



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

## Thèse

Présenté en vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université Henri Poincaré**  
en Chimie Informatique et Théorique

Par

Adil Khalfa

# Étude des cycles peptidiques en interaction avec les membranes lipidiques par simulations de dynamique moléculaire utilisant l'approche gros grains

Sous la direction de Dr. Mounir Tarek et Dr Bernard Maigret

Équipe de Dynamique des Assemblages Membranaires, UMR UHP/CNRS 7565

Soutenue publiquement le 30/03/2009

Membres du jury :

Président :	<b>Prof. Xavier Assfeld</b>	<b>Nancy Université</b>
Rapporteurs :	<b>Prof. Catherine Etchebest</b> <b>Dr. Juan Elezgaray</b>	<b>Université Paris Diderot-Paris 7</b> <b>IECB-CNRS, Université de Bordeaux</b>
Examineurs :	<b>Prof. Christophe Ramseyer</b> <b>Dr. Bernard Maigret</b> <b>Dr. Mounir Tarek</b>	<b>Université de Franche-Comté Besançon</b> <b>INRIA-CNRS, LORIA</b> <b>CNRS, Nancy Université</b>

---

---

---

# Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de l'équipe de Dynamique des Assemblages Membranaires (UMR UHP/CNRS 7565) à l'université Henri Poincaré Nancy1 sous la direction de Dr Mounir Tarek et Dr Bernard Maigret.

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Bernard Maigret pour m'avoir accueilli dans son groupe et accepté la direction de cette thèse.

J'exprime ma très sincère reconnaissance au Dr Mounir Tarek pour m'avoir fait découvrir la simulation numérique et de m'avoir transmis sa passion et sa rigueur de travail. Merci beaucoup pour la disponibilité, les efforts constants, les discussions chaleureuses et fructueuses, et surtout pour sa confiance en moi et l'autonomie qu'il m'a laissé pour mener à bien ce travail.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du jury.

Un grand merci au Prof. Catherine Etchebest et le Dr Juan Elezgaray d'avoir accepté de relire et juger ce manuscrit. Sincères remerciements au Prof. Christophe Ramseyer d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie très sincèrement Drs Chris Chipot et François Dehez pour leur soutien permanent durant ces quatre années de thèse.

Je tiens à remercier Werner Treptow avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions très importantes. Un énorme merci aussi à mes amis qui m'ont aidé et soutenu de près ou de loin tout au long de ma thèse.

Je n'oublie pas de remercier Lucie Delemotte de sa participation cruciale en tant que stagiaire à la fin de ce travail.

Je tiens à remercier également le Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur - CINES- (centre national de calculs à Montpellier) pour les nombreuses heures de calculs attribuées à ce travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements à mes parents, mes frères, mes sœurs et mon oncle pour leur confiance inestimable envers moi, et pour leur soutien permanent depuis toujours, merci à tous.

Tous mes pensées sincères et mes chaleureux remerciements vont à ma femme de ma vie Asma, car elle a eu la patience de lire et de relire ce mémoire, mais aussi et surtout de m'encourager lors des moments les plus difficiles. Merci infiniment d'être là, merci sincèrement d'être toi.

---



---

*À ma petite fille Aya*

---

---

# Introduction

Les cycles peptidiques (CPs) composés d'un nombre paire d' $\alpha$ -acides aminés possédant l'alternance de chiralité L/D [1] sont capables de s'auto assembler grâce à un réseau de liaisons d'hydrogène qui se forme entre les groupes carbonyles d'une unité et les groupes amines de l'unité contiguë [2].

Ces cycles peptidiques possèdent des angles  $\varphi$  et  $\psi$  qui sont uniques et bien déterminées [3], ils sont beaucoup plus stables que les feuilletts- $\beta$  classiques et faciles à synthétiser. Les propriétés de leurs surfaces externes et leurs diamètres internes sont contrôlables et ajustables respectivement par la propriété et le nombre d'acides aminés qui les forment [4].

En 1994, l'équipe de recherche de Ghadiri a montré que l'auto assemblage des CPs hydrophobes [Gln-(D-Leu-Trp)<sub>4</sub>-D-Leu] résulte en la formation de nanotubes transmembranaires de différentes tailles à travers des liposomes [5, 6]. Ces nanotubes peptidiques se caractérisent par une capacité à transporter des ions, des molécules d'eau et des macromolécules à travers les membranes.

En outre, l'équipe de Ghadiri a démontré en 2001 par des tests *in vivo* et *in vitro* que certains CPs chargés agissent préférentiellement sur les membranes bactériennes gram positif (gram+) et gram négatif (gram-) par rapport aux cellules mammifères, en augmentant sensiblement la perméabilité de la membrane, provoquant rapidement la mort de la cellule [7]. Ghadiri *et al.* ont suggéré que les CPs chargés sont capables de répondre efficacement en tant que molécules pharmaceutiques à la croissance de la résistance bactérienne et à la prolifération d'infections d'origine bactérienne.

Les processus impliqués dans ces types de phénomènes dépendent des paramètres structurels et/ou physico-chimiques des composés à l'échelle moléculaire. Dans ce cadre, les méthodes de simulations atomistiques, notamment la dynamique moléculaire (DM) [8, 9] sont fréquemment utilisées comme complément aux méthodes expérimentales pour mieux caractériser ces processus à l'échelle moléculaire. La DM est une méthode déterministe, qui consiste à simuler l'évolution d'un système de particules au cours du temps par des outils informatiques en appliquant les lois de la mécanique classique [10, 11].

Dans ce travail nous mettons à profit de telles simulations pour étudier les interactions de plusieurs cycles peptidiques hydrophobes et chargés avec des membranes lipidiques pour mieux caractériser leur processus d'auto-assemblage, la formation de nanotubes transmembranaires et leur potentielle action antibactérienne.

Nous souhaitons répondre à travers cette étude à plusieurs questions, notamment :

- Quels sont les mécanismes mis en jeu dans la formation de nanotubes transmembranaires et dans l'activité antimicrobienne ?
- Quelle est la relation entre les propriétés des acides aminés composant les CPs, l'activité de ces derniers et la sélectivité membranaire.

---

Il est à noter que les temps de relaxation des lipides, principales composantes des membranes, et l'échelle du temps dans laquelle se produit un phénomène comme l'auto assemblage d'un nanotube synthétique et sa migration vers le cœur de la membrane lipidique, vont largement au-delà des moyens du calcul conventionnels, qui sont limités à des échelles d'espace et de temps de  $\approx 5-10$  nm et 100 ns, respectivement [12]. Par conséquent, nous avons eu recours à une modélisation de DM dite gros grains (GG), qui consiste à représenter plusieurs atomes par un seul site d'interaction. Une telle représentation réduit notablement le nombre de particules interagissant dans le système et augmente par conséquent la rapidité du calcul.

En 2001, Klein et ses collègues ont développé le premier modèle GG semi quantitatif pour étudier notamment l'agrégation des lipides en phases lamellaires [13, 14]. Ils ont par la suite étendu ce modèle à d'autres systèmes moléculaires (surfactants/ polymères) [15]. En 2004, Marrink et ses collègues ont proposé un autre modèle GG semi quantitatif [16] permettant d'étudier et reproduire les propriétés structurales et thermodynamiques des lipides hydratés dans différentes phases. Une amélioration de ce modèle fut proposé par le même groupe en 2007 [17]. Suivant ces premiers travaux, d'autres équipes de recherche comme celles de Schulten [18, 19] et de Sansom [20, 21] ont étendu le modèle GG de Marrink à quelques acides aminés afin d'étudier l'auto assemblage ou l'interaction des peptides ou des complexes protéiques avec des lipides membranaires. Le premier modèle GG comprenant un champ de forces décrivant les interactions de l'ensemble des acides aminés ne fut présenté pour la première fois, d'une manière complète qu'en 2008, par l'équipe de Marrink [22].

Une des caractéristiques de ces champs de forces GG est qu'ils ont été très peu testés et ne pas optimisés pour décrire les interactions entre acides aminés, mais plutôt entre acides aminés et composantes de la membrane. Par conséquent, ce travail a consisté tout d'abord à évaluer ces champs de forces, puis à les optimiser pour retrouver un comportement cohérent en adéquation avec les données expérimentales des CPs mis en présence des membranes lipidiques. Nous avons ensuite utilisé ces champs de forces GG pour étudier les phénomènes proprement dits d'auto-assemblage en nanotubes transmembranaires et d'action antibactérienne.

Ce document s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier décrit les systèmes étudiés. Nous présenterons d'abord brièvement les systèmes membranaires, en décrivant surtout leurs rôles et leurs caractéristiques en fonction de leurs composants. Nous décrirons ensuite les cycles peptidiques et leur importance dans les applications biologiques.

Dans le deuxième chapitre, nous nous intéresserons aux peptides antimicrobiens, nous décrirons notamment leurs structures, leurs classements et leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que leurs avantages dans l'action antibactérienne.

Dans le troisième chapitre, nous exposons brièvement les principes de la dynamique moléculaire, technique utilisée dans ce travail.

Dans le quatrième chapitre, nous décrirons les différents champs de forces gros grains cités ci-dessus ainsi que leurs applications récentes pour étudier des systèmes membranaires.

---

Le cinquième chapitre sera entièrement consacré aux résultats obtenus par simulations de DM, utilisant l'approche GG pour les processus d'auto assemblage des cycles peptidiques hydrophobes, et ceux concernant l'action antibactérienne. Nous finirons par un résumé global des résultats obtenus, et décrirons les perspectives envisagées de ce travail.

---

# **Chapitre I : Systèmes étudiés**

## **I-1 Les membranes plasmiques**

La cellule biologique est une unité structurale de tout être vivant. Il s'agit d'un compartiment limité par une membrane plasmique. Cette dernière est une structure qui délimite non seulement les cellules vivantes mais aussi les organites intracellulaires (mitochondries, noyau, etc). Les membranes plasmiques jouent ainsi de nombreux rôles :

- Elles sont des barrières qui séparent les milieux externes et internes de la cellule tout en permettant les échanges contrôlés d'ions et de macromolécules entre les deux compartiments grâce par exemple à des protéines transmembranaires ;
- Leur surface externe comporte des sites de reconnaissance spécifiques (oligosaccharides, protéines, etc) assurant la réception des signaux moléculaires de différentes origines ;
- Elles contiennent des enzymes et des sites d'activité biochimique ;
- Elles sont parfois capables d'adapter leur forme comme dans le cas des globules rouges, ou de résister à des cycles de contraction relaxation comme dans le cas des cellules musculaires.

Les membranes constituent donc une barrière sélective qui permet à la cellule de préserver sa composition afin d'assurer son intégrité et sa reproduction.

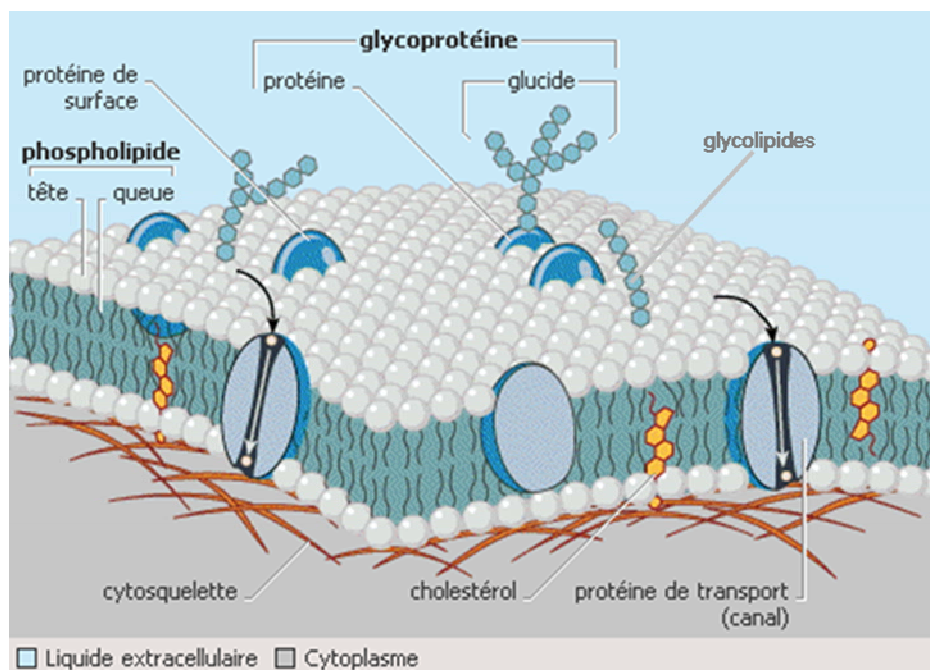
Dans ce chapitre, nous présenterons des membranes biologiques de manière très sommaire, afin de comprendre d'abord leur rôle et leurs caractéristiques. Nous décrirons ensuite plus particulièrement les composants de la membrane procaryote et eucaryote, et la différence entre les deux parois bactériennes positives et négatives.

### **1.1.1 Composantes**

Les membranes plasmiques sont constituées de trois éléments dont les proportions diffèrent selon les organismes : les lipides, les protéines et les glucides. Elles sont organisées en modèle de fluide mosaïque comme proposé par Singer et Nicholson en 1972 [23] (Figure I-1).

#### **Les lipides**

Les membranes plasmiques comportent principalement deux feuillets de lipides formant une bicouche dont les parties hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque et dont les têtes polaires sont dirigées vers les phases aqueuses.



**Figure I-1** Modèle de membrane en fluide mosaïque.

Il existe une grande variété de substances lipidiques. Ces lipides sont classés suivant leur composition chimique en trois catégories : les phosphoriques, les sphingolipides et les stérols. Notons que les membranes plasmiques sont constituées principalement par des phospholipides.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles caractérisées par une partie polaire (les têtes polaires) et une partie apolaire (deux chaînes hydrophobes). Ils sont classés à la fois en fonction de la nature des têtes polaires (Tableau. I-1), de la longueur des chaînes hydrophobes, du degré d'insaturation et de la position des doubles liaisons dans ces chaînes (Tableau I-2).

La nature des têtes polaires détermine presque toutes les propriétés physico chimiques de la région de l'interface membranaire, comme la charge totale, la courbure, l'hydratation, le recrutement des ions [24, 25] et modulent par ailleurs les interactions des protéines et des polypeptides à l'interface de la membrane [24].

La taille et la rigidité des phospholipides qui dépendent de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes hydrophobes, déterminent l'épaisseur et la raideur de la membrane, mais parfois aussi l'activité des protéines membranaires [26] et des segments transmembranaires [24].

Nom commun	Abréviation	Charge	Tête polaire
Acide phosphatique	PA	0	$\text{PO}_4^- \text{-H}$
Phosphatidylcholine	PC	0	$\text{PO}_4^- \text{-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)$
Phosphatidylethanolamine	PE	0	$\text{PO}_4^- \text{-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
Phosphatidylsérine	PS	-1	$\text{PO}_4^- \text{-CH}_2\text{CH}_2(\text{COO}^-)\text{NH}_3^+$
Phosphatidylglycerol	PG	-1	$\text{PO}_4^- \text{-CH}_2\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$
Phosphatidylinositol	PI	-1	$\text{PO}_4^- \text{-C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

**Tableau I-1** Nomenclature des principaux phospholipides en fonction de leur tête polaire.

Nbre de C	Nbre d'insaturations	Nom Commun	Abréviation
12	0	Lauroyl	C12:0
14	0	Myristoyl	C14:0
16	0	Palmitoyl	C16:0
16	1	Palmiteoyl	C16:1
18	0	Stéroyl	C18:0
18	1	Oléoyl	C18:1
18	2	Linoléoyl	C18:2

**Tableau I-2** Quelques acides gras les plus présents dans la membrane cytoplasmique

### *Les protéines membranaires*

Les protéines insérées dans la membrane sont classées en deux groupes : les protéines intrinsèques, enchâssées dans la membrane, et les protéines périphériques, interagissant faiblement avec celle-ci soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres protéines membranaires.

La structure tertiaire d'une protéine membranaire est stabilisée par un ensemble d'interactions non covalentes : interactions électrostatiques, liaisons d'hydrogène et interactions hydrophobes. Son repliement final résulte d'un compromis entre ces interactions.

Les fonctions des protéines membranaires sont aussi variées que celle des protéines solubles : elles permettent le passage des molécules polaires à travers la barrière lipidique, elles servent de site spécifique de fixation des molécules messagères comme les hormones, elles catalysent parfois des réactions enzymatiques, etc. En raison de leur localisation spécifique à l'interface de deux parties de la membrane, les protéines intégrales membranaires peuvent cependant avoir d'autres types de fonctions additionnelles tout à fait spécifiques, comme réception/transmission de signaux à travers la membrane, etc. Elles participent aussi à la maintenance de la forme et de la stabilité de la membrane et servent de point d'ancrage à des structures extra- ou intracellulaires comme le cytosquelette. Pour plus des détails sur les protéines membranaires, voir l'ouvrage [27].

### *Les glucides*

Les glucides sont les derniers constituants de base de la membrane. Ils forment à la surface de celle-ci, du côté extracellulaire, des structures complexes et variées. Les glucides sont accrochés à la membrane de deux manières :

- Ils sont fixés à des protéines et forment des glycoprotéines ;
- Ils sont fixés aux lipides et forment des glycolipides.

Les glucides interviennent à trois niveaux :

- 
- Grâce à leurs propriétés antigéniques, ils ont un rôle de reconnaissance, par exemple le groupe sanguin ;
  - Puisqu'ils sont très polaires, ils contribuent à l'environnement local ;
  - Ils renforcent la rigidité de la membrane.

## **I-2 Les deux membranes eucaryote et procaryote**

Il existe deux grands types de membranes plasmiques : la membrane procaryote qui désigne généralement la membrane interne des bactéries, et la membrane eucaryote qui représente l'enveloppe des cellules animales.

Les lipides à têtes polaires PE et PG sont les composants majeurs de la membrane procaryote. Dans *Escherichia coli* (E. coli), les PE et PG sont présents respectivement avec un pourcentage de 70-80% et 20-25% (+ 5% de cardiolipin). Par contre, ils sont très rares dans la membrane eucaryote [28]. Pour celle-ci, la majorité des têtes polaires sont des zwitterioniques PC, SM, PE..) [29, 30]. Dans les cellules rouges de sang par exemple les PE et PG sont présents respectivement avec un pourcentage de 6% et 2% [28]. Notons que les membranes eucaryotes contiennent des glycolipides et du cholestérol, dont elles sont dépourvues dans la plupart des cellules procaryotes [31].

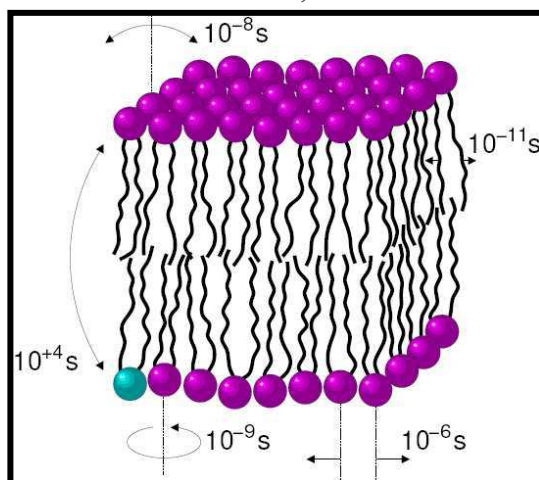
### **1.2.1 Propriétés physiques**

Le comportement des membranes biologiques est en général gouverné par des propriétés physiques liées à la spécificité de la membrane. Parmi ces propriétés :

- La température de fusion ( $T_M$ ) : C'est la température de transition entre la phase gel et la phase liquide-cristalline de la membrane. En effet, la phase gel (rigide) est souvent retrouvée à basse température (inférieure à  $T_M$ ). Dans celle-ci, les chaînes aliphatiques sont très ordonnées voir 'cristallisées' dans le plan normal à la membrane. La phase liquide-cristalline est rencontrée à température supérieure à  $T_M$ . Dans ce cas, les chaînes aliphatiques sont désordonnées, sont caractérisées par une grande mobilité, et confèrent à la bicouche de plus amples fluctuations ;
- La fluidité membranaire : En général, à température physiologique, tous les éléments constitutifs de la membrane composent une mosaïque fluide dont la mobilité des éléments leur permet d'interagir de manière plus ou moins transitoire. Par exemple la mobilité des lipides dans la membrane se fait par la rotation autour d'eux-mêmes, la diffusion latérale ou transversale et la dynamique de leur chaîne aliphatique [25] (Figure I-2) ;
- La viscosité membranaire : Celle-ci représente la résistance aux déplacements dans la membrane. Notons que, les membranes sont des milieux asymétriques et anisotropes dans lesquels la résistance aux mouvements n'est pas la même dans toutes les directions et les régions ;



- L'élasticité membranaire : Cette dernière joue un rôle important dans des nombreuses fonctions biologiques, comme la formation des pores, l'organisation des protéines membranaires, l'activité antimicrobienne, etc.



**Figure I-2** Mouvements des lipides dans une membrane fluide et échelles de temps correspondantes [25]

Notons finalement que les cellules eucaryotes et procaryotes ont un potentiel transmembranaire différent. Les cellules animales présentent habituellement une différence potentielle entre les milieux intra et extra- cellulaires de l'ordre -90 mV à -110 mV. Tandis que pour les bactéries, le potentiel transmembranaire varie entre -130 mV et -150 mV [32].

### **1.2.2 Spécificités dépendants des têtes polaires**

Les têtes polaires PE et PC sont tous zwitterioniques, et donc électriquement neutres. Dans une bicouche lipidique, le groupe ammonium de PE forme des liaisons d'hydrogène avec les atomes d'oxygène de phosphate et carbonyle des molécules PE adjacentes [33, 34] [35-37]. Par contre entre les têtes polaires PC, ces liaisons sont beaucoup moins prépondérantes [38, 39]. L'existence de têtes polaires PG dans la membrane procaryote diminue l'extension des têtes polaires PE vers la phase aqueuse, et réduite ainsi la mobilité de ces derniers selon l'axe normal à la bicouche lipidique [35]. Les PG augmentent de 34 % les interactions inter-lipides (par rapport au cas des membranes pure en PE) [35, 40] à cause principalement des différentes liaisons d'hydrogène PE—PE, PE—PG et PG—PG. Par ailleurs, la présence des têtes polaires PG recrute un grand nombre de contreions (présents dans les liquides intra et extracellulaires) vers l'interface de la membrane ce qui provoque une diminution de l'hydratation de la membrane [35].

La présence des têtes polaires PE change également les propriétés intrinsèques de la membrane. Thurmond et ses collègues ont montré que le paramètre d'ordre des chaînes aliphatiques [41, 42] et la température de transition de phase [43] d'une membrane formée par PE sont supérieurs à ceux d'une membrane formée par les PC.

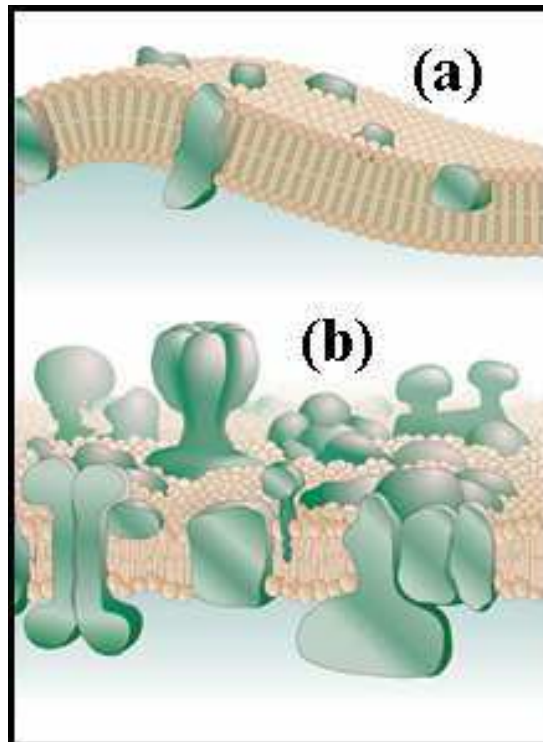
Plusieurs caractéristiques structurelles ont été déterminées par modélisation moléculaire de modèles de membrane bactérienne (POPE et POPG, ratio 7:3) [35, 40, 44], ou de modèles de membrane de cellule animale (POPC 100%) [40, 44, 45] en phase liquide-cristalline :

- La surface moyenne occupée par lipide dans le plan de la membrane pour les bicouches POPE, POPG et POPC vaut  $61 \pm 0.2 \text{ \AA}^2$ ,  $62.8 \pm 0.3 \text{ \AA}^2$ ,  $63.5 \pm 0.2 \text{ \AA}^2$ , respectivement ;
- L'épaisseur hydrophobe, définie comme la distance entre les groupes phosphate d'une monocouche et des groupes de l'autre monocouche pour des membranes POPE, POPG et POPC est  $36.4 \pm 0.1 \text{ \AA}$ ,  $35.6 \pm 0.1 \text{ \AA}$  et  $35.5 \pm 0.1 \text{ \AA}$ , respectivement ;
- Le coefficient de diffusion latérale des lipides dans les bicouches POPE, POPG et POPC vaut  $3.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $3.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  et  $4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  respectivement.

Pour plus des détails sur la membrane cellulaire, voir les ouvrages [46, 47]

Il est très important de noter que le concept standard des membranes proposé par Singer et Nicholson en 1972 [23], dans lequel les lipides s'organisent en bicouches planes suivant le modèle de fluide mosaïque a été depuis sensiblement révisé. Les membranes sont actuellement plus mosaïques que fluides. Elles sont formées par plusieurs régions hétérogènes à épaisseurs variables et contiennent beaucoup plus de protéines [48]. La membrane est constituée ainsi par des régions de fonctions et de structures différentes. Ces régions (microdomaines) sont généralement riches en cholestérol et sphingolipides [49-51], ce qui résulte en des régions plus compactes et plus épaisses (dimension latérale de 4 à 700 nm) caractérisées par un plus grand ordre des chaînes aliphatiques [52, 53]. Ces régions dites « rafts », jouent de nombreux rôles dans les processus cellulaires comme la fusion de la membrane, la transduction des signaux etc.... Pour plus de détail voir les références [49, 53, 54]

La membrane est donc un ensemble très complexe, dont la composition est très variable d'une espèce à l'autre, d'un feuillet à l'autre dans une même bicouche, mais aussi d'une région à l'autre dans un même feuillet.

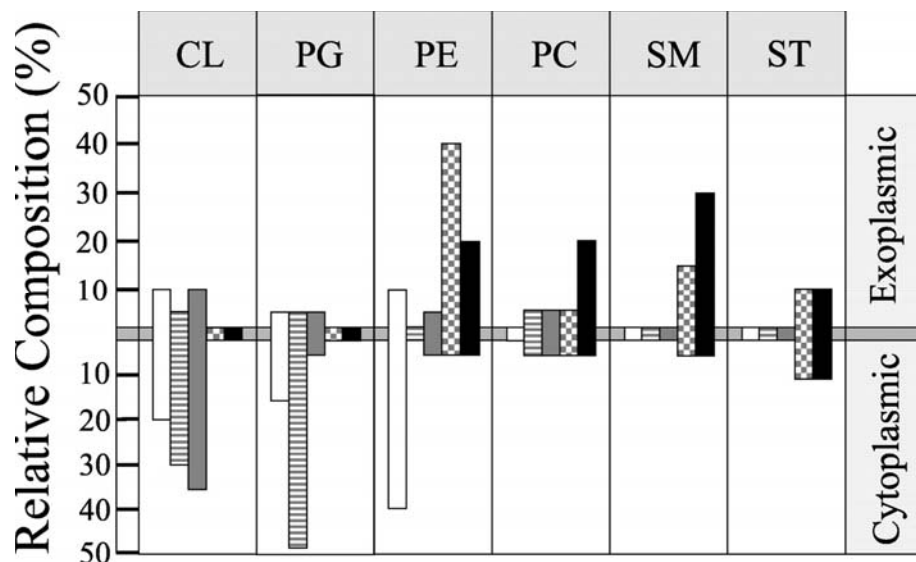


**Figure I-3** Représentation d'une membrane plasmique dans le modèle de fluide mosaïque (Singer et Nicholson [23]) (a) et dans le modèle mosaïque plus que le fluide (b)

L'asymétrie lipidique dans la membrane : Elle traduit le fait que la distribution des lipides entre les deux feuilletts de la membrane est asymétrique, c'est-à-dire que chaque feuillet est formé par un pourcentage et/ou un type de lipides différents par rapport à l'autre feuillet [55] [47]. L'asymétrie lipidique a été retrouvée dans de nombreuses membranes. Elle dépend de la nature des têtes polaires et de la composition des chaînes aliphatiques, ainsi que de leur degré d'insaturation. Par exemple, dans les globules rouges, les lipides à têtes polaires sphingomyélines (SM) et phosphatidylcholines sont placés dans la couche externe de la membrane, alors que les lipides à têtes polaires phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines sont généralement localisés sur la couche interne [29, 56]. Cette distribution asymétrique des lipides et de composition stéréochimique confèrent à chaque monocouche des propriétés différentes et a une influence significative sur les propriétés de la membrane [57, 58] comme la transition de phase et la fluidité membranaire... Mais le rôle exact de ces différences dans le fonctionnement physiologique n'est pas entièrement élucidé.

Ces différences entre les deux feuilletts de la membrane se retrouvent aussi dans la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes, et aussi dans la membrane externe des bactéries de gram- (voir la Figure I-4). Dans de nombreuses membranes bactériennes, notamment *E. coli* et *S. aureus*, la couche interne est beaucoup plus riche des phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycerols et cardiolipines que la couche externe [59], par conséquent la charge et l'amphipacité de la couche interne et externe varie considérablement. Ce qui peut expliquer d'une part la réponse spécifique lors de l'interaction avec un peptide antimicrobien cationique en comparant avec les cellules animales, et d'autre part une partie du rôle de l'asymétrie lipidique.

Notons qu'un lipide de la couche externe peut passer à la couche interne et vice versa grâce à la diffusion transversale dit flip-flop qui consiste de mettre en évidence les échanges des lipides entre les deux feuilletts de la membrane.



**Figure I-4** Comparaison de la composition de la membrane microbienne et animale. *E. coli* (blanc) ; *S. aureus* (hachures horizontales) ; *B. subtilis* (gris) ; *C. albicans* (carrés) ; érythrocyte humain (noir) [59]

### I-3 Les parois positives et négatives de la bactérie

La paroi bactérienne existe chez toutes les espèces du domaine des "*Bacteria*" à l'exception des *Mycoplasmatales*. En revanche, chez les "*Archaea*", la présence d'une paroi est inconstante, et lorsqu'elle existe, elle ne présente pas de peptidoglycane. Seule la paroi des "*Bacteria*" sera décrite ci-dessous.

La paroi est une structure rigide et résistante qui entoure la cellule bactérienne, Elle protège la bactérie et lui confère notamment sa forme. Globalement, la paroi représente environ 20% du poids de la bactérie. Elle peut se différencier en épaisseur, en structure et en composition chimique d'une bactérie à l'autre.

Les parois peuvent être classées en deux groupes en fonction de leurs structures (Figure I-5) :

- Une paroi de gram positif qui est épaisse et homogène ;
- Une paroi de gram négatif qui est moins épaisse, hétérogène et irrégulière.

Dans la paroi de bactéries gram+, on constate la présence d'un peptidoglycane qui peut atteindre jusqu'à 80 nm d'épaisseur. Ce peptidoglycane (muréine) est formé par des longues chaînes répétitives. Ces dernières sont composées de l'alternance de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (ANAM) qui sont enchaînés par des liaisons osidiques. Ces chaînes répétitives sont liées par des liaisons inter-peptidiques (Figure I-6). Le peptidoglycane est séparé de la membrane plasmique par un petit espace périplasmique. On note aussi la présence d'acides téchoïques qui traversent le peptidoglycane. Certains sont ancrés directement dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une partie lipidique et portent le nom d'acides lipotéchoïques. Ces molécules, dont la fonction reste assez floue, montrent une grande variabilité au sein du monde microbien. Ils sont utilisés comme des marqueurs antigéniques.

Exemples de bactéries gram+ :

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ;
- *Lactococcus* ;
- *Lactobacillus* ;
- *Micrococcus* ;
- *Streptococcus*.

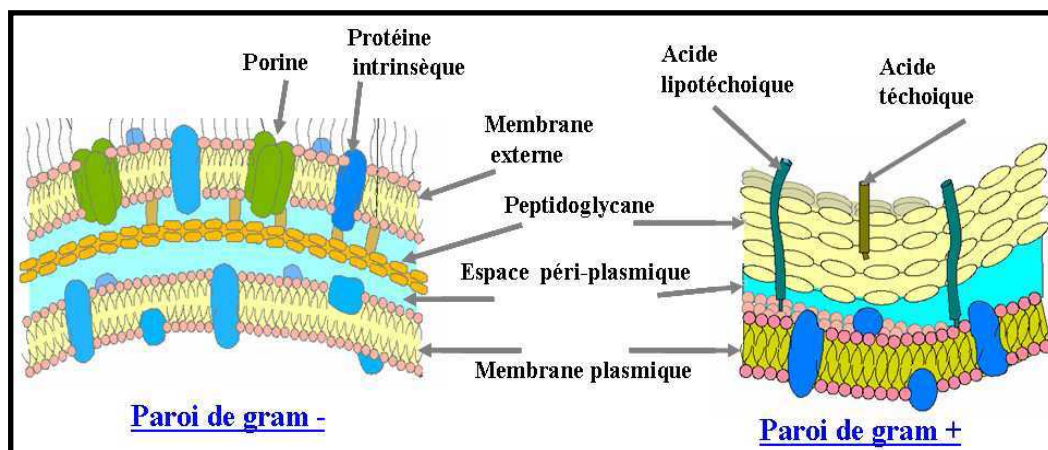
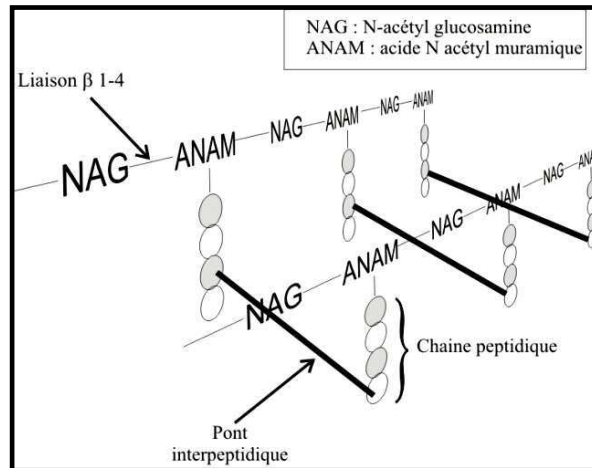


Figure I-5 Parois des bactéries gram positif et gram négatif.



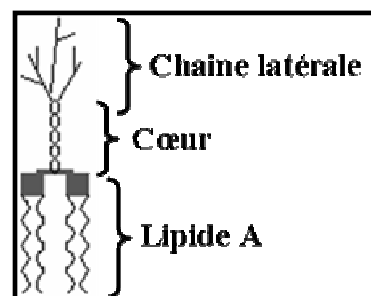
**Figure I-6** Structure de peptidoglycane

La paroi de bactéries gram- possède une membrane externe en plus du peptidoglycane (structure commune aux gram+ et gram-) qui est très fine, puisque sa taille moyenne ne dépasse pas 3-5 nm. Dans cette paroi, le peptidoglycane se trouve dans l'espace péri plasmique entre les deux membranes externe et plasmique.

La membrane externe a été observée chez les bactéries d'E. coli par microscope électronique dans les années quatre-vingt par Hancock [60]. Elle entoure la cellule (y compris le peptidoglycane) et ressemble à une membrane biologique classique : double couche de phospholipides incluant des protéines. Cependant, la couche externe de cette membrane contient une molécule particulière : le Lipo-polysaccharide (LPS) ou encore endotoxine. Le LPS est spécifique aux bactéries gram-, est composé de trois parties (Figure I-7) :

- Le lipide A, qui est situé dans la partie proximale du LPS et à l'intérieur de la bicouche lipidique, il possède un caractère hydrophobe ;
- L'antigène O, qui est situé dans la partie distale du LPS, de nature polysaccharidique, il possède un caractère hydrophile ;
- Le noyau (ou cœur) de nature polysaccharidique qui représente le pont entre les deux autres parties, il est divisé à son tour en deux parties : le noyau interne plutôt hydrophobe et le noyau externe plutôt hydrophile.

Le LPS joue un rôle antigénique (immunogène) et pathogène (entraîne de nombreux symptômes différents en fonction des espèces).



**Figure I-7** Représentation d'un Lipo-polysaccharide

On trouve également des protéines intégrées dans la membrane externe : les protéines de transport (porines) et les lipoprotéines entre le peptidoglycane et la membrane externe (lipoprotéines de Braun) qui consolident la paroi bactérienne.

Exemples de bactéries gram- :

- *Salmonella* ;
- *E. coli* ;
- *Vibrio cholerae* (responsable du choléra) ;
- *Neisseria*.

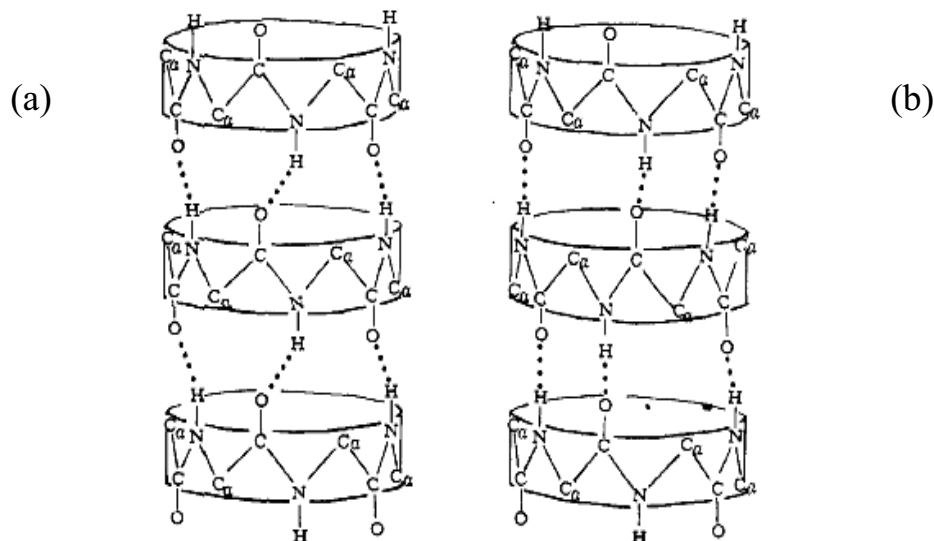
Pour conclure, la paroi bactérienne assure donc un passage sélectif des substances, elle a un rôle antigénique, et protecteur contre les chocs osmotiques. Parfois, elle joue également le rôle de point d'impact primaire pour les agents antibactériens. Pour plus des détails sur la les parois bactériennes, voir les ouvrages [61, 62].

## I-4 Les cycles peptidiques (CPs)

### 1.4.1 Structure

En 1974, Desantis et ses collègues ont suggéré grâce à l'analyse théorique des séquences peptidiques énantiomères ordinaires, que les CPs composés d'un nombre paire d' $\alpha$ -acides aminés de chiralité L/D alternée, sont capables de s'organiser en une structure cylindrique creuse grâce à un réseau de liaisons d'hydrogène entre les sites des squelettes (Figure I-8) [63].

La première expérience [64] pour confirmer cette hypothèse, utilisant la diffraction des rayons X, a montré que les cycles peptidiques  $[-(\text{Val-D-Val})_3-]$  et  $[-(\text{Phe-D-Phe})_3-]$  forment plutôt de liaisons d'hydrogène avec des molécules de solvants.

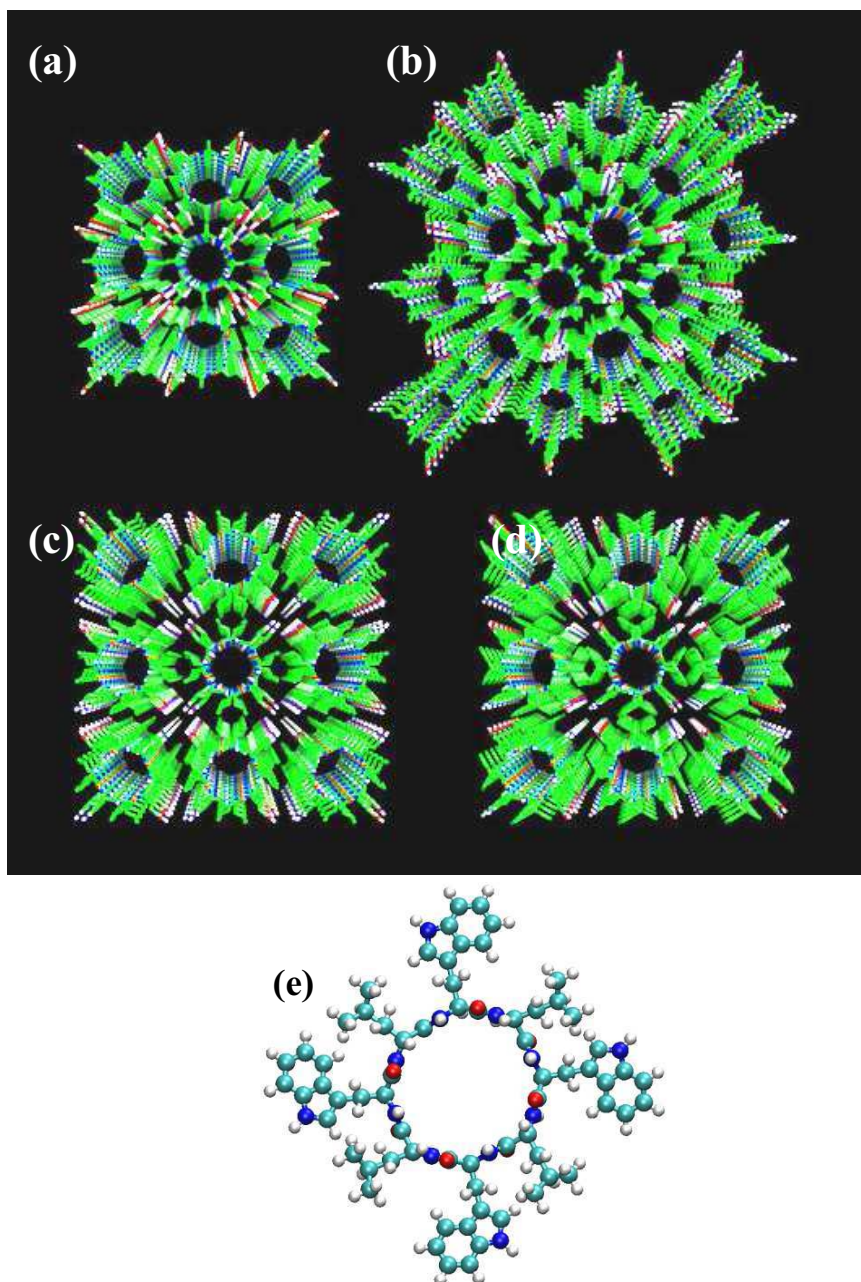


**Figure I-8** : Conformation parallèle (a) et antiparallèle (b) de l'association intermoléculaire de feuillets- $\beta$  de type cyclique [63].

Ce n'est qu'en 1993, que l'équipe de recherche de Ghadiri a réussi à former des cristallins de nanotubes peptidiques tubulaires creux grâce à l'auto-assemblage de cycles peptidiques  $[-(\text{Gln-D-Ala-Glu-D-Ala})_2-]$  dans une solution aqueuse à pH acide (Figure I-9) [2].



L'équipe de Ghadiri a caractérisé la structure de ces nouveaux cristaux organiques en utilisant plusieurs techniques expérimentales. Particulièrement, elle a observé par microscope électronique en transmission (TEM) que les CPs forment des cristaux constitués par des nanotubes peptidiques qui sont séparés par une distance bien déterminée de 14.9 Å. La diffraction des électrons a permis de montrer que le réseau cristallin est sous forme trigonale avec des paramètres du réseau  $a = 9.5 \text{ \AA}$ ,  $b = c = 15.1 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$  et  $\beta = \gamma = 99^\circ$ . Ils ont déduit alors le diamètre intérieur du nanotube ( $7 - 8 \text{ \AA}$ ) et la distance séparant deux cycles successifs ( $4,73 \pm 0.002 \text{ \AA}$ ). La spectroscopie infrarouge à transformation de fourrier (FT-IR) a confirmé que les nanotubes sont stables grâce au réseau de liaisons d'hydrogène formé entre les groupes carbonyles d'une unité CP et les groupes amines de deux unités contiguës.



**Figure I-9** : Structures cristallines résultant de l'auto assemblage des cycles peptidiques. (a) [- (D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)<sub>2</sub>-]; (b) [- (D-Ala-Gln)<sub>4</sub>-]; (c) [- (D-Leu-Gln)<sub>4</sub>-]; (d) [- (D-Phe-Gln)<sub>4</sub>-] [65]. (e) conformation du cycle peptidique [- (Trp-D-Leu)<sub>4</sub>].

---

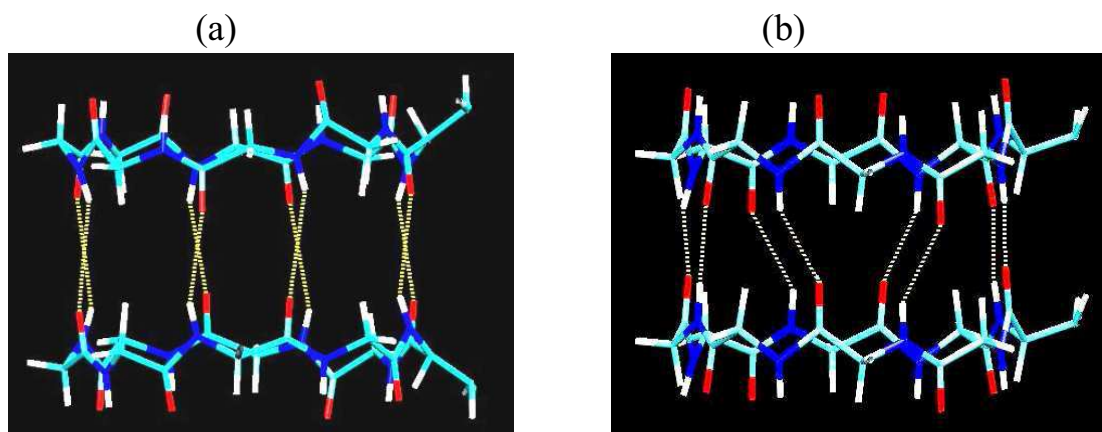
Ces cycles peptidiques agencés en pseudo brins- $\beta$ , sont composés d'acides aminés, dont les angles  $\varphi$  et  $\psi$  sont uniques et bien déterminés [3, 66, 67]. Grâce à l'alternance de la chiralité L et D des résidus, les chaînes latérales des acides aminés sont orientées vers la surface extérieure, ce qui permet d'avoir une structure cylindrique creuse [68] (Figure I-9(e)).

Plusieurs études ont été menées dans le but de déterminer le nombre de résidus qui favorise l'auto assemblage des CPs. Ces études ont montré que les CPs constitués par huit résidus sont très avantageux pour la formation d'une structure cylindrique stable, car ils sont caractérisés par une tension cyclique faible. Par contre, ceux formés par six résidus ne sont pas favorables pour la formation de cette architecture [68]. Ainsi les CPs  $[-(D\text{-}^{Mc}\text{NAla-L-Phe})_4-]$  s'auto-assemblent en structure tubulaire rigide [66, 67], alors que la séquence  $[-(D\text{-}^{Mc}\text{NAla-L-Phe})_3-]$  ne produit pas de nanotubes peptidiques. De même, Lorenzi *et al.* ont montré que le cycle peptidique formé par six résidus  $[-(D\text{-Leu-L-}^{Mc}\text{NLeu})_3-]$  conduit à la formation d'une structure cylindrique [69], à l'inverse des cycles peptidiques  $[-(L\text{-Val-D-Val})_3-]$  et  $[-(L\text{-Phe-D-Phe})_3-]$  [64].

Il s'avère en fait que la formation de nanotubes à partir des CPs composés de six résidus n'est pas un phénomène général, elle dépend souvent de la séquence peptidique, la solution aqueuse et les conditions cristallines utilisées.

En outre, la tension cyclique et la stabilité de la conformation sont des facteurs très importants dans le processus d'auto assemblages des CPs [68]. Ces deux facteurs sont contrôlés par la taille des cycles peptidiques.

L'équipe de Ghadiri a confirmé par IR, diffraction d'électrons, RMN, diffraction de rayons X et modélisation moléculaire [68] que les liaisons d'hydrogène se forment préférentiellement dans la conformation antiparallèle (Figure I-10). Les mesures de la constante d'équilibre [3] et les calculs quantiques semi empiriques [70] montrent en effet que l'orientation antiparallèle est favorisée par 4 kJ/mol par rapport à l'orientation parallèle. Notons que l'énergie nécessaire pour stabiliser une liaison d'hydrogène pour les deux conformations (parallèle et antiparallèle) est  $\sim -18$  kJ/mol [70]. Ainsi la différence d'énergie entre les deux orientations ne permet pas de prédire ou confirmer qu'une conformation est favorisée par rapport à une autre.



**Figure I-8** : Auto assemblage des cycles peptidiques dans les conformations antiparallèle (a) et parallèle (b) [68].



---

## **1.4.2 Propriétés**

### **a) Canaux transmembranaires**

Un des avantages remarquables des cycles peptidiques réside dans le fait que la propriété de leurs surfaces externes et leurs diamètres internes sont contrôlés respectivement par la nature et le nombre d'acides aminés les formant. Ces propriétés favorisent l'application de ces structures organiques dans divers domaines, comme la biologie et la médecine [4].

Les CPs ayant des chaînes latérales hydrophobes sont susceptibles de former des nanotubes capables de s'insérer à l'intérieur d'une bicouche lipidique et de former un nanotube transmembranaire. En 1994, l'équipe de Ghadiri a montré en effet que la présence des CPs cyclo[-(Trp-D-Leu)<sub>3</sub>-Gln-D-Leu] dans une solution aqueuse de suspension de liposomes provoque une partition rapide des CPs dans la bicouche lipidique et leur auto assemblage sous forme des nanotubes transmembranaires [5].

Ces nanotubes peuvent transporter des ions à travers des bicouches lipidiques : leur conductance (55 pS et 65 pS à 0.5 M respectivement en NaCl et KCl) est trois fois plus grande que celle de Gramicidin A (GA) [5, 71-73]. De même, le rapport entre le coefficient de diffusion des molécules d'eau à travers la GA et à travers le nanotube octa-peptidique est égal à trois [74, 75].

En 1994, L'équipe de Ghadiri a démontré pour la première fois que le diamètre interne de tels nanotubes est ajustable. Elle a synthétisé en effet des cycles peptidiques constitués par 10 résidus [Gln-(D-Leu-Trp)<sub>4</sub>-D-Leu] [6] et 12 résidus [(Gln-D-Ala-Glu-D-Ala)<sub>3</sub>] [76] qui forment des nanotubes caractérisés par des diamètres internes d'environ 10 Å et 13 Å, respectivement.

Ces nanotubes furent utilisés comme canaux transmembranaires pour étudier le passage de molécules de glucose à travers la bicouche lipidique. Notons que dans les mêmes conditions, la GA et le nanotube octapeptidique ayant respectivement un diamètre de 4.5 Å et 7.5 Å, ne montrent aucune activité du transport de glucose.

Notons que l'équipe EDAM s'intéresse aux nanotubes peptidiques en analysant à l'échelle moléculaire leurs stabilités et leurs propriétés d'équilibre à l'intérieur de la membrane. En particulier, elle utilise les techniques de simulations de DM, afin de comprendre l'interaction de ces nanotubes avec la membrane lipidiques et les processus associés du transport d'ions et des molécules d'eau [77-79].

### **b) action antibactérienne**

En 2001, l'équipe de Ghadiri a synthétisé des CPs potentiellement capables de répondre efficacement à la croissance de la résistance bactérienne et la prolifération d'infections d'origine bactérienne. Elle a démontré en effet par des tests *in vivo* et *in vitro*, que certains CPs amphipathiques ont une activité bactérienne particulièrement élevée et agissent préférentiellement sur les membranes de gram+ et gram- par rapport aux membranes de cellules mammifères, en augmentant sensiblement la perméabilité de la membrane cellulaire provoquant ainsi la mort rapide de la cellule [7].

---

## *In vitro*

L'activité antibactérienne a été testée pour les bactéries gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup> représentées respectivement par *S. aureus* et *E. coli*, tandis que leur activité hémolytique a été examinée en considérant les cellules rouges de sang de cellules mammifères. Les CPs utilisés dans ces tests comprennent au moins un résidu basique favorisant leur interaction avec la membrane bactérienne (chargée toujours négativement (c.f. section I-2)). Par ailleurs, les séquences étudiées sont composées toujours de deux parties : une chargée et une hydrophobe permettant d'attribuer aux CPs la propriété amphipathique. Cette dernière est une condition nécessaire et indispensable pour reproduire l'action antibactérienne (cf. chapitre II).

Le Tableau I-3 reprend la liste des CPs examinés et les activités antimicrobiennes et hémolytiques obtenues *in vitro* en déterminant respectivement la concentration minimale inhibitrice et la moitié de la dose hémolytique (HD<sub>50</sub>).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration en µg/ml des CPs qui inhibe, à 37°C, toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture [80]. La dose hémolytique (HD<sub>50</sub>) correspond à la concentration en µg/ml des CPs, nécessaire pour détruire la moitié des cellules rouges du sang testé. Ces valeurs déterminées expérimentalement caractérisent l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

Ghadiri *et al.* ont considéré trois groupes (1 à 3) formés par des octapeptides. La partie hydrophobe de leurs séquences est formée toujours par cinq résidus [-(D-Trp-Leu)<sub>2</sub>-D-Trp-], alors que la partie chargée est modifiée d'une séquence à l'autre.

L'étude comparative a permis de constater plusieurs points intéressants : dans le 1<sup>er</sup> groupe qui contient des CPs ayant uniquement un seul résidu basique, la substitution du résidu Lysine par Histidine rend la séquence peptidique inactive contre *S. aureus* et non hémolytique. Dans le 2<sup>ème</sup> groupe, les CPs possèdent deux résidus basiques : leur activité antibactérienne s'accroît quinze fois par rapport au 1<sup>er</sup> groupe, et ils deviennent cinq fois moins hémolytiques. Dans le 3<sup>ème</sup> groupe où la partie chargée des CPs comprend trois résidus basiques, les CPs, et en particulier les séquences 17 et 14, ont une activité antibactérienne très élevée et modérée respectivement contre *S. aureus* et *E. coli*.

Le groupe 4 regroupe les chaînes linéaires de même séquence que celle du CP 13. Ces chaînes linéaires sont partiellement actives uniquement contre *S. aureus*, ce qui démontre l'importance de la structure cyclique dans l'action antibactérienne.

Dans le 5<sup>ème</sup> groupe, on retrouve les CPs formés par 6 résidus, dont deux sont basiques. Quand ces résidus sont des Lysines, les cycles montrent une activité antibactérienne importante contre les membranes de gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup>, et sont presque non hémolytiques. La substitution d'un résidu Lysine par Histidine [-(D-Lys-His-(Trp-D-Leu)<sub>2</sub>] provoque une réduction de l'activité antibactérienne contre *E. coli* et une augmentation de l'activité hémolytique, mais ce CP garde toujours la même activité contre *S. aureus*. Le CP devient inactif en remplaçant le résidu Lysine par Serine (séquence 24). Finalement la séquence 25 qui possède deux résidus Arginines au lieu de deux Lysines montre une grande activité antibactérienne contre *E. coli* et une faible activité hémolytique.

En comparant les séquences 10 et 12, l'équipe de Ghadiri a constaté que la présence d'acide Glutamique annule complètement l'activité antibactérienne. La réduction de cette

dernière est due probablement à la répulsion électrostatique entre la membrane bactérienne et les CPs. Par ailleurs, les deux énantiomères 4 et 5 montrent la même activité antibactérienne et hémolytique malgré la différence dans l'ordre de l'alternance de la chiralité D/L dans la séquence. Ghadiri *et al.* en déduisent que le mode intermédiaire récepteur/ligand pour sélectionner la membrane ciblée par les CPs est improbable.

	Peptides	<i>S. aureus</i> (MRSA)* MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	<i>E. coli</i> † MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Haemolysis‡ HD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
1	(SKSWLWLW)	10	100	30
2	(THSWLWLW)	100	100	100
3	(RGDWLWLW)	100	100	100
4	(KQRWLWLW)	8	80	45
5	(KQRWLWLW)	8	80	40
6	(RQRWLWLW)	18	90	25
7	(KQKWLWLW)	45	100	50
8	(KSKWLWLW)	5	40	100
9	(SHKWLWLW)	10	100	35
10	(SKHWLWLW)	15	100	20
11	(SHHWLWLW)	20	100	20
12	(EKHWLWLW)	100	100	>100
13	(KKKWLWLW)	8	70	50
14	(RRKWLWLW)	8	15	50
15	(KRKWLWLW)	10	40	50
16	(RRRWLWLW)	10	50	35
17	(HKHWLWLW)	12	15	25
18	(KHKWLWLW)	10	80	30
19	H <sub>2</sub> N-WKKKWLWLW-COOH	60	-	100
20	H <sub>2</sub> N-KKKWLWLW-CONH <sub>2</sub>	50	-	100
21	Ac-KKKWLWLW-CONH <sub>2</sub>	80	-	100
22	(KKLWLW)	10	17	80
23	(KHLWLW)	10	100	25
24	(KSLWLW)	75	100	90
25	(RRLWLW)	35	5	90

**Tableau I-3 :** Les résultats *in vitro* de l'activité des CPs. Les séquences sont représentées par le code à une lettre des acides aminés. Les lettres soulignées dénotent une chiralité D pour l'acide aminé correspondant. Les trois dernières colonnes représentent les concentrations minimales inhibitrices ( $\mu\text{g/ml}$ ) des CPs sur des bactéries gram+ (*S. aureus*) et gram- (*E. coli*), et la dose hémolytique ( $\mu\text{g/ml}$ ) des CPs sur les cellules rouge du sang de souris [7].

