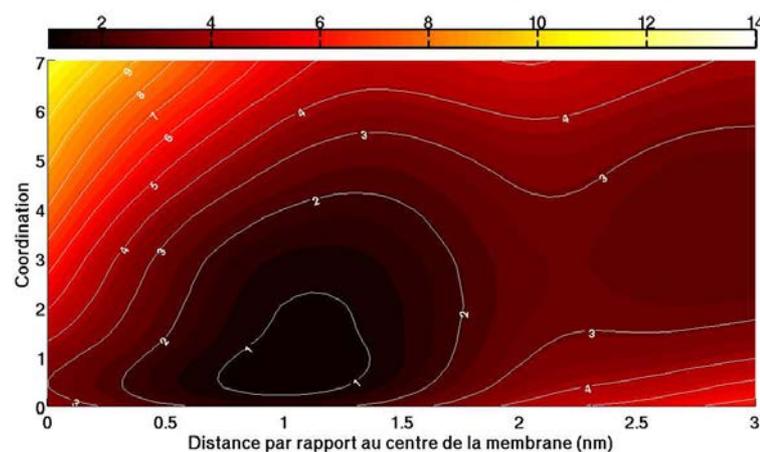
3.6.3 Profils de pK_a multidimensionnel

Finalement, une surface multidimensionnelle de pK_a a été construite basée sur la même idée que pour les profils à une dimension. La différence d'énergie libre entre la surface reliée à la forme neutre et celle reliée à la forme chargée a servi à estimer un profil de pK_a . Ce profil est donné sur la figure 3.17.

À partir de la surface d'énergie libre où cette dernière est minimum et en la superposant à la surface de pK_a , il apparaît dans la région où l'analogue de la lysine pouvait passer d'un état protoné à un état déprotoné relativement facilement, le pK_a de cette molécule peut varier sensiblement suivant qu'elle se trouve être coordonnée par une ou plusieurs molécules d'eau. La population d'espèces neutres à l'interface peut, d'après cette surface, devenir suffisamment important pour permettre le passage d'une portion significative de molécule à travers la membrane sous la forme neutre.



(a) Surface d'énergie libre multidimensionnelle pour la forme protonée



(b) Surface d'énergie libre multidimensionnelle pour la forme déprotonée

FIGURE 3.16 – Surfaces d'énergie libre multidimensionnelles obtenues en utilisant la méthode UFED en fonction de la projection de la distance entre le centre de la membrane et l'analogue de la lysine le long de la normale à l'interface et du nombre de coordination avec les molécules d'eau dans la première sphère d'hydratation de l'amine. Les lignes de niveaux sont données toutes les kcal.mol¹

3.7 Conclusion générale

Les principaux résultats provenant de ces travaux sont d'une part l'étude de l'influence de la composition de la membrane sur l'état de protonation d'un composé cationique, d'autre part la possibilité d'étudier l'état de protonation le transfert en utilisant

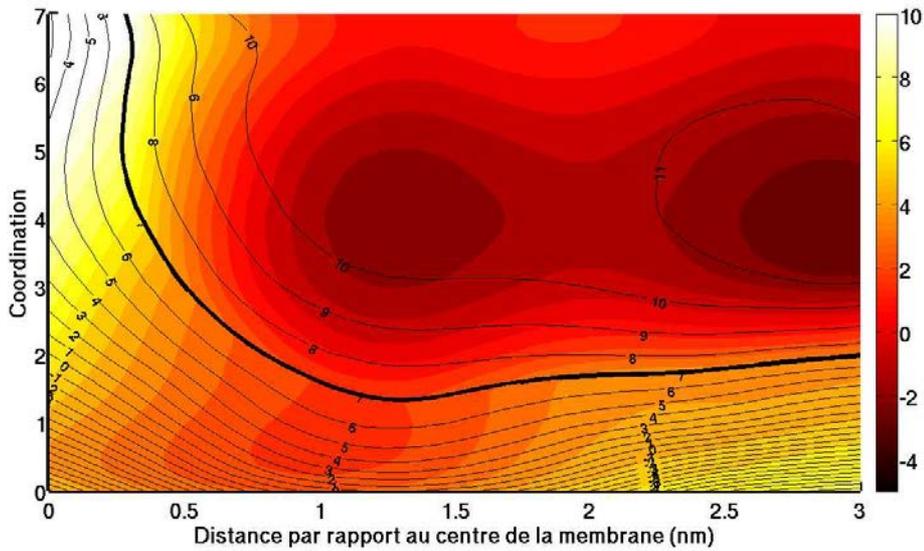


FIGURE 3.17 – Surface de pK_a multidimensionnelle pour l’analogue de lysine en fonction de la distance par rapport au centre de la membrane et du nombre de coordination. Chaque ligne de niveau correspond à une unité pK_a . La surface hybride est donnée en fond.

plusieurs degré de liberté.

Pour ce faire, trois membranes différentes ont été utilisées afin d’étudier l’influence des chaînes aliphatiques et l’influence des glycérols. Pour le premier cas, des lipides constitués soit par des chaînes linéaires traditionnelles soit par des chaînes isopréniques et pour le deuxième cas des lipides où les têtes polaires sont reliés aux chaînes carbonées soit par des fonctions éther soit des fonctions ester. Ces derniers se retrouvent dans une catégorie bien particulière de micro-organismes, les archées. Les lipides de ces êtres vivants sont connus pour former des membranes particulièrement stable sous une grande variété de conditions. L’estimation de l’énergie libre de transfert pour la forme chargée à effectivement montré que le coût énergétique pour amener une charge dans le cœur hydrophobe d’une membrane constituée par des chaînes carbonées méthylées est bien supérieur au cas de chaînes linéaires. Dans le cas de la dif-

férence éther/ester, aucune influence sur le pK_a n'est réellement observée. Cependant, les profils d'énergie libre révèlent que l'insertion d'une molécule dans une membrane faite de lipides non-estérifiés est plus difficile notamment à cause de l'existence d'une pression latérale intérieure plus importante.

La seconde partie a nécessité l'évaluation de profils d'énergie libre multidimensionnels en prenant en compte en plus de la distance entre le centre de masse de la membrane et le centre de masse du peptide, la coordination de l'amine avec les molécules d'eau présentes dans sa première sphère d'hydratation. Ces profils ont montré de nouvelles possibilités pour le peptide pour changer d'état de protonation. Effectivement, suivant le nombre de molécules d'eau hydratant le peptide la forme neutre apparaît stable au-dessous des glycérols pouvant faciliter de ce fait l'insertion dans le cœur hydrophobe de la membrane.

