



HAL
open science

Solvants et sites de liaison hydrophobes

Caroline Senac

► **To cite this version:**

Caroline Senac. Solvants et sites de liaison hydrophobes. Bio-Informatique, Biologie Systémique [q-bio.QM]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS021 . tel-02108973v1

HAL Id: tel-02108973

<https://theses.hal.science/tel-02108973v1>

Submitted on 24 Apr 2019 (v1), last revised 24 Sep 2019 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse pour obtenir le grade de docteur de
Sorbonne Université

École doctorale Pierre Louis de santé publique à Paris : épidémiologie et
sciences de l'information biomédicale

Discipline : Bioinformatique

Solvants et sites de liaison hydrophobes

PRÉSENTÉE PAR : **Caroline SENAC**

**Sous la direction de DR. NICOLAS TAULIER, CNRS et DR. PATRICK
FUCHS, Université Paris Diderot**

MEMBRES DU JURY:

Présidente du jury : Pr. Sophie CRIBIER, Sorbonne Université

Rapporteuse : Pr. Annick DEJAEGERE, Université de Strasbourg

Rapporteuse : Pr. Sophie FOURMENTIN, Université Littoral Côte d'Opale

Examineur : Dr. Gilles FERRY, Institut de recherche Servier

Examineur : Dr. Damien LAAGE, CNRS

Examineur : Dr. François-Xavier LEGRAND, Université Paris-Sud

Date de soutenance : 28 février 2018

Remerciements

Je remercie Pascal Laugier et tous les collègues du laboratoire d'imagerie biomédicale pour m'avoir accueilli et pour avoir gardé une certaine ouverture d'esprit malgré un sujet loin de leur domaine de recherche.

Je remercie tous nos collaborateurs : Stéphane Desgranges et Christiane Contino-Pépin, pour avoir réalisé les expériences de RMN, Philippe Hünenberger et Bruno Horta pour leur aide et conseils précieux lors de la mise au point des paramètres des C_1E_j et nos collaborateurs de l'institut Servier pour nous avoir fourni la protéine QR2.

Je remercie mes directeurs de thèse Nicolas Taulier et Patrick Fuchs pour leur encadrement, leur disponibilité et leur soutien. Vous m'avez permis de réaliser ce projet dans les meilleures conditions possibles.

Enfin, je tiens à remercier Romaryc pour son soutien indéfectible tout au long de ces nombreuses années.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Articles :

Senac C., Urbach W., Kurtisovski E., Hünenberger P.H., Horta B.A.C., Taulier N., Fuchs P.F.J. Simulating Bilayers of Nonionic Surfactants with the GROMOS-Compatible 2016H66 Force Field. *Langmuir*. 2017 ; 33(39) :10225-10238

Senac, C., Desgranges, S., Contino-Pépin, C., Urbach, W., Fuchs, P.F.J., Taulier, N. Effect of dimethyl sulfoxide on binding of 1-adamantane carboxylic acid to β and γ -cyclodextrins. *ACS Omega*. 2018 ; 3(1) :1014-1021

Posters :

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Does the Presence of a Co-Solvent Alter the Affinity of a Hydrophobic Drug to its Target ? *Biophysical Journal*, 112(3), 493a. Février 2016. Los Angeles.

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Effect of a cosolvent in binding events of hydrophobic molecules. ISQBP president's meeting 2016. Juin 2016. Bergen.

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Effect of a Cosolvent in Binding Events of Hydrophobic Molecules. An Experimental and Numerical Study. *Biophysical Journal*, 110(3), 49a-50a. Février 2017. Nouvelle-Orléans.

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Does the presence of DMSO alter the affinity of a hydrophobic drug to its target ? GGMM 2017. Mai 2017. Reims.

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Does the presence of DMSO alter the affinity of a hydrophobic drug to its target ? Workshop on Free Energy Calculations from Molecular Simulation. Mai 2017. Londres.

Communication :

Senac, C., Fuchs, P., Urbach, W., Taulier, N. Effect of dimethylsulfoxide on the binding affinity of a hydrophobic ligand for γ -cyclodextrin. 17E journées cyclodextrines. Octobre 2016. Nancy.

RÉSUMÉ

La recherche pharmaceutique : une industrie performante ? C'est ce que la commercialisation régulière de nouveaux médicaments semble indiquer. Pourtant, en y regardant de plus près, on constate que les temps de développement sont de plus en plus longs et coûteux, seulement 2 % des projets de recherche mènent à la commercialisation d'un nouveau médicament. La faible efficacité du processus peut s'expliquer par les méthodes de sélection employées. La sélection de médicaments en laboratoire est réalisée dans des conditions très différentes du lieu de leur délivrance dans le corps humain. En effet, la majorité des cibles thérapeutiques et des molécules actives sont hydrophobes. Pour les expériences *in vitro*, il est donc nécessaire de travailler dans un solvant permettant la solubilisation de molécules hydrophobes. Pour cela, un cosolvant est ajouté dans le milieu de réaction. Un des cosolvant régulièrement employé dans l'industrie pharmaceutique est le diméthylsulfoxyde (DMSO). Or, de nombreuses études ont montré qu'à concentration élevée le DMSO a un effet sur les affinités des ligands pour leur récepteur. Cependant, le DMSO est utilisé en faible concentration dans l'industrie pharmaceutique, il est alors considéré comme n'ayant aucun effet. Dans cette étude, nous avons voulu caractériser l'effet d'une faible concentration de DMSO sur les interactions de molécules hydrophobes.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet d'une concentration de 5 % de DMSO sur l'affinité d'un ligand hydrophobe pour son récepteur à l'aide de simulations de dynamique moléculaire (DM), d'expériences de résonance magnétique nucléaire et de mesures de vitesse ultra-sonore. Ensuite, nous avons caractérisé l'interaction du DMSO avec les sites de liaison hydrophobes par DM. Nous avons étudié trois systèmes différents : les cyclodextrines β (β -CD) et γ (γ -CD) avec l'acide adamantane-1-carboxylique (ADA) un ligand hydrophobe pouvant se lier aux deux CD, la β -CD avec un tensioactif de type C_iE_j (polyéthylène glycol alkyl-éther) et enfin la protéine quinone réductase 2 (QR2) avec un ligand hydrophobe (MCA-NAT).

Les trois systèmes étudiés, ADA/CD, C_iE_j /CD et MCA-NAT/QR2, ont montré des comportements différents du DMSO. Pour les complexes ADA/CD, nous avons montré que le DMSO diminue l'affinité de l'ADA pour la β -CD mais pas pour la γ -CD. Nos simulations ont montré une compétition entre le DMSO et l'ADA pour le site de liaison de la β -CD. Plus le volume du ligand est ajusté au volume de la cavité plus l'effet du DMSO sur l'affinité est important. En effet, pour les deux autres systèmes, le ligand est soit plus grand que la cavité (C_iE_j /CD) soit plus petit (MCA-NAT/QR2) et nous n'avons pas vu d'effet du DMSO sur les interactions.

Notre étude est un premier pas vers la caractérisation de l'effet du DMSO à faible concentration sur les interactions des ligands hydrophobes. Nous avons montré qu'il n'est pas neutre pour les interactions. Il est important de le prendre en considération lorsque le DMSO est utilisé dans des expériences, en particulier lors des mesures d'affinité des ligands hydrophobes.

ABSTRACT

Drug design : a successful process? This is what the regular launch of new drugs seems to indicate. Yet, if you take a closer look, you can see that development times are becoming longer and more expensive. Only 2% of projects lead to the commercialization of a new drug. This low efficiency process can be explained by screening methods. In laboratory, selection of drugs are done in an environment very different from the human body. Indeed, the majority of therapeutic targets and active molecules are hydrophobic. So, for *in vitro* experiments it is necessary to work in a solvent allowing the solubilization of hydrophobic molecules. For this, a cosolvent is added to the reaction medium. One regularly used cosolvent in the pharmaceutical industry is dimethylsulfoxide (DMSO). However, numerous studies have shown that a high concentration of DMSO has an effect on ligand affinities for their receptor. However, DMSO is used in low concentrations in the pharmaceutical industry and is considered to have no effect. In this study we wanted to characterize the effect of DMSO at low concentration.

In this work, we studied the effect of a 5% concentration of DMSO on the affinity of a hydrophobic ligand for its receptor using molecular dynamics (MD) simulations, nuclear magnetic resonance experiments and ultra-sound velocity measurements. Then, we characterized the interaction of DMSO with the hydrophobic binding sites by MD. We studied three different systems : the β (β -CD) and γ (γ -CD) cyclodextrins with 1-adamantanecarboxylic acid (ADA) a hydrophobic ligand binding to the two CDs, the β -CD with a surfactant ($C_{12}E_6$, polyethylene glycol alkyl-ether) and finally a protein (quinone reductase 2, QR2) with a hydrophobic ligand (MCA-NAT).

The three systems studied, ADA/CD, $C_{12}E_6$ /CD and MCA-NAT/QR2, showed different behaviors of DMSO. For ADA/CD complexes, we showed that DMSO decreases the affinity of ADA for β -CD but not for γ -CD. Our simulations showed a competition between DMSO and ADA for the β -CD binding site. The more the ligand volume is adjusted to the volume of the cavity, the greater is the effect of DMSO on affinity. Indeed, for the two other systems the ligand is either larger than the cavity ($C_{12}E_6$ /CD) or smaller (MCA-NAT/QR2) and we have not seen any effect of DMSO on interactions.

Our study is a first step towards the characterization of the effect of DMSO at low concentration on the interactions of hydrophobic ligands. We showed that DMSO is not neutral for interactions. It is important to take it into consideration when DMSO is used in experiments, particularly in affinity measurements of hydrophobic ligands.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Introduction : solvants et interactions moléculaires	3
1.1	Recherche de nouvelles molécules actives	3
1.1.1	Sélection de molécules actives	3
1.1.2	Principe de la mesure d'affinité	4
1.1.3	Thermodynamique de la liaison	6
1.2	Les solvants	6
1.2.1	L'eau	7
1.2.2	Le diméthylsulfoxyde	9
1.3	Objectif de l'étude	10
II	Matériel et méthodes	11
2	Matériel et méthodes	13
2.1	La modélisation et la dynamique moléculaire	13
2.1.1	Champs de force	13
2.1.2	Algorithme de la dynamique moléculaire	15
2.1.3	Conditions périodiques	16
2.1.4	Interactions longue portée	17
2.1.5	Ensembles thermodynamiques	18
2.2	Systèmes étudiés	20
2.2.1	Les cyclodextrines	20
2.2.2	La quinone réductase 2	23
2.2.3	Les C_iE_j	24
2.2.4	Conditions de simulation	25
2.3	Estimation de l'énergie libre de liaison	26
2.3.1	Cycle thermodynamique	27
2.3.2	Méthode de perturbation de l'énergie libre	28
2.3.3	Calcul de l'énergie libre absolue de liaison	29
2.4	Analyse des simulations	30
2.4.1	Calcul de la moyenne et de l'écart-type	30
2.4.2	Méthodes d'analyses des solvants	31
2.4.3	Méthodes d'analyses de l'interaction ligand/récepteur	35

2.4.4	Méthodes d'analyses des bicouches de tensioactifs	35
III	Cyclodextrines	41
3	Effet du DMSO sur l'affinité	43
3.1	Résumé de l'article	43
3.2	Article : Effect of dimethyl sulfoxide on the binding of 1-adamantane carboxylic acid to β and γ -cyclodextrins	44
3.3	Décomposition de l'énergie libre de liaison	53
3.4	Discussion	55
4	Propriétés des molécules de solvant	57
4.1	Propriétés des molécules d'eau dans la β et la γ -cyclodextrine en eau pure	57
4.1.1	Distribution radiale	57
4.1.2	Hydratation	60
4.1.3	Liaisons hydrogène	61
4.1.4	Volume spécifique	62
4.1.5	Diffusion latérale et facteur de retardement	63
4.1.6	Diffusion rotationnelle	65
4.2	Propriétés des molécules de solvant dans les β et γ -CD dans 5% de DMSO	66
4.2.1	Distribution radiale	66
4.2.2	Hydratation	68
4.2.3	Liaisons hydrogène	68
4.2.4	Volume spécifique	69
4.2.5	Diffusion latérale et facteur de retardement	69
4.2.6	Diffusion rotationnelle	70
4.3	Discussion	71
5	Stabilité du complexe ligand/cyclodextrine	73
5.1	Liaisons hydrogène ligand/cyclodextrine	73
5.2	Angle ligand/cyclodextrine	74
5.3	Distance ligand/cyclodextrine	75
5.4	Énergie libre de liaison du DMSO	77
5.5	Discussion	79
IV	Tensioactifs	81
6	Bicouches de tensioactifs	83
6.1	Résumé de l'article	83

6.2	Article : Simulating bilayers of nonionic surfactants with the GROMOS-compatible 2016H66 force field	84
7	Interaction cyclodextrine tensioactif	99
7.1	Interaction cyclodextrine $C_{12}E_4$	99
7.2	Interaction cyclodextrine bicouche de $C_{12}E_4$	100
7.3	Discussion	104
V	Protéine Quinone Réductase 2	107
8	Solvatation d'une protéine	109
8.1	Quinone réductase 2	109
8.2	Propriétés des molécules d'eau dans QR2 en eau pure	111
8.2.1	Hydratation	111
8.2.2	Volume spécifique	113
8.2.3	Diffusion latérale et facteur de retardement	113
8.2.4	Diffusion rotationnelle	113
8.3	Propriétés des molécules de solvant dans QR2 en dans 5% de DMSO	114
8.3.1	Hydratation	114
8.3.2	Volume spécifique	115
8.3.3	Diffusion latérale et facteur de retardement	116
8.3.4	Diffusion rotationnelle	116
8.4	Discussion	116
VI	Conclusion	119
9	Conclusion	121
	Bibliographie	125
	Annexes	143
9.1	Calcul de l'énergie libre de liaison du DMSO	143
9.2	Annexe de l'article sur l'effet du DMSO	144
9.3	Annexe de l'article sur les C_iE_j	151

Table des figures

1.1	Protocole de recherche d'un médicament	4
1.2	Exemple d'une courbe de saturation	5
1.3	Évènement de liaison	7
1.4	Liaisons hydrogène de l'eau	7
1.5	Le diméthylsulfoxyde	9
2.1	Interactions entre particules	13
2.2	Les types de champ de force	15
2.3	Algorithme de <i>leap-frog</i>	16
2.4	Boîte de simulation	17
2.5	Conditions périodiques	17
2.6	<i>Cut-off</i>	18
2.7	Les cyclodextrines	20
2.8	Forme des CD	21
2.9	L'acide adamantane-1-carboxylique	21
2.10	Boîtes de simulation	22
2.11	Dimère de β -CD	22
2.12	La quinone réductase 2	23
2.13	Le FAD et le MCA-NAT	24
2.14	Les C_iE_j	25
2.15	Cycle thermodynamique	27
2.16	Énergie potentielle au cours du découplage	29
2.17	Recherche des molécules de solvant dans les cyclodextrines	31
2.18	Distribution radiale : calcul	32
2.19	Distribution radiale : résultat	32
2.20	Triangulation de Delaunay et diagramme de Voronoï	33
2.21	Mesure de l'angle entre l'ADA et les CD	35
2.22	Calcul de l'épaisseur d'une bicouche	36
2.23	Détection des pores	38
2.24	Énergie de barrière de flip-flop	39
3.1	Simulation de l'évènement de liaison	54
4.1	Distribution radiale des molécules d'eau autour des CD	58
4.2	Répartition des molécules d'eau autour des CD	59

TABLE DES FIGURES

4.3	Molécules d'eau dans les cavités en eau pure	60
4.4	Réseau de liaisons hydrogène	61
4.5	Liaisons hydrogène entre l'eau et les CD	61
4.6	Volume spécifique des molécules d'eau de la cavité en eau pure	62
4.7	Molécules d'eau autour de la cavité des CD	63
4.8	Auto-corrélation rotationnelle de l'eau en eau pure	65
4.9	Distribution radiale de l'eau dans 5% de DMSO	66
4.10	Distribution radiale du DMSO dans 5% de DMSO	67
4.11	Molécules de solvant dans les cavités des CD dans 5% de DMSO	68
4.12	Liaisons hydrogènes entre le solvant et les CD dans 5% de DMSO	68
4.13	Volume spécifique des molécules de solvant dans 5% de DMSO	69
4.14	Auto-corrélation rotationnelle des molécules de solvant dans 5% de DMSO	70
5.1	Liaisons hydrogène entre l'ADA et les CD	73
5.2	Angle entre l'ADA et les CD	74
5.3	Liaisons hydrogène entre l'ADA et les CD	74
5.4	Distance entre l'ADA et les CD	75
5.5	Répartition de la distance entre l'ADA et les CD	76
5.6	Insertion du DMSO dans la β -CD	76
5.7	Compétition entre le DMSO et l'ADA pour les CD	77
7.1	Distance β -CD $C_{12}E_4$	99
7.2	Complexe $C_{12}E_4/\beta$ -CD	100
7.3	Boîte de simulation β -CD bicouche de $C_{12}E_4$	101
7.4	Distance β -CD $C_{12}E_4$ de la bicouche	101
7.5	Position en z de la β -CD et de la bicouche	102
7.6	β -CD dans une bicouche de $C_{12}E_4$	102
7.7	Pore dans une bicouche de $C_{12}E_4$ en présence de la β -CD	103
7.8	Fraction de pores dans une bicouche de $C_{12}E_4$ en présence de la β -CD	103
7.9	Cholestérol et $C_{12}E_4$	104
8.1	La protéine QR2	109
8.2	RMSD de QR2	111
8.3	FAD	112
8.4	Auto-corrélation rotationnelle de l'eau dans QR2 en eau pure	114
8.5	Auto-corrélation rotationnelle des molécules de solvant dans QR2	117

Liste des tableaux

2.1	Simulations réalisées pour les cyclodextrines	26
2.2	Simulations réalisées pour QR2	26
3.1	Décomposition de l'énergie libre de liaison	55
4.1	Facteur de retardement des molécules d'eau dans les CD	64
4.2	Temps de relaxation de la rotation des molécules d'eau dans les CD	66
4.3	Facteur de retardement des molécules de solvant dans les CD	70
4.4	Temps de relaxation de la rotation des molécules de solvant dans les CD	71
5.1	Énergie libre de liaison du DMSO	78
8.1	Composition de la poche de QR2	110
8.2	Molécules d'eau dans QR2	111
8.3	Temps de résidence des molécules d'eau	112
8.4	Volume spécifique des molécules d'eau dans QR2	113
8.5	Facteur de retardement des molécules d'eau dans QR2	113
8.6	Temps de relaxation de la rotation des molécules de solvant dans les CD	114
8.7	Molécules de solvant dans QR2	115
8.8	Temps de résidence des molécules de solvant	115
8.9	Volume spécifique des molécules de solvant dans QR2	115
8.10	Facteur de retardement des molécules de solvant dans QR2	116
8.11	Temps de relaxation de la rotation des molécules de solvant dans les CD	117

Abréviations et annotations

ADA : acide adamantane-1-carboxylique

CD : cyclodextrine

C_iE_j : polyéthylène glycol alkyl-éter

COM : centre de masse (*center of mass*)

DM : dynamique moléculaire

DMSO : diméthylsulfoxyde

FEP : perturbation de l'énergie libre (*free energy perturbation*)

Liaison H : liaison hydrogène

MCA-NAT : 5-méthoxycarboylamino-N-acetyltryptamine

MD : modélisation moléculaire

MSD : déplacement quadratique moyen (*mean square displacement*)

MVU : mesure de vitesse ultra-sonore

NVT : ensemble canonique

NPT : ensemble isotherme-isobare

QR2 : quinone réductase 2

RDF : fonction de distribution radiale (*radial distribution function*)

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMSD : racine carrée de l'écart quadratique moyen (*root mean square deviation*)

ΔG : énergie libre de réaction (liaison)

ΔH : enthalpie de réaction (liaison)

ΔS : entropie de réaction (liaison)

K_b : constante d'affinité (liaison)

PREMIÈRE PARTIE

Introduction

Introduction : solvants et interactions moléculaires

1.1 Recherche de nouvelles molécules actives

Un des plus grands enjeux pour l'industrie pharmaceutique est le développement de nouveaux composés actifs, efficaces et ayant le moins d'effets secondaires possibles (KOLA et LANDIS 2004; HOPKINS 2008). La recherche, le développement et la validation de nouveaux médicaments durent en moyenne une dizaine d'années et coûtent des millions d'euros aux entreprises pour un rendement très faible (NICOLAOU 2014). Seuls 2 % des projets amènent à la commercialisation d'une nouvelle molécule (BROWN et SUPERTI-FURGA 2003). Il est donc nécessaire d'améliorer et d'optimiser le processus de recherche. La recherche et développement de nouveaux composés peut se diviser en deux parties : une partie découverte de nouvelles molécules actives (*drug design*) et une partie de validation de la molécule par des essais cliniques (PAUL et al. 2010). La seconde partie bien que longue et coûteuse peut difficilement être optimisée. La partie découverte et mise au point peut être plus aisément améliorée. La découverte et la mise au point d'une molécule active est basée sur une succession de sélections (criblage) visant à trouver la molécule la plus efficace pour la cible (Fig. 1.1).

1.1.1 Sélection de molécules actives

La première étape en développement de médicament est l'identification d'une cible. La cible correspond à une molécule qui semble impliquée dans une pathologie (RASK-ANDERSEN et al. 2011). Un fois la cible identifiée il faut trouver un composé capable d'agir sur l'activité de la cible (inhibition ou activation). Pour cela, le composé va être choisi dans une base de données de molécules chimiques appelée chimiothèque. Dans ces chimiothèques sont recensées des molécules chimiques déjà existantes ou qui peuvent être synthétisées (GORDON et al. 1994). Les molécules de ces chimiothèques sont classées selon des propriétés physico-chimiques ayant un intérêt pharmacologique. Pour trouver la bonne molécule active dans la chimiothèque il faut réaliser un criblage basé sur les caractéristiques de la cible (par exemple les pharmacophores, WOLBER et al. 2008; YANG 2010). Le premier criblage est en général réalisé *in silico*. Ensuite des tests *in vitro*, en

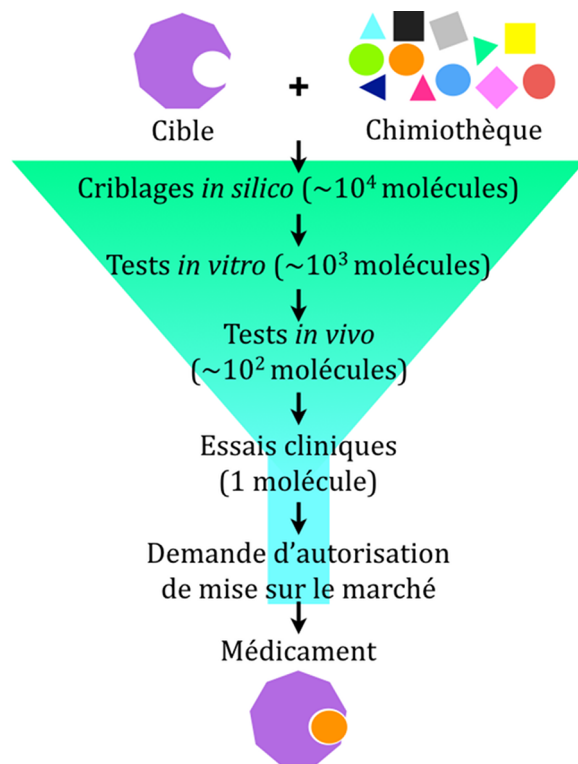


FIGURE 1.1 – Protocole simplifié de la recherche d'un nouveau médicament. Les valeurs sont données à titre indicatif.

tube ou sur culture cellulaires, sont réalisés sur les composés sélectionnés. Puis des tests *in vivo* sur l'animal sont réalisés sur les molécules choisies. Après ces tests, la molécule la plus prometteuse (si il y en a une) est testée sur l'humain en phase clinique. Dans les premières étapes de criblage *in silico* et *in vitro*, un critère de sélection essentiel est l'affinité du composé actif pour la cible. La molécule pour être active doit pouvoir se lier à la cible, la force de la liaison peut être mesurée par l'intermédiaire de l'affinité exprimée par la constante d'association K_b ou l'énergie libre de réaction ΔG .

1.1.2 Principe de la mesure d'affinité

Expérimentalement, la force de la liaison entre un ligand (L) et le récepteur (R) est quantifiée par la mesure de la constante de liaison (d'affinité) K_b lors d'une réaction de complexation.



Plus la constante de liaison est élevée et plus l'affinité du ligand pour le récepteur est grande. À l'équilibre, la constante de liaison est égale au rapport entre la concentration en complexe ligand/récepteur [LR] et le produit de la concentration en ligand non lié [L] et

de la concentration en récepteur libre $[R]$ (Eq. 1.2).

$$K_b = \frac{[LR]}{[L][R]} \quad (1.2)$$

Il existe de nombreuses techniques expérimentales permettant de mesurer la constante de liaison. La plupart repose sur un même principe, le suivi d'un signal au cours d'une expérience de titrage du récepteur par son ligand. Pour la mesure de la constante d'association, on appelle titrage le fait d'ajouter à une solution de récepteurs, à concentration donnée, un volume constant d'une solution de ligand. À chaque ajout du ligand, on mesure un signal qui change en fonction de la liaison. Par exemple, un changement de fluorescence pour la spectroscopie de fluorescence ou un changement thermique pour le titrage calorimétrique isotherme (ITC). Ces différentes mesures permettent de tracer une courbe de saturation, soit le signal en fonction du rapport de concentration entre le ligand et le récepteur (Fig. 1.2). À partir d'une courbe de saturation on peut obtenir la stœchiométrie de la réaction, c'est à dire le nombre de molécules de ligand capables de se fixer sur une molécule de récepteur. L'ajustement de la courbe permet d'obtenir la constante de liaison.

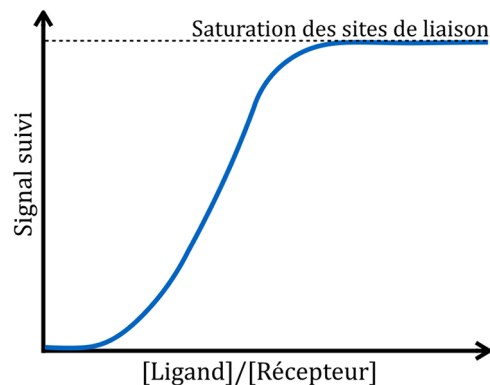


FIGURE 1.2 – Représentation schématique d'une courbe de saturation obtenue à la suite d'une expérience de titrage. En abscisse, le ratio entre la concentration en ligand et la concentration en récepteur. En ordonnée, le signal suivi au cours du titrage (par exemple fluorescence du récepteur). En pointillé, le plateau atteint à l'équilibre, lorsque tous les sites de liaison des molécules réceptrices sont occupés par une ou plusieurs molécules de ligand.

in silico, la valeur qui est calculée pour estimer l'affinité d'un ligand pour un récepteur est l'énergie libre de liaison ΔG . L'énergie libre de liaison est directement liée, à l'équilibre, à la constante de liaison K_b selon la formule suivante :

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad (1.3)$$

Avec R la constante des gaz parfaits et T la température de réaction. Une liaison favorable sera caractérisée par un ΔG négatif. Plus ΔG est faible plus l'affinité du ligand pour le récepteur est grande.

Nous pouvons donc comparer les valeurs obtenues expérimentalement avec celles calculées *in silico* par amarrage moléculaire (*docking*) ou par des méthodes de dynamique moléculaire par exemple.

1.1.3 Thermodynamique de la liaison

L'énergie libre de liaison (ΔG) peut être décomposée en enthalpie de liaison (ΔH) et en entropie (ΔS) (GIBBS 1902).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.4)$$

L'enthalpie est directement liée aux énergies des interactions entre les molécules. Les interactions pour l'évènement de liaison correspondent à toutes les interactions non liées comme par exemple les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques et les interactions de van der Waals. Plus une réaction permet la création d'interactions plus la variation d'enthalpie sera importante.

L'entropie est liée à la notion de désordre du système. Plus les molécules ont une grande liberté de mouvement dans l'espace et plus la variation d'entropie sera élevée. En général, pour une réaction de liaison, le ligand lié a une liberté de mouvement plus faible ce qui entraîne une diminution de l'entropie du système.

Mais il ne faut pas oublier que les réactions de liaisons se font en solution. Or, les molécules de solvants sont aussi impactées par la liaison.

1.2 Les solvants

Un solvant est une substance, le plus souvent liquide, permettant de dissoudre ou diluer une autre substance appelée le soluté, dans le but de former une solution homogène (BARWICK 1997). En général on considère les molécules de solvants inertes, c'est à dire qu'elles ne font pas de réaction chimique avec les solutés. Cependant, les solvants sans modifier la chimie des solutés, peuvent changer les comportements de ceux-ci et inversement les solutés peuvent modifier les solvants (CONSTABLE et al. 2007). Pour solubiliser, les molécules de solvant interagissent avec les solutés (Fig. 1.3).

Pour créer des interactions entre le ligand et le récepteur, lors de la liaison, il faut donc désolvater les solutés (MONDAL et al. 2014) en supprimant une partie des interactions entre les molécules de solvant et le ligand et entre le solvant et le site de liaison du récepteur. Mais dans le même temps, les molécules de solvant libérées de l'interaction avec les solutés peuvent faire de nouvelles interactions avec les autres molécules de solvant. Il y a donc une partie de l'enthalpie de liaison qui est due aux molécules de solvant.

L'entropie aussi est affectée par les solvants. En effet, les molécules de solvant solubilisant ont souvent une liberté de mouvement plus faible que les molécules de solvant libres. La

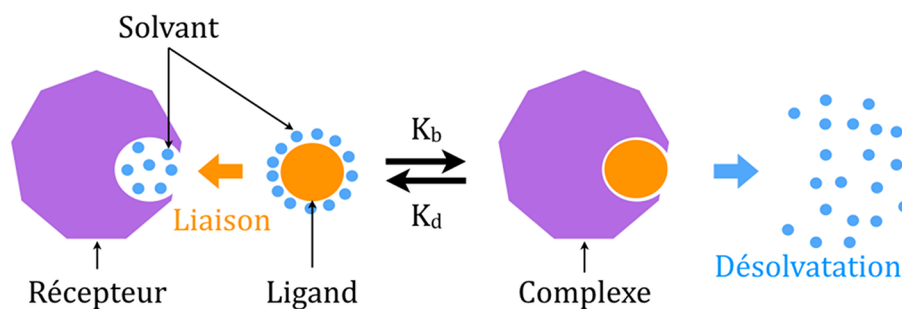


FIGURE 1.3 – Liaison d'un ligand (orange) dans un récepteur (violet) en présence de solvant (bleu).

libération des molécules de solvant lors de la liaison va donc permettre une augmentation de l'entropie (BARON et MCCAMMON 2013). Ce phénomène est d'autant plus important que les solutés sont hydrophobes et que le solvant est polaire (YOUNG et al. 2007; ABEL et al. 2008; SNYDER et al. 2014).

1.2.1 L'eau

L'eau est un solvant polaire protique, c'est à dire qu'il peut fournir des protons pour des liaisons hydrogène (liaisons H). C'est le solvant le plus répandu dans la nature et donc le plus utilisé en recherche dans les domaines de la biologie, la médecine et la pharmaceutique. L'eau est capable de solubiliser un grand nombre de molécules. Mais selon la nature du soluté, l'eau n'aura pas le même comportement. Dans l'eau liquide pure, les molécules d'eau sont organisées sous la forme d'un réseau dynamique structuré par les liaisons H intermoléculaires. Les molécules d'eau sont capables de former jusqu'à quatre liaisons H, deux en tant que donneuses de proton et deux en tant que receveuses. Lorsqu'une molécule d'eau est engagée dans 4 liaisons H en même temps, elle forme un tétraèdre (Fig 1.4). Sous forme liquide, la conformation tétraédrique des molécules est flexible, les liaisons H se font et se défont aisément, contrairement à la forme solide qui est organisée en tétraèdre rigide avec des liaisons H durables.

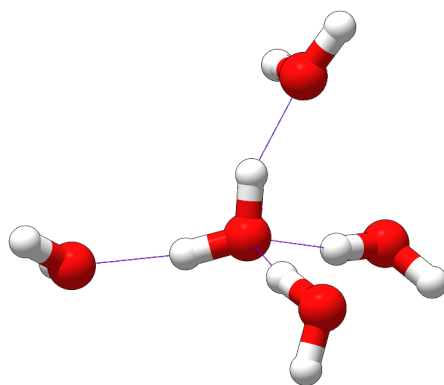


FIGURE 1.4 – Une molécule d'eau engagée dans 4 liaisons hydrogène avec 4 molécules d'eau. Les liaisons hydrogène sont en violet.

L'ajout d'un soluté perturbe ce réseau de molécules d'eau. Suivant la nature du soluté les molécules d'eau s'organisent différemment. Lorsque le soluté est une petite molécule polaire (comme un ligand), les molécules d'eau vont s'organiser autour des différentes molécules du soluté dans le but d'optimiser les interactions. Ce type de soluté affecte le comportement des molécules d'eau. Mais, les propriétés dynamiques de celle-ci sont proches de celles en eau pure, elles sont toujours organisées en réseaux dynamiques avec 4 liaisons H par molécule d'eau. Seule la première couche d'hydratation est modifiée (KREKELER et SITE 2007).

Lorsque le soluté est une petite molécule hydrophobe, le comportement des molécules d'eau va être plus affecté. Pour s'accommoder des solutés hydrophobes, le réseau de molécule d'eau forme des cavités dans lesquelles il enferme les molécules hydrophobes. Pendant longtemps, il a été admis que les molécules d'eau de ces cavités forment une cage rigide autour des solutés hydrophobes en adoptant une structure plus cristalline, c'est le modèle dit de l'« iceberg » (FRANK et EVANS 1945). Dans ce modèle, les molécules d'eau ont un comportement proche de celui des molécules d'eau en phase solide. Cependant, ce modèle à depuis été remis en cause (BLOKZIJL et ENGBERTS 1993). De nombreuses études expérimentales et de dynamique moléculaire (DM) ont montré que les molécules d'eau de la cavité sont toujours capables de bouger, elles sont seulement ralenties et leur orientation est limitée, elles ne peuvent pas visiter toutes les orientations possibles (QVIST et HALLE 2008 ; LAAGE et al. 2009). Les molécules d'eau hydratant le soluté hydrophobe ont donc une dynamique différente des molécules non hydratantes (molécule dites du *bulk*). Le réseau d'eau est d'autant plus perturbé que le soluté hydrophobe est volumineux. En effet, pour une petite molécule hydrophobe, les molécules d'eau forment une cavité mais arrivent encore à former environ 4 liaisons H par molécule d'eau. En revanche, plus la surface hydrophobe à hydrater est grande et plus le réseau est modifié, les molécules d'eau ne font plus que 2 à 3 liaisons H, le réseau autour de ces solutés est « cassé », les molécules d'eau s'éloignent de la surface hydrophobe qui est alors dite « sèche » (CHENG et ROSSKY 1998). Cette relation entre le volume des solutés et l'effet sur le réseau à donné lieu à la mise en place de modèle d'hydratation des surfaces hydrophobes, ces modèles ont pour objectif de prédire l'organisation du réseau suivant le volume du soluté (CHANDLER 2005).

Eau et protéine

L'eau hydratant les protéines est organisée en couches d'hydratation. Dans ces couches, l'eau a une organisation différente de l'eau du *bulk*. La dynamique de ces molécules est ralentie (diffusion latérale et rotationnelle ralentie) et les liaisons H sont plus durables. Les molécules d'eau de la couche d'hydratation sautent moins de liaisons H en liaisons H. Elles forment des liaisons H plus fortes avec les atomes de la protéine et les autres molécules d'eau de la couche d'hydratation. L'eau hydratante joue de nombreux rôles auprès des protéines. Elle est impliquée par exemple, dans le repliement des structures

secondaires des protéines (CHANDLER 2005). En effet, les acides aminés hydrophobes de la protéine vont s'organiser de façon à s'éloigner le plus possible du solvant aqueux. Ce phénomène va permettre la mise en place des structures secondaires de la protéine et donc sa structure 3D. Par le même type d'effet hydrophobe, l'eau permet des interactions protéine-protéine. Ainsi, des protéines dont la surface hydrophobe est hydratée peuvent s'associer entre elles dans le but de diminuer l'aire de la surface hydrophobe en contact avec l'eau (BALL 2008). Les molécules d'eau hydratantes peuvent aussi servir de lien entre deux surfaces hydrophiles par l'intermédiaire de liaisons H (BAUER et al. 2012). Enfin, l'eau intervient dans la liaison d'un ligand dans un site de fixation protéique. Si le ligand et la poche sont hydrophile, l'eau peut servir d'intermédiaire entre les deux molécules. À l'inverse si les deux molécules sont hydrophobes, la déshydratation peut améliorer l'interaction entre les deux molécules. La déshydratation des régions hydrophobes est un mécanisme important de ce type d'interaction, la libération de molécules d'eau de régions hydrophobes est énergétiquement favorable. Ces molécules libérées ont une plus grande liberté de mouvement, donc une entropie du système plus importante ce qui se traduit par une énergie libre de réaction plus favorable à la liaison du ligand (OLSSON et al. 2008).

1.2.2 Le diméthylsulfoxyde

La majorité des sites de liaison de cibles thérapeutiques sont hydrophobes (GAO et SKOLNICK 2013). Or, les ligands étant sélectionnés selon les caractéristiques de la poche de la cible, la plupart de composés sélectionnés sont eux aussi hydrophobes. Le problème des molécules hydrophobes c'est qu'il faut utiliser un solvant autre que l'eau pour les solubiliser. En général, un solvant supplémentaire est ajouté à faible concentration à l'eau pour permettre de solubiliser les composés hydrophobes, c'est ce que l'on appelle un cosolvant. Un des cosolvants le plus utilisé en pharmacologie est le diméthylsulfoxyde (DMSO, Fig. 1.5).

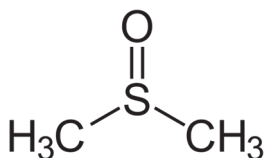


FIGURE 1.5 – Formule du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Le DMSO est un solvant organique polaire et aprotique capable de solubiliser de nombreuses molécules polaires et apolaires. Le DMSO est très utilisé dans le domaine de la chimie comme réactif, intermédiaire de synthèse et milieu de réaction. Mais il est aussi très utilisé en biologie pour, par exemple solubiliser des molécules peu solubles dans l'eau, servir de cryoprotecteur (WILMUT 1972; MANDUMPAL et al. 2011) ou encore permettre la perméabilisation des membranes dans le but de faciliter le passage membranaire de molécules (KLIGMAN 1965). C'est un solvant polyvalent et peu toxique (JACOB et WOOD

1967; DA VIOLANTE et al. 2002). Cependant, de nombreuses études ont montré que le DMSO a un effet sur les interactions moléculaires. Par exemple, dans l'article de ZHENG et ORNSTEIN 1996, les auteurs ont montré que le DMSO à une concentration proche de 100 % est capable de déplier les structures secondaires des protéines, ils montrent aussi un effet déshydratant de la surface des protéines, effet qu'ils n'observent pas avec d'autres solvants organiques. Le DMSO est aussi capable d'avoir des effets à de faibles concentrations. Ainsi dans l'article HUANG et al. 2018, les auteurs mettent en évidence une modification du comportement cellulaire pour des concentrations de DMSO de 10 %. Le DMSO est donc un solvant capable d'avoir des effets sur les solutés. Malgré cela, le DMSO est fréquemment utilisé dans l'industrie pharmaceutique lors des tests *in vitro* de l'affinité des molécules peu solubles dans l'eau. Les concentrations en DMSO utilisées étant faibles (moins de 10 %), le DMSO est considéré comme n'ayant aucun effet sur les mesures effectuées. À notre connaissance, peu d'études mettant en évidence un effet du DMSO sur les affinités à faible concentration (CUBRILOVIC et ZENOBI 2013), la plupart montre un effet à forte concentration (EARP et al. 1984; LEE et al. 2013). Il y a donc un manque d'information sur l'effet du DMSO sur les affinités à des concentrations proches de celles utilisées lors de tests *in vitro*. C'est pourquoi, dans cette étude nous nous sommes donné pour objectif de caractériser l'effet du DMSO à une concentration de 5 % sur les affinités de ligands hydrophobes pour des molécules cibles.

1.3 Objectif de l'étude

Les solvants et cosolvants sont plus que des outils permettant de solubiliser des molécules d'intérêts. Ils ont un rôle fondamentale dans les interactions entre molécules et en particuliers pour les solutés hydrophobes (van der VEGT et NAYAR 2017). Cependant, leurs effets sont régulièrement minimisés voir ignorés lorsqu'ils sont utilisés en faible concentration sans preuves de leur innocuité sur les interactions. Le but de notre étude est d'étudier l'effet d'une faible concentration de DMSO, un cosolvant souvent employé lors des tests d'efficacité des ligands, sur les affinités des liaisons de ligands hydrophobes pour un récepteur. La question à laquelle nous allons essayer de répondre est donc celle-ci : Est-ce que le DMSO à une concentration de 5 % a un effet sur l'affinité des ligands hydrophobes pour leur récepteur ?

DEUXIÈME PARTIE

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

2.1 La modélisation et la dynamique moléculaire

Pour répondre à notre problématique, nous avons étudié les interactions à l'échelle moléculaire grâce à des techniques de modélisations moléculaires (MM). Comme son nom l'indique, la MM est un domaine de recherche qui utilise des représentations simplifiées pour modéliser les molécules. Les outils informatiques de MM permettent de représenter les interactions entre les atomes constituant le système étudié. Grâce à la puissance des outils nous pouvons animer ces modèles, c'est ce que l'on fait en dynamique moléculaire (DM). La DM permet entre autre de simuler et d'observer à l'échelle nanoscopique les interactions entre molécules, comme la solubilisation ou la fixation d'un ligand sur son récepteur.

2.1.1 Champs de force

Un champ de force correspond à l'ensemble des paramètres permettant de décrire les atomes du système et leurs interactions. Il existe deux grands types d'interactions : les interactions entre les atomes liés par des liaisons covalentes (liaisons, angles, dièdres) et les interactions entre atomes non-liés par des liaisons covalentes (électrostatiques et van der Waals) représentées figure 2.1.

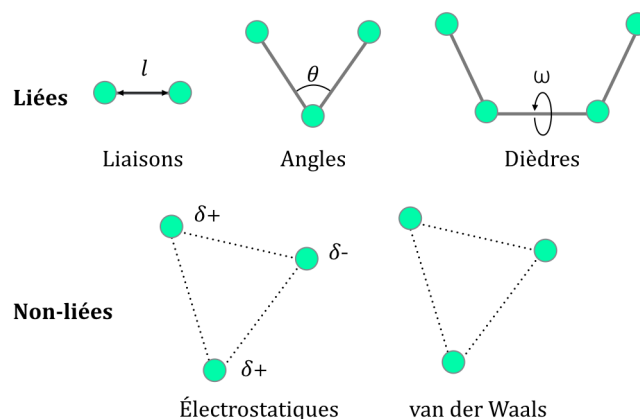


FIGURE 2.1 – Les interactions possibles entre les atomes d'un système moléculaire

À partir des paramètres du champ de force, nous pouvons calculer l'énergie potentielle

V du système définie par la somme des énergies des interactions liées et non-liées (Eq. 2.1).

$$\begin{aligned}
V_{potentielle} = & \sum_{liaisons} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i_0})^2 \\
& + \sum_{angles} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i_0})^2 \\
& + \sum_{dièdres} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\
& + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
& + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}
\end{aligned} \tag{2.1}$$

Le premier terme de l'équation 2.1 représente l'énergie de liaison entre deux particules, sous la forme d'un potentiel harmonique, avec k_i la constante de force appliquée à la liaison, l_{i_0} la longueur de référence et l_i la longueur de la liaison. Le deuxième terme représente l'énergie d'angle entre trois particules, là encore sous la forme d'un potentiel harmonique, avec θ_{i_0} l'angle de référence et θ_i l'angle entre les particules. Le troisième terme représente l'énergie de torsion autour d'une liaison reliant quatre particules. Le quatrième terme représente les interactions de van der Waals entre deux atomes i et j , sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones. Ce potentiel permet de représenter les forces de répulsion entre atomes à très courtes distances et les forces d'attraction à longues distances. r_{ij} représente la distance entre les deux atomes, la constante σ_{ij} représente la distance à laquelle les forces répulsives et attractives sont identiques et ε_{ij} est l'énergie d'interaction la plus basse. Le dernier terme représente les interactions électrostatiques entre les atomes chargés, exprimées à l'aide de la loi de Coulomb. Avec respectivement q_i et q_j les charges des atomes i et j , r_{ij} la distance entre les deux atomes et ε_0 la permittivité du vide. Pour un système donné, on considère que plus l'énergie potentielle est basse plus la conformation est favorable.

Tous les champs de force n'ont pas le même niveau de détails et ne sont pas capables de décrire de façon optimale tous les types de molécules (protéines, nucléotides, lipides, glucides). Ainsi, l'on doit choisir le champ de force suivant les molécules que l'on souhaite modéliser et la taille du système. Un système de grande taille comme une membrane cellulaire sera plutôt modélisée avec un champ de force gros-grain qui simplifiera les molécules en fusionnant plusieurs atomes dans une même particule, à l'inverse un petit système comme un ligand nécessitera une résolution plus fine et on choisira un champ de force tout-atome qui représente tous les atomes. Enfin il existe un troisième type de champ de force dit atome-unifié qui représente tous les atomes sauf les hydrogènes apolaires qui sont fusionnés aux carbones, c'est ce type de champ de force que nous avons utilisé (Fig.

2.2).

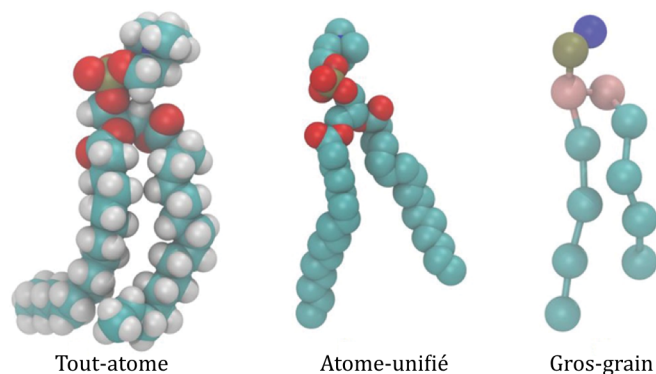


FIGURE 2.2 – Les différentes représentations d’un même lipide suivant le niveau de résolution du champ de force (Tiré de LEONG et al. 2016).

2.1.2 Algorithme de la dynamique moléculaire

La DM correspond à la création d’une trajectoire moléculaire par la génération de configurations successives du système via l’intégration des lois du mouvement de Newton. Le mouvement du système est déterminé à l’aide de la deuxième loi de Newton (Eq. 2.2).

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a} \quad (2.2)$$

Avec \mathbf{F} la somme résultante des forces s’appliquant sur le système de masse m et donnant lieu à une accélération \mathbf{a} . Pour déterminer la position d’un atome i au temps $t + 1$ à partir de sa position au temps t , nous avons besoin de sa vitesse \mathbf{v}_i au temps t . Or, la vitesse peut être obtenue en intégrant l’accélération \mathbf{a}_i de l’atome. Selon Eq. 2.2 l’accélération a_i de i est directement liée à la force \mathbf{F}_i et à la masse m_i de l’atome. La force \mathbf{F}_i s’appliquant sur l’atome i au temps t est obtenue à partir de la dérivée partielle de l’énergie potentielle V appliquée à l’atome (Eq. 2.3).

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2.3)$$

Avec \mathbf{r}_i les coordonnées cartésiennes de l’atome, soit pour un repère 3D le vecteur $[x_i, y_i, z_i]$. V est déterminée par le champ de force utilisé pour la simulation (Eq. 2.1). L’accélération de l’atome au temps t correspond à la dérivée seconde de sa position et peut donc s’exprimer selon Eq. 2.2 sous la forme suivant :

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \quad (2.4)$$

En remplaçant \mathbf{F}_i par l’Eq. 2.3 on obtient l’expression de l’accélération suivante :

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\frac{\partial V}{m_i \partial \mathbf{r}_i} \quad (2.5)$$

La progression de la trajectoire se fait en répétant les étapes de calcul des forces (Eq. 2.3) puis de détermination de l'accélération (Eq. 2.5). Néanmoins la résolution de l'équation 2.5 dans le cas des DM n'est pas possible analytiquement sur des systèmes complexes. Des algorithmes numériques sont utilisés pour intégrer cette équation. Nous avons utilisé l'algorithme *leap-frog* (Fig. 2.3) qui suit les séries de Taylor suivantes :

$$\mathbf{v}_i \left(t + \frac{1}{2} \delta t \right) = \mathbf{v}_i \left(t - \frac{1}{2} \delta t \right) + \delta t \mathbf{a}_i (t) \quad (2.6)$$

$$\mathbf{r}_i (t + \delta t) = \mathbf{r}_i (t) + \delta t \mathbf{v}_i \left(t + \frac{1}{2} \delta t \right) \quad (2.7)$$

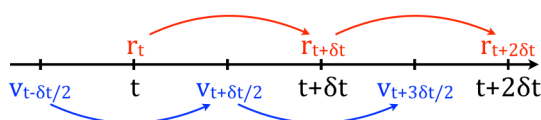


FIGURE 2.3 – Principe de l'algorithme *leap-frog*.

Dans cet algorithme, la vitesse au temps $t + \frac{1}{2} \delta t$ est calculée à partir de la vitesse au temps $t - \frac{1}{2} \delta t$ et de l'accélération au temps t (Eq. 2.6), la position au temps $t + \delta t$ est alors calculée à partir de la position au temps t et de la vitesse au temps $t + \frac{1}{2} \delta t$ (Eq. 2.7).

Le pas d'intégration δt est choisi pour être plus petit que le mouvement de plus haute fréquence du système qui correspond à la vibration de la liaison entre un atome lourd et un hydrogène, soit quelques femtosecondes. Pour augmenter le pas d'intégration et donc réduire le temps de calcul, on peut bloquer les vibrations des liaisons à l'aide d'algorithmes permettant de gérer le « gel » des liaisons. Nous avons utilisé l'algorithme LINCS (HESS 2008) pour nos molécules d'intérêts et pour rigidifier les molécules d'eau nous employons l'algorithme de SETTLE (MIYAMOTO et KOLLMAN 1992). Grâce à cette simplification, nous avons pu utiliser un pas d'intégration de 2 fs.

2.1.3 Conditions périodiques

Pour limiter la taille des systèmes simulés, on les place dans une boîte de simulation (Fig. 2.4).

Les molécules proches des bords de la boîte se retrouvent dans des conditions différentes des molécules au centre de la boîte, c'est ce qu'on appelle l'effet de bord. Pour éviter ce problème, on applique des conditions périodiques aux limites (PBC, *periodic boundary conditions*), on considère que les bords sont reliés directement à leurs bords opposés, ce qui revient à multiplier les boîtes dans toutes les directions. Par exemple pour un système 2D, une molécule atteignant le bord droit ne va pas être stoppée par une bordure mais elle apparaîtra au niveau du bord opposé, soit le bord gauche de la boîte (Fig. 2.5). Ceci permet de simuler un système infini. Cependant il est nécessaire de faire attention à la

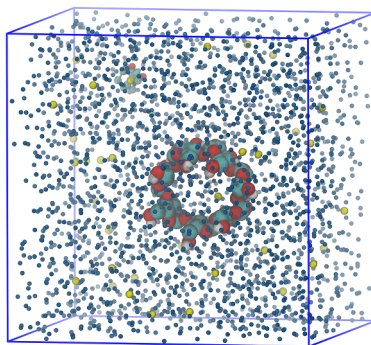


FIGURE 2.4 – Exemple d’une boîte de simulation cubique.

taille initiale de la boîte, si la boîte est trop petite une molécule peut se retrouver à interagir avec elle même. Il faut que la distance entre une molécule et son image dans les boîtes voisines soit supérieure à la distance considérée pour les interactions non-liées.

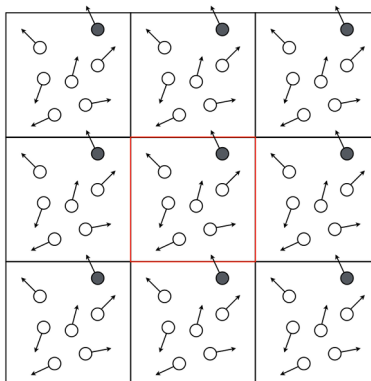


FIGURE 2.5 – Conditions périodiques pour une boîte de simulation. La boîte principale en rouge est dupliquée dans toutes les directions. L’atome en gris sort de la boîte et apparaît de l’autre côté grâce aux PBC. Pour simplifier la visualisation, cette représentation est en 2D mais pour les simulations les conditions périodiques sont bien appliquées en 3D.

2.1.4 Interactions longue portée

Les interactions non-liées intermoléculaires sont calculées pour toutes les paires d’atomes et les non-liées intramoléculaires sont calculées pour les atomes séparés par plus de 3 liaisons covalentes. Les interactions non-liées sont dépendantes de la distance r entre les atomes (Eq. 2.1), plus la distance est élevée plus la valeur de l’énergie des interactions non-liées est négligeable. Pour simplifier les calculs nous pouvons séparer les interactions non-liées en deux classes : les interactions à courte distance et les interactions à longue distance. Pour classer les interactions nous utilisons un seuil de distance appelé *cut-off* (Fig. 2.6). Pour un atome i tous les atomes j à une distance r_{ij} inférieure au *cut-off* seront classés dans les interactions courtes, les autres seront dans les interactions longues. Toutes les interactions courtes sont calculées à chaque pas de simulation. Pour les interactions longues, on peut considérer que l’énergie est négligeable et donc la mettre à 0. Cette approximation est

utilisée pour les interactions de van der Waals qui diminuent rapidement avec la distance. Mais cette approximation est trop grossière pour les interactions électrostatiques. Pour celles-ci nous utilisons le PME (*Particle Mesh Ewald*, DARDEN et al. 1993) basé sur la sommation d’Ewald (EWALD 1921). Les interactions longue portée sont alors calculées dans l’espace réciproque grâce à la transformée de Fourier et une discrétisation de l’espace au niveau des points d’une grille. Cet algorithme considère ainsi le système comme un cristal, c’est à dire que la boîte du système est répliquée à l’infini dans toutes les directions.

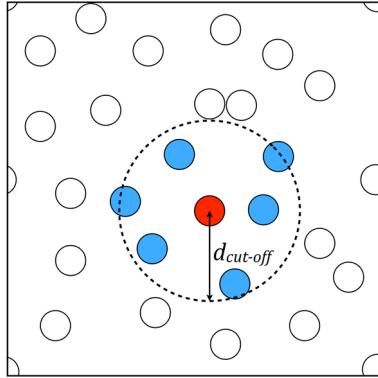


FIGURE 2.6 – Exemple d’un traitement des interactions non-liées par un *cut-off*. Tous les atomes en bleu sont à une distance $d < d_{cut-off}$ de l’atome en rouge. Leurs interactions non-liées seront calculées. Pour les autres atomes, seules les interactions électrostatiques seront prises en compte par PME.

2.1.5 Ensembles thermodynamiques

Les simulations sont réalisées dans des conditions thermodynamiques stables. Deux types d’ensembles thermodynamiques ont été utilisés : l’ensemble NPT (nombre de molécules, pression et température constants) et l’ensemble NVT (nombre de molécules, volume et température constants). La température est contrôlée par un thermostat qui va agir sur les vitesses des atomes et la pression par un barostat qui agit sur le volume de la boîte de simulation.

Thermostat

La température du système est directement liée à l’énergie cinétique selon la relation suivante :

$$E_{cinétique} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{k_B T}{2} (3N - N_c) \quad (2.8)$$

Avec v_i la norme du vecteur vitesse \mathbf{v}_i , k_B la constante de Boltzmann, T la température, N le nombre d’atomes du système et N_c le nombre de contraintes du système (par exemple les liaisons bloquées).

Lors des simulations, la température fluctue autour de sa valeur d’équilibre. Pour empêcher

de trop grandes fluctuations on utilise un thermostat. Nous avons utilisé deux algorithmes de contrôle de température : Berendsen et Bussi (BERENDSEN et al. 1984; BUSSI et al. 2007). À chaque pas de simulation Berendsen ajuste les vitesses du système pour approcher la température du système de la température de référence en suivant une décroissance exponentielle. Cette méthode permet d'atteindre rapidement la température souhaitée mais elle ne reproduit pas correctement les fluctuations attendues de l'ensemble canonique. La méthode de Bussi (ou *v-rescale*) reprend le même principe que Berendsen mais ajoute un terme stochastique à l'ajustement qui permet de reproduire correctement les fluctuations de l'ensemble canonique. L'algorithme de Berendsen est donc utilisé pour la mise en température du système lors de l'équilibrage et celui de Bussi est utilisé pour la simulation de production qui nécessite de bien répliquer les variations de l'ensemble thermodynamique.

Barostat

La pression d'un système en 3D suivant les axes (x, y, z) peut se représenter sous la forme d'un tenseur \mathbf{P} , où chaque élément représente la pression P suivant une dimension de la boîte (Eq. 2.9). Ainsi P_{xy} représente la pression suivant les axes x et y de la boîte de simulation.

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} P_{xx} & P_{xy} & P_{xz} \\ P_{yx} & P_{yy} & P_{yz} \\ P_{zx} & P_{zy} & P_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.9)$$

Les termes hors diagonale jouent sur les angles entre les arêtes de la boîte. Comme nous travaillons avec une boîte cubique et que nous souhaitons conserver sa forme nous n'agissons que sur les pressions dépendant d'un seul axe (P_{xx} , P_{yy} et P_{zz}). Tous les autres termes sont mis à 0. Pour un système isotrope $P_{xx} = P_{yy} = P_{zz}$ et pour un système anisotrope (type interface) $P_{xx} = P_{yy} \neq P_{zz}$. La pression du système est la moyenne de la diagonale de \mathbf{P} (trace).

La pression du système est directement liée au volume, à l'énergie cinétique et aux forces exercées entre les particules (aussi appelé viriel). \mathbf{P} est calculée comme suit :

$$\mathbf{P} = \frac{1}{V} \left[\sum_i m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i - \sum_{i<j} \mathbf{F}_{ij} \otimes \mathbf{r}_{ij} \right] \quad (2.10)$$

Avec $m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i$ l'énergie cinétique et $\mathbf{F}_{ij} \otimes \mathbf{r}_{ij}$ le viriel. Le symbole \otimes représente le produit tensoriel.

Pour contrôler la pression on peut agir sur le volume de la boîte et la position des particules. Comme pour la température, il existe des algorithmes permettant de contrôler la pression. Nous avons utilisé deux types : Berendsen et Parrinello-Rahman (BERENDSEN et al. 1984; PARRINELLO et RAHMAN 1981). Le barostat de Berendsen est basé sur le même principe que le thermostat du même nom, on utilise cet algorithme pendant l'équilibrage

car bien qu'efficace il reproduit mal les fluctuations de volume. Pour la production nous utilisons l'algorithme de Parrinello-Rahman. L'hamiltonien H d'un système fermé est égal à la somme de l'énergie cinétique et de l'énergie potentielle du système. L'algorithme de couplage de Parrinello-Rahman est dit étendu car il ajoute un terme à H permettant de mimer l'échange d'énergie avec un système extérieur, ce qui permet de reproduire les fluctuations de l'ensemble NPT lors des simulations.

2.2 Systèmes étudiés

Durant ces travaux nous avons utilisé trois types de systèmes différents.

2.2.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités de glucose liées en α -1,4. Le nombre de glucoses formant le cycle peut varier de 6 à 12, nous avons étudié la β et la γ -cyclodextrines (β et γ -CD) composées respectivement de 7 et 8 glucoses (Fig. 2.7).

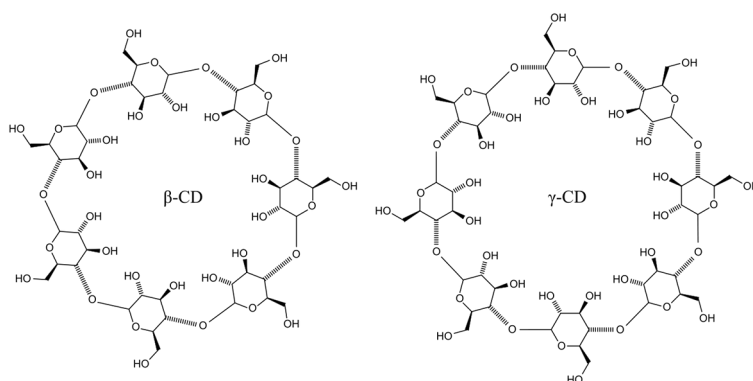


FIGURE 2.7 – La β -cyclodextrine (β -CD) et la γ -cyclodextrine (γ -CD)

La forme des CD est celle d'un cône tronqué comme un abat-jour, avec un côté large et un côté plus resserré (Fig. 2.8). La face interne est hydrophobe et la face externe hydrophile. La forme particulière des CD fait d'elles des molécules dites cage capables d'encapsuler de très nombreux composés hydrophobes. Les propriétés chimiques des CD font d'elles des outils très employés en laboratoire sous leurs formes natives ou modifiées. Entre autres applications médicales, elles peuvent servir de vecteur pour transporter des médicaments dans les sites d'intérêts ou elles peuvent être utilisées pour neutraliser des composés indésirables en les encapsulant (DAVIS et BREWSTER 2004; ARUN RASHEED 2008). Elles sont aussi connues pour être capables d'extraire des molécules de cholestérol des membranes lipidiques (OHTANI YOSHIRO et al. 1989; BRESLOW et ZHANG 1996; LÓPEZ et al. 2013).

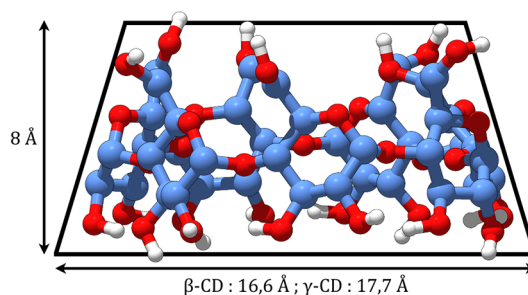


FIGURE 2.8 – Forme des CD. Structure de la β -CD. La forme en noire est la représentation schématique des CD, avec un côté large en bas et un côté plus resserré en haut comme pour un abat-jour.

Nous avons choisi d'utiliser les CD car ce sont des petites molécules rigides très connues, faciles à utiliser dans le cadre de nos mesures expérimentales et capables de former des complexes d'inclusion (pour les CD on ne parle pas de liaison mais d'inclusion) avec de nombreux ligands hydrophobes (TAULIER et CHALIKIAN 2006 ; TAULIER et CHALIKIAN 2008). Elles sont faciles à modéliser et leur petite taille rend les calculs de DM moins coûteux par rapport à des protéines. Elles sont pour nous des modèles simplifiés des interactions protéine-ligand permettant d'expérimenter et de tester nos outils avant de passer au modèle protéique plus complexe. La β et la γ -CD ont une composition et une forme proches pourtant leur hydrophobicité est très différente, la β est 10 fois moins soluble dans l'eau ($18,5 \text{ g l}^{-1}$) que la γ -CD (232 g l^{-1}) et elle a souvent une interaction plus forte avec les ligands hydrophobes. Ces spécificités nous permettent d'étudier et de comparer les différences de comportement de deux cavités hydrophobes proches vis à vis des solvants et des ligands.

Le ligand étudié est l'acide adamantane-1-carboxylique (ADA, Fig. 2.9) qui est connu pour former des complexes d'inclusion avec la β et la γ -CD. L'affinité dans l'eau de l'ADA pour la β -CD est supérieure à celle pour la γ -CD (CROMWELL et al. 1985). Nous travaillons à pH 7,5 ce qui implique que l'ADA est sous forme déprotonée.

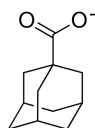


FIGURE 2.9 – L'acide adamantane-1-carboxylique (ADA) sous forme déprotonnée.

Les structures initiales des CD proviennent de coordonnées issues de la cristallographie aux rayons X. Pour β -CD la structure est issue de la CSD (*Cambridge Structural Database*), son code de référence est RIPKIL et son code CCDC est 648855 (CHATZIEFTHIMIOU et al. 2007). La structure de la γ -CD provient de la *Protein Data Bank* (PDB), son code PDB est 1D3C (UITDEHAAG et al. 1999). Le champ de force GROMOS 53A6_{GLYC} (POL-FACHIN et al. 2012) a été utilisé pour les CD. Pour l'ADA c'est le champ de force GROMOS 54A7 (SCHMID et al. 2011).

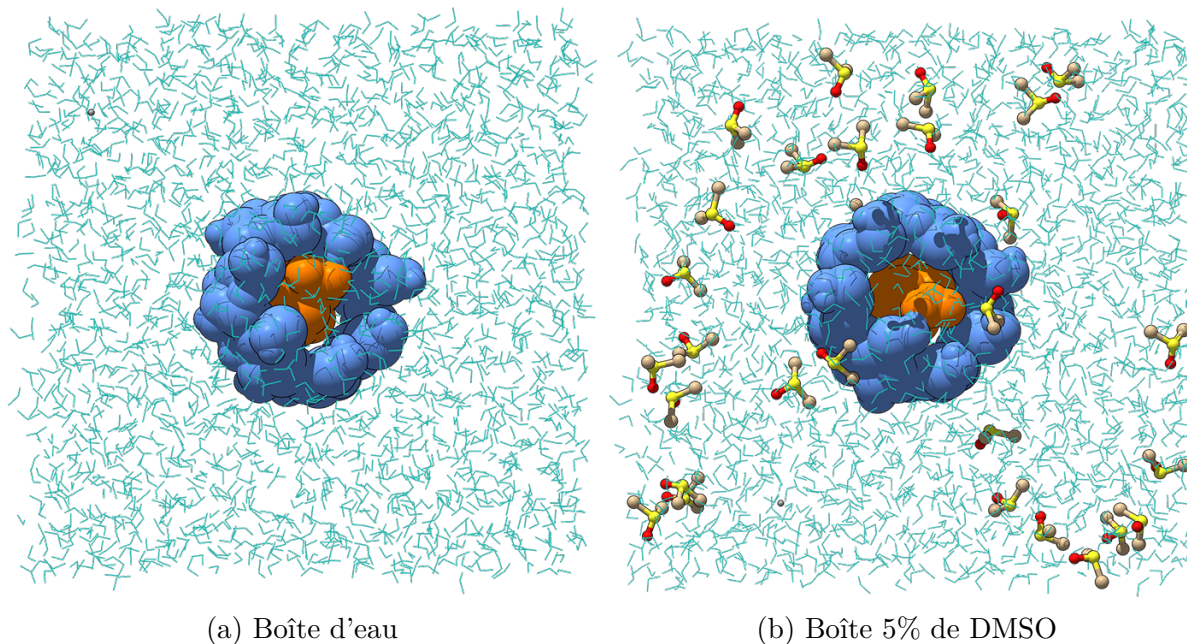


FIGURE 2.10 – Boîtes de simulation en eau pure (a) et avec 5% de DMSO (b). En cyan, sont représentées les molécules d'eau, en jaune les molécules de DMSO, la sphère grise correspond à l'ion Na^+ permettant de neutraliser la charge du système, en bleu la β -CD et en orange l'ADA.