### In vivo

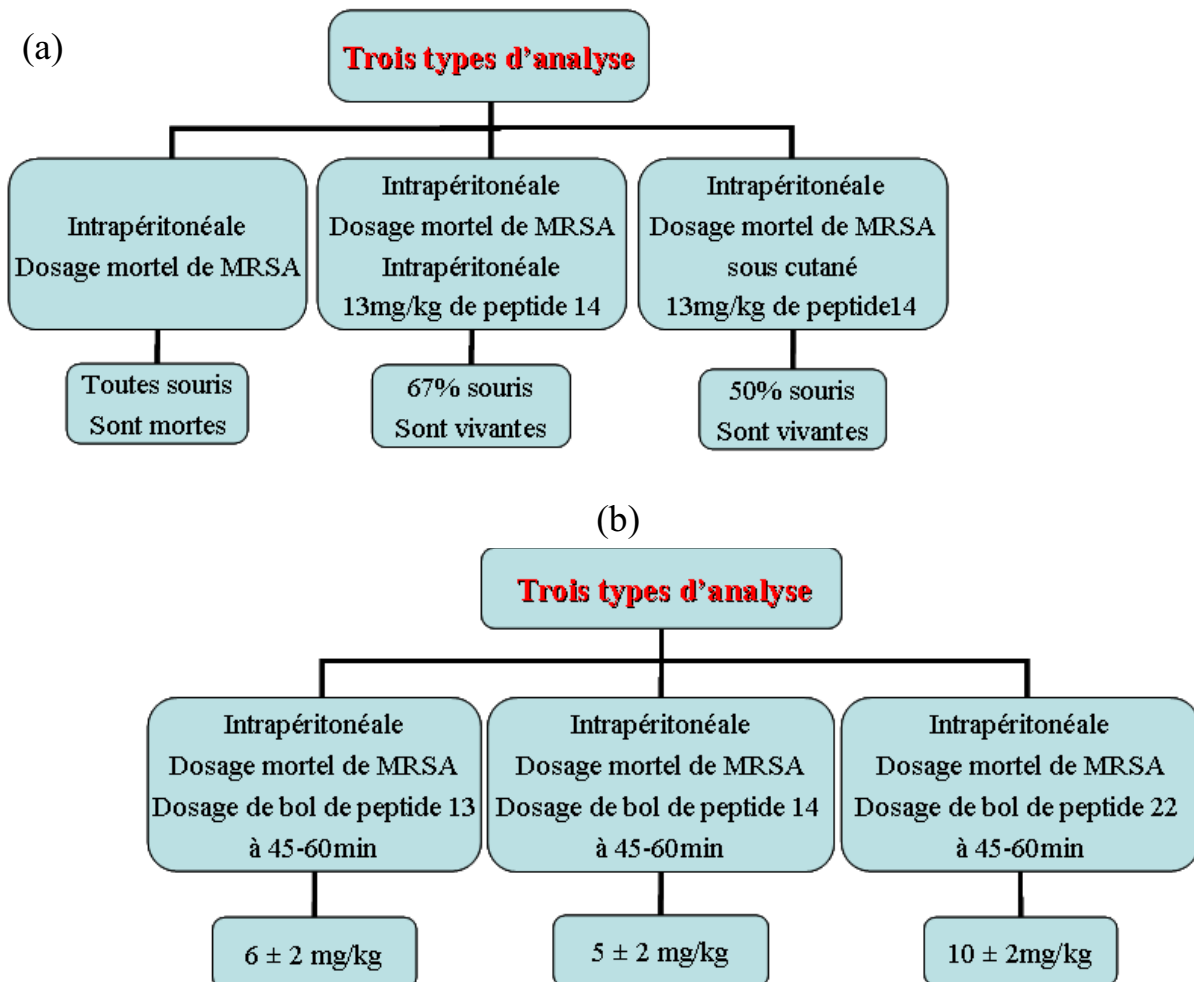
La stabilité des CPs 9, 14, 22 et 25 a été testée contre la susceptibilité de protéolyse en utilisant l' $\alpha$ -chymotrypsine, la subtilisin et le plasma sanguin de murine pour une période de 72h. Les résultats obtenus par chromatographie liquide (HPLC) confirment que la structure des CPs est très stable, et ne montrent aucun signe de dégradation des CPs. Par contre, les chaînes linéaires analogues sont dégradées sous les mêmes conditions après 10 min.

La présence des CPs en quantités différentes dans différents organes de souris ne provoque aucun signe de toxicité. En outre, après injections intra péritonéale et sous cutanée

de CPs (seq14) avec une quantité de 300 mg/j pendant 3 jours consécutifs, les analyses faites le quatrième jour sur divers tissus et organes de souris, montrent des profils normaux de sang et de la morphologie des souris. Les comportements physiques et sociaux des animaux n'ont pas changés.

L'activité antibactérienne des CPs (seq 14) *in vivo* a été testée contre l'infection bactérienne. Trois groupes des souris ont été soumis à une injection intra péritonéale par un dosage mortel de *S. aureus*. Deux ont subi une autre injection intra péritonéale ou sous cutanée de CP14 (13 mg/kg) afin d'évaluer l'efficacité de ce peptide (Figure I-11 (a)). Les résultats montrent que les souris du 1<sup>er</sup> groupe n'ayant pas reçues de doses de peptides, sont tous mortes en 48 heures. Par contre, 67% et 50% des souris du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> groupes ont survécu après 7 jours de tests.

Afin de déterminer la quantité nécessaire qui assure le traitement de l'infection par la bactérie *S. aureus* (Figure I-11 (b)), Ghadiri *et al.* ont comparé l'action des CP13, CP14 et CP22 contre un dosage mortel de la bactérie. Les analyses ont montré que les quantités requises pour assurer la survie d'un grand nombre de souris sont les plus faibles pour le CP14.



**Figure I-9 :** L'activité *in vivo* de CPs de la séquence 14 (a), et celles de 13, 14 et 22 (b) contre un dosage mortel de bactéries gram+ (*S.aureus*).

---

# **Chapitre II : L'action antimicrobienne**

## **II-1 Introduction**

Les agents antibiotiques sont des substances naturelles ou issues de la synthèse chimiques qui sont capables d'inhiber la multiplication ou de tuer d'autres micro-organismes. L'utilisation abusive et inconsidérée de tels agents autant que substances thérapeutiques et en production animale, a contribué fortement à la croissance des résistances pathogènes aux antibiotiques conventionnels. Ces résistances posent un véritable problème dans la lutte contre les agents infectieux.

Ainsi, la nécessité de trouver de nouveaux agents anti-infectieux ou de développer des molécules thérapeutiques rationnelles est un des enjeux majeurs de la recherche et de l'industrie pharmaceutiques. Au cours des dernières décennies, la découverte chez les espèces vertébrées et invertébrées (y compris les plantes) des peptides endogènes présentant des propriétés antimicrobiennes avec des structures très différentes de celles des antibiotiques classiques, a ouvert des nouvelles perspectives dans la lutte contre la croissance de la résistance bactérienne. Ces substances qui sont synthétisées par l'organisme lui-même, sont définies dans son code génétique, protègent en permanence cet organisme des multiples agressions bactériennes et participent au maintien permanent de son intégrité. Leur large spectre d'activité et leur rapidité d'action présentent un intérêt majeur. Les caractéristiques de leurs structures et de leurs modes d'action peuvent servir à la production de nouvelles classes d'antibiotiques originaux, utilisables en thérapeutique.

## **II-2 Les peptides antimicrobiens (PAMs)**

Pour la majorité des cellules vivantes, les peptides antimicrobiens sont des composés importants de la défense naturelle contre les microbes pathogènes envahissants. Ils sont produits par les espèces vertébrées et invertébrées, comme les bactéries, les champignons, les plantes, les animaux et les être humains [81, 82].

Les PAMs sont des peptides linéaires, cationiques et amphipathiques, relativement petits. Ils sont composés au maximum de 50 résidus avec la chiralité L ou avec l'alternance de la chiralité L/D d' $\alpha$ -acides aminés. La charge totale des PAMs dépend du nombre de résidus basiques qui forment la séquence peptidique [83, 84], et peut varier de +2e à +9e [32, 84].

La plupart des PAMs adoptent à la structure secondaire en hélice- $\alpha$  ou en feuillet- $\beta$ , mais d'autres ont une structure mélangée entre hélice- $\alpha$  et feuillet- $\beta$  avec un certain nombre de liaisons disulfures. Leur diversité dépend des composants de la séquence de leurs chaînes peptidiques et de leurs structures tridimensionnelles [32, 85].

Les PAMs ont un grand spectre d'activité contre une large gamme des micro-organismes. La majorité d'entre eux sont actifs contre les bactéries gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup>, et certains d'entre eux sont aussi antifongiques, antiviral et anticancéreux [82, 86]. La plupart des PAMs agissent sur

---

la membrane cytoplasmique des micro-organismes mais certains d'entre eux agissent après avoir traversé la membrane sur des éléments intra cytoplasmiques, comme l'ADN et l'ARN. Leur activité et leur sélectivité envers les micro-organismes sont gouvernées principalement par leurs structures et leurs interactions avec la membrane ciblée [32, 86, 87].

## **II-3 Classification des PAMs**

Les PAMs sont nommés d'abord en fonction de leur origine, mais la plupart d'entre eux ont pris leur nom de l'animal dont ils ont été extraits. En revanche, la similarité entre les peptides isolés d'organismes différents, ainsi que la coexistence dans une même espèce de peptides différents par leur structure et leur activité rendent cette classification inappropriée. La classification commune des PAMs se base actuellement sur leurs structures tridimensionnelles et leurs propriétés chimiques [86, 88] et se déclinent en cinq groupes:

- Ceux organisés en hélices- $\alpha$  ;
- Ceux organisés en feuillets- $\beta$  ;
- Ceux riches en Cystéine ;
- Ceux riches en certains acides aminés ;
- Et finalement ceux riches en acides aminés rares.

### **2.3.1 Les peptides hélicoïdaux**

Ces sont des peptides linéaires dépourvus de résidus cystéines. Dans des conditions favorables, ils forment une hélice- $\alpha$ . Dans ce groupe, on retrouve : les cecropins et les maganines

Les cecropins sont reproduits par les insectes et les corps gras comme les foies de mammifères [89]. Tous ont une structure hélice- $\alpha$  en solution organique [90] comme par exemple les cercropins-A qui sont amphipathiques dans 15% d'hexafluoroisopropyl-alcool [91]. Ils sont surtout antibactériens et antifongiques, mais certains ont aussi une activité sur les cellules de levures [82].

Les maganines sont extraites de la peau et de l'intestin des amphibiens. il a été montré (RMN) que ces peptides ont une structure secondaire en hélice- $\alpha$  leur conférant une propriété amphipathique [92]. Certaines présentent une forte activité antibactérienne sur les germes gram $\pm$ , mais sont peu antifongiques. Elles montrent aussi une activité lytique sur les cellules cancéreuses et sur les virus [82].

### **2.3.2 Les peptides en feuillets- $\beta$**

Dans ce groupe, on distingue deux types : le 1<sup>er</sup> est composé de feuillets- $\beta$  rigides, liés par des épingle à cheveux ( $\beta$ -hairpin) et maintenus par un pont disulfure [93]. La thantine appartenant à ce groupe, isolée chez les insectes est formée par 21 acides aminés. Ce peptide est actif contre les bactéries gram $+$  et gram $-$ , il est aussi antifongique et anti-levures [94].

---

Le 2<sup>ème</sup> type, se présente par des feuillets- $\beta$  sous forme de cycles peptidiques constitués par l'alternance de la chiralité L/D des acides aminés. La chiralité L/D dans la séquence forme une structure unique. On retrouve dans ce type la gramicidin S constitué de 10 acides aminés qui fut isolée chez le *bacille brevis*. La gramicidin S est active contre les bactéries gram+ et gram-, ainsi que contre les champignons. Par contre, ce peptide est toxique pour les érythrocytes [95-97].

### **2.3.3 Les peptides riches en Cystéine**

Cette famille regroupe des peptides spécifiés par un nombre de ponts disulfures supérieur ou égal à deux. Leur structure est composée de feuillets- $\beta$  ou une structure mixte contenant des hélices- $\alpha$  et des feuillets- $\beta$ . On retrouve dans ce groupe :

- Les tachyplésines extraites du crabe fer à cheval. Elles sont composées de 18 à 21 acides aminés [94], et sont formées par deux brins- $\beta$  antiparallèles liés par deux ponts disulfures [98]. Ces peptides sont actifs contre les bactéries de gram+/- et virus, et sont également hémolytiques [82] ;
- Les défensines- $\beta$  et  $\alpha$  qui sont isolées chez les vertébrés ont une structure comparable composée de trois brins- $\beta$  liés par un  $\beta$ -hairpin pour former des feuillets- $\beta$  antiparallèle [99]. Les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines sont beaucoup plus actives contre les bactéries gram+ comparé aux bactéries gram- et les champignons. Mais, à concentrations élevées, elles sont aussi cytotoxiques pour les cellules mammifères. La présence des ions cationiques (mon- ou divalents) supprime l'activité antimicrobienne de cet ensemble de peptides [94, 100]
- Les peptides drosomycins que l'on trouve chez les invertébrés (drosophile) ont une structure composée de deux feuillets- $\beta$  avec une hélice- $\alpha$  intégrée entre les deux premiers brins- $\beta$ . Leur structure est stabilisée par la présence des 4 ponts disulfures, [94, 101]. Ils sont strictement anti-champignons.

### **2.3.4 Les peptides linéaires riches en certains acides aminés**

Ce sont des peptides linéaires, caractérisés par la prédominance de certains résidus. Leur structure est variable entre hélices- $\alpha$  et feuillets- $\beta$ .

Dans cet ensemble, on trouve le peptide histatin 5 qui est extrait de salive humaine. Il est composé de 24 acides aminés et riche en histidines. Ce peptide se caractérise par une structure désordonnée en phase aqueuse et ordonnée à côté des têtes polaires de la membrane. Il reproduit une grande action antimicrobienne surtout contre l'espèce de levure le *Candida Albicans* [102, 103].

L'indolicin est lui produit par les neutrophiles de bovins (les cellules blanches du sang). Il est formé par 13 acides aminés avec 39% de Tryptophan. Il n'adopte aucune structure secondaire et n'a pas de caractère amphipathique. Il est actif contre les bactéries gram+ et gram-, est antifongique et antivirus HIV [104, 105].

---

### 2.3.5 Les peptides avec des acides aminés rares

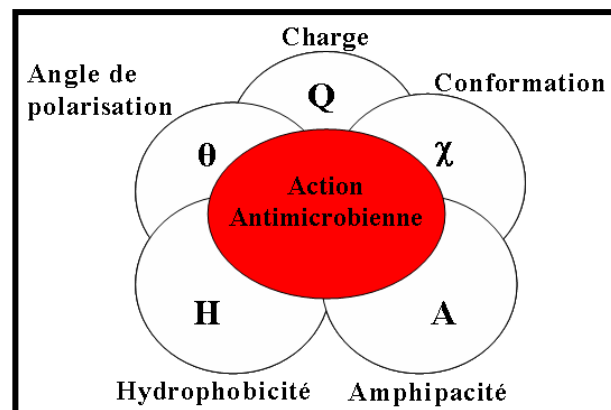
Ce sont des polypeptides inhabituels, composés d'acides aminés très rares. Parmi ces peptides on trouve le *Nisin* produit par la *Lactococcus lactis* (bactérie gram+). Il est formé par des acides aminés rares comme *lanthionine*, *3-méthyllanthionine*, *dehydroalanine* et *dehydrobutyrine*. Il est actif principalement contre les bactéries gram+. Sa structure est inconnue dans l'eau mais il s'organise sous forme de feuillets- $\beta$  au voisinage d'une membrane. Un autre peptide le leucocin-A est lui composé de 37 résidus et adopte une conformation amphipathique qui favorise l'interaction avec la membrane. Ce dernier a été isolé chez la *Leuconostoc gelidum* (bactérie gram+) [86].

## II-4 Propriétés des PAMs

Les critères primordiaux qui permettent à ces peptides de faire la distinction entre agents pathogènes et cellules de l'hôte sont particulièrement importants à définir. La reconnaissance spécifique des PAMs se base principalement sur leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques et celles de la membrane ciblée.

Les caractéristiques cruciales qui différencient les deux membranes plasmiques (bactériennes et non-bactériennes) sont la nature des têtes polaires, les composants et le potentiel transmembranaire (notons également la présence de cholestérol uniquement dans la membrane eucaryote). Ces propriétés physico-chimiques et structurelles spécifiques à chaque membrane expliquent en partie leur reconnaissance par les peptides antimicrobiens.

Les propriétés fondamentales permettant de déterminer l'action anti-microbienne d'un peptide sont, elles, liées à sa conformation, sa charge, son amphipathicité, son hydrophobicité et son angle de polarisation [85, 106] (Figure II-1). Ces caractères sont interdépendants, de telle sorte que la modification d'un caractère parmi eux souvent ramène à l'altération des autres.



**Figure II-1:** Les caractéristiques principales intervenant à déterminer l'action antimicrobienne d'un peptide, [32]



---

### **2.4.1 La conformation**

Voir la section II-2 et Annexe A.1.2

### **2.4.2 La charge**

La plupart des PAMs ont une charge nettement positive variante de +2e à +9e. Ce caractère cationique est extrêmement important pour l'interaction électrostatique entre les PAMs et les lipides anioniques de la membrane bactérienne. Cette charge aide ainsi à assurer à la fois la sélectivité par la membrane ciblée et l'efficacité antibactérienne [32].

Plusieurs études montrent qu'il existe une relation entre le nombre de charges positives et le degré de l'action antibactérienne [107-110], mais cette relation n'est pas entièrement linéaire. Ainsi par exemple, Dathe *et al.* ont montré que l'augmentation de la charge de la maganine progressivement de +3e à +5e provoque une augmentation de l'action bactérienne. Au contraire, le passage de la charge de peptide de +6e à +7e diminue l'action antibactérienne et augmente l'action hémolytique [110].

### **2.4.3 L'amphipathicité et le moment hydrophobe**

La plupart des PAMs forment une structure fortement amphipathique lorsqu'ils interagissent avec les membranes ciblées. Dans les hélices- $\alpha$ , elle est due à la périodicité des résidus chargés, mais, l'amphipathicité peut aussi se présenter dans les structures à feuillet- $\beta$ .

L'amphipathicité intervient directement dans les mécanismes de perturbation et de destruction de la membrane. Les PAMs amphipathiques s'orientent parallèlement à l'interface de la membrane en mettant la partie hydrophile auprès des têtes polaires et la partie hydrophobe vers l'intérieur de la membrane. La suite du processus est complètement variable d'un peptide à l'autre. Il dépend forcément de l'ensemble de propriétés de peptide et la membrane ciblée [111-113].

L'amphipathicité provoque une croissance non seulement de l'activité des peptides sur les membranes chargées mais aussi de l'activité des peptides sur les lipides zwitterioniques.

Il est à noter que :

- l'amphipathicité est extrêmement primordiale et nécessaire pour assurer l'action antibactérienne au contraire de l'hélicité ou de l'hydrophobicité. L'amphipathicité est évaluée à travers les mesures quantitatives du Moment hydrophobe  $M_H$ , qui reflète l'espace séparant les chaînes latérales hydrophobes et hydrophiles dans les peptides [32, 106] ;
- La perméabilité de la membrane devient plus importante avec l'augmentation du  $M_H$  des PAMs. Cependant, l'effet de la croissance du  $M_H$  sur une membrane chargée reste toujours modeste, tandis que, sur une membrane neutre, le  $M_H$  joue un rôle prédominant sur l'action hémolytique sur la cellule l'hôte [32, 106].

---

#### **2.4.4 L'angle de polarisation**

L'angle de polarisation exprime le rapport entre la face polaire et apolaire de peptides dans la conformation en hélice- $\alpha$  amphipathique. Lorsqu'une face d'hélice est formée uniquement par des résidus hydrophobes, et l'autre par des résidus chargés, l'angle de polarisation  $\theta$  vaut alors  $180^\circ$  [32, 114].

Il est important de savoir que, la réduction de l'espace entre les deux faces hydrophobe et hydrophile ou l'augmentation du nombre de résidus hydrophobes provoque la diminution de l'angle de polarisation. La perméabilité ou la formation de pores dans la membrane sont maximales avec des peptides ayant un petit angle de polarisation, par contre la durée de vie des pores devient très courte, ce qui favorise la translocation des peptides à l'intérieur de la membrane. Les peptides PGLa ( $\theta = 100^\circ$ ) sont très faciles à transférer à l'intérieur de la membrane par rapport au peptide maganine ( $\theta = 180^\circ$ ) [114] [114, 115]. Ce résultat montre que la stéréo géométrie joue un rôle significatif dans la perméabilité et la destruction de la membrane.

#### **2.4.5 L'hydrophobicité**

Elle représente le pourcentage du nombre de résidus hydrophobes dans le peptide. Elle est presque 50% dans plusieurs PAMs. Ce paramètre est fondamental pour l'interaction avec la membrane et la perméabilité de cette dernière [32]. On notera que l'augmentation de l'hydrophobicité provoque la croissance de la toxicité de cellules mammifères et une réduction de l'action antibactérienne.

Wierprecht *et al.* ont étudié la relation entre l'hydrophobicité et la perméabilité de la membrane en variant le degré de l'hydrophobicité d'un peptide tout en gardant sa charge, son hélicité et son moment hydrophobe. Ils ont trouvé que le peptide à grande hydrophobicité, induit une perméabilité croissante dans les vésicules formées par les lipides PC par rapport à ceux formés par les PG, en comparant avec les peptides présentant une hydrophobicité modérée [116, 117].

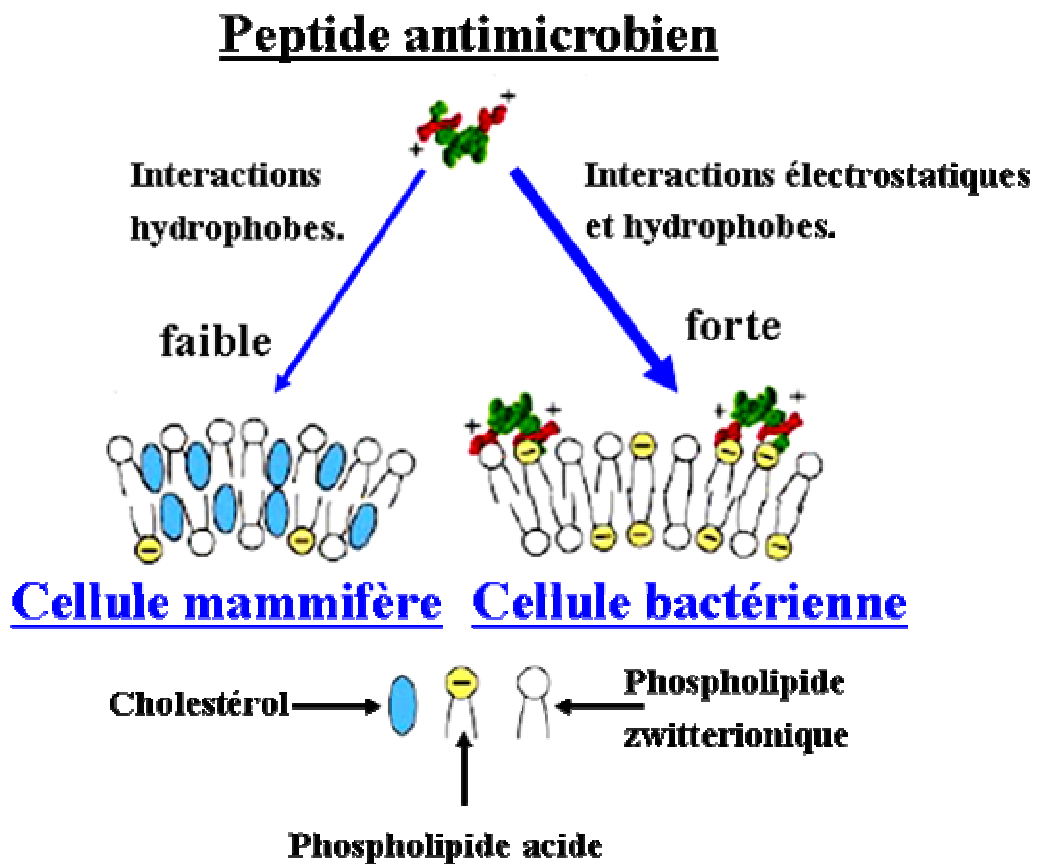
## **II-5 Le mode d'action**

### **2.5.1 La fixation initiale du peptide**

La fixation initiale d'un PAM sur la membrane est gérée par des interactions électrostatiques entre les charges positives des PAMs et les charges négatives des lipides de la membrane, ainsi que par les interactions hydrophobes [118, 119] (Figure II-2).

Plusieurs études ont démontré qu'il existe une relation directe entre la charge du peptide et sa capacité à se fixer sur une membrane [107, 109, 110, 120]. Par ailleurs, dans certains cas, le potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ) peut être un facteur déterminant pour la fixation des PAMs sur la membrane. L'activité de la nisine sur des lipides membranaires exige un  $\Delta\psi$  critique [121]. Un potentiel membranaire inférieur à  $-20$  mV provoque une augmentation du

nombre de liaisons entre le peptide tachyplesin I et la membrane [118]. D'autres peptides nécessitent un potentiel électrochimique substantiel pour assurer une activité antimicrobienne optimale [122].



**Figure II-2** : Représentation des relations spécifiques entre le peptide antibactérien et les membranes procaryote et eucaryote [119].

Après la fixation des peptides sur la membrane, le mode d'action des peptides découle généralement de trois critères fondamentaux :

- Le changement de conformation des peptides, notamment celui de la structure secondaire en hélice- $\alpha$ ;
- L'auto assemblage ou multimérisation peptide-peptide et/ou peptide-lipide qui résulte en une structure très complexe afin de permettre la création de pores, comme nous le décrirons dans la suite. Ce processus propre à chaque peptide, est en fonction de la composition et de la conformation du peptide monomérique ;
- la concentration critique, qui correspond à la concentration de peptides à partir de laquelle l'auto assemblage des PAMs ou la destruction de la membrane peuvent se produire.

Ces trois facteurs qui sont variables pour chaque peptide, expliquent la diversité des modèles proposés pour expliquer le mode d'action des antimicrobiens.

Notons enfin que l'interaction de type ligand-récepteur a été envisagée pour décrire l'étape initiale de la fixation des certains peptides sur la membrane. Breukink et Kruijff [121]

---

ont montré que l'affinité de la risine est 1000 fois plus importante pour des vésicules intégrant le lipide II (composant de la membrane extérieure chez la bactérie de gram+) que pour des vésicules dépourvues de ce dernier. Ils ont conclu que cette spécificité d'activité de la risine est liée à une interaction de type ligand-récepteur avec les lipides II.

### **2.5.2 Les mécanismes**

Les PAMs ne semblent pas opérer par un mécanisme universel. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire la perméabilité de la membrane plasmique par des PAMs. Cette perméabilité peut être la cause réelle de la mort de la cellule bactérienne, ou n'être qu'une étape dans des processus plus complexes. Elle peut résulter [32, 85, 87, 113, 118, 119, 123] :

- Soit de la formation de pores ou de canaux, suivie de fuite d'éléments cytoplasmiques ;
- Soit de la dépolarisation de la membrane ;
- Soit de la rupture de la membrane par un excès d'incorporation des peptides.

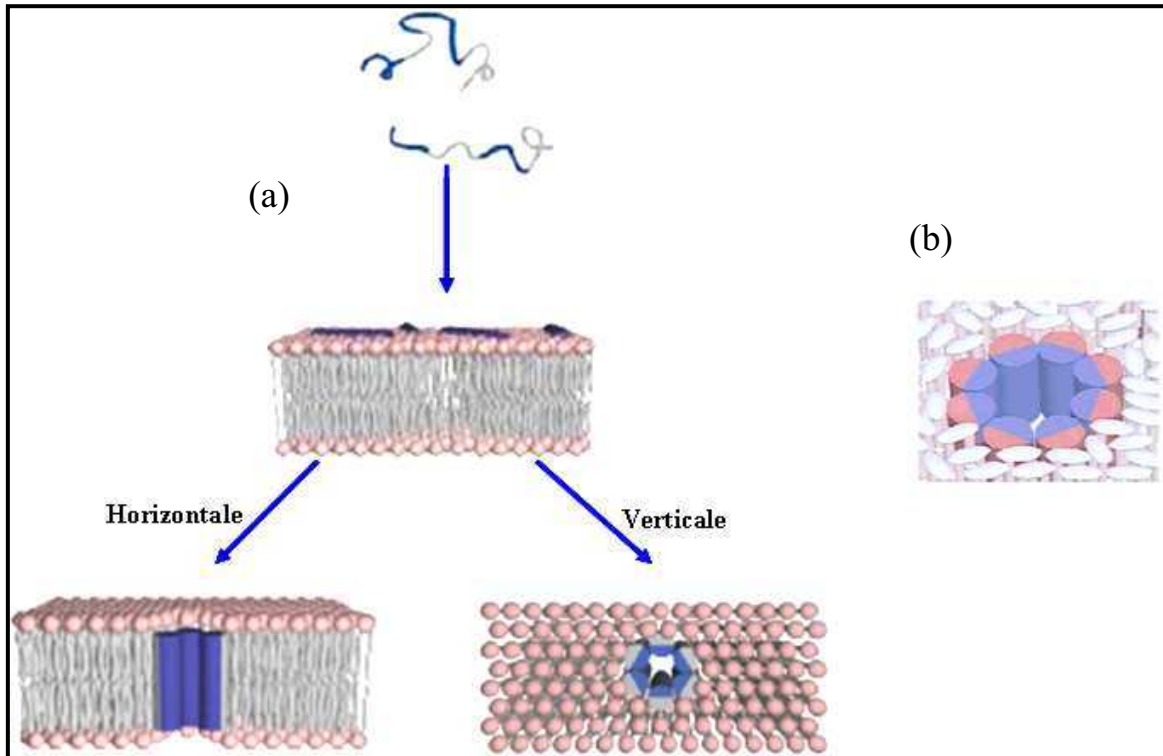
#### **Le modèle de pores transmembranaires (Barrel-stave model)**

Ce modèle décrit la formation d'un canal transmembranaire par des peptides (hélices- $\alpha$ ) amphipathiques, de telle sorte que la partie hydrophobe des peptides soit au contact avec le cœur de la membrane, et la partie hydrophile située à l'intérieur du pore. Le pore transmembranaire est constitué uniquement par des peptides, qui sont regroupés entre eux et orientés comme les planches d'un tonneau (barrel). La taille de ce type de pore dépend directement au nombre de peptides qui le forment (Figure II-3).

Le peptide alaméthicine par exemple forme un pore de diamètre intérieur et extérieur  $\sim 18$  Å et 40 Å, respectivement, grâce à l'agencement de huit monomères [124-126] (Figure II-3 (b)). La structure du pore et ses propriétés physico-chimiques lui permettent de sélectionner les molécules qui le traversent.

Les critères et processus suivants sont nécessaires à la formation du pore transmembranaire [111, 113] :

- En interagissant avec la membrane, les monomères adoptent une structure secondaire en hélicé- $\alpha$  ;
- La densité locale des monomères doit atteindre un seuil critique ;
- Les monomères s'auto assemblent ;
- Les hélices s'insèrent au cœur de la membrane ;
- Eventuellement, participation d'autres hélices arrivées à l'interface de la membrane afin d'augmenter la taille du pore.



**Figure II-3** : Représentation du modèle du pore transmembranaire, (a) mécanisme transmembranaire pour un peptide amphipathique (cylindre) : en bleue la partie hydrophile et en gris la partie hydrophobe [87]. (b) modèle du canal transmembranaire formé par l'alaméthicine [125].

### *Le modèle de pores toroïdaux (toroïdal pore, wormhole model)*

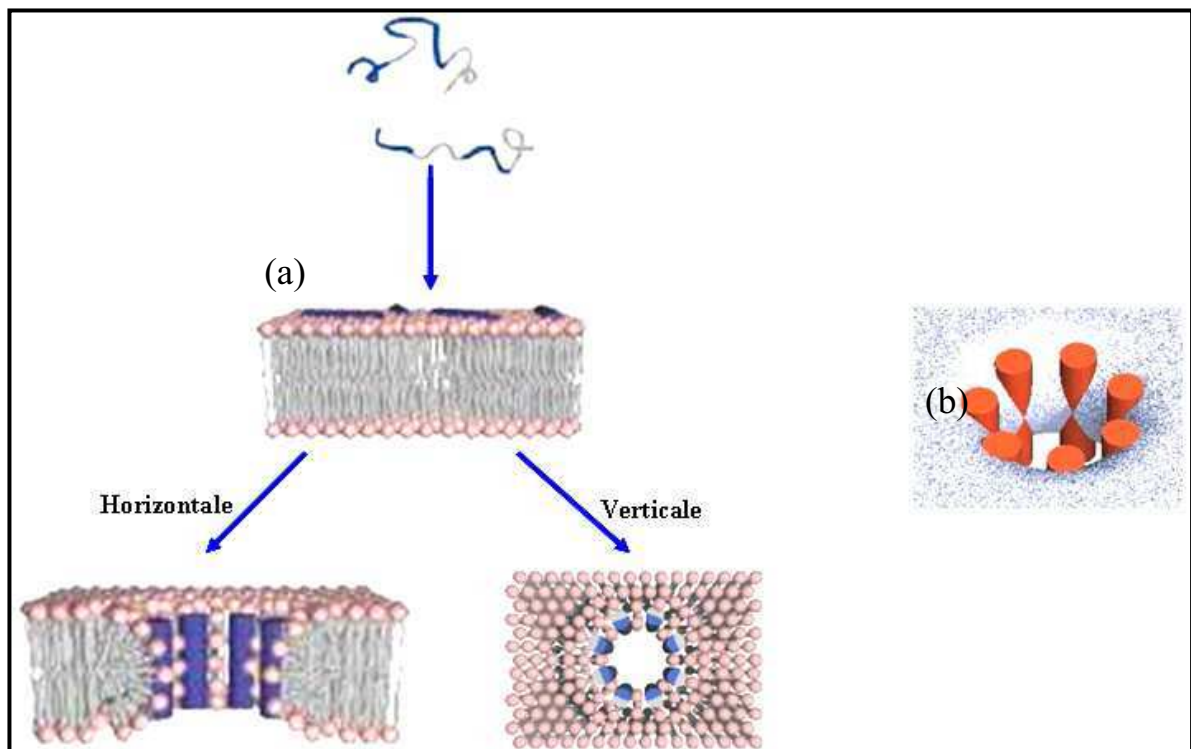
Ce modèle du pore est caractérisé par la présence des lipides dans l'organisation du pore, il concerne principalement les membranes chargées. Il a été utilisé pour décrire le mode d'action de plusieurs peptides antimicrobiens sur une membrane chargée. Ce mode a été caractérisé par différentes techniques, notamment pour la PGLa utilisant la RMN, DC et ITC [127], la mellitine [128] en utilisant la diffraction de neutrons et l'orientation DC, et les protégrines en utilisant la diffraction de neutrons et de rayons X [129].

Dans ce modèle, après la fixation des peptides à la membrane par les forces électrostatiques, les peptides prennent la conformation d'une hélice- $\alpha$  en restant toujours parallèle à la membrane, de telle sorte que la partie hydrophobe des peptides s'enfouit dans la membrane, et la partie hydrophile se met auprès des têtes polaires en induisant une courbure positive de la membrane. Dès qu'un taux peptide/lipide critique est atteint, la membrane se plie afin de permettre aux peptides à se présenter perpendiculaires à l'interface pour former un pore, appelé pore toroïdal. La taille de ce dernier dépend du nombre et de la nature des lipides et des peptides qui le forment [111, 113] (Figure II-4).

Yang et ses collègues ont montré que la maganine forme, grâce à sept monomères, un pore toroïdal de diamètre intérieur  $\sim 30$  Å [115, 125, 126] (Figure II-4 (b)), *i.e.* deux fois plus grand que celui du pore transmembranaire formé par l'alaméthicine [126].

Il est très important de noter que,

- Plusieurs techniques expérimentales (RMN, FTIR,...) ont montré que, la maganine 2 se présente parallèlement à l'interface des membranes zwitterioniques à n'importe quelle concentration. Avec une membrane chargée, elle se place d'une manière perpendiculaire à la membrane à haute concentration (entre 1/50 et 1/10 [118]), en formant un pore toroïdal [118, 126, 130]. La réorientation des peptides dans la membrane à travers le pore toroïdal se décrit par la translocation de type flip-flop des peptides vers la partie inférieure de la membrane [131, 132]. Cette observation a été confirmée par fluorescence NDB et RET. A plus haute concentration, plusieurs équipes de recherche ont suggéré, en utilisant notamment la RMN, que la maganine détruit la membrane plasmique par un effet de type detergent-like (*cf.* plus bas) en formant des micelles, dans lesquelles les lipides sont collapsés et emprisonnés par des peptides [123, 133].
- Il fut établi par SPR, DC et TFIR que la mellitine forme un pore transmembranaire dans les lipides zwitterioniques. Par contre dans les lipides anioniques, elle forme un pore toroïdal dans la membrane [134-137]. D'autres études (SPR) suggèrent que la mellitine provoque la rupture de la membrane en agissant par un mode detergent-like [135-137].



**Figure II-4.** Représentation du modèle du pore toroïdal, (a) mécanisme du pore toroïdal pour un peptide amphipathique (cylindre) : les parties hydrophile et hydrophobe sont respectivement en bleu et en gris [87]. (b) modèle du pore toroïdal formé par la maganine [125]

Un modèle du pore toroïdal désordonné suffisamment différent des autres cités ci-dessus, a été observé par simulation atomistique de dynamique moléculaire [138, 139]. Dans ce modèle, les peptides s'auto associent auprès de la membrane de telle sorte que leurs surfaces hydrophobes interagissent avec le cœur hydrophobe de la membrane. A haute concentration, certains peptides commencent à pénétrer progressivement la membrane avec un ensemble des molécules d'eau, provoquant alors une fluctuation importante à l'interface de la membrane. Ce comportement des peptides est apparemment un processus coopératif résultant de

---

l'interaction excessive de peptide avec les têtes polaires de la membrane. Pendant ce processus, les peptides se déplacent avec un ensemble de lipides à travers la membrane, en augmentant la fluctuation structurale, conduisant alors à la relaxation rapide du pore toroïdal désordonné. Dans les deux simulations citées, deux peptides au maximum, pénètrent la membrane alors que les autres restent à proximité de l'ouverture du pore. Leontiadou et ses collègues [138] ont suggéré que la formation du pore est favorisée par deux critères : (1) les peptides doivent s'auto assembler à l'interface de la membrane, (2) les peptides atteignent la concentration critique ( $P/L = 1/32$ ) qui est en accord avec l'expérience ( $1/100 < P/L < 1/30$ ) [123, 126, 131].

On note finalement que, la formation d'un pore toroïdal dépend des propriétés physico-chimiques des PAMs et celles de la membrane. Il est souvent suggéré que ce processus peut n'être qu'une étape intermédiaire dans la rupture de la membrane qui est due à la formation des micelles [32, 113, 118, 140].

### *Le modèle « carpet-like »*

Ce modèle décrit en général la perméabilité de la membrane plasmique ciblée par des PAMs amphipathiques. Dans ce modèle, les peptides s'accumulent sur l'interface de la membrane sous forme d'un tapis (carpet) [32, 87, 111, 140]. Autrement dit, les peptides se présentent parallèlement en restant toujours attaché à l'interface de la membrane grâce aux forces électrostatiques entre les charges positives des peptides et les charges négatives des têtes polaires des lipides. Le mode de tapis (carpet-like) nécessite deux conditions principales : une concentration élevée des peptides et une force électrostatique assez fortes entre les peptides et la membrane (Figure II-5).

Le mode de tapis s'applique uniquement aux peptides ayant une action antibactérienne, au contraire au pore transmembranaire, qui a été proposé pour les peptides lytiques non sélectifs. Ce mode n'exige pas une reconnaissance entre les peptides et la membrane, ni une structure spécifique des peptides et ni une insertion des peptides au cœur de la membrane afin de former un canal transmembranaire.

Le modèle carpet-like se réalise généralement suivant quatre étapes [111, 140]:

- Les peptides chargés positivement se lient préférentiellement avec les lipides chargés négativement sous forme de monomères ou d'oligomères dans une structure désordonnée, en couvrant l'interface de la membrane ;
- La réorientation des monomères à l'interface de la membrane de telle sorte que les acides aminés basiques soient en interaction avec les têtes polaires des lipides ou avec des molécules d'eau et les résidus hydrophobes orientés vers le cœur de la membrane ;
- La concentration critique des peptides est atteinte ;
- La membrane se désintègre par rupture de la couche lipidique due à la formation de micelles.

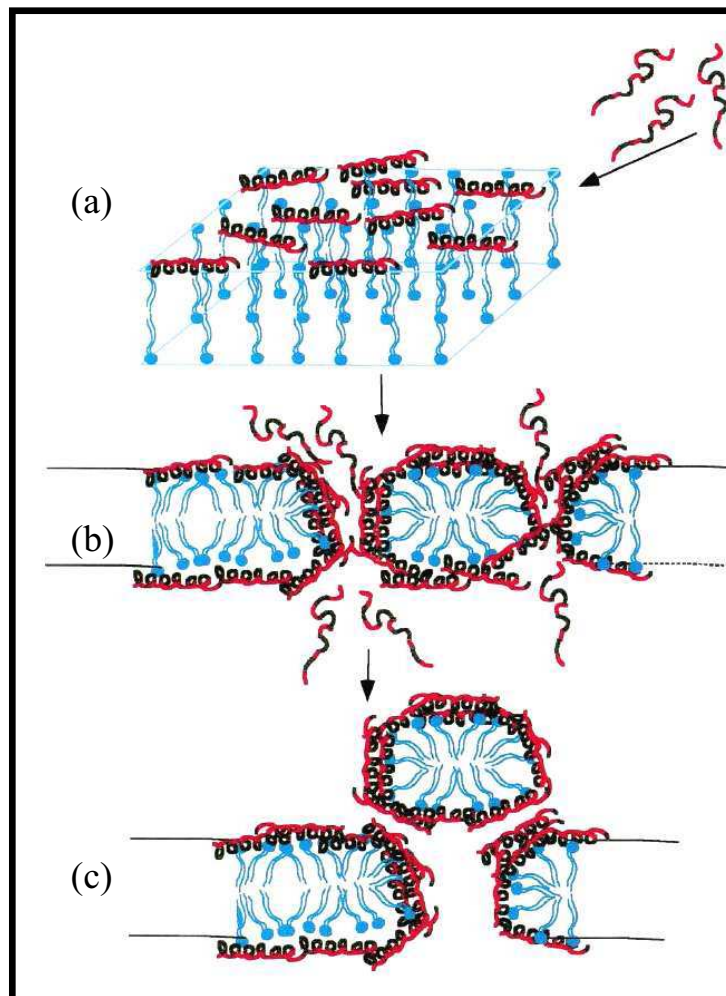
Il est admis ainsi que la destruction de la membrane suivant ce model, s'effectue grâce à la formation de micelles composées de peptides et de lipides membranaires. Comme noté précédemment, dans certains cas, la formation des micelles se réalise après la création des pores toroïdaux dans la membrane [113, 118, 140]. En effet, quand le rapport critique peptide/lipide est atteint, les monomères s'orientent perpendiculairement à la membrane.

Cette réorientation des peptides favorise la formation de pores désordonnés dans la membrane, types toroïdaux. Finalement, la désintégration de la membrane découle de la formation des micelles.

Le mode de carpet-like avec pénétration de la membrane par les peptides a été proposé au début pour décrire le mode d'action de la dermaseptin S et ses analogues sur la membrane (PC/PS) [140, 141]. Ensuite, il a été proposé pour décrire l'interaction des peptides cecropin [140, 141] ou LL-37 [141, 142] avec la membrane (PC/PS).

Dans d'autres cas, la formation de micelles se fait seulement par dépolarisation de la membrane en réalisant une grande concentration locale des peptides qui courbent positivement la surface de la membrane sans former aucun pore [32, 113, 118, 140].

Le mode carpet-like avec dépolarisation de la membrane sans la pénétrer a été proposé pour décrire l'activité de plusieurs peptides antimicrobiens, comme celle de la gramicidin S [95] sur la membrane microbienne et synthétique, l'action antimicrobienne de peptide maganine et mellitine avec la structure cyclique [143], l'activité des peptides cecropin P1 sur un mélange de lipides membranaires [144, 145] et sur les bactéries gram- (*E. coli*) [146], ou encore l'activité de peptides synthétiques sur des membranes biologique ou synthétique [108, 147].



**Figure II-5** : Représentation du modèle de carpet-like, (a) Les peptides sont liés à la surface de la membrane de telle sorte que la partie hydrophobe des peptides est orientée vers le cœur de la membrane et la partie hydrophile vers la solution. (b) Quand la concentration critique des monomères peptides est atteinte, les monomères commencent à pénétrer la membrane afin de former des pores. (c) Cas dans lequel la formation des micelles se reproduit par création des pores dans la membrane [111].



---

## **Quelques peptides antimicrobiens interagissent avec la membrane sans la pénétrer**

La gramicidin S (GS) se caractérise par un large spectre d'activité antimicrobienne. Elle agit contre les bactéries gram+/- et les champignons. Cependant la GS n'est pas sélective, elle est considérablement active sur les cellules mammifères [95].

Katsu et ses collègues ont montré que la GS s'auto assemble d'abord à l'interface de la membrane plasmique de la bactérie gram+/- . Une fois une concentration critique de peptides est atteinte, elle provoque la dépolarisation de la membrane, ce qui se traduit par la déformation de cette dernière d'une manière irréversible. Cette déformation entraîne à la fois la libération de fragments des lipides et l'augmentation de la perméabilité de la membrane. Basé sur ces observations, il fut suggéré que le mécanisme d'action de ces peptides est comparable à celui de simples détergents [96, 97, 148].

Mc Elhaney *et al.* ont montré par diffraction de rayons X [149], DSC [95] et RMN [150], que la GS provoque une réduction de l'épaisseur de bicouche lipidique à basse concentration, mais à haute concentration, cette dernière est capable d'induire une transition vers la phase cubique des lipides. Cet effet peut être un aspect important pour la destruction de la membrane, et le mécanisme a été proposé pour expliquer l'action de la GS sur les bactéries gram+/-.

L'étude qui a été faite par Shai *et al.* utilisant le DC et la fluorescence NBD montre une activité hémolytique et antimicrobienne similaire entre les deux structures cyclique et linéaire pour les deux peptides maganine et mellitine [143]. Il est raisonnable de supposer que la conformation cyclique a un mode d'action différent de celui de la conformation linéaire. Vu l'absence de formation de pores stables dans la membrane, la rupture de cette dernière se décrit par un effet détergent-like, en passant seulement par la dépolarisation de la membrane à concentration critique locale sans pénétration de la membrane [87, 113].

Boman et collègues ont montré que la cecropin P1 (CeP1) à haute concentration est très active contre les bactéries gram+ par rapport aux bactéries gram- [146, 151]. Shai *et al.* ont montré par TFIR [145], DC [144] et fluorescence NBD, que le peptide CeP1 se place parallèlement à l'interface des membranes PS/PC et PG/PE et adopte une structure secondaire en hélice- $\alpha$ . Des simulations de dynamique moléculaire confirment aussi que la CeP1 se présente toujours parallèlement à l'interface de la membrane, plutôt que s'insérer à l'intérieur de celle-ci [145]. Par ailleurs, L'affinité de ce peptide envers les lipides anioniques PS ou PG est plus importante par rapport aux lipides zwitterioniques PC.

Les deux équipes suggèrent que le mode d'action du CeP1 se produit selon le mécanisme carpet-like, et ne nécessite pas la formation d'un pore transmembranaire : La présence de monomères amphipathiques à l'interface déstabilise un faisceau phospholipidique qui conduit alors à la désintégration de la membrane et à l'augmentation de sa perméabilité.

Un autre exemple est celui du peptide synthétique LAH<sub>4</sub> qui montre aussi une grande activité contre les bactéries gram+/- [147]. Il a été montré par ATR-FTIR [123], DC et RMN [152] que ce peptide présente une grande affinité envers la membrane anionique, et se présente parallèlement à l'interface de la membrane sous forme d'hélice- $\alpha$  amphipathique. Il a été suggéré que ce peptide détruit la membrane par un mode détergent-like et ne forme pas de pores transmembranaires.

D'une manière similaire, le peptide synthétique KLAL interagit fortement avec la membrane lipidique anionique POPG par la structure secondaire d'hélice- $\alpha$  amphipathique. A grande concentration, ce peptide détruit la membrane par formation de clusters peptides-lipides à l'interface ce qui provoque une perturbation de l'organisation des lipides dans la membrane [108].

Ainsi, plusieurs peptides naturels ou synthétiques, linéaires ou cycliques, sont capables certainement de provoquer la rupture de la membrane en couplant les deux mécanismes carpet-like et detergent-like sans pénétrer la membrane.

### *Le modèle de Shai-Matsuzaki-Yang*

Le modèle proposé par Shai-Matsuzaki-Yang [113, 118, 125] reprend différents modèles mentionnés ci-dessus en les associant chronologiquement. Après les interactions électrostatiques entre les phospholipides chargés négativement de la membrane et les peptides cationiques, ces derniers s'étalent (modèle carpet-like), et puis s'intègrent à la membrane en créant alors une déstabilisation générale. Si cette déstabilisation ne suffit pas à entraîner la rupture de la membrane, le mécanisme peut alors se poursuivre par l'enfouissement des hélices- $\alpha$  et la formation de pores qui entraînent soit à une osmolyse, soit la diffusion de fragments peptidiques vers des cibles intracellulaires (Figure II-6).

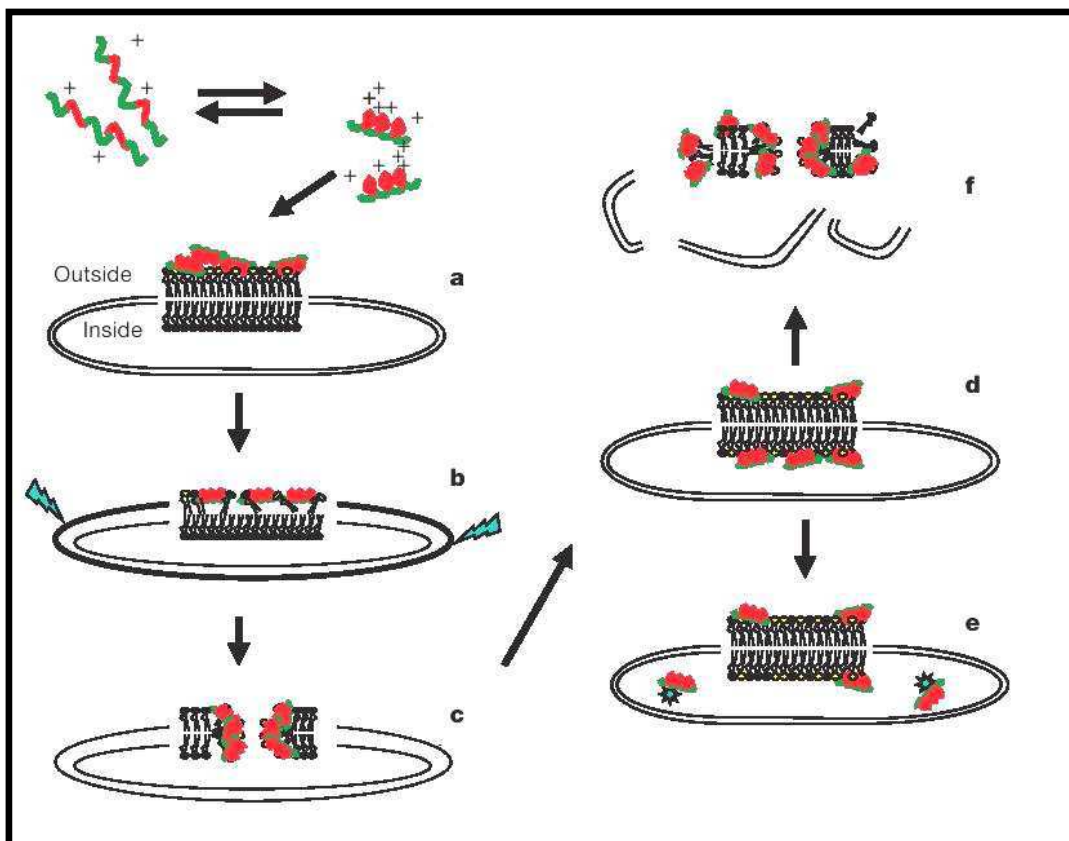


Figure II-6 : Représentation du modèle de Shai-Matsuzaki-Yang [119].

---

## **II-6 Mort de la cellule**

Les pores formés dans la membrane de gram<sup>+/-</sup> induisent une fuite d'ions et de métabolites consécutive à la dépolarisation et perturbent plusieurs fonctions comme la synthèse des protéine qui entraînent alors à la mort de la cellule [32, 87]. Les PAMs peuvent tuer la cellule ciblée en 2 à 3 minutes après exposition à la membrane [153, 154].

Dans certains cas, la perméabilité de la membrane ne suffit pas à tuer la cellule [155, 156]. Elle permet cependant l'internalisation du peptide dans le cytoplasme qui inhibe la synthèse des protéines [32, 87], ou les mécanismes de réplication ou de transcription de l'ADN [146, 157, 158]. Ces processus ne sont pas encore bien élucidés : Un peptide semble pouvoir agir directement à plusieurs niveaux, ou faciliter l'action d'autres protéines impliquées dans les phénomènes de cytolysse.

Plusieurs études montrent que l'effet de l'association de certains peptides est supérieur à la somme des effets produits par chaque peptide pris isolément [115, 159, 160]. Cette activité en synergie est discernée par la réduction considérable des concentrations minimales inhibitrices. Elle peut se traduire alors par la formation de pores composés d'hétéro-dimères, qui se révèlent plus stables que ceux composés des mêmes monomères [161].

Pour conclure, il semble que la mort cellulaire soit le résultat de plusieurs mécanismes d'actions indépendants ou coopérants. Cette diversité permet aux peptides antimicrobiens de s'adapter à des conditions physiologiques variables, tout en restant actifs sur une grande variété de micro-organismes.

## **II-7 Résistance des micro-organismes**

La résistance des micro-organismes aux antibiotiques ne cesse de croître, et devient un réel problème. La situation est telle que plusieurs souches bactériennes sont devenues multi résistantes à la plupart des antibiotiques à large spectre. Ce phénomène de résistance aux agents antibiotiques n'est pas nouveau, mais il s'est considérablement aggravé depuis les 20 dernières années. Il apparaît donc nécessaire et urgent de découvrir des nouvelles classes d'agents anti-infectieux [81, 162].

Les résistances bactériennes aux peptides antimicrobiens sont improbables. Ces derniers sont des substances qui ont fait partie depuis toujours des défenses innées de l'organisme, et de plus, leurs mécanismes d'action (Figure II-4) sont très basiques. Pour cela, les PAMs possèdent une grande sérénité face au risque d'apparition de la résistance bactérienne [32, 119, 163].

Les résistances bactériennes peuvent être globalement classées en deux types : résistance passive et résistance adaptative

La résistance passive est due aux propriétés particulières de certains microorganismes. Elle existe même en l'absence du peptide, mais dans d'autres cas, elle est induite par l'attaque du peptide. Ce type de résistances est lié à la composition et à la charge de surface de la

---

membrane. La présence des molécules de cholestérol dans la membrane bactérienne semble réduire l'activité des peptides antimicrobiens, par l'augmentation de la stabilité membranaire mais aussi par certaines interactions spécifiques entre le peptide et le cholestérol [118]. Certains genres des bactéries présentent des membranes externes pauvres en phospholipides acides, ou des membranes riches en phospholipides bien spécifiques. Ceci peut résulter par exemple en une diminution de la charge négative de la surface de la membrane, et donc une diminution du nombre de sites de fixation pour les peptides cationiques [32, 164]. Une autre hypothèse de résistance constitutive est avancée : par la présence du glycocalyx à la surface de certaines capsules bactériennes. Ce dernier, très anionique, emprisonnerait les peptides cationiques et limiterait alors leur contact avec la membrane [165]. Enfin, le micro-environnement physiologique (forces ioniques, pH, ...) dans lequel certaines espèces évoluent *in vivo* semble d'être à l'origine de leur résistance aux peptides antimicrobiens [166].

La résistance adaptative correspond à une réponse spécifique du microorganisme lors du contact avec le peptide antimicrobien. Ces mécanismes ont pu être étudiés récemment grâce notamment à des travaux sur des souches mutantes génétiquement modifiées. Cette réponse peut se traduire par la sécrétion de protéases qui sont capables de cliver certains peptides [167], ou par la modification de certains composants membranaires en réponse à l'agression des peptides antimicrobiens [168].

Ces mécanismes de résistance doivent faire l'objet de travaux complémentaires afin de mieux comprendre leur fonctionnement. De même, l'étude de la résistance naturelle de certains peptides antimicrobiens aux processus de dégradation des micro-organismes permettra l'élaboration des nouvelles molécules.

---

# **Chapitre III : Dynamique moléculaire**

## **III-1 Introduction**

Les processus et les fonctions biologiques dépendent toujours des propriétés structurales et dynamiques de leurs composants. Les informations, à l'échelle moléculaire, sur ces processus obtenues par les techniques expérimentales conventionnelles sont souvent très limitées et insuffisantes pour mieux comprendre et mettre en évidence ces fonctions avec une résolution atomique.

La simulation numérique de dynamique moléculaire [10, 11, 169] se base principalement sur des modèles théoriques et des données expérimentales, et utilise des outils informatiques pour simuler et étudier des phénomènes biologiques à l'échelle atomique. Son but ultime est de reproduire les propriétés macroscopiques d'un système donné à partir de ses caractéristiques microscopiques.

La dynamique moléculaire (DM) a pris un grand essor en biochimie ces dernières années. Ce développement est lié à celui des moyens de calcul informatique et à celui d'algorithmes plus performants.

La simulation numérique, notamment la DM est fréquemment utilisée de manière incontournable afin de comprendre et de déterminer les processus des phénomènes biologiques, et aussi d'évaluer les paramètres qui sont inaccessibles par l'expérience. La combinaison entre les deux techniques (la simulation numérique et l'expérience) est souhaitable pour extraire le maximum d'informations sur un phénomène à différentes échelles.