Une des limitations des études réalisées durant cette thèse provient du fait que le résidu traversant la membrane est isolé, ce qui dans le cas de molécules thérapeutiques, plus complexe, des corrélations ou des synergies entre résidus peuvent exister. Ces phénomènes ont été identifiés pour des peptides riches en résidus cationiques comme la transportane [108], adoptant une conformation en hélice- α , dont le passage à travers la membrane est facilité par la présence de multiples lysines formant des structures d'hydratation. Dans le cas du peptide TAT ou de la pénétratine, deux peptides riches en arginine, la présence de multiples arginines provoque la courbure de la membrane ou la formation de pore transmembranaire, phénomènes qu'un seul résidu isolé ne peut créer [125]. L'ajout d'un vecteur, comme une nanoparticule de fullerène, via ses propriétés hydrophobes va également changer la thermodynamique du transfert d'une molécule thérapeutique [67]. Une possibilité serait de considérer des peptides modèles simples avec plusieurs fonctions titrables et regarder, via l'estimation de profils d'énergie libre multidimensionnels, les synergies entre ces différents résidus. Dans le cadre de ces molécules plus complexes, l'estimation de degrés de liberté supplémen-

taires pourraient être en lien avec les angles diédraux ou la distance entre deux atomes. Les molécules pharmacologiques pouvant exister sous des conformations différentes, celles se trouvant être les plus pertinentes en milieu aqueux peuvent être différentes de celles dans la membrane ou à l'interface.

Bibliographie

- [1] P. van der Ploeg and H. J. C. Berendsen. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. *J. Chem. Phys.*, 76 :3271–3276, 1982.
- [2] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. C. Berendsen. GROMACS : Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, 26 :1701–1718, 2005.
- [3] S.-J. Marrink and H. J. C. Berendsen. Simulation of water transport through a lipid membrane. *J. Phys. Chem.*, 98 :4155–4168, 1994.
- [4] D. Bassolino-Klimas, H. E. Alper, and T. R. Stouch. Solute diffusion in lipid bilayer membranes : An atomic level study by molecular dynamics simulation. *Biochemistry*, 32 :12624–12637, 1993.
- [5] H. E. Alper and T. R. Stouch. Orientation and diffusion of a drug analog in biomembranes : Molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.*, 99 :5724–5731, 1995.
- [6] A. Pohorille, P. Cieplak, and M. A. Wilson. Interactions of anesthetics with the membrane-water interface. *Chem. Phys.*, 204 :337–345, 1996.
- [7] K. Tu, M. Tarek, M. L. Klein, and D. Scharf. Effects of anesthetics on the structure of a phospholipid bilayer : Molecular dynamics investigation of halothane in

- the hydrated liquid crystal phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.*, 75 :2123–2134, 1998.
- [8] M. A. Wilson and A. Pohorille. Mechanism of unassisted ion transport across membrane bilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 :6580–6587, 1996.
- [9] S. J. Marrink and H. J. C. Berendsen. Permeation process of small molecules across lipid membranes studied by molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.*, 100 :16729–16738, 1996.
- [10] P. Jedlovsky and M. Mezei. Calculation of the Free Energy Profile of H₂O, O₂, CO, CO₂, NO, and CHCl₃ in a Lipid Bilayer with a Cavity Insertion Variant of the Widom Method. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 :5125–5131, 2000.
- [11] C. Wei and A. Pohorille. Permeation of membranes by ribose and its diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :10237–10245, 2009.
- [12] J. Tian, A. Sethi, B. I. Swanson, B. Goldstein, and S. Gnanakaran. Taste of sugar at the membrane - thermodynamics and kinetics of the interaction of a disaccharide with lipid bilayers. *Biophys. J.*, 104 :622–632, 2013.
- [13] J. Kapla, J. Wohler, B. Stevansson, O. Engström, G. Widmalm, and A. Maliniak. Molecular dynamics simulations of Membrane–Sugar interactions. *J. Phys. Chem. B*, 117 :6667–6673, 2013.
- [14] I. V. Khavrutskii, A. A. Gorfe, B. Lu, and J. A. McCammon. Free energy for the permeation of na and cl ions and their ion-pair through a zwitterionic dimyristoyl phosphatidylcholine lipid bilayer by umbrella integration with harmonic fourier beads. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :1706–1716, 2009.
- [15] H. L. Tepper and G. A. Voth. Protons may leak through pure lipid bilayers via a concerted mechanism. *Biophys. J.*, 88 :3095–3108, 2005.
- [16] H. L. Tepper and G. A. Voth. Mechanisms of passive ion permeation through lipid bilayers : insights from simulations. *J. Phys. Chem. B*, 110 :21327–21337, 2006.

-
- [17] J. L. MacCallum, W.F. Drew Bennett, and D. P. Tieleman. Transfer of arginine into lipid bilayers is nonadditive. *Biophys. J.*, 101 :110–117, 2011.
- [18] A. C. V Johansson and E. Lindahl. Position resolved free energy of solvation for amino acids in lipid membranes from molecular dynamics simulations. *Proteins*, 70 :1332–1344, 2008.
- [19] J. L. MacCallum and D. P. Tieleman. Chapter 8 : Interactions between small molecules and lipid bilayers. In *Computational Modeling of Membrane Bilayers*, volume 60, 227–256. Academic Press, 2008.
- [20] A. C. V. Johansson and E. Lindahl. Titratable amino acid solvation in lipid membranes as a function of protonation state. *J. Phys. Chem. B*, 113 :245–253, 2009.
- [21] J. L. MacCallum, W. F. D. Bennett, and D. P. Tieleman. Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophys. J.*, 94 :3393–3404, 2008.
- [22] D. Sengupta, J. C. Smith, and G. M. Ullmann. Partitioning of amino-acid analogues in a five-slab membrane model. *Bba - Biomembr.*, 1778 :2234–2243, 2008.
- [23] A. C. V. Johansson and E. Lindahl. Amino-acid solvation structure in transmembrane helices from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 91 :4450–4463, 2006.
- [24] S. Dorairaj and T. W. Allen. On the thermodynamic stability of a charged arginine side chain in a transmembrane helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 :4943–4948, 2007.
- [25] L. Li, I. Vorobyov, and T. W. Allen. Potential of mean force and pKa profile calculation for a lipid membrane-exposed arginine side chain. *J. Phys. Chem. B*, 112 :9574–9587, 2008.
- [26] J. Gumbart and B. Roux. Determination of membrane-insertion free energies by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 102 :795–801, 2012.

- [27] A. C. V. Johansson and E. Lindahl. The role of lipid composition for insertion and stabilization of amino acids in membranes. *J. Chem. Phys.*, 130 :185101–185108, 2009.
- [28] J. Yoo and Q. Cui. Chemical versus mechanical perturbations on the protonation state of arginine in complex lipid membranes : Insights from microscopic pKa calculations. *Biophys. J.*, 99 :1529–1538, 2010.
- [29] A. A. Gurtovenko, J. Anwar, and I. Vattulainen. Defect-mediated trafficking across cell membranes : Insights from in silico modeling. *Chem. Rev.*, 110 :6077–6103, 2010.
- [30] J. P. Ulmschneider, M. Andersson, and M. B. Ulmschneider. Determining peptide partitioning properties via computer simulation. *J. Membrane Biol.*, 239 :15–26, 2011.
- [31] C. L. Wennberg, D. van der Spoel, and J. S. Hub. Large influence of cholesterol on solute partitioning into lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 134 :5351–5361, 2012.
- [32] J. Ulander and A. D. J. Haymet. Permeation across hydrated DPPC lipid bilayers : Simulation of the titrable amphiphilic drug valproic acid. *Biophys. J.*, 85 :3475–3484, 2003.
- [33] E. B. Kim, N. Lockwood, M. Chopra, O. Guzmán, N. L. Abbott, and J. J. de Pablo. Interactions of liquid crystal-forming molecules with phospholipid bilayers studied by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 89 :3141–3158, 2005.
- [34] M. J. Hinner, S. -J. Marrink, and A. H. de Vries. Location, tilt, and binding : A molecular dynamics study of voltage-sensitive dyes in biomembranes. *J. Phys. Chem. B*, 113 :15807–15819, 2009.
- [35] R. W. Tejwani, M. E. Davis, B. D. Anderson, and T. R. Stouch. Functional group dependence of solute partitioning to various locations within a DOPC bilayer : A comparison of molecular dynamics simulations with experiment. *J. Pharm. Sci.*, 100 :2136–2146, 2011.