Les CD sont connues pour former des dimères ou trimères capables de se lier à des ligands (FRANCHI et al. 2003; CHATZIEFTHIMIOU et al. 2007; CAO et WU 2015). En particulier, une étude a mis en évidence par cristallographie une structure dimérique de la β -CD en complexe avec l'ADA (HAMILTON et SABESAN 1982, Fig. 2.11). Cependant, la structure montre que chaque unité de β -CD est liée à une molécule d'ADA. Le dimère n'est pas nécessaire pour observer l'inclusion. Nous avons donc décidé d'étudier les CD sous forme non dimérique, ce qui facilite les simulations de DM.

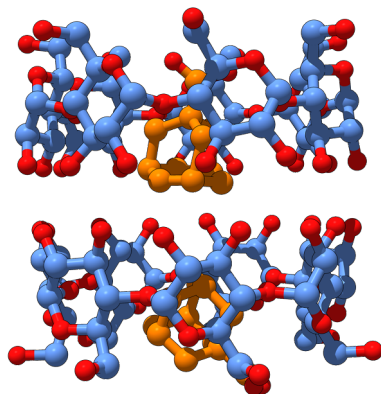


FIGURE 2.11 – Structure déterminée par cristallographie des rayons X montrant deux β -CD (bleu/rouge) sous forme de dimère complexé à deux molécules d'ADA (orange).

Une autre caractéristique connue des CD est la capacité de certains ligands à se fixer

avec deux orientations possibles (côté large ou côté resserré de la CD, Fig. 2.8). Ainsi, une étude montre une structure du complexe ADA/ β -CD, avec la molécule d'ADA orientée du côté resserré de la CD (RÜDIGER et al. 1996). Cependant, dans cette conformation le complexe semble être moins stable. Toutes nos simulations ont montré, que dans cette orientation, l'ADA est lié plus faiblement que dans l'autre orientation. De plus, l'orientation change en cours de simulation pour se mettre dans le sens le plus stable. Nous pensons donc qu'étudier seulement l'orientation la plus stable n'impactera que faiblement nos résultats.

En faisant ces choix, nous diminuons l'échantillonnage des conformations mais nous pensons avoir étudié les conformations les plus probables et significatives.

2.2.2 La quinone réductase 2

Nous avons travaillé avec l'enzyme quinone réductase 2 (QR2, VELLA et al. 2005) sujet d'étude fourni par nos collaborateurs de l'Institut de Recherches Servier (IRS).

QR2 est capable de réduire des neurotransmetteurs de la famille des catécholamines (FU et al. 2008) mais son rôle biologique n'est pas encore élucidé. Elle pourrait être impliquée dans des maladies neurodégénératives telles que Alzheimer ou Parkinson (BENOIT et al. 2010; HASHIMOTO et NAKAI 2011; OXENKRUG et al. 2010).

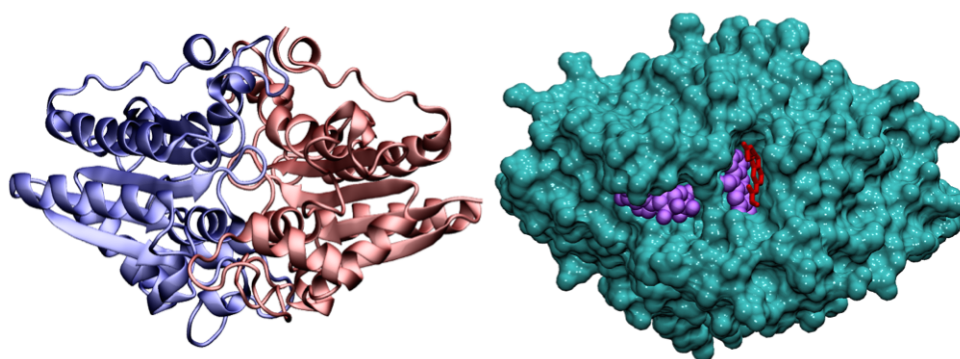


FIGURE 2.12 – La quinone réductase 2 (QR2). À gauche les deux chaînes de QR2. À droite QR2 en vert, le FAD en violet et le MCA-NAT en rouge.

QR2 est un homodimère, elle est constituée de deux chaînes de 231 acides aminés. Les deux sites actifs se situent à l'interface entre les chaînes (Fig. 2.12). QR2 a besoin de deux co-facteurs pour son activité enzymatique : un ion métallique Zn^{2+} par sous unité et une flavine adénine dinucléotide (FAD, Fig. 2.13a) par site de fixation. La structure cristallographique utilisée est celle de la protéine complexée avec le ligand 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT, Fig. 2.13b). Le MCA-NAT est une petite molécule hydrophobe capable d'inhiber l'activité de QR2.

La structure utilisée pour les simulations provient de la PDB, elle a été obtenue par

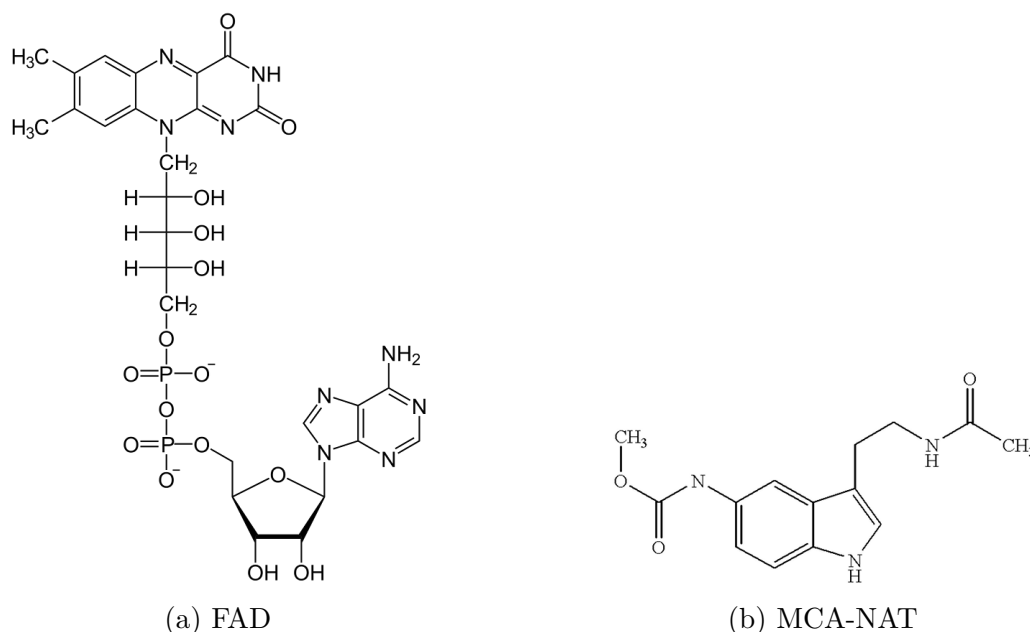


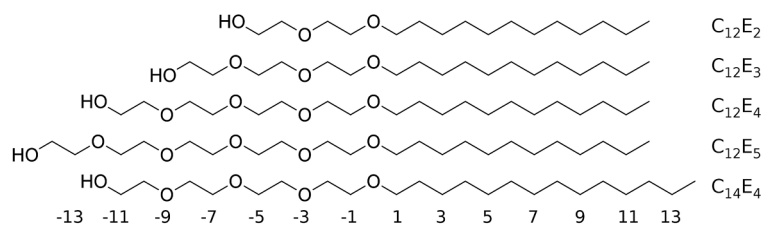
FIGURE 2.13 – Co-facteur et ligand de QR2 : (a) le co-facteur la flavine adénine dinucléotide (FAD), (b) le ligand 5-méthoxycarbonylamino-N-acétyltryptamine (MCA-NAT).

l'IRS par diffraction de rayons X avec une résolution de 2,09 Å, son code PDB est 3OVM (PEGAN et al. 2011). La structure n'étant pas complète, nous avons modélisé les résidus manquant (2 résidus en N_{ter} et C_{ter} , de chaque chaîne) à l'aide du logiciel MODELLER (ESWAR et al. 2006). Nous avons utilisé le champ de force GROMOS 54A7 pour modéliser QR2, le FAD et le MCA-NAT.

2.2.3 Les C_iE_j

Les C_iE_j (polyéthylène glycol alkyl-éther) sont des tensioactifs non-ioniques. Comme tous les tensioactifs, ce sont des molécules amphiphiles, c'est à dire ayant une partie hydrophile (la tête polaire) ici composée de fonctions éthers et une partie hydrophobe (queue apolaire appelée chaîne aliphatique) ici composée de fonctions alcanes. Grâce à leur propriété amphiphile les tensioactifs peuvent se placer à l'interface entre un milieu hydrophobe (huile) et un milieu polaire (eau). La formule générale des C_iE_j est la suivante : $CH_3-(CH_2)_{i-1}-(-O-CH_2-CH_2)_j-OH$, le nombre de carbones i de la chaîne aliphatique et le nombre de fonctions éthers j de la tête polaire sont modifiables (Fig. 2.14). Les C_iE_j ont été très étudiés et de nombreuses propriétés physico-chimiques sont connues (LAI et CHEN 1999 ; KURTISOVSKI et al. 2007 ; ROSEN et al. 1982). Nous avons étudié les C_iE_j , $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$ et $C_{14}E_4$ en phase lamellaire (NIBU et INOUE 1998). La phase lamellaire correspond à la superposition de bicouches de tensioactifs.

Les paramètres utilisés pour les C_iE_j sont issus du champ de force GROMOS 2016H66 (HORTA et al. 2011 ; FUCHS et al. 2012 ; HORTA et al. 2016).

FIGURE 2.14 – Les C_iE_j utilisés dans ce travail.

2.2.4 Conditions de simulation

Ici sont présentées les conditions pour la majorité des simulations. Pour les cas particuliers, les conditions sont définies directement lors de la présentation des résultats.

Cyclodextrines et QR2

Les simulations ont été réalisées avec GROMACS 5.0.7 (ABRAHAM et al. 2015). Les molécules d'intérêt ont été « minimisées » dans le vide puis solubilisées dans l'eau (modèle SPC *single point charge*, BERENDSEN et al. 1981) ou dans de l'eau avec 5% de DMSO (les paramètres du DMSO sont ceux du champ de force GROMOS 54A7). Le système a été neutralisé avec des ions Na^+ ou Cl^- puis minimisé. L'équilibrage a été fait en deux étapes, d'abord une étape de chauffage en NVT pendant 50 ps puis un équilibrage en NPT sur 200 ps. Puis la production a été réalisée en NPT. La température a été fixée à 298 K par un thermostat de Bussi avec un temps de relaxation de 0,1 ps. La pression isotrope a été fixée à 1 bar par un barostat de Parrinello-Rahman avec un temps de relaxation de 4 ps. La compressibilité isotherme a été fixée à $4,5 \cdot 10^{-5} \text{bar}^{-1}$. Les interactions de van der Waals ont été traitées par un *twin range cut-off* de 8 et 14 Å. Les interactions électrostatiques ont été traitées par PME avec un *cut-off* de l'espace réel de 10 Å, un espacement de grille de 1,2 Å et une extrapolation d'ordre 4.

C_iE_j

Toutes les simulations de bicouches ont été réalisées avec GROMACS 4.0.7. Les bicouches de 90 C_iE_j ont été générées par auto-assemblage. Les plus grandes bicouches (1024 C_iE_j) sont des répliques en x, y des bicouches de 90. Les bicouches ont été solubilisées dans le modèle d'eau SPC. Les bicouches ont été minimisées puis une DM de production a été réalisée en NPT. La température a été fixée à 300 K par un thermostat de Bussi avec un temps de relaxation de 0,1 ps. La pression semi-isotrope a été fixée à 1 bar par un barostat de Parrinello-Rahman avec un temps de relaxation de 4 ps. La compressibilité isotherme a été fixée à $4,5 \cdot 10^{-5} \text{bar}^{-1}$. Les interactions de Lennard-Jones ont été gérées par un *twin-range cut-off* à 8 et 14 Å. Pour les interactions électrostatiques des petites bicouches un *twin-range cut-off* ainsi que le *reaction-field* (TIRONI et al. 1995) avec une permittivité fixée à 61 (celle de l'eau) ont été utilisés. Pour les grandes bicouches,

Cible	Ligand	Eau	DMSO	Ions	Temps (ns)	Pas (ps)	Rép
		2118			50/15	10/0,1	1/1
		2118	29		50/15	10/0,1	1/1/1
β -CD		2118			500/50/50	10/10/0,1	1/1/1
β -CD		2118	29		500/50/50	10/10/0,1	1/1/1
β -CD	ADA	2118		1 Na ⁺	500/50/50/50	10/10/0,1/10	1/1/1/20
β -CD	ADA	2118	29	1 Na ⁺	500/50/50/50	10/10/0,1/10	1/1/1/20
γ -CD		2118			500/50/50	10/10/0,1	1/1/1
γ -CD		2118	29		500/50/50	10/10/0,1	1/1/1
γ -CD	ADA	2118		1 Na ⁺	500/50/50/50	10/10/0,1/10	1/1/1/20
γ -CD	ADA	2118	29	1 Na ⁺	500/50/50/50	10/10/0,1/10	1/1/1/20

TABLE 2.1 – Tableau des simulations réalisées pour les cyclodextrines (sauf celles du calcul d'énergie libre). Avec rép = répétitions. Le pas correspond au pas d'enregistrement des simulations (le pas d'intégration étant de 2 fs). Les simulations de 500 ns ont servi pour les analyses de présence des molécules de solvant dans les cavités. Celles de 50 ns enregistrées toutes les 10 ps ont servi au calcul du volume spécifique. Celles de 50 ns enregistrées toutes les 0,1 ps ont été utilisées pour les analyses des diffusions latérales et rotationnelles. Celles répétées 20 fois étaient des simulations de liaison utilisées pour la décomposition de l'énergie libre.

Cible	Ligand	Eau	DMSO	Ions	Temps (ns)	Pas (ps)	Rép
QR2		24310			500/10	10/0,1	1/1
QR2		24310	334		500/10	10/0,1	1/1
QR2	MCA-NAT	24310		8 Na ⁺	500/10	10/0,1	1/1
QR2	MCA-NAT	24310	334	8 Na ⁺	500/10	10/0,1	1/1

TABLE 2.2 – Tableau des simulations réalisées pour QR2. Avec rép = répétitions. Le pas correspond au pas d'enregistrement des simulations (le pas d'intégration étant de 2 fs). QR2 inclus les 2 chaînes, les deux molécules de FAD et les deux ions Zinc. MCA-NAT indique deux molécules. Les simulations de 500 ns enregistrées toutes les 10 ps ont servi aux analyses des solvants sauf pour les analyses des diffusions latérales et rotationnelles pour lesquelles nous avons utilisé les simulations enregistrées toutes les 0,1 ps.

les longues portées des interactions électrostatiques ont été prises en compte par PME avec un *cut-off* de l'espace réel de 10 Å, un espacement de grille de 1,2 Å et une extrapolation d'ordre 4.

2.3 Estimation de l'énergie libre de liaison

L'affinité d'un ligand pour son récepteur peut être estimée en DM par le calcul de l'énergie libre de liaison ΔG .

2.3.1 Cycle thermodynamique

L'échelle de temps des réactions de liaison est trop importante pour pouvoir déterminer ΔG directement par DM. Nous sommes obligés de prendre un chemin indirect créé via un cycle thermodynamique particulier pour calculer ΔG . Le cycle thermodynamique, que nous utilisons en DM, fait intervenir des réactions inobservables dans le réel, nous les appelons transformations « alchimiques ». Ces transformations permettent d'établir un cycle thermodynamique réalisable par DM (Fig. 2.15).

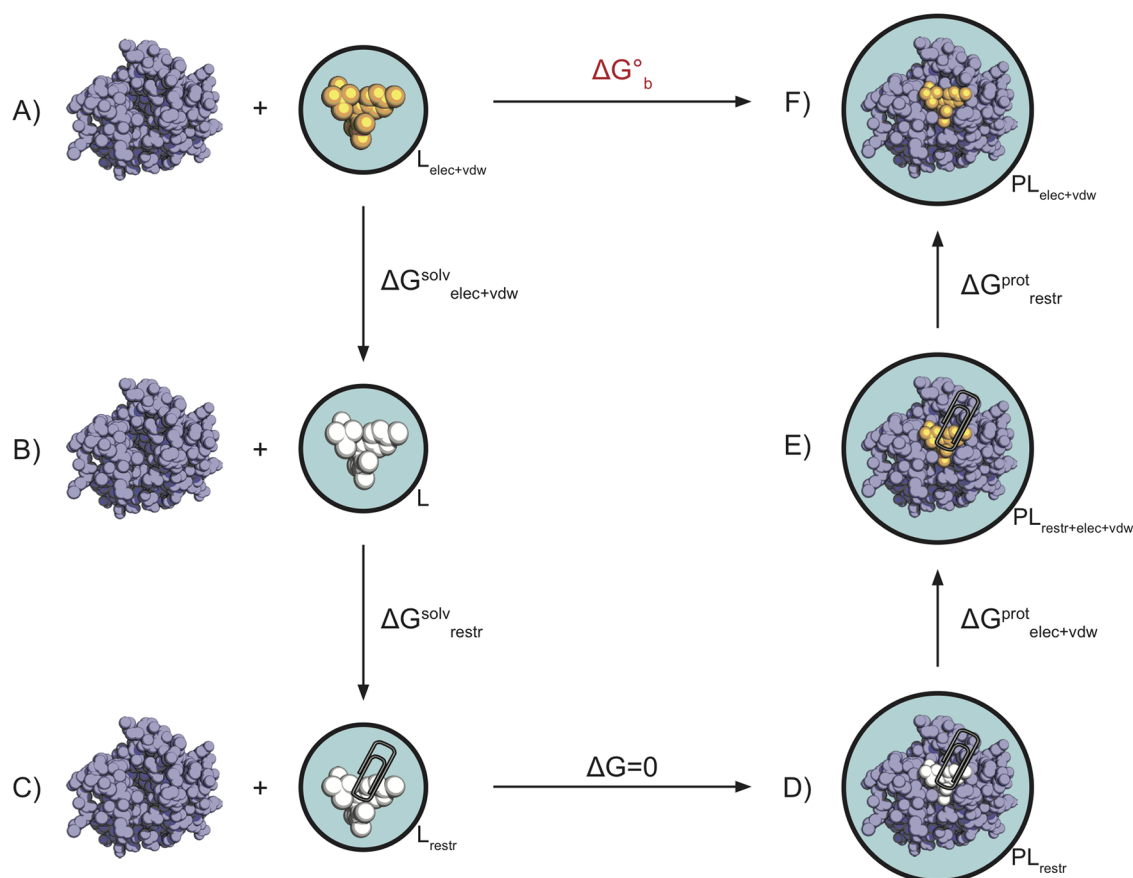


FIGURE 2.15 – Cycle thermodynamique de la liaison d'un ligand (L) à une protéine (P). Description des étapes du cycle : A) Simulation du ligand seul dans le solvant ; B) Ligand découplé du solvant ; C) Ligand découplé du solvant avec des restrictions de positions ; D) Complexe dans le solvant, ligand restreint et découplé de la protéine et du solvant ; E) Complexe avec le ligand restreint ; F) Complexe protéine ligand dans le solvant (Tiré de ALDEGHI et al. 2016).

Explication détaillée du cycle thermodynamique

Dans la figure 2.15 issue de ALDEGHI et al. 2016, la détermination de l'énergie libre du passage direct de l'état A à l'état F ($A \rightarrow F$) n'est pas possible. Nous devons passer par le chemin composé des étapes suivantes $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow F$.

L'étape $A \rightarrow B$ est le découplage du ligand. Le découplage consiste en l'annihilation

des interactions non-liées entre le ligand et le solvant. Les interactions liées et non-liées intramoléculaires du ligand sont conservées. L'énergie libre de cette transformation est facilement calculable par DM.

L'étape $B \rightarrow C$ correspond à la restriction du mouvement du ligand. Pour permettre un bon échantillonnage, il est nécessaire de restreindre les mouvements du ligand. La détermination de l'énergie libre de cette étape se fait analytiquement. Pour une restriction de distance par un potentiel harmonique l'énergie libre de restriction ΔG_{restr} est calculée par la formule suivante (ROUX et al. 1996 ; GILSON et al. 1997 ; BORESCH et al. 2003) :

$$\Delta G_{restr} = k_B T \ln \left[\frac{3}{V} \left(\frac{\pi k_B T}{k} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \quad (2.11)$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, V le volume de référence, T le température et k la constante de force du potentiel harmonique.

L'étape $C \rightarrow D$ correspond au transfert du ligand découplé et restreint d'un milieu avec seulement du solvant à un milieu avec la protéine. Le ligand étant découplé, il n'interagit pas avec le reste du système donc le transfert à une énergie libre de 0.

L'étape $D \rightarrow E$ correspond au « recouplage » du ligand. Comme pour l'étape $A \rightarrow B$ l'énergie libre de cette transformation est facilement calculable par DM.

L'étape $E \rightarrow F$ correspond au retrait des restrictions du ligand. Cette énergie est déterminée par DM.

2.3.2 Méthode de perturbation de l'énergie libre

La différence d'énergie libre entre deux états A et B est définie comme suit :

$$\Delta G_{A,B} = G_B - G_A = -k_B T \ln \left\langle \exp \frac{-\Delta U_{A,B}}{k_B T} \right\rangle_A \quad (2.12)$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, $\Delta U_{A,B}$ la variation d'énergie potentielle entre l'état A et l'état B, $\langle \dots \rangle_A$ la moyenne sur l'ensemble statistique représentatif de l'état A.

Cette définition ne s'applique que si les espaces de phase de A et B sont chevauchants (Fig. 2.16), c'est à dire que l'énergie potentielle de A doit être proche de celle de B et alors $\Delta U_{A,B}$ doit être plus petit que $k_B T$. Si on ne peut pas appliquer directement l'équation 2.12 entre la simulation de l'état A et celle de l'état B il est nécessaire de passer par des états intermédiaires ayant un chevauchement d'espace de phase. Si on découpe la réaction en N états chevauchant on obtient l'équation suivante :

$$\Delta G_{A,B} = \sum_{n=1}^{N-1} \Delta G_{n,n+1} \quad (2.13)$$

Avec l'état $n = 1$ correspondant à l'état A et l'état $n = N$ correspondant à l'état B. Les

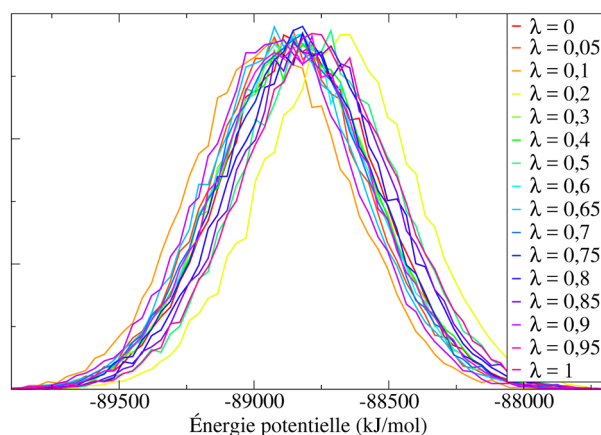


FIGURE 2.16 – Énergie potentielle lors du découplage des liaisons de van der Waals d'un ion sodium dans l'eau. Chaque λ correspond à une étape du découplage, avec $\lambda = 0$ pas découplé et $\lambda = 1$ complètement découplé.

états intermédiaires doivent être choisis suffisamment rapprochés mais n'ont pas besoin d'avoir une signification physique.

Dans le cadre du découplage du ligand, on choisit les états intermédiaires de façon à annihiler progressivement les interactions non-liées. Le paramètre contrôlant le découplage est noté λ avec $\lambda = 0$ correspondant à l'état initial du système, soit ici le ligand couplé et $\lambda = 1$ correspondant à l'état final, soit le ligand découplé. Il est fortement conseillé de ne pas découpler en même temps les interactions électrostatiques et les interactions de van der Waals. Il faut d'abord découpler les interactions électrostatiques puis après on peut découpler les interactions de van der Waals à l'aide d'un potentiel mou. Si l'on veut mettre des restrictions on utilise aussi des états intermédiaires λ . Pour chaque état intermédiaire une simulation est réalisée, le calcul de ΔG se fait sur l'ensemble de ces trajectoires. Pour les simulations nous avons utilisé un intégrateur de *leap-frog* stochastique.

2.3.3 Calcul de l'énergie libre absolue de liaison

Pour faire nos calculs d'énergie libre, nous avons utilisé l'outil Python `alchemical-analysis.py` du package `pymbar` (KLIMOVICH et al. 2015). Nous avons choisi la méthode MBAR développée dans `pymbar` pour le calcul de l'énergie libre de réaction.

Méthode BAR et MBAR

La méthode de calcul de BAR (*Bennett acceptance ration*, BENNETT 1976) prend en compte les états intermédiaires dans le sens $A \rightarrow B$ (*forward*) et dans le sens $A \leftarrow B$ (*backward*) pour calculer $\Delta G_{A,B}$. Ainsi la différence d'énergie $\Delta G_{i,j}$ entre deux états intermédiaires i et j (ayant chacun N_i et N_j micro-états correspondants pour les DM aux différentes étapes d'une simulation) est trouvée en résolvant numériquement la fonction

$\Delta U_{i,j}$ suivante :

$$\frac{1}{\langle 1 + \exp \frac{\Delta U_{i,j} - C}{k_B T} \rangle_i} = \frac{1}{\langle 1 + \exp \frac{\Delta U_{j,i} - C}{k_B T} \rangle_j} \quad (2.14)$$

Avec $C = \Delta G_{ij} + k_B T \ln \frac{N_j}{N_i}$.

BAR cherche à minimiser la variance entre les données de deux états intermédiaires adjacents pour améliorer la précision de ΔG finale. Une amélioration de la méthode BAR est la méthode MBAR (*multi Bennett acceptance ration*, SHIRTS et CHODERA 2008). MBAR prend en compte tous les états intermédiaires pour optimiser la matrice de variance des ΔG .

Recherche des échantillons non-corrélés

Pour les simulations liées aux calculs d'énergie libre, nous avons enregistré les énergies toutes les 20 fs, ceci permet d'avoir de nombreuses données mais cette fréquence peut aussi amener à avoir des données trop corrélées, c'est à dire que deux étapes consécutives sont trop proches énergétiquement. Une corrélation entraîne un mauvais échantillonnage de l'énergie du système. Il est donc nécessaire de ré-échantillonner les données en cherchant les échantillons non-corrélés. La méthode de détection utilisée est celle décrite dans l'article du programme pymbar (SHIRTS et CHODERA 2008). Pour l'observable $A(x)$ d'une série temporelle $\{x_t\}_{t=1}^T$, la fonction d'auto-corrélation normalisée est définie comme suit :

$$C_{AA}(t) = \frac{\langle A(x_{t_0})A(x_{t_0+t}) \rangle - \langle A \rangle^2}{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2} \quad (2.15)$$

Alors, le temps d'auto-corrélation τ_A pour l'observable A est défini par :

$$\tau_A = \sum_{t=1}^T \left(1 - \frac{t}{T}\right) C_{AA}(t) \quad (2.16)$$

Dans pymbar, les auteurs choisissent les échantillons par rapport à τ_A . Ils prennent un échantillon tous les $1 + 2\tau_A$ temps. L'observable A étudié pour déterminer τ_A est la dérivée de l'énergie $\partial U / \partial \lambda$.

2.4 Analyse des simulations

2.4.1 Calcul de la moyenne et de l'écart-type

Nous avons déterminé les moyennes selon deux méthodes : soit nous avons au moins trois répliques d'une même simulation et dans ce cas nous avons fait la moyenne et l'écart-type des répliques, soit nous n'avons qu'une réplique et dans ce cas nous avons fait du *block-averaging*. Le *block-averaging* consiste à découper une simulation en au moins

trois parties égales. La valeur observée est calculée pour chaque partie et la moyenne et l'écart-type sont calculés sur l'ensemble des parties.

2.4.2 Méthodes d'analyses des solvants

Hydratation du site de fixation

Pour nos analyses, nous voulions comparer les molécules de solvant présentes dans le site de fixation avec celle du *bulk* (*bulk* : milieu de solvant seul, par exemple pour l'eau une boîte d'eau pure ou des molécules d'eau suffisamment éloignées du récepteur pour ne plus avoir d'interaction avec lui). La première étape a donc été la recherche des molécules de solvant présentes dans le site de fixation des CD et de QR2. La recherche s'est faite par l'utilisation d'un seuil de distance entre le centre de masse (COM) de l'oxygène de l'eau ou le soufre du DMSO et un point de référence du récepteur.

Pour les cyclodextrines, nous avons fait une sélection en deux étapes (Fig. 2.17). D'abord nous avons cherché toutes les molécules de solvant à moins de 4 Å (5.5 Å) du COM de la β -CD (γ -CD). Ensuite sur ces molécules nous avons cherché celles qui étaient à moins de 3 Å du plan transversal de la CD. L'équation du plan transversal est obtenue à partir des coordonnées de trois atomes centraux de la CD. Une fois l'équation du plan déterminée nous avons pu calculer la distance entre l'atome de solvant et le plan.

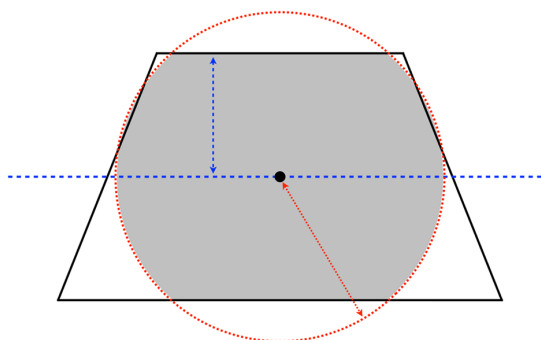


FIGURE 2.17 – Représentation des seuils de détection des molécules de solvant dans les cyclodextrines. En rouge la sphère centrée sur le centre de masse de la CD (point noir), toutes les molécules de solvant présentes dans cette sphère sont sélectionnées puis parmi ces molécules seules celles à moins d'une certaine distance du plan transversal à la CD en bleu sont considérées comme étant dans le site de fixation. Le plan est déterminé par 3 atomes centraux de la CD. Finalement, les molécules d'eau sélectionnées sont celles dans la zone grise.

Pour QR2, nous avons cherché toutes les molécules de solvant à moins de 6 Å du COM du triple cycle de la flavine du FAD (Fig. 2.13a). Une fois que les molécules de solvant présentes dans le site actif sont identifiées on peut étudier leurs propriétés dynamiques et volumétriques et les comparer à celles du *bulk*.

Distribution radiale

La fonction de distribution radiale $g(r)$ est la probabilité de trouver un atome j à une distance r d'un atome i par rapport à la distribution d'un gaz idéal. $g(r)$ permet de caractériser l'organisation d'un liquide.

$$g(r) = \frac{\rho(r)}{\rho} = \frac{N(r)}{4\pi r^2 \rho \delta r} \quad (2.17)$$

Avec ρ la densité dans le *bulk* de la molécule i et $\rho(r)$ la densité dans la couche sphérique d'épaisseur δr à une distance r de l'atome j et N le nombre de molécules dans la couche sphérique.

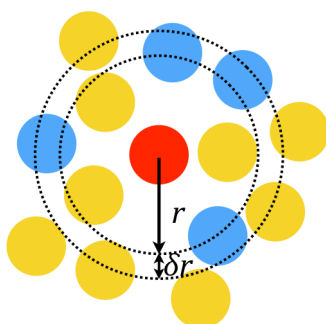


FIGURE 2.18 – Exemple du calcul de la distribution radiale. En rouge l'atome de référence, en bleu les atomes compris dans la couche d'épaisseur δd .

Quand $g(r) = 1$ la densité des molécules de solvant est égale à celle du *bulk*. Si $g(r) < 1$ il y a moins de molécules de solvant à la distance r que dans le *bulk*. Si $g(r) > 1$ il y a plus de molécules de solvant autour de l'ensemble des atomes de notre molécule d'intérêt que dans le *bulk*.

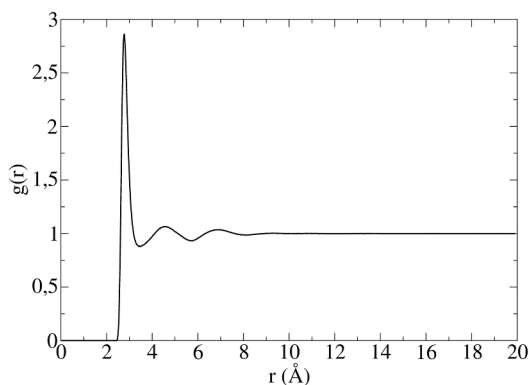


FIGURE 2.19 – Représentation de la distribution radiale de l'eau dans une boîte d'eau pure. Plus r est proche de 1, plus la répartition des molécules est la même que dans le *bulk*.

Dans ce travail, nous avons utilisé la distribution radiale pour étudier la répartition de l'eau et du DMSO autour des sites de fixation des récepteurs avec ou sans ligand dans le but de déterminer si les solvants sont « attirés » par ces régions hydrophobes. $g(r)$ a été

calculé entre le COM de la molécule d'intérêt (cyclodextrine, QR2, ligand) et le COM de l'oxygène de l'eau ou le soufre du DMSO.

Volume

Le volume des molécules de solvant a été déterminé à l'aide du programme VLDP (*Voronoi Laguerre Delaunay Protein*, ESQUE et al. 2013). La triangulation de Delaunay relie tous les points d'un plan par des triangles, aucun point ne doit être inclus dans les cercles circonscrits des triangles. À partir de la triangulation, on peut déduire le diagramme de Voronoï, les points du diagramme sont les centres des cercles circonscrits des triangles (Fig. 2.20). Dans VLDP, une triangulation de Delaunay est réalisée pour les atomes du système puis un diagramme de Laguerre est calculé à partir de la triangulation de Delaunay, grossièrement un diagramme de Laguerre est un diagramme de Voronoï auquel on ajoute des poids pour les différents points. Les zones délimitées par le diagramme correspondent aux espaces occupés par les atomes. Grâce à VLDP, on obtient le volume des différents atomes du système.

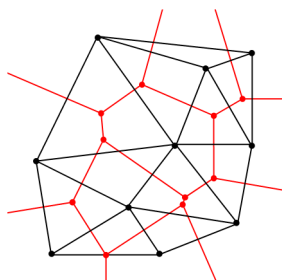


FIGURE 2.20 – Exemple d'un diagramme de Voronoï (rouge) issu de la triangulation de Delaunay (noir). Dans l'exemple d'atomes, chaque point noir correspond à un atome, les zones rouges correspondent à l'espace qu'il occupe.

Le volume a été déterminé pour les molécules de solvant présentes dans les sites de fixation sur des simulations de 50 ns enregistrées toutes les 10 ps. Seules les 40 dernières nanosecondes ont servi au calcul. La moyenne du volume est obtenue par *block averaging*. Le programme VLDP est capable de séparer la boîte de simulation en couches sphériques. Pour les volumes dans le *bulk*, nous avons utilisé les volumes des 1-2 couches les plus internes de boîtes de solvant pures.

Facteur de retardement

Le facteur de retardement R_f (FISSETTE et al. 2016) permet de mesurer le retard de diffusion d'une molécule de solvant à proximité d'une molécule de récepteur par rapport à la vitesse de diffusion de cette même molécule dans le *bulk*. Le R_f correspond au rapport entre le déplacement quadratique moyen (*MSD mean square displacement*) du solvant

dans le site de fixation et du MSD solvant dans le *bulk*.

$$MSD = \langle (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0))^2 \rangle \quad (2.18)$$

$$R_f = \frac{MSD_{bulk}}{MSD_{site}} \quad (2.19)$$

Pour calculer le MSD, nous avons réalisé des simulations de 50 ns d'une molécule d'intérêt dans le solvant en enregistrant toutes les 10 ps. Puis à partir de ces simulations, toutes les 5 ns à partir de 10 ns nous avons initié une nouvelle simulation de 1 ns en enregistrant toutes les 0.1 ps. Nous avons donc pour chaque système 9 simulations de 1 ns avec 10000 clichés (*frames*). Sur ces simulations de 1 ns nous avons calculé le MSD des molécules de solvant présentes dans le site de fixation sur 10 ps par fenêtre glissante de 0,1 ps. Le MSD est moyenné sur toutes ces molécules de solvant. Le calcul du MSD a été fait grâce à un script Python que nous avons développé.

Auto-corrélation rotationnelle

L'auto-corrélation rotationnelle $C(t)$ permet d'estimer la vitesse de rotation d'une molécule. $C(t)$ est déterminée pour un vecteur définissant l'axe de la molécule. Si la molécule est rigide comme l'eau une liaison est utilisée. Pour le DMSO nous avons pris la double liaison S=O.

$$C(t) = \langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle \quad (2.20)$$

Avec $\mathbf{v}(t)$ le vecteur étudié à l'instant t , $\mathbf{v}(0)$ le vecteur à $t = 0$. $C(t)$ correspond à une corrélation, elle peut prendre des valeurs allant de -1 à 1.

Plus l'auto-corrélation décroît rapidement plus le mouvement de rotation de la molécule est rapide. À partir de $C(t)$, nous calculons le temps de relaxation τ par un ajustement à l'aide d'une exponentielle étendue (Eq. 2.21, BIZZARRI et CANNISTRARO 2002).

$$C_{fit}(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right) \quad (2.21)$$

τ nous renseigne sur le temps que met une molécule d'eau pour s'éloigner de son orientation initiale. Plus τ est faible et plus la molécule tourne rapidement.

Lorsque $C(t)$ tend vers 0, au cours d'une longue simulation, alors le vecteur visite toutes les directions possibles (mouvement isotrope). Si le vecteur tend vers une valeur supérieure à 0 alors le mouvement est restreint.

Nous avons calculé $C(t)$ sur des simulations de 50 ps enregistrées toutes les 0,1 ps. Seules les 40 dernières nanosecondes ont servi au calcul. L'ajustement a été réalisé avec la fonction *optim* du logiciel R.

2.4.3 Méthodes d'analyses de l'interaction ligand/récepteur

Pour déterminer la stabilité des complexes ligand/cyclodextrine, nous avons réalisé trois analyses différentes : mesure de la distance ligand-récepteur, liaisons H entre le ligand et le récepteur et mesure de l'angle entre l'ADA et la cyclodextrine.

Pour la distance et les liaisons H entre le ligand et le récepteur, nous avons utilisé les outils de GROMACS : *gmx distance* et *gmx hbond*.

Mesure de l'angle ADA/cyclodextrine

Pour mesurer l'angle formé par l'ADA et la cyclodextrine, nous avons écrit un script qui calcule l'angle formé par l'axe principal de l'ADA (liaison C-COO⁻, Fig. 2.9) et par l'axe correspondant à la droite perpendiculaire au plan formé par l'axe principale de la cyclodextrine et passant par le centre du cercle de la CD (Fig. 2.21).

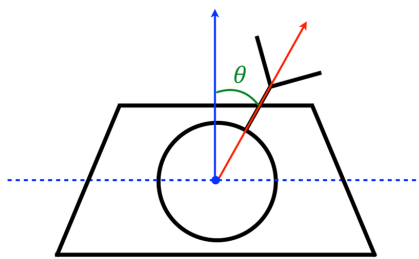


FIGURE 2.21 – Schéma représentant la méthode de calcul utilisée pour mesurer l'angle entre l'ADA et une CD. Le plan de l'axe principal de la CD est représenté par une ligne pointillée bleue, la perpendiculaire au plan est représentée par un vecteur bleu. L'axe principal de l'ADA est représenté par un vecteur rouge. L'angle mesuré θ est en vert.

2.4.4 Méthodes d'analyses des bicouches de tensioactifs

Aire par tensioactif

L'aire par tensioactif est définie par l'aire moyenne occupée par un tensioactif à la surface de la bicouche. Pour la calculer, nous déterminons l'aire totale puis nous la divisons par le nombre de tensioactifs par feuillet.

Densité

La densité correspond à la densité d'une boîte de tensioactif pure. Elle est obtenue en divisant la masse de la boîte par son volume total.

Épaisseur de la bicouche

Pour estimer l'épaisseur de la bicouche, nous avons calculé la densité massique de l'eau et des C_iE_j selon l'axe des z . L'épaisseur correspond à la distance séparant le croisement

des densités (Fig. 2.22).

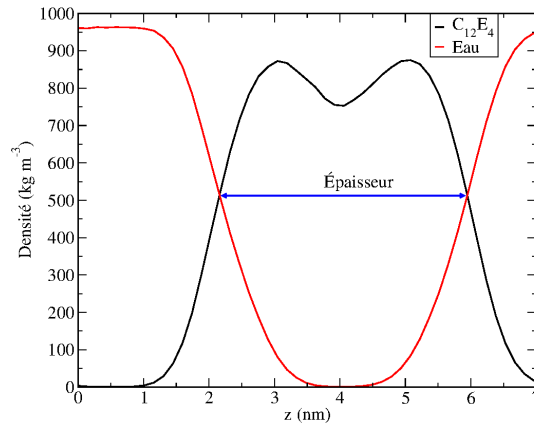


FIGURE 2.22 – Densité massique de l'eau (rouge) et de C₁₂E₄ (noir) en fonction de l'axe z . L'épaisseur correspond à la distance représentée par la flèche bleue.

Diffusion latérale

La diffusion latérale correspond au déplacement d'un tensioactif à la surface de la bicouche. Le coefficient de diffusion D peut être défini selon la relation d'Einstein suivante (EINSTEIN 1905) :

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{4tN} \sum_{i=1}^N \langle (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0))^2 \rangle \quad (2.22)$$

Le terme entre $\langle \dots \rangle$ définit le MSD, il s'agit de la distance parcourue par le centre de masse (COM) du tensioactif i entre le temps 0 et le temps t , élevée au carré. Le symbole $\langle \dots \rangle$ indique qu'on calcule la moyenne du MSD en choisissant plusieurs temps 0 pour augmenter les statistiques. Ce calcul est réalisé pour la totalité N des tensioactifs. La diffusion D est typiquement calculée à partir de la pente du graphique du MSD en fonction du temps, une fois que celle-ci atteint le régime Brownien (entre quelques centaines de picosecondes à quelques nanosecondes pour les lipides, WOHLERT et EDHOLM 2006). Toutefois, la valeur de diffusion calculée de cette manière, pour les bicouches de lipides ou de tensioactifs, fluctue de manière importante et il est parfois difficile de bien l'estimer. Le groupe d'Ilpo Vatulainen a proposé une méthode alternative (FALCK et al. 2008) permettant d'estimer la diffusion de manière plus précise. Pour calculer la diffusion selon cette méthode, nous déterminons la distance r parcourue par les tensioactifs pendant un intervalle de temps δt . Nous calculons cette distance sur plusieurs δt (1, 5, 10, 20, 30, 50, 70 et 100ns) et pour plusieurs temps initiaux. Ensuite nous calculons la distribution des distances par rapport au δt . Cette distribution est ajustée sur la distribution P décrivant la diffusion d'équation

suivante (FALCK et al. 2008) :

$$P(r, \delta t) = \frac{r}{2D\delta t} \exp - \frac{r^2}{4D\delta t} \quad (2.23)$$

Avec D le coefficient de diffusion pour un δt donné.

Le coefficient final est obtenu à partir de la courbe de D en fonction de δt . La valeur est obtenue au niveau de la convergence asymptotique aux longs δt . À noter, cette procédure est réalisée sur chaque monocouche, après avoir ôté le mouvement de chacune d'entre elle par rapport à l'autre (chaque monocouche « glisse » par rapport à l'autre à cause des conditions périodiques, il faut donc éliminer ce mouvement de glissement avant de faire l'analyse pour éviter des artefacts, WOHLERT et EDHOLM 2006).

Paramètre d'ordre

Le paramètre d'ordre $|S_{CH}|$ permet d'évaluer l'orientation des tensioactifs par rapport à la normale à la bicouche (l'axe z).

$$|S_{CH}| = \left| \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta) - 1 \rangle \right| \quad (2.24)$$

Avec θ l'angle formé entre la liaison C-H et la normale à la bicouche.

Comme nous utilisons un champ de force unifié, il a été nécessaire de reconstruire les hydrogènes. Cela a été fait avec l'outil `g_order` de GROMACS. Le paramètre d'ordre varie ici entre 0 et 1. Plus $|S_{CH}|$ est proche de 0 et plus les chaînes sont désordonnées et visitent un maximum de direction et inversement plus $|S_{CH}|$ est proche de 1 et plus les chaînes sont ordonnées et visitent peu de directions.

Rigidité

Les grandes bicouches de tensioactif sont capables d'onduler. À partir des ondulations on peut déterminer le module de rigidité, κ , en utilisant le modèle continu d'Helfrich (HELFRICH 1973 ; BRANDT et al. 2011 ; LINDAHL et EDHOLM 2000b) :

$$\left\langle |U(q)|^2 = \frac{k_B T}{A \kappa q^4} \right\rangle \quad (2.25)$$

Avec A l'aire totale du feuillet, $U(q)$ la transformée de Fourier du déplacement en z $u(\mathbf{r})$ à la surface de la bicouche (\mathbf{r} est décrit en représentation de Monge par $\mathbf{r} = [x, y]$). $U(q)$ est obtenu par la transformée de Fourier discrète de $u(\mathbf{r})$:

$$U(q) = N^{-1} \sum_N u(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.26)$$

Avec q le vecteur d'onde ($\mathbf{q} = [q_x, q_y] = \frac{2\pi[n_x, n_y]}{L}$, avec L l'arrête de la bicouche, n_x et n_y des entiers allant de 0 à $N - 1$), q est la norme de \mathbf{q} , N est le nombre de points de la

grille servant à discrétiser la surface. κ a été obtenu par un ajustement non-linéaire de l'équation 2.25 en forçant la pente à -4.

Détection des pores

Les tensioactifs sont capables de former spontanément des pores dans la bicouche. Pour détecter ces pores, nous avons écrit un script qui détecte les pores dans la membrane et calcule l'aire des pores. Les pores sont détectés à partir des chaînes d'alcane. Seules les positions en (x, y) des atomes nous intéressent. Nous découpons la surface de la bicouche en grille de 200x200 points. La grille est représentée sous la forme d'une matrice de 0 de dimension $(200, 200)$ où chaque valeur correspond à une case. Pour chaque case, nous cherchons s'il existe un atome qui se superpose à cette case. Si aucun atome n'est présent dans cette case alors elle est considérée comme faisant partie d'un pore, et sa valeur dans la matrice passe à 1. Pour les atomes nous avons pris en compte le rayon défini par la distance r_{min} du potentiel de Lennard-Jones. Pour détecter les cases faisant partie d'un même pore, nous avons utilisé un algorithme de composantes connexes et nous avons pris en compte les PBC. Pour déterminer si un pore perdure au cours du temps, nous avons comparé la matrice au temps t à celle au temps $t + 1$: si deux pores possèdent des cases communes aux deux temps alors ils sont considérés comme identiques.

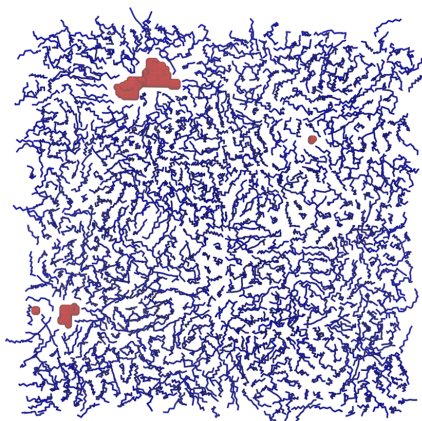


FIGURE 2.23 – Pores détectés dans la bicouche. En bleu les queues aliphatiques d'un C_iE_j , les billes rouges représentent les cases de la matrice correspondant aux pores.

Flip-flop

Les tensioactifs sont capables de passer d'un feuillet à l'autre de la bicouche par un mouvement de flip-flop. On peut suivre ces flip-flops en observant le mouvement en z de l'oxygène de l'hydroxyle. Si l'oxygène passe d'un feuillet à l'autre on considère qu'il y a eu flip-flop. L'énergie nécessaire pour réaliser un flip-flop (ou barrière de flip-flop) peut être estimée par un calcul d'un potentiel de force moyenne (PMF, *potential of mean force*). Le

PMF est calculé simplement en suivant le mouvement en z de l'oxygène de l'hydroxyle :

$$PMF(z) = -RT \ln \frac{p(z)}{p(z_0)} \quad (2.27)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température, $p(z)$ la fonction de distribution de la position en z et $p(z_0)$ la plus grande valeur de $p(z)$, soit la position d'équilibre.

La barrière de flip-flop est déduite du PMF entre le centre de la bicouche et la position d'équilibre (Fig. 2.24).

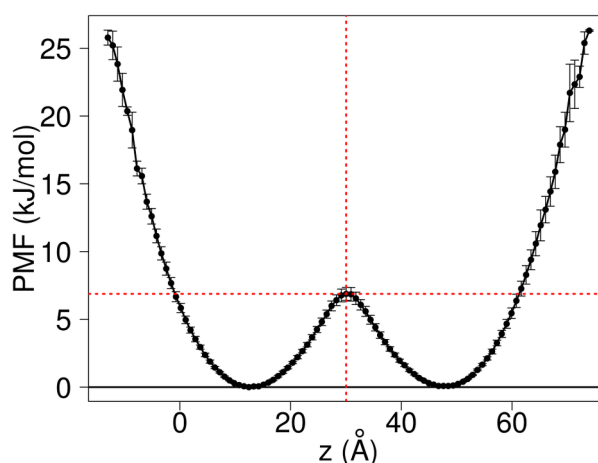


FIGURE 2.24 – Exemple du calcul du PMF le long de l'axe z pour une grande bicouche de $C_{12}E_4$, le croisement des lignes rouges nous donne l'énergie de barrière de flip-flop.

Perméation de l'eau

L'eau est capable de diffuser à travers la bicouche. Pour suivre la perméation de l'eau à travers la bicouche nous avons utilisé le script Python `fluxer.py` (MELO et al. 2017) qui suit le mouvement en z des molécules d'eau. La barrière de perméation de l'eau a été calculée avec la même approche que les flip-flops. Nous avons utilisé les déplacements en z de l'oxygène de l'eau pour calculer le $PMF(z)$.

TROISIÈME PARTIE

Cyclodextrines

Effet du DMSO sur l'affinité d'un ligand hydrophobe pour les cyclodextrines β et γ

La première question à laquelle nous avons essayé de répondre dans ce chapitre a été : est-ce que le DMSO a un effet sur l'affinité de l'ADA pour les cyclodextrines β et γ ? Pour déterminer cela nous avons mesuré expérimentalement les constantes d'association en présence et en absence de 5% de DMSO et nous avons aussi calculé l'énergie libre de liaison par des DM de perturbation d'énergie libre. Ce travail a donné lieu à un article qui est directement retranscrit dans ce chapitre, après un bref résumé. Ensuite nous avons décomposé ΔG en enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) de réaction pour mieux comprendre l'origine des différences d'affinité.

3.1 Résumé de l'article

Grâce à sa capacité à solubiliser de nombreuses molécules polaires et apolaires, le DMSO est un cosolvant fréquemment employé à faible concentration lors de mesures *in vitro* et en particuliers pour les tests d'affinité de molécules hydrophobes. L'effet des fortes concentrations de DMSO sur les interactions moléculaires a déjà été caractérisé, le DMSO diminue voire empêche les interactions (CUBRILOVIC et ZENOBI 2013; EARP et al. 1984; TJERNBERG et al. 2006). Mais à notre connaissance, l'effet de faibles concentrations telles que celles employées lors des expériences d'affinité en recherche pharmaceutiques, n'ont pas été étudiées. Nous avons donc voulu tester l'hypothèse d'un effet d'une concentration de 5% DMSO sur les interactions de molécules hydrophobes. Pour cela nous avons choisi de déterminer l'affinité d'un couple ligand hydrophobe/récepteur dans l'eau et dans un milieu à 5% de DMSO. Si le DMSO a un effet sur l'affinité nous devrions constater une affinité différente suivant le milieu de réaction. Nous avons choisi d'employer les CD comme récepteurs. En effet, les CD sont des molécules de petites tailles facilement disponibles, solubles dans l'eau et dans le DMSO et capables de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses petites molécules hydrophobes. Nous avons choisi la β et la γ -CD. Pour pouvoir faire cette expérience, nous avons besoin d'un ligand hydrophobe mais tout de

même capable d'être solubilisé dans l'eau à des concentrations détectables par les appareils de mesure. Nous avons choisi l'acide adamantane-1-carboxylique (ADA). L'ADA est connu pour se fixer aussi bien sur la β et la γ -CD mais avec une meilleure affinité pour la β -CD (CROMWELL et al. 1985). Pour mesurer l'affinité nous avons utilisé deux techniques expérimentales : la mesure de vitesse ultra-sonore (MVU) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La MVU est une méthode employée au laboratoire qui permet de déterminer l'affinité par titrage et qui renseigne sur la compressibilité et l'hydratation des molécules titrées (CHALIKIAN 2003). Cependant cette méthode demande des concentrations et des volumes élevés pour une bonne précision. Nous avons donc voulu compléter nos mesures avec des expériences de RMN plus précises mais qui ne sont pas disponibles au laboratoire. Nous avons fait appel à nos collaborateurs Stéphane Desgranges et Christiane Contino-Pépin de l'université d'Avignon pour réaliser ces mesures. Ces expériences ont montré que le DMSO n'affecte pas l'affinité de l'ADA pour la γ -CD mais diminue l'affinité de l'ADA pour la β -CD. Le DMSO a donc un effet différent suivant le récepteur étudié. La γ -CD est composée de seulement un glucose supplémentaire par rapport à la β -CD, malgré des structures proches leurs propriétés physico-chimiques sont différentes, la β -CD est moins soluble dans l'eau et présente une cavité plus petite que la γ -CD. Ces différences expliquent peut-être une interaction plus forte du DMSO avec la β -CD, ce qui pourrait entraîner une compétition entre le ligand et le DMSO pour la β -CD. Alors que la plus grande solubilité et le large site de fixation de la γ -CD empêchent l'effet compétitif du DMSO. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'interaction du DMSO avec les CD et l'ADA. Pour pouvoir observer des phénomènes à l'échelle atomique, nous avons utilisé des techniques de modélisation moléculaire. Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire les résultats expérimentaux des mesures d'affinité. Pour cela, nous avons réalisé des calculs d'énergie libre de liaison (ΔG) par méthode de DM de perturbation d'énergie libre (FEP), pour les couples ADA/ β -CD et ADA/ γ -CD dans l'eau et dans 5% de DMSO. Les calculs de ΔG ont donné des résultats similaires aux mesures expérimentales, nous voyons une baisse de l'affinité de l'ADA pour la β -CD en présence de DMSO alors que pour la γ -CD l'affinité de l'ADA est la même dans les deux conditions. Nos simulations sont validées par les résultats expérimentaux, nous pouvons ainsi utiliser nos modèles pour faire une étude plus poussée à l'échelle atomique de l'interaction ADA/CD et des solvants avec les CD.

3.2 Article : Effect of dimethyl sulfoxide on the binding of 1-adamantane carboxylic acid to β and γ -cyclodextrins



Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Binding of 1-Adamantane Carboxylic Acid to β - and γ -Cyclodextrins

Caroline Senac,[†] Stéphane Desgranges,^{‡,¶} Christiane Contino-Pépin,[‡] Wladimir Urbach,^{‡,§} Patrick F. J. Fuchs,^{||,⊕} and Nicolas Taulier^{*,†,⊕}

[†]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB), F-75006 Paris, France

[‡]Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 84911 Avignon, France

[¶]Faculty of Medicine, Radiology, University of Geneva, 1205 Geneva, Switzerland

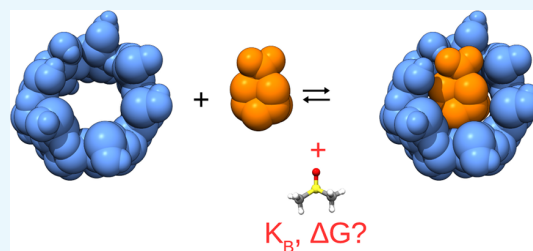
[§]Laboratoire de Physique Statistique, Département de Physique de l'ENS, PSL Research University, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France

^{||}Université Paris Diderot, 75005 Paris, France

[⊕]Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École Normale Supérieure, PSL Research University, CNRS, Laboratoire des Biomolécules (LBM), 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: Most therapeutic targets are proteins whose binding sites are hydrophobic cavities. For this reason, the majority of drugs under development are hydrophobic molecules exhibiting low solubility in water. To tackle this issue, a few percent of cosolvent, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), is usually employed to increase drug solubility during the drug screening process. However, the few published studies dealing with the effect of adding DMSO showed that the affinity of hydrophobic ligands is systematically underestimated. To better understand the effect of DMSO, there is a need of studying its effect on a large range of systems. In this work, we used β - and γ -cyclodextrins (made of 6 and 7 α -D-glucopyranoside units, respectively) as models of hydrophobic cavities to investigate the effect of the addition 5% DMSO on the affinity of 1-adamantane carboxylic acid (ADA) to these cyclodextrins. The two systems differ by the size of the cyclodextrin cavity. The evaluation of binding constants was performed using ultrasound velocimetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and molecular simulations. All techniques show that the presence of 5% DMSO does not significantly modify the affinity of ADA for γ -cyclodextrin, while the affinity is dramatically reduced for β -cyclodextrin. The bias induced by the presence of DMSO is thus more important when the ligand volume better fits the cyclodextrin cavity. Our work also suggests that free energy calculations provide a sound alternative to experimental techniques when dealing with poorly water-soluble drugs.



INTRODUCTION

The majority of drugs are small ligands whose purpose is to bind therapeutic targets, mostly proteins.^{1,2} Because most of the newly discovered targeted binding sites are small hydrophobic pockets located in proteins,^{3,4} drugs under development are also mainly hydrophobic.⁵ To deal with this increasing number of poorly water-soluble drugs,⁵ new strategies have to be developed for drug discovery and delivery.⁶ Most of them rely on the use of specific molecules that help solubilize the insoluble drugs. Among these molecules, dimethyl sulfoxide (DMSO) is widely used as a cosolvent due to its known ability to readily dissolve a wide range of compounds, including hydrophobic molecules. DMSO is particularly used during the drug discovery process in screening techniques such as cell-based assays or high-throughput screening.⁷ These techniques allow rapid identification of active compounds, antibodies, or genes of therapeutic interest. Once a therapeutic target is

identified, the goal consists in selecting the ligands with the highest affinity for the designated target. Hydrophobic drugs are first solubilized in a 100% DMSO solution, then titrated to an aqueous solution containing the therapeutic protein target so that the volume fraction of DMSO is on the order of a few percent. Indeed, exceeding 10% of DMSO volume concentration is known to unfold proteins^{8–10} as well as to induce cell death.¹¹ Thus, the ligand affinity is systematically evaluated in the presence of less than 10% of DMSO. Surprisingly, the literature dealing with the effect of a small addition of DMSO on binding constant measurements is sparse. It may be because measuring the binding constant of poorly water-soluble or insoluble drugs in the absence of a cosolvent is challenging, as

Received: August 18, 2017

Accepted: January 5, 2018

Published: January 25, 2018

most techniques require a drug concentration significantly higher than the solubility of the drug. The few experimental articles^{12–15} systematically measured binding constants that are weakened in the presence of DMSO compared to values performed without it. Hence, screening techniques that use DMSO most likely underestimate the efficiency of hydrophobic drug candidates. Consequently, there is an urgent need either better quantifying the effect of DMSO to be able to correct its effect on a given system, or using new approaches to evaluate binding constants without the need for a cosolvent. In this context, cyclodextrins represent an attractive model to investigate the effect of a cosolvent in binding events at a hydrophobic site. They are small molecules made of six to eight glucopyranose units assembled into a truncated cone shape, the inner hydrophobic cavity of which can accommodate various small hydrophobic molecules. Their inner cavity can be considered as a simplistic model of a hydrophobic pocket found in proteins of pharmaceutical interest. Moreover, cyclodextrins are widely used in commercial formulations to encapsulate hydrophobic drugs.^{5,16,17} Similarly to drug screening techniques, the production of cyclodextrin based formulations requires the use of a cosolvent to form the hydrophobic drug–cyclodextrin complex. The choice of the cosolvent is a balance between improving the solubility of the hydrophobic drug and decreasing its affinity for cyclodextrins. Because this balance is difficult to predict, most medicinal products contain a majority of empty cyclodextrins, hence leading to less efficient formulations. The understanding of the effect of cosolvents on the binding of cyclodextrins should at the same time help optimize cyclodextrin based formulations as well as predict the affinity of hydrophobic ligands with more accuracy during the drug discovery process. In this article, we have investigated using experimental and numerical techniques the difference in binding constant of a hydrophobic ligand for β - and γ -cyclodextrins performed with or without 5% DMSO, which is a typical concentration employed in screening techniques (i.e., in the range of 1–10%). To the best of our knowledge, the effect of a few percent of DMSO on the binding of chemically unmodified cyclodextrins has never been investigated. All previous studies dealt with large concentrations, ranging from 25% to 100% DMSO.^{18–20}

RESULTS

Sound Velocity Measurements. The effect of 5% DMSO (v/v) on the binding of 1-adamantane carboxylic acid (ADA) to β - and γ -cyclodextrin (β - and γ -CD) was investigated at 25 °C. This system was previously studied in aqueous solution^{21,22} as well as in the presence of various osmolytes,²³ except DMSO. Many studies demonstrated a 1:1 stoichiometry for the complexes of ADA with β - and γ -CD.^{23–25} In particular, the number of water molecules leaving the hydration shell of ADA and β -CD after their binding were determined to be 20–25 water molecules from sound velocity measurements,²¹ which are known to be extremely sensitive to changes in hydration.²⁶ Indeed, the strength of a ligand affinity is proportional to the number of solvent molecules released from the solvation shell of the binding sites and to the energetic frustration experienced by these molecules, which would prefer going to the bulk than staying in the solvation shell of hydrophobic solutes. This frustration is reduced when the physical properties between solvent molecules in the solvation shell and in the bulk are closer. Thereby, we first measured the sound velocities, U and U_0 , of an ADA solution and of its solvent (either made of an

aqueous buffer with or without 5% DMSO), respectively. Both velocities were measured each time a titration was performed using the same CD solution. For each titration, we calculated the increment of sound velocity $[U] = (U_0 - U)/(U_0[ADA])$, where $[ADA]$ is the ADA molar concentration. The values of $\Delta[U](r) = [U](r) - [U](0)$ are plotted in Figure 1 as a

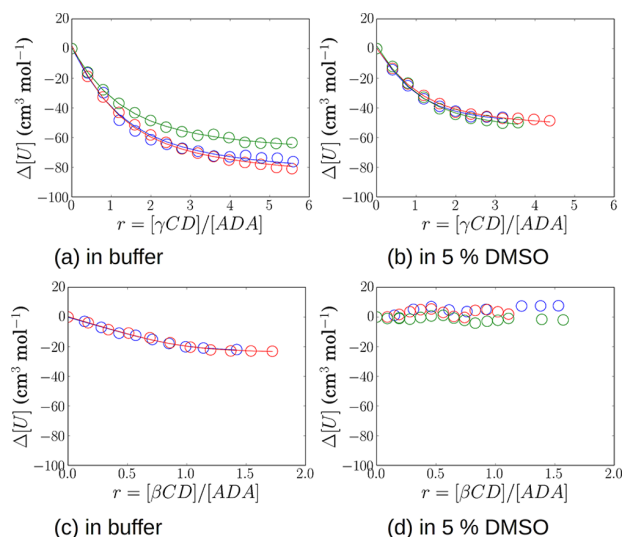


Figure 1. Variation of the sound velocity increment, $[U]$, of a solution of adamantane carboxylic acid upon addition of β (c, d) or γ -cyclodextrin (a, b). The left (a, c) and right columns (b, d) correspond to measurements performed in buffer and in 5% DMSO buffer, respectively. The various colors correspond to different titration measurements.

function of the molar ratio $r = [CD]/[ADA]$, where $[CD]$ is the molar concentration of added CD. The variation of $\Delta[U](r)$ is mainly due to a change in the properties of solvent molecules (water or DMSO) that are released from the binding sites due to the ADA binding to CD. The Newton–Laplace equation, $\beta_s = 1/(\rho U^2)$ relates the sound velocity U to the coefficient of adiabatic compressibility β_s and the density ρ . Since changes in compressibility are much larger than that of density,^{21,22} we can consider that $\Delta[U](r)$ is mainly a reflection of compressibility changes in solvent molecules that no longer hydrate the binding sites. It can be fitted to the following equation:

$$\Delta[U](r) = \alpha(r)[U](\infty) \quad (1)$$

where $\alpha(r)$ is the molar fraction of bound ADA and $[U](\infty)$ is the value at $r = \infty$. Knowing that β - and γ -CD bind only one ADA, we can easily relate $\alpha(r)$ to the binding constant K_b (see eq 3). A fit of the γ -CD data in buffer leads to a binding constant $K_b = (340 \pm 25) \text{ M}^{-1}$, in good agreement with a published value, $(324 \pm 11) \text{ M}^{-1}$, also measured using sound velocity.²² The binding constant slightly increased to $(509 \pm 50) \text{ M}^{-1}$ in the presence of 5% DMSO. For β -cyclodextrin, we derived in buffer a value $K_b = (5700 \pm 3000) \text{ M}^{-1}$, whereas we could not observe a significant variation for $[U](r)$ in the presence of 5% DMSO. The K_b values can be easily converted into a change of Gibbs free energy $\Delta G = -RT \ln(K_b)$ (where R is the gas constant and T is the temperature, that is, 298 K) accompanying the binding event (see Table 1). As K_b varies exponentially, small variations in entropy (ΔS) or enthalpy (ΔH) can lead to huge variations in K_b , whereas $\Delta G = \Delta H -$

Table 1. Values of the Binding Constant of the Association of 1-Adamantane Carboxylic Acid with β - and γ -Cyclodextrin Evaluated by Sound Velocity, NMR, and Simulation in a 50 mM Phosphate Buffer at pH 7.5, without or with 5% DMSO

	solvent	K_b in M^{-1} (ΔG in kJ/mol)		
		from sound velocity	from NMR	from simulation
γ -CD	buffer	340 ± 25 (-14.4 ± 0.2)	H3, 236 ± 10 (-13.5 ± 0.1) H5, 173 ± 21 (-12.8 ± 0.3)	348 ± 141 (-14.4 ± 0.9)
	5% DMSO	509 ± 50 (-15.4 ± 0.2)	H3, 148 ± 7 (-12.4 ± 0.1) H5, 174 ± 7 (-12.8 ± 0.1)	109 ± 59 (-11.4 ± 1.3)
β -CD	buffer	5700 ± 3000 (-21.4 ± 1.3)	H3, 3200 ± 150 (-20.0 ± 0.1) H5, 710 ± 38 (-16.3 ± 0.1)	882 ± 180 (-16.8 ± 0.5)
	5% DMSO		H3, 172 ± 18 (-12.8 ± 0.3) H5, 44 ± 8 (-9.4 ± 0.3)	47 ± 57 (-8.1 ± 3.2)

$T\Delta S$ does not overexpress these energetic variations. Since K_b and ΔG are equally employed and given in the literature, we will provide both values. When considering the binding free energy ΔG , the ADA to γ -CD binding is only (1 ± 0.4) kJ mol $^{-1}$ more stable in 5% DMSO than in buffer (see Table 1). For β -CD, the lack of significant velocity variation in the presence of DMSO can be due, according to eq 1, to a negligible value of K_b , or of $|[U](\infty)|$ or both. The latter scenario is most probable since for γ -CD we observe that the addition of DMSO reduces the difference $[U](0) - [U](\infty)$ (see Figure 1), that is, the difference between compressibilities of solvents in the bulk and in the solvation shell of ADA and CD binding sites. So if the same phenomenon occurred for β -CD, it would have led to a different value, $[U](0) - [U](\infty)$, smaller than the detection threshold of the velocimetry technique (which can be estimated around 8 cm 3 mol $^{-1}$).

