HAL
open science

Etude par dynamique moléculaire gros grains de l'impact des lipides polyinsaturés sur les propriétés conformationnelles du récepteur dopaminergique D2

Maylou Vang

To cite this version:

Maylou Vang. Etude par dynamique moléculaire gros grains de l'impact des lipides polyinsaturés sur les propriétés conformationnelles du récepteur dopaminergique D2. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0277 . tel-02878339

HAL Id: tel-02878339

https://theses.hal.science/tel-02878339v1

Submitted on 23 Jun 2020

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.

THESE PRESENTEE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Chimie organique

Par Maylou VANG

Etude par dynamique moléculaire gros grains de l'impact des lipides polyinsaturés sur les propriétés conformationnelles du récepteur dopaminergique D2

Sous la direction de Jean DESSOLIN
(co-directrice : Nada TAIB-MAAMAR)

Soutenue le 3 décembre 2019

Membres du jury :

M. BLOSSEY Ralf	Directeur de Recherche	Rapporteur	*Université De Lille*
M. CHAVENT Matthieu	Chargé de Recherche	Examinateur	*Université de Toulouse*
Mme ETCHEBEST Catherine	Professeur	Rapporteur	*Université Paris-Diderot*
M. MARGEAT Emmanuel	Directeur de Recherche	Président	*Université de Montpellier*

Résumé

Le récepteur dopaminergique D2 (RD2) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) qui est localisé dans le système nerveux. L'altération de son activité est impliquée dans certaines pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie et des études ont montré que la composition lipidique de la membrane avait un impact sur les propriétés pharmacologiques du RD2. En effet, la présence d'acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des oméga 3 et oméga 6 influence l'affinité du récepteur pour certains antipsychotiques, aspect lié aux changements conformationnels. L'utilisation de techniques de simulation numérique telles que la dynamique moléculaire gros grains (DMGG) permettrait d'examiner ces modifications puisque cette méthode, associée à une puissance informatique accrue, permet actuellement de simuler à grande échelle de temps (microseconde ou milliseconde) des systèmes de taille biologiquement pertinente (submicrométrique). Par nos études, nous avons pu déterminer le comportement de divers lipides polyinsaturés (LPI) de type oméga 3 et oméga 6 ainsi que de RD2, et nous avons identifié les hélices préférentiellement contactées par ces LPI et le cholestérol qui est un composant important des membranes.

Mots clés : RD2, composition lipidique, AGPI, oméga 3, oméga 6, changements conformationnels, DMGG, LPI, hélices préférentiellement contactées, cholestérol.

Abstract

The dopamine D2 receptor (D2R) is a G-proteins coupled receptor (GPCR) localized in the nervous system. The alteration of its activity is involved in psychiatric pathologies such as schizophrenia and studies have shown that the membrane lipid composition had an impact on the pharmacological properties of D2R. Indeed, the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the omega-3 and omega-6 family influences the affinity of the receptor for some antipsychotics – aspect related to conformational changes. The use of digital simulation technique such as coarse grain molecular dynamics (CGMD) would make it possible to look into these changes since this method, combined with enhanced computer power, currently allows the simulation of systems of biologically relevant size (submicrometric) and timescale (microsecond or millisecond). Through our studies, we have been able to determine the behavior of various omega-3 and omega-6 polyunsaturated lipids (PUL) as well as RD2, and we have identified the helices preferentially contacted by these PUL and cholesterol, which is an important component of the membranes.

Keywords : D2R, lipid composition, PUFAs, omega-3, omega-6, conformational changes, CGMD, PUL, helices preferentially contacted, cholesterol.

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets

UMR5248, Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14

Remerciements

Tout d'abord, ce projet a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et a été effectué au sein de l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets à Pessac. Ainsi, je tiens à remercier M. Erick DUFOURC, ancien directeur de l'institut lors de mon début, et Mme Sophie LECOMTE, directrice actuelle de l'unité, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail et particulièrement Mme Catherine ETCHEBEST et M. Ralf BLOSSEY pour la lecture de mon manuscrit en leur qualité de rapporteurs, ainsi que M. Emmanuel MARGEAT pour avoir accepté de présider le jury.

Je voudrais ensuite remercier mes directeurs de thèse, Mme Nada TAIB-MAAMAR et M. Jean DESSOLIN, pour leur disponibilité et leurs avis qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Merci également à Mme Isabelle BESTEL de m'avoir reçu dans son équipe et pour ses remarques constructives pour la création de ma présentation, ainsi qu'à Mme Estelle RASCOL et M. Edouard BARDARAU pour leur assistance.

Mme Isabel ALVES, sans qui ces 3 années n'auraient pas été enrichissantes, a toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet.

Je tiens à remercier spécialement Rémy BAILLY, qui fut le premier à me faire découvrir et m'initier à la méthode de dynamique moléculaire, ainsi que pour son aide et ses conseils judicieux.

Un mot de remerciements également envers les ami(e)s et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma formation, ainsi que la bonne ambiance qu'ils ont crée, ce qui m'a permis d'apprécier ces années de thèse.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à ma famille et mon chéri, pour leur patience, leur confiance, leur soutien inestimable et leur amour qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Sommaire

Chapitre I Introduction générale et projet de thèse 2
I. Les protéines 3
II. Protéines transmembranaires : les récepteurs couplés aux protéines G 7
II.1 Généralité sur les RCPG 8
II.2 Les récepteurs de la dopamine 13
II.3 Mode d'activation des RCPG 21
III. La membrane plasmique, une protection cellulaire 28
III.1 Description et généralités 28
III.2 Importance de l'apport alimentaire en oméga 3 et oméga 6 pour le cerveau 30
IV. Impact de l'environnement lipidique sur les propriétés conformationnelles des RCPG 33
IV.1 Influence de la nature des chaînes grasses 33
IV.2 Influence des têtes polaires 35
IV.3 Interaction du DHA et du cholestérol avec les RCPG 36
V. Projet de thèse 40
Chapitre II La dynamique moléculaire, une méthode de simulation 42
I. Généralité 43
II. La dynamique moléculaire tout-atome ou atome unifié 47
II.1 Interactions liantes 48
II.2 Interactions non-liantes 49
II.3 Acquisition des nouvelles positions 50
II.4 Traitement et modèles de l'eau 52
II.5 Système infini: les conditions périodiques aux limites 53
II.6 Minimisation et équilibration du système 54
III. L'approche MARTINI pour l'étude de systèmes biologiques 58
III.1 Champ de forces gros grains MARTINI : principe 58
III.2 Paramétrage des super-atomes 60
III.3 Extension aux protéines 63
IV. Protocole des dynamiques moléculaires 69
IV.1 Simulations gros grains 69

IV.2 Simulation tout-atome/atomes unifiés 73
V. Les outils d'analyses 75
Chapitre III ..... Etude du comportement de lipides polyinsaturés 78
I. Organisation de LPI en milieu aqueux 80
I.1 LPI greffés avec l'AGPI DHA 81
I.2 LPI greffés avec l'AGPI DPA 83
II. Comportement des LPI dans une membrane de POPC 85
II.1 Etude des oméga 3 85
II.2 Etude des oméga 6 88
Chapitre IV Influence des LPI sur l'état conformationnel du récepteur dopaminergique D2 90
I. Comportement de RD2 dans une membrane de POPC 92
I.1 Dynamique de RD2 92
I.2 Etats conformationnels adoptés par RD2 95
I.3 Site de liaison de RD2 97
I.4 Validation du modèle gros grains 99
II. Dynamique et conformation de RD2 dans une membrane peu complexe 102
II.1 Membrane constituée de POPC et 5 % de DHA-PC 102
II.2 Membrane constituée de POPC et 5 % de DDHA-PC 108
II.3 Membrane constituée de POPC et 5 % de DPA-PC 113
II.4 Membrane constituée de POPC et 5 % DDPA-PC 119
II.5 Membrane simple de DDHA-PC 124
III. Dynamique de RD2 dans une membrane complexe 128
III.1 Effets du cholestérol sur l'état de RD2 en présence d'oméga 3 129
III.2 Effets du cholestérol sur l'état de RD2 en présence d'oméga 6 133
Chapitre V Discussion des résultats 137
Chapitre VI Conclusion et perspectives 144
ANNEXES 149
Projets annexes 174
Références 177

Liste des illustrations

Schéma 1 Production de protéines 3
Schéma 2 Formation de la liaison peptidique. 4
Figure 1 Structures des acides aminés naturels 4
Figure 2 Illustrations de l'enchaînement d'acides aminés 5
Figure 3 Les protéines membranaires 6
Schéma 3 Les principaux types de protéines transmembranaires 7
Figure 4 Schématisation des RCPG couplés à une protéine G 8
Schéma 4 Exemple de réponse d'un RCPG 9
Figure 5 Description simplifiée de deux familles de RCPG 10
Schéma 5 Processus de neurotransmission entre deux neurones 13
Schéma 6 Représentation du modèle "Go/No go" 16
Figure 6 Structure tridimensionnelle du RD2 lié au lysozyme T4 17
Figure 7 Comparaison des structures cristallographiques de RD2, RD3 et RD4 19
Figure 8 Poche de liaison étendue 20
Figure 9 Principales conformations de β2AR 22
Figure 10 Différents états conformationnels adoptés par les RCPG 24
Schéma 7 Formation du ionic lock au cours d'une dynamique moléculaire 25
Figure 11 Caractéristiques d'un état intermédiaire chez β2AR 26
Schéma 8 Diverses conformations intermédiaires de β2AR 27
Figure 12 Caractéristiques d'un lipide 28
Schéma 9 Description d'un AGPI et incorporation sur une tête d'un phospholipide 31
Figure 13 AGPI synthétisés à partir de l'acide linoléique et l'acide α-linolénique 32
Figure 14 Exemple de conformation où une molécule de DHA-PC s'adapte à la surface de la protéine 34
Figure 15 Impact de la nature des lipides sur l'organisation et la fluidité de la membrane 34
Figure 16 Structures de la β2AR dans une membrane sous l'effet allostérique de DOPE, DOPG et DOPC 36
Figure 17 Cartes de densité du DHA et du cholestérol pour chaque monocouche 38
Figure 18 Densité de probabilité des lipides autour du centre de masse de A2A 39
Figure 19 Séquence de RD2 et LPIs étudiés 41
Figure 20 La modélisation moléculaire à différentes échelles 43
Figure 21 Evolution du nombre de macromolécules inscrites dans la PDB 44
Figure 22 Représentation des atomes et de la liaison chimique en mécanique classique 45
Figure 23 Modèles atomistiques du 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) 47
Figure 24 Principe de l'algorithme *Leapfrog* 51
Figure 25 Illustration 2D des conditions périodiques aux limites 53
Figure 26 Principe de la minimisation 55
Figure 27 Exemples de cartographies 59
Figure 28 Diagramme énergétique 60
Figure 29 Cartographie des acides aminés 64
Figure 30 Nouvelle topologie de résidus chargés et polaires 65

Figure 31 Représentation du réseau élastique pour RD2 67
Figure 32 Système initial pour les DMGG 69
Figure 33 Structure des lipides polyinsaturés (LPI) étudiés 70
Figure 34 Cartographies des biomolécules 72
Figure 35 Système initial de la DMTA/UA 74
Figure 36 Illustration du calcul de fonctions de distribution radiale 76
Figure 37 Représentations de POPC 79
Figure 38 Système initial des DMGG “contrôles” 80
Figure 39 Structures de DHA-PC et DDHA-PC 81
Schéma 10 Systèmes finaux après 3 µs de simulation 82
Figure 40 Structures de DPA-PC et DDPA-PC 83
Schéma 11 Systèmes finaux après 3 µs de simulation 84
Figure 41 Etat final de la DMGG comprenant 5 % de DDHA-PC 85
Figure 42 Epaisseur de bicouche 87
Figure 43 Epaisseurs de bicouche 89
Figure 44 Système étudié et épaisseur de bicouche 92
Figure 45 RMSD de RD2 93
Figure 46 Superposition de structures (haut) et RMSD des hélices 94
Figure 47 Distances entre les grains BB des acides aminés D114^{TM3} et S217^{TM5} (L_L), et R132^{TM3} et E368^{TM6} (L_G) 96
Figure 48 Conformations adoptées par Y426 et le coeur de triade 97
Schéma 12 Evolution de la poche de liaison du ligand 98
Figure 49 Superposition de structures et RMSD de RD2 100
Figure 50 Superposition de structures 101
Figure 51 Système après 5 µs de production 102
Figure 52 Graphes des RMSD de RD2 entier et de chaque hélice 103
Figure 53 Superposition de diverses orientations adoptées par Y426 et graphe des distances 104
Figure 54 Superposition du cœur de triade 105
Figure 55 Superposition des résidus impliqués ou jouant un rôle dans la liaison du ligand 106
Figure 56 Distribution radiale de DHA-PC par rapport au centre de masse de chaque hélice 107
Figure 57 Vue de dessus du système final après 5 µs de simulation 109
Figure 58 Graphes montrant l’évolution de la distance L_G, distances d_{I-S} et d_{L-P} et états du cœur de triade 110
Figure 59 Arrangements des résidus 111
Figure 60 RDF de DDHA-PC par rapport à chaque hélice 112
Figure 61 RDF de DDHA-PC par rapport à chaque hélice 113
Figure 62 Epaisseur de bicouche 114
Figure 63 Superposition de structures 115
Figure 64 Evolution au cours du temps des distances entre les hélices 116
Figure 65 Etat du site de liaison 117
Figure 66 RDF de DPA-PC par rapport à chaque hélice 118

Figure 67 RDF de DHA-PC et de DPA-PC.....119
Figure 68 *S*ystème après 5 µs de dynamique.....120
Figure 69 Evolution des distances.....122
Figure 70 Conformations adoptées par les acides aminés.....123
Figure 71 RDF de DDPA-PC par rapport à chaque hélice.....124
Figure 72 Superposition de structures.....125
Figure 73 Evolution des distances.....126
Figure 74 Réarrangement au cours de la dynamique.....126
Figure 75 Etat du site de liaison.....127
Figure 76 Système initial des DMGG.....128
Figure 77 Système final après simulation.....129
Figure 78 RDF de DDHA-PC et du cholestérol par rapport à chaque hélice.....130
Figure 79 Système final.....131
Figure 80 RDF de DDHA-PC et du cholestérol, par rapport au centre de masse de chaque hélice.....132
Figure 81 Système final après une production de 5 µs.....134
Figure 82 RDFs de DPA-PC et du cholestérol par rapport au centre de masse de chaque hélice.....134
Figure 83 Etat du système après simulation et superposition des RMSD de RD2.....135
Figure 84 RDFs de DDPA-PC et du cholestérol par rapport au centre de masse de chaque hélice.....136

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification de la famille Rhodopsine 12
Tableau 2 Hélices de la rhodopsine préférentiellement en contact avec le DHA-PC et le cholestérol 37
Tableau 3 Quelques champs de forces atomistiques 48
Tableau 4 Niveaux d'interaction décrivant la force des interactions non-liantes 61
Tableau 5 Détails des simulations réalisées en présence de RD2 et LPI 73
Tableau 6 Paramètres d'ordre des lipides 86
Tableau 7 Paramètres d'ordre des lipides 89
Tableau 8 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DHA-PC et cholestérol) 130
Tableau 9 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DDHA-PC et cholestérol) 132
Tableau 10 Tableau des concentrations lipidiques 132
Tableau 11 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DPA-PC et cholestérol) 134
Tableau 12 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DDPA-PC et cholestérol) 136

Abréviations *(par ordre d'apparition)*

ARNm : acide riobonucléique messager
ADN : acide désoxyribonucléique
PTM : protéine transmembranaire
TM : transmembranaire
ATP : adénosine triphosphate
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
BEC : boucle extracellulaire
BIC : boucle intracellulaire
ND : neurone dopaminergique
RD : récepteur de la dopamine
RD1 : récepteur de la dopamine D1
RD2 : récepteur de la dopamine D2
RD3 : récepteur de la dopamine D3
RD4 : récepteur de la dopamine D4
RD5 : récepteur de la dopamine D5
AC : adénylyl cyclase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AR : auto-récepteur
PDB : Protein data bank, en anglais
EBP : *Extended binding pocket*, anglicisme pour poche de liaison étendue
DM : dynamique moléculaire
MP : membrane plasmique
PC : phosphocholine
PS : phosphosérine
PE : phosphoéthalonamine
PG : phosphoglycérol
SM : sphingomyéline
DL : double liaison
AGI : acide gras insaturé
LI : lipide insaturé
LPI : lipide polyinsaturé
AG : acide gras
AGPI : acide gras polyinsaturé
AA : acide arachidonique
DHA : acide docosahexaénoïque
LA : acide linoléique
ALA : acide α-linoléique
DPA : acide docosapentaénoïque
EPA : acide eicosapentaénoïque
AA-PC : 1-stéaroyl-2-arachidonyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
DHA-PC : 1-stéaroyl-2-docosahexaénoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
DDHA-PC : 1,2-docosahexaénoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DPA-PC : 1-stéaroyl-2-docosapentaénoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
DDPA-PC : 1,2-docosapentaénoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
DOPE : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOPG : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol
DOPC : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine
CCM : *Cholesterol Consensus Motif*, en anglais
SFO : site fréquemment occupé
CRAC : *Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus*, en anglais
RMN : résonance magnétique nucléaire
DEER : double résonance électron-électron
MM : modélisation moléculaire
DMTA/AU : dynamique moléculaire tout-atome/atomes unifiés
LJ : Lennard-Jones
VdW : Van der Waals
PME : *Particle Mesh Ewald*, en anglais
SPC : *single point charge*, en anglais
TIP3P : *transferable intermolecular potential 3 points*, en anglais
PBC : conditions périodiques aux limites
SD : *steepest descent*, en anglais
GC : gradient conjugé
DMGG : dynamique moléculaire gros grains
RMSD : *root mean square deviation*, en anglais
RMSF : *root mean square fluctuation*, en anglais
RDF : *radial distribution function*, en anglais

Chapitre I Introduction générale et projet de thèse

I. Les protéines

Sportif ou au régime, ce n'est qu'une question d'alimentation et surtout de protéines. En effet, ces biomolécules ont un rôle important dans l'organisme tel que l'apport de calories (énergie), le transport de l'oxygène et le renouvellement cellulaire.[1,2] Elles sont synthétisées dans les cellules à partir de l'acide ribonucléique messager (ARNm) obtenu après transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) : il s'agit de l'étape de traduction ou "décodage" de l'information génétique (**Schéma 1**). La présence de protéines dans le corps provient également de la nourriture que nous ingérons lors des repas.

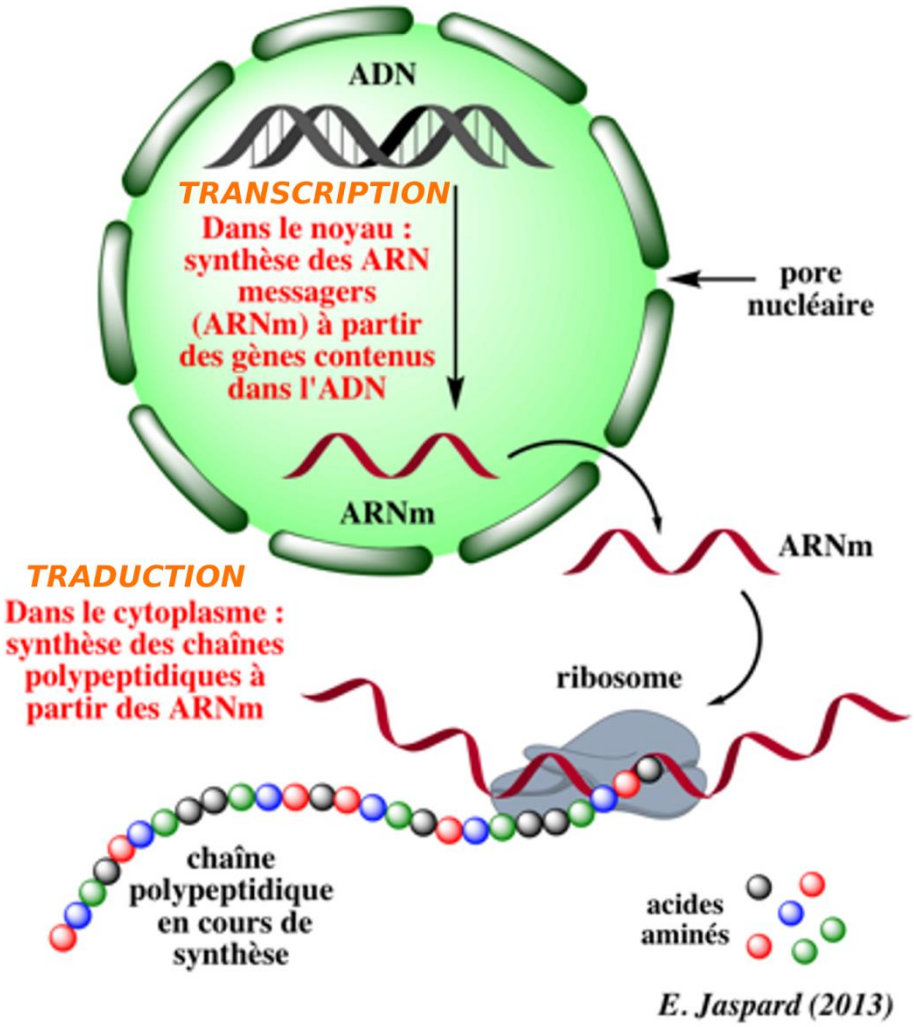


Schéma 1 Production de protéines. Rappelons qu'une protéine est un enchaînement de peptides composés d'acides aminés [*reprise d'un cours de biochimie*].

Comme évoqué au schéma précédent, une protéine est un polypeptide, ce qui signifie qu'elle comporte plusieurs peptides dont la définition est une succession d'acides aminés (ou résidus). Ces derniers sont liés de façon covalente par leurs extrémités (NH_2 et CO_2H) : on parle de liaisons peptidiques et la réaction mise en jeu est une réaction de condensation (élimination d'une molécule d'eau comme le décrit le schéma ci-dessous). Il existe une vingtaine de résidus naturels qui possèdent une structure très proche. La différence se fait uniquement au niveau de la chaîne latérale connectée au carbone dénoté α (C_α) (**Figure 1**).

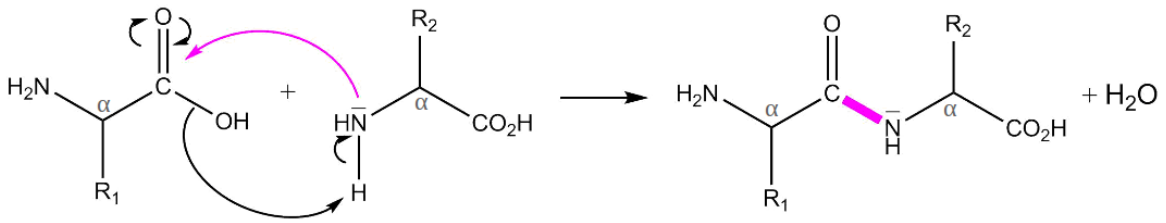


Schéma 2 Formation de la liaison peptidique (magenta). Exemple avec deux acides aminés quelconques (R_1 et R_2 = chaînes latérales). La répétition de la suite [HN-C_α-C=O] constitue le squelette du peptide.

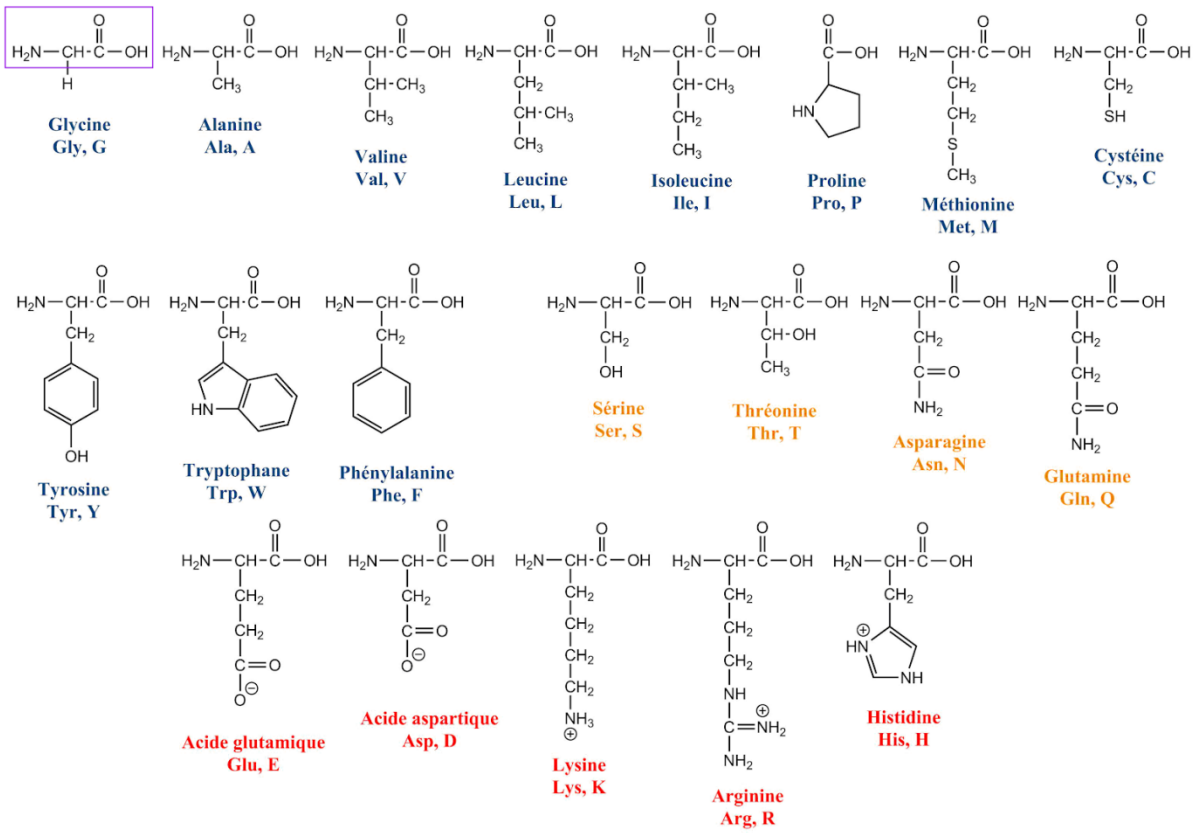


Figure 1 Structures des acides aminés naturels qui exposent leur chaîne latérale à la verticale. La structure commune à tous les résidus est encadrée en violet, les résidus apolaires sont visibles en bleu, en orange, les résidus polaires non-chargés et ceux chargés sont inscrits en rouge. Les abréviations à une et trois lettres sont également indiquées.

Cet enchaînement de résidus peut adopter plusieurs structures :

- structure *primaire* : séquence d'acides aminés,
- structure *secondaire* : organisation en hélice α ou feuillet β stabilisés par des liaisons hydrogène (liaisons H),
- structure *tertiaire* : enchaînement de structures secondaires,
- structure *quaternaire* : assemblage de structures tertiaires.

Les protéines sont majoritairement constituées d'hélices reliées entre elles par un segment peptidique souvent non-organisé nommé boucle (**Figure 2**). Pour connaître la séquence, soit l'ordre des résidus au sein d'un peptide, il faut identifier la partie Nterm (terminaison N qui correspond au groupe NH_2 ou NH_3^+) où va démarrer la lecture jusqu'au Cterm (terminaison C pour CO_2H ou CO_2^-).

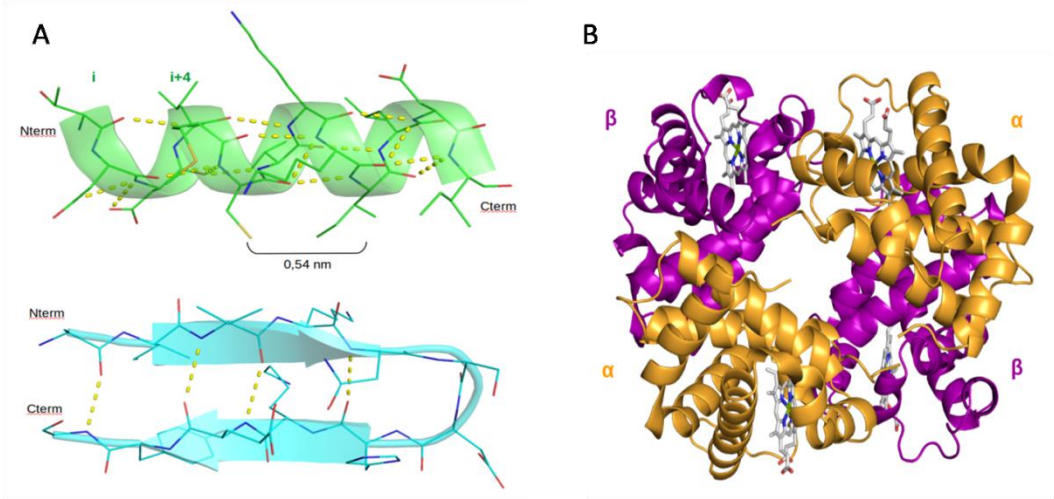


Figure 2 Illustrations de l'enchaînement d'acides aminés. **A**) Structures secondaires : hélice α en vert et feuillet β en cyan. Les liaisons hydrogène figurent en traits discontinus jaunes et sont établies entre l'oxygène du carbonyle (C=O) et l'hydrogène de l'amine (NH non visible ici). **B**) Structure quaternaire de l'hémoglobine (PDB : **1A3N**). Dans l'image **B**), les représentations en *cartoon* colorées sont des structures tertiaires et correspondent aux sous-unités de la macromolécule. L'hème est tracé en *stick* gris avec le fer au centre de couleur verte.

Le monde de ces biomolécules est vaste et complexe de par les différentes classes de protéines, un grand nombre de familles et des fonctions propres à elles. Nous pouvons distinguer les protéines fibreuses[3] des protéines globulaires[4] et des protéines membranaires[5] qui forment les trois principales classes de protéines.

Les protéines fibreuses, comme le sous-entend leur nom, sont des molécules de forme filamenteuse, de longue taille et en général, elles sont insolubles dans l'eau. Elles ont essentiellement un rôle *structurel* et parmi elles, on compte le collagène qui est la protéine la

plus abondante et qui est responsable de l'élasticité de la peau. Une autre protéine se trouvant dans la peau mais qui est connu comme un composant des cheveux est la kératine. Contrairement au collagène, cette dernière a pour rôle de protéger notre corps. La myosine est également une biomolécule structurelle importante pour l'organisme du fait de sa localisation. On la retrouve dans les cellules musculaires et elle permet la contraction des muscles.

A la différence, les protéines globulaires sont plutôt sphériques et solubles dans l'eau. Elles ont un rôle *fonctionnel*, ce qui signifie qu'elles participent à de nombreux processus physiologiques. Ainsi, il s'agit des enzymes (catalyseurs de réactions chimiques du métabolisme), des anticorps (permettent de combattre des agents pathogènes), voire quelques hormones (rôle de stimulateur, elles provoquent une action biologique en interagissant avec des organes cibles). Il ne faut surtout pas oublier de citer l'hémoglobine qui est la protéine indispensable à tous les vertébrés parce qu'elle transporte l'oxygène.

La troisième classe définit les protéines membranaires qui possèdent des structures et fonctions diverses, et on peut distinguer deux types : les protéines *périphériques* et les protéines *transmembranaires* (PTM).[6] Pour rappel, une membrane aussi dénommée bicouche, est composée de deux couches de lipides qui sont des molécules avec une tête polaire (soluble dans l'eau) et des chaînes grasses hydrophobes (insolubles dans l'eau, **Figure 3** et **Figure 12**). Les protéines périphériques, comme spécifié dans leur nom, sont positionnées à la surface de la membrane soit à l'interface d'un milieu "aqueux" et d'un milieu hydrophobe. Elles sont donc majoritairement constituées de résidus polaires et peuvent interagir *indirectement* avec la bicouche par le biais des protéines transmembranaires (interaction protéine-protéine) ou *directement* en étant en contact avec les têtes polaires des lipides.

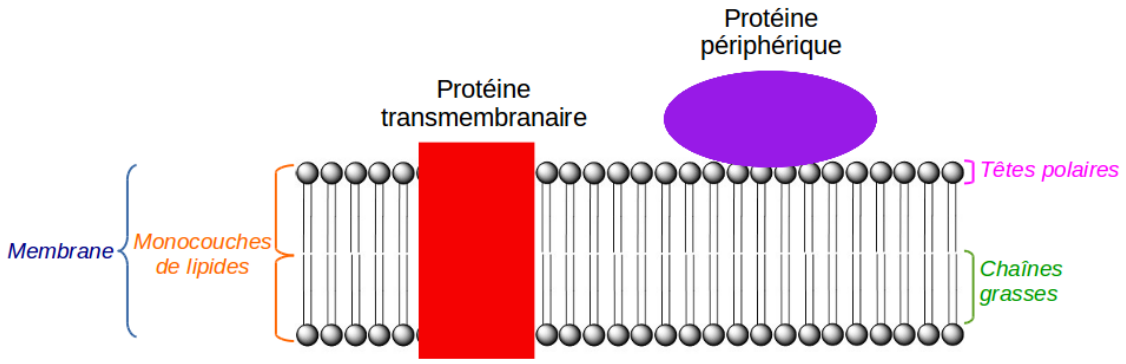


Figure 3 Les protéines membranaires (les lipides sont schématisés en gris).

A l'inverse, les protéines transmembranaires sont essentiellement hydrophobes et un axe dans ce mémoire est dédié à ce type de biomolécules.

II. Protéines transmembranaires : les récepteurs couplés aux protéines G

Les organes sont délimités par des cellules, elles-mêmes bâties d'une barrière lipidique (ou membrane). Cette cloison ne comporte pas uniquement des lipides mais contient également des protéines en son sein. En effet, il est possible de retrouver différents types de protéines dites transmembranaires (TM) qui possèdent des structures et des fonctions variées (**Schéma 3**). Cependant, elles se caractérisent par trois régions distinctes: la région *extracellulaire*, celle *enchâssée* dans la bicouche lipidique et la région *intracellulaire* qui interfère avec le cytoplasme. L'une des particularités propres à ces PTM est que la partie enchâssée présente des résidus hydrophobes généralement organisés en hélices α qui sont en contact direct avec les lipides. A noter que les PTM ne sont pas figées à un emplacement mais elles sont libres de se déplacer latéralement dans la membrane.

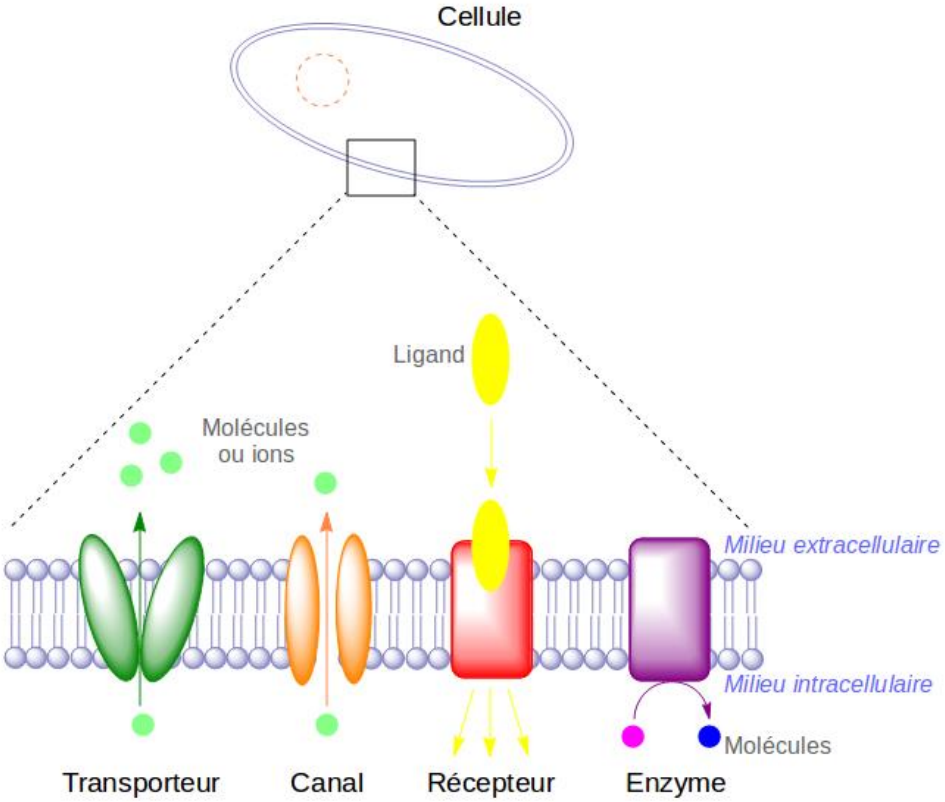


Schéma 3 Les principaux types de protéines transmembranaires localisables au sein d'une membrane cellulaire (noyau illustré en trait discontinu orange). Les transporteurs et les canaux conduisent des composés d'un milieu à un autre, les récepteurs en interagissant avec un ligand vont émettre un signal pour déclencher (ou empêcher) un processus et les enzymes catalysent des réactions chimiques.

Les PTM définissent les propriétés de la cellule mais jouent également un rôle important dans son fonctionnement. Le **Schéma 3** montre que certaines de ces protéines permettent aux cellules de communiquer avec l'extérieur (fonction de signalisation) ou de faciliter le passage de molécules souvent hydrophiles (transport). Une partie des PTM sont impliquées dans la reconnaissance cellulaire, l'ancrage de macromolécules à la surface de la bicouche mais aussi dans la transduction d'énergie (*ex: synthèse d'ATP*).[7]

Parmi les nombreux types de PTM, la famille des récepteurs couplés aux protéines G, ou RCPG, suscitent un grand intérêt étant donné qu'ils régulent la plupart des fonctions physiologiques.[8]

II.1 Généralité sur les RCPG

Les RCPG constituent la plus grande famille de protéines membranaires et sont associés à diverses maladies.[9] Par conséquent, ils sont devenus d'importantes cibles thérapeutiques et de nombreux travaux de recherche sont consacrées à la conception et la synthèse de ligands à visée curative.[10–13]

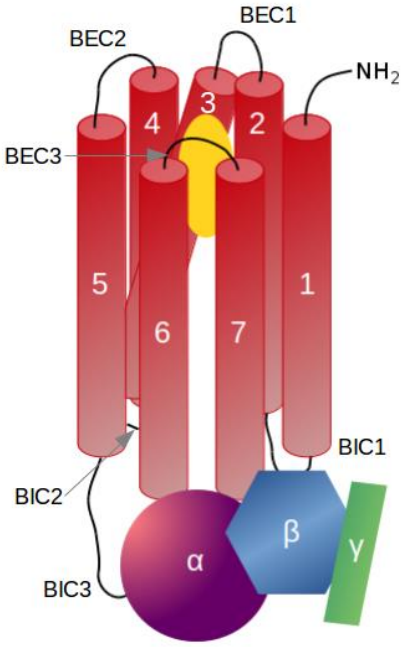


Figure 4 Schématisation des RCPG couplés à une protéine G. Les hélices transmembranaires sont décrites par des cylindres rouges (BEC = boucle extracellulaire et BIC = boucle intracellulaire) et le ligand figure en jaune. La protéine G est représentée par ses trois sous-unités (α, β et γ).

Ils disposent de sept hélices α transmembranaires séparées par des boucles (**Figure 4**) et arrangées de façon à former un "entonnoir". En général, ces biomolécules présentent également une longue partie Nterm et préservent un bon nombre d'acides aminés. Malgré ces caractéristiques, il a été énoncé que la structure des Nterm et Cterm, ainsi que des boucles varie beaucoup au sein de ce groupe. En considérant cela, on identifie cinq familles de RCPG chez l'Homme selon leur séquence et leur similarité structurale : ***1***. les récepteurs type Rhodopsine aussi dénommés Classe A, ***2***. les récepteurs de la sécrétine (Classe B), ***3***. ceux du glutamate (Classe C), ***4***. les récepteurs d'adhésion et ***5***. les récepteurs *Frizzled/TAS2*.[14]
Ces PTM, suite au contact de *stimuli* extérieurs tels que la lumière ou de petites molécules, vont émettre des signaux à travers la membrane et après interaction avec la protéine G ou la β-arrestine *via* la BIC3, une cascade de réponses est déclenchée dans le milieu cytoplasmique (**Schéma 4**).

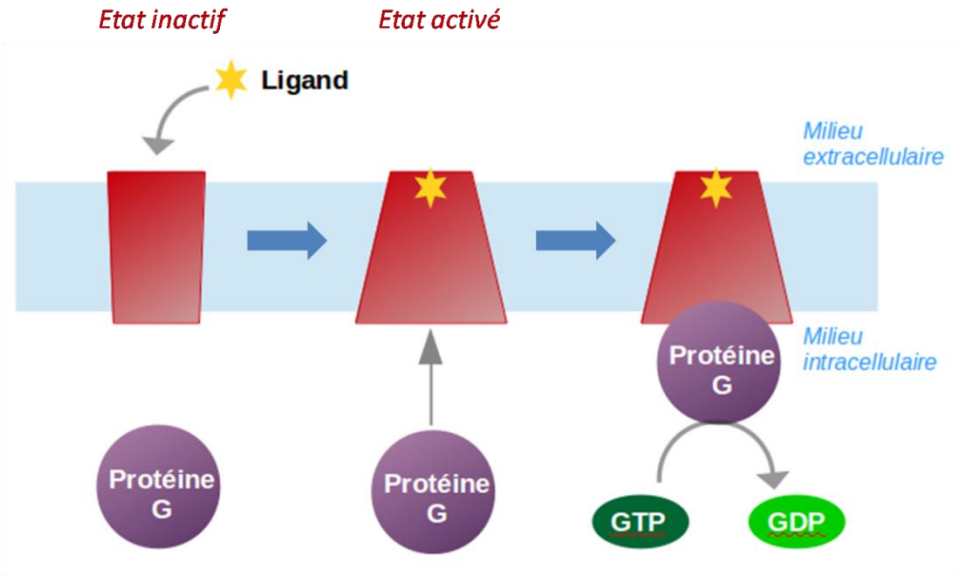


Schéma 4 Exemple de réponse d'un RCPG (rouge) suite au contact avec son ligand (en bleu clair figure la membrane) : conversion du GTP en GDP *via* la protéine G. Cette dernière interagit avec le récepteur après ouverture au niveau de la région intracellulaire.

Parmi les cinq familles citées précédemment, les deux plus petites sont les récepteurs de la sécrétine (Classe B) et du glutamate (Classe C) qui regroupent une quinzaine de protéines chacune. La Classe B interagit avec des peptides d'une trentaine d'acide aminés qui partagent une identité au niveau séquentiel et qui constituent la famille de la sécrétine.[15] Ce sont des hormones peptidiques localisées dans le système digestif et qui sont libérées lors de la digestion. La partie Nterm de cette classe de RCPG, composée de soixante à quatre-vingt

résidus et riche en pont disulfure (liaison S-S entre deux acides aminés cystéine) est impliquée dans la liaison du ligand. En effet, elle entre en contact avec la région Cterm du peptide alors que la région Nterm de ce dernier est dirigée vers le coeur du récepteur. Cette complexation va induire la sécrétion de molécules par les organes porteurs de ces RCPG afin d'aider la transformation des aliments.

La Classe C diffère des autres familles par une région Nterm bien organisée qui comprend deux cents quatre-vingt à cinq cents quatre-vingt acides aminés, et forme à elle seule le lieu de fixation du ligand. A noter que dans cette classe sont également regroupés des récepteurs du goût. L'extrémité située dans le milieu extracellulaire se structure donc en deux lobes distincts séparés par une cavité dans laquelle va se lier le glutamate, un neurotransmetteur très abondant dans le système nerveux (**Figure 5a**) : on parle de *Venus fly trap*, où la présence du neurotransmetteur va entraîner le rapprochement des lobes autour du ligand.[14,16] Selon les types de protéines inscrites dans cette famille et le type de molécules avec lesquelles elle interagit, la Classe C joue un rôle important dans divers processus physiologiques comme la transmission synaptique et la sensation de goût.