Dans la suite de ce chapitre, nous décrivons les principes de l'application de la technique de dynamique moléculaire pour étudier des systèmes moléculaires complexes.

## **III-2 Principe**

La dynamique moléculaire est une méthode déterministe qui consiste à décrire *in silico* l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps en intégrant les équations du mouvement pour chaque atome. Elle permet de calculer les grandeurs macroscopiques du système étudié, particulièrement les propriétés structurales et thermodynamiques.

Chaque atome dans le système est considéré comme une masse ponctuelle avec ses propriétés physiques et chimiques correspondantes comme la masse, la charge électronique et le type d'atome. Le déplacement de chaque atome est dirigé par sa propre énergie cinétique, et par les forces que l'entourage exerce sur lui.

Les mouvements des atomes d'un système sont déterminés en intégrant numériquement les équations du mouvement, avec un pas d'intégration fini. Les nouvelles vitesses et les

positions des atomes du système à l'instant  $t$  sont calculées en fonction de leurs vitesses et leurs positions à l'instant  $t-1$ . Les positions et les vitesses initiales sont des données du sujet étudié. En intégrant pas à pas les équations, on obtient les trajectoires de chaque atome en fonction du temps.

Les atomes interagissent entre eux par deux types des forces :

**Les forces intramoléculaires** : ce sont des dérivées des fonctions d'énergie empiriques qui déterminent les déformations géométriques (liaisons covalents, angles, dièdres propres et dièdres impropres).

**Les forces intermoléculaires** : il s'agit des forces à distance électrostatiques et de Van der Waals.

## III-3 Potentiels intramoléculaires

### 3.3.1 Le potentiel des liaisons

La liaison covalente est généralement modélisée par un potentiel harmonique. Cette approximation décrit le déplacement d'une paire d'atome autour de sa position d'équilibre. Le potentiel d'énergie de la liaison covalente s'écrit :

$$U_1 = k_{AB} (r_{AB} - r_{AB}^0)^2 \quad \text{Eq III-1}$$

$r_{AB}^0$  La distance d'équilibre entre les deux atomes A et B

$r_{AB}$  La distance entre les deux atomes A et B.

$k_{AB}$  La constante de force.

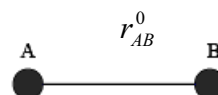


Figure III-1 : La liaison covalente entre deux atomes A et B.

### 3.3.2 Le potentiel angulaire

Ce potentiel est généralement représenté par une fonction harmonique qui prend en compte les déformations angulaires entre deux liaisons covalentes autour d'angle d'équilibre. Il s'écrit :

$$U_2 = k_{ABC} (\theta_{ABC} - \theta_{ABC}^0)^2 \quad \text{Eq III-2}$$

$\theta_{ABC}^0$  : L'angle d'équilibre entre les trois atomes A, B et C

$\theta_{ABC}$  : L'angle entre les trois atomes A, B et C

$k_{ABC}$  : La constante de force

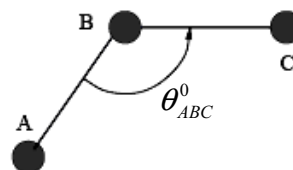


Figure III-2 : L'angle entre trois atomes liés.

### 3.3.3 Le potentiel des dièdres propres

Ce potentiel décrit les rotations possibles autour de l'angle dièdre. C'est une somme qui détermine tous les minimums et les maximums du dièdre formé par quatre atomes. Cette énergie peut être modélisée par une série de Fourier :

$$U_3 = \sum_K k_K (1 + \cos(n_K \phi_K - \delta_K)) \quad \text{Eq III-3}$$

$\delta_K$  : L'angle du décalage par rapport à l'état initial.

$\phi_K$  : L'angle dièdre propre.

$n_K$  : Le nombre de la périodicité ( $1 < n_K < 6$ ).

$k_K$  : La constante de force.

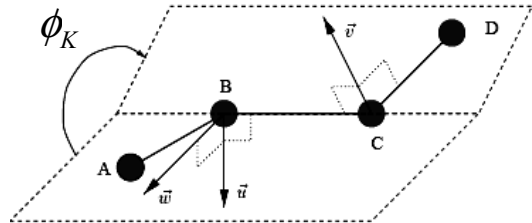


Figure III-3 : L'angle de torsion propre

### 3.3.4 Le potentiel des dièdres impropres

Ce potentiel décrit la vibration d'un atome par rapport au plan formé par trois autres atomes. Ce type de mouvement apparaît surtout dans une structure cyclique. Ce modèle peut être décrit par un potentiel d'oscillation harmonique autour d'un angle d'équilibre.

$$U_4 = k_P (\psi_P - \psi_P^0)^2 \quad \text{Eq III-4}$$

$\psi_P^0$  : L'angle dièdre impropre d'équilibre

$\psi_P$  : L'angle dièdre impropre.

$K_P$  : La constante d'énergie.

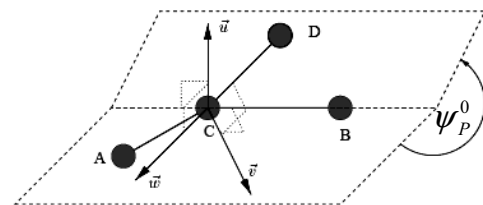


Figure III-4 : L'angle de torsion impropre.

## III-4 Potentiels intermoléculaires

Les interactions entre les atomes non liés chimiquement se décomposent en deux termes : le potentiel électrostatique et le potentiel de Van der Waals.

Le modèle électrostatique décrit les interactions entre deux atomes chargés  $q_i$  et  $q_j$  séparées d'une distance  $r_{ij}$ . Il est modélisé par la loi de Coulomb :

$$U_{el}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r} \quad \text{Eq III-5}$$

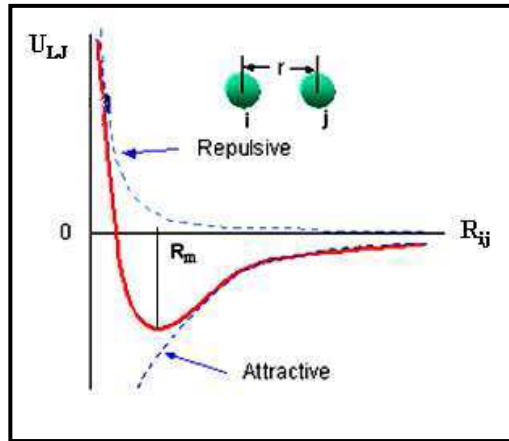
Où  $\epsilon_r$  est la permittivité relative.

Les interactions de Van der Waals représentent l'interaction répulsive et attractive entre deux atomes  $i$  et  $j$ . Ils sont décrits généralement par le potentiel de Lennard-Jones (voir la Figure III-5)

$$U_{LJ} = 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r^6} \right) \quad \text{Eq III-6}$$

$\sigma_{ij}$  : Le diamètre de collision relié aux rayons de Van der Waals des atomes.

$\epsilon_{ij}$  : L'énergie minimale d'interaction entre les deux atomes.



**Figure III-5** : Représentation du potentiel de Lennard-Jones «12-6 » pour un couple d'atomes  $ij$ ,  $R_m$  est la distance où  $U_{LJ}$  est le minimum d'énergie à  $2^{1/6} \sigma_{ij}$ .

## III-5 Champs de force et codes de dynamique moléculaire

Il existe plusieurs champs de force, qui permettent d'étudier les systèmes macromoléculaires. Parmi ces champs de force, on retrouve principalement :

**CHARMM** (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics). C'est le nom d'un programme de dynamique moléculaire et d'analyses de mécanique moléculaire [170]. Il reflète aussi le nom d'un champ de force [171]. Le développement et la maintenance de CHARMM sont assurés par un réseau de collaborateurs à travers le monde autour de Martin Karplus et de son groupe à Harvard. La fonction énergie potentielle de CHARMM s'écrit :

$$U = \sum_{\text{liaisons}} k_{AB} (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_{ABC} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dièdres}} k_K (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

$$+ \sum_{\text{impropre}} K_P (\psi - \psi_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{UB} (s - s_0)$$

$$+ \sum_{\text{paires } ij} 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r^6} \right) + \sum_{\text{paire } ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad \text{Eq III-7}$$

**AMBER** (Assisted Model Building with Energy Refinement). C'est un programme de dynamique moléculaire et d'analyses de mécanique moléculaire [172], qui est aussi le nom



d'un champ de force [173, 174]. Ce dernier a été développé à travers d'une collaboration internationale entre David Case, Tom Cheatham, *et al.* La fonction énergie potentielle d'Amber s'écrit :

$$U = \sum_{\text{liaisons}} k_{AB} (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_{ABC} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dièdres}} k_K (1 + \cos (n\phi - \delta))$$

$$+ \sum_{\text{non-lié}} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] + \sum_{\text{H-liaison}} \left[ \frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right] \quad \text{Eq III-8}$$

Il existe d'autres champ de force comme OPLS [175, 176] et GROMOS [177]. La différence entre ces champs mentionnés ci-dessus, réside souvent dans la manière dont les paramètres des fonctions d'énergie sont optimisés et dans les algorithmes de dynamique moléculaire qu'ils utilisent.

### III-6 Conditions périodiques aux limites

Dans l'expérience, les systèmes étudiés sont normalement continus et intégrés dans leur propre environnement. En simulation numérique, les systèmes ont nécessairement une taille finie. La question de la réduction des effets de bord se pose alors avec acuité, parce qu'avec des surfaces libres, les propriétés d'un système quelconque sont fortement perturbées.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour traiter ce problème, particulièrement, celles utilisant les conditions périodiques aux limites. Cette approche est très adaptée à l'étude des molécules biologiques en solution. D'abord les macromolécules sont placées dans une boîte d'eau. La réplication de cette boîte dans toutes les directions de l'espace, fournit alors un système infini. L'application des conditions périodiques aux limites, consiste à vérifier que lorsqu'un atome quitte la boîte centrale, son image dans une boîte adjacente rentre dans cette boîte centrale, toutes les interactions avec les autres atomes sont prises en compte. Cette procédure revient alors à simuler un réseau cristallin infini où le comportement moléculaire serait identique d'une maille à l'autre. Il faut toutefois s'assurer que le soluté n'interagit pas avec ses images et que chaque molécule n'interagit qu'une fois avec un atome de la boîte centrale ou avec son image dans une boîte qui est juxtée (Figure III-6).

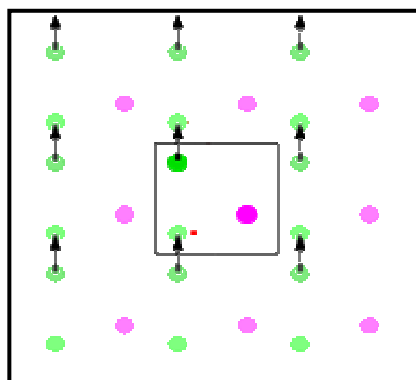


Figure III-6 : Les conditions périodiques aux limites

---

## **III-7 Ensembles thermodynamiques**

Le but de la dynamique moléculaire est d'étudier l'état microscopique d'un système afin d'accéder notamment aux différentes grandeurs thermodynamiques (échelle macroscopique). L'état macroscopique du système est défini par des paramètres thermodynamiques comme la pression, la température et la densité. L'état microscopique est décrit lui par des coordonnées  $\vec{q}$  et des quantités des mouvements  $\vec{p}$  de chaque particule du système. Ces derniers expriment les configurations du système dans l'espace de phase.

Donc, l'espace de phase est constitué par un ensemble d'états du système en fonction de  $\vec{q}$  et  $\vec{p}$ . Pour un système de N atomes, chaque point dans cet espace est noté par  $\Gamma$  :

$$\Gamma = (q_1^\alpha, \dots, q_N^\alpha, p_1^\alpha, \dots, p_N^\alpha) \quad \text{EqIII-9}$$

Soit une observable thermodynamique  $A_{obs}$  qui dépend de la configuration dans laquelle le système se trouve. Puisque la configuration des particules évolue au cours du temps  $t$ , la grandeur  $A_{obs}$  évolue aussi. La grandeur mesurable expérimentalement peut être déterminée par :

La moyenne temporelle (méthode de Boltzmann) :

$$A_{obs} = \langle A \rangle_{time} = \lim_{t_{obs}} \frac{1}{t_{obs}} \int_0^{t_{obs}} dt A(r^N(t), p^N(t)) \quad \text{EqIII-10}$$

ou par la moyenne sur l'ensemble (méthodes de Gibbs) :

$$A_{obs} = \langle A \rangle_{ensemble} = \sum_{etat} A_{etat} f_{etat} \quad \text{EqIII-11}$$

$f_{etat}$  Étant la densité de probabilité d'une configuration.

### **Hypothèse ergodique (Boltzmann, 1871)**

Un système est dit ergodique si les moyennes temporelles obtenues ne dépendent pas des conditions initiales et sont équivalentes aux moyennes sur l'ensemble.

$$\langle A \rangle_{obs} = \langle A \rangle_{time} = \langle A \rangle_{ensemble} \quad \text{EqIII-12}$$

Les coordonnées  $(\vec{q}, \vec{p})$  sont traditionnellement déterminées dans un ensemble thermodynamique précis. A partir des données caractéristiques de ces ensembles, on peut calculer les grandeurs macroscopiques du système en utilisant la physique statistique. En général, quatre ensembles thermodynamiques, sont accessibles aux simulations de DM.

#### **3.7.1 L'ensemble micro canonique (NVE)**

Le système décrit dans cet ensemble est complètement isolé. Il n'échange ni énergie ni particule avec le milieu extérieur. Il est caractérisé par des variables suivantes : un nombre de

particule  $N$ , un volume  $V$  et une énergie  $E$ . les états microscopiques accessibles ont la même probabilité. Cet ensemble n'est pas idéal pour étudier les observations expérimentales. Il est plus intéressant de travailler plutôt dans les autres ensembles, si on veut comparer les simulations avec les résultats expérimentaux.

### **3.7.2 L'ensemble canonique (NVT)**

Il est caractérisé par un nombre  $N$  de particule constant et un volume  $V$ , ainsi que par la température  $T$  du système. L'hamiltonien  $H$  du système s'écrit sous forme :

$$H(\Gamma) = \sum_i \frac{P_i^2}{2m_i} + K(q_N) \quad \text{Eq III-13}$$

La fonction de partition s'écrit :

$$Z_c(N, V, T) = \int_{\epsilon} \exp(-\beta H(\Gamma)) d\Gamma \quad \text{Eq III-14}$$

Où :  $\beta = 1/K_B T$  ( $K_B$  constante de Boltzman)

$$d\Gamma = \frac{1}{N! h^{3N}} d^3 r_1 d^3 r_2 d^3 r_3 \dots d^3 r_N d^3 p_1 d^3 p_2 d^3 p_3 \dots d^3 p_N$$

Les propriétés thermodynamiques du système sont calculées à partir de  $Z_c$  :

L'énergie libre du système est égale à :

$$F(N, V, T) = U - TS = -K_B T \ln Z_c(\beta) \quad \text{Eq III-15}$$

L'énergie interne du système :

$$U = \langle E \rangle = -\frac{\partial \ln Z_c}{\partial \beta} \quad \text{Eq III-16}$$

L'entropie de ce système :

$$S = -\frac{\partial F}{\partial T} = -K_B (\ln Z_c + \langle H \rangle) \quad \text{Eq III-17}$$

La probabilité de trouver une configuration  $r$  est donnée par :

$$\rho(N, V, T) = \frac{\exp(-\beta H(r))}{Z_c(N, V, T)} \quad \text{Eq III-18}$$

La capacité calorifique du système :

$$C_V = -T \frac{\partial^2 F}{\partial T^2} = \frac{1}{K_B T^2} [\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2] \quad \text{Eq III-19}$$

\*

La pression du système :

$$P = -\frac{\partial F}{\partial V} = k_B T \left( \frac{\partial \ln Z_c}{\partial V} \right) \quad \text{Eq III-20}$$

### **3.7.3 L'ensemble isobare isotherme (NPT)**

Ce système permet les fluctuations de volume  $V$ . Il est caractérisé par des variables thermodynamiques suivantes : un nombre de particules  $N$ , une pression  $P$  et une température  $T$ . L'hamiltonien du système s'écrit :

$$H(\Gamma) = \sum_i \frac{P_i^2}{2m_i} + K(q_N) + PV \quad \text{Eq III-21}$$

La probabilité de trouver un état donné du système :

$$d\rho(N, T, P) = \exp(-\beta(H(\Gamma) + PV)) * \frac{dV}{Z_c(N, P, T)} \quad \text{Eq III-22}$$

La fonction de partition s'écrit en fonction de celle de l'ensemble  $NVT$  :

$$Z_c(N, P, T) = \int_{\epsilon} dV Z_c(N, V, T) \exp(-\beta PV) \quad \text{Eq III-23}$$

L'énergie libre dans cet ensemble s'exprime sous forme du potentiel de Gibbs :

$$G(N, T, P) = -K_B T \ln(Z_c(N, P, T)) \quad \text{Eq III-24}$$

L'entropie correspond cet ensemble :

$$S = -\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P = k_B \left( \ln Z_c(N, P, T) + T \frac{\partial \ln Z_c(N, P, T)}{\partial T} \right) \quad \text{Eq III-25}$$

La capacité calorifique  $C_p$  :

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_P = \frac{1}{K_B T^2} \left[ \langle (H + PV)^2 \rangle - \langle H + PV \rangle^2 \right] \quad \text{Eq III-26}$$

Le volume du système :

$$V = -\left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_T = K_B T \left( \frac{\partial \ln Z_c(N, P, T)}{\partial P} \right) \quad \text{Eq III-27}$$

### **3.7.4 L'ensemble grand canonique**

Dans ce cas, le système peut échanger la chaleur et des particules avec l'environnement. Il est caractérisé par les variables thermodynamiques suivantes : un volume  $V$ , une température  $T$  et un potentiel chimique  $\mu$ . L'hamiltonien correspondant à cet ensemble s'écrit :

$$H(\Gamma) = \sum_i \frac{P_i^2}{2m_i} + K(q_N) - \mu N \quad \text{Eq III-28}$$

La fonction de partition :

$$Z_c(V, T, \mu) = \sum_{N=0}^{\infty} \sum_{\epsilon} \exp(-\beta(H(\Gamma) - \mu N)) \quad \text{Eq III-29}$$

La probabilité d'avoir une configuration  $\Gamma$  pour  $N$  particules est donnée par :

$$\rho(V, T, \mu) = \frac{\exp(-\beta(H(\Gamma) - \mu N))}{Z_c(V, T, \mu)} \quad \text{Eq III-30}$$

Le grand potentiel est défini à partir de la fonction de partition :

$$J(V, T, \mu) = -K_B T \ln Z_C(T, V, \mu) \quad \text{Eq III-31}$$

Le nombre moyen de particule est donnée par :

$$\begin{aligned} \langle N \rangle &= \sum_s P_s N_s = \frac{1}{Z_C(V, T, \mu)} \sum_s \exp(-\beta(E_s - \mu N_s)) \cdot N_s \\ &= K_B T \frac{\partial \ln Z_C}{\partial \mu} \end{aligned} \quad \text{Eq III-32}$$

De la même façon, la dérivation de  $Z_C$  par rapport à  $\beta$  fournit la valeur moyenne de la combinaison  $U - \mu N_s$

$$\langle U \rangle = \mu \langle N_s \rangle - \frac{\partial Z_C(V, T, \mu)}{\partial \beta} \quad \text{Eq III-33}$$

## III-8 Les équations du mouvement

### 3.8.1 Dynamique de Newton

La dynamique de Newton permet de décrire le mouvement d'un ensemble d'atomes dans l'ensemble  $NVE$ . Il s'agit d'un système non linéaire d'équations différentielles ordinaires d'ordre deux. Celles-ci s'écrivent de manière suivante :

$$\forall i = 1, \dots, N \quad m_i \left( \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \right) = F_i(t) \quad \text{Eq III-34}$$

$m_i$  est la masse de l'atome  $i$  et  $r_i(t)$  sa position à l'instant  $t$ .  $F_i(t)$  est la somme des forces exercées sur l'atome  $i$  par d'autres atomes ( $N-1$ ) du système à l'instant  $t$ . Elle dérive de la fonction énergie potentielle du système  $U(r_1, \dots, r_N)$ .

$$F_i(t) = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i(t)} \quad \text{Eq III-35}$$

Les intégrateurs de la dynamique moléculaire servent à discrétiser les équations différentielles du mouvement avant de les intégrer numériquement. Il existe une grande variété de choix pour réaliser cette opération, mais la condition primordiale pour que l'algorithme soit applicable, est que l'énergie du système soit conservée au cours du temps.

L'algorithme de Verlet [178] est historiquement l'un des premiers introduit, qui reste aussi l'un des plus utilisés actuellement. Il est basé sur le développement en série de Taylor des positions pour calculer les nouvelles positions des atomes. Il procède selon les étapes suivantes :

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{f(r(t))}{2m}(\Delta t)^2 + \frac{d^3 r}{dt^3}(\Delta t)^4 + O((\Delta t)^4) \quad \text{Eq III-36}$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{f(r(t))}{2m}(\Delta t)^2 - \frac{d^3 r}{dt^3}(\Delta t)^4 + O((\Delta t)^4) \quad \text{Eq III-37}$$

la somme de deux équations 36 et 37 donne :

$$r(t - \Delta t) + r(t + \Delta t) = 2r(t) + \frac{f(r(t))}{m} (\Delta t)^2 + O((\Delta t)^4) \quad \text{Eq III-38}$$

Le calcul de la nouvelle position est effectué avec une précision à l'ordre  $(\Delta t)^4$ . Cet algorithme n'utilise pas les vitesses des particules pour calculer les nouvelles positions. On peut toutefois déterminer celles-ci de la manière suivante :

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O((\Delta t)^2) \quad \text{Eq III-39}$$

Notons que les positions initiales des atomes sont des données du problème, tandis que les vitesses initiales (à  $t = 0$ ) des atomes sont calculées habituellement par la distribution aléatoire de Maxwell qui est configurée sous forme d'une fonction gaussienne, dont le module dépend de la température initiale du système :

$$\sqrt{\frac{K_B T(0)}{m_i}} \quad \text{Eq III-40}$$

$T(0)$  est la température initiale du système.  $K_B$  est une constante de Boltzmann,  $m_i$  est la masse d'atome  $i$ .

La performance d'une simulation de DM dépend principalement de la qualité de l'algorithme utilisé et de ses propriétés. D'ailleurs, parmi les avantages de l'algorithme de Verlet est qu'il permet de :

- Réduire la dérivée énergétique au cours de la simulation ;
- Réaliser et respecter la symétrie par le renversement du temps ;
- Vérifier que le volume de l'espace des phases est conservé.

Il existe un autre algorithme connu sous le nom d'algorithme Saute-mouton (leap-frog) [179, 180] dans lequel les vitesses sont calculées dans les intervalles du temps demi-entiers et les positions dans les intervalles du temps entiers (Figure III-7).

$$v(t + \Delta t / 2) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t)}{\Delta t} \quad \text{Eq III-41}$$

$$v(t - \Delta t / 2) = -\frac{r(t - \Delta t) - r(t)}{\Delta t} \quad \text{Eq III-42}$$

Ce qui permet d'exprimer les positions de la manière suivante :

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t + \Delta t / 2)\Delta t \quad \text{Eq III-43}$$

et

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t - \Delta t / 2)\Delta t \quad \text{Eq III-44}$$

On obtient alors pour les vitesses :

$$\boxed{v(t + \Delta t / 2) = v(t - \Delta t / 2) + \frac{f(t)}{m} (\Delta t)^2 + o((\Delta t)^4)} \quad \text{Eq III-45}$$

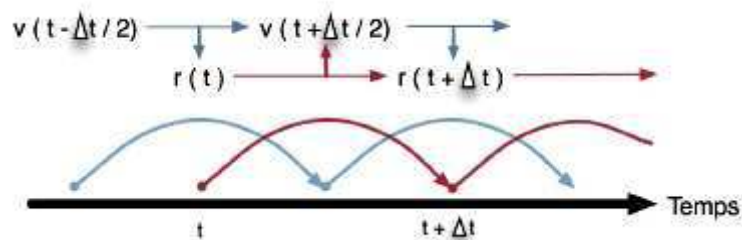


Figure III-7 : Représentation de l'algorithme leapfrog

Les inconvénients majeurs de l'intégration des équations du mouvement à l'aide d'un pas du temps unique, sont de restreindre sérieusement le temps de simulation puisque la valeur de  $\Delta t$  doit être calée sur les mouvements les plus rapides, typiquement ceux des atomes d'hydrogène. En effet, le choix du pas de temps  $\delta t$  est primordial pour la stabilité de la trajectoire prévue du système simulé. On considère que la fréquence  $1/\delta t$  doit être supérieure à la plus haute fréquence de mouvements présents dans le système. La fréquence la plus haute dans le système étant la vibration des atomes d'hydrogène ( $0.25 \cdot 10^{15} s$ ), un pas de 1fs est en principe suffisant pour intégrer l'équation du mouvement.

Tuckerman, Berne et Martyna [181] ont introduit une nouvelle approche pour intégrer les équations du mouvement. C'est l'algorithme dit à pas de temps multiples ou *r-RESPA* (reversible Reference-System Propagation Algorithm). L'idée centrale de l'algorithme est de séparer les différentes interactions de la fonction de potentielle en plusieurs termes, et chaque terme est associé à une échelle du temps d'évolution et un pas d'intégration différent. Ainsi, les degrés de liberté évoluant rapidement dans le temps seront intégrés avec des pas de temps courts, les degrés de liberté plus lents avec des pas de temps plus longs. À l'origine, l'algorithme a été utilisé pour séparer les mouvements intramoléculaires et intermoléculaires des molécules.

### 3.8.2 Dynamique moléculaire à température constante

Il existe plusieurs méthodes pour maintenir la température du système simulé à une valeur constante. La méthode la plus simple consiste à multiplier les vitesses atomiques par un facteur  $\sqrt{T_0/T(t)}$  à chaque étape de la simulation. Cette méthode pose cependant un certain nombre de problèmes car la température  $T_0$  de référence n'apparaît pas directement dans les équations qui sont intégrés au cours de la simulation, et par conséquent les fluctuations de sa valeur ne peuvent être stabilisées. En plus, cette méthode ne produit pas une trajectoire dans l'ensemble canonique, parcequ'elle ne contrôle que l'énergie cinétique moyenne du système.

Une autre méthode dite Weak Coupling Method [182], consiste à coupler le système à un réservoir externe de température désirée. Dans ce couplage à un bain thermique, on modifie les équations du mouvement et on met en place une relaxation du premier ordre pour la température par rapport à sa valeur de référence  $T_0$ .

$$\frac{dT}{dt} = \frac{(T_0 - T)}{\tau_T} \quad \text{Eq III-46}$$

Où  $\tau_T$  est le temps de relaxation ou constante de couplage de la température. A chaque pas de la dynamique, les vitesses atomiques sont ajustées par un facteur  $\lambda$  :

$$\lambda = \sqrt{1 + (T_0/T - 1)\Delta t / \tau_T} \quad \text{Eq III-47}$$

où

$$T = \frac{\sum_{i=1}^N m_i \vec{V}_i^2}{3NK_B} \quad \text{Eq III-48}$$

La dynamique de Langevin fait intervenir un terme de friction et une force aléatoire pour simuler l'influence du milieu extérieur sur le système.

$$m_i \left( \frac{d^2 r_i}{dt^2} \right) (t) = F_i(t) + f_i(t) - m_i \beta_i v_i(t) \quad \text{Eq III-49}$$

$m_i$  est la masse de l'atome  $i$  et  $r_i$  sa position.  $F_i$  la somme des forces exercées par les autres atomes sur l'atome  $i$ .  $\beta_i$  est un terme de friction,  $v_i(t)$  est la vitesse de l'atome  $i$  à l'instant  $t$ .

et  $f_i(t)$  est une force aléatoire dépendant de la température dont les composants suivent une loi normale centrée et d'écart-type :

$$\sqrt{\frac{2 m_i \beta_i k_B T_{cible}}{\delta t}} \quad \text{Eq III-50}$$

$T_{cible}$  est la température cible du système au temps  $t$

$k_B$  est la constante de Boltzmann, et  $\delta t$  est l'intervalle d'intégration.

Une autre approche connue sur le nom de la méthode de systèmes étendus, a été proposée par Nosé et Hoover [183-185]. Il s'agit d'introduire un thermostat externe au système. Le thermostat réagit alors en tant que réservoir de chaleur, qui vérifie la température du système pour qu'il soit rigoureusement canonique. Ce thermostat est implémenté en ajoutant un degré de liberté supplémentaire  $s$ . En plus, les variables du système réels ( $p_i, q_i$ ) sont liées aux variables virtuels ( $\pi_i, \rho_i$ ).

La transformation des variables virtuelles aux variables réelles se fait par des relations suivantes :

$$p_i s = \pi_i \text{ et } q_i = \rho_i \quad \text{avec} \quad s = d\tau/dt$$

L'hamiltonien du système en fonction des variables virtuelles s'écrit alors :

$$H^* = \underbrace{\sum_{i=1}^N \frac{\pi_i^2}{2ms^2}}_1 + U + \underbrace{\frac{\pi_s^2}{2M_s}}_A + \underbrace{gK_B T \ln s}_B \quad \text{Eq III-51}$$

Le premier terme de cet hamiltonien est lié au système de particule et le 2<sup>ème</sup> terme est lié au thermostat. Le terme A représente l'énergie cinétique du thermostat et le terme B décrit l'énergie potentielle du thermostat.

où :

- $\pi_s$  : est la variable conjuguée de  $s$ .
- $M_s$  : la masse thermique du thermostat.
- $g$  : le nombre de degrés de liberté du système.

Les équations du mouvement obtenues à partir de  $H^*$  sont :

$$\frac{d \vec{\rho}_i}{d\tau} = \frac{\partial H^*}{\partial \pi_i} = \frac{\vec{\pi}_i}{m s^2} \quad \text{Eq III-52}$$



$$\frac{d\vec{\pi}_i}{d\tau} = -\frac{\partial H^*}{\partial \vec{\rho}_i} = -\frac{\partial U}{\partial \vec{\rho}_i} \quad \text{Eq III-53}$$

$$\frac{ds}{d\tau} = \frac{\partial H^*}{\partial \pi_s} = \frac{\pi_s}{M_s} \quad \text{Eq III-54}$$

$$\frac{d\pi_s}{d\tau} = -\frac{\partial H^*}{\partial s} = -\frac{gk_B T}{s} + \sum_{i=1}^N \frac{\pi_i^2}{m_i s^3} \quad \text{Eq III-55}$$

$M_s$  est une masse fictive pour  $s$  qui détermine le taux du transfert thermique. La valeur de ce paramètre doit être choisie soigneusement, parce que, s'il était trop petit, l'espace de phase du système ne sera pas canonique, s'il était trop grand, la commande de température ne sera pas efficace.

### 3.8.3 Dynamique moléculaire à pression constante

Le contrôle de la pression s'effectue aussi par une méthode weak coupling [182] comme le contrôle de la température. L'algorithme de la pression constante est similaire à celui de la température. Les équations du mouvement sont modifiées afin d'obtenir une relaxation de la pression  $P$  au premier ordre vers la valeur de référence  $P_0$ .

$$\frac{dP}{dt} = \frac{(P_0 - P)}{\tau_p} \quad \text{Eq III-56}$$

Où  $\tau_p$  est le temps de relaxation associé à la fluctuation de pression. Le couplage dans ce cas s'effectue par l'ajustement des coordonnées atomiques et de la taille de la boîte de simulation par un facteur  $\xi$  :

$$\xi = \left[ 1 - \kappa_T (P_0 - P) \frac{\delta t}{\tau_p} \right]^{1/3} \quad \text{Eq III-57}$$

$$P = \frac{2 \left( \sum \frac{1}{2} m_i \vec{V}_i^2 - W \right)}{3Q} \quad \text{Eq III-58} \quad W = -\frac{1}{2} \sum_{i < j}^N \vec{R}_{ij} \cdot \vec{F}_{ij} \quad \text{Eq III-59}$$

$Q$  : Le volume de la boîte de simulation ;

$R_{ij}$  : La distance entre les centres de masse des molécules  $i$  et  $j$  ;

$F_{ij}$  : La force qui exerce sur le centre de masse de la molécule  $i$  par la molécule  $j$  ;

$\kappa_T$  : Le coefficient de la compressibilité isotherme.

La méthode d'Anderson est plus simple à utiliser pour maintenir la pression à une valeur constante [186]. Cette dernière est analogue à celle de Nosé pour la température. Il s'agit d'introduire une variable supplémentaire qui représente le volume virtuel de la boîte de simulation. La transformation des variables virtuelles aux variables réelles se fait par des relations suivantes :

$$p_i s \cdot Q^{1/3} = \pi_i \quad \text{et} \quad q_i = Q^{1/3} \rho_i \quad \text{avec} \quad s = d\tau/dt$$

L'hamiltonien du système en fonction des variables virtuelles s'écrit :

$$H^* = \sum_i \frac{\overbrace{\pi_i^2}^1}{2Q^{2/3} m_i s^2} + \overbrace{U(Q^{1/3} \rho_1, \dots, Q^{1/3} \rho_N)}^2 + \underbrace{\frac{1}{2 M_Q s^2} p_Q^2}_3 + \underbrace{\frac{P_{ext} Q}{4}}_4 \quad \text{Eq III-60}$$

Où :  $p_i$  est la quantité du mouvement conjuguée de  $Q$ .  
 $M_Q$  est la masse du piston virtuel.

Les deux premiers termes -1- et -2- désignent respectivement l'énergie cinétique et l'énergie potentielle du système de particules. Le terme -3- représente l'énergie cinétique d'un piston virtuel de masse  $M_Q$ , et le terme -4- représente le travail de la pression extérieure.

Les équations du mouvement obtenues à partir de  $H^*$  sont :

$$\frac{d \vec{p}_i}{d\tau} = \frac{\partial H^*}{\partial \vec{\pi}_i} = \frac{\vec{\pi}_i}{m s^2} \quad \text{Eq III-61}$$

$$\frac{d \vec{\pi}_i}{d\tau} = -\frac{\partial H^*}{\partial \vec{\rho}_i} = -\frac{\partial U}{\partial \vec{\rho}_i} \quad \text{Eq III-62}$$

$$\frac{d Q}{d\tau} = \frac{\partial H^*}{\partial P_Q} = \frac{P_Q}{Q} \quad \text{Eq III-63}$$

$$\frac{d P_Q}{d\tau} = -\frac{\partial H}{\partial Q} = \left[ \sum_i \left( \frac{\pi_i^2}{m_i Q^{2/3} s^2} - \frac{\partial U}{\partial q_i} q_i \right) \right] \cdot 1/3 Q - P_{ex} \quad \text{Eq III-64}$$

Finalement, il est intéressant d'indiquer que, lorsqu'il s'agit de l'ensemble isobare ( $P = Cte$ ) isotherme ( $T = Cte$ ), l'hamiltonien du système s'écrit :

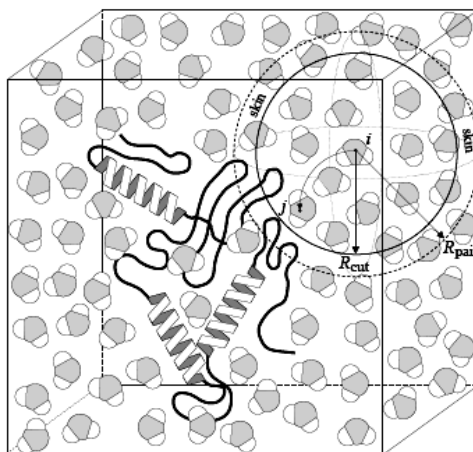
$$H^* = \sum_i \frac{Q^{2/3} m_i s^2 \pi_i^2}{2} + U(Q^{1/3} \rho_1, \dots, Q^{1/3} \rho_N) + \frac{1}{2 M_Q s^2} P_Q^2 + P_{ext} Q + \frac{1}{2 M_s} \pi_s^2 + g K_B T \ln s \quad \text{Eq III-65}$$

## III-9 Implémentations

### 3.9.1 Méthodes de calcul des interactions intermoléculaires

L'évaluation des interactions intermoléculaires (non liées) est l'opération la plus coûteuse en temps de calcul dans les simulations. En effet la complexité algorithmique de ces calculs est proportionnelle au carré du nombre d'atomes  $N^2$ . Le calcul des forces d'interactions non-liées représente souvent plus de 90 % du temps de calcul d'une itération complète. Afin de réduire le nombre d'interactions à calculer, il est possible d'introduire un rayon de coupure (*cutoff*), noté  $R_{cut}$ , au delà duquel les potentiels intermoléculaires sont nuls.

La méthode du rayon de coupure (*cutoff*) est très largement employée en DM classique. Cette méthode consiste à calculer seulement les interactions non-liées entre les atomes voisins se trouvant à une distance inférieure à la distance  $R_{cut}$ . Le programme utilisé doit permettre de construire des listes de paires non liées dans une sphère de rayon  $R_{pair}$  supérieur à  $R_{cut}$ , qui seront employées pour repérer tous les atomes voisins de l'atome  $i$  dans l'intervalle du rayon de coupure. Ces listes sont régulièrement remises à jour au cours de la dynamique moléculaire (Figure III-8).



**Figure III-8** : Illustration de méthode de rayon de coupure,  $R_{cut}$ , est le rayon de la sphère contenant la liste des voisins de l'atome  $i$ ,  $R_{pair}$  est le rayon de la sphère contenant la liste des atomes qui sera employée pour établir la liste de tous les voisins de l'atome  $i$ .

La méthode de rayon de coupure est une approximation acceptable dans le calcul des interactions de type Lennard-Jones, parce que ces derniers décroissent très rapidement lorsque la distance entre deux atomes augmente. Par contre, dans le calcul des interactions électrostatiques, cette méthode provoque une discontinuité du calcul des énergies et des forces au voisinage de  $R_{cut}$ , car le terme électrostatique diminue lentement en fonction de l'inverse de la distance. Par conséquent, même à longue distance, les interactions électrostatiques ne sont pas négligeables. Alors, l'introduction d'un rayon de coupure dans le calcul de l'énergie coulombienne, n'est pas une solution fiable. De même, l'augmentation de la valeur du  $R_{cut}$  n'est pas, non plus, une solution acceptable surtout dans le cas des simulations de biomolécules en solutions.

La méthode de la sommation d'Ewald consiste à diviser la somme d'énergie électrostatique en trois termes : la somme en réseau directe, la somme en réseau réciproque (transformée de Fourier rapide) et un terme correction [187]. Elle a été proposée pour calculer les forces électrostatiques dans un environnement soumis à des conditions périodiques aux limites. Mais le temps de calcul de cette méthode est réduit seulement à  $O(N^{3/2})$  au lieu de  $O(N^2)$ . Malgré cette réduction, la simulation de systèmes macromoléculaires reste toujours très coûteuse.

La méthode du maillage particulier d'Ewald (Partice Mesh Ewald ou PME) [188-190] a été proposée pour calculer la sommation d'Ewald de manière rapide et efficace. L'algorithme de PME a une complexité séquentielle égale à  $0(N \cdot \log N)$  au lieu de  $O(N^{3/2})$ . De ce fait, la méthode PME permet un meilleur traitement de l'électrostatique pour les interactions à longues distances pour un coût plus modeste en temps de calcul, ce qui rend cette méthode particulièrement attractive dans le cadre des simulations de DM des macromoléculaires en solution.

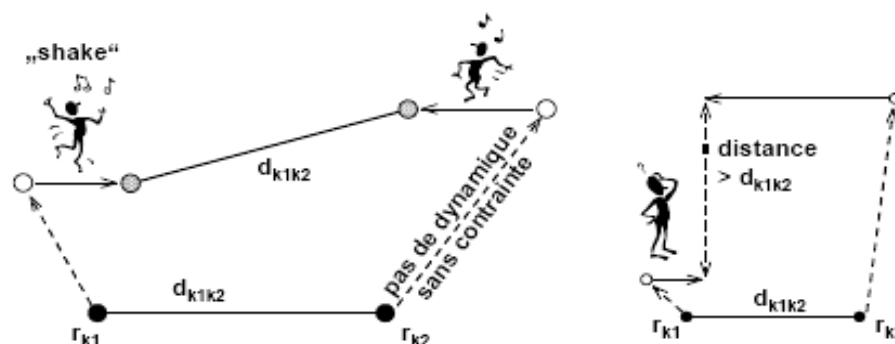
### **3.9.2 Contraintes**

La méthode SHAKE [191, 192] est généralement utilisée pour appliquer des contraintes au système moléculaire, typiquement sur les longueurs de liaisons entre atomes  $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont

contraints à la distance de référence  $d_{\alpha\beta}$ , et qui sont séparés par le vecteur instantané  $\vec{r}$ . Cet algorithme est souvent appliqué aux liaisons faisant intervenir un atome d'hydrogène, pour éliminer les plus hautes fréquences de vibration présentes dans les systèmes  $\|k_{\alpha\beta}\|$ . La période d'oscillation de ces vibrations correspond au plus petit pas d'intégration  $\Delta t$ . En limitant ces vibrations qui n'ont aucune importance sur la dynamique globale du système, il est possible alors d'augmenter  $\Delta t$  sans affecter le résultat de la DM.

Schématiquement, l'algorithme est illustré dans la Figure III-9. La correction sur les positions s'effectue après un pas de dynamique sans contrainte en assurant la validité de l'équation suivant :

$$\sigma_k(r) = \vec{k}_{\alpha\beta}^2 - d_{\alpha\beta}^2 \quad \text{Eq III-66}$$



**Figure III-9 :** Principe de l'algorithme de SHAKE : A gauche, les corrections sur les positions des atomes initiales  $r_{k1}$  et  $r_{k2}$  (cercles pleins). Après un pas de dynamique sans contraintes (cercles vides), l'algorithme contraint la distance initiale qui est fixée au départ (cercles gris). A droite, une situation dans laquelle l'algorithme échoue à cause d'un déplacement trop grand au cours du pas de dynamique sans contrainte.

L'algorithme SHAKE, peut être appliqué à tous les types de liaisons et d'angles. Il existe un autre type des contraintes dans lesquelles les atomes restent toujours fixés à leurs positions initiales, afin de les maintenir immobiles pendant la durée de la simulation. Ce type de contraintes peut être utile pour équilibrer une partie du système, ou bien pour relaxer seulement les molécules de solvant sans affecter la conformation du soluté.

## III-10 Protocole général de dynamique moléculaire

Pour étudier un système donné par simulation de DM, il faut définir au départ le système lui-même en fournissant les coordonnées des atomes, les liaisons, les angles et les dièdres de la structure, ainsi que les paramètres des champs de forces choisis. Ces informations sont fournies dans les fichiers d'entrées de la simulation. Le format et le nombre de ces fichiers dépendent du code utilisé. Par exemple, le code NAMD [193] que nous avons utilisé dans notre travail, exige trois fichiers d'entrées :

*Le fichier paramètre* : c'est un fichier qui comprend les listes des paramètres des champs de forces intramoléculaires et intermoléculaires pour tous les types des atomes ;

*Le fichier de la structure (le fichier de psf)* : ce fichier contient la liste de tous les atomes du système avec leurs types, leurs résidus, leurs masses et leurs charges électriques. Il comprend également toutes les liaisons, les angles et les dièdres de la structure,

---

*Le fichier de coordonnées (le fichier de pdb)* : ce fichier comprend en général les positions des atomes du système à  $t = 0$ , avec leur nom et leur résidu correspondant.

### **3.10.1 La minimisation**

Une fois le système construit, il subit une étape de minimisation d'énergie. Il existe plusieurs algorithmes qui permettent de réaliser cette minimisation :

*Le Steepest Descents* [194] (SD) : Après avoir calculé les gradients d'énergie, l'algorithme suivra la direction imposée par les forces inter atomiques. Cette méthode est très efficace lorsque le système est loin de sa position d'équilibre, mais elle devient vite inadaptée lorsque le système se rapproche d'un minimum.

*Le gradient conjugué* [194] (CONJ) : cet algorithme est fondé sur le même principe que le "Steepest Descent", mais il utilise à chaque nouvelle itération le gradient calculé au nouveau point de référence, et les gradients calculés aux points précédents. La prise en compte de cet historique, permet de déterminer plus finement la direction et le pas, ainsi il permet une convergence accélérée vers un minimum de l'énergie potentielle.

*Adapted Basis Newton Raphson* [194] (ABNR) : cet algorithme reprend le même principe, mais il est plus gourmand en temps de calcul car à chaque point, les dérivées secondes de l'énergie potentielle par rapport aux degrés de liberté doivent être calculées ou estimées.

Dans notre projet, nous avons utilisé souvent la même stratégie, on commence la minimisation des nos systèmes par l'algorithme de "Steepest Descent", et on terminera par celui de Gradient Conjugué.

### **3.10.2 La production**

La production de la DM se réalise dans un ensemble thermodynamique désiré avec des paramètres bien spécifiques, notamment la pression et la température.

Dans ma thèse, nous avons utilisé tout au début la DM en tout atome, avant d'exécuter notre projet avec le DM en gros grains.

En tout atome, nous avons utilisé le code NAMD [193] avec le champ de force CHARMM. Nous avons utilisé le modèle TIP3P [195, 196]. Nos simulations s'effectuent dans l'ensemble *NPT*, avec conditions périodiques aux limites dans les trois directions et utilisant les algorithmes de Langevin pour maintenir la température et la pression du système. Nous avons utilisé aussi l'algorithme PME pour calculer les forces électrostatiques. En gros grains, nous avons utilisé une version modifiée du code NAMD pour qu'elle soit compatible avec le champ de force gros grains de Marrink [16]. Nos simulations ont toujours été effectuées dans l'ensemble *NPT*. Nous avons utilisé la méthode weak-coupling pour maintenir la température et la pression du système et la méthode de rayon de coupure pour calculer les forces à distance (comme recommandé par Marrink) *c.f.* chapitre IV.

---

## **III-11 Calcul d'énergie libre par la méthode adaptative ABF**

La méthode adaptative (Adaptive Biasing Force (ABF)) [197, 198] est une technique efficace pour déterminer le profil d'énergie libre (G) le long d'une coordonnée de réaction  $\lambda$  à travers l'intégral de l'équation suivante :

$$\frac{dG}{d\lambda} = \left\langle \frac{\partial V(X)}{\partial \lambda} - \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln|J|}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} = -\langle F_{\lambda} \rangle_{\lambda} \quad \text{Eq III-67}$$

En fait, la définition standard de l'énergie libre associée à une coordonnée de réaction  $\lambda$  est :

$$G(\lambda) = -\frac{1}{\beta} \ln Z(\lambda) + A_0$$

Où  $A_0$  est la constante de force,  $P(\lambda)$  est la densité de probabilité de la variable  $\lambda$  dans l'ensemble canonique, et est définie comme :

$$P(\lambda) = \int \delta[\lambda - \lambda(x)] \exp[-\beta H(x, p_x)] dx dp_x$$

Où  $\lambda(x)$  est la valeur de  $\lambda$  correspondant aux coordonnées cartésiennes  $x$ .

Sachant que la dérivée de l'énergie libre en fonction de coordonnée de réaction s'écrit

$$\frac{dG}{d\lambda} = -\frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z(\lambda)}{\partial \lambda} = -\frac{1}{\beta} \frac{1}{Z(\lambda)} \frac{\partial Z(\lambda)}{\partial \lambda} \quad \text{Eq III-68}$$

En utilisant le changement de variable des coordonnées généralisées aux coordonnées cartésiennes dans l'équation (Eq III-68) on obtient :

$$\frac{dG(\lambda)}{d\lambda} = \left\langle \frac{\partial V(X)}{\partial \lambda} - \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln|J|}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} = -\langle F_{\lambda} \rangle_{\lambda} \quad \text{Eq III-69}$$

Où  $\langle F_{\lambda} \rangle_{\lambda}$  est la force moyenne collectée à  $\lambda$  et  $V(\lambda)$  l'énergie potentielle à la coordonnée de réaction  $\lambda$ . L'équation (Eq III-67) correspond au schéma classique d'intégration thermodynamique, mais contient explicitement la matrice Jacobine  $|J|$  de la transformation inverse des coordonnées généralisées aux coordonnées cartésiennes.

L'estimation précise de la force moyenne nécessite en général un échantillonnage uniforme le long de la coordonnée de réaction, ce qui s'avère compliqué dans le cas de systèmes complexes. Dans ABF, cette difficulté est surmontée en appliquant une force de biais itérative,  $F^{ABF}$ , qui permet au système de franchir les barrières d'énergie libre rencontrées lors d'une dynamique moléculaire non contrainte. Ceci est estimé en utilisant les forces instantanées :

$$F^{ABF} = \nabla_x \tilde{G} = -\langle F_{\lambda} \rangle_{\lambda} \nabla_x \lambda \quad \text{Eq III-70}$$

Où  $\nabla_x \tilde{G}$  est la dérivée de l'énergie libre par rapport aux coordonnées cartésiennes  $X$ . Puisque l'estimation de  $\tilde{G}$  ou de,  $\langle F_{\lambda} \rangle_{\lambda}$  est améliorée durant la simulation, la force de biais s'adapte exactement à la barrière d'énergie libre, permettant un échantillonnage uniforme du système qui diffuse alors sur une surface d'énergie libre plane.

---

Cette méthode ABF a été implémentée dans le code *NAMD* (version 2.6b1 2005) par notre équipe de recherche EDAM en utilisant des scripts séparés en Tcl suivant les coordonnées de réaction. Actuellement, parmi les coordonnées implémentées dans le code NAMD pour cette méthode, on trouve :

- La distance entre deux atomes ;
- La distance entre les centres de masse de deux groupes d'atomes ;
- La distance le long d'une direction donnée de l'espace entre les centres de masse de deux groupes d'atomes.

---

# Chapitre IV : L'approche gros grain

## IV-1 Introduction

L'auto assemblage et l'organisation de peptides auprès ou à l'intérieur de la membrane sont des processus importants dans plusieurs phénomènes biologiques comme le repliement à l'interface et l'insertion dans la membrane [199], l'action antibactérienne [32, 119] ou l'assemblage de complexes protéine-lipide [200]. L'étude de ces phénomènes à l'échelle moléculaire est principalement accessible par simulation atomistique de DM [8, 9, 201]. Cependant, cette dernière est actuellement très restreinte pour décrire totalement les processus mentionnés ci-dessus, parce que l'échelle du temps de ces processus va largement au-delà des moyens et des algorithmes des calculs d'aujourd'hui [138, 202, 203]. Le modèle gros grains (GG), dans lequel un ensemble d'atomes est représenté par un seul site d'interaction, est une approche possible pour franchir les limites de la simulation atomistique biomoléculaire [15, 204-206].

Au delà des modèles traditionnels GG développés pour les protéines [207], plusieurs modèles ont été proposés pour étudier l'assemblage de lipides et de peptides. Le 1<sup>er</sup> modèle GG utilisé pour représenter les membranes lipidiques a été proposé par Klein *et al.* [13, 14]. Ce modèle fut utilisé pour étudier l'auto assemblage des lipides/peptides, l'insertion de nanopores hydrophobes dans une bicouche lipidique [208] ou encore l'action antimicrobienne d'une chaîne polymère [209]. Ensuite, Marrink *et al.*, ont proposé un autre modèle de lipides en GG, qui permet de reproduire plusieurs phases lipidiques [16, 17, 210].

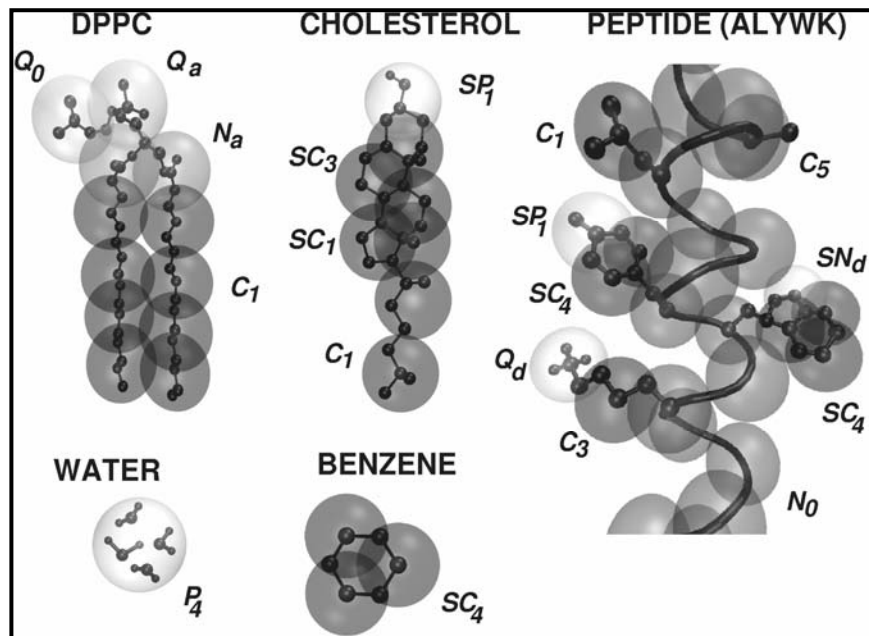


Figure IV-1 : Quelques représentations GG dans le modèle de Marrink [17].

Ce modèle fut étendu pour étudier l'interaction de peptides ou de protéines avec des bicouches lipides. D'abord, Schulten *et al.* ont proposé un modèle de lipoprotéine [19] [18]. Sansom *et al.* ont introduit un autre modèle pour étudier l'auto assemblage de micelles, de



---

bicouches lipidiques autour des protéines membranaires [20, 21], et la stabilité de domaine transmembranaire d'un canal ionique dans une membrane lipidique [211]. Finalement, Marrink *et al.* ont proposé un modèle comparable avec le modèle initial et étudié l'effet des membranes sur l'auto-assemblage du récepteur couplé à la protéine G [212], ou pour examiner le changement de conformation de canaux ioniques [213, 214]

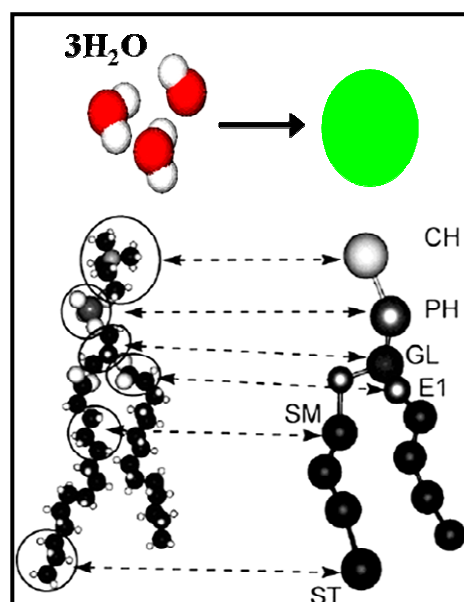
Nous décrivons dans les paragraphes suivants en détails ces modèles.

## IV-2 Le modèle de Klein, M.L. (MLK)

C'est le 1<sup>er</sup> modèle GG semi quantitatif développé pour les phospholipides [13, 14]. Ce modèle a été paramétré pour reproduire les propriétés structurales des bicouches lipidiques obtenues par simulations atomistiques.

### 4.2.1 Le modèle d'eau

Dans le modèle de MLK, une particule GG (W) d'eau représente trois molécules d'eau (Figure IV-2). Les interactions entre les particules W sont décrites par un potentiel de LJ6-4 [1] qui a relativement un large minimum afin de permettre la coexistence vapeur-liquide dans une large gamme de la température. Ce modèle se caractérise par une pression de vapeur de 1/3 atm à la température 318.15 K et un point critique à 636.3 K. La température de fusion et d'ébullition sont respectivement à de 212.1K et 373.15K pour une mobilité réelle des molécules d'eau dans une solution aqueuse.



**Figure IV-2 :** Représentation atomistique (gauche) et gros grains MLK (droite) de DMPC et de trois molécules d'eau.

### 4.2.2 Le modèle d'alcane

Les groupes composés en général par trois atomes de carbone avec leurs atomes d'hydrogène (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> sont représentés en GG par les particules SM et ST, respectivement. Afin d'assurer la variété des chaînes hydrocarbures en fonction de leurs longueurs, un site peut ne représenter que deux atomes de carbone avec leurs atomes d'hydrogène.

Les liaisons entre ces particules (SM et ST) sont modélisées par un potentiel harmonique. Un potentiel angulaire caractérisé par une fonction cosinus [Eq. IV-1], a été utilisé pour maintenir la raideur et la longueur de chaîne. Les paramètres des deux potentiels sont ajustés

de façon à reproduire par DM-GG la moyenne et la déviation standard de la distance et de l'angle d'équilibre, qui sont calculés par DM en représentation tout atome.

$$V(r_{\alpha\beta\gamma}) = K_{\alpha\beta\gamma} (1 - \cos(1 - \theta_{\alpha\beta\gamma})) \quad \text{Eq IV-1}$$

Un potentiel de LJ9-6 a été choisi pour représenter les interactions de vdw entre les sites SM et ST (les interactions entre deux sites liées directement ne sont pas incluses), et entre ceux-ci et ceux de l'eau. Les paramètres des interactions entre les sites hydrocarbures sont ajustés pour qu'à la fois la densité et la pression obtenues par simulation GG, soient en accord avec celles de l'expérience. Les paramètres des interactions entre les sites hydrocarbures et ceux de l'eau sont ajustés de façon à reproduire la séparation de phases entre les deux composants.

$$V(r_{ij}) = \frac{15}{4} \epsilon_{\alpha\beta} \left\{ \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^9 - \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^6 \right\} \quad \text{Eq IV-2}$$

### 4.2.3 Le modèle du phospholipide

Dans le modèle GG de MLK, le lipide DMPC est modélisé par 13 sites d'interaction (Figure IV-2). Les sites CH, PH et GL sont utilisés pour remplacer respectivement le groupe de choline, phosphate et le squelette de glycérol. Les deux sites E1 et E2 sont utilisés pour représenter le groupe d'ester et les deux chaînes aliphatiques palmitoyl sont représentées de la même manière que pour les alcanes (SM et ST).

Les déformations géométriques des chaînes aliphatiques sont décrites par les potentiels développés pour les alcanes, sauf un potentiel angulaire quadratique qui a été introduit pour éviter le problème qui peut être reproduit dans la simulation de DM quand les chaînes aliphatiques deviennent rectilignes. Les particules CH et PH ont des charges positive et négative, respectivement, pour modéliser les propriétés électrostatiques de leurs groupes. Notons que la constante diélectrique de 78 a été utilisée ici pour toute interaction électrostatique.