Another technique is needed to confirm the above scenario. In binding studies, the technique of choice is isothermal titration calorimetry (ITC). Unfortunately, this technique provided unreproducible results when performing titration measurements on solution containing 5% DMSO. In this respect, Fotiadou et al.²⁷ also could not get reproducible results on cyclodextrin derivatives when using 80% DMSO “due to ground noise coming from a strong DMSO–water exothermic association which is very much dependent on the exact composition of the mixture”. For this reason, the authors performed only measurements in pure DMSO. Thus, we used a more adapted method, that is, nuclear magnetic resonance (NMR) technique.

Nuclear Magnetic Resonance Measurements. We performed NMR measurements in which water and DMSO were deuterated. Stock solutions of cyclodextrins were prepared in deuterated buffers with or without the presence of 5% DMSO- d_6 . ADA stock solution was prepared by solubilizing ADA in a volume of CD stock solution. Then, samples were prepared by mixing a volume of CD stock solution with another volume of ADA stock solution, so that the CD concentration remains constant through all samples, while AD concentration is diluted. For each sample, we monitored the chemical shift of the peak signal ascribed to hydrogen atoms of cyclodextrin (see Figure S1). In good agreement with other publications,^{28,29} the H3 and H5 protons, located inside the CD cavity, are the most affected by the ADA inclusion, while the H6 proton, which is located at the edge of the smaller opening face is weakly shifted. In contrast, the chemical shifts of protons located outside the cavity (i.e., H1, H2, and H4) weakly change upon complexation (data not shown). In this context, we only considered the H3 and H5 protons in our NMR analysis. The variations of the chemical shifts were

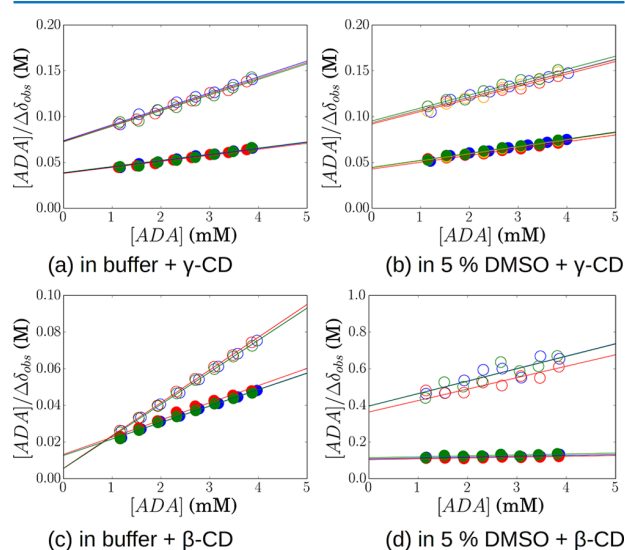


Figure 2. Variations of chemical shift as a function of $[ADA]$. In each panel, the various colored symbols correspond to different titration measurements where the values of $[ADA]/\Delta\delta_{obs}$ were obtained from H3 (○) and H5 (●). The top panels (a, b) were performed with γ -cyclodextrin and the bottom panels (c, d) with β -cyclodextrin, while the left column (a, c) deals with experiments in buffer and the right column (b, d) in the presence of 5% DMSO.

plotted as a function of $[ADA]$ (see Figure 2). In a one-to-one stoichiometry as expected in our systems, these variations must behave linearly according to Scott's equation:^{28,30}

$$\frac{[ADA]}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{[ADA]}{\Delta\delta_{max}} + \frac{1}{K_b\Delta\delta_{max}} \quad (2)$$

where $\Delta\delta_{obs}$ represents the observed chemical shift difference of CD proton H3 or H5 between free CD and CD + ADA complexes and $\Delta\delta_{max}$ is the chemical shift difference at saturation. Since a linear behavior was indeed observed in all our figures, we could extract the apparent binding constant K_b by fitting the NMR data to eq 2. For γ -CD, the data based on H3 protons shows that K_b slightly decreases from (236 ± 10) M $^{-1}$ to (148 ± 7) M $^{-1}$ when 5% DMSO is added, while K_b is almost constant when considering H5 protons (see Table 1). For data derived from H3 protons, this corresponds to a slight increase in free energy of about 1.1 ± 0.3 kJ mol $^{-1}$, from (-13.5 ± 0.1) to (-12.4 ± 0.1) kJ mol $^{-1}$, while this change is

null for H5 protons. These variations are different from what has been measured by sound velocity (a slight decrease in free energy), but we can consider that both NMR and velocity techniques measured only small changes upon the addition of DMSO. Note also that the two techniques do not probe the same observables: for sound velocity the change in properties of solvents released from the solvation shell of binding sites is monitored, whereas for NMR the change in the chemical environment of two cyclodextrin proton types is monitored. Moreover, it is noteworthy that the H5 proton of β -CD is the most sensitive to ADA complexation. The latter protons are located in the interior cavity of CD close to the narrower rim. As there is no chemical shift assigned to H6 protons, this result suggests that ADA inclusion reaches the H5 protons but not the H6 ones. However, the K_b estimation is obviously more precise for H3 protons than for H5 protons, for which broadened and shape-changing NMR signal over the range of low concentration conditions (data not shown) can hamper an accurate estimation of the chemical shift. For β -CD, we succeeded to measure a binding constant in the solution containing 5% DMSO; this value is equal to $(172 \pm 18) \text{ M}^{-1}$ for H3 protons and $(44 \pm 8) \text{ M}^{-1}$ for H5 protons, while in buffer we measured, respectively, $(3200 \pm 150) \text{ M}^{-1}$ for H3 protons and $(710 \pm 38) \text{ M}^{-1}$ for H5 protons. We observe for both proton types a 17 times decrease in K_b values upon the addition of DMSO, while the value for H3 protons is closest to the value derived from sound velocity. Although K_b is reduced by the presence of DMSO, it still exhibits a significant value that should have been detectable by previous velocity measurements, which demonstrates that the value of $[U](0) - [U](\infty)$ has to be very small in the presence of DMSO. The observed variation in K_b corresponds to a significant difference in free energy ΔG of about 7 kJ mol^{-1} , with values increasing from $(-20.0 \pm 0.1) \text{ kJ mol}^{-1}$ in buffer to $(-12.8 \pm 0.3) \text{ kJ mol}^{-1}$ in DMSO based on H3 proton and from $(-16.3 \pm 0.1) \text{ kJ mol}^{-1}$ to $(-9.4 \pm 0.3) \text{ kJ mol}^{-1}$ based on H5 proton.

Molecular Simulations and Free Energy Calculations.

Molecular simulations allow the evaluation of the binding free energy using so-called "alchemical" approaches.³¹ It consists in calculating the free energy of the simulated complex (see Figure S2) via a suitable thermodynamic cycle involving alchemical transformations (i.e., by decoupling nonbonded interactions of the ligand from its environment). Using this method, we obtained the change in free energy associated with the binding of ADA to CD. However, one has to bear in mind that the accuracy of such calculations relies on the force field. It is especially challenging when it comes to carbohydrate molecules such as cyclodextrins. In the literature, some simulation studies assessing the effects of solvents on the deformation of cyclodextrins were published recently.^{32,33} The one from Zhang et al.³² used the GLYCAM06³⁴ (derived from AMBER) while the other from Khuntawee et al.³³ used the GROMOS 53A6 for carbohydrates.³⁵ Both studies revealed that the flexibility of the cyclodextrin depends not only on the solvent used but also on the ligand.

Here we used the GROMOS 53A6_{GLYC} force field³⁶ which is an update of GROMOS 53A6. The systems we simulated consisted of a box containing either a β or γ -cyclodextrin bound to an adamantane carboxylic acid and solubilized either in water or in water with 5% DMSO (together with a sodium ion to keep the complex neutral). Of note, all free energy values ΔG presented here were corrected for finite-size and discrete solvent effects due to the net charge of ADA (i.e., -1) (see SI).

In all cases, the corrections were quite small (about 1 kJ mol^{-1} or lower). When DMSO molecules are present, they solvate the cavities of both β - and γ -CD before their complexation with ADA. For γ -CD, we calculated a change in free energy, ΔG , associated with the binding equal to $(-14.4 \pm 0.9) \text{ kJ mol}^{-1}$ in buffer and $(-11.4 \pm 1.3) \text{ kJ mol}^{-1}$ in 5% DMSO. This gives a difference of 3 kJ mol^{-1} , which is closer to the variation observed for H3 atoms in our NMR experimental data (1.1 kJ mol^{-1}) and confirms the fact that DMSO does not significantly modify the affinity of ADA for γ -CD. In terms of binding constants, it means that $K_b = \exp(-\Delta G/(RT))$ is equal to $(348 \pm 141) \text{ M}^{-1}$ in water and $(109 \pm 59) \text{ M}^{-1}$ in the presence of 5% DMSO. For β -cyclodextrin, ΔG equals $(-16.8 \pm 0.5) \text{ kJ mol}^{-1}$ in water and $(-8.1 \pm 3.2) \text{ kJ mol}^{-1}$ in DMSO. This increase of 8.7 kJ mol^{-1} in free energy upon DMSO addition also agrees very well with NMR measurements. From these free energy values, we conclude that the binding constant is reduced from (882 ± 180) to $(47 \pm 57) \text{ M}^{-1}$ upon the addition of 5% DMSO. We also performed the same calculations without restraining the movement of ADA. Similar free energy values were obtained, that is, $(-17 \pm 2) \text{ kJ mol}^{-1}$ in buffer and $(-7 \pm 3) \text{ kJ mol}^{-1}$ in 5% DMSO for γ -CD, while for β -CD we have $(-14 \pm 3) \text{ kJ mol}^{-1}$ in buffer and $(-9 \pm 1) \text{ kJ mol}^{-1}$ in 5% DMSO.

DISCUSSION

From our experimental and simulation results, we conclude that the presence of 5% DMSO significantly decreases the affinity of ADA for β -CD, while its effect is marginal on ADA affinity for γ -CD. The decrease in ADA affinity for β -CD is consistent with published works performed using other ligands at higher volume concentration of DMSO. For instance, Siegel and Breslow¹⁸ showed that the binding of β -CD with *m*-tert-butylphenyl acetate becomes weaker when increasing DMSO concentration, with K_b values equal to 10^4 , 500, and 67 M^{-1} at 0, 50%, and 99% DMSO, respectively. Similar observations were made by Tachibana et al.³⁷ for the complexation of carbazole with β -CD when the DMSO addition varies from 10% to 60% and by Eftink and Harrison³⁸ for the complexation of *p*-nitrophenol with α -CD with 10% to 50% of DMSO. In some cases, a high concentration of DMSO can prevent a complexation from taking place, like for the binding of puerarin with β -CD, which does not occur at 100% DMSO.²⁰ Finally, Bernad-Bernad et al.¹⁹ showed that the binding constant of albendazole and mebendazole to α , β -, and γ -CD drastically decreases when 25%, 50%, or 75% DMSO is added, but at 100% DMSO, if the binding constant is smaller than that in water it is larger than that in a mixture of water and DMSO. However, the behavior is different for thianedazole: while additions of DMSO continuously increase the binding constant for β -CD, it first increases it for α - and γ -CD at 36% and 50% DMSO and then decreases it for 75% and 100%. Thianedazole has also a much weaker affinity for cyclodextrins in water ($K_b = 24, 38, \text{ and } 100 \text{ M}^{-1}$ for α -, β -, and γ -CD, respectively) than the two other drugs ($K_b = 300\text{--}315, 1200\text{--}1500, \text{ and } 1000\text{--}900 \text{ M}^{-1}$ for α -, β -, and γ -CD, respectively). These results show that the addition of DMSO cannot be systematically ascribed to a decrease in binding constant and depends both on the type of cyclodextrin and on the ligand. Most studies point out the importance of the size ratio between the ligand and the cyclodextrin cavity. In our experiments, it is indeed the only difference between the two AD/CD complexes. ADA's volume fits very well within the β -CD cavity, while the bigger γ -CD

cavity gives room for ADA to move. We expect a smaller number of hydrogen bonds between the frustrated solvent molecules inside the cavity as its size decreases, which strongly modifies the entropy. This would induce a larger difference in solvent properties between the molecules in the bulk and those in the solvation shell for β -CD compared to γ -CD, which is consistent with sound velocity measurements (as given by $[U](\infty)$). The difference contributes to make the binding of ADA to β -CD in water much stronger than that to γ -CD. However, it is still difficult to assess the exact contribution of DMSO. To gain further insight on this question, future work should focus on the decomposition of the free energy into its enthalpic and entropic contributions.

CONCLUSION

The above results suggest that the effect of DMSO is stronger for hydrophobic ligands whose volume better fits the cavity of a hydrophobic binding site. For these complexes, the ligand affinity determined in the presence of DMSO may not reflect its affinity in the absence of DMSO, such as in vivo conditions. Ideally, binding properties should be determined in the absence of any cosolvent, which is likely impossible using experimental techniques for poorly water-soluble ligands. However, our free energy calculations using computer simulations could reproduce accurately the experimental variations of binding free energies. This suggests that such a numerical approach represents a valuable alternative to experimental techniques to determine binding constants without the need of a cosolvent.

METHODS

Materials. β -Cyclodextrin (purity >97%), γ -cyclodextrin (purity >98%), 1-adamantane carboxylic acid (purity >99%), and dimethyl sulfoxide (DMSO) (purity of >99.9%) were purchased from Sigma-Aldrich. The solubilities of β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin in water at 25 °C are 18.5 and 232 g/L, respectively,³⁹ while the solubility of 1-adamantane carboxylic acid in buffer was about 0.75 g/L. We evaluated the latter by sound velocity measurements as the value of sound velocity is very sensitive to both aggregation and solute concentration.⁴⁰ All samples were prepared with solute concentrations below their solubility values. Water was purified using a PURELAB Option-Q unit (ELGA LabWater). D₂O and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) were purchased from Euriso-Top (Saint-Aubin, France).

Sample Preparation. We prepared two kinds of pH 7.5 buffers. The first one is a 50 mM phosphate buffer, prepared by dissolving the appropriate amounts of sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic in a required volume of water (H₂O). Then the pH was adjusted to 7.5 when necessary. The second one followed the same preparation except for the addition of 5% (v/v) DMSO during the buffer preparation. For sound velocity measurements, H₂O was used, whereas for NMR D₂O was used along with deuterated DMSO.

Ultrasound Velocity. Sound velocities of solutions were measured at 25 °C using a previously described differential resonator method,^{41–44} at a frequency of 7.5 MHz with a precision of 0.15 cm/s in buffers. A solution of 1-adamantane carboxylic acid (0.76 mL) filled a first thermostatted cell (with an initial concentration of 0.5–0.7 g/L depending on the sample), while the second cell contained the same volume of solvent (either a 50 mM phosphate buffer at pH 7.5 or the same buffer with the addition of 5% (v/v) of DMSO). In each

cell, two lithium niobate piezotransducers face each other. The analysis of the frequency–amplitude characteristic of the resonator was performed with an Agilent (model E5100A) network/spectrum analyzer. Titration was performed in both cells by adding an identical volume of a solution of cyclodextrin solubilized in the same buffer as for ADA. For each titration, we derived the sound velocity increment $[U] = (U - U_0) - (U_0[ADA])$, where U and U_0 are the sound velocities in the solution and in its solvent, respectively, and $[ADA]$ is the molar concentration of 1-adamantane carboxylic acid. The variation in $[U]$ values is eventually plotted as a function of the molar ratio, $r = [CD]/[ADA]$, of cyclodextrin to 1-adamantane carboxylic acid and can be fitted by the following equation $[U](r) = [U](r = 0) + \alpha(r)[U](r = \infty)$, where $\alpha(r)$ is the fraction of bound 1-adamantane carboxylic acid. Taking $Y = 2K_b[ADA]$, it can be easily demonstrated that $\alpha(r)$ is a solution of the equation:

$$\alpha^2 - \left(r + 1 + \frac{2}{Y}\right)\alpha + r = 0 \quad (3)$$

It should be stressed that the above technique probes all the sample volume (i.e., all solvent molecules also contribute to sound velocity). Any discrepancy between the concentration of titrant or of solvent between the titrated solution (i.e., solute solubilized in the solvent) and the titrated solvent would lead to a wrong estimation of sound velocity increment. Thus, extra care should be exerted when using DMSO due to absorption/desorption phenomena on cell and transducer surfaces. In particular, cells should always be washed with a 5% DMSO buffer and be soaked for hours with it before starting measurements.

NMR. All solutions were freshly prepared either in D₂O or in D₂O with 5% DMSO-*d*₆ and buffered with 10 mM phosphate buffer at a pH of 7.5. Two stocks solutions were prepared, the first one with 0.1 mM of either β - or γ -CD and the second one containing 0.1 mM of either β - or γ -CD supplemented with 0.1 mM of adamantane. A volume v_1 of the first stock solution, that is, without ADA, was added to and mixed with a volume v_2 of the second stock solution, that is, with ADA, so that the total volume was always 500 μ L. By varying v_1 and v_2 , we prepared solutions with a resulting $[CD]/[ADA]$ ratio ranging from 0.4 to 4, while the concentration of β or γ -CD was kept constant. Each experiment was repeated three times. 1D ¹H NMR spectra were recorded on an Avance II Bruker AC-400 MHz Bruker NMR spectrometer. Each spectrum was acquired with 128 scans, and the temperature was maintained at 25 \pm 0.1 °C. Spectral acquisition and processing and chemical shift determination were performed using TopSpin 2.1 software. Chemical shifts are given in ppm (δ) and calibrated to the residual solvent HDO peak at 4.79 ppm. The complexation-induced chemical shift difference is given as the difference between the chemical shift of the free cyclodextrin molecule and the chemical shift of the bound CD molecule: $\Delta\delta = \delta_{\text{free}} - \delta_{\text{complex}}$.

Data Fitting. For velocity and NMR experiments, the data were fitted using the least-squares method accessible from the scipy module of python (www.scipy.org). For several series of titration corresponding to the same type of experiment (i.e., same solvent, same cyclodextrin, and NMR based on same proton), all the points were fitted once using an identical unknown binding constant, K_b , while other unknown parameters, $[U](\infty)$ for sound velocity and $\Delta\delta_{\text{max}}$ for NMR, were different depending on the series. Indeed, a global fitting allows us to achieve better accuracy on the K_b value.⁴⁵ The

error associated with each parameter was obtained from the autocorrelation matrix.

Free Energy Calculations. All molecular dynamics (MD) simulations were performed with GROMACS 5.0.7.⁴⁶ The GROMOS 53A6_{GLYC} force field³⁶ was used for β - and γ -CD, the GROMOS 54A7⁴⁷ force field for ADA, along with the SPC model for water.⁴⁸ For all MD simulations involved in free energy calculations, we used the Langevin integrator with a 2 fs time step, a friction coefficient of 0.1 ps⁻¹ and a temperature of 298 K. All bonds were constrained with the P-LINCS algorithm,⁴⁹ and the full rigidity of the water molecules was enforced by the SETTLE algorithm.⁵⁰ For NPT simulations, pressure was maintained at 1 bar using the Parrinello–Rahman barostat⁵¹ with a relaxation time of 4 ps and an isothermal compressibility of 4.5×10^{-5} bar⁻¹. Lennard-Jones interactions were computed using a twin-range scheme set to 8 and 14 Å, and the neighbor list was updated every 10 steps. Electrostatic interactions were computed using the particle-mesh Ewald (PME) method^{52,53} with a real-space cutoff distance of 14 Å, a grid spacing of 1.2 Å, and an interpolation scheme of order 4. The structures of β -CD, γ -CD, and ADA were obtained from CSD Cambridge Structural Database (CDDC 648855),⁵⁴ Protein Data Bank (PDB 1D3C),⁵⁵ and PubChem (CID 13235) respectively. To construct the complex CD–ADA, we first performed some self-assembly MD simulations in the NPT ensemble using the leapfrog integrator. The ligand spontaneously bound to the CD within a few tens of nanoseconds. For all simulations involving the complex or the ADA ligand in water, we added one sodium ion to neutralize the ADA carboxylic group. Neutrality was maintained to fit our experimental conditions performed at pH 7.5. All the systems were obtained from self-assembly simulations and then used for free energy calculations. The composition of each system is described in Table 2. Four and three replicas were performed

Table 2. Composition of the Systems Used for Free Energy Calculations

systems	CD	ADA	Na ⁺	SPC	DMSO
β -CD	1	1	1	2120	0
β -CD	1	1	1	2120	29
γ -CD	1	1	1	3105	0
γ -CD	1	1	1	3105	42

for a system containing β - and γ -CD, respectively. To assess the affinity of ADA for both types of CD we used a free energy perturbation method. ADA was decoupled from CD or solvent via a linear alchemical pathway. The distance between the centers of mass of CD and ADA was restrained⁵⁶ by a harmonic potential with a force constant of 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻². Ten windows were used for distance restraints, 5 for electrostatic decoupling, and 15 for van der Waals interaction decoupling. Each window was simulated for 50 ns. The last 40 ns were used for analysis. Results were analyzed with the python package pymbar⁵⁷ which implements the multiple Bennett acceptance ratio.⁵⁸ The evaluation of the binding free energy of a charged species such as carboxylic ADA (net charge of -1) using explicit-solvent simulations and lattice-sum methods induces some artifacts that need to be corrected. We used the analytical scheme suggested by Rocklin et al.⁵⁹ for correcting the free energy evaluated from our simulations:

$$\Delta G_{\text{MD,NBC}} = \Delta G_{\text{MD,PBC}}(L) + \Delta \Delta G_{\text{ANA}}(L) + \Delta \Delta G_{\text{DSC}}(L) \quad (4)$$

where $\Delta G_{\text{MD,PBC}}(L)$ is the raw value calculated from our simulations using periodic boundary conditions, $\Delta \Delta G_{\text{ANA}}(L)$ is a correction term for finite-size effects, $\Delta \Delta G_{\text{DSC}}(L)$ is a correction term for discrete solvent effects, and $\Delta G_{\text{MD,NBC}}$ is the binding free energy corrected for all these effects. Reported in SI is the description of how $\Delta \Delta G_{\text{ANA}}(L)$ and $\Delta \Delta G_{\text{DSC}}(L)$ were calculated. All reported values in this manuscript and in Table 1 are the corrected free energies $\Delta G_{\text{MD,NBC}}$.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.7b01212.

Detailed description of the correction made to the free energy of binding, figure detailing the H atom locations in the cyclodextrins, and figure exhibiting the complexes ADA– β -CD and ADA– γ -CD (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: nicolas.taulier@upmc.fr.

ORCID

Patrick F. J. Fuchs: 0000-0001-7117-994X

Nicolas Taulier: 0000-0003-1017-1068

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed through access to the HPC resources of the institute for computing and data sciences (ISCD) at Université Pierre et Marie Curie and support from GENCI-CINES (Grant No. 2016-A0010706720).

■ REFERENCES

- (1) Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 821–834.
- (2) Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Donadi, R. S.; Bologa, C. G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T. I.; Overington, J. P. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 19–34.
- (3) Gao, M.; Skolnick, J. A Comprehensive Survey of Small-Molecule Binding Pockets in Proteins. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003302.
- (4) Zhou, H.; Gao, M.; Skolnick, J. Comprehensive prediction of drug-protein interactions and side effects for the human proteome. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11090.
- (5) Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1607–1621.
- (6) Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; Porter, C. J. H. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 315–499.
- (7) Pereira, D. A.; Williams, J. REVIEW: HISTORICAL PERSPECTIVES IN PHARMACOLOGY. Origin and evolution of high throughput screening. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 53–61.
- (8) Arakawa, T.; Kita, Y.; Timasheff, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys. Chem.* **2007**, *131*, 62–70.
- (9) Voets, I. K.; Cruz, W. A.; Moitzi, C.; Lindner, P.; Arêas, E. P. G.; Schurtenberger, P. DMSO-Induced Denaturation of Hen Egg White Lysozyme. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11875–11883.

- (10) Batista, A. N. L.; Batista, J. M., Jr; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Blanch, E. W. Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 20147–20152.
- (11) Da Violante, G. D.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J.-C.; Arnaud, P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1600–1603.
- (12) Earp, H. S.; Lin, Q.; Blaisdell, J. Dimethyl sulfoxide decreases specific EGF binding. *J. Cell. Biochem.* **1984**, *26*, 221–230.
- (13) Tjernberg, A.; Markova, N.; Griffiths, W. J.; Hallén, D. DMSO-related effects in protein characterization. *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 131–137.
- (14) Cubrilovic, D.; Zenobi, R. Influence of dimethylsulfoxide on protein-ligand binding affinities. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2724–2730.
- (15) Lee, J.; Vogt, C. E.; McBairty, M.; Al-Hashimi, H. M. Influence of Dimethylsulfoxide on RNA Structure and Ligand Binding. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9692–9698.
- (16) Arun, R.; Ashok, C. K.; Sranthi, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567–598.
- (17) Gidwani, B.; Vyas, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 198268.
- (18) Siegel, B.; Breslow, R. Lyophobic binding of substrates by cyclodextrins in nonaqueous solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6869–6870.
- (19) Bernad-Bernad, M.-J.; Gracia-Mora, J.; Diaz, D. D.; Castillo-Blum, S. Thermodynamic Study of Cyclodextrins Complexation with Benzimidazolic Anti-helmintics in Different Reaction Media. *Curr. Drug Discovery Technol.* **2008**, *5*, 146–153.
- (20) Zhao, R.; Tan, T.; Sandström, C. NMR studies on puerarin and its interaction with beta-cyclodextrin. *J. Biol. Phys.* **2011**, *37*, 387–400.
- (21) Taulier, N.; Chalikian, T. V. Hydrophobic hydration in cyclodextrin complexation. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 12222–12224.
- (22) Taulier, N.; Chalikian, T. V. gamma-cyclodextrin forms a highly compressible complex with 1-adamantanecarboxylic acid. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9546–9549.
- (23) Harries, D.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A. Solutes Probe Hydration in Specific Association of Cyclodextrin and Adamantane. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2184–2190.
- (24) Cromwell, W. C.; Byström, K.; Eftink, M. R. Cyclodextrin-adamantanecarboxylate inclusion complexes: studies of the variation in cavity size. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 326–332.
- (25) Lichtenthaler, F. W.; Immel, S. Towards Understanding Formation and Stability of Cyclodextrin Inclusion Complexes: Computation and Visualization of their Molecular Lipophilicity Patterns[1]. *Starch* **1996**, *48*, 145–154.
- (26) Chalikian, T. V. Volumetric properties of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 207–235.
- (27) Fotiadou, K.; Thanassoulas, A.; Nounesis, G.; Yannakopoulou, K. Cooperative heterodimer formation between per-guadinylated and carboxylated or phosphorylated cyclodextrins in DMSO and DMSO-water studied by NMR spectroscopy and microcalorimetry. *Supramol. Chem.* **2011**, *23*, 493–500.
- (28) Aksamija, A.; Polidori, A.; Plasson, R.; Dangles, O.; Tomao, V. The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: a thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chem.* **2016**, *208*, 258–263.
- (29) Zhang, J.-Q.; Jiang, K.-M.; Xie, X.-G.; Jin, Y.; Lin, J. Water-soluble inclusion complexes of trans-polydatin by cyclodextrin complexation: Preparation, characterization and bioactivity evaluation. *J. Mol. Liq.* **2016**, *219*, 592–598.
- (30) Fielding, L. Determination of association constants (K_a) from solution NMR data. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151–6170.
- (31) Mobley, D.; Klimovich, P. V. Perspective: alchemical free energy calculations for drug discovery. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 230901.
- (32) Zhang, H.; Ge, C.; van der Spoel, D.; Feng, W.; Tan, T. Insight into the Structural Deformations of Beta-Cyclodextrin Caused by Alcohol Cosolvents and Guest Molecules. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 3880–3889.
- (33) Khuntawee, W.; Karttunen, M.; Wong-ekkabut, J. A molecular dynamics study of conformations of beta-cyclodextrin and its eight derivatives in four different solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 24219–24229.
- (34) Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 622–655.
- (35) Lins, R. D.; Hünenberger, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1400–1412.
- (36) Pol-Fachin, L.; Rusu, V. H.; Verli, H.; Lins, R. D. GROMOS 53A6GLYC, an Improved GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 4681–4690.
- (37) Tachibana, M.; Furusawa, M.; Kiba, N. Application of solvent extraction and synchronous spectrofluorimetry to the determination of the formation constant for a 1:1 complex of carbazole with β -cyclodextrin in water-dimethyl sulfoxide medium. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, *22*, 313–329.
- (38) Eftink, M.; Harrison, J. C. Calorimetric studies of p-nitrophenol binding to α - and β -cyclodextrin. *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 388–398.
- (39) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753.
- (40) Taboada, P.; Gutiérrez-Pichel, M.; Mosquera, V. Effects of self-aggregation on the hydration of an amphiphilic antidepressant drug in different aqueous media. *Chem. Phys.* **2004**, *298*, 65–74.
- (41) Eggers, F.; Funck, T. Ultrasonic measurements with milliliter liquid samples in 0.5–100 MHz Range. *Rev. Sci. Instrum.* **1973**, *44*, 969–977.
- (42) Eggers, F. Ultrasonic velocity and attenuation measurements in liquids with resonators, extending the MHz frequency-Range. *Acustica* **1992**, *76*, 231–240.
- (43) Eggers, F.; Kaatze, U. Broad-band ultrasonic measurement techniques for liquids. *Meas. Sci. Technol.* **1996**, *7*, 1–19.
- (44) Sarvazyan, A. P. Development of methods of precise ultrasonic measurements in small volumes of liquids. *Ultrasonics* **1982**, *20*, 151–154.
- (45) Meisl, G.; Kirkegaard, J. B.; Arosio, P.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 252–272.
- (46) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25.
- (47) Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 843.
- (48) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In *Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981*; Pullman, B., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1981; pp 331–342.
- (49) Hess, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 116–122.
- (50) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 952–962.
- (51) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190.
- (52) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.

(53) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577–8593.

(54) Chatziefthimiou, S. D.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M. β -Cyclodextrin trimers enclosing an unusual organization of guest: The inclusion complex β -cyclodextrin/4-pyridinealdazine. *CrystEngComm* **2007**, *9*, 976–979.

(55) Uitdehaag, J. C. M.; Kalk, K. H.; van der Veen, B. A.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B. W. The Cyclization Mechanism of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) as Revealed by a γ -Cyclodextrin-CGTase Complex at 1.8-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34868–34876.

(56) Wang, J.; Deng, Y.; Roux, B. Absolute Binding Free Energy Calculations Using Molecular Dynamics Simulations with Restraining Potentials. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2798–2814.

(57) Shirts, M. R.; Chodera, J. D. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 124105.

(58) Bennett, C. H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22*, 245–268.

(59) Rocklin, G. J.; Mobley, D. L.; Dill, K. A.; Hünenberger, P. H. Calculating the binding free energies of charged species based on explicit-solvent simulations employing lattice-sum methods: An accurate correction scheme for electrostatic finite-size effects. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 184103.

3.3 Décomposition de l'énergie libre de liaison

L'énergie libre de liaison ΔG peut être décomposée en enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) selon la relation suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.1)$$

Avec T la température absolue.

L'enthalpie d'un système est directement liée à l'énergie interne (U), la pression (p) et le volume (V) de celui-ci :

$$H = U + pV \quad (3.2)$$

Dans le cadre des simulations de DM, U est définie par l'énergie potentielle du système, soit les interactions entre les particules (Eq. 2.1). Le terme pV relié au changement de volume du système est en général petit par rapport à U .

Lorsque pour une réaction de liaison $\Delta H > 0$, la réaction est dite endothermique et on considère qu'elle est essentiellement dominée par les effets hydrophobes. Si $\Delta H < 0$, la réaction est exothermique et ce sont essentiellement les liaisons de type van der Waals, et dans une moindre mesure les interactions électrostatiques, qui agissent sur la liaison (CHANDLER 2005).

La variation d'entropie ΔS est plus complexe à définir, elle est associée à la notion de désordre d'un système. La formule de Boltzmann de l'entropie, nous informe sur son origine :

$$S = k_B \ln W \quad (3.3)$$

Avec S l'entropie d'un système, k_B la constante de Boltzmann et W le nombre de micro-états du système. Les micro-états correspondent aux différentes répartitions possibles des molécules du système. On simplifie en considérant que l'entropie est liée à la liberté de mouvement des molécules. Plus les molécules sont libres de leurs mouvements plus l'entropie est élevée, une restriction des mouvements comme par exemple lors de liaison d'un ligand, entraîne une diminution de l'entropie. Cependant, la formule 3.3 ne s'applique qu'à l'ensemble microcanonique. Nos simulations ont été réalisées dans l'ensemble canonique (NVT) pour lequel la formule de l'entropie est celle-ci :

$$S(NVT) = k_B \sum_j p_j \ln p_j \quad (3.4)$$

Avec j l'ensemble des micro-états possibles du système et p_j la probabilité du micro-état j .

Pour les cyclodextrines, il a déjà été démontré par CROMWELL et al. 1985 que l’inclusion de l’ADA dans la β -CD est exothermique alors que dans la γ -CD la réaction est endothermique. Nous avons voulu savoir si nos simulations reproduisaient ce résultat. Pour cela nous avons réalisé des simulations de fixation de l’ADA dans les CD (Fig. 3.1).

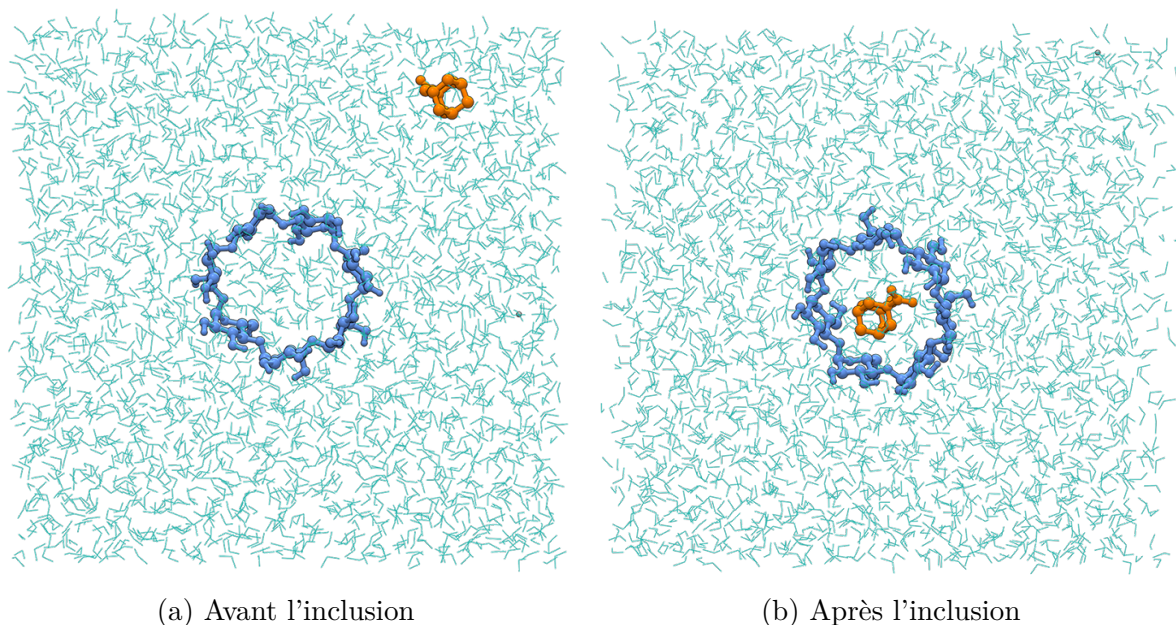


FIGURE 3.1 – Boîte de simulation en début (a) et en fin (b) de trajectoire d’une simulation de l’évènement d’inclusion l’ADA dans la β -CD.

Pour faire une simulation de fixation, nous avons placé dans une même boîte de simulation le ligand et la CD sous forme libre et nous avons simulé une trajectoire de 50 ns. Au cours de la trajectoire, nous observons l’inclusion de l’ADA dans la CD. Nous avons calculé avec l’outil *gmx energy* de GROMACS l’enthalpie de la simulation avant l’inclusion et après l’inclusion de l’ADA et nous avons calculé ΔH selon la relation suivante :

$$\Delta H = H_{\text{après liaison}} - H_{\text{avant liaison}} \quad (3.5)$$

Pour déterminer $T\Delta S$ nous avons utilisé la relation 3.1 avec ΔH calculé selon l’équation 3.5 et ΔG calculé par la méthode de perturbation de l’énergie libre. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.1.

Malgré des écart-types importants dus au manque de répétitions et à la méthode de calcul employée, nous retrouvons les mêmes tendances que dans CROMWELL et al. 1985 pour les réactions dans l’eau pure, c’est à dire pour la γ -CD une réaction dominée par les effets hydrophobes et pour la β -CD une réaction dominée par l’enthalpie. Cependant, dans le DMSO, nous trouvons que la formation du complexe d’inclusion entre l’ADA et la γ -CD devient exothermique comme pour la β -CD. Ce qui pourrait traduire un effet hydrophobe moins fort, la complexation serait alors guidée par d’autres interactions telles que les interactions de van der Waals et électrostatiques. Cependant, il est à noter

	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)
β -CD H ₂ O	-16,8 ± 0,5	-14 ± 4	-3 ± 5
γ -CD H ₂ O	-14,4 ± 0,9	5 ± 5	-19 ± 6
β -CD DMSO	-8,1 ± 3,2	-14 ± 3	6 ± 6
γ -CD DMSO	-11,4 ± 1,3	-6 ± 3	-6 ± 4

TABLE 3.1 – Décomposition de l'énergie libre de liaison ΔG en enthalpie ΔH et entropie ΔS .

que les écart-types de nos résultats de décomposition sont très élevés. Pour observer la convergence de l'enthalpie d'un système en DM, il est nécessaire de simuler plusieurs centaines de nanosecondes. Or, nous observons l'évènement de liaison en moins de 20 ns. Pour améliorer l'échantillonnage, nous avons réalisé 20 trajectoires de fixation pour chaque système mais cela n'a pas suffi à diminuer les variations. De plus, nous n'avons pas directement évalué l'entropie, nous l'avons déduite des valeurs d'énergie libre et d'enthalpie calculées précédemment. Il serait intéressant de déterminer l'entropie, en réalisant des simulations à différentes températures.

3.4 Discussion

Nous avons mis en évidence un effet du DMSO spécifique du récepteur. En effet, le DMSO diminue l'affinité de l'ADA seulement pour la β -CD. La décomposition de ΔG en ΔH et $T\Delta S$ montre une fixation de l'ADA dans la γ -CD dominée par les effets hydrophobes. En effet, une réaction essentiellement liée aux effets hydrophobes présente une faible variation d'enthalpie et une variation d'entropie forte, inversement une réaction mettant en jeu de nombreuses liaisons comme les liaisons de van der Waals et les interactions électrostatiques, présente une variation d'enthalpie élevée (CHANDLER 2005). La β -CD étant plus hydrophobe que la γ -CD, on se serait attendu à ce que l'énergie libre de liaison pour la β -CD ait une composante hydrophobe plus importante. Une étude précédente sur l'affinité de l'ADA pour la β -CD en présence et en absence de méthanol a montré des résultats similaires (HARRISON et EFTINK 1982). Ils ont mesuré ΔG dans différentes concentration de méthanol (de 0% à 80%) et ils ont mis en évidence que l'ajout de méthanol dans le milieu de réaction induit une baisse de l'affinité de l'ADA, les auteurs en déduisent que l'interaction entre l'ADA et la β -CD a une forte contribution hydrophobe. Cependant ils trouvent aussi une forte variation de l'enthalpie. Ils classent l'interaction ADA/ β -CD dans les interactions hydrophobes « non-classiques ». Dans d'autres travaux (EFTINK et al. 1989) où les auteurs comparent l'inclusion de l'ADA dans la β -CD et la α -CD (un glucose en moins que la β -CD), les auteurs mettent en évidence que pour la β -CD la composante hydrophobe est présente

mais qu'elle est masquée par les fortes interactions entre l'ADA et la β -CD. Ils expliquent cela par la taille de la cavité. La α -CD étant plus petite que la β -CD, l'ADA ne peut pas entrer complètement dans la cavité et donc il fait moins d'interactions avec la CD, seul l'effet hydrophobe est présent. À l'inverse dans la β -CD le ligand rentre parfaitement dans la cavité et il réalise de nombreuses interactions avec la CD, ce qui résulte en une énergie libre dominée par l'enthalpie. Pour la γ -CD nous pouvons en venir aux mêmes conclusions. La cavité de la γ -CD est plus large que celle de la β -CD, donc nous supposons que lorsque l'ADA est dans la cavité de la γ -CD, il a trop d'espace et il réalise moins d'interactions avec la CD. Alors l'effet hydrophobe domine l'énergie libre d'interaction. Les résultats que nous avons obtenus, nous ont permis de mettre en évidence un effet du DMSO à faible concentration. Mais nous n'avons pas encore clarifié le mécanisme d'action du DMSO ni pourquoi son effet est différent suivant le récepteur étudié. Dans le chapitre suivant nous étudions les caractéristiques des molécules de solvant dans les cavités des CD. En effet, les solvants jouent un rôle important dans l'entropie et l'enthalpie d'une réaction. ΔH et ΔS peuvent être décomposés selon les interactions des solutés et les interactions des solvants. On a alors :

$$\Delta H = \Delta H_{ADA-CD} + \Delta H_{ADA-Solvant} + \Delta H_{CD-Solvant} + \Delta H_{Solvant-Solvant} \quad (3.6)$$

Avec ΔH_{ADA-CD} l'enthalpie pour les interactions entre le ligand et la CD, $\Delta H_{ADA-Solvant}$ et $\Delta H_{CD-Solvant}$ l'enthalpie pour les interactions entre les solvants, et le ligand et la CD, $\Delta H_{Solvant-Solvant}$, l'enthalpie pour les interactions entre les molécules de solvant, ce terme est supposé très faible car peu de molécules sont impliquées dans l'évènement de liaison par rapport aux nombres de molécules non impliquées.

Nous pouvons décomposer l'entropie comme suit :

$$-T\Delta S = -T(\Delta S_{conformation} + \Delta S_{rotation+translation} + n\Delta S_{désolvation}) \quad (3.7)$$

Avec $\Delta S_{conformation}$ l'entropie liée au changement de conformation de la CD lors de la liaison, $\Delta S_{rotation+translation}$ l'entropie liée aux mouvements de rotation et de translation des molécules d'intérêt et $\Delta S_{désolvation}$ l'entropie liée à la libération des n molécules d'eau qui étaient liées aux molécules d'intérêt.

Dans notre cas, on considère que la conformation des CD ne change pas au cours de l'inclusion de l'ADA nous avons donc $\Delta S_{conformation} = 0$.

En étudiant les différences de comportement des molécules d'eau et de DMSO présentes dans la cavité de la β -CD et de la γ -CD, nous espérons pouvoir expliquer l'effet du DMSO différent selon la CD mais aussi la différence de décomposition thermodynamique entre les deux CD.

Propriétés des molécules de solvant

Dans le chapitre précédent nous avons montré que le DMSO diminue l'affinité de l'ADA pour la β -CD mais n'a aucun effet sur l'affinité de l'ADA pour la γ -CD. En décomposant l'énergie libre de réaction en enthalpie et entropie, nous avons vu que dans l'eau pure pour la β -CD l'inclusion est principalement dirigée par les interactions de van der Waals alors que pour la γ -CD la réaction a une forte composante hydrophobe. Cependant, en présence de DMSO, l'inclusion de l'ADA semble un peu plus liée aux interactions de van der Waals et moins liée aux interactions hydrophobes.

Dans l'objectif de mieux comprendre l'effet des solvants, nous avons réalisé des études des propriétés volumiques et dynamiques des molécules de solvants qui se trouvent à l'intérieur des cavités hydrophobes des CD. En effet, des études ont déjà mis en évidence le rôle essentiel des molécules de solvants dans les mécanismes de liaisons et de stabilisations des structures (BALL 2008; van der VEGT et NAYAR 2017). Les molécules de solvants impliquées dans ces interactions ont des caractéristiques dynamiques différentes des molécules libres du *bulk*. Nous avons analysé plusieurs propriétés des molécules d'eau et de DMSO dans la β et la γ -CD en présence et en absence du ligand dans le but de mettre en évidence une différence de comportement entre les deux CD qui pourrait expliquer la différence d'effet du DMSO sur l'énergie de liaison. Pour cela, nous avons réalisé des DM des CD avec et sans ADA, dans un milieu d'eau pure et un milieu à 5% de DMSO.

4.1 Propriétés des molécules d'eau dans la β et la γ -cyclodextrine en eau pure

Dans un premier temps, nous présentons les résultats obtenus en milieu d'eau pure pour les deux CD libres ou en complexe avec le ligand.

4.1.1 Distribution radiale

La répartition des molécules d'eau autour des solutés est différente de celle des molécules du *bulk*. En général, autour des solutés les molécules d'eau sont réparties en couches appelées couches d'hydratation. Souvent dans ces couches d'hydratation les molécules d'eau sont plus denses que dans le *bulk* mais ce n'est pas systématique. Les molécules de ces couches

ont des propriétés volumiques et dynamiques différentes de celles du *bulk*. Plus la couche d'hydratation est proche du soluté et plus les propriétés des molécules d'eau sont affectées. La proportion des molécules réparties dans ces couches peut être détectée par un calcul de la distribution radiale (RDF) des molécules d'eau autour des CD et du complexe ADA/CD.

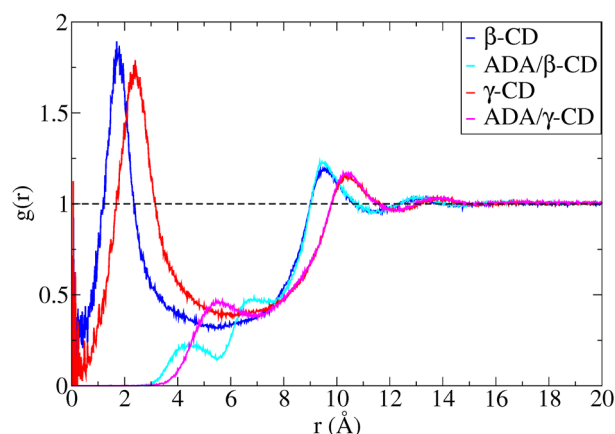


FIGURE 4.1 – Distribution radiale des molécules d'eau autour des cyclodextrines β et γ en absence (courbes bleue et rouge) et en présence du ligand (courbes turquoise et rose) dans un milieu d'eau pure. Lorsque la distribution $g(r)$ est supérieure à 1, la densité en molécule d'eau est plus importante que dans le *bulk*, lorsque $g(r)$ est inférieure à 1 la densité est plus faible que dans le *bulk*.

Cyclodextrines libres

Habituellement, les molécules de solvant ne sont détectées qu'à partir d'une certaine distance (r) qui correspond à la distance entre le centre de masse de la molécule étudiée et le centre de masse de la molécule de solvant. Par exemple, pour la distribution radiale de l'eau dans l'eau pure, nous observons un signal seulement à partir de 2,5 Å (Fig. 2.19). Cette valeur correspond environ à la distance entre deux molécules d'eau. Cependant, pour les deux CD, nous observons un pic à une distance de 0 Å (Fig. 4.1). Ceci s'explique par la méthode utilisée pour calculer la distribution de l'eau. En effet, nous calculons la distribution radiale entre le COM de la CD et le COM de l'oxygène de l'eau. Or le COM de la CD se situe au niveau de la cavité, si des molécules d'eau sont dans la cavité nous obtenons un pic à une distance r de 0 Å.

Nous observons un grand pic à 1,9 Å pour la β -CD et 2,2 Å pour la γ -CD. Ce pic correspond aux molécules d'eau présentes dans la cavité des CD (ce qui correspond aux molécules vertes dans la Fig. 4.2). Ensuite, nous observons une baisse de $g(r)$, ceci est dû à la présence des CD, mais la distribution n'est pas à 0 car à cette distance du COM des CD (6 Å pour la β -CD et 7 Å pour la γ -CD) nous détectons les molécules d'eau en périphérie de la cavité (les molécules d'eau oranges dans la Fig. 4.2). Enfin, le pic vers 9 Å pour la β -CD et 10 Å pour la γ -CD correspond à la couche d'hydratation en périphérie de la CD (les molécules d'eau rouges dans la Fig. 4.2). Après ce pic, nous observons un

dernier petit pic qui correspond à une seconde couche d'hydratation. Ensuite, la densité des molécules d'eau est équivalente à celle du *bulk*.

La répartition des molécules d'eau autour de la β -CD est différente de celle autour de la γ -CD. Nous observons un décalage des pics de la γ -CD vers les distances plus élevées. Cela est dû à la structure plus large de la γ -CD par rapport à la β -CD. De plus, le premier pic est plus haut pour la β -CD, ce qui indique une densité plus importante de la cavité. Cependant le pic de la γ -CD est plus large, ce qui est en accord avec un plus grand nombre de molécule d'eau dans la γ -CD que dans la β -CD.

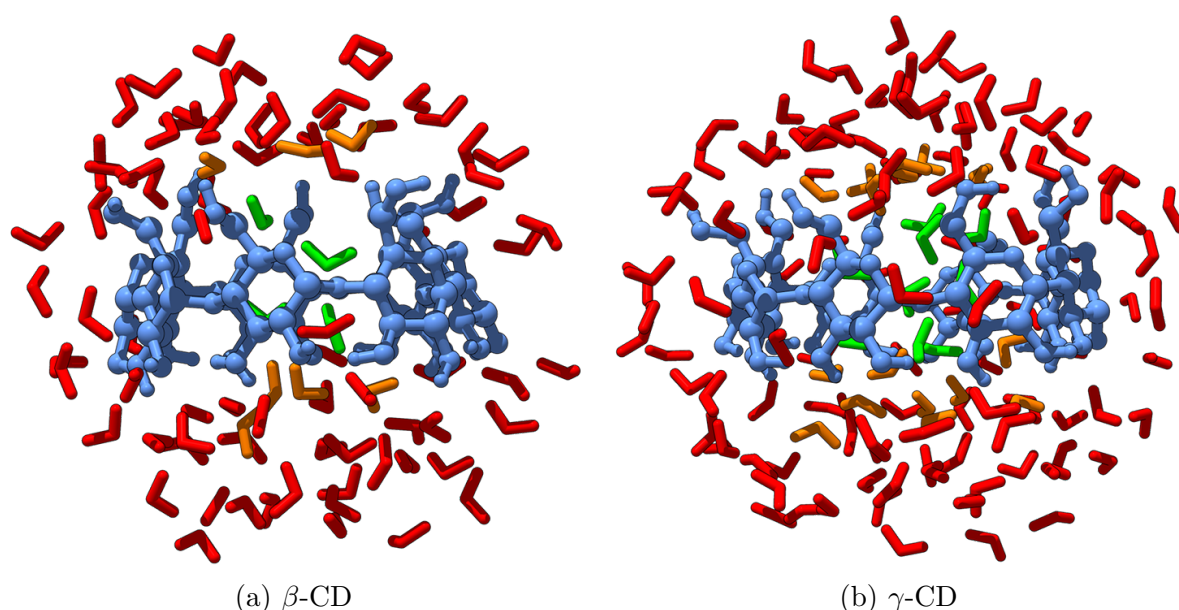


FIGURE 4.2 – Molécules d'eau à proximité de la β et γ -CD. En bleu les CD, en vert les molécules d'eau à moins de 3 Å du centre de masse de la β -CD et 4 Å pour la γ -CD, en orange celles à moins de 6 Å pour la β -CD et 7 Å pour la γ -CD et en rouge celles à moins de 10 Å pour la β -CD et 11 Å pour la γ -CD.

Complexes ligand/cyclodextrine

Nous avons ensuite regardé la répartition des molécules d'eau autour de l'ADA et des CD sous forme de complexe d'inclusion (Fig. 4.1, courbes turquoise et rose). Pour les deux CD, nous ne voyons plus le pic correspondant aux molécules d'eau dans la cavité car celles-ci ont été expulsées par le ligand. Par contre, nous détectons des pics dans la région correspondant à la périphérie des cavités. Pour la β -CD, nous observons deux pics (vers 4,5 Å et 6,5 Å), ce qui correspond respectivement à la périphérie côté large et côté resserré de la CD (Fig. 2.8). Le côté large de la CD est plus proche du centre de masse que le côté resserré ce qui explique la présence de deux pics différents pour la périphérie de la cavité. La densité côté resserré est plus importante, c'est aussi à cet endroit que ce trouve la partie carboxylique du ligand. Cette partie, polaire et chargée, peut faire de nombreuses liaisons hydrogène avec l'eau, ce qui explique la densité plus grande comparée

au côté avec la partie adamantane hydrophobe du ligand.

Pour la γ -CD nous n’observons qu’un pic vers 5,5 Å, la périphérie côté large est aussi proche du centre de masse que la partie côté resserré. Les pics à partir de 8 Å, sont les mêmes que sans le ligand. Les couches d’hydratation externes ne sont pas changées par la présence du ligand dans la cavité.

4.1.2 Hydratation

La déshydratation du site de fixation est un mécanisme important de la liaison d’un ligand dans une cavité. Cet effet est d’autant plus important que la cavité est hydrophobe et très hydratée (HARRIES et al. 2005; YOUNG et al. 2007; ZHANG et al. 2013). En effet, dans une cavité hydrophobe les molécules sont dans un environnement défavorable, les interactions telles que les liaisons hydrogène avec la cavité hydrophobe ne sont pas possibles. Lors de la liaison du ligand hydrophobe, les molécules d’eau sont expulsées dans un milieu plus polaire et donc plus favorable aux liaisons. Pour quantifier la déshydratation des cavités, nous avons écrit un script qui permet de compter le nombre de molécules de solvant présentes dans la cavité en absence et en présence du ligand (Fig. 4.3).

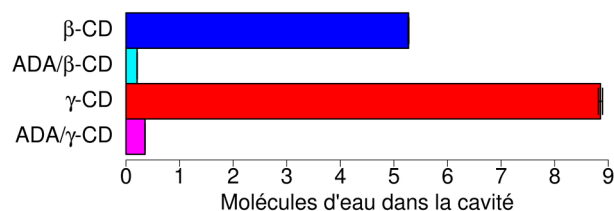


FIGURE 4.3 – Nombre de molécules d’eau présentes dans le site de fixation de la β -CD en présence (turquoise) et absence du ligand (bleu) et dans la γ -CD en présence (rose) et en absence de l’ADA (rouge), dans un milieu d’eau pure. Les barres d’erreurs sont peu visibles car trop petites.

Nous observons en moyenne 5 molécules d’eau dans la cavité de la β -CD et 9 molécules d’eau dans la γ -CD.

Pour les deux CD, la cavité est déshydratée lors de l’inclusion, mais la γ -CD étant plus hydratée que la β -CD, l’inclusion de l’ADA implique la libération d’un plus grand nombre de molécules d’eau d’un milieu hydrophobe défavorable vers un milieu polaire favorable. L’augmentation de la liberté de mouvement est liée à une augmentation de l’entropie, ceci peut expliquer la plus grande implication de l’entropie dans l’énergie libre de réaction de la γ -CD par rapport à la β -CD.

Quelques molécules d’eau en périphérie interne de la cavité sont détectées (Fig. 4.4). Ces molécules sont capables de faire des liaisons hydrogène avec la CD et l’ADA en même temps. Ces ponts de liaison hydrogène peuvent améliorer la stabilité du complexe.

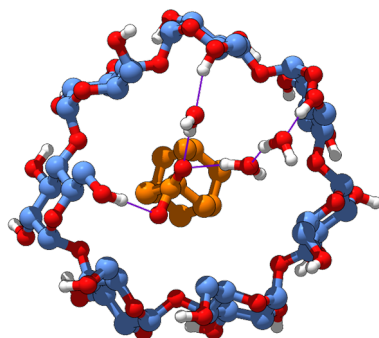


FIGURE 4.4 – Réseau de liaisons hydrogène entre l'eau, l'ADA et la β -CD. Les liaisons hydrogène sont représentées en violet.

4.1.3 Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène (liaisons H) sont essentielles à la stabilité de nombreuses molécules. Les molécules d'eau sont capables de jouer le rôle de donneur et d'accepteur de liaisons hydrogène. Plus les molécules d'eau peuvent faire de liaisons hydrogène et plus l'environnement leur est favorable. Nous avons calculé le nombre moyen de liaisons hydrogène entre l'eau et les CD puis entre l'eau et les complexes ADA/CD (Fig. 4.5).

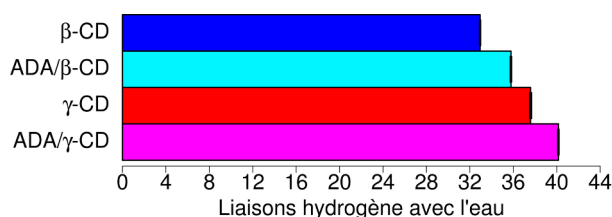


FIGURE 4.5 – Nombre de liaisons hydrogène entre l'eau et les CD seules ou complexées avec le ligand. Les barres d'erreurs sont trop faibles pour être visibles.

Cyclodextrines libres

En absence de ligand, la β -CD est impliquée en moyenne dans 33 liaisons hydrogène avec l'eau et la γ -CD est impliquée dans 38 liaisons hydrogène. La présence d'une unité glucose en plus dans la γ -CD permet de réaliser plus de liaisons hydrogène avec l'eau. Si on calcule le nombre de liaisons hydrogène possibles par unité de glucose, nous obtenons 4,7 liaisons hydrogène par glucose pour la β et la γ -CD.

Complexes ligand/cyclodextrine

En présence du ligand, nous calculons en moyenne 36 liaisons H pour le complexe ADA/ β -CD et 40 pour le complexe ADA/ γ -CD. Le ligand permet 3 liaisons H de plus pour la β -CD et seulement 2 pour la γ -CD. L'ADA peut réaliser au maximum 6 liaisons H par l'intermédiaire de sa fonction acide carboxylique déprotonnée. Nous aurions pu penser

que la présence de l'ADA diminuerait le nombre de liaisons H avec le solvant mais c'est l'inverse que nous observons. De plus, nous constatons que l'ADA permet une liaison H de plus pour la β -CD que pour la γ -CD. Nous avons pu voir précédemment que des molécules d'eau étaient capables de réaliser des ponts hydrogène entre la β -CD et l'ADA, ce genre de conformation permet de comptabiliser deux liaisons H pour le complexe avec l'eau. Il est possible que dans la γ -CD, l'ADA est trop éloigné pour réaliser ce genre de structure.

4.1.4 Volume spécifique

Pour réaliser des interactions telles que les liaisons hydrogène et les interactions de van der Waals, deux atomes doivent être à une distance spécifique. Si les atomes sont très éloignés alors les interactions ne sont pas possibles, à l'inverse si les atomes sont trop proches les interactions de van der Waals seront de type répulsives. La proximité d'un atome avec d'autres peut être quantifiée par le volume disponible pour l'atome. Ainsi, un volume trop grand indique que les interactions sont peu nombreuses voire impossibles, à l'inverse un volume trop faible indique des gênes stériques. Dans les deux cas, l'environnement est défavorable pour la stabilité de la molécule. Dans le but de caractériser l'environnement des molécules de solvant dans la cavité, nous avons mesuré le volume occupé par les molécules d'eau présentes et nous avons comparé ce volume au volume des molécules d'eau dans le *bulk* (Fig. 4.6). Nous considérons que l'eau libre occupe un volume optimal pour réaliser des liaisons hydrogène et des interactions non-liées avec les autres molécules d'eau. Si le volume dans les cavités est très différent de celui de l'eau libre alors nous pouvons considérer que la cavité est moins favorable.

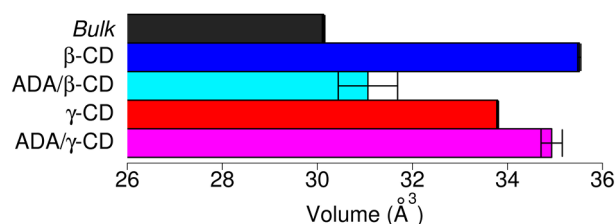


FIGURE 4.6 – Volume spécifique des molécules d'eau dans le *bulk* (noir) comparé aux volumes des molécules d'eau présentes dans la cavité de la β -CD seule (bleu) ou complexée avec le ligand (turquoise) et de la γ -CD seule (rouge) ou complexée avec le ligand (rose).

Cyclodextrines libres

Pour les deux CD, le volume des molécules d'eau est plus grand que pour les molécules d'eau libres. La concentration en molécules d'eau dans les cavités est plus faible que dans le *bulk* et le nombre d'interactions possibles est plus faible. Cependant, nous constatons que le volume est plus important dans la β -CD que dans la γ -CD. En effet, le volume de la cavité de la γ -CD (427 Å³) est 1,6 fois plus important que celui de la β -CD (262

Å³), alors que le nombre de molécules d'eau dans la γ -CD est 1,8 fois plus important que dans la β -CD (Fig. 4.3), ce qui explique que le volume des molécules d'eau dans la γ -CD est plus faible. Un volume plus faible (mais supérieur à celui du *bulk*) est favorable à un plus grand nombre d'interactions. Ceci confirme l'idée que la cavité de la β -CD est un environnement moins propice pour les molécules d'eau.

Complexes ligand/cyclodextrine

Lorsque l'ADA est dans les CD, le volume des molécules d'eau est plus grand que celui des molécules libres. Cependant, par rapport au volume en absence de ligand, le volume est diminué pour la β -CD mais augmenté pour la γ -CD. Le volume de la cavité de la β -CD étant plus faible que celui de la γ -CD, quand l'ADA est inclus dans la β -CD quasiment toute la cavité est occupée par le ligand, les seules molécules d'eau détectées sont celles proches de la partie carboxylique de l'ADA (Fig. 4.7a). Dans la γ -CD, les molécules d'eau peuvent entrer entièrement dans la cavité au niveau du côté large et certaines molécules d'eau sont proches de la cage hydrophobe du ligand, un environnement défavorable pour les molécules polaire (Fig. 4.7b). Le complexe ADA/ β -CD forme un environnement plus favorable aux molécules d'eau que la CD libre. Il est cependant important de rappeler qu'en présence de l'ADA nous avons en moyenne moins d'une molécule d'eau dans les cavités des deux CD, ces résultats ne concernent donc qu'un faible nombre de molécules.

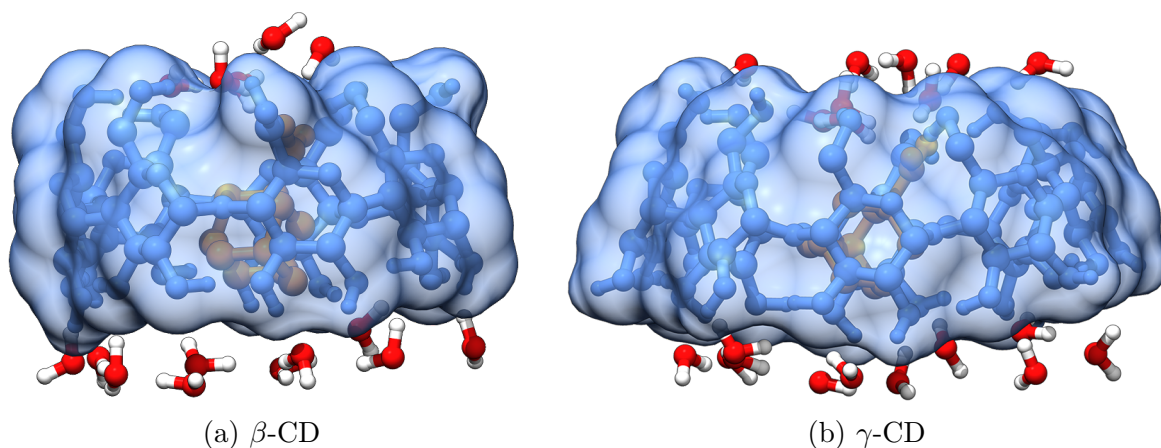


FIGURE 4.7 – Molécules d'eau autour de la cavité de la β -CD (a) et de la γ -CD (b). En bleu translucide est représenté la surface des CD, le ligand est en orange. Pour la β -CD les molécules d'eau restent à l'extérieur de la cavité en présence du ligand avec que pour la γ -CD certaines molécules entrent dans la cavité malgré la présence du ligand.

4.1.5 Diffusion latérale et facteur de retardement

Le déplacement latéral des molécules dans un milieu est appelé diffusion latérale. La vitesse de diffusion d'une molécule est directement liée à la taille de celle-ci et à son environnement (viscosité du milieu). Plus la molécule pourra interagir avec son environnement

par des interactions non-liées, des liaisons hydrogène ou des effets hydrophobes et plus la diffusion sera ralentie (BIZZARRI et CANNISTRARO 2002; FOGARTY et LAAGE 2014). L'absence de partenaire peut au contraire accélérer la diffusion comme par exemple une molécule d'eau dans un canal hydrophobe (CICERO et al. 2008). Comparer les coefficients de diffusion dans le *bulk* à celles dans la cavité permet de savoir si les molécules sont ralenties dans les cavités. Pour quantifier cela, nous faisons un calcul du facteur de retardement R_f (Eq. 2.19, FISETTE et al. 2016). Si $R_f > 1$ alors la diffusion dans le *bulk* est supérieure à celle dans la cavité. Si $R_f < 1$, la vitesse de diffusion est supérieure dans la cavité par rapport au *bulk*.

	R_f
<i>Bulk</i>	1
β -CD	$2,5 \pm 0,1$
ADA/ β -CD	$4,3 \pm 0,6$
γ -CD	$2,3 \pm 0,1$
ADA/ γ -CD	$1,8 \pm 0,1$

TABLE 4.1 – Facteur de retardement R_f des molécules d'eau présentes dans les cavités des cyclodextrines seules ou complexées au ligand dans l'eau pure.