-
- [36] O. Cramariuc, T. Rog, M. Javanainen, L. Monticelli, A. V. Polishchuk, and I. Vattulainen. Mechanism for translocation of fluoroquinolones across lipid membranes. *Bba - Biomemb.*, 1818 :2563–2571, 2012.
- [37] M. Paloncyova, K. Berka, and M. Otyepka. Convergence of free energy profile of coumarin in lipid bilayer. *J. Chem. Theory Comput.*, 8 :1200–1211, 2012.
- [38] B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, R. Friedman, A. M. Rosengren, H. Henschel, and I. A. Nicholls. How warfarin’s structural diversity influences its phospholipid bilayer membrane permeation? *J. Phys. Chem. B*, 117 :2384–2395, 2013.
- [39] P. Podloucka, K. Berka, G. Fabre, M. Paloncyová, J. -L. Duroux, M. Otyepka, and P. Trouillas. Lipid bilayer membrane affinity rationalizes inhibition of lipid peroxidation by a natural lignan antioxidant. *J. Phys. Chem. B*, 117 :5043–5049, 2013.
- [40] J. P. M. Jämbeck and A. P. Lyubartsev. Exploring the free energy landscape of solutes embedded in lipid bilayers. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4 :1781–1787, 2013.
- [41] M. Paloncyova, K. Berka, and M. Otyepka. Molecular insight into affinities of drugs and their metabolites to lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B*, 117 :2403–2410, 2013.
- [42] J. P. M. Jambeck and A. P. Lyubartsev. Implicit inclusion of atomic polarization in modeling of partitioning between water and lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 :4677–4686, 2013.
- [43] R. Notman and J. Anwar. Breaching the skin barrier : Insights from molecular simulation of model membranes. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 65 :237–250, 2013.
- [44] J. L. MacCallum and D. P. Tieleman. Computer simulation of the distribution of hexane in a lipid bilayer : Spatially resolved free energy, entropy, and enthalpy profiles. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :125–130, 2006.
- [45] D. P. Tieleman and S. -J. Marrink. Lipids out of equilibrium : Energetics of desorption and pore mediated flip-flop. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :12462–12467, 2006.

- [46] W. F. D. Bennett, J. L. MacCallum, M. J. Hinner, S. -J. Marrink, and D. P. Tieleman. Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :12714–12720, 2009.
- [47] C. Xing and R. Faller. Density imbalances and free energy of lipid transfer in supported lipid bilayers. *J. Chem. Phys.*, 131 :175104–175111, 2009.
- [48] N. Sapay, W. F. D. Bennett, and D. P. Tieleman. Thermodynamics of flip-flop and desorption for a systematic series of phosphatidylcholine lipids. *Soft Matter*, 5 :3295–3302, 2009.
- [49] W. F. D. Bennett and D. P. Tieleman. Molecular simulation of rapid translocation of cholesterol, diacylglycerol, and ceramide in model raft and nonraft membranes. *J. Lipid Res.*, 53 :421–429, 2012.
- [50] Z. -L. Li, H. -M. Ding, and Y. -Q. Ma. Translocation of polyarginines and conjugated nanoparticles across asymmetric membranes. *Soft Matter*, 9 :1281–1286, 2012.
- [51] K. Huang and A. E. Garcia. Free energy of translocating an arginine-rich cell-penetrating peptide across a lipid bilayer suggests pore formation. *Biophys. J.*, 104 :412–420, 2013.
- [52] H. Leontiadou, A. E. Mark, and S. J. Marrink. Antimicrobial peptides in action. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :12156–12161, 2006.
- [53] B. A. Hall, A. P. Chetwynd, and M. S. P. Sansom. Exploring peptide-membrane interactions with coarse-grained MD simulations. *Biophys. J.*, 100 :1940–1948, 2011.
- [54] C. H. Davis and M. L. Berkowitz. Interaction between amyloid-beta (1–42) peptide and phospholipid bilayers : A molecular dynamics study. *Biophys. J.*, 96 :785–797, 2009.
- [55] J. Mondal, X. Zhu, Q. Cui, and A. Yethiraj. Sequence-dependent interaction of beta-peptides with membranes. *J. Phys. Chem. B*, 114 :13585–13592, 2010.

-
- [56] V. Vivcharuk and Y. Kaznessis. Free Energy Profile of the Interaction between a Monomer or a Dimer of Protegrin-1 in a Specific Binding Orientation and a Model Lipid Bilayer. *J. Phys. Chem. B*, 114 :2790–2797, 2010.
- [57] I. -C. Yeh, D. R. Ripoll, and A. Wallqvist. Free energy difference in indolicidin attraction to eukaryotic and prokaryotic model cell membranes. *J. Phys. Chem. B*, 116 :3387–3396, 2012.
- [58] S. J. Irudayam and M. L. Berkowitz. Binding and reorientation of melittin in a POPC bilayer : Computer simulations. *Bba - Biomemb.*, 1818 :2975–2981, 2012.
- [59] R. Chen and S. -H. Chung. Effect of gating modifier toxins on membrane thickness : Implications for toxin effect on gramicidin and mechanosensitive channels. *Toxins*, 5 :456–471, 2013.
- [60] L. Li, H. Davande, D. Bedrov, and G. D. Smith. A molecular dynamics simulation study of C60 fullerenes inside a dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer. *J. Phys. Chem. B*, 111 :4067–4072, 2007.
- [61] J. Wong-Ekkabut, S. Baoukina, W. Triampo, I. -M. Tang, D. P. Tieleman, and L. Monticelli. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nat. Nano*, 3 :363–368, 2008.
- [62] D. Bedrov, G. D. Smith, H. Davande, and L. Li. Passive transport of C60 fullerenes through a lipid membrane : A molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem. B*, 112 :2078–2084, 2008.
- [63] A. Jusufi, R. H. DeVane, W. Shinoda, and M. L. Klein. Nanoscale carbon particles and the stability of lipid bilayers. *Soft Matter*, 7 :1139–1146, 2011.
- [64] C. C. Chiu, W. Shinoda, R. H. DeVane, and S. O. Nielsen. Effects of spherical fullerene nanoparticles on a dipalmitoyl phosphatidylcholine lipid monolayer : A coarse grain molecular dynamics approach. *Soft Matter*, 8 :9610–9616, 2012.