Les interactions de vdw entre les particules CH, PH, GL et E avec W, ST et SM sont modélisées par le potentiel LJ9-6. Les constantes de ce potentiel sont paramétrées pour reproduire les distributions radiales ( $g(r)$ ) obtenues par simulations atomistiques de la bicouche lipidique. Par contre, les interactions de vdw entre les sites CH, PH, GL et E sont modélisées par des potentiels tabulés. Ces potentiels se basent principalement sur le calcul du potentiel de la force moyenne (pmf) dérivée des  $g(r)$  atomistiques. Les potentiels tabulés sont calculés entre 2 et 15 Å.

$$V_{c,\alpha\beta} = \alpha_{pmf} \left\{ -k_B T \ln(g_{\alpha,\alpha\beta}(r)) \right\} \quad \text{Eq IV-3}$$

Avec  $k_B$  La constante de Boltzmann ;  
 $T$  La température de kelvin ;  
 $\alpha_{pmf}$  Le facteur de pmf.

Une simulation de DM est effectuée en utilisant une 1<sup>ère</sup> estimation de ce potentiel pour calculer  $g(r)$  en GG. Ensuite, la différence entre les  $g(r)$  calculées par DM-GG et DM tout atome est utilisée pour corriger le potentiel tabulé d'une manière récurrente en utilisant la relation suivante :

$$\Delta V_{c;\alpha\beta}(r) = \alpha_{iter} k_B T [\ln(g_{c;\alpha\beta}(r)) - \ln(g_{a;\alpha\beta}(r))] \quad \text{Eq IV-4}$$

Avec  $\alpha_{iter} = 0.15$

On note que :

$$V(r_{ij}) = \frac{15}{4} \varepsilon_{\alpha\beta} \left\{ \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^6 - \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^4 \right\} \quad \text{Eq IV-5}$$

sites	types	$\sigma$ (Å)	$\varepsilon$ (k)
W-W	LJ6-4	4.58	212.1
SM-SM	LJ9-6	4.40	123.0
SM-ST	LJ9-6	4.40	188.4
ST-ST	LJ9-6	4.40	288.6
SM-W	LJ9-6	4.49	130.57
ST-W	LJ9-6	4.49	200

#### **4.2.4 Applications**

Parmi les applications importantes de ce modèle et ses extensions successives, on note l'étude :

- De l'auto assemblage de bicouche lipidique [14] et de phase hexagonale inversée [13] à partir d'une configuration aléatoire de lipides DMPC et DHPC, respectivement ;
- Du processus d'insertion d'un nanotube peptidique dans une membrane DMPC [215], et la perturbation induite dans une bicouche lipidique [216] ;
- De l'auto assemblage de surfactants non ioniques alkyl poly (oxyde d'éthylène) à l'interface liquide/solide [217] ;
- De l'auto assemblage de copolymères amphiphiles sous forme d'une membrane avec la présence d'une protéine membranaire modélisée par un cylindre creux [218] ;
- De l'activité antimicrobienne d'une molécule synthétique qui s'inspire d'un antimicrobien naturel [209] ;
- De la formation du nanotube à travers l'auto assemblage des molécules amphipathiques (hexa-peri-hexabenzocoronene) dans une solution aqueuse [219].

### **IV-3 Le modèle de Marink, S. J. (MSJ)**

C'est le 2<sup>ème</sup> modèle utilisant l'approche GG [16] pour les lipides.

### 4.3.1 Les sites d'interactions

Dans le modèle MSJ, quatre atomes lourds avec leurs atomes d'hydrogène sont représentés par un seul site d'interaction. Cette manière de passage de la représentation de tout atome à GG n'est pas stricte. Certaines fois, un groupe de trois, cinq ou plus atomes lourds est décrit par une seule particule. Ces dernières sont classifiées en quatre sites principaux : polaire (P), apolaire (C), non polaire (N) et chargé (Q).

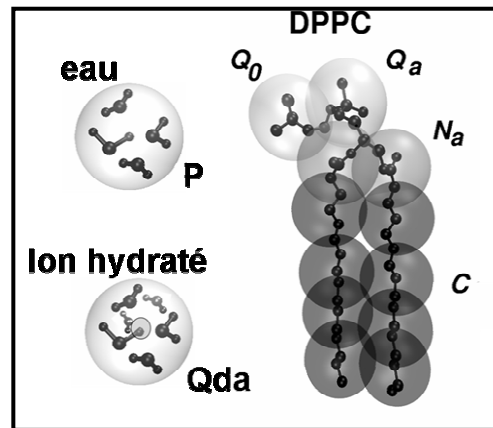


Figure IV-3 : Représentation à l'échelle de gros grains (MSJ) pour le modèle d'eau, d'ions et du lipide DPPC.

Le site polaire (P), représente un groupe d'atomes neutre qui est facile à hydrater, comme éthylène glycol. Le site apolaire (C) sert à décrire un groupe d'atomes hydrophobe, comme le butane. Le site non polaire (N) est utilisé pour mimer un groupe d'atomes qui est caractérisé par une mixture de deux propriétés, polaire et apolaire, comme propanol, et le site chargé (Q) sert à représenter un groupe chargé, comme l'ammonium.

Les sites Q et N possèdent chacun des sous-types (0, a, d, ad) pour spécifier d'autres types d'interactions. La définition des sous-types se base essentiellement sur les propriétés chimiques des atomes. Le sous-type (0) indique que, le groupe n'a pas la possibilité de former des liaisons d'hydrogène. Tandis que, les sous-types (a) et (d) représentent respectivement les groupes qui sont susceptibles de former des liaisons d'hydrogène en tant qu'accepteur et donneur. Finalement, le sous-type (ad) peut être donneur et accepteur.

### 4.3.2 Les fonctions énergies potentielles

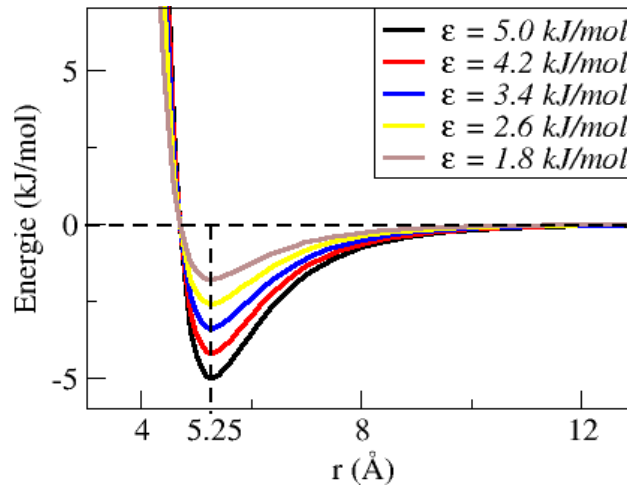
Les interactions à distance de type Van der Waals entre les sites  $i$  et  $j$  sont décrites par le potentiel classique de LJ12-6.

$$V(r_{ij}) = 4\epsilon_{\alpha\beta} \left\{ \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{ij}} \right)^6 \right\} \quad \text{Eq IV-6}$$

Les interactions entre les sites sont classées selon les niveaux dits : attractif (I  $\epsilon_{\alpha\beta} = 5$  kJ/mol), semi attractif (II  $\epsilon_{\alpha\beta} = 4.2$  kJ/mol), neutre (III  $\epsilon_{\alpha\beta} = 3.4$  kJ/mol), semi répulsif (IV  $\epsilon_{\alpha\beta} = 2.6$  kJ/mol) et répulsif (V  $\epsilon_{\alpha\beta} = 1.8$  kJ/mol). Les niveaux I et III décrivent respectivement les fortes interactions entre sites polaires comme dans la solution aqueuse, et sites non polaires comme les chaînes aliphatiques. Le niveau V décrit les interactions entre les phases polaires et non polaires. Finalement, les niveaux II et IV sont intermédiaires. La même distance effective  $\sigma_{\alpha\beta} = 0.47 \text{ nm}$  a été choisie pour toutes les interactions. Notons que l'interaction LJ entre deux sites liés directement est exclue.

group	subtype	P				N				C				Q			
		0	d	a	da	0	d	a	da	0	d	a	da	0	d	a	da
P		I	IV	III	III	II	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
N	0	IV	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
	d	III	III	II	II	II	IV	III	III	II	II	II	II	II	II	II	II
	a	III	III	II	II	II	IV	III	II	III	II	III	II	III	II	III	II
	da	II	III	II	II	I	V	III	II	II	II	II	I	II	II	II	I
C	0	V	III	IV	IV	V	III	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	d	I	III	III	III	III	V	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
	a	I	III	II	III	II	V	III	II	III	II	III	II	III	II	III	II
	da	I	III	II	II	I	V	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I

**Tableau IV-1** : Matrice d'interactions de Van der Waals entre les sites P, N, C et Q. Les niveaux d'interaction : I (attractif), II (semi attractif), III (neutre), IV (semi répulsif) ou V (répulsif).



**Figure IV-4** Le potentiel de vdw entre tous les sites GG du modèle MSJ

Les interactions électrostatiques entre des sites chargés ( $q_i$  et  $q_j$ ) sont décrites par le potentiel standard de Coulomb.

$$U_{el}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r} \quad \text{Eq IV-7}$$

Avec  $\epsilon_r$  La constante diélectrique relative considérée dans ce modèle = 20.

La charge de chaque site représente la vraie charge du groupe, sauf dans le cas des ions, où la charge est réduite de 30% pour reproduire l'effet d'hydratation des ions. En effet, un ion ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) est représenté ainsi en GG avec sa sphère d'hydratation.

Un rayon de coupure de 1.2 nm a été utilisé pour les deux types d'interactions non liées. Pour réduire la variation très brutale de la troncature des énergies d'interactions non liées au bord du rayon de coupure, les forces de LJ et électrostatiques sont modulées par la fonction *switch* respectivement vers zéro à partir de  $r_{transf} = 0.9 \text{ nm}$  et  $r_{transf} = 0.0 \text{ nm}$ .

Dans le modèle MSJ, les liaisons sont décrites par un potentiel harmonique  $V_{bond}(R)$  avec une distance d'équilibre  $R_0 = \sigma = 0.47 \text{ nm}$  et une constante de force  $K_{bond} = 1250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ .

$$V_{bond}(R) = \frac{1}{2} K_{bond} (R - R_0)^2 \quad \text{Eq IV-8}$$

---

Pour représenter et maintenir la rigidité des chaînes, un potentiel harmonique  $V_{angle}(\theta)$  caractérisé par une fonction cosinus est utilisé avec un angle d'équilibre ( $\theta_0 = 180^\circ$ ) et une constante de force ( $k_{angle} = 25 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$ ).

$$V_{angle}(R) = \frac{1}{2} K_{angle} (\cos(\theta) - \cos(\theta_0))^2 \quad \text{Eq IV-9}$$

Les paramètres de ce potentiel reproduisent les propriétés des angles des chaînes aliphatiques. Par contre, pour les autres angles (non chaînes aliphatiques), la comparaison avec le modèle atomistique est nécessaire pour optimiser les paramètres du système étudié.

### **4.3.3 Le modèle d'eau/d'alcane**

Les propriétés d'une solution aqueuse dans des conditions thermodynamiques normales (T, 300 K et P, 1 bar), peuvent être reproduites dans le modèle GG en remplaçant quatre molécules d'eau par un seul site d'interaction (W). Les interactions entre ces particules sont décrites uniquement par le potentiel de *LJ12-6*. Les paramètres de ce potentiel sont déterminés pour que les propriétés de la solution aqueuse en GG comme la densité ( $0.99 \text{ g.cm}^{-3}$ ), le coefficient de diffusion ( $2. \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ), la compressibilité ( $6 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ ) et la température de fusion ( $290 \pm 5 \text{ K}$ ) soient en accord avec l'expérience

Pour les alcanes, quatre atomes de carbone avec leurs atomes d'hydrogène sont représentés en GG par un seul site d'interaction (C). Il n'y a pas la différence entre les deux groupes méthyles et méthylènes. D'ailleurs, les trois atomes de carbones peuvent être représentés par un seul site pour mimer certaines chaînes hydrocarbures comme le décane. Les interactions de type vdw entre les particules C sont décrites par le potentiel *LJ12-6* avec des constantes optimisées pour reproduire les propriétés physiques des alcanes, comme la densité, la compressibilité et le coefficient de diffusion. De plus, Les interactions entre les sites C et W sont optimisées pour générer correctement la solubilité mutuelle de l'un dans l'autre à 0.5 kT.

Les liaisons entre les sites C sont modélisées par les deux potentiels harmoniques [Eq. IV-9 et IV-10]. Les constantes de ces potentiels sont déterminées en reproduisant la simulation atomistique des chaînes hydrocarbures. Les liaisons insaturées sont introduites en remplaçant l'angle d'équilibre de  $180^\circ$  par  $120^\circ$ , et la constante de force de  $25 \text{ par } 35 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$ . L'angle qui se trouve au milieu du segment linéaire formé par trois sites C est paramétré de la même manière qu'une liaison insaturée. En ce qui concerne les ions, pour les concentrations variant de  $0.1-1.0 \text{ M}$ , la fonction de distribution de paire de NaCl peut être reproduite en remplaçant les  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  par des particules de site Q avec la charge réduite de  $\pm 0.7e$  et le sous-type da. (Tableau IV-1).

### **4.3.4 Le modèle phospholipidique**

Le phospholipide DPPC est modélisé en GG par douze sites d'interactions (voir Figure IV-3). Les deux chaînes aliphatiques (palmitoyl) sont représentées de la même manière que les alcanes, le groupe ester, y compris le squelette glycérol, est décrit par deux particules non polaire de type Na, le groupe choline et phosphate sont modélisés respectivement par la particule  $Q_0$  avec une charge positive, et  $Q_a$  avec une charge négative.

---

D'autres phospholipides peuvent être aussi modélisés : La longueur des chaînes aliphatiques peut être ajustée en rajoutant ou en enlevant un site apolaire. Par exemple, le lauroyl est représenté par trois sites de C, les miristoyl et palmiloyl par quatre sites et le stearoyl par cinq sites. Les doubles liaisons sont paramétrées de la même manière que les alcènes. Les têtes polaires PE et PG ont les mêmes sites que les PC, sauf que les sites représentant les groupes éthanamine et glycérol sont représentés respectivement par le site Qda avec une charge positive, et le site P.

Plusieurs propriétés membranaires ont été testées pour ce modèle GG :

- *Les propriétés structurelles*, notamment la surface par lipide, la densité électronique, La pénétration des molécules d'eau dans la membrane, l'épaisseur de la membrane et le paramètre d'ordre des chaînes aliphatiques ;
- *Les propriétés élastiques*, comme la compressibilité et la tension de ligne de la membrane ;
- *Les propriétés dynamiques*, particulièrement, le taux de l'agrégation et la diffusion latérale des lipides, le coefficient de perméabilité des molécules d'eau à travers la membrane.

Ce modèle lipidique GG permet d'étudier les phases non lamellaires comme les phases hexagonale et micellaire.

### **4.3.5 Applications**

Parmi les phénomènes importants, pour lesquels le modèle MSJ a été appliqué, il y a l'étude :

- De l'auto assemblage des lipides dans les phases lamellaire, micellaire et hexagonale inversé [16] ;
- De la transformation d'une bicouche lipidique DPPC entre les deux phases liquide/gel [220] ;
- De la transition de phase et de la formation d'une bicouche lipidique mixte DLPC/DSPC [221] ;
- De la transition complète d'un système multi lamellaire pur DOPC ou de mélange DOPC/DOPE vers la phase hexagonale inversé [210] ;
- De l'auto-assemblage de nanotubes de carbone avec des lipides (DPPC) [222] et plusieurs détergents (DHPC et LDC) [222, 223], ainsi que l'insertion de ces nanotubes dans une bicouche lipidique de DPPC [224]

### **4.3.6 Construction d'une molécule dans le modèle MSJ**

Les étapes principales pour paramétrer des molécules dans le modèle GG sont classées à l'ordre suivant :

- *La représentation des molécules à l'échelle GG* : cette étape consiste à diviser la molécule sous forme des petits blocs chimiques qui sont formellement représentés par quatre atomes lourds avec leurs atomes d'hydrogène ;

- 
- Définir les paramètres des potentiels des liaisons : pour la majorité des molécules, l'utilisation de la distance d'équilibre  $r_0 = 0.47 \text{ nm}$  et la constante de force  $K_{\text{liaison}} = 1250 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  sont raisonnables et satisfaisantes, c'est-à-dire en accord avec la simulation atomistique. Mais, l'utilisation d'autres valeurs pour mieux représenter telles propriétés est toujours admissible ;
  - Optimisation : les procédures pour paramétrer les sites d'interactions de GG ne sont pas standards et uniques. Pour cela, il est vivement conseillé de prendre les deux techniques : la simulation atomistique et l'expérience autant que des références pour faire la meilleure optimisation de la qualité du modèle GG.

### **4.3.7 Limitations du modèle MSJ**

L'application du modèle GG reste potentiellement très large, surtout en considérant la diversité et les transitions des phases des phénomènes. Pour cette raison, il y a des limites nécessaires à tenir en compte au cours de la simulation, principalement :

- Tant que le modèle est paramétré dans la phase liquide, les propriétés dans la phase solide ne seront pas alors exactes. Par exemple, les propriétés thermodynamiques des interfaces solide/liquide et liquide/gaz ;
- Le paramétrage du modèle GG se base sur les énergies libres. La perte de l'entropie associée au modèle GG est nécessairement compensée par la réduction de l'enthalpie. Par conséquent, la dépendance de la température est affectée, notamment, la température qui correspond à l'énergie libre d'hydratation pour les chaînes linéaires des alcanes en GG est plus grande que celle obtenue en tout atome ;
- L'intensité de l'interaction entre substances dans un solvant non polarisable est sous-estimée à cause de la représentation implicite des fonctions chimiques dans le modèle GG. Par exemple, la formation de complexe chargé/polaire dans un environnement non polaire est susceptible d'être affectée ;
- La négligence de l'interaction électrostatique à longue portée peut provoquer un autre problème pour le modèle GG.

## **IV-4 La version MARTINI 2 du modèle MSJ**

En 2007, Marrink *et al.* ont proposé une nouvelle version du champ de force GG dans laquelle ils ont résolu beaucoup des problèmes de la 1<sup>ère</sup> version en introduisant d'autres types d'interactions et d'autres niveaux d'énergie, en analysant aussi la partition d'énergie libre de plusieurs composés chimiques, sans compromettre la vitesse et la simplicité du champ de force par rapport à l'ancienne version. En outre, ils ont proposé un protocole pour modéliser des structures cycliques. Cette version de champ de force GG s'appelle MARTINI 2.

Dans cette version, ils ont gardé toujours 4 types d'interactions (P, N, Q et C). Mais ils ont créé d'autres sous types particulièrement pour les types P et C. Ces nouveaux sous types (1, 2, 3, 4 et 5) traduisent le degré de polarité des groupes représentés par les sites GG P et C (de 1 : faible polarité à 5 : forte polarité). Ainsi, le nombre total de sites (tenant compte les sous types) est devenu 18 sites d'interactions plutôt que 10 dans la première version.



Pour les interactions non liées chimiquement, ils ont gardé généralement les mêmes potentiels [Eqs. IV-7 et IV-8] avec leurs constantes d'énergie, sauf quelques exceptions :

- Pour décrire l'interaction entre les sites chargés (Q) et apolaires (C1 et C2), ils ont introduit une autre valeur de la constante  $\sigma = 0.62 \text{ nm}$  du potentiel LJ afin de modéliser l'effet du nuage d'hydratation des particules chargées lorsqu'elles pénètrent un milieu apolaire ;
- Ils ont proposé dix niveaux d'énergie dans la nouvelle version de GG (Tableau IV-2) au lieu de 5 niveaux dans la première version afin de rendre le modèle GG plus rigoureux et précis pour la reproduction des solubilités expérimentales ;
- La constante diélectrique relative a été réduite à 15 dans le nouveau champ de force afin d'augmenter l'hydratation de certaines types de particules GG.

sub	Q					P					N				C				
	da	d	a	0	5	4	3	2	1	da	d	a	0	5	4	3	2	1	
Q	da	O	O	O	II	O	O	O	I	I	I	I	I	IV	V	VI	VII	IX	IX
	d	O	I	O	II	O	O	O	I	I	I	III	I	IV	V	VI	VII	IX	IX
	a	O	O	I	II	O	O	O	I	I	I	I	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
P	0	II	II	II	IV	I	O	I	II	III	III	III	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
	5	O	O	O	I	O	O	O	O	I	I	I	I	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	4	O	O	O	O	O	I	I	II	II	III	III	III	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	3	O	O	O	I	O	I	I	II	II	II	II	II	IV	IV	V	V	VI	VII
	2	I	I	I	II	O	II	II	II	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VII
N	1	I	I	I	III	O	II	II	II	II	II	II	II	IV	IV	IV	V	VI	VI
	da	I	I	I	III	I	III	II	II	II	II	II	II	IV	IV	V	VI	VI	VI
	d	I	III	I	III	I	III	II	II	II	II	II	II	IV	IV	V	VI	VI	VI
C	a	I	I	III	III	I	III	II	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VI	VI
	0	IV	IV	IV	IV	IV	IV	III	III	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	V	VI	VI
	5	V	V	V	V	V	V	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	V	V
	4	VI	VI	VI	VI	VI	VI	V	IV	IV	V	V	V	IV	IV	IV	IV	V	V
	3	VII	VII	VII	VII	VI	VI	V	V	IV	VI	VI	VI	IV	IV	IV	IV	IV	IV
1	2	IX	IX	IX	IX	VII	VII	VI	VI	V	VI	VI	V	V	V	IV	IV	IV	IV
	1	IX	IX	IX	IX	VIII	VIII	VII	VII	VI	VI	VI	VI	V	V	IV	IV	IV	IV

**Tableau IV-2 :** La matrice d'interactions de vdw entre les sites P, N, C et Q. Les niveaux d'interaction : O ( $\epsilon = 5.6 \text{ kJ/mol}$ ), I ( $\epsilon = 5.0 \text{ kJ/mol}$ ), II ( $\epsilon = 4.5 \text{ kJ/mol}$ ), III ( $\epsilon = 4.0 \text{ kJ/mol}$ ), IV ( $\epsilon = 3.5 \text{ kJ/mol}$ ), V ( $\epsilon = 3.1 \text{ kJ/mol}$ ), VI ( $\epsilon = 2.7 \text{ kJ/mol}$ ), VII ( $\epsilon = 2.3 \text{ kJ/mol}$ ), VIII ( $\epsilon = 2.0 \text{ kJ/mol}$ ) ou IX ( $\epsilon = 2.0 \text{ kJ/mol}$ ). Les deux sites P et C ayant également les sous types qui signifient le degré de la polarité des groupes : de 1 : faible polarité à 5 : forte polarité.

Pour les sites liés chimiquement, ils ont gardé les mêmes potentiels d'interaction que ceux de la première version, sauf la constante de force du potentiel angulaire pour la double liaison qui a été augmentée de 35 à 45  $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$ . Cette augmentation tend à reproduire une meilleure distribution des liaisons insaturées dans le modèle GG.

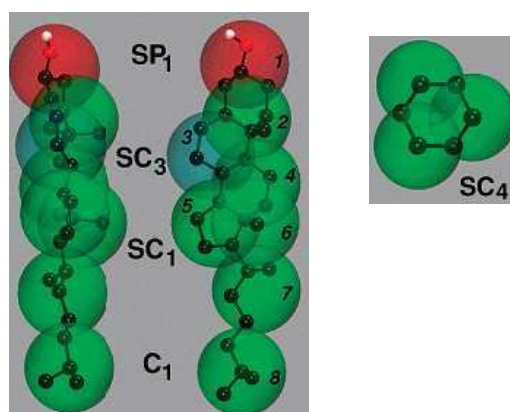
Les particules d'eau (W) sont combinées avec un pourcentage de 10 % à des nouveaux sites anti-nucléation BP4, afin d'éviter le problème de nucléation cristalline aléatoire qui survenait dans certains simulations de solutions aqueuses. Les constantes  $\sigma = 0.57 \text{ nm}$  et  $\epsilon_{ij} = 5.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$  qui décrivent les interactions entre les sites BP4 et W ont été choisies afin de perturber l'agrégat des particules de solvants et d'éviter la séparation de phase entre les particules. L'intensité de l'interaction entre les sites BP4 et d'autres sites GG, et entre elles-mêmes, reste la même que celle des particules d'eau W.

Finalement, les ions sont modélisés dans cette version avec leurs charges totales au lieu de charges réduites, et leurs interactions entre eux sont modélisées par le niveau d'énergie O afin de renforcer la force d'hydratation.

La nouvelle version permet la modélisation de structures cycliques, comme le cyclohexane, le benzène ou le groupe stérol. Ceci est basé essentiellement sur l'introduction du site S qui se caractérise par des paramètres spécifiques permettant de reproduire la densité de la phase liquide des molécules cycliques sans provoquer de nucléation (*cf.* [17] pour plus de détails).

Le cyclohexane est représenté par trois sites SC1 dans une conformation triangulaire. La distance d'équilibre entre deux sites SC<sub>1</sub> vaut 0.3 nm et est maintenu par la constante de force de 5000 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-2</sup>. Le benzène est modélisé de la même manière que le cyclohexane, sauf la distance d'équilibre et le degré de polarité des sites qui sont légèrement modifiés en utilisant les sites SC<sub>4</sub> avec la distance de 0.27 nm, afin d'imiter la contrainte et l'effet de la double liaison.

Ainsi, la molécule de cholestérol est modélisée par huit sites d'interaction (Figure IV-5) dont six représentent le groupe stérol, et deux pour la queue terminale. La représentation du cholestérol exige l'utilisation de paramètres spécifiques pour les potentiels de liaisons, d'angles et d'impropres, afin de maintenir la rigidité du groupement stérol [17]. Les nouveaux modèles (le cyclohexane, le benzène et le cholestérol) ont été testés et examinés afin de reproduire leurs solubilités dans l'eau et leurs densités.



**Figure IV-5 :** Représentation de benzène (droite) et du cholestérol (gauche) dans le modèle de MSJ.

La version MARTINI 2 permet de reproduire plusieurs paramètres dont :

- L'énergie libre de vaporisation, d'hydratation et de partition entre l'eau et un nombre de phases organiques (hexadécane, chloroforme, éther et octanol) ;
- La distribution de la pression auprès de la surface des têtes polaires en augmentant l'hydratation du groupe de phosphate afin d'améliorer la propriété de la surface courbée en fonction de la nature de lipides ;
- Les tensions inter faciales des systèmes eau/vapeur, alcane/vapeur et eau/alcane ;
- L'énergie libre de la désorption et flip-flop des lipides.

Il faut bien noter aussi qu'il existe encore des modèles GG pour les lipides. La plupart de ces modèles sont assez similaires au modèle de MLK, par exemple :

- Dans le modèle de Graig Voth, et ses collègues nommé « multiscale coarse graining » MS-CG [225-227], une molécule d'eau est représentée par un seul site d'interaction (W) et les lipides ont la même représentation que celle qui utilisé dans le modèle de MLK. Les paramètres de champ de forces intramoléculaires (liaisons et angles) et intermoléculaires sont dérivés respectivement par la linéaire des moindres carrés de la force équivalence (least-square linear of force-matching) et par la minimisation directe de la force équivalence [228].

- Le modèle de Juan Elezgaray [229] est très similaire à celui de MKL [13, 14]. Il se différencie surtout par l'utilisation de la méthode Reverse Monte-Carlo (RMC) pour paramétrer les interactions de vdw.
- Dans le modèles d'Orsi [230], trois molécules d'eau sont représentées par un seul site avec le modèle dipolaire de type « sticky soft », les sites représentant les chaînes aliphatiques, le squelette de glycérol et le groupe ester sont modélisés par un potentiel anisotropique Gay-Berne. Les forces électrostatiques de terme charge-charge, charge-dipôle et dipôle-dipôle sont donc tenu en compte dans ce modèle, sachant que ces termes électrostatiques sont très importants dans plusieurs processus cellulaires. Note que dans ce modèle les forces intramoléculaires contiennent uniquement les liaisons.

## **IV-5 Le modèle GG pour les protéines**

Les modèles des protéines fréquemment utilisés jusqu'à maintenant en conjonction avec les membranes lipidiques sont des extensions du champ de force MSJ pour lipides [16, 17]. Chaque site d'interaction (P, N, Q et C) dans le modèle de protéines représente quatre atomes lourds avec leurs atomes d'hydrogène, et les fonctions d'énergie potentielle sont toujours les mêmes que celles des lipides à l'exception d'un potentiel de dièdre propre qui a été introduit pour reproduire et/ou maintenir la structure secondaire des hélices- $\alpha$ .

### **6.5.1 Modèle de Sansom**

Dans le modèle de Sansom *et al.* les sites du squelette des acides aminés sont représentés par le type N et le nombre de sites représentant les chaînes latérales varie entre zéro et deux [20].

Les petites (Ala, Ile, Leu, Pro, Val) et grandes (Phe) chaînes latérales hydrophobes sont représentées respectivement par un et deux sites apolaires de type C. Les chaînes latérales caractérisant par le groupement thiol (Cys et Met) sont représentées par une particule de type N0. Les chaînes latérales contenant la fonction hydroxyle (Ser et Thr) et amide (Asn et Gln) sont modélisées respectivement par une particule de type P et Nda. Les chaînes latérales ayant une partie cyclique comme Tyr, His et Trp sont modélisées respectivement par deux sphères de type C et Nd, C et Nda, et C et Nd. Finalement, les chaînes latérales portant une charge négative (Asp et Glu) ou positive (Arg et Lys) sont représentées respectivement par une ou deux particules de type Qa, ou C avec Qd.

Les liaisons sont décrites par un potentiel harmonique (Eq. IV-9) avec une constante de force  $k_{\text{bond}} = 1250 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  et une distance d'équilibre  $R_0 = \sigma = 0.38 \text{ nm}$ , et les angles sont modélisés par la fonction cosinus (Eq IV-10) avec une constante de force de  $k_{\text{angle}} = 25 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$  pour une structure aléatoire et  $k_{\text{angle}} = 25 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$  pour une structure secondaire, avec un angle d'équilibre de  $90^\circ$  pour les hélices- $\alpha$  et  $130^\circ$  pour les feuillettes- $\beta$ .

Finalement, pour mimer la structure secondaire d'une hélice- $\alpha$ , une contrainte sous forme d'un potentiel harmonique (avec une constante de force  $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  et une distance entre 0.45-0.65 nm) a été introduite pour maintenir la distance entre les sites du squelette I et I+4.

Le modèle de Sansom a été utilisé pour étudier l'assemblage d'une protéine membranaire avec des détergents micellaires et des lipides membranaires [20], l'auto assemblage des peptides WALPs et LS3 dans une bicouche lipidique de DPPC [21] et la stabilité de domaine transmembranaire du canal ionique dans une membrane lipidique [211].

### **6.5.2 Modèle de Schulten**

Dans le modèle de Schulten *et al.* tous les acides aminés sont représentés par deux sites d'interactions : une site de type Nda pour tous les sites du squelette et une site de type variable pour tous les chaînes latérales (Tableau IV-3) [19], sauf la Glycine qui est représentée seulement par le site du squelette.

Résidu	Type de chaîne latérale	Distance d'équilibre (Å)
Ala	C	2.0
Arg	Qd	4.1
Asn	Nda	2.8
Asp	Qa	3.0
Cys	P	2.7
Gln	Nda	4.0
Glu	Qa	4.0
Gly	none	N/A
His	P	4.7
Leu	C	3.5
Lys	Qd	4.2
Met	C	3.8
Phe	C	4.1
Pro	C	2.5
Ser	P	2.5
Thr	P	2.7
Trp	C	4.5
Tyr	Nda	4.6
Val	C	2.7

**Tableau IV-3** Particules des chaînes latérales des acides aminés et distances entre les sites du squelette et la chaîne latérale dans le modèle de Schulten pour les protéines.

Les liaisons sont décrites par le même potentiel de l'équation IV-9 ( $\delta_L = 130^\circ$ ) avec des distances d'équilibres qui varient d'un acide aminé à l'autre en fonction du type de chaîne latérale (Tableau IV-3). Mais, pour représenter les angles, un potentiel harmonique a été utilisé (Eq IV-11) avec une constante de force et un angle d'équilibre  $K_K^{protein} = 12.5 kJ.mol^{-1}.rad^{-2}$  de  $92^\circ$  pour le squelette et  $134^\circ$  pour les chaînes latérales. Finalement un potentiel de dièdre propre (Eq IV-12) a été introduit pour reproduire la structure secondaire des hélices- $\alpha$  avec une constante de  $\phi_L = 1.21 kJ/mol$  force, une multiplicité  $n = 1$ , et un déphasage  $\delta_L = 180^\circ$  pour tous les dièdres du squelette non-proline, et pour ceux qui comprennent la proline.

$$V_{\text{angle}}^{protein} = \sum_K K_K^{protein} (\theta_K - \theta_K^{protein})^2 \quad \text{Eq IV-10}$$

$$V_{\text{dihedral}} = \sum_K \phi_L (1 + \cos(n\chi_L - \delta_L)) \quad \text{Eq IV-11}$$

Le modèle de Schulten a été fait principalement pour reproduire l'assemblage des particules de lipoprotéines [18, 19]

### **6.5.3 Modèle de Marrink (MARTINI)**

Marrink *et al.* ont proposé d'abord un modèle MARTINI I pour les protéines [212, 214], qui se base principalement sur le champ de force GG des lipides [16]. Dans ce modèle, les sites du squelette sont représentés par une particule de type N0, les chaînes latérales sont modélisées avec un nombre et un type variable en fonction de la propriété de la chaîne latérale (Tableau IV-4), sauf Gly et Ala qui sont représentées seulement par le site du squelette.

Résidu	Type de particule	Distance ( $10^{-1}$ nm) et angle d'équilibre (deg)	Constantes de force $K_{\text{bond}}$ ( $10^3$ kJ/mol/nm <sup>2</sup> ) et $K_{\text{angle}}$ ( $10^3$ kJ/mol/rad <sup>2</sup> )
Leu	C	2.6	12.5
Ile	C	2.3	5.0
Val	C	1.5	12.5
Pro	C	1.8	12.5
Met	N0	4.1	1.25
Cys	N0	2.8	12.5
Thr	Nda	1.8	12.5
Ser	Nda	1.5	12.5
Gln	P	3.4	5.0
Asn	P	2.6	12.5
His	Qda	3.4	5.0
Lys	Qd	4.0	1.25
Asp	Qa	2.6	12.5
Glu	Qa	3.8	5
Arg	Nd-Qda	3.0-2.5 et 180	1.25-5.0 et 0.025
Phe	N0-N0-N0	3.3-3.3-4.5-1.5-1.5-1.5 et 30-30	6*12.5 et 2*1.25
Trp	Nd-C-C	3.4-5.65-2.9-2.9-1.5 et 127-97	5*12.5 et 2*0.25
Tyr	Nda-N0-N0	3.5-3.5-5.5-1.5-2.2-2.2 20-20	6*12.5 et 2*1.25

**Tableau IV-4** Chaînes latérales des acides aminés avec leurs distances, leurs angles d'équilibre et leurs constantes de force correspondantes.

Les fonctions énergies potentielles sont les mêmes que celles de MARTINI I pour les lipides avec des paramètres qui sont cités dans le Tableau IV-4. Le modèle MARTINI I des protéines a été utilisé pour étudier l'auto assemblage d'un récepteur couplé à la protéine G [212], les mouvements d'un canal de potassium sensible à la tension [214] l'effet de mutations (V21D) sur le mécanisme et le seuil de l'ouverture du canal bactérien mécano-sensible Tb-MscL [213].

Notons que Marrink *et al.* ont proposé en 2008 une nouvelle version de ce modèle GG pour les protéines [22] qui s'inspire la même philosophie du champ de force des acides aminés MARTINI I, mais se basant sur le modèle GG des lipides MARTINI 2 pour définir les types de sites et les paramètres des fonctions potentielles.

Les sites du squelette sont représentés comme une particule de type variable en fonction de la structure présentée (Tableau IV-4), et les chaînes latérales sont définies avec un nombre et un type variable en fonction de la propriété de la chaîne latérale (Tableau IV-5).

Les paramètres et constantes des fonctions énergies potentielles sont les même que celles de MARTINI 2 [17], avec une introduction d'un potentiel de dièdre propre comme celui du modèle de Schulten (Eq IV-12) pour maintenir la structure secondaire des hélices- $\alpha$ . Les paramètres et constantes de ces fonctions potentielles pour les squelettes et les chaînes latérales sont définis respectivement dans les Tableaux IV-5, IV-6, et IV-7. Par contre, les paramètres des interactions de vdw et électrostatiques pour tous les types des sites d'interaction sont identiques à celles définies dans le réf [17]. Pour plus des détails, voir [22].

Dans cette version, ils ont calculé le potentiel de force moyenne pour chaque acide aminé correspondant à son transfert du centre d'une bicouche DOPC vers le milieu aqueux. Ils ont étudié la partition d'une série de peptides (KALP, modèle penta peptides et poly-alanine-Leucine) dans une bicouche lipidique, ainsi que la partition et l'orientation des peptides WALP23 dans une membrane, ils ont reproduit aussi la formation du pore transmembranaire par le peptide antimicrobien maganine.

Ce modèle est déjà utilisé pour étudier la structure de lipoprotéine à haute densité [231].

	coil		helix	$\beta$ -strand
backbone	bend free	helix	(N-terminus/C-terminus)	turn
backbone	P5	N0	Nd/Na	Nda
Gly	P5	N0	Nd/Na	Nda
Ala	P4	C5	N0	N0
Pro	Na	C5	N0/Na	N0

**Tableau IV-5** Sites d'interactions du squelette en fonction des structures présentées.

backbone	$d_{BB}$ (nm)	$K_{BB}$		$K_{BBB}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\psi_{BBBB}$ (deg)	$K_{BBBB}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
		(kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\theta_{BBB}$ (deg)			
helix	0.35	1250	96 <sup>a</sup>	700	60	400
coil	0.35	200	127	25		
extended	0.35	1250	134	25	180	10
turn	0.35	500	100	25		
bend	0.35	400	130	25		

**Tableau IV-6** Paramètres des fonctions potentielles et géométriques pour les sites du squelette.  $d_{BB}$  : distance d'équilibre et  $K_{BB}$  : constante de force correspondante.  $\theta_{BBB}$  : l'angle d'équilibre et  $K_{BBB}$  : constante de force correspondante.  $\psi_{BBBB}$  : angle de dièdre et  $K_{BBBB}$  : constante de force correspondante.

side chain	$d$ (nm)	$K$ (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
Leu	0.33	7500
Ile	0.31	constraint
Val	0.265	constraint
Pro	0.30	7500
Met	0.40	2500
Cys	0.31	7500
Ser	0.25	7500
Thr	0.26	constraint
Asn	0.32	5000
Gln	0.4	5000
Asp	0.32	7500
Glu	0.4	5000
Arg $d_{BS}$	0.33	5000
Arg $d_{SS}$	0.34	5000
Lys $d_{BS}$	0.33	5000
Lys $d_{SS}$	0.28	5000
His $d_{BS}$	0.32	7500
His $d_{SS}$	0.27	constraint
Phe $d_{BS}$	0.31	7500
Phe $d_{SS}$	0.27	constraint
Tyr $d_{BS}$	0.32	5000
Tyr $d_{SS}$	0.27	constraint
Trp $d_{BS}$	0.3	5000
Trp $d_{SS}$	0.27	constraint
Cys-Cys $d_{S-S}$	0.39	5000

**Tableau IV-7** Paramètres des potentiels harmoniques des liaisons pour les acides aminés.

side chain	CG representation
Leu	C1 <sup>P</sup>
Ile	C1 <sup>P</sup>
Val	C2 <sup>P</sup>
Pro	C2 <sup>P</sup>
Met	C5
Cys	C5
Ser	P1
Thr	P1
Asn	P5
Gln	P4
Asp	Qa
Asp (uncharged)	P3
Glu	Qa
Glu (uncharged)	P1
Arg	N0-Qd
Arg (uncharged)	N0-P4
Lys	C3-Qd
Lys (uncharged)	C3-P1
His	SC4-SP1-SP1
Phe	SC4-SC4-SC4
Tyr	SC4-SC4-SP1
Trp	SC4-SP1-SC4-SC4

**Tableau IV-8** Sites d'interactions des chaînes latérales pour chaque acide aminé

side chain	$\theta$ (deg)	$K$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
$\theta_{BBS}$ (all)	100	25
$\theta_{BBS}$ (Lys, Arg)	180	25
$\theta_{BBS}$ (His, Tyr, Phe)	150	50
$\theta_{BBS}$ (Trp)	90, 210	50, 50
side chain	$\psi$ (deg)	$K$ (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
$\psi_{BSSS}$ (His, Tyr, Phe)	0	50
$\psi_{BSSS}$ (Trp)	0, 0	50, 200

**Tableau IV-9** Paramètres des potentiels harmoniques des angles pour les acides aminés.

---

Notons qu'aucun modèle proposé à ce jour ne permet une modélisation du repliement de structures secondaires. Dans la modélisation de protéines et de peptides, celles-ci sont imposées par différents jeux de contraintes. Par ailleurs dans aucun modèle, les interactions entre acides aminés n'ont été testées ou optimisées.

Il faut noter aussi qu'il existe d'autres modèles de GG qui sont optimisés uniquement pour reproduire les interactions entre peptides et les sites d'eau. Dans ces modèles les sites du squelette des peptides sont représentés explicitement afin d'assurer le repliement des peptides dans la solution aqueuses. Parmi ces modèles, il y a :

- Le modèle de Graig Voth, et ses collègues (multiscale coarse graining) [232] dans lequel chaque acide aminé est représenté dans le squelette par trois sites OBB, NBB et CBB modélisant respectivement les groupes carbonyles, amines et des carbones- $\alpha$  pour assurer la formation de liaisons d'hydrogène. Toutes les chaînes latérales sont représentées par un seul site d'interaction, et chaque molécule d'eau est représentée par un seul site d'interaction. Le paramétrage du champ de forces a été fait de la même manière que celle qui était appliquée par le groupe pour les lipides [228]. Les forces intramoléculaires (liaisons et angles) et intermoléculaires sont dérivées respectivement par la linéaire des moindres carrés de la force équivalence (least-square linear fit of force-matching) et par la minimisation directe la force équivalente.
- Le modèle de Han et Wu [233], dans lequel tous les atomes lourds avec leurs atomes d'hydrogène dans le squelette du peptide sont représentés explicitement, les chaînes latérales sont représentés par un nombre et des types différents en fonction de leurs composants, les molécules d'eau sont représentées par le même modèle que celui de MSJ. Le paramétrage de ce modèle suit la même philosophie que celle de modèle de MSJ.

Les limitations du modèle GG pour les peptides sont assez similaires à celles des lipides (voir la section IV-4). On cite ici notamment le problème de la modélisation correcte de la partition des composantes polaires et chargées dans un milieu à faible constante diélectrique. La formation d'un complexe polaire/chargé dans un environnement apolaire est donc affectée. Par exemple, dans la simulation atomistique certains résidus chargés restent hydratés lorsqu'ils pénètrent la membrane [234] [235], alors que, dans le modèle GG, les mêmes résidus perdent leur couche d'hydratation à 0.7 nm du centre de la membrane. Ce problème sera effectivement présent au cours de l'étude de l'insertion de peptides antimicrobiens à l'intérieur de la membrane [138, 139] et la reproduction du phénomène telle que de l'électroporation [236]. On note aussi que la négligence de l'interaction électrostatique à longue distance (au delà de 1.2 nm) peut engendrer aussi des problèmes pour le modèle GG. L'ajout de la longue portée de l'interaction électrostatique au champ de force [237] [238] peut éventuellement mieux décrire les interactions entre les peptides et entre ceux-ci et les membranes. Malgré ces limitations, plusieurs simulations de DM avec le modèle GG reproduisent des pores aqueux en présence des peptides (magaine-H2) [239] ou PAMAM dendrimer [237].



---

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

Récemment, l'évolution de la résistance bactérienne à une large gamme d'agents thérapeutiques est devenue remarquable dans le secteur pharmaceutique. Ce dernier a été sensibilisé de trouver et/ou de développer des nouvelles molécules thérapeutiques capables de répondre efficacement à ces nouveaux impératifs. Dans les deux dernières décennies, les peptides antimicrobiens (PAMs) ont reçu une attention considérable par les équipes de recherche car ils sont perçus comme nouveaux agents antimicrobiens. Ces peptides sont des molécules cationiques, produits par des organismes naturels et composés d'une grande variété d'acides aminés possédant des structures différentes. Ils se caractérisent par un large spectre d'activité et une rapidité d'action (*cf.* chapitre II). Aujourd'hui, de nombreux PAMs comme les maganines et cathelicidins sont en phase de développement.

Récemment, l'équipe de Ghadiri a montré que certains cycles peptidiques (CPs) dans lesquels les acides aminés sont alternés par la chiralité L/D, forment des architectures tubulaires tridimensionnelles qui agissent préférentiellement sur les membranes bactériennes gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup> par rapport aux cellules d'eucaryotes, en augmentant sensiblement la perméabilité de la membrane, provoquant alors la mort rapide de la cellule [7]. L'équipe a montré par ailleurs que lorsqu'il s'agit des CPs hydrophobes, ils s'organisent en nanotube transmembranaire soluble dans une bicouche lipidique [5], ce qui peut servir à transporter des ions, des molécules d'eau ou encore le glucose (*cf.* chapitre I, partie des cycles peptidiques).

Les détails moléculaires des différents processus d'assemblage et d'interaction avec la membrane lipidique, que ce soit l'action antimicrobienne, la sélectivité membranaire aux CPs ou la formation de nanotubes transmembranaires sont encore mal connus.

Le but de ce travail est d'étudier l'interaction des CPs avec les membranes lipidiques par simulation de DM. En particulier, il s'agit de comprendre la relation entre les propriétés de la surface, l'activité des cycles peptiques et la sélectivité membranaire, ainsi que de poursuivre selon la nature des cycles les processus : de la formation de nanotubes transmembranaires et de la destruction de membranes procaryotes.

### **V-1 L'étude préliminaire à l'échelle atomistique**

#### **5.1.1 La membrane**

Rappelons qu'un des buts de ce travail est de produire l'action antibactérienne, d'étudier la sélectivité de la membrane procaryote par rapport à celle eucaryote, et de caractériser le processus de formation de nanotubes transmembranaires dans la membrane eucaryote. Pour cela, il est nécessaire de modéliser deux types de membranes : procaryote (représentant l'enveloppe des cellules des bactéries) et eucaryote (représentant l'enveloppe des cellules mammifères).

---

Les phospholipides à têtes polaires PE et PG sont présentes dans les membranes procaryotes avec un pourcentage de 70-80% et 20-25%, respectivement [28]. Par contre, ceux-ci sont très rares dans la membrane eucaryote (6% et 2% respectivement), pour laquelle, les lipides à têtes polaires PC sont majoritaires [30] (*cf.* Chapitre I : partie membranes).

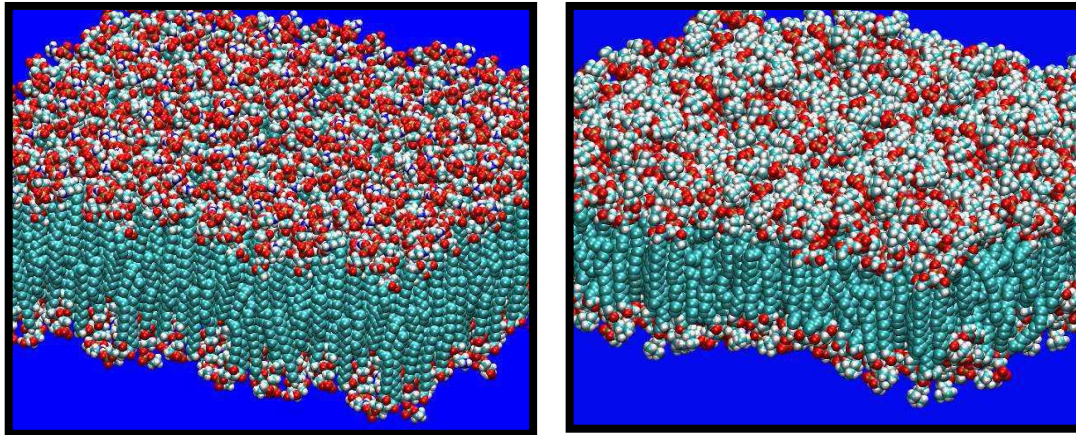
Nous avons choisi pour les deux cas des chaînes aliphatiques PalmiteoylOléoyl (PO). Pour modéliser la membrane POPC, nous avons généré une bicouche lipidique formée par 160 lipides à l'aide du logiciel *VMD* [240]. Ensuite, nous avons enlevé les atomes d'hydrogène des chaînes aliphatiques à l'aide d'un script Tcl pour passer à une représentation en atomes unifiés. Puis, nous avons solvato la membrane par des molécules d'eau.

On a effectué la simulation en utilisant le code *NAMD*. Le système est examiné dans l'ensemble *NPT* dans lequel les fluctuations de trois dimensions de la boîte de simulation sont indépendantes. Les équations de mouvement sont intégrées par l'algorithme de *r-RESRA* avec un pas d'intégrale de 1 fs pour les interactions intramoléculaires, 2 fs et 4 fs respectivement pour les forces à courte et longue portée. La dynamique de Langevin a été utilisée pour maintenir la température (300K pour POPC) et la pression (1atm) du système. Les contraintes de SHAKE ont été appliquées sur les liaisons entre les atomes d'hydrogène et les atomes lourds. Les forces électrostatiques sont évaluées par l'algorithme de *PME* avec une tolérance  $10^{-6}$  Å dans la somme en réseau direct avec un rayon de coupure de 11 Å, et une espace de grille de 80\*80\*72 points qui a été utilisé pour évaluer la sommation en réseau réciproque. On a utilisé le champ de force CHARMM atomes unifiés pour lipides, et le modèle *TIP3P* pour décrire les molécules d'eau.

Après la minimisation, nous avons effectué une DM à pression et température constante (1atm, 300K). Initialement, nous avons chauffé le système à 350K pendant les premiers 2 ns de la dynamique afin de désordonner des chaînes aliphatiques. Nous avons poursuivi la simulation à la température de 300 K pour laquelle la membrane est dans la phase fluide pendant 7.8 ns de simulation. La durée totale de cette simulation est  $\sim 10$  ns.

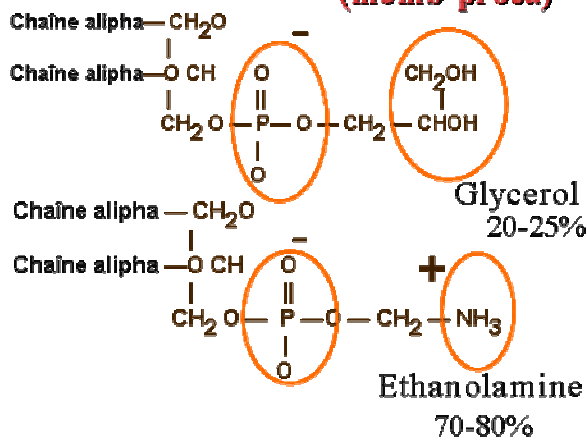
Dans le cas de la membrane procaryote, nous avons parcouru les mêmes étapes. On a formé une bicouche lipidique de 160 lipides POPE, ensuite on a remplacé aléatoirement 30 % des têtes polaires ethanolamines (50 PE) par ceux des glycerols, en neutralisant aussi la membrane par 50 d'ions  $\text{Na}^+$ . Notons que la température utilisée dans ce cas pour chauffer la membrane pendant une durée de 2 ns est de 360 K, et la température utilisée pour la phase fluide de la membrane est 310 K pour une simulation d'une durée de 5 ns.

Après avoir vérifié que la densité de deux membranes procaryote (memb-proca) et eucaryote (memb-euca) au cours de la dynamique était stable, nous avons calculé la surface moyenne occupée par lipide. Pour la bicouche POPC et le mélange de POPE et POPG, cette dernière s'élève à  $61.9 \text{ \AA}^2$  et  $59.8 \text{ \AA}^2$ , respectivement. Les valeurs de la surface par lipide obtenues pour chaque modèle sont comparables à celles obtenues par d'autres études par simulations de DM atomistiques en utilisant les paramètres *OPLS* avec la représentation unifiée de chaînes aliphatiques pour les lipides, et le modèle *TIP3P* pour l'eau ( $63.5 \text{ \AA}^2$  et  $61.5 \text{ \AA}^2$  pour la membrane POPC et POPE-POPG [40, 241] respectivement).



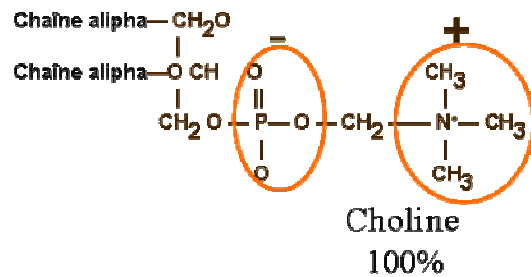
### membrane procaryote

(memb-proca)



### membrane eucaryote

(memb-euca)



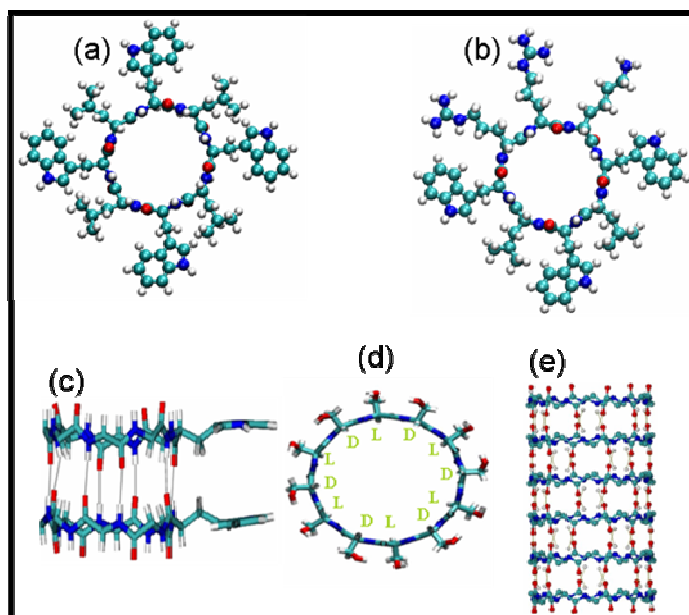
**Figure V-1** : Représentation atomistique (chaînes aliphatiques en atomes unifiés) des membranes procaryote et eucaryote. A gauche, la membrane procaryote est représentée par des lipides POPE et POPG. A droite, la membrane eucaryote est représentée seulement par des lipides POPC.

## 5.1.2 Les cycles peptidiques

Nous avons considéré le cycle peptidique [-(D-Trp-Leu)<sub>4</sub>], (CP1) formé par des acides aminés hydrophobes qui en présence des membranes lipidiques forment des nanotubes transmembranaires [5] (Figure V-2 (a)). Nous avons sélectionné aussi le cycle peptidique [-(D-Trp-L-Leu)<sub>2</sub>-D-Trp-Arg-D-Arg-Lys] (CP2) qui est très actif *in vivo* et *in vitro* contre les bactéries gram+/- et possède une plus faible activité hémolytique [7] (Figure V-2 (b)).

Nous avons généré des conformations initiales des CPs en utilisant le logiciel InsightII d'Accelrys (San Diego, CA). Nous avons construit d'abord des chaînes linéaires composées de huit résidus Glycine, en utilisant l'alternance de la chiralité L et D des α-acides aminés, et les angles (ψ, φ) [3, 66, 67] correspondants aux structures cycliques formées.

Ensuite, nous avons connecté les deux extrémités des chaînes linéaires par des liaisons peptidiques. Les CPs ont été minimisés (dans le vide) en utilisant le champ de force CHARMM (Figure V-2 (d)).

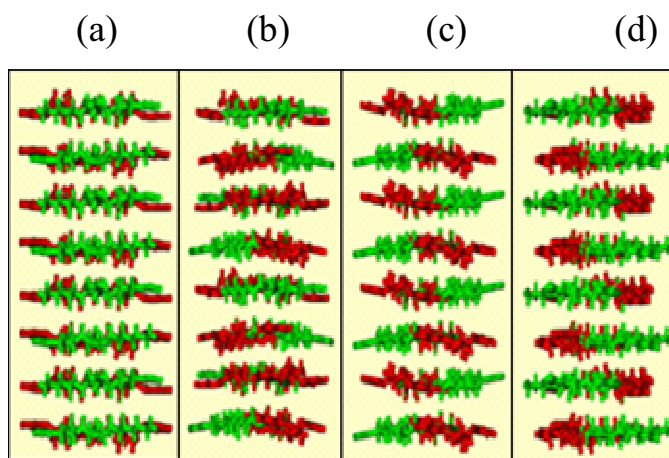


**Figure V-2** : Représentation atomistique de CP, (a)  $[-(D-Trp-Leu)_4]$ , (b)  $[-(D-Trp-Leu)_2-D-Trp-Arg-D-Arg-Lys]$ .

Enfin, nous avons substitué les résidus Glycines dans les CPs par ceux des séquences CP1s et CP2s. Nous avons également généré des configurations de nanotubes peptidiques (NTPs) composés de huit CPs, organisés en conformation anti-parallèle et séparés par une distance de 4.7 Å pour former les liaisons d'hydrogène entre les CPs (Figure V-2 (e) et (c)).

La séquence de CP1s ne permet pas de générer de nanotubes isomères malgré leurs différents arrangements dans la structure cylindrique, tandis que la séquence de CP2s admet la formation de quatre classes de topos isomères dans leurs organisations en nanotubes peptidiques (NTP) (Figure V-3). Pour ces isomères, les acides aminés chargés positivement :

1. S'interposent dans la même côté du nanotube (a) ;
2. Se présentent sous forme d'hélice dans le nanotube (b) ;
3. Se mettent d'une manière opposée dans le nanotube (c) ;
4. Se décalent l'un par rapport à l'autre dans le nanotube (d).