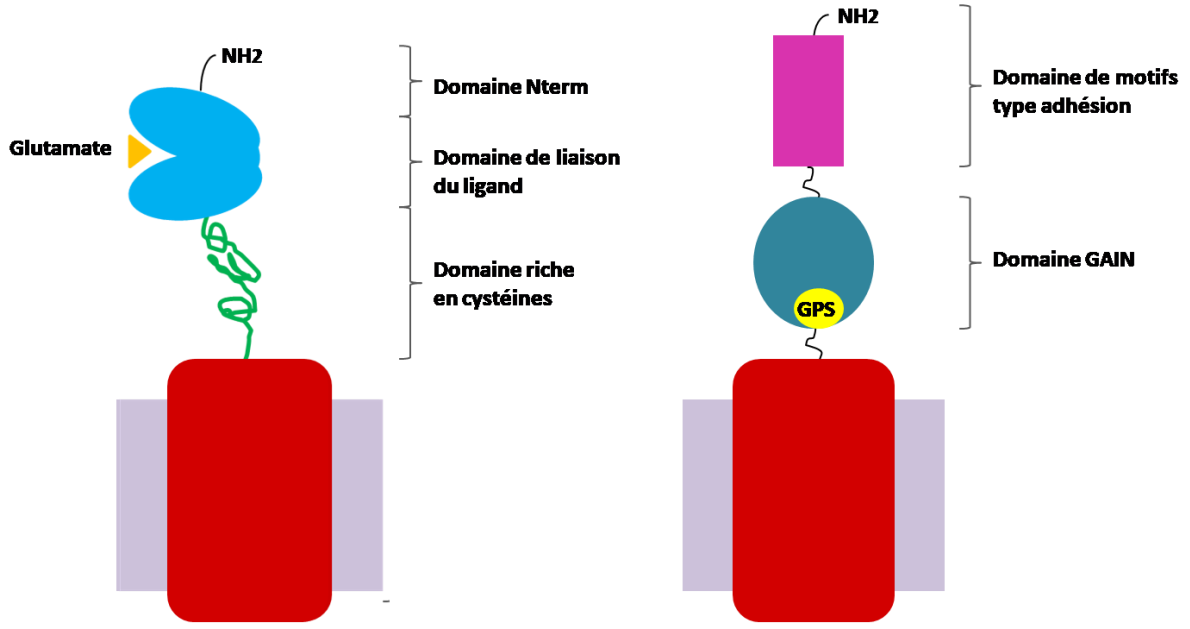


Figure 5 Description simplifiée de deux familles de RCPG résidant dans une membrane de couleur violette. Les hélices transmembranaires sont schématisées en un unique rectangle arrondi rouge. **a)** Famille des récepteurs du glutamate. Les lobes apparaissent en bleu clair (*Venus fly trap*) avec le glutamate logé dans la cavité. **b)** Récepteurs d'adhésion. A noter que le ligand entre en contact avec le domaine de motifs d'adhésion.

A la deuxième place, on retrouve les familles des récepteurs d'adhésion et ceux dits *Frizzled/TAS2* avec vingt-quatre protéines dans chaque groupe. Cependant, pourquoi les RCPG d'adhésion portent-ils ce nom ? Ils le doivent aux divers fragments caractérisés au niveau Nterm (deux cents à deux milles huit cents résidus) qui affichent des motifs semblables aux peptides d'adhésion capables de connecter les cellules entre elles. D'autres particularités de cette extrémité, qui est le lieu d'interaction des ligands, sont la présence d'un grand nombre de cystéines ainsi que de sites de glycosylation et d'un domaine appelé GAIN (*GPCR autoproteolysis-inducing*).[14,17] On trouve ces PTM dans plusieurs variétés de cellules et leur mécanisme d'activation diffère de celui des autres familles. En effet, suite à la liaison avec un ligand, un autoclivage de la région Nterm est réalisé dans le domaine GAIN où réside le site protéolytique dénommé GPS (*GPCR proteolytic site*)[18] (**Figure 5b**), et il a été identifié deux réponses physiologiques possibles :

- faciliter l'adhésion cellulaire sans émettre de signaux en aval. Dans ce cas, la partie Nterm clivée reste en contact avec la région transmembranaire ou,
- activer les voies de signalisation une fois la protéine G liée au récepteur.[17]

Le second groupe de vingt-quatre protéines inclut deux types de récepteurs : *Frizzled* et TAS2. L'appellation *frizzled* fait référence à la forme enroulée et tordue de la protéine Wnt qui a pour hôte un récepteur dont la séquence a été prise comme élément comparatif afin de classifier les PTM.[19] Les récepteurs de cette sous-famille sont importants car ils contrôlent le devenir des cellules et ils sont considérés comme des RCPG du fait qu'ils peuvent se coupler avec la protéine G et parce qu'ils montrent des relations structurelles avec eux.[20,21] Leur Nterm est constitué d'environ deux cents acides aminés et notamment des cystéines qui participent à la fixation du ligand. Contrairement à ces derniers, les PTM type TAS2 sont exprimées dans la langue et elles fonctionneraient comme des récepteurs du goût amer. Elles se rapprochent des récepteurs *Frizzled via* des séquences consensus qui exposent des motifs aminés identiques et qui ne sont pas rencontrés chez les autres familles de RCPG.[14] Cependant, les TAS2 ont un petit domaine Nterm qui ne peut recevoir de ligand : la poche de liaison se situe au niveau extracellulaire des hélices TM comme dans la famille Rhodopsine.

La Classe A (famille Rhodopsine) est la plus large avec sept cent un récepteurs dont environ quatre cent soixante sont des récepteurs olfactifs.[14] Elle rallie quatre principaux groupes qui se divisent eux-mêmes en plusieurs branches, et qui sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Groupes	Branches	Nombre de protéines	Exemple de récepteurs
α	Récepteurs de prostaglandine	15	
	Récepteurs aux amines	40	*Récepteurs de la dopamine*
	Opsines	9	*Protéine rétinale (ou RGR)*
	Récepteurs de la mélatonine	3	
	MECA	22	*Récepteurs de l'adénosine*
β	Récepteurs de peptides	36	*Récepteurs d'ocytocine*
γ	SOG	15	*Récepteurs opiacés*
	Récepteurs à la MCH	2	
	Récepteurs de chimiokines	42	
δ	Récepteurs type MAS	8	*Récepteur du gène MAS1*
	Récepteurs de hormones glycoprotéiques	8	*Récepteur de l'hormone FSH*
	Récepteurs purinergiques	42	*Récepteurs de nucléotides*
	Récepteurs olfactifs	~ 460	

Tableau 1 Classification de la famille Rhodopsine d'après l'article de Fredriksson *et al*.[14]

Cette famille partage des caractéristiques similaires telles que le motif NSxxNPxxY et le motif DRY (ou ERF) situés dans la région intracellulaire des hélices TM7 et TM3 respectivement, mais elle se distingue au niveau extracellulaire des hélices qui forment le site actif.[22,23] Par conséquent, l'affinité pour un ligand dépendra en grande partie du type de récepteurs bien qu'ils aient une structure du domaine transmembranaire commune due à la conservation d'un grand nombre d'acides aminés.[14,22,23]

Toutefois, parmi les récepteurs de la Classe A, ceux de la dopamine et surtout le récepteur dopaminergique 2 (RD2) nous intéressent du fait de leur implication dans divers troubles neurologiques.[24–26]

II.2 Les récepteurs de la dopamine

Le comportement d'un individu est dirigé par la motivation qui est elle-même contrôlée par le système nerveux. Ce dernier est défini par un large réseau de neurones qui ont la capacité de transmettre un signal électrique d'un endroit à un autre : on parle de neurotransmission. La communication n'est faisable que par l'intermédiaire de substances chimiques appelées neurotransmetteurs produits et libérés par le neurone "émetteur" et reconnus par le neurone "récepteur" (**Schéma 5**).

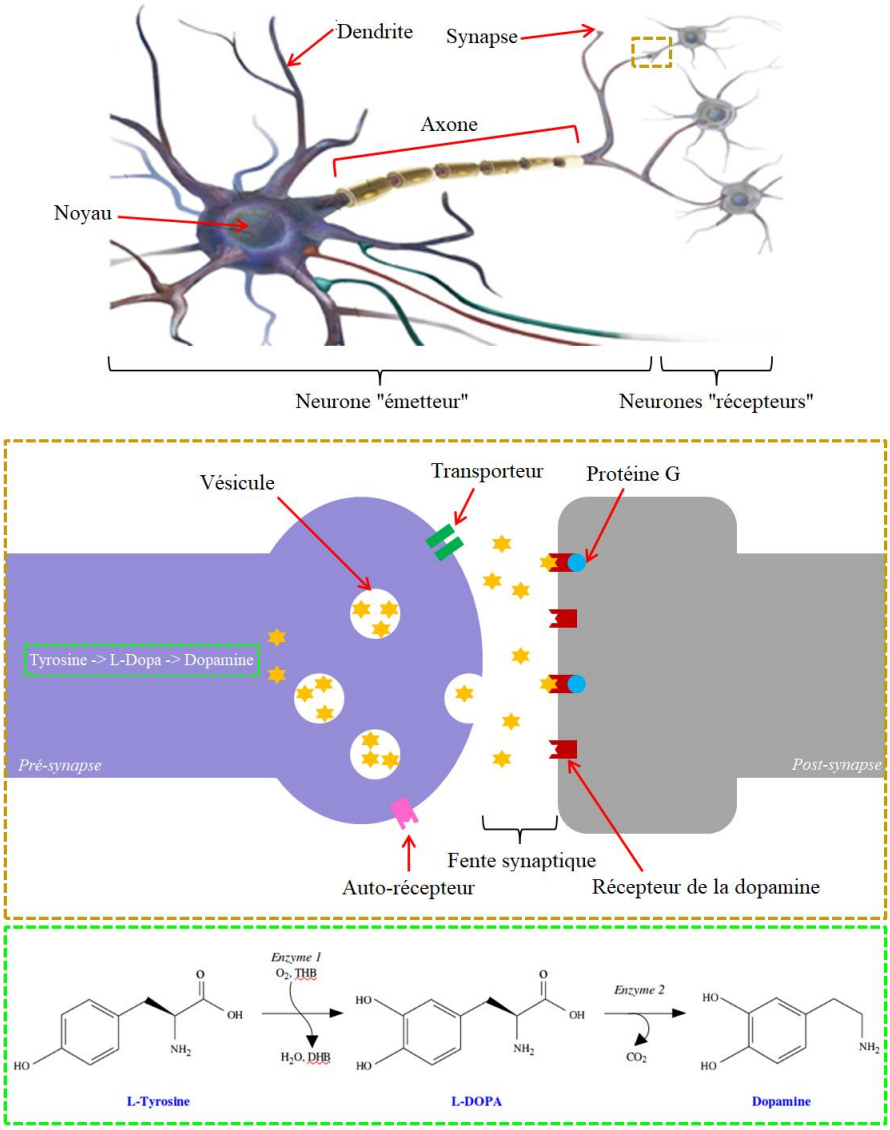


Schéma 5 Processus de neurotransmission entre deux neurones dont la description est dressée au front de l'image et biosynthèse de la dopamine. La première étape de la synthèse fait intervenir une enzyme (tyrosine hydroxylase) et un co-facteur (THB = Tétrahydrobioptérine) pour conduire au L-DOPA (L-Dihydroxyphénylalanine) avec élimination d'eau et du DHB (Dihydrobioptérine). L'enzyme 2 est une décarboxylase qui permet d'obtenir la dopamine avec rejet de dioxyde de carbone.

Le neurotransmetteur responsable d'un comportement motivé est la dopamine fabriquée par les neurones dopaminergiques (ND) issus de la voie mésolimbique en particulier.[27] En effet, cette dernière qui est une des diverses voies dopaminergiques majeures du cerveau, relie le cerveau moyen situé dans le tronc cérébral au système limbique connu sous le nom simple de cerveau émotionnel. Elle régit donc les différentes formes de mémoire, l'attention et la motivation. La dopamine, quant à elle, est une catécholamine soit une molécule synthétisée à partir de la tyrosine (**Schéma 5**).[28,29] Elle est un agoniste des récepteurs de la dopamine (RD), ce qui veut dire qu'elle va activer les récepteurs et à l'inverse, un antagoniste est un composé qui va inhiber l'activité. La synthèse de la dopamine est réalisée dans le cytosol des ND et le produit de réaction est transporté par des vésicules jusqu'à la synapse où il sera relâché. Une fois que la dopamine se retrouve dans la fente synaptique, elle va interagir avec ses récepteurs exposés sur le neurone voisin (post-synapse), mais elle peut également agir sur la pré-synapse : on parle de rétrocontrôle négatif. La diffusion d'une quantité contrôlée de dopamine dans l'espace synaptique est donc activée sous l'effet d'un signal *via* ce phénomène[30], et la concentration de substances chimiques dans cet espace est modulée par recapture grâce à des transporteurs insérés dans la membrane pré-synaptique (**Schéma 5**). A noter que la majorité des RD n'occupe pas les ND, en revanche ceux présents sur des ND sont surnommés auto-récepteurs et jouent un rôle essentiel dans la régulation du système dopaminergique (synthèse, délivrance, rétrocontrôle).[28,30]

Chez certaines personnes, des dérégulations dans la production de dopamine et/ou de ses récepteurs peuvent survenir et conduire à une attitude "anormale" qui est identifiable chez des patients atteints de pathologies neuronales et psychiatriques.[27,31–33] Cependant, cette observation n'est pas une certitude et les études relatives à ces sujets se poursuivent afin de comprendre les mécanismes par lesquels une maladie se développe, sachant qu'il existe plusieurs RD.[14] En effet, il n'est pas encore certain que les RD soient impliqués dans les troubles neuropsychiatriques de manière indépendante ou combinée.

I.2.1 Les différentes familles de récepteurs dopaminergiques

A ce jour, les RD se comptent au nombre de cinq et sont distingués en deux groupes en fonction de leurs séquences, structures et propriétés de transduction cellulaires : les récepteurs type D1 (RD1-like) et les récepteurs type D2 (RD2-like).[25,34]

La famille RD1 rassemble les récepteurs dopaminergiques D1 et D5, abrégés RD1 et RD5 respectivement, qui partagent ~80% d'homologie. De fait, le second groupe comprend le RD2, le RD3 (~80% d'homologie avec RD2) et le RD4 (~50% d'homologie avec RD2).[27] Les RD sont répartis dans diverses zones du cerveau mais RD1 et RD2 sont les plus abondants. Les RD1-like se caractérisent par une BIC3 courte et une longue séquence peptidique pour la terminaison C, alors que RD2-4 sont constitués d'une BIC3 plus longue et d'une partie Cterm courte.

Ces PTM déclenchent plusieurs voies de transduction du signal suivant qu'ils interagissent avec la protéine G ou la β-arrestine. Par exemple, couplés à une protéine G et plus précisément Gs, RD1 et RD5 initient l'activité de l'adényl-cyclase (AC) qui est une enzyme insérée dans la membrane. Le produit issu de la réaction enzymatique est l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), un intermédiaire pour d'autres processus intracellulaires et dont le précurseur est l'ATP (adénosine triphosphate).[26] La fonction des RD2-like est l'inverse de la famille RD1 en inhibant l'activité de AC après s'être complexés à une protéine Gi.

Cependant, le contact de la β-arrestine avec les RD conduit à un effet identique quel que soit le type de RD. Le rôle principal de cette protéine est l'internalisation de la PTM une fois le ligand décomplexé et le récepteur phosphorylé à son Cterm, ce qui résulte de l'arrêt fonctionnel de la protéine G.[35] La β-arrestine agit donc comme un régulateur négatif et suite à ce phénomène d'endocytose, le couple RD-β-arrestine va pouvoir activer d'autres biomolécules pour induire de nouvelles réactions au sein du cytoplasme.

I.2.2 Les récepteurs dopaminergiques D2

Comme expliqué au début de l'axe **II.2**, le système dopaminergique est régulé par les auto-récepteurs (AR) localisés sur les ND afin d'éviter tout désordre neurologique dans un cerveau sain, résultant d'une attitude "normale". Il a été démontré que les AR sont les RD2-like et notamment les RD2 qui vont activer directement les canaux potassiques (restauration du potentiel de membrane à sa valeur initiale) et indirectement, contrôler en aval l'expression de l'enzyme tyrosine hydroxylase et le transporteur.[30] Ce processus permet ainsi d'avoir un équilibre entre un état *dépressif* et un état *hyperactif*.

En effet, il a été admis que le RD2 participe de manière indirecte à l'activation d'un comportement motivé.[36] Les neurones présentant le récepteur seraient en contact avec ceux

portant le RD1 au niveau du cerveau émotionnel, et la fixation de la dopamine sur ces RCPG induirait deux réponses différentes. D'après le modèle dit du "Go/No go" (**Schéma 6**) utilisé pour décrire cette transmission dopaminergique, le RD2 est situé sur les neurones responsables de la voie du "No go" alors que celle du "Go" est gouvernée par les neurones peuplés de RD1. La dopamine en interagissant avec les RD2 entraîne le blocage de la voie du "No go" mais stimule la voie du "Go" par les RD1, ce qui se caractérise par une attitude motivée. Néanmoins, si ces derniers restent actifs, il en résultera une hyperactivité chez l'individu, et *a contrario*, si la voie du "No go" est déclenchée *via* un autre neurotransmetteur, la personne sera démotivée (dépression dans un cas extrême).

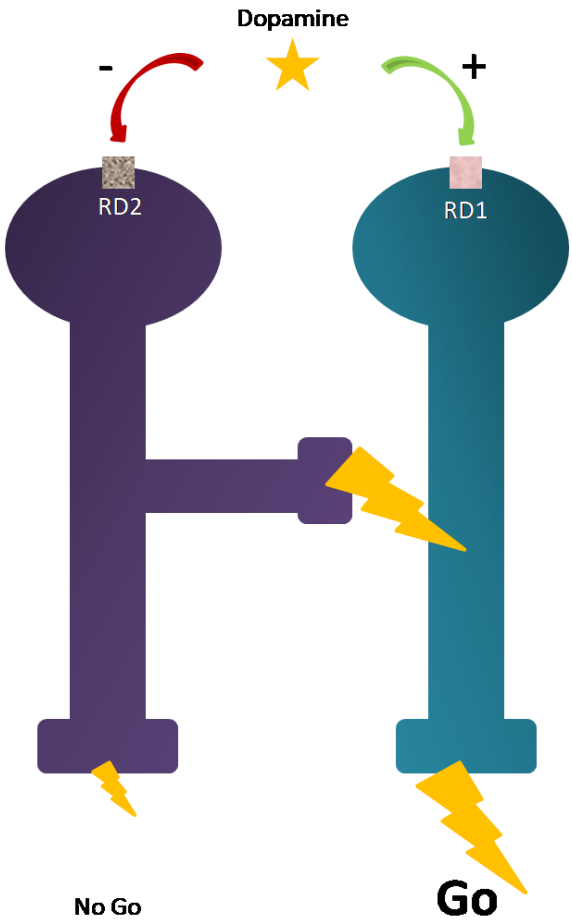


Schéma 6 Représentation du modèle "Go/No go" pour l'activation de la motivation.

Par conséquent, cela nous amène à la relation entre le RD2 et de nombreuses pathologies psychiatriques comme la schizophrénie.[24] Ce trouble mental est défini par deux comportements distinctifs par leurs symptômes : *1*. les symptômes **négatifs** se réfèrent à une attitude non-motivée et dépourvue d'émotion et *2*. les symptômes **positifs** perçus chez des

individus paranoïaques ou atteints d'hallucinations sensorielles. Dans un premier temps, il a été démontré par des expériences de *binding* (complexation ligand-protéine) que les molécules (neuroleptiques) interagissent majoritairement avec le RD2 et les résultats observés étaient une atténuation des symptômes de la maladie, ce qui a clarifié l'importance de ce récepteur dans l'action des neuroleptiques et son implication dans la schizophrénie.[27] De plus, selon des études menées sur des cerveaux *post-mortem* de patients malades, les post-synapses présenteraient un grand nombre de RD2, et en 1996, Laruelle *et al.*[37] ont découvert que les schizophrènes libèrent une quantité importante de dopamine contrairement aux personnes saines. Ce dernier cas a été reconnu chez les individus souffrant d'hallucinations : la dopamine relâchée dans la fente synaptique va saturer les RD2 et ainsi bloquer "continuellement" la voie du "No go" qui permet de contrebalancer la réponse des neurones "Go". Ce sujet reste cependant en débat.

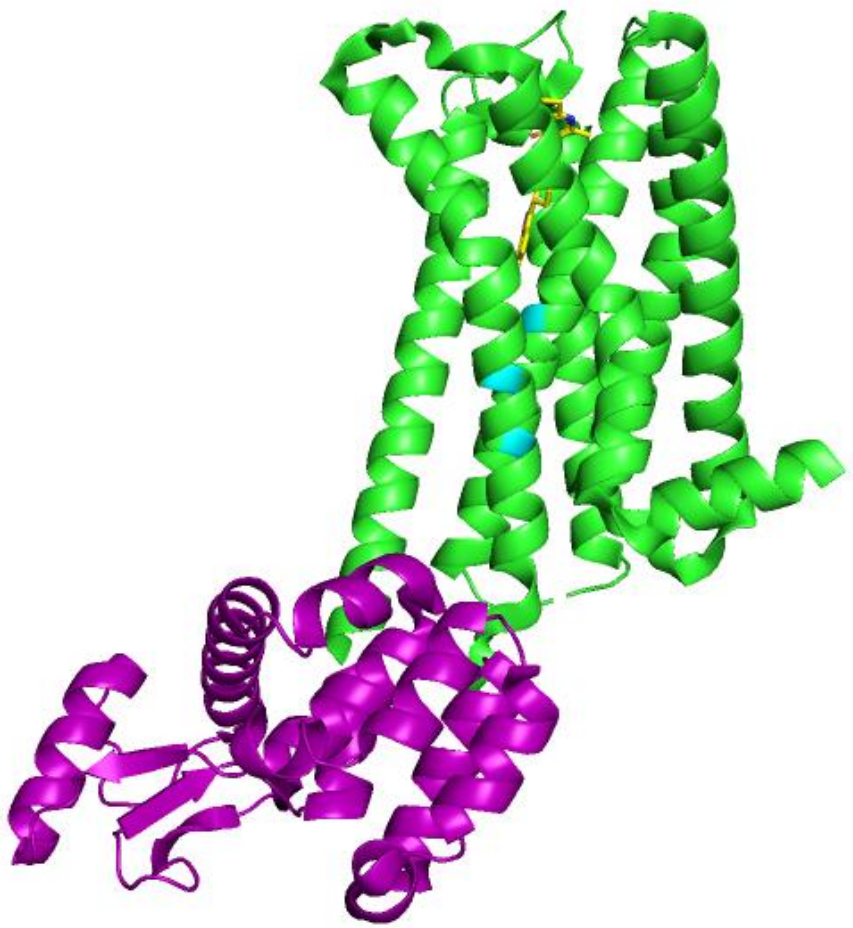


Figure 6 Structure tridimensionnelle du RD2 lié au lysozyme T4 (LT4, en violet) et comportant le ligand rispéridone (en stick jaune) (PDB : **6CM4**). La substitution de la BIC3 par LT4 confère un caractère moins apolaire du récepteur, ce qui va favoriser la formation de cristaux en privilégiant les interactions protéines-protéines. Afin d'améliorer ce processus, trois mutations thermostables ont été réalisées (en cyan). RD2 est complexé à un agoniste inverse, il est donc dans un état *inactif*.

Le gène du RD2 a été le premier gène codé parmi les RD mais la structure du récepteur n'avait pas encore été cristallisée jusqu'en janvier 2018 où Wang *et al.*[38] ont publié la structure 3D du RD2 complexé avec la rispéridone (**Figure 6**). La protéine est démunie de la BIC3 qui est difficile à cristalliser à cause d'une mobilité élevée imposée par une longue séquence. Néanmoins, un groupe a pu la reconstruire. Malgré le fait que RD2 s'apparente à RD3 (PDB : **3PBL**) et RD4 (PDB : **5WIU**), il diffère structurellement au niveau des BEC 1 et 2 et des parties extracellulaires des hélices TM5-7.

La **Figure 7** montre que la BEC2 du RD2 ne "ferme" pas la région supérieure de la protéine et présente un tour d'hélice formé par la cystéine C182 à l'alanine A185. L'acide aminé isoleucine (I184) de cette boucle, qui est conservé dans la majorité des récepteurs aminergiques, n'interagit pas avec le ligand mais avec le tryptophane W100 localisé sur la BEC1 et qui participe à la liaison de la molécule. Les autres distinctions sont la position de l'hélice TM5, rapprochée du *bundle* hélicoïdal, et des hélices TM6/7 qui s'éloignent de ce dernier. Néanmoins, le pont disulfure créé entre des cystéines de l'hélice TM3 (C107) et de la BEC2 (C182) est préservé, ce qui permettra de limiter d'importantes fluctuations conformationnelles lors de l'activation du RCPG. Un autre pont disulfure est identifié au niveau de la BEC3 et il aurait une influence sur la fonction du récepteur en restreignant les mouvements de la boucle.[39]

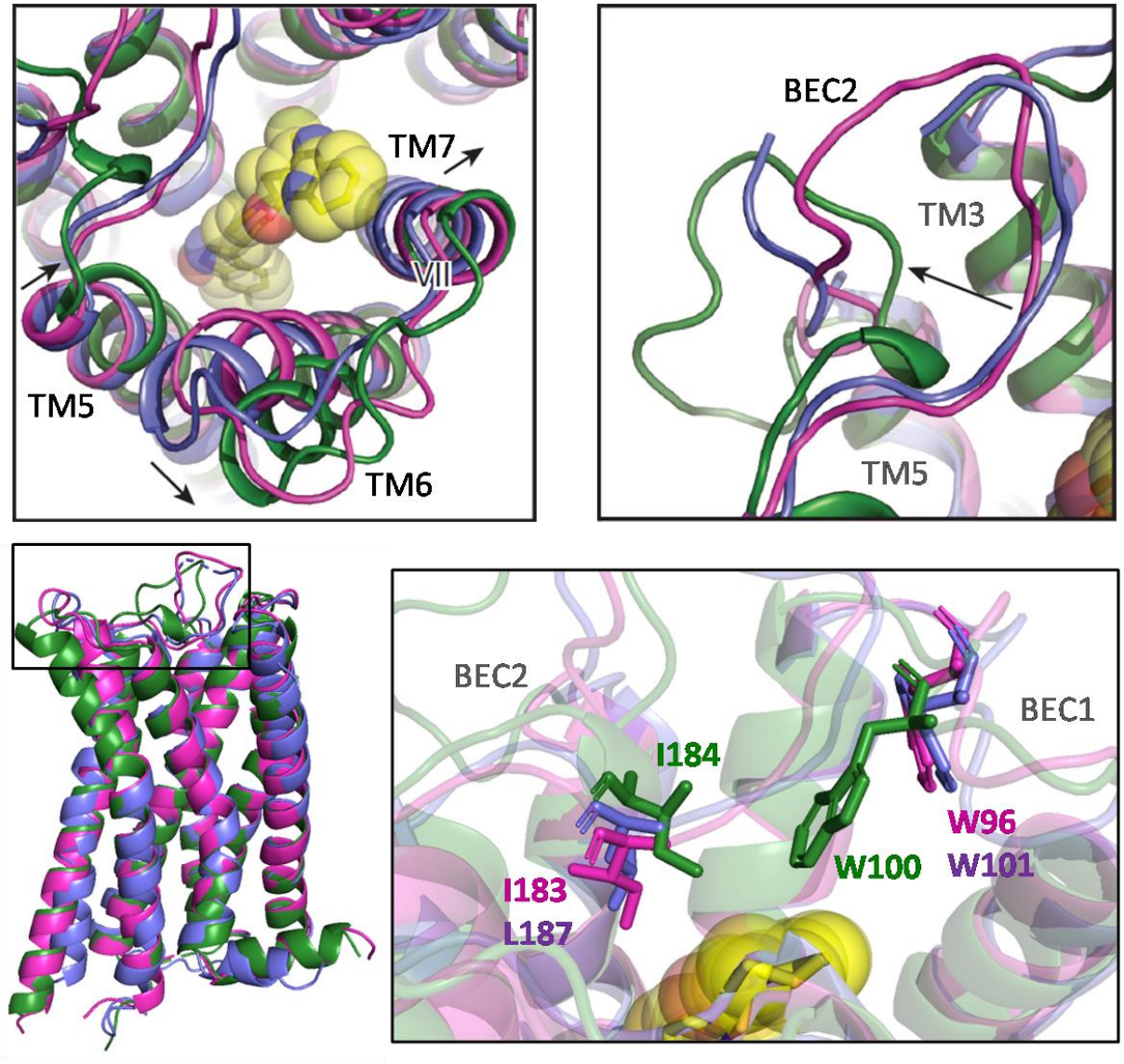


Figure 7 Comparaison des structures cristallographiques de **RD2** (vert), **RD3** (magenta) et **RD4** (violet). Le ligand apparaît en stick et sphères transparentes jaunes et les deux images du haut sont extraites de l'article de Wang *et al*.[38]

Une particularité du RD2 qui le rend intéressant est son site de liaison. De tous les RD voire protéines de la Classe A étudiés, lui seul expose un site qui peut s'étendre de la cavité extérieure, appelée site orthostérique, au coeur de ce dernier (**Figure 8**).[38] Le site orthostérique correspond au lieu de fixation du ligand naturel et il est principalement composé de résidus apolaires qui forment une poche hydrophobe. Le développement d'une poche de liaison étendue (*extended binding pocket ou EBP*, en anglais) établie par la jonction des hélices TM1/2 et 7 est occasionné par de multiples réorganisations à l'intérieur du récepteur :

- la tyrosine $Y365^{TM3}$ (*cette annotation sera parfois employée pour indiquer, en exposant, l'hélice TM sur laquelle est positionné le résidu*) s'accommode afin

d'accueillir le ligand tout en restant lié de façon non-covalente à l'histidine H414^{TM6}. Cette opération n'est pas observée chez RD3 et RD4 bien que la liaison hydrogène (liaison H) entre Y365 et H414 qui permet de stabiliser le mouvement extérieur de l'hélice TM6 soit présente dans RD3,

- l'éloignement de la partie extracellulaire de l'hélice TM7 par rapport au *bundle* hélicoïdal ajoute du volume au site,
- W100 est décalé au sommet du site orthostérique alors qu'il est orienté vers l'extérieur chez les autres récepteurs aminergiques (**Figure 7**),
- outre ce dernier critère, la présence de l'acide aminé F110 au niveau extracellulaire de l'hélice TM3 empêche la génération d'une cavité étendue comme dans RD4.

Ainsi, la poche de liaison s'adapte à la molécule qui a également la possibilité de se réarranger une fois en son sein.

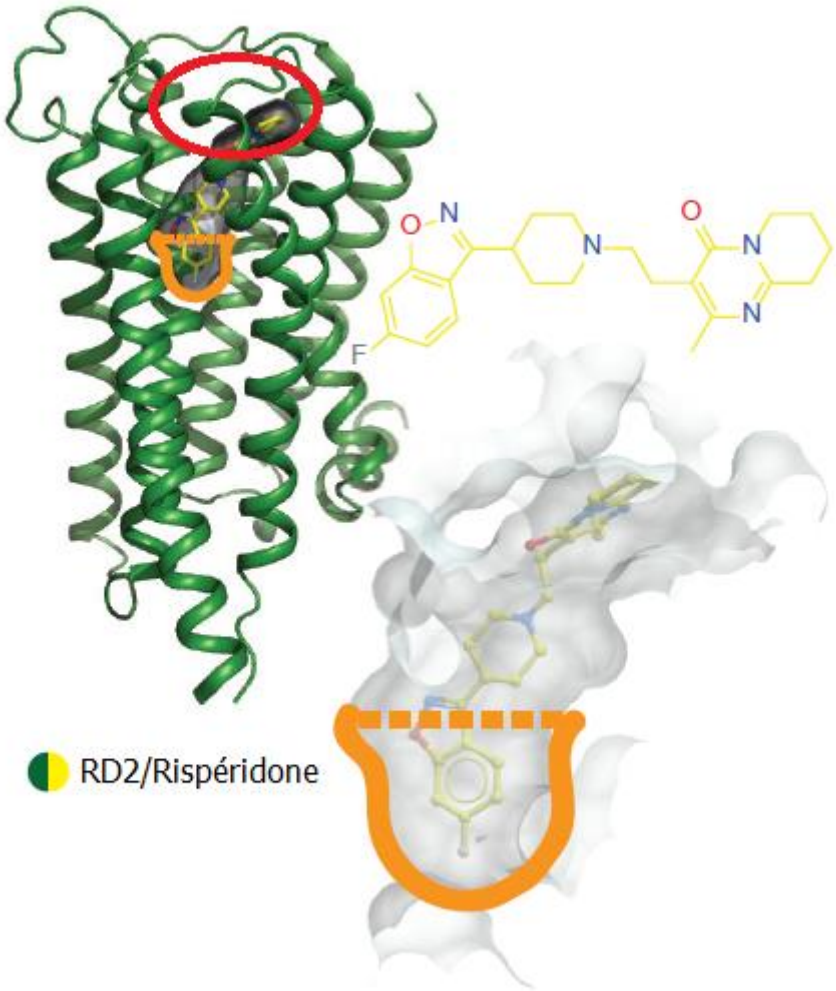


Figure 8 Poche de liaison étendue. Le cercle rouge indique la position du site orthostérique et la zone en orange correspond à la place supplémentaire de la poche de fixation. Cette dernière n'est pas développée dans RD3 et RD4 [*reprise de la figure 2 de l'article de Wang et al.* [38]].

Il a été énoncé que W100, I184 et la leucine L94 sont importants dans l'interaction avec le ligand. L'hypothèse émise est que ce trio forme un "mur" dans la région extracellulaire du récepteur qui rétrécirait la cavité de liaison et donc, éviterait au ligand de sortir dû à de forts contacts hydrophobes. Dans ce cas, W100 peut être comparé à une "porte" qui gère l'entrée et la sortie du neuroleptique. En effet, la mutation de ces trois acides aminés par de plus petits résidus tel l'alanine (moins hydrophobes) a montré une diminution du temps de résidence du composé dans le site. D'autres expériences de mutations réalisées sur la poche de fixation du RD2 ont conclu que les résidus W386 et F390 joueraient un rôle essentiel sur l'affinité du ligand pour la protéine. L'aspartate D114, demeurant dans la majorité des RCPG sur l'hélice TM3, est également important au sein du site de liaison car il interagit avec la partie polaire du ligand.[38,40,41] Ces résultats révèlent une flexibilité du RD2 intéressante et importante pour la recherche, puisqu'elle va permettre de concevoir de nouvelles molécules spécifiques de ce récepteur.

II.3 Mode d'activation des RCPG

Les voies de signalisation des RCPG sont déclenchées par la stimulation de la protéine G une fois couplée au récepteur complexé à son ligand. L'activation des RCPG est un processus complexe qui nécessite des modifications conformationnelles de la PTM causées par un nouvel agencement des hélices. De fait, l'hypothèse communément admise est que deux états sont discernables suivant l'organisation des hélices TM au niveau intracellulaire : état *actif* et état *inactif*.

La Rhodopsine a été le premier récepteur cristallisé avec une bonne résolution dans les différents états.[42] Néanmoins, il est difficile d'obtenir la conformation activée des RCPG dû à leur grande flexibilité en l'absence de la protéine G qui rend instable cet état. Afin de remédier à ce problème et afin d'acquérir des données structurales d'autres RCPG, des alternatives ont été mises en place pour stabiliser la structure active démunie du partenaire intracellulaire : *i*) la synthèse de peptides mimant la partie Cterm de la sous-unité α de ce dernier et *ii*) la conception d'anticorps qui manifestent un comportement semblable de la protéine G.[41,43,44] Cependant en 2011, Rasmussen *et al.*[44] ont divulgué la première structure cristallographique d'un RCPG (β2AR) couplé à la protéine Gs qui a permis de fournir des

détails à haute résolution du mécanisme de signalisation à travers une membrane, ainsi qu'une base architecturale pour les propriétés fonctionnelles du complexe tertiaire (PDB : **3SN6**).

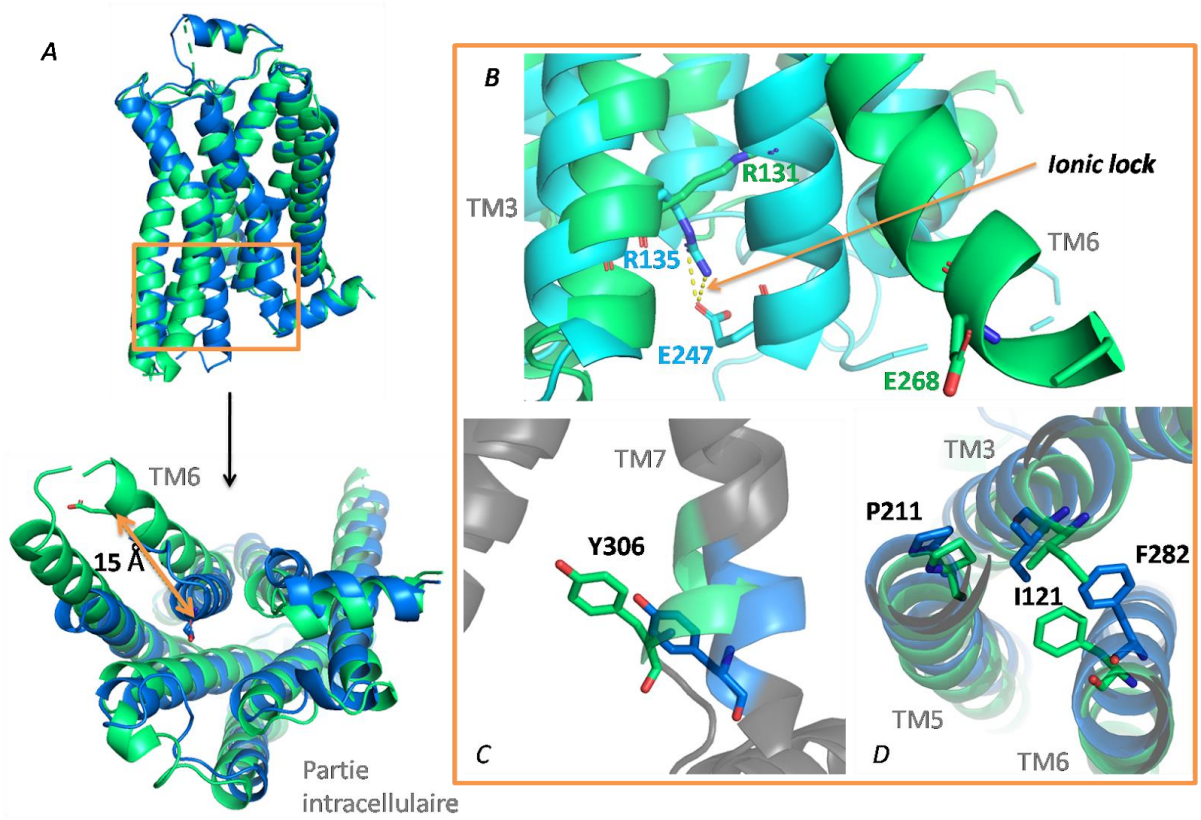


Figure 9 Principales conformations de ***β*2AR**. *A*) Superposition des deux structures (la couleur bleue est attribuée à l'état *inactif*, PDB : **2RH1**, et le vert à l'état *actif*, PDB : **3SN6**), *B*) "Verrou ionique" établi par l'interaction électrostatique entre une arginine et un glutamate (la rhodopsine, en cyan, a été superposée pour la comparaison, PDB : **1F88**, et l'hélice TM5 a été enlevée pour plus de visibilité), *C*) Fluctuation de la région NPxxY (colorée; les hélices TM1, 2 et 5 ont été retirées pour une meilleure visibilité) et *D*) Coeur de triade.

En vue d'avoir une description du mécanisme d'activation de la majorité des RCPG, la *β*2AR qui est largement étudiée sera prise comme le récepteur de comparaison (**Annexe 1**).[40,44–48]
Le passage d'un état inactif à un état actif n'influe pas énormément sur la région supérieure du récepteur. Seuls un repositionnement et une réorientation de certains résidus impliqués dans la liaison avec le ligand peuvent être constatés.[44,48] Le changement le plus remarquable est le mouvement extérieur de la région cytoplasmique de l'hélice TM6 : on a un écart d'environ 15 Å entre le C*α* de l'acide aminé E268 de l'état inactif et celui de la forme activée (**Figure 9A**). Cela est engendré par la rotation de la partie supérieure de cette hélice (avant un résidu proline, P288) appariée au réarrangement de la phénylalanine F282. Ce phénomène a également été caractérisé chez d'autres RCPG[41,43] et il est crucial pour pouvoir lier la protéine

G ou la β-arrestine. L'ouverture conduit à la cassure du "verrou ionique" (*ionic lock* en anglais), établi entre un glutamate (E268^{TM6}) et l'arginine du segment DRY (R131^{TM3}), qui engendre le rapprochement du motif NPxxY et donc de la tyrosine Y306^{TM7} vers le *bundle* (**Figure 9B et C**). Il a été admis que ces deux critères (présence du *ionic lock* et position extérieure de NPxxY) définissent l'état inactif des RCPG.[42,47–49] Les autres changements lors de l'activation des récepteurs sont le faible déplacement extérieur et l'extension de l'hélice TM5 au niveau intracellulaire, et un avancement du domaine extracellulaire de TM3 en direction du coeur de la protéine. En addition, selon des études de spectroscopie, le tryptophane qui réside au sein de l'hélice TM6 et conservé dans la plupart des RCPG aurait un rôle dans ce processus d'activation dû à la mobilité de son aromatique (chaîne latérale) : c'est un commutateur rotamérique.[44]

Un troisième attribut de la forme inactive peut être identifié : le coeur de triade, composé d'une isoleucine (I121^{TM3} chez β2AR), une proline (P211^{TM5}) et de F282^{TM6} (**Figure 9D**). Il est défini comme un "interrupteur" qui fait le lien entre le lieu de fixation du ligand et celui de la protéine G[47], ce qui signifie qu'un changement dans l'espace supérieur occasionne une nouvelle organisation du coeur qui amorce un changement dans l'espace inférieur. En effet, la position de ces trois acides aminés diffère d'un état à un autre. Dans l'état actif, la phénylalanine est dirigée vers la proline qui est légèrement plus près de l'hélice TM6, et l'isoleucine se rapproche davantage de cette même hélice (**Figure 9D**). Toutefois, la fluctuation du site du ligand est indépendante du coeur de triade bien que la conformation de ce dernier impacte la population relative de configurations du site. Dror e*t al.*[47] ont démontré par des études de dynamique moléculaire (DM) que la cavité de liaison adopte une configuration activée 78% du temps lorsque la triade est active contre 11% dans la forme inactive. De même pour le site de la protéine G, son état agit sur celui du coeur de triade. I121, P211 et F282 sont en position active à 86% du temps quand la région cytoplasmique du récepteur est ouverte et 0% lorsqu'elle est inactive (fermée).

Les travaux portant sur le mécanisme d'activation des RCPG ainsi que sur leurs voies de signalisation n'ont cessé d'avancer, ce qui a permis de déterminer d'autres états conformationnels de ces récepteurs : il s'agit d'états *intermédiaires* (**Figure 10**).[35,40,47,50] La notion est au pluriel parce qu'il n'existe pas qu'un seul état intermédiaire mais une multitude qui présente des propriétés structurales apparentes conformément aux études de modélisation.