Cyclodextrines libres

Nous avons, pour les deux CD, un facteur de retardement des molécules d'eau de la cavité d'environ 2,5 (Tab. 4.1). Les molécules qui hydratent le site de fixation sont ralenties, ceci semble indiquer un plus grand nombre d'interactions dans la cavité que dans le *bulk*. Cependant, nous avons vu précédemment que l'environnement de la cavité n'est pas favorable aux interactions. Il est probable que ce retardement soit dû à des difficultés de déplacement dans la cavité.

Complexes ligand/cyclodextrine

En présence du ligand, la vitesse de diffusion augmente pour la γ -CD (1,8) alors qu'elle diminue pour la β -CD (4,3). Nous avons vu qu'en présence de l'ADA dans la β -CD, les molécules d'eau sont capables de créer des liaisons hydrogène entre la fonction acide carboxylique du ligand et les fonctions alcool de la CD, cette double liaison hydrogène peut expliquer le fort retardement de la diffusion des molécules d'eau. Pour la γ -CD, nous avons vu précédemment que la fixation de ligand diminue les interactions ce qui explique la diffusion ralentie des molécules d'eau.

4.1.6 Diffusion rotationnelle

La diffusion latérale permet de suivre le mouvement des particules dans l'espace mais les particules tournent aussi sur elles mêmes. Comme la diffusion latérale, la diffusion rotationnelle des molécules d'eau est affectée par son environnement, par exemple plus une molécule fera d'interactions différentes (compétition dans les interactions) et plus elle tournera vite. Pour suivre la rotation d'une molécule sur elle-même nous calculons l'auto-corrélation rotationnelle ($C(t)$). À partir des courbes de $C(t)$, nous pouvons estimer si le mouvement de rotation est rapide. En effet, pour déterminer la vitesse, nous calculons le temps de relaxation τ en réalisant un ajustement de $C(t)$ selon une exponentielle étendue. Plus τ est faible et plus la vitesse de rotation est élevée et la courbe décroît rapidement. Nous pouvons aussi déterminer si les molécules tournent dans toutes les directions possibles de l'espace. Si la courbe tend vers 0 alors la molécule prend toutes les orientations possibles, à l'inverse si elle ne tend pas vers 0 alors toutes les orientations ne sont pas visitées. Nous avons calculé l'auto-corrélation rotationnelle des molécules de la cavité et nous l'avons comparée à celle des molécules du *bulk* (Fig. 4.8).

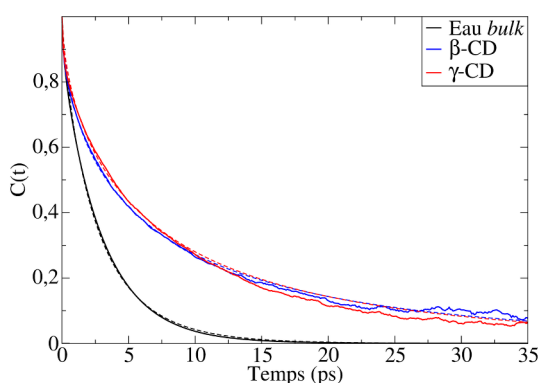


FIGURE 4.8 – Auto-corrélation rotationnelle des molécules d'eau dans la cavité de la β -CD et de la γ -CD comparée à celle de l'eau du *bulk*. Les courbes en pointillées correspondent aux ajustement suivant une exponentielle étendue.

Nous constatons, que pour les deux CD, la vitesse de rotation est plus faible que pour les molécules libres (Tab. 4.2). Ce qui indique que la cavité ralentit la rotation. Ce ralentissement peut être dû à la rigidification des molécules d'eau dans un environnement hydrophobe (LAAGE et al. 2009). De plus, pour les deux CD, la courbe ne tend pas vers 0 dans la fenêtre de temps étudiée, ce qui indique que les molécules sont restreintes dans leur mouvements, ce qui tend à confirmer l'hypothèse de la restriction des molécules d'eau en milieu hydrophobe.

Nous constatons que le β pour l'eau *bulk* est inférieur à 1 alors que normalement le déclin pour les molécules d'eau du *bulk* est décrit par une exponentielle simple (c'est à dire $\beta = 1$). Ceci est dû à l'intervalle sur lequel nous avons réalisé l'ajustement. En effet, l'ajustement a été réalisé entre 0 et 35 ps. Or, entre 0 et 0,2 ps le déclin initial est dû au

	τ (ps)	β	χ^2
Eau pure	2,55	0,84	$2,2 \cdot 10^{-5}$
β -CD	6,27	0,59	$2,6 \cdot 10^{-4}$
γ -CD	6,75	0,61	$6,1 \cdot 10^{-5}$

TABLE 4.2 – Résultat de l’ajustement des courbes d’auto-corrélation rotationnelle par une exponentielle étendue. La valeur de χ^2 permet de valider l’ajustement, plus χ^2 est faible, meilleur est l’ajustement. Le terme β permet d’évaluer la déviation de la décroissance exponentielle simple, si $\beta=1$ alors la décroissance suit une exponentielle simple, si $\beta>1$ la décroissance est plus rapide qu’une exponentielle simple et si $\beta<1$ la décroissance est plus faible qu’une exponentielle simple.

mouvement de libration des molécules d’eau (LAAGE et al. 2011 ; LAAGE et al. 2017). Il aurait fallu réaliser l’ajustement après les mouvements de libration (donc après 0,2 ps).

4.2 Propriétés des molécules de solvant dans les β et γ -CD dans 5% de DMSO

Nous avons réalisé les mêmes analyses pour des simulations des CD libres et des complexes ADA/CD dans 5% de DMSO.

4.2.1 Distribution radiale

Nous avons calculé la distribution radiale des molécules d’eau (Fig. 4.9) et de DMSO (Fig. 4.10) autour des CD libres et autour des complexes ADA/CD.

Molécules d’eau

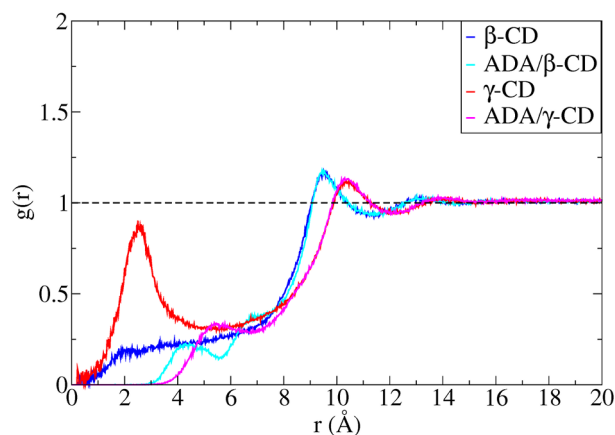


FIGURE 4.9 – Distribution radiale de l’eau autour des CD et de l’ADA dans 5% de DMSO.

Pour la répartition de l'eau en présence de 5% de DMSO, nous observons une distribution de l'eau différente de celle en eau pure (Fig. 4.9). Les pics correspondants aux molécules dans la cavité (avant 4 Å) sont plus faibles pour la γ -CD et inexistantes pour la β -CD. Ce qui indique que pour la β -CD, en présence de DMSO il n'y a pratiquement plus de molécules d'eau dans la cavité. Pour la γ -CD, le pic indique une présence de molécules d'eau mais en plus faible densité qu'en eau pure. Par contre, la couche d'hydratation externe n'est pas modifiée.

En présence du ligand, nous observons le même type de profil qu'en eau pure mais la densité est plus faible.

Molécules de DMSO

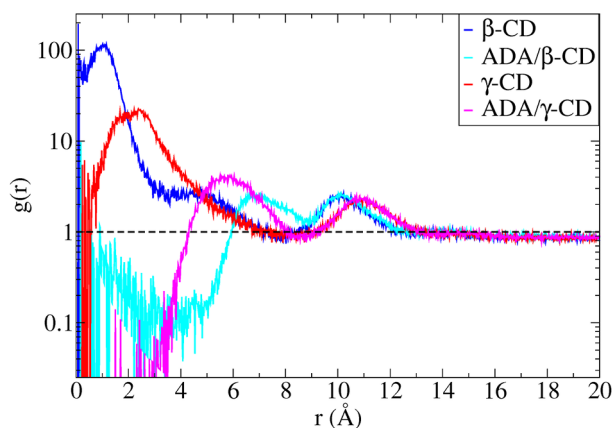


FIGURE 4.10 – Distribution radiale du DMSO autour des CD et de l'ADA dans 5% de DMSO. L'axe des ordonnées est représenté en échelle logarithme pour permettre une meilleur lisibilité.

Pour le DMSO, en absence de ligand, nous observons un grand pic dans la zone correspondant à la cavité. La densité est très élevée (plus de 100 pour la β -CD et environ 25 pour la γ -CD) car la densité de DMSO dans le *bulk* est très faible, la détection d'une molécule de DMSO à la même position entraîne une valeur de $g(r)$ élevée. Pour la γ -CD nous n'observons qu'un seul pic large qui englobe la région de la cavité et sa périphérie, alors que pour la β -CD nous détectons deux pics distincts pour les deux régions. Comme pour l'eau, le DMSO est organisé en couche autour des CD (pics après 10 Å). L'importance des pics nous indique que le DMSO est attiré par la cavité des CD.

En présence du ligand, nous n'observons plus les grands pics de la cavité. Cependant, pour la β -CD nous détectons la présence de DMSO dans la cavité en faible densité. Ce qui suggère que par moment le DMSO est présent au niveau de la cavité en présence du ligand (voir chapitre suivant). Ce phénomène est beaucoup moins important pour la γ -CD.

4.2.2 Hydratation

Nous avons vu, avec la RDF, que les molécules de solvant (eau et DMSO) sont présentes dans les cavités des CD, nous les avons quantifiées grâce à notre programme de détection des molécules de solvant (Fig. 4.11).

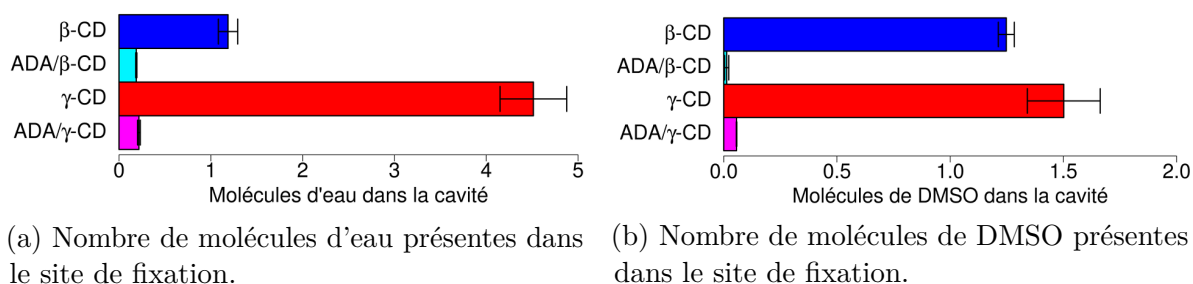


FIGURE 4.11 – Nombre de molécules de solvant présentes dans le site de fixation de la β -CD en présence (turquoise) et en absence de l'ADA (bleu) et de la γ -CD en présence (rose) et en absence du ligand (rouge).

Pour la β -CD, nous trouvons en moyenne 1 molécule d'eau et 1 molécule de DMSO dans la cavité. L'inclusion du ligand expulse la quasi-totalité des molécules de solvant. Pour la γ -CD, en moyenne 4,5 molécules d'eau et 2,5 molécules de DMSO sont présentes. Là aussi, l'inclusion expulse les molécules de solvant. Comparé à la simulation en eau pure, le DMSO prend la place de 4 molécules d'eau dans la β -CD mais de seulement 2 dans la γ -CD.

4.2.3 Liaisons hydrogène

Nous avons calculé le nombre de liaisons H entre le solvant (eau et DMSO combinés) et les CD ou les complexes ADA/CD (Fig. 4.12).

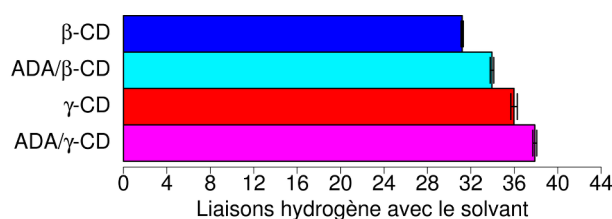


FIGURE 4.12 – Nombre de liaisons hydrogène entre les molécules de solvant (eau + DMSO) et les CD seules ou complexées avec le ligand.

Cyclodextrines libres

Pour la β -CD, nous obtenons en moyenne 31 liaisons H et pour la γ -CD 36 liaisons H. La présence du DMSO diminue de 2 le nombre de liaisons H entre les CD et le solvant. Le DMSO ne peut réaliser que 2 liaisons H et seulement dans le rôle de l'accepteur. De plus

le DMSO étant plus volumineux de l'eau pour un nombre inférieur de sites de liaisons H, sa présence dans l'environnement des CD diminue le nombre de liaisons H.

Complexes ligand/cyclodextrine

En présence du ligand, on obtient en moyenne 34 liaisons H entre le complexe ADA/ β -CD et les molécules de solvant, et 39 liaisons H entre le complexe ADA/ γ -CD et les molécules de solvant. Pour les deux CD, le ligand permet 3 liaisons H en plus. Pour la β -CD ce résultat est identique à celui obtenu dans l'eau pure mais pour la γ -CD on obtient une liaison H de plus. Cette fois, la largeur de la γ -CD est favorable aux liaisons H dans un environnement plus encombré par les molécules de DMSO.

4.2.4 Volume spécifique

Nous avons ensuite mesuré le volume des molécules d'eau et de DMSO de la cavité (Fig. 4.13).

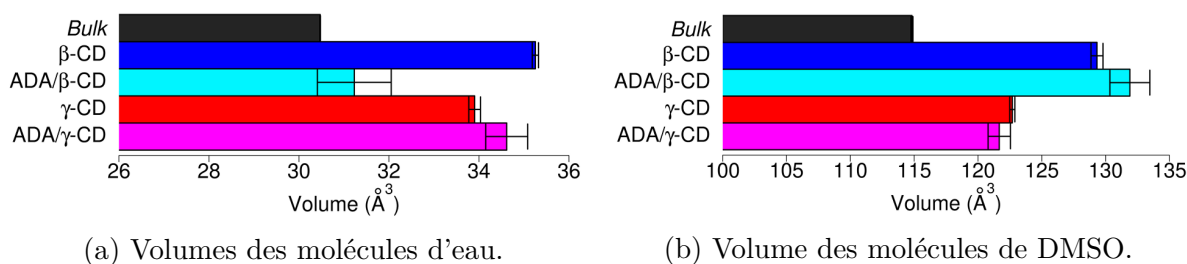


FIGURE 4.13 – Volume spécifique des molécules de solvant présentes dans les cavités des cyclodextrines comparé à celui des molécules de solvant du *bulk*, dans un milieu à 5% de DMSO.

Le volume des molécules d'eau est quasiment similaire à celui de l'eau de la cavité en absence de DMSO (Fig. 4.6, Fig. 4.13a). Pour la β -CD, le DMSO a un volume moyen supérieur à celui du DMSO libre (129,3 Å et 114,8 Å respectivement, Fig. 4.13b). Pour la γ -CD, le volume du DMSO est aussi plus important que celui du DMSO libre (122,7 Å) mais il est plus faible que dans la β -CD. Contrairement aux molécules d'eau dans la β -CD, les molécules d'eau dans la γ -CD ont un volume plus important que les molécules d'eau en absence de DMSO. Si on considère qu'un volume plus important indique une configuration défavorable alors le DMSO gêne les molécules d'eau de la cavité. Il est possible que, dans la γ -CD, le DMSO fasse de nombreuses interactions et réduise celles disponibles pour les molécules d'eau. Alors qu'au contraire, l'eau fait plus d'interactions dans la β -CD.

4.2.5 Diffusion latérale et facteur de retardement

Nous avons estimé la diffusion des molécules de solvant par le facteur de retardement (Tab. 4.3). Pour toutes les conditions, les molécules de solvant sont ralenties dans la cavité.

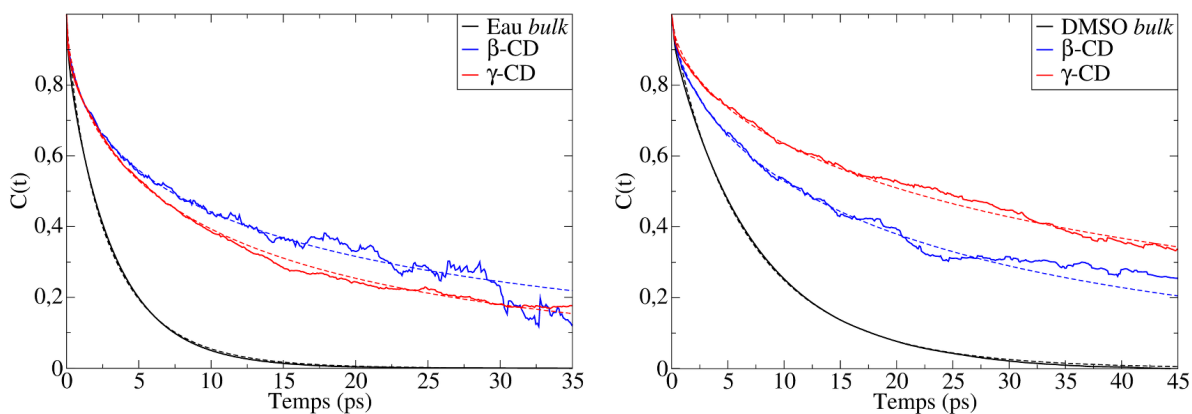
Pour la β -CD, l'eau a le même comportement qu'en absence de DMSO. En présence de ligand, nous n'avons pas assez de statistiques pour conclure. Pour la γ -CD nous n'observons pas de résultats intéressants.

	R_f	
	Eau	DMSO
β -CD	$2,6 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2$
ADA/ β -CD	$4,3 \pm 0,6$	
γ -CD	$2,9 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,5$
ADA/ γ -CD	$2,1 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,4$

TABLE 4.3 – Facteur de retardement R_f des molécules de solvant présentes dans les cavités des cyclodextrines seules ou complexées au ligand dans le DMSO à 5%.

4.2.6 Diffusion rotationnelle

La rotation des molécules de solvant de la cavité sont ralenties par rapport aux molécules libres (Fig. 4.14).



(a) Eau dans la cavité de la β et la γ -CD (b) DMSO dans la cavité de la β et la γ -CD

FIGURE 4.14 – Auto-corrélations rotationnelles des molécules de solvant dans les cavités des CD comparées à celles des molécules de solvants dans le *bulk*.

Molécules d'eau

Pour l'eau, nous constatons que la rotation est plus ralentie qu'en eau pure, « ralentissement » de la décroissance vers 0,2 au lieu de 0,05 (Fig. 4.14a, Tab. 4.4). La rotation des molécules d'eau est plus restreinte en présence de DMSO qu'en eau pure. Nous constatons aussi que le phénomène est plus accentué pour la β -CD.

	τ (ps)	β	χ^2
Eau	2,76	0,83	$2,2 \cdot 10^{-5}$
β -CD	15,11	0,49	$2,7 \cdot 10^{-5}$
γ -CD	11,32	0,55	$4,4 \cdot 10^{-5}$
DMSO	6,89	0,88	$3,6 \cdot 10^{-5}$
β -CD	21,07	0,61	$3,7 \cdot 10^{-5}$
γ -CD	40,00	0,57	$4,8 \cdot 10^{-5}$

TABLE 4.4 – Résultat de l’ajustement des courbes d’auto-corrélation rotationnelle par une exponentielle étendue. La valeur de χ^2 permet de valider l’ajustement, plus χ^2 est faible, meilleur est l’ajustement. Ajustement réalisé entre 0 et 25 ps.

Molécules de DMSO

Le DMSO étant plus volumineux que l’eau, le DMSO du *bulk* à une vitesse de rotation plus faible de celle de l’eau du *bulk*.

Comme pour les molécules d’eau, les molécules de DMSO dans les cavités sont ralenties et restreintes dans leurs mouvements ($C(t) > 0$, Fig. 4.14b). Les molécules de DMSO dans la γ -CD sont plus atteintes par ce phénomène que celles de la β -CD (« ralentissement » de la décroissance à 0,25 pour la β -CD et 0,33 pour la γ -CD). Les molécules dans la γ -CD sont plus nombreuses, la densité élevée restreint les mouvements en permettant plus d’interactions et en gênant les mouvements de rotation.

4.3 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons traité deux sujets : la dynamique des molécules de solvant à proximité des cyclodextrines et la différence de comportement des molécules de solvant entre la β -CD et la γ -CD.

Nous avons montré que la diffusion de l’eau dans les cavités hydrophobes des CD est deux fois plus ralentie que dans le *bulk*. De plus, le temps de relaxation des molécules hydratantes et lui aussi augmenté d’un facteur 2. Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été montré pour les molécules des couches d’hydratation des protéines et celles en contactes avec des régions hydrophobes (LAAGE et HYNES 2006 ; FISETTE et al. 2016 ; YANG et al. 2017). Le changement de dynamique de ces molécules peut s’expliquer entre autre par les liaisons hydrogène qu’elles font avec leur environnement. Dans ces régions, il arrive que les molécules d’eau ne puissent pas « sauter » aussi rapidement d’une liaison H à une autre . Nous avons également montré une augmentation du volume disponible pour les molécules d’eau dans les cavités, l’augmentation du volume implique une diminution des interactions et liaisons H possibles. Les molécules d’eau, dans une cavité hydrophobe, ont tendance à se « figer » par manque d’interactions possibles. De plus, elles peuvent

former des réseaux de liaisons H entre elles qui stabilisent les molécules. En dehors de la cavité hydrophobe, l'environnement des CD est riche en donneurs et accepteurs de l'hydrogène qui peuvent former des ponts hydrogène, (une molécule d'eau impliquée dans deux liaisons H différentes), ce type d'interaction peut empêcher la rotation des molécules d'eau dans toutes les directions de l'espace. L'ajout de 5% de DMSO dans le solvant ne change pas de manière drastique la dynamique des molécules d'eau, nous observons une légère amplification des effets précédemment décrits. En effet, l'ajout de DMSO rend la solution plus hydrophobe, nous nous attendons donc à une augmentation des effets hydrophobes sur l'eau. Le temps de relaxation semble être la propriété la plus touchée avec une augmentation d'un facteur 5. La vitesse de rotation est plus affectée par la présence de DMSO. Le DMSO est lui aussi affecté dans sa dynamique à proximité des CD, sa diffusion est ralentie d'un facteur 2 et son temps de relaxation par un facteur 3 pour la β -CD et 6 pour la γ -CD. Les molécules sont gênées dans leur rotation, elles sont probablement impliquées dans des liaisons H fortes et peu disponibles. Nous avons également mis en évidence une plus grande concentration de DMSO à proximité des CD. Le DMSO forme une couche « d'hydratation » autour des CD.

Plusieurs études ont montré comme nous que les cavités des CD étaient hydratées (RAFFAINI et GANAZZOLI 2007; ANGELOVA et al. 2017). Or, il est connu que la déshydratation d'un site de fixation, en particulier s'il est hydrophobe a un effet sur l'affinité du ligand et sur la thermodynamique de la liaison (HARRIES et al. 2005; LI et LAZARIDIS 2006; YOUNG et al. 2007; BARON et al. 2010; HUGGINS 2015). La déshydratation d'un site hydrophobe entraîne souvent une augmentation de l'entropie, mais si les molécules de solvant présentes dans la cavité ont de fortes interactions avec la cible alors la liaison peut être défavorable au niveau de l'enthalpie de réaction. La liaison de l'ADA entraîne une plus forte déshydratation de la γ -CD que de la β -CD, ce qui explique qu'au chapitre précédent nous avons trouvé une variation d'entropie plus grande pour la γ -CD que pour la β -CD. Cependant, les molécules présentes dans la β -CD semblent plus contraintes dans la β -CD, ce qui pourrait expliquer la plus grande affinité de l'ADA pour la β -CD. Mais nous avons vu dans le chapitre précédent que la β -CD a une composante enthalpique plus forte que la γ -CD. Au vu de nos résultats sur les solvants, nous pouvons penser que la différence d'énergie libre entre les deux CD est plus liée à une différence d'interaction entre l'ADA et les CD qu'une différence d'interaction entre les molécules de solvant et les CD.

Stabilité du complexe ligand/cyclodextrine

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que le DMSO a un effet négatif sur l'affinité de l'ADA pour la β -CD mais pas pour la γ -CD. L'analyse de l'interaction des molécules de solvant avec les CD libres ou complexées a montré que la cavité de la β -CD est moins favorable aux molécules d'eau que celle de la γ -CD. La β -CD fait plus de liaisons H avec l'eau que la γ -CD. Mais le DMSO semble plus présent autour de la γ -CD que de la β -CD. Ces informations ont permis de mieux caractériser les spécificités des CD vis à vis des solvants. Cependant, nous n'avons pas encore étudié l'interaction entre les CD et leur ligand. Dans ce chapitre, nous faisons l'analyse de la stabilité des complexes ligand/cyclodextrines en présence et en absence de DMSO à 5%.

5.1 Liaisons hydrogène ligand/cyclodextrine

Un façon de mesurer la stabilité d'une interaction entre deux molécules consiste à suivre les liaisons hydrogène qui relient les deux partenaires. Nous avons suivi au cours d'une simulation des complexes ADA/CD, le nombre de liaisons H entre les deux molécules dans un milieu d'eau pure et dans 5% de DMSO (Fig. 5.1). L'ADA est capable de former 6 liaisons H en tant qu'accepteur, mais nous avons vu précédemment que l'ADA est déjà impliqué dans 2-3 liaisons H avec le solvant. Nous détectons moins de 2 liaisons H entre les CD et l'ADA. Le nombre de liaison H pour les différentes conditions sont très proches, nous trouvons environ 1,5 liaisons H entre l'ADA et la CD. Mais il semblerait que la γ -CD soit capable de former un peu plus de liaisons H que la β -CD. Pour les deux CD, la présence de DMSO semble augmenter le nombre de liaisons H entre la CD et l'ADA.

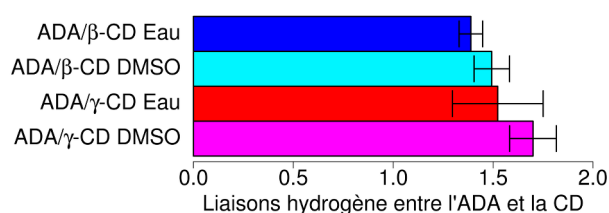


FIGURE 5.1 – Liaisons hydrogène entre le ligand et la β et γ -CD dans le complexe dans l'eau pure et dans le DMSO à 5%.

Cependant, les différences ne sont pas suffisamment significatives pour vraiment conclure dans ce sens.

5.2 Angle ligand/cyclodextrine

Pour déterminer si une fois complexée l'ADA est figé dans la CD ou s'il est capable de se réorienter, nous avons mesuré l'angle entre l'axe formé par la liaison C-COO⁻, et le troisième axe d'inertie de la CD (qui correspond à la perpendiculaire au plan formé par l'anneau de la CD, passant par le centre de la CD, Fig. 2.21).

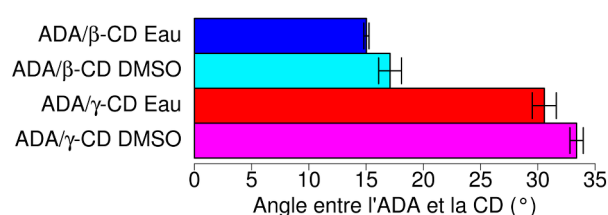


FIGURE 5.2 – Angle entre le ligand et la β et γ -CD dans l'eau pure et dans 5% DMSO

Nous trouvons un angle différent entre les deux CD (Fig. 5.2). Pour la β -CD l'angle est plus faible que pour la γ -CD (environ 15° et 30° respectivement). Le petit angle pour la β -CD s'explique par la petite taille de la cavité. Quand l'ADA est dans la β -CD, il n'a plus d'espace pour bouger, mais il est capable de faire des liaisons H (Fig. 5.3a). Alors que dans la γ -CD, l'ADA est plus éloigné des groupements OH de la CD, il doit donc se pencher pour réaliser des liaisons H tout en restant dans la partie hydrophobe de la CD (Fig. 5.3b).

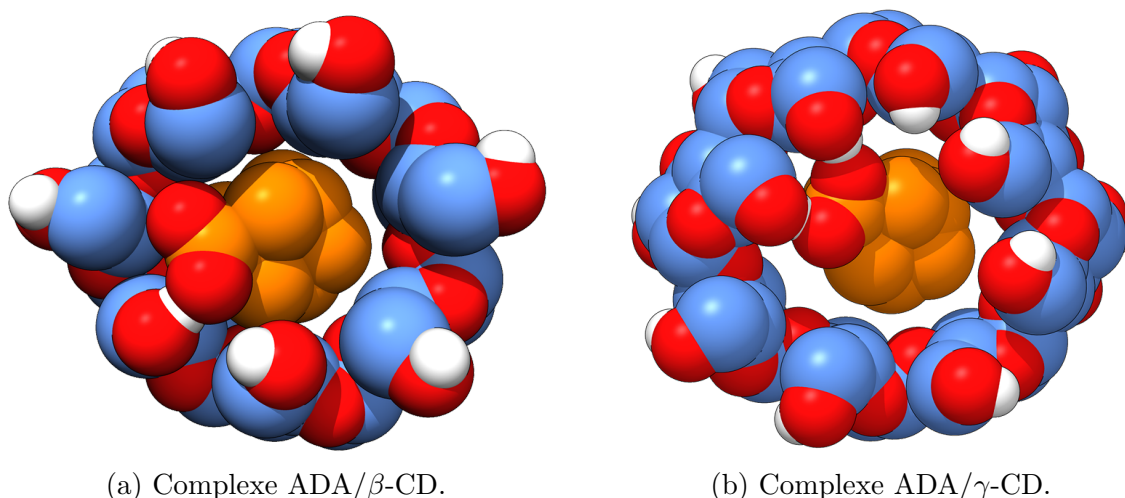


FIGURE 5.3 – Représentation des complexes ADA/CD. En bleu les atomes de carbone des CD, en orange ceux de l'ADA. Les sphères rouges sont des atomes d'oxygène, les sphères blanches des atomes d'hydrogène. L'ADA fait des liaisons hydrogène avec les deux CD, mais pour la γ -CD (b) l'ADA est plus penché que pour la β -CD (a).

Pour les deux CD, la présence du DMSO, accroît la valeur de l'angle formé par l'ADA et la CD. Il est possible que le DMSO déstabilise le complexe forçant le ligand à plus de mouvement.

5.3 Distance ligand/cyclodextrine

Pour mieux observer la déstabilisation du complexe par le DMSO, nous avons mesuré la distance entre le centre de masse de l'ADA et celui de la CD, lors de simulation de 500 ns des complexes ADA/CD en présence et en absence de 5% de DMSO (Fig. 5.4).

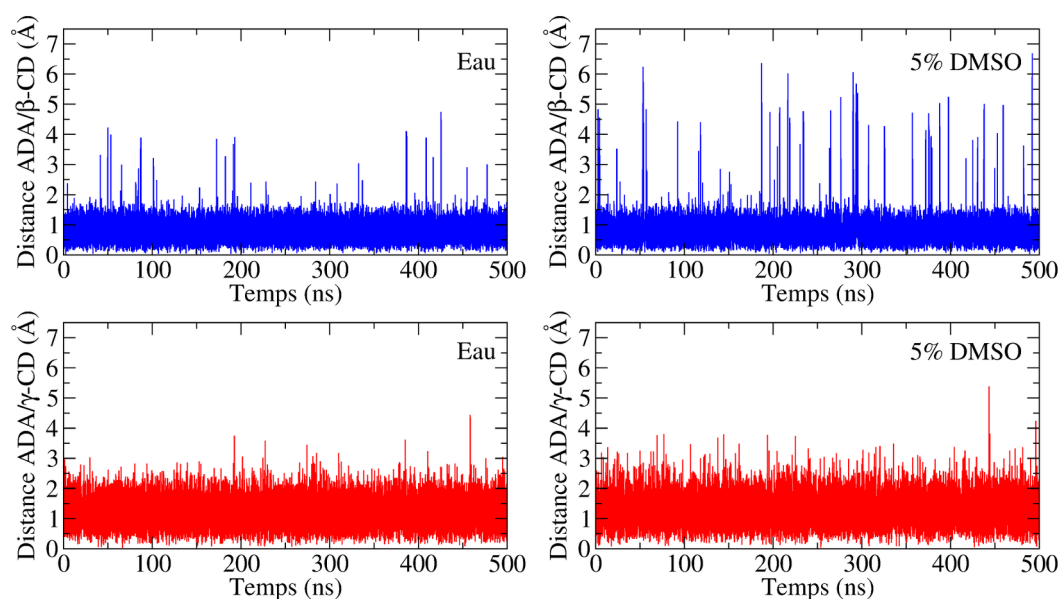


FIGURE 5.4 – Distance entre le centre de masse du ligand et celui de la β et γ -CD au cours d'une DM du complexe, dans l'eau pure et dans le DMSO à 5%.

Nous constatons que la distance entre la β -CD et l'ADA est plus faible ($0,8 \pm 0,3 \text{ \AA}$) que celle entre l'ADA et la γ -CD ($1,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$). Cette différence de distance corrobore celle de l'angle, l'ADA est lié moins profondément dans la γ -CD que dans la β -CD et donc la distance entre la γ -CD et l'ADA fluctue plus qu'entre l'ADA et la β -CD. Cependant, en présence de DMSO la distance ADA/CD pour le complexe ADA/ β -CD est plus variable. En traçant le diagramme en boîte à moustache de la distance ADA/CD entre 200 et 500 ns pour les quatre conditions, on obtient une meilleure représentation des écarts entre les différentes populations (Fig. 5.5).

Nous constatons que pour la β -CD, la présence de DMSO déstabilise le complexe d'inclusion. L'ADA s'éloigne régulièrement de la CD. Pour la γ -CD, nous constatons aussi que l'ADA s'éloigne plus souvent de la CD, mais cet éloignement est moins important que pour la β -CD, en moyenne moins de 1 \AA pour la γ -CD contre $2-3 \text{ \AA}$ pour la β -CD. Une observation des simulations lors de l'éloignement de l'ADA de la β -CD, nous montre qu'une molécule de DMSO est dans la cavité de la CD à la place du ligand (Fig. 5.6).

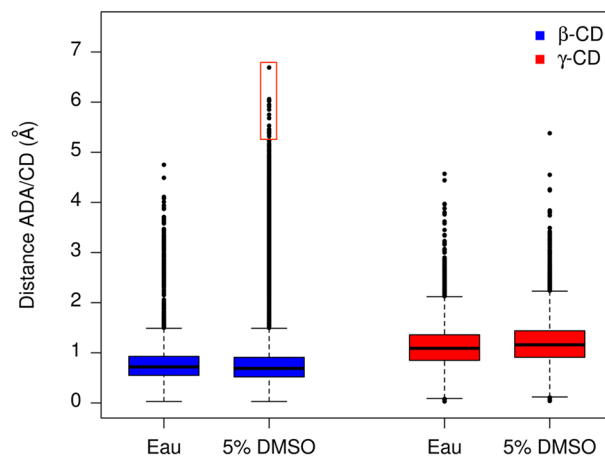


FIGURE 5.5 – Répartition de la distance entre le ligand et les CD au cours de 300 ns de DM. Les traits noirs dans les boîtes représentent les médianes, en pointillés les écarts-types et les points noirs représentent les cas particuliers (*outlier*).

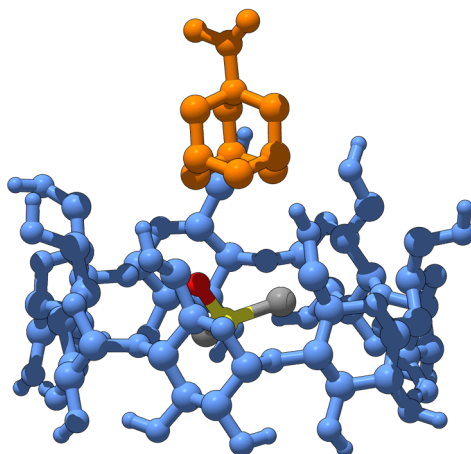
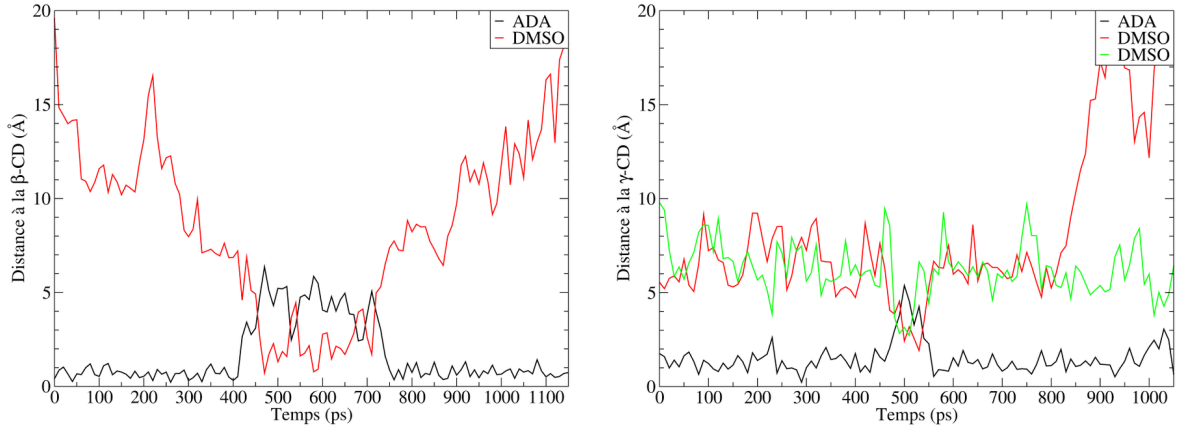


FIGURE 5.6 – Une molécule de DMSO (jaune) a expulsé l'ADA (orange) de la β -CD (bleu).

Nous avons mesuré la distance à la CD pour l'ADA et les molécules de DMSO les plus proches lors d'un évènement d'éloignement (Fig. 5.7a).

Nous pouvons voir que l'ADA commence à s'éloigner de la β -CD quand la molécule de DMSO commence à s'approcher de la cavité. Le DMSO expulse le ligand du site hydrophobe. Mais l'ADA reste proche de la CD, il revient se lier en expulsant la molécule de DMSO. L'évènement de décrochage de l'ADA dure environ 400 ps. Nous avons réalisé la même mesure pour la γ -CD lors du décrochage de l'ADA le plus important (vers 450 ns Fig. 5.4). Nous observons que 2 molécules de DMSO prennent la place de l'ADA pendant environ 100 ps (Fig. 5.7b).

Cependant, pour la β -CD, le décrochage semble être dû au DMSO, nous observons que le DMSO s'approche de la cavité progressivement jusqu'à pousser le ligand, l'amarrage du DMSO précède le décrochage de l'ADA. Alors que pour la γ -CD, les molécules de DMSO sont déjà proches de la cavité, leur amarrage est simultanément avec le décrochage de l'ADA. L'entrée du DMSO dans la γ -CD semble être une conséquence de l'éloignement du ligand



(a) Distance entre la β -CD et le ligand (noir) et entre la β -CD et une molécule de DMSO (rouge). (b) Distance entre la γ -CD et le ligand (noir) et entre la γ -CD et deux molécules de DMSO (vert et rouge).

FIGURE 5.7 – Distance entre les CD et le ligand et des molécules de DMSO.

alors que pour la β -CD, l'éloignement du ligand est la conséquence de l'inclusion du DMSO. Cependant nos données sont insuffisantes pour être catégorique.

5.4 Énergie libre de liaison du DMSO

Nous avons vu que le DMSO est capable d'entrer dans les cavités des CD malgré la présence du ligand. Cela indique que le DMSO a une forte affinité pour la cavité hydrophobe des CD. Pour quantifier cela nous avons calculé l'énergie libre de fixation du DMSO dans la β et la γ -CD. Nous commençons par la définition de l'énergie libre de liaison ΔG et sa relation à la constante d'équilibre K_{eq} :

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (5.1)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température de simulation et K_{eq} la constante d'équilibre de réaction définie comme suit :

$$K_{eq} = \frac{\{DMSO/CD\}}{\{CD\}\{DMSO\}} \quad (5.2)$$

Avec $\{CD\}$ l'activité chimique de la CD, $\{DMSO\}$ l'activité chimique du DMSO et $\{DMSO/CD\}$ l'activité chimique du complexe d'inclusion. Cependant nous avons voulu travailler avec les concentrations, la constante d'équilibre s'écrit alors comme suit :

$$K_{eq} = \frac{[DMSO/CD]}{[CD][DMSO]} \times \frac{\gamma(DMSO/CD)}{\gamma(CD)\gamma(DMSO)} \quad (5.3)$$

Avec $[CD]$ la concentration en CD, $[DMSO]$ la concentration en DMSO et $[DMSO/CD]$ la concentration en complexe. $\gamma(CD)$ le coefficient d'activité de la CD, $\gamma(DMSO)$ le coef-

ficient d'activité du DMSO et $\gamma(DMSO/CD)$ le coefficient d'activité du complexe. Nous considérons ici que le rapport des coefficients d'activité est égale à 1 mol l^{-1} .

Nous avons utilisé nos simulations de 500 ns des boîtes à 5% de DMSO avec les CD mais sans le ligand. Pour les deux trajectoires (celle de la β et celle de la γ -CD), nous avons calculé la probabilité q de voir un DMSO dans la cavité avec :

$$q = \frac{n_f}{n_{f_{tot}}} \quad (5.4)$$

Avec n_f le nombre de clichés de la trajectoire (*frames*) où le DMSO est dans la cavité et $n_{f_{tot}}$ le nombre total de clichés. La probabilité q peut être directement reliée aux concentrations $[CD]$, $[DMSO]$ et $[DMSO/CD]$ de l'état d'équilibre de réaction. Par exemple, pour la CD, nous pouvons calculer sa concentration totale $[CD]_{tot}$ car nous connaissons le volume V de la boîte et le nombre de molécules n_{CD} dans la boîte.

$$[CD]_{tot} = \frac{n_{CD}}{V\mathcal{N}_A} \quad (5.5)$$

Avec \mathcal{N}_A le nombre d'Avogadro, ce qui permet de convertir le nombre de molécules en mole. Pour avoir la concentration de l'espèce libre, il suffit de multiplier la concentration totale par la probabilité de voir la molécule libre soit dans notre cas $1 - q$. Après avoir remplacé les concentrations de l'Eq. 5.3 avec l'expression de l'Eq. 5.5 et fait une simplification, nous obtenons la formule suivante :

$$K_{eq} = \frac{qV\mathcal{N}_A}{(1-q)(n_{DMSO} - q)} \quad (5.6)$$

Le cheminement détaillé est présenté en annexes.

Les résultats pour la β et la γ -CD sont présentés dans le tableau 5.1.

	ΔG (kJ mol ⁻¹)
β -CD	$-8,6 \pm 0,6$
γ -CD	$-6,3 \pm 0,2$

TABLE 5.1 – Énergie libre de liaison d'une molécule de DMSO dans la cavité de la β -CD et de la γ -CD.

Nous trouvons une énergie libre de réaction négative pour les deux CD ce qui indique que l'inclusion du DMSO dans les cavité est favorable. Cependant l'affinité du DMSO pour la β -CD est supérieure à celle pour la γ -CD. L'affinité du DMSO pour les CD est inférieure à celle de l'ADA pour les CD dans l'eau pure, ce qui explique que l'on trouve préférentiellement le ligand dans la cavité plutôt que la DMSO. Cependant, l'affinité de l'ADA pour la β -CD dans 5% de DMSO est proche de celle du DMSO ($-8,1 \pm 3,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour l'ADA et $-8,6 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour le DMSO) ce qui explique la compétition

entre les deux molécules pour la cavité de la β -CD.

5.5 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé la stabilité des complexes ligand/cyclodextrine en présence et en absence de DMSO. Nous avons montré que dans l'eau pure, l'ADA est mieux fixé à la β -CD qu'à la γ -CD, le complexe est plus stable. La position de l'ADA est plus ancrée dans la β -CD. Cependant nous avons un peu moins de liaisons H entre l'ADA et la β -CD qu'entre l'ADA et la γ -CD. Mais dans le chapitre précédent, nous avons montré que le complexe ADA/ β -CD réalise plus de liaisons H avec l'eau que le complexe ADA/ γ -CD. La plus grande stabilité du complexe ADA/ β -CD dans l'eau peut expliquer l'affinité plus importante de l'ADA pour la β -CD que pour la γ -CD. À l'inverse dans le DMSO, le complexe ADA/ β -CD est moins stable que le complexe ADA/ γ -CD. Le DMSO semble entrer en compétition avec le ligand pour la cavité hydrophobe. La cavité de la β -CD ne peut contenir que le ligand, le DMSO doit expulser le ligand pour interagir avec la cavité, alors que pour la γ -CD des molécules de DMSO sont capables d'entrer en interaction avec la cavité en laissant le ligand en place. Nous avons vu, dans le premier chapitre de cette partie, que l'énergie libre de réaction est diminuée en présence de 5% de DMSO, mais seulement pour la β -CD. Or dans ce chapitre nous avons montré que le DMSO n'entre en compétition avec l'ADA que pour la β -CD. La compétition semble expliquer cette diminution d'énergie libre de réaction. Nous avons montré que pour faire sortir l'ADA de la γ -CD deux molécules de DMSO sont nécessaires. Nous pourrions alors tester des concentrations de DMSO plus élevées dans le but d'observer une compétition entre le DMSO et l'ADA pour la γ -CD. En effet, s'il y a plus de DMSO dans le milieu, il peut y avoir plus de DMSO dans la cavité de la γ -CD et donc une plus grande compétition entre l'ADA et les molécules de DMSO.

Dans cette partie nous avons montré que le DMSO à une concentration de 5% est capable d'affecter l'affinité de l'ADA pour la β -CD mais pas pour la γ -CD. Plus le volume du ligand rentre « parfaitement » dans la cavité (CROMWELL et al. 1985) plus l'effet du DMSO semble important. Il serait intéressant de quantifier la compatibilité de volume entre le ligand et la poche. Le mécanisme principal pour expliquer le changement d'affinité est la compétition entre le ligand et le DMSO. Cet effet du DMSO semble être très lié à la structure du site de fixation et à la forme du ligand. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons étudié d'autres couples ligand/récepteur. Dans les deux prochaines parties, nous testons un ligand différent avec la β -CD et un couple ligand/protéine.

QUATRIÈME PARTIE

Tensioactifs

Bicouches de tensioactifs

Dans la première partie, nous avons étudié l'effet du DMSO sur les interactions entre les cyclodextrines et une petite molécule hydrophobe l'ADA. Pour généraliser nos résultats sur l'effet du DMSO, il est nécessaire d'élargir le nombre de systèmes étudiés. Dans ce but, dans cette partie, nous étudions la β -CD avec un ligand différent. Mais comme nous sommes intéressés par les interactions entre molécules hydrophobes, il est donc nécessaire d'utiliser un ligand ayant une partie hydrophobe. De nombreux travaux ont montré des interactions entre les CD et des lipides et en particulier la capacité des CD à extraire des molécules de cholestérol de membranes lipidiques (OHTANI YOSHIRO et al. 1989; BRESLOW et ZHANG 1996; DASS et JESSUP 2000; LEVENTIS et SILVIUS 2001; MASCETTI et al. 2008; dos SANTOS et al. 2017). Des simulations en représentation gros grain et atomes unifiés ont aussi reproduit l'extraction de cholestérol par l'intermédiaire de dimères de β -cyclodextrine (LÓPEZ et al. 2011; LÓPEZ et al. 2013). Ainsi, nous avons voulu tester l'effet du DMSO sur l'extraction de molécules de bicouches par l'intermédiaire des CD. Dans le laboratoire, nous étudions expérimentalement les tensioactifs de type C_iE_j . Les C_iE_j sont des molécules amphiphiles, c'est à dire avec une partie polaire (la tête) et une partie hydrophobe (la queue aliphatique, Fig. 2.14) capables de former des structures similaires aux structures lipidiques telles que des bicouches. Nous avons donc décidé d'étudier les interactions entre les CD et les C_iE_j par DM. Dans ce chapitre nous présentons la validation des paramètres du champ de force pour les C_iE_j , ces travaux ont donné lieu à une publication qui est directement retranscrite après un bref résumé.

6.1 Résumé de l'article

Pour pouvoir réaliser des simulations de bicouches de tensioactifs, il a été nécessaire d'utiliser des paramètres pour les C_iE_j dans le champ de force GROMOS. Nous avons utilisé le champ de force 2016H66 compatible avec GROMOS. Pour valider ces paramètres, nous avons simulé des bicouches de différentes tailles (90 ou 1024 tensioactifs) de 5 C_iE_j ($C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$ et $C_{14}E_4$). Nous avons mesuré différentes propriétés physiques des bicouches (densité, aire, rigidité, paramètre d'ordre, *flip-flop*...) que nous avons comparé à des valeurs expérimentales.

Nous avons trouvé que nos simulations donnent des résultats proches des résultats expérimentaux. Nous avons constaté que les meilleurs résultats étaient obtenus pour les

larges bicouches de $C_{12}E_4$ et $C_{12}E_5$. Cependant l'analyse structurale de la bicouche de $C_{12}E_5$ montre qu'un changement de phase a lieu lors de la simulation, ce phénomène a déjà été rapporté dans l'article de FERREIRA et al. 2014. En revanche, pour $C_{12}E_4$ nous n'observons pas de changement de phase mais nous voyons l'apparition de pores à la surface de la grande bicouche. L'apparition des pores coïncide avec une meilleure adéquation des résultats de simulation avec les résultats expérimentaux de RMN au deutérium. Nous avons conclu que pour une bonne reproduction des résultats expérimentaux, il est nécessaire d'avoir de nombreux pores dans la bicouche de C_iE_j .

Les paramètres du champ de force 2016H66 compatible GROMOS pour les C_iE_j permettent de reproduire de façon satisfaisante les propriétés des C_iE_j . Cependant des améliorations sont encore nécessaires. Les C_iE_j les mieux reproduits sont les $C_{12}E_4$ en grande bicouche. Nous avons donc utilisé les $C_{12}E_4$ pour l'étude de l'interaction cyclodextrine/tensioactif.

6.2 Article : Simulating bilayers of nonionic surfactants with the GROMOS-compatible 2016H66 force field

Simulating Bilayers of Nonionic Surfactants with the GROMOS-Compatible 2016H66 Force Field

Caroline Senac,[†] Wladimir Urbach,^{†,‡} Erol Kurtisovski,^{†,‡} Philippe H. Hünenberger,[§]
Bruno A. C. Horta,^{||} Nicolas Taulier,[†] and Patrick F. J. Fuchs^{*,†,||}

[†]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, F-75006 Paris, France

[‡]Laboratoire de Physique Statistique, École Normale Supérieure, PSL Research University; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris-Cité; Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, CNRS, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

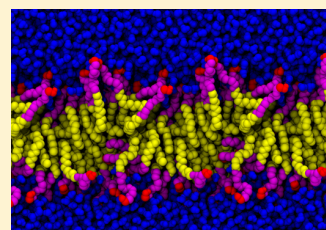
[§]Laboratory of Physical Chemistry, ETH Hönggerberg, HCI, Zürich CH-8093, Switzerland

^{||}Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

^{*}Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: Polyoxyethylene glycol alkyl ether amphiphiles (C_iE_j) are important nonionic surfactants, often used for biophysical and membrane protein studies. In this work, we extensively test the GROMOS-compatible 2016H66 force field in molecular dynamics simulations involving the lamellar phase of a series of C_iE_j surfactants, namely $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, and $C_{14}E_4$. The simulations reproduce qualitatively well the monitored structural properties and their experimental trends along the surfactant series, although some discrepancies remain, in particular in terms of the area per surfactant, the equilibrium phase of $C_{12}E_5$, and the order parameters of $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$. The polar head of the C_iE_j surfactants is highly hydrated, almost like a single polyethyleneoxide (PEO) molecule at full hydration, resulting in very compact conformations. Within the bilayer, all C_iE_j surfactants flip-flop spontaneously within tens of nanoseconds. Water-permeation is facilitated, and the bending rigidity is 4 to 5 times lower than that of typical phospholipid bilayers. In line with another recent theoretical study, the simulations show that the lamellar phase of C_iE_j contains large hydrophilic pores. These pores should be abundant in order to reproduce the comparatively low NMR order parameters. We show that their contour length is directly correlated to the order parameters, and we estimate that they should occupy approximately 7–10% of the total membrane area. Due to their highly dynamic nature (rapid flip-flops, high water permeability, observed pore formation), C_iE_j surfactant bilayers are found to represent surprisingly challenging systems in terms of modeling. Given this difficulty, the results presented here show that the 2016H66 parameters, optimized independently considering pure-liquid as well as polar and nonpolar solvation properties of small organic molecules, represent a good starting point for simulating these systems.



INTRODUCTION

Polyoxyethylene glycol alkyl ethers are nonionic amphiphilic surfactants.¹ Their aliphatic tail is composed of i carbon atoms, and their polar head is made of j ether functional groups, arranged in 1–4 manner like in polyethylene glycol (PEG) and poly(ethylene oxide) (PEO) (we will use the PEO acronym throughout) and terminated by a hydroxyl group. Their general formula is thus $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{i-1}-(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_j-\text{OH}$, where i and j can be tuned at will. Nowadays, they are commonly named C_iE_j , whereas C_iEO_j was the common notation before 1998. The C_iE_j surfactants have been extensively studied since the 1970's, and many of their properties have been determined, including the critical micelle concentration (CMC), surface tension, density, diffusion coefficient, cloud point, etc.^{2–6} These surfactants can be mixed with water to produce a variety of microemulsions. The microemulsion topology depends mainly on the molar ratio of surfactant to water and on the temperature but also on the surfactant shape (relative size of polar head vs aliphatic tail). Phase diagrams were determined for $C_{10}E_5$, $C_{10}E_6$,

and $C_{10}E_8$ by Nibu and Inoue,⁷ for $C_{12}E_4$, C_8E_4 , $C_{12}E_6$, $C_{12}E_8$, $C_{16}E_4$, $C_{16}E_8$, and $C_{16}E_{12}$ by Mitchell et al.,⁸ for $C_{12}E_2$ by Conroy et al.² with some improvements by Lynch et al.,⁹ as well as for many others C_iE_j surfactants.¹ From these phase diagrams, it was observed that the C_iE_j surfactants are capable of forming many different phases such as micelle (L_1), reverse micelle (L_2), lamellar (L_α for liquid crystalline and L_β for gel), sponge (L_3), and hexagonal (H_1) phases. These phases appear spontaneously after mixing and are extremely stable over a long time period. It is also possible to form emulsions of small and giant vesicles, either unilamellar or multilamellar,¹⁰ but these structures are thermodynamically unstable.

As these surfactants are nonionic, they generally do not denature or destabilize the structure of proteins above their CMC. For this reason, they are commonly used as detergents for

Received: April 21, 2017

Revised: August 21, 2017

Published: August 23, 2017

the purification and crystallization of membrane proteins (mainly C_8E_5 , $C_{12}E_8$, or $C_{12}E_9$).^{11–15} The C_iE_j surfactants are also used for biophysical studies such as membrane protein diffusion.^{16–18} The L_3 phase has been shown to be particularly convenient for this purpose, because it preserves in vitro membrane protein activity while allowing the protein to diffuse in a bilayer environment.¹⁹

The experimental methods to study C_iE_j emulsions usually deliver average observables, lacking microscopic details and time resolution. In contrast, atomistic molecular dynamics (MD) simulations give in principle direct access to this information. However, reproducing the correct phase behavior of C_iE_j /water systems is very challenging in these simulations, because: (i) reaching the time and length scales required for the self-assembly is computationally expensive and (ii) the detailed structure of the different phases can be sensitive to many force field details. So far, most atomistic MD studies have focused on small systems such as micelles of $C_{12}E_5$ ²⁰ or $C_{12}E_6$,^{21,22} reverse micelles of $C_{12}E_4$,²³ a few $C_{12}E_5$ molecules at a liquid/vacuum interface,²⁴ or a small $C_{12}E_2$ patch in the lamellar phase.²⁵ All these investigations have focused on a single point of the phase diagram. Only the study by Ferreira et al. has considered several points of the phase diagram of $C_{12}E_5$, all in the lamellar phase.²⁶ However, the system size was limited to 512 surfactant molecules.

Coarse-grained (CG) MD simulations are in principle well-suited for studying the different phases of surfactant systems.²⁷ By grouping several atoms into a single bead, the kinetics is accelerated and the computational cost reduced. Thus, one can study larger systems on longer time scales. Two main CG models have been used for exploring the different phases of C_iE_j surfactants. The first one is the Shinoda, DeVane, and Klein (SDK) model, which is parametrized against surface tension data for liquid/liquid interfaces.²⁸ Shinoda et al. simulated $C_{12}E_6$ mixed with water at ambient temperature. They considered three surfactant weight fractions (20, 50, and 80%) and could reproduce three important phases (L_1 , H_1 , and L_w respectively).²⁹ The second main CG model is MARTINI, which is parametrized primarily against partitioning free energies of the different beads between polar and apolar solvents.³⁰ Rossi et al. developed a MARTINI model for C_iE_j molecules and could reproduce the phase behavior of a few C_iE_j surfactants mixed with water.³¹ Using another CG model with a coarser mapping, Loison et al. studied the lamellar phase of a generic 4 bead amphiphile, which could represent a C_iE_j molecule (i.e. C_6E_3) mixed with water.³² By simulating a stack of large bilayers, they found that these amphiphiles were spontaneously forming pore defects of fractal shape.

The goal of the present study is to investigate the properties of the lamellar phase of the C_iE_j /water systems at atomistic resolution using the recently published GROMOS-compatible 2016H66 force field.³³ In particular, we wish to test and validate the transferability of the parameters upon varying the lengths of the aliphatic tail and of the polar head. We focus on surfactants with long hydrocarbon chains (at least C12) for several reasons: (i) C_iE_j must possess hydrocarbon chains longer than C8 to evidence complex phase behavior in water;¹ (ii) among these, several present a well-defined lamellar region;^{8,9,34} (iii) some surfactants with too short chains do not preserve membrane protein function;^{15,35} and (iv) a wealth of experimental data are available^{1,34} to which the simulation results can be compared. For these reasons, we selected the lamellar phase of the series $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, and $C_{14}E_4$. The GROMOS 2016H66 force field³³ was well-suited for this study, since it has a single set of

charges irrespective of the environment polarity, in contrast to the 53A5/53A6 version.³⁶ Furthermore, 2016H66 encompasses different parameter sets, including 53A6_{OXY}, in which the ether functional group contained in C_iE_j surfactants has been carefully parametrized,³⁷ and 53A6_{OXY+D}, which improved the parametrization of the vicinal diether function present in PEO polymers.³⁸ On the other hand, the alkane parameters (associated with the hydrocarbon chain of C_iE_j) did not change over the last versions, and the parameters from the 45A3 force field³⁹ are still in use in 2016H66. These alkane parameters were also refined to reproduce experimental thermodynamic and structural properties. Of particular interest is the question whether the parameters of 2016H66, refined independently for the alkane and diethers considering pure liquid as well as polar and apolar solvation properties of small molecules, are transferable to the complex C_iE_j /water systems.

A second motivation for this study is to gain further insight into the structure and dynamics of the lamellar phase of C_iE_j surfactants. In particular, Ferreira et al. recently performed atomistic MD simulations using the GROMOS 45A3 force field³⁹ modified by Shang et al.,⁴⁰ and suggested that the lamellar phase of $C_{12}E_5$ contains pore defects.²⁶ Other CG studies suggested the presence of pore defects within the lamellar phase of C_iE_j surfactants or amphiphiles.^{31,32} One of the aims of the present study is to assess the presence of pores based on the new 2016H66 force field and to investigate whether their formation is a specific feature of $C_{12}E_5$ or a more general property of C_iE_j surfactants.

In this work, MD simulations of pure surfactants in the liquid state, of small hydrated bilayers, and of large hydrated bilayers are presented for the series $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, and $C_{14}E_4$. All simulations are analyzed in terms of structural, dynamic, and elastic properties. Surfactant conformations and their interaction with water are precisely determined. The lateral and transverse motion of C_iE_j surfactants are analyzed as well as the water molecules going across the bilayer. The bending rigidity of each C_iE_j is determined from the undulations of the large bilayers. In the latter, some hydrophilic pores can occur, which are characterized in terms of area. Last, the simulations are compared to experimental data, especially to NMR-order parameters when available. The calculated observables obtained from the simulations are also compared to those of common phosphatidylcholine (PC) bilayers. We then discuss the general structure of C_iE_j surfactants in the lamellar phase as well as the transferability of the force field parameters between the different C_iE_j .

METHODS

Simulated Systems. We considered a series of five surfactants, namely $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, and $C_{14}E_4$, depicted in Figure 1. These molecules were simulated considering four different states,

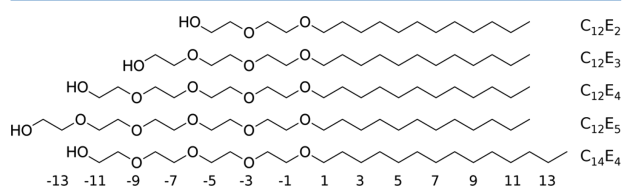


Figure 1. Chemical structures of the five C_iE_j surfactants considered in this work. The atom numbering is also shown and is the same as used in ref 26 for $C_{12}E_5$ (negative integers for the polar head, positive integers for the aliphatic tail).

namely the pure liquid state (150 or 1200 molecules), a small hydrated bilayer of 90 surfactant molecules (45 per leaflet), and a large hydrated bilayer of 1024 surfactant molecules (512 per leaflet). The unit-cell contents, durations, and number of repeats of all simulations performed in this work are summarized in Table 1.

Table 1. Summary of All Simulations Performed in This Work^a

	C ₁₂ E ₂	C ₁₂ E ₃	C ₁₂ E ₄	C ₁₂ E ₅	C ₁₄ E ₄
<i>M</i> (g/mol)	274.4	318.5	362.6	406.6	390.6
<i>N</i>	19	22	25	28	27
pure liquid (small)					
<i>n_s</i>	150	150	150	150	150
<i>t</i> (ns)	10	10	10	10	10
<i>R</i> (RF)	2	2	2	2	2
pure liquid (large)					
<i>n_s</i>	1200	1200	1200	1200	1200
<i>t</i> (ns)	10	10	10	10	10
<i>R</i> (RF)	2	2	2	2	2
small bilayer					
<i>n_s</i>	90	90	90	90	90
<i>n_w</i>	600	1880	1880	675	2700
<i>wt</i> (%)	70	46	49	75	42
<i>t</i> (ns)	200	200	200	200	200
<i>R</i> (RF)	2	2	2	2	2
<i>R</i> (PME)	2	2	2	2	2
<i>R</i> (RF, cst area)			1		
large bilayer					
<i>n_s</i>	1024	1024	1024	1024	1024
<i>n_w</i>	6827	21390	21736	7839	21921
<i>wt</i> (%)	70	46	49	75	50
<i>t</i> (ns)	200	200	500	1000	200
<i>R</i> (PME)	1	1	1	1	1
<i>R</i> (PME, cst area)			1		

^aThe values reported are the molar mass (*M*) and number of heavy atoms (*N*) of the surfactant, the number of surfactant (*n_s*) and water (*n_w*) molecules in the computational box, the surfactant weight fraction (*wt*), the simulation time (*t*), and the number of simulation repeats (*R*). Indicated in parentheses after *R* is the electrostatic scheme used for the simulations (RF stands for reaction-field and PME stands for particle-mesh Ewald). All simulations were performed at 300 K and 1 bar (NPT ensemble), except one repeat of the small and large bilayers of C₁₂E₄, which were performed at constant area in the NPAT ensemble (line “cst area”). The phase diagrams of the involved surfactants (except C₁₄E₄) are shown in Figure S1, including the representative points for the selected simulation conditions.

As we are interested in the lamellar phase (*L_α*) of the C_{*i*}E_{*j*} surfactants, the choice of a temperature and of a surfactant/water ratio are critical for the bilayer systems. For the sake of comparison, the same temperature of 300 K was selected for all systems. When possible, the surfactant/water ratio was chosen close to the midpoint of the lamellar phase region (*L_α*) in the phase diagram.^{2,8} These diagrams based on refs 8 and 9 are presented in Figure S1 for four of the five surfactants, including the representative point for the selected simulation conditions. The exception is C₁₄E₄ for which, to the best of our knowledge, no phase diagram is available in the literature. However, according to Kurtisovski et al.,³⁴ C₁₄E₄ forms a lamellar phase under the conditions used in the simulations. The surfactant weight fractions were set to 70, 46, 49, 75, and 42% for C₁₂E₂, C₁₂E₃, C₁₂E₄, C₁₂E₅, and C₁₄E₄, respectively. For C₁₂E₂, a relatively high weight fraction of 70% was selected, motivated by: (i) the complexity of the phase diagram at 300 K (70% is close the weight fraction at which the *L_α* phase exists at the highest temperature) and (ii) some test simulations at 293 K evidenced a transition from the liquid crystalline (*L_α*) to the gel (*L_β*) phase at all surfactant weight

fractions. For C₁₂E₅, the *L_α* region is relatively narrow, so that a value of about 75% was selected. Note that the high weight fractions used for C₁₂E₂ and C₁₂E₅ (70% and 75%, respectively) lead to a relatively short distance between the bilayer and its periodic image.

System Setup. The pure liquid C_{*i*}E_{*j*} small systems were built by placing randomly 150 surfactant molecules in a cubic box. After a minimization, the box was equilibrated during 10 ns, which allowed the convergence of the density. Large pure liquid systems (1200 surfactant molecules) were constructed by replicating each small system twice in each direction using the GROMACS tool *genconf*. Each simulation was carried out for 10 ns.

The small bilayers of 90 surfactants were generated by self-assembly simulations,⁴¹ where the bilayer was formed after a few tens of nanoseconds (see Supporting Information for further details). After removing any entrapped water molecule from the interior of the bilayer, the simulations were carried out for 200 ns.

The large bilayers of 1024 surfactants were created by replicating the equilibrated small bilayers 4 times along the *x* and *y* directions with the GROMACS tool *genconf*. The resulting patch was cut appropriately in order to obtain 1024 surfactants, energy minimized and equilibrated during a few nanoseconds to recover periodic boundary conditions. Simulations of different durations were then performed (200 to 1000 ns, see Table 1).

One repeat of the both small and large C₁₂E₄ bilayer simulations was performed at constant lateral area by fixing the lateral size of the box to the experimentally determined area per surfactant (see Table 2) times the number of surfactants per monolayer. Throughout the manuscript, when we refer to these simulations, we systematically use the term “C₁₂E₄ bilayer simulations at constant area” in order to avoid confusion with the C₁₂E₄ bilayer simulations at variable area.

Simulation Parameters. All simulations were carried out using GROMACS 4.0.7.⁴² The recently developed 2016H66 force field³³ was used for the C_{*i*}E_{*j*} molecules along with the SPC water model.⁴³ The equations of motion were integrated with the leapfrog algorithm⁴⁴ using a 2 fs time step. The surfactant bond-length distances were constrained by application of the P-LINCS algorithm,⁴⁵ and the full rigidity of the water molecules was enforced by means of the SETTLE algorithm.⁴⁶ Periodic boundary conditions were applied in all directions based on rectangular computational boxes.