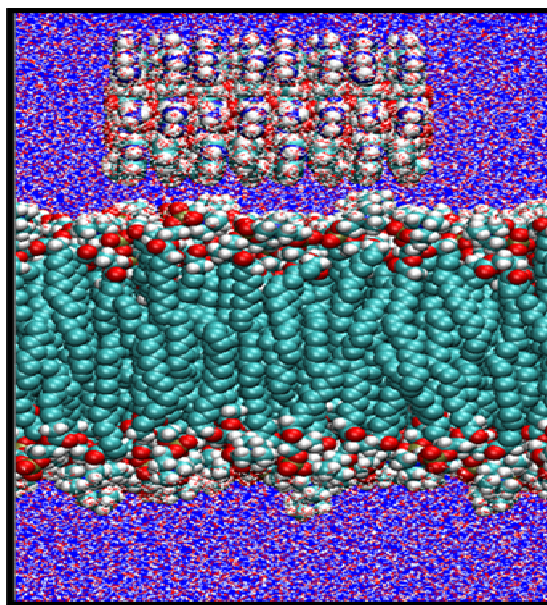


**Figure V-3** : Représentation atomistique de quatre topos isomères des nanotubes peptidiques (NTPs) chargés. Les chaînes latérales des résidus chargés et hydrophobes sont colorées respectivement en vert et en rouge.

---

## **V-2 Représentations des systèmes à l'échelle gros grains**

Tenant compte des temps de relaxation des lipides et de l'échelle du temps dans laquelle se produit un phénomène tel que l'auto assemblage des CPs et leur réorganisation sous forme d'un nanotube transmembranaire, la simulation de DM atomistique (Figure V-4) va largement au-delà des moyens actuels de calcul, qui sont limités à la taille de l'ordre de 5-10 nm et aux échelles de temps inférieure à 100 ns [12]. Par conséquent, nous avons en recours aux modèles gros grains (GG).



**Figure V-4** : Représentation atomistique d'un NTP placés au voisinage d'une membrane procaryote.

Le modèle GG consiste à regrouper plusieurs atomes, et les représenter par un seul site d'interaction pour réduire le nombre d'interaction par pair dans le système et augmenter la rapidité du calcul. Ceci permet d'étudier des phénomènes importants comme l'assemblage des systèmes complexes (cf chapitre IV).

Nous présentons d'abord nos systèmes en GG conformément au modèle de Marrink MARITNI I pour les lipides [16] et pour les acides aminés [212, 214].

Les systèmes que nous avons utilisés sont composés de cycles peptidiques, de lipides, de molécules d'eau et d'ions. Nous avons préparé des scripts en Tcl qui permettent de définir les coordonnées de ces systèmes dans le modèle GG et d'écrire leurs fichiers de topologies.

Tous les lipides employés dans ce projet (POPC, POPE et POPE) sont représentés par 13 sites d'interaction (au lieu de 134, 125 et 130 atomes, respectivement) (Figure V-5 (b)). La différence entre les trois lipides dans le modèle GG se trouve dans le premier site d'interaction de chaque lipide, ce qui traduit la différence entre les têtes polaires. Ainsi les groupes choline, ethanolamine et glycerol sont représentés par les sites Q0, Qda et P respectivement.

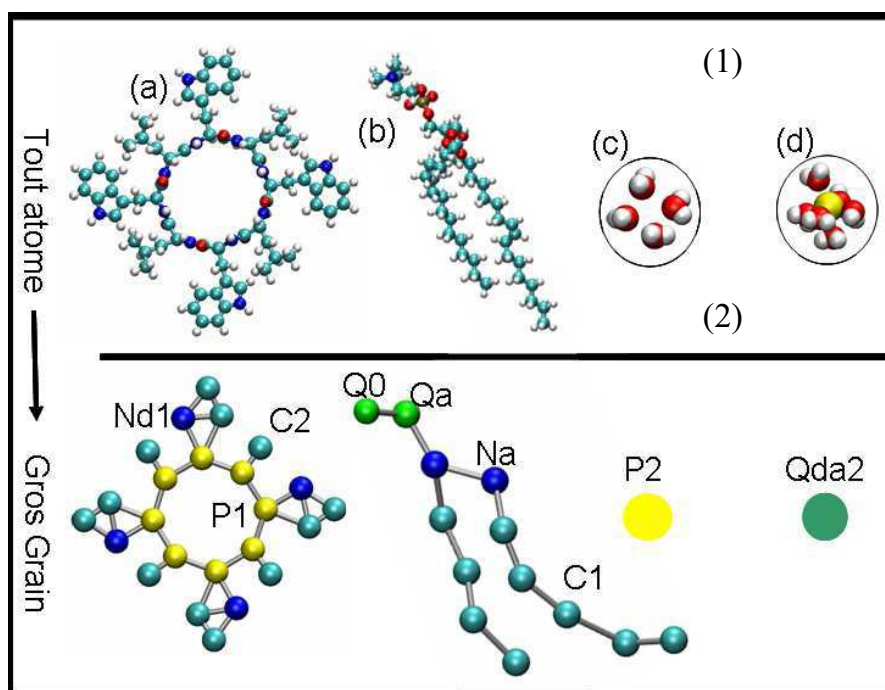
Les cycles peptidiques CP1s et CP2s sont représentés par 24 sites d'interaction (au lieu de 172 et 180, respectivement). La Leucine est modélisée par deux sites d'interaction (P et C), la Tryptophane par quatre sites (P, Nd et deux C), l'Arginine par trois sites (P, Nd et Qda) et la



Lysine par deux sites (P et Qd). Un ensemble de quatre molécules d'eau ou un ion avec sa première sphère d'hydratation sont modélisés respectivement par une particule (P) ou (Qda) (Figure V-5 (c,d)).

Les coordonnées des sites dans le modèle GG sont choisies de la manière suivante : Les coordonnées des sites du squelette ou des chaînes latérales des CPs correspondent respectivement aux coordonnées des carbones- $\alpha$  et certains atomes des chaînes latérales. Pour les lipides, les coordonnées de deux sites des têtes polaires correspondent respectivement à l'atome centrale des groupements choline (ethanolamine ou glycerol) et phosphate. Les coordonnées de deux sites du groupe glycérol correspondent aux deux atomes d'oxygène. Finalement, les coordonnées des sites d'eau (W) ou d'ions correspondent respectivement aux coordonnées du centre géométrique de quatre molécules d'eau ou d'ions eux-mêmes.

On a effectué la simulation en utilisant le code *NAMD* (version 2.5 modifiée). Les systèmes pour la plupart furent examinés dans l'ensemble *NPT*. Un pas d'intégrale de 30 fs a été utilisé pour intégrer les équations de mouvements. Les deux algorithmes weak-coupling ont été utilisés pour maintenir la température (300 K) et la pression (1atm) des systèmes. Les forces non liées chimiquement ont été évaluées avec un rayon de coupure de 12 Å. Les forces électrostatiques furent calculées en utilisant une constante diélectrique égale à 20. On a utilisé initialement le champ de force MARTINI I pour lipides [16] et pour acides aminés [212, 214].



**Figure V-5** : Représentation de nos systèmes dans les deux échelles atomistique (1) et GG (2). (a) CP1.(b) lipide POPC. (c) quatre molécules d'eau. (d) ion avec sa sphère d'hydratation.

Dans toutes les figures ci-après, en GG, les CPs sont représentés seulement par les sites du squelette en forme de sphères. Dans les CP1s, les résidus Leu et Trp sont colorés respectivement en vert et jaune. Dans les CP2s, les deux types de résidus hydrophobes (Trp et Leu) et chargés (Lys et Arg) sont colorés respectivement en jaune et cyan. Les chaînes aliphatiques sont représentées sous forme des bâtons avec la couleur cyan. Les sites du groupe glycérol sont représentés par une particule colorée en orange. Les têtes polaires PC, PE et PG sont représentés en sphères colorées respectivement en violet, bleu et rouge. Dans les hélices, les sites du squelette des résidus Leu et Lys sont représentés en sphères verte et rouge,

---

respectivement. Alors que les sites des chaînes latérales sont représentés par des particules colorées en cyan. Les sites des molécules d'eau et des ions seront toujours omis afin de simplifier les représentations.

## **V-3 Formation de nanotubes transmembranaires**

Rappelons que l'expérience a montré que la partition de CPs hydrophobes dans une solution de liposome conduit à la formation de nanotubes transmembranaires [5]. Il en est de même pour l'auto-assemblage des lipides membranaires avec ces CPs [242]. Dans cette première étude, on cherche à produire le processus de la formation des nanotubes transmembranaires (NTTMs) par simulation de DM utilisant l'approche GG.

Les interactions à distance impliquant les CP1s ne mettent en jeu que les forces de vdw, ce qui nous permet de tester et d'optimiser le cas échéant correctement ces derniers. Dans la deuxième partie du travail, ces données seront directement exploitées dans l'optimisation des interactions impliquant les CP2s, car ceux-ci sont formés en partie par les mêmes résidus composants les CP1s (Trp et Leu). On pourra alors se concentrer sur l'optimisation de la partie hydrophile des CP2s, constitué par des résidus chargés (Arg et Lys).

### **5.3.1 Le champs de force préliminaire**

Nous avons utilisé initialement le champ de force GG des lipides qui a été utilisé pour produire les différentes phases des lipides [16], et le champ de force pour acides aminés qui a été utilisé pour simuler la dynamique d'un canal de potassium [214]. Rappelons que pour ce champ de force, les interactions entre acides aminés n'ont pas été testées et ni spécifiquement optimisées. Nous avons considéré trois scénarios :

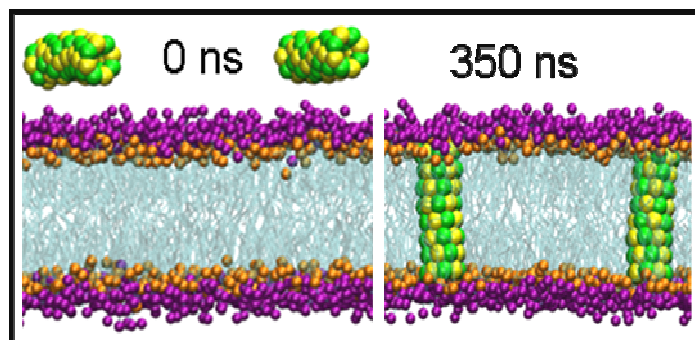
- a) Des nanotubes préformés en interaction avec une bicouche lipidique ;
- b) Des clusters (amas) de CP1s préformés, placés au voisinage d'une membrane ;
- c) Des CP1s individuels placés auprès des têtes polaires d'une membrane.

#### **a) Les nanotubes à l'interface de la membrane.**

Nous avons considéré tout d'abord un système formé par deux nanotubes qui sont placés au voisinage d'une membrane. Le système est composé de :

	<b>Membrane</b>	<b>Nanotube</b>	<b>Eau</b>
<b>Système</b>	576 popc	Deux de 8 CP1s	11200

Des simulations de DM, montrent que les nanotubes s'approchent de la membrane, puis la pénètrent progressivement avant d'adapter une configuration transmembranaire. Ce processus se déroule dans une échelle du temps de quelques centaines de ns. Au-delà, nous n'avons observé qu'un déplacement latéral des nanotubes.



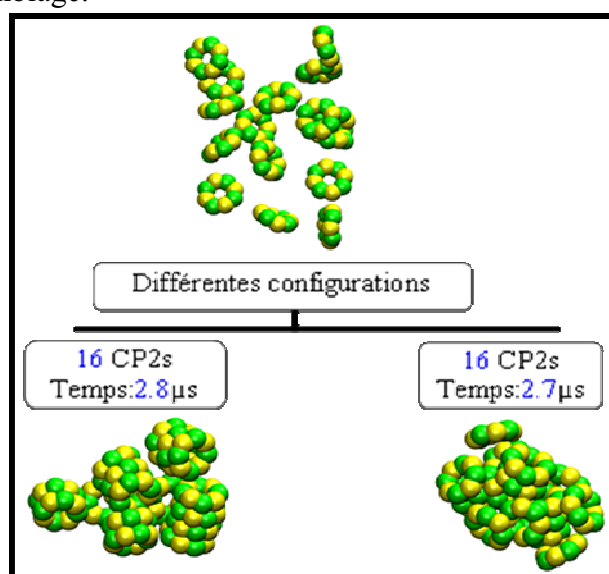
**Figure V-6** Insertion de deux nanotubes peptidiques dans la membrane POPC

Les deux nanotubes pré assemblés formés par huit cycles peptidiques pénètrent la membrane et adoptent une orientation perpendiculaire à la bicouche (Figure V-6). Un résultat similaire a été obtenu par Klein *et al*, pour un nanotube hydrophobe mis au contact d'une bicouche DMPC [208]. Très récemment, une autre équipe de recherche a également reproduit l'insertion d'un nanotube peptidique de huit CPs de séquence [(Trp-Leu)<sub>4</sub>] par dynamique moléculaire gros grains [243]. Cependant, il n'existe pas d'évidence expérimentale ou théorique qui montre que les cycles peptidiques forment des nanotubes en solution.

### **b) Les clusters pré assemblés des CP1s à l'interface de la membrane POPC**

Tout d'abord, nous avons étudié l'auto assemblage des CP1s en solution aqueuse. Nous avons préparé cinq configurations différentes dans lesquelles seize CP1s sont placés aléatoirement dans une solution de 3838 sites d'eau (Figure V-7).

Toutes les simulations de DM ont abouti à la formation de clusters dans des échelles de temps de l'ordre de 1.5  $\mu$ s. Ces clusters sont composés des morceaux de nanotubes de 2 à 4 unités et entourés par des CP1s. Nous avons remarqué qu'au-delà de la  $\mu$ s, la forme des clusters n'évoluait plus avec le temps, même pour des simulations poursuivies au-delà de 3  $\mu$ s. De plus, certaines CP1s absorbés en périphérie des amas encombrant clairement le processus d'auto assemblage.



**Figure V-7** Auto assemblage des CP1s en solution aqueuse.



Nous avons préparé plusieurs systèmes dans lesquels les clusters auto assemblés en solution (Figure V-8) sont placés à l'interface de la membrane POPC. Nous présentons ici les résultats relatifs à un système représentatif constitué par :

	Membrane	Cluster	Eau
Système	576 popc	1 de 24 CP1s	11100

Au cours de la simulation, le cluster s'absorbe à la membrane dès les premières ns. Ensuite, les têtes polaires s'écartent pour permettre l'interaction de l'amas avec le corps hydrophobe de la membrane. Au-delà de 500 ns, on ne détecte aucun réarrangement des peptides. L'amas ne détache pas, ne réorganise pas, et ne pénètre pas non plus la membrane. Il reste stable à l'interface de cette dernière, même quand la simulation est poursuivie au delà de la  $\mu$ s.

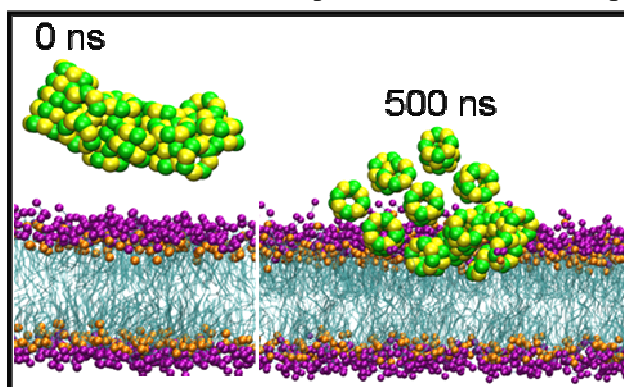


Figure V-8 Interaction d'un amas des CP1s avec la membrane POPC.

### c) Les cycles peptidiques placés à l'interface de la membrane POPC

Dans ce cas, nous considérons que les CP1s atteignent et interagissent individuellement avec une membrane lipidique POPC (Figure V-9). Le système étudié est composé de :

	Membrane	CP1	Eau
Système	576 popc	24	11200

L'évolution du système par simulation de DM a montré que la majorité des CP1s ont commencé d'abord à s'auto assembler auprès de l'interface de la membrane, puis interagissent avec cette dernière sous forme d'un amas. D'autres CP1s ont interagi individuellement avec la membrane avant de s'auto assembler au niveau des têtes polaires avec le cluster. Au bout de 350 ns, le système semble converger vers le même état que celui obtenu précédemment. C'est-à-dire, l'amas reste au voisinage des têtes polaires, sans se réorganiser ni pénétrer la membrane, même quand la simulation est poursuivie au-delà de la  $\mu$ s.

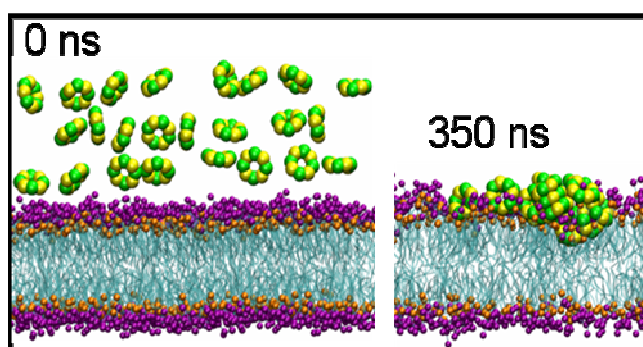


Figure V-9 Interaction des CP1s individuels avec la membrane POPC.

---

## **Conclusions**

En considérant le champ de force MARTINI I, l'auto assemblage des CP1s résulte en la formation d'amas. Par ailleurs, les interactions entre les sites de ce dernier ou entre les amas et les têtes polaires PC semblent être trop attractives, ce qui empêche une réorganisation favorable des clusters.

Notre étude montre clairement que le champ de force original pour les acides aminés ne permet pas de produire la formation de nanotubes transmembranaires en partant des CP1s libres ou des amas pré assemblés au voisinage de la membrane. Ces résultats ne sont pas surprenants car ces champs de force n'ont été optimisés que pour produire les interactions entre les peptides et la membrane et non pas les interactions entre les acides aminés.

Une grande partie du travail présenté ci-après est consacrée à optimiser le champ de force GG initial avec comme objectif principal celui de reproduire l'ensemble des observables expérimentales.

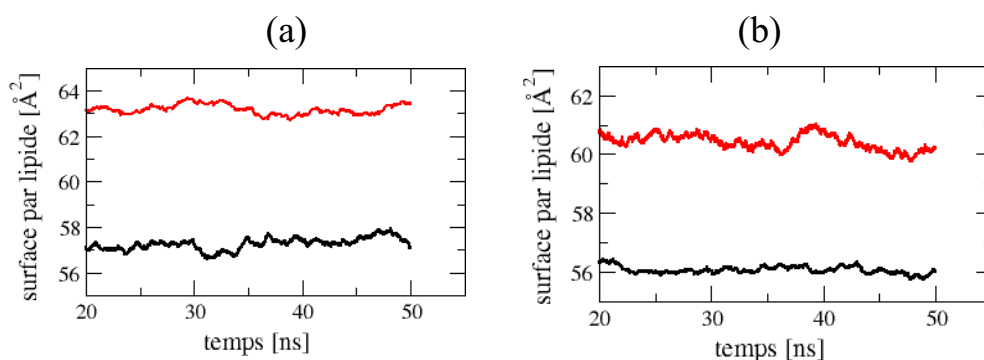
### **5.3.2 Optimisation du comportement des sites d'eau**

Dans nos études préliminaires, nous avons observé occasionnellement en fonction des conditions de simulation une cristallisation des molécules d'eau à température ambiante 300 K. Cette nucléation se propage par la suite à tous les composants du système, y compris les lipides. Ce problème a été déjà signalé par Marrink *et al.* dans la version de MARTINI 2 [17]. Pour y remédier, ils ont introduit des sites anti-nucléations BP4 pour perturber l'agrégation uniforme des particules d'eau en solution aqueuse.

Nous avons préféré modifier les interactions (LJ) entre les sites de particules d'eau en réduisant la valeur d'énergie minimale du niveau 1 ( $\epsilon_{\alpha\beta} = 5$  kJ/mol) au niveau 2 ( $\epsilon_{\alpha\beta} = 4.2$  kJ/mol) afin de rectifier ce problème. Cette modification n'altère pas la densité d'eau qui est de 1.004 g/cm<sup>3</sup>.

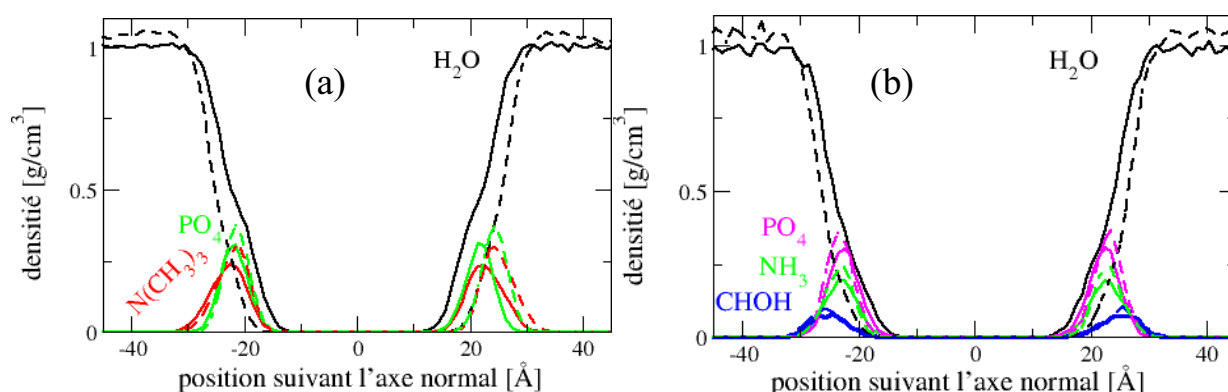
Nous avons testé l'effet de ce changement sur la distribution des sites W d'eau à l'interface des membranes eucaryote et procaryote. Nous avons calculé à partir des simulations de DM des membranes, la surface par lipide (area/lipid) pour une bicouche hydratée POPC (288 lipides avec 5834 sites d'eau) et une bicouche hydratée POPE-POPG (198 POPE et 90 POPG avec 5834 sites d'eau et 128 d'ions Na<sup>+</sup>) avant et après le changement de champ de force décrivant l'interaction entre sites W d'eau.

Pour le champ de force modifié, nous avons trouvé des valeurs de  $\sim 63$  Å<sup>2</sup> et  $\sim 60.7$  Å<sup>2</sup> respectivement pour les membranes eucaryote et procaryote qui sont compatibles avec l'expérience et avec les simulations en tout atome  $\sim 63.5$  Å<sup>2</sup> et 61 Å<sup>2</sup>. Ceci constitue une amélioration notable par rapport au champ de force original qui donnait les valeurs de 57 Å<sup>2</sup> (eucaryote) et 56 Å<sup>2</sup> (procaryote) (Figure V-10).



**Figure V-10** Surface par lipide d'une membrane POPC (a) ou et POPE-POPG (b) avec le champ de force original (noir) et optimisé (rouge).

La réduction de l'interaction entre les sites d'eau que nous avons introduite, a un effet notable sur les propriétés de la surface de la membrane car elle permet une meilleure hydratation des têtes polaires, comme le montre les profils de densité d'eau suivant l'axe normal à la membrane (Figure V-11). Cette distribution est similaire aux résultats atomistiques obtenus pour POPC [244], DPPC [245-247], DMPC [37], POPE-POPG [35]



**Figure V-11** Représentation de la densité volumique des composants de la membrane hydratée eucaryote (a) ou procaryote (b) suivant l'axe normal à l'interface de la membrane. Le champ de force original ou optimisé est représenté respectivement par des lignes pointillées ou solides. La position zéro représente le centre de la bicouche lipidique.

### 5.3.3 Optimisation du champ de force impliquant les Trp et Leu

#### a) Potentiel intramoléculaire

Lors de l'étude initiale de l'auto assemblage des CP1s en solution, nous avons constaté que les chaînes latérales des CP1s adoptent des conformations perpendiculaires aux plans- $\alpha$ , alors que dans les simulations atomistiques, les chaînes latérales sont principalement parallèles aux plans- $\alpha$ .

Par ailleurs, Unden et ses collègues ont observé que l'auto-assemblage des CPs de séquence  $[-(L-Gln-D-Tle-L-Glu-D-Tle)_2-]$  ou de leurs énantiomères  $[-(D-Gln-L-Tle-D-Glu-L-Tle)_2-]$  en solution, est favorable lorsque les CPs sont énantiomères, alors que dans le cas des CPs ayant le même caractère stéréochimique elle n'est pas favorable. Ils ont conclu que la

---

réduction de l'entropie de conformation et le maintien de la structure étendue de la chaîne latérale facilitent l'auto-assemblage des CPs [248].

Nous avons par conséquent, dans le modèle GG, introduit des contraintes sous forme de dièdres impropres pour maintenir les chaînes latérales parallèlement aux plans- $\alpha$ , et des contraintes angulaires entre les sites du squelette afin de garder toujours le rayon de l'anneau constant.

### **b) Potentiel intermoléculaire**

Tout d'abord, on note que les interactions entre les lipides et l'eau ont été optimisées par Marrink [16]. Les interactions entre les acides aminés, entre ceux-ci et les lipides n'ont pas été toujours optimisées. Sachant que les interactions à distance impliquant les CP1s sont gérées par les forces de vdw, l'optimisation du champ de force pour les CP1s sera focalisée alors sur les paramètres du potentiel de LJ : la distance effective  $\sigma_{\alpha\beta}$  et l'énergie minimale  $\epsilon_{\alpha\beta}$ .

Plusieurs investigations expérimentales [2, 5, 242] et théoriques [76, 77] ont déterminé la distance (4.7 Å) séparant deux cycles peptidiques adjacents nécessaire pour la formation des liaisons d'hydrogène qui assurent la stabilité de la structure tubulaire, que ce soit dans un cristal [2] ou dans une membrane [5, 77, 242]

Les simulations de DM en GG d'un nanotube de huit CP1s intégré dans une membrane ou présentés dans une solution aqueuse, montrent que le potentiel LJ avec la distance minimale effective ( $\sigma_{\alpha\beta} = 4.7$  Å) permet de reproduire exactement la distance séparée entre deux CP1s adjacents. En conséquent, la suite de notre optimisation sera concentrée, sur l'ajustement des valeurs  $\epsilon_{\alpha\beta}$ .

D'après l'étude préliminaire, nous avons trouvé que les interactions entre les CP1s et entre ceux-ci et la membrane sont très attractives, ce qui empêche de reproduire la formation de nanotubes transmembranaires. Il est donc nécessaire de modifier les valeurs de  $\epsilon_{\alpha\beta}$  correspondantes aux interactions impliquant la Trp et Leu (Tableau V-1). Nous avons adopté alors une stratégie qui consiste d'abord à garder les mêmes niveaux d'énergie, et définir d'autres niveaux d'énergie intermédiaire si nécessaire, afin d'une part d'éviter les cas non physiques et d'autre part favoriser le processus d'auto assemblage, ensuite effectuer plusieurs simulations pour chaque nouvelle valeur de  $\epsilon_{\alpha\beta}$  afin d'assurer des bons comportements physiques.

L'optimisation des champs de force décrivant les CP1s est composée principalement de deux étapes :

L'étude d'auto assemblage des CPs en solution aqueuse qui servira à optimiser les différentes interactions entre les chaînes latérales, et entre celles-ci et les sites du squelette. Il s'agira de réduire progressivement l'intensité de quatre interactions ( $\epsilon_{\alpha\beta}$ ) entre différents sites. Principalement, on a réduit les interactions entre les sites du squelette des CPs et entre ceux-ci et les sites des chaînes latérales chargées (Nd1 et Qd) pour éviter les cas non physiques. On a testé tous les niveaux inférieurs à celui de l'interaction initiale, en passant nécessairement par des niveaux intermédiaires. Au cours de l'optimisation, lorsque l'on constate aucun réarrangement des CPs, comme le cas des CPs figés dans le cluster qui encombrant complètement le processus d'auto assemblage, on met fin à la série de simulations. La valeur de  $\epsilon_{\alpha\beta}$  retenue est alors celle qui reproduit le meilleur comportement physique. Considérant le

nombre de sites (quatre) et les niveaux d'énergie (cinq) ainsi que les niveaux intermédiaires, le nombre de simulations effectuées pour le travail d'essai/erreur fut de l'ordre d'une cinquantaine de simulations couvrant une échelle du temps de l'ordre de quelque  $\mu$ s.

*L'étude des CPs pendant l'assemblage ou en présence de bicouches lipidiques* sera utilisée pour tester les interactions entre les acides aminés et la membrane. On a d'abord réduit les interactions qui sont évidemment très fortes, comme celles entre les sites du squelette des CP1s et les sites des têtes polaires pour éviter à la fois l'insertion de lipides dans l'anneau décrit par le plan- $\alpha$ , et la formation d'amas désordonnés lors de l'auto assemblage des lipides et de CP1s. Note que la réduction de l'interaction entre les sites du squelette au niveau 4 est nécessaire pour favoriser l'insertion des clusters dans la membrane. On met fin à une série de simulations ou change de paramètres lorsque l'on constate qu'un comportement non physique comme celui de l'insertion de lipides dans l'anneau décrit par le plan- $\alpha$  ou bien l'encombrement d'un processus qui est énergétiquement favorable persiste. Ici, on a considéré les paramètres correspondant à l'interaction de quatre sites de lipides (Q0, Qa, Na C), trois de CP1s (P, Nd1 et C) et un seul site d'eau, avec cinq niveaux d'énergie et les niveaux intermédiaires. Le nombre de simulations effectuées pour le travail d'essai / erreur est de l'ordre d'une centaine de simulations couvrant un total du temps de simulation de l'ordre de quelque  $\mu$ s.

Mol	Type	Lipide						CP						W	Ion
		Qda 3	Q0	P 3	Qa	Na	C 1	P 1	Nd 1	Nd 2	Qda 1	Qd	C 2	P 2	Qda 2
Lipide	Qda3	1													
	Q0	2	4												
	P3	1	1	1											
	Qa	1	4	1	4										
	Na	2	4	4	4	2									
	C1	6	6	6	6	5	4								
CP	P1	1 6	1 6	1 6	1 6	4 6	6	1 4							
	Nd1	2 3	4	4	2 3	2 4	5 6	4 6	2 4						
	Nd2	2 3	4	4	2 3	2 4	5	4	2 5	2					
	Qda1	1 2	2	1 2	1 2	2 4	6	1 4	2 5	2 4	1				
	Qd	1 2	4	1 2	2 3	2 4	6	1 4	4 5	4	1	4			
	C2	6	6	6	6	5	4 3	6	5 6	5	6	6	4		
W	P2	1	1	1	1	4	6	1 2	4	4	1 2	1 2	6	1 2	
Ion	Qda2	1	2	1	1	2	6	1 2	2	2	1	1	6	1 2	1 2

**Tableau V-1:** Matrice d'interactions de vdw entre les sites du modèle GG. En noir : champ de force original, et en rouge : champ de force optimisé. Les niveaux d'énergie sont définis du plus attractif au moins attractif : 1:  $\epsilon_{ij} = 5$  kJ/mol, 2:  $\epsilon_{ij} = 4.2$  kJ/mol, 3:  $\epsilon_{ij} = 3.8$  kJ/mol, 4:  $\epsilon_{ij} = 3.4$  kJ/mol, 5:  $\epsilon_{ij} = 2.6$  kJ/mol and 6:  $\epsilon_{ij} = 1.8$  kJ/mol.

Pour évaluer l'effet de modification de champ de force MARTINI 1, nous avons calculé le profil d'énergie libre correspondant au transfert des chaînes latérales de trois acides aminés (Leu, Trp, Lys) à travers l'interface l'eau/butane, et les avons comparé avec l'expérience ou aux profils calculés par simulations atomistiques de DM.

Nous avons calculé le profil d'énergie libre par la méthode Adaptive Biasing Force (ABF) (*c.f.* chapitre III). Nous avons trouvé que la barrière d'énergie pour transférer les résidus Leu, Trp et Lys de l'eau vers le butane en utilisant le champ de force optimisé est respectivement

22 kJ/mol, 21.5 kJ/mol, -20.25 KJ/mol (Figure V-39). Nous avons calculé aussi la densité de trois systèmes en fonction de la coordonnée de réaction d'énergie libre, afin de vérifier que le centre de masse des systèmes est toujours stable au cours de la simulation (Figure V-40).

Les valeurs d'énergie libre des chaîne latérales Leu et Lys (respectivement  $\sim 22$  kJ/mol et -23 kJ/mol) sont similaires à celles obtenues expérimentalement [249, 250] et théoriquement [251, 252] en utilisant l'interface l'eau/cyclohexane.

Par contre, la valeur pour la Trp est surestimée par rapport à l'expérience (9 kJ/mol). Cette contradiction est présente même en simulation atomistique. En effet, ce problème semble du à la structure aromatique et aux propriétés physiques de la chaîne latérale de Trp qui n'est pas facile à reproduire correctement [249, 250].

D'une manière générale, les profils d'énergie libre montrent que l'optimisation des champs de force décrivant les acides aminés n'a pas affecté leurs propriétés thermodynamiques.

Les paragraphes suivants décrivent les simulations effectuées avec le champ de force optimisé.

### Auto assemblage des CP1s en solution

On a étudié l'auto assemblage des CP1s en solution pour différentes configurations, chacune composée de seize CP1s et 3838 sites d'eau (1/220 CP1/Eau). On a constaté dans toutes les simulations la formation des clusters plutôt organisés dans une échelle du temps très courte par rapport au champ de force original (Figure V-12).

Les clusters obtenus sont classés en deux types (a) et (b) : Le (a) un ordre cristallin, et le (b) un amas. Ces deux conformations ne dépendent ni de la concentration, ni de la configuration initiale de CP1s.

Tenant compte l'échelle du temps accessible par nos moyens du calcul, le (a) reste la configuration la plus fréquente, et surtout la plus proche des observables expérimentales de l'équipe de Ghadiri [4].

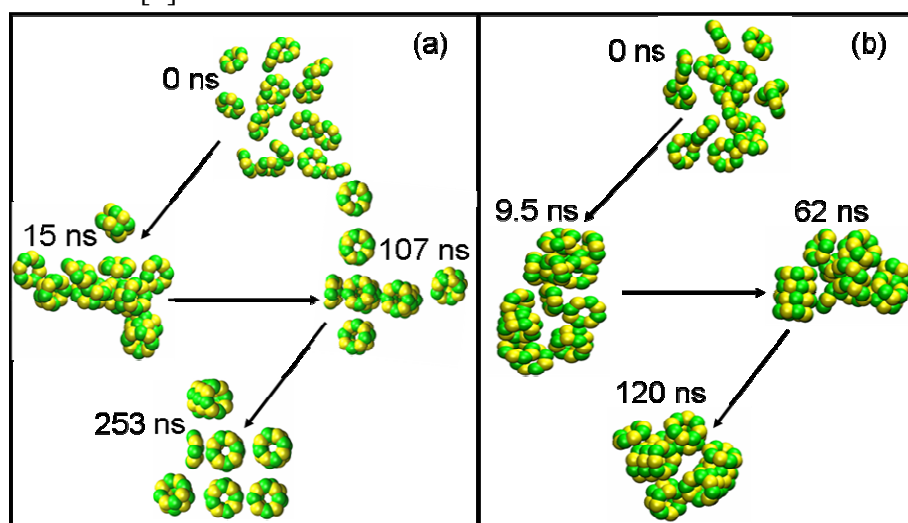
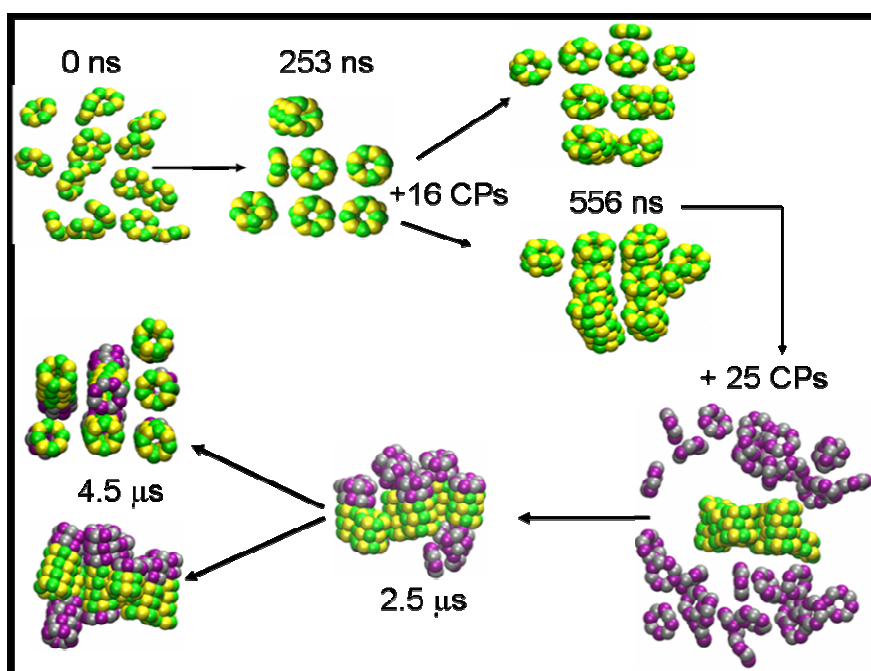


Figure V-12 Auto assemblages des CP1s en solution aqueuse.

Nous avons additionné 16 CP1s à de la conformation (a) pour produire un cristallin de nanotubes peptidiques de taille plus grande. Le système dans ce cas est constitué de trente deux CP1s avec 3838 sites d'eau (1/120 CP1/Eau). La simulation de DM montre que la taille des nanotubes a augmenté en effet à la fois de 5 à 8 cycles et de 3 à 5 cycles au bout de quelques centaines de ns (Figure V-13).

Nous avons rajouté à la conformation précédente 25 CP1s. Le système dans ce cas est constitué de cinquante sept CP1s avec 3950 sites d'eau (1/65 CP1/Eau). Nous avons observé que la formation de trois et deux nanotubes de 6 et 10 CP1s respectivement se produit en quelques 2  $\mu$ s, alors que la réorganisation de ces nanotubes en cristallin plus ordonné nécessite plus que 6  $\mu$ s (Figure V-13).



**Figure V-13** Formation de cristallin de nanotubes peptidiques par DM GG. Dans la deuxième étape, les 25 CP1s additionnés sont colorés par violet et gris pour montrer leur agrégation et leur organisation par rapport à l'amas préformé.

En parallèle, nous avons effectué une DM de 125 CP1s dans une solution de 12000 sites d'eau. Au bout de 5  $\mu$ s, nous avons obtenu un amas composé de morceaux de nanotubes qui sont orientés différemment et entourés par plusieurs CP1s. D'après l'étude d'une basse concentration, l'organisation de ces amas nécessite probablement une échelle du temps de l'ordre de centaines de  $\mu$ s, qui va au-delà de la disponibilité de notre moyen de calcul. Ce qui supporte encore une fois notre choix pour reproduire un cristallin des NTPs par la DM en partant d'un motif avantageux comme le cas (a), ce qui traduit le fait qu'une nucléation d'un ordre cristallin favorise la formation des structures ordonnées.

### *Partition des CP1s dans la membrane POPC*

Rappelons encore une fois que l'expérience a montré que la partition des CP1s au voisinage d'une membrane [5] ou bien l'auto assemblage des lipides membranaires avec ces

CP1s [242], conduisent à la formation de nanotubes transmembranaires. Pour cela, on a considéré dans la suite trois processus pour produire ces deux observables expérimentales par simulation de DM utilisant l'approche GG.

Les trois processus sont les suivants : Organisation de CP1s individuels ou de clusters (amas) préformés de CP1s à l'interface la membrane POPC et auto assemblage d'une configuration aléatoire de lipides membranaires POPC et de CP1s.

Nous avons préparé plusieurs systèmes dans lesquels les CP1s libres sont placés aléatoirement à l'interface de la membrane POPC. Nous présentons ici les résultats relatifs à un système représentatif constitué par :

	<b>Membrane</b>	<b>CP1</b>	<b>Eau</b>
<b>Système</b>	576 popc	40	11100

Au cours de simulation, la majorité de CP1s ont commencé à s'auto assembler en deux à quatre amas auprès des têtes polaires PC, puis interagissent avec la membrane. D'autres CP1s ont d'abord interagit individuellement avec la membrane avant de se réorganiser à côté des têtes polaires avec les autres amas (Figure V-14 (a)). Cette étape a été observée dans plusieurs simulations. Elle semble être indispensable avant que les CP1s diffusent au cœur hydrophobe de la membrane. Un comportement similaire a été rapporté pour les nano structures de carbone (Fullerène C60) interagissant avec des membranes lipidiques [253]. Ce comportement semble être général pour les petites molécules hydrophobes leur permettant de traverser la barrière d'énergie de l'interface eau/têtes polaires de phospholipides.

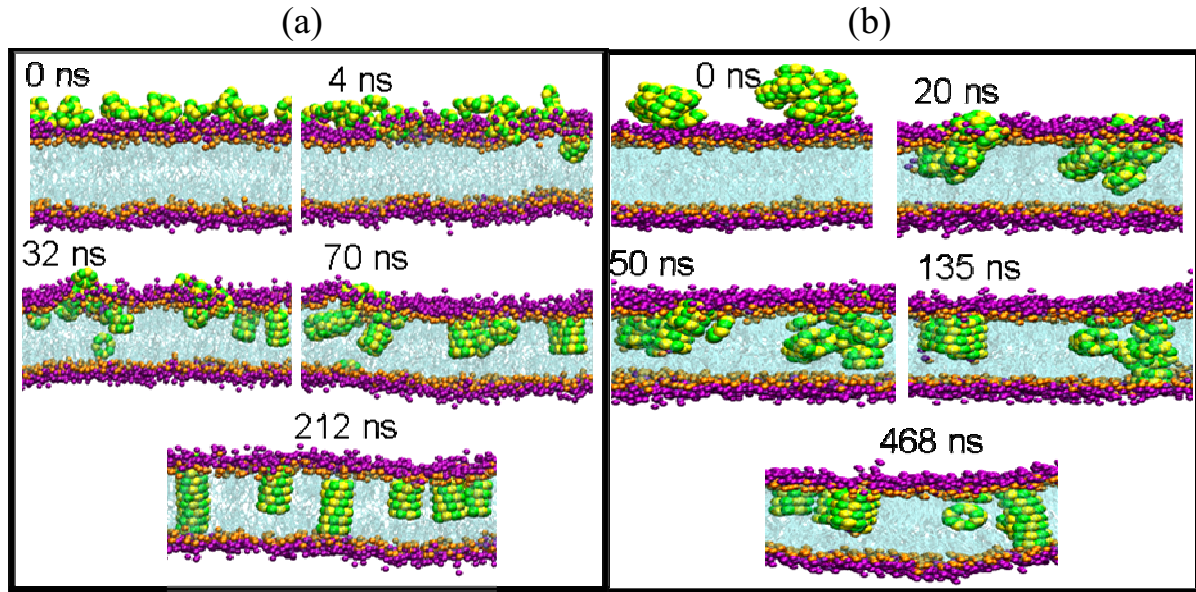
Après diffusion à l'intérieur de la membrane, les clusters se réorganisent au bout d'environ 200 ns pour former de nanotubes transmembranaires (NTTMs) de sept à neuf CP1s, d'autres forment par des bouts de nanotubes. Notons que le nombre optimal de CP1s composant les NTTMs n'est pas connu précisément. Une simulation atomistique montre que ce nombre est de 7 ou 8 dans une bicouche lipidique de DMPC [77].

Le même scénario a été observé lorsque nous avons étudié deux clusters ((a) et (b)) préformés en interaction avec la membrane POPC. Le système est composé de :

	<b>Membrane</b>	<b>Cluster</b>	<b>Eau</b>
<b>Système</b>	576 popc	2 de 16 CP1s	11100

Dès les premières dizaines de ns, les clusters interagissent avec la membrane, puis la pénètrent entièrement. Dans cette simulation, le cluster (b) s'est réorganisé afin de former un NTTMs (Figure V-14 (b)). Au-delà de 470 ns, on n'observe aucun réarrangement des peptides dans la membrane même pour une échelle du temps allant jusqu'à 1.4  $\mu$ s.





**Figure V-14** Réorganisation des cycles peptidiques CP1s au contact d'une membrane POPC pour former des NTTMs. Des CP1s libres (a) ou des clusters préformés (amas) de CP1s (b) sont placés initialement à l'interface de la membrane.

Les simulations précédentes ont été réalisées à température (300 K) et pression (1 atm) constantes. Dans ce cas, les membranes lipidiques sont capables à se détendre et adapter leur configuration initiale au cours de la simulation, car les variations de la surface moyenne par lipide A et l'épaisseur de la région hydrophobe sont permises.

Selon le protocole adopté, la tension de surface du système membranaire qui est donnée par :  $\gamma = \int [P_{\perp} - P_{\parallel}] dz$ , où  $P_{\parallel}$  et  $P_{\perp}$  sont respectivement la pression latérale et normale à l'interface l'eau-lipide, est essentiellement nulle. Cependant, l'insertion des peptides dans la membrane provoque certainement une pression accentuée sur la bicouche. Afin d'évaluer cette effet, on a estimé le profil de pression locale suivant l'axe normal à la membrane [254] pendant la translocation des peptides de la solution vers le cœur de la membrane. Le profil de

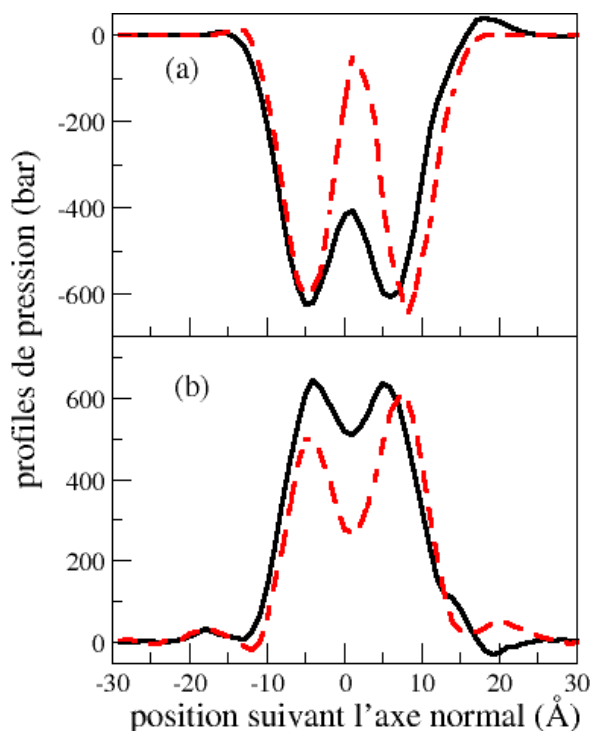
la pression locale peut être calculé par :  $P_{local}(z) = \frac{1}{\Delta V} \left[ \sum_i m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i - \sum_{i < j} \mathbf{F}_{ij} \otimes \mathbf{r}_{ij} f(z, z_i, z_j) \right]$ , où

$P_{local}(z)$  est le tenseur de la pression locale estimé dans une tranche  $\Delta z$  centrée autour de la coordonnée  $z$ . La somme des termes cinétiques est effectuée sur tous les atomes situés dans  $\Delta z$  pour chaque pas de simulation. La fonction de pondération  $f(z, z_i, z_j)$  est choisie de telle façon que la contribution fractionnaire de l'interaction entre deux particules  $i$  et  $j$  à la pression dans  $\Delta z$  centrée en  $z$  est 1 si les deux particules sont situées dans la même plaque,  $dz/|z_1 - z_2|$  si l'une des particules est à l'extérieur de la tranche, et  $\Delta z/|z_1 - z_2|$  si les deux particules sont à l'extérieur de  $\Delta z$ . La  $dz$  est la distance séparant les deux particules.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du programme *NAMD* (version 2.6) [193] qui permet d'évaluer séparément la contribution d'énergie cinétique + d'interactions liées chimiquement (bonded) par rapport la contribution d'interactions non-liées chimiquement (non-bonded). L'évaluation des profils de pression dès les premiers stades du processus de l'insertion des peptides indique clairement un effet sur la partie supérieure de la membrane lorsque le peptide pénètre la bicouche lipidique (Figure V-15). Les deux composants de la pression (bonded et nonbonded) sont affectés par le transfert des peptides.

Une fois les peptides complètement insérés dans le cœur de la membrane et auto assemblés en nanotubes, les profils de pression redeviennent symétriques, avec des caractéristiques identiques à celles des membranes pures [17].

Notons par ailleurs que, la bicouche lipidique montre également des ondulations à grande longueur d'onde. Ces dernières sont similaires à celles obtenues par des simulations à grande échelle pour des membranes pures permettant de telles fluctuations, et ne semblent pas être dû à la pénétration des peptides.



**Figure V-15** Profils de pression selon l'axe normal à la membrane pendant la pénétration et l'auto assemblage des cycles peptidiques à l'intérieur de la bicouche (Figure 14(a)). (a) Contribution des termes "bonded" (a) (énergie cinétique + interactions liées chimiquement) et (b) contribution des termes "nonbonded" (interactions non liées chimiquement) au profil du tenseur de pression locale pour les premiers stades de la pénétration de peptide et la fin du processus de l'assemblage sont représentés respectivement en noirs et rouges. Les profils sont calculés pour chaque moyenne de 1.5 ns.

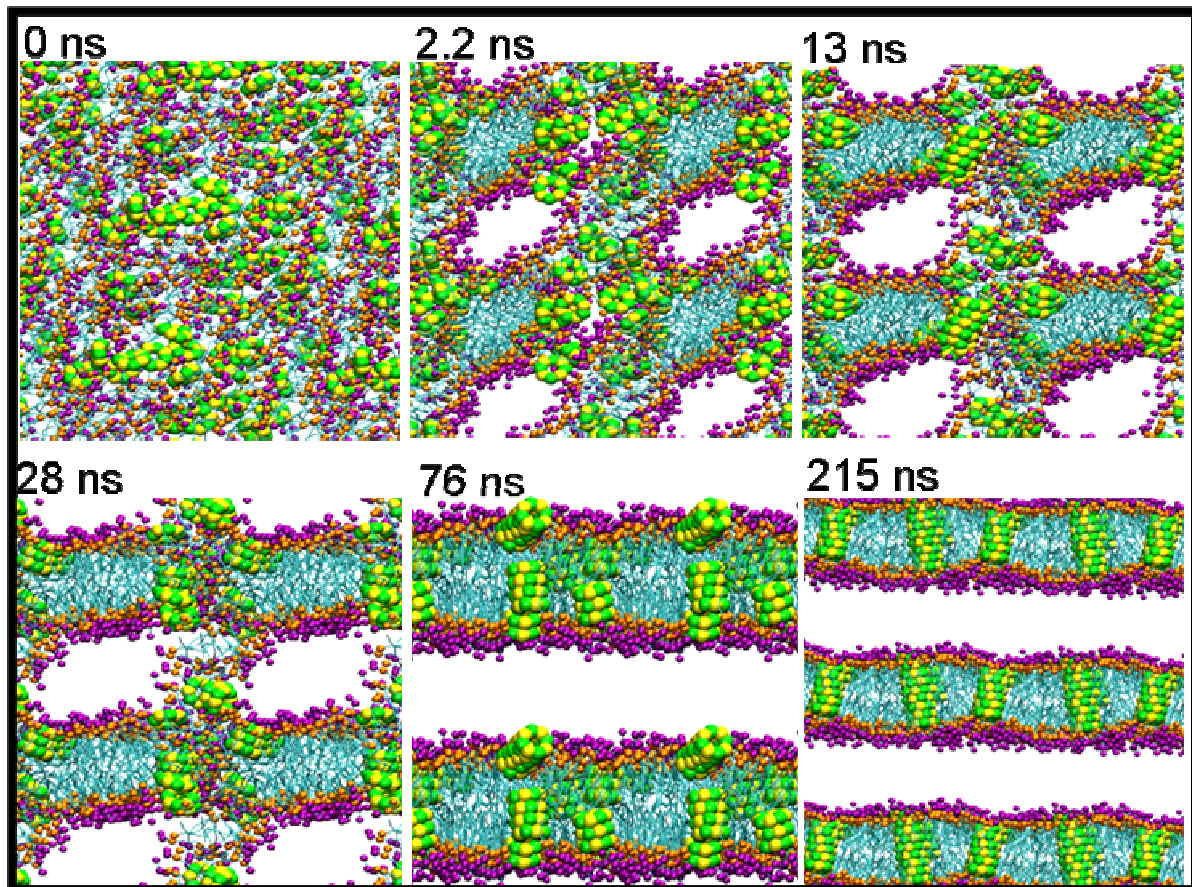
Pour modéliser le troisième processus, nous avons étudié l'auto assemblage des lipides et des CP1s, à partir d'une solution homogène où ils sont placés aléatoirement. Notons que, l'auto assemblage des lipides avec peptides est une méthode très utilisée par les expérimentateurs pour former des multicouches [21, 242].

Nous avons effectué une simulation de DM GG de l'auto assemblage d'un système composé de :

	Lipides	CP1	Eau
Système	157 popc	24 CP1s	2003

Dans la Figure V-16, nous avons rapporté quelques étapes principales de ce processus avec leurs échelles du temps correspondantes. Lors de l'auto assemblage, à partir de 3 ns de simulation de DM, les lipides commencent à s'auto assembler en bicouches séparées par des CP1s ou par des morceaux de nanotubes. La formation complète de la bicouche lipidique a été

observée vers 70 ns de simulation avec des morceaux de nanotubes localisés à l'interface ou à l'intérieur de la membrane. Les formations du premier et le deuxième nanotube transmembranaire de 10 CP1s et de 8 CP1s sont détectés respectivement vers 300 ns et à 1.2  $\mu$ s (Figure V-16). Notons que le nanotube de 8 CP1s était à mi-parcours constitué de deux morceaux CP1s situés aux deux interfaces de la membrane, et qu'au bout de 215 ns, tous les CP1s se sont auto-assemblés en NTTMs.



**Figure V-16** Auto assemblage des lipides POPC et des CP1s en solution aqueuse pour former de nanotubes transmembranaires.

On note ici que le nombre de CP1s utilisés dans toutes étapes précédentes a été choisi de telle manière que : (1) dans l'auto assemblage des CP1s en solution, on a considéré un nombre de CP1s (16, 24) qui permet de reproduire dans une échelle du temps raisonnable un motif de réseau cristallin de nanotubes (en accord avec les observations expérimentales). (2) Dans le cas de l'auto assemblage des CP1s et des lipides popc en solution aqueuse où on a utilisé un rapport de CP1:Lip = 1:7 assez proche à celui de l'expérience 1:9. Notons que généralement, le nombre de CP1s devait être assez grand pour qu'on puisse observer la formation de quelques nanotubes transmembranaires (observation expérimentale).

## **Conclusion**

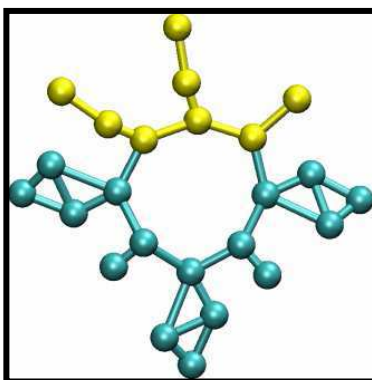
L'ensemble des résultats obtenus pendant cette première étude montrent clairement que l'auto assemblage des CP1s en solution et l'interaction des CP1s avec la membrane sont bien reproduites par simulations de DM GG, une fois les paramètres d'interaction à distance (LJ) des acides aminés (Trp et Leu) optimisés. Cette étude nous a permis de montrer que

- 
- La formation du cristal de nanotubes peptidiques à travers l'auto assemblage des CP1s en solution dépend de la concentration des CP1s et l'échelle du temps de simulation ;
  - Quelque soit la configuration des CP1s atteignent la membrane, la formation de nanotubes transmembranaires se réalise par la réorganisation des clusters à l'intérieur de la membrane.
  - Les premiers stades de l'insertion des CP1s provoquent une perturbation considérable sur les deux contributions d'interactions (bonded et nonbonded) au profil de pression avant que ce dernier ne se stabilise après la formation de nanotubes transmembranaires

Ainsi, les simulations de DM GG sont utiles pour étudier l'assemblage et la réorganisation de tels peptides auprès ou à l'intérieur de la membrane. Nous avons montré principalement que le champ de force original n'était pas adapté et nécessitait une optimisation des paramètres de potentiels impliquant les résidus Trp et Leu. Ce premier résultat, ouvre de nouvelles voies vers l'étude de systèmes plus complexes, comme les cycles chargés impliqués dans l'activité antibactérienne. L'utilisation des modèles gros grains pour de tels processus peut donc être envisagée avec plus de confiance.

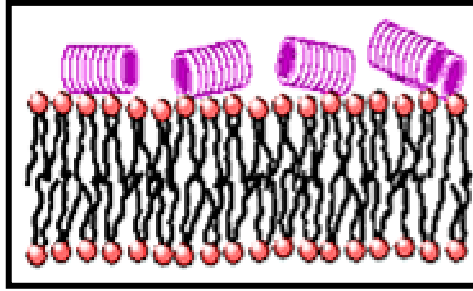
## V-4 L'action antibactérienne

Rappelons qu'avec les CPs chargés (CP2s), nous cherchons à comprendre et décrire le processus de l'action antibactérienne de ces cycles par simulations de DM utilisant l'approche GG.



**Figure V-17** Cycle peptidique CP2s [D-Arg-Arg-D-Lys-(Trp-D-Leu)<sub>2</sub>-Trp] en représentation GG. Ici, les résidus chargés sont colorés en jaune et les résidus hydrophobes en bleu.

Dans ce contexte, l'équipe de Ghadiri a montré par spectroscopie IR qu'à basse concentration, l'auto assemblage des CP2s avec des lipides DMPC résulte en la formation de nanotubes peptidiques (NTPs) adsorbés parallèlement (angle de 70°) à l'interface de la membrane DMPC, en accord avec le mode dit carpet-like [7]



**Figure V-18** Représentation des NTPs à l'interface de la membrane dans le mode carpet-like.

Par ailleurs, les résultats *in vitro* et *in vivo* montrent que ces CP2s agissent sur les bactéries gram+/- en augmentant sensiblement la perméabilité de leurs membranes, provoquant alors la mort rapide des cellules [7] ; le mode exacte de destruction de la membrane restant inconnu.

#### **5.4.1 Champs de force préliminaires**

Nous avons adopté pour cette étude le même scénario que celui de l'étude de CP1s, car nous cherchons de caractériser un mécanisme déterminé principalement par la partition de CP2s à l'interface de la membrane, sauf que dans ce cas, les forces électrostatiques interviennent véritablement dans la détermination de mode d'action des CP2s.