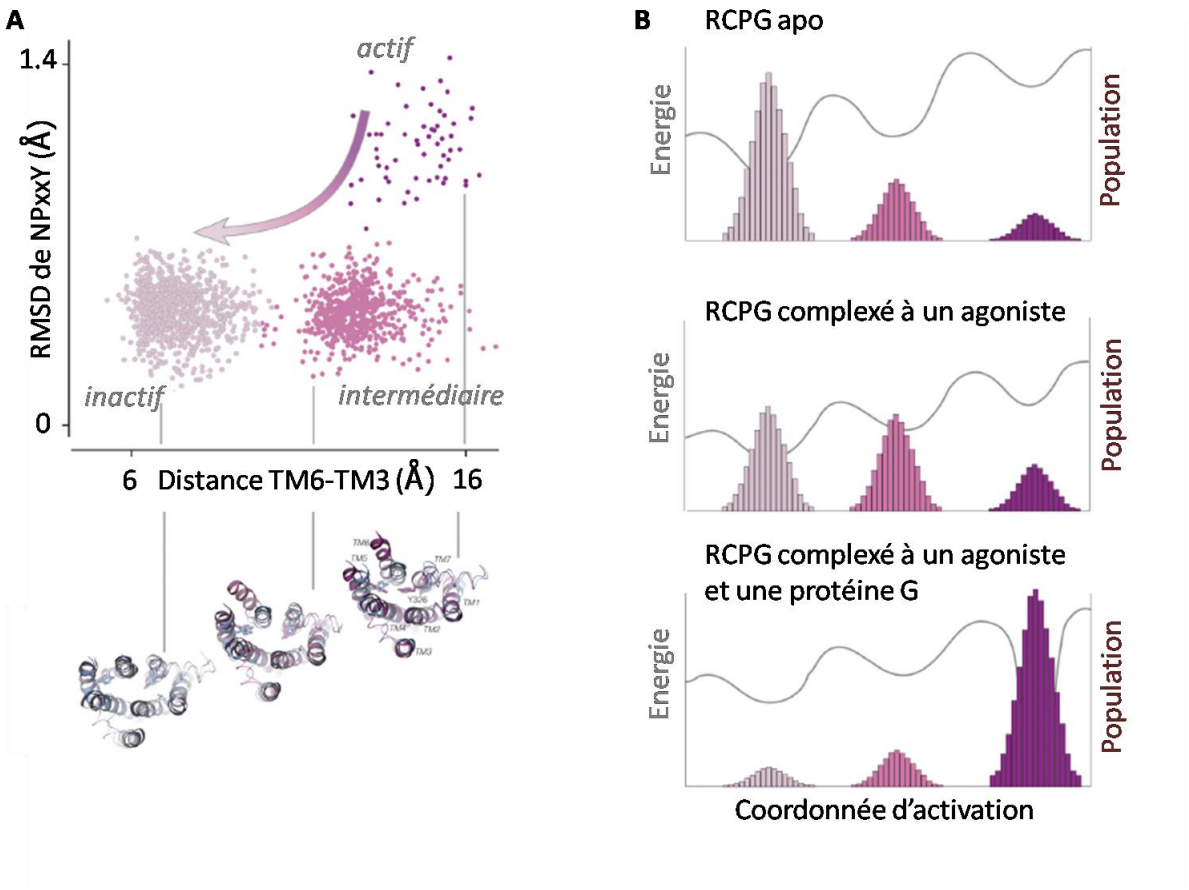


Figure 10 Différents états conformationnels adoptés par les RCPG. **A**) Traçage d'une trajectoire de dynamique moléculaire selon deux coordonnées géométriques (*RMSD est la déviation racine carrée moyenne*). Le graphe révèle trois états distincts au cours du processus de désactivation de **β2AR**, et qui sont représentés en rose pâle, magenta et violet. Ils sont superposés à la structure inactive cristalline (bleu). **B**) Population relative des trois états suivant diverses conditions : protéine non complexée (état inactif prédomine), protéine activée par un agoniste (états inactif et intermédiaire fréquents) et protéine activée par un agoniste et liée à une protéine G (état actif prime) [*adaptée des figures 4 et 5 de Latorraca et al.*[48]].

La première identité découverte est l'absence du *ionic lock* dans certaines structures cristallographiques exposant un RCPG complexé à un "antagoniste".[40,50,51] Ce dernier devrait donc être sous sa conformation inactive avec formation du "verrou ionique". Plusieurs hypothèses ont été émises concernant cette problématique comme la fusion du lysozyme T4 ou la co-cristallisation avec un anticorps volumineux qui prohiberait l'interaction entre l'arginine et le glutamate, ou que l'état inactif serait en équilibre entre une forme avec le "verrou" et une en l'absence de ce dernier. Des expériences de DM ont été réalisées afin d'appuyer cette conclusion et les résultats confirment bien la cassure ionique et une absence de modification de la position de l'hélice TM6 (**Schéma 7**).[47,52]

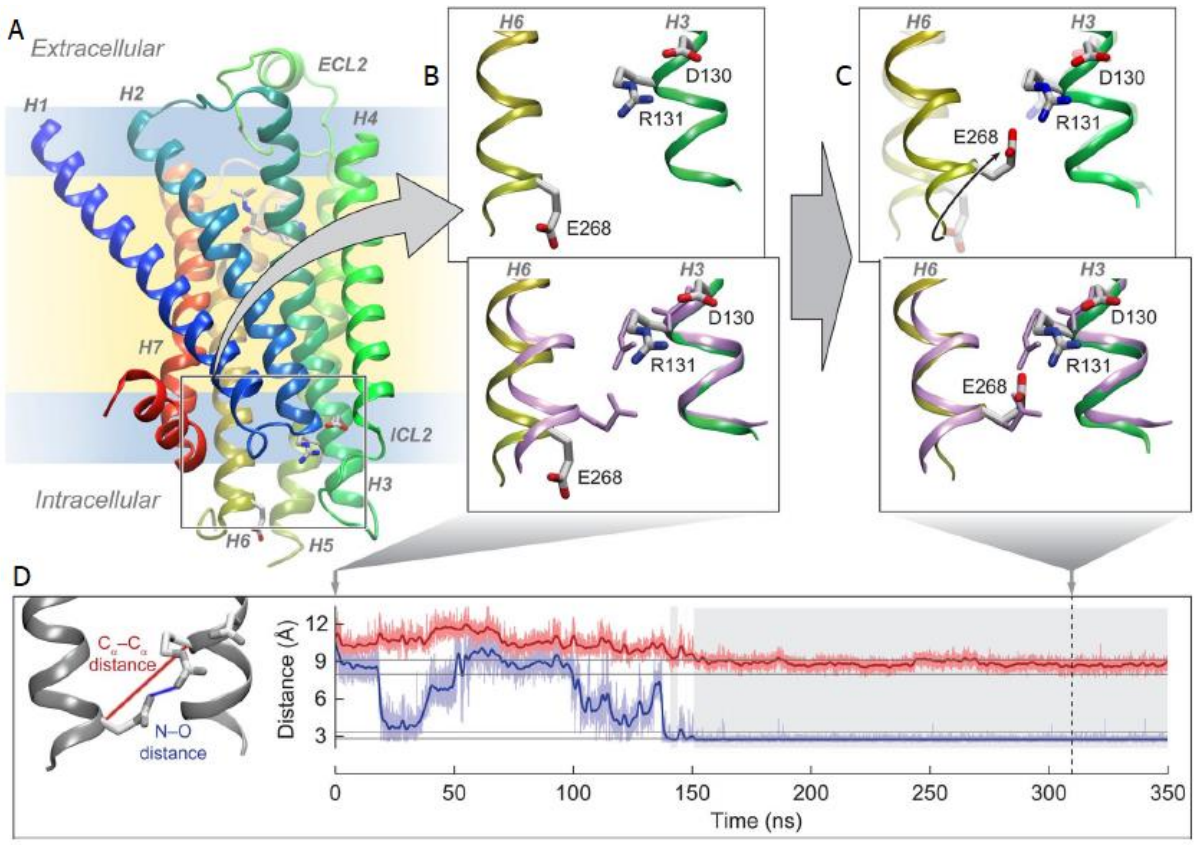


Schéma 7 Formation du ionic lock au cours d'une dynamique moléculaire. **A**) Structure *inactive* cristalline de ***β*2AR** (PDB : **2RH1**), **B**) Zoom sur les extrémités de TM3 et TM6 avec superposition à celles de la rhodopsine (rose, PDB : **1GZM**), **C**) Résultat après simulation : le "verrou" est élaboré, **D**) Variation au cours du temps de la distance entre les C*α* des deux résidus (rouge) ainsi que celle de leurs extrémités (N_{R131}-O_{E268} en bleue). La zone grisée correspond à la période où le *ionic lock* est observé avec la distance C_α-C_α qui est comparable à celles de deux structures inactives de la rhodopsine (PDB : **1U19** et **1L9H**) qui apparaissent en lignes grises (haut). Il en est de même pour la distance N-O (lignes du bas) [*extraite de la publication Dror et al.*[52]].

Le second critère analysé est la flexibilité de la région NPxxY qui inclut une tyrosine (Y306 chez *β*2AR) orientée vers la cavité orthostérique. Nygaard *et al.*[46] ont observé à travers leurs simulations de dynamique que cette partie de l'hélice TM7 est mobile et se réarrange au cours du temps. Une nouvelle configuration du récepteur est obtenue mais elle ne corrèle pas à la forme activée (**Figure 11**). Cette réorganisation est caractérisée par la mesure des distances entre les C_α de $S319^{TM7}$ et $I47^{TM1}$, et les C_α de $P323^{TM7}$ et $L75^{TM1}$. Une transition de la tyrosine est également visible[48] : l'acide aminé s'incline durant l'(in)activation du RCPG (**Schéma 8**).

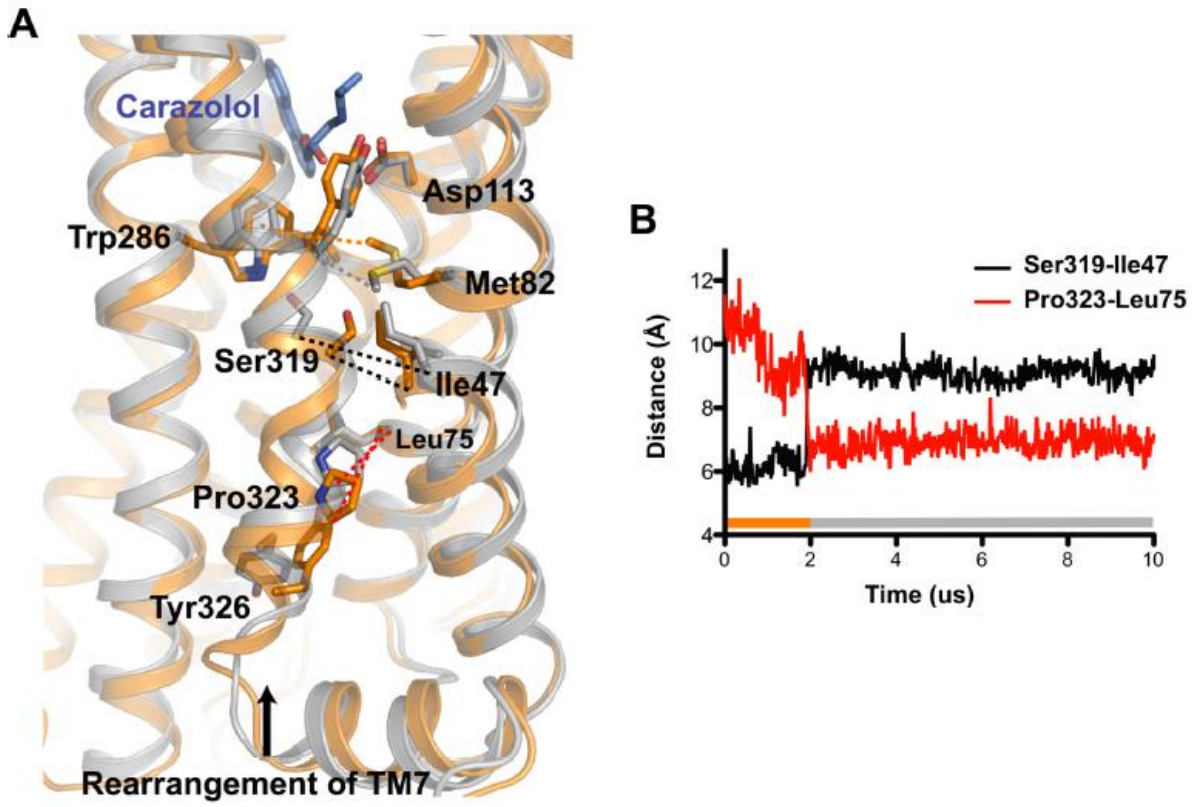


Figure 11 Caractéristiques d'un état intermédiaire chez ***β*2AR**. **A**) Transition de la conformation *inactive* cristallographique (orange, PDB : 2RH1) à une conformation alternative (gris) implique une rotation de la région intracellulaire de l'hélice TM7 définie par un changement de position de deux résidus (S319 et P323). **B**) Evolution au cours du temps des distances $S319^{TM7}$-$I47^{TM1}$ et $P323^{TM7}$-$L75^{TM1}$: la transition conduit à un accroissement de la distance Ser-Ile et inversement pour la distance Pro-Leu [*reprise de l'article de Nygaard et al.*[46]].

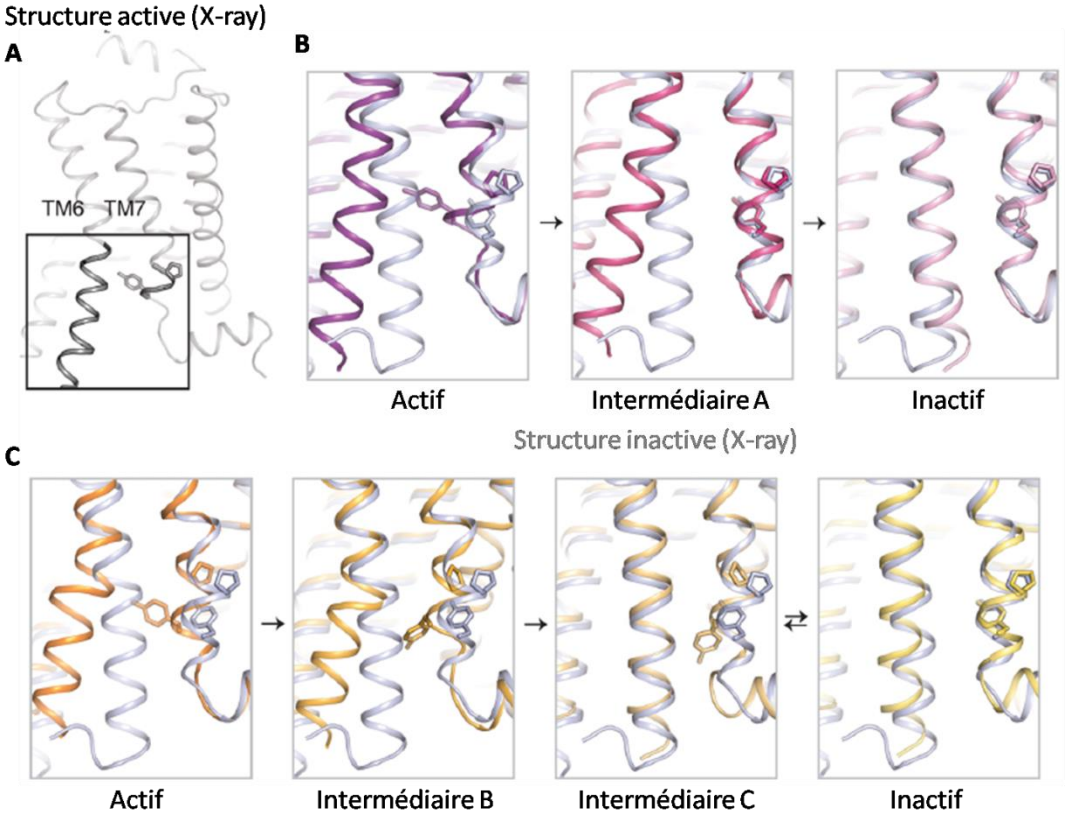


Schéma 8 Diverses conformations intermédiaires de ***β*2AR**. **A**) Structure *inactive* cristalline, **B**) Principale voie d'inactivation : le processus passe par un état intermédiaire dans lequel TM6 maintient sa position extérieure alors que TM7 est redressée et **C**) une voie alternative qui montre deux autres états intermédiaires possibles avec la tyrosine inclinée vers le bas avant de retrouver une orientation initiale [*figure 9 de l'article Latorraca et al.*[48] *remaniée*].

Le coeur de triade n'a pas échappé aux études *in silico* et comme décrit précédemment, il est dynamique et de ce fait, passe par plusieurs configurations possibles (**Figure 9D**).[53] De plus, des travaux antérieurs ont été communiqués par Dror *et al.* en 2011[47] au sujet d'une abondance faible au cours du temps de la triade activée (11%) dès lors où la partie intracellulaire est dans un état intermédiaire.

En regard de ces rapports, il a été découvert que plusieurs protéines *apo* (sans ligand) présentent quelques activités basales qui sont indépendantes du contact d'un ligand.[8,51] Cela s'expliquerait par de faibles barrières énergétiques entre divers états qui sont aisément franchies grâce aux fluctuations thermiques. Les analyses suggèrent donc que la structure cernant le ligand est relativement "vivante" en l'absence de ce dernier. Ceci dit, la dynamique des récepteurs peut aussi être influencée par l'environnement qui l'entoure, soit la membrane.

III. La membrane plasmique, une protection cellulaire

III.1 Description et généralités

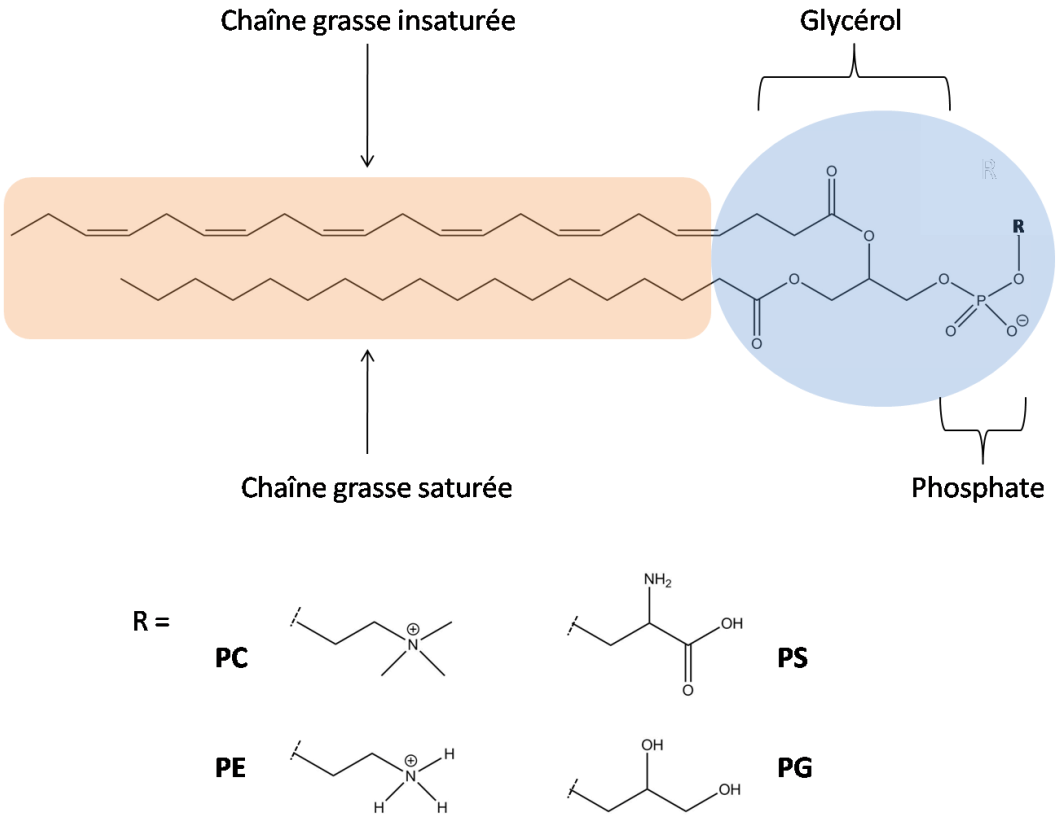


Figure 12 Caractéristiques d'un lipide. En orange est représentée la queue hydrophobe et en bleue, la tête polaire. Le fait que la tête possède un groupe phosphate, on peut parler de phospholipide. Suivant la nature de R, divers phospholipides sont obtenus : PC (phosphocholine ou phosphatidylcholine), PS (phosphosérine ou phosphatidylsérine), PE (phosphoéthalonamine ou phosphatidyléthalonamine) et PG (phosphoglycérol ou phosphatidylglycérol).

La membrane plasmique (MP), une bicouche lipidique, délimite toutes les cellules du corps et elle est caractérisée par deux couches de phospholipides qui sont des composés amphiphiles puisqu'ils possèdent une tête "phosphate" polaire et une queue carbonée apolaire qui peut être décrite par une ou deux chaînes grasses (**Figure 12**). Les interactions mises en jeu dans la conception d'une monocouche ou bicouche sont *1.* les effets hydrophobes et interactions de Van de Waals qui favorisent l'association des chaînes carbonées et *2.* les interactions

électrostatiques et liaisons H au niveau des têtes polaires. Ces dernières peuvent être de différents types (phosphocholine PC, phosphosérine PS, phosphoéthanolamine PE, phosphoglycérol PG et sphingomyéline SM), et les chaînes apolaires présentent parfois une ou plusieurs doubles liaisons (DL) : on parle d'insaturation (**Figure 12**). La présence de DL est le résultat d'une substitution d'une chaîne saturée d'un phospholipide par un acide gras insaturé (AGI, *cf sous-partie **III.2***). De cette réaction, on obtient des phospholipides insaturés (LI) et on notera qu'une double substitution est possible.[54]

L'épaisseur moyenne d'une membrane est égale à environ 7 nm (ou 3,5 nm en partant des groupes phosphates), et l'aire par lipide déduite du volume de la tête polaire vaut environ 7,3 nm^3 pour une phosphatidylcholine. En tenant compte de ces descriptions, les molécules qui sont en contact avec l'extrémité polaire sont donc hydrophiles et celles retenues au sein des queues sont dites hydrophobes ou lipophiles. La membrane établit une barrière entre deux milieux aqueux (polaires) : celui à l'extérieur et celui à l'intérieur de la cellule. D'autres molécules telles que des protéines et du cholestérol peuvent se trouver insérées dedans et leur répartition n'est pas équivalente dans chaque film lipidique. Cette composition mixte induit une fluidité à la membrane : les phospholipides sont mobiles et peuvent, par exemple, se déplacer latéralement (diffusion latérale). Néanmoins, divers paramètres influent également sur la fluidité :

- la température. Chaque phospholipide a une température de transition (T_f) au-delà de laquelle la fluidité est importante[55] (**Annexe 2**) : on parle de phase liquide. Lorsque la température est inférieure à T_f, on obtient une phase gel ordonnée non dynamique.[56]
- la nature des chaînes carbonées. Plus le nombre d'insaturations ou de lipides insaturés est élevé, plus il y a de désordre et donc plus la membrane est fluide. Cela est possible dû aux doubles liaisons qui créent des courbures dans la chaîne grasse empêchant les phospholipides de se compacter et s'ordonner.[57,58]
- le cholestérol. Par sa structure cyclique rigide et de petite taille par rapport aux phospholipides, il joue deux rôles distincts suivant la température. A $T < T_f$, son insertion entre les queues apolaires confère une fluidité à la bicouche et à $T > T_f$, ce composé apporte une certaine rigidité.[59]
- certains ligands comme des neuroleptiques qui sont amphiphiles. Ce caractère est nécessaire vu qu'ils doivent être miscibles en milieu aqueux pour leur transport jusqu'à l'organe cible et pouvoir interagir avec les récepteurs qui présentent un site de liaison essentiellement hydrophobe. De fait, il est possible qu'ils s'accumulent dans les MP.[60,61]

De plus, ce mélange d'éléments membranaires conduit parfois à la formation de *raft* lipidiques qui sont des domaines enrichis en cholestérol. Ils peuvent s'associer à certaines PTM et joueraient un rôle essentiel dans des processus biologiques comme la signalisation cellulaire ou l'endocytose.[62,63] Néanmoins, des domaines appelés *non-raft*, pauvres en cholestérol, sont également générés dans la membrane et sont constitués de LI et précisément de phospholipides polyinsaturés (**LPI**, *cf sous-partie **III.2***).[58,64] Cet assemblage de LPI aurait un impact sur l'activité des biomolécules (ex: RCPG) avec lesquelles ils interagissent.[64,65] Les AGI sont cruciaux pour le bon fonctionnement des cellules et spécialement des neurones qui comptent une quantité élevée de LPI au niveau de leur membrane, et qui régissent tous nos faits et gestes. De fait, moduler ces composés va affecter un grand nombre de mécanismes tels la fluidité membranaire, les interactions lipide-protéine ou encore la signalisation intracellulaire.[66]

III.2 Importance de l'apport alimentaire en oméga 3 et oméga 6 pour le cerveau

Les acides gras (AG) comme leur nom l'indique sont des acides carboxyliques à chaîne carbonée aliphatique (hydrophobe) plus ou moins longue. Le nombre d'atomes de carbone que compte une chaîne grasse varie de deux à vingt-six, et une chaîne peut avoir des DL : elle est dite *monoinsaturée* lorsqu'elle présente une DL et *polyinsaturée* si elle en possède plus d'une. Une DL est capable d'adopter deux configurations (*cis* ou *trans*) qui n'auront pas les mêmes conséquences sur la structure de l'AGI. Néanmoins, la majorité des AGI affichent des DL *cis* et leur position caractérise le type d'AGI. Une nomenclature a été dressée pour les identifier : **Cx:y,n-z** où **C** est l'atome de carbone, **x** désigne le nombre de carbones, **y** le nombre de DL et **z** correspond à la position de la première DL par rapport au bout de chaîne (**Schéma 9**). En l'absence de DL au sein de la chaîne carbonée, on parle de chaîne saturée (**Figure 12**).

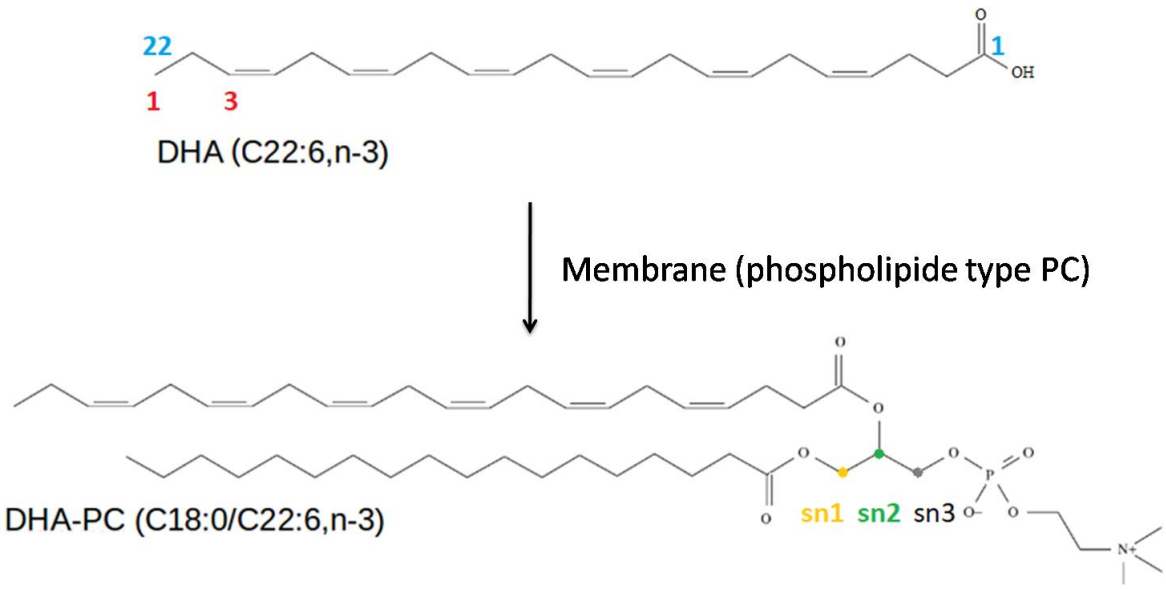


Schéma 9 Description d'un AGPI et incorporation sur une tête d'un phospholipide. L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un AGPI de la famille des oméga 3 (n-3, numérotation en rouge) qui a une chaîne de vingt-deux carbones (numérotation en bleu clair) et six doubles liaisons d'où la nomenclature associée. Par l'action d'une enzyme, le DHA va être greffé en position sn2 du groupe glycérol du phospholipide pour former le 1-stéaroyl-2-docosahexaénoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine simplifié en DHA-PC.

Le système nerveux, et surtout les synapses, sont très riches en acides gras polyinsaturés (**AGPI**), et particulièrement en acide arachidonique (**AA** ; C20:4,n-6) et acide docosahexaénoïque (**DHA** ; C22:6,n-3).[67] La membrane synaptique contient ~80% de LPI, c'est-à-dire des composés qui comprennent au moins une queue carbonée avec plusieurs DL résultant de l'incorporation d'AGPI (**Schéma 9**).[62,68] Parmi les principaux AGPI, on retrouve l'acide linoléique (**LA** ; C18:2,n-6) et l'acide α-linolénique (**ALA** ; C18:3,n-3) qui ne sont pas synthétisés par l'organisme mais sont indispensables parce qu'ils peuvent être transformés en AGPI à chaîne plus longue. Il est donc essentiel d'apporter ces AG par l'alimentation. Le LA est le précurseur des AGPI de la famille des oméga 6 (n-6) avec l'AA et l'acide docosapentaénoïque (**DPA** ; C22:5,n-6) qui sont les plus abondants, et l'ALA conduit à la production de l'acide eicosapentaénoïque (**EPA** ; C20:5,n-3) et du DHA pour la famille des oméga 3 (n-3) (**Figure 13**).[69] Ces voies métaboliques sont en compétition car elles mettent en jeu les mêmes enzymes, et une fois synthétisés, les AGPI pourront être introduits dans la bicouche neuronale en position sn2 du phospholipide (**Schéma 9**). Communément, les LPI exposent une chaîne saturée en position sn1 et une chaîne insaturée en sn2.

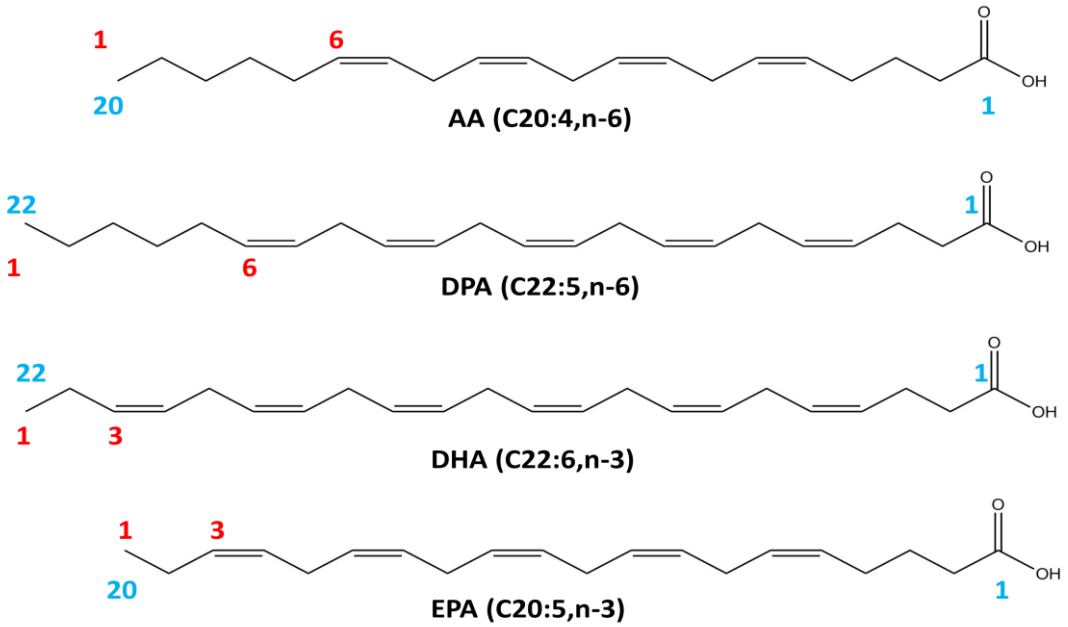


Figure 13 AGPI synthétisés à partir de l'acide linoléique et l'acide α-linolénique. Les numérotations en rouge indiquent à quelle famille appartient l'AGPI et celles en bleu clair correspondent au nombre de carbones constituant la chaîne grasse.

Des études ont permis d'observer que certaines pathologies psychiatriques (ex: dépression) n'étaient pas uniquement liées à une mauvaise régulation de PTM et/ou de neurotransmetteurs mais elles sont également associées à une diminution des taux en AGPI et particulièrement en oméga 3.[33,70–73]

Bien que les oméga 3 et 6 soient proches structurellement (**Figure 13**), leurs propriétés biophysiques sont différentes et par conséquent, leurs fonctions physiologiques. Elles sont parfois même opposés.[74,75] Un équilibre entre les oméga 3 et 6 se révèle alors important pour certains processus physiologiques.[67] En outre, il a été démontré qu'une augmentation de la quantité de DPA "compensait" l'appauvrissement en DHA.[70,76]

Ce dernier a été attesté comme étant essentiel pour le développement et la maintenance des fonctions adéquates du cerveau et possède potentiellement des effets neuroprotecteurs.[73,74,77] Il est également capable d'affecter l'organisation latérale de la membrane cellulaire par la formation de domaines *non-raft* qui améliorent la fonction de protéines spécifiques.[64,65] En effet, des études sur des RCPG menées par plusieurs équipes de recherches ont abouti à la conclusion que les AGPI, et notamment le DHA, impactaient les fonctions et propriétés du récepteur.[75,78–80] Une hypothèse sur un mécanisme du DHA a été soulevée : cet AGPI faciliterait le recrutement des effecteurs (protéine G et β-arrestine).[81]

IV. Impact de l'environnement lipidique sur les propriétés conformationnelles des RCPG

Les interactions lipides-protéines ont longtemps été étudiées et les données acquises mettent en évidence que la longueur et le degré d'insaturation des lipides, le type de tête polaire ainsi que la teneur en cholestérol dans la bicouche jouent un rôle crucial dans la modulation de ces biomolécules. La dynamique moléculaire (DM) a permis de comprendre le comportement et certains mécanismes par lesquels les composés d'une membrane impactent les propriétés des PTM tels les RCPG. Etant le premier RCPG à avoir été cristallisé, la rhodopsine a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, mais avec l'évolution des procédés expérimentaux d'autres RCPG comme la β2AR ont été largement examinés.

IV.1 Influence de la nature des chaînes grasses

En 2007, Cordomí and Perez[82] ont souligné l'importance de la longueur et du degré de saturation des chaînes carbonées sur les propriétés structurales de la rhodopsine. Dans un premier temps, plus la chaîne est longue et plus le lipide interagit avec la protéine. En effet, un lipide *long* pourrait "se déformer" au voisinage de la PTM afin d'optimiser les effets hydrophobes contrairement à un lipide *court* qui adopterait une conformation étendue due à une différence de taille. Dans ce dernier cas, les interactions hydrophobes lipide-lipide seraient favorisées.

Il en est de même pour le nombre de DL : un lipide fortement insaturé sera préférentiellement en contact avec la biomolécule puisqu'il pourra s'adapter à la géométrie de la protéine comme l'illustre la **Figure 14**.[83–85] Rappelons qu'en lipidomique, les DL induisent une fluidité au composé porteur de ces DL et donc un désordre au sein de la membrane en défavorisant le regroupement des phospholipides (**Figure 15**).[85–87] La surface membranaire se voit alors « élargie » et l'épaisseur diminuée. Le changement aura un impact direct sur les propriétés fonctionnelles de la PTM.[85,88]

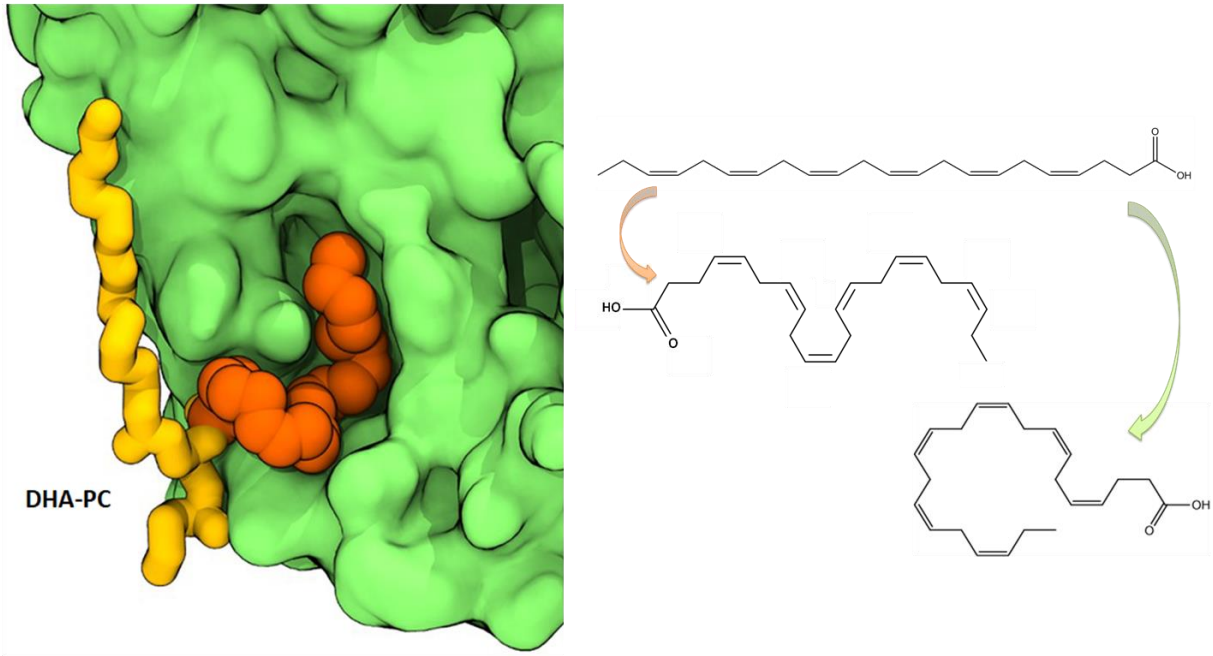


Figure 14 A gauche, un exemple de conformation où une molécule de DHA-PC (jaune = chaîne saturée et orange = chaîne insaturée DHA) s'adapte à la surface de la protéine (vert) [*extraite de l'article de Javanainen et al.*[85]]. En effet, le schéma de droite affiche des configurations que peut prendre un AGPI et ici, le DHA.

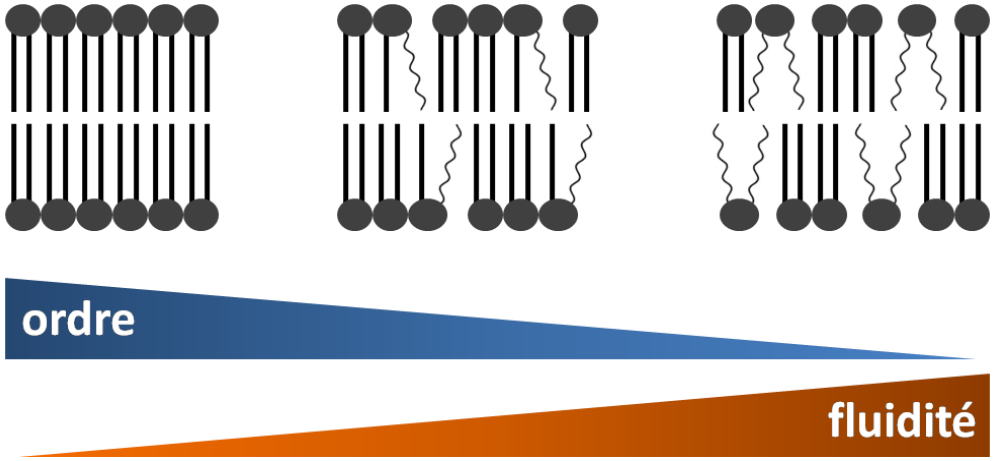


Figure 15 Impact de la nature des lipides sur l'organisation et la fluidité de la membrane. Les lignes droites caractérisent les chaînes saturées et les lignes ondulées représentent les chaînes insaturées.

Dans un second temps, les auteurs révèlent que certaines régions hélicoïdales du RCPG sont sensibles aux LPI et particulièrement aux conformations adoptées par ces derniers. Il s'agit des segments peptidiques qui comprennent des glycines et des prolines qui sont des résidus

pouvant conduire à une torsion de l'hélice. L'orientation des hélices n'est cependant pas ou peu affectée par l'environnement lipidique.

IV.2 Influence des têtes polaires

Outre le critère précédent, le type de la tête polaire influence les états conformationnels de la PTM comme démontré par Bruzzese *et al.*[53] Les chercheurs ont comparé les effets allostériques de trois phospholipides, **DOPE** (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine), **DOPG** (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol) et **DOPC** (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) dont la différence réside au niveau de leur extrémité : DOPE et DOPC possèdent un groupe chargé positivement qui amène à une molécule neutre (zwitterion) et DOPG affiche une charge négative (**Figure 12**). L'analyse des simulations atomistiques, qui ont pour état initial la β2AR *apo* activée dans une bicouche simple, dévoile trois résultats distincts suivant le lipide :

- le RCPG se désactive rapidement dans une membrane de DOPE avec la fermeture du domaine intracellulaire par l'hélice TM6 qui s'accompagne d'une diminution de la distance E268-R135 (« verrou ionique »), l'éloignement de l'hélice TM7 et une réorganisation du coeur de triade. La superposition de la structure après simulation et celle inactive cristallisée confirme l'état inactif adopté (**Figure 16A**).
- le DOPG quant à lui, stabilise la forme active. Cela est causé par l'interaction des lipides avec des résidus chargés positivement de l'extrémité cytoplasmique de l'hélice TM6, ce qui permet de maintenir l'ouverture de la protéine au niveau intracellulaire. Ces observations sont validées par une superposition structurale (**Figure 16B**).
- la β2AR, insérée dans une bicouche de DOPC, tend progressivement vers une conformation inactive sans jamais atteindre cet état : elle est en équilibre entre une forme inactive et des états intermédiaires. En effet, l'hélice TM6 se rapproche du *bundle* alors que l'hélice TM7 s'en écarte, et le coeur de triade affiche des acides aminés en position active et inactive (**Figure 16C**). Ces données sont comparables à celles publiées par Dror *et al.*[47] qui ont réalisé des DMs avec le lipide **POPC** (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine).

Horn *et al.*[88], ont aussi mis en avant ce mécanisme selon la nature des têtes polaires. Toutes ces analyses corrèlent avec celles expérimentales acquises par Dawaliby *et al.*[89] qui ont attesté que l'affinité pour un agoniste diminue en présence de DOPE mais augmente avec DOPG. En effet, DOPE ne stabilise pas l'état actif alors que DOPG fournit le meilleur environnement pour l'activation, et DOPC ne favorise aucun des deux états mais déstabilise tout de même la conformation active.

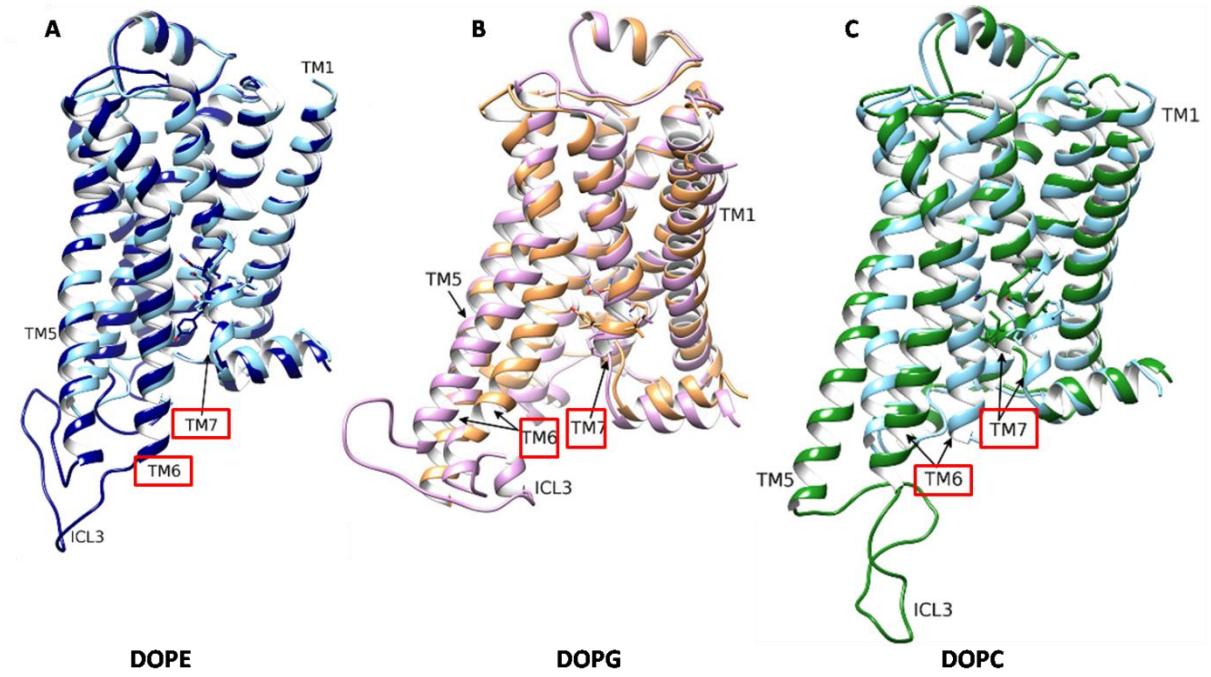


Figure 16 Structures de la **β2AR** dans une membrane sous l'effet allostérique de A) **DOPE**, B) **DOPG** et C) **DOPC**. La structure cristallographique *inactive* apparaît en bleu clair et celle *active* en orange. Les conformations après 4 µs de simulation sont tracées en *cartoon* bleu, rose et vert (ICL est l'anglicisme de BIC qui sont les initiales pour boucle intracellulaire) [*réadaptée de 3 figures de l'article Bruzzese et al.*[53]].