For all simulations, temperature and pressure were maintained at 300 K and 1 bar, respectively, using the Bussi thermostat⁴⁷ with a relaxation time of 0.1 ps and the Parrinello-Rahman barostat⁴⁸ with a relaxation time of 4 ps. The isothermal compressibility of the barostat was set to 4.5×10^{-5} bar⁻¹. We used isotropic scaling for the pure liquid C_{*i*}E_{*j*} systems and semi-isotropic scaling (*x* and *y* dimensions scaled independently from the *z* dimension) for the bilayer systems. For the simulations at constant area, the *xy* dimensions were set to the appropriate value (experimental area per surfactant times the number of surfactants per monolayer). Note that imposing a larger area than that predicted by the force field in the NPT ensemble leads to a positive surface tension.

For the small bilayer and the pure liquid simulations, the nonbonded interactions were evaluated following standard GROMOS procedure. Lennard-Jones and electrostatic interactions were handled using a twin-range scheme, with short- and long-range (group based) cutoff distances set to 8 and 14 Å, respectively, and a frequency of 5 time steps for the update of the short-range pairlist and intermediate-range interactions. The mean effect of the omitted long-range electrostatic interactions was reintroduced using a reaction-field (RF) correction.⁴⁹ The corresponding RF dielectric permittivity was set to 61 as appropriate for SPC water.⁵⁰ All simulations of the small bilayers were repeated using a lattice-sum (LS) scheme. In this case, the particle-mesh Ewald (PME) method^{51,52} was applied, with a real-space cutoff distance of 10 Å, a grid spacing of 1.2 Å, and an interpolation scheme of order 4. For the large bilayer simulations, we only used PME after the initial observation that the use of RF was leading to a collapse of the bilayer. For all PME simulations, a cutoff of 14 Å was used for the Lennard-Jones interactions.

Simulation and structure files are accessible at https://github.com/patrickfuchs/CiEj_2016H66.

Table 2. Main Observables of C_iE_j, Evaluated from the Simulations and Compared to Experiments^a

	C ₁₂ E ₂	C ₁₂ E ₃	C ₁₂ E ₄	C ₁₂ E ₅	C ₁₄ E ₄
ρ (kg/m ³)					
pure	879 ± 1	900	914	928 ± 1	909
exp	913 ± 3	923 ± 3	942 ± 3	967 ± 3	945 ± 3
A (Å ²)					
small	29.7 ± 0.1	32.9 ± 0.1	36.9	41.2 ± 0.3	34.7 ± 0.5
large	29.1	33.3	36.7	–	36.3 ± 0.1
exp	32.7 ± 0.3	37.3 ± 0.3	41.1 ± 0.3	42.9 ± 0.3	41.3 ± 0.3
δ (Å)					
small	36 ± 1	36 ± 2	37 ± 1	38 ± 2	44 ± 1
large	36.0 ± 0.4	35.8 ± 0.4	36.6 ± 0.2	–	39.6 ± 0.4
exp	30.5 ± 0.1	30.8 ± 0.1	31.1 ± 0.1	32.6 ± 0.1	33.1 ± 0.1
ΔG_{flip} (kJ/mol)					
small	19 ± 2	17 ± 2	13 ± 2	13 ± 3	17 ± 2
large	14.0 ± 0.1	10.8 ± 0.5	6.6 ± 0.8	–	11.8 ± 0.5
$\Delta G_{\text{wat-perm}}$ (kJ/mol)					
small	29 ± 1	27 ± 4	20 ± 4	18 ± 4	25 ± 3
D (μm ² /s)					
small	60 ± 8	47 ± 6	41 ± 6	28 ± 3	30 ± 4
κ (kT)					
large	6.6 ± 0.1	5.2 ± 0.2	4.5 ± 0.4	–	4.8 ± 0.1
exp	5.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	–	5.4 ± 0.1

^aThe reported properties are density (ρ), area per surfactant (A), bilayer thickness (δ), flip-flop barrier (ΔG_{flip}), water-permeation barrier ($\Delta G_{\text{wat-perm}}$), lateral diffusion coefficient (D) and bending modulus (κ). κ is expressed in units of kT (1 kT equals $\sim 4.14 \times 10^{-21}$ J at 300 K). Uncertainties were evaluated using a block averaging procedure. Properties were evaluated using simulations of pure surfactants (*pure*), small (*small*), or large (*large*) bilayers. Experimental values (*exp*) were determined by Kurtisovski et al.³⁴ using a pycnometer for the density and small angle X-ray scattering for the other observables. For the large C₁₂E₅ simulation, the determination of the area, thickness, bending rigidity, and flip-flop barrier were ambiguous owing to the massive shape change, thus they are not reported (see text). When the uncertainty is not indicated, it is below 1 kg/m³ for the density and below 0.1 Å² for the area per surfactant. The procedure applied to calculate the mean and uncertainty from the simulations is explained in detail in the Supporting Information methods.

Trajectory Analyses. The simulations were analyzed in terms of density, area per surfactant, thickness, lateral diffusion, flip-flop barrier, water-permeation barrier, bending rigidity, pore area, and order parameters. Most of these analyses are described in detail in the Supporting Information. All snapshots were rendered with VMD.⁵³ All analyses concerning the small bilayers reported in the main text of this article refer to the simulations that used the RF electrostatic scheme (Table S1 reports the results on the small bilayer simulations that used the PME scheme).

We now detail the calculation of the order parameters, which is an important observable for evaluating the simulations. The order parameter S_{CH} of each methylene group was calculated using

$$S_{\text{CH}} = \frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

where θ is the angle between the C–H bond and the membrane normal (z axis), and $\langle \dots \rangle$ means ensemble averaging. Since we used a united-atom force field, hydrogens atom coordinated had to be reconstructed. We used the GROMACS tool *g_order* to this purpose. Reported S_{CH} values were calculated on the last 100 ns for each simulation (we used only one simulation for the small bilayers since both repeats gave very similar results). In addition, the convergence of S_{CH} was monitored carefully for the large bilayers (see Figure S2). Once converged, uncertainties were systematically below 0.01 unit and are thus not reported. S_{CH} is a dimensionless quantity which varies between -0.5 and 1 . However, the experimental determination of its sign can be difficult.⁵⁴ The standard is thus to report the absolute value $|S_{\text{CH}}|$. The order parameters can be evaluated experimentally by ²H or ¹³C NMR, and encompasses information on the average structure and the dynamics of C–H bonds. It is a precious observable that is often used to validate simulations.⁵⁴ Experimentally, the order parameters are deduced from quadrupolar splittings of deuterated samples or more recently from ¹H–¹³C dipolar couplings.⁵⁵ Importantly, they can be measured with high accuracy (± 0.02)⁵⁴ for both ²H and ¹³C techniques. All order

parameters presented in this study are $|S_{\text{CH}}|$ and are in the range $[0, 0.2]$ (the lower the order parameter the higher the number of orientations of the C–H vector).

RESULTS AND DISCUSSION

Bulk Liquid C_iE_j and Density. All C_iE_j surfactants considered here are known to form a bulk liquid phase at room temperature. Simulations of pure surfactants were performed to assess their density in the liquid state. During these simulations, all surfactants remained liquid. Their density is compared to experiment in Table 2. Density values derived from our simulations are systematically lower by 3–4% relative to the experimental values. This lower density is in line with the original parametrization of dimethoxyethane^{33,38} that is used as a model compound in the 2016H66 force field for vicinal polyethers.³³ Relative variations between the different surfactants are well reproduced (within less than 2%). The simulations with larger boxes containing 1200 surfactants give very similar results in terms of density (Table S2). Interestingly, we observe in these large boxes some clustering of ether oxygen atoms, similar to what is observed in a triglyceride solution⁵⁶ (the polar atoms group together without forming any specific structure). Each oxygen atom can make hydrogen bonds with a hydroxyl group. For the large C₁₂E₄ box, the occurrences of these hydrogen bonds range between ~ 0.03 hydrogen bond per surfactant for the most central oxygen (O₀) and ~ 0.16 for the hydroxyl oxygen (the latter can be donor and acceptor).

Structural Properties of Small C_iE_j Bilayers. The main structural, dynamic, and elastic properties calculated from the simulations of the small C_iE_j bilayers are compared to experimental data in Table 2. All the values presented in Table

2 come from the simulations performed with the RF scheme for computing electrostatic interactions. A few other simulations were performed with the PME scheme for $C_{12}E_4$, and all monitored properties were similar irrespective of the scheme used for electrostatics (Table S1). In all cases, the small bilayer was very stable and remained in a liquid crystalline phase (L_α).

The area per molecule is a central quantity for lamellar systems and was systematically assessed for the small bilayers. All values are well converged (see Figure S3 for the time series). Experimentally, the area per surfactant was evaluated using a geometrical model which relates the area with the density, molar mass, and bilayer thickness. The area per surfactant in the simulations is systematically underestimated by about 10% relative to the experimental value, meaning that the surfactants are slightly too packed against each other. The relative area variations between surfactants are within 5–10%.

The bilayer thickness is another commonly monitored structural quantity of lamellar systems. However, there is no single definition and it can be calculated in many ways. Experimentally, Kurtisovski et al.³⁴ evaluated the thickness from the product of the lamellar spacing (measured directly in the small-angle X-ray scattering experiments) times the membrane volume fraction (given by the amount of material in the experiment). In order to calculate a thickness compatible with that definition, we evaluated it from a transversal atom-density plot, as the distance between the two crossover points of the surfactant and water distributions (Figure S4). Consistent with the area results, the thicknesses calculated from the simulations are overestimated by 10–15% (up to 20% for $C_{14}E_4$). The relative thickness variations between surfactants are within 1–15%.

We next assessed the polar head conformations by means of dihedral distribution analysis. With 5 ether repeats, $C_{12}E_5$ was particularly interesting to compare with a single PEO molecule. The distribution for OCCO dihedrals in the small $C_{12}E_5$ bilayer simulations is shown in Figure 2 and compared to the

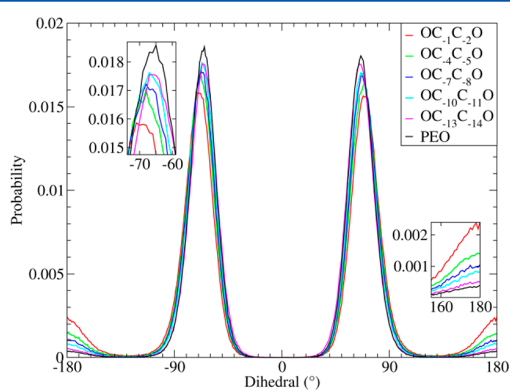


Figure 2. Distributions of OCCO dihedral angles in the small bilayers of $C_{12}E_3$ and in PEO28. Data for PEO28 were taken from ref 38, where the simulations involved one poly(ethylene oxide) molecule with 28 ether repeats in water (at full hydration). The insets show two zoomed regions around the gauche- and trans conformations.

corresponding distribution for PEO28 in water (see Figure S5 for the CCOC and COCC dihedrals as well as for the distributions of all these dihedrals in the pure small and large bilayer systems). For the OCCO dihedral, the distributions are clearly dominated by the gauche conformations. Conversely, CCOC and COCC are more populated with trans conforma-

tions. This results in some very compact conformations of the polar head. The dihedral distributions of $C_{12}E_5$ are very close to those of PEO28, indicating that the polar heads of $C_{12}E_5$ are highly hydrated almost like a single PEO molecule in water (the higher the polarity of the environment, the higher the amount of OCCO gauche conformation,³⁸ see also below the hydrogen-bond analysis). Accordingly, the amount of gauche conformations of the OCCO dihedral angle in a pure liquid $C_{12}E_5$ system is less pronounced (Figure S5). Furthermore, we can observe some subtle differences (see insets of Figure 2) upon going from the center of the bilayer ($O_{-3}CCO_0$, slightly less gauche conformation) to the water environment (more gauche conformations, almost the same as PEO28 for the last dihedral $O_{-12}CCO_{-15}$ which faces water). This feature can be explained by a slightly lower hydration of the ether functional groups that are deep in the bilayer. For CCOC and COCC, the opposite trend is observed.

The compact conformations of the polar heads, mainly result from water-bridging, that is, water molecules forming hydrogen-bonds between two consecutive ether oxygen atoms (or possibly further apart). This water-bridging promotes gauche conformations.³⁸ The amount of hydrogen bonds between water and polar heads is high in all the simulations. For instance, there is on average ~ 0.4 hydrogen-bond per ether oxygen for the small $C_{12}E_4$ bilayer (Figure S6), from ~ 0.5 for the most water exposed O_{-9} to ~ 0.3 for the most buried ether oxygen O_0 . In comparison, a fully hydrated PEO molecule has on average one hydrogen-bond per ether oxygen.³⁸ This high hydration of the polar head is a key for correctly simulating C_iE_j surfactants, because water goes very deep inside the bilayer and the polar heads are thereby much more compact. Both phenomena will increase the lateral space occupied by the molecules and thus the area per surfactant.

Dihedral analysis was also performed for the aliphatic tails as well as their connections with the polar heads. Figure 3 shows a

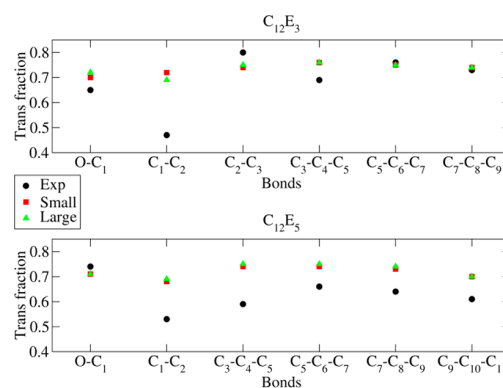


Figure 3. Trans fractions of $C_{12}E_3$ and $C_{12}E_5$. Simulation data were taken from small (red \blacksquare) and large (green \blacktriangle) simulations of $C_{12}E_3$ (top) and $C_{12}E_5$ (bottom). Experimental values (black \bullet) were taken from Raman experiments or $C_{12}E_3$ ⁵⁷ and $C_{12}E_5$.⁵⁸ The same nomenclature is used as in refs 57 and 58 for the dihedral angles: $O-C_1$ means the dihedral around that bond, $C_3-C_4-C_5$ means an average over the two dihedrals C_3-C_4 and C_4-C_5 , and so on.

comparison of selected dihedral angle trans fractions with the corresponding experimental values from Raman spectroscopy. For $C_{12}E_3$, the overall agreement between experiment and simulation is good (within 1–7%) for CCCC dihedrals and for the $C_{-1}O_0C_1C_2$ dihedral (first ether linkage connecting the aliphatic tail and the polar head). Only the $O_0C_1C_2C_3$ dihedral is

~25% above the experimental value. For $C_{12}E_5$, the simulation values are systematically 10–15% higher than experiment for the aliphatic chain, and only the $C_{-1}O_0C_1C_2$ dihedral is well-reproduced (within 3%). It is also instructive to compare these trans fractions between the two surfactants. The values observed in the simulations are similar between $C_{12}E_3$ and $C_{12}E_5$, whereas the Raman experiments suggest a decrease of trans fraction upon going from $C_{12}E_4$ to $C_{12}E_5$ (except for the $O_0C_1C_2C_3$ dihedral). A lower trans fraction means looser surfactant–surfactant packing, which likely points to a different bilayer “organization” between the two surfactants. Of all the dihedral angles, the least well-reproduced is $O_0C_1C_2C_3$, which connects the aliphatic tail and the polar head. For both $C_{12}E_3$ and $C_{12}E_5$, the fraction of trans conformations is 15–20% too high. This dihedral is the only one that was not refined in the GROMOS 53A6_{OXY+D} force field,³⁸ because it does not exist in PEO polymers. Values for the large bilayer simulations are discussed later.

Dynamic Properties of Small C_iE_j Bilayers and Water-Permeation. Next, we looked at the lateral self-diffusion of C_iE_j surfactants. The longest surfactants $C_{12}E_5$ and $C_{14}E_4$ (28 and 27 heavy atoms, respectively) diffuse more slowly (at $\sim 30 \mu\text{m}^2/\text{s}$). In contrast, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_3$, and $C_{12}E_2$ diffuse more rapidly as the number of heavy atoms decreases (25, 22, and 19 heavy atoms, respectively), up to $\sim 60 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for $C_{12}E_2$. Interestingly, the diffusion is approximately linearly correlated with the length of the surfactant (Figure S7). Conroy et al. measured $C_{12}E_2$ lateral diffusion by pulse-field gradient NMR and reported $49 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (at 62.5% weight fraction, 298.5 K)². Our value of $60 \mu\text{m}^2/\text{s}$ was obtained under slightly different conditions (70%, 300 K), and it should also be corrected to take periodic boundary conditions into account, since the direct value obtained from simulation (D^{PBC}) generally underestimates the infinite system value (D^∞) of the model.⁵⁹ In summary, the calculated value for $C_{12}E_2$ slightly overestimates the experimental value but the order of magnitude is reproduced. For comparison, experimental values for PC phospholipids determined by pulsed field gradient magic angle spinning NMR are $8.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for DOPC⁶⁰ at 298 K or $15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for DPPC at 323 K.⁶¹ Our model thus suggests that C_iE_j surfactants diffuse 2 to 6 times faster than PC phospholipids.

The vertical motion of the surfactant was also investigated. The oxygen of the hydroxyl group undergo vigorous vertical oscillations (along the normal to the bilayer) (as well as the other atoms of the polar head). For comparison, the vertical fluctuations of the O_{-12} atom in a small $C_{12}E_4$ bilayer are twice as large as that of a phosphorus atom in a DOPC phospholipid bilayer at the same temperature (Figure S8).

While being amphiphatic and forming lamellar phases, C_iE_j form bilayers that are in general much more permeable to water and where the surfactants are more prone to flip-flop compared to phospholipids. For all C_iE_j simulated in this work, we did observe water permeation and spontaneous flip-flops in the small bilayers, on the tens of nanoseconds time scale. An example of water permeation and flip-flop monitoring is shown for $C_{12}E_4$ in Figure 4. The total number of flip-flops reaches 12 events for 90 surfactants over 200 ns. However, the total number of surfactants per leaflet does not vary much. When a leaflet is enriched owing to flip-flop events in one direction, flip flops in the other direction usually occur not long after the first event. Thus, the number of surfactants per leaflet stays on average constant. This high flip-flop rate allowed us to compute a potential of mean force (PMF, Figure S9, see the Supporting Information methods) by directly binning the z positions of hydroxyl oxygen atoms (after removal of any bilayer translation along the z axis) and deduce a flip-flop

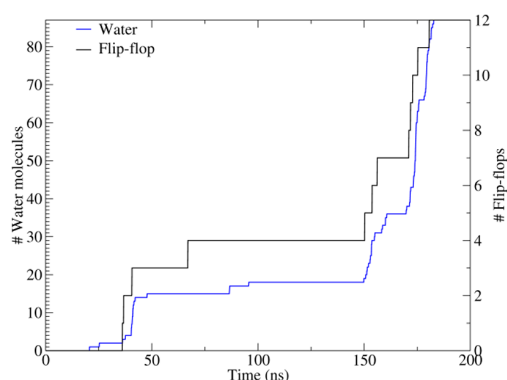


Figure 4. Cumulative number of flip-flop and water-permeation events in a small $C_{12}E_4$ bilayer.

barrier (Table 2). For a given length of aliphatic tail (e.g., 12 carbon atoms), a longer polar head leads to a smaller flip-flop barrier. This might be due to a change of surfactant shape (size of the polar head relative to that of the aliphatic tail). Interestingly, our simulations suggest a “saturation” of this trend, as $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ have the same barrier of about 13 kJ/mol. From $C_{12}E_4$ to $C_{14}E_4$, the length of the aliphatic tail increases and the barrier logically goes up because the hydrophobic thickness increases. Overall, for all C_iE_j surfactants, the barrier is within 13–19 kJ/mol, meaning that flip-flop is facilitated in these small bilayers at room temperature. In contrast, the flip-flop barrier is considerably higher in phospholipid membranes. For example, it has been estimated to be on the order of 80 kJ/mol for DPPC⁶² (at 323 K) and 100 kJ/mol for DOPC (at 300 K)⁶³ based on MD simulations.

Similarly to flip-flop, water-permeation is also very frequent. For example for the small $C_{12}E_4$ bilayer, which contains 90 surfactants and 1880 water molecules, the total number of water going spontaneously across the bilayer (either way) reaches ~ 85 molecules over 200 ns. For all surfactants, the water-permeation barrier is on the order of 18–29 kJ/mol and seems to be linearly correlated with the flip-flop barrier (Figure S10). As shown in Figure 4, flip-flop and water-permeation are often concomitant. The surfactant polar head can act as a “water-shuttle” owing to the number and strength of the ether-water and hydroxyl-water hydrogen bonds.

Both flip-flop and water-permeation in the small bilayers proceed in general through “short-lived mini pores” (very short lifetime of less than 5 ns, and very small area, of a few tens of \AA^2), and we never observe permanent or long-lived pores. In rare occasions, flip-flop events may occur without any detectable pore. In this case, the surfactant going through the alkane layer adopts a very compact conformation by forming a hydrogen-bond with itself, thereby protecting its oxygen atoms against the apolar environment (Figure S11). Water-permeation can also occur without any detectable pore. However such an event is still mediated by a surfactant carrying one or two water molecule(s), but which does not flip-flop. Surprisingly, the water-permeation barriers in phospholipid membranes are on the same order of magnitude, for example, ~ 25 kJ/mol for going through a DPPC bilayer,⁶⁴ although at a higher temperature (323 K).

Last, we did not observe any desorption events (surfactant spontaneously extracting itself from the bilayer toward the water phase) on the small bilayers for all C_iE_j surfactants.

So far, we presented results obtained with small bilayers. Simulations of large bilayers were also performed, which are

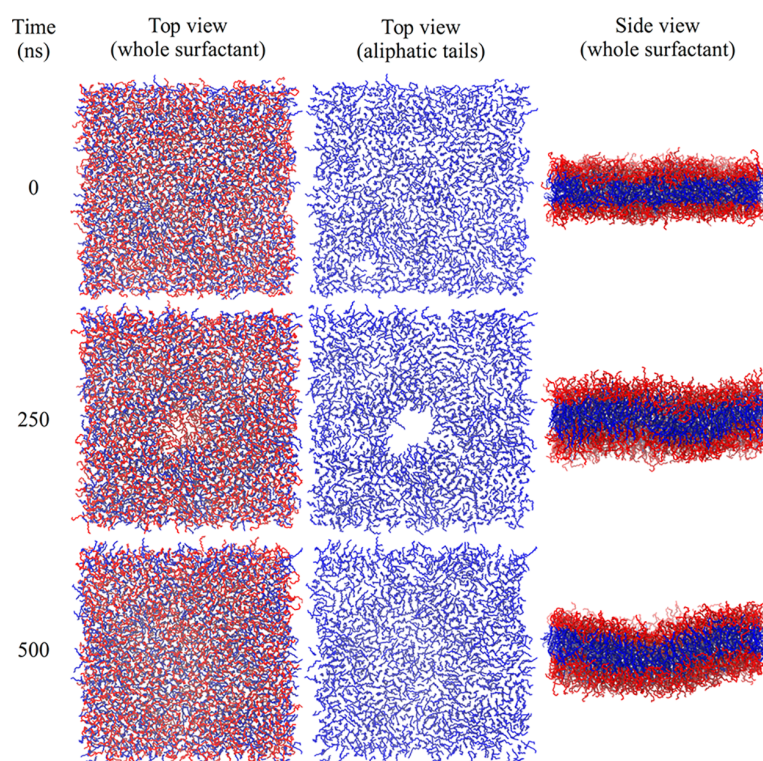


Figure 5. Evolution of the large $C_{12}E_4$ bilayer. Shown are snapshots at different times. The aliphatic tails are drawn as blue lines, the polar heads as red lines, and water is not shown for clarity. The lateral size is approximately $137 \times 137 \text{ \AA}^2$.

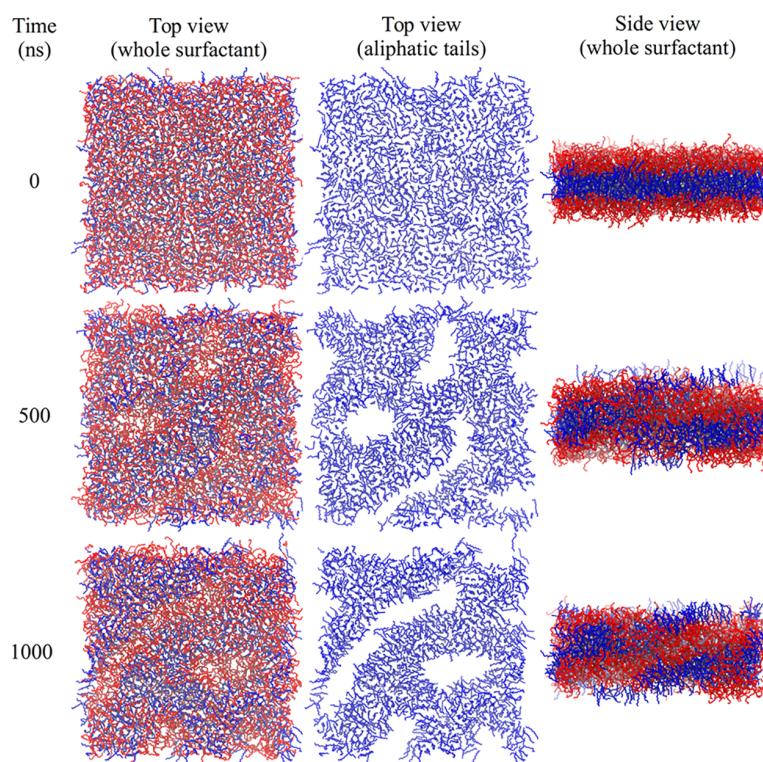


Figure 6. Evolution of the large $C_{12}E_5$ bilayer. Shown are snapshots at different times. The color coding is the same as in Figure 5. The lateral size is approximately $138 \times 138 \text{ \AA}^2$.

discussed next. These allowed us to address a number of questions: (i) what is the bending rigidity? (ii) Are some

properties changed upon going to larger patches? (iii) Ferreira et al. noticed the appearance of large pores in a large $C_{12}E_5$ bilayer,²⁶ so does it also apply to our simulations and to other surfactants?

Large C_iE_j Bilayers, Hydrophilic Pores, and Phase Change. Some properties remain essentially unchanged between small and large systems, such as the area per surfactant and membrane thickness (Table 2). The surfactant conformations (Figures 2 and 3 and Figure S5) and the numbers of hydrogen bonds between polar heads and water (Figure S6) are also very similar between the small and large systems.

However, some effects are only observed when considering the large systems. The most striking feature is the possible occurrence of large hydrophilic pores throughout the bilayer. In this kind of pores, the polar heads are oriented toward the center of the pore and allow the passage of water and hydrophilic solutes. In the simulations, the pore sections are mostly circular but some other shapes are possible such as elongated ones. Snapshots of large bilayers for $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$ are shown in Figure S12, Figure 5 and Figure 6, respectively. The top view, showing the aliphatic tails only, makes the occurrence of large pores very clear. Irrespective of the surfactant, this top view also shows that the packing is in general not uniform. Even when there is no large pore, we can observe areas with dense packing and others with loose packing. Areas with loose packing can possibly allow water-permeation and surfactant flip-flop (short-lived mini pores) or be a nucleation spot for the appearance of larger pores.

In terms of pore formation, three types of behaviors are observed in the large systems: (i) short-lived mini pores (lifetime < 5 ns and area < 100 Å²) for all surfactants (similar to those observed in the small bilayers); (ii) transient (a few tens to hundreds of nanoseconds) and large (a few hundreds of Å²) pores for $C_{12}E_4$; and (iii) large pores for $C_{12}E_5$ that eventually lead to a phase change. The large pores occurring for $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ could potentially allow for the passage of relatively large solutes. Figure 7 shows the fraction of the total area occupied by all pores as a function of time (in addition, Figure S13 shows the area of each individual pore and Figure S14 the total area occupied by all pores). Note that this area was evaluated in terms of a projection onto the xy plane (using a two-dimensional grid),

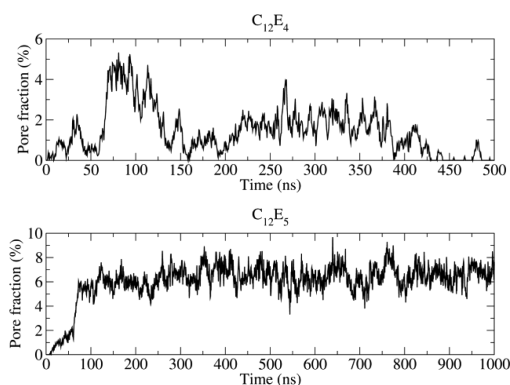


Figure 7. Fraction of the total bilayer area occupied by pores in the large $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ systems. Upper and lower panels correspond to $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$, respectively. Only the alkane part was considered for estimating the pore area. Note that there is a phase change toward a hexagonal-like phase at ~ 250 ns for $C_{12}E_5$. After that time, the area fraction no longer really characterizes pores, as the system is not a regular bilayer.

considering the aliphatic tails only. For $C_{12}E_4$, the pores last in general a few tens of nanoseconds but always tend to vanish after some time. The area occupied by pores can reach up to 5% of the total area at the most pronounced spike around 100 ns. Throughout the entire simulation, $C_{12}E_4$ remains lamellar. In contrast, pores form early in the $C_{12}E_5$ simulation, and their size suddenly rises around 60 ns. When looking at the pores in a vertical way across the aliphatic tail layer, as presented in Figure 6, middle column, it may seem that the pores are “regular” all along the trajectory. However, what we actually observe is a phase change toward a hexagonal-like phase (H_1). The change is initiated around 60 ns when some large pores suddenly expand (steep increase in Figure 7 bottom) until the system slowly relaxes to a state similar to a H_1 phase up to 1000 ns. This phase change leads to a significant change in the shape of the computational box. The vertical dimension expands whereas the lateral dimensions shrink (Figure S15). Figure 8 shows the system from a different viewpoint and makes it easier to see the “tubes” formed in this hexagonal-like phase. Note that it is not a real hexagonal phase. All tubes are still branched after 1000 ns, and the system has not relaxed toward a true H_1 . Presently, it cannot be assessed whether the simulation is trapped in a local minimum, or whether it would lead to a different structure if the system was larger and simulated for a longer time. In addition, the use of a semi-isotropic pressure coupling may prevent further box reshaping during the phase change.

The large pores have important consequences on a number of properties. First, the amount of surfactant-water hydrogen bonds increases, as exemplified in the large $C_{12}E_4$ simulation around 80–120 ns (Figure S6). Since the pores are hydrophilic, this increase can be explained by the high curvature of $C_{12}E_4$ molecules at the rim of each pore, allowing for a deeper access to water. Another possible explanation is that the low polarity of the membrane interior reduces the screening of electrostatic interactions, including hydrogen bonds.

The large pores also increase dramatically the number of flip-flop and water-permeation events (Figure S16). There is a massive increase of the water flow through the pore, and flip-flop is facilitated since the pores are hydrophilic (polar heads pointing toward the center of the pore). As a result, the flip-flop barrier is decreased when large pores are present (Table 2). For example, the value for $C_{12}E_4$ is smaller (~ 7 kJ/mol) than that for the other surfactants which do not form large pores ($\geq \sim 12$ kJ/mol). These barriers are all remarkably low compared to PC phospholipids, for which they can reach 80–100 kJ/mol depending on the composition^{62,63} and the conditions. In all studies on phospholipids, flip-flop events were observed to be pore-mediated,⁶² and the enormous free-energy barrier was precisely attributed to the cost of pore formation. This makes flip-flop very rare events for PC phospholipids. Instead, the very low barrier for C_iE_j makes flip-flops occur on the tens of nanoseconds time scale. The large difference in the barrier can be explained by two main reasons: (i) the alkane layer of C_iE_j surfactants is considerably less difficult to cross (only one tail in the surfactant, reduced bilayer thickness, higher permeability to water and increased propensity to form pores) and (ii) the head is less polar (no net charge as in zwitterionic phospholipids).

Last, some finite-size effects are observed in the simulations. The large pores are only able to form in the large systems but not in the small ones. This has been pointed out in another study.²⁶ A small box size artificially keeps the system too ordered and impairs pore expansion. One can also notice that the flip-flop barrier of large bilayers is systematically ~ 5 kJ/mol smaller than

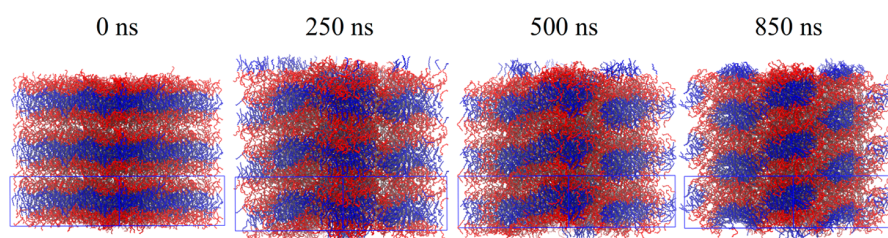


Figure 8. Phase transition in the large $C_{12}E_5$ bilayer. The system is replicated three times along the z direction. Box edges are shown as blue lines. The view angle has been chosen so that one can easily see the “tubes” at the end of the simulation. The color coding is the same as in Figure 5.

that of small bilayers, irrespective of whether large pores are present or not. Since all flip-flop barrier values have converged, we attribute this difference to a finite-size effect rather than to a lack of sampling. Water-permeation and flip-flop events are also artificially impaired when using a too small box size. For these reasons, the properties evaluated on large bilayers are probably more reliable. Another difference between the small and large systems concerns the scheme for computing electrostatic interactions (RF or PME). The scheme has only a marginal effect on the properties calculated for the small bilayers (Table S2). However, the use of RF for the large systems leads to a collapse of the bilayer. A buckle initially forms, and the lateral dimensions shrink until the collapse. In contrast, using the PME scheme maintains the bilayer structure. We thus recommend the use of PME for simulating large C_iE_j bilayers.

Order Parameters of C_iE_j Surfactants. Figure 9 shows the order parameters $|S_{CH}|$ for $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$ from the

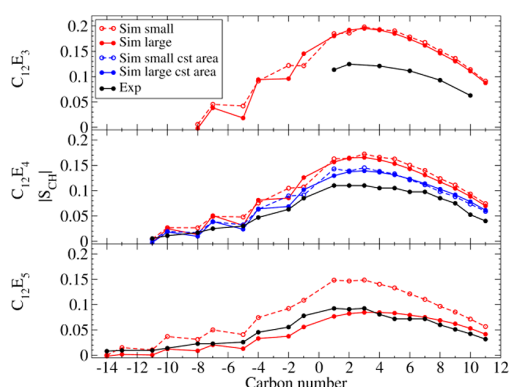


Figure 9. Order parameters $|S_{CH}|$ of $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$. Experimental values are taken from ref 66 (wt fraction: 50%, temperature: 300 K) for $C_{12}E_3$, ref 65 (60%, 298 K) for $C_{12}E_4$, and ref 26 (80%, 298 K) for $C_{12}E_5$. The simulation conditions are $C_{12}E_3$ (46%, 300 K), $C_{12}E_4$ (49%, 300 K), and $C_{12}E_5$ (75%, 300 K). The simulation values are systematically computed considering the last 100 ns. The errors on the order parameters from the simulations are always very low (<0.01) and are thus not reported. The blue curves correspond to the $C_{12}E_4$ simulations at constant area. Figure S17 (panel e) shows a zoom of the different curves for $C_{12}E_4$.

simulations and compared to experimental values^{26,65,66} from 2H and ^{13}C solid state NMR. The results from the simulations of $C_{12}E_4$ at constant area are also shown. Note that simulation and experiment do not exactly match the same point in the phase diagram but are very close, within a maximum deviation of 10% in terms of surfactant weight fraction, and 2 K in terms of temperature. All experimental data were taken within the L_α phase, and the representative point is within the L_α phase for all simulations as well.

For $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$, the surfactants for which experimental data is available, the experimental $|S_{CH}|$ is much lower (~ 0.1 for the carbons C_1 and C_2 which are connected to the polar head) with respect to what is generally observed for phospholipids (around ~ 0.2 for POPC at room temperature⁶⁷). In addition, there are slight differences between the different surfactants presented in Figure 9. The values for the C_2 carbon are 0.125, 0.110, and 0.091 for $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$, respectively. Lengthening the polar head has thus an effect on the aliphatic tails and on the bilayer structure. Last, the order parameter for the polar heads is extremely low (below 0.1), and reaches almost 0 for the hydroxyl group of $C_{12}E_5$, meaning that all orientations are almost equally likely. This correlates well with the important vertical motion of hydroxyl oxygen atoms (Figure S8) discussed above.

Different behaviors for the three surfactants $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$ (also for $C_{12}E_4$ at constant area) are observed when comparing the calculated order parameters to the experimental, which we discuss now in detail.

For the large $C_{12}E_3$ bilayers, for which we do not observe any large pore, the order parameter values are in the range of 0.19–0.20 for the carbon atoms C_1 and C_2 and can be 0.06–0.07 unit above the experimental value. In addition, the global shape of the curve is not reproduced. The progressive increase upon going from C_{11} to C_2 is much steeper in the simulation than in experiment. The large bilayer has slightly lower order parameters than the small one, but overall they are both too ordered.

For $C_{12}E_4$, the order parameters are also too high for both bilayers. However, the large one has order parameters slightly lower than the small one. Interestingly, in the large $C_{12}E_4$ simulation at 80 ns, the order parameters decrease for a while (Figure S2), which is concomitant with the occurrence of the largest pores in the simulation (Figure 7 top). At this point, the order parameter of the C_1 atom reaches 0.14, which is 0.03 unit away from the experimental value of 0.11. There are exactly 3 pores (Figure S13, top panel) which amount to $\sim 5\%$ of the total box area and represent a total area of $\sim 700\text{--}900 \text{ \AA}^2$ (Figure S14, top panel). When these large pores disappear, the order parameter increases back to its initial value. As previously noted by Ferreira et al.,²⁶ the occurrence of large membrane pores has an important effect on the order parameters. The reason why pores make the order parameters decrease is the higher number of orientations C_iE_j can take when they are involved in the pore. Our simulation has clearly not yet converged pore-wise, and simulating beyond 500 ns would possibly make some other large pores appear again. We can also hypothesize that simulating an even larger system would allow for the occurrence of more pores, similar to the coarse-grained study by Loison et al.³² However, the computational cost would be very high (our system already encompasses ~ 90000 atoms).

For both small and large $C_{12}E_4$ simulations at constant area (blue curves in Figure 9), the order parameters logically go down with respect to the simulations at variable area. Since we artificially increase the area per surfactant, there is more freedom for the hydrocarbon chains. Nonetheless, we can clearly see that this is not sufficient to reach the experimental order parameters. Imposing a constant area has also a massive effect on the pore sizes. In $C_{12}E_4$ at variable area, the maximum pore fraction is $\sim 5\%$, whereas at constant area, it plateaus around 10% with one very large and stable pore of $\sim 2000 \text{ \AA}^2$ plus one other transient and smaller one (Figure S17, panels c and d). Interestingly, the order parameters again slightly go down during the large simulation and then go up again. Figure S17 presents a thorough analysis of the dependence of the order parameters on the geometry of the pores. Although the pore fraction remains essentially constant after 100 ns (around 10% of the total area), the order parameters are the lowest around 220–240 ns, and at this specific moment there are two pores. This means that, in order to reproduce the order parameters, not only should pores be present, but they also need to be abundant. For a given total pore area, the order parameters are lower in the presence of multiple small pores than when there is a single large one. Having more pores for a given total pore area maximizes their contour lengths (the total circumference of two circles of area $A/2$ is larger than the circumference of a single circle of area A). The direct relationship between the total contour length of pores and the order parameters can be easily explained in the following way. If the total contour length increases, there are more surfactants that have access to “horizontal” conformations at the rim of the pores, thereby decreasing the order parameters.

For the $C_{12}E_5$ system, which undergoes a change toward a hexagonal-like phase, the agreement with experimental order parameters is very good for the large system, that is twice larger. For the large $C_{12}E_5$ system, the shape of the curve is well reproduced, and the agreement is also very good for the polar heads. It is important to stress that many hundreds of ns (~ 700 ns) were necessary to obtain this result on the large $C_{12}E_5$ system (Figure S2). The convergence of the order parameters is in this case very slow, because the phase change is a slow process.

Although the order parameters of the large $C_{12}E_5$ system are in very good agreement with NMR data, the transition toward a hexagonal-like phase should not occur. At the chosen weight fraction and temperature (75%, 300 K) $C_{12}E_5$ should form a lamellar phase⁸ (see Figures S1 and S18). Ferreira et al. simulated several points within the L_α phase of $C_{12}E_5$ ²⁶ using the GROMOS 45A3 force field³⁹ modified by Shang et al.⁴⁰ They systematically found pores and possibly some transitions toward a hexagonal-like phase. They considered the formation of pores as “realistic”, since their occurrence was leading to an excellent reproduction of the experimental order parameters, but the transition toward a hexagonal-like phase was, according to them, an artifact due to the too small box size and too short-simulation time. Here we simulated a system that is twice larger (1024 surfactants vs 512), with a force field that has been optimized for polyethers³³ (2016H66), and for a longer time (1000 ns vs 500 ns), and we also found a transition toward a hexagonal-like phase in the 1 μs simulation. However, the SAXS data presented in Figure S18 and the phase diagram of Figure S1 unambiguously demonstrate that $C_{12}E_5$ is experimentally in the lamellar phase (presence of a Bragg peak) under the conditions employed in the simulations (49%, 300 K). Thus, the observed phase transition is clearly an artifact. We cannot know another simulation of a large $C_{12}E_5$ system would lead to the same phase change. Similarly,

Ferreira et al. could not be sure of what is the real phase for their model.

So what is the true lamellar structure of C_iE_j ? In agreement with the conclusions of Ferreira et al. for $C_{12}E_5$,²⁶ our results suggest that a bilayer with pores is probably the right hypothesis. Pore occurrence provides a highly plausible hypothesis for explaining the low order parameters (about 0.1 unit at the head/tail connection) in a phase that remains a lamellar phase. Some studies using CG models are also compatible with the occurrence of pores defects within the surfactant bilayer.^{31,32,68} In the work of Loison et al., a generic CG model was used to study stacks of bilayers made of a tetrameric surfactant (two hydrophilic and two hydrophobic beads) which would correspond to C_6E_3 . Interestingly, they observed spontaneous pore formation in tensionless bilayers could thus be a general feature of these amphiphilic molecules. Experimentally, some studies published on different C_iE_j surfactants using X-ray scattering and/or NMR,^{69,70} FRAP,⁷¹ EPR,⁷² or water-in-oil emulsions,⁷³ also postulated the existence of pore defects within the lamellar phase. However, the observation of pores in all these systems was indirect. Rancon et al. studied by X-ray scattering and NMR the structural fluctuations of $C_{12}E_6$ near specific phase transitions (lamellar to cubic and hexagonal).⁷⁰ In the lamellar to cubic transition, they could explain the experimental results by postulating a fragmentation of the lamellae into cylinders. Later, another NMR study confirmed these findings, and the existence of pores in the lamellar phase of $C_{12}E_6$ was again involved to explain the experimental results.⁶⁹ In the water-in-oil experiments, the authors studied water droplets coated by a C_iE_j monolayer within oil.⁷³ By approaching two such droplets, one can form droplet interface bilayers (DIB). The authors could only observe DIBs using pure $C_{12}E_2$, and were unable to form DIBs using $C_{12}E_4$ or $C_{12}E_5$. In DIBs involving pure $C_{12}E_2$, the addition of more than 5% of $C_{12}E_4$ or $C_{12}E_5$ caused a full destabilization of the DIBs. Our results are compatible with these experimental observations. The small pores in $C_{12}E_2$ do not break the bilayer and keep the DIBs stable. In contrast, larger pores in $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ impair DIB formation. The above experimental observations strongly suggest that the lamellar phase of $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$ surfactants contain pore defects, explaining in particular the comparatively low order parameters of the hydrocarbon chain.^{26,65,66} However, it may not be the case for all C_iE_j surfactants (such as $C_{12}E_2$ and $C_{14}E_4$).

The pore hypothesis appears to be the most plausible, in particular for explaining the low order parameters. Since the large $C_{12}E_4$ bilayer simulation samples various values of the order parameters and involves pores of different sizes, we can use this data to assess how both observables are correlated. In Figure S19, we show a plot of the order parameters versus the total contour length of pores. Interestingly, these two observables appear to be linearly correlated. We can thus use this relationship to extrapolate the total contour length that would be required to reach the experimental order parameters. This leads to an estimate of about 400 \AA . Using the total area of the system ($137 \text{ \AA} \times 137 \text{ \AA}$), we can calculate the fraction of area occupied by pores in order to have a total contour length of 400 \AA . For example, 4 pores of contour length 100 \AA would correspond to $\sim 17\%$ of the total membrane area, 8 pores of contour length 50 \AA would correspond to $\sim 8.5\%$, and 10 pores of 40 \AA of contour length would correspond to $\sim 6.8\%$ of this area. This simple reasoning suggests that having many small pores is more plausible, since the total membrane surface area occupied by pores cannot go beyond a certain threshold in a tensionless bilayer.

Bending Rigidity of C_iE_j Surfactants. The large surfactant bilayers have a total area on the order of $100\text{--}150 \times 100\text{--}150 \text{ \AA}^2$, the membrane is thus free to undergo thermal undulations. Using the Helfrich framework, the bending modulus κ can be estimated from these undulations^{74,75} (see Figure S20 for the fluctuation spectra). The simulation results are compared to experimental values³⁴ in Figure 10 and Table 2. Using theoretical arguments,

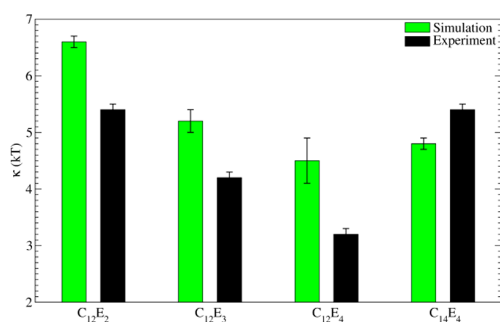


Figure 10. Bending modulus κ of different C_iE_j surfactants from the large bilayer simulations and from experiments. κ values are expressed in units of kT (see Table 2). Experimental values are taken from ref 34. Numerical values are reported in Table 2.

Helfrich derived a swelling law^{76,77} that relates the interlamellar distance to the membrane bending rigidity. Experimentally, Kurtisovski et al. measured this interlamellar distance by SAXS experiments at different hydration levels and determined κ . Note that these authors could not attain a value for $C_{12}E_5$ due to a phase change from L_α to L_1 (micelle) upon increasing swelling (see the phase diagram in Figure S1 and the spectra in Figure S17). The simulations give values in the range 4–6 kT , in good agreement with the experimental values (with deviations of 1–2 kT). Importantly, the trends along the surfactant series are essentially reproduced. Upon going from $C_{12}E_4$ to $C_{12}E_2$ and then to $C_{14}E_4$, the rigidity increases in both experiments and simulations. Upon increasing the aliphatic tail length or decreasing the polar head length, the bending rigidity of the bilayer is enhanced. For comparison, the bending moduli of phospholipid bilayers are well above 10 kT ⁷⁸ at 303 K and can go beyond 20 kT depending on the composition (degree of unsaturation, etc.). The rigidity of C_iE_j bilayers is about 3 to 5 times lower than that of phospholipids bilayers, meaning that the former are much more floppy than the latter.

CONCLUSIONS

In the present study, we investigated the properties of $C_{12}E_2$, $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, and $C_{14}E_4$ surfactants in the lamellar phase using the recently developed GROMOS 2016H66 force field. Our simulations represent the first systematic comparative study considering several different C_iE_j within a single atomistic force field. We calculated several structural (area, thickness, polar head conformation, order parameters), dynamic (lateral diffusion), thermodynamic (density, flip-flop and water-permeation barriers), and elastic (bending rigidity) properties. Overall, our simulations reproduce well a number of these properties as well as their trends along the surfactant series, showing the global transferability of our force-field parameters. For all surfactants simulated in this work, the polar head is well hydrated, as much as a PEO molecule at full hydration. This originates from very compact conformations of the polar heads and affects the collective behavior of C_iE_j surfactants. Our simulations also show

for the first time that C_iE_j bilayers are much more “floppy” than phospholipid PC bilayers. They are easier to bend, easier to permeate, and they spontaneously form pores under thermal fluctuations. All these properties are important determinants for accommodating membrane proteins.

In line with a number of other theoretical and experimental studies in literature, our results suggest the presence of hydrophilic pores within the lamellar phase of $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$, which reduces the order parameters toward values much smaller (~ 0.1 unit at the head-tail connection) than those commonly found in phospholipid PC bilayers (~ 0.2 unit). We find that it is mandatory to simulate large systems (at least $130 \times 130 \text{ \AA}^2$) because these hydrophilic pores are unable to form in small bilayers (below $50 \times 50 \text{ \AA}^2$). Our work also suggests that these pores should be abundant and thus have an intermediate size (not as large as in the $C_{12}E_4$ constant area simulation, but sufficiently large to reach a lifetime of a few tens of nanoseconds) in order to reproduce the NMR order parameters.

Reproducing the correct structure of the lamellar phase as well as the appropriate phase behavior is nonetheless a difficult challenge for atomistic simulations: (i) even if the 2016H66 force field has been refined independently based on pure liquid as well as polar and apolar solvation properties of small molecules, and the parameters of the alkane tail and PEO head have been thoroughly validated on their own, pore occurrence and phase behavior can be very sensitive to force field details such as a single dihedral torsion and (ii) one needs to simulate very large systems over very long time scales, which may not be achievable for atomistic simulations. Even if our simulations reproduce qualitatively well many structural, dynamic, and elastic properties, some discrepancies remain, in particular in terms of the equilibrium phase of $C_{12}E_5$, the area per surfactant which is globally overestimated by $\sim 10\%$, and the order parameters of $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, and $C_{12}E_5$ (the surfactants for which experimental values are available).

Overall, the present work shows that the 2016H66 force field represents a good starting point for simulating C_iE_j surfactants. It also suggests that the refinement of the $O_0C_1C_2C_3$ dihedral angle connecting the aliphatic tail and the polar head could further improve the reproduction of C_iE_j properties. Since we found a direct relationship between the order parameters and the pore contour length, another interesting direction will be to investigate the physics of pore occurrence, especially computing the line tension at their rim. The free energy cost of pore formation as well as the stress distribution along the normal to the membrane (lateral pressure profile) will also be interesting to evaluate.

Our work paves the way toward getting a force field able to reproduce the complex phase behavior of C_iE_j surfactants and simulating their interactions with other important biological molecules such as membrane proteins. Further work will test some longer surfactants (e.g., $C_{12}E_8$ which is commonly used for purifying and crystallizing membrane proteins). Having in hand sound parameters for this kind of simulations will be extremely useful to the membrane protein structure community.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01348.

Supplementary methods: self-assembly procedure for generating small bilayers, general considerations for simulation analyses, density, area per surfactant, bilayer thickness, dihedral angle distributions, lateral self-diffusion, bending rigidity, flip-flop and water permeation barrier, flip-flop and water permeation monitoring, pore area monitoring; supplementary tables: effect of the electrostatic scheme on the small bilayer properties and density of the different pure C_iE_j systems for the small and large boxes; and supplementary figures: phase diagrams, convergence of the order parameters, time series of the area per surfactant, determination of the membrane thickness from a density plot, distributions of polar head dihedral angles, hydrogen bonds between the polar head and water in the small and large bilayers, lateral self-diffusion as a function of surfactant length for the small bilayers, density plot showing the vertical fluctuations, potential of mean force, relationship between the flip-flop and water-permeation barriers, illustration of a $C_{12}E_4$ flip-flop without pore, evolution of the large $C_{12}E_3$ bilayer, area of individual pores in bilayer systems, total area occupied by pores in the large systems, time series of the box dimensions for the large systems, flip-flop and water-permeation in the large systems, thorough analysis of a large $C_{12}E_4$ bilayer simulation, SAXS spectra of $C_{12}E_5$ -water mixtures, relationship between the order parameter of the C_1 atom and the total contour length of pores for the large bilayer simulations, and height fluctuations of the large bilayers (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: patrick.fuchs@univ-paris-diderot.fr.

ORCID

Bruno A. C. Horta: 0000-0002-3952-1474

Nicolas Taulier: 0000-0003-1017-1068

Patrick F. J. Fuchs: 0000-0001-7117-994X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

P.F.J.F. thanks Luca Monticelli and Samuli Ollila for useful discussions. B.A.C.H. acknowledges the Brazilian agency FAPERJ for financial support (Grants E-26/203.198/2016 and E-26/010.002420/2016).

ABBREVIATIONS

C_iE_j , polyoxyethylene glycol alkyl ether; $C_{12}E_2$, diethylene glycol monododecyl ether; $C_{12}E_3$, triethylene glycol monododecyl ether; $C_{12}E_4$, tetraethylene glycol monododecyl ether; $C_{12}E_5$, pentaethylene glycol monododecyl ether; $C_{14}E_4$, tetraethylene glycol monotetradecyl ether; NMR, nuclear magnetic resonance; MD, molecular dynamics; PC, phosphatidylcholine; CMC, critical micelle concentration; RF, reaction field; PME, particle mesh Ewald

REFERENCES

- (1) Dong, R.; Hao, J. Complex Fluids of Poly(oxyethylene) Monoalkyl Ether Nonionic Surfactants. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (9), 4978–5022.
- (2) Conroy, J. P.; Hall, C.; Leng, C. A.; Rendall, K.; Tiddy, G. J. T.; Walsh, J.; Lindblom, G. Nonionic surfactant phase behavior. The effect of CH₃ capping of the terminal OH. Accurate measurements of cloud

curves. In *Surfactants and Macromolecules: Self-Assembly at Interfaces and in Bulk*; Steinkopff: 1990; Vol. 82, pp 253–262.

(3) Einaga, Y. Wormlike Micelles of Polyoxyethylene Alkyl Ethers C_iE_j . *Polym. J.* **2009**, *41* (3), 157–173.

(4) Gradzielski, M.; Langevin, D.; Sottmann, T.; Strey, R. Droplet microemulsions at the emulsification boundary: The influence of the surfactant structure on the elastic constants of the amphiphilic film. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106* (19), 8232–8238.

(5) Lai, H.-H.; Chen, L.-J. Liquid-Liquid Equilibrium Phase Diagram and Density of Three Water + Nonionic Surfactant C_iE_j Binary Systems. *J. Chem. Eng. Data* **1999**, *44* (2), 251–253.

(6) Rosen, M. J.; Cohen, A. W.; Dahanayake, M.; Hua, X. Y. Relationship of structure to properties in surfactants. 10. Surface and thermodynamic properties of 2-dodecylpoly(ethenoxyethanol)s, $C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_xOH$, in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (4), 541–545.

(7) Nibu, Y.; Inoue, T. Phase Behavior of Aqueous Mixtures of Some Polyethylene Glycol Decyl Ethers Revealed by DSC and FT-IR Measurements. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205* (2), 305–315.

(8) Mitchell, D. J.; Tiddy, G. J. T.; Waring, L.; Bostock, T.; McDonald, M. P. Phase behaviour of polyoxyethylene surfactants with water. Mesophase structures and partial miscibility (cloud points). *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1983**, *79* (4), 975–1000.

(9) Lynch, M. L.; Kochvar, K. A.; Burns, J. L.; Laughlin, R. G. Aqueous-Phase Behavior and Cubic Phase-Containing Emulsions in the $C_{12}E_2$ -Water System. *Langmuir* **2000**, *16* (7), 3537–3542.

(10) Fernandez, P.; Willenbacher, N.; Frechen, T.; Kühnle, A. Vesicles as rheology modifier. *Colloids Surf., A* **2005**, *262*, 204–210.

(11) Garavito, R. M.; Ferguson-Miller, S. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32403–32406.

(12) Garavito, R. M.; Picot, D. The Art of Crystallizing Membrane Proteins. *Methods* **1990**, *1*, 57–69.

(13) Jia, Y.; Narayanan, J.; Liu, X.-Y.; Liu, Y. Investigation on the Mechanism of Crystallization of Soluble Protein in the Presence of Nonionic Surfactant. *Biophys. J.* **2005**, *89* (6), 4245–4251.

(14) le Maire, M.; Champeil, P.; Møller, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1508* (1–2), 86–111.

(15) Seddon, A. M.; Curnow, P.; Booth, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2004**, *1666*, 105–117.

(16) Gambin, Y.; Lopez-Esparza, R.; Reffay, M.; Sierecki, E.; Gov, N. S.; Genest, M.; Hodges, R. S.; Urbach, W. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (7), 2098–102.

(17) Gambin, Y.; Reffay, M.; Sierecki, E.; Homble, F.; Hodges, R. S.; Gov, N. S.; Taulier, N.; Urbach, W. Variation of the lateral mobility of transmembrane peptides with hydrophobic mismatch. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (10), 3559–66.

(18) Reffay, M.; Gambin, Y.; Benabdelhak, H.; Phan, G.; Taulier, N.; Ducruix, A.; Hodges, R. S.; Urbach, W. Tracking membrane protein association in model membranes. *PLoS One* **2009**, *4* (4), e5035.

(19) Rayan, G.; Adrien, V.; Reffay, M.; Picard, M.; Ducruix, A.; Schmutz, M.; Urbach, W.; Taulier, N. Surfactant Bilayers Maintain Transmembrane Protein Activity. *Biophys. J.* **2014**, *107* (5), 1129–1135.

(20) Yuan, F.; Wang, S.; Larson, R. G. Potentials of Mean Force and Escape Times of Surfactants from Micelles and Hydrophobic Surfaces Using Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2015**, *31* (4), 1336–1343.

(21) Sterpone, F.; Pierleoni, C.; Briganti, G.; Marchi, M. Molecular Dynamics Study of Temperature Dehydration of a $C_{12}E_6$ Spherical Micelle. *Langmuir* **2004**, *20* (11), 4311–4314.

(22) Sterpone, F.; Pierleoni, C.; Briganti, G.; Marchi, M. Structure and Dynamics of Hydrogen Bonds in the Interface of a $C_{12}E_6$ Spherical Micelle in Water Solution: A MD Study at Various Temperatures. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (37), 18254–18261.

(23) Abel, S. p.; Waks, M.; Marchi, M.; Urbach, W. Effect of Surfactant Conformation on the Structures of Small Size Nonionic Reverse

- Micelles: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir* **2006**, *22* (22), 9112–9120.
- (24) Elola, M. D.; Rodriguez, J. Structure and Dynamics of Nonionic Surfactants Adsorbed at Vacuum/Ionic Liquid Interfaces. *Langmuir* **2013**, *29* (44), 13379–13387.
- (25) Bandyopadhyay, S.; Tarek, M.; Lynch, M. L.; Klein, M. L. Molecular Dynamics Study of the Poly(oxyethylene) Surfactant C12E2 and Water. *Langmuir* **2000**, *16* (3), 942–946.
- (26) Ferreira, T. M.; Topgaard, D.; Ollila, O. H. S. Molecular Conformation and Bilayer Pores in a Nonionic Surfactant Lamellar Phase Studied with 1H-13C Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2014**, *30* (2), 461–469.
- (27) Shinoda, W.; DeVane, R.; Klein, M. L. Computer simulation studies of self-assembling macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22* (2), 175–186.
- (28) Shinoda, W.; DeVane, R.; Klein, M. L. Multi-property fitting and parameterization of a coarse grained model for aqueous surfactants. *Mol. Simul.* **2007**, *33* (1–2), 27–36.
- (29) Shinoda, W.; DeVane, R.; Klein, M. L. Coarse-grained molecular modeling of non-ionic surfactant self-assembly. *Soft Matter* **2008**, *4* (12), 2454–2462.
- (30) Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (27), 7812–7824.
- (31) Rossi, G.; Fuchs, P. F. J.; Barnoud, J.; Monticelli, L. A Coarse-Grained MARTINI Model of Polyethylene Glycol and of Polyoxyethylene Alkyl Ether Surfactants. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (49), 14353–14362.
- (32) Loison, C.; Mareschal, M.; Schmid, F. Pores in bilayer membranes of amphiphilic molecules: Coarse-grained molecular dynamics simulations compared with simple mesoscopic models. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121* (4), 1890–1900.
- (33) Horta, B. A. C.; Merz, P. T.; Fuchs, P. F. J.; Dolenc, J.; Riniker, S.; Hünenberger, P. H. A GROMOS-Compatible Force Field for Small Organic Molecules in the Condensed Phase: The 2016H66 Parameter Set. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (8), 3825–3850.
- (34) Kurtisovski, E.; Taulier, N.; Ober, R.; Waks, M.; Urbach, W. Molecular Origin of Model Membrane Bending Rigidity. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (25), 258103.
- (35) Lund, S.; Orłowski, S.; de Foresta, B.; Champeil, P.; le Maire, M.; Möller, J. V. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (9), 4907–4915.
- (36) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1656–1676.
- (37) Horta, B. A. C.; Fuchs, P. F. J.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. New Interaction Parameters for Oxygen Compounds in the GROMOS Force Field: Improved Pure-Liquid and Solvation Properties for Alcohols, Ethers, Aldehydes, Ketones, Carboxylic Acids, and Esters. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (4), 1016–1031.
- (38) Fuchs, P. F. J.; Hansen, H. S.; Hünenberger, P. H.; Horta, B. A. C. A GROMOS Parameter Set for Vicinal Diether Functions: Properties of Polyethyleneoxide and Polyethyleneglycol. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (10), 3943–3963.
- (39) Schuler, L. D.; Daura, X.; van Gunsteren, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22* (11), 1205–1218.
- (40) Shang, B. Z.; Wang, Z.; Larson, R. G. Molecular Dynamics Simulation of Interactions between a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle and a Poly(Ethylene Oxide) Polymer. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (10), 2888–2900.
- (41) Marrink, S. J.; Lindahl, E.; Edholm, O.; Mark, A. E. Simulation of the Spontaneous Aggregation of Phospholipids into Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (35), 8638–8639.
- (42) Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (3), 435–447.
- (43) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular Forces*, Pullman, B., Ed.; Reidel Publishing Company: Dordrecht, The Netherlands, 1981; pp 331–342.
- (44) Hockney, R. W.; Goel, S. P.; Eastwood, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. *J. Comput. Phys.* **1974**, *14* (2), 148–158.
- (45) Hess, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (1), 116–122.
- (46) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (8), 952–962.
- (47) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (1), 014101–7.
- (48) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52* (12), 7182–7190.
- (49) Tironi, I. G.; Sperb, R.; Smith, P. E.; van Gunsteren, W. F. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102* (13), 5451–5459.
- (50) Heinz, T. N.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. Comparison of four methods to compute the dielectric permittivity of liquids from molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (3), 1125–1136.
- (51) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N [center-dot] log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.
- (52) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593.
- (53) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14* (1), 33–38.
- (54) Botan, A.; Favela-Rosales, F.; Fuchs, P. F. J.; Javanainen, M.; Kanduc, M.; Kulig, W.; Lamberg, A.; Loison, C.; Lyubartsev, A.; Miettinen, M. S.; Monticelli, L.; Maatta, J.; Ollila, O. H. S.; Retegan, M.; Rog, T.; Santuz, H.; Tynkkynen, J. Toward Atomistic Resolution Structure of Phosphatidylcholine Headgroup and Glycerol Backbone at Different Ambient Conditions. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (49), 15075–15088.
- (55) Ferreira, T. M.; Medronho, B.; Martin, R. W.; Topgaard, D. Segmental order parameters in a nonionic surfactant lamellar phase studied with 1H-13C solid-state NMR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (39), 6033–6038.
- (56) Bacle, A.; Gautier, R.; Jackson, C. L.; Fuchs, P. F. J.; Vanni, S. Interdigitation between Triglycerides and Lipids Modulates Surface Properties of Lipid Droplets. *Biophys. J.* **2017**, *112* (7), 1417–1430.
- (57) Masatoki, S.; Ohno, K.; Yoshida, H.; Matsuura, H. Conformational Analysis of Nonionic Surfactants in Water by a Selective Monodeuteration Method. C-D Stretching Infrared Spectroscopy of alpha-Monodeuterododecyl-omega-hydroxytris(oxyethylene)s. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (20), 8487–8498.
- (58) Tonegawa, A.; Ohno, K.; Matsuura, H.; Yamada, K.; Okuda, T. A Combined Raman and Deuterium NMR Spectroscopic Study on the Molecular and Phase Structure of a Nonionic Surfactant C12E5 Water System. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (51), 13211–13223.
- (59) Venable, R. M.; Ingolfsson, H. I.; Lerner, M. G.; Perrin, B. S.; Camley, B. A.; Marrink, S. J.; Brown, F. L. H.; Pastor, R. W. Lipid and Peptide Diffusion in Bilayers: The Saffman-Delbrück Model and Periodic Boundary Conditions. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 3443–3457.
- (60) Lindblom, G.; Oradd, G. Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788* (1), 234–244.
- (61) Scheidt, H. A.; Huster, D.; Gawrisch, K. Diffusion of Cholesterol and Its Precursors in Lipid Membranes Studied by 1H Pulsed Field Gradient Magic Angle Spinning NMR. *Biophys. J.* **2005**, *89* (4), 2504–2512.