Nous avons utilisé au début le champ de force GG de Marrink de lipides [16] et notre champ de force optimisé pour acides aminés et l'eau (*cf.* section 5.2.1). Notons qu'à ce stade le champ de force des chaînes latérales des acides aminés chargés (Arg et Lys) n'est pas encore testé ni optimisé.

On a remarqué au cours des simulations effectuées utilisant le champ de force optimisé dans la première partie de l'étude que les processus d'auto assemblage des lipides POPC et CP2s, ou encore l'organisation des CP2s en solution ou à interface de la membrane sont plus avancés par rapport le champ de force original (MARTINI 1). Ainsi on a observé, pendant la simulation de l'auto assemblage des lipides POPC et des CP2s, la formation de morceaux de bicouches lipidiques séparés par un mélange de lipides et CP2s, et on a remarqué que les amas de CP2s formés en solution sont plus organisés. Cependant, les interactions impliquant les chaînes latérales des acides aminés Arg et Lys nous ont semblé encore trop attractives. Nous avons donc modifié notablement ces interactions afin d'améliorer le comportement des CP2s.

Au cours de l'optimisation, nous avons adopté la même stratégie que celle de l'étude précédente. On a rendu les interactions entre les chaînes latérales ou entre celles-ci et les sites des têtes polaires (PC, PE et PG) moins attractives pour éviter la formation de clusters trop stables constitués par des lipides et CP2s pendant l'auto assemblage, ou encore pour favoriser leurs réorganisations en solution ou à l'interface de la membrane.

Nous présentons ci-après les résultats obtenus pour les CP2s avec le champ de force optimisé (Tableau V-1).



## 5.4.2 Auto assemblage des lipides POPC et des CP2s

Rappelons que l'expérience a montré que l'auto assemblage des lipides POPC avec les CP2s forme des multicouches lipidiques dans lesquelles des nanotubes sont adsorbés parallèlement à l'interface de la membrane, prêt des têtes polaires. Nous avons effectué par conséquent un ensemble de simulations de DM GG de l'auto assemblage des lipides POPC et CP2s à différentes concentrations tendant à examiner ce processus. Les systèmes étudiés sont composés de :

	Lipides (popc)	CP2s (CP/Lip)	Eau	Ion (Cl)
systeme-1	172	12 (1/14)	2230	51
systeme-2	172	18 (1/9)	2230	77
systeme-3	172	27 (1/6)	2230	115
systeme-4	172	43 (1/4)	2230	172

Ces simulations montrent qu'après avoir formé la bicouche lipidique POPC, les CP2s forment à basse concentrations (1/14 et 1/9 CP/Lip) des NTPs de différentes tailles, présentés parallèlement à l'une de deux interfaces de la membrane, conformément à l'observation expérimentale de l'équipe de Ghadiri, alors qu'à grande concentration (1/6, 1/5 et 1/4 CP/Lip), les CP2s commencent à former des NTPs transmembranaires (Figure V-18). Notons que :

- Même à grande concentration, il existe toujours des nanotubes qui se placent à l'interface de la membrane ;
- Le nombre et taille de NTPs dépend de la concentration des CP2s, par exemple avec le rapport de 1/6 CP/Lip on retrouve un NTP de 10 CP2s, et avec le rapport de 1/4 CP/Lip, l'auto-assemblage permet la formation de 2 NTPs de 7 CP2s (Figure V-19).

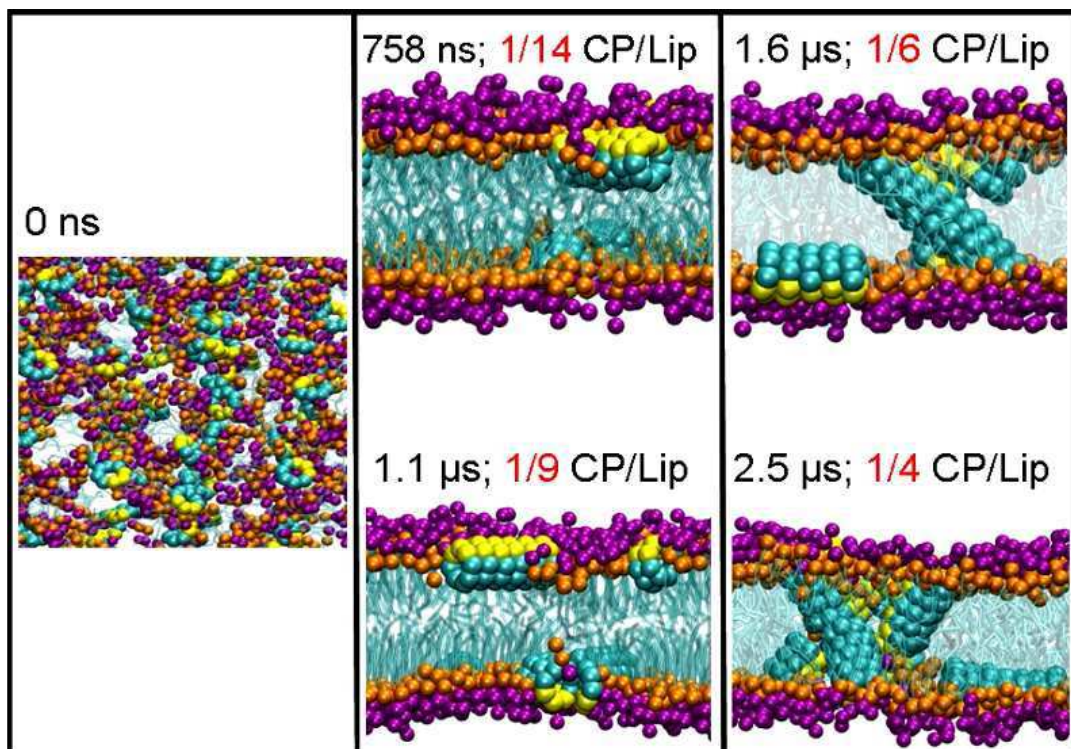


Figure V-19 Auto assemblage des lipides POPC et des CP2s à différentes concentrations.

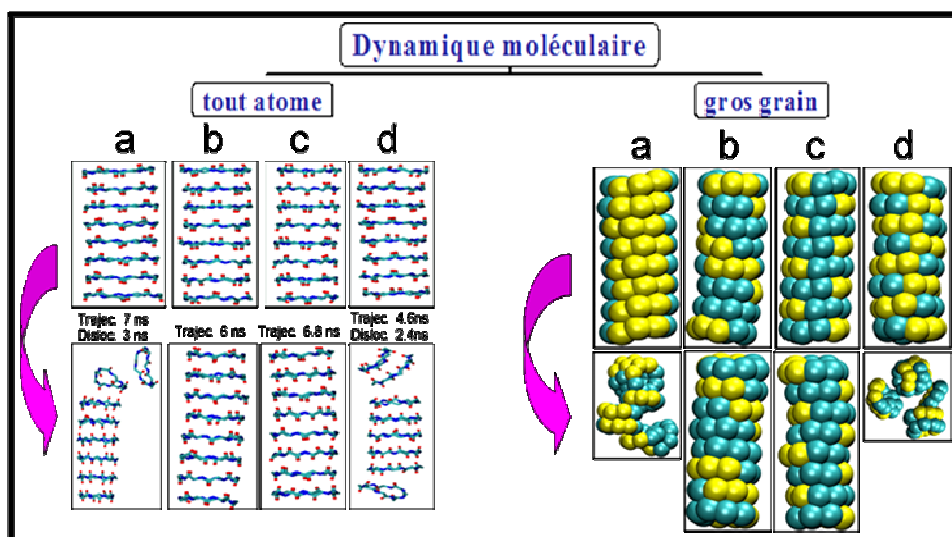
Ainsi, nos résultats montrent qu'à basse concentration, les CP2s se présentent sous forme des nanotubes parallèlement à la membrane (en accord avec l'expérience), alors qu'à grande concentration, les CP2s peuvent former éventuellement des nanotubes transmembranaires.

Il est très important de noter ici qu'en accord avec l'observation expérimentale [7], nos résultats montrent que la conformation la plus stable des CP2s à l'interface de la membrane est celle des nanotubes **amphipathiques**. Sachant que les CP2s peuvent s'organiser en quatre topos isomères de nanotubes (voir section 5.1.2), il est intéressant de savoir parmi ceux-ci quel est le nanotube le plus stable en solution.

Nous avons effectué des simulations de DM atomistique pour les quatre topos isomères en solution (Figure V-20) et avons trouvé que seuls deux topos isomères (b et c) sont stables, les autres (a et d) se désassocient dans une échelle du temps de l'ordre de nanoseconde (3 ns (a) et 2.4 ns (d)). La dégradation observée des deux nanotubes a et d est dû à l'interaction électrostatique défavorable entre les résidus Arg et Lys chargés positivement. Ces résultats sont retrouvés aussi par simulations de DM en représentation GG (Figure V-20).

L'arrangement des résidus chargés dans les nanotubes a et d réduit les interactions répulsives entre les résidus chargés car ces dernières s'interposent dans la structure. Par contre, cette interaction est conséquente dans les nanotubes c et b vu la proximité des résidus chargés.

Ainsi, les deux topos isomères b et c sont stables en solution aqueuse, alors que le topo isomère (a) amphipathique est le seul qui est stable à l'interface de la membrane (Figure V-20).



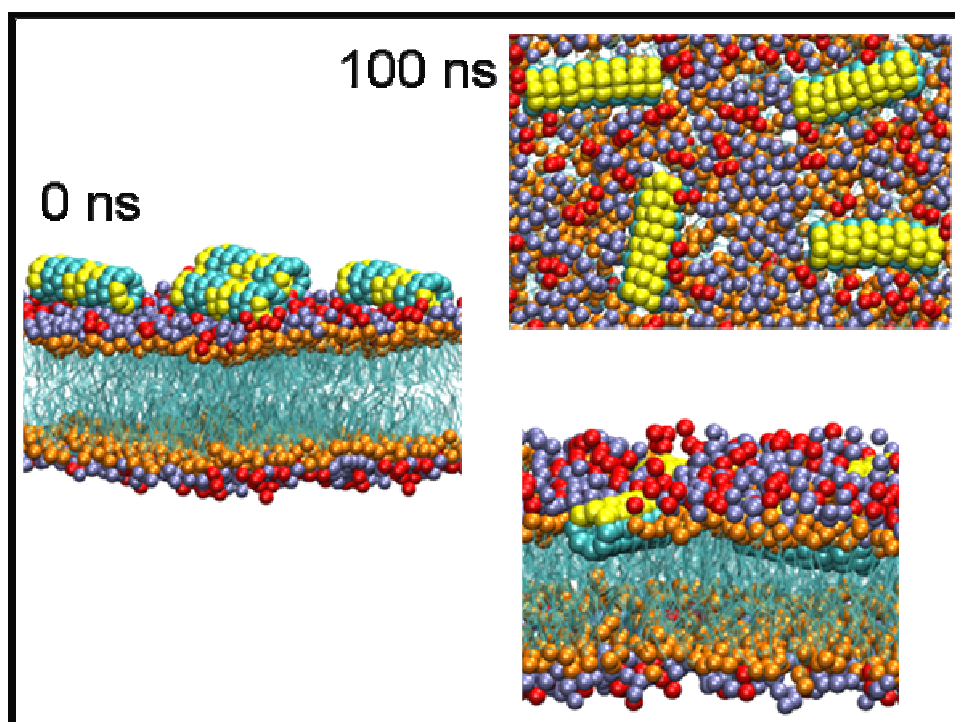
**Figure V-20** Résultats des DM tout atome et GG de la stabilité de quatre topos isomères en solution.

A la suite de ces résultats, il est intéressant de savoir si les nanotubes se transforment d'une conformation stable en solution vers une autre conformation stable à l'interface de la membrane. Nous avons préparé pour cela un système composé de 4 nanotubes (topo isomère b) neutralisés par d'ions  $\text{Cl}^-$  et placés auprès d'une membrane procaryote qui est équilibrée par d'ion  $\text{Na}^+$  (Figure V-21).

	membrane	Nanotube (top (b))	Eau	$\text{Na}^+$	$\text{Cl}^-$
<b>système</b>	440 pope 200 popg	Quatre de huit CP2s	9500	285	137

La simulation DM GG montre que les nanotubes (b) s'absorbent à l'interface de la membrane, puis se réorganisent de telle sorte leurs résidus hydrophobes s'orientent vers le cœur de la membrane et leurs résidus hydrophiles se mettent auprès des têtes polaires. (Figure V-20). 100 ns de simulation sont suffisantes pour que tous les nanotubes deviennent amphipathiques à l'interface de la membrane.

Ainsi, l'interaction électrostatique défavorable entre les résidus chargés dans le topo isomère (a) semble être compensée par les contre ions  $\text{Cl}^-$  et les charges négatives des sites des groupements de phosphate. Cette conformation est de plus stabilisée par l'interaction entre la partie hydrophobe du nanotube et les chaînes aliphatiques de la membrane. Ce type de comportement en passant d'une structure aléatoire dans la solution à la structure secondaire amphipathique à l'interface de la membrane est déjà observé pour d'autres PAMs naturels [106, 118, 255] et synthétiques [32, 106, 256, 257].

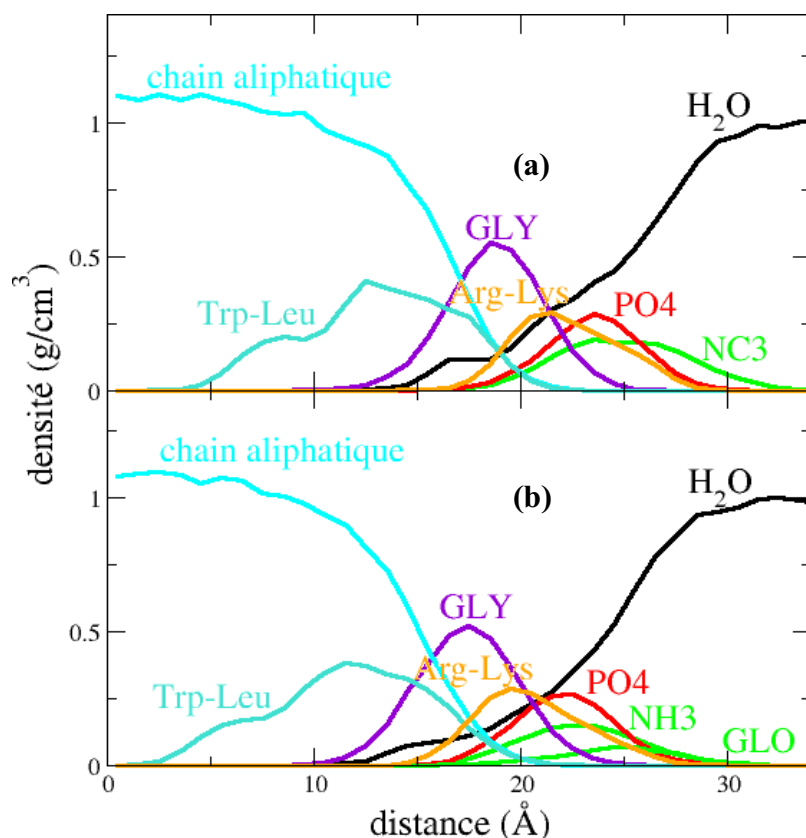


**Figure V-21** Représentation de l'interaction de quatre nanotubes chargés sous forme de tops isomères (b) avec une membrane procaryote. Droite conformation initiale et gauche conformation finale. Notez les réarrangements des résidus qui résultent en une conformation amphipathique du nanotube.

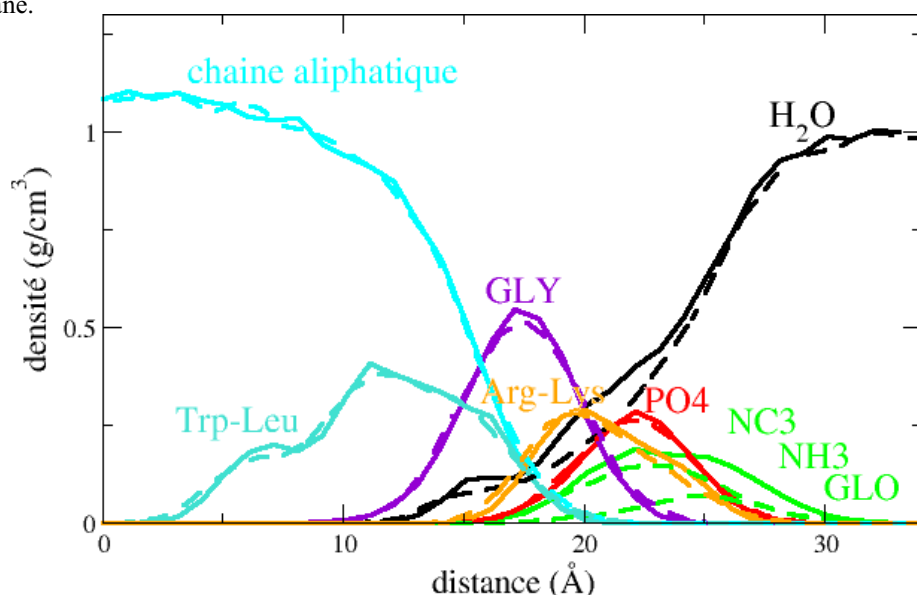
On a analysé la position des nanotubes amphipathiques à l'interface de la membrane dans les deux bicouches POPC et POPE/POPG. Nous avons reporté dans la Figure V-22 les profils de densité des sites des lipides et des nanotubes suivant l'axe perpendiculaire à la membrane. Notons que dans ces analyses, seuls les lipides à 15 Å des nanotubes sont été pris en compte. Les résultats montrent que les résidus chargés se localisent à coté des sites représentant les groupements de phosphate ( $\text{PO}_4$ ) dans les deux membranes. Par ailleurs, la partie chargée du nanotube semble être plus insérée vers le cœur hydrophobe dans le mélange de lipides POPE/POPG par rapport à la membrane POPC. Cependant, lorsqu'on a reporté les densités des composants de deux membranes (POPC, POPE/POPG) (Figure V-23), en décalant vers la gauche les profils de POPC par 1.5 Å, on a constaté que les profils de densité des composants deux membranes sont totalement superposés. Cette analyse montre également que les densités des acides aminés sont également inchangées d'un système à l'autre. Ainsi,



les résultats montrent que les nanotubes se positionnent de la même manière dans les deux membranes par rapport au corps hydrophobe et par rapport aux groupements de phosphate.



**Figure V-22** Profils de densité des composants des membranes POPC (a) et POPE/POPG (b), et des résidus hydrophobes (Trp et Leu) et chargés (Arg et Lys) des nanotubes amphipathiques selon la normale à la membrane.



**Figure V-23** Profils de densité des composants des membranes POPC (lignes continues) et POPE/POPG (pointillés), et des résidus des nanotubes amphipathiques selon l'axe z normal à la membrane. Les profils du premier système ont été traduits vers la droite pour faire coïncider les profils des groupements de phosphate.

### **5.4.3 Partition des CP2s à l'interface des membranes procaryotes**

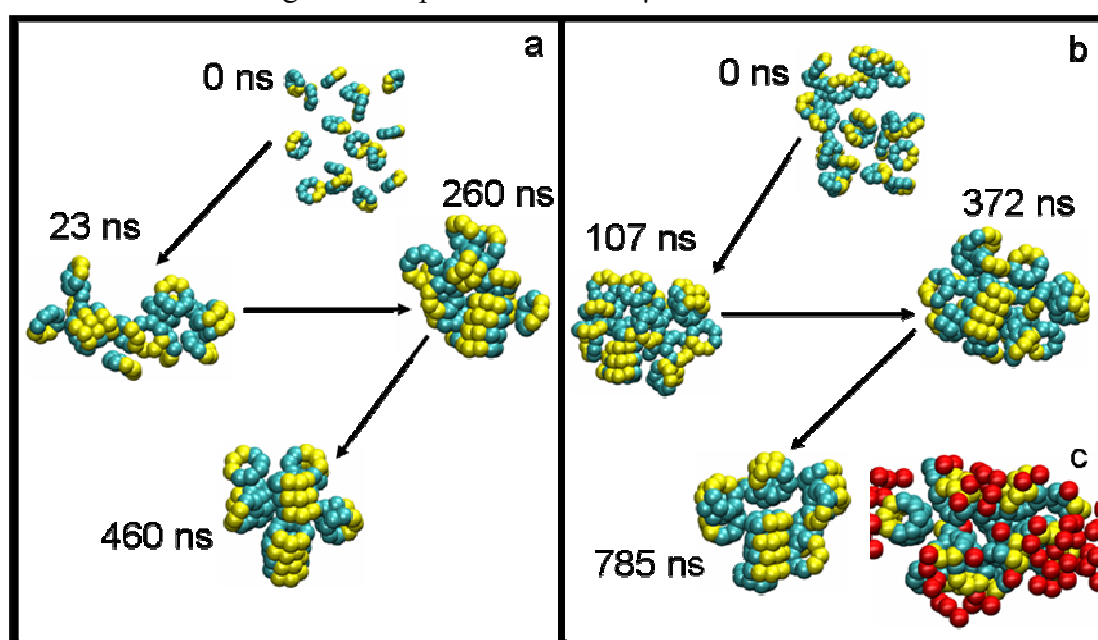
Rappelons que l'expérience a montré que les CP2s sont très actifs sur les membranes bactériennes gram+/- . Les résultats obtenus *in vitro* montrent que l'activité des CP2s est caractérisée par une CMI de 6 et 15  $\mu\text{g/ml}$  pour les bactéries gram+ et gram-, respectivement. Nous cherchons dans la suite à reproduire cette activité antibactérienne par simulations de DM GG pour caractériser le mode d'action des CP2s. On a considéré deux processus dans lesquels des clusters de CP2s (amas) préformés ou bien des CP2s individuels sont mis au contact des bicouches lipidiques.

### Auto assemblage des CP2s en solution aqueuse

Nous avons étudié d'abord l'auto assemblage des CP2s en solution aqueuse par simulation de DM. Nous avons préparé des systèmes de 16 et 24 CP2s solvatés par des molécules d'eau et neutralisés par d'ions  $\text{Cl}^-$ . Nous présentons dans la Figure V-24 des résultats relatifs à un système représentatif pour chaque concentration.

	CP2	Eau	$\text{Cl}^-$
<b>Système.1</b>	16	3838	49
<b>Système.2</b>	24	3838	102

Toutes les simulations de DM produisent des clusters constitués par des morceaux de nanotubes amphipathiques entourés par des cycles CP2s. Notons que l'association des CP2s se fait dans une échelle de temps de l'ordre de la centaine ns, alors que la réorganisation ordonnée des clusters exige des temps à l'ordre de la  $\mu\text{s}$ .



**Figure V-24** Auto assemblage des CP2s en solution aqueuse. Les cas (a) et (b) correspondent respectivement aux configurations de 16 et 24 CP2s. (c) est un cluster représentatif, entouré par des conterions  $\text{Cl}^-$  qui sont représentés par des sphères rouges.

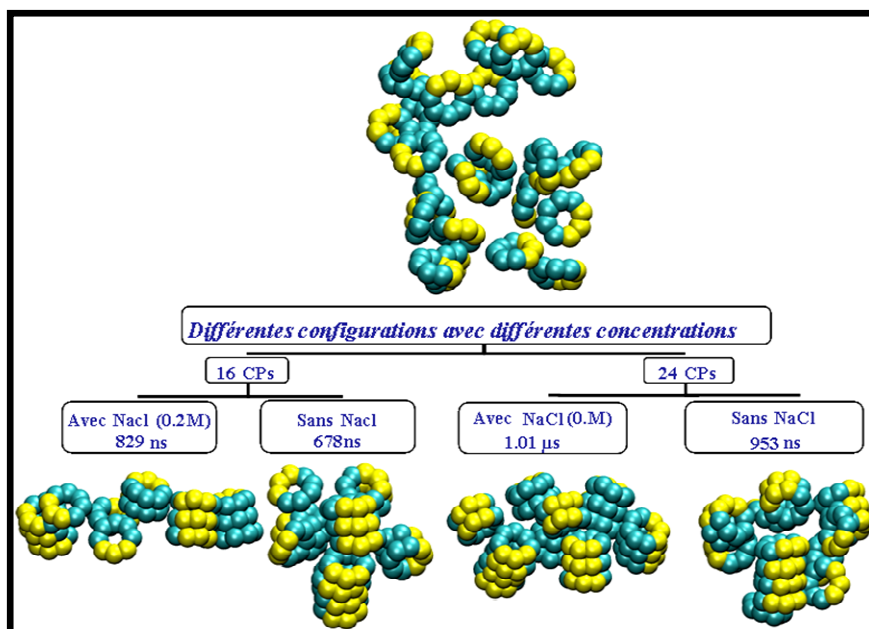
Dans les amas formés, les résidus chargés se localisent à la surface extérieure des clusters, alors que les résidus hydrophobes se situent préférentiellement au cœur de l'amas. Ainsi, les clusters sont caractérisés par une surface chargée positivement et un cœur hydrophobe bien

protégé. Cette conformation spécifique est généralement observée pour d'autres peptides amphipathiques qui sont capables de s'auto assembler en solution [258-260].

Par ailleurs, nous avons étudié par DM GG l'effet d'un excès d'ions sur le processus d'auto assemblage des CP2s en solution. Nous avons préparé comme les deux systèmes précédents de 16 et 24 CP2s avec une concentration de NaCl est d'environ 0.2 M.

	CP2	Eau	Cl <sup>-</sup>	[NaCl] M
<b>Système.1</b>	16	3838	49	0.2
<b>Système.2</b>	24	3838	102	0.2

Les résultats obtenus (Figure V-25) montrent que les amas formés à cette concentration saline ont une structure étendue et entourée par un nombre important d'ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, au contraire des clusters formés sans présence de NaCl. La force électrostatique générée par les ions placés autour des clusters semble (Figure V-25 (c)) jouer un rôle important dans la stabilité de ces derniers, même si leurs régions hydrophobes ne sont pas entièrement protégées.



**Figure V-25** Auto assemblage des CP2s en solution aqueuse sans ou avec la présence de 0.2 M de NaCl.

Ainsi, dans le cas des CP2s, la conformation des amas dépend de la contribution de deux effets opposés : l'interaction hydrophobe favorable et l'interaction électrostatique défavorable. Cette dernière est modulée par les contre ions Cl<sup>-</sup> (Figure V-25 (c)) et par la croissance de la taille de région hydrophobe, au contraire de certains peptides pour lesquels d'autres paramètres comme une grande concentration dans la solution et/ou un pH très basique jouent un rôle prépondérant [258].

Shai, Y a suggéré que les PAMs doivent exposer leurs régions hydrophobes vers le cœur hydrophobe de la membrane au cours de l'interaction avec cette dernière pour produire leur activité antimicrobienne. Dans le cas des monomères, cette transformation se reproduit par la formation de structure secondaire à l'interface de la membrane [137, 256, 261], et dans le cas des oligomères, elle se réalise par la dissociation et la réorganisation de ces derniers en mettant la région hydrophobe de PAMs vers le cœur de la membrane et la partie hydrophile

auprès des têtes polaires. Cette réorganisation d'oligomères conduit souvent au processus dit carpet-like [112, 113].

Partant de l'hypothèse de Shai, et les suggestions expérimentale [7] (spectroscopie d'IR) et théorique [262] (simulation de DM), ainsi que nos études de l'auto assemblage des CP2s en solution, on préconise un mécanisme similaire pour les cycles peptidiques chargés ici étudiés.

### Les clusters ou les CP2s individuels à l'interface d'une membrane procaryote

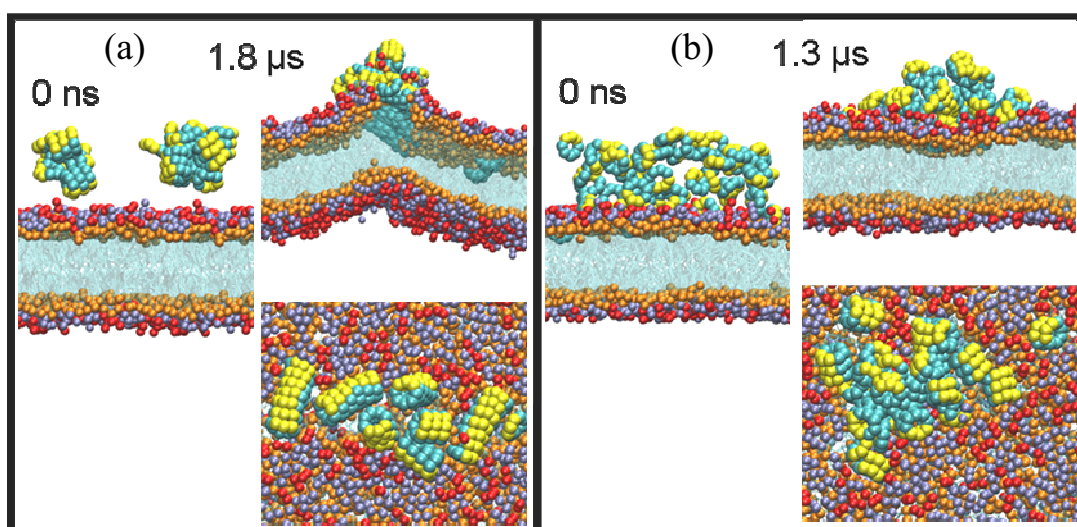
Pour étudier les deux processus de partition des CP2s auprès de la membrane, nous avons préparé d'abord un système composé de deux clusters (a) et (b) neutralisés par d'ions Cl<sup>-</sup> (Figure V-26 (a)) placés initialement au voisinage de la membrane procaryote (~8 Å). La concentration de CP2s par rapport aux lipides présentée dans le système est  $\approx 1/15$  CP/Lip.

	membrane	Cluster	Eau	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
système	440 pope 200 popg	Un de 16 CP2s Un de 24 CP2s	9500	285	171

Dès les premières ns de simulation de DM, les deux clusters s'absorbent à la membrane avec une grande affinité qui est gérée principalement par la force électrostatique, qui n'est pas gouvernée seulement par la charge de lipide et du cluster, mais aussi par la présence de contre ions Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> auprès des têtes polaires.

A partir de 750 ns, les clusters sont regroupés et réorganisés en nanotubes amphipathiques (de 6 et 7 CP2s) présentés parallèlement à l'interface de la membrane (mode carpet-like) (Figure V-26 (a)). Cette concentration et l'organisation des nanotubes amphipathiques imposent une courbure positive de surface de la membrane. Cette courbure, pour le modèle carpet-like a été observée aussi avec la cecropin P1 [144, 145], LL-37 [263, 264], dermaseptin S [265, 266] et ses analogues [267, 268].

Nous n'avons détecté aucune évolution du système au-delà de 900 ns, sauf quelques réarrangements de CP2s en morceaux des nanotubes, même lorsque la simulation a été poursuivie jusqu'à 1,8  $\mu$ s.



**Figure V-26** Représentation de l'interaction des clusters (a) et des CP2s individuels (b) avec une memb-proca.

---

Ensuite, nous avons également préparé un système pour étudier l'interaction de CP2s individuels avec une membrane procaryote. Les CP2s sont neutralisés par d'ions  $\text{Cl}^-$  et placés aléatoirement à l'interface de cette dernière. La concentration de CP2s par rapport aux lipides est identique à celle de l'étude précédente (1/15 CP/Lip).

	membrane	CP2s	Eau	$\text{Na}^+$	$\text{Cl}^-$
système	440 pope 200 popg	40	10000	285	171

La simulation de DM de ce système montre que la majorité de CP2s s'auto assemble auprès des têtes polaires, puis interagit avec la membrane sous forme d'amas. D'autres CP2s interagissent d'abord individuellement avec la membrane avant de se réorganiser à côté des têtes polaires avec le cluster (Figure V-26 (b)).

Au bout de 1.28  $\mu\text{s}$  de simulation, on n'observe que quelques réorganisations de CP2s pour former des bouts de nanotubes amphipathiques dans le cluster ou à l'interface de la membrane, on n'a détecté aucune perturbation de la membrane avec cette organisation des CP2s.

En comparant les deux simulations, on constate qu'avec la même concentration (1/15 CP/Lip) l'interaction d'un ensemble des nanotubes amphipathiques avec la membrane induit une déformation à cette dernière, alors qu'un cluster de CP2s et des bouts de nanotubes amphipathiques n'induisent aucune déformation. Ceci semble indiquer que la présence de nanotubes amphipathiques de CP2s est importante pour déformer la membrane.

Note que la simulation du système (a) a été poursuivie jusqu' à  $\sim 1\mu\text{s}$  après déformation de la membrane sans observer une évolution de sa courbure, ce qui suggère que la concentration 1/15 CP/Lip est insuffisante pour détruire la membrane.

## **Conclusion**

A ce stade, l'étude permet de déduire les trois points suivants :

- La majorité des CP2s interagissent avec la membrane sous forme des clusters caractérisés par un cœur hydrophobe et une surface chargée positive ;
- La réorganisation de clusters à l'interface de la membrane conduit à la formation de petits nanotubes amphipathiques présentés dans un mode carpet-like ;
- La taille et la distribution des nanotubes à l'interface de la membrane, sont nécessaires pour perturber la surface membranaire.

Nous chercherons dans la suite à savoir à quel point l'interaction des nanotubes amphipathiques avec la membrane procaryote à différentes concentrations peut induire une perturbation majeure de la bicouche lipidique.

Nous avons préparé d'abord un système composé de vingt fragments de nanotubes amphipathiques, formés par trois CP2s, neutralisés par des ions  $\text{Cl}^-$  et placés auprès d'une membrane procaryote qui est équilibrée initialement en présence d'ions  $\text{Na}^+$ . Ensuite, nous avons additionné au système des fragments de nanotubes amphipathiques au cours de la simulation, ce qui a résulté en des configurations avec des concentrations ioniques différentes :

	Membrane	Na <sup>+</sup>	CP2s	Cl <sup>-</sup>	Eau	CP/Lip	[Na <sup>+</sup> ] et [Cl <sup>-</sup> ] 10 <sup>-4</sup> M
<b>Système (a)</b>	914 pope 391 popg	558	60	257	29000	1/22	2 et 0.8
<b>Système (b)</b>	914 pope 391 popg	558	129	552	36300	1/10	1.8 et 1.5
<b>Système (c)</b>	914 pope 391 popg	558	203	870	59200	1/7	1.2 et 1.8
<b>Système (d)</b>	914 pope 391 popg	558	233	998	58500	1/5	0.7 et 1.3

**Tableau V-2** Compositions de quatre configurations qui correspondent à quatre concentrations de CP/Lip. Les concentrations d'ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> sont calculées loin de la membrane (en solution) pendant les dernières ns de la simulation.

Nous avons choisi d'utiliser des fragments de trois CP2s parce que les deux premières études (Figure V-26) ont montré que l'auto assemblage de trois CP2s sous forme d'un nanotube est très fréquente.

Au début de simulation correspondant à la concentration de 1/22 CP/Lip, on a constaté, comme dans les simulations précédentes, une grande affinité des CP2s vers la membrane procaryote qui se traduit par l'absorption de tous les fragments à l'interface de la membrane. Au cours de la simulation, certains fragments se sont regroupés à l'interface de la membrane, augmentant ainsi leur concentration locale ce qui a résulté à partir de 33 ns en une perturbation légère à la membrane. D'autres fragments ont continué à interagir individuellement avec la membrane (Figure V-27 (a)). La simulation a été poursuivie jusqu'à 165 ns sans détecter aucune évolution du système.

Lorsque nous avons rajouté des CP2s au système, augmentant ainsi la concentration à 1/10 CP/Lip, nous avons constaté une grande déformation, qui génère une courbure positive de la membrane (bosse). Au bout de 250 ns de simulation, on n'observe plus l'évolution de cette conformation, à l'exception de quelques réorganisations de fragments de CP2s formant des nanotubes amphipathiques plus longs à l'interface de la membrane, bien que la simulation fut poursuivie jusqu'à 823 ns.

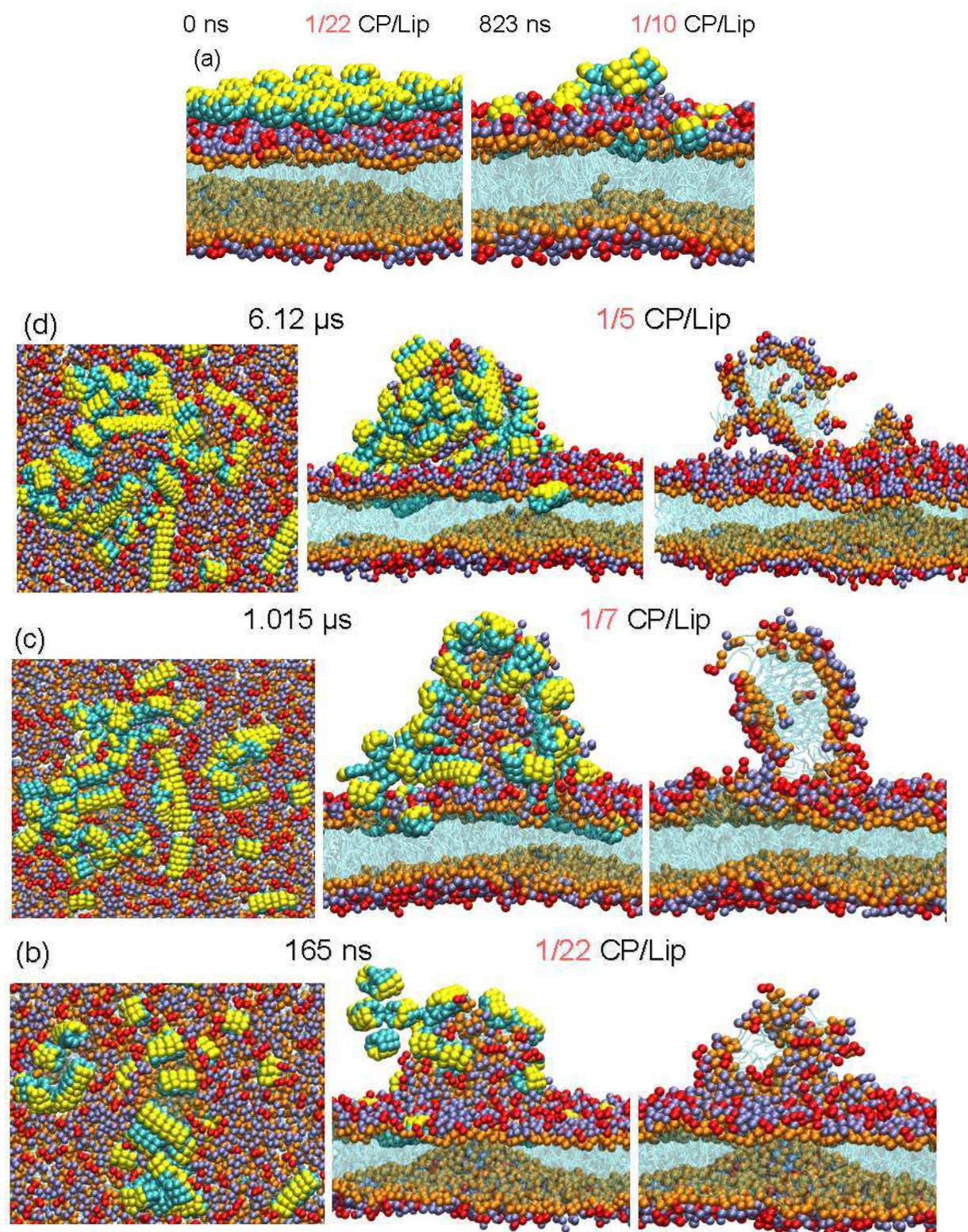
L'augmentation de la concentration de CP2s au-delà, jusqu'à 1/5 CPs/Lip, a provoqué clairement une déformation irréversible de la membrane qui se traduit par la formation d'une micelle de phospholipide à l'interface de la membrane, comprenant des lipides qui se sont détachés de la bicouche lipidique (Figure V-27 b, c et d).

Ainsi à 1/7 CP/Lip (Figure V-27 c), la déformation de la membrane se manifeste par une protubérance de lipides s'accumulant autour des peptides cycliques atteignant ~125 Å par rapport à l'interface de la membrane avant qu'elle se stabilise à 77 Å. Il est important de noter ici qu'une telle protubérance devrait être observée par des méthodes telles que l'AFM (microscope à force atomique).

La réorganisation des lipides et des peptides à cette concentration forme une micelle riche en lipides qui reste cependant, dans les échelles de temps examinées toujours attaché à la membrane (panel du bas). La simulation montre qu'à cette concentration, les peptides continuent de s'assembler, formant un nombre important des nanotubes amphipathiques. Certains de ces nanotubes contiennent de six à douze CP2s. Au-delà de la 1 µs, on n'observe



plus de réarrangements des CP2s, même quand la simulation est poursuivie jusqu'à 3  $\mu$ s (Figure V-27 (c)).

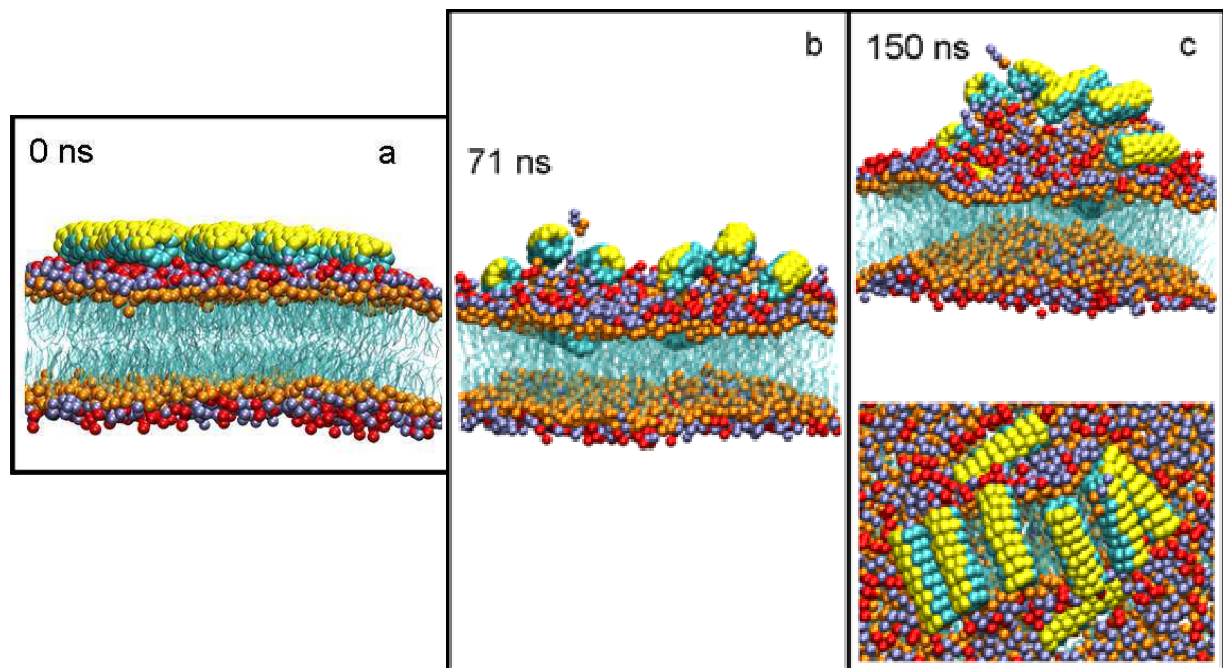


**Figure V-27** Interaction de petits fragments des CP2s à différentes concentrations avec une membrane procaryote. Les cas (a), (b), (c) et (d) correspondent respectivement aux concentrations de  $1/22$ ,  $1/10$ ,  $1/7$  et  $1/5$  cycle peptidique par lipide. Dans chaque cas, l'image de la gauche est une vue verticale, l'image du milieu et de la droite est respectivement une vue horizontale avec et sans nanotubes.

A plus haute concentration (1/5 CP/Lip), nous observons un processus similaire, mais dans lequel maintenant, la réorganisation des lipides et des fragments de nanotubes permet un détachement progressif de la micelle. Au bout de 6.12  $\mu$ s en effet, cette dernière reste attachée à la membrane seulement par deux lipides (Figure V-27 (d)). Cette micelle est formée par 60 POPE et 23 POPG, entourés de 60 CP2s.

Nous pouvons ainsi résumer l'interaction des CP2s avec la membrane procaryote de manière suivante :

Les CP2s s'adsorbent d'abord à l'interface de la membrane formant des nanotubes amphipathiques. Ces derniers provoquent une courbure positive de la membrane qui dépend de leur concentration et de leur distribution à l'interface. Une reptation des lipides vers les amas de peptides situés à l'interface de la membrane leur permet de s'extraire de la bicouche lipidique. Notons qu'une telle déformation a également été observée aussi lorsqu'on a étudié l'interaction de nanotubes amphipathiques composés de huit CP2s avec la membrane procaryote (memb-proca-I, concentration de 1/10 CP/Lip). La trajectoire de 80 ns de simulation de DM GG (Figure V-28) a permis de constater un regroupement en série de six nanotubes placés parallèlement à l'interface de la membrane. Il n'est pas clair cependant si cette configuration est due aux conditions de simulation (membrane de petite taille, NTPs positionnés en parallèle, la taille des nanotubes ...). Il est clair cependant qu'à haute concentration (concentration critique), les fragments de nanotubes sont capables de capsuler la bosse lipidique sous forme d'une micelle et la libérer à l'interface de la membrane générant alors une lacune irréversible dans celle-ci.



**Figure V-28** Interaction de huit NTPs amphipathiques longs (concentration de 1/10 CP/Lip ) avec une memb-proca.

### **Discussion :**

Les résultats obtenus dans cette section montrent que le mode carpet-like avec libération des micelles sans pénétration de la membrane et sans formation des pores transitoires, semble être le mécanisme d'action antibactérienne des cycles peptidiques chargés CP2s. Ce modèle a



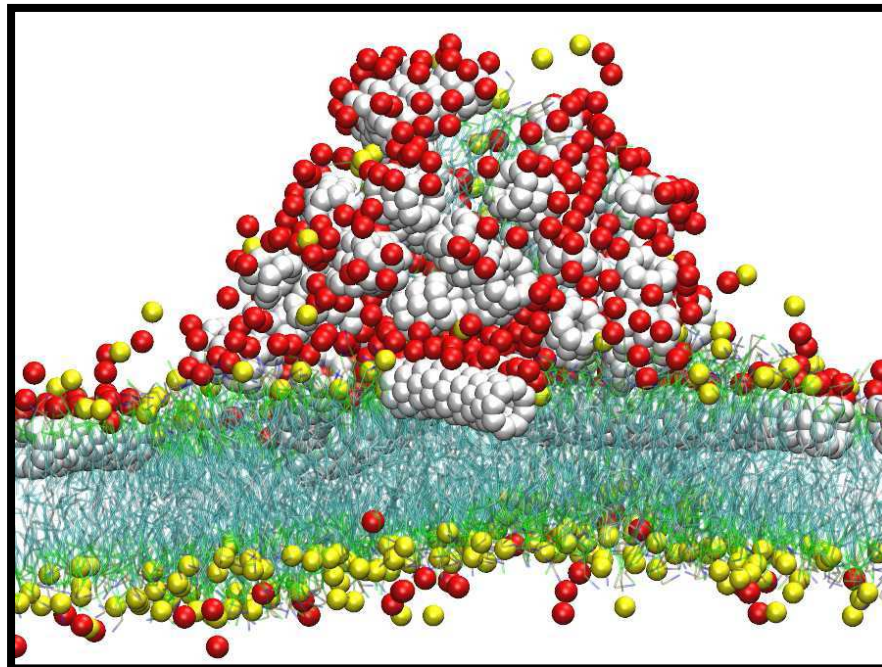
---

été déjà proposé pour décrire le mode d'action de plusieurs PAMs [112, 113]. Nous noterons en particulier les cas de :

**La gramicidin S**, qui provoque à basse concentration une réduction remarquable de l'épaisseur de la membrane cytoplasmique, alors qu'à grande concentration, elle produit une dépolarisation de la membrane qui conduit à une déformation irréversible de cette dernière [149, 269, 270]. Cette déformation augmente la formation de 'particules' phospholipidiques dans la solution et par conséquent la perméabilité de la membrane [96, 97, 148] ;

**La cecropin P1**, qui, à basse concentration s'adsorbe parallèlement de la membrane sans s'insérer à l'intérieur de celle-ci (mode carpet-like). Lorsque, la concentration atteint un seuil critique, le peptide déstabilise un ensemble de phospholipides membranaires avant de l'extraire [144-146].

La concentration d'ions  $[Na^+]$  et  $[Cl^-]$  loin de la membrane pendant aux dernières sept ns dans chaque simulation, qui correspondent à la concentration d'ions en solution, sont rapportées dans le tableau V-2. D'après ces calculs et nos observations des trajectoires (Figure V-29), on a constaté que les ions  $Na^+$  se trouvent majoritairement (1) à l'interface de la membrane et contribuent à neutraliser la charge globalement négative de cette dernière, (2) à une concentration de l'ordre de  $1.5 \cdot 10^{-4}$  M en solution, et (3) (l'ordre d'une vingtaine) autour de la micelle. Les ions  $Cl^-$  sont principalement adsorbés autour de la micelle, et à une concentration de l'ordre  $1.2 \cdot 10^{-4}$  M en solution. Note que dans la dernière configuration (système d), la micelle est caractérisée par un grand nuage ionique ( $510 Cl^-$  et  $24 Na^+$ ) dans un rayon de 18 Å. Ces ions sont absolument nécessaires à la fois pour neutraliser la charge des CP2s et des lipides (POPE, POPG), et aussi pour stabiliser la forme de la micelle en solution aqueuse.



**Figure V-29** Représentation de l'interaction de petits fragments de CP2s à concentration  $CP2s/Lip = 1/5$  avec la memb-proca. Les lipides sont représentés sous forme des bâtons avec la couleur suivant le nom de chaque site d'interaction. Les CP2s sont représentés seulement par les sites du squelette comme des sphères blanches. Les ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  sont représentés respectivement par des sphères jaunes et rouges. Les sites d'eau sont omis afin de simplifier la représentation.

Dans l'ensemble des simulations, la concentration ionique en solution est largement inférieure aux concentrations physiologiques. Notons cependant que la concentration en  $[\text{Na}^+]$  est très inférieure à celle qui inhibe l'activité antimicrobienne de peptides comme la défensine- $\beta$  1 (150 mM) [271, 272] et la défensine- $\beta$  2 (125 mM) [273, 274], et la Thanatin (500 mM) [275].

La perméabilité de la membrane n'a pas été observée dans l'échelle du temps simulée même après la libération de la micelle phospholipide à l'interface de la membrane. Au vu des résultats expérimentaux, cet inachèvement du processus dans notre simulation peut être dû à plusieurs effets. Tout d'abord, il est probable que cela nécessite une échelle du temps supérieure à celle effectuée dans notre simulation et/ou une concentration supérieure à  $\text{CP/Lip} = 1/5$ . Ensuite, on pourrait imaginer que la libération d'une micelle doit se reproduire plusieurs fois avant d'induire éventuellement une perméabilité de la membrane. On note en effet que, au cours de la libération de la micelle phospholipide avec la concentration ( $\text{CP/lip} = 1/5$ ), on a observé une apparition progressive d'une nouvelle protubérance dans la couche supérieure de la membrane. Finalement, d'autres paramètres dépendant cette fois du champ de force GG, notamment la représentation correcte des molécules d'eau pour reproduire leurs moments dipolaires qui jouent un rôle primordial dans la distribution des molécules d'eau à l'interface de la membrane, ainsi que leurs diffusions à travers de cette dernière peuvent jouer un rôle. Ces comportements des molécules d'eau peuvent être nécessaires pour induire la rupture de la membrane.

## V-5 Sélectivité membranaire aux CP2s

Bien que la sélectivité de la membrane procaryote aux CPs chargés apparaisse manifestement dans les résultats *in vitro* et *in vivo* de l'équipe de Ghadiri, ces cycles peptidiques ont aussi une activité hémolytique, mais celle-ci exige une grande dose ( $\text{HD}_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ) de peptides. Nous voulons étudier ici par simulation de DM GG cette activité, afin de déterminer la relation entre les propriétés de la surface, l'activité des nanotubes et la sélectivité membranaire.

Afin de comparer les effets des CP2 sur les membranes eucaryotes à ceux sur les membranes procaryotes, nous avons préparé un système avec les mêmes conditions de simulation citée dans la Figure V-27 (a), sauf que dans ce cas on utilise une membrane POPC. Ce système est composé initialement de vingt fragments amphipathiques de 3 CP2s placés à l'interface d'une membrane eucaryote :

	Membrane	CP2s	$\text{Cl}^-$	Eau	CP/Lip	$[\text{Cl}^-] 10^{-4} \text{ M}^{(1)}$
<b>Système (a)</b>	1305 popc	60	257	29000	1/22	0.5
<b>Système (b)</b>	1305 popc	129	552	36300	1/10	$\sim 1$

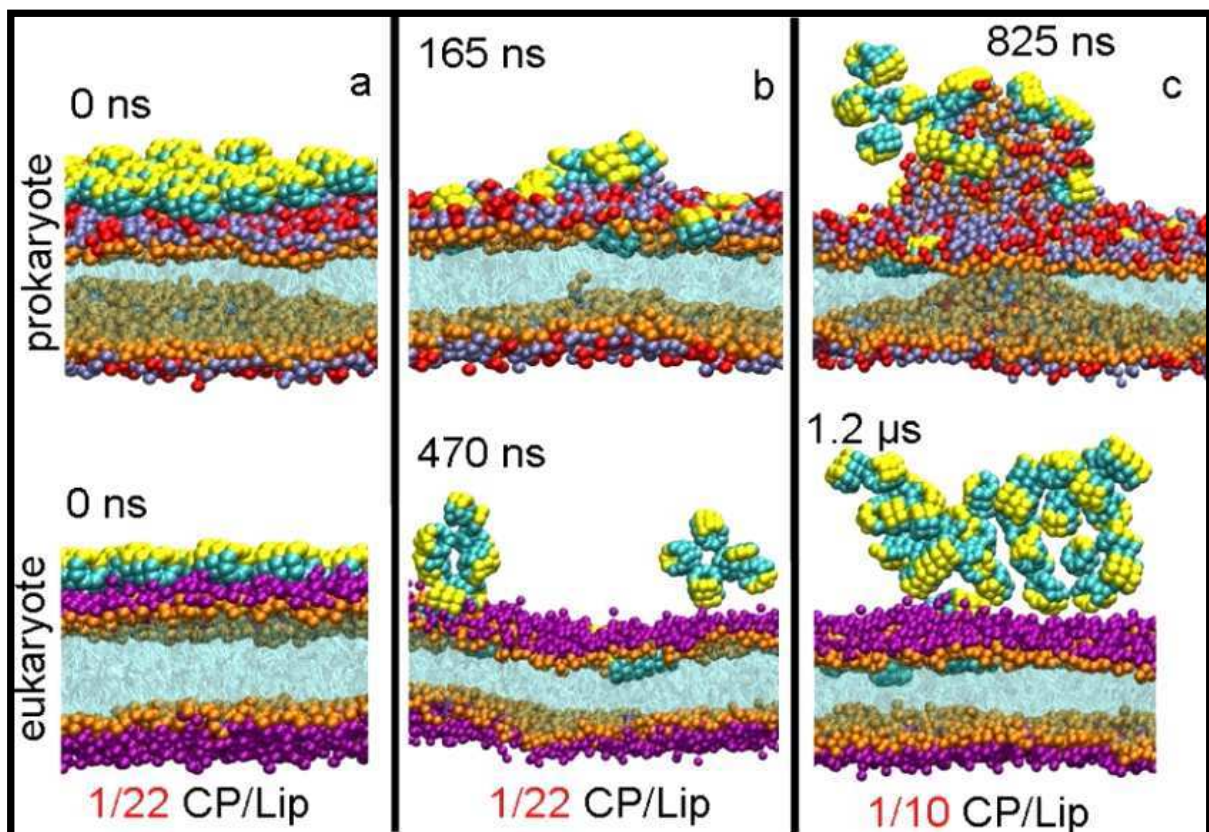
<sup>(1)</sup> la concentration d'ions  $\text{Cl}^-$  est calculée loin de la membrane (en solution) pendant les dernières ns de la simulation.

La simulation de DM menée à une concentration de 1/22 CP/Lip montre que la majorité des fragments de nanotubes se regroupent en deux amas près des têtes polaires PC avant de s'absorber partiellement à la membrane, tandis que d'autres morceaux interagissent individuellement avec les têtes polaires PC avant de s'assembler en nanotubes amphipathiques si leur distribution à l'interface de la membrane est favorable. Au delà de 86

ns, on ne détecte aucune réorganisation des peptides près ou dans la membrane, même quand la simulation est poursuivie jusqu'à 470 ns.

Rappelons qu'à la même concentration des peptides (1/22 CP/Lip) placés auprès de la membrane procaryote, les CP2s sont tous adsorbés à la membrane rapidement (35 ns), et que certains fragments sont regroupés à l'interface créant une perturbation notable de la membrane (Figure V-30 (b)).

Lorsque la concentration en peptides fut augmentée à 1/10 CP/Lip (Figure V-30 (c)), on a observé au cours de simulation que les CP2s ont continué de former de plus grand amas à l'interface de la membrane eucaryote, à l'exception de quelques fragments interagissant avec la membrane. En contraste, une telle concentration de peptides auprès de la membrane procaryote induisit une courbure positive de la surface de la membrane dès 280 ns de simulation, la configuration correspondante indiquant que tous les fragments sont en interaction directe avec la membrane.



**Figure V-30** Interaction des morceaux nanotubes des CP2s avec la memb-proca et memb-euca.

L'étude montre ainsi que les CP2s forment des nanotubes amphipathiques à n'importe quelle interface membranaire. La concentration de CP2s nécessaire pour perturber la membrane procaryote semble ainsi être plus petite par rapport à celle nécessaire à perturber la membrane eucaryote. La grande affinité entre la membrane procaryote et les clusters de CP2s résulte principalement des interactions électrostatiques qui favorisent l'absorption et la stabilité des nanotubes auprès des têtes polaires. La membrane procaryote contient en effet des lipides POPG chargés négatives qui sont susceptibles d'interagir fortement avec les

---

clusters chargés positivement, contrairement à la membrane eucaryote qui est formée uniquement par des lipides zwitterioniques.