- [65] L. Monticelli. On atomistic and coarse-grained models for C60 fullerene. *J. Chem. Theory Comput.*, 8 :1370–1378, 2012.
- [66] R. Qiao, A. P. Roberts, A. S. Mount, A. J. Klaine, and P. C. Ke. Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett.*, 7 :614–619, 2007.
- [67] S. Kraszewski, M. Tarek, and C. Ramseyer. Uptake and translocation mechanisms of cationic amino derivatives functionalized on pristine C60 by lipid membranes : A molecular dynamics simulation study. *ACS Nano*, 5 :8571–8578, 2011.
- [68] P. Gkeka, L. Sarkisov, and P. Angelikopoulos. Homogeneous Hydrophobic–Hydrophilic surface patterns enhance permeation of nanoparticles through lipid membranes. *J. Phys. Chem Lett.*, 4 :1907–1912, 2013.
- [69] C. V. Kelly, P. R. Leroueil, E. K. Nett, J. M. Wereszczynski, J. R. Baker, B. G. Orr, M. M. B. Holl, and I. Andricioaei. Poly(amidoamine) dendrimers on lipid bilayers : Free energy and conformation of binding. *J. Phys. Chem. B*, 112 :9337–9345, 2008.
- [70] S. L. Fiedler and A. Violi. Simulation of nanoparticle permeation through a lipid membrane. *Biophys. J.*, 99 :144–152, 2010.
- [71] S. Choe, R. Chang, J. Jeon, and A. Violi. Molecular dynamics simulation study of a pulmonary surfactant film interacting with a carbonaceous nanoparticle. *Biophys. J.*, 95 :4102–4114, 2008.
- [72] R. C. V. Lehn and A. Alexander-Katz. Penetration of lipid bilayers by nanoparticles with environmentally-responsive surfaces : simulations and theory. *Soft Matter*, 7 :11392–11404, 2011.
- [73] P. Liu, F. Dehez, W. Cai, and C. Chipot. A toolkit for the analysis of free-energy perturbation calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, 8 :2606–2616, 2012.
- [74] G. Hummer, L. R. Pratt, and A. E. Garcia. Free energy of ionic hydration. *J. Phys. Chem.*, 100 :1206–1215, 1996.

-
- [75] M. A. Kastholz and P. H. Hunenberger. Influence of artificial periodicity and ionic strength in molecular dynamics simulations of charged biomolecules employing lattice-sum methods. *J. Phys. Chem. B*, 108 :774–788, 2004.
- [76] J. Yoo and Q. Cui. Does arginine remain protonated in the lipid membrane? Insights from microscopic pKa calculations. *Biophys. J.*, 94 :61–63, 2008.
- [77] C. Neale, W. F. D. Bennett, D. P. Tieleman, and R. Pomès. Statistical convergence of equilibrium properties in simulations of molecular solutes embedded in lipid bilayers. *J. Chem. Theory Comput.*, 7 :4175–4188, 2011.
- [78] M. Orsi, W. E. Sanderson, and J. W. Essex. Permeability of small molecules through a lipid bilayer : A multiscale simulation study. *J. Phys. Chem. B*, 113 :12019–12029, 2009.
- [79] M. Orsi and J. W. Essex. Permeability of drugs and hormones through a lipid bilayer : insights from dual-resolution molecular dynamics. *Soft Matter*, 6 :3797–3808, 2010.
- [80] H. Wang, C. S. Peskin, and T. C. Elston. A robust numerical algorithm for studying biomolecular transport processes. *J. Theor. Biol.*, 221 :491–511, 2003.
- [81] M. Jansen and A. Blume. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains *Biophys. J.*, 68 :997–1008, 1995.
- [82] W. Shinoda, M. Mikami, T. Baba, and M. Hato. Molecular dynamics study on the effect of chain branching on the physical properties of lipid bilayers : Structural stability. *J. Phys. Chem. B*, 107 :14030–14035, 2003.
- [83] J. B. Lim and J. B. Klauda. Lipid chain branching at the iso- and anteiso-positions in complex chlamydia membranes : A molecular dynamics study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808 :323–331, 2011.

- [84] L. Martinez, R. Andrade, E. G. Birgin, and J. M. Martinez. PACKMOL : A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 30 :2157–2164, 2009.
- [85] K. Shinoda, W. Shinoda, T. Baba, and M. Mikami. Comparative molecular dynamics study of ether- and ester-linked phospholipid bilayers. *J. Chem. Phys.*, 121 :9648–9654, 2004.
- [86] L. Wang, P. S. Bose, and F. J. Sigworth. Using cryo-EM to measure the dipole potential of a lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 :18528–18533, 2006.
- [87] W. Shinoda, M. Mikami, T. Baba, and M. Hato. Molecular dynamics study on the effects of chain branching on the physical properties of lipid bilayers : Permeability. *J. Phys. Chem. B*, 108 :9346–9356, 2004.
- [88] A. Polak, D. Bonhenry, F. Dehez, P. Kramar, D. Miklavcic, and M. Tarek. On the electroporation thresholds of lipid bilayers : Molecular dynamics simulation investigations. *J. Membr. Biol.*, doi : 10.1007/s00232-013-9570-7, 2013.
- [89] F. L. Gervasio, M. Parrinello, M. Ceccarelli, and M. L. Klein. Exploring the gating mechanism in the ClC chloride channel via metadynamics. *J. Mol. Biol.*, 361 :390–398, 2006.
- [90] Z. Ghaemi, M. Minozzi, P. Carloni, and A. Laio. A novel approach to the investigation of passive molecular permeation through lipid bilayers from atomistic simulations. *J. Phys. Chem. B*, 116 :8714–8721, 2012.
- [91] M. Sprik. Computation of the pK of liquid water using coordination constraints. *Chem. Phys.*, 258 :139–150, 2000.
- [92] A. Laio and M. Parrinello. Escaping free-energy minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :12562–12566, 2002.
- [93] J. B. Klauda, R. M. Venable, L. A. Freites, J. W. O'Connor, D. J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A. D. MacKerell and R. W. Pastor. Update of the

-
- CHARMM all-atom additive force field for lipids : Validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B*, 114 :7830–7843, 2010.
- [94] R. E. Bulo, D. Donadio, A. Laio, F. Molnar, J. Rieger, and M. Parrinello. Site binding of Ca²⁺ ions to polyacrylates in water : A molecular dynamics study of coiling and aggregation. *Macromolecules*, 40 :3437–3442, 2007.
- [95] M. Bonomi, D. Branduardi, G. Bussi, C. Camilloni, D. Provasi, P. Raiteri, D. Donadio, F. Marinelli, F. Pietrucci, R. A. Broglia, and M. Parrinello. Plumed : A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Comput. Phys. Commun.*, 180 :1961–1972, 2009.
- [96] A. Warshel. Calculations of enzymic reactions : Calculations of pKa, proton transfer reactions, and general acid catalysis reactions in enzymes. *Biochemistry*, 20 :3167–3177, 1981.
- [97] Y. Y. Sham, Z. T. Chu, and A. Warshel. Consistent calculations of pKa's of ionizable residues in proteins : Semi-microscopic and microscopic approaches. *J. Phys. Chem. B*, 101 :4458–4472, 1997.
- [98] N. J. Gleason, V. V. Vostrikov, D. V. Greathouse and R. E. Koeppe. Buried lysine, but not arginine, titrates and alters transmembrane helix tilt. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 110 :1692–1695, 2013.
- [99] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. J. McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin and M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102 :3586–3616, 1998.
- [100] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein.

- Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79 :926–935, 1983.
- [101] I. Vorobyov, V. M. Anisimov, S. Greene, R. M. Venable, A. Moser, R. W. Pastor and A. D. MacKerell Jr. Additive and classical drude polarizable force fields for linear and cyclic ethers. *J. Chem. Theory Comput.*, 3 :1120–1133, 2007.
- [102] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé and K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 26 :1781–1802, 2005.
- [103] P. F. Batcho, D. A. Case and T. Schlick. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 115 :4003–4019, 2001.
- [104] J. A. Izaguirre, S. Reich and R. D. Skeel. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 110 :9853–9864, 1999.
- [105] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti and H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints : Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23 :327–341, 1977.
- [106] D. G. Isom, C. A. Castaneda, B. R. Cannon and E. B. Garcia-Moreno. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108 :5260–5265, 2011.
- [107] H. D. Herce, A. E. Garcia, J. Litt, R. S. Kane, P. Martin, N. Enrique, A. Rebolledo and V. Milesi. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys. J.*, 97 :1917–1925, 2009.
- [108] M. Pourmoussa and M. Karttunen. Early stages of interactions of cell-penetrating peptide penetratin with a DPPC bilayer. *Chem. Phys. Lipids*, 169 :85–94, 2013.

-
- [109] A. Radzicka and R. Wolfenden. Comparing the polarities of the amino acids : Side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry*, 27 :1664–1670, 1988.
- [110] M. Chen, M. A. Cuendet, and M. E. Tuckerman. Heating and flooding : A unified approach for rapid generation of free energy surfaces. *J. Chem. Phys.*, 137 :24102–024113, 2012.
- [111] M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52 :7182–7190, 1981.
- [112] G. J. Martyna, M. L. Klein, and M. Tuckerman. Nosé–Hoover chains : The canonical ensemble via continuous dynamics. *J. Chem. Phys.*, 97 :2635–2643, 1992.
- [113] T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh ewald : An N.log(N) method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98 :10089–10092, 1993.
- [114] O. Berger, O. Edholm and F. Jähnig. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature systems. *Biophys. J.*, 72 :2002–2013, 1997.
- [115] G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives and J. L. William. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B*, 105 :6474–6487, 2001.
- [116] L. Li, I. Vorobyov, Igor and A. W. Toby. The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *J. Phys. Chem. B*, doi : 10.1021/jp405418y, 2013.
- [117] A. Ziegler, X. L. Blatter, A. Seelig and J. Seelig. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry*, 42 :9185–9194, 2003.

- [118] E. Goncalves, E. Kitas and J. Seelig. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate : Structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 44 :2692–2702, 2005.
- [119] I. Vorobyov and T. W. Allen. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. *Bba - Biomembranes*, 1808 :1673–1683, 2011.
- [120] I. Vorobyov, L. Li and A. W. Toby. Assessing atomistic and coarse-grained force fields for protein-lipid interactions : The formidable challenge of an ionizable side chain in a membrane. *J. Phys. Chem. B*, 112 :9588–9602, 2008.
- [121] D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman and J. B. Rothbard. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Sci.*, 56 :318–325, 2000.
- [122] S. Mukherjee and A. Chattopadhyay. Influence of ester and ether linkage in phospholipids on the environment and dynamics of the membrane interface : A wavelength-selective fluorescence approach. *Langmuir*, 21 :287–293, 2000.
- [123] K. Yamauchi, K. Doi, Y. Yoshida and M. Kinoshita. Archaeobacterial lipids : Highly proton-impermeable membranes from 1,2-diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocoline. *Bba - Biomembranes*, 1146 :178–182, 1993.
- [124] T. H. Haines. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.*, 40 :299–324, 2001.
- [125] S. Yesylevskyy, S. J. Marrink and A. E. Mark. Alternative mechanisms for the interaction of the cell-penetrating peptides penetratin and the TAT peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.*, 97 :40–49, 2009.
- [126] S. Baoukina, L. Monticelli and D. P. Tieleman. Interaction of pristine and functionalized carbon nanotubes with lipid membranes. *J. Phys. Chem. B*, doi : 10.1021/jp405732k, 2013.

- [127] C. F. Chew, A. Guy and P. C. Biggin. Distribution and dynamics of adamantanes in a lipid bilayer. *Biophys. J.*, 12 :5627–5636, 2008.

Annexe

Les méthodes utilisées pour calculer les potentiels électrostatiques et les profils de pressions sont donnés ici . Viennent ensuite, les convergences pour les profils présentés dans les résultats puis les profils de diffusion dans les différentes membranes.

1 Calculs des profils électrostatiques et de pressions le long de la normale à la membrane

1.1 Théorie

Il est possible de l'estimer à partir de simulations de dynamique moléculaire en utilisant l'équation de Poisson-Boltzmann appliquée à l'électrostatique faisant une double intégration sur la densité de charges le long d'une direction de la boîte de simulation.

$$\Delta\phi(z) = \phi(z) - \phi(0) = -\frac{1}{\epsilon_0} \int_0^z \int_0^{z'} \rho(z'') dz'' dz' \quad (1)$$

où z correspond à la normale par rapport à la bicouche, ϕ est le potentiel électrostatique, ϵ_0 la perméabilité du vide et ρ la distribution de charges.

Il est également possible de calculer la pression pour différentes profondeurs dans la membrane et d'obtenir un profil de pression latérale en fonction de z , la normale à la

membrane [1]. La pression moyenne peut être exprimée comme le tiers de la trace du tenseur de pression \mathbf{p} , ce dernier s'écrivant d'après le théorème du viriel

$$\mathbf{p} = 2\langle \mathbf{E} \rangle - \Sigma \quad (2)$$

où $\langle \dots \rangle$ représente une grandeur moyennée sur l'ensemble des probabilités de l'observable, \mathbf{E} représente le tenseur d'énergie cinétique et Σ le tenseur des contraintes. L'énergie cinétique est obtenue à partir des vitesses

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2} \sum_i m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i \quad (3)$$

Le tenseur des contraintes Σ est une grandeur macroscopique résultant de la moyenne sur l'ensemble des propriétés microscopiques provenant des forces d'interactions entre les particules. Il est peut être exprimé en fonction du viriel Θ

$$\Sigma = \frac{\Theta}{V} = \frac{1}{V} \sum_{i < j} \mathbf{F}_{ij} \otimes \mathbf{r}_{ij} \quad (4)$$