- (62) Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. Lipids Out of Equilibrium: Energetics of Desorption and Pore Mediated Flip-Flop. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (38), 12462–12467.
- (63) Vamparys, L.; Gautier, R.; Vanni, S.; Bennett, W. F.; Tieleman, D. P.; Antonny, B.; Etchebest, C.; Fuchs, P. F. Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* **2013**, *104* (3), 585–93.
- (64) Orsi, M.; Essex, J. W. Chapter 4 Passive Permeation Across Lipid Bilayers: A Literature Review. In *Molecular Simulations and Biomembranes: From Biophysics to Function*; The Royal Society of Chemistry: 2010; pp 76–90.
- (65) Klose, G.; Mädler, B.; Schäfer, H.; Schneider, K.-P. Structural Characterization of POPC and C12E4 in Their Mixed Membranes at Reduced Hydration by Solid State 2H NMR. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (15), 3022–3029.
- (66) Tonegawa, A.; Ohno, K.; Matsuura, H.; Yamada, K.; Okuda, T. Conformational Dynamics of Alkyl Chains in the Lamellar Phase of a Nonionic Surfactant C12E3 Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance. *Chem. Lett.* **2000**, *29* (4), 324–325.
- (67) Ferreira, T. M.; Coreta-Gomes, F.; Ollila, O. H. S.; Moreno, M. J.; Vaz, W. L. C.; Topgaard, D. Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state 1H-13C NMR and MD simulation studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (6), 1976–1989.
- (68) Klose, G.; Levine, Y. K. Membranes of Palmitoyllecithin Phosphatidylcholine and C12E4A Lattice Model Simulation. *Langmuir* **2000**, *16* (2), 671–676.
- (69) Capitani, D.; Yethiraj, A.; Burnell, E. E. Memory Effects Across Surfactant Mesophases. *Langmuir* **2007**, *23* (6), 3036–3048.
- (70) Rancon, Y.; Charvolin, J. Fluctuations and phase transformations in a lyotropic liquid crystal. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92* (22), 6339–6344.
- (71) Constantin, D.; Oswald, P. Diffusion Coefficients in a Lamellar Lyotropic Phase: Evidence for Defects Connecting the Surfactant Structure. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85* (20), 4297–4300.
- (72) Paz, L.; Di Meglio, J. M.; Dvolaitzky, M.; Ober, R.; Taupin, C. Highly curved defects in lyotropic (nonionic) lamellar phases. Origin and role in hydration process. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (16), 3415–3418.
- (73) Astafyeva, K.; Urbach, W.; Garroum, N.; Taulier, N.; Thiam, A. R. Stability of C12Ej Bilayers Probed with Adhesive Droplets. *Langmuir* **2015**, *31* (24), 6791–6796.
- (74) Brandt, E. G.; Braun, R.; Anthony, R.; Sachs, Jonathan, N.; Nagle, John, F.; Edholm, O. Interpretation of Fluctuation Spectra in Lipid Bilayer Simulations. *Biophys. J.* **2011**, *100* (9), 2104–2111.
- (75) Lindahl, E.; Edholm, O. Mesoscopic Undulations and Thickness Fluctuations in Lipid Bilayers from Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2000**, *79* (1), 426–433.
- (76) Golubovic, L.; Lubensky, T. C. Smectic elastic constants of lamellar fluid membrane phases: Crumpling effects. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1989**, *39* (16), 12110–12133.
- (77) Helfrich, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1973**, *28*, 693–703.
- (78) Nagle, J. F. Introductory Lecture: Basic quantities in model biomembranes. *Faraday Discuss.* **2013**, *161* (0), 11–29.

Interaction cyclodextrine tensioactif

Dans le chapitre précédent, nous avons validé notre modèle pour les C_iE_j , en particulier pour le $C_{12}E_4$. Dans ce chapitre, nous étudions les interactions entre la β -CD et le $C_{12}E_4$.

7.1 Interaction cyclodextrine $C_{12}E_4$

Pour l'étude des interactions entre les cyclodextrines et les C_iE_j , nous avons choisi la β -CD car c'est celle pour laquelle nous avons vu les effets du DMSO les plus importants et le $C_{12}E_4$ car c'est celui pour lequel nous reproduisons le mieux les résultats expérimentaux. Pour pouvoir étudier l'interaction entre les deux molécules, il est nécessaire de savoir si la β -CD est capable de former un complexe d'inclusion avec le $C_{12}E_4$. Pour tester cela, nous avons réalisé des simulations de liaison. Dans une même boîte de simulation, nous avons placé une molécule de β -CD et une molécule de $C_{12}E_4$ éloignées de 25 Å l'une de l'autre, puis nous avons simulé pendant 200 ns. Nous avons observé la formation d'un complexe $C_{12}E_4/\beta$ -CD (Fig. 7.2a) en moins de 50 ns (Fig. 7.1).

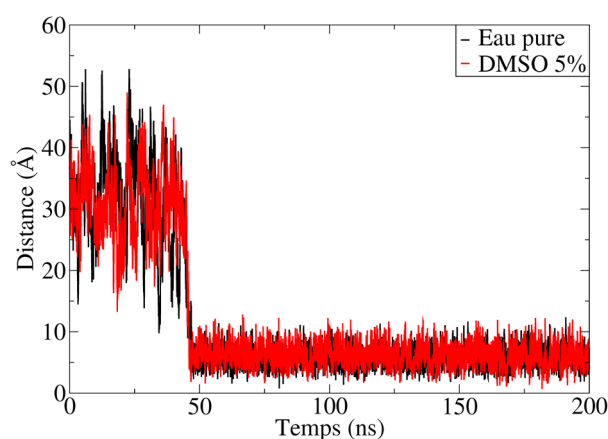


FIGURE 7.1 – Distance entre la β -CD et le $C_{12}E_4$ au cours d'une simulation de liaison dans l'eau pure (noir) et dans 5% de DMSO (rouge). La distance est mesurée entre le COM de la β -CD et le COM du $C_{12}E_4$.

La distance entre le $C_{12}E_4$ et la β -CD reste constante. Le complexe est stable dans l'eau. Lorsque l'on observe la structure du complexe, nous constatons que le $C_{12}E_4$ est lié à la β -CD par sa queue aliphatique pendant que la partie polaire interagit avec la partie resserrée de la β -CD. Toute la partie apolaire du $C_{12}E_4$ semble être protégée de l'eau par

la cavité hydrophobe de la β -CD. Le $C_{12}E_4$ est lié à la β -CD avec la même orientation que l'ADA.

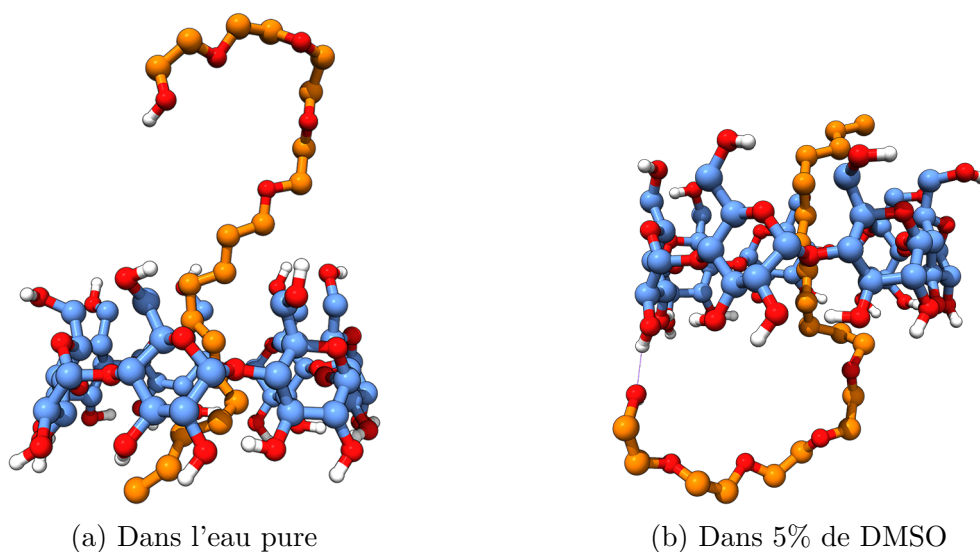


FIGURE 7.2 – Structure du complexe $C_{12}E_4/\beta$ -CD dans l'eau pure (a) et dans 5% de DMSO (b).

Nous avons voulu tester la complexation en présence de 5% de DMSO. Nous sommes partis de la même structure initiale, c'est à dire la β -CD éloignée de 25 Å du $C_{12}E_4$, la seule différence est l'ajout de molécules de DMSO pour atteindre une concentration de 5%. Comme en eau pure, nous observons la complexation en moins de 50 ns de simulation. L'analyse de la distance ne montre pas de décomplexation. La variation est la même qu'en eau pure (Fig. 7.1). Nous pouvons dire que le DMSO à 5% semble n'avoir aucun effet sur la liaison d'un $C_{12}E_4$ dans la β -CD. L'observation de la structure (Fig. 7.2) nous indique que le $C_{12}E_4$ s'est lié dans l'autre sens, la tête polaire du $C_{12}E_4$ se trouve du côté large de la β -CD. Dans la Fig. 7.2b, nous observons une liaison hydrogène entre la β -CD et $C_{12}E_4$.

Nous avons montré que la β -CD est capable de former un complexe d'inclusion avec le $C_{12}E_4$ et que 5% de DMSO ne semble pas avoir d'effet sur la formation du complexe. Maintenant, nous allons tenter de réaliser l'extraction d'une molécule de $C_{12}E_4$ d'une bicouche par l'intermédiaire d'une molécule de β -CD.

7.2 Interaction cyclodextrine bicouche de $C_{12}E_4$

Pour simuler l'extraction d'une molécule de $C_{12}E_4$ d'une bicouche par l'intermédiaire d'une molécule de β -CD, nous sommes partis d'une boîte de simulation avec une bicouche de 360 $C_{12}E_4$ et une molécule de β -CD éloignée de la bicouche (Fig. 7.3). La simulation a été réalisée dans l'eau pure. Pour avoir assez de place pour éloigner la β -CD de la bicouche, nous avons dû mettre de nombreuses molécules d'eau tout en nous assurant de rester dans

la phase lamellaire. Avec 16090 molécules d'eau pour 360 $C_{12}E_4$, nous sommes dans un rapport massique de 31% ce qui nous place toujours dans la phase lamellaire pour une simulation à 300 K. Nous avons réalisé une simulation de 1 μs de ce système.

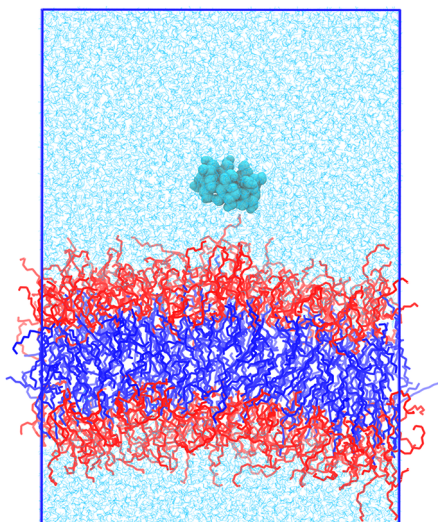


FIGURE 7.3 – Boîte de simulation de la β -CD (spheres cyan) avec une bicouche de 360 $C_{12}E_4$ (en rouge les têtes polaires, en bleu les queue aliphatique), dans l'eau pure (cyan).

L'observation de la trajectoire nous montre que la molécule de β -CD vient rapidement (en moins de 20 ns) se lier à une molécule de $C_{12}E_4$ dans la bicouche. En suivant la distance entre β -CD et le $C_{12}E_4$ lié, nous constatons que le complexe reste stable au cours du temps. La β -CD ne va pas se lier à un autre $C_{12}E_4$ (Fig. 7.4). Les variations de la distance sont les mêmes que pour un $C_{12}E_4$ seul.

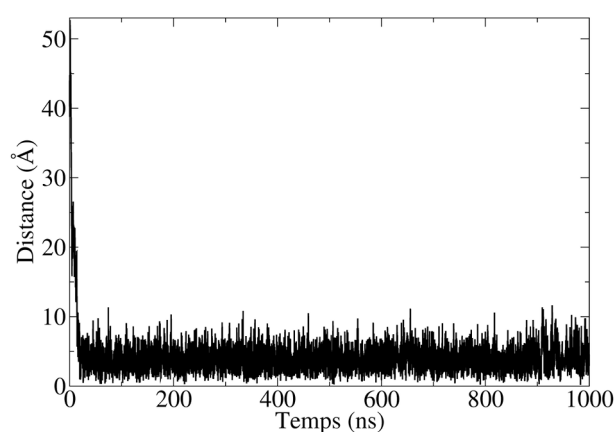


FIGURE 7.4 – Distance entre le COM de la β -CD et le COM de la molécule de $C_{12}E_4$ liée.

Nous essayons de reproduire l'extraction d'un $C_{12}E_4$. Maintenant que nous avons vu que la β -CD est capable de se lier à un $C_{12}E_4$ de la bicouche, nous regardons si le complexe sort de la bicouche. Pour cela, nous avons suivi la position de la β -CD selon l'axe perpendiculaire à la bicouche (axe z, Fig. 7.5).

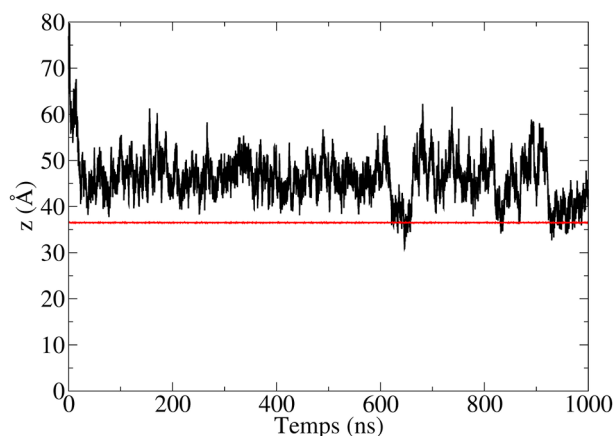


FIGURE 7.5 – Position selon l’axe perpendiculaire à la bicouche (axe z) du COM de la β -CD (courbe noire) et du COM de l’oxygène terminal des $C_{12}E_4$ de la bicouche (courbe rouge).

La position en z nous indique que la β -CD ne sort pas de la bicouche après y être entré. Elle reste du même côté de la bicouche, elle ne fait pas de *flip-flop* avec le $C_{12}E_4$ lié (Fig. 7.6).

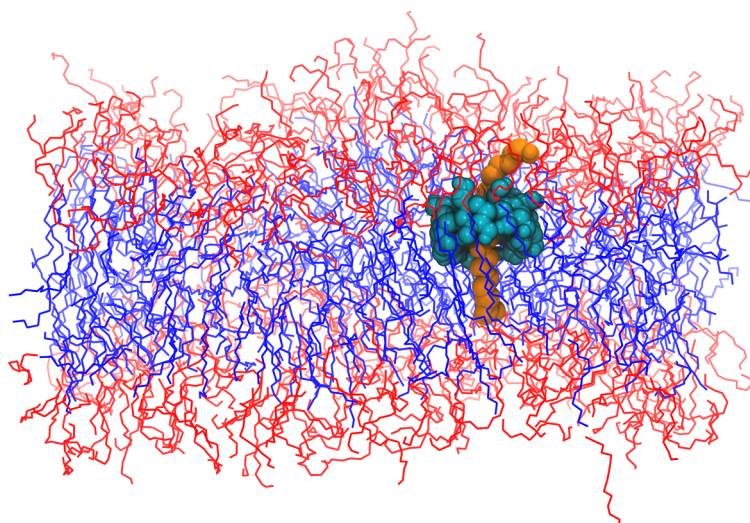


FIGURE 7.6 – Vue transversale de la bicouche de $C_{12}E_4$. En représentation ligne les $C_{12}E_4$ avec en rouge les têtes polaires et en bleu les queues aliphatiques. La β -CD est en représentation sphère en cyan. En sphères oranges le $C_{12}E_4$ lié à la β -CD.

Vers 600 ns, le complexe descend au milieu de la bicouche, dans la partie hydrophobe mais il remonte rapidement dans la partie polaire au bout de 100 ns sans faire de *flip-flop*. Le complexe reste dans le même feuillet de la bicouche. Nous n’avons pas réussi à simuler l’extraction d’un $C_{12}E_4$ par une β -CD.

La β -CD reste dans la bicouche, nous nous sommes donc demandé si la présence de la β -CD pouvait modifier les propriétés de la bicouche. Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que l’une des caractéristiques principales de la grande bicouche de $C_{12}E_4$ est la capacité de former des pores transitoires. Est-ce que la β -CD empêche la formation des

pores? Ou au contraire stabilise-t-elle les pores? Pour vérifier cela nous avons suivi la présence des pores au cours de la simulation.

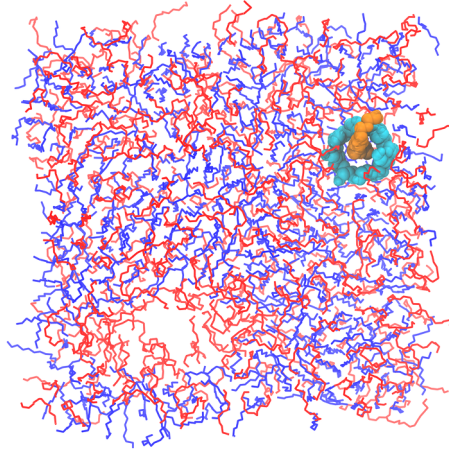


FIGURE 7.7 – Vue de dessus de la bicouche de $C_{12}E_4$. En représentation ligne les $C_{12}E_4$ avec en rouge les têtes polaires et en bleu les queues aliphatiques. La β -CD est en représentation sphère en cyan. En sphères oranges le $C_{12}E_4$ lié à la β -CD. Le pore se trouve en bas à droite de l'image.

Nous constatons que la présence de la β -CD n'empêche pas la formation des pores (Fig. 7.7). Le complexe reste éloigné de la périphérie des pores. Pour savoir si la présence de la β -CD augmente ou diminue la formation des pores, nous avons suivi la fraction d'aire de la bicouche occupée par des pores (Fig. 7.8)

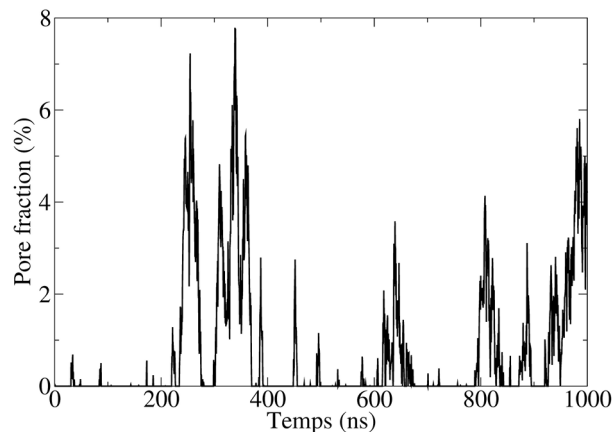


FIGURE 7.8 – Fraction de l'aire de la bicouche de $C_{12}E_4$ occupée par des pores en présence de la β -CD complexée à un $C_{12}E_4$.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la fraction d'aire de pore pour une bicouche de 1024 $C_{12}E_4$ était quasiment toujours supérieure à 0 % avec un maximum de 6% de l'aire occupée par les pores. En présence de la β -CD, il n'y a pas toujours de pore mais la fraction peut dépasser 7 %. Il est possible que la β -CD augmente la fraction d'aire occupée par les pores. Cependant, il est important de remarquer que la bicouche que nous avons simulée dans cette partie est presque trois fois plus petite que celle de l'article. Or,

nous savons que pour observer des pores, il est nécessaire de simuler de grandes bicouches. Mais pour des raisons de temps de calcul, nous n'avons pas pu simuler de bicouche de taille plus importante.

7.3 Discussion

Dans ce chapitre nous avons étudié l'interaction de la β -CD avec le tensioactif $C_{12}E_4$ d'abord seul en présence et en absence de DMSO, puis sous forme de bicouche dans l'eau pure.

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que la β -CD est capable de former un complexe d'inclusion, avec le $C_{12}E_4$, stable dans le temps. Ce résultat était attendu car les cyclodextrines et en particulier la β -CD sont connues pour se lier aux lipides (DASS et JESSUP 2000) et particulièrement au cholestérol (MASCETTI et al. 2008).

L'ajout de 5% de DMSO dans le milieu n'a pas gêné la liaison. Le DMSO semble n'avoir aucun effet sur l'interaction entre les deux molécules. Cependant, pour en être sûr il aurait été intéressant de calculer l'énergie libre d'interaction en présence et en absence de DMSO comme nous l'avons fait pour l'ADA et les CD. Mais contrairement à l'ADA, le $C_{12}E_4$ est une grande molécule flexible. Or, pour calculer un ΔG par FEP, il est nécessaire de bien échantillonner l'ensemble des conformations possibles du complexe $C_{12}E_4/\beta$ -CD. Cela n'est possible qu'en réalisant de longues simulations ou en réalisant de courtes simulations de chaque orientation possible en restreignant le mouvement du $C_{12}E_4$. Ce genre de calcul demande beaucoup de temps et nous n'avons pas pu les réaliser.

Dans un second temps, nous avons essayé de reproduire les simulations d'extraction de molécules de cholestérol de membranes lipidiques (LÓPEZ et al. 2011 ; LÓPEZ et al. 2013), mais à la place du cholestérol nous avons utilisé les $C_{12}E_4$. Nous avons pu montrer la liaison de la β -CD avec un $C_{12}E_4$ de la bicouche mais nous n'avons pas observé l'extraction du $C_{12}E_4$ de sa bicouche. La β -CD reste au niveau des têtes polaires avec parfois une descente dans les queues aliphatiques, tout en restant liée à la même molécule de $C_{12}E_4$. Dans les articles de López et al., ils utilisent des dimères de β -CD pour extraire une molécule de cholestérol. Or la molécule de cholestérol est moins longue qu'un $C_{12}E_4$ (Fig. 7.9).

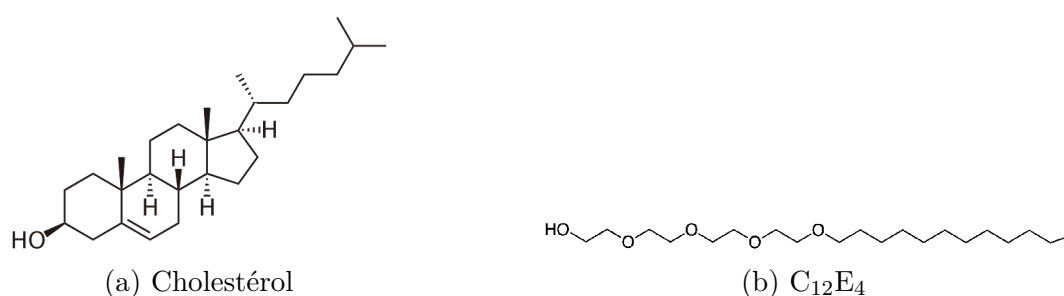


FIGURE 7.9 – Formule d'une molécule de cholestérol (a) et d'une molécule de $C_{12}E_4$ (b).

Il est peut-être nécessaire que la molécule à extraire soit complètement enfouie dans les β -CD pour pouvoir être extraite de la bicouche. Cependant, contrairement au cholestérol, le $C_{12}E_4$ a une importante partie polaire qui devrait pouvoir se solubiliser facilement dans l'eau pure sans avoir besoin d'être enfouie dans le dimère de β -CD. Pour en être sûr, nous pourrions réaliser la même simulation mais cette fois avec un dimère de β -CD.

Nous n'avons pas simulé la bicouche avec le DMSO, car le DMSO pourrait déstabiliser la bicouche en s'insérant au niveau des queues aliphatiques et des têtes polaires et empêcher l'observation de l'extraction.

Dans cette partie, nous avons étudié l'interaction entre la β -CD et le $C_{12}E_4$. Malheureusement, par faute de temps et de moyen de calcul nous n'avons pas pu étudier l'effet du DMSO sur cette interaction. Cependant, nos travaux ont permis de mettre au point des paramètres de champ de force pour les C_iE_j .

Dans la prochaine partie, nous étudions l'effet du DMSO sur l'interaction d'un couple ligand hydrophobe/protéine.

CINQUIÈME PARTIE

Protéine Quinone Réductase 2

Solvatation d'une protéine

Dans la première partie, nous avons étudié l'effet du DMSO sur l'affinité de l'ADA un ligand hydrophobe pour les cyclodextrines β et γ . Pour caractériser cet effet, nous avons étudié les propriétés volumiques et dynamiques des molécules de solvant présentes dans les cavités des cyclodextrines. Dans cette partie, nous étudions les mêmes caractéristiques mais pour les molécules de solvant présentes dans les poches d'une protéine.

8.1 Quinone réductase 2

La protéine que nous avons étudiée est la quinone réductase 2 (QR2), une protéine d'intérêt pharmaceutique. Cette protéine possède deux poches hydrophobes identiques situées à l'interface entre les deux monomères. À l'intérieur des poches, nous trouvons le co-facteur de QR2, le FAD. Quand un ligand comme le MCA-NAT se fixe à QR2, il se superpose à la partie flavine du FAD (partie à l'interface des chaînes de QR2, Fig. 8.1). Par la suite, lorsque nous parlons de QR2 nous englobons les deux chaînes ainsi que les co-facteurs de la protéine (le FAD et l'ion zinc).

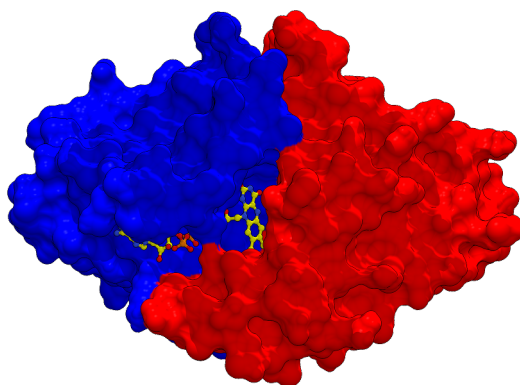


FIGURE 8.1 – Structure 3D de la protéine QR2. Chaque chaîne est représentée d'une couleur différente (chaîne A en bleu, chaîne B en rouge). Le FAD est en jaune. Une seule poche est visible. Structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X, issue du fichier PDB 1QR2 (FOSTER et al. 1999).

La poche de QR2 est difficile à caractériser, c'est une poche large aux contours peu définis. Pour étudier sa composition en acides aminés, nous avons utilisé la structure de QR2 liée au MCA-NAT et nous avons cherché tous les acides aminés à moins de 6 Å du ligand (Tab. 8.1).

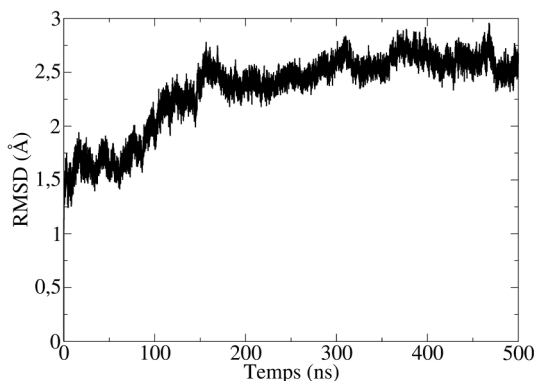
Acide aminé	Quantité	Hydrophobe ?
Alanine	1	Oui
Asparagine	2	Non
Aspartate	1	Non
Cystéine	2	Non
Glutamate	1	Non
Glutamine	1	Non
Glycine	4	Non
Isoleucine	2	Oui
Leucine	1	Oui
Méthionine	1	Oui
Phénylalanine	6	Oui
Thréonine	4	Non
Tryptophane	1	Oui
Tyrosine	3	Oui
Valine	2	Oui

TABLE 8.1 – Acides aminés composant une poche de QR2.

La poche est composée de 32 acides aminés dont 17 hydrophobes. La poche n'est donc pas complètement hydrophobe.

QR2 est un système beaucoup plus gros que les cyclodextrines. Une boîte de simulation de QR2 est composée en moyenne de 78500 particules contre 6500 pour les CD. Les trajectoires obtenues sont donc plus difficiles à étudier. En effet, nous n'avons pas pu étudier des simulations aussi longues que pour les CD car nos scripts python n'étaient pas adaptés à un jeu de données aussi volumineux et nous n'avons pas encore eu le temps de les réécrire pour les optimiser, mais c'est en projet. Donc, pour des raisons de limitations techniques, notre échantillonnage est moins représentatif. Cependant, nous détectons plus de molécules d'eau dans les poches de QR2 que dans les cavités des CD et nos études ont été faites sur les deux poches, les résultats présentés ne différenciant pas les poches. Nous avons donc moins de clichés mais plus d'individus, ce qui permet de compenser légèrement la perte de qualité de l'échantillonnage.

Comme nous ne pouvions étudier de longues simulations de QR2, nous avons bien fait attention à nous assurer que la protéine était à l'équilibre avant de faire nos analyses. Pour cela, nous avons étudié le RMSD (racine carrée de l'écart quadratique moyen, *root mean square deviation*) de la structures des $C\alpha$. Le RMSD permet de mesurer la déviation de la structure au cours de la trajectoire à partir de l'alignement à une structure initiale de référence. Comme structure initiale, nous avons choisi le premier cliché de la trajectoire de production.

FIGURE 8.2 – RMSD des C α de QR2 dans l'eau pure et sans ligand.

La Fig. 8.2 montre le RMSD de QR2 sans ligand dans l'eau pure au cours d'une trajectoire de 500 ns. Le RMSD croît jusqu'à 150 ns où il atteint un plateau. Nous ne montrons dans la Fig. 8.2 que les résultats pour cette simulation car c'est celle qui a mis le plus de temps à converger. Pour nos analyses, nous avons utilisé les trajectoires à partir de 200 ns. Comme pour les CD, nous avons étudié QR2 avec et sans son ligand le MCA-NAT, dans l'eau et dans 5% de DMSO.

8.2 Propriétés des molécules d'eau dans QR2 en eau pure

Dans cette section nous présentons les résultats pour les molécules d'eau dans les poches de QR2 en eau pure.

8.2.1 Hydratation

Nous avons compté le nombre de molécules d'eau dans les poches de QR2. Pour identifier les molécules qui se trouvent dans la poche, nous avons fait une sélection par rapport à la distance à laquelle les molécules se trouvent du FAD (Fig. 8.3). Toutes les molécules à moins de 4 Å d'un des atomes est sélectionnée.

	Molécules
QR2	$9,4 \pm 0,6$
MCA-NAT/QR2	$7,4 \pm 0,4$

TABLE 8.2 – Nombre de molécules d'eau présentes dans les poches des QR2 dans l'eau pure.

Nous trouvons en moyenne $9,4 \pm 0,6$ molécules d'eau dans la poche en absence du ligand et $7,4 \pm 0,4$ molécules d'eau en présence du ligand (Tab. 8.2). La liaison du MCA-NAT

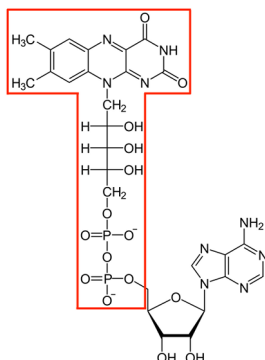


FIGURE 8.3 – Atomes utilisés pour sélectionner les molécules d'eau dans la poche de QR2. Toutes les molécules d'eau ayant leur atome d'oxygène à moins de 4 Å d'un des atomes dans la zone rouge est considérée comme étant dans la poche de QR2.

entraîne l'expulsion de seulement 2 molécules d'eau. La poche est encore hydratée en présence du ligand, alors que pour les CD quasiment toute l'eau était expulsée de la cavité (Fig. 4.3).

Nous avons calculé le temps de résidence des molécules d'eau dans les poches de QR2 que nous comparons aux temps dans les cavités des CD (Tab. 8.3).

	Temps (ps)
QR2	257 ± 61
MCA-NAT/QR2	312 ± 11
β -CD	36,0 ± 0,4
ADA/ β -CD	12,5 ± 0,2
γ -CD	38,9 ± 0,1
ADA/ γ -CD	11,5 ± 0,2

TABLE 8.3 – Temps moyen de résidence des molécules d'eau dans les poches de QR2 et les cavités des cyclodextrines β et γ . Le temps de résidence est calculé en comptant le nombre de clichés successifs qu'une molécule d'eau est détectée dans la poche que nous multiplions par le pas de simulation (ici 10 ps).

Les molécules d'eau restent en moyenne 7 fois plus longtemps dans la poche de QR2 que dans les cavités des CD. Pour les CD, le site de liaison est ouvert alors que pour QR2 le site de liaison est une poche avec une seule ouverture, les molécules d'eau sont « piégées » dans la poche. La présence du MCA-NAT augmente le temps de résidence des molécules d'eau dans QR2 alors qu'il est diminué dans les CD en présence de l'ADA. Ceci s'explique par le fait que l'ADA expulse quasiment toutes les molécules d'eau, les molécules détectées sont de passage alors que pour QR2 le MCA-NAT n'expulse pas toutes les molécules, il semble même les stabiliser dans la poche.

8.2.2 Volume spécifique

Nous avons ensuite regardé le volume spécifique des molécules d'eau à l'intérieur des poches de QR2 (Tab. 8.4).

	Volume (\AA^3)
<i>Bulk</i>	$30,13 \pm 0,03$
QR2	$29,3 \pm 0,4$
MCA-NAT/QR2	$29,4 \pm 0,2$

TABLE 8.4 – Volume spécifique des molécules d'eau présentes dans la cavité de QR2. *Bulk* représente les molécules d'eau libres dans l'eau pure.

Nous trouvons un volume spécifique légèrement diminué dans les poches. La poche doit être plus dense en eau que le *bulk*. En présence du ligand le volume ne change pas.

8.2.3 Diffusion latérale et facteur de retardement

Nous avons étudié la diffusion latérale des molécules de la poche en la comparant avec la diffusion latérale du *bulk* par l'intermédiaire du facteur de retardement R_f (Tab. 8.5).

	R_f
<i>Bulk</i>	1
QR2	$8,0 \pm 0,7$
MCA-NAT/QR2	$7,3 \pm 0,6$

TABLE 8.5 – Facteur de retardement des molécules d'eau de la poche de QR2.

Les molécules de la poche diffusent 8 fois plus lentement que les molécules du *bulk*. Ce ralentissement semble légèrement moindre en présence du ligand.

8.2.4 Diffusion rotationnelle

Nous avons vu que la diffusion latérale est ralentie mais la rotation est-elle affectée par l'environnement de la poche ?

L'analyse du temps de relaxation de la diffusion rotationnelle (Tab. 8.6), nous indique que la rotation des molécules d'eau est 10 fois plus lente dans les poches de QR2 que dans le *bulk*. En présence du MCA-NAT la rotation est 5 fois plus lente qu'en absence de celui-ci.

	τ (ps)	β	χ^2
Eau pure	2,6	0,84	$2,2 \cdot 10^{-5}$
QR2	30	0,35	$1,1 \cdot 10^{-4}$
MCA-NAT/QR2	122	0,32	$8,5 \cdot 10^{-5}$

TABLE 8.6 – Résultat de l'ajustement des courbes d'auto-corrélation rotationnelle par une exponentielle étendue. La valeur de χ^2 permet de valider l'ajustement, plus χ^2 est faible, meilleur est l'ajustement. Ajustement réalisé entre 0 et 25 ps.

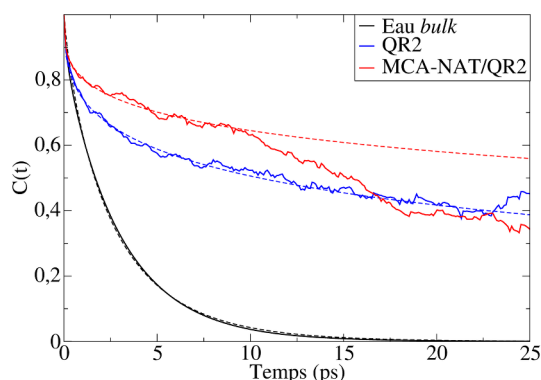


FIGURE 8.4 – Auto-corrélation rotationnelle des molécules d'eau dans les poches de QR2 en eau pure. En bleu QR2 seule, en rouge QR2 en complexe avec le ligand, en noir l'eau du *bulk*.

Les propriétés volumiques des molécules d'eau dans la poche sont peu affectées, les molécules sont très ralenties dans leur diffusion latérale et rotationnelle. Ceci semble indiquer que dans les poches les molécules d'eau ont des interactions avec leur environnement mais elles « sautent » moins vite d'une interaction à une autre que dans le *bulk*.

8.3 Propriétés des molécules de solvant dans QR2 en dans 5% de DMSO

Nous avons ensuite analysé les propriétés des molécules d'eau et de DMSO dans les poches avec 5% de DMSO.

8.3.1 Hydratation

Nous avons compté les molécules d'eau et de DMSO présentes dans les poches de QR2 (Tab. 8.7).

Nous trouvons en moyenne $7,1 \pm 0,2$ molécules d'eau et $1,59 \pm 0,05$ molécules de DMSO dans une poche de QR2. Le DMSO est capable d'entrer en prenant la place de 2 molécules d'eau. La présence du MCA-NAT dans la cavité expulse quasiment tout

	Eau	DMSO
QR2	$7,1 \pm 0,2$	$1,59 \pm 0,05$
MCA-NAT/QR2	$6,0 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,2$

TABLE 8.7 – Nombre de molécules d’eau et de DMSO présentes dans les poches des QR2 dans 5% de DMSO.

le DMSO mais seulement une molécule d’eau. La poche est toujours hydratée par de nombreuses molécules d’eau malgré la présence du DMSO et/ou du ligand.

Nous avons calculé le temps de résidence de ces molécules de solvant (Tab. 8.8).

	Temps (ps)	
	Eau	DMSO
QR2	453 ± 104	7216 ± 66
MCA-NAT/QR2	765 ± 145	5045 ± 2282

TABLE 8.8 – Temps moyen de résidence des molécules d’eau et de DMSO dans les poches de QR2 dans 5% de DMSO.

Le temps de résidence des molécules de solvant dans les poches est plus élevé pour le milieu à 5 % de DMSO qu’en eau pure. Nous avons vu qu’il y a peu de molécules de DMSO dans les poches, cependant elles y restent longtemps, en moyenne 7 ns en absence du ligand. La présence du ligand augmente la variabilité de la mesure car il expulse quasiment toutes les molécules de DMSO, la mesure du temps est donc faite sur peu de molécules, d’où une grande variabilité.

8.3.2 Volume spécifique

Nous avons mesuré le volume spécifique des molécules de solvant à l’intérieur des poches de QR2 (Tab. 8.9).

	Volume (\AA^3)	
	Eau	DMSO
<i>Bulk</i>	$30,471 \pm 0,006$	$114,83 \pm 0,08$
QR2	$29,10 \pm 0,05$	111 ± 1
MCA-NAT/QR2	$29,0 \pm 0,1$	110 ± 1

TABLE 8.9 – Volume spécifique des molécules d’eau et de DMSO présentes dans la cavité de QR2 dans 5% de DMSO. *Bulk* représente les molécules d’eau et de DMSO libres dans 5% de DMSO.

Comme pour l'eau pure, nous trouvons qu'à l'intérieur des poches les molécules d'eau occupent un volume inférieur à celui du *bulk*, le volume est même identique qu'en eau pure (Tab. 8.4). Le volume du DMSO est lui aussi légèrement diminué dans la poche. La présence du MCA-NAT ne change pas les volumes. Nous pouvons conclure que, dans les poches, la densité en solvant est un peu plus importante que dans le *bulk*. Ce qui sous-entend un nombre d'interactions plus important et/ou des gênes stériques.

8.3.3 Diffusion latérale et facteur de retardement

Nous avons ensuite déterminé le facteur de retardement des molécules de solvant de la poche (Tab. 8.8).

	R_f	
	Eau	DMSO
<i>Bulk</i>	1	1
QR2	$7,9 \pm 1,3$	$6,3 \pm 1,3$
MCA-NAT/QR2	$8,9 \pm 2,8$	$7,5 \pm 2,5$

TABLE 8.10 – Facteur de retardement des molécules d'eau et de DMSO de la poche de QR2 dans 5% de DMSO.

L'estimation du facteur de retardement R_f des molécules de solvant de la poche montre qu'elles sont très ralenties. L'eau semble plus ralentie que le DMSO, mais les variations sont trop importantes pour être catégorique. Nous avons vu précédemment que le DMSO reste plus longtemps dans la poche que l'eau. Or, sa diffusion latérale est moins ralentie.

8.3.4 Diffusion rotationnelle

Nous avons calculé le temps de relaxation de la vitesse de diffusion rotationnelle (Tab. 8.11)

Pour l'eau, nous observons un ralentissement proche de celui en eau pure. Sauf en présence de MCA-NAT où le ralentissement est moins fort qu'en eau pure. Pour le DMSO les résultats obtenus semblent aberrants, ceci est dû au manque d'échantillonnage. Nous n'avons pas pu étudier de longues simulations et comme il y a peu de molécules de DMSO dans les poches, l'échantillonnage est très insuffisant.

8.4 Discussion

Nous avons montré que dans les poches de QR2, le volume est peu modifié. Nous voyons une légère diminution du volume par rapport aux molécules dans le *bulk*. Une

	τ (ps)	β	χ^2
Eau (5% DMSO)	2,76	0,83	$2,2 \cdot 10^{-5}$
QR2	48	0,46	$1,8 \cdot 10^{-4}$
MCA-NAT/QR2	26	0,37	$2,1 \cdot 10^{-4}$
DMSO	6,89	0,88	$3,6 \cdot 10^{-5}$
QR2	$1 \cdot 10^{12}$	0,11	$2,7 \cdot 10^{-5}$
MCA-NAT/QR2	$1 \cdot 10^{11}$	0,10	$1,7 \cdot 10^{-5}$

TABLE 8.11 – Résultat de l’ajustement des courbes d’auto-corrélation rotationnelle par une exponentielle étendue. La valeur de χ^2 permet de valider l’ajustement, plus χ^2 est faible, meilleur est l’ajustement. Ajustement réalisé entre 0 et 25 ps pour l’eau et entre 0 et 15 ps pour le DMSO.

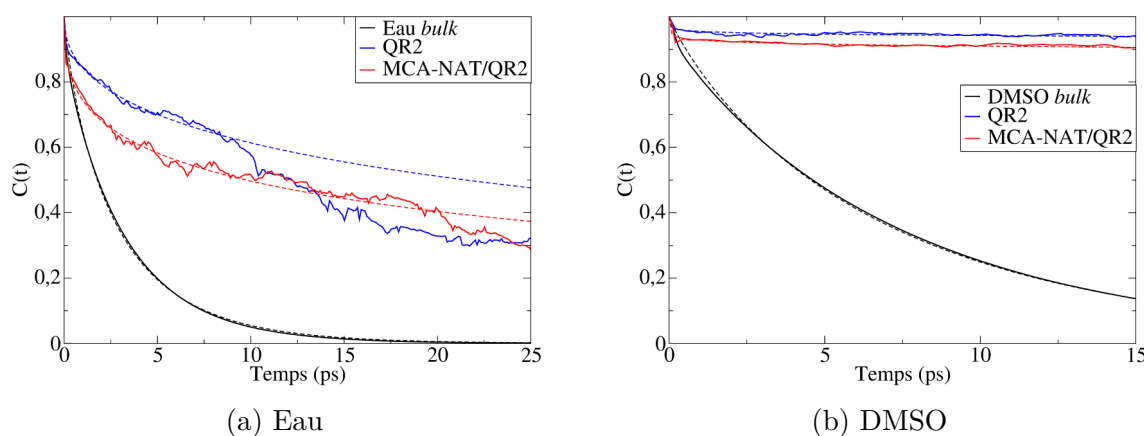


FIGURE 8.5 – Auto-corrélation rotationnelle des molécules d’eau (a) et du DMSO (b) dans les poches de QR2 dans 5% de DMSO. En bleu QR2 seule, en rouge QR2 en complexe avec le ligand, en noir les molécules de solvant du *bulk*.

diminution du volume peut s’expliquer par un plus grand nombre d’interactions.

La dynamique des molécules de solvant est très ralentie. Nous savons qu’une diminution de la diffusion latérale peut s’expliquer par un nombre d’interactions plus grand et/ou des interactions plus fortes. Or, une diminution de la diffusion rotationnelle indique plutôt un plus faible nombre de sauts entre les interactions (LAAGE et HYNES 2006).

L’ensemble de ces résultats permet de supposer que dans les poches de QR2, les molécules de solvant sont ralenties car elles font des interactions plus longues avec leur environnement. Lorsque nous comparons la dynamique des molécules de DMSO par rapport aux molécules d’eau, nous voyons que les molécules de DMSO restent plus longtemps dans la poche. Dans la poche, les molécules de DMSO doivent être dans un environnement favorable pour des interactions ce qui peut indiquer une forte affinité du DMSO pour la poche. Cependant, nous avons constaté que la liaison du ligand MCA-NAT expulse quasiment tout le DMSO de la poche. Si le DMSO a une forte affinité pour la poche alors il peut y avoir compétition entre le MCA-NAT et le DMSO pour la poche de QR2. Pour pouvoir conclure, il faudrait

mesurer l'affinité du MCA-NAT pour QR2 en présence et en absence de DMSO. Cette mesure ne peut être faite qu'en simulation car le MCA-NAT est insoluble dans l'eau ce qui rend impossible les mesures expérimentales en eau pure. Cependant, pour des raisons de temps nous n'avons pas pu faire les calculs d'énergie libre de réaction de la liaison du MCA-NAT dans QR2.

SIXIÈME PARTIE

Conclusion

Conclusion

Notre but était d'étudier l'hypothèse d'un effet du DMSO à faible concentration sur les interactions entre un ligand hydrophobe et son site de liaison. Pour cela, nous avons étudié plusieurs systèmes ligand/récepteur : ADA/ β -CD, ADA/ γ -CD, C₁₂E₄/ β -CD et MCA-NAT/QR2. Malheureusement, par manque de temps et de moyens techniques nous n'avons pu étudier entièrement que les complexes ADA/ β -CD et ADA/ γ -CD présentés dans la première partie de ce manuscrit.

Dans la première partie, nous avons étudié l'effet du DMSO sur l'affinité de l'ADA pour la β et la γ -CD. Avant de pouvoir caractériser l'effet du DMSO, il nous a fallu étudier l'inclusion de l'ADA dans la β -CD et la γ -CD dans l'eau pure. Les mesures expérimentales par MVU et RMN de la constante de liaison K_b et le calcul par FEP de l'énergie libre de réaction ΔG nous ont permis de mettre en évidence une affinité plus forte de l'ADA pour la β -CD que pour la γ -CD. Dans le but d'expliquer cette différence, nous avons réalisé une décomposition de ΔG en enthalpie de réaction ΔH et en entropie de réaction ΔS . Cette décomposition a montré que pour la γ -CD nous avons une liaison dominée par les effets hydrophobes (ΔH faible et ΔS élevé) alors que pour la β -CD nous avons une énergie de liaison dominée par les interactions moléculaires telles que les interactions électrostatiques et de van der Waals. L'analyse par DM des structures des complexes, nous a permis d'expliquer la différence d'affinité entre les deux CD par un meilleur ajustement de l'ADA dans la cavité de la β -CD que celle de la γ -CD. Par ailleurs, l'étude des caractéristiques volumiques et dynamiques des molécules d'eau présentes dans la cavité des CD nous a permis de mettre en évidence un effet « plus hydrophobe » de la β -CD sur les molécules d'eau que de la γ -CD. Ce résultat semble en contradiction avec la forte variation de ΔH pour la β -CD. En l'état, nos analyses ne permettent pas d'expliquer ce résultat déjà observé dans la littérature.

Nous avons ensuite fait les mêmes analyses mais dans 5% de DMSO. Nous avons déterminé l'affinité de l'ADA pour les CD en présence de DMSO par les mêmes techniques que précédemment. Nous avons trouvé que le DMSO à une concentration de 5 % n'a pas d'effet sur l'affinité de l'ADA pour la γ -CD alors qu'il diminue l'affinité de l'ADA pour la β -CD. L'analyse de la décomposition ΔG en ΔH et ΔS n'a pas été concluante, car trop de variations entre les mesures. Nous avons étudié les propriétés volumiques et dynamiques des molécules d'eau et de DMSO présentes dans les cavités des CD mais nous n'avons

pas observé de différences significatives entre les CD permettant d'expliquer la différence d'effet du DMSO sur l'affinité. Enfin, l'étude de la stabilité de l'interaction de l'ADA avec les CD, nous a permis de mettre en évidence une compétition entre la DMSO et l'ADA pour la cavité de la β -CD. Le DMSO est capable d'expulser l'ADA de la cavité de la β -CD. Alors que dans la γ -CD le DMSO ne prend pas la place du ligand. Il peut pousser le ligand pour entrer dans la cavité sans faire sortir l'ADA. La différence d'effet est donc due à la compétition entre le DMSO et l'ADA pour la petite cavité de la β -CD. La γ -CD ayant une plus grande cavité le ligand et le DMSO peuvent y entrer sans vraie compétition.

Dans la seconde partie, nous avons étudié par DM les C_iE_j et leur interaction avec la β -CD en présence et en absence de DMSO. Nous n'avons pas pu apporter de nouvelles données sur l'effet du DMSO. Cependant, pour cette étude, nous avons mis au point des paramètres pour les C_iE_j pour le champ de forces 2016H66 compatible avec GROMOS. La validation de ces paramètres a donné lieu à une publication et les fichiers ont été mis à la disposition de la communauté scientifique désireuse de réaliser des DM de C_iE_j .

Dans la troisième partie, nous avons étudié par DM les propriétés dynamiques et volumiques des molécules de solvant (eau et DMSO) présentes dans la poche hydrophobe d'une protéine (QR2) en présence et en absence du ligand (MCA-NAT). Nous avons vu que les molécules de solvant ont des propriétés différentes dans la poche comparé au *bulk*. Le DMSO semble très affiné pour la poche de QR2. Cependant, contrairement aux CD, la poche de QR2 est capable d'accueillir le ligand et de nombreuses molécules de solvants. Or, le changement d'affinité observé pour les CD en présence du DMSO est dû à la compétition entre le ligand et le DMSO pour la cavité. Donc nous nous attendons à ne pas voir d'effet du DMSO sur l'affinité du MCA-NAT pour QR2. Il serait intéressant de pouvoir réaliser des calculs d'énergie libre de liaison en présence et en absence de 5 % de DMSO pour voir si le DMSO a un effet sur ce système d'intérêt pharmaceutique. Cela, demande beaucoup de temps de calcul que nous n'avons pas eu le temps de demander.

Nous pouvons conclure que le DMSO à 5 % est capable d'avoir un effet sur l'affinité d'un ligand hydrophobe pour un récepteur. Cependant, cet effet dépend du récepteur et du ligand. Nos analyses semblent montrer que plus le ligand s'ajuste à la cavité et plus l'effet du DMSO est marqué. Pour valider cette hypothèse, nous pourrions faire des études similaires, pour différents couples ligand/récepteur avec un ligand plus ou moins ajusté au site de fixation. Peut-être qu'un ligand fixé en surface d'un récepteur sera moins impacté qu'un ligand enfoui dans une poche. Ce type de travaux pourrait mener à la mise au point d'un outil permettant la mesure de l'ajustement volumique entre le ligand et la poche du récepteur.

Les trois systèmes étudiés, ADA/CD, C_iE_j /CD et MCA-NAT/QR2, ont montré des

comportements différents du DMSO. Chaque système à sa particularité, ce qui rend l'analyse de l'effet du DMSO compliquée. La mise en place d'un modèle de l'effet du DMSO demande une étude plus poussée et un plus grand nombre de modèles.

Notre étude est un premier pas vers la caractérisation de l'effet du DMSO à faible concentration sur les interactions des ligands hydrophobes. Nous avons montré que le DMSO, même à une concentration de 5 %, n'est pas exempt d'effet sur les interactions. Il est important de le prendre en considération lorsque le DMSO est utilisé dans des expériences, en particulier lors des mesures d'affinité des ligands hydrophobes. Dans l'idéal, il serait utile d'avoir un terme correctif permettant de prendre en compte l'effet du DMSO lors des mesures d'affinité. Mais pour cela de nombreuses études sont nécessaires avec différents couples ligand/récepteurs mais aussi avec différentes concentrations de DMSO.

Bibliographie

- ABEL, R., YOUNG, T., FARID, R., BERNE, B. J. et FRIESNER, R. A. (2008), Role of the Active-Site Solvent in the Thermodynamics of Factor Xa Ligand Binding, *Journal of the American Chemical Society* 130.9, p. 2817–2831.
- ABEL, S., WAKS, M., MARCHI, M. et URBACH, W. (2006), Effect of Surfactant Conformation on the Structures of Small Size Nonionic Reverse Micelles : A Molecular Dynamics Simulation Study, *Langmuir* 22.22, p. 9112–9120.
- ABRAHAM, M. J., MURTOLO, T., SCHULZ, R., PÁLL, S., SMITH, J. C., HESS, B. et LINDAHL, E. (2015), GROMACS : High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers, *SoftwareX* 1-2, p. 19–25.
- AKSAMIJA, A., POLIDORI, A., PLASSON, R., DANGLES, O. et TOMAO, V. (2016), The Inclusion Complex of Rosmarinic Acid into Beta-Cyclodextrin : A Thermodynamic and Structural Analysis by NMR and Capillary Electrophoresis, *Food Chemistry* 208, p. 258–263.
- ALDEGHI, M., HEIFETZ, A., BODKIN, M. J., KNAPP, S. et BIGGIN, P. C. (2016), Accurate Calculation of the Absolute Free Energy of Binding for Drug Molecules, *Chem. Sci.* 7.1, p. 207–218.
- ANGELOVA, S., NIKOLOVA, V., PEREVA, S., SPASSOV, T. et DUDEV, T. (2017), α -Cyclodextrin : How Effectively Can Its Hydrophobic Cavity Be Hydrated?, *The Journal of Physical Chemistry B* 121.39, p. 9260–9267.
- ARAKAWA, T., KITA, Y. et TIMASHEFF, S. N. (2007), Protein Precipitation and Denaturation by Dimethyl Sulfoxide, *Biophysical Chemistry* 131.1, p. 62–70.
- ARUN RASHEED (2008), Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule : A Review, *Scientia Pharmaceutica* 76.4, p. 567–598.
- ASTAFYEVA, K., URBACH, W., GARROUM, N., TAULIER, N. et THIAM, A. R. (2015), Stability of $C_{12}E_j$ Bilayers Probed with Adhesive Droplets, *Langmuir* 31.24, p. 6791–6796.
- BACLE, A., GAUTIER, R., JACKSON, C. L., FUCHS, P. F. et VANNI, S. (2017), Interdigitation between Triglycerides and Lipids Modulates Surface Properties of Lipid Droplets, *Biophysical Journal* 112.7, p. 1417–1430.
- BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M. J. et MCCAMMON, J. A. (2001), Electrostatics of Nanosystems : Application to Microtubules and the Ribosome, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.18, p. 10037–10041.
- BALL, P. (2008), Water as an Active Constituent in Cell Biology, *Chemical Reviews* 108.1, p. 74–108.

-
- BANDYOPADHYAY, S., TAREK, M., LYNCH, M. L. et KLEIN, M. L. (2000), Molecular Dynamics Study of the Poly(Oxyethylene) Surfactant C₁₂E₂ and Water, *Langmuir* 16.3, p. 942–946.
- BARON, R. et MCCAMMON, J. A. (2013), Molecular Recognition and Ligand Association, *Annual Review of Physical Chemistry* 64.1, p. 151–175.
- BARON, R., SETNY, P. et MCCAMMON, J. A. (2010), Water in Cavity-Ligand Recognition, *Journal of the American Chemical Society* 132.34, p. 12091–12097.
- BARWICK, V. J. (1997), Strategies for Solvent Selection — a Literature Review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16.6, p. 293–309.
- BATISTA, A. N., BATISTA JR, J. M., BOLZANI, V. S., FURLAN, M. et BLANCH, E. W. (2013), Selective DMSO-Induced Conformational Changes in Proteins from Raman Optical Activity, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15.46, p. 20147–20152.
- BAUER, B. A., OU, S., PATEL, S. et SIVA, K. (2012), Dynamics and Energetics of Hydrophobically Confined Water, *Physical Review E* 85.5, p. 051506.
- BENNETT, C. H. (1976), Efficient Estimation of Free Energy Differences from Monte Carlo Data, *Journal of Computational Physics* 22.2, p. 245–268.
- BENOIT, C.-E., BASTIANETTO, S., BROUILLETTE, J., TSE, Y., BOUTIN, J. A., DELAGRANGE, P., WONG, T., SARRET, P. et QUIRION, R. (2010), Loss of Quinone Reductase 2 Function Selectively Facilitates Learning Behaviors, *Journal of Neuroscience* 30.38, p. 12690–12700.
- BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., van GUNSTEREN, W. F., DiNOLA, A. et HAAK, J. R. (1984), Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath, *The Journal of Chemical Physics* 81.8, p. 3684–3690.
- BERENDSEN, H. J., POSTMA, J. P., van GUNSTEREN, W. F. et HERMANS, J. (1981), Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration, *Intermolecular Forces*, p. 331–342.
- BERNAD-BERNAD, M.-J., GRACIA-MORA, J., DIAZ, D. et CASTILLO-BLUM, S. E. (2008), Thermodynamic Study of Cyclodextrins Complexation with Benzimidazolic Antihelmintics in Different Reaction Media, *Current drug discovery technologies* 5.2, p. 146–153.
- BIZZARRI, A. R. et CANNISTRARO, S. (2002), Molecular Dynamics of Water at the Protein-Solvent Interface, *The Journal of Physical Chemistry B* 106.26, p. 6617–6633.
- BLOKZIJL, W. et ENGBERTS, J. B.F. N. (1993), Hydrophobic Effects. Opinions and Facts, *Angewandte Chemie International Edition in English* 32.11, p. 1545–1579.
- BORESCH, S., TETTINGER, F., LEITGEB, M. et KARPLUS, M. (2003), Absolute Binding Free Energies : A Quantitative Approach for Their Calculation, *The Journal of Physical Chemistry B* 107.35, p. 9535–9551.

-
- BOTAN, A. et al. (2015), Toward Atomistic Resolution Structure of Phosphatidylcholine Headgroup and Glycerol Backbone at Different Ambient Conditions, *The Journal of Physical Chemistry B* 119.49, p. 15075–15088.
- BRANDT, E. G., BRAUN, A. R., SACHS, J. N., NAGLE, J. F. et EDHOLM, O. (2011), Interpretation of Fluctuation Spectra in Lipid Bilayer Simulations, *Biophysical Journal* 100.9, p. 2104–2111.
- BRESLOW, R. et ZHANG, B. (1996), Cholesterol Recognition and Binding by Cyclodextrin Dimers, *Journal of the American Chemical Society* 118.35, p. 8495–8496.
- BROWN, D. et SUPERTI-FURGA, G. (2003), Rediscovering the Sweet Spot in Drug Discovery, *Drug discovery today* 8.23, p. 1067–1077.
- BUSSI, G., DONADIO, D. et PARRINELLO, M. (2007), Canonical Sampling through Velocity Rescaling, *The Journal of chemical physics* 126.1, p. 014101.
- CAO, R. et WU, S. (2015), In Silico Properties Characterization of Water-Soluble γ -Cyclodextrin Bi-Capped C₆₀ Complex : Free Energy and Geometrical Insights for Stability and Solubility, *Carbohydrate Polymers* 124, p. 188–195.
- CAPITANI, D., YETHIRAJ, A. et BURNELL, E. E. (2007), Memory Effects Across Surfactant Mesophases, *Langmuir* 23.6, p. 3036–3048.
- CHALIKIAN, T. V. (2003), Volumetric Properties of Proteins, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 32.1, p. 207–235.
- CHANDLER, D. (2005), Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly, *Nature* 437.7059, p. 640–647.
- CHATZIEFTHIMIOU, S. D., YANNAKOPOULOU, K. et MAVRIDIS, I. M. (2007), β -Cyclodextrin Trimers Enclosing an Unusual Organization of Guest : The Inclusion Complex β -Cyclodextrin/4-Pyridinealdazine, *CrystEngComm* 9.11, p. 976.
- CHENG, Y.-K. et ROSSKY, P. J. (1998), Surface Topography Dependence of Biomolecular Hydrophobic Hydration, *Nature* 392.6677, p. 696.
- CHONG, S.-H. et HAM, S. (2017), Dynamics of Hydration Water Plays a Key Role in Determining the Binding Thermodynamics of Protein Complexes, *Scientific Reports* 7.1.
- CICERO, G., GROSSMAN, J. C., SCHWEGLER, E., GYGI, F. et GALLI, G. (2008), Water Confined in Nanotubes and between Graphene Sheets : A First Principle Study, *Journal of the American Chemical Society* 130.6, p. 1871–1878.
- CONROY, J. P., HALL, C., LENG, C. A., RENDALL, K., TIDDY, G. J. T., WALSH, J. et LINDBLOM, G. (1990), Nonionic Surfactant Phase Behavior. The Effect of CH₃ Capping of the Terminal OH. Accurate Measurements of Cloud Curves, *Surfactants and Macromolecules : Self-Assembly at Interfaces and in Bulk*, p. 253–262.
- CONSTABLE, D. J. C., JIMENEZ-GONZALEZ, C. et HENDERSON, R. K. (2007), Perspective on Solvent Use in the Pharmaceutical Industry, *Organic Process Research & Development* 11.1, p. 133–137.

-
- CONSTANTIN, D. et OSWALD, P. (2000), Diffusion Coefficients in a Lamellar Lyotropic Phase : Evidence for Defects Connecting the Surfactant Structure, *Physical review letters* 85.20, p. 4297.
- CROMWELL, W. C., BYSTROM, K. et EFTINK, M. R. (1985), Cyclodextrin-Adamantane Carboxylate Inclusion Complexes : Studies of the Variation in Cavity Size, *The Journal of Physical Chemistry* 89.2, p. 326–332.
- CUBRILOVIC, D. et ZENOBI, R. (2013), Influence of Dimethylsulfoxide on Protein–Ligand Binding Affinities, *Analytical Chemistry* 85.5, p. 2724–2730.
- DA VIOLANTE, G., ZERROUK, N., RICHARD, I., PROVOT, G., CHAUMEIL, J. C. et ARNAUD, P. (2002), Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures, *Biological and pharmaceutical bulletin* 25.12, p. 1600–1603.
- DARDEN, T., YORK, D. et PEDERSEN, L. (1993), Particle Mesh Ewald : An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems, *The Journal of Chemical Physics* 98.12, p. 10089.
- DASS, C. R. et JESSUP, W. (2000), Apolipoprotein A-I, Cyclodextrins and Liposomes as Potential Drugs for the Reversal of Atherosclerosis. A Review, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52.7, p. 731–761.
- DAVIS, M. E. et BREWSTER, M. E. (2004), Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals : Past, Present and Future, *Nature Reviews Drug Discovery* 3.12, p. 1023–1035.
- DONG, R. et HAO, J. (2010), Complex Fluids of Poly(Oxyethylene) Monoalkyl Ether Nonionic Surfactants, *Chemical Reviews* 110.9, p. 4978–5022.
- DOS SANTOS, A. G., BAYIHA, J. C., DUFOUR, G., CATALDO, D., EVRARD, B., SILVA, L. C., DELEU, M. et MINGEOT-LECLERCQ, M.-P. (2017), Changes in Membrane Biophysical Properties Induced by the Budesonide/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859.10, p. 1930–1940.
- EARP, H. S., BLAISDELL, J. et LIN, Q. (1984), Dimethyl Sulfoxide Decreases Specific EGF Binding, *Journal of cellular biochemistry* 26.4, p. 221–230.
- EFTINK, M. R. et HARRISON, J. C. (1981), Calorimetric Studies of p -Nitrophenol Binding to α - and β -Cyclodextrin, *Bioorganic Chemistry* 10.4, p. 388–398.
- EFTINK, M. R., ANDY, M. L., BYSTROM, K., PERLMUTTER, H. D. et KRISTOL, D. S. (1989), Cyclodextrin Inclusion Complexes : Studies of the Variation in the Size of Alicyclic Guests, *Journal of the American Chemical Society* 111.17, p. 6765–6772.
- EGGERS, F. (1973), Ultrasonic Measurements with Milliliter Liquid Samples in the 0.5–100 MHz Range, *Review of Scientific Instruments* 44.8, p. 969.
- (1992), Ultrasonic Velocity and Attenuation Measurements in Liquids with Resonators, Extending the MHz Frequency Range, *Acta Acustica united with Acustica* 76.5, p. 231–240.

-
- EGGERS, F. et KAATZE, U. (1996), Broad-Band Ultrasonic Measurement Techniques for Liquids, *Measurement Science and Technology* 7.1, p. 1.
- EINAGA, Y. (2009), Wormlike Micelles of Polyoxyethylene Alkyl Ethers C_iE_J , *Polymer Journal* 41.3, p. 157–173.
- EINSTEIN, A. (1905), Über Die von Der Molekular-kinetischen Theorie Der Wärme Geforderte Bewegung von in Ruhenden Flüssigkeiten Suspensierten Teilchen, *Annalen der Physik* 322.8, p. 549–560.
- ELOLA, M. D. et RODRIGUEZ, J. (2013), Structure and Dynamics of Nonionic Surfactants Adsorbed at Vacuum/Ionic Liquid Interfaces, *Langmuir* 29.44, p. 13379–13387.
- ESQUE, J., LEONARD, S., de BREVERN, A. G. et OQUEY, C. (2013), VLDP Web Server : A Powerful Geometric Tool for Analysing Protein Structures in Their Environment, *Nucleic Acids Research* 41 (W1), W373–W378.
- ESSMANN, U., PERERA, L., BERKOWITZ, M. L., DARDEN, T., LEE, H. et PEDERSEN, L. G. (1995), A Smooth Particle Mesh Ewald Method, *The Journal of chemical physics* 103.19, p. 8577–8593.
- ESWAR, N., WEBB, B., MARTI-RENOM, M. A., MADHUSUDHAN, M., ERAMIAN, D., SHEN, M.-y., PIEPER, U. et SALI, A. (2006), Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, *Current Protocols in Bioinformatics*, sous la dir. d'A. BATEMAN, W. R. PEARSON, L. D. STEIN, G. D. STORMO et J. R. YATES, Hoboken, NJ, USA, p. 5.6.1–5.6.30.
- EWALD, P. P. (1921), Die Berechnung Optischer Und Elektrostatischer Gitterpotentiale, *Annalen der Physik* 369.3, p. 253–287.
- FALCK, E., RÓG, T., KARTTUNEN, M. et VATTULAINEN, I. (2008), Lateral Diffusion in Lipid Membranes through Collective Flows, *Journal of the American Chemical Society* 130.1, p. 44–45.
- FERNANDEZ, P., WILLENBACHER, N., FRECHEN, T. et KÜHNLE, A. (2005), Vesicles as Rheology Modifier, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 262 (1-3), p. 204–210.
- FERREIRA, T. M., TOPGAARD, D. et OLLILA, O. H. S. (2014), Molecular Conformation and Bilayer Pores in a Nonionic Surfactant Lamellar Phase Studied with ^1H - ^{13}C Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulations, *Langmuir* 30.2, p. 461–469.
- FERREIRA, T. M., MEDRONHO, B., MARTIN, R. W. et TOPGAARD, D. (2008), Segmental Order Parameters in a Nonionic Surfactant Lamellar Phase Studied with ^1H - ^{13}C Solid-State NMR, *Physical Chemistry Chemical Physics* 10.39, p. 6033.
- FERREIRA, T. M., CORETA-GOMES, F., OLLILA, O. H. S., MORENO, M. J., VAZ, W. L. C. et TOPGAARD, D. (2013), Cholesterol and POPC Segmental Order Parameters in Lipid Membranes : Solid State ^1H - ^{13}C NMR and MD Simulation Studies, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15.6, p. 1976–1989.