Notons que, les contre ions  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{Na}^+$  jouent un rôle important à la fois pour compenser les charges de la membrane ou des clusters, mais aussi pour moduler l'interaction des clusters avec les têtes polaires des lipides. Une meilleure caractérisation de ces effets nécessite des études supplémentaires. Les simulations pour d'autres distributions de fragments de CP2s auprès de la membrane eucaryote sont en cours, afin de mieux caractériser leur mode d'action hémolytique.

Une comparaison directe entre la concentration de CP2s utilisés dans la simulation avec la membrane procaryote (membrane eucaryote) (Figure V-30) et la CMI (dose hémolytique) est irraisonnable. En effet, *in vitro* les CP2s se trouvent d'abord dans une solution aqueuse qui détermine leur concentration (CMI ou DH). Ensuite, après l'addition des cellules bactériennes dans la solution, les CP2s migrent vers les cellules, et diffusent à travers leurs parois externes pour arriver à la membrane plasmique. Finalement, les CP2s interagissent avec cette dernière (points de départ dans nos simulations), en augmentant sa perméabilité, en provoquant alors la mort de la cellule. Donc, la CMI ou DH est déterminé en fonction du volume de la solution en tube à essai (en ml), mais dans nos simulations, on étudie l'interaction locale d'un certain nombre de CP2s avec la membrane plasmique. Ce qui montre que, le rapport (CP/Lip) utilisé dans nos simulations est difficilement comparable à la concentration des CP2s en solution globale (CMI ou DH).

## **V-6 Un autre type de cycle peptidique**

La charge totale des cycles peptidiques ne semble pas être l'unique facteur déterminant l'activité de ces objets. En effet, les résultats obtenus par l'équipe de Ghadiri *in vitro* montrent que, les CPs de séquence  $[-(\text{D-Lys-Leu})_4]$  (CP3s) sont inactifs contre les bactéries malgré leur charge +4e.

Ghadiri *et al.* ont suggéré que la suppression de l'activité de CP3s est due probablement à leur séquence peptidique qui ne favorise pas la formation des nanotubes dans la membrane. L'optimisation du champ de force GG (Lys et Leu) nous permet de vérifier directement cette hypothèse.

### **Auto assemblage des CP3s en solution**

Nous avons étudié d'abord l'auto assemblage des CP3s en solution aqueuse, en considérant des systèmes suivants :

	CP2s	Cl <sup>-</sup>	Eau
<b>Système.1</b>	16	91	3838
<b>Système 2</b>	24	137	3838

Pour l'ensemble des simulations de DM GG, on a constaté que les CP3s ne s'auto assemblent pas en solution pour former des amas compacts ou des petits cristallins de nanotubes, comme l'on avait observé avec les CP1s et CP2s, bien même que certaines simulations ont été poursuivies jusqu'à 500 ns (Figure V-31). Ce résultat n'est pas surprenant vu que l'agencement des résidus chargés dans la séquence des cycles donne lieu à une

---

interaction électrostatique très défavorable entre les CP3s dans l'arrangement en structure cylindrique.

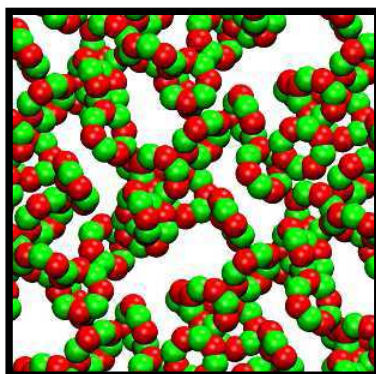


Figure V-31. Représentation de l'interaction des CP3s en solution.

Sachant qu'il existe des PAMs qui ne s'auto assemblent pas en solution mais qui sont actifs contre les bactéries [113, 256], et au vu des résultats précédents, nous avons voulu savoir si l'interaction des CP3s avec une membrane procaryote peut favoriser leur auto assemblage ?

### **CP3s à l'interface d'une membrane POPE-POPG**

Pour répondre à cette question, nous avons préparé un système constitué de 40 CP3s neutralisés par d'ions Cl<sup>-</sup> et placés aléatoirement au voisinage de l'interface de la membrane procaryote (Figure V-32).

	Membrane	CP3s	Eau	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
système	440 pope 200 popg	40	10000	285	228

Nous avons effectué une simulation de DM d'une durée de plus de 500 ns mais n'avons détecté aucun d'auto assemblage des CP3s pour former des fragments de nanotubes ni près des têtes polaires, ni à l'interface de la membrane (Figure V-32). Bien que les CP3s interagissent avec la membrane, ils ne semblent pas pouvoir s'ancrer à l'interface probablement parce qu'ils ne possèdent pas proprement dit de caractère d'amphipacité. Rappelons que ce dernier est important pour stabiliser les CPs chargés à l'interface de la membrane. Comme nous l'avons souligné précédemment (chapitre de l'action antimicrobienne), la suppression l'un de cinq caractères des peptides antimicrobiens : conformation, charge, amphipacité, angle polaire ou hydrophobicité résulte souvent en l'altération de l'action antimicrobienne.

Ainsi par exemple des résultats similaires ont été reportés par Dathe *et al.* concernant l'activité antimicrobienne de la maganine [110]. Cette dernière augmente progressivement lorsque la charge du peptide augmente de +3 à +5. Au contraire, le passage de la charge de +6 à +7 provoque une diminution de l'action antimicrobienne et une augmentation significative de l'action hémolytique. Les auteurs ont suggéré que la suppression de l'activité de peptide maganine est due à la réduction de la région hydrophobe dans le peptide.

Ainsi, l'arrangement des résidus chargés dans la séquence peptidique est aussi important que la charge nette de PAMs ou d'autres caractères de peptides antimicrobiens.



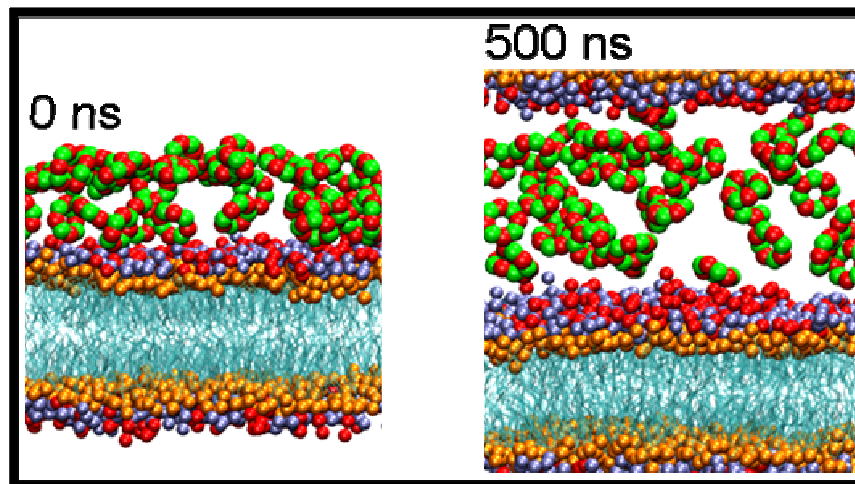


Figure V-32 Représentation de l'interaction des CP3s libres avec la memb-proca.

Pour conclure, l'inactivité de CP3s est due à leur séquence peptidique qui ne possède pas le caractère d'amphipacité leur permettant de s'auto-assembler ni de stabiliser de nanotubes des CPs chargés à l'interface de la membrane. Notons que, ces deux processus sont primordiaux dans la réalisation de l'action antibactérienne de ces CPs chargés.

## **V-7 Extension du champ de force aux peptides linéaires**

Les cycles peptidiques s'auto organisent en nanotubes peptidiques grâce au réseau de liaisons d'hydrogène qui se forme entre les groupes carbonyles d'une unité et les groupes amines de l'unité contiguë [2]. Dans le modèle GG, tous ces groupes de chaque acide aminé, y compris le carbone- $\alpha$ , sont représentés par un seul site d'interaction (P). Dans nos études précédentes, nous avons optimisé les interactions à distance de vdw entre ces sites dans la structure des CP1s et CP2s. Ceci suggère que les interactions entre les sites du squelette rendent compte de ces liaisons d'hydrogène.

Afin de tester la '*transférabilité*' du champ de force optimisé à d'autres structures peptidiques, nous chercherons ici à étudier le repliement et la stabilité de peptides hélicoïdaux à l'échelle GG.

Plusieurs auteurs ont utilisé des simulations de DM GG pour étudier l'interaction de peptides [20-22, 213] et/ou de protéines [18, 211, 212, 214, 231] avec des membranes. Or, les champs de force GG proposés actuellement pour les acides aminés ne sont pas capables de produire le repliement de structures secondaires en hélices. Ces structures sont toujours pré définies et figées par des liaisons non-physiques entre les sites du squelette d'une séquence [20, 21, 214] ou par des contraintes sous forme de potentiel de torsion [18, 22, 231].

Nous nous intéresserons pour notre part aux polypeptides composés particulièrement des mêmes acides aminés que ceux dont nous avons optimisés (Leu, Trp, Lys et Arg), qui présentent une structure en hélice- $\alpha$  à l'intérieur ou à l'interface de la membrane.

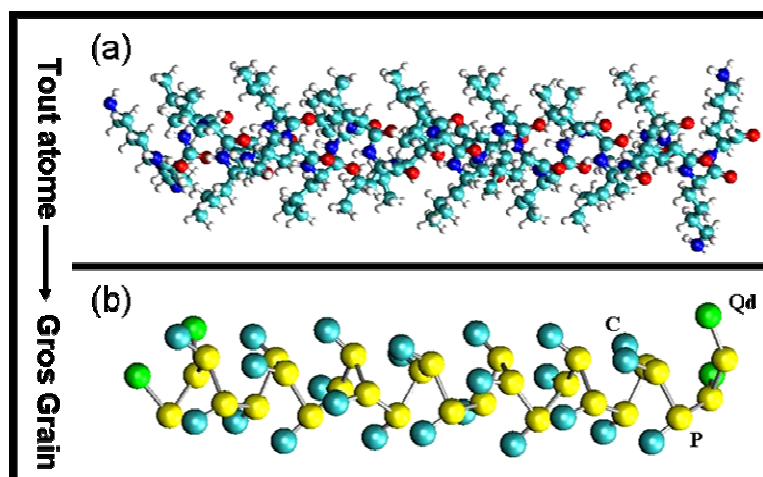
Le peptide synthétique Acetyl-Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>-Ala-amide et ses analogues sont de très bons modèles d'hélice- $\alpha$  transmembranaire [276-280]. Ces peptides sont formés par une

---

longue région hydrophobe (Leu<sub>24</sub>) qui favorise fortement la formation d'une hélice- $\alpha$ , et par deux extrémités chargées qui permettent d'éviter l'agrégation latérale des peptides et maintenir la conformation d'une hélice- $\alpha$  transmembranaire.

Pour les peptides s'adsorbant à l'interface des membranes, nous avons choisi ceux étudiés par Shai *et al.* Ces sont des petits peptides linéaires formés par des Leu (L) et des Lys (K) (ratio L/K = 9/6) et qui présentent trois structures différentes à l'interface d'une membrane en fonction de l'arrangement de deux résidus dans leur séquence [256, 281, 282]. Pour les trois séquences différentes, les structures obtenues à l'interface de membranes sont soit amphipathique (Amp) [LKLLKKLLKKLLKLL-NH<sub>2</sub>], brouillée (Scm) [KLKLLKLLKLLKLLK-NH<sub>2</sub>] et ségrégué (Seg) [KKKLLLLLLLLLLLKKK-NH<sub>2</sub>]. Notons au passage que ces peptides possèdent une activité antimicrobienne et hémolytique remarquable, et que l'introduction d'un tiers de la chiralité D dans les trois structures augmente leur activité antimicrobienne et réduit leur activité hémolytique.

Nous avons choisi les deux séquences hydrophobes ([K<sub>2</sub>-L<sub>24</sub>-K<sub>2</sub>], [Leu<sub>24</sub>]) et trois peptides ([LKLLKKLLKKLLKLL], [KLKLLKLLKLLKLLK], et [KKKLLLLLLLLLLLKKK]) pour étudier le repliement et la stabilité des peptides linéaires en GG. On a appliqué essentiellement les mêmes protocoles et champs de force que ceux adoptés pour l'étude des cycles peptidiques. En gros grains, les sites du squelette sont représentés par le type P, et les sites des chaînes latérales de résidus Leucine et Lysine sont modélisés respectivement par C et Qd (Figure V-33).



**Figure V-33** Représentation toute atome (a) et GG (b) d'une hélice polyleucine [Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>]. Les atomes dans (a) et les sites dans (b) sont colorés en fonction de leur type.

On a utilisé les paramètres du champ de force (vdw) optimisé, et gardé les mêmes paramètres des potentiels géométriques et électrostatiques, à l'exception de modification des paramètres de potentiel angulaire entre les sites du squelette. Rappelons que ces derniers ont été établis précédemment à  $K_a = 2.99$  kcal/mol et  $\theta_0 = 90^\circ$  pour maintenir la structure cyclique des CPs.

Pour les sites du squelette des peptides linéaires, les premiers ont montré rapidement que les structures en hélices- $\alpha$  des peptides n'étaient pas stables avec le champ de force original ou optimisé.

Nous avons par conséquent introduit un potentiel de dièdre propre sous forme d'une série de Fourier entre les sites du squelette. Il est important de noter ici que nous avons utilisé des

paramètres **UNIQUES** pour ce potentiel le long des chaînes peptidiques. Notons aussi que la forme du potentiel adoptée a été utilisée par l'équipe de Schulten en 2006 pour produire la structure secondaire des hélices dans un complexe de lipoprotéine [19]. Cependant, la constante de force utilisée ( $k = 1.21$  kJ/mol) par Shulten *et al.* n'a pas non plus permis d'obtenir des structures en hélices stables avec le champ de force MARTINI original ou celui que l'on a optimisé. En 2007, la même équipe a utilisé pour ce potentiel de torsion une très grande constante de force (maintenant  $k = 62.8$  kJ/mol) pour étudier la structure du même complexe lipoprotéine [18].

Il apparaît donc nécessaire d'optimiser cette constante afin de produire la bonne structure secondaire de peptides uniquement dans les conditions favorables.

Nous avons effectué des études préliminaires qui ont montré qu'avec une constante de force de ( $k \sim 20$  kJ/mol), la structure secondaire des peptides, quelle que soit la séquence, est maintenue en hélice- $\alpha$ . Il était donc nécessaire d'optimiser la constante de force. Pour cela, nous avons testé (par essais et erreurs) plusieurs valeurs correspondantes aux points d'échantillonnage de la fenêtre de [1-20 kJ/mol]. On a trouvé que la plus petite valeur qui assure le repliement d'hélice uniquement à l'interface (hélices amphipathiques) ou à l'intérieur de la membrane (hélices hydrophobes) est de 3.65 kJ/mol.

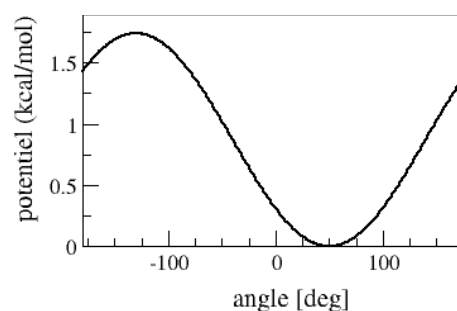
$$U_3 = \sum_K k_K (1 + \cos(n_K \phi_K - \delta_K))$$

$\delta_K$  : Déphasage ( $-130^\circ$ )

$\phi_K$  : L'angle dièdre propre.

$n_K$  : Le nombre de la périodicité ( $n_K = 1$ ).

$k_K$  : La constante de force (3.65 kJ/mol)



### 5.7.1 Stabilité des structures secondaires en hélices- $\alpha$

#### Les hélices hydrophobes

Les études par dichroïsme circulaire [276], diffraction de rayon X [276, 277], DSC [276, 278, 279], RMN [276, 279, 280] et FTIR [278] sur l'interaction des peptides Acetyl-Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>-Ala-amide avec une bicouche lipidique montrent que ces peptides forment une hélice- $\alpha$  transmembranaire très stable.

Ici, nous cherchons à reproduire la structure secondaire de ce peptide par simulation de DM GG afin de monter la transférabilité de notre champ de force optimisé. Nous avons préparé un système dans lequel deux chaînes analogues ([K<sub>2</sub>-L<sub>24</sub>-K<sub>2</sub>], l'une en conformation étendue et l'autre en hélice- $\alpha$ , neutralisées par d'ions de Cl<sup>-</sup> sont intégrées perpendiculairement dans une membrane eucaryote (Figure V-34). Le système est composé de :

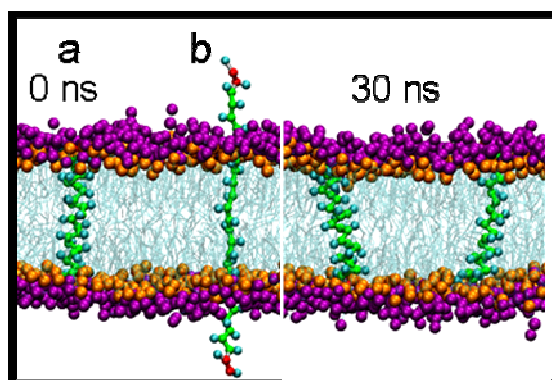
	Membrane	[K <sub>2</sub> -L <sub>24</sub> -K <sub>2</sub> ]	Cl <sup>-</sup>	Eau
<b>Système.1</b>	576 popc	2	11	11000

Au cours de simulation, l'hélice- $\alpha$  a perdu sa structure secondaire dans les premières 3-5 ns, mais elle l'a récupéré et maintenu durant le reste de la simulation. La chaîne étendue a,



---

elle, commencé à se replier progressivement avant de se stabiliser en hélice- $\alpha$  transmembranaire en une vingtaine de ns.

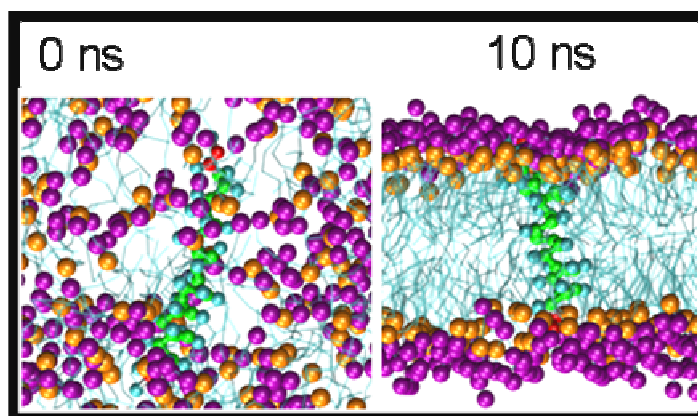


**Figure V-34** Simulation d'une hélice- $\alpha$  (a) et d'une chaîne étendue (b) intégrées dans une membrane POPC.

Nous avons également considéré l'auto assemblage du peptide  $[K_2-L_{24}-K_2]$  et de lipides par simulation de DM GG. Nous avons préparé plusieurs systèmes dans lesquels un nombre variable de peptides sont placés au hasard dans une configuration aléatoire de lipides POPC. Nous présentons ici les résultats relatifs à un système représentatif constitué par une chaîne  $[K_2-L_{24}-K_2]$ , 157 lipides de POPC, 1992 sites W d'eau et 11 ions  $Cl^-$ .

Toutes les simulations ont abouti au résultat suivant : les lipides s'auto assemblent pour former une bicouche lipidique, et les peptides se replient en hélices- $\alpha$  transmembranaires. Cette conformation de peptide se produit lorsque les deux extrémités des hélices se situent de part et d'autre de la bicouche au cours de la formation de membrane (Figure V-35). Si tel n'est pas le cas, on retrouve une conformation de peptide dans laquelle les deux extrémités restent accrochées aux têtes polaires de la membrane et leur partie hydrophobe s'insère au cœur de la membrane.

Les hélices capées  $[K_2-L_{24}-K_2]$  (avec extrémités chargées) ne peuvent pas traverser la membrane à cause de la grande barrière d'énergie provoquée par les interactions électrostatiques entre les deux extrémités et les têtes polaires de la membrane. Ce résultat est totalement en accord avec l'observation expérimentale [283-285] et les simulations de peptides [234].



**Figure V-35** Auto assemblage des lipides POPC et d'une hélice hydrophobe  $[Lys_2-Leu_{24}-Lys_2]$  en solution aqueuse.

Lorsqu'on a étudié l'auto assemblage des lipides et des hélices hydrophobes  $[Leu_{24}]$  (sans leurs extrémités chargées), les simulations montrent que les peptides passent facilement d'une configuration d'hélice transmembranaire à un peptide à l'interface. Nous présentons dans la

Figure V-36 une fenêtre de la simulation d'une durée de l'ordre de 40 ns de simulation où le peptide forme deux fois une hélice transmembranaire passant par une conformation interfaciale. L'analyse de plusieurs trajectoires a montré que ce peptide est dans une conformation transmembranaire 75% du temps.

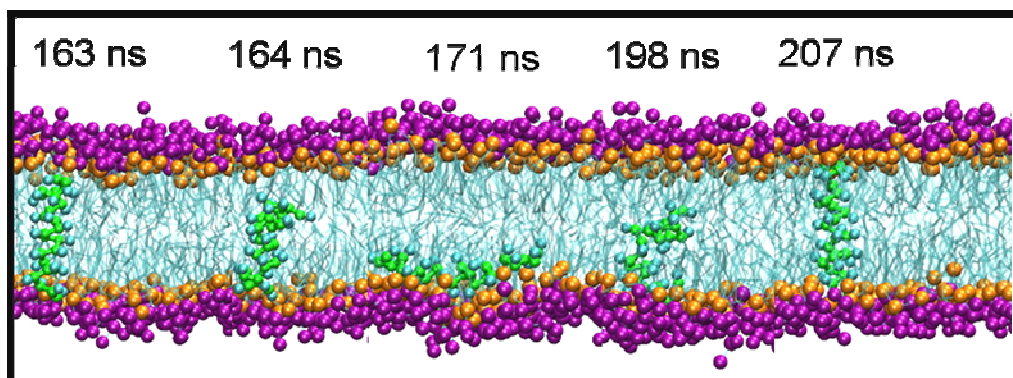


Figure V-36 Une fenêtre temporelle de la simulation d'une chaîne [Leu<sub>24</sub>] placée dans une membrane POPC.

### Les séquences antimicrobiennes

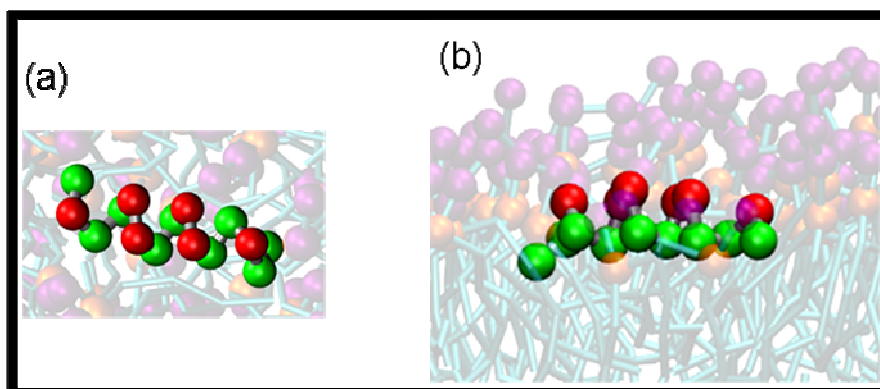
Rappelons que l'expérience a montré que les séquences ([LKLLKLLKLLKLL], [KLKLLKLLKLLKLLK] et [KKLLLLLLLLLKKK]) adoptent respectivement des conformations Amp, Scm et Seg à l'interface de la membrane. Ainsi, leur pourcentage d'hélicité est de 90 %, 50 % et 45 %, alors que ces séquences ont une structure secondaire aléatoire en solution aqueuse.

Nous avons cherché à reproduire les trois structures secondaires (Amp, Scm et Seg) par simulation de DM GG pour tester encore une fois la transférabilité de notre champ de force optimisé (notons que dans ce cas on considère aussi les résidus Lys). On a préparé trois systèmes dans lesquels on a considéré trois chaînes pour chaque peptide, neutralisées par d'ions Cl<sup>-</sup> et placées dans un mélange aléatoire de lipides de POPC et de sites W d'eau.

	Membrane	[L <sub>9</sub> K <sub>6</sub> ]	Eau	Cl <sup>-</sup>
<b>Système.1</b>	157 popc	1 Amp	1992	25
<b>Système.2</b>	157 popc	1 Scm	1992	25
<b>Système.3</b>	157 popc	1 Seg	1992	25

Pour la séquence ([LKLLKLLKLLKLL]), on a observé au cours de la simulation, que la structure amphipathique du peptide est bien produite à l'interface de la membrane. Dans cette conformation, tous les résidus chargés sont localisés près des têtes polaires alors que les résidus hydrophobes sont orientés vers le cœur de la membrane (Figure V-37). On note que le peptide Amp s'est replié majoritairement en hélice- $\alpha$  dans la simulation.

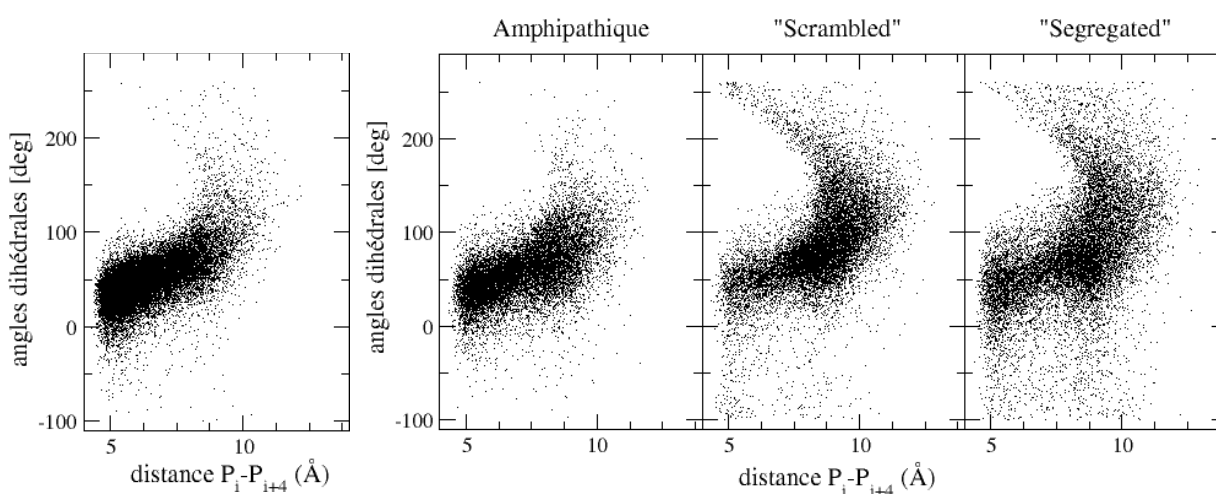
Avec les peptides Scm et Seg, les simulations montrent que, les premiers restent la plupart du temps sous forme dépliés, de manière à garder leurs résidus chargés (Lys) près de têtes polaires et leurs résidus hydrophobes (Leu) orientés vers les chaînes aliphatiques, alors que les secondes enfouissent leurs résidus hydrophobes dans le cœur de la membrane lorsque les deux extrémités chargés (Lys) sont toujours à l'interface de la membrane. Notons que les peptides Scms et Seg ne se replient au cours de la simulation en hélice à l'interface de la membrane que partiellement (50 % de peptide).



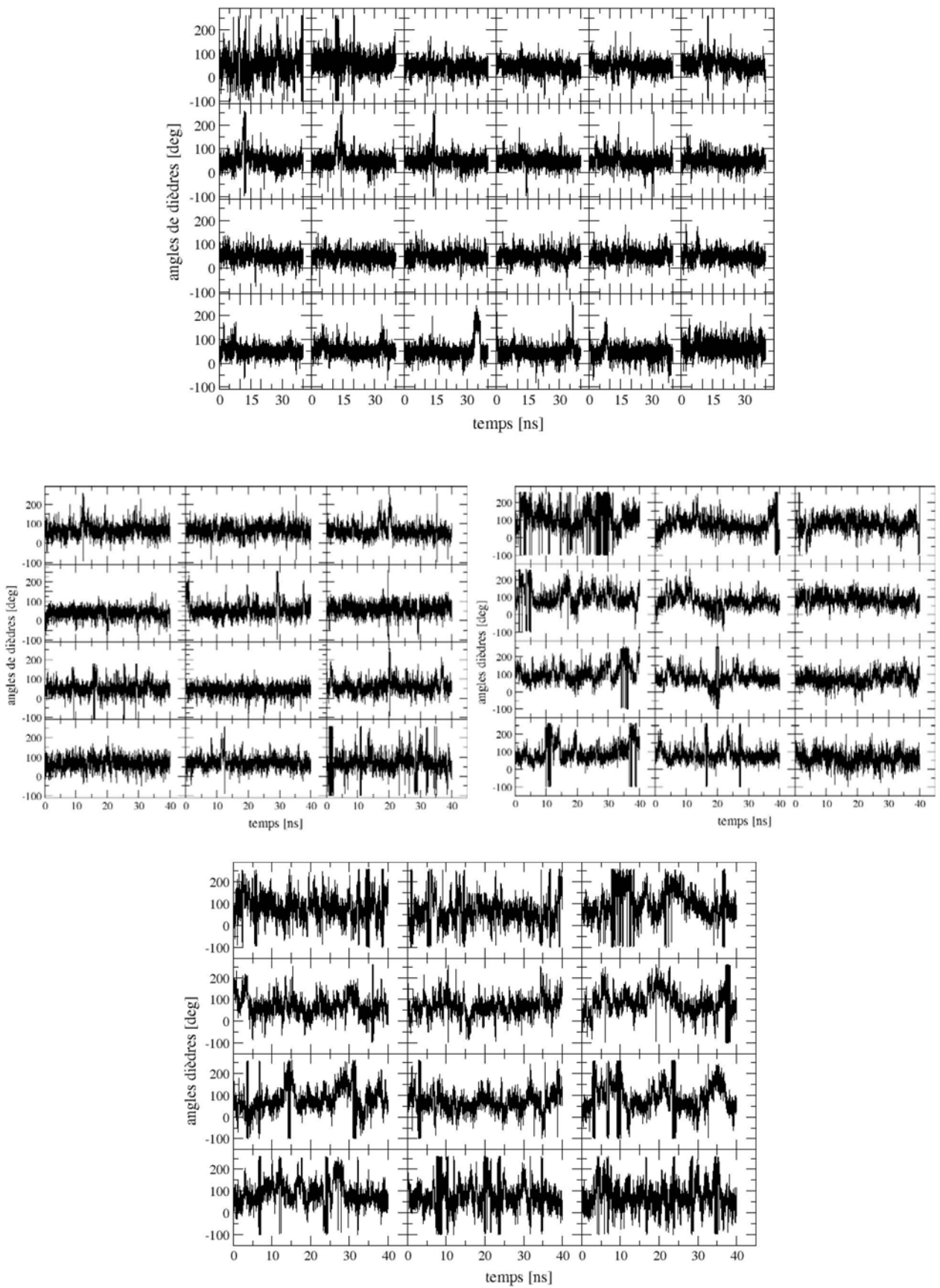
**Figure V-37** Configurations du peptide Amp ([LKLLKLLKLLKLL]) à l'interface d'une membrane POPC. Les résidus Lys sont représentés en rouge et les Leu en vert. (a) vue latérale et (b) vue perpendiculaire.

### 5.7.2 Analyse des structures secondaires

Une hélice idéale en représentation gros grains se caractérise par un angle de dièdre de  $50^\circ$  entre les sites du squelette et une distance de  $6.3 \text{ \AA}$  entre acide aminé I et I+4. Pour analyser la structure secondaire des peptides linéaires, nous avons par conséquent calculé les angles de dièdre (torsion) formés par les sites du squelette des chaînes hydrophobes [Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>] et des trois peptides antimicrobiens (Amp, Scm et Seg). Nous avons représenté ensuite ces angles en fonction à la fois de la distance qui est déterminé entre les acides aminés I et I+4 (Figure V-38), et du temps de simulation (Figure V-39).



**Figure V-38** Distribution des angles de dièdres du squelette en fonction de la distance entre les acides aminés I et I+4. (a) hélice hydrophobe [Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>]. (b) peptides antimicrobiens ([LKLLKLLKLLKLL], [KLKLLKLLKLLKLLK] et [KKKLLLLLLLLLKKK]).



**Figure V-39** Représentation des angles de dièdres du squelette des peptides en fonction du temps de simulation. (a) hélice transmembranaire [Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>]. (b), (b) et (c) peptides antimicrobiens, respectivement ([LKLLKLLKLLKLL], [KLKLLKLLKLLKLLK] et [KKLLLLLLLLLLLLKKK]).

La distribution des angles dièdre en fonction de la distance I-I+4 (Figure V-38), montre que l'angle de dièdre de  $50\pm 15^\circ$  et la distance de  $6.1\pm 1.3$  sont très fréquemment reproduits, notamment pour le peptide antimicrobien, bien que les excursions en dehors de ces valeurs sont aussi retrouvées.

La distribution des angles dièdre en fonction du temps montre que les peptides étudiés, se replient souvent en hélice (leurs angles de dièdres sont toujours autour de  $50^\circ$ ). Les angles vers les extrémités Nter et Cter prennent des valeurs aléatoires, ce qui indique une flexibilité des peptides. Notons également que conformément à l'expérience, la conformation des peptides s'écarte de l'hélice pour les peptides Scm et Seg. Ceci démontre clairement que la barrière d'énergie de potentiel de dièdre adoptées ( $k = 3.47$  kJ/mol) n'est pas très forte et peut être franchie à température ambiante.

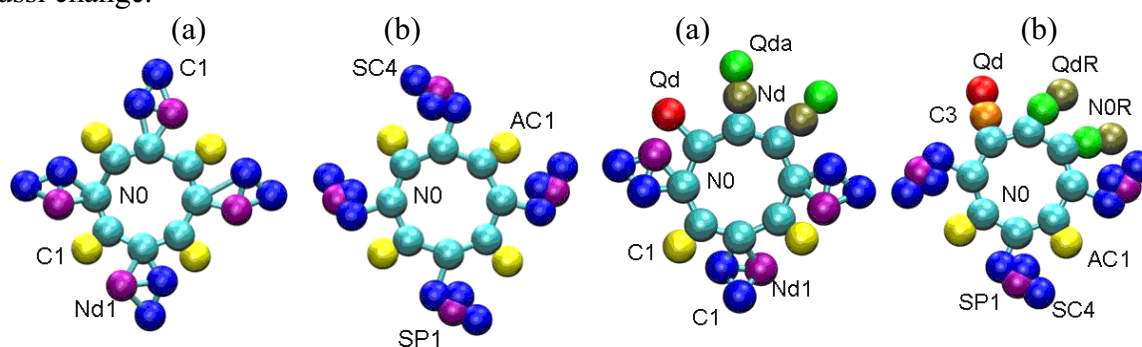
En résumé, il est possible, grâce au champ de force optimisé, en introduisant un potentiel de torsion le long des chaînes peptidiques, de reproduire leur repliement, sinon la stabilité des conformations en hélice- $\alpha$  de plusieurs peptides hélicoïdaux.

## V-8 Évaluation du champ de force MARTINI 2

Marrink *et al.* ont proposé en 2008 (à la fin de ma thèse) un champ de force GG incluant les paramètres décrivant les 20 acides aminés, (MARTINI 2) [22], dans lequel, ils ont rapporté plusieurs améliorations par rapport à MARTINI 1 (voir section IV-4).

Un stage de fin d'étude de Master 2 effectué par L'étudiante Lucie Delemotte au sein de notre équipe a eu pour objet de tester et d'optimiser ce champ de force GG MARTINI en étudiant l'auto assemblage des CP1s ou CP2s en solution et l'interaction de ces CPs avec les lipides membranaires procaryote ou eucaryote, dans l'esprit des travaux que nous avons effectués précédemment avec le champ de force original. Nous reportons ici brièvement les résultats généraux de cette étude

Les topologies de CP1s et CP2s dans les champs de force Martini1 et Martini2 sont représentées dans la Figure V-40. On notera que, la représentation des résidus Leu et Arg n'a pas été modifiée entre les deux versions, mais celles des Trp et Lys ont évoluées respectivement de 4 à 5 sites et 2 à 3 sites. De même, pour ces résidus, le type de particules a aussi changé.



**Figure V-40** Topologie d'un CP1s (gauche) et d'un CP2s (droite) en représentation GG de MARTINI I (a) et MARTINI 2 (b). Les sites du squelette sont colorés en bleu ciel, les chaînes latérales de Trp, Leu, Lys, Arg sont colorées respectivement en bleu et violet, jaune, orange et rouge, vert et kaki.



Tout d'abord considérant le champ de force MARTINI 2 original, la simulation de l'auto assemblage de 20 CPs de type CP1s ou CP2s en solution aqueuse a résulté en la formation d'agrégats dans une échelle du temps de l'ordre de quelques dizaines de ns. Les simulations de l'interaction des agrégats de CP1s ou CP2s avec la memb-euca-I ou memb-proca-I, respectivement, montrent que ces clusters de peptides ne s'auto organisent pas et ne pénètrent non plus la membrane dans des échelles du temps de l'ordre de plusieurs centaines de ns.

Ces simulations montrent clairement que le champ de force MARTINI 2 ne permet pas non plus de décrire d'une manière adéquate l'interaction à distance entre acides aminés et acides amines/lipides, dont l'optimisation semble nécessaire.

Le champ de force des peptides a été optimisé en adoptant une stratégie similaire à l'optimisation précédente (voir le Tableaux V-3, V-4 et V-5). Grâce aux nouveaux paramètres, les simulations de DM ont montré une reproduit (1) une formation de clusters plus organisés dans la solution, (2) une organisation plus physique à l'intérieur de la memb-euca-I de cluster de CP1s conduisant à la formation d'un nanotube de 7 CPs, et (3) une réorganisation des amas de CP2s à l'interface de la memb-proca-I résultant en la formation de nanotubes amphipathiques conformément à l'expérience (Rapport Master 2 Chimie Informatique et Théorie 2008 L. Delemotte, Nancy Université).

		<i>RINGS</i>				<i>TRP</i>				<i>LEU</i>							
		<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NdI</i>	<i>SP1</i>	<i>CI</i>	<i>SC4</i>	<i>CI</i>	<i>SC4</i>	<i>CI</i>	<i>AC1</i>				
<i>RINGS</i>	<i>P NO</i>	1	1	4	1												
<i>TRP</i>	<i>NdI SP1</i>	4+	8+	3	8	3-	3-	2-75	3								
	<i>CI SC4</i>	8+	8+	4	8	6+	8+	4-75	8	4+	4+	4-75	6				
<i>LEU</i>	<i>CI AC1</i>	8+	8+	6	8	6+	8+	6	8	4+	4+	5	6	4+	4	4	4

**Tableau V-3 :** Niveaux d'énergie de van der Waals pour chaque interaction intervenant entre acides aminés Leu et Trp. En noir : Martini.1, en vert : Martini.1 après transformations par A. Khalfa, en rouge : Martini.2, en bleu : Martini.2 après transformation par L. Delmotte.

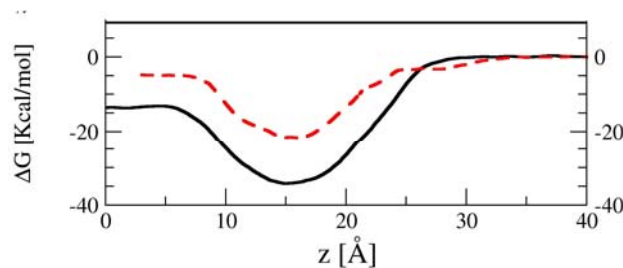
		<i>RINGS</i>				<i>TRP</i>				<i>LEU</i>						
		<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NdI</i>	<i>SP1</i>	<i>CI</i>	<i>SC4</i>	<i>CI</i>	<i>SC4</i>	<i>CI</i>	<i>AC1</i>			
<i>POPC</i>	<i>Q0 LQ0</i>	1	8+	4	8	4+	4+	1		8+	8+	6	5	8+	8+	8
	<i>Qa LQa</i>	1	8+	4	8	3-	4-	1		8+	8+	6	5	8+	8+	8
	<i>Na LNa</i>	4+	8+	4	8	3-	4+	2		6+	6+	5	4	6+	6+	6
	<i>C LCI</i>	8+	8+	6	8	6+	8+	6		4+	4-	5	5	4+	4-	4
	<i>C LCS</i>	8+	8+	6	8	6+	8+	6		4+	4-	5	5	4+	4-	4

**Tableau V-4 :** Niveaux d'énergie de van der Waals pour chaque interaction intervenant entre acides aminés Leu et Trp et les lipides POPC. En noir : Martini.1, en vert : Martini.1 après transformation par A. Khalfa, en rouge : Martini.2, en bleu : Martini.2 après transformation par L. Delmotte.

		RINGS			TRP			LEU		ARG		LYS				
		P	NB3	NO	MI	CI	SC4	CI	AC1	MI	Qda	Qd	C3	Qd		
ARG	MI	4+	4+	3-	6+	3	6+	6+	6+	6+	3-	3-				
	NOR		4		6		1	6		6	4	3				
ARG	Qda				3-	6+	1	3+	3+	3+	3+	1	1			
	Qd	1	4+	4	6		6	3		8	4		1			
LYS	C3		4		4		4		4	4		7	4			
	Qd				4+	6+	8+	3+	8+	3+	4+	4+	1	1	4+	4+
LYS	Qd	1	4+	4	1	6	6	8		8	4		1		7	1
	Qd															

**Tableau V-5** : Niveaux d'énergie de van der Waals pour chaque interaction de particules intervenant dans les acides aminés Lysine, Arginine, Leucine et Tryptophane. En noir : Martini.1, en vert : Martini.1 après transformation par A. Khalfa, en rouge : Martini.2, en bleu : Martini.2 après transformation par L. Delmotte.

Notons que le profil d'énergie libre du transfert de Trp de l'eau vers l'intérieur de la membrane a été comparé au profil obtenu par simulation atomistique afin d'évaluer l'effet de l'optimisation sur le comportement de l'acide aminé. Ce calcul a montré que, la différence d'énergie libre entre la phase aqueuse et la phase hydrophobe est exagérée en comparant avec le calcul en tout atome (Figure V-41). Le changement du champ de force effectué a fait disparaître un artefact induit par le champ de force MARTINI 2, mais en a généré un autre, ce qui montre que d'autres améliorations/ajustements sont nécessaires.



**Figure V-41** Profil d'énergie libre le long de la normale à la membrane (calculé par L. Delmotte), 0 représente le centre de la membrane. Énergie libre  $\Delta G$  calculée avec le champ de MARTINI 2 après modification (noir) et avec le champ de force (CHARMM27) tout atome (rouge).

Au cours de ce stage, le champ de force MARTINI 2 optimisé a également été utilisé pour étudier le repliement / stabilité des peptides hydrophobes (WLP et KLP) et des antimicrobiens à base des résidus Lys et Leu (Amp, Scm et Seg). Comme dans notre précédente étude, les paramètres du potentiel angulaire et de dièdre propre pour les sites du squelette des hélices ( $K_d = 400$  KJ/mol,  $\varphi = 60^\circ$ ) et ( $K_a = 700$  KJ/mol)) ont été remplacés par les paramètres optimisés dans nos études précédentes pour produire les structures secondaires adéquates ( $K_d = 2.6$  KJ/mol et  $\varphi = 130^\circ$ ) et ( $K_a = 12.5$  KJ/mol)) (voir section V-6)

Les simulations de DM utilisant les champs de force MARTINI 2 modifié montrent que les deux chaînes peptidiques WLP et KLP se replient en quelques ns en hélices transmembranaires dans une memb-euca-I. Les peptides antimicrobiens produisent eux leurs structures prévues au cours d'interactions avec la membrane : (1) Les peptides amphipathiques se replient majoritairement en hélice. (2) les Scms restent la plupart du temps sous forme dépliés de manière à garder leurs résidus chargés (Lys) près des têtes polaires et leurs résidus hydrophobes (Leu) orientés vers les chaînes aliphatiques. (3) les Segs enfouissent leurs résidus hydrophobes dans le cœur de la membrane tandis que les deux extrémités chargées restent toujours à l'interface de la membrane.

---

## **Chapitre VI : Conclusions et perspectives**

Les cycles peptidiques (CPs) composés d'un nombre paire d' $\alpha$ -acides aminés ayant l'alternance de chiralité L/D sont capables de s'auto assembler grâce à un réseau de liaisons d'hydrogène qui se forme entre les groupes carbonyles d'une unité et les groupes amines de l'unité contiguë. Ces cycles peptidiques possèdent des angles  $\phi$  et  $\psi$  qui sont uniques et bien déterminées. Les propriétés de leurs surfaces externes et leurs diamètres internes sont contrôlables et ajustables respectivement par la propriété et le nombre d'acides aminés qui les forment.

Mon travail a consisté à étudier l'interaction de tels cycles peptidiques avec les membranes lipidiques par simulations de dynamique moléculaire utilisant l'approche gros grains. Il est basé sur les observations expérimentales montrant que la partition de CPs hydrophobes dans une membrane lipidique forme un nanotube transmembranaire, alors que les CPs chargés montrent une forte activité antibactérienne contre les bactéries gram+/- . L'objectif était de comprendre les processus d'auto-assemblage des CPs auprès ou à l'intérieur de la membrane pour mieux caractériser la formation de nanotubes transmembranaires et leur action antibactérienne.

Nous avons démontré que la partition des CP hydrophobes auprès de la membrane commence par l'auto assemblage sous forme d'amas avant de s'insérer et de se réorganiser à l'intérieur de la membrane pour former des nanotubes transmembranaires. Le nombre de CPs formant les nanotubes transmembranaires semble dépendre de l'épaisseur de la membrane. L'auto assemblage des CPs hydrophobes en amas semble être un comportement commun entre les petites molécules hydrophobes leur permettant de franchir la barrière de potentiel pour passer, à travers la région des têtes polaires, vers l'intérieur de la membrane.

Nous avons constaté que l'action antibactérienne des CPs chargés nécessite d'abord la formation de nanotubes amphipathiques adsorbés parallèlement à l'interface de la membrane suivant un mode carpet-like. Ces nanotubes provoquent une courbure positive de la membrane qui dépend de leur concentration locale. A haute concentration, les nanotubes libèrent une micelle lipidique à l'interface de la membrane, en générant alors une lacune irréversible à la monocouche membranaire, ce qui probablement a une incidence majeure sur les propriétés structurales et dynamiques de la bicouche lipidique.

Le champ de force GG optimisé a été testé seulement pour étudier les cycles peptidiques. Pour évaluer la transférabilité de ce champ de force à d'autres structures peptidiques, nous avons introduit un potentiel de dièdre propre avec une constante de force optimisée afin de maintenir dans des conditions favorables des structures secondaires de peptides linéaires en hélices- $\alpha$ . Nos simulations montrent que cette extension de champ de force assure effectivement les repliements en hélice de deux types de peptides linéaires : hydrophobe transmembranaire [Lys<sub>2</sub>-Leu<sub>24</sub>-Lys<sub>2</sub>] et antimicrobiennes (à base de résidus Leu et de Lys) comme la [LKLLKKLLKLLKLL], seulement dans des conditions favorables, et sans introduire des contraintes à l'instar de champs de force actuels, pour maintenir le repliement des peptides ou des protéines.



---

Nous avons ainsi mis en évidence que la simulation de DM en représentation GG peut servir à étudier des phénomènes tels que le repliement de peptides (auprès ou à l'intérieur de la membrane) ou encore l'auto-assemblage et la réorganisation de peptides au voisinage de membranes résultant en une action antimicrobienne, phénomènes qui requièrent une échelle du temps très longue, si les paramètres d'énergie potentielle décrivant les interactions à distance sont bien optimisés.

L'optimisation du champ de force décrivant tous les acides aminés reste la perspective majeure de ce travail, car elle permet d'étudier de tels mécanismes pour d'autres peptides formés par plusieurs types d'acides aminés, ou encore comme l'assemblage et la dynamique de structures plus complexes comme des microtubules, voir protéiques comme les transporteurs et autres récepteurs membranaires ...etc.

Dans le futur proche, et dans la suite directe de ce travail, nous nous intéressons à trois problématiques. Premièrement, nous voulons caractériser les deux mécanismes antimicrobien et hémolytique de peptides synthétiques formés par des rapports variables Leu:Lys. Nous avons déjà commencé à étudier l'effet de la concentration de peptide Amp sur la convergence de l'auto assemblage des lipides POPC et des peptides par simulations de DM GG.

Ces simulations montrent qu'à basse concentration 1/50 HéL/Lip, les hélices se replient parallèlement à l'interface de la membrane et adoptent une configuration amphipathique, alors qu'à haute concentration 1/25 et 1/15 HéL/Lip, les hélices sont capables en plus de s'auto assembler afin de former un nano pore qui permet le passage des molécules d'eau et d'ions à travers la membrane. La taille du pore dépend de la concentration d'hélices. A ce jour ces résultats, ne permettent pas de déterminer si le mode d'action de ces peptidiques se réalise par la formation des pores. D'autres simulations concernant l'action de ces peptides sur une membrane préformée devraient évidemment éclaircir ce point.

Dans un deuxième axe de recherche, nous cherchons à caractériser le mode d'action du peptide l'indolicidin [ILPWKWPWWPWR] qui fait partie d'une famille de peptide linéaire riche en Tryptophane. En effet, ce peptide est actif contre les bactéries gram +/-, il est aussi antifongique et antivirus HIV, par contre le mode d'action de ce peptide n'est pas encore connu. Dans l'étude de l'activité de peptide l'indolicidin, les nouveaux acides aminés par rapport à notre champ de force optimisé seront seulement Isoleucine et Proline. Ces derniers sont des résidus hydrophobes très similaires à la Leucine. Nous exploiterons l'avantage du champ de force de MARTINI 2 pour discerner entre les trois chaînes latérales hydrophobes, en utilisant différents degrés de polarisabilité (paramètres LJ) des sites représentant les chaînes apolaires. Notons que, l'optimisation de deux chaînes latérales d'Isoleucine et Proline peut être nécessaire.

Finalement, nous projetons d'étudier l'effet de la concentration et du type (mon- et divalent) des ions présents en solution sur l'activité antibactérienne de différents peptides (CP2s, L<sub>n</sub>K<sub>m</sub>, ILPWKWPWWPWR). En effet, plusieurs études montrent que la grande concentration des ions mono- ou divalents auprès de la membrane, ou bien la présence d'ions divalents (comme Mg<sup>2+</sup>) réduit significativement l'activité antimicrobienne. Notons aussi que, dans le même intérêt, nous voulons aussi tester la synergie des CPs chargés (voir le Tableau I-3) sur leur activité antibactérienne et hémolytique.

---

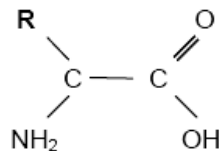
# Annexe

## A-1 les peptides

### A.1.1 Définition

Un peptide est une chaîne linéaire comprenant moins de 100 acides aminés, reliés par des liaisons peptidiques. La chaîne peptidique est caractérisée par deux extrémités N et C du groupe aminé et carboxyle, respectivement. Les peptides sont discernés par le nombre, la nature et l'ordre des acides aminés qui forment leurs séquences peptidiques.

On parle de dipeptides, de tripeptides, lorsque la chaîne peptidique comprend que deux ou trois résidus d'acides aminés. Mais, la plus longue chaîne peptidique, on l'adresse généralement par polypeptides. La structure générale des acides aminés est :



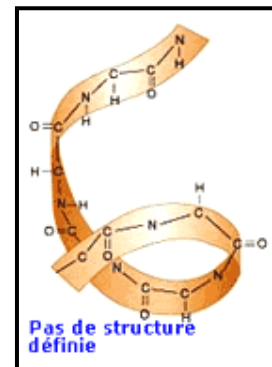
La chaîne latérale R peut être :

- **Non polaire** : Glycine (Gly), Alanine (Ala), Valine (Val), Leucine (Leu), Isoleucine (Ile), Méthionine (Met), Phénylalanine (Phe), Tryptophane (Trp) et Proline (Pro) ;
- **Polaire** : Sérine (Ser), Thréonine (Thr), Cystéine (Cys), Tyrosine (Tyr), Asparagine (Asn) et Glutamine (Gln) ;
- **Chargée négative** : Acide aspartique (Asp) et Acide glutamique (Glu) ;
- **Chargée positive** : Lysine (Lys), Arginine (Arg) et Histidine (His).

### A.1.2 Structure peptidique

Les peptides ont généralement deux types de structure : primaire et secondaire, mais certains peptides ont des structure mixtes sans ou avec des propriétés particulières.

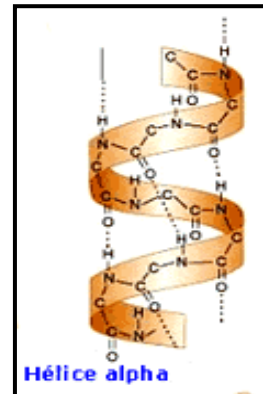
**La structure primaire** : correspond à la succession linéaire des acides aminés. Cette dernière possède un sens bien défini. Le premier acide aminé de la séquence est par convention celui qui possède une extrémité amine libre (N-Terminal). De manière symétrique, le dernier acide aminé est celui qui possède une extrémité carboxylate libre (C-terminal).



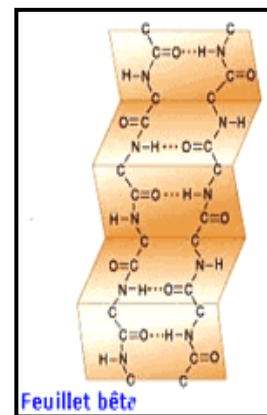
---

**La structure secondaire** correspond à un arrangement régulier des acides aminés selon un axe. Il existe deux types principaux de structure secondaire :

- L'hélice- $\alpha$  est une structure périodique très fréquente chez les peptides. Elle se caractérise par la formation de liaisons d'hydrogène entre le groupement carbonyle -CO d'un résidu  $i$  et le groupement amide -NH d'un résidu  $i+4$ . Un tour moyen d'hélice- $\alpha$  contient 3,6 résidus et mesure 0.54 nm, soit une translation de 0.15 nm par résidu.



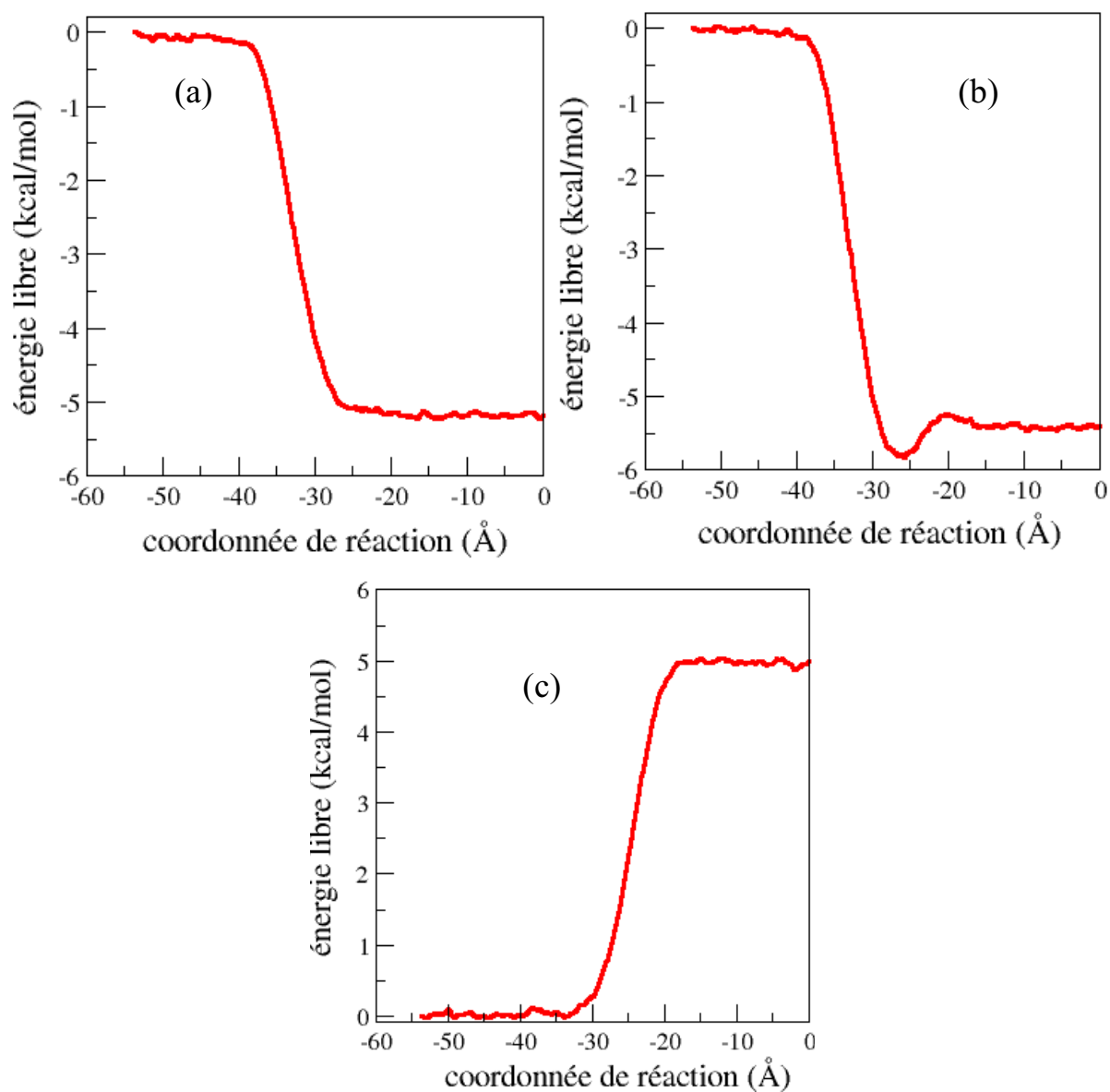
- Le feuillet- $\beta$  est la somme de plusieurs brin- $\beta$  (le brin- $\beta$  est une structure périodique étendue) qui sont reliés par de liaisons d'hydrogène. Ces derniers se font entre les deux groupes superposés de CO et NH, plutôt qu'entre les groupes consécutifs, comme dans le cas de l'hélice- $\alpha$ . Lorsque les brins- $\beta$  s'organisent d'une manière tête-bêche, ils forment un feuillet- $\beta$  antiparallèle, mais lorsque les brins- $\beta$  sont tous orientés dans le même sens, ils se forment en un  $\beta$ -feuillet parallèle.