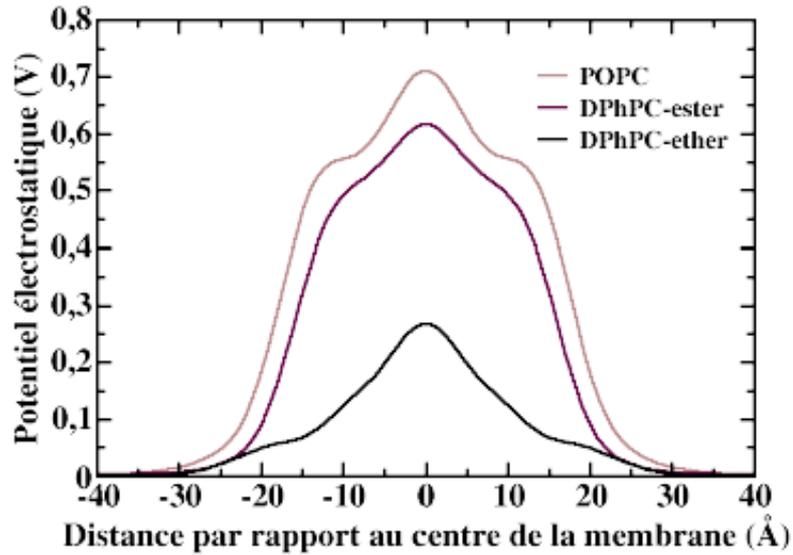
où \mathbf{r}_{ij} et \mathbf{F}_{ij} sont respectivement la distance et la force entre les particules i et j et V le volume du système. Dans le cas où les forces sont estimées en utilisant une sommation sur un réseau (comme dans le cas des sommations d'Ewald pour les forces électrostatiques), cette formulation doit être légèrement modifiée. La membrane peut être considérée comme étant un système homogène et isotrope dans le plan (x, y) , le tenseur est évalué uniquement le long de z , la normale à la surface. La boîte de simulation est ainsi divisée en tranches d'épaisseur Δz . Ainsi le profil de pression le long de la normale à la bicouche peut être estimée lors d'une simulation de dynamique moléculaire par la relation

$$\mathbf{p}_{\text{local}}(z) = \sum_{i \in \text{tranche}} m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i - \frac{1}{\Delta V} \sum_{i < j} \mathbf{F}_{ij} \otimes \mathbf{r}_{ij} f(z, z_i, z_j) \quad (5)$$

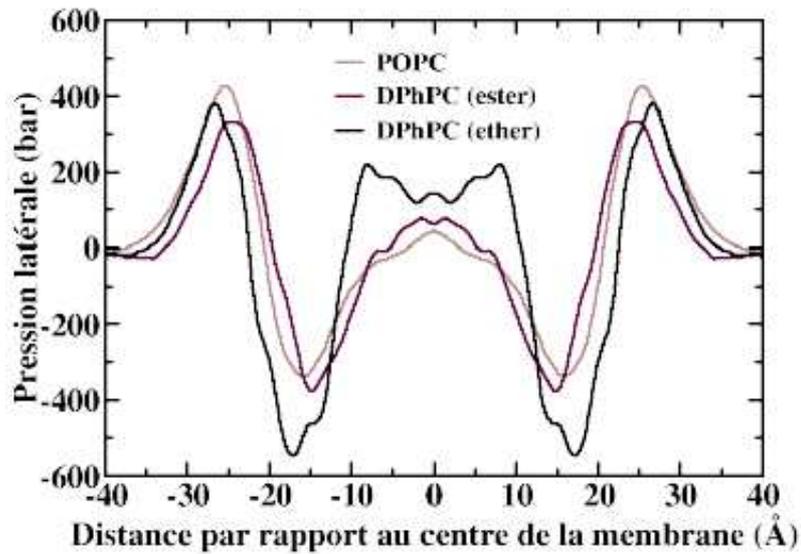
où ΔV est le volume de chaque tranche, $f(z, z_i, z_j) = \Delta z / |z_i - z_j|$ si chacune des particules se situent en dehors de la tranche et de chacun des côtés (en respectant les conditions aux limites), $f(z, z_i, z_j) = \Delta z / 2|z_i - z_j|$ si une des particules se trouvent dans la tranche et $f(z, z_i, z_j) = 1$ si les deux particules se trouvent à l'intérieur de la tranche. Finalement, si les deux particules se trouvent en dehors de la tranche mais de même côté, la contribution au viriel est nulle.

Les profils de potentiels électrostatiques et de pressions présentés respectivement sur les figures 1a et 1b ont nécessité des temps de simulation de 70 ns environ de manière à obtenir une statistique suffisante. Les méthodes pour les obtenir sont présentées en annexe. Dans le cas de la pression, un module présent dans le programme NAMD (v9) a été utilisé.

1.2 Résultats



(a) Potentiels électrostatiques



(b) Profils de pression

FIGURE 1 – Profils électrostatique et de pression pour les trois différentes membranes utilisées pour étudier le transfert et la protonation de peptides.

2 Profils de diffusion

Les profils de diffusion utilisés pour estimer les différentes constantes cinétiques sont données sur la figure (A.3).

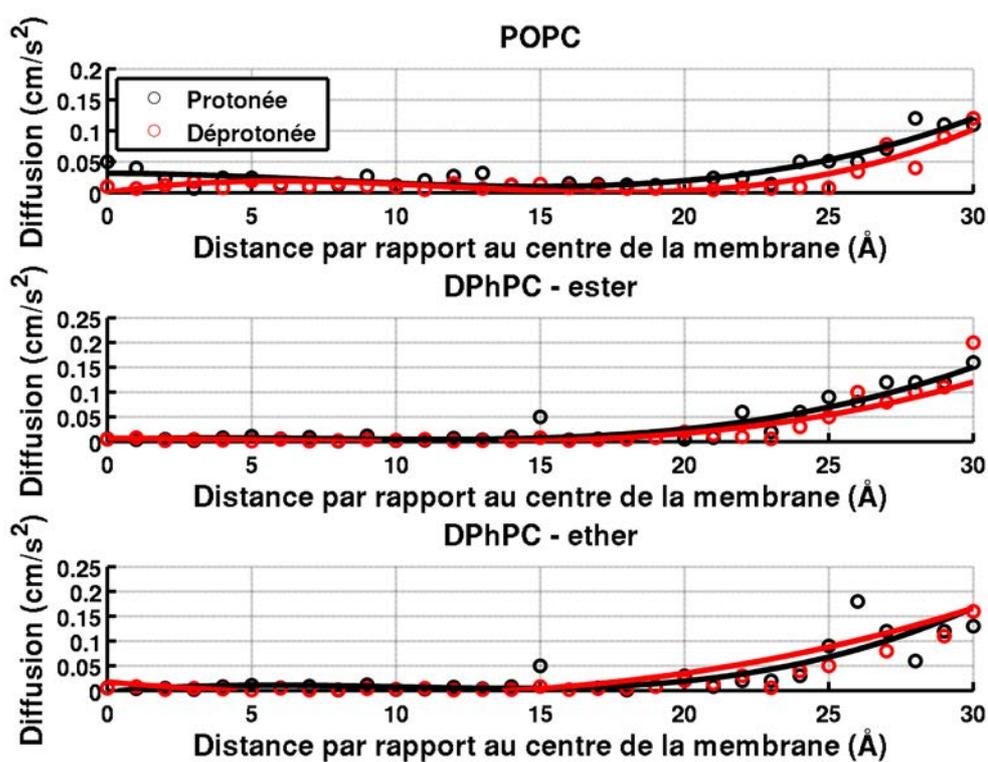


FIGURE 2 – Profils de diffusion pour les trois membranes utilisées lors de l'estimation de l'influence de la composition de la membrane sur le passage d'un analogue d'acide aminé