-
- FERRY, G. et al. (2010), Old and New Inhibitors of Quinone Reductase 2, *Chemico-Biological Interactions* 186.2, p. 103–109.
- FIELDING, L. (2000), Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data, *Tetrahedron* 56.34, p. 6151–6170.
- FISSETTE, O., PÄSLACK, C., BARNES, R., ISAS, J. M., LANGEN, R., HEYDEN, M., HAN, S. et SCHÄFER, L. V. (2016), Hydration Dynamics of a Peripheral Membrane Protein, *Journal of the American Chemical Society* 138.36, p. 11526–11535.
- FOGARTY, A. C. et LAAGE, D. (2014), Water Dynamics in Protein Hydration Shells : The Molecular Origins of the Dynamical Perturbation, *The Journal of Physical Chemistry B* 118.28, p. 7715–7729.
- FOSTER, C. E., BIANCHET, M. A., TALALAY, P., ZHAO, Q. et AMZEL, L. M. (1999), Crystal Structure of Human Quinone Reductase Type 2, a Metalloflavoprotein, *Biochemistry* 38.31, p. 9881–9886.
- FOTIADOU, K., THANASSOULAS, A., NOUNESIS, G. et YANNAKOPOULOU, K. (2011), Cooperative Heterodimer Formation between Per-Guadinylated and Carboxylated or Phosphorylated Cyclodextrins in DMSO and DMSO–water Studied by NMR Spectroscopy and Microcalorimetry, *Supramolecular Chemistry* 23.7, p. 493–500.
- FRANCHI, P., LUCARINI, M. et PEDULLI, G. F. (2003), Detection of Paramagnetic pH-Dependent Inclusion Complexes between β -Cyclodextrin Dimers and Nitroxide Radicals, *Angewandte Chemie International Edition* 42.16, p. 1842–1845.
- FRANK, H. S. et EVANS, M. W. (1945), Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures ; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions ; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes, *The Journal of Chemical Physics* 13.11, p. 507–532.
- FU, Y., BURYANOVSKYY, L. et ZHANG, Z. (2008), Quinone Reductase 2 Is a Catechol Quinone Reductase, *Journal of Biological Chemistry* 283.35, p. 23829–23835.
- FUCHS, P. F. J., HANSEN, H. S., HÜNENBERGER, P. H. et HORTA, B. A. C. (2012), A GROMOS Parameter Set for Vicinal Diether Functions : Properties of Polyethyleneoxide and Polyethyleneglycol, *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.10, p. 3943–3963.
- GAMBIN, Y., LOPEZ-ESPARZA, R., REFFAY, M., SIERECKI, E., GOV, N. S., GENEST, M., HODGES, R. S. et URBACH, W. (2006), Lateral Mobility of Proteins in Liquid Membranes Revisited, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.7, p. 2098–2102.
- GAMBIN, Y., REFFAY, M., SIERECKI, E., HOMBLÉ, F., HODGES, R. S., GOV, N. S., TAULIER, N. et URBACH, W. (2010), Variation of the Lateral Mobility of Transmembrane Peptides with Hydrophobic Mismatch, *The Journal of Physical Chemistry B* 114.10, p. 3559–3566.

-
- GAO, M. et SKOLNICK, J. (2013), A Comprehensive Survey of Small-Molecule Binding Pockets in Proteins, *PLoS Computational Biology* 9.10, e1003302.
- GARAVITO, R. M. et FERGUSON-MILLER, S. (2001), Detergents as Tools in Membrane Biochemistry, *Journal of Biological Chemistry* 276.35, p. 32403–32406.
- GARAVITO, R. M. et PICOT, D. (1990), The Art of Crystallizing Membrane Proteins, *Methods* 1.1, p. 57–69.
- GIBBS, J. W. (1902), *Elementary Principles in Statistical Mechanics*.
- GIDWANI, B. et VYAS, A. (2015), A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs, *BioMed Research International* 2015, p. 1–15.
- GILSON, M. K., GIVEN, J. A., BUSH, B. L. et MCCAMMON, J. A. (1997), The Statistical-Thermodynamic Basis for Computation of Binding Affinities : A Critical Review, *Biophysical Journal* 72.3, p. 1047–1069.
- GOLUBOVIĆ, L. et LUBENSKY, T. C. (1989), Smectic Elastic Constants of Lamellar Fluid Membrane Phases : Crumpling Effects, *Physical Review B* 39.16, p. 12110.
- GORDON, E. M., BARRETT, R. W., DOWER, W. J., FODOR, S. P. et GALLOP, M. A. (1994), Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions, *Journal of medicinal chemistry* 37.10, p. 1385–1401.
- GRADZIELSKI, M., LANGEVIN, D., SOTTMANN, T. et STREY, R. (1997), Droplet Microemulsions at the Emulsification Boundary : The Influence of the Surfactant Structure on the Elastic Constants of the Amphiphilic Film, *The Journal of Chemical Physics* 106.19, p. 8232–8238.
- HAMILTON, J. A. et SABESAN, M. N. (1982), Structure of a Complex of Cycloheptaamylose with 1-Adamantanecarboxylic Acid, *Acta Crystallographica Section B : Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 38.12, p. 3063–3069.
- HANSEN, N. et van GUNSTEREN, W. F. (2014), Practical Aspects of Free-Energy Calculations : A Review, *Journal of Chemical Theory and Computation* 10.7, p. 2632–2647.
- HARRIES, D., RAU, D. C. et PARSEGAN, V. A. (2005), Solutes Probe Hydration in Specific Association of Cyclodextrin and Adamantane, *Journal of the American Chemical Society* 127.7, p. 2184–2190.
- HARRISON, J. C. et EFTINK, M. R. (1982), Cyclodextrin–adamantanecarboxylate Inclusion Complexes : A Model System for the Hydrophobic Effect, *Biopolymers* 21.6, p. 1153–1166.
- HASHIMOTO, T. et NAKAI, M. (2011), Increased Hippocampal Quinone Reductase 2 in Alzheimer’s Disease, *Neuroscience Letters* 502.1, p. 10–12.

-
- HEINZ, T. N., van GUNSTEREN, W. F. et HÜNENBERGER, P. H. (2001), Comparison of Four Methods to Compute the Dielectric Permittivity of Liquids from Molecular Dynamics Simulations, *The Journal of Chemical Physics* 115.3, p. 1125–1136.
- HELFRICH, W (1973), Elastic Properties of Lipid Bilayers : Theory and Possible Experiments, *Zeitschrift für Naturforschung C* 28 (11-12), p. 693.
- HESS, B. (2008), P-LINCS : A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation, *Journal of Chemical Theory and Computation* 4.1, p. 116–122.
- HESS, B., KUTZNER, C., van der SPOEL, D. et LINDAHL, E. (2008), GROMACS 4 : Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, *Journal of Chemical Theory and Computation* 4.3, p. 435–447.
- HOCKNEY, R. W., GOEL, S. P. et EASTWOOD, J. W. (1974), Quiet High-Resolution Computer Models of a Plasma, *Journal of Computational Physics* 14.2, p. 148–158.
- HOPKINS, A. L. (2008), Network Pharmacology : The next Paradigm in Drug Discovery, *Nature Chemical Biology* 4.11, p. 682.
- HORTA, B. A. C., FUCHS, P. F. J., van GUNSTEREN, W. F. et HÜNENBERGER, P. H. (2011), New Interaction Parameters for Oxygen Compounds in the GROMOS Force Field : Improved Pure-Liquid and Solvation Properties for Alcohols, Ethers, Aldehydes, Ketones, Carboxylic Acids, and Esters, *Journal of Chemical Theory and Computation* 7.4, p. 1016–1031.
- HORTA, B. A. C., MERZ, P. T., FUCHS, P. F. J., DOLENC, J., RINIKER, S. et HÜNENBERGER, P. H. (2016), A GROMOS-Compatible Force Field for Small Organic Molecules in the Condensed Phase : The 2016H66 Parameter Set, *Journal of Chemical Theory and Computation* 12.8, p. 3825–3850.
- HUANG, Y., CARTLIDGE, R., WALPITAGAMA, M., KASLIN, J., CAMPANA, O. et WLODKOWICZ, D. (2018), Unsuitable Use of DMSO for Assessing Behavioral Endpoints in Aquatic Model Species, *Science of The Total Environment* 615 (Supplement C), p. 107–114.
- HUGGINS, D. J. (2015), Quantifying the Entropy of Binding for Water Molecules in Protein Cavities by Computing Correlations, *Biophysical Journal* 108.4, p. 928–936.
- HUMPHREY, W., DALKE, A. et SCHULTEN, K. (1996), VMD : Visual Molecular Dynamics, *Journal of molecular graphics* 14.1, p. 33–38.
- IMMING, P., SINNING, C. et MEYER, A. (2006), Drugs, Their Targets and the Nature and Number of Drug Targets, *Nature Reviews Drug Discovery* 5.10, p. 821.
- JACOB, S. W. et WOOD, D. C. (1967), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Toxicology, Pharmacology, and Clinical Experience, *The American Journal of Surgery, Symposium on Diseases of the Small Intestine* 114.3, p. 414–426.
- JIA, Y., NARAYANAN, J., LIU, X.-Y. et LIU, Y. (2005), Investigation on the Mechanism of Crystallization of Soluble Protein in the Presence of Nonionic Surfactant, *Biophysical Journal* 89.6, p. 4245–4251.

-
- KHUNTAWEE, W., KARTTUNEN, M. et WONG-EKKABUT, J. (2017), A Molecular Dynamics Study of Conformations of Beta-Cyclodextrin and Its Eight Derivatives in Four Different Solvents, *Physical Chemistry Chemical Physics* 19.35, p. 24219–24229.
- KIRSCHNER, K. N., YONGYE, A. B., TSCHAMPEL, S. M., GONZÁLEZ-OUTEIRIÑO, J., DANIELS, C. R., FOLEY, B. L. et WOODS, R. J. (2008), GLYCAM06 : A Generalizable Biomolecular Force Field. Carbohydrates, *Journal of Computational Chemistry* 29.4, p. 622–655.
- KLIGMAN, A. M. (1965), Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide—Part 1, *JAMA* 193.10, p. 796–804.
- KLIMOVICH, P. V., SHIRTS, M. R. et MOBLEY, D. L. (2015), Guidelines for the Analysis of Free Energy Calculations, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 29.5, p. 397–411.
- KLOSE, G. et LEVINE, Y. K. (2000), Membranes of Palmitoylcholine and C₁₂E₄ A Lattice Model Simulation, *Langmuir* 16.2, p. 671–676.
- KLOSE, G., MÄDLER, B., SCHÄFER, H. et SCHNEIDER, K.-P. (1999), Structural Characterization of POPC and C₁₂E₄ in Their Mixed Membranes at Reduced Hydration by Solid State ²H NMR, *The Journal of Physical Chemistry B* 103.15, p. 3022–3029.
- KOLA, I. et LANDIS, J. (2004), Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates ?, *Nature Reviews Drug Discovery* 3.8, p. 711.
- KREKELER, C. et SITE, L. D. (2007), Solvation of Positive Ions in Water : The Dominant Role of Water–water Interaction, *Journal of Physics : Condensed Matter* 19.19, p. 192101.
- KURTISOVSKI, E., TAULIER, N., OBER, R., WAKS, M. et URBACH, W. (2007), Molecular Origin of Model Membrane Bending Rigidity, *Physical Review Letters* 98.25.
- LAAGE, D. et HYNES, J. T. (2006), A Molecular Jump Mechanism of Water Reorientation, *Science* 311.5762, p. 832–835.
- LAAGE, D., STIRNEMANN, G. et HYNES, J. T. (2009), Why Water Reorientation Slows without Iceberg Formation around Hydrophobic Solutes, *The Journal of Physical Chemistry B* 113.8, p. 2428–2435.
- LAAGE, D., STIRNEMANN, G., STERPONE, F., REY, R. et HYNES, J. T. (2011), Reorientation and Allied Dynamics in Water and Aqueous Solutions, *Annual Review of Physical Chemistry* 62.1, p. 395–416.
- LAAGE, D., ELSAESSER, T. et HYNES, J. T. (2017), Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules, *Chemical Reviews* 117.16, p. 10694–10725.
- LAI, H.-H. et CHEN, L.-J. (1999), Liquid-Liquid Equilibrium Phase Diagram and Density of Three Water + Nonionic Surfactant C_iE_j Binary Systems, *Journal of Chemical & Engineering Data* 44.2, p. 251–253.

-
- Le MAIRE, M., CHAMPEIL, P. et MØLLER, J. V. (2000), Interaction of Membrane Proteins and Lipids with Solubilizing Detergents, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1508.1, p. 86–111.
- LEE, J., VOGT, C. E., MCBRAIRTY, M. et AL-HASHIMI, H. M. (2013), Influence of Dimethylsulfoxide on RNA Structure and Ligand Binding, *Analytical Chemistry* 85.20, p. 9692–9698.
- LEONG, S., LIM, T. et CHOONG, Y. (2016), Bioinformatics for Membrane Lipid Simulations : Models, Computational Methods, and Web Server Tools, *Bioinformatics - Updated Features and Applications*, sous la dir. d'I. Y. ABDURAKHMOMOV.
- LEVENTIS, R. et SILVIUS, J. R. (2001), Use of Cyclodextrins to Monitor Transbilayer Movement and Differential Lipid Affinities of Cholesterol, *Biophysical Journal* 81.4, p. 2257–2267.
- LI, Z. et LAZARIDIS, T. (2006), Thermodynamics of Buried Water Clusters at a Protein-Ligand Binding Interface, *The Journal of Physical Chemistry B* 110.3, p. 1464–1475.
- LICHTENTHALER, F. W. et IMMEL, S. (1996), Towards Understanding Formation and Stability of Cyclodextrin Inclusion Complexes : Computation and Visualization of Their Molecular Lipophilicity Patterns, *Starch - Stärke* 48.4, p. 145–154.
- LINDAHL, E. et EDHOLM, O. (2000a), Mesoscopic Undulations and Thickness Fluctuations in Lipid Bilayers from Molecular Dynamics Simulations, *Biophysical journal* 79.1, p. 426–433.
- (2000b), Spatial and Energetic-Entropic Decomposition of Surface Tension in Lipid Bilayers from Molecular Dynamics Simulations, *The Journal of Chemical Physics* 113.9, p. 3882–3893.
- LINDBLOM, G. et ORÄDD, G. (2009), Lipid Lateral Diffusion and Membrane Heterogeneity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788.1, p. 234–244.
- LINS, R. D. et HÜNENBERGER, P. H. (2005), A New GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates, *Journal of Computational Chemistry* 26.13, p. 1400–1412.
- LOFTSSON, T. et BREWSTER, M. E. (2010), Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins : Basic Science and Product Development : Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62.11, p. 1607–1621.
- LOISON, C., MARESCHAL, M. et SCHMID, F. (2004), Pores in Bilayer Membranes of Amphiphilic Molecules : Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations Compared with Simple Mesoscopic Models, *The Journal of Chemical Physics* 121.4, p. 1890–1900.
- LÓPEZ, C. A., de VRIES, A. H. et MARRINK, S. J. (2011), Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction, *PLoS Computational Biology* 7.3, sous la dir. de M. BERKOWITZ, e1002020.
- (2013), Computational Microscopy of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction from Lipid Model Membranes, *Scientific Reports* 3.

-
- LUND, S., ORLOWSKI, S., FORESTA, B. de, CHAMPEIL, P., MAIRE, M. le et MØLLER, J. V. (1989), Detergent Structure and Associated Lipid as Determinants in the Stabilization of Solubilized Ca^{2+} -ATPase from Sarcoplasmic Reticulum., *Journal of Biological Chemistry* 264.9, p. 4907–4915.
- LYNCH, M. L., KOCHVAR, K. A., BURNS, J. L. et LAUGHLIN, R. G. (2000), Aqueous-Phase Behavior and Cubic Phase-Containing Emulsions in the C_{12}E_2 -Water System, *Langmuir* 16.7, p. 3537–3542.
- MANDUMPAL, J. B., KRECK, C. A. et MANCERA, R. L. (2011), A Molecular Mechanism of Solvent Cryoprotection in Aqueous DMSO Solutions, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13.9, p. 3839–3842.
- MARRINK, S. J., LINDAHL, E., EDHOLM, O. et MARK, A. E. (2001), Simulation of the Spontaneous Aggregation of Phospholipids into Bilayers, *Journal of the American Chemical Society* 123.35, p. 8638–8639.
- MARRINK, S. J., RISSELADA, H. J., YEFIMOV, S., TIELEMAN, D. P. et de VRIES, A. H. (2007), The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations, *The Journal of Physical Chemistry B* 111.27, p. 7812–7824.
- MASATOKI, S., OHNO, K., YOSHIDA, H. et MATSUURA, H. (1996), Conformational Analysis of Nonionic Surfactants in Water by a Selective Monodeuteration Method. C-D Stretching Infrared Spectroscopy of α -Monodeuterododecyl- ω -Hydroxytris(Oxyethylene)S, *The Journal of Physical Chemistry* 100.20, p. 8487–8498.
- MASCETTI, J., CASTANO, S., CAVAGNAT, D. et DESBAT, B. (2008), Organization of β -Cyclodextrin under Pure Cholesterol, DMPC, or DMPG and Mixed Cholesterol/Phospholipid Monolayers, *Langmuir* 24.17, p. 9616–9622.
- MEISL, G., KIRKEGAARD, J. B., AROSIO, P., MICHAELS, T. C. T., VENDRUSCOLO, M., DOBSON, C. M., LINSE, S. et KNOWLES, T. P. J. (2016), Molecular Mechanisms of Protein Aggregation from Global Fitting of Kinetic Models, *Nature Protocols* 11.2, p. 252–272.
- MELO, M. N., ARNAREZ, C., SIKKEMA, H., KUMAR, N., WALKO, M., BERENDSEN, H. J. C., KOCER, A., MARRINK, S. J. et INGÓLFSSON, H. I. (2017), High-Throughput Simulations Reveal Membrane-Mediated Effects of Alcohols on MscL Gating, *Journal of the American Chemical Society* 139.7, p. 2664–2671.
- MITCHELL, D. J., TIDY, G. J., WARING, L., BOSTOCK, T. et McDONALD, M. P. (1983), Phase Behaviour of Polyoxyethylene Surfactants with Water. Mesophase Structures and Partial Miscibility (Cloud Points), *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1 : Physical Chemistry in Condensed Phases* 79.4, p. 975–1000.
- MIYAMOTO, S. et KOLLMAN, P. A. (1992), SETTLE : An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models, *Journal of computational chemistry* 13.8, p. 952–962.

-
- MOBLEY, D. L. et KLIMOVICH, P. V. (2012), Perspective : Alchemical Free Energy Calculations for Drug Discovery, *The Journal of chemical physics* 137.23, p. 230901.
- MONDAL, J., FRIESNER, R. A. et BERNE, B. J. (2014), Role of Desolvation in Thermodynamics and Kinetics of Ligand Binding to a Kinase, *Journal of Chemical Theory and Computation*, p. 141126075550005.
- NAGLE, J. F. (2013), Introductory Lecture : Basic Quantities in Model Biomembranes, *Faraday discussions* 161, p. 11–29.
- NIBU, Y. et INOUE, T. (1998), Phase Behavior of Aqueous Mixtures of Some Polyethylene Glycol Decyl Ethers Revealed by DSC and FT-IR Measurements, *Journal of Colloid and Interface Science* 205.2, p. 305–315.
- NICOLAOU, K. C. (2014), Advancing the Drug Discovery and Development Process, *Angewandte Chemie* 126.35, p. 9280–9292.
- OHTANI YOSHIRO, IRIE TETSUMI, UEKAMA KANETO, FUKUNAGA KAZUHIRO et PITHA JOSEF (1989), Differential Effects of α -, β - and γ -Cyclodextrins on Human Erythrocytes, *European Journal of Biochemistry* 186 (1-2), p. 17–22.
- OLSSON, T. S., WILLIAMS, M. A., PITT, W. R. et LADBURY, J. E. (2008), The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation : Insights for Ligand Design, *Journal of Molecular Biology* 384.4, p. 1002–1017.
- OOSTENBRINK, C., VILLA, A., MARK, A. E. et VAN GUNSTEREN, W. F. (2004), A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation : The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6, *Journal of Computational Chemistry* 25.13, p. 1656–1676.
- ORSI, M. et ESSEX, J. W. (2010), Passive Permeation Across Lipid Bilayers : A Literature Review, *Molecular Simulations and Biomembranes*, sous la dir. de M. S. P. SANSOM et P. C. BIGGIN, Cambridge, p. 76–90.
- OXENKRUG, G. F., BACHURIN, S. O., PRAKHIE, I. V. et ZEFIROV, N. S. (2010), Quinone Reductase 2 and Antidepressant Effect of Melatonin Derivatives, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1199.1, p. 121–124.
- PARRINELLO, M. et RAHMAN, A. (1981), Polymorphic Transitions in Single Crystals : A New Molecular Dynamics Method, *Journal of Applied Physics* 52.12, p. 7182–7190.
- PAUL, S. M., MYTELKA, D. S., DUNWIDDIE, C. T., PERSINGER, C. C., MUNOS, B. H., LINDBORG, S. R. et SCHACHT, A. L. (2010), How to Improve R&D Productivity : The Pharmaceutical Industry’s Grand Challenge, *Nature Reviews Drug Discovery* 9.3, p. 203.
- PAZ, L., DI MEGLIO, J. M., DVOLAITZKY, M., OBER, R. et TAUPIN, C. (1984), Highly Curved Defects in Lyotropic (Nonionic) Lamellar Phases. Origin and Role in Hydration Process, *The Journal of Physical Chemistry* 88.16, p. 3415–3418.

-
- PEGAN, S. D., STURDY, M., FERRY, G., DELAGRANGE, P., BOUTIN, J. A. et MESECAR, A. D. (2011), X-Ray Structural Studies of Quinone Reductase 2 Nanomolar Range Inhibitors, *Protein Science* 20.7, p. 1182–1195.
- PEREIRA, D. A. et WILLIAMS, J. A. (2007), Origin and Evolution of High Throughput Screening, *British journal of pharmacology* 152.1, p. 53–61.
- POL-FACHIN, L., RUSU, V. H., VERLI, H. et LINS, R. D. (2012), GROMOS 53A6_{GLYC}, an Improved GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates, *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.11, p. 4681–4690.
- QVIST, J. et HALLE, B. (2008), Thermal Signature of Hydrophobic Hydration Dynamics, *Journal of the American Chemical Society* 130.31, p. 10345–10353.
- RAFFAINI, G. et GANAZZOLI, F. (2007), Hydration and Flexibility of α -, β -, γ - and δ -Cyclodextrin : A Molecular Dynamics Study, *Chemical Physics* 333 (2-3), p. 128–134.
- RANÇON, Y. et CHARVOLIN, J. (1988), Fluctuations and Phase Transformations in a Lyotropic Liquid Crystal, *The Journal of Physical Chemistry* 92.22, p. 6339–6344.
- RASK-ANDERSEN, M., ALMÉN, M. S. et SCHIÖTH, H. B. (2011), Trends in the Exploitation of Novel Drug Targets, *Nature Reviews Drug Discovery* 10.8, p. 579.
- RAYAN, G., ADRIEN, V., REFFAY, M., PICARD, M., DUCRUIX, A., SCHMUTZ, M., URBACH, W. et TAULIER, N. (2014), Surfactant Bilayers Maintain Transmembrane Protein Activity, *Biophysical Journal* 107.5, p. 1129–1135.
- REFFAY, M., GAMBIN, Y., BENABDELHAK, H., PHAN, G., TAULIER, N., DUCRUIX, A., HODGES, R. S. et URBACH, W. (2009), Tracking Membrane Protein Association in Model Membranes, *PLoS ONE* 4.4, sous la dir. de L. KREPLAK, e5035.
- REIF, M. M. et HÜNENBERGER, P. H. (2016), Origin of Asymmetric Solvation Effects for Ions in Water and Organic Solvents Investigated Using Molecular Dynamics Simulations : The Swain Acidity–Basicity Scale Revisited, *The Journal of Physical Chemistry B* 120.33, p. 8485–8517.
- ROCKLIN, G. J., MOBLEY, D. L., DILL, K. A. et HÜNENBERGER, P. H. (2013), Calculating the Binding Free Energies of Charged Species Based on Explicit-Solvent Simulations Employing Lattice-Sum Methods : An Accurate Correction Scheme for Electrostatic Finite-Size Effects, *The Journal of Chemical Physics* 139.18, p. 184103.
- ROSEN, M. J., COHEN, A. W., DAHANAYAKE, M. et HUA, X. Y. (1982), Relationship of Structure to Properties in Surfactants. 10. Surface and Thermodynamic Properties of 2-Dodecyloxypoly(Ethenoxyethanol)s, C₁₂H₂₅(OC₂H₄)_xOH, in Aqueous Solution, *The Journal of Physical Chemistry* 86.4, p. 541–545.
- ROSSI, G., FUCHS, P. F. J., BARNOUD, J. et MONTICELLI, L. (2012), A Coarse-Grained MARTINI Model of Polyethylene Glycol and of Polyoxyethylene Alkyl Ether Surfactants, *The Journal of Physical Chemistry B* 116.49, p. 14353–14362.

-
- ROUX, B., NINA, M., POMÈS, R. et SMITH, J. C. (1996), Thermodynamic Stability of Water Molecules in the Bacteriorhodopsin Proton Channel : A Molecular Dynamics Free Energy Perturbation Study, *Biophysical journal* 71.2, p. 670–681.
- RÜDIGER, V., ELISEEV, A., SIMOVA, S., SCHNEIDER, H.-J., J. BLANDAMER, M., M. CULLIS, P. et J. MEYER, A. (1996), Conformational, Calorimetric and NMR Spectroscopic Studies on Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Substituted Phenyl and Adamantane Derivatives, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 0.10, p. 2119–2123.
- SANTOS, R. et al. (2017), A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets, *Nature Reviews Drug Discovery* 16.1, p. 19.
- SARVAZAN, A. P. (1982), Development of Methods of Precise Ultrasonic Measurements in Small Volumes of Liquids, *Ultrasonics* 20.4, p. 151–154.
- SCHEIDT, H. A., HUSTER, D. et GAWRISCH, K. (2005), Diffusion of Cholesterol and Its Precursors in Lipid Membranes Studied by ^1H Pulsed Field Gradient Magic Angle Spinning NMR, *Biophysical Journal* 89.4, p. 2504–2512.
- SCHMID, N., EICHENBERGER, A. P., CHOUTKO, A., RINIKER, S., WINGER, M., MARK, A. E. et van GUNSTEREN, W. F. (2011), Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7, *European Biophysics Journal* 40.7, p. 843–856.
- SCHULER, L. D., DAURA, X. et VAN GUNSTEREN, W. F. (2001), An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase, *Journal of Computational Chemistry* 22.11, p. 1205–1218.
- SEDDON, A. M., CURNOW, P. et BOOTH, P. J. (2004), Membrane Proteins, Lipids and Detergents : Not Just a Soap Opera, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666 (1-2), p. 105–117.
- SHANG, B. Z., WANG, Z. et LARSON, R. G. (2008), Molecular Dynamics Simulation of Interactions between a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle and a Poly(Ethylene Oxide) Polymer, *The Journal of Physical Chemistry B* 112.10, p. 2888–2900.
- SHINODA, W., DEVANE, R. et KLEIN, M. L. (2007), Multi-Property Fitting and Parameterization of a Coarse Grained Model for Aqueous Surfactants, *Molecular Simulation* 33 (1-2), p. 27–36.
- (2008), Coarse-Grained Molecular Modeling of Non-Ionic Surfactant Self-Assembly, *Soft Matter* 4.12, p. 2454.
- (2012), Computer Simulation Studies of Self-Assembling Macromolecules, *Current Opinion in Structural Biology* 22.2, p. 175–186.
- SHIRTS, M. R. et CHODERA, J. D. (2008), Statistically Optimal Analysis of Samples from Multiple Equilibrium States, *The Journal of Chemical Physics* 129.12, p. 124105.
- SHIRTS, M. R. et MOBLEY, D. L. (2013), An Introduction to Best Practices in Free Energy Calculations, *Biomolecular Simulations*, sous la dir. de L. MONTICELLI et E. SALONEN, t. 924, Totowa, NJ, p. 271–311.

-
- SIEGEL, B. et BRESLOW, R. (1975), Lyophobic Binding of Substrates by Cyclodextrins in Nonaqueous Solvents, *Journal of the American Chemical Society* 97.23, p. 6869–6870.
- SNYDER, P. W., LOCKETT, M. R., MOUSTAKAS, D. T. et WHITESIDES, G. M. (2014), Is It the Shape of the Cavity, or the Shape of the Water in the Cavity?, *The European Physical Journal Special Topics* 223.5, p. 853–891.
- STELLA, V. J., RAO, V. M., ZANNOU, E. A. et ZIA, V. (1999), Mechanisms of Drug Release from Cyclodextrin Complexes, *Advanced drug delivery reviews* 36.1, p. 3–16.
- STERPONE, F., PIERLEONI, C., BRIGANTI, G. et MARCHI, M. (2004), Molecular Dynamics Study of Temperature Dehydration of a C₁₂E₆ Spherical Micelle, *Langmuir* 20.11, p. 4311–4314.
- (2006), Structure and Dynamics of Hydrogen Bonds in the Interface of a C₁₂E₆ Spherical Micelle in Water Solution : A MD Study at Various Temperatures, *The Journal of Physical Chemistry B* 110.37, p. 18254–18261.
- SZEJTLI, J. (1998), Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chemical Reviews* 98.5, p. 1743–1754.
- TABOADA, P., GUTIÉRREZ-PICHEL, M. et MOSQUERA, V. (2004), Effects of Self-Aggregation on the Hydration of an Amphiphilic Antidepressant Drug in Different Aqueous Media, *Chemical Physics* 298.1, p. 65–74.
- TACHIBANA, M., FURUSAWA, M. et KIBA, N. (1995), Application of Solvent Extraction and Synchronous Spectrofluorimetry to the Determination of the Formation Constant for a 1 : 1 Complex of Carbazole with β -Cyclodextrin in Water-Dimethyl Sulfoxide Medium, *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry* 22.4, p. 313–329.
- TAULIER, N. et CHALIKIAN, T. V. (2006), Hydrophobic Hydration in Cyclodextrin Complexation, *The Journal of Physical Chemistry B* 110.25, p. 12222–12224.
- (2008), γ -Cyclodextrin Forms a Highly Compressible Complex with 1-Adamantanecarboxylic Acid, *The Journal of Physical Chemistry B* 112.31, p. 9546–9549.
- TIELEMAN, D. P. et MARRINK, S.-J. (2006), Lipids Out of Equilibrium : Energetics of Desorption and Pore Mediated Flip-Flop, *Journal of the American Chemical Society* 128.38, p. 12462–12467.
- TIRONI, I. G., SPERB, R., SMITH, P. E. et van GUNSTEREN, W. F. (1995), A Generalized Reaction Field Method for Molecular Dynamics Simulations, *The Journal of Chemical Physics* 102.13, p. 5451–5459.
- TJERNBERG, A., MARKOVA, N., GRIFFITHS, W. J. et HALLÉN, D. (2006), DMSO-Related Effects in Protein Characterization, *Journal of Biomolecular Screening* 11.2, p. 131–137.
- TONEGAWA, A., OHNO, K., MATSUURA, H., YAMADA, K. et OKUDA, T. (2000), Conformational Dynamics of Alkyl Chains in the Lamellar Phase of a Nonionic Surfactant C₁₂E₃ Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance, *Chemistry letters* 29.4, p. 324–325.

-
- TONEGAWA, A., OHNO, K., MATSUURA, H., YAMADA, K. et OKUDA, T. (2002), A Combined Raman and Deuterium NMR Spectroscopic Study on the Molecular and Phase Structure of a Nonionic Surfactant C₁₂E₅-Water System, *The Journal of Physical Chemistry B* 106.51, p. 13211–13223.
- UITDEHAAG, J. C. M., KALK, K. H., VEEN, B. A. van der, DIJKHUIZEN, L. et DIJKSTRA, B. W. (1999), The Cyclization Mechanism of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) as Revealed by a γ -Cyclodextrin-CGTase Complex at 1.8-Å Resolution, *Journal of Biological Chemistry* 274.49, p. 34868–34876.
- VAMPARYS, L., GAUTIER, R., VANNI, S., BENNETT, W. D., TIELEMAN, D. P., ANTONNY, B., ETCHEBEST, C. et FUCHS, P. F. (2013), Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to That Induced by Positive Curvature, *Biophysical Journal* 104.3, p. 585–593.
- Van der VEGT, N. F. A. et NAYAR, D. (2017), The Hydrophobic Effect and the Role of Cosolvents, *The Journal of Physical Chemistry B*.
- VELLA, F., FERRY, G., DELAGRANGE, P. et BOUTIN, J. A. (2005), NRH :Quinone Reductase 2 : An Enzyme of Surprises and Mysteries, *Biochemical Pharmacology* 71 (1-2), p. 1–12.
- VENABLE, R. M., INGÓLFSSON, H. I., LERNER, M. G., PERRIN, B. S., CAMLEY, B. A., MARRINK, S. J., BROWN, F. L. H. et PASTOR, R. W. (2017), Lipid and Peptide Diffusion in Bilayers : The Saffman–Delbrück Model and Periodic Boundary Conditions, *The Journal of Physical Chemistry B* 121.15, p. 3443–3457.
- VOETS, I. K., CRUZ, W. A., MOITZI, C., LINDNER, P., ARÊAS, E. P. G. et SCHURTENBERGER, P. (2010), DMSO-Induced Denaturation of Hen Egg White Lysozyme, *The Journal of Physical Chemistry B* 114.36, p. 11875–11883.
- WANG, J., DENG, Y. et ROUX, B. (2006), Absolute Binding Free Energy Calculations Using Molecular Dynamics Simulations with Restraining Potentials, *Biophysical Journal* 91.8, p. 2798–2814.
- WILLIAMS, H. D., TREVASKIS, N. L., CHARMAN, S. A., SHANKER, R. M., CHARMAN, W. N., POUTON, C. W. et PORTER, C. J. H. (2013), Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development, *Pharmacological Reviews* 65.1, p. 315–499.
- WILMUT, I. (1972), The Effect of Cooling Rate, Warming Rate, Cryoprotective Agent and Stage of Development of Survival of Mouse Embryos during Freezing and Thawing, *Life Sciences* 11 (22, Part 2), p. 1071–1079.
- WOHLERT, J. et EDHOLM, O. (2006), Dynamics in Atomistic Simulations of Phospholipid Membranes : Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Rates and Lateral Diffusion, *The Journal of Chemical Physics* 125.20, p. 204703.
- WOLBER, G., SEIDEL, T., BENDIX, F. et LANGER, T. (2008), Molecule-Pharmacophore Superpositioning and Pattern Matching in Computational Drug Design, *Drug Discovery Today* 13.1, p. 23–29.

-
- YANG, J., WANG, Y., WANG, L. et ZHONG, D. (2017), Mapping Hydration Dynamics around a β -Barrel Protein, *Journal of the American Chemical Society* 139.12, p. 4399–4408.
- YANG, S.-Y. (2010), Pharmacophore Modeling and Applications in Drug Discovery : Challenges and Recent Advances, *Drug Discovery Today* 15.11, p. 444–450.
- YOUNG, T., ABEL, R., KIM, B., BERNE, B. J. et FRIESNER, R. A. (2007), Motifs for Molecular Recognition Exploiting Hydrophobic Enclosure in Protein–ligand Binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.3, p. 808–813.
- YUAN, F., WANG, S. et LARSON, R. G. (2015), Potentials of Mean Force and Escape Times of Surfactants from Micelles and Hydrophobic Surfaces Using Molecular Dynamics Simulations, *Langmuir* 31.4, p. 1336–1343.
- ZHANG, H., GE, C., van der SPOEL, D., FENG, W. et TAN, T. (2012), Insight into the Structural Deformations of Beta-Cyclodextrin Caused by Alcohol Cosolvents and Guest Molecules, *The Journal of Physical Chemistry B* 116.12, p. 3880–3889.
- ZHANG, H., TAN, T., HETÉNYI, C. et van der SPOEL, D. (2013), Quantification of Solvent Contribution to the Stability of Noncovalent Complexes, *Journal of Chemical Theory and Computation* 9.10, p. 4542–4551.
- ZHANG, J.-Q., JIANG, K.-M., XIE, X.-G., JIN, Y. et LIN, J. (2016), Water-Soluble Inclusion Complexes of Trans-Polydatin by Cyclodextrin Complexation : Preparation, Characterization and Bioactivity Evaluation, *Journal of Molecular Liquids* 219 (Supplement C), p. 592–598.
- ZHAO, R., TAN, T. et SANDSTRÖM, C. (2011), NMR Studies on Puerarin and Its Interaction with Beta-Cyclodextrin, *Journal of Biological Physics* 37.4, p. 387–400.
- ZHENG, Y.-J. et ORNSTEIN, R. L. (1996), A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics Analysis of the Effect of DMSO on Enzyme Structure and Dynamics : Subtilisin, *Journal of the American Chemical Society* 118.17, p. 4175–4180.
- ZHOU, H., GAO, M. et SKOLNICK, J. (2015), Comprehensive Prediction of Drug-Protein Interactions and Side Effects for the Human Proteome, *Scientific Reports* 5, p. 11090.

Annexes

9.1 Calcul de l'énergie libre de liaison du DMSO

Nous souhaitons calculer l'énergie libre de liaison du DMSO dans les CD à partir d'une simulation. L'énergie libre de réaction est définie comme suit :

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (9.1)$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température de simulation et K_{eq} la constante d'équilibre de réaction définie comme suit :

$$K_{eq} = \frac{\{DMSO/CD\}}{\{CD\}\{DMSO\}} \quad (9.2)$$

Avec $\{CD\}$ l'activité chimique de la CD, $\{DMSO\}$ l'activité chimique du DMSO et $\{DMSO/CD\}$ l'activité chimique du complexe d'inclusion. Cependant nous avons voulu travailler avec les concentrations, la constante d'équilibre s'écrit alors comme suit :

$$K_{eq} = \frac{[DMSO/CD]}{[CD][DMSO]} \times \frac{\gamma(DMSO/CD)}{\gamma(CD)\gamma(DMSO)} \quad (9.3)$$

Avec $[CD]$ la concentration en CD, $[DMSO]$ la concentration en DMSO et $[DMSO/CD]$ la concentration en complexe. $\gamma(CD)$ le coefficient d'activité de la CD, $\gamma(DMSO)$ le coefficient d'activité du DMSO et $\gamma(DMSO/CD)$ le coefficient d'activité du complexe. Nous considérons ici que le rapport des coefficients d'activité est égale à 1 mol l⁻¹.

On pose q la probabilité de voir un DMSO dans la cavité :

$$q = \frac{n_f}{n_{f_{tot}}} \quad (9.4)$$

Avec n_f le nombre de clichés de la trajectoire où le DMSO est dans la cavité et $n_{f_{tot}}$ le nombre total de clichés. La probabilité q peut être directement reliée aux concentrations $[CD]$, $[DMSO]$ et $[DMSO/CD]$ de l'état d'équilibre de réaction. On prend V le volume de la boîte de simulation et \mathcal{N}_A le nombre d'Avogadro, qui permet de convertir le nombre de molécules en mole. Les différentes concentrations sont calculées comme suit :

$$[DMSO/CD] = \frac{qn_{DMSO/CD}}{V\mathcal{N}_A} \quad (9.5)$$

Avec $n_{DMSO/CD}$ le nombre maximal de complexe DMSO/CD dans une boîte de simulation, ici 1.

$$[CD] = \frac{(1-q)n_{CD}}{V\mathcal{N}_A} \quad (9.6)$$

Avec n_{CD} le nombre total de molécule de CD dans la boîte de simulation, ici 1.

$$[DMSO] = \frac{(1-q)n_{DMSO} + q(n_{DMSO} - 1)}{V\mathcal{N}_A} \quad (9.7)$$

Avec n_{DMSO} le nombre total de molécule de DMSO dans la boîte de simulation, ici 29.

Si on remplace dans l'Eq. 9.3 les concentrations par les équations Eq. 9.5, 9.6 et 9.7, on obtient :

$$K_{eq} = \frac{\frac{qn_{DMSO/CD}}{V\mathcal{N}_A}}{\frac{(1-q)n_{CD}}{V\mathcal{N}_A} \frac{(1-q)n_{DMSO} + q(n_{DMSO} - 1)}{V\mathcal{N}_A}} \quad (9.8)$$

En simplifiant :

$$K_{eq} = \frac{qn_{DMSO/CD}V\mathcal{N}_A}{(1-q)n_{CD}(n_{DMSO} - qn_{DMSO} + qn_{DMSO} - q)} \quad (9.9)$$

Dans notre cas $n_{CD} = n_{DMSO/CD}$. On a alors l'équation finale suivante :

$$K_{eq} = \frac{qV\mathcal{N}_A}{(1-q)(n_{DMSO} - q)} \quad (9.10)$$

9.2 Annexe de l'article sur l'effet du DMSO

Effect of dimethyl sulfoxide on the binding of 1-adamantane carboxylic acid to β and γ -cyclodextrins

Caroline Senac,[†] Stéphane Desgranges,^{‡,¶} Christiane Contino-Pépin,[‡] Wladimir
Urbach,^{§,†} Patrick F. J. Fuchs,^{||,⊥} and Nicolas Taulier^{*,†}

*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie
Biomédicale (LIB), F-75006 Paris, France, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes
Amphiphiles, Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Université d'Avignon
et des Pays de Vaucluse, 84911 Avignon, France, Faculty of Medicine, Radiology,
University of Geneva, Switzerland, Laboratoire de Physique Statistique, Département de
Physique de l'ENS, PSL Research University, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris
Cité, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris France, Université Paris
Diderot, Paris, France, and Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École normale
supérieure, PSL Research University, CNRS, Laboratoire des Biomolécules (LBM), 4 place
Jussieu, 75005 Paris, France*

E-mail: nicolas.taulier@upmc.fr

*To whom correspondence should be addressed

[†]Sorbonne Universités

[‡]Université d'Avignon

[¶]University of Geneva

[§]PSL Research University, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Sorbonne Universités

^{||}Université Paris Diderot

[⊥]Sorbonne Universités, École normale supérieure, PSL Research University

1. Correction to the free energy of binding

The evaluation of the binding free energy of a charged species, such as carboxylic ADA (net charge of -1), using explicit-solvent simulations and lattice-sum methods (PME) induces some artefacts that need to be corrected. We used the analytical scheme suggested by Rocklin et al.¹ for correcting the free energy evaluated from our simulations:

$$\Delta G_{MD,NBC} = \Delta G_{MD,PBC}(L) + \Delta\Delta G_{ANA}(L) + \Delta\Delta G_{DSC}(L) \quad (1)$$

where $\Delta G_{MD,PBC}(L)$ is the raw value calculated from our simulations using periodic boundary conditions, $\Delta G_{MD,PBC}(L)$ is the raw value calculated from our simulations using periodic boundary conditions, $\Delta\Delta G_{ANA}(L)$ is a correction term for finite-size effects, $\Delta\Delta G_{DSC}(L)$ is a correction term for discrete solvent effects, and $\Delta G_{MD,NBC}$ is the binding free energy corrected for all these effects. All reported values in the main manuscript and in Table 1 are the corrected free energies $\Delta G_{MD,NBC}$. We explain hereafter how $\Delta\Delta G_{ANA}(L)$ and $\Delta\Delta G_{DSC}(L)$ were calculated. According to Rocklin et al., $\Delta\Delta G_{ANA}(L)$ is decomposed into four different terms, namely:

$$\Delta\Delta G_{ANA}(L) = \Delta\Delta G_{NET}(L) + \Delta\Delta G_{USV}(L) + \Delta\Delta G_{RIP}(L) + \Delta\Delta G_{EMP}(L) \quad (2)$$

where $\Delta\Delta G_{NET}(L)$ and $\Delta\Delta G_{USV}(L)$ are terms depending on the inverse of the box dimension L for which we have analytical expressions (equations (15) and (16) of Rocklin’s paper). These expressions also require the dielectric constant of the solvent ϵ_S of the model used in the simulations. We used the values 66.7 for SPC water and 39.5 for the DMSO model present in GROMOS 54A7.² For simulations in the water/DMSO mixture, we used a linear interpolation between the value of water and DMSO based on a 95%/5% mixture. For all the other terms involving the dielectric constants, we used the same values as previously described. $\Delta\Delta G_{RIP}(L)$ represents the residual integrated potential (RIP) and involves the evaluation

of the electrostatic potential. This latter was calculated using the program APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver, version 1.4.1).³ The final RIPs (I_P and I_L) were computed using the python scripts supplied by Rocklin et al.. $\Delta G_{EMP}(L)$ is an empirical correction term which also requires a Poisson-Boltzmann calculation (solvation contribution to the RIP), it was thus computed in the same way. Finally, we computed the discrete solvent correction term $\Delta\Delta G_{DSC}(L)$. For the simulations in water, we used equation (35) of Rocklin et al.:

$$\Delta\Delta G_{DSC}(L) = -\frac{\gamma_S Q_L N_S}{6\epsilon_0 L^3} \quad (3)$$

where γ_S is the quadrupole-moment trace of the SPC model (we used a value of 8.2×10^3 e nm² taken from Reif’s article² and Q_L is the ligand charge (-1 in our case), N_S is the number of solvent molecules, and L is the edge length of the box. For the simulations in the water/DMSO mixture we could not use equation 3 since it assumes a homogenous solvent. Instead we used equation (30) of Rocklin et al.:

$$\Delta\Delta G_{DSC}(L) = -\frac{\gamma_S \rho_S Q_L}{6\epsilon_0 M_S} \left(1 - \frac{V_C}{L^3}\right) \quad (4)$$

where ρ_S is the effective solvent density and V_C is the excluded volume of the complex (CD-ADA) or the ADA alone (for the simulations that do not involve the CDs). ρ_S was computed from a pure water/DMSO mixture (95%/5%) in the NPT ensemble after proper convergence. V_C was obtained by comparing the volume of a pure water/DMSO mixture, and another simulation with either the CD-ADA complex or the ADA alone within the same mixture of solvents. For γ_S and M_S , we used the same reasoning as for ϵ_S , that is, a linear interpolation between the value for water ($\gamma_S = 8.20 \times 10^{-3}$ e nm² and $M_S = 18$ g mol⁻¹) and that for DMSO ($\gamma_S = 1.45 \times 10^{-3}$ e nm² taken from Reif’s article² and $M_S = 78$ g mol⁻¹) based on a 95%/5% water /DMSO ratio.

All correction values are presented in Table S1. All these corrections have to be applied when we decouple the ligand from the complex (within the solvent), or when we decouple

the ligand alone from the solvent. In the end, the large terms tend to cancel out in the two legs of the thermodynamic cycle (especially $\Delta\Delta G_{DSC}$) leading to an effective correction to the final free energy of binding that does not exceed 1 kJ/mol. Note that only the values of $\Delta\Delta G_{RIP}$ and $\Delta\Delta G_{EMP}$ can fluctuate, the others being constant whatever the MD frame. For each system, we thus took 10 different snapshots and computed these corrections. The standard deviations were systematically very small (below 0.1 kJ/mol), we thus do not report any error in Table S1 for $\Delta\Delta G_{RIP}$ and $\Delta\Delta G_{EMP}$.

Table S1

(all values in kJ/mol)	$\Delta\Delta G_{NET}$	$\Delta\Delta G_{USV}$	$\Delta\Delta G_{RIP}$	$\Delta\Delta G_{EMP}$	$\Delta\Delta G_{ANA}$	$\Delta\Delta G_{DSC}$
water						
β -CD/ADA	48.5	-47.8	-0.4	-0.1	0.2	-75.6
γ -CD/ADA	42.9	-42.2	-0.5	0.0	0.2	-76.3
ADA	61.4	-60.5	0	0.0	0.9	-76.7
water/DMSO						
β -CD/ADA	48.5	-47.8	-0.5	-0.1	0.2	-62.7
γ -CD/ADA	42.2	-41.6	-0.5	0.0	0.1	-63.1
ADA	60.4	-59.5	0	0.0	0.9	-62.8

2. Supplementary figures

Figure S1. The figure shows the structure of β -cyclodextrin, viewed from above the larger (left panels) and narrower (right panels) cavity opening. The labels indicate the locations of H-atoms (white balls) that can be monitored by NMR. These labels are similar for γ -cyclodextrin. Green and red balls represent carbon and oxygen atoms respectively.

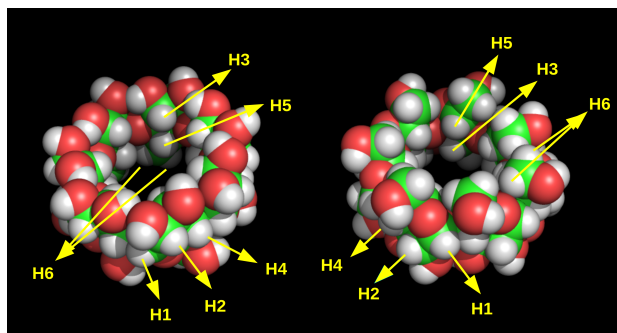
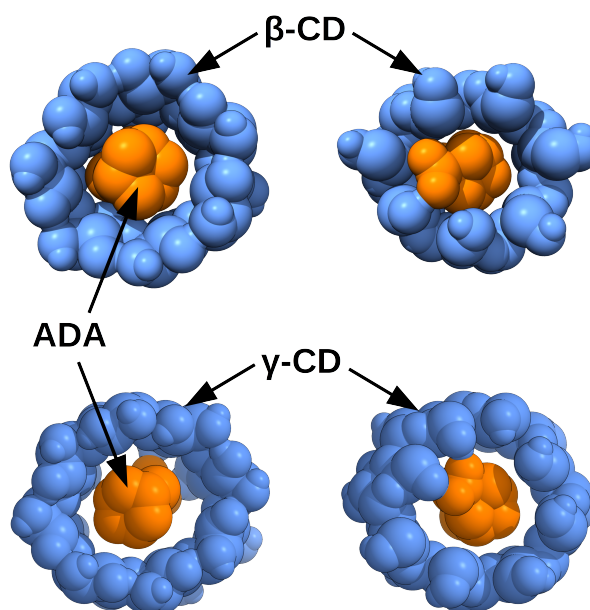


Figure S2. The figure displays the simulated complexes ADA – β -CD and ADA – γ -CD. The solvent molecules are not displayed for a better clarity. The left panels represent a top view of the larger cyclodextrin cavity opening, while the right panels show a view from the narrower CD cavity opening.



References

- (1) Rocklin, G. J.; Mobley, D. L.; Dill, K. A.; Hünenberger, P. H. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 184103.
- (2) Reif, M. M.; Hünenberger, P. H. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8485–8517.

- (3) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10037–10041.

9.3 Annexe de l'article sur les C_iE_j

Simulating bilayers of nonionic surfactants with the GROMOS-compatible 2016H66 force field

C. Senac, P.W. Urbach, E. Kurtisovski, P.H. Hünenberger, B.A.C. Horta, N. Taulier, and P.F.J. Fuchs*

* Corresponding author.

This supporting information file describes further details on the methods, as well as 2 supplementary tables and 20 supplementary figures supporting the main text.

Supplementary Methods

Self-assembly simulations for generating small bilayers

Self-assembly simulations briefly consisted of the following. After a short MD in vacuum of one surfactant molecule, 90 random conformations were inserted in a box at random places with the GROMACS tool *genbox*. Then the system was hydrated with *genbox*, and random molecules were deleted with an in-house program so that we got the exact chosen weight fraction. After a steepest descent minimization, the box was slightly compressed with successive minimizations, and then the self-assembly MD could be launched.

General considerations for simulation analyses

All the following analyses were done on pure systems or small / large bilayers. It is important to note that we observed several times the bilayer translating along the z axis. This artificial motion can distort many analyses, so we took care of removing this translation (using the GROMACS tool *trjconv*) before doing any analysis. Except otherwise stated, data collection was done on the last 195 ns (last 5 ns for density) by dividing them into 3 blocks. For the small bilayers, we had two simulations, so we used 6 blocks, while for the large bilayers, we had only one simulation, so we used 3 blocks. The final value is the mean over all blocks, and the uncertainty is the standard deviation over all blocks. In the following paragraphs, we describe how we performed each simulation analysis.

Density

Surfactant density was computed from pure surfactant simulations by dividing the total mass of surfactant in the box by the box volume.

Area per surfactant

The area per surfactant was calculated using the box area divided by the number of surfactants per leaflet.

Bilayer thickness

Bilayer thickness was calculated using a density plot from the distance between the two crossovers surfactant-water (see Figure S4 below).

Dihedral angle distributions

Dihedral angle distribution was evaluated for each angle of interest using the GROMACS tool *g_angle*. The *trans* ratio was evaluated from these distributions considering all dihedrals less than -120° or greater than 120° .

Lateral self-diffusion

Lateral diffusion of C_iE_j molecules (considering the hydroxyl oxygen for each C_iE_j) was computed on small patches only. To correct for the overall motion of each monolayer, the linear momentum was removed at each step for each monolayer separately. Lateral diffusion D was determined by fitting the distribution $P(r, \Delta t)$ of displacements r for different time intervals Δt ¹:

$$P(r, \Delta t) = (r/2D\Delta t) \exp(-r^2/4D\Delta t) \quad (1).$$

Calculating D for longer and longer Δt shows that it decays and tends to the value corresponding to the hydrodynamic regime. We thus report D for $\Delta t = 150$ ns, which is a tradeoff between having the longest possible Δt for our simulation length (200 ns) and having enough points to fit a distribution. For this analysis, the whole trajectory was used (no division into blocks). The uncertainty was evaluated by calculating the standard deviation over the two leaflets of the two trajectories. Last, the diffusion calculated in this way (D_{PBC}) is underestimated because of periodic boundary conditions and should be corrected to get the true value (D_∞) of the model². However, we did not apply this correction since we were mainly interested in relative differences between surfactants. Thus we systematically report D_{PBC} .

Bending rigidity

Bilayer rigidity was evaluated from the undulations of the large patches (1,024 surfactants). Using the continuum model of Helfrich³, it is possible to extract the rigidity (or bending) modulus κ from the power spectrum (see for example refs^{4,5}):

$$\langle |U(q)|^2 \rangle = k_B T / A \kappa q^4 \quad (2),$$

where A is the total area of the system, $U(q)$ is the discrete Fourier transform of the out-of-plane displacement $u(\mathbf{r})$ of the bilayer surface in Monge representation ($\mathbf{r}=[x,y]$), and $\langle \dots \rangle$ means averaging over the trajectory (note that the term in q^{-2} involving microscopic surface tension γ has been omitted since it is equal to 0 in our simulations). $U(q)$ is evaluated from $u(\mathbf{r})$:

$$U(q) = N^{-1} \sum_N u(\mathbf{r}) e^{iq \cdot \mathbf{r}} \quad (3),$$

where \mathbf{q} is the wave vector ($\mathbf{q}=[q_x, q_y]=2\pi[n_x, n_y]/L$, where L is the length of the bilayer edge, n_x and n_y are positive integers and we avoid the case $n_x=0; n_y=0$), q is the norm of \mathbf{q} , N is the number of grid points for discretizing the surface. κ has been evaluated from formula (2) using a non-linear fit (so that it enforces the q^{-4} behavior, *i.e.* a slope of -4 from the plot $|U(q)|^2$ vs q with a log-log scale). Note that we used only the points between 10 and 3.3 \AA^{-1} (the lowest point due to the size of our system, roughly $150 \times 150 \text{ \AA}^2$) which correspond to the undulation regime. For this analysis, we used one frame every 100 ps on the last 195 ns of each simulation. Uncertainty was evaluated by dividing the trajectory in 3 blocks and by computing the corresponding standard deviation. The power spectra are shown in Figure S20.

Flip-flop and water permeation barrier

All surfactants undergo spontaneous flip-flop within the time scale of our simulations. We could thus calculate a potential of mean force (PMF) from a simple binning of the z position of the hydroxyl oxygen atoms. For each block we ensured to have the same class intervals and could compute the probability $p(z)$ to have any hydroxyl oxygen at position z . The PMF was then calculated using:

$$\text{PMF}(z) = -RT \ln(p(z) / p^0(z)) \quad (4),$$

where R is the gas constant, T the absolute temperature and $p^0(z)$ is the highest value of $p(z)$ (thus the equilibrium position). The flip-flop barrier was deduced from the PMF between the center of the bilayer and the equilibrium position (see Figure S9). Water permeation barrier was evaluated using the same approach: we calculated a PMF for all water oxygen z positions and deduced the barrier from the PMF (difference between the water compartment and the center of the bilayer).

Flip-flop and water permeation monitoring

Flip-flop monitoring (Figure 4 of the main text and Figure S16) was easily deduced from the z position of each hydroxyl. We considered a flip-flop event when a hydroxyl oxygen from the lower leaflet passed beyond the center of the bilayer plus a buffer zone (to avoid counting unsuccessful events). We applied the same rule minus a buffer zone for a hydroxyl of the upper leaflet. For monitoring water permeation, we used the script *fluxer.py* which was recently developed for simulations of membrane channels⁶ (downloaded from <http://www.cgmartini.nl> on Monday February 20th, 2017). The idea is the same as for the flip-flop, counting the number of crossing events in the two ways. In order not to miss any event, we used a trajectory saved at one frame every 10 ps for both monitoring.

Pore area monitoring

Some C_iE_j surfactants spontaneously form large hydrophilic pores in our simulations (with the polar heads pointing towards the center of the pore). We developed an in-house python script to monitor the area of each pore. As can be seen in Figure 5 of the main text for $C_{12}E_4$ at 250 ns, when both polar heads and aliphatic tails are shown, some pores may seem narrow. We thus decided to evaluate pore area by considering alkanes only (so polar heads and water are not considered). Our method is based on a grid. For each frame, we build a grid of 200×200 grid points (each grid point is within $[0.3, 0.6] \text{ \AA}^2$ according to the system). The grid adapts to the box area fluctuations at each frame, but the number of grid points stays constant. For each grid-point, we scan the system vertically and if no aliphatic tail atom overlaps with that grid point, this latter is considered to be part of a pore. Overlap is evaluated by setting the radius of each atom to the r_{\min} distance (distance at which the LJ potential is minimal), and by calculating the distance of the center of the grid point

to the center of the square: if this distance is less than the sum of r_{\min} + half-diagonal of a grid point, there is overlap. Using *numpy*, a matrix M is built for each frame where every overlap is written as 1 (0 otherwise). To merge neighboring positive grid points, we use a connected component algorithm which gives, for each frame, the area and a label for each pore. The connected component algorithm takes periodic boundary conditions into account when pores overlap with box edges. In order to follow large pores along the trajectory, we compare the matrices ($M(t_1)$ and $M(t_2)$) of two neighboring frames (t_1 and t_2) and correct pore labels of $M(t_2)$ by checking the overlap between pores at t_1 and t_2 . When we monitor pores like in Figure S13, only those that last at least 5 ns are shown. However, when we compute the total area occupied by pores (Figure S14), we consider all of them, even the very small ones (which can occur during a flip-flop event for example).

Supplementary Tables

Table S1. Comparison of the effect of the electrostatic scheme on the small bilayer properties. The two tested schemes are reaction field (RF) and particle-mesh-Ewald (PME). See Table 1 of the main text for the meaning of the property acronyms. When the uncertainty is not reported, it is below 0.1 \AA^2 for the area, and below 1 kJ/mol for the water permeation PMF. Each scheme yields very similar values, except for C_{14}E_4 in which RF simulations gives a slightly more compact bilayer compared to PME.

	C_{12}E_2		C_{12}E_3		C_{12}E_4	
	RF	PME	RF	PME	RF	PME
$A \text{ (\AA}^2\text{)}$	29.7 ± 0.1	29.1	32.9 ± 0.1	33.6 ± 0.2	36.9	37.4 ± 0.1
$\delta \text{ (\AA)}$	36 ± 1	36 ± 2	36 ± 2	36 ± 1	37 ± 1	37 ± 2
$\Delta G_{\text{flip}} \text{ (kJ/mol)}$	19 ± 2	18 ± 2	17 ± 2	17 ± 1	13 ± 2	16 ± 1
$\Delta G_{\text{wat-perm}} \text{ (kJ/mol)}$	29.0	29.0	27 ± 3	28 ± 1	20 ± 4	23 ± 1
$D \text{ (\mu m}^2\text{/s)}$	60 ± 8	61 ± 6	47 ± 6	50 ± 5	41 ± 6	45 ± 7

	C_{12}E_5		C_{14}E_4	
	RF	PME	RF	PME
$A \text{ (\AA}^2\text{)}$	41.2 ± 0.2	40.5 ± 0.2	34.7 ± 0.5	36.7 ± 0.3
$\delta \text{ (\AA)}$	38 ± 2	39 ± 1	44 ± 1	39 ± 2
$\Delta G_{\text{flip}} \text{ (kJ/mol)}$	13 ± 3	12 ± 4	17 ± 2	20 ± 2
$\Delta G_{\text{wat-perm}} \text{ (kJ/mol)}$	28 ± 3	29 ± 3	30 ± 4	36 ± 6
$D \text{ (\mu m}^2\text{/s)}$	18 ± 4	16 ± 6	25 ± 3	29 ± 2

Table S2. Density of the different pure C_iE_j systems for the small and large boxes. The small boxes contain 150 surfactant molecules, and the large ones contain 1200 surfactant molecules. All values are in units of kg/m^3 . When the uncertainty is not shown, it is below 1 kg/m^3 . In all simulations the surfactants are in a liquid state.

	C_{12}E_2	C_{12}E_3	C_{12}E_4	C_{12}E_5	C_{14}E_4
<i>Small box</i>	879 ± 1	900	914	928 ± 1	909
<i>Large box</i>	878	899	915 ± 1	927	909
<i>Exp</i>	913 ± 3	923 ± 3	942 ± 3	967 ± 3	945 ± 3

Supplementary Figures

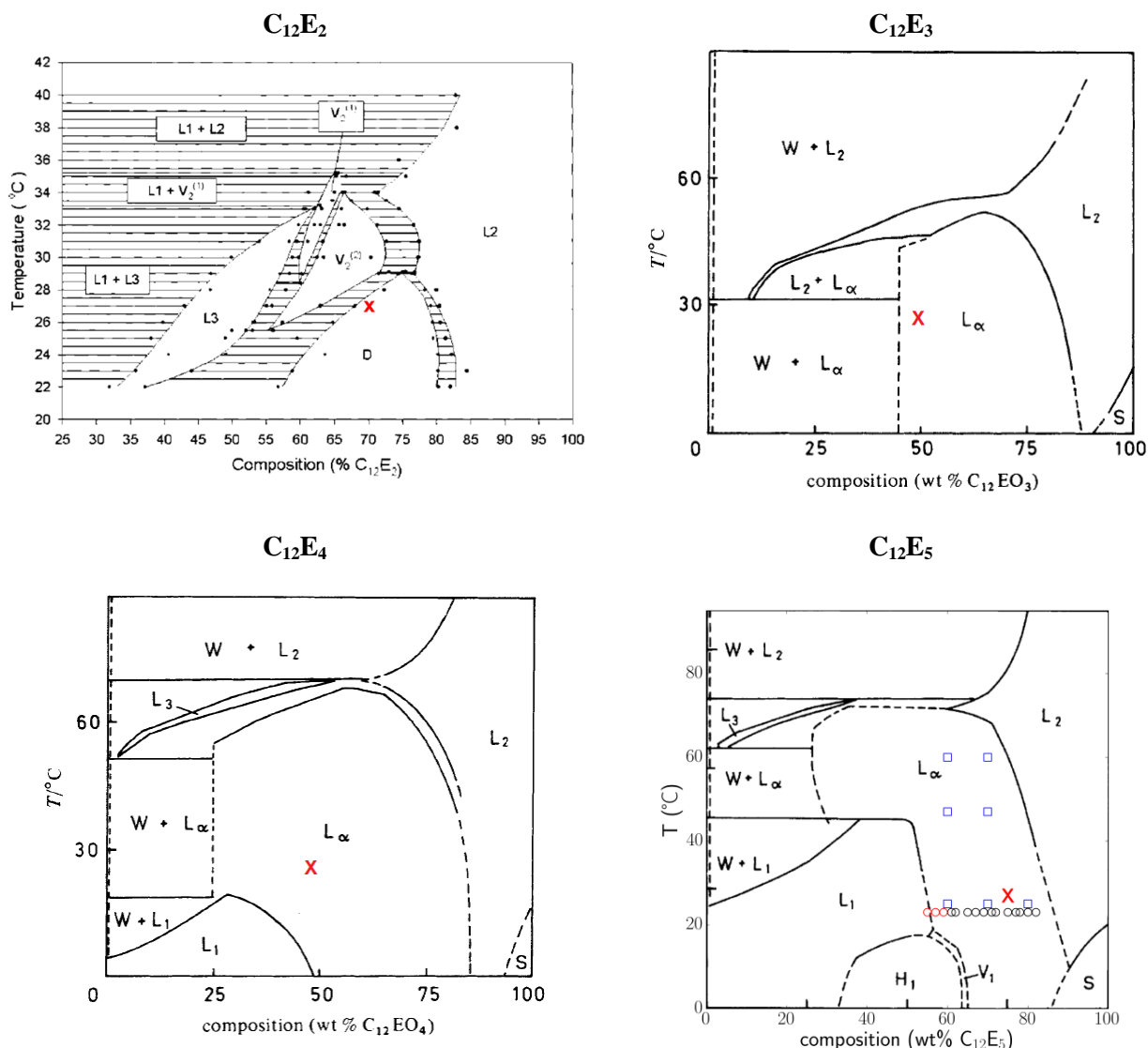


Figure S1. Phase diagrams of the different C_iE_j surfactants used in this study. The bold red cross indicates where each simulation has been performed. The letters indicating the different phases mean: L_α / D lamellar, L_1 micelle, L_2 reverse micelle, L_3 sponge, H_1 hexagonal, V_1 normal bicontinuous cubic, V_2 reverse bicontinuous cubic, S contains solid surfactant, W contains very dilute surfactant. All phase diagrams were taken from Ref ⁷, except for $C_{12}E_2$ ⁸. Notice that this latter $C_{12}E_2$ phase diagram is an improvement of the previously accepted one ⁹. To the best of our knowledge, we did not find any phase diagram for $C_{14}E_4$, but according to Ref ¹⁰ it is lamellar at (49 %, 296 K) very close to the fraction and temperature at which we ran our simulations (49 % / 300 K). For $C_{12}E_2$, we chose a weight fraction of 70% (near the point where the L_α exists at the highest temperatures, see phase diagram above) for the following reasons: (i) we initially observed that our simulations were going to a gel below 300 K (293 K), (ii) so that temperature was the same for all surfactants simulated in this work (i.e. 300 K). For $C_{12}E_5$, the blue squares correspond to the points tested by Ollila and co-workers ¹¹. The circles correspond to the points tested by Kurtisovski et al. ¹⁰ in their SAXS experiments (see the spectra in Figure S18). The spectra corresponding to the black circles gave a clear Bragg peak (indicative of an L_α), whereas the Bragg peak disappeared for the red ones (indicative of a phase change towards a L_1 , see Figure S18). It shows that the transition between L_α and L_1 is slightly more at

the right (at upper surfactant fraction) than the dashed line of the initial phase diagram ⁷ (the dashed lines indicates uncertainties where the real changes occur).