IV.3 Interaction du DHA et du cholestérol avec les RCPG

Le DHA étant important pour le bon fonctionnement de la transmission neuronale, plusieurs travaux ont été et sont consacrés à cet acide gras et notamment à son interaction avec les RCPG. Il en est de même pour le cholestérol qui est un composant principal des MP et il semblerait que ces molécules sont toutes les deux essentielles pour une activité biologique

efficace de par leur interaction directe avec les PTM, ce qui impacte leur comportement et donc leurs fonctions.[79,80,90,91]

En 2006, Grossfield *et al*[78] ont montré par l'application de la DM tout-atome (DMTA, *cf* ***Chapitre II*** - *partie* ***II***) que le DHA-PC est fortement en contact avec la rhodopsine. Il se fixe spécifiquement dans des régions du récepteur, tout en formant une "couronne" autour de ce dernier (**Tableau 2** et **Figure 17**), ce qui provoque l'éloignement des hélices, alors que le cholestérol interagit faiblement avec la protéine. Les interactions entre les résidus qui confèrent une certaine stabilité à la protéine seraient ainsi perdues à cause de la présence du LPI qui oriente sa chaîne grasse polyinsaturée vers le RCPG (**Figure 14**).[83,84] Ce résultat concorde avec les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) menées par Soubias and Gawrisch[92] : une forte interaction est établie entre la rhodopsine et la chaîne DHA.

Groupes	Fréquence	Hélices
DHA-PC		
1	10	6
2	14	1, 7
3	9	3, 4
4	4	1, 2
5	9	6, 7
6	4	1, 7
7	7	3, 4
8	5	6
non-groupé	16	-
Cholestérol		
1	4	1, 8
2	5	6, 7
3	6	3, 4
non-groupé	47	-

Tableau 2 Hélices de la rhodopsine préférentiellement en contact avec le DHA-PC et le cholestérol. L'analyse des différentes simulations a permis aux auteurs de distinguer plusieurs groupes au sein d'un même composé. Un groupe correspond à un ensemble de molécules (DHA ou cholestérol) qui présentent des sites de liaisons semblables [*données extraites de l'article de Grossfield et al.*[78]].

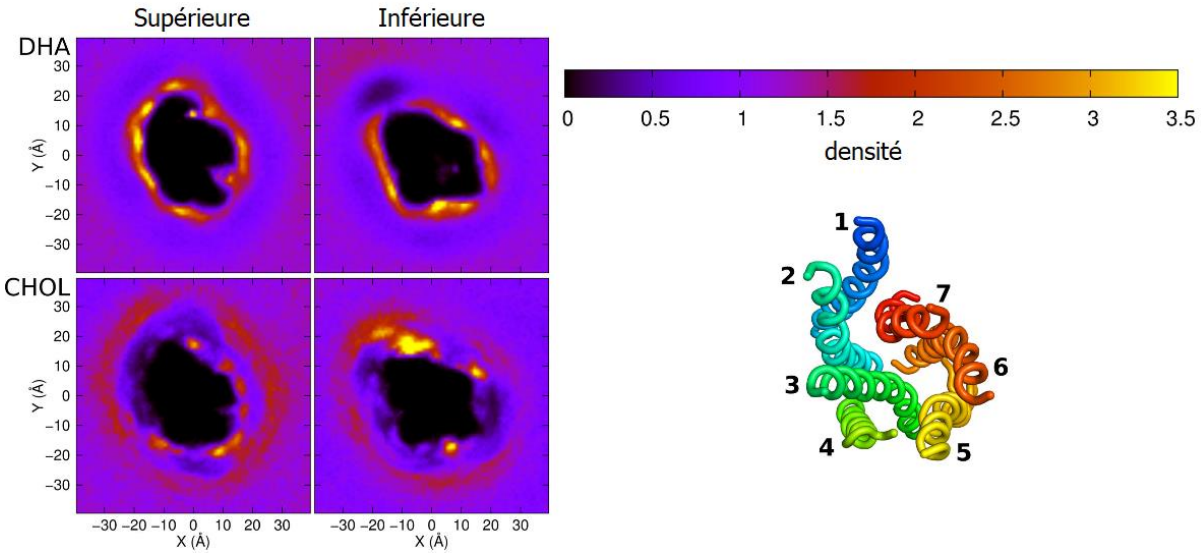


Figure 17 Cartes de densité du DHA et du cholestérol pour chaque monocouche. La rhodopsine est au centre cependant elle n'est pas visible mais l'orientation des hélices est indiquée à droite de l'image [*Figure 2 de l'article Horn et al.*[88] *modifiée*].

Les travaux de Horn[88] appuient les résultats ci-dessus en démontrant la compétition qui existe entre les LPI et le cholestérol. En effet, tel qu'exposé dans le **Tableau 2**, le DHA-PC se lie parfois dans les sites définis comme ceux du cholestérol.[93] D'autres recherches ont également révélé cette compétitivité entre le cholestérol et le DHA ainsi que la préférence remarquable pour l'interaction de RD2 et A2A (récepteur A2 de l'adénosine, Classe A) avec la chaîne DHA, en employant la DMTA et la dynamique moléculaire gros grains (DMGG, *cf* ***Chapitre II*** - *partie* ***III***).[80,85] Cette tendance est observée aussi bien au sein d'une membrane saine que malade (**Figure 18**) mais la variabilité de la population en DHA-PC a des effets différents sur les processus tels que l'oligomérisation des PTMs.[80,90] Les chercheurs mettent en évidence l'assemblage du LPI autour du RD2 et dans une étude récente qui n'a pas encore été publiée, ils ont déterminé certaines hélices qui sont préférentiellement impliquées dans l'interaction LPI-protéine (TM4, 6, 2 et 1).

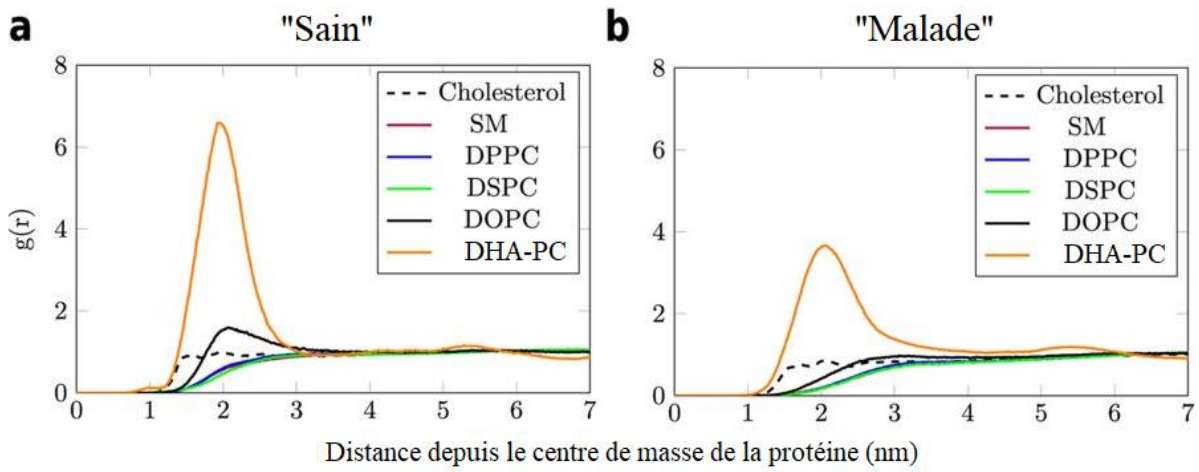


Figure 18 Densité de probabilité (fonction de distribution radiale, g(r)) des lipides autour du centre de masse de **A2A**. Résultats de DMGG obtenus dans des membranes modèles **a**) saine (taux élevé de DHA) et **b**) malade (taux faible de DHA) [*reprise de Guixà-González et al.*[80]].

Concernant le cholestérol, cette molécule stabilise un état ce qui a une conséquence sur les fonctions du récepteur.[94] Bien que la molécule soit faiblement en contact avec la protéine, une structure cristallographique de la β2AR dévoile que les hélices TM1-4 forment le site de liaison du cholestérol.[93] Par la suite, cette cavité portera le nom de CCM (*Cholesterol Consensus Motif*). Cependant, des travaux récents sur certains RCPG exposent plusieurs sites fréquemment occupés (SFO) par le stérol[88,95–102], et suivant le récepteur étudié, ces SFO peuvent varier. Toutefois, des hélices reviennent souvent dans les articles, il s'agit des hélices TM1, 4, 6, 7 et 5. Cette dernière présente un motif de trois résidus V/L-Y-R/K qui est défini comme le site CRAC (*Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus*) reconnu par la molécule de cholestérol.

V. Projet de thèse

Les parties précédentes rapportent qu'un grand nombre de pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie ou les troubles bipolaires s'accompagnent d'altérations de l'activité du RD2 et de la composition lipidique cérébrale. Néanmoins, le rôle de l'environnement lipidique dans les processus d'activation des récepteurs et des voies de signalisation reste peu étudié. Une entière compréhension de cet aspect nécessite la contribution de plusieurs domaines : pharmacologiques (*in cellulo* et *in vivo*), biophysiques et théoriques.

De ce fait, un projet a été fondé autour du RD2 (cible de fort intérêt thérapeutique, **Figure 19A**) et des AGPI et s'insère dans une collaboration pluridisciplinaire allant du vivant à la simulation numérique. Suite aux résultats obtenus par Chalon[71] et ne connaissant pas les mécanismes par lesquels un déséquilibre en AGPI participe au développement de ces maladies psychiatriques, l'hypothèse de ce projet est que **les modifications lipidiques des membranes neuronales pourraient directement impacter les processus de neurotransmission *via* une action directe sur l'activité du RD2**. En effet, la modulation de LPI pourrait altérer l'état conformationnel du RD2 et donc son affinité pour ses ligands mais également sa mobilité membranaire, ce qui aurait un impact sur la signalisation.

Les résultats préliminaires acquis par Isabel Alves et Rim Baccouch ont démontré que l'affinité du RD2 pour un agoniste et un antagoniste est améliorée dans une membrane enrichie en LPI de type 3 (DHA-PC) mais également dans celle supplémentée en oméga 6 (AA-PC, DPA-PC) [*non publiés ; thèse de Rim Baccouch (2018-2021)*]. Le point intéressant de ces analyses est qu'une meilleure affinité a été observée avec le DHA-PC. Dans un second temps, les travaux ont attesté de l'effet des LPI sur la quantité de β-arrestine recrutée au niveau de la membrane ainsi que sur l'internalisation (endocytose) du récepteur (elle diminue) [*non publiés ; thèse de Rim Baccouch (2018-2021)*].

Dans le cadre de la modélisation, l'objectif est d'illustrer par la DMGG, l'influence de l'environnement lipidique sur les propriétés conformationnelles du RD2. Pour cela, trois aspects ont été abordés : **i**) le comportement de LPIs, **ii**) les interactions LPI-RD2 et **iii**) la compétition entre les LPI et le cholestérol. Des systèmes peu complexes ont été générés en accord avec les expériences de biophysique réalisées par Isabel Alves. Elle travaille sur des membranes modèles constituées de POPC qui contiennent 5% d'un LPI et dans certaines études, du cholestérol y est ajouté (10-30%). Le pourcentage indiqué de LPI a été déterminé

comme la quantité minimale pour observer un changement dans les fonctions du RD2, et un tel système peut être comparé à une membrane de patients malades. Ainsi, nous avons étudié quatre types de LPI séparément, dans un premier temps : DHA-PC, DDHA-PC (phospholipide qui comporte deux chaînes grasses insaturées DHA, *oméga 3*), DPA-PC et DDPA-PC (phospholipide qui comporte deux chaînes grasses insaturées DPA, *oméga 6*) (**Figure 19B**).

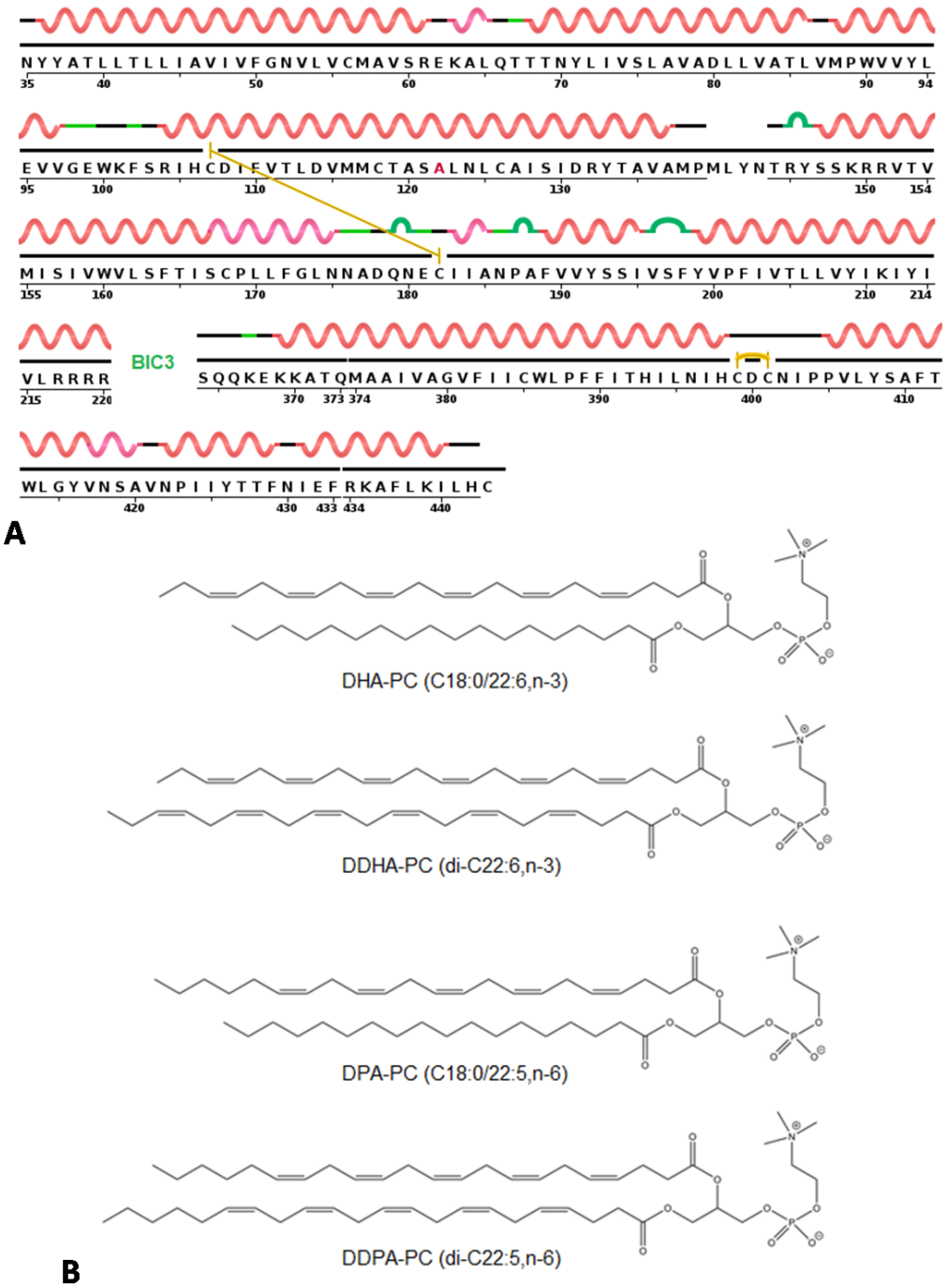


Figure 19 A) Séquence de RD2 (PDB : **6cm4**, en rouge les hélices α, en rose les hélices 3^{10}, en vert les boucles et en jaune les ponts disulfures ; BIC = boucle intracellulaire) et **B**) LPIs étudiés dans les travaux de dynamique moléculaire.

Chapitre II La dynamique moléculaire, une méthode de simulation

I. Généralité

Bien que la pratique permette d'obtenir un grand nombre de données comme la cinétique d'agrégation de protéines, leur dynamique ou leur affinité pour un ligand, il est souvent difficile de les comprendre. Les observations et interprétations faites conduisent à des interrogations dont les réponses se trouvent au niveau atomique du phénomène considéré, et qui ne sont pas visibles expérimentalement bien que la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou celle par double résonance électron-électron (DEER) par exemple, ont pu répondre à un certain nombre de questions.[92,103–105]

Afin de faciliter l'interprétation des résultats expérimentaux, les méthodes qui consistent en l'application de l'informatique telles que la modélisation moléculaire (MM) sont utilisées. Ce domaine en plein essor a fait ses preuves et a montré un grand intérêt dans la compréhension de mécanismes biologiques et chimiques dû à une capacité d'analyse au niveau atomique voire subatomique (**Figure 20**). Parmi les différentes techniques que regroupe la MM, la dynamique moléculaire (DM) est très attractive car elle tient compte de la flexibilité des molécules et de la notion du temps. De fait, il est possible d'étudier l'évolution temporelle (10^{-15}-10^{-3} s) d'un système dans un environnement (ex: interaction lipides-protéine) et par conséquent, de parcourir l'espace conformationnel des molécules.[101,106,107]

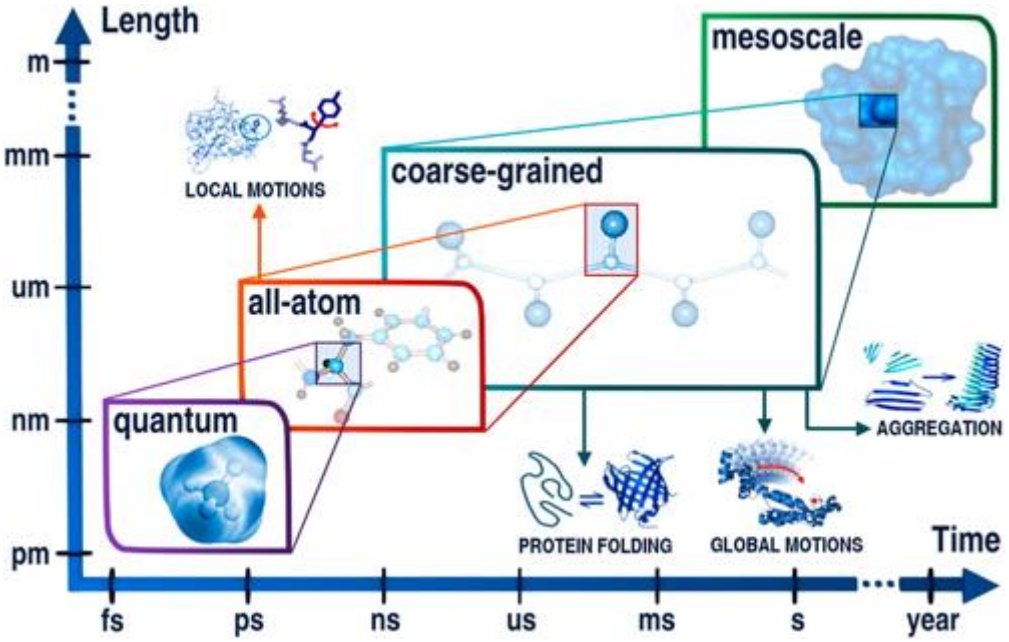


Figure 20 La modélisation moléculaire à différentes échelles (méthodes quantique ("*quantum*"), tout-atome ("*all-atom*"), gros grains ("*coarse-grained*") et méso-échelle ("*mesoscale*")) [*Kmiecik et al.*[108]].

Dans ce projet, la DM classique est utilisée et elle suit une démarche bien précise qui requiert une structure tridimensionnelle des molécules ainsi que leurs données chimiques (ex: charges atomiques) et physiques (ex: température de fusion) si possible, afin de réaliser une simulation qui traduit avec précision la réalité ou d'obtenir de bons modèles prédictifs. Le site Protein Data Bank (PDB) recense un grand nombre de macromolécules biologiques (**Figure 21**) et principalement des protéines déterminées expérimentalement par cristallographie aux rayons X, RMN et cryo-microscopie électronique. L'évolution de ces techniques a permis d'obtenir des structures avec une bonne résolution atomistique, un critère important depuis qu'il a été démontré que l'activité biologique d'une protéine est directement liée à son architecture 3D avec le concept "serrure-clé" proposé par le chimiste allemand Emil Fischer en 1894.

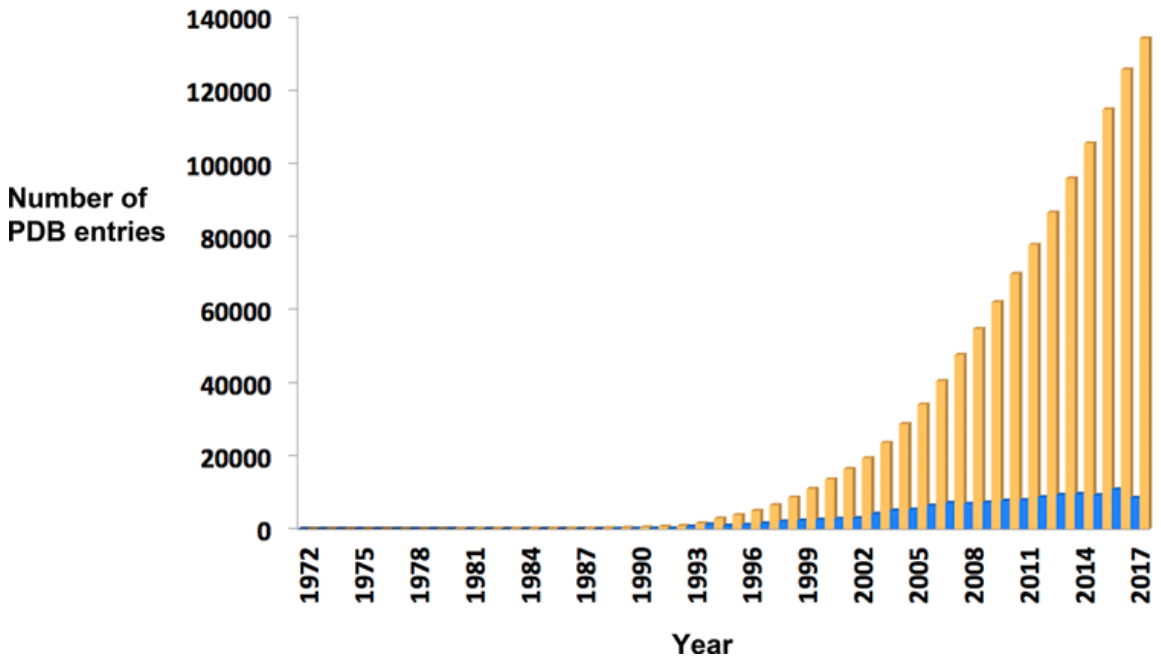


Figure 21 Evolution du nombre de macromolécules inscrites dans la PDB. En jaune, le nombre total de structures identifiées par cristallographie aux RX, RMN, microscopie électronique et modélisées. Le nombre total de structures déposées dans la PDB par an est indiqué en bleu [*van Montfort and Workman*[109]].

La DM classique s'appuie sur les principes simples de la physique et notamment les lois de Newton qui relient le mouvement des particules, soit leurs positions dans l'espace au cours du temps, à la force appliquée (**Equation 1**). Le comportement des molécules est ainsi simulé au niveau atomique et cela signifie que les réactions chimiques, impliquant des effets quantiques, ne peuvent être traitées.

$$\boldsymbol{F_i(t)} = m_i.\boldsymbol{a_i} \qquad \text{avec} \qquad \boldsymbol{a_i} = {d^2\boldsymbol{r_i}}/{dt^2} \qquad \textbf{Equation 1}$$

où a_i = accélération de la particule i
m_i = masse de la particule i
r_i = position de la particule i
avec 1<i<N

Les atomes sont représentés par des sphères impénétrables possédant un rayon, une masse et une charge atomique, reliées entre elles par des ressorts définis par une longueur d'équilibre et une constante de force (**Figure 22**).

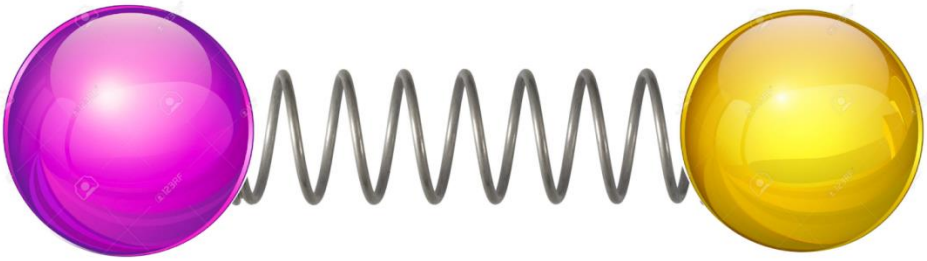


Figure 22 Représentation des atomes et de la liaison chimique en mécanique classique.

Le mouvement des particules dépend et est donc déterminé par l'ensemble des forces exercées par toutes les autres particules en fonction du temps : l'intégration de l'**Equation 1** permet de définir la nouvelle position d'une particule. Ces forces dérivent de potentiels de liaisons ou interactions ainsi l'énergie potentielle totale $\mathbf{E_T}$ est décrite comme la somme de plusieurs termes énergétiques (énergies de liaisons $\mathbf{E_l}$, d'angles $\mathbf{E_\theta}$, de torsions $\mathbf{E_\phi}$, des liaisons hydrogènes $\mathbf{E_H}$, interactions de Van der Waals (VdW) $\mathbf{E_{LJ}}$ et électrostatique $\mathbf{E_e}$). A cela, il peut s'ajouter les forces imposées ou contraintes $\mathbf{E_{contraintes}}$ (**Equation 2**). $\mathbf{E_T}$ est un modèle semi-empirique qui caractérise ce jeu de sphères et de ressorts et correspond au champ de forces.

$$E_T = \underbrace{E_l + E_\theta + E_\phi}_{\text{termes liants}} + \underbrace{E_{LJ} + E_e + E_H}_{\text{termes non-liants}} + E_{contraintes} \qquad \textbf{Equation 2}$$

Notons qu'il n'existe pas qu'un champ de forces mais différents champs de forces suivant le logiciel de simulation utilisé et deux logiciels peuvent présenter un même champ de forces. Les logiciels les plus connus sont AMBER, GROMACS (utilisé pour notre étude[110]) et

NAMD, mais le principe reste le même. La différence se fait au niveau des algorithmes qui peuvent varier d'un logiciel à un autre.

Néanmoins, l'avancée des recherches biologiques a entraîné une amélioration de la DM afin de pouvoir simuler de larges systèmes tout en gardant un temps de calcul convenable. Actuellement, il est possible de représenter les molécules à différentes échelles (**Figures 20, 23 et 29**) et l'emploi spécifique d'un modèle dépend de l'étude et de la problématique qui en résulte.

II. La dynamique moléculaire tout-atome ou atome unifié

Les premières études de l'appareil humain en DM ont été réalisées en tout-atome (TA) ou atomes unifiés (AU) suivant le champ de forces utilisé (**Tableau 3**). Ainsi, les molécules constituants le système sont représentées par des atomes et des liaisons en respectant l'hybridation soit la géométrie des molécules (**Figure 23**). Dans le second modèle (AU), les hydrogènes aliphatiques ne sont pas présents explicitement : le groupe -CH_x est décrit comme une seule particule, ce qui diminue le nombre de degré de liberté et donc accélère le calcul.

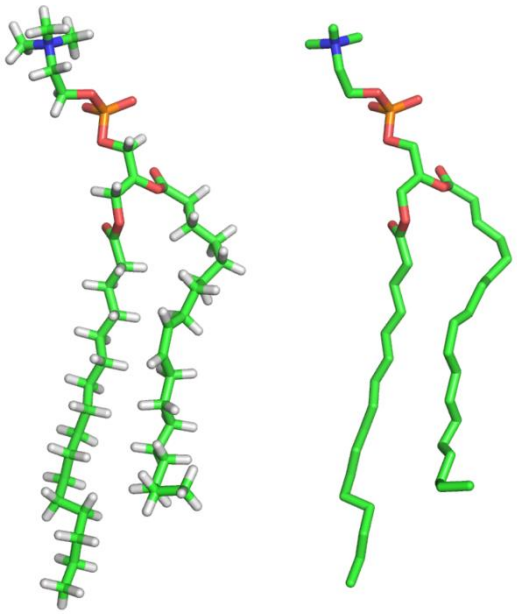


Figure 23 Modèles atomistiques du 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC). A gauche, la représentation tout-atome (*134 atomes*) et à droite, la représentation atome unifié (*52 atomes*).

Le choix d'une représentation dépend de l'étude en question qui conduira à sélectionner un champ de forces adéquat suivant le logiciel de DM. En effet, rappelons qu'il ne compte pas un unique champ de forces mais plusieurs avec une spécificité pour certaines biomolécules. Le tableau suivant répertorie les champs de forces les plus connus et leur champ d'application. En général, ils sont dits semi-empiriques car ils introduisent à la fois des données expérimentales et des résultats de simulations de mécanique quantique afin de reproduire avec précision le(les) phénomène(s) réel(s).

Nom	Modèle	Protéine	Lipide	Acides nucléiques
GROMOS	AU	+	+	+
AMBER	TA	+	-	+
OPLS	TA/AU	+	+	-
CHARMM	TA	+	+	-

Tableau 3 Quelques champs de forces atomistiques pour l'étude de macromolécules (TA = tout-atome, AU = atome unifié).

Cependant, quel que soit le champ de forces, il décrit les interactions inter- et intramoléculaires et il est constitué de deux principaux termes (**Equation 2**).

II.1 Interactions liantes

De manière simple, une molécule est constituée de particules (ou atomes) liées de façon covalente ainsi les interactions mises en jeu peuvent impliquer deux particules (élongation de la liaison, **Equation 3a**), trois particules (déformation d'angle, **Equation 3b**) ou quatre particules (torsion, **Equation 3c**). Un potentiel harmonique permet de décrire chacune de ces déformations.

$$a. \quad E_l = {}^{1}/_{2}\, K_{ij}(r_{ij}.\, l_{eq})^2 \qquad \textbf{Equation 3}$$

$$b. \quad E_\theta = {}^{1}/_{2}\, K_{ijk}(\theta_{ijk}.\, \theta_{eq})^2$$

$$c. \quad E_\varphi = K_{ijkl}^{m}(1 + \cos(m\varphi_{ijkl} - \gamma))$$

avec K = constantes de forces
i-l = particule i-l
r_{ij} = distance entre les particules i et j
l_{eq} = distance à l'équilibre
θ = angle formé par les particules i, j, k
θ_{eq} = angle à l'équilibre
m = ordre de séries de Fourier
φ_{ijkl} = angle dièdre formé par les particules i, j, k, l
ϒ = angle de phase du dièdre

La différence entre les champs de forces se fait au niveau des paramètres constituants les équations ci-dessus. Par exemple, le champ de forces GROMOS96[111] développé dans GROMACS applique un coefficient de ¼ au lieu de ½, et le carré de r_{ij} et l_{eq} dans l'expression de $\mathbf{E_l}$. L'**Equation 3c)** diffère également dans ce champ de forces, elle comporte un terme de torsion des angles dièdres et un terme d'interaction harmonique des angles dièdres *impropres*. Ainsi, le résultat de simulation ne sera pas le même suivant le champ de forces employé.

II.2 Interactions non-liantes

Ces termes correspondent aux interactions entre deux particules non-liées. Elles regroupent les interactions de VdW et les interactions électrostatiques. Un potentiel permet également de traduire ces interactions (**Equations 4 et 5**).

En effet, l'interaction électrique de faible intensité entre deux particules i et j qui conduit à une déformation de leur nuage électronique est exprimée sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones (LJ, **Equation 4**). Il est le plus utilisé pour traduire les interactions de VdW.

$$E_{LJ} = \left({C_{ij}^{12}}/{r_{ij}^{12}} \right) - \left({C_{ij}^{6}}/{r_{ij}^{6}} \right) \qquad \textbf{Equation 4}$$

où C_{ij}^{12} et C_{ij}^{6} = constantes qui dépendent de la nature des particules i et j

r_{ij} = distance entre les particules i et j

${C_{ij}^{12}}/{r_{ij}^{12}}$ = terme répulsif et ${C_{ij}^{6}}/{r_{ij}^{6}}$ = terme attractif

Le potentiel Coulombien permet de décrire le terme d'énergie électrostatique soit l'interaction entre deux particules i et j possédant une charge entière ou partielle (q_i et q_j). Il est représenté par l'équation suivante :

$$E_e = {q_i \cdot q_j}/{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \qquad \textbf{Equation 5}$$

où ε_0 est la permittivité du vide et ε_r celle du milieu

r_{ij} = distance entre les particules i et j

On notera que cette interaction ne dépend pas uniquement de la distance entre les deux particules mais sera fortement influencée par le milieu.

En chimie, l'intensité des interactions non-liantes dépend de la distance des deux partenaires, plus ils sont proches et plus l'interaction est forte et inversement. Ainsi, il est important de simuler ce caractère en DM et cela peut demander un temps de traitement considérable suivant la taille du système étudié (augmentation du nombre de paires de particules soit le nombre d'interactions à calculer).

Afin de se dispenser d'une telle consommation en temps de calcul, plusieurs approches ont été développées comme celle dite du *cut-off*. Cette méthode induit une coupure instantanée du calcul d'énergie lorsque la distance entre les deux particules excède la valeur seuil indiquée, ce qui peut engendrer des artefacts de simulation ou des instabilités énergétiques. Une autre approche est celle de la diminution accélérée de l'énergie d'interaction, et deux méthodes existent pour décrire ce processus. La première est appelée *Shift* et elle entraîne une diminution rapide mais légère suivant que $\mathbf{r_{ij}}$ croît jusqu'à un arrêt une fois que la distance maximale, précisée par l'utilisateur, est atteinte. La seconde méthode, *Switch*, fait appel à deux valeurs seuils où l'interaction est calculée normalement avant la première limite et au-delà, une décroissance énergétique est observée. L'interaction sera ignorée lorsque le deuxième seuil est dépassé.

La coupure brusque des interactions non-liantes par ces trois démarches ne posera pas spécialement de problème concernant les interactions de VdW mais pourrait conduire à une mauvaise reproduction des interactions électrostatiques. Afin de remédier à cette sous-évaluation, les méthodes de *Particle Mesh Ewald* (PME)[112,113] et de *reaction-field*[114,115] sont favorisées puisqu'elles n'induisent pas d'interruption du calcul des potentiels. On notera que la première approche nécessite d'avoir un système initialement neutre, de fait, des ions peuvent être ajoutés si besoin.

II.3 Acquisition des nouvelles positions

La DM s'appuyant sur les lois de Newton, les nouvelles coordonnées, soit la position, d'une particule i sont déterminées en intégrant l'équation du mouvement (**Equation 1**). L'itération de cette opération permet d'obtenir une trajectoire qui décrit l'évolution du système au cours du temps. Plusieurs algorithmes existent pour intégrer cette équation mais le plus connu est

celui de *Leapfrog*[116] qui utilise les vélocités au temps $t-\Delta t/2$ pour calculer la position r au temps t. Les vitesses sont donc mesurées pour des intervalles de temps (Δt) demi-entiers alors que r est évaluée pour des Δt entiers ainsi que la force F exercée sur i (**Figure 24**). De fait, la position de i à t+Δt est obtenue par la relation suivante :

$$\boldsymbol{r}_i(t+\Delta t) = \boldsymbol{r}_i(t) + \boldsymbol{v}_i(t+\Delta t/2)\Delta t \qquad \textbf{Equation 6}$$

avec $\mathbf{v}_i(t+\Delta t/2) = \mathbf{v}_i(t-\Delta t/2) + \left(\boldsymbol{F}_i(t)/m_i\right)\Delta t$

où v_i = vitesse de la particule i

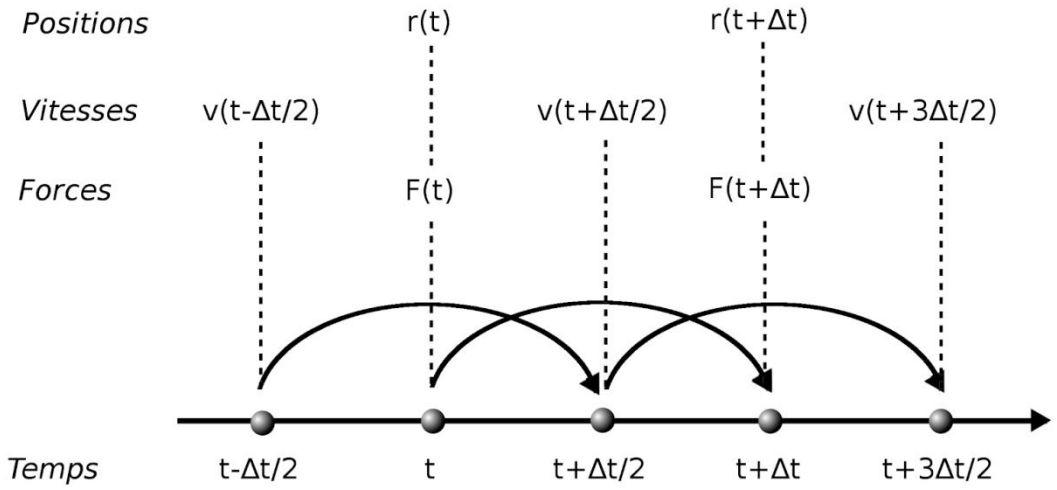


Figure 24 Principe de l'algorithme *Leapfrog* lors de l'intégration de l'équation du mouvement.

On notera que la vibration moléculaire la plus rapide étant de l'ordre de 10 fs, Δt doit être bien inférieur à ce dernier (1 - 2 fs).

Lors du calcul de la position, il est possible de tenir compte d'un troisième terme énergétique qui correspond aux contraintes (**Equation 2**). L'application de ces forces spéciales se fait dans certains cas et aura donc une influence sur l'évaluation de la nouvelle position de i. En effet, il est possible de restreindre le mouvement de particules qui nous intéressent (ex: protéine) lors de la simulation afin de maintenir une structure proche de celle initiale. L'emploi de contraintes ou restrictions sur la position de particules, voire les longueurs de liaisons, les angles et les torsions, dépend de l'objectif du projet et il est souvent réalisé pendant l'étape d'équilibration du système. Pour cela, plusieurs algorithmes peuvent être

utilisés tels que l'algorithme LINCS[117] qui applique des contraintes sur la position et les longueurs de liaisons. Ces dernières sont rectifiées à une bonne longueur en cas de déformations démesurées après l'ajustement des positions. Cette méthode est rapide et stable, c'est pourquoi elle est couramment employée.

II.4 Traitement et modèles de l'eau

Outre les contraintes, le solvant dans lequel est immergé la/les molécule(s) à étudier influence leur comportement. Le résultat ne sera pas le même suivant la représentation du solvant (explicite/implicite), leur nature (aqueux/organique) et le modèle de la molécule de solvant. Il est donc important de choisir raisonnablement le solvant afin de modéliser avec précision le comportement des molécules d'intérêts. Nos études portant sur des systèmes biologiques, l'eau a été utilisée comme solvant et des ions (NaCl) ont été ajoutés afin d'imiter le milieu naturel de l'objet d'étude. Dans le cas d'une production avec la méthode PME, l'addition d'ions permet d'arriver à un système neutre.

L'emploi du solvant aqueux peut se faire de deux manières : explicitement ou implicitement. Un solvant explicite sera présent dans la boîte de simulation et donc visible lorsque le système est ouvert avec un logiciel de visualisation comme VMD. A la différence, un solvant implicite est représenté par sa constante diélectrique ε qui sera prise en compte dans le calcul de toutes les interactions, ce qui demande un temps de simulation beaucoup moins important que la première méthode. Toutefois, l'ajout des molécules de solvants conduit à une meilleure reproductibilité car les interactions solvant/soluté(s) seront également analysées.

Plusieurs modèles d'eau ont été développés et ceux utilisés dans ces travaux sont le modèle *single point charge* (SPC)[118] et le modèle *transferable intermolecular potential 3 points* (TIP3P)[119] qui représentent la molécule comme trois sites rigides portants chacun une charge partielle. Ce dernier est applicable de préférence avec le champ de forces AMBER.

II.5 Système infini: les conditions périodiques aux limites

In vivo, les réactions s'effectuent dans un milieu infini et en pratique, elles se réalisent dans un milieu limité (ex: ballon) où les bords n'auront pas d'impact sur le processus. Cela n'est pas le cas en DM qui induirait un arrêt du traitement des interactions lorsque les atomes se retrouvent à la limite de la boîte qui présente un vide de l'autre côté. Il y aurait une perturbation du comportement des molécules et donc de la simulation. Afin de réduire les effets de bord et avoir un système infini qui mime la réalité, les conditions périodiques aux limites (PBC) sont utilisées. Cela revient à répliquer la boîte de simulation dans les trois directions de l'espace xyz, ainsi tout atome qui sort d'un côté est réintroduit en même temps, avec le même jeu de vélocité et de forces, du côté opposé (**Figure 25**). Les interactions non-liantes s'effectuant entre deux particules, seules les images périodiques les plus proches de chaque particule seront prises en compte pour les calculs énergétiques. De plus, pour éviter qu'une particule n'interagisse avec son image, la plus petite distance entre le soluté et le bord de boîte doit être au moins deux fois supérieur à la limite de troncature (*cf sous-partie **II.2***).

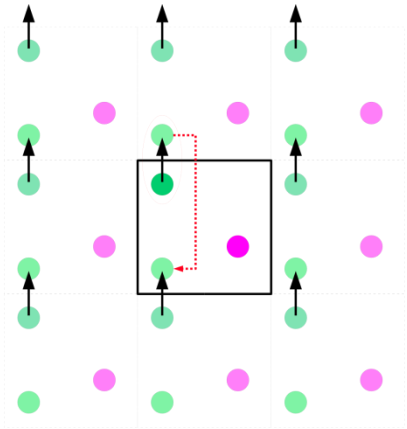


Figure 25 Illustration 2D des conditions périodiques aux limites. La boîte principale est représentée en noir et les particules constituants le système en vert foncé et magenta. La flèche noire indique le mouvement de la particule qui quitte la boîte *vers le haut* pour rentrer *vers le bas*. La flèche discontinue rouge indique l'image périodique de la particule qui est sortie de la boîte.

Malgré toutes ces étapes accomplies (choix du champ de forces, boîte de simulation, solvatation, etc), la dynamique ne peut pas encore être lancée. Tout d'abord, il faut minimiser l'énergie et équilibrer le système.

II.6 Minimisation et équilibration du système

Les larges systèmes dépendent de plusieurs variables et paramètres, ainsi les forces initiales peuvent être trop importantes, ce qui amènerait à des erreurs de calculs et donc une trajectoire anormale. Afin d'éviter cela, il faut partir d'un système stable.

II.6.1 Génération d'un système stable

La première étape pour avoir un système moléculaire stable, soit obtenir *une* configuration de basse énergie, est de procéder à une minimisation de l'énergie. Le principe est de rechercher le minimum *local* le plus proche de l'état initial. Le minimum *global* qui correspond à *l'état* énergétiquement le plus bas ne sera jamais atteint car il n'est pas possible de franchir des barrières énergétiques et donc de balayer tout l'espace conformationnel (**Figure 26a**). On notera qu'à chaque réarrangement des particules, correction des valeurs d'angles, de liaisons et donc des gênes stériques, une configuration est attribuée. De plus, l'état stable déterminé lors de cette phase dépend de la conformation initiale du système.
Les méthodes de minimisation les plus couramment utilisées sont celles dites de gradient qui font appel à l'énergie potentielle et sa dérivée première.