3 Convergence

3.1 Profil à une dimension

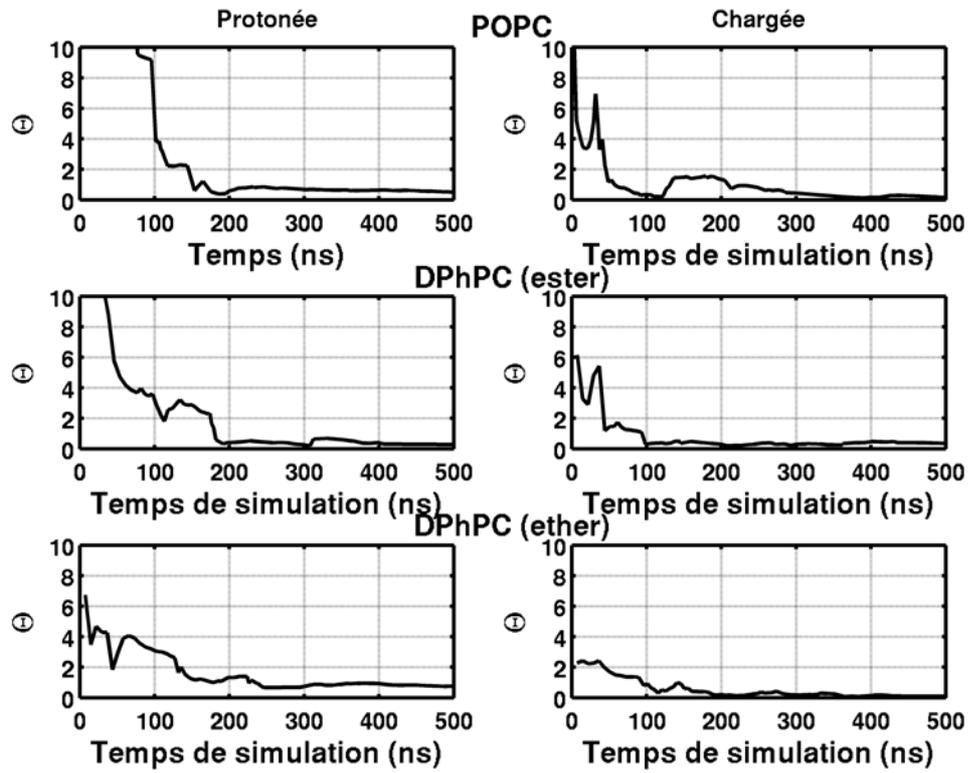
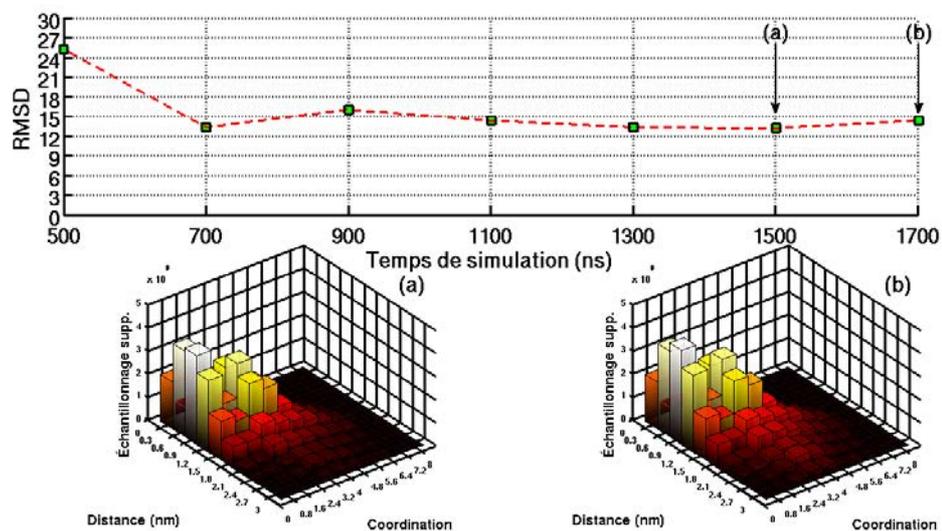
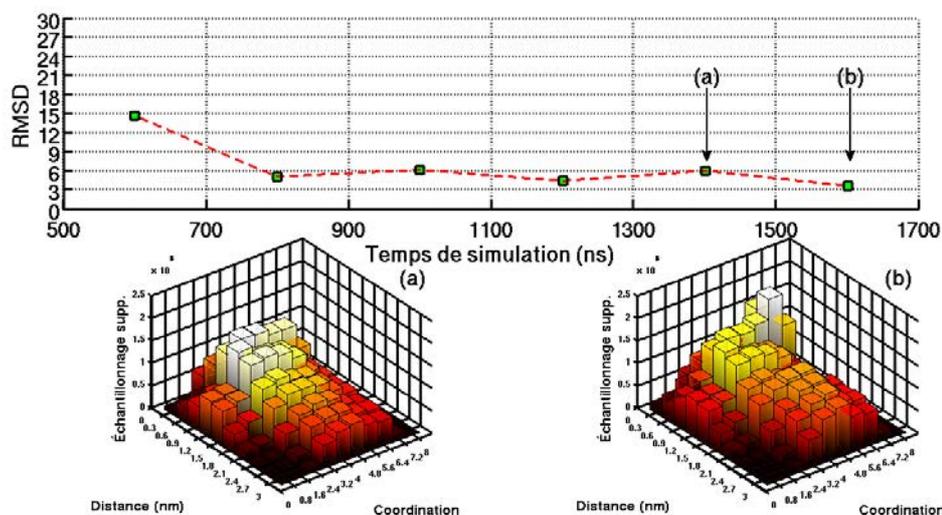


FIGURE 3 – Estimation de la convergence sur les profils à une dimension utilisés dans l'étude sur l'influence de la membrane sur le transfert de composés titrables

3.2 Profils multidimensionnels



(a) Forme neutre



(b) Forme chargée

FIGURE 4 – Estimation de la convergence sur le profil à deux dimensions utilisant la distance et la coordination pour la forme neutre et chargée de l'analogue de la lysine. L'écart quadratique moyen est donné sur le graphique en haut de la figure. Les zones échantillonnées en fin de simulation correspondant au instant (a) et (b) sont donnés sur les histogrammes en dessous.

Bibliographie

- [1] E. Lindahl and O. Edholm Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations *J. Chem. Phys.*, 113 :3882–3893, 2000.