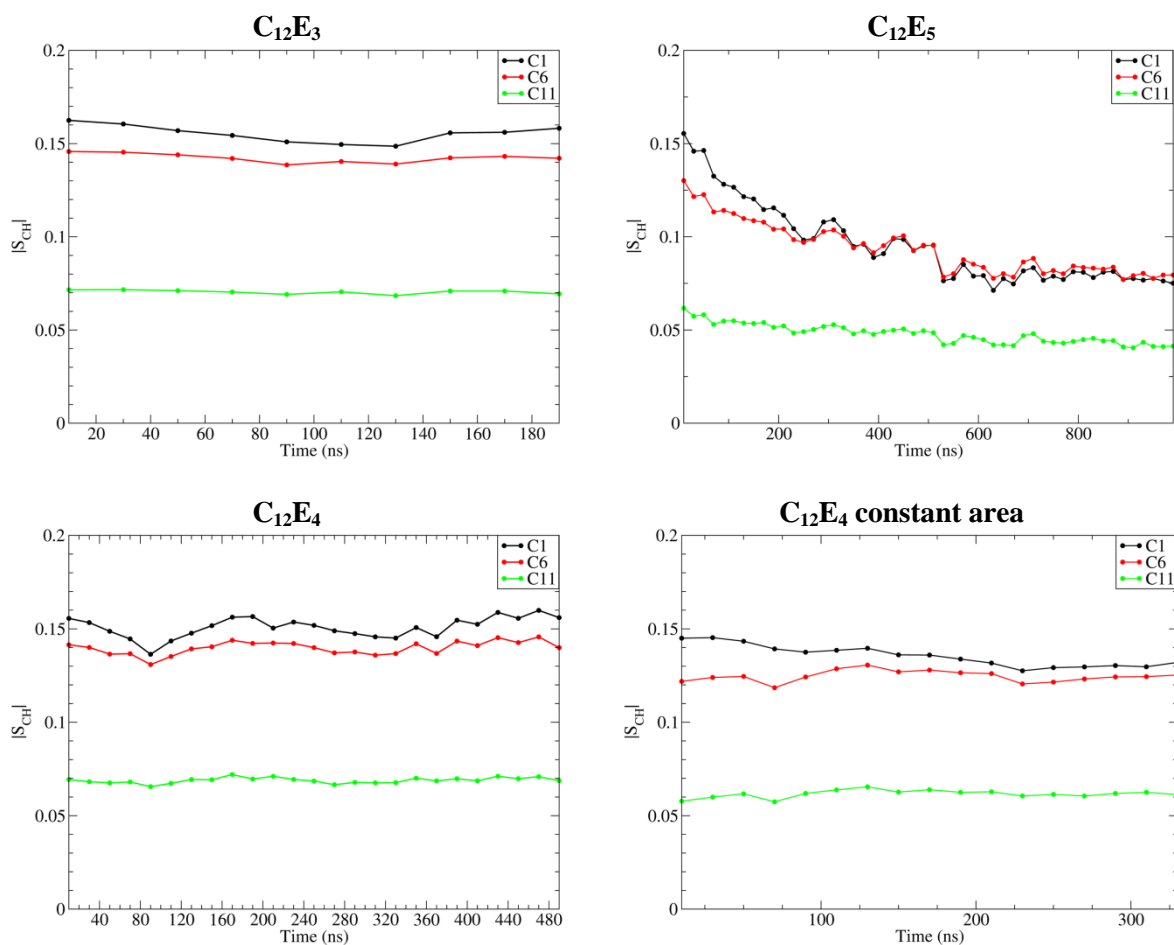


Figure S2. Convergence of the order parameters for the large $C_{12}E_3$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_4$ at constant area and $C_{12}E_5$ systems. Only three carbon atoms are showed, at the beginning, middle and end of the aliphatic chain. Each point is an average over 20 ns (the point at 10 ns corresponds to the window 0-20 ns, the point at 30 ns corresponds to the window 20-40 ns, etc). This figure illustrates the influence of large pores and phase change on the order parameters: (i) for $C_{12}E_3$ there is no large pore and the order parameters are quite stable; (ii) for $C_{12}E_4$ the decrease of the order parameters at 80 ns corresponds to the occurrence of the largest pores in the simulation; (iii) for $C_{12}E_5$ the order parameters take 700 ns to relax because there is a phase change towards a hexagonal-like phase; (iv) for $C_{12}E_4$ at constant area, the order parameters slowly decrease and seem to converge on the last 100 ns. The minimum value for C1 is reached around 230 ns. For each plot, C₁ is the carbon that is much affected, mainly because it is located at the connection between the aliphatic tail and the polar head: in a neat bilayer this is the place where the surfactants are tightly packed against each other (restraining thus their motion), so if there is no pore, the order parameters are the highest for C₁ and C₂; near a pore, C₁ and C₂ atoms have access to “some new horizontal orientations” which decrease the order parameters. Some further explanations on the relationship between pores and order parameters are described in Figure S17.

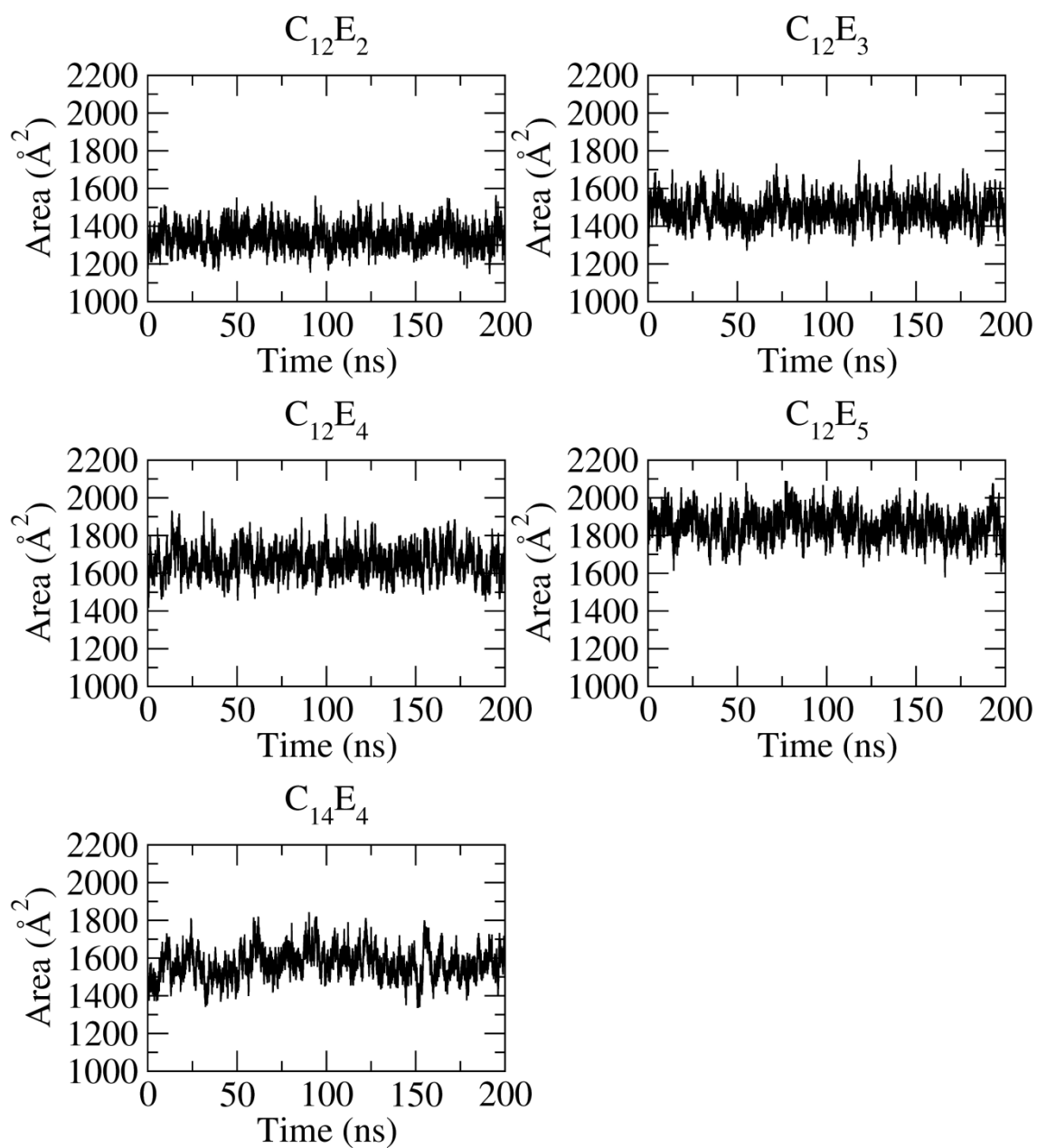


Figure S3. Time series of the area per surfactant for the small bilayers. All are well converged.

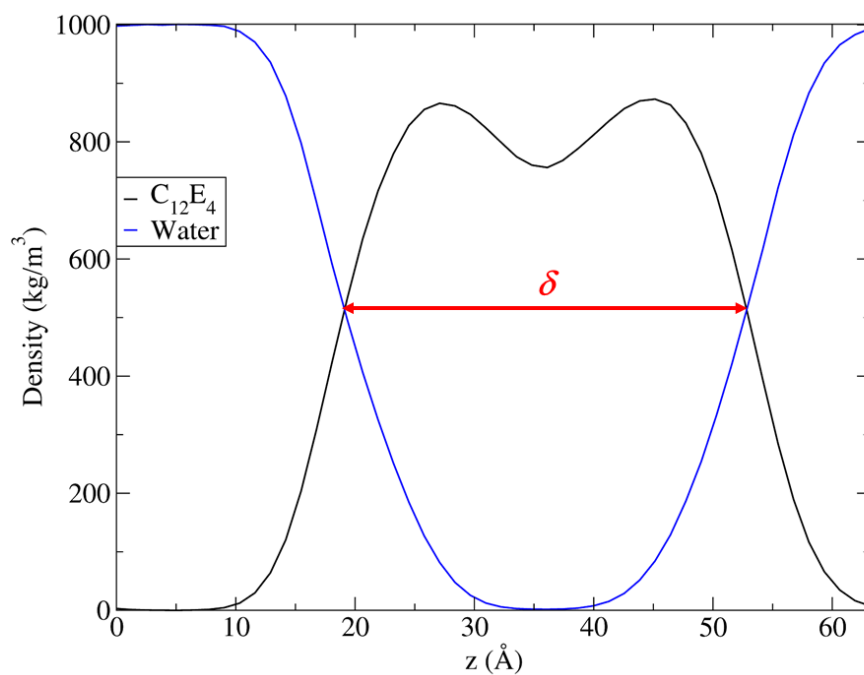


Figure S4. Determination of membrane thickness from a density plot for the small C₁₂E₄ bilayer. The thickness δ was calculated from the distance between the two crossovers as indicated by the red arrow. All other systems (not shown) look similar except for the large C₁₂E₅ system.

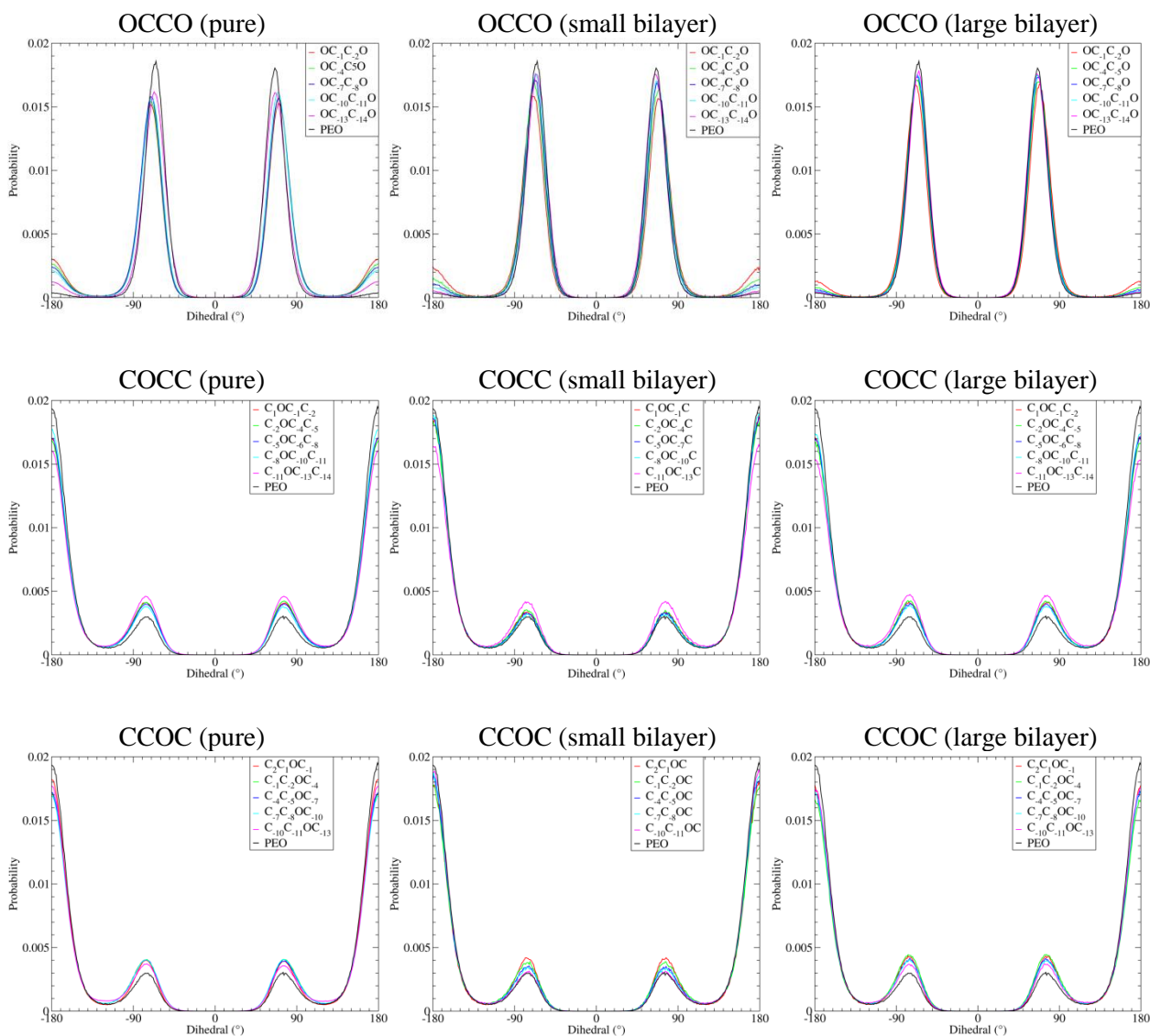


Figure S5. Distributions of polar head dihedral angles of $C_{12}E_5$ systems and PEO28. (a) The data are shown for the pure small system (left panel), the small bilayer (medium panel) and the large bilayer (right panel) $C_{12}E_5$ systems. In all panels, the dihedral distributions for PEO28 are also shown (black line), the simulations consisted of one polyethyleneoxide molecule (with 28 repeats) in water, thus at full hydration (taken from ref. ¹²). Notice that the upper middle panel is the same graph as that shown in Figure 2 of the main text (without the insets). Each distribution has been computed on the last 195 ns of the bilayer simulations (on the last 5 ns for the pure system). Strikingly, there is little difference between the small and large bilayer systems in these distributions, although the large system undergoes a phase change. The OCCO dihedral angle is dominated by the *gauche* conformations whereas the COCC and CCOC are dominated by the *trans* conformations. In the pure system, there is a clear decrease of *gauche* conformations with respect to the bilayer systems for the OCCO dihedral. This is due to the absence of water molecules preventing water bridging between two consecutive oxygen atoms.

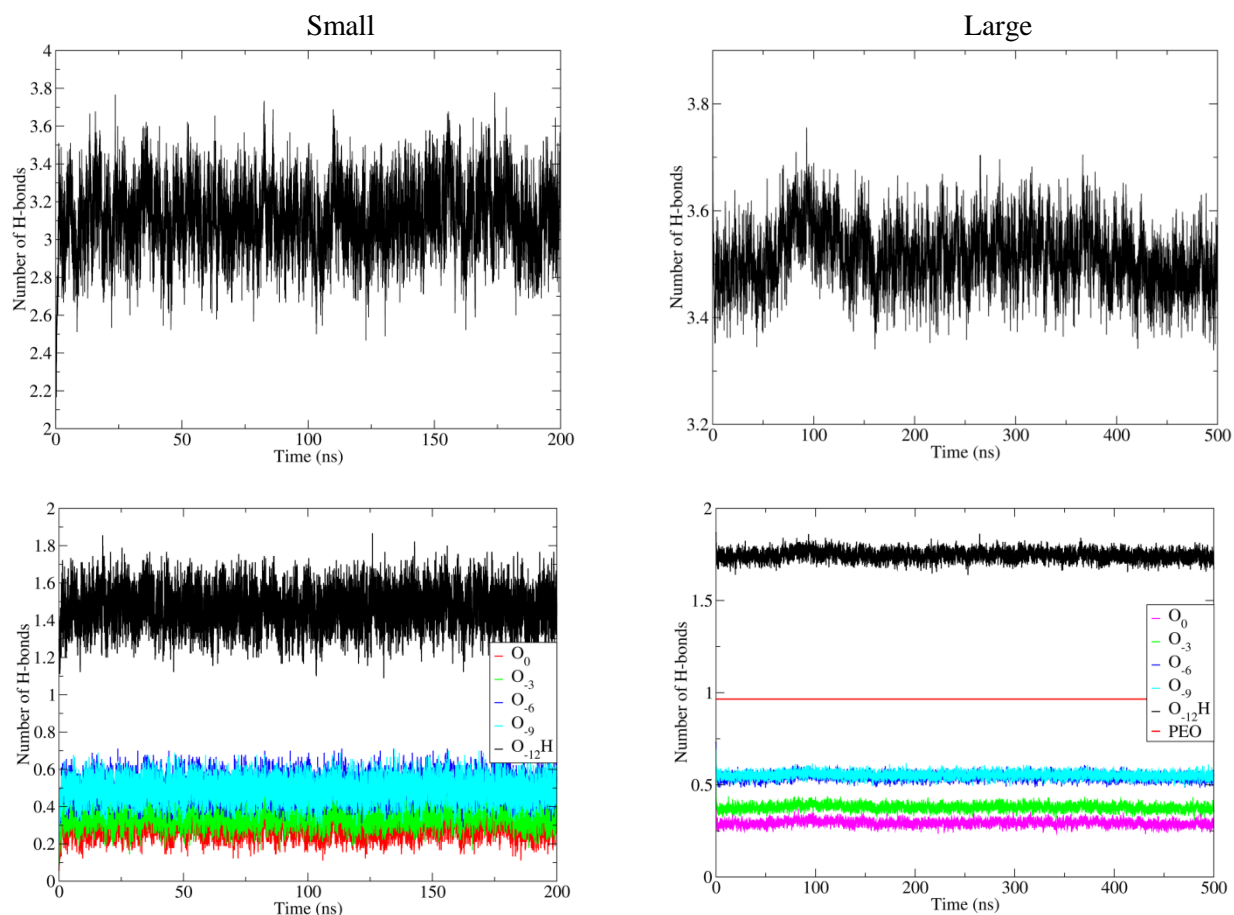


Figure S6. Hydrogen-bonds between the polar head and water in the small and large $C_{12}E_4$ bilayers. Top panels show the total number of H-bonds per surfactant between $C_{12}E_4$ polar head and water. Bottom panels show the detail for each ether oxygen and for the hydroxyl. The red line on the bottom right panel shows the mean number of H-bonds per ether oxygen in a PEO28 simulation (taken from Ref. 38 of the main text), which almost equals 1. The average values on the last 100 ns of the large (small) bilayer simulations are 0.29 (0.29) for O_0 , 0.38 (0.36) for O_{-3} , 0.54 (0.50) for O_{-6} , 0.55 (0.49) for O_{-9} , 1.75 (1.47) for $O_{-12}H$, 3.51 (3.11) for all polar head atoms. A hydrated PEO molecule has thus 3 times more H-bonds than the most buried ether oxygens of $C_{12}E_5$ and twice more H-bonds than the most exposed oxygens of $C_{12}E_4$. This quantification demonstrates the high hydration of $C_{12}E_4$ polar heads in a bilayer. The hydroxyl function has more H-bonds with water because it has both acceptor and donor atoms. The hydroxyl group has slightly more H-bonds for the large bilayer compared to the small one. For the ether oxygens, the number of H-bonds is similar between the small and large bilayers. The increase of H-bonds at 100 ns for the large bilayer is due to the presence of large hydrophilic pores.

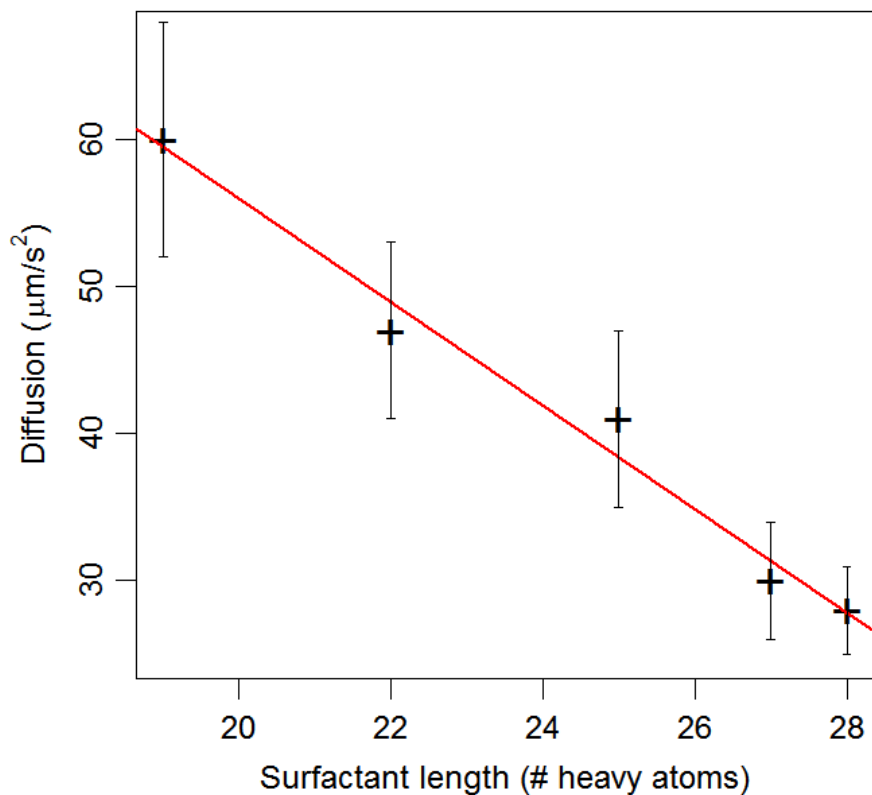


Figure S7. Lateral self-diffusion as a function of surfactant length for the small bilayers. Tabulated values and uncertainties are shown in Table 2 of the main text. The red line is a linear fit to the values ($R^2 = 0.98$, slope = $-3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}/\text{heavy atom}$, intercept = $126.1 \pm 6.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$). This graph shows that lateral diffusion appears correlated to the surfactant length.

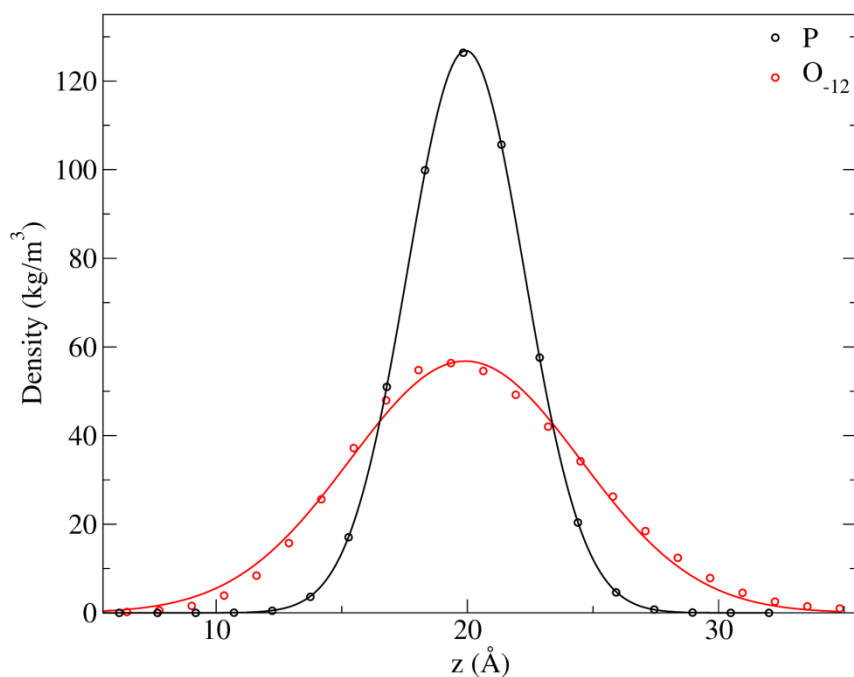


Figure S8. Density plot showing the vertical fluctuations of the $C_{12}E_4$ hydroxyl oxygen and DOPC phosphorous atoms within a leaflet of a bilayer. Both graphs were calculated from the lower leaflet of a bilayer MD simulation. After careful removal of the global z translation of each bilayer, a density plot of O_{-12} of a small $C_{12}E_4$ bilayer (red), as well as the phosphorous (P) atom (black) of a DOPC bilayer of 256 lipids (taken from Ref ¹³) were computed (circles) and the two peaks of the lower leaflet were aligned. Both simulations were performed at 300 K and 1 bar. Solid lines are fits to a Gaussian. Note that during the fit a scaling factor was used, so that the relevant output of the fit is the Gaussian width. We find a width of 4.6 Å for $C_{12}E_4$ and 2.3 Å for DOPC. This figure illustrates the more important z motion of O_{-12} in a $C_{12}E_4$ bilayer with respect to a P in a DOPC bilayer.

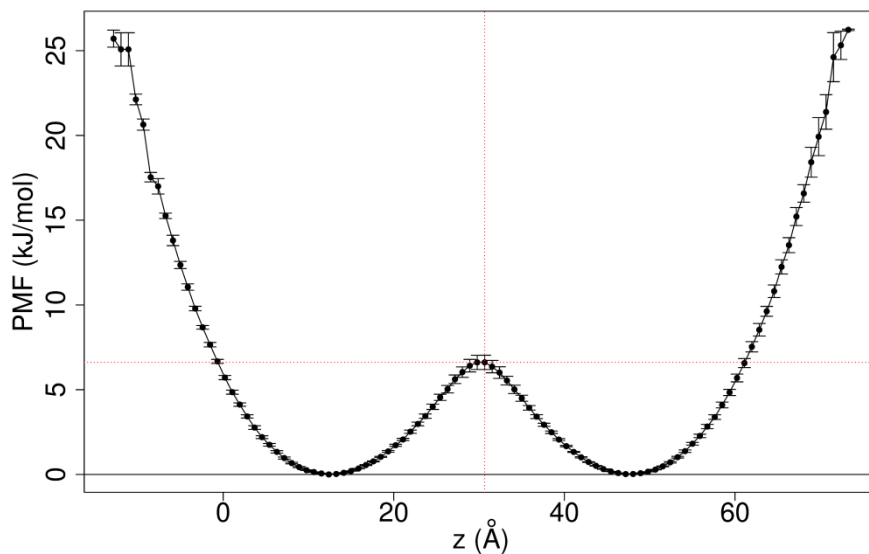


Figure S9. Potential of mean force of O_{-12} z position in a large $C_{12}E_4$ bilayer. This potential of mean force (PMF) allowed us to extract the flip-flop barrier, which is the free energy difference between the equilibrium position (when the PMF equals 0 kJ/mol) and that in the middle of the bilayer (around 30 Å). Uncertainties (vertical bars) were calculated by dividing each trajectory in 3 blocks. Note that uncertainties reported in Table 2 of the main text has been evaluated by generating one PMF per block (thus 6 PMFs) and computing 6 barrier values (the final value \pm uncertainty are the mean and standard deviation respectively). For the other surfactants each PMF resembles this one except for the large $C_{12}E_5$ system. The same strategy was used for water permeation (not shown).

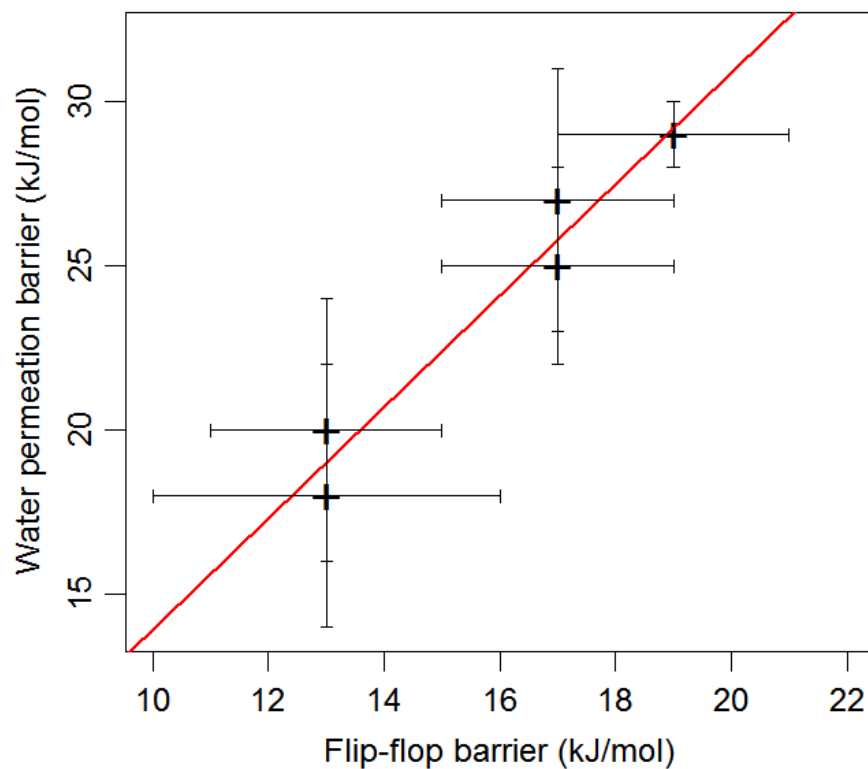


Figure S10. Relationship between the flip-flop and water permeation barriers. The red line is a linear fit to the data ($R^2 = 0.9526$, intercept = -3 ± 3 kJ/mol, slope = 1.7 ± 0.2). This graph shows that the flip-flop barrier seems linearly correlated with the water permeation barrier.

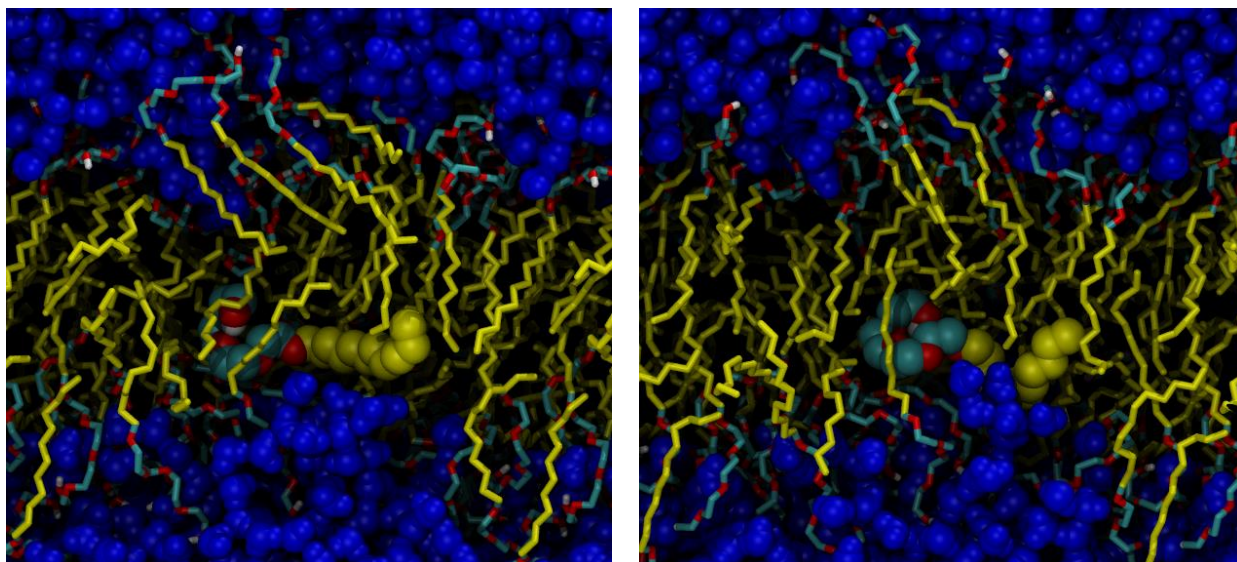


Figure S11. Illustration of a $C_{12}E_4$ flip-flop without pore. These two snapshots were taken from a small $C_{12}E_4$ bilayer simulation at a few ps of interval. Water molecules are represented as blue spheres. Surfactants are represented as licorice, in yellow for the aliphatic tails, in cyan, red, white for the polar heads (for carbon, oxygen and hydrogen respectively). The surfactant undergoing a flip-flop is represented as spheres (using the same color code). The two snapshots illustrate that the surfactant undergoing flip-flop can hydrogen-bond with itself and form a compact conformation which protects its oxygen atoms from the apolar environment.

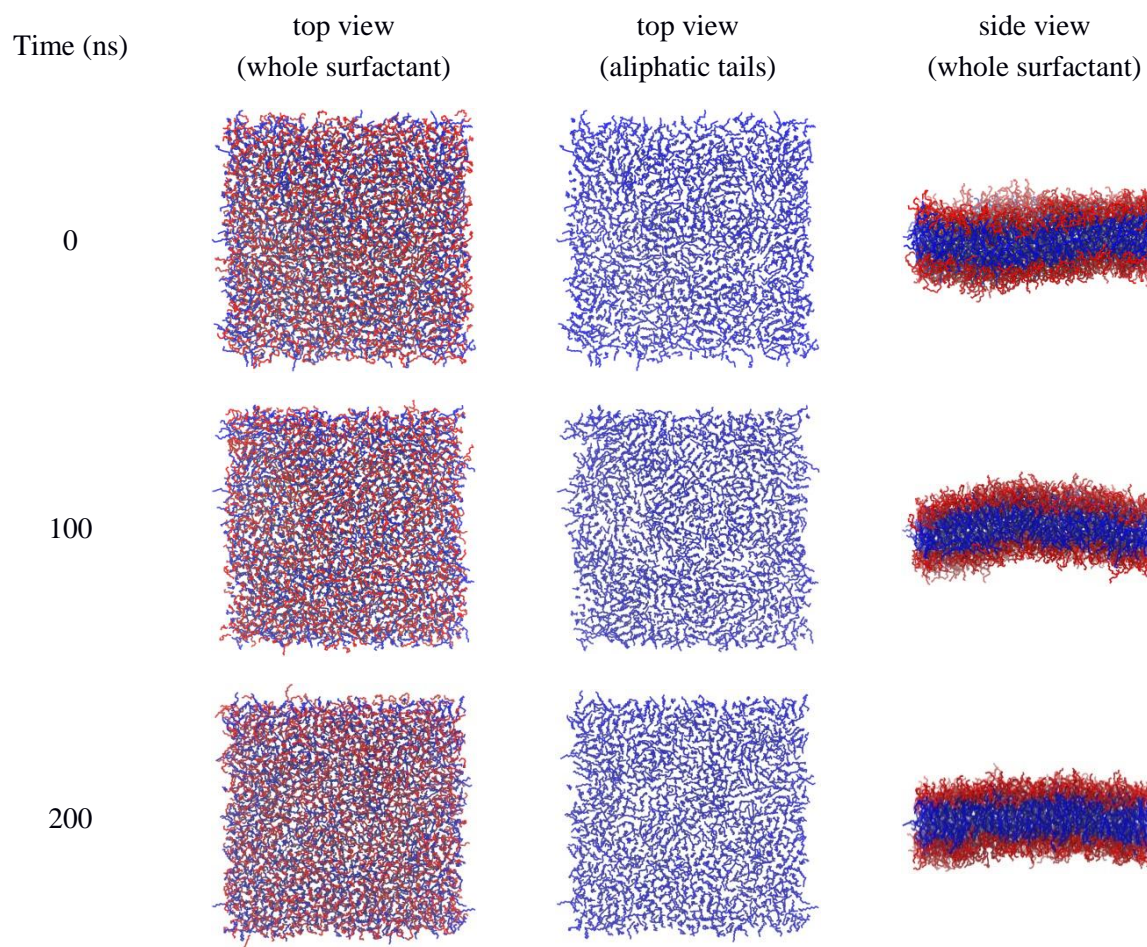


Figure S12. Evolution of the of the large $C_{12}E_3$ bilayer. Shown are snapshots at different times. Alkane tails are drawn as blue lines, polar heads as red lines, water is not shown for clarity. The lateral size is approximately $131 \times 131 \text{ \AA}^2$.

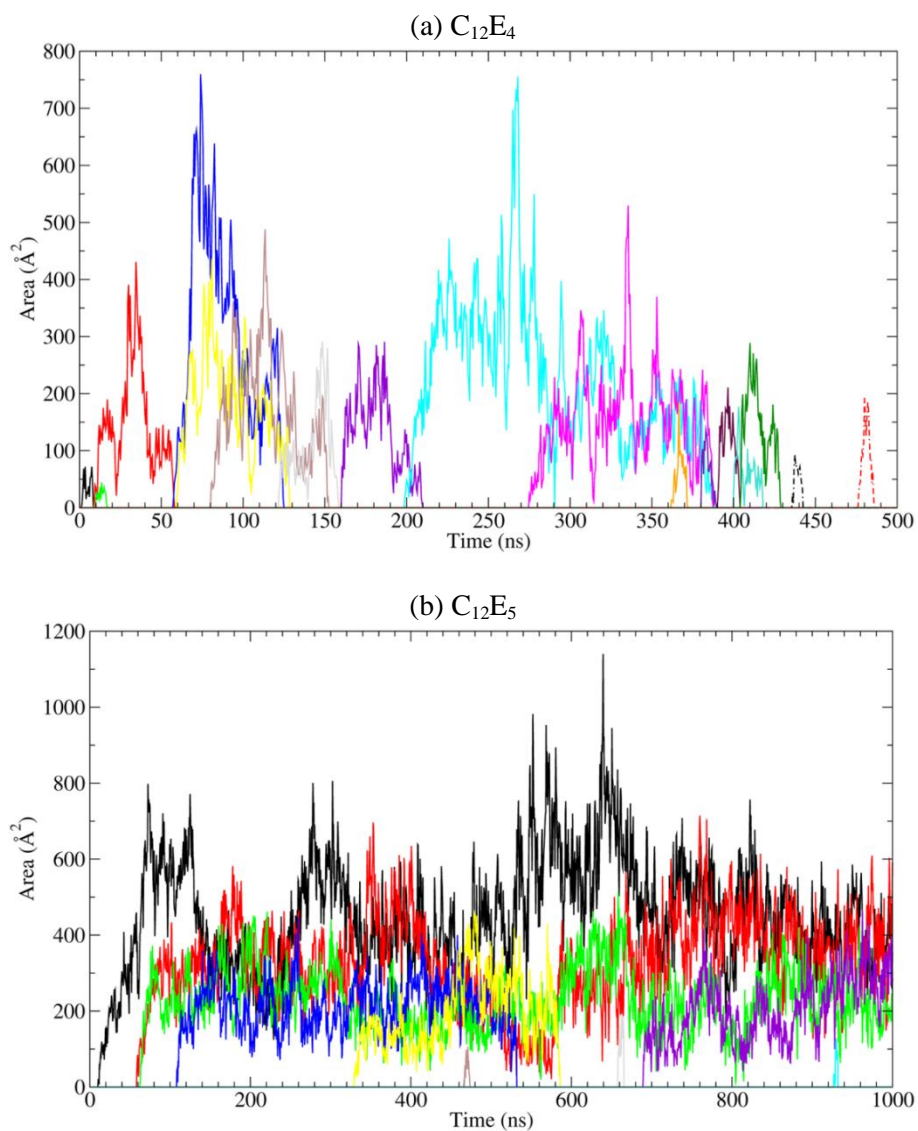


Figure S13. Area of individual pores in the large $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ bilayer systems. Each new occurring pore has a different color. Only pores that have a lifetime of at least 5 ns are shown. Of note, pore area was calculated considering aliphatic carbons only (see supp. methods above).

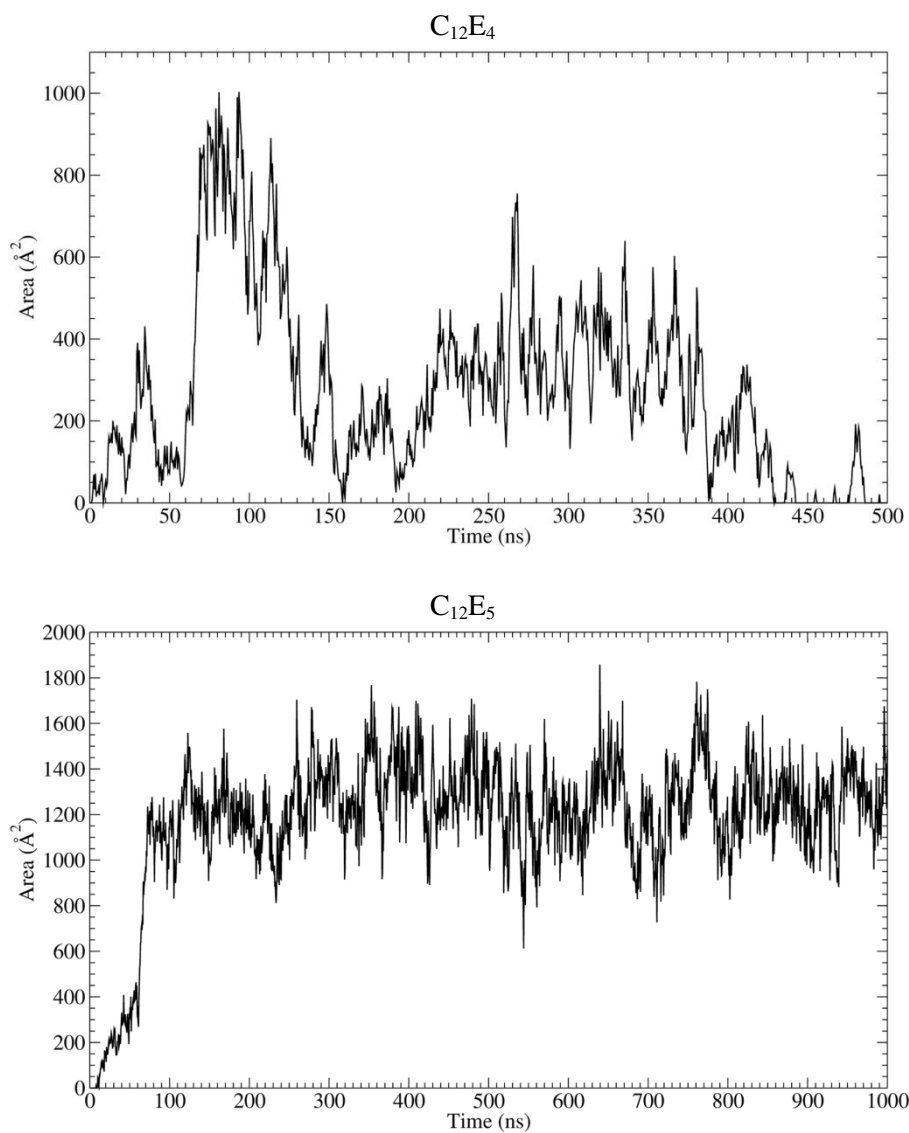


Figure S14. Total area occupied by pores in large $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ systems. Of note, pore area was calculated considering aliphatic carbons only (see supp. methods above).

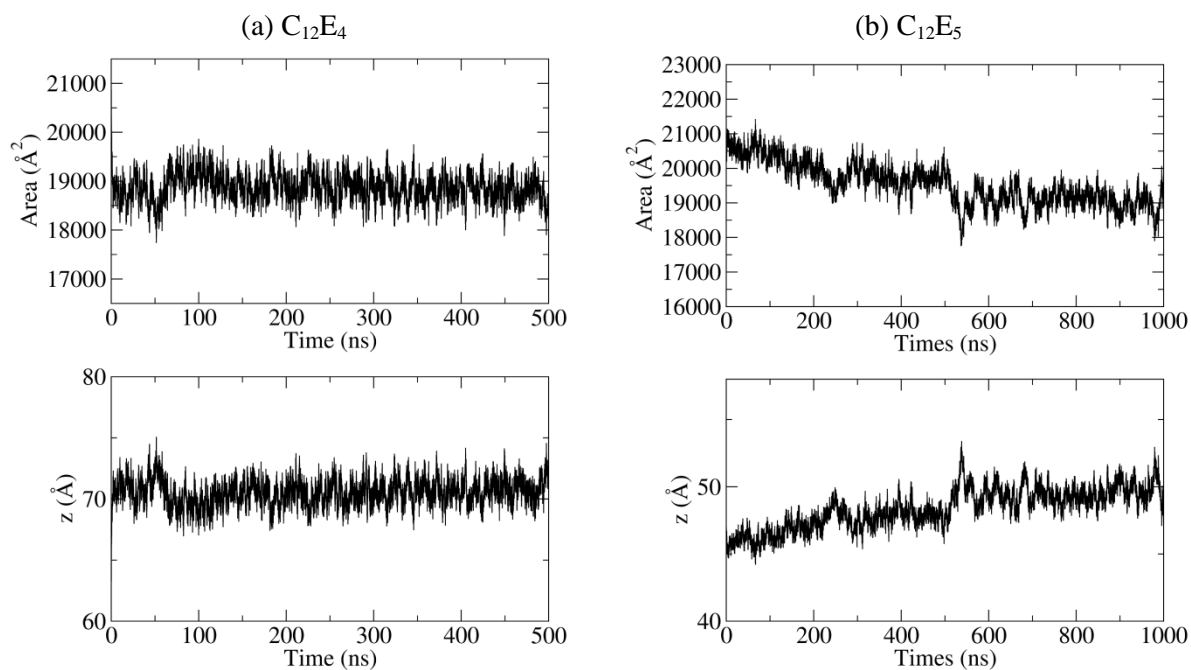


Figure S15. Time series of the box dimensions for the large $C_{12}E_4$ and $C_{12}E_5$ systems. The top panels show the area of the xy plane, whereas the lower panels show the vertical box dimension (z axis). Since we used semi-isotropic pressure coupling, there is in general compensation between xy and z dimensions.

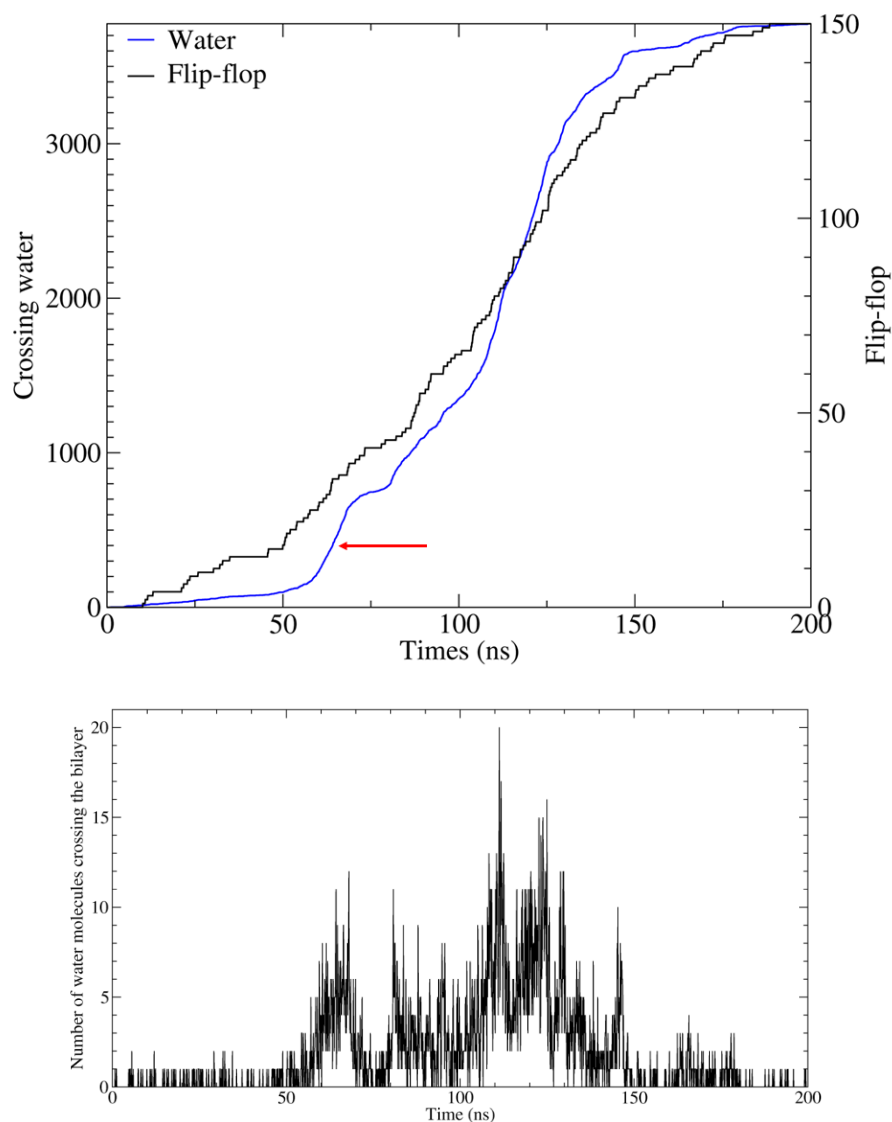


Figure S16. Flip-flop and water permeation in the large $C_{12}E_4$ simulation. The top panel shows the cumulative number of flip-flop and water permeation events. The bottom panel shows the instantaneous water flux. The red arrow points to a moment where the largest pores occur (see Figure S14 top panel). The number of flip-flops increases at this moment thanks to the pores. The slope of both curves is an indicator of the presence of pores. This plot also shows that flip-flop and water permeation are correlated.

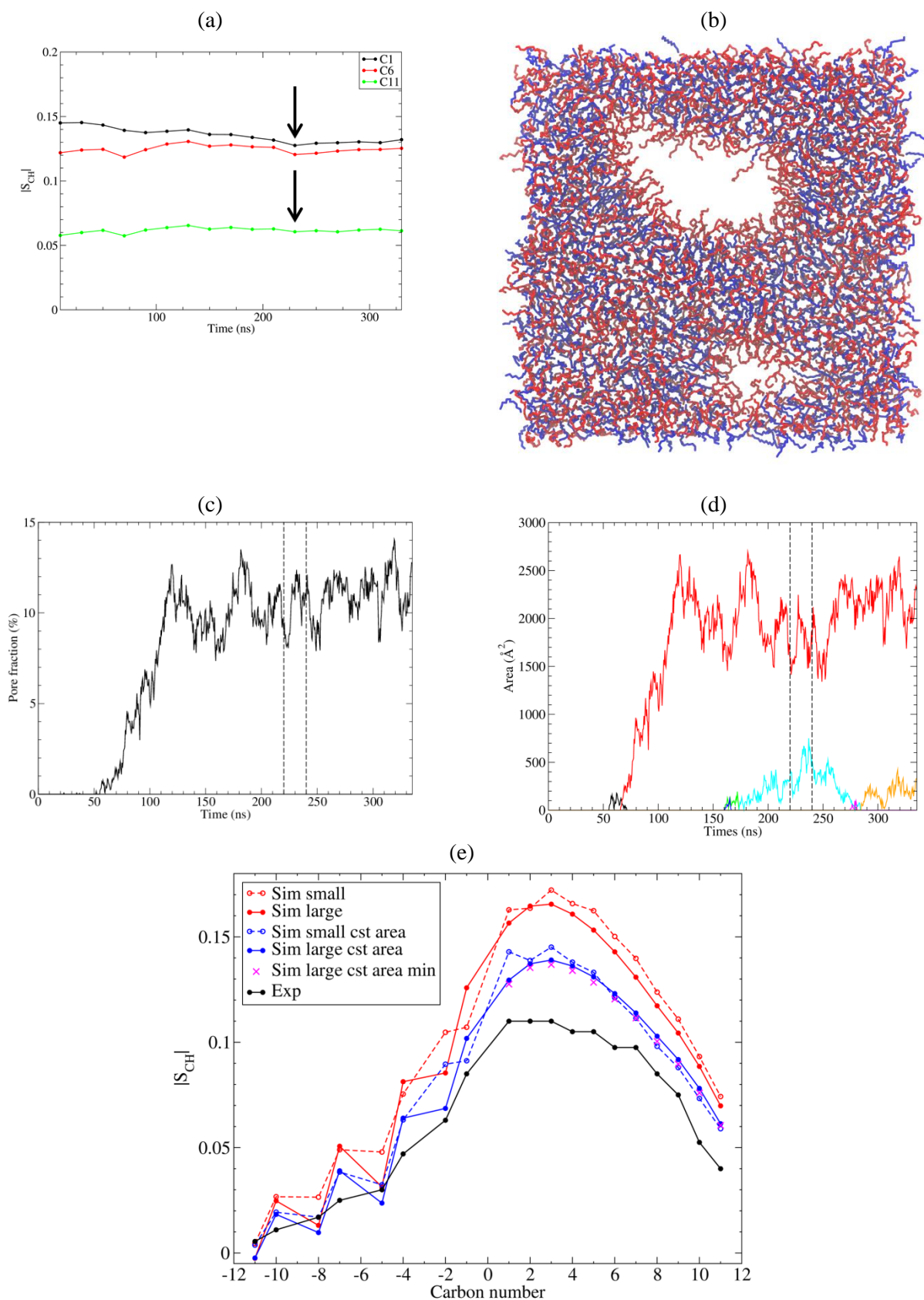


Figure S17. Thorough analysis of the large C₁₂E₄ bilayer simulation at constant area in terms of pores and order parameters. Panel (a) shows the convergence of the order parameters (taken from Figure S2), and the arrow shows the point where the order parameter of C1 is the lowest (window 220-240 ns). Panel (b) shows the corresponding snapshot where two pores are present, a large one of ~2000 Å² and a small one of ~500 Å². Panels (c) and (d) show the fraction of the total bilayer area occupied by pores and the area of each pore

respectively (the dashed lines show the window 220-240 ns). Panel (e) is a zoom of Figure 9 of the main text, but with additional magenta crosses corresponding to the order parameters of the window 220-240 ns. On this zoom we can better see the differences between the different systems. Interestingly, when the order parameters are the lowest (magenta crosses), the total area occupied by pores is not the highest (it is around 10%), but it coincides with a moment where there are two pores of moderate size (2000 and 500 Å²). It suggests that not only pores need to be present, but their number (thus their total contour length) is also important to make the order parameters decrease.

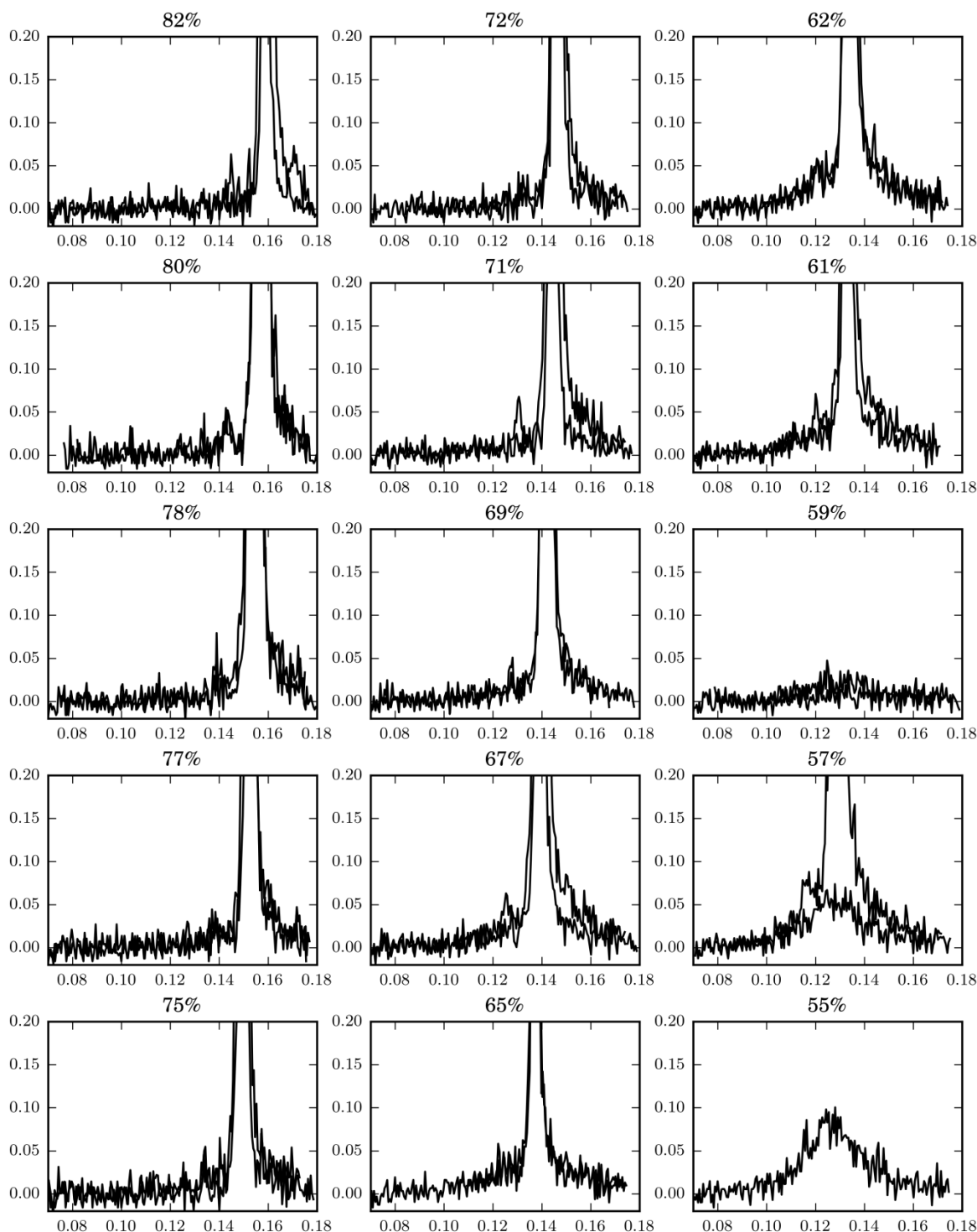


Figure S18. SAXS spectra of $C_{12}E_5$ -water mixtures at 296 K. All spectra were produced in ref ¹⁰. For each spectra, the x -axis is the wavenumber (\AA^{-1}), and the y -axis is the intensity (a.u.). Each spectrum has been recorded twice (both spectra are shown). The title of each graph is the surfactant weight fraction. From 82 to 61% we can clearly see the Bragg peak (which depends on the vertical distance bilayer thickness + water) indicative of a lamellar phase. At 59% and below, the Bragg peak tends to disappear which indicates a phase change towards a micellar phase (L_1).

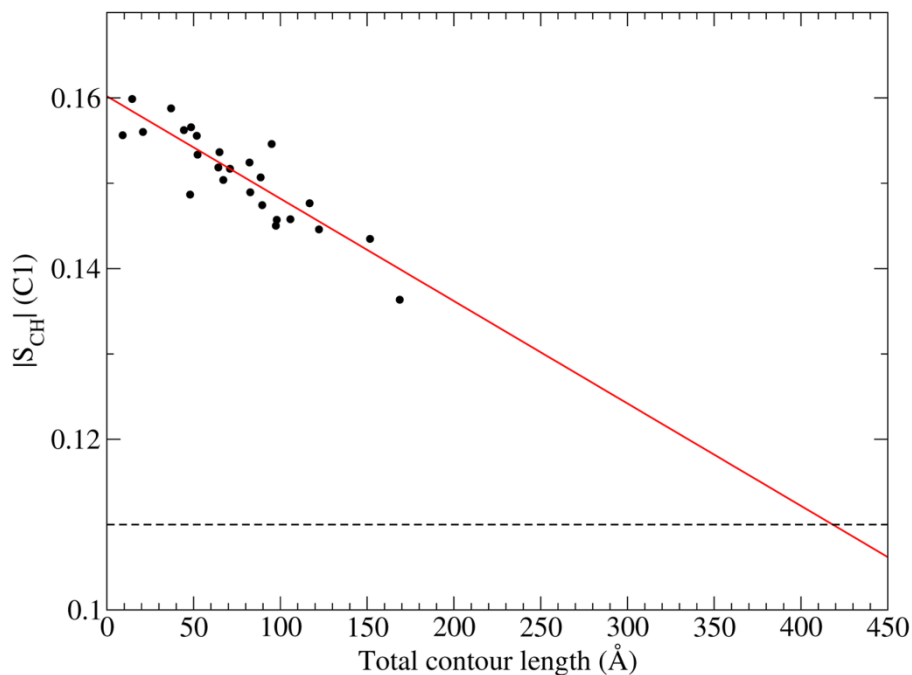


Figure S19. Relationship between the order parameter of the C1 atom and the total contour length of pores for the large C₁₂E₄ bilayer simulation. Each point represents an average over 20 ns. The contour length c of each pore was determined in the following way: starting from the area a of each pore (Figure S13) and assuming they were all cylindrical, we determined their radius r (using $a = \pi r^2$) and deduced c (from $c = 2 \pi r$). The red line is a linear fit to the data ($R^2 = 0.78$, slope = $-0.0012 \pm 0.0001 \text{ \AA}^{-1}$, intercept = 0.160 ± 0.001). The dashed line corresponds to the experimental value for the C1 order parameter (taken from ref ¹⁴). Using the fitted line, we can extrapolate the total contour length that would be needed for achieving the experimental order parameter: the red line crosses the dashed line at 418 Å.

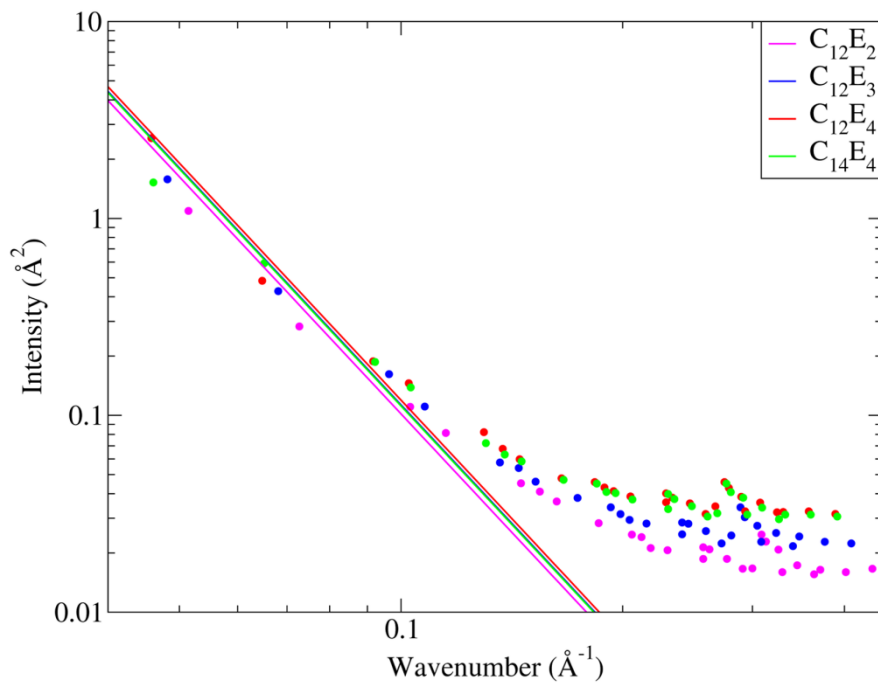


Figure S20. Height fluctuation spectra of the large C_iE_j bilayers. The lines correspond to the fits which allow the extraction of κ (see supplementary method above). Each fit was performed by imposing a slope of -4 and considering the points up to 0.1 \AA^{-1} (corresponding to the undulation regime).

References

1. Falck, E.; Rog, T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I., Lateral Diffusion in Lipid Membranes through Collective Flows. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, (1), 44-45.
2. Venable, R. M.; Ingolfsson, H. I.; Lerner, M. G.; Perrin, B. S.; Camley, B. A.; Marrink, S. J.; Brown, F. L. H.; Pastor, R. W., Lipid and Peptide Diffusion in Bilayers: The Saffman-Delbrück Model and Periodic Boundary Conditions. *J. Phys. Chem. B* **2016**, in press.
3. Helfrich, W., Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch C* **1973**, 28, 693-703.
4. Brandt, Erik G.; Braun, Anthony R.; Sachs, Jonathan N.; Nagle, John F.; Edholm, O., Interpretation of Fluctuation Spectra in Lipid Bilayer Simulations. *Biophys. J.* **2011**, 100, (9), 2104-2111.
5. Lindahl, E.; Edholm, O., Mesoscopic Undulations and Thickness Fluctuations in Lipid Bilayers from Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2000**, 79, (1), 426-433.
6. Melo, M. N.; Arnarez, C.; Sikkema, H.; Kumar, N.; Walko, M.; Berendsen, H. J. C.; Kocer, A.; Marrink, S. J.; Ingolfsson, H. I., High-Throughput Simulations Reveal Membrane-Mediated Effects of Alcohols on MscL Gating. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, (7), 2664-2671.
7. Mitchell, D. J.; Tiddy, G. J. T.; Waring, L.; Bostock, T.; McDonald, M. P., Phase behaviour of polyoxyethylene surfactants with water. Mesophase structures and partial miscibility (cloud points). *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1983**, 79, (4), 975-1000.
8. Lynch, M. L.; Kochvar, K. A.; Burns, J. L.; Laughlin, R. G., Aqueous-Phase Behavior and Cubic Phase-Containing Emulsions in the C12E2-Water System. *Langmuir* **2000**, 16, (7), 3537-3542.
9. Conroy, J. P.; Hall, C.; Leng, C. A.; Rendall, K.; Tiddy, G. J. T.; Walsh, J.; Lindblom, G., Nonionic surfactant phase behavior. The effect of CH₃ capping of the terminal OH. Accurate measurements of cloud curves. In *Surfactants and Macromolecules: Self-Assembly at Interfaces and in Bulk*, Steinkopff: 1990; Vol. 82, pp 253-262.
10. Kurtisovski, E.; Taulier, N.; Ober, R.; Waks, M.; Urbach, W., Molecular Origin of Model Membrane Bending Rigidity. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 98, (25), 258103.
11. Ferreira, T. M.; Topgaard, D.; Ollila, O. H. S., Molecular Conformation and Bilayer Pores in a Nonionic Surfactant Lamellar Phase Studied with ¹H-¹³C Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2014**, 30, (2), 461-469.
12. Fuchs, P. F. J.; Hansen, H. S.; Hünenberger, P. H.; Horta, B. A. C., A GROMOS Parameter Set for Vicinal Diether Functions: Properties of Polyethyleneoxide and Polyethyleneglycol. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, (10), 3943-3963.
13. Vamparys, L.; Gautier, R.; Vanni, S.; Bennett, W. F.; Tieleman, D. P.; Antonny, B.; Etchebest, C.; Fuchs, P. F., Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* **2013**, 104, (3), 585-93.
14. Klose, G.; Mädler, B.; Schäfer, H.; Schneider, K.-P., Structural Characterization of POPC and C12E4 in Their Mixed Membranes at Reduced Hydration by Solid State ²H NMR. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, (15), 3022-3029.