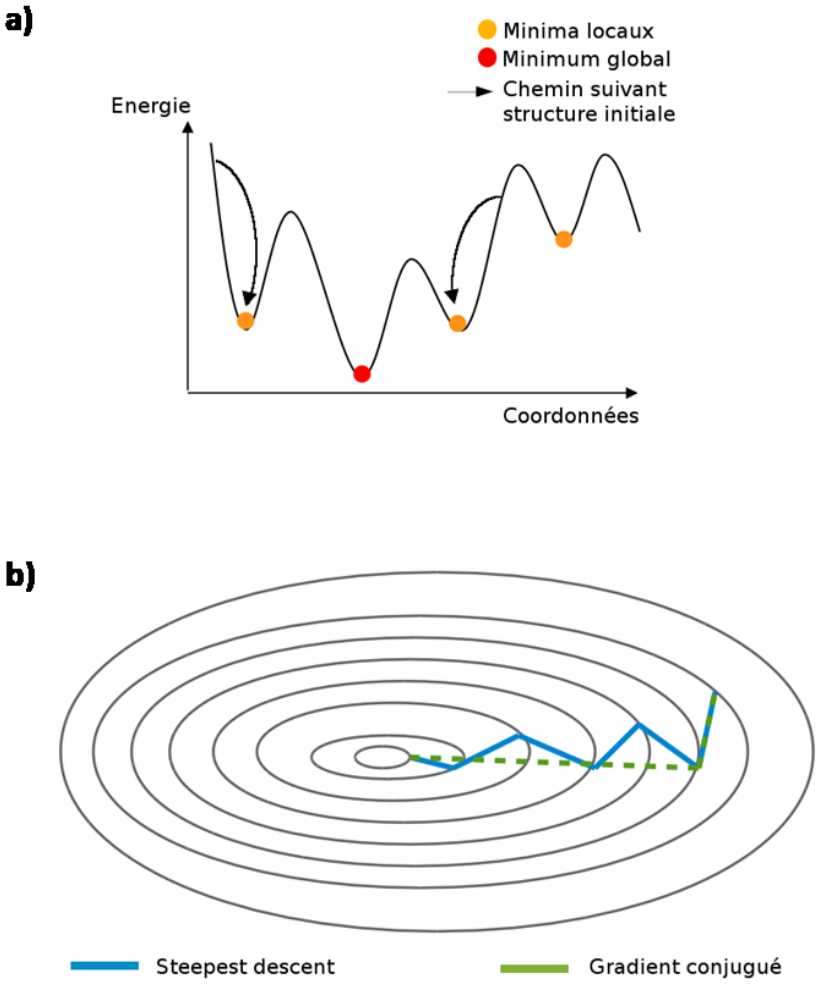


Figure 26 Principe de la minimisation. **a)** Diagramme énergétique présentant les minima locaux et le minimum global d'un système et **b)** les deux méthodes de minimisation.

La première approche fait appel à l'algorithme *steepest descent* (SD, *plus grande pente* en français) qui est une méthode de minimisation qui utilise uniquement la pente de la surface (**Figure 26b**). L'avantage de cette démarche est qu'elle est applicable pour des structures initiales car elle permet de diminuer les caractéristiques d'énergies les plus hautes, ainsi il est possible de descendre rapidement vers un minimum local. Elle est donc conseillée pour une première minimisation afin de rectifier les contacts stériques entre particules. Cependant, il y a une perte d'informations des étapes précédentes et elle converge lentement aux faibles valeurs de gradient sans jamais atteindre le minimum : elle aura plutôt tendance à osciller autour.

La seconde méthode dite des gradients conjugués (GC) suit le même principe mais prend en compte les données générées par les itérations précédentes pour calculer plus finement les nouvelles conditions (**Figure 26b**) : un processus d'optimisation a donc lieu. De plus, la

convergence est plus rapide, mais elle ne conviendrait pas à un premier usage car l'espace conformationnel n'aurait pas été complètement exploré, puis elle est instable lorsque la structure initiale est loin du point minimum. Elle demande également un temps de calcul plus important que la SD. Par conséquent, cette approche peut être utilisée pour compléter la minimisation.

II.6.2 Contrôle de la température et de la pression

L'étape suivante est appelée "équilibration" et permet de stabiliser certains paramètres de thermodynamique autour d'une valeur consignée. Ainsi, ils seront indépendants de tous changements tels que l'évolution du volume de la boîte.

Par défaut, la dynamique est réalisée dans un ensemble **NVE** (microcanonique) où le nombre de particules (N) et le volume (V) sont constants et l'énergie totale du système (E) conservée lors de l'intégration des équations de Newton. Suivant l'objet de l'étude, il sera amené de travailler à température (T) constante, et non en conservant E, ou bien à température et pression (P) fixes en permettant au volume de varier : on parlera d'ensembles **NVT** (canonique) et **NPT** (isobare-isotherme) respectivement. Néanmoins, un contrôle de la température, qui est donnée par l'équation de Boltzmann en fonction de l'énergie cinétique (E_c) des particules, est souvent requis.

Plusieurs méthodes ont été développées pour effectuer ce contrôle de température et de pression. Dans le premier cas, un thermostat comme celui de Berendsen, implémenté dans GROMACS, peut être employé pour maintenir la température : une relaxation de T vers $T_{\text{référence}}$ a lieu sans tenir compte de la distribution de E_c.[120] Cela peut donc induire des erreurs pour de larges systèmes ainsi, il est préférable de réaliser les simulations avec l'algorithme *V-rescale* qui renormalise les vitesses et comprend un terme qui prend en compte cette distribution énergétique.[121] Le thermostat de Berendsen est pour autant très efficace pour les systèmes hors équilibre car il permet la fluctuation de température jusqu'à atteindre la valeur inscrite : T n'est pas fixe.

Il est possible de travailler à pression constante si le système est couplé au bain de pression de Parrinello-Rahman.[122] Pendant l'équilibration, il est recommandé d'utiliser le barostat de Berendsen dû à ses propriétés intéressantes en terme de relaxation de système : il traduit bien les données thermodynamiques et il est donc plus lent.[123]

L'application de la DM au niveau atomique reste difficile pour un grand nombre d'études de phénomènes biologiques qui se produisent sur une échelle de temps trop importante due à leur taille et/ou leur complexité. En effet, il faudra un temps de calcul considérable afin d'explorer une grande partie de l'espace énergétique et ainsi observer le phénomène qui nous intéresse. Dans l'intention de balayer cet espace énergétique, il conviendrait d'avoir une puissance de calcul importante ou bien, de diminuer le nombre de degré de liberté des molécules et passer à une description moléculaire simplifiée. Cela a conduit à l'élaboration de modèles appelés "gros grains" (GG) (**Figure 27**) et plusieurs champs de forces ont été développés en se basant sur cette représentation.[108]

III. L'approche MARTINI pour l'étude de systèmes biologiques

Les premières représentations GG ont été publiées dans les années 70 et sont élaborées en gardant un lien étroit avec les modèles atomistiques et chaque description suit une philosophie différente. Pour notre étude, nous avons employé le champ de forces MARTINI qui est le plus utilisé pour l'analyse de systèmes lipidiques[124,125] et de protéines[126,127] et qui a été développé pour GROMACS.

III.1 Champ de forces gros grains MARTINI : principe

Ce champ de forces est basé sur la reproduction des propriétés thermodynamiques telles que les énergies libres de partitionnement entre la phase polaire et apolaire d'un grand nombre de composés chimiques, les énergies libres d'hydratation et de vaporisation, afin de sélectionner les paramètres d'interactions appropriés. Cependant, comme en DMTA/UA, il existe un grand nombre de champs de forces gros grains qui sont bien commentés dans la revue de Kmiecik *et al*. publiée en 2016.[108]

Le modèle MARTINI suit une construction "quatre pour un", cela signifie qu'environ quatre atomes lourds sont considérés comme un seul centre d'interaction et constituent un grain. On peut également parler de super-atome. Ainsi, le grain "eau" comporte quatre molécules d'eau (**Figure 27A**). Une exception est accordée pour modéliser les cycles : un découpage "deux pour un" ou "trois pour un" est adopté afin de garder une bonne résolution et ces super-atomes sont désignés par la lettre *S* (**Figure 27C**). Les ions sont pris individuellement, c'est-à-dire qu'un grain regroupe un ion avec sa couche d'hydratation. Lors de la première optimisation de ce champ de forces (version 2.0), des particules "anti-gel" dénommées BP4 ont été implémentées et elles sont souvent utilisées pour empêcher la solidification non-souhaitée de l'eau dans des dynamiques réalisées à des températures inférieures à 290 K. En 2010, le modèle d'eau polarisée a été envisagé pour avoir une meilleure description des interactions entre composés polaires et/ou chargés et il n'est employé que dans des cas spécifiques où ces interactions jouent un rôle important.[128]

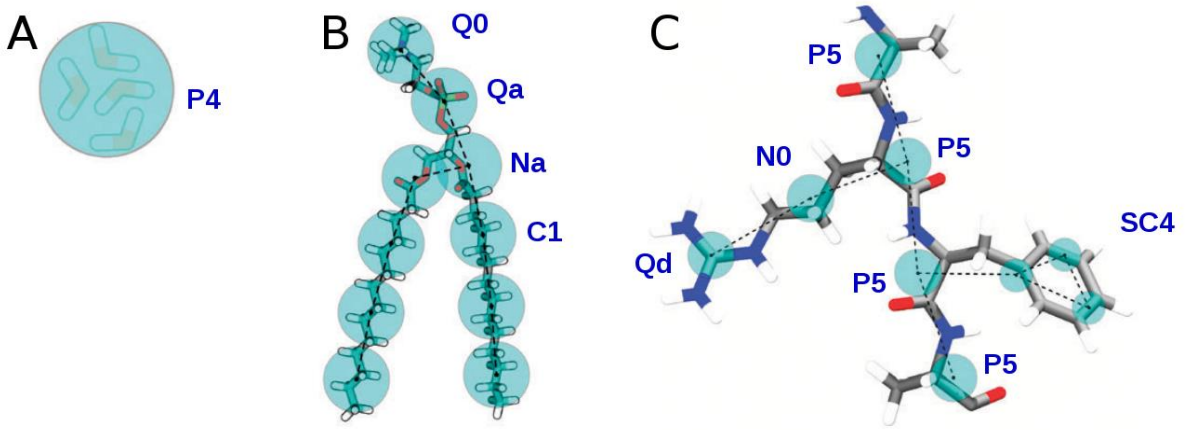


Figure 27 Exemples de cartographies (en cyan, les grains et le type de grain est inscrit en bleu). **A**) Particule représentant l'eau constituée de quatres molécules, **B**) Lipide DPPC et **C**) Peptide (AlaArgPheAla) [*basée sur la figure 1 de la revue de Marrink and Tielman*[129]].

Cette représentation MARTINI ne vise pas à reproduire exactement des détails structuraux d'un état particulier pour un système distinct, mais elle a pour objectif un grand nombre d'applications sans recourir à une re-paramétrisation du modèle à chaque fois. Pour cela, un calibrage approfondi de *building blocks* chimiques a été réalisé par rapport aux données thermodynamiques et notamment les coefficients de partage huile/eau.[126]

Notons que l'utilisation de la dynamique moléculaire gros grains (DMGG) ne permet pas de se focaliser sur des phénomènes locaux de l'objet d'étude, soit considérer les interactions interatomiques, mais elle s'intéresse aux comportements mésoscopiques qui résultent d'interactions prépondérantes (ex: interaction lipides-protéine, auto-assemblage lipidique). En effet, travailler à une telle échelle revient à réduire le nombre de particules et donc le degré de liberté du système, ce qui implique un changement dans le diagramme énergétique qui devient plus lisse (**Figure 28**). Il sera parcouru plus facilement et plus rapidement : on a une réduction du temps de simulation de l'ordre de 4. Par conséquent, il est possible de lancer des dynamiques de quelques millisecondes de systèmes de l'ordre du micromètre sur une courte durée suivant les ressources de calcul. Les liaisons entre les grains étant généralement moins rigides que celles reliant les atomes, l'intervalle de temps pour l'intégration de l'équation du mouvement varie également, il peut prendre des valeurs comprises entre 10 et 100 fs.

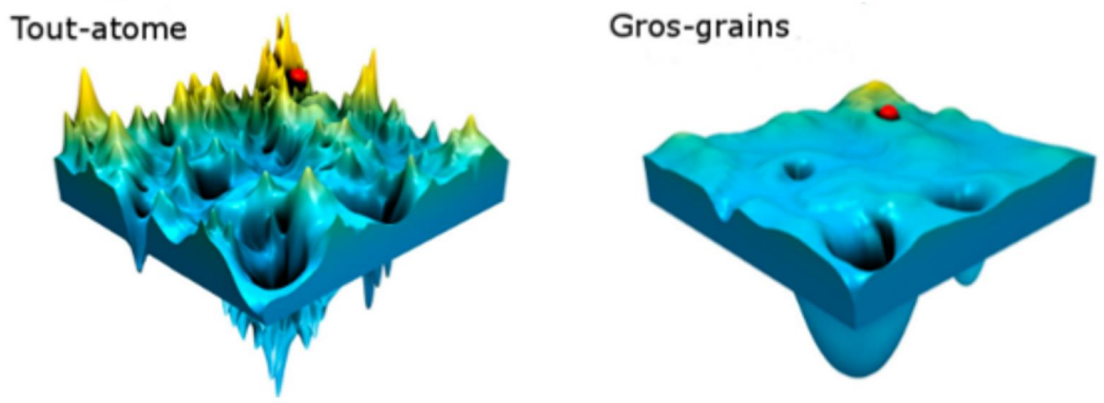


Figure 28 Diagramme énergétique 3D tout-atome VS gros grains. Un aplanissement est appliqué en gros grains, ce qui permet une exploration plus efficace de l'espace énergétique afin d'atteindre un minimum *global* [*adaptée de la figure 3 de la revue de Kmiecik et al*[108]].

III.2 Paramétrage des super-atomes

Un grain comportant plusieurs atomes lourds, on a une perte d'informations sur la nature chimique des espèces et la directionnalité des liaisons. Ce dernier attribut signifie qu'il n'est pas possible de simuler les liaisons hydrogène (ou liaisons H) en DMGG. Afin de reproduire les interactions entre les super-atomes et donc la conduite des composés, chaque grain de masse égale à 72 uma (correspondant à quatre molécules d'eau) se voit assigner un type. Le champ de forces MARTINI propose quatre principaux types de grain : polaire (**P**), non-polaire (**N**), apolaire (**C**) et chargé (**Q**), qui peuvent être divisés en sous-types indiquant le degré de polarité (1 = faible polarité à 5 = polarité élevée) et la capacité donneur-accepteur de liaisons H pour P et N (d, a, 0, da) (**Figure 27**). Cela permet un réglage plus fin des interactions sur la base de la nature des atomes et de conserver la spécificité chimique des molécules.

III.2.1 Interactions non-liantes

Toutes les particules interagissent *via* des forces de types VdW à l'exception des voisins *proches* (contact suivant un potentiel harmonique de liaison), voisins *suivants* (application

d'un potentiel harmonique d'angle) et les groupes *chargés* (interaction électrostatique). Comme en DMTA, cette "liaison" est exprimée par le potentiel de LJ (**Equation 7**) qui fait intervenir la force de l'interaction ε_{ij} et la distance effective minimale entre deux grains σ_{ij}. ε_{ij} est déterminée par une valeur qui définit un niveau d'interaction allant de 0 à IX soit dix au total (**Tableau 4**) et qui sont présentés sous forme d'une matrice.[124] Cette constante équivaut à 75% de la valeur standard pour les particules cycliques.

$$V_{LJ} = 4\epsilon_{ij}\left[\left({\sigma_{ij}}/{r}\right)^{12} - \left({\sigma_{ij}}/{r}\right)^{6}\right] \qquad \textbf{Equation 7}$$

où r = distance entre les deux particules considérées

Niveau	Valeur (kJ/mol)	Interaction
0	5,6	la plus polaire
I	5,0	forte interaction polaire en milieu aqueux
II / III	4,5 / 4,0	modéliser liquides volatiles
IV	3,5	non-polaire (chaînes aliphatiques)
V - VIII	3,1 / 2,7 / 2,3 / 2,0	mimer divers degrés de répulsions hydrophobes
IX	2,0	entre particules chargées et milieu très apolaire

Tableau 4 Niveaux d'interaction décrivant la force des interactions non-liantes.

La distance σ_{ij} peut prendre trois valeurs suivant le type de grains mis en jeu. Elle est communément de 0,47 nm mais vaut 0,43 nm pour l'ensemble *S* afin de maintenir la géométrie des cycles et donc leur comportement. Elle est fixée à 0,62 nm pour les couples Q - C1/C2 (particules chargées - très apolaires) en vue d'avoir une meilleure conservation des couches d'hydratation des super-atomes chargés en milieu apolaire. Les interactions électrostatiques sont, quant à elles, traitées par une fonction d'énergie potentielle Coulombienne avec une constante diélectrique relative ε_r de 15 (2,5 avec modèle d'eau polarisé), qui a été déterminée comme la valeur qui conduit à un bon équilibrage de la force d'hydratation accrue de plusieurs grains. Ce potentiel est uniquement appliqué aux groupes

porteurs d'une vraie charge. Ceux possédant une petite charge partielle interagissent *via* une "liaison" type LJ et les ions disposent d'une charge réduite pour prendre en compte les effets d'hydratation implicite. Ces interactions non-liantes dépendent de la distance, ainsi un *shift* de l'énergie potentielle a lieu au-delà d'une valeur pour être nulle une fois la limite (r_{cutoff} = 1,1 nm) dépassée.

III.2.2 Interactions liantes

Un potentiel harmonique permet de contrôler chaque interaction liante (élongation, déformation, torsion) et les paramètres impliqués ont été mesurés en s'appuyant sur des données structurales qui dérivent de la géométrie atomistique, ou à partir d'un processus itératif. Cette dernière démarche permettait d'ajuster systématiquement les valeurs des paramètres GG jusqu'à obtenir un bon recouvrement avec la fonction de distribution résultant de simulations TA de groupes d'atomes correspondants.

Ainsi, la liaison entre sites connectés est caractérisée par une distance d'équilibre de 0,47 nm et une constante de force de 1250 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$. Ces valeurs ne sont pas un prérequis, il est possible de les changer pour traduire au mieux la structure chimique sous-jacente. La rigidité des chaînes est représentée par l'utilisation d'un potentiel harmonique du cosinus (**Equation 8**) pour les angles θ_o qui peuvent être égaux à 120° (double liaison *cis*) ou 180° (aliphatique et double liaison *trans*) à l'équilibre. La constante de force K associée est de 25 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$ pour les chaînes aliphatiques et vaut 45 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$ pour les doubles liaisons. De même, ces données sont modifiables suivant la molécule considérée.

$$V_\theta = {}^{K}/_{2}\,(\cos\theta - \cos\theta_0)^2 \qquad \textbf{Equation 8}$$

Les particules cycliques sont des cas particuliers. Les liaisons et les angles peuvent être remplacés par un ensemble de contraintes pour maintenir la rigidité des cycles et éviter les hautes fréquences d'oscillations résultants de grandes constantes de forces. De plus, les interactions intermoléculaires de types LJ sont exclues dans les systèmes cycliques, et un potentiel d'angle dièdre *impropre* est applicable pour des géométries plus complexes afin d'empêcher des distorsions hors plan.

III.3 Extension aux protéines

Principalement développé pour les lipides, le champ de forces MARTINI a rapidement été adapté aux protéines.[126] Le modèle GG protéique a été défini en adoptant la même philosophie que pour les lipides : les paramètres d'interactions ont été sélectionnés en se basant sur les énergies de partitionnement des chaînes latérales des acides aminés entre l'eau et l'huile. Cependant, cette version 2.1 présentait plusieurs défauts comme le caractère trop hydrophobe de la phénylalanine (Phe), la proline (Pro) et du tryptophane (Trp), l'instabilité de dimères formés par des résidus polaires en milieu apolaire, ainsi que la polarité de certains acides aminés. Des améliorations ont donc été effectuées et le nouveau jeu de paramètres est inscrit dans MARTINI version 2.2.[127] On notera qu'une nouvelle version (3.0) est disponible depuis juillet 2018 avec de nouvelles corrections[130], cependant ayant utilisée la version 2.2, ce qui suit traitera uniquement de cette dernière.

III.3.1 Modèle gros grains d'acides aminés

La cartographie des résidus suit également un découpage en *building blocks* chimiques (**Figure 29**) dénotés BB et SC où le grain BB correspond au squelette (N-C_α-CO) et l'ensemble SC définit la chaîne latérale. Cependant, les types et sous-types de particules et la matrice des interactions non-liantes restent identiques à ceux des lipides, ce qui rend compatible le champ de forces protéique avec celui pour les lipides. Les paramètres liants ont été déterminés en se basant sur les distributions des longueurs de liaisons, d'angles et d'angles dièdres calculées à partir de la PDB. Ces interactions non-liantes et liantes sont traitées par un jeu de fonctions d'énergie potentielle.

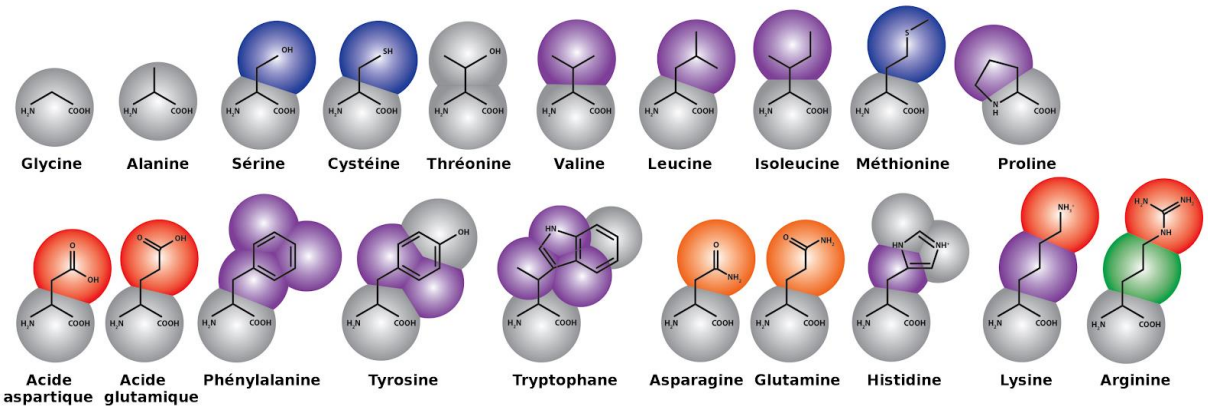


Figure 29 Cartographie des acides aminés. La structure atomique est représentée en noire et le modèle gros grains en couleur (gris et orange = polaire, bleu et vert = non-polaire, violet = apolaire et rouge = chargé) (*reprise et adaptée de la figure 3 de l'article de Bradley and Radhakrishnan*[131]).

Malgré le caractère donneur-accepteur de liaisons H des super-atomes, la simplicité du modèle conduit à une perte de directionnalité, de fait, les liaisons H ne peuvent pas être simulées au sein d'une hélice ou d'un feuillet dont la stabilité est régie par ces interactions. Cela signifie que le type de la particule BB est variable en fonction de la structure secondaire adoptée par le peptide : on aura un type P5 si l'acide aminé est libre ou s'il fait partie d'un coude ou d'une boucle, un type N pour une hélice et un feuillet. Cette réduction de polarité est due aux liaisons H en TA. Un potentiel d'angle dièdre entre grains du squelette est également appliqué pour imposer une structure secondaire.

III.3.2 Jeu de paramètres MARTINI 2.2

L'alanine et la glycine sont des cas particuliers car étant de petits résidus, ils sont modélisés comme un seul site d'interaction BB pouvant être de type P ou N suivant la structure dans laquelle ils participent.

Parmi les acides aminés hydrophobes, Phe, Pro et Trp ont été reconfigurés dû à leur trop grande hydrophobicité (version 2.1). Un réassignement des types de grains a été effectué et les nouveaux paramètres ont été testés par rapport au partitionnement à travers une membrane, l'interaction peptide-membrane et l'énergie libre de dimérisation dans des solvants de différentes polarités. Ainsi, la chaîne latérale de Phe se voit attribuer un type plus polaire, ce qui induit une amélioration des énergies libres de dimérisation en milieu aqueux et

de liaison. La polarité de la proline est augmentée : le grain BB peut être de type P lorsque le résidu est seul ou inséré dans un segment non-structuré, et la chaîne latérale n'est plus considérée comme une particule cyclique *S* mais comme une chaîne aliphatique apolaire (propane) de type C. L'acide aminé Trp a subi un changement du type des grains représentant la chaîne latérale qui sont plus polaires. Le caractère donneur de liaisons H a aussi été défini. Ce reparamétrage conduit à un meilleur profil de partitionnement le long de la normale de la membrane et de l'énergie libre de dimérisation en milieu aqueux.

Un autre défaut de la version 2.1 était la non-reproductibilité des interactions charge-charge en raison d'un modèle d'eau qui ne possédait pas de charge partielle. Afin de remédier à cela, la première solution est d'employer un modèle polarisé de l'eau mais cette démarche a une limitation, celle de l'approche de particules chargées due à la taille importante des grains d'eau (diamètre = 0.26 nm). De fait, le recours à une représentation GG alternative a été envisagé pour les chaînes latérales des résidus chargés. Ce nouveau modèle présente le super-atome chargé comme un ensemble de deux sites d'interaction distincts reliés par une liaison de longueur fixée à 0.11 nm. On a ainsi un décentrage de la charge car le site qui décrit l'interaction coulombienne est situé en périphérie (**Figure 30**) : cela permet d'avoir des interactions plus fortes puisque la distance qui sépare deux grains est réduite. L'autre particule, centrée, portera donc l'interaction de VdW mais cette nouvelle définition n'influence pas le comportement des résidus.

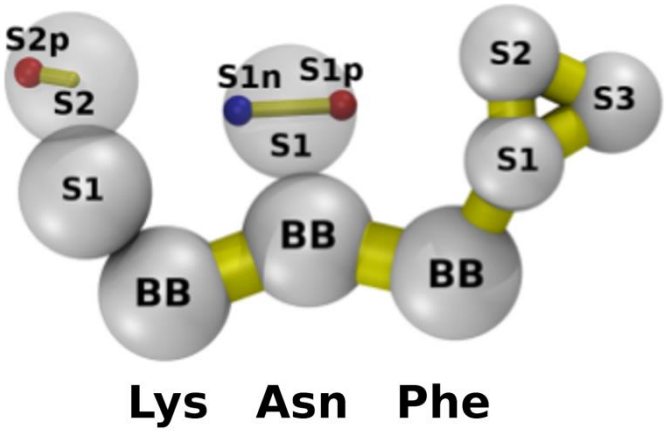


Figure 30 Nouvelle topologie de résidus chargés et polaires (les particules BB caractérisent le squelette du peptide et les grains SX la chaîne latérale). La lysine (Lys) chargée possède ainsi un grain comportant deux sites (S2 spécifiant l'interaction de VdW et S2p qui porte uniquement la charge positive). La chaîne latérale de l'asparagine (Asn), résidu polaire, est représentée par un grain S1 dont le centre définit le site virtuel et le milieu des deux autres, S1n et S1p de charges partielles négative et positive respectivement. Ce site virtuel intervient dans l'interaction non-liante de VdW. Les grains S1-3 dans Phe constituent le cycle aromatique de cette dernière (*reprise de la figure 3 de Jong et al.*[127]).

L'innovation de cette version 2.2 repose sur le fait que deux nouvelles topologies GG ont été déterminées pour l'histidine (His). La forme neutre ayant été élaborée dans la version précédente, Jong *et al*. ont conçu deux modèles pour la chaîne latérale de la forme ionique. Le premier modèle compte un grain de type SQd de charge +1e et dans le second, il possède une charge décentrée mais ces deux résidus présentent un comportement similaire.

Le problème d'absence de charges *e* au sein des acides aminés polaires, qui ne permet pas de reproduire exactement leur comportement, a été réglé en introduisant un dipôle à la particule polaire. De cette façon, on définit un grain comme le regroupement de trois sites dont un virtuel qui correspond au centre des deux autres. Il est le site d'interaction de VdW alors que les deux autres particules sont porteuses de charges partielles égales et de signe opposé (**Figure 30**). Ces dernières sont séparées de 0.28 nm et interviennent dans les interactions non-liantes *via* le potentiel Coulombien uniquement. On notera que ces deux sites n'interagissent pas entre eux : on a ainsi un moment dipolaire fixe qui contribue à la polarisation d'orientation et qui induit une diminution de l'interaction de type LJ de ces résidus polaires.
La validation des paramètres a été faite par les études d'énergies libres de partitionnement (huile/eau et de dimérisation) et du comportement de partitionnement à travers une membrane.

Néanmoins, l'emploi de ces nouvelles particules GG polarisées et chargées dépendra de l'importance des résidus polaires et chargés au sein du système étudié.

III.3.3 Configuration tridimensionnelle

Comme décrit dans le **Chapitre I**, les protéines sont majoritairement constituées d'hélices α reliées entre elles par un segment souvent non structuré. Il est indispensable de connaître la structure secondaire car l'hélicité est imposée par les angles dièdres (BB-BB-BB-BB) dans le champ de forces MARTINI. Il est donc fondamental d'avoir une distance convenable entre les grains BB impliqués dans une hélice pour être le plus cohérent possible avec les autres paramètres (angles, dièdres). Cette dernière a été déterminée à 0,31 nm et elle est maintenue

avec une contrainte, ce qui signifie qu'il n'est plus question de liaisons harmoniques flexibles. Ainsi, on a une meilleure représentation de la longueur des hélices.

Ce critère de flexibilité va de pair avec l'importance des interactions non-liantes : une augmentation de la flexibilité des liaisons induit une augmentation des interactions. Par conséquent, le problème rencontré était un effondrement possible du squelette des parties non organisées (ex: boucle) à cause d'un clash énergétique (LJ > liaison). Les peptides composés de résidus volumineux n'étaient pas vraiment concernés car la présence des chaînes latérales empêche le rapprochement des BB, cependant le résultat était différent lorsqu'un segment peptidique présentait au moins deux petits acides aminés (alanine, glycine) consécutifs. La solution qui a donc été mise en place fut de faire croître progressivement la constante de force de liaison dans les configurations de types boucle et coude (200 - 1250 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$), et de diminuer la constante de force angulaire à 20 $kJ.mol^{-1}$ afin de compenser cet accroissement de la rigidité. Ces données ne sont pas généralisées, elles sont applicables exclusivement à de courts peptides déstructurés au sein d'une protéine.

Notons que ce nouveau jeu de paramètres prohibe toutes études de repliements - déploiements structuraux. Toutefois, il peut être intéressant d'observer ce processus et pour se faire, un degré de déformation du squelette doit être permis. Cela est faisable en utilisant un "réseau élastique" (**Figure 31**).[132]

III.3.4 Réseau élastique ElNeDyn

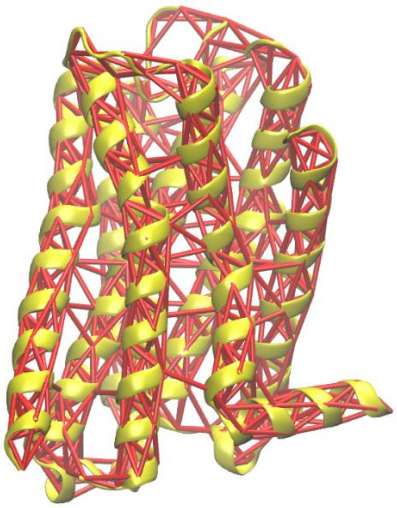


Figure 31 Représentation du réseau élastique pour RD2. Le squelette carboné de la protéine est schématisé en cartoon jaune et les liaisons élastiques en rouge.

Dans ce projet, nous avons eu recours au champ de forces ElNeDyn[132] très utilisé pour l'étude de systèmes protéiques grâce à une bonne reproduction des propriétés structurales et dynamiques d'une protéine. Il associe le champ de forces MARTINI avec un réseau élastique mais contrairement à ce dernier, le jeu de liaisons relie les super-atomes dont la position correspond à celle du C_α des résidus: il n'est plus question de grain représentant le squelette. Ces forces additionnelles permettent de maintenir la structure secondaire voire tertiaire comme l'expose la **Figure 31** avec des liaisons entre les hélices.
La paramétrisation de ElNeDyn est telle qu'une même distance limite (R_c = 0,9 nm) et une même constante de force (initialement à 500 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$) sont appliquées aux acides aminés constituant la biomolécule. La valeur de R_c indique que deux résidus sont connectés par une liaison élastique si la distance qui les sépare est inférieure ou égale à R_c. Cependant, ces données peuvent être modifiées.[90] Il est à noter qu'une contrainte est imposée entre deux particules BB adjacentes quelle que soit la structuration peptidique. De même que les autres champs de forces, les interactions liantes et non-liantes définissent l'évolution du système et comme énoncé au début, les grains reliés (voisins proches) n'interagissent pas *via* des interactions non-liantes. Ainsi, lorsque la protéine fluctue cela correspond à des changements conformationnels.

Bien que nous ayons abordé le champ de forces MARTINI pour les lipides et les protéines, il faut retenir que la gamme d'applications de ce dernier est grande avec des extensions à de grandes familles de composés.[133,134] De plus, ce champ de forces a été implémenté dans d'autres logiciels tels que NAMD et GROMOS du fait de la forme générale de la fonction d'énergie potentielle.

IV. Protocole des dynamiques moléculaires

Durant cette thèse, la majorité des dynamiques ont été effectuées en gros grains. Cependant, une simulation en tout-atome/atomes unifiés a été réalisée pour valider le comportement de la protéine.

IV.1 Simulations gros grains

Le projet est axé sur l'impact des AGPIs et plus précisément, le DHA et le DPA (*cf* ***Chapitre I - partie III***), sur les propriétés structurales du RD2. Les systèmes étudiés comprennent une membrane de POPC enrichie en lipides polyinsaturés (LPI) en ratio 95:5 (POPC:LPI) et dans laquelle le RD2 est placé au centre (**Figure 32**). Quatre LPI ont été considérés et sont présentés dans la **Figure 33** : on notera qu'un seul type de LPI est introduit dans la bicouche, ce qui conduit à analyser quatre systèmes. Les simulations ont été réalisées en milieu aqueux avec une concentration en ions NaCl de 0,15 M. Des systèmes présentant du cholestérol (10 %) ont également été construits et étudiés afin d'identifier les sites d'occupation du stérol au sein du RCPG et son influence sur la conformation de ce dernier.

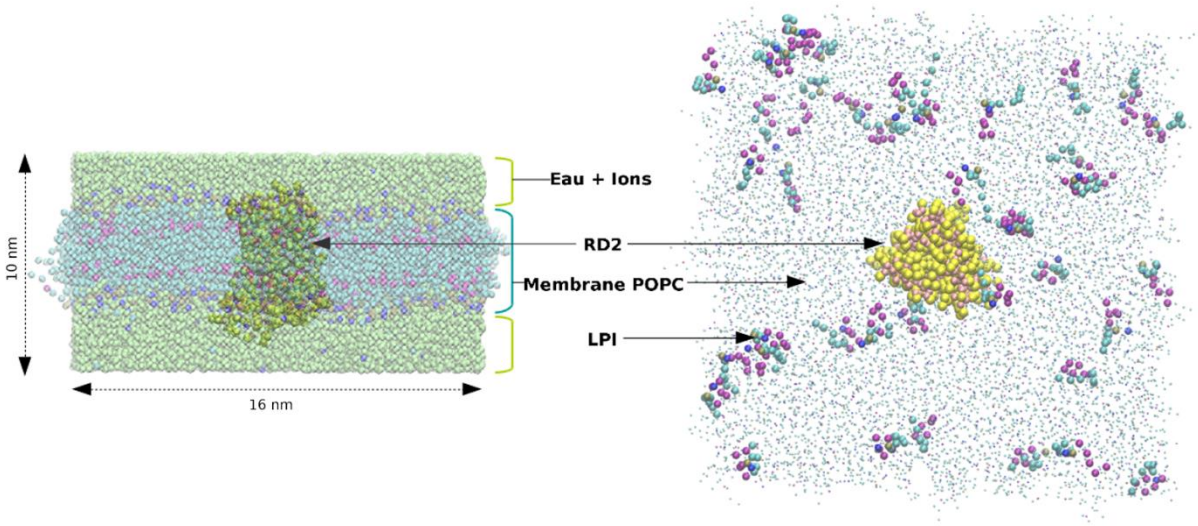


Figure 32 Système initial pour les DMGG. A gauche, la vue de profil et à droite, la vue de dessus (l'eau et les ions ont été masqués pour une meilleure visibilité). Dans le cas des systèmes comportant du cholestérol, ce dernier est également placé aléatoirement dans la bicouche.

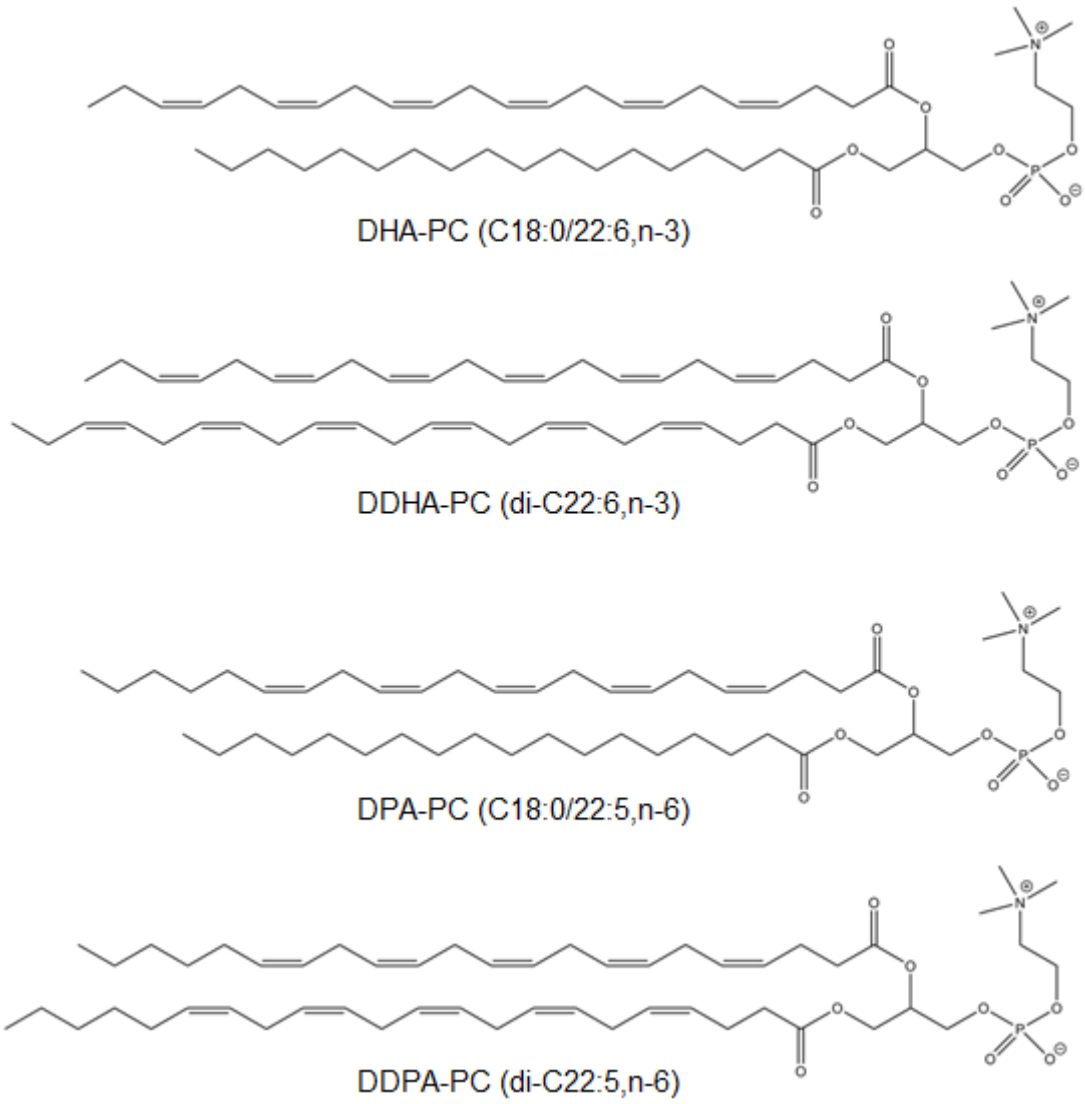


Figure 33 Structure des lipides polyinsaturés (LPI) étudiés : ils possèdent une tête polaire phosphocholine (PC). Les deux premiers LPI font partie de la classe des oméga 3 avec pour chaîne(s) grasses le DHA et les deux derniers comportent du DPA, ce sont des oméga 6.

Au début de la thèse, la structure tridimentionnelle de la protéine n'avait pas encore été déterminée et publiée. Ainsi, il a fallu la construire à partir de celle du RD3 avec lequel elle possède plus de 70% d'identité (**Annexe 3**). De fait, le début du projet a impliqué la structure reconstruite et comme décrit dans l'axe III, les simulations ont été réalisées avec le champ de forces ElNeDyn (constante de force = 190 $kJ.mol^{-1}.nm^{-2}$) qui fait appel au champ de forces MARTINI version 2.2. A partir de mars 2018, la structure cristallographique du RD2 a été employée (PDB : **6cm4**).[38] Cependant, il a fallu apporter quelques modifications à la structure avant de procéder aux dynamiques. En effet, la majorité des résidus ne présentent pas de chaînes latérales complètes, trois résidus ont été mutés pour une meilleure cristallisation et la

boucle intracellulaire 2 (BIC2) est manquante. Cette dernière a été reconstruite avec DiscoveryStudio[135] et suite à cela, les 3 acides aminés mutés ont été remplacés. Un *clean geometry* a été appliqué sur les trois résidus avant d'effectuer une première minimisation avec le même logiciel (champ de force CHARMM, steepest descent, 2000 steps, rms gradient 0.01, constante de force CF = 10). Pour cela, le squelette est contraint et une restriction harmonique est appliquée sur les chaînes latérales à l'exception de celle de I122, L375, L379, M140, L141, Y142 et N143 qui constituent BIC2. Il s'en suit une seconde minimisation en retenant (harmonique) le squelette uniquement.

Le passage du tout-atome au gros grain pour RD2 (**Figure 34A**) se fait à l'aide d'un script accessible sur le site MARTINI (http://cgmartini.nl/). L'eau, les ions et la plupart des lipides sont déjà implémentés dans ce champ de forces et le script *insane.py*[136] permet de générer le système sans avoir eu recours à la création des topologies et fichiers de coordonnées. Seul l'oméga 3 di-substitué (DDHA-PC) a été conçu en se basant sur l'enchaînement et les *building blocks* chimiques du lipide existant DHA-PC (**Figure 34B**).

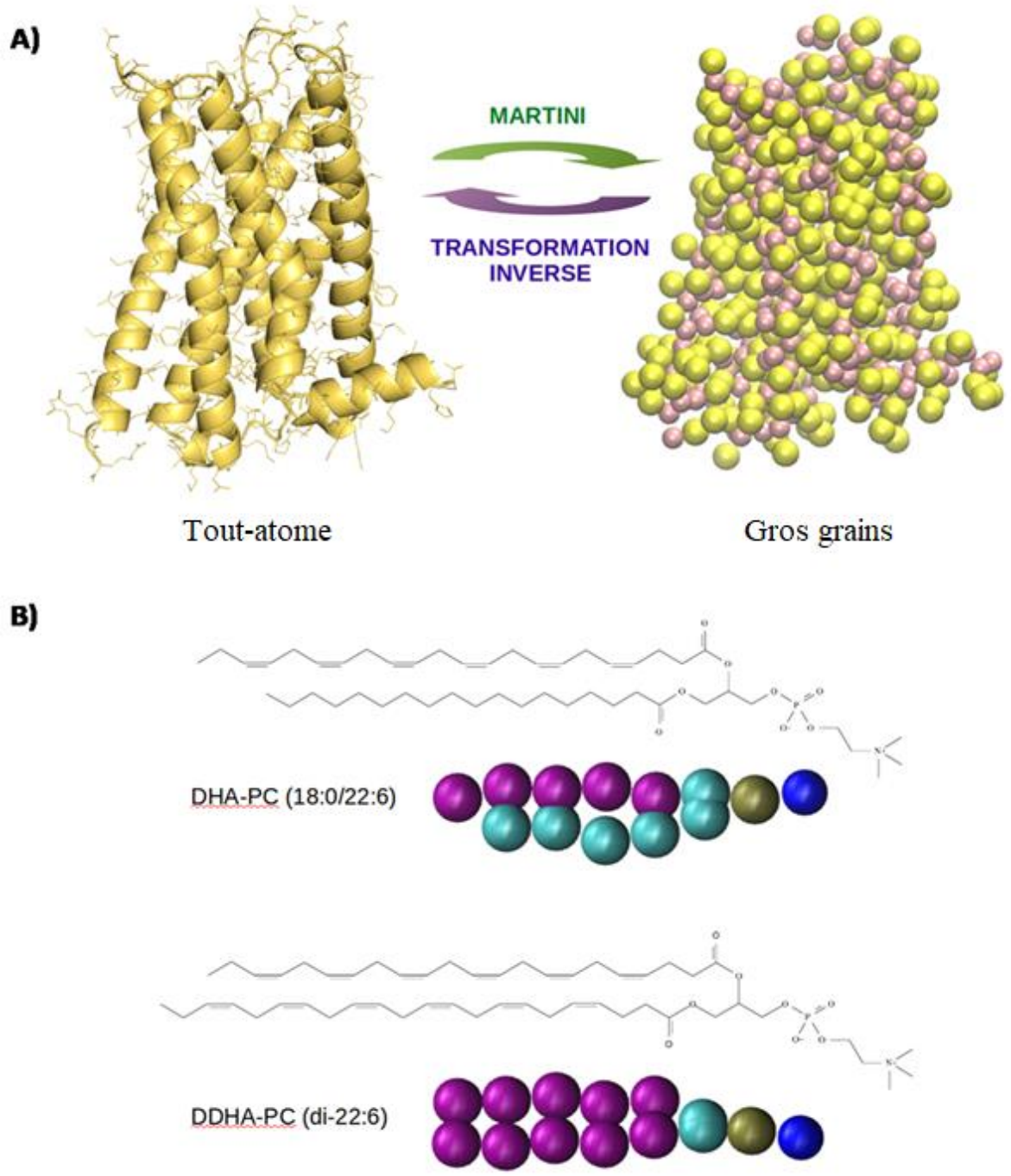


Figure 34 Cartographies des biomolécules. **A)** Modèles du RD2 (gros grain : rose = squelette et jaune = chaînes latérales) et **B)** Représentations des LPI type oméga 3 (bleu = ammonium, kaki = phosphate, cyan = glycérol et liaisons simples et enfin magenta = doubles liaisons).