Conclusion générale et perspectives

Une molécule peut être internalisée de plusieurs manières différentes, soit par endocytose, soit via des protéines ancrées dans la membrane ou alors par diffusion libre à travers la paroi cellulaire. Cette dernière éventualité a été exploré au cours de ma thèse. Suite à des évidences montrant la possibilité pour des peptides titrables de pouvoir passer au travers des membranes [2], les travaux se sont concentrés sur un peptide titrable pouvant se retrouver dans plusieurs composés ayant des propriétés thérapeutiques. Sans contrainte particulière sur la molécule à étudier et compte tenue de la vaste famille de pharmacophore existants aujourd'hui, un peptide commun a été choisi, pouvant se retrouver dans différents médicaments et peptides ayant des propriétés thérapeutiques. Le choix s'est donc porté sur un analogue de lysine, une butylamine, possédant un site titrable à travers sa fonction amine et une chaîne carbonée simple. Par la suite, j'ai décidé d'étudier les phénomènes de changement d'état de protonation suivant deux angles différents. La première a été de considérer l'effet de la composition de la membrane sur le transfert du peptide en question. La deuxième aura été d'approcher le transfert d'une manière originale en analysant les différentes contributions et degré de liberté pouvant influencer sur l'état de protonation du peptide. Pour ce faire, le choix de considérer l'évolution du pK_a non pas comme étant dépendant uniquement de la position du peptide dans la bicouche mais également en fonction de son degré d'hydratation.

Ce dernier apparaissant comme une condition importante dans la stabilisation de la charge.

Dans le premier cas, l'influence des glycérols et des chaînes aliphatiques sur le transfert et l'état de protonation du composé modèle a été étudié. Les membranes faites d'étherlipides ont un potentiel dipolaire deux fois plus faible et ont également une pression latérale à l'intérieur beaucoup plus importante. La membrane constituée d'étherlipides est de ce fait moins perméable aux composés neutres que chargés. En ce qui concerne les chaînes aliphatiques, l'addition de groupements méthyles stabilise la membrane en la rigidifiant. Cet ajout ne montre aucun effet sur la molécule neutre. Il n'en est pas de même pour la forme chargée où la barrière d'énergie au centre est considérablement plus importante. Il s'est avéré que la forme chargée d'une molécule ne pouvait se trouver enfouie loin à l'intérieur de la membrane et la perméation du peptide, assumant un changement de protonation, s'en retrouvait ainsi diminuée.

Avec les nombreuses avancées faites sur la compréhension des mécanismes ayant lieu lors de l'interaction de peptides avec des membranes phospholipidiques, les voies d'internalisation des molécules à l'intérieur des cellules sont dépendantes des propriétés de la molécule en elle-même. La thématique liée au transfert de médicaments à travers les membranes biologiques est une d'importance capitale en médecine et en pharmacologie. Elle offre de ce fait de nombreuses perspectives d'études avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, les thérapies géniques ou la thérapie ciblée.

La taille des molécules transférées en simulation augmentant en complexité conduit invariablement à augmenter le nombre de degrés de liberté interne liés à ces molécules, comptant de plus sur la possibilité de pouvoir lier ces molécules à des plates-formes nanoscopiques telles que des fullerènes. De plus, les membranes phospholipidiques sont également des environnements offrant de nombreux degrés de liberté lents augmentant les temps de convergence des calculs d'énergie libre. Avec le développement des méthodes de calculs d'énergie libre, il devient donc envisageable d'estimer des pro-

fils multidimensionnels afin d'explorer plus en détail les conformations d'une molécule à visée thérapeutique durant son adsorption sur la membrane et lors de sa solubilisation à l'intérieur du cœur hydrophobe.

Enfin, une dernière approche envisageable, concernant plus particulièrement les composés titrables, fait appel aux méthodes à pH constant. Le développement et l'amélioration de ces méthodes pourraient permettre d'analyser la déprotonation d'un peptide au cours de la simulation lors de son adsorption à la membrane comme ce fut déjà le cas pour des lipides s'assemblant en micelle en milieu aqueux [1].

Bibliographie

- [1] W. Bennett, A. Chen, S. Donnini, G. Groenhof and P. Tielman. Constant pH simulations with the coarse-grained MARTINI model : application to oleic acid aggregates *Can. J. Chem.*, doi : 10.1139/cjc-2013-0010, 2013.
- [2] S. Kraszewski, M. Tarek, and C. Ramseyer. Uptake and translocation mechanisms of cationic amino derivatives functionalized on pristine c60 by lipid membranes : A molecular dynamics simulation study. *ACS Nano*, 5 :8571–8578, 2011.
-

Résumé

Le transfert d'un analogue de lysine au travers de membranes de phospholipides a été étudié. Des simulations de dynamique moléculaire et des calculs d'énergie libre ont été conduits afin d'étudier l'évolution du pK_a de cette molécule en fonction de sa position à l'intérieur de la membrane. Des grandeurs cinétiques telles que la perméabilité et les constantes de réaction associées au transfert ont montré que ce processus est susceptible de se produire sur des échelles de temps appartenant à la ms. La comparaison de ces grandeurs entre des membranes constituées d'étherlipides et de lipides avec des chaînes branchées a été faite par la suite. Les études ont montré une diminution de la perméabilité et une augmentation du temps de passage dans des membranes faites d'étherlipides. L'ajout de méthyles le long des chaînes carbonées augmentent également le temps de passage et la perméabilité mais de manière moins importante. Cependant, le pK_a indique que la forme chargée ne peut être retrouvée aussi profondément que dans une membrane constituée de chaînes linéaires. Finalement, le transfert du peptide a été étudié en estimant des surfaces d'énergie libre multidimensionnelles. La coordination de l'amine avec les molécules d'eau dans sa première sphère d'hydratation et la projection de la distance par rapport au centre de la membrane. De nouvelles possibilités pour le changement d'état de protonation du peptide sont apparues. Contrairement au cas 1D, la forme neutre peut apparaître déjà dans la région des têtes polaires pour une certaine valeur de la coordination. Ces valeurs, inférieures à celles du milieu aqueux, peuvent être atteintes à l'interface d'après les surfaces déterminées.

Mots-clés: Simulations, dynamique moléculaire, énergie libre, pK_a , membranes biologiques, lipides, peptides, état de protonation, cinétique, perméabilité.

Abstract

The transfer of a lysine amino acid analog across phospholipid membrane models was investigated using molecular dynamics simulations. The evolution of the protonation state of this small peptide as a function of its position inside the membrane was studied by determining the local pKa by means of free energy calculations. Permeability and mean first time passage were evaluated and showed that the transfer occurs on the sub-ms time scale. Comparative studies were conducted to evaluate the changes in the local pKa arising from the differences in the phospholipid chemical structure. We compared hence the effect of the ether vs ester linkage of the lipid head group as well as the linear vs branched lipid tails. The study reveals that protonated lysine residues can be buried further inside ether lipid membrane than ester lipid membrane while branched lipids are found to stabilize less the charged form compared to their un-branched lipid chain counterparts. As a result, the permeability and the transfer rate across a membrane constituted by ether lipid was found to slower than in membranes constituted by esterified lipids. Finally, multidimensionnal free-energy surfaces for the transfer of the peptide in its both states, charged and neutral, were estimated. The coordination of the amine with the water molecules in its first hydration shell with the projection of the distance from the center of the membrane were used as reaction coordinates. New possibilities for the deprotonation reaction were found, the latter appearing closer to the headgroup region. This finding suggests that if the lysine analog were less coordinated by water molecule a deprotonation is possible in the headgroup region.

Keywords: Simulations, molecular dynamics, free energy, pK_a, biological membranes, lipids, peptides, protonation state, kinetics permeability.