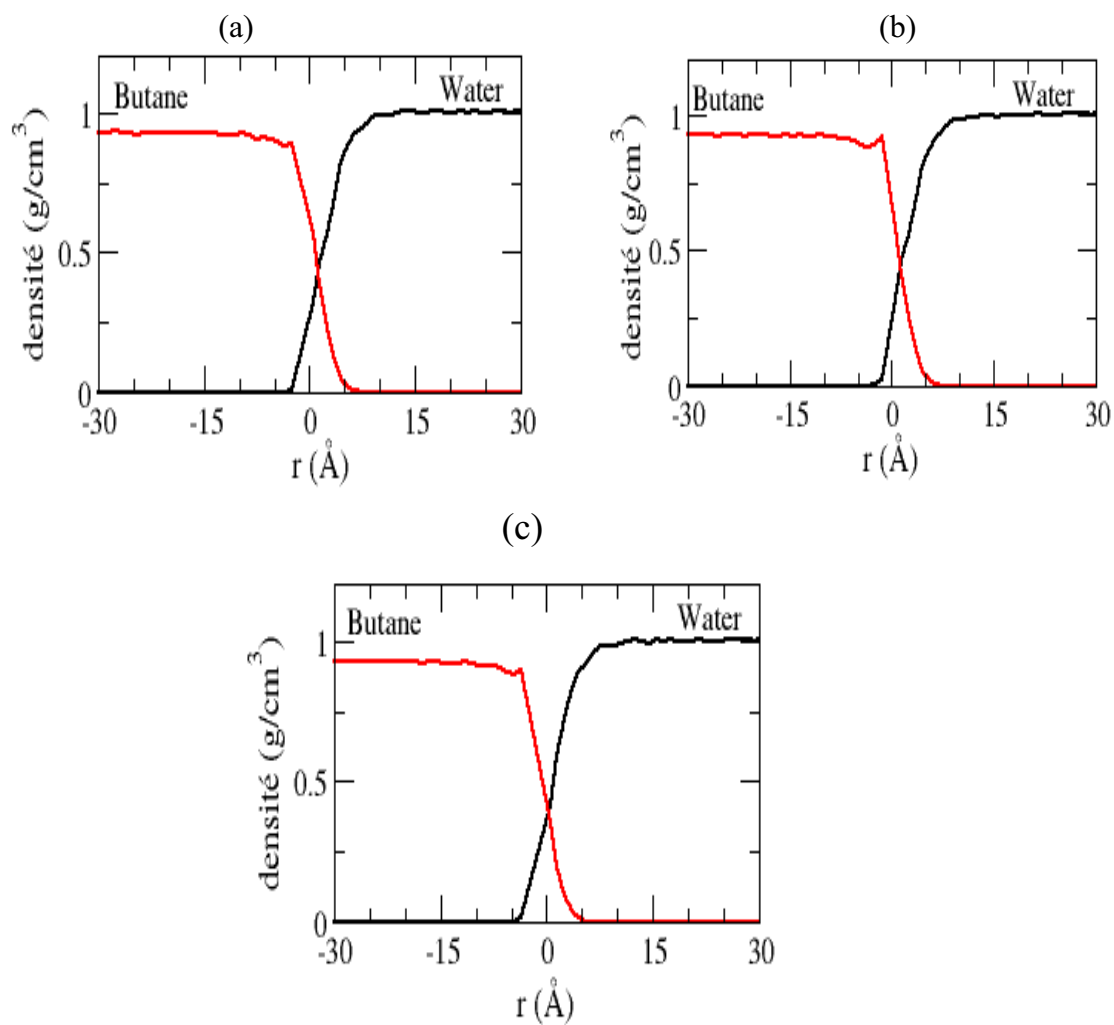
Les peptides en hélice- $\alpha$  et en feuillet- $\beta$  sont les plus représentés dans la multitude des peptides naturels découverts et caractérisés à ce jour. D'ailleurs, dans certains peptides, on trouve des structures qui contiennent un ensemble des feuillets- $\beta$  qui se replient sur eux-mêmes en épingle à cheveux (Hairpin like), d'autres structures se caractérisent par une mixture entre les hélices- $\alpha$  et les feuillets- $\beta$  avec des ponts de disulfure. Chez d'autres peptides, la structure est linéaire et particulièrement riches en certains acides aminés peu fréquents (Arg, Pro, Trp, His, Gly).

La diversité des propriétés structurelles des peptides, notamment leur petite taille, leur caractère cationique, leur caractère amphiphile, leur aptitude à s'auto assembler pour former des structures tertiaires plus complexes, fait paraître des caractéristiques essentielles pour leurs activités dans des phénomènes biologiques comme l'activité antimicrobienne, etc.

## B-1 Profils d'énergie libre



Profils d'énergie libre correspondant au transfert des acides aminés Leu (a), Trp (b) et Lys (c) à travers une interface eau/butane.



Profils de densité de l'eau et du butane au cours du transfert des acides aminés Leu (a), Trp (b) et Lys (c) à travers une interface eau/butane.

---

## Abréviations

CP	cycle peptidique.
Gram +	gram positif.
Gram-	gram négatif.
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
DM	dynamique moléculaire.
GG	gros grains.
DMPC	dimyristoylphosphatidylcholine.
CMI	concentration minimale inhibitrice.
PC	phosphatidylcholine.
PG	phosphatidylglycerole.
PE	phosphatidylethanolamine.
PS	phosphatidylserine.
POPC	palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine.
POPE	palmitoyl oleoyl phosphatidylethanolamine.
POPG	palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerole.
LPS	lipopolysaccharide.
PMA	peptide antimicrobien
GS	gramicidin S.
CeP1	cecropin P1
CP1	cycle peptidique de la séquence $[-(\text{D-Trp-Leu})_4]$ .
CP2	cycle peptidique de la séquence $[-(\text{D-Trp-Leu})_2\text{-D-Trp-Arg-D-Arg-Lys}]$ .
CP3	cycle peptidique de la séquence $[-(\text{D-Lys-Leu})_4]$ .
NT	nanotube.
NTP	nanotube peptidique.
NTTM	nanotube transmembranaire.
vdw	Van der Waals.
TF-IR	Infrarouge à transformé de Fourier.
RMN	résonance magnétique nucléaire.
DC	dichroïsme circulaire.
DSC	calorimétrie différentielle à balayage.
SPR	résonance des plasmas de surface.
RET	transfert d'énergie par résonance.
ITC	calorimétrie de titrage isotherme

---

# Bibliographie

1. Hartgerink JD, Clark TD, Ghadiri RM: **Peptides nanotubes and beyond.** *Chem Eur J* 1998, **4**:1367-1372.
2. Ghadiri MR, Granja JR, Milligan RA, McRee DE, Khazanovich N: **Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture.** *Nature* 1993, **366**:324-327.
3. Clark TD, Buriak JM, Kobayashi K, Ister MP, McRee DE, Ghadiri RM: **Cylindrical beta-sheet peptide assemblies.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:8949-8962.
4. Bong DT, Clark TD, Granja JR, Ghadiri MR: **Self-assembling organic nanotubes.** *Angew Chem Int Ed* 2001, **40**:988-1011.
5. Ghadiri MR, Granja JR, Buehler LK: **Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes.** *Nature* 1994, **369**:301-304.
6. Granja JR, Ghadiri MR: **Channel-mediated transport of glucose across lipid bilayers.** *J Am Chem Soc* 1994, **116**:10785-10786.
7. Fernandez-Lopez S, Kim H-S, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, Kraehenbuehl K, Long G, Weinberger DA, Wilcoxon KM *et al*: **Antibacterial agents based on the cyclic D,L-  $\alpha$ -peptide architecture.** *Nature* 2001, **412**:452-455.
8. Ash WL, Zlomislic MR, Oloo EO, Tieleman DP: **Computer simulations of membrane proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1666**:158-189.
9. Matyus E, Kandt C, Tieleman DP: **Computer simulation of antimicrobial peptides.** *Curr Med Chem* 2007, **14**:2789-2798.
10. Allen MP, Tildesley DJ: **Computer simulation of liquids.** Oxford: Clarendon Press; 1987.
11. Frenkel D, Smit B: **Understanding molecular simulations: From algorithms to applications.** San Diego: Academic Press; 1996.
12. Tieleman DP, Marrink SJ, Berendsen HJC: **A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1331**:235-270.
13. Shelley JC, Shelley MY, Reeder RC, Bandyopadhyay S, Moore PB, Klein ML: **Simulations of phospholipids using a coarse grain model.** *J Phys Chem B* 2001, **105**:9785-9792.
14. Shelley JC, Shelley MY, Reeder RC, Bandyopadhyay S, Klein ML: **A Coarse grain model for phospholipid simulation.** *J Phys Chem B* 2001, **105**:4464-4470.
15. Nielsen SO, Lopez CF, Srinivas G, Klein ML: **Coarse grain models and the computer simulation of soft materials.** *J Phys: Condens Matt* 2004, **16**:R481-R512.
16. Marrink SJ, Vries AH, Mark AE: **Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations.** *J Phys Chem B* 2004, **108**:750-760.
17. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, De Vries AH: **The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations.** *J Phys Chem B* 2007, **111**:7812-7824.
18. Shih AY, Freddolino PL, Arkhipov A, Schulten K: **Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations.** *J Struct Biol* 2007, **157**:579-592.
19. Shih AY, Arkhipov A, Freddolino PL, Schulten K: **Coarse grained protein-lipid model with application to lipoprotein particles.** *J Phys Chem B* 2006, **110**:3674-3684.
20. Bond PJ, Sansom MSP: **Insertion and assembly of membrane proteins via simulation.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:2697-2704.
21. Bond PJ, Holyoake J, Ivetaç A, Khalid S, Sansom MSP: **Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane proteins and peptides.** *J Struct Biol* 2007, **157**:593-605.
22. Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ: **The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins.** *J Chem Theory Comput* 2008, **4**:819-834.
23. Singer SJ, Nicolson GL: **The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.** *Science* 1972, **175**:720-731.
24. Lee GA: **How lipids affects the activities of integral membrane proteins.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1666**:62-87.
25. Chipot C, Klein ML, Tarek M: **Modeling lipid membranes.** *Handbook of Materials Modeling* 2005:929-958.
26. Lee AG: **Lipid-protein interaction in biological membranes: a structural perspective.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1612**:1-40.
27. White. SH: **Membrane protein structure: experimental approaches.**; 1994.
28. Dowhan W: **Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?.** *Annu Rev Biochem* 1997, **66**:199-232.

- 
29. Zwaal RFA, Schroit AJ: **Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.** *Blood* 1997, **89**:1121-1132
  30. Uran S, Larsen A, Jacobsen PB, Skotland T: **Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr B* 2001, **758**:265-275.
  31. Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP: **Cholesterol interactions with phospholipids in membranes.** *Prog Lipid Res* 2002, **41**:66-97.
  32. Yeaman MR, Yount NY: **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** *Pharmacol Rev* 2003, **55**:27-55.
  33. Boggs JM: **Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organisation and membrane function.** *Biochim biophys Acta* 1987, **906**:353-404.
  34. Hubner W, Blume A: **Interaction at the lipid-water interaction.** *Chem Phys Lipids* 1998, **96**:99-123.
  35. Zhao W, Rog T, Gurtovenko AA, Vattulainen I, Karttunen M: **Role of phosphatidylglycerols in the stability of bacterial membranes.** *Biochimie* 2008, **90**:930-938.
  36. Pink AD, MscNeil BQ, Zuckermann MJ: **A model of hydrogen bond formation in phosphatidylethanolamine bilayers.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1368**:289-305.
  37. Damodaran KV, Merz KM: **A comparison of DMPC and DLPE-based lipid bilayers.** *Biophys J* 1994, **66**:1076-1087.
  38. Pasenkiewicz-Gierula M: **Charge pairing of headgroup in phosphatidylcholine membrane: A molecular dynamics simulation study.** *Biophys J* 1999, **76**:1228-1240.
  39. Pandit AS, Bostick D, Berkowitz ML: **Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl.** *Biophys J* 2003, **84**:3743-3750.
  40. Murzyn K, Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M: **Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane.** *Biophys J* 2005, **88**:1091-1103.
  41. Thurmond RL, Dodd SW, Brown MF: **Molecular areas of phospholipids as determined by H NMR spectroscopy.** *Biophys J* 1991, **59**:108-113.
  42. Urbina JA, Moreno B, Arnold W, Taron CH, Orlean P, Oldfield E: **A carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic study of inter-proton pair order parameters: A new approach to study order and dynamics in phospholipid membrane systems.** *Biophys J* 1998, **75**:1372-1383.
  43. Huang CH, Li SS: **Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids.** *Biochim biophys Acta* 1999, **1422**:273-307.
  44. Murzyn K, Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M: **Interactions of magainin-2 amide with membrane lipids.** *Lect Notes Comput Sci* 2004, **3037**:325-331.
  45. Pasenkiewicz-Gierula M, Murzyn K, Rog T, Czaplewski C: **Molecular dynamics simulation studies of lipid bilayer systems.** *Acta Biochim Pol* 2000, **47**:601-611.
  46. Alberts BM, Johnson A, Lewis J, Berthaut I, Kamoun P: **Biologie moléculaire de la cellule**, 4e edn; 2004.
  47. Gerald K: **Biologie cellulaire & moléculaire**, 2é edn; 2004.
  48. Engelman DM: **Membranes are more mosaic than fluid.** 2005, **438**:578-580.
  49. Brown DA, London E: **Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.** *J Biol Chem* 2000, **275**:17221-17224.
  50. Brown RE: **Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal.** *J Cell Sci* 1998, **111**(1-9).
  51. Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**:569-572.
  52. Edidin M: **The state of lipid rafts: from model membranes to cells.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003, **32**:257-283.
  53. Anderson RG, Jacobson K: **A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains.** *Science* 2002, **296**:1821-1825.
  54. Pike LJ: **Lipid rafts: heterogeneity on the high seas.** *Biochem J* 2004, **378**:281-292.
  55. Alberts BM, Johnson A, Lewis J, Berthaut I, Kamoun P: **Biologie moléculaire de la cellule**, 4e edn; 2004.
  56. Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B: **The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze etch electron microscopy.** *Biochim biophys Acta* 1973, **323**:178-193.
  57. Bayer AS, Prasad R, Chandra J, Koul A, Smriti M, Varma A, Skurray RA, Firth N, Brown MH, Koo SP *et al*: **In vitro resistance of Staphylococcus aureus to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity.** *Infect Immun* 2000, **68**:3548-3553
  58. Verkleij AJ, Post JA: **Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction.** *J Membr Biol* 2000, **178**:1-10.
-



- 
59. Yeaman MR, Yount NY: **Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance.** *Pharma Rev* 2003, **55**:27-55.
  60. Hancock REW: **The bacterial outer membrane as a drug barrier.** *Trends Microbiol* 1997, **5**:37-42.
  61. Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M: **Physiology of the bacterial cell: A molecular approach.**; 1990.
  62. Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M: **Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien.**, 4e édition edn; 1995.
  63. DeSantis P, Morosetti S, Rizzo R: **Conformational analysis of regular enantiomeric sequences.** *Macromolecules* 1974, **7**:52-58.
  64. Pavone V, Benedetti E, Di Blasio B, Lombardi A, Pedone C, Tomasich L, Lorenzi GP: **Regularly alternating L,D-peptides. III. hexacyclic peptides from valine or phenylalanine.** *Biopolymers* 1989, **28**:215-223.
  65. Buriak JM, Ghadiri RM: **Self-assembly of peptide based nanotubes.** *Mater Sci Eng, C* 1997, **4**:207-212.
  66. Ghadiri RM, Kobayashi K, Granja JR, Chadha RK, McRee DE: **The structure and thermodynamic basis for the formation of self assembled peptide nanotubes.** *Angew Chem Int Ed Engl* 1995, **34**:93-95.
  67. Kobayashi K, Granja JR, Ghadiri MR: **Beta-sheet peptide architecture: Measuring the relative stability of parallel vs. antiparallel beta-sheets.** *Angew Chem Int Ed Engl* 1995, **34**:95-98.
  68. Hartgering JD, Granja JR, Milligan RA, Ghadiri MR: **Self-assembling peptide nanotubes.** *J Am Chem Soc* 1996, **118**:43-50.
  69. Sun X, Lorenzi GP: **On the stacking of beta-rings: The solution self-association behavior of two partially N-methylated cyclo(hexaleucines).** *Helv Chim Acta* 1994, **77**:1520-1526.
  70. Gailer C, Feigel M: **Is the parallel or antiparallel beta-sheet more stable ? A semiempirical study.** *J Comput Aided Mol Des* 1997, **11**:273-277.
  71. Smart OS, Breed J, Smith GR, Sansom MSP: **A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties.** *Biophys J* 1997, **72**:1109-1126.
  72. Smart OS, Goates GMP, Sansom MSP, Alder GM, Bashford CL: **Structure-based prediction of the conductance properties of ion channels.** *Faraday Discuss* 1998, **111**:185-199.
  73. Smart OS, Goodfellow JM, Wallace BA: **The pore dimensions of gramicidin A.** *Biophys J* 1993, **72**:1109-1126.
  74. Engels M, Bashford D, Ghadiri MR: **Structure and dynamics of self-assembling peptide nanotubes and the channel-mediated water organization and self-diffusion. A molecular dynamics study.** *J Am Chem Soc* 1995, **117**:9151-9158.
  75. Chiu SW, Subramanian S, Jakobsson E: **Simulation study of a Gramicidin/lipid bilayer system in excess water and lipid. II. rates and mechanisms of water transport.** *Biophys J* 1999, **76**:1939-1950.
  76. Khazanovich N, Granja JR, McRee DE, Milligan RA, Ghadiri MR: **Nanoscale tubular ensembles with specified internal diameters. Design of a self-assembled nanotube with a 13-A pore.** *J Am Chem Soc* 1994, **116**:6011-6012.
  77. Tarek M, Maigret B, Chipot C: **Molecular dynamics investigation of an oriented cyclic peptide nanotube in DMPC bilayers.** *Biophys J* 2003, **85**:2287-2298.
  78. Dehez F, Tarek M, Chipot C: **Energetic of ion transport in a peptide nanotube.** *J Phys Chem B* 2007, **111**:10633-10635.
  79. Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M: **Modeling membranes under a transmembrane potential.** *J Phys Chem B* 2008, **112**:5547-5550.
  80. Andrews JM: **Determination of minimum inhibitory concentrations.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **48**:5-16.
  81. Andreu D, Rivas L: **Animal antimicrobial peptides: an overview.** *Biopolymers* 1998, **47**:415-433.
  82. Bulet P, Stocklin R, Menin L: **Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.** *Immunol Rev* 2004, **198**:169-184.
  83. Powers J-PS, Hancock REW: **The relationship between peptide structure and antibacterial activity.** *Peptides* 2003, **24**:1681-1691.
  84. McPhee JB, Hancock REW: **Function and therapeutic potential of host defence peptides.** *J Peptide Sci* 2005, **11**:677-687.
  85. Borgden KA: **Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?** *Nature* 2005, **3**:238-250.
  86. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C: **Antimicrobial peptides: premises and promises.** *Antimicrob Agents* 2004, **24**:536-547.
  87. Toke O: **Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections.** *Biopolymers* 2005, **80**:717-735.
-

- 
88. Boman GH: **Peptide antibiotics and their role in innate immunity.** *Annu Rev Immunol* 1995, **13**:61-92.
  89. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG: **Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.** *Nature* 1981, **292**:246 - 248.
  90. Cammers-Goodwin A, Allen TJ, Oslick SL, McClure KF, Lee JH, Kemp DS: **Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol.** *J Am Chem Soc* 1996, **118**:3082-3090.
  91. Holak TA, Engström A, Kraulis PJ, Lindeberg G, Bennich H, Jones TA, Gronenborn AM, Clore GM: **The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: A Nuclear Magnetic Resonance and dynamical simulated annealing study.** *Biochemistry* 1988, **27**:7620-7629.
  92. Berchinger B, Zasloff M, Opella SJ: **Structure and Orientation of the Antibiotic Peptide Magainin in Membranes by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.** *Protein Sci* 1993, **2**:2077-2084.
  93. Mandard N, Sodano P, Labbe H, Bommatin JM, Bulet P, Hetru C, Ptak M, Vovelle F: **Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimernsion nuclear magnetic resonance data.** *Eur J Biochem* 1998, **256**:404-410.
  94. Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J: **Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates.** *Biopolymers* 1998, **47**:465-477.
  95. Prenner EJ, Lewis RNAH, McElhanev RN: **The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:201-221.
  96. Katsu T, Ninomiya C, Kuroko M, Kobayashi H, Hirota T, Fujita Y: **Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erythrocyte membrane.** *Biochim Biophys Acta, Biomembr* 1988, **939**:57-63.
  97. Katsu T, Kuroko M, Morikawa T, Sanchika K, Fujita Y, Yamamura H, Uda M: **Mechanism of membrane damage induced by amphipathic peptides gramicidin S and melittin.** *Biochim Biophys Acta, Biomembr* 1989, **983**:135-141.
  98. Tamamura H, Kuroda M, Masuda M, Otaka A, Funakoshi S, Nakashima H, Yamamoto N, Waki M, Matsumoto A, Lancelin JM *et al*: **A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance.** *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol* 1993, **1163**:209-216.
  99. Ganz T: **Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.** *Nature* 2003, **3**:710-720.
  100. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI: **Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes.** *Proc Nat Acad Sci USA* 1990, **87**:210-214.
  101. Landon C, Sodano P, Hetru C, Hoffmann J, Ptak M: **Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects.** *Protein Sci* 1997, **6**:1878-1884.
  102. Raj PA, Edgerton M, Levine MJ: **Salivary histatin 5:dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity.** *J Biol Chem* 1990, **265**:3898-3905.
  103. Levine M, J., and , Raj PA, Soni SD, Levine MJ: **Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins.** *J Biol Chem* 1994, **269**(13):9610-9619.
  104. Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock REW: **Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin.** *J Biol Chem* 1996, **271**:19298-19303.
  105. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ: **Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1758**:1184-1202.
  106. Dathe M, Wieprecht T: **Structural feature of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membrane and biological cells.** *Biochem Biophys Acta* 1999, **1462**:71-87.
  107. Bessalle R, Haas H, Gorla A, Shalit I, Fridkin M: **Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension.** *Antimicrob Agents Chemother* 1992, **36**:313-317.
  108. Dathe M, Mann MS, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M: **Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological.** *Biochemistry* 1996, **35**:12612-12622.
  109. Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N, Miyajima K: **Interactions of antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of gram-negative bacteria.** *Biochem Biophys Acta* 1997, **1327**:119-130.
  110. Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M: **Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge.** *FEBS Lett* 2001, **501**:146-150.
-

- 
111. Shai Y: **Mechanism of the binding, insertion and destabilisation of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:55-70.
  112. Shai Y, Oren Z: **From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides.** *Peptides* 2001, **22**:1629-1641.
  113. shai Y: **Mode of action of membrane active antimicrobial peptides.** *Biopolymers* 2002, **66**:236-248.
  114. Uematsu N, Matsuzaki K: **Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: A model peptide study.** *Biophys J* 2000, **79**:2075-2083.
  115. Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, Miyajima K: **Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa.** *Biochemistry* 1998, **37**:15144-15153.
  116. Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, Beyermann M, Bienert M: **Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides.** *FEBS Lett* 1997, **403**:208-212.
  117. Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M: **Peptides hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes.** *Biochemistry* 1997, **36**:6124-6132.
  118. Matsuzaki K: **Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense ? magainins and tachyplesins as archetypes.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:1-10.
  119. Zasloff M: **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature* 2002, **415**:389-395.
  120. Matsuzaki K, Nakamura A, Murase O, Sugishita KI, Fujii N, Miyajima K: **Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge.** *Biochemistry* 1997, **36**:2104-2111.
  121. Breukink E, de Kruijff B: **The lantibiotic nisin, a special case or not ?** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:223-234.
  122. Yeaman MR, Bayer AS, Koo SP, Foss W, Sullam PM: **Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the staphylococcus aureus cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action.** *J Clin Invest* 1998, **101**:178-187.
  123. Bechinger B: **The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:157-183.
  124. He K, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW: **Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores.** *Biophys J* 1996, **70**:2659-2666.
  125. Huang HW: **Action of antimicrobial peptides: two-state model.** *Biochemistry* 2000, **39**:8348-8352.
  126. Ludtke SJ, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW: **Membrane pores induced by magainin.** *Biochemistry* 1996, **35**:13723-13728.
  127. Wieprecht T, Apostolov O, Beyermann M, Seelig J: **Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: Thermodynamic and mechanistic aspects.** *Biochemistry* 2000, **39**:442-452.
  128. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW: **Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores.** *Biophys J* 2001, **81**:1475-1485.
  129. Yang D, Weiss RM, Lehrer RI, Huang HW: **Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin.** *Biophys J* 2000, **79**:2002-2009.
  130. Matsuzaki K: **Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1376**:391-400.
  131. Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K: **An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation.** *Biochemistry* 1996, **35**:11361-11368.
  132. Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K: **Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore.** *Biochemistry* 1995, **34**:6521-6526.
  133. Williams RW, Starman R, Taylor KMP, Gable K, Beeler T, Zasloff M, D. C: **Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptide magainin 2a and PGLa.** *Biochemistry* 1990, **29**:4490-4496.
  134. Oren Z, Ramesh J, Avrahami D, Suryaprakash N, Shai Y, Jelinek R: **Structure and mode of membrane interaction of a short alpha helical lytic peptide and its diastereomer determined by NMR, FTIR, and fluorescence spectroscopy.** *Eur J Biochem* 2002, **269**:3869-3880.
  135. Papo N, Shai Y: **Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic.** *Biochemistry* 2003, **42**:458-466.
  136. Ladokhin A, White S: **'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1514**:253-260.
-

- 
137. Raghuraman H, Chattopadhyay A: **Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions.** *Biosci Rep* 2007, **27**:189-223.
  138. Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ: **Antimicrobial peptides in action.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:12156-12161.
  139. Jean-François F, Elezgaray J, Berson P, Vacher P, Dufourc EJ: **Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects.** *Biophys J* 2008, **95**:5748-5756.
  140. Oren Z, Shai Y: **Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides.** *Biopolymers* 1998, **47**:451-463.
  141. Neville F, Cahuzac M, Kononov O, Ishitsuka Y, Lee KYC, Kuzmenko I, Kale GM, Gidalevitz D: **Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptides LL-37: insight into mechanism of Action.** *Biophys J* 2006, **90**:1275-1287.
  142. Shai Y: **Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides.** In.: *Trends Biochem. Sci*; 1995: 460-464.
  143. Unger T, Oren Z, Shai Y: **The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interaction: implication to their mode of action.** *Biochemistry* 2001, **40**:6388-6397.
  144. Gazit E, Boman A, Boman HG, shai Y: **Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles.** *Biochemistry* 1995, **34**:11479-11488.
  145. Gazit E, Miller IR, Biggin PC, Sansom MSP, Shai Y: **Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes.** *J Mol Biol* 1996, **258**:860-870.
  146. Boman HG, Agerberth B, Boman A: **Mechanisms of action on escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine.** *Infect Immun* 1993, **61**:2978-2984.
  147. Vogt R, Crutzen PJ, Sander R: **A mechanism for halogen release from sea-salt aerosol in the remote marine boundary layer.** *Nature* 1996, **383**:327-330.
  148. Katsu T, Kobayashi H, Fujita Y: **Mode of action of gramicidin S on Escherichia coli membrane.** *Biochim Biophys Acta* 1986, **860**:608-619.
  149. Staudegger E, Prenner EJ, Kriechbaum M, Degovics G, Lewis RNAH, McElhaney RN, Lohner K: **X-Ray studies on the interaction of the antimicrobial peptides gramicidin S with microbial lipid extracts: evidence for cubic phase formation.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1468**:213-230.
  150. Prenner EJ, Lewis RNAH, Neuman KC, Gruner SM, Kondejwski LH, Hodges RS, McElhaney RN: **Nonlamellar phases induced by the interaction of gramicidin S with lipid bilayers. A possible relationship to membrane-disrupting activity.** *Biochemistry* 1997, **36**:7906-7916.
  151. Lee J-Y, Boman A, Chuanxin S, Andersson M, Jornvall H, Mutt V, Boman HG: **Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin.** *Proc Nat Acad Sci USA* 1989, **86**:9159-9162.
  152. Bechinger B: **Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin.** *J Membrane Biol* 1996, **156**:197-211.
  153. Tossi A, Tarantino C, Romeo D: **Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity.** *Eur J Biochem* 1997, **250**:549-558.
  154. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwing SSL, Ganz T, Selsted ME: **Interaction of human defensins with escherichia coli. mechanism of bactericidal activity.** *J Clin Invest* 1989, **84**:553-561.
  155. Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock REW: **Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of pseudomonas Aeruginosa.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:3317-3321.
  156. Koo SP, Bayer AS, Yeaman MR: **Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides.** *Infect Immun* 2001, **69**:4916-4922.
  157. D. PK, Kim YS, Han DK, Kim YH, H. LE, Suh H, Choi KS: **Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces.** *Biomaterials* 1998, **19**:851-859.
  158. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG: **The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2001, **98**:14637-14642.
  159. Yan H, Hancock REW: **Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**:1558-1560.
  160. Zhang L, Benz R, Hancock REW: **Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides.** *Biochemistry* 1999, **38**:8102-8111.
  161. Hara T, Mitani Y, Tanaka K, Uematsu N, Takakura A, Tachi T, Kodama H, Kondo M, Mori H, Otaka A *et al*: **Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study.** *Biochemistry* 2001, **40**:12395-12399.
  162. Hancock REW: **Peptide antibiotics.** *Lancet* 1997, **349**:418-422.
-

- 
163. Otvos L: **Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets.** *J Peptide Sci* 2005, **11**:697-706.
164. Nahaie MR, Goodfellow M, Minnikin DE, Hajek V: **Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of staphylococcus.** *J Gen Microbiol* 1984, **130**:2427-2437.
165. Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock REW: **Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:1542-1548.
166. Dhawan VK, Yeaman MR, Cheung AL, Kim E, Sullam PM, Bayer AS: **Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in vitro is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to staphylococcus aureus.** *Infect Immun* 1997, **65**:3293-3299.
167. Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI: **A phop-regulated outer membrane protease of salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides.** *J Bacteriol* 2000, **182**:4077-4086.
168. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, Kalbacher H, Nieuwenhuizen WF, Jung G, Tarkowski A *et al*: **Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with 1-lysine.** *J Exp Med* 2001, **193**:1067-1076.
169. van Gunsteren WF, Berendsen HJC: **Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry.** *Angew Chem Int Ed Engl* 1990, **29**:992-1023.
170. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M: **Charmm: a program for macromolecular energy, minimizations, and dynamics calculations.** *J Comp Chem* 1983, **4**:187-217.
171. MacKerell Jr. AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr. RL, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S *et al*: **All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins.** *J Phys Chem B* 1998, **102**:3586-3616.
172. Weiner PK, Kollman PA: **AMBER: assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions.** *J Comp Chem* 1981, **2**:287-303.
173. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz Jr. KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JC, Kollman PA: **A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules.** *J Am Chem Soc* 1995, **117**:5179-5197.
174. Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagona G, Profeta S, Weiner PKJ: **A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins.** *J Am Chem Soc* 1984, **106**:765-784.
175. Jorgensen WL, Tirado-Rives J: **The OPLS force field for proteins: energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin.** *J Am Chem Soc* 1988, **110**:1657-1666.
176. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rivers J: **Development and testing of the OPLS all-Atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids.** *J Am Chem Soc* 1996, **118**:11225-11236.
177. Hermans J, Berendsen HJC, van Gunsteren WF, Postma JPM: **A consistent empirical potential for water-protein interactions.** *Biopolymers* 1984, **23**:1513-1518.
178. Verlet L: **Computer "experiments" on classical fluids. I. thermodynamical properties of lennard-jones molecules.** *Phys Rev* 1967, **159**:98-103.
179. Hockney RW: **The potential calculation and some applications.** *Methods Comput Chem* 1970, **9**:136-211.
180. Hockney RW, Goel SP: **Quiet high-resolution computer models of plasma.** *J Comput Phys* 1974, **14**:148-158.
181. Tuckerman M, Berne BJ, Martyna GJ: **Reversible multiple time scale molecular dynamics.** *J Chem Phys* 1992, **97**:1990-2001.
182. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR: **Molecular dynamics with coupling to an external bath.** *J Chem Phys* 1984, **81**:3684-3690.
183. Hoover WG: **Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions.** *Phys Rev* 1985, **A31**:1695-1697.
184. Nosé S: **A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods.** *J Chem Phys* 1984, **81**:511-519.
185. Nosé S: **A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble.** *Mol Phys* 1984, **52**:255-268.
186. Andersen HC: **Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature.** *J Chem Phys* 1980, **72**:2384-2393.
187. Ewald PP: **Die berechnung optischer und elektrostatischer gitterpotentiale.** *Ann Phys* 1921, **64**:253-287.
-

- 
188. Darden T, York D, Pedersen L: **Particle Mesh Ewald - an Nlog(N) method for ewald sums in large systems.** *J Chem Phys* 1993, **98**:10089-10092.
189. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Pedersen LG: **A smooth particle mesh ewald method.** *J Chem Phys* 1995, **103**:8577-8593.
190. Hockney RW, Eastwood JW: **Computer simulation using particles:** Taylor & Francis, Inc. Bristol, PA, USA; 1988.
191. Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJC: **Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes.** *J Comp Phys* 1977, **23**:327-336.
192. Van GWF, Berendsen HJC: **Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics.** *Mol Phys* 1977, **34**:1311-1327.
193. Kalé L, Skeel R, Bhandarkar M, Brunner R, Gursoy A, Krawetz N, Phillips J, Shinozaki A, Varadarajan K, Schulten K: **Namd2: greater scalability for parallel molecular dynamics.** *J Comp Phys* 1999, **151**:283-312.
194. Leach AR: **Molecular modelling: principles and applications,** Second Edition edn: Prentice Hall; 2001.
195. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML: **Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.** *J Chem Phys* 1983, **79**:926-935.
196. Mahoney MW, Jorgensen WL: **A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions.** *J Chem Phys* 2000, **112**:8910-8922.
197. Hénin J, Chipot C: **Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations.** *J Phys Chem* 2004, **121**:2904-2914.
198. Rodriguez-Gomez D, Darve E, Pohorille A: **Assessing the efficiency of free energy calculation methods.** *J Chem Phys* 2004, **120**:3563-3578.
199. Orgel O, Joseph PR: **Surface-active helices in transmembrane proteins.** *Current Protein and Peptide Sciences* 2006, **7**:533-560.
200. Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HMK: **Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2006, **103**:2126-2131.
201. Im W, Brooks CL: **Interfacial folding and membrane insertion of designed peptides studied by molecular dynamics simulations.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2005, **102**:6771-6776.
202. Hecce HD, Garcia AE: **Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:20805-20810.
203. Nymeyer H, Woolf TB, Garcia AE: **Folding is not required for bilayer insertion: replica exchange simulations of an  $\alpha$ -helical peptide with an explicit lipid bilayer.** *Protein Struct Funct Genet* 2005, **59**:783-790.
204. Voth GA (ed.): **Coarse-graining of condensed phase and biomolecular systems:** Taylor and Francis; 2008.
205. Lindahl E, Sansom MSP: **Membrane proteins: molecular dynamics simulations.** *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18**:425-431.
206. Arkhipov A, Yin Y, Schulten K: **Four-scale description of membrane sculpting by BAR domains.** *Biophys J* 2008, **95**:2806-2821.
207. Tozzini V: **Coarse-grained models for proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 2005, **15**:144-150.
208. Lopez CF, Nielsen SO, Moore PB, Klein ML: **Understanding nature's design for a nanosyringe.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2004, **101**:4431-4434.
209. Lopez CF, Nielsen SO, Srinivas G, DeGrado WF, Klein ML: **Probing membrane insertion activity of antimicrobial polymers via coarse-grain molecular dynamics.** *J Chem Theory Comput* 2006, **2**:649-655.
210. Marrink SJ, Mark AE: **Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membrane.** *Biophys J* 2004, **87**:3894-3900.
211. Bond PJ, Sansom MSP: **Bilayer deformation by the Kv channel voltage sensor domain revealed by self-assembly simulations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:2631-2636.
212. Periole X, Huber T, Marrink SJ, Sakmar TP: **G protein-coupled receptors self-assembly in dynamics simulations of model bilayers.** *J Am Chem Soc* 2007, **129**:10126-10132.
213. Yefimov S, Van der Giessen E, Onck PR, Marrink SJ: **Mechanosensitive membrane channels in action.** *Biophys J* 2008, **94**:2994-3002.
214. Treptow W, Marrink SJ, Tarek M: **Gating motions in voltage-gated potassium channels revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations.** *J Phys Chem B* 2008, **112**:3277-3282.
215. Lopez CF, Nielsen SO, Ensing B, Moore PB, Klein ML: **Structure and dynamics of model pore insertion into a membrane.** *Biophys J* 2005, **88**:3083-3094.
-

- 
216. Nielsen SO, Ensing B, Ortiz V, Moore PB, Klein ML: **Lipid bilayer perturbations around a transmembrane nanotubes: A coarse grain molecular dynamics study.** *Biophys J* 2005, **88**:3822-3828.
217. Srinivas G, Nielsen SO, Moore PB, Klein ML: **Molecular dynamics simulation of surfactant self-organization at a solid-liquid interface.** *J Am Chem Soc* 2005, **128**:848-853.
218. Srinivas G, Discher DE, Klein ML: **Key roles for chain flexibility in block copolymer membranes that contain pores or make tubes.** *Nano Lettres* 2005, **5**:2343-2349.
219. Srinivas G, Klein ML: **Molecular dynamics simulation of self-assembly and nanotube formation by amphiphilic molecules in aqueous solution: A coarse-grain approach.** *Nanotechnology* 2007, **18**:205703
220. Marrink SJ, Risselada J, Mark AE: **Simulation of gel phase formation and melting in lipid bilayer using a coarse grained model.** *Chem Phys Lipids* 2005, **135**:223-244.
221. Faller R, Marrink SJ: **Simulation of domain formation in DLPC-DSPC mixed bilayers.** *Langmuir* 2004, **20**:7686-7693.
222. Wallace EJ, Sansom MSP: **Carbon nanotube/detergent interactions via coarse-grained molecular dynamics.** *Nano Lette* 2007, **7**:1923-1928.
223. Wallace EJ, Sansom MSP: **Carbon nanotube self-assembly with lipids and detergent: A molecular dynamics study.** *Nanotechnology* 2009, **20**.
224. Wallace EJ, Sansom MSP: **Blocking of carbon based nanoinjectors by lipids: a simulation study.** *Nano Lette* 2008, **8**:2751-2756.
225. Izvekov S, Voth GA: **A multiscale coarse-graining method for biomolecular systems.** *J Phys Chem B* 2005, **109**:2469-2473.
226. Izvekov S, voth GA: **Multiscale coarse-graining of mixed phospholipid/cholesterol bilayers.** *J Chem Theory Comput* 2006, **2**:637-648.
227. Shi Q, Voth GA: **Multi-Scale Modeling of Phase Separation in Mixed Lipid Bilayers.** *Biophys J* 2005, **89**:2385-2394.
228. Izvekov S, Parrinello M, Bumham CJ, Voth GA: **Effective force fields for condensed phase systems from ab initio molecular dynamics simulation: A new method for force-matching.** *J Phys Chem B* 2005, **109**:2469-2473.
229. Elezgaray J, Laguerre M: **A systematic method to derive force fields for coarse-grained simulations of phospholipids.** *Comput Phys Commun* 2006, **175**:264-268.
230. Orsi M, Haubertin DY, Sanderson WE, Essex JW: **A quantitative coarse-grain model for lipid bilayers.** *J Phys Chem B* 2008, **112**:802-815.
231. Catte A, Patterson JC, Bashtovyy D, Jones MK, Gu F, Li L, Rampioni A, Sengupta D, Vuorela T, Niemela P *et al*: **Structure of spheroidal HDL particles revealed by combined atomistic and coarse-grained simulations.** *Biophys J* 2008, **94**:2306-2319.
232. Thorpe IF, Zhou J, Voth GA: **Peptide folding using multiscale coarse-grained models** *J Phys Chem B* 2008, **112**:13079-13090.
233. Han W, Wu Y-D: **Coarse-grained protein model coupled with a coarse-grained water model: molecular dynamics study of polyalanine-based peptides.** *J Chem Theor Comp* 2007, **3**:2146-2161.
234. MacCallum JL, Bennett WFD, Tieleman DP: **Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations.** *Biophys J* 2008, **94**:3393-3404.
235. Freitas JA, Tobias DJ, Von Heijne G, White SH: **Interface connections of a transmembrane voltage sensor.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2005, **102**:15059-15064.
236. Tarek M: **Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation.** *Biophys J* 2005, **88**:4045-4053.
237. Lee H, Larson RG: **Molecular dynamics simulations of PAMAM dendrimer-induced pore formation in DPPC bilayers with a coarse-grained model.** *J Phys Chem B* 2006, **110**:18204-18211.
238. Adhangale PS, Gaver III DP: **Equation of state for a coarse-grained DPPC monolayer at the air/water interface.** *Mol Phys* 2006, **104**:3011-3019.
239. Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink S-J: **The MARTINI coarse-grained force field: Extension to proteins** *J Chem Theor Comp* 2008, **4**:819-834.
240. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: **VMD -- Visual molecular dynamics.** *J Molec Graph* 1996, **14**:33--38.
241. Róg T, Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M: **Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: Treatment of electrostatic interactions.** *Acta Biochimica Polonica* 2003, **50**:789-798.
242. Kim HS, Hartgerink D, Ghadiri MR: **Oriented self-assembly of cyclic peptide nanotubes in lipid membranes.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:4417-4424.
-

- 
243. Hwang H, Schatz GC, Ratner MA: **Coarse-grained molecular dynamics study of cyclic peptide nanotube insertion into a lipid bilayer.** *J Phys Chem A* 2008, In press.
244. Hyvonen MT, Kovanen PT: **Molecular dynamics simulations of unsaturated lipid bilayers: effects of varying the numbers of double bonds.** *Eur Biophys J* 2005, **34**:294-305.
245. Feller SE, Venable RM, Pastor RW: **Computer simulation of a dppc phospholipid bilayer: Structural changes as a function of molecular surface area.** *Langmuir* 1997, **13**:6555-6561.
246. Berger O, Edholm O, Jähnig F: **Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature.** *Biophys J* 1997, **72**:2002-2013.
247. Tieleman DP, Berendsen HJC: **Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters.** *J Chem Phys* 1996, **105**:4871-4880.
248. Rosenthal-Aizman K, Svensson G, Unden A: **Self-assembling peptide nanotubes from enantiomeric pairs of cyclic peptides with alternating D and L amino acid residues.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**:3372-3373.
249. Wolfenden R, Andersson L, Cullis PM, Southgate CCB: **Affinities of amino acid side-chains for solvent water.** *Biochemistry* 1981, **20**:849-855.
250. Radzicka A, Wolfenden R: **Comparing the polarities of the amino-acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol and neutral aqueous solution.** *Biochemistry* 1988, **27**:1664-1670.
251. MacCallum JI, Tieleman DP: **Calculation of the water-cyclohexane transfer free energies of neutral amino acid side-chain analogs using the OPLS all-atom force field.** *J Comput Chem* 2003, **24**:1930-1935.
252. Chang J, Lenhoff AM, Sandler SI: **Solvation free energy of amino acids and side-chain analogues.** *J Phys Chem B* 2007, **111**:2098-2106.
253. Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, Tang I-M, Tieleman DP, Monticelli L: **Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes.** *Nat Nanotechnol* 2008, **3**:363-368.
254. Lindahl E, Edholm O: **Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations.** *J Chem Phys* 2000, **113**:3882-3893
255. Sitaram N, Nagaraj R: **Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity.** *biochim biophys Acta* 1999, **1462**:29-54.
256. Papo N, Oren Z, Pag U, Sahl HG, Shai Y: **The Consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers.** *J Biol Chem* 2002, **277**:33913-33921.
257. Sal-Man N, Oren Z, Shai Y: **Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells.** *Biochemistry* 2002, **41**:11921-11930.
258. Raghuraman H, Chattopadhyay A: **Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution.** *Biopolymers* 2006, **83**:111-121.
259. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B: **Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37.** *J Biol Chem* 1998, **273**:3718-3724.
260. Jelokhani-Niaraki M, Prenner EJ, Kay CM, McElhaney RN, Hodges RS, Kondejewski LH: **Conformation and other biophysical properties of cyclic antimicrobial peptides in aqueous solutions.** *J Pept Res* 2001, **58**:293-306.
261. Ghosh JK, Shaol D, Guillaud P, Cicéron L, Mazier D, Kustanovich I, Shai Y, Mor A: **Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic plasmodium falciparum and the underlying molecular basis.** *J Biol Chem* 1997, **272**:31609-31616.
262. Chipot C, Tarek M: **Interaction of a peptide nanotube with a water-membrane interface.** *Phys Biol* 2006, **3**:S20-S25.
263. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y: **Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity.** *Biochem J* 1999, **341**:501-513.
264. Wildman KAH, Lee DK, Ramamoorthy A: **Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37.** *biochemistry* 2003, **42**:6545-6558.
265. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y: **Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes.** *Biochemistry* 1992, **31**:12416-12423.
266. Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore DS, Nicolas P: **Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin.** *Biochemistry* 1991, **30**:8824-8830.
-



- 
267. Mor A, Hani K, Nicolas P: **The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms.** *J Biol Chem* 1994, **269**:31635-31641.
268. Mor A, Nicolas P: **The NH<sub>2</sub>-terminal  $\alpha$ -helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity.** *J Biol Chem* 1994, **269**:1934-1939.
269. Prenner EJ, Lewis RNAH, Neuman KC, Kondejewski LH, Hodges RS, McElhaney RN: **Nonlamellar phases induced by the interaction of gramicidin S with lipid bilayers. A possible relationship to membrane-disrupting activity.** *Biochemistry* 1997, **36**:7906-7916.
270. Lewis RNAH, Prenner EJ, Kondejewski LH, Flach CR, Mendelsohn R, Hodges RS, McElhaney RN: **Fourier transform infrared spectroscopic studies of the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid micelles and with lipid monolayer and bilayer membrane.** *Biochemistry* 1999, **38**:15193-15203.
271. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM: **Human  $\beta$ -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung That is inactivated in cystic fibrosis.** *Cell* 1997, **88**:553-560.
272. Bals R, Goldman MJ, Wilson JM: **Mouse  $\beta$ -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract.** *Infect Immun* 1998, **66**:1225-1232.
273. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM: **Human  $\beta$ -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.** *J Clin Invest* 1998, **102**:874-880.
274. Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y: **Effect of ions on antibacterial activity of human  $\beta$ -defensin 2.** *Microbiol Immunol* 2000, **44**:749-754.
275. Wu G, Ding J, Li H, Li L, Zhao R, Shen Z, Fan X, Xi T: **Effects of cations and PH on antimicrobial activity of thanatin and s-thanatin against Escherichia coli ATCC25922 and B. subtilis ATCC 21332 .** *Curr Microbiol* 2008, **57**:552-557.
276. Davis JH, Clare DM, Hodges RS, Bloom M: **Interaction of a synthetic amphiphilic polypeptide and lipid in a bilayer structure.** *Biochemistry* 1983, **22**:5298-5305.
277. C. HA, Millman BM, Davis JH: **Orientation of alpha-helical peptides in a lipid bilayer.** *Biochim Biophys Acta* 1989, **979**:139-141.
278. Zhang Y-P, Lewis RNAH, Hodges RS, McElhaney RN: **Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayer: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies.** *Biochemistry* 1992, **31**:11579-11588.
279. Morrow MR, Huschilt JC, Davis JH: **Simulation modeling of phase and calorimetric behavior in an amphiphilic peptide/phospholipid model membrane.** *Biochemistry* 1985, **24**:5396-5406.
280. Paul KP, Mackav AL, Soderman O, Bloom M, Tanjea AK, Hodges RS: **Dynamic properties of backbone of an integral membrane polypeptide measured by 2H-NMR.** *Eur Biophys J* 1985, **12**:1-11.
281. Pag U, Oedenkoven M, Papo N, Oren Z, Shai Y, H.-G. S: **In vitro activity and model of action of diastereomeric antimicrobial peptides against bacterial clinical Isolates. .** *J Am Chem* 2004, **53**:230-239.
282. Papo N, Shai Y: **Effect of drastic sequence alteration and D-amino acid incorporation on the membrane binding behavior of lytic peptides.** *Biochemistry* 2004, **43**:6393-6403.
283. Meijberg W, Booth PJ: **The activation energy for insertion of transmembrane alpha-helical is dependent on membrane composition.** *J Mol Biol* 2002, **319**:839-853.
284. Percot A, Zhu XX, Lafleur M: **Design and characterization of anchoring amphiphilic peptides and their interaction with lipid vesicles.** *Biopolymers* 1999, **50**:647-655.
285. Hunt JF, Rath P, Rothschild KJ, Engelman DM: **Spontaneous, pH-dependent membrane insertion of a transbilayer alpha-helix.** *Biochemistry* 1997, **36**:15177-15192.
-

---

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I : SYSTEMES ETUDIES</b> .....	<b>8</b>
I-1 LES MEMBRANES PLASMIQUES .....	8
1.1.1 Composantes.....	8
I-2 LES DEUX MEMBRANES EUCARYOTE ET PROCARYOTE.....	11
1.2.1 Propriétés physiques.....	11
1.2.2 Spécificités dépendants des têtes polaires .....	12
I-3 LES PAROIS POSITIVES ET NEGATIVES DE LA BACTERIE.....	15
I-4 LES CYCLES PEPTIDIQUES (CPS) .....	17
1.4.1 Structure .....	17
1.4.2 Propriétés .....	20
<b>CHAPITRE II : L'ACTION ANTIMICROBIENNE</b> .....	<b>24</b>
II-1 INTRODUCTION.....	24
II-2 LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS (PAMs).....	24
II-3 CLASSIFICATION DES PAMs.....	25
2.3.1 Les peptides hélicoïdaux.....	25
2.3.2 Les peptides en feuillets- $\beta$ .....	25
2.3.3 Les peptides riches en Cystéine.....	26
2.3.4 Les peptides linéaires riches en certains acides aminés.....	26
2.3.5 Les peptides avec des acides aminés rares.....	27
II-4 PROPRIETES DES PAMs.....	27
2.4.1 La conformation .....	28
2.4.2 La charge.....	28
2.4.3 L'amphipacité et le moment hydrophobe.....	28
2.4.4 L'angle de polarisation .....	29
2.4.5 L'hydrophobicité .....	29
II-5 LE MODE D'ACTION.....	29
2.5.1 La fixation initiale du peptide.....	29
2.5.2 Les mécanismes .....	31
II-6 MORT DE LA CELLULE .....	38
II-7 RESISTANCE DES MICRO-ORGANISMES .....	38
<b>CHAPITRE III : DYNAMIQUE MOLECULAIRE</b> .....	<b>40</b>
III-1 INTRODUCTION .....	40
III-2 PRINCIPE .....	40
III-3 POTENTIELS INTRAMOLECULAIRES .....	41
3.3.1 Le potentiel des liaisons .....	41
3.3.2 Le potentiel angulaire.....	41
3.3.3 Le potentiel des dièdres propres.....	42
3.3.4 Le potentiel des dièdres impropres.....	42
III-4 POTENTIELS INTERMOLECULAIRES.....	42
III-5 CHAMPS DE FORCE ET CODES DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE .....	43
III-6 CONDITIONS PERIODIQUES AUX LIMITES .....	44
III-7 ENSEMBLES THERMODYNAMIQUES .....	45
3.7.1 L'ensemble micro canonique (NVE).....	45
3.7.2 L'ensemble canonique (NVT).....	46
3.7.3 L'ensemble isobare isotherme (NPT).....	47
3.7.4 L'ensemble grand canonique.....	47
III-8 LES EQUATIONS DU MOUVEMENT.....	48
3.8.1 Dynamique de Newton.....	48
3.8.2 Dynamique moléculaire à température constante.....	50
3.8.3 Dynamique moléculaire à pression constante.....	52
III-9 IMPLEMENTATIONS .....	53
3.9.1 Méthodes de calcul des interactions intermoléculaires.....	53

3.9.2 Contraintes .....	54
III-10 PROTOCOLE GENERAL DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE .....	55
3.10.1 La minimisation .....	56
3.10.2 La production .....	56
III-11 CALCUL D'ENERGIE LIBRE PAR LA METHODE ADAPTATIVE ABF .....	57
<b>CHAPITRE IV : L'APPROCHE GROS GRAIN .....</b>	<b>59</b>
IV-1 INTRODUCTION .....	59
IV-2 LE MODELE DE KLEIN, M.L. (MLK) .....	60
4.2.1 Le modèle d'eau .....	60
4.2.2 Le modèle d'alcane .....	60
4.2.3 Le modèle du phospholipide .....	61
4.2.4 Applications .....	62
IV-3 LE MODELE DE MARINK, S. J. (MSJ) .....	62
4.3.1 Les sites d'interactions .....	63
4.3.2 Les fonctions énergies potentielles .....	63
4.3.3 Le modèle d'eau/d'alcane .....	65
4.3.4 Le modèle phospholipidique .....	65
4.3.5 Applications .....	66
4.3.6 Construction d'une molécule dans le modèle MSJ .....	66
4.3.7 Limitations du modèle MSJ .....	67
IV-4 LA VERSION MARTINI 2 DU MODELE MSJ .....	67
IV-5 LE MODELE GG POUR LES PROTEINES .....	70
<b>CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>76</b>
V-1 L'ETUDE PRELIMINAIRE A L'ECHELLE ATOMISTIQUE .....	76
5.1.1 La membrane .....	76
5.1.2 Les cycles peptidiques .....	78
V-2 REPRESENTATIONS DES SYSTEMES A L'ECHELLE GROS GRAINS .....	80
V-3 FORMATION DE NANOTUBES TRANSMEMBRANAIRES .....	82
5.3.1 Le champs de force préliminaire .....	82
5.3.2 Optimisation du comportement des sites d'eau .....	85
5.3.3 Optimisation du champ de force impliquant les Trp et Leu .....	86
V-4 L'ACTION ANTIBACTERIENNE .....	95
5.4.1 Champs de force préliminaires .....	96
5.4.2 Auto assemblage des lipides POPC et des CP2s .....	97
5.4.3 Partition des CP2s à l'interface des membranes procaryotes .....	100
V-5 SELECTIVITE MEMBRANAIRE AUX CP2S .....	109
V-6 UN AUTRE TYPE DE CYCLE PEPTIDIQUE .....	111
V-7 EXTENSION DU CHAMP DE FORCE AUX PEPTIDES LINEAIRES .....	113
5.7.1 Stabilité des structures secondaires en hélices- $\alpha$ .....	115
5.7.2 Analyse des structures secondaires .....	118
V-8 ÉVALUATION DU CHAMP DE FORCE MARTINI 2 .....	120
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>123</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>125</b>
A-1 LES PEPTIDES .....	125
A.1.1 Définition .....	125
A.1.2 Structure peptidique .....	125
B-1 PROFILS D'ENERGIE LIBRE .....	127
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>130</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>141</b>

---

## **Résumé**

Les cycles peptidiques (CPs) composés d'un nombre paire d'acides aminés avec l'alternance de la chiralité L/D, sont capables de s'auto assembler pour former des nanotubes peptidiques tubulaires creux grâce à un réseau de liaisons d'hydrogène. La partition des CPs hydrophobes dans une membrane lipidique forme un nanotube transmembranaire, alors que les CPs chargés caractérisé par l'amphipacité montrent une forte activité antibactérienne contre les bactéries gram+/- . Le but de ce travail consiste principalement à étudier les interactions des CPs avec des membranes lipidiques par simulations de dynamique moléculaire utilisant l'approche gros grains, pour mieux caractériser le processus d'auto assemblage, la formation de nanotubes transmembranaires et l'action antibactérienne des CPs. Les résultats obtenus montrent que l'activité de CPs est gouvernée par les propriétés physico-chimiques de la l'interaction des CPs avec les têtes polaires de la membrane. Dans le cas des CPs hydrophobes, les peptides s'auto-assemblent en amas à la surface des membranes avant de s'auto organiser à l'intérieur des bicouches lipidiques pour former des nanotubes transmembranaires. Dans le cas des CPs chargés, leur action antibactérienne semble résulter de l'extraction et la libération de micelles de phospholipides de la membrane qui est précédée par l'adsorption des peptides à la surface des bicouches lipidiques en mode dit carpet-like. L'ensemble de cette étude a nécessité un grand effort d'optimisation des champs de forces gros grains existants. Nous avons en effet montré leurs limites et optimisés les paramètres d'interaction impliquant plusieurs acides amines comme les résidus Leu, Trp, Arg et Lys. Nous avons étendu l'étude au repliement de peptides hélicoïdaux transmembranaires ([K<sub>2</sub>-L<sub>24</sub>-K<sub>2</sub>] et antimicrobiens [LKLLKLLKLLKLL-NH<sub>2</sub>] montrant ainsi la transférabilité du champ de force GG optimisé.

## **Abstract**

Cyclic peptides (CPs) composed of an even number of alternating D and L amino acids, are able to self-assemble into hollow tubular peptide nanotubes by means of a network of hydrogen bonds. The partition of hydrophobic CPs in lipid membranes forms an artificial transmembrane nanotube, while charged CPs characterized by amphipathic properties exhibit high antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The main goal of our investigation consisted to studying the interaction of cyclic peptides with lipid membranes using coarse grained molecular dynamics simulations in order to characterize the process of self assembly in solution, formation of transmembrane nanotubes and antibacterial activity of cyclic peptides. The results obtained revealed that, the activity of these CPs are governed by their physicochemical properties and by the interactions with the membrane lipid head-groups. In the case of hydrophobic CPs, the peptides pre-assemble as clusters before re-organizing in the interior of the membrane to form transmembrane nanotubes. For cationic CPs, the antibacterial activity seems to result from a release of phospholipid micelles following a carpet-like model adsorption. This study required a large effort in optimizing the coarse grain force field published so far. We have indeed shown their shortcomings, and optimized the parameters describing the interactions involving several amino-acids such as Leu, Trp, Arg and Lys. We have extended the study to the investigation of the folding of transmembrane and antimicrobial peptides probing hence the transferability of the optimized coarse grained model force field.

---