Après minimisation de l'énergie, les systèmes sont équilibrés dans l'ensemble NPT en milieu semi-isotrope pendant 10 ns en utilisant les algorithmes de Berendsen. Les contraintes sont régies par l'algorithme LINCS et la méthode de Verlet (optimisée pour le calcul en parallèle) est choisie pour la recherche des voisins. Par la suite, les dynamiques sont simulées pour une

durée de 5 µs (Δt = 10 fs) en maintenant la température à 320 K avec le thermostat *V-rescale* et le barostat de Parrinello-Rahman est employé pour conserver la pression à 1 bar avec une constante de temps de 12 ps. L'intensité des interactions électrostatiques diminuent avec la distance mais la méthode de *reaction-field* permet un traitement des interactions longues distances. Cependant, les VdW deviennent nulles lorsque la limite est dépassée (rvdw = 1,1 nm). Travaillant en milieu aqueux, la constante diélectrique ε_r vaut 15.

Quatre répliques ont été lancées pour chacun des quatre systèmes contenant un type de LPI. Néanmoins, deux simulations contrôles ont été réalisées pour comparaison : la première comprend la protéine au centre d'une membrane de POPC et dans la seconde, le POPC est remplacé par le DDHA-PC.

Dans les DMGG présentant 10% de cholestérol, les molécules de LPI et du stérol sont placées aléatoirement dans la boîte (**Tableau 5**). La compétition entre oméga 3 et oméga 6 au sein d'une même membrane a également été étudiée.

Systèmes	POPC + 5% DHA-PC	POPC + 5% DDHA-PC	POPC + 5% DPA-PC	POPC + 5% DDPA-PC
Nombre de POPC et LPI	~ 360 et ~ 40	~ 360 et ~ 40	~ 360 et ~ 40	~ 360 et ~ 40
Nombre de répliques	4	4	4	4
Temps simulation /système	5 µs	5 µs	5 µs	5 µs

Tableau 5 Détails des simulations réalisées en présence de RD2 et LPI.

IV.2 Simulation tout-atome/atomes unifiés

Une seule dynamique a été lancée en utilisant ce modèle dans le but d'observer le comportement du RD2 et comparer le résultat obtenu avec celui de la DMGG. Le système considéré est celui de la première simulation contrôle : une membrane de POPC dans laquelle est insérée au centre la protéine (**Figure 35**).

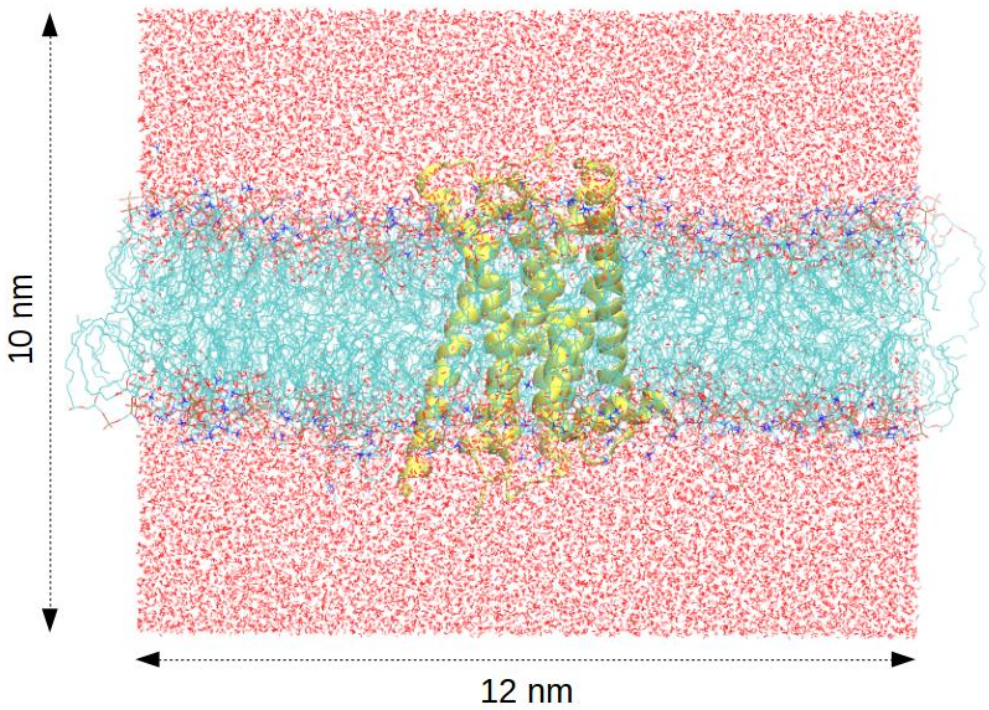


Figure 35 Système initial de la DMTA/UA dite de contrôle. La membrane de POPC affiche les chaînes grasses en cyan, le groupe phosphate en orange et le triméthylammonium en bleu. RD2 est représenté en *cartoon* jaune et les molécules d'eau en rouge/blanc. NaCl peu visible est de couleur violette.

Pour cette étude, le champ de forces GROMOS96 54A7[137] a été choisi car il reproduit bien les enthalpies libres d'hydratation en milieu aqueux et permet de maintenir la structure secondaire des peptides. L'intervalle de temps pour l'intégration de l'équation de Newton a été fixé à 2 fs. A la différence du gros grains, les interactions électrostatiques sont nulles au-delà de 1,2 nm mais celles à longues distances sont traitées par la méthode de PME. Les interactions de VdW sont quant à elles calculées selon l'approche *switch* (r = 1.0 nm et rvdw = 1,2 nm). Travaillant avec GROMOS, le modèle d'eau SPC est celui employé pour solvater le système qui sera ensuite minimisé.

Tout comme en DMGG, durant la production, la température (300 K) et la pression (1 bar) sont contrôlées en utilisant les algorithmes *V-rescale* et de Parrinello-Rahman respectivement. Cependant, une équilibration dans l'ensemble NVT précède celle dans l'ensemble NPT en DMTA/UA. Le temps total de la simulation est de 500 ns.

V. Les outils d'analyses

GROMACS ne met pas uniquement à disposition des outils pour préparer et lancer des simulations de DM. Ce logiciel inclut également un grand nombre de commandes pour les analyses de DMTA et DMGG. La liste ci-dessous présente uniquement celles qui ont été utilisées dans cette étude.

- gmx energy : extraction de la température et de la pression après l'étape d'équilibration. Ainsi, on vérifie si le système est aux conditions indiquées. Comme le nom l'indique, les énergies (coulombiennes, totale, etc) peuvent être générées sous forme de graphes.
- gmx eneconv : concaténation de fichiers au format « edr » qui correspondent aux fichiers qui contiennent les données énergétiques du système.
- gmx trjcat : une fois la production terminée et avant de commencer les analyses, les fichiers trajectoires générés de 20 ns doivent être concaténés dans le but d'avoir la trajectoire totale de la simulation, visible sous VMD (http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/) ou PyMol (https://pymol.org/2/). Ce dernier est très utilisé pour afficher et analyser les structures tridimensionnelles.
- gmx trjconv : une correction des conditions périodiques aux limites s'ensuit pour éviter de se retrouver avec des molécules "cassées". Il est également possible de centrer la protéine dans la boîte.
- gmx make_ndx : création d'un index qui contient tous les composés du système. Il est possible de spécifier des résidus ou groupes de particules selon l'objectif de l'analyse.
- gmx rms : comparaison de deux structures en mesurant la déviation standard des particules (C_α du squelette carboné dans le cas des protéines) par rapport à leur position initiale, soit la "distance" séparant les deux images. Le résultat est donné sous forme d'un graphique qui présente la déviation de la racine quadratique moyenne des positions (abrégée RMSD en anglais) en fonction du temps : on voit ainsi comment se comporte l'objet analysé pendant la dynamique dans un milieu spécifique.
- gmx rmsf : semblable au RMSD mais cette commande permet de calculer la fluctuation des positions atomiques individuellement dans la trajectoire. Un graphique

exposant la fluctuation (RMSF) en fonction des particules est généré : on peut ainsi déterminer les résidus les plus mobiles au sein du composé.

- gmx distance : calcul de la distance entre des paires de particules en fonction du temps. Cette commande fait souvent appel au fichier index.
- gmx rdf : l'information obtenue suite à cette commande est la "probabilité de présence" des particules proches de l'objet de référence suivant la distance qui les sépare.

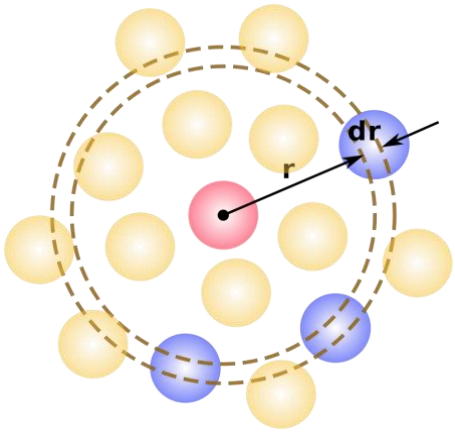


Figure 36 Illustration du calcul de fonctions de distribution radiale (ou RDF en abréviation anglaise). r est la distance qui sépare une paire de particules et dr correspond à un élément de volume dans lequel peut se trouver des particules.

- gmx density : déduction de l'épaisseur de la membrane à partir du calcul de la densité d'un groupement fonctionnel (ex: grain phosphate). La valeur correspond à la différence entre les deux pics distincts du graphe. Il est possible de mesurer cette caractéristique ainsi que l'aire par lipide avec l'outil GridMAT (http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/GridMAT-MD/).
- do-order-gmx5.py : observation numérique de l'organisation des lipides dans la membrane. Les lipides sont parfaitement alignés si le résultat vaut 1 et lorsque ces derniers n'adoptent pas une orientation propre, il donne 0. L'anti-alignement est traduit par une valeur de -0,5.

La plupart des données acquises par les commandes sont visualisables avec le logiciel de traçage 2D Grace (http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/) ou l'outil Gnuplot (http://www.gnuplot.info/).

Dans ce projet, nous sommes amenés à effectuer des analyses structurales et pour cela, il faut revenir à un niveau détaillé dans le cas des DMGG. Wassenaar *et al.*[138] ont ainsi développé une méthode qui permet de passer du gros grains à un modèle atomistique : on parle de transformation inverse (**Figure 34A**). L'outil nécessaire pour cette phase est disponible sur le site du champ de forces MARTINI (dossier "backward-v5") et seul le fichier de topologie tout-atome de la protéine doit être généré. Le fichier de coordonnées gros grains est également

requis en *input*. Deux scripts sont accessibles dans ce dossier : initram-v5.sh et backward.py, ainsi que des cartes qui permettent la reconstruction tout-atome des résidus. Le script en bash fait appel au script python pour recomposer la protéine en se basant sur les cartes qui font la correspondance atomes - grains. Des minimisations de l'énergie et une relaxation du système *via* une série de dynamiques moléculaires automatiques sont ensuite effectuées avec le même script initram-v5.sh afin de produire une structure tout-atome correcte.

Chapitre III Etude du comportement de lipides polyinsaturés

Isabel Alves travaille sur des membranes modèles constituées d'un grand nombre de phospholipides avec zéro ou plusieurs doubles liaisons (DL). Les bicouches peuvent être simples (100% d'un lipide) ou complexes (mélange d'au moins deux lipides différents de par la nature de leurs chaînes grasses). Ces dernières sont majoritairement construites avec du POPC (**Figure 37**).

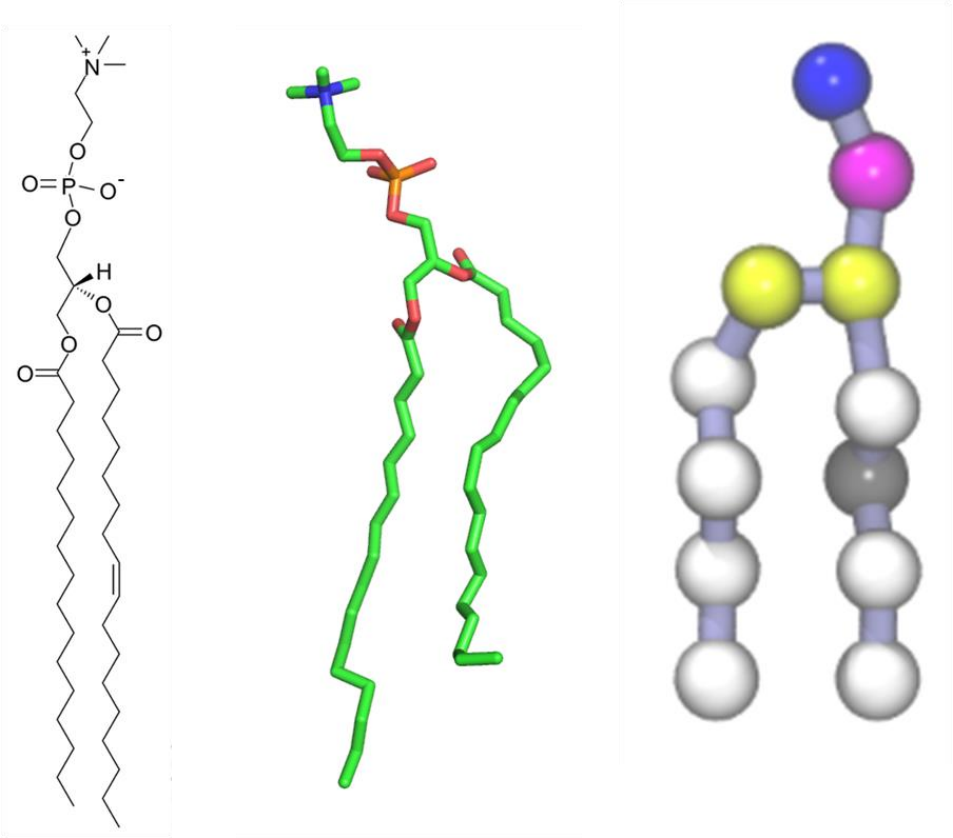


Figure 37 POPC (C16:0/18:1) représenté en tout-atome (exactement en atome-unifié, milieu) et gros-grains (*droite* avec le grain bleu qui représente le groupe ammonium ; le grain magenta, le groupe phosphate ; les grains jaunes correspondent aux groupes carbonyl du glycérol ; les grains blancs regroupent des atomes de carbone liés par une simple liaison et le grain gris défini la double liaison).

Afin d'accompagner ses expériences et apporter une vision atomistique des phénomènes, nous étudions par la DMGG la tendance de quelques phospholipides et précisément de LPI de la famille des oméga 3 et 6. Le système comprend 600 particules d'un LPI placées *aléatoirement* dans une boîte cubique remplie d'eau et d'ions NaCl. Ainsi, nous traiterons des propriétés physiques et notamment la pression sous des conditions isotropiques.

I. Organisation de LPI en milieu aqueux

Le POPC est connu pour former une bicouche[139] mais qu'en est-il des dérivés insaturés ? Aucuns travaux expérimentaux et *in silico* ont été effectués à ce sujet, c'est pourquoi nous avons voulu répondre à cette question. Pour cela, nous avons employé la DMGG.

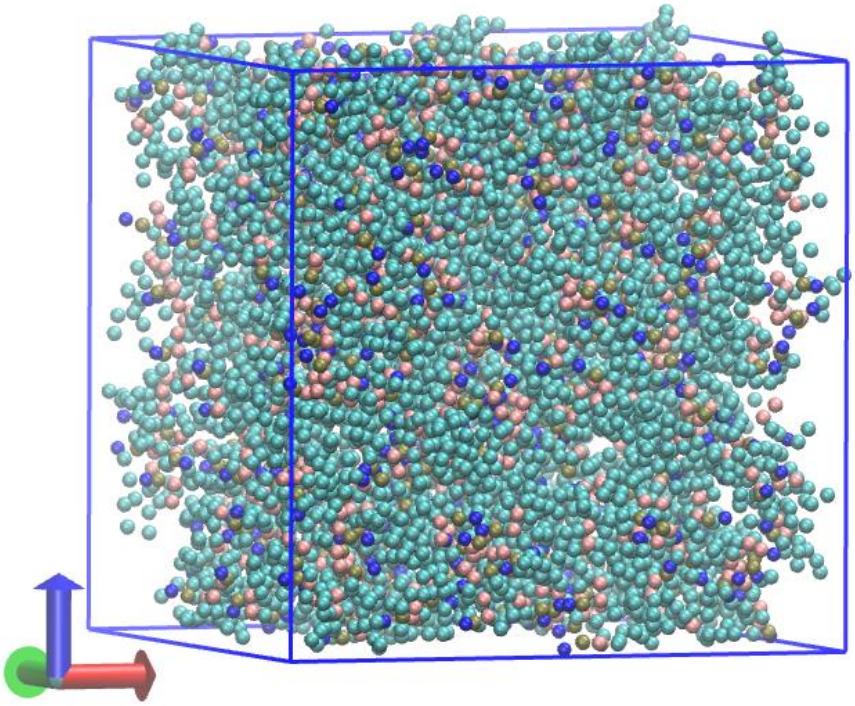


Figure 38 Système initial des DMGG "contrôles" : une boîte cubique qui comprend un type de LPI (DHA-PC ou DDHA-PC ou DPA-PC ou DDPA-PC avec en bleu les grains ammonium, en marron les grains phosphate, en rose les grains glycérol et en cyan les grains formant les chaînes grasses).

I.1 LPI greffés avec l'AGPI DHA

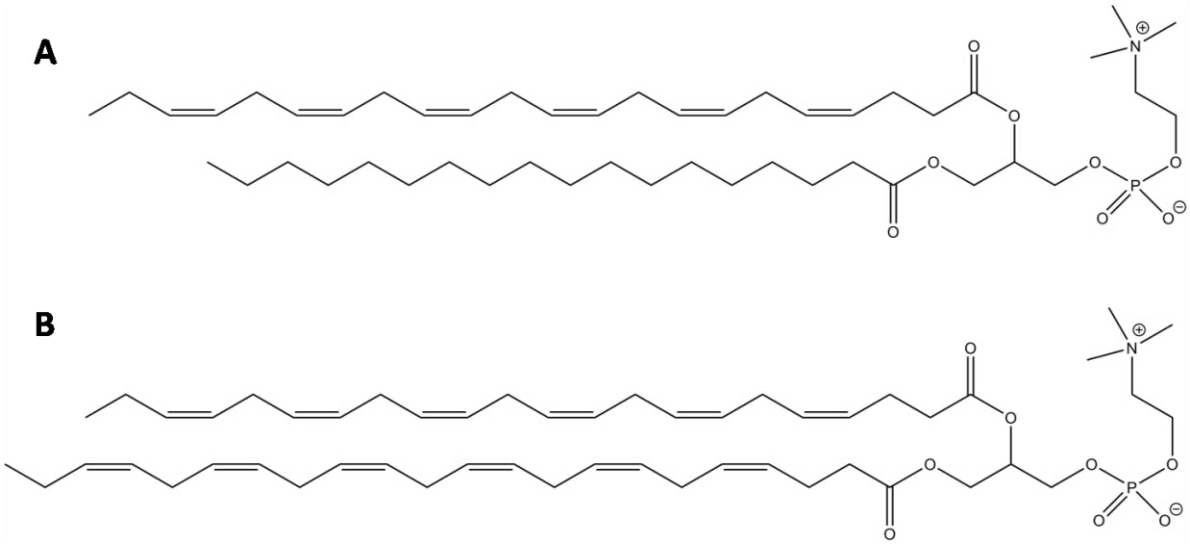


Figure 39 Structures de A) DHA-PC (C18:0/22:6,n-3) et B) DDHA-PC (di-C22:6,n-3).

Le DHA-PC pour rappel, est un LPI qui possède en position sn1, une chaîne saturée de dix-huit carbones et en position sn2, une chaîne polyinsaturée DHA (n-3) (**Figure 39A**). De fait, le DDHA-PC comporte deux chaînes insaturées (**Figure 39B**).

Après 3 µs de simulation en milieu isotropique, les molécules de DHA-PC s'organisent en une bicouche "plane" d'épaisseur moyenne de 3,63 nm (*valeur approximative déduite entre des grains phosphate du lipide avec PyMol*) alors que le DDHA-PC forme un "réseau de bicouches" (**Schéma 10**). Cela peut être expliqué par la géométrie de DDHA-PC. Néanmoins, il tend à s'assembler en bicouche (épaisseur de bicouche (e.b) ~ 3,52 nm). Les DL cis au sein d'une chaîne lipidique sont considérées comme des coudes qui induisent des courbures (**Figure 14**) et empêcheraient donc aux LPI (DDHA-PC) de "se redresser" pour s'aligner comme un lipide entièrement saturé. Ce genre de lipide est plus écarté à la base, ce qui permet à la bicouche de se plier en adoptant une certaine courbure. Cette propriété permet ainsi d'obtenir des bicouches moins compactes (e.b_{POPC} théorique[139] = 3,79 - 3,91 ± 0,08 nm > e.$b_{DDHA\text{-}PC}$ ~ 3,52 nm) et éventuellement une aire par lipide plus grande. Le DHA-PC dû à sa chaîne saturée "ordonnée", se comporte vraisemblablement comme le POPC. La chaîne saturée va interagir avec les autres chaînes simples comme illustré sur le schéma suivant, et afin de maximiser les contacts hydrophobes, ces dernières s'étirent pour pratiquement s'aligner, ce qui expliquerait la valeur de e.$b_{DHA\text{-}PC}$.

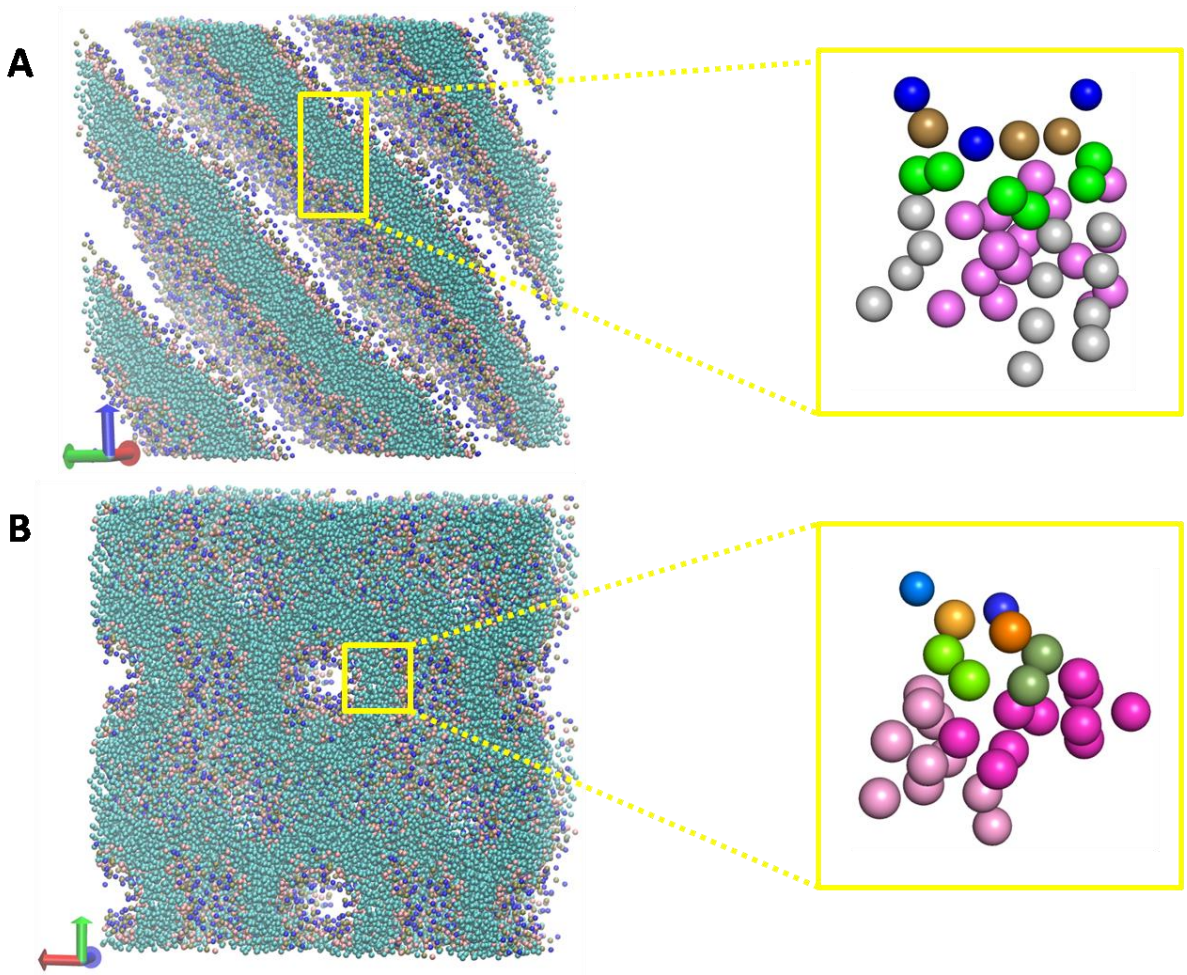


Schéma 10 Systèmes finaux après 3 µs de simulation. **A**) Organisation du DHA-PC en bicouches planes. De couleur grise claire sont représentées les chaînes saturées qui interagissent essentiellement entre elles, il en est de même pour les chaînes insaturées (rose clair). De plus, on observe bien que les chaînes saturées sont plus alignées que les insaturées malgré le niveau de détail. **B**) Organisation du DDHA-PC en un « réseau de bicouches ». On peut voir, encadrée en jaune, la structuration adoptée par deux lipides (couleur foncée et clair pour les distinguer). Les chaînes grasses insaturées (rose clair et rose foncé) sont visiblement désordonnées et davantage en comparaison à celles du DHA-PC en **A**. Ce résultat témoigne de la flexibilité des chaînes constituées de doubles liaisons.

I.2 LPI greffés avec l'AGPI DPA

Les dynamiques qui traitent l'auto-assemblage du DPA-PC et DDPA-PC, LPI avec une et deux chaînes DPA respectivement (**Figure 40**), présentent les mêmes observations qu'avec les oméga 3. Le DPA-PC qui ressemble au DHA-PC, s'organise également en une bicouche "plane" (**Schéma 11A**) et le DDPA-PC s'auto-assemble en un réseau (**Schéma 11B**) comme le DDHA-PC avec lequel il partage une structure proche. Tout comme précédemment, la bicouche établie à partir d'un LPI avec une seule chaîne insaturée est plus épaisse (e.$b_{DPA\text{-}PC}$ ~ 3,69 nm ; e.$b_{DDPA\text{-}PC}$ ~ 3,59 nm < théorique = 3,79 - 3,91 ± 0,08 nm).

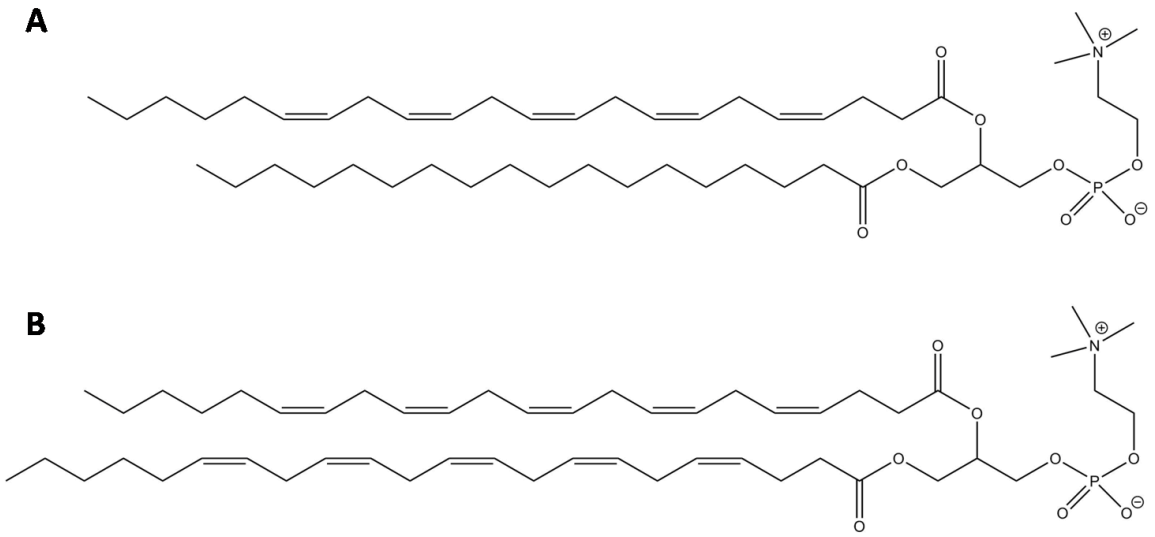


Figure 40 Structures de A) DPA-PC (C18:0/22:5,n-6) et B) DDPA-PC (di-C22:5,n-6).

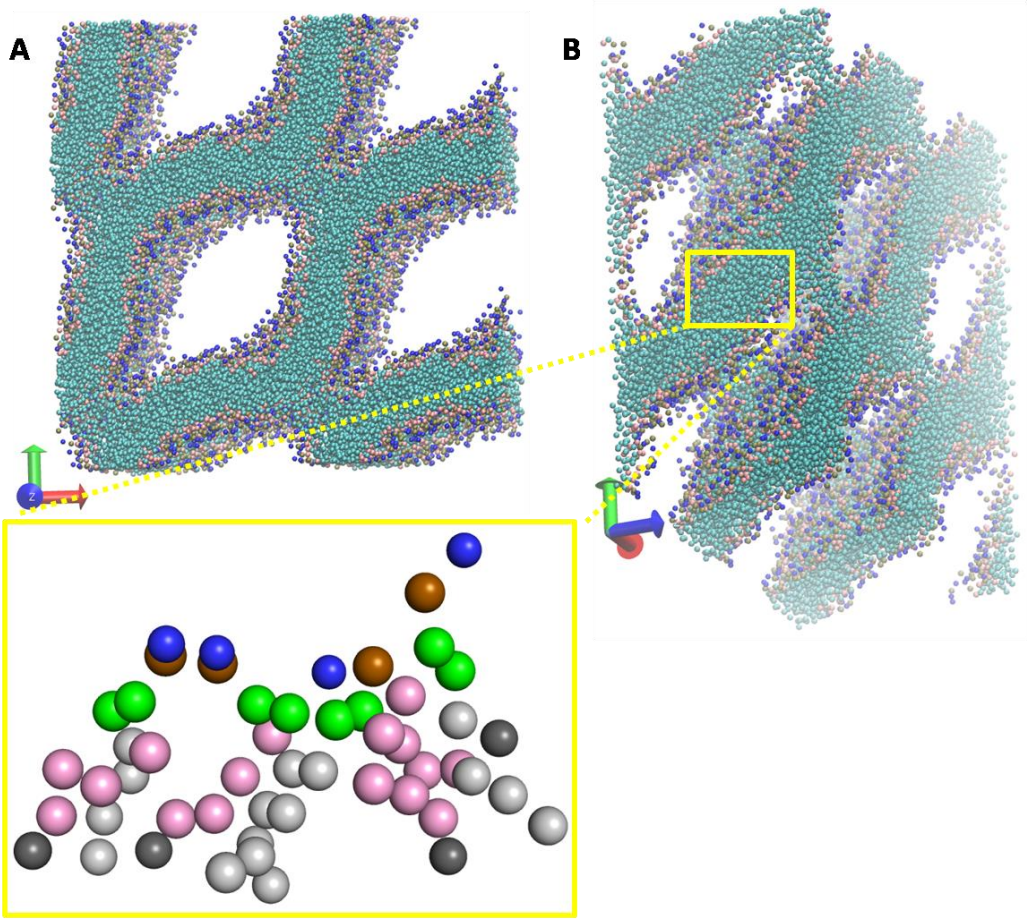


Schéma 11 Systèmes finaux après 3 µs de simulation. **A**) Organisation du DDPA-PC en un « réseau de bicouches ». Les lipides s'organisent de la même manière que le DDHA-PC, à savoir que les deux chaînes insaturées du DDPA-PC adoptent une structuration aléatoire et non ordonnée. **B**) Organisation du DPA-PC en bicouches « planes ». Tout comme avec le DHA-PC, les chaînes saturées (gris clair) en position sn1 du LPI sont préférentiellement en contact entre elles. La même observation est faite pour les chaînes insaturées (rose/gris foncé) mais vu que le DPA possède moins de doubles liaisons que le DHA, il peut interagir avec les chaînes simples par son extrémité (grain gris foncé qui défini les liaisons simples de la chaînes insaturée, *cf Figure 40*).

II. Comportement des LPI dans une membrane de POPC

Nous nous sommes également intéressés au comportement "naturel" des LPI dans une membrane, car ils jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques et leur dynamisme et organisation peuvent être aussi influencés par leur environnement (présence de protéines transmembranaires, etc).[64] Pour analyser cet aspect, une membrane préformée constituée de POPC avec 5 % de LPI (DHA-PC ou DDHA-PC ou DPA-PC ou DDPA-PC) est générée.
Dans la suite du mémoire, le terme "simple chaîne oméga X" (X est le type de famille du LPI) sera parfois employé pour se référer à DHA-PC (X = 3) et DPA-PC (X = 6). Il en est de même pour DDHA-PC et DDPA-PC qui porteront les noms de "doubles chaînes oméga 3" et "doubles chaînes oméga 6" respectivement.

II.1 Etude des oméga 3

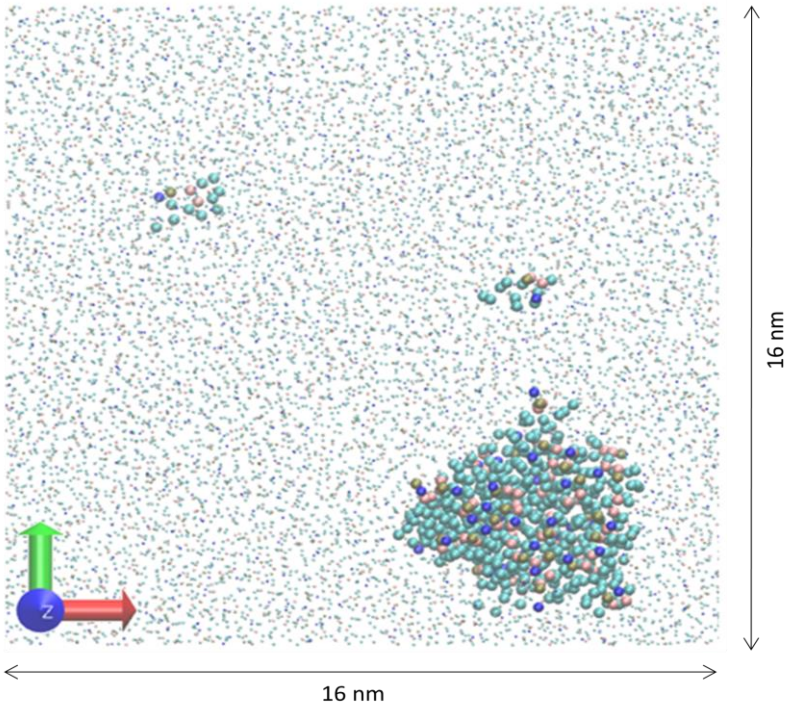


Figure 41 Etat final de la DMGG comprenant 5 % de DDHA-PC introduit dans une membrane préformée de POPC (vue de dessus). Rappel : le système initial présentait les molécules de DDHA-PC dispersées au sein de la bicouche.

L'analyse de la trajectoire (5 µs) du premier système avec le simple chaîne oméga 3 montre que ce dernier est très dynamique au sein de la membrane. Cependant, lorsque l'on substitue la chaîne saturée par une chaîne insaturée (DDHA-PC), le LPI s'auto-assemble en un domaine (diamètre ~ 6 nm) qui peut être comparé à un domaine *non-raft* (**Figure 41**).[64,65] Une telle association est sûrement causée par **1**. une maximisation des interactions π-π (doubles liaisons) et **2**. une différence de structuration (POPC = ordre, peu fluide et DDHA-PC = désordre, très fluide). En effet, toutes choses étant égales, la probabilité de rencontre entre deux LPI est la même puisque l'on a la même quantité (5 %) or, le comportement est différent entre le simple et double chaîne oméga 3. Malgré la chaîne insaturée chez DHA-PC, la présence de la chaîne saturée sur la position sn1 du DHA-PC est suffisante pour éviter cet agrégation de LPI car cette dernière est fortement en contact avec la queue de POPC.

Dans un second temps, nous avons procédé au calcul du paramètre d'ordre <P> des LPI et du POPC. Ce critère permet de déterminer l'organisation d'un lipide dans une membrane en mesurant le mouvement spatial des vecteurs SC-SC avec SC qui désigne un grain de la chaîne apolaire. Les lipides sont dits parfaitement alignés (ordonnés) si <P> vaut **1** et lorsqu'ils n'ont pas d'orientation propre (désordre), <P> est égal à **0**. L'anti-alignement est traduit par une valeur de -0,5. De fait, la mesure de <P> pour les LPI et POPC dans chacune des dynamiques (**Tableau 6**), démontre bien cet arrangement assez ordonné de DHA-PC en comparaison au DDHA-PC. Les valeurs sont comprises entre 0 et 1, ce qui signifie que les lipides n'adoptent pas une unique configuration mais diverses. Ce résultat n'est pas étonnant sachant que ces composés sont libres de mouvement au sein d'une bicouche. Néanmoins, une différence peut être perçue : les valeurs de <P> pour POPC et DHA-PC tendent tout de même vers 1 donc vers un alignement des lipides, alors que celle pour DDHA-PC est très proche de 0.

Lipides	**<P>**
POPC	0,225* 0,229**
DHA-PC	0,119
DDHA-PC	0,044

Tableau 6 Paramètres d'ordre des lipides (calcul suivant toutes les chaînes grasses) constituants les systèmes de DMGG (*valeur pour la simulation impliquant DHA-PC, **valeur pour la simulation impliquant DDHA-PC).

On remarquera également, que la nature de la queue hydrophobe (une ou deux chaînes insaturées) n'impacte pas énormément l'épaisseur de la bicouche (e.b) qui est en accord avec celle de la littérature[139] : $e.b_{DHA}$ = 3,85 nm et $e.b_{DDHA}$ = 3,79 nm (théorique = 3,79 - 3,91 ± 0,08 nm), avec $e.b_{DHA}$ qui correspond à l'épaisseur de la membrane disposant de POPC et 5% DHA-PC et $e.b_{DDHA}$ celle avec 5% de DDHA-PC (**Figure 42**). Etant donné que la membrane comporte 95% de POPC, ce dernier va régir la structure de la bicouche. Puis, si on analyse de plus près la région riche en DDHA-PC, l'épaisseur de ce domaine est égale à 3,62 nm, soit inférieure à la valeur théorique.

De même pour l'aire par lipide (A), elle ne varie pas spécialement malgré la présence des LPI et cela doit être dû au ratio non proportionnel des différents lipides du système. Une aire par lipide A de 6,76 nm² a été calculée pour la bicouche POPC/DHA-PC, et pour POPC/DDHA-PC, A vaut 6,83 nm² (théorique[139] = 6,43 - 6,73 ± 0,13 nm²).

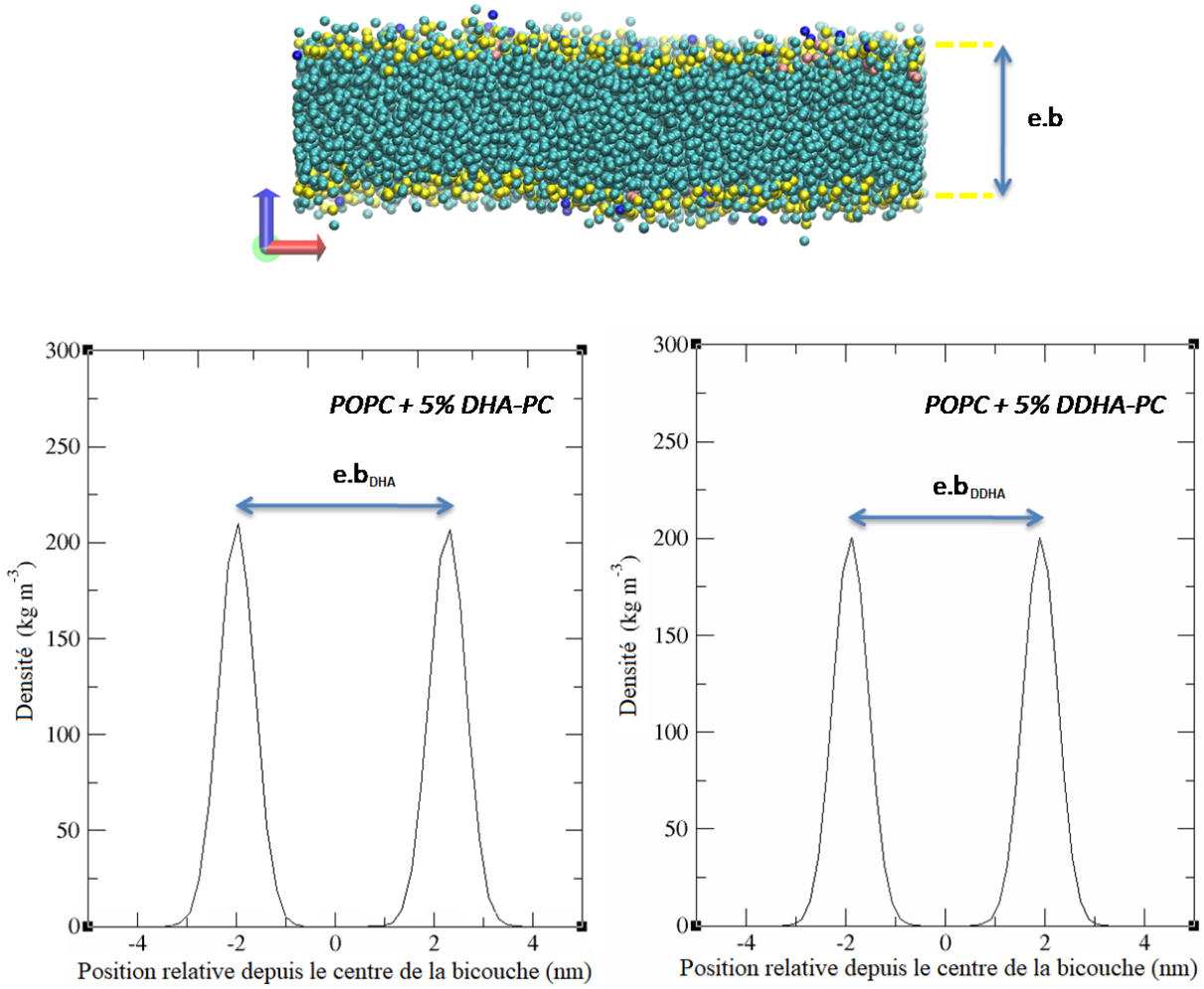


Figure 42 L'image du haut montre quel critère a été pris pour mesurer l'épaisseur de bicouche (e.b) : les grains « phosphate » en jaune ont été pris pour le calcul avec la commande gmx density.

II.2 Etude des oméga 6

Dans le cas des oméga 6, les lipides de DPA-PC ne s'auto-assemblent pas et cela n'est pas surprenant. En effet, on aurait pu se douter de leur tendance naturelle en s'appuyant sur la structure qui se rapproche de celle de DHA-PC. La trajectoire de la simulation avec le double chaîne oméga 6 cependant, témoigne de la formation de plusieurs micro-domaines et non d'un seul agrégat (**Figure 43**). Tout comme le DDHA-PC, la présence de deux chaînes carbonées avec des DL va favoriser les interactions entre queues insaturées.

Le **Tableau 7** affiche le paramètre d'ordre des LPI et de POPC et nous pouvons voir que le DPA-PC est capable de s'aligner selon POPC à la différence de DDPA-PC. Cela est dû à la présence d'une longue chaîne saturée en position sn1.

La même observation est faite à propos de l'épaisseur de la membrane, les oméga 6 n'induisent ni épaississement, ni affinement significatifs de la bicouche une fois insérés à l'intérieur : $e.b_{DPA}$ = 3,87 nm et $e.b_{DDPA}$ = 3,81 nm (théorique = 3,79 - 3,91 ± 0,08 nm) (**Figure 43**). On remarquera que les micro-domaines de DDPA-PC font 4 nm de long et 2,93 nm de diamètre, et les aires par lipide des membranes restent inchangées (A_{DPA} = 6,70 nm² et A_{DDPA} = 6,80 nm², avec A_{DPA} qui correspond à l'aire par lipide de la bicouche composée de POPC et 5% DPA-PC et A_{DDPA} celle avec 5% de DDPA-PC ; théorique = 6,43 - 6,73 ± 0,13 nm²).

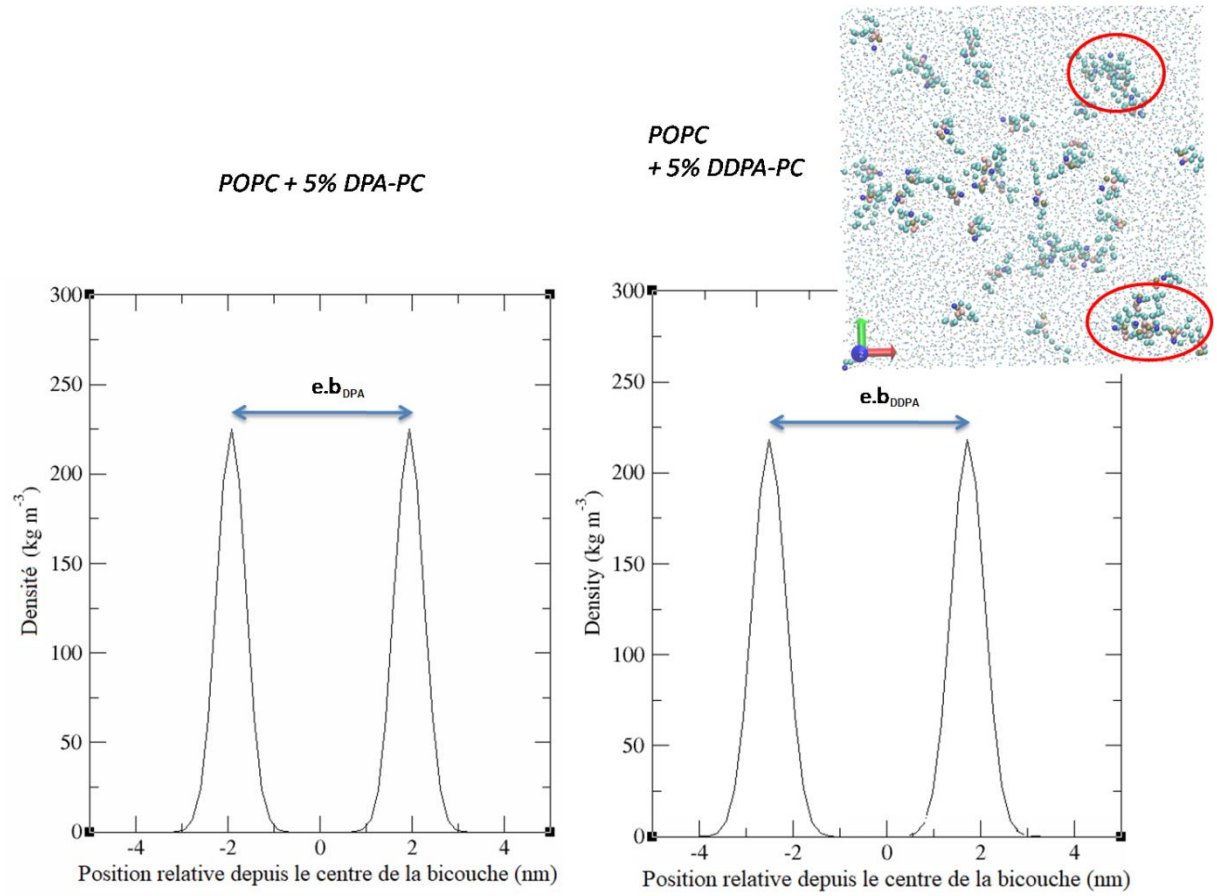


Figure 43 Epaisseurs de bicouche. L'image en haut à droite affiche l'état final du système composé de 5% de DDPA-PC avec la formation de petits amas de LPI (entourés en rouge, *vue de dessus*).

Lipides	**<P>**
POPC	0,228* 0,226**
DPA-PC	0,143
DDPA-PC	0,067

Tableau 7 Paramètres d'ordre des lipides (calcul suivant toutes les chaînes grasses) constituants les systèmes de DMGG (*valeur pour la simulation impliquant DPA-PC, **valeur pour la simulation impliquant DDPA-PC).

Chapitre IV Influence des LPI sur l'état conformationnel du récepteur dopaminergique D2

Des simulations de DMGG en présence du récepteur (RD2 cristallographique) ont été réalisées après avoir contrôlé le comportement des lipides et la formation de bicouches. L'objectif de cette étude était de :

1. analyser le comportement des lipides polyinsaturés (LPI) en présence d'une PTM afin de comprendre comment ces derniers pourraient impacter certaines propriétés du récepteur,
2. déterminer les changements conformationnels de RD2 dans une membrane peu complexe (mélange de deux lipides),
3. comprendre l'effet du cholestérol sur les interactions LPI-RD2.

Néanmoins, avant de traiter les membranes peu complexes, une simulation par dynamique moléculaire (simulation "contrôle") a été réalisée : RD2 dans une membrane simple (100% POPC). Cela nous permettra d'élucider l'impact des LPI sur la protéine en comparant les simulations.

A noter, les résultats présentés pour chaque système sont issus d'une simulation et convergent avec ceux obtenus des différentes répliques.

I. Comportement de RD2 dans une membrane de POPC

I.1 Dynamique de RD2

La dynamique des lipides est apparente en visualisant la trajectoire totale avec le logiciel VMD. L'épaisseur de la membrane ne semble pas avoir été modifiée par la présence de RD2 qui a été insérée à l'intérieur (e.b = **3, 89 nm**, théorique = 3,79 - 3,91 ± 0,08 nm *en prenant en compte le groupe phosphate du lipide*) (**Figure 44**), et l'aire par lipide corrèle bien avec celles déterminées par Kučerka *et al.*[139] (<A> = **6,87 nm²**, théorique = 6,43 - 6,73 ± 0,13 nm²).

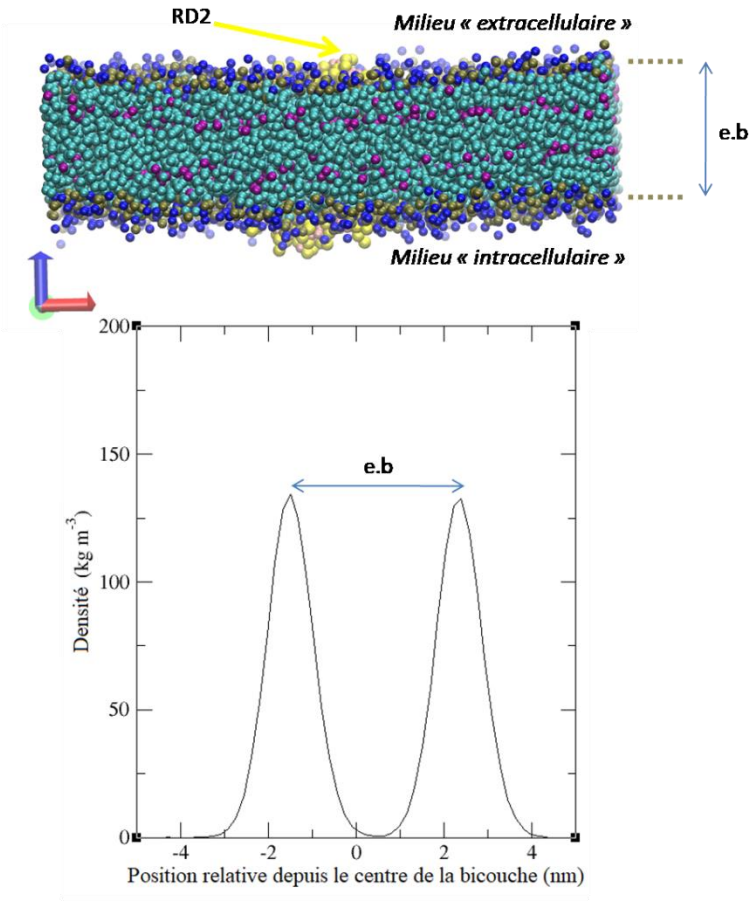


Figure 44 En haut, le système étudié et en bas, le graphe sur lequel on déduit l'épaisseur de bicouche (e.b) toujours en prenant en compte les grains « phosphate » (marron) dans le calcul.

Outre ces observations, le récepteur se déplace au sein de la bicouche. En effet, comme décrit dans la littérature, les composés d'une membrane ne sont pas "figés", ainsi leurs propriétés peuvent être modifiées par l'environnement qui les entoure.[62,64,66] Le calcul du RMSD (déviation de la racine quadratique moyenne des positions) témoigne de la dynamique du RD2 soit de l'influence des molécules de POPC sur cette caractéristique (<RMSD> = **0,3 nm**). Néanmoins, cette mesure ne prend plus en compte uniquement les C_α du squelette carboné car ces derniers sont regroupés avec les fonctions -NH et -CO adjacentes en un seul grain dénommé BB (*cf* ***Chapitre II*** - *paragraphe* ***III.3.1***). De fait, la **Figure 45** présente l'évolution du comportement de la protéine entière au cours du temps : tous les grains représentant RD2 ont été considérés dans le calcul (**Annexe 4**). En analysant le graphe, nous pouvons voir un grand nombre de fluctuations significatives qui peuvent être assimilées à des changements locaux du récepteur. Nous pouvons également supposer que ces variations conduisent à des configurations particulières et afin de le démontrer, une transformation inverse (retour à une structure en tout-atome détaillée) est nécessaire.

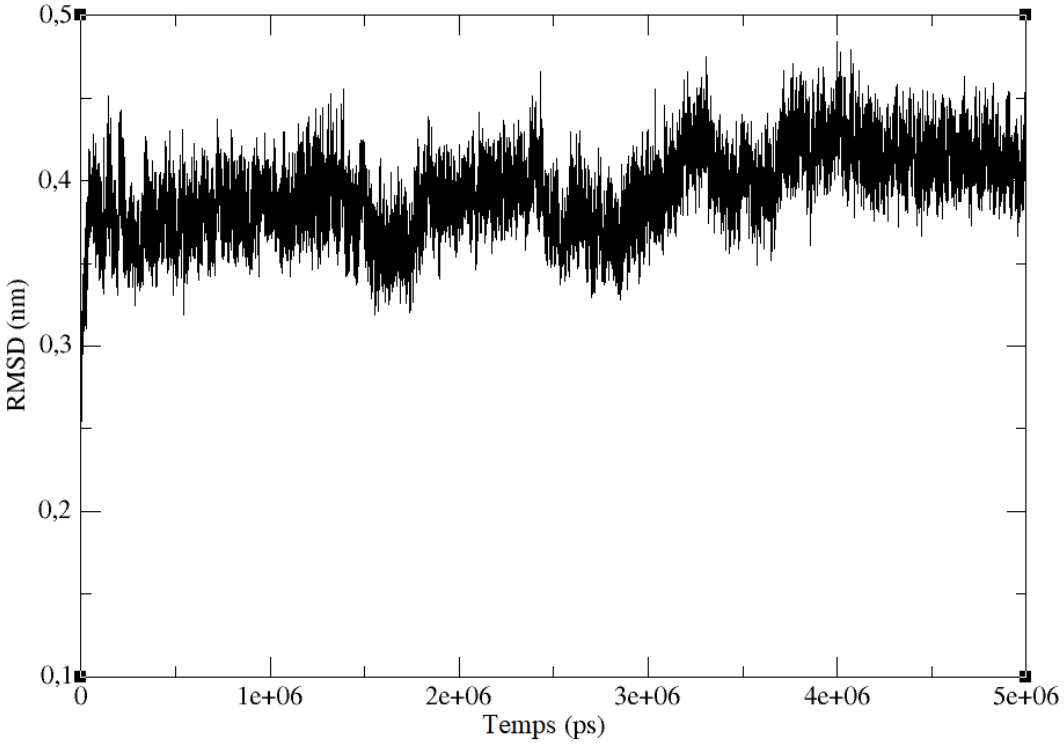


Figure 45 RMSD de RD2 en prenant en compte la protéine entière. La structure de référence est celle cristallographique inactive.

La transformation inverse a été réalisée sur plusieurs structures de la protéine extraites à différents temps et précisément, aux temps où les fluctuations sont les plus importantes. Leur

superposition (**Figure 46**) illustre bien la dynamique de RD2 avec les hélices TM5-7 qui paraissent être les plus mobiles, puis, le RMSD de chaque hélice (**Figure 46**) valide cette observation. Cela était attendu puisque les hélices TM6 et TM7 sont engagées dans le processus d'activation des RCPG et le dynamisme de TM5 est dû essentiellement aux oscillations de sa région cytoplasmique. Ce phénomène a également été constaté par Cordomí and Perez[82] qui ont simulé la Rhodopsine dans diverses membranes à tête polaire PC. Néanmoins, l'absence de la BIC3 doit aussi avoir une influence sur ces fluctuations.

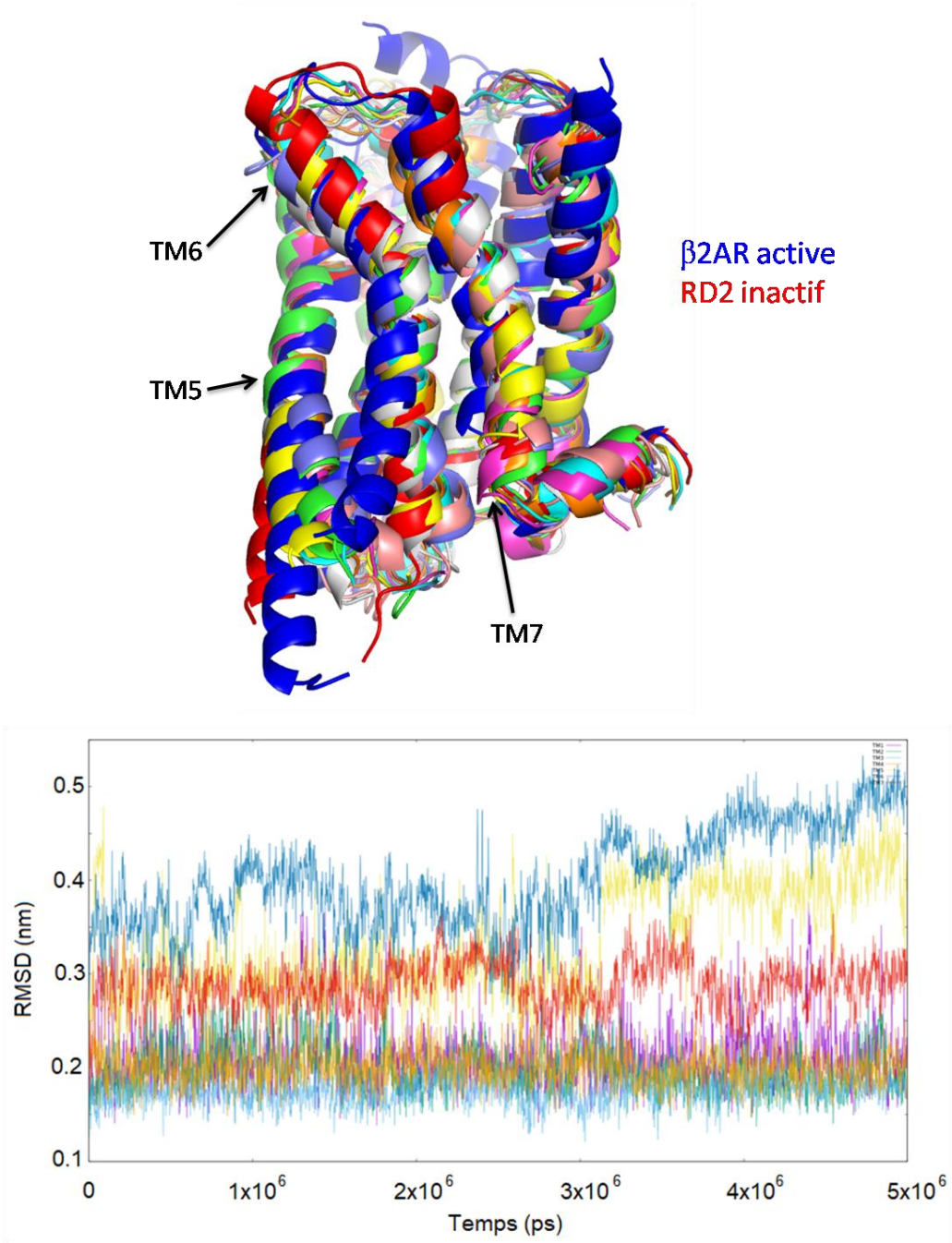


Figure 46 Superposition de structures (haut) et RMSD des hélices (bas). Sur le graphe, une couleur correspond à une hélice : **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6** et **TM7**.

Le calcul de la fluctuation des particules BB (RMSF) permet d'appuyer les analyses ci-dessus. Le graphe en **Annexe 5** montre qu'il y a neuf régions majoritaires au sein de RD2 qui présentent une grande dynamique. Elles correspondent aux résidus situés d'une part au niveau des boucles, ce qui témoignerait de la flexibilité/mouvement des acides aminés impliqués dans la fixation du ligand (**W100^{BEC1}**, **I184^{BEC2}**), et d'autre part aux extrémités de quelques hélices (**TM5-7**) dont certaines exposent les résidus qui participent au site de liaison (**H393^{TM6}**, **F390^{TM6}** et **Y408^{TM7}**).[38]

I.2 Etats conformationnels adoptés par RD2

La détermination d'un ou de plusieurs états conformationnels est possible avec l'analyse des trois critères évoqués dans le ***Chapitre I*** - *sous-partie* ***II.3*** à savoir la formation ou non du "verrou ionique", la position de la région NPxxY et l'état du coeur de triade. Une première indication peut être donnée par la superposition des structures extraites (**Figure 46**) : aucun mouvement extérieur de l'hélice TM6 n'est visible si on compare avec les structures cristallographiques de la β2AR active et RD2 inactif, et la partie intracellulaire de TM7 ne se rapproche pas du *bundle*. Ainsi, le simple examen visuel nous laisse à penser que RD2 ne passe pas par un état actif durant la simulation.

La mesure de la distance L_G (distance entre BB_{R132} et BB_{E368}, résidus qui établissent le "verrou ionique") affirme que la région intracellulaire de RD2 ne s'ouvre pas donc que la protéine n'est pas activée (**Figure 47A**). En effet, la distance L_G est comprise entre **0,6 et 1,2 nm** or, si un mouvement extérieur de TM6 avait eu lieu, il y aurait une variation d'environ 1,5 nm (*cf* ***Figure 9*** - ***Chapitre I***). Néanmoins, RD2 ne reste pas sous sa forme inactive puisque R132 et E368 n'interagissent pas continuellement entre eux (**Figure 47B**) et cela signifie que le "verrou ionique" est parfois « cassé ». Ce résultat a déjà été rapporté dans les articles de Bruzzese *et al.*[53] et Dror *et al.*[47,52] : DOPC et son semblable POPC n'induisent ni inactivation propre, ni activation et la distance entre les chaînes latérales des acides aminés du "verrou ionique" varie malgré un faible mouvement de l'hélice TM6 (*cf* ***Schéma 7*** - ***Chapitre I***).

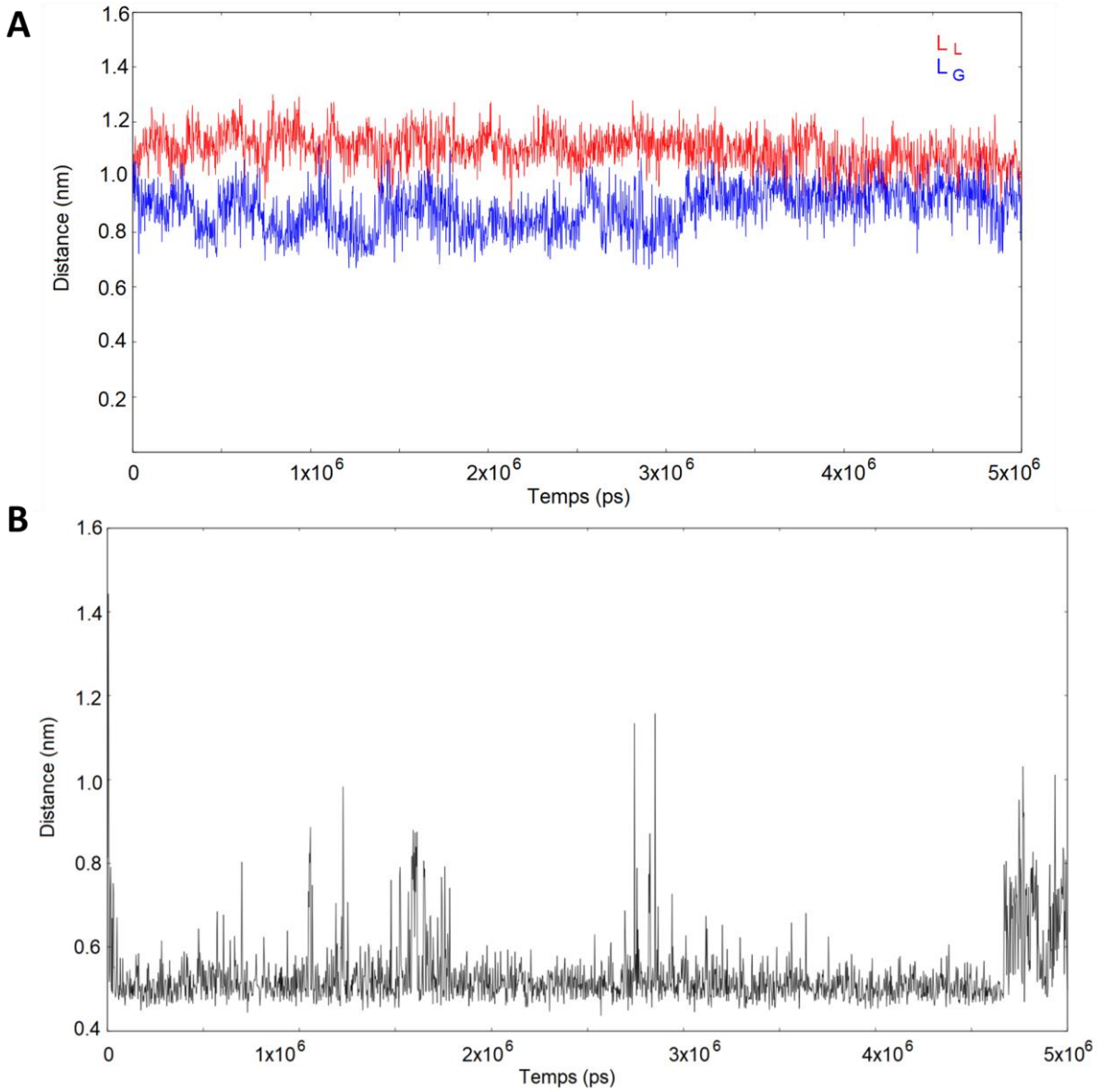


Figure 47 Distances entre **A**) les grains BB des acides aminés D114^{TM3} et S217^{TM5} (L_L), et R132^{TM3} et E368^{TM6} (L_G). L_L caractérise l'état de la région extracellulaire du récepteur et précisément du site de liaison du ligand et L_G celui de la région intracellulaire (site de la protéine G).[45,99] Ces deux critères varient, normalement, dans le sens opposé, ce qui veut dire que lorsque L_L diminue (fermeture du site du ligand généralement après l'entrée de la petite molécule), L_G augmente (ouverture pour accueillir la protéine G) et inversement. **B**) Distance entre les grains SC définissant les extrémités des chaînes latérales des résidus R132 et E368 qui établissent le « verrou ionique ». Les distances supérieures à 0,6 nm indiquent que les deux acides aminés n'interagissent pas ensemble. *La valeur « théorique » mesurée sous PyMol sur la structure gros grains de RD2 inactif vaut 0,45 nm*.

En addition de l'étude précédente et afin d'appuyer la supposition faite au début, soit que RD2 ne passe pas par un état actif, l'analyse de la région cytoplasmique de l'hélice TM7 et du

coeur de triade a été réalisée. L'**Annexe 6** qui retrace la dynamique du motif NPxxY^{TM7} en fonction du temps certifie que cette partie est peu mobile, ce qui est perceptible sur la **Figure 48**. Cette caractéristique peut révéler que RD2 est maintenu dans un état inactif mais lorsqu'on s'intéresse au résidu **Y426**, ce dernier est essentiellement incliné vers le bas et Latorraca *et al.*[48] ont expliqué que cette position était représentative de divers états intermédiaires (*cf* ***Schéma 8 - Chapitre I***).

Il en est de même pour le coeur de triade : **I122** s'oriente majoritairement tel que dans la forme active alors que **P201** et **F382** adoptent une configuration inactive (**Figure 48B**). Cependant, F382 est très mobile comparé aux deux autres acides aminés (**Annexe 7**). Encore une fois, ce passage d'une configuration à une autre de ces trois résidus est typique de l'effet d'une membrane à base de phosphatidylcholine.[53]

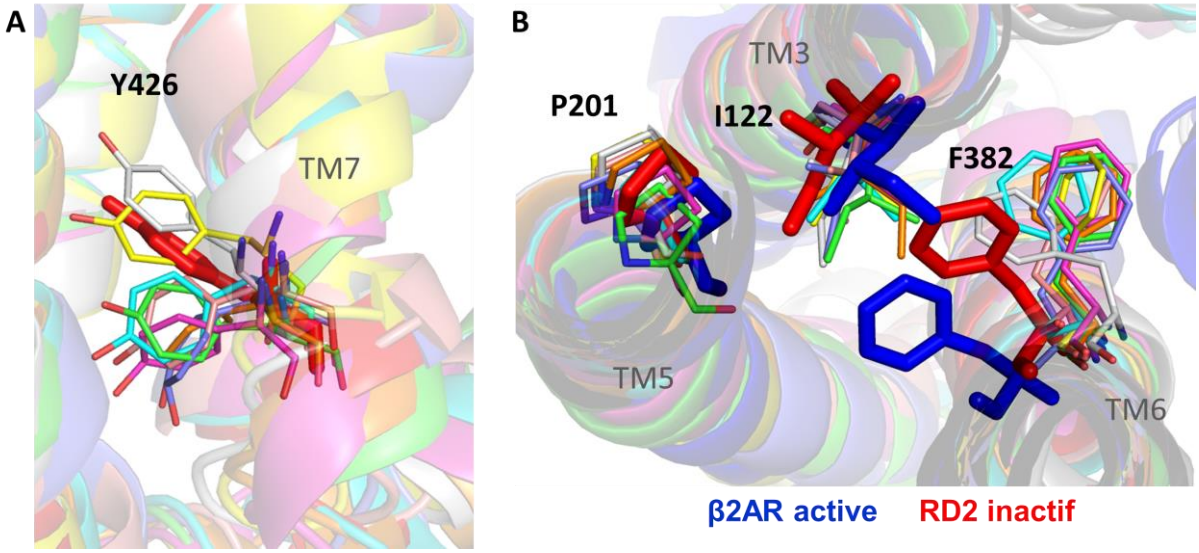


Figure 48 Conformations adoptées par A) Y426 du motif NPxxY (vue de profil) et B) le coeur de triade (*vue de dessus*), à divers temps au cours de la dynamique.

Suite à ces résultats, nous concluons que RD2 est en **équilibre** entre une conformation qui présente le "verrou ionique" (inactive) et "une" en l'absence sans passer à l'état actif : on parle d'états intermédiaires.

I.3 Site de liaison de RD2

Les résidus qui sont impliqués ou qui ont une importance dans la fixation du ligand se comportent, pour la plupart, différemment en l'absence de la molécule. Tout d'abord, **I184** et **W100** interagissent davantage ensemble lorsque le site orthostérique ne possède pas de ligand : W100 est mobile et ainsi, il lui est possible de s'orienter vers I184 qui s'éloigne du coeur de la protéine (**Annexe 8**). La leucine **L94**, également en contact avec la molécule une fois complexée à RD2, est très flexible en son absence alors que **V91** et **F110** sont plus avancées vers l'intérieur du récepteur (**Schéma 12**). Cela montre que RD2 se comprime au niveau extracellulaire et induit un rétrécissement du site de liaison étendu (*EBP*). Ce processus est également engendré par le retour à une configuration initiale de **Y408** (dirigé vers la cavité). Effectivement, Wang *et al.*[38] ont découvert que cette tyrosine était capable de s'accommoder pour accueillir le ligand chez le RD2 uniquement. Par conséquent, l'interaction entre Y408 et **H393** est affaiblie, ce qui entraîne une perte de stabilisation de TM6 qui est libre de mouvement (**Annexe 9**).

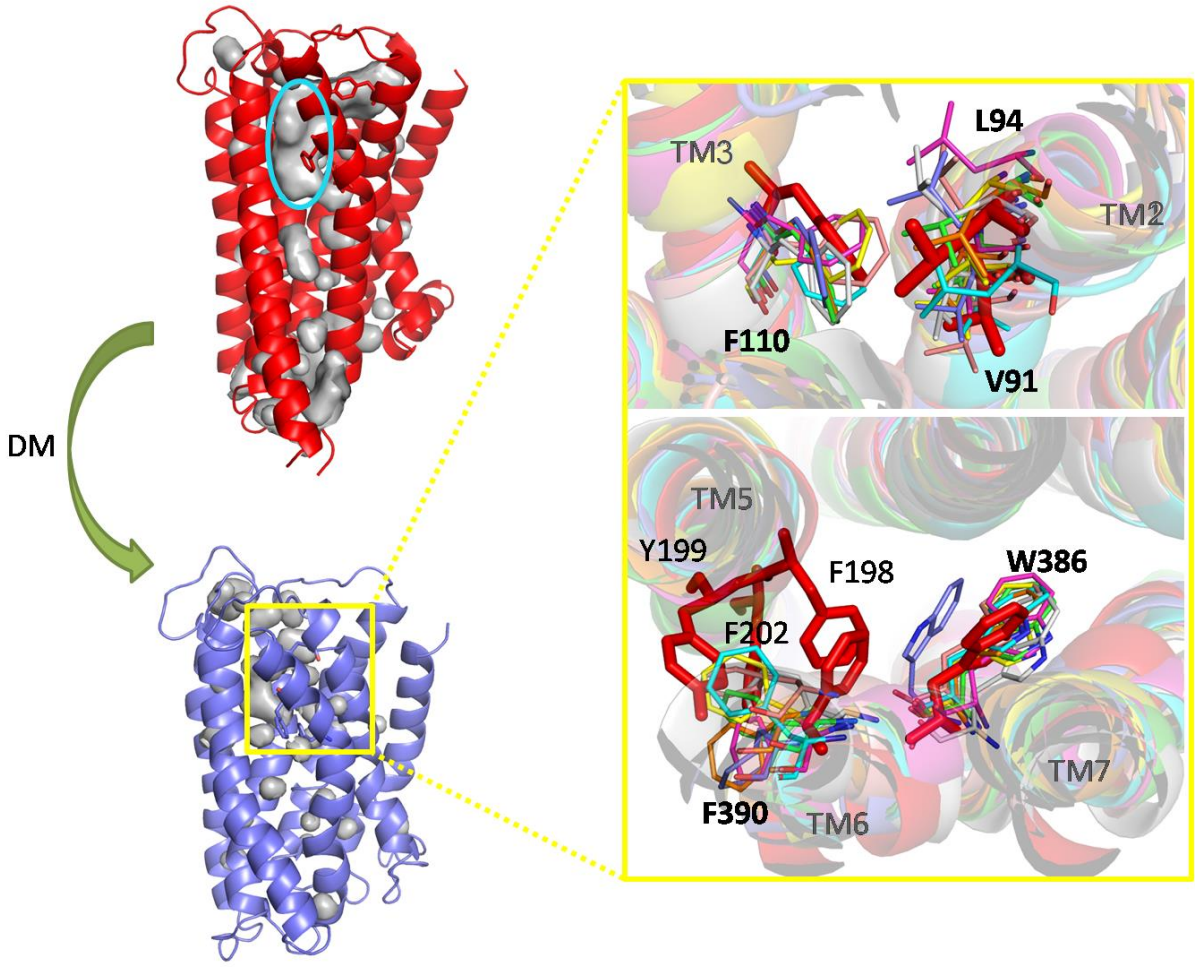


Schéma 12 Evolution de la poche de liaison du ligand (surface grise entourée en cyan sur l'image de la structure inactive cristallographique de RD2 qui est représentée en *cartoon* rouge). Dû aux

réarrangements des acides aminés (en *stick* colorés, *vue de dessus*) et des hélices, la poche dite *EBP* disparaît rapidement.

Les autres résidus définis comme jouant un rôle important dans la fixation du ligand sont **F390** et **W386** et l'interprétation des résultats de la dynamique nous a conduit à la conclusion suivante : ces acides aminés contribuent à l'établissement de la poche de liaison étendue (*EBP*). F390 est dynamique, elle peut interférer avec F202 et Y199 et se trouve donc décalée vers TM5, ou comme dans la structure cristallographique, elle entre en contact avec F198. W386 quant à lui se retrouve avec son groupe aromatique orienté vers le bas dans la protéine *apo*, ce qui bloque en partie le prolongement de *EBP* (**Schéma 12**).

I.4 Validation du modèle gros grains

Une dynamique en tout-atome (DMTA) a été réalisée afin de valider notre modèle gros grains. Pour cela, on part d'un système simple composé d'une membrane de POPC dans laquelle est insérée RD2 comme énoncé dans le **Chapitre II** - sous-partie **IV.2**.
Après 500 ns de production, l'analyse de la superposition de structures démontre bien que les hélices TM5 et TM6 sont les plus mobiles et qu'aucun mouvement extérieur de TM6 n'est observé au niveau cytoplasmique (**Figure 49**). La mesure des distances entre les C_α de R132 et E368, et leurs extrémités (N_{R132}, O_{E368}) soutient ce résultat (**Figure 49**). La région intracellulaire de l'hélice TM7 est aussi peu dynamique (**Figure 49**). Néanmoins, le RMSD en **Figure 49** de la protéine expose des fluctuations qui signifient que le RD2 passe par plusieurs états (intermédiaires) sans jamais atteindre la forme activée malgré une valeur du RMSD élevée (<RMSD> = **0,35 nm**).

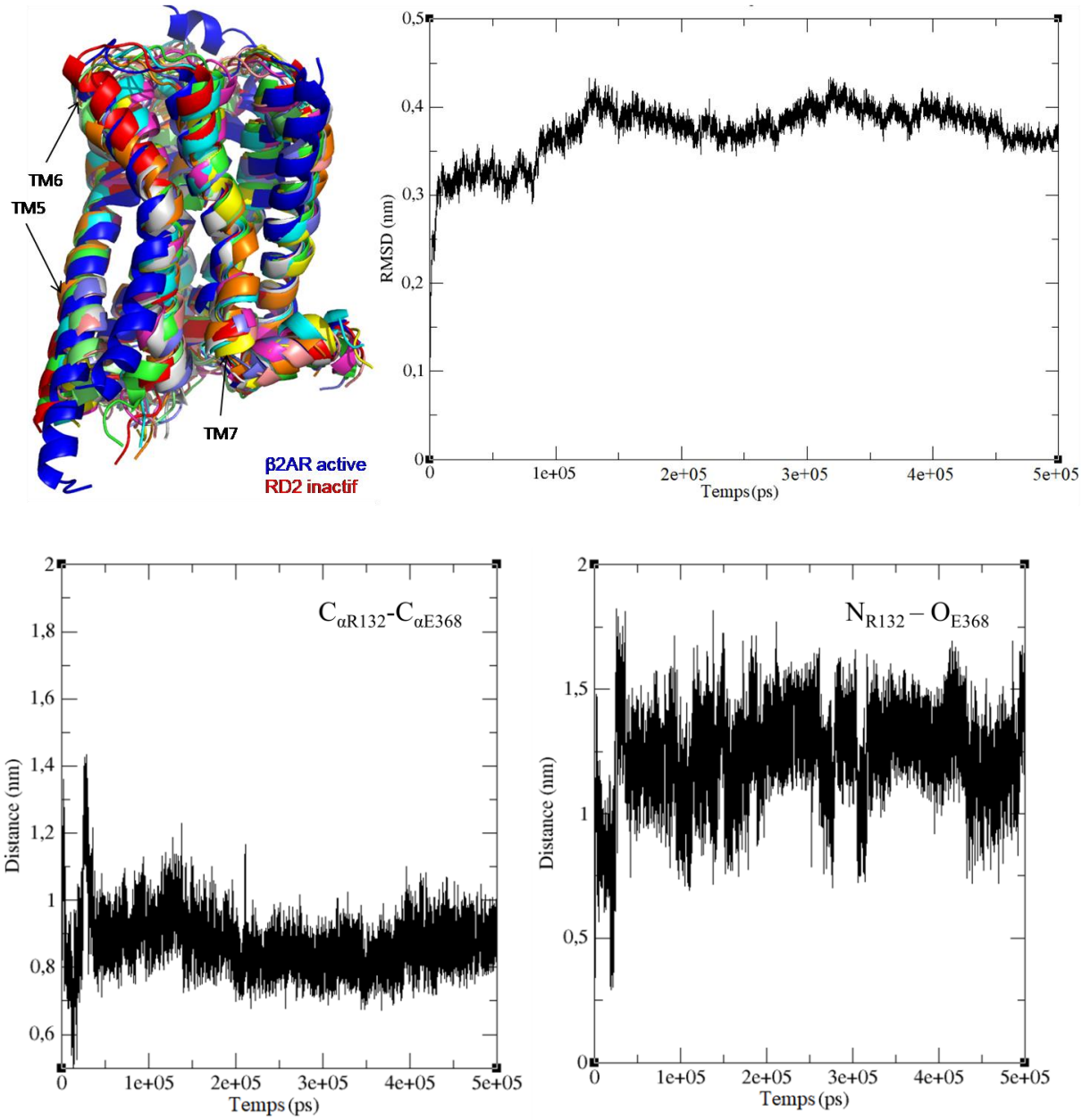


Figure 49 *Haut :* Superposition de structures extraites à différents temps sur les structures cristallographiques de la β2AR activée et du RD2 inactif (gauche). A droite, le graphe résultant du calcul du RMSD de RD2 sur la base des C_α. *Bas :* Evolution des distances $C_{\alpha R132} - C_{\alpha E368}$ (L_G) et $N_{R132} - O_{E368}$ au cours du temps. Le graphe de droite montre l'absence du « verrou ionique » chez RD2 *apo*. *Les valeurs « théoriques » mesurées sous PyMol, en utilisant la structure cristallographique de RD2 inactif, sont égales à 0,87 nm pour L_G et 0,27–0,32 nm pour la distance entre les extrémités.*

En examinant de plus près, la région cytoplasmique du récepteur, on remarque que :

- E368 adopte plusieurs configurations ainsi que R132 (**Figure 50A**)
- Y426 ne maintient pas un état inactif et l'hélice TM7 est éloignée du *bundle* (**Figure 50B**)

- P201 et F382 passent d'une forme inactive à "active" contrairement à I122
- I184 maintient sa position alors que W100 est orienté vers la cavité protéique
- V91, L94 et F110 maintiennent leur position "inactive" dans le site de liaison
- F390 présent bien une orientation vers TM5 (**Figure 50C**)
- W386 bloque la cavité qui permet le développement de *EBP* (**Figure 50C**)

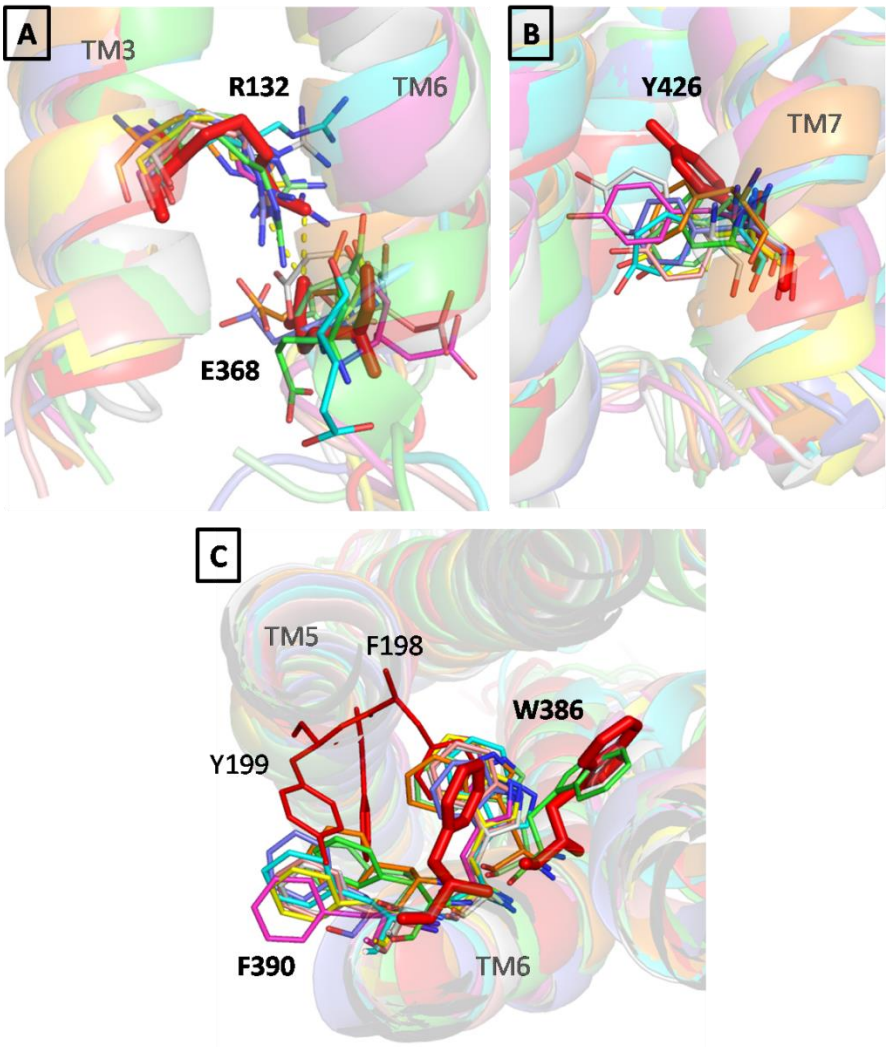


Figure 50 Superposition de structures extraites à différents temps sur celle cristallographique du RD2 inactif (rouge). **A**) « verrou ionique », **B**) Y426 du motif NPxxY et **C**) réarrangement de F390 et W386 au sein du site de liaison.

Ces observations corrèlent assez bien avec celles de la DMGG. Malgré certaines dissemblances, nous pouvons confirmer que le comportement de RD2 est bien reproduit en gros grains. En effet, la DMTA prenant en compte tous les atomes du système, qui est assez volumineux, n'a pas permis d'explorer amplement l'espace énergétique et ainsi observer certains phénomènes en 500 ns.

II. Dynamique et conformation de RD2 dans une membrane peu complexe

Les analyses précédentes (épaisseur de bicouche, RMSD, RDF, etc) ont été effectuées pour tous les systèmes suivants ainsi que les répliques lancées pour chacun d'entre eux.

II.1 Membrane constituée de POPC et 5 % de DHA-PC

L'insertion de DHA-PC n'entraîne aucune variation significative de l'épaisseur de la bicouche (**3,83 nm** ~ $e.b_{POPC}$ = 3,89 nm ~ $e.b_{DHA}$ = 3,85 nm, **Figure 51**) et de l'aire par lipide (<A> = **6,94 nm²** ~ A_{POPC} = 6,87 nm² < A_{DHA} = 6,76 nm²). Pareillement, leur orientation ne semble pas être affectée par la présence de RD2 (<P> = **0,116**) ainsi que leur comportement : les molécules de DHA-PC ne s'agrègent pas (**Figure 51**), des interactions transitoires sont observées entre le LPI et le récepteur.

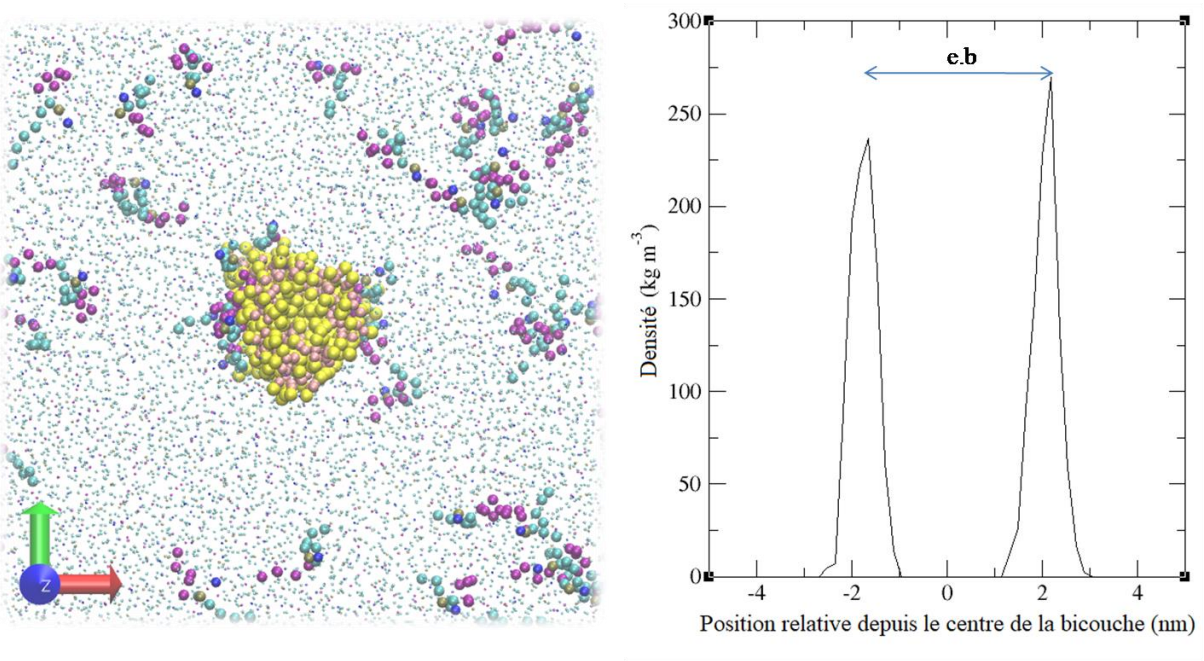


Figure 51 Système après 5 µs de production (*gauche, vue de dessus*). L'image affiche le récepteur au centre pour une meilleure comparaison, mais il ne faut pas oublier que la protéine est libre de mouvement au sein de la bicouche. A droite, le graphe de densité qui indique l'épaisseur de la bicouche (e.b). Le calcul s'effectue sur la même base que celle indiquée en **Figure 44**.

Néanmoins, la protéine est dynamique (<RMSD> = **0,32 nm**) et particulièrement les hélices **TM5-7**, voire TM1 comme l'expose le graphe des RMSD (**Figure 52**). Le calcul du RMSF de certaines régions des hélices impliquées dans l'activation des RCPG (**Annexe 5**) montre que les résidus qui fluctuent le plus comptent ceux qui participent à la formation de la poche étendue de liaison (*EBP*) soit **Y408^{TM7}**, **H393^{TM6}** et **F390^{TM6}** mais également **I397^{TM6}**, **C385^{TM6}** et **W413^{TM7}**. Ainsi, on peut conclure que le DHA-PC n'impacte pas la liberté de mouvement du RD2.

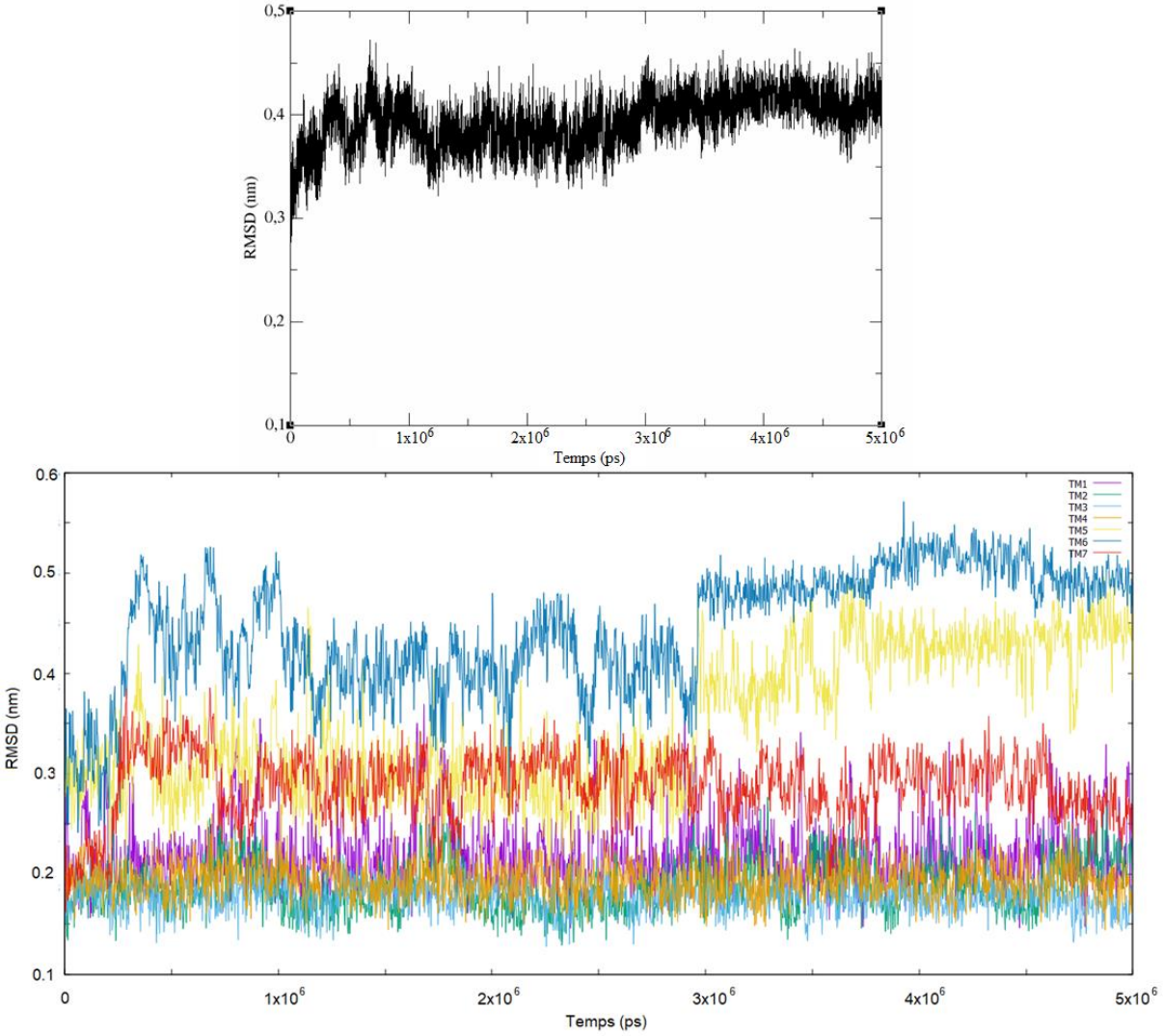


Figure 52 Graphes des RMSD de RD2 entier et de chaque hélice.

De même qu'avec POPC, la superposition de structures après une transformation inverse permet de visualiser des conformations adoptées par le récepteur qui ne semble pas présenter d'état actif durant la simulation. Bien que TM6 soit très dynamique, la distance TM3-TM6 qui a été mesurée en prenant les grains BB des acides aminés établissant le "verrou ionique"

(R132 et E368) ne dépasse pas **1,1 nm**, il n'y a donc pas d'activation (**Annexe 10**). Cela est validé par l'analyse du motif NPxxY dont l'étude de l'orientation de Y426 et l'évolution des distances **I48-S419** (d_{I-S}) et **L76-P423** (d_{L-P}) (**Figure 53**) appuie le fait que RD2 passe par diverses conformations intermédiaires étant donné que :

- la partie intracellulaire de TM7 reste principalement inactive (très peu mobile) avec d_{I-S} **< 0,8 nm** et d_{L-P} **~ 1,1 nm**, typique d'un état inactif comme énoncé dans le **Chapitre I** (***Figure 11***) mais,
- Y426 est majoritairement inclinée puis,
- le "verrou ionique" est absent (d > 0,45 nm, **Annexe 10**).

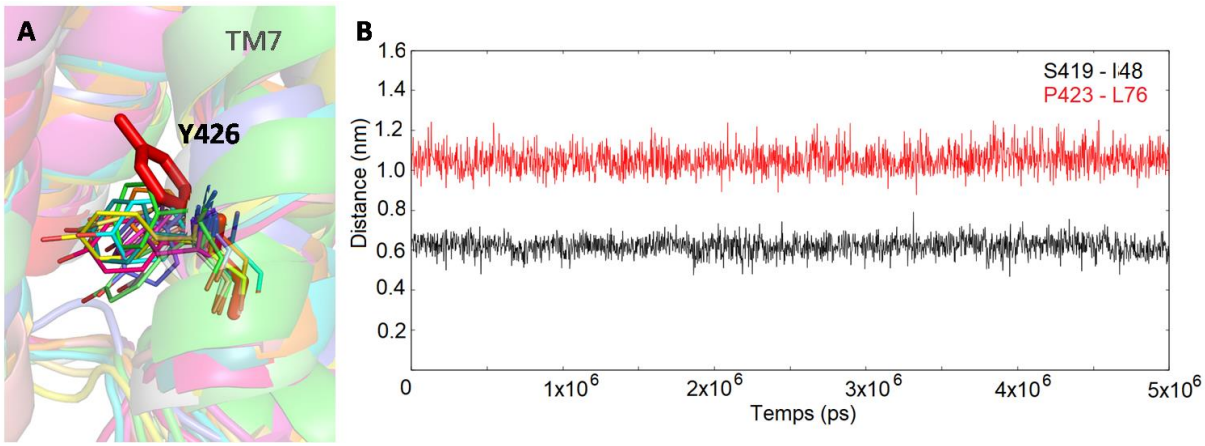


Figure 53 A) Superposition de diverses orientations adoptées par Y426 et **B**) graphe des distances permettant de caractériser la mobilité de l'hélice TM7 qui diffère selon l'état du récepteur.

Le troisième critère qui permet de déterminer l'état d'un RCPG est le coeur de triade, et ce dernier conduit à la même conclusion. Le fait que **I122**, **P201** et **F382** ne conservent pas tous les trois une configuration inactive ou active (**Figure 54**) illustre que la présence du LPI ne favorise aucun des états principaux mais induit bien un équilibre entre un état inactif et des états intermédiaires. Cependant, l'**Annexe 11** démontre que ce trio est peu dynamique.

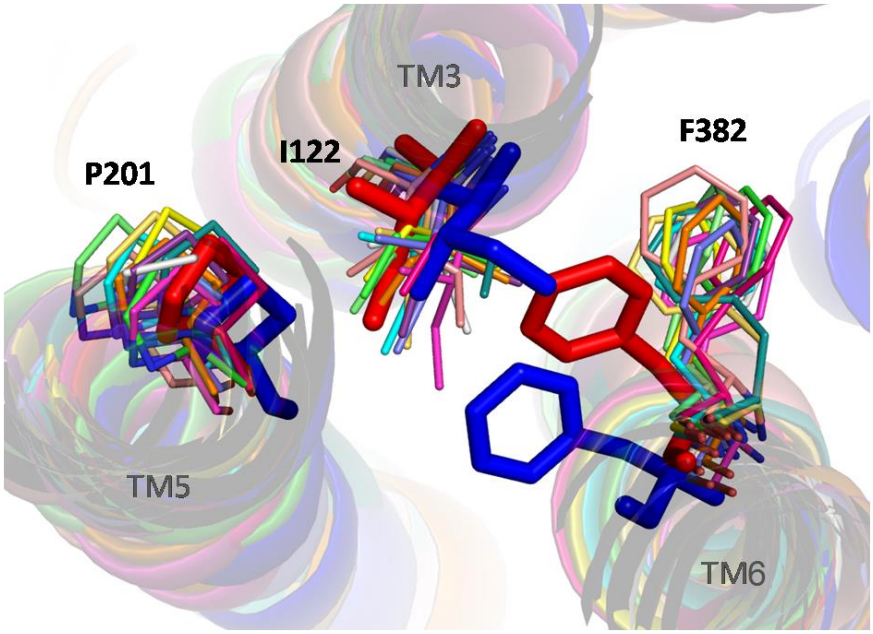


Figure 54 Superposition du cœur de triade sur les structures cristallographiques de la β2AR active (bleu foncé) et le RD2 inactif (rouge). I122 se positionne parfois comme l'isoleucine de la β2AR, alors que P201 et F382 affichent clairement une organisation type inactive sans jamais « s'activer ».

Lorsqu'on se penche sur le site de liaison, **I184** et **W100** interagissent moins ensemble car ce dernier se déplace parfois entre TM2 et TM7 (**Figure 55**). **V91** et **F110** se rapprochent de la cavité centrale de RD2 et **L94** dû à une très grande flexibilité s'oriente vers l'extérieur de la protéine (**Figure 55A**). Avec **Y408** dirigé vers les hélices et TM6 approchée de TM3, le site étendu n'existe pas. Le réarrangement de l'hélice TM6 conduit par moment **F390** à interagir avec F202 et Y119, et **W386** à bloquer le prolongement de la poche de liaison (**Figure 55B**).

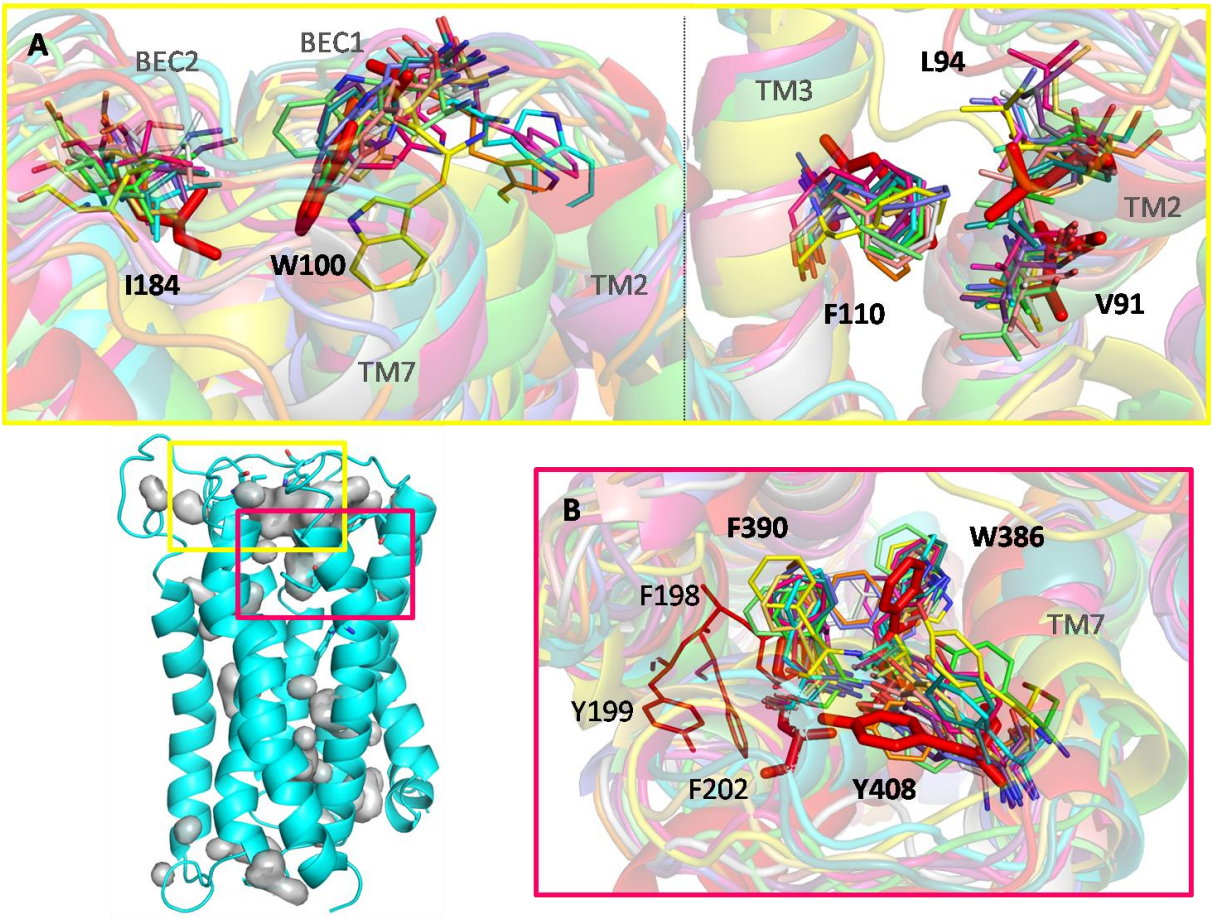


Figure 55 Superposition des résidus impliqués ou jouant un rôle dans la liaison du ligand. La structure en *cartoon* cyan expose le site de liaison en fin de dynamique. **A**) Acides aminés en contact avec le ligand (site orthostatique) et **B**) ceux participant au prolongement de *EBP*.

Outre cette réorganisation au sein de la protéine, il a été possible de déterminer les localisations où vient fréquemment se fixer le DHA-PC. En effet, il a été décrit dans la littérature que les RCPG, et notamment la rhodopsine et β2AR, affichent des régions spécifiques au DHA (*cf* ***Chapitre I*** - *sous-partie* ***IV.3***). Ainsi, la **Figure 56** désigne les hélices **TM4, TM3 et TM5**, voire TM2 comme étant celles préférentiellement contactées par le LPI et précisément la région intracellulaire de TM4 et TM5, et la région extracellulaire de TM2 et TM3 (**Figure 56B**).

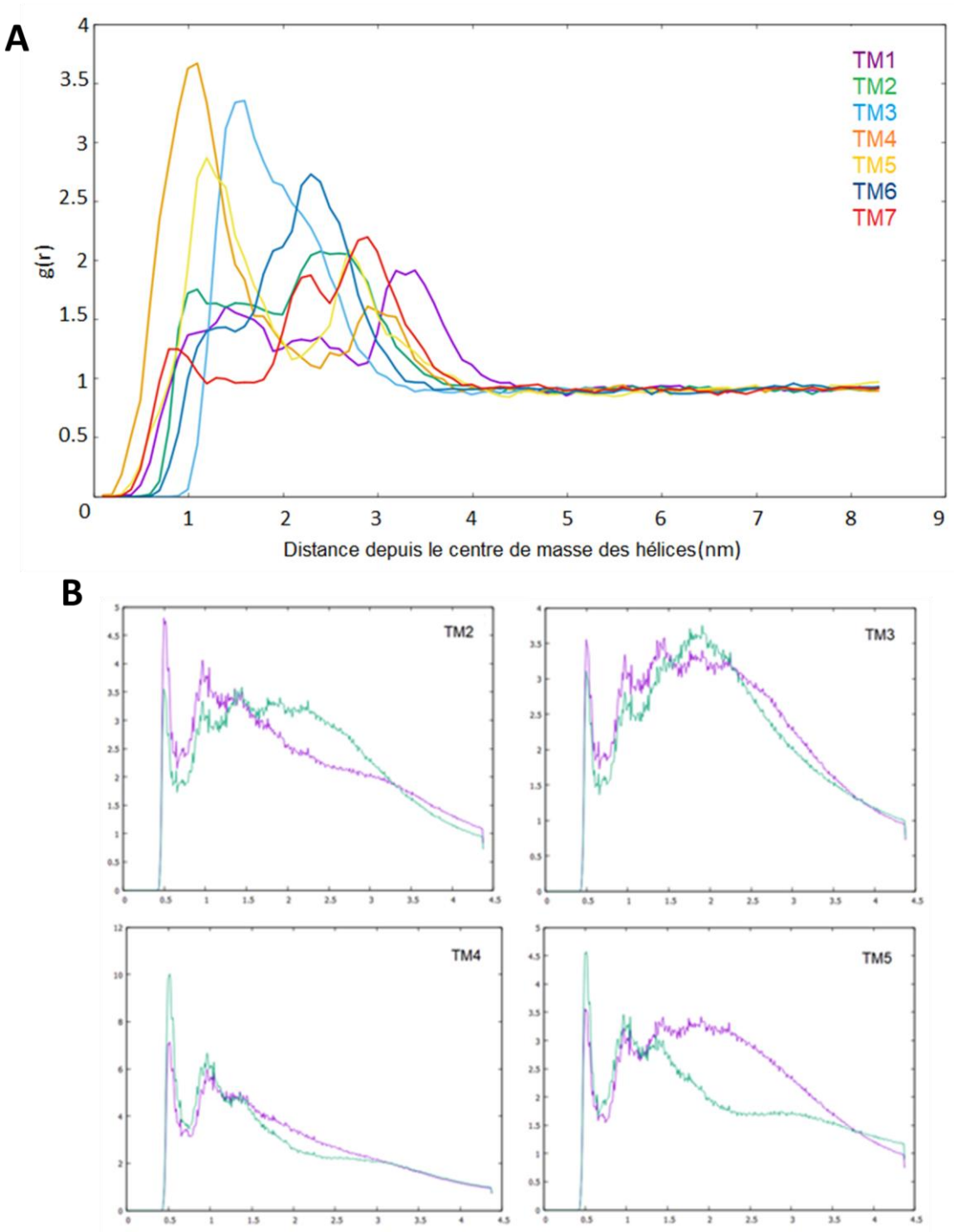


Figure 56 A) Distribution radiale (g(r) est la fonction radiale) de DHA-PC par rapport au centre de masse de chaque hélice. Le résultat peut être interprété comme la probabilité de présence du LPI. *Plus la courbe est haute, plus il y a de molécules de DHA-PC, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée : on voit sur le graphe qu'il y a un plus grand nombre de DHA-PC qui interagit avec TM4 (orange)*. **B**) RDF de DHA-PC par rapport à la surface de chaque extrémité (extracellulaire/ intracellulaire) des hélices. On retrouve en abscisse, la distance (en nm) et en ordonnée, la fonction g(r) (« probabilité de présence »). Les résultats du calcul par rapport à la région extracellulaire des hélices apparaissent en violet, et ceux par rapport à la région intracellulaire en vert.

II.2 Membrane constituée de POPC et 5 % de DDHA-PC

Par cette étude, nous verrons comment se comportent le LPI en présence du RD2 (agrégation ou non) et la protéine sous l'effet de lipide doublement insaturé. La visualisation de la trajectoire montre que, dans un premier temps, les molécules de DDHA-PC viennent se regrouper autour de la protéine avant de s'auto-assembler totalement sur une "face" (**Figure 57A**). La mesure des épaisseurs de la membrane et de l'agrégat montre qu'elles ne changent pas : e.b = **3,8 nm** ($e.b_{DDHA}$ = 3,79 nm) et $e.b_{agrégat}$ = **3,67 nm** ~ 3,62 nm (**Figure 57B** et *cf* ***Chapitre III*** - *sous-partie* ***II.1***). L'aire par lipide de la bicouche a été déduite à environ **6,95 nm²** (A_{DDHA} = 6,83 nm²) et le paramètre d'ordre de DDHA-PC à **0,053**, ce qui signifie qu'il n'a pas d'orientation propre ainsi cette région est fluide.

La protéine assemblée à ce domaine de DDHA-PC est dynamique (<RMSD> = **0,30 nm**) et cela se rapporte à la flexibilité de **TM1** et **TM5**-7 (**Figure 57C** et **D**) et de la mobilité des résidus **H393^{TM6}**, **F390^{TM6}**, **E368^{TM6}** et **W413^{TM7}** (**Annexe 5**).

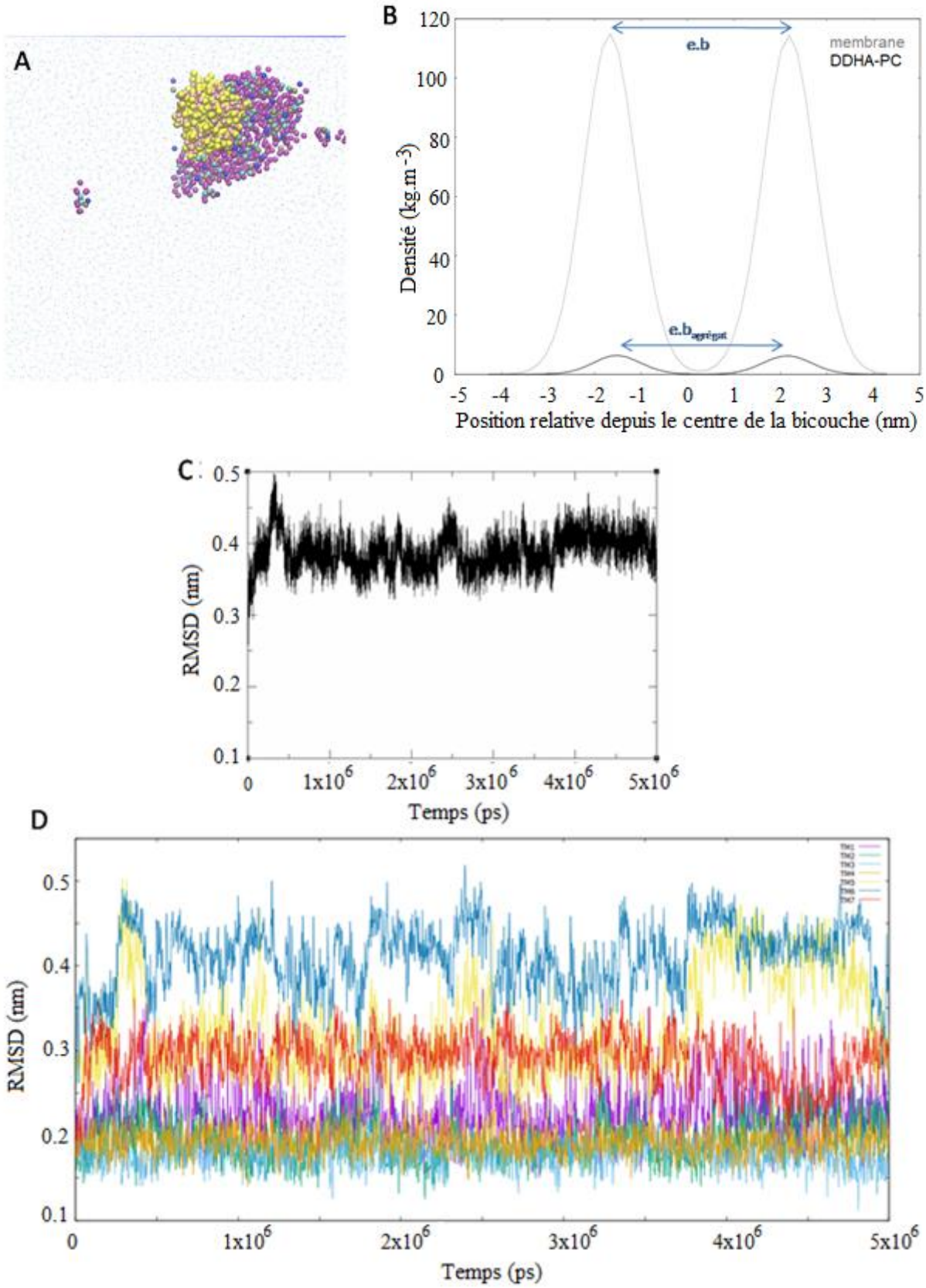


Figure 57 A) Vue de dessus du système final après 5 µs de simulation (le POPC est représenté en point), **B**) superposition des graphes de densité des deux bicouches, soit la membrane (POPC + DDHA-PC) et la bicouche de DDHA-PC (agrégat), sur lesquels on détermine l'épaisseur (le calcul s'effectue sur la même base que celle indiquée en **Figure 44**), **C**) RMSD du récepteur et **D**) RMSD des hélices.

Malgré les fluctuations marquantes visibles sur les graphes de RMSD (**Figure 57C** et **D**), le récepteur ne passe par l'état actif. L'évolution de la distance L_G (**< 1,2 nm**) au cours du temps valide cette observation (**Annexe 12**). Les calculs de la distance entre les extrémités des acides aminés R132 et E368 (**Figure 58A**) et des distances d_{I-S} et d_{L-P} (**Figure 58B**), confirment également la réflexion précédente et le fait que RD2 adopte plusieurs états intermédiaires dont l'inactif parfois. On peut aussi s'appuyer sur l'analyse du coeur de triade qui expose une dynamique moindre de **I122**, **P201** et **F382** avec F382 qui semble toutefois être plus mobile (**Figure 58C** et **Annexe 13**).

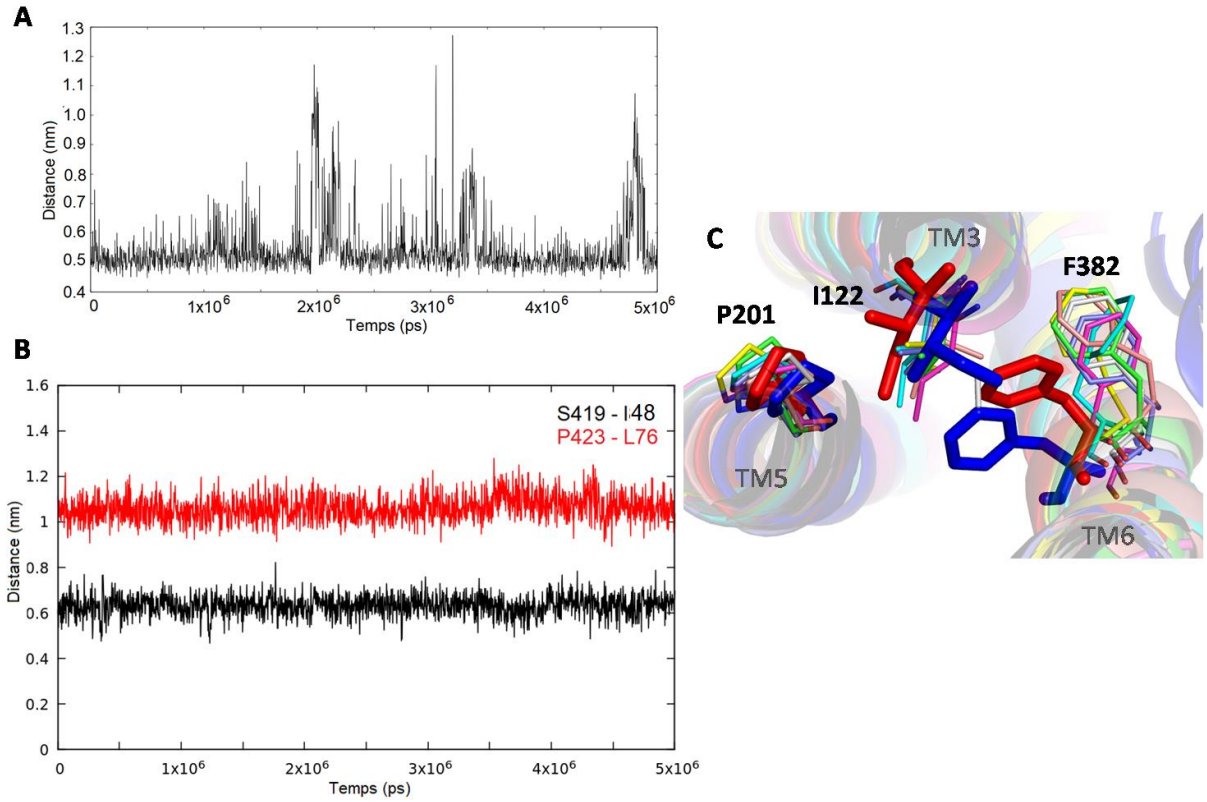


Figure 58 Graphes montrant l'évolution de **A**) la distance L_G, **B**) distances d_{I-S} et d_{L-P} et **C**) états du cœur de triade.

Démuni de ligand, le site orthostérique retrouve sa taille "initiale" : on a d'une part **W386** et **Y408** qui s'orientent de manière à obstruer la cavité (**Figure 59A**), **F110** qui restreint la poche en se rapprochant du coeur de la protéine (**Figure 59B**) et **I184** et **W100** qui se maintiennent leur position au-dessus du site avec W100 qui peut être déplacée vers TM2, ce qui crée un accès au site de liaison (**Figure 59C**). La restriction de la poche étendue est également causée par la rotation de TM6, qui amène **F390** à se réarranger vers l'extérieur de RD2 pour établir un contact avec F202 et Y119 (**Figure 59A**).

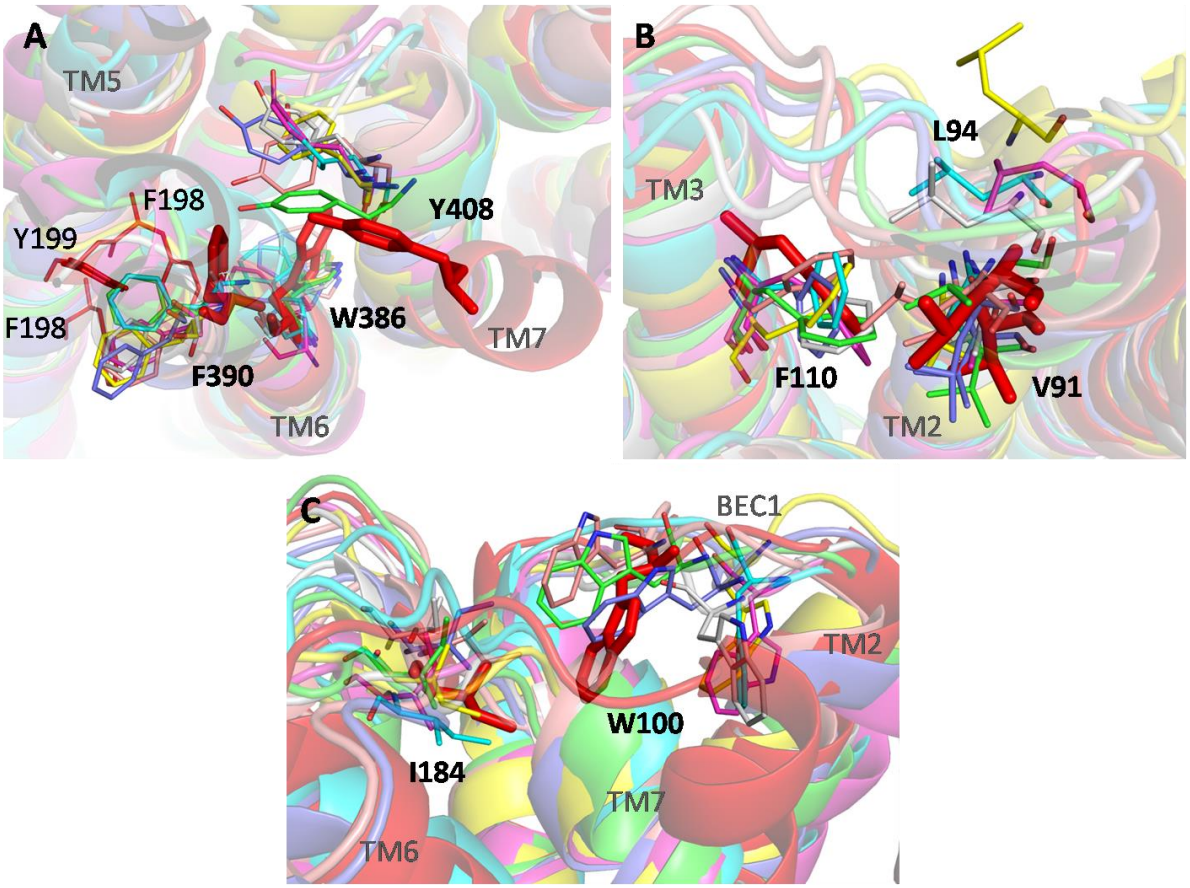


Figure 59 Arrangements des résidus possédant un rôle dans la liaison du ligand (**A**) et du site orthostérique (**B** et **C**).

Concernant les interactions LPI-RD2, le calcul du RDF de chaque hélice par rapport au centre de masse de la protéine indique que **TM4, TM3, TM2 et TM1** sont fortement en contact avec DDHA-PC (**Figure 60**). Il s'agit donc de la "face" sur laquelle vient s'auto-assembler le LPI, elle est formée par les hélices TM1-4 qui a été admise comme le site CCM du cholestérol (*cf* ***Chapitre I*** *- sous-partie* ***IV.3***). En analysant indépendamment les régions extracellulaire et intracellulaire des hélices citées, on remarque cependant, que TM4 et TM1 sont occupées au niveau cytoplasmique alors que TM2 et TM3 le sont au niveau extracellulaire (**Annexe 14**).

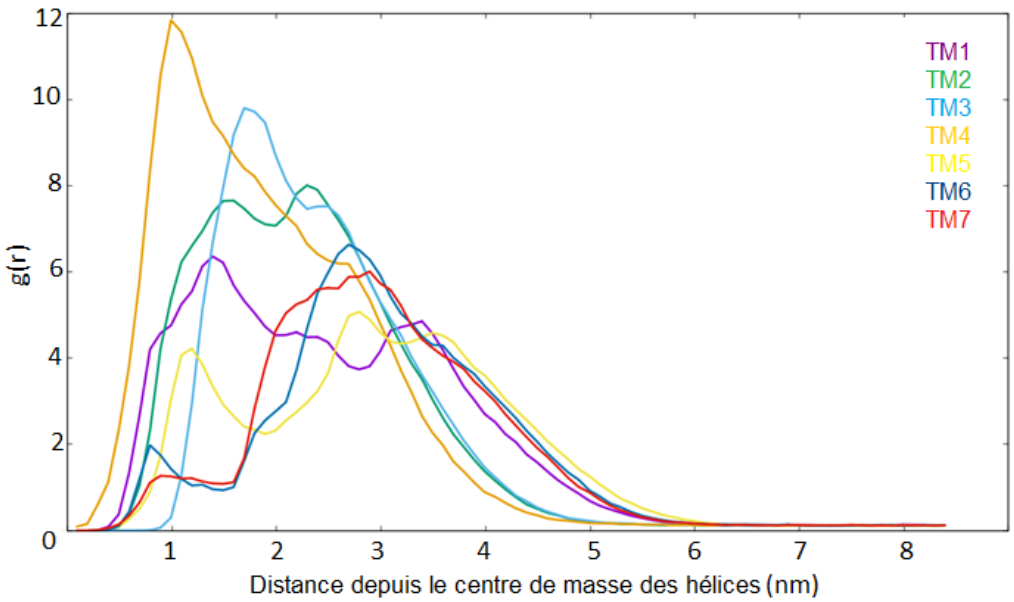


Figure 60 RDF de DDHA-PC par rapport à chaque hélice. *Plus la courbe est haute, plus il y a de molécules de DDHA-PC, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

Suite à cette étude et précisément au comportement de DDHA-PC vis-à-vis de RD2 (agrégation préférentielle sur une face), nous avons voulu observer l'influence de la concentration en DDHA-PC sur cet auto-assemblage. Le LPI viendrait-il encercler la protéine ? Pour cela, nous avons itéré cette expérience en partant d'un ratio POPC:DDHA-PC de 75:25 et le résultat est remarquable : tous les lipides du double chaîne oméga 3 s'auto-assemblent sur une "face" de RD2 qui a été déterminée comme celle formée par **TM1-4** (**Figure 61**) et identifiée précédemment.

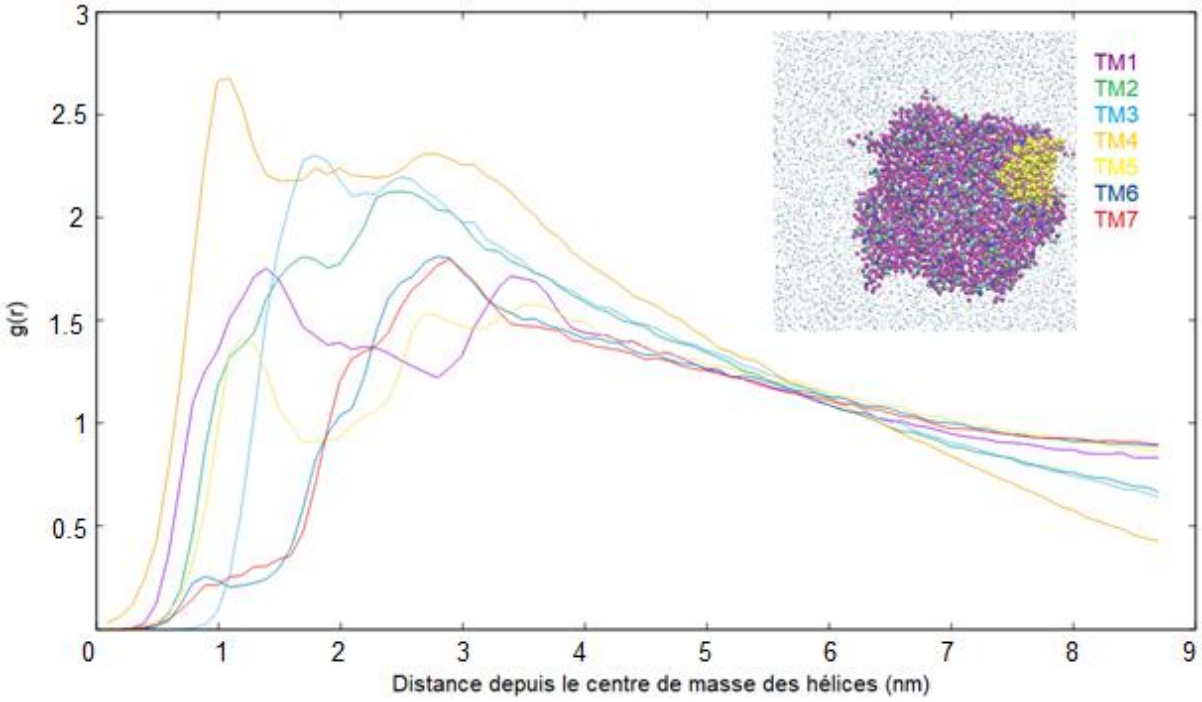


Figure 61 RDF de DDHA-PC par rapport à chaque hélice. *Plus la courbe est haute, plus il y a de molécules de DDHA-PC, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée*. L'image en haut à droite affiche l'état final du système avec les molécules du LPI et le RD2 en sphères et POPC en point.

II.3 Membrane constituée de POPC et 5 % de DPA-PC

Dans le cas du simple chaîne oméga 6 dont le comportement est semblable à celui du simple chaîne oméga 3, on observe également des interactions transitoires. L'épaisseur de la membrane est comparable à celle constatée en l'absence de la protéine (**3,87 nm**, e.b_{DPA} = 3,87 nm, **Figure 62**) et il en est de même pour l'aire par lipide : <A> = **7 nm²** (A_{DPA} = 6,83 nm²). Bien que certaines caractéristiques n'aient pas été modifiées, on s'est intéressé à l'organisation du DPA-PC. Le calcul du paramètre d'ordre affiche une valeur de <P> égale à **0,146**, ce qui signifie que les lipides s'arrangent de manière à maximiser les contacts hydrophobes entre les queues.

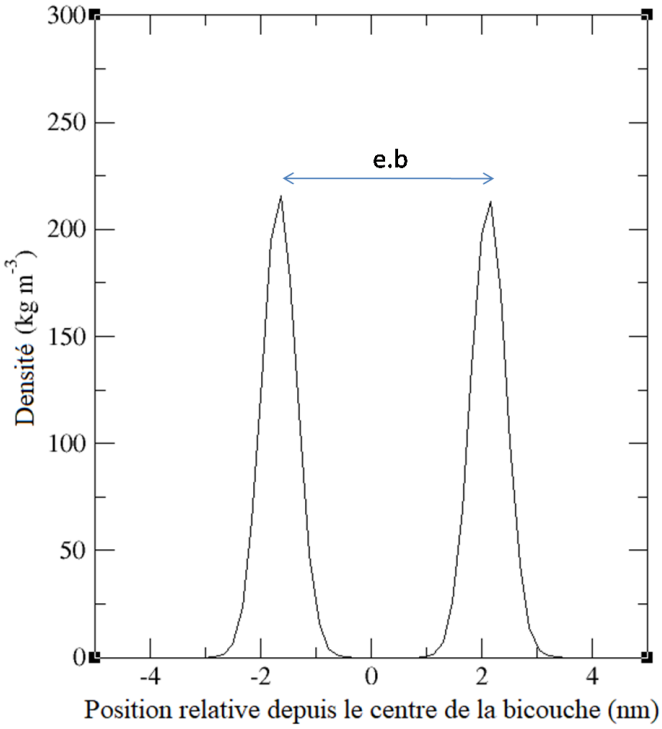


Figure 62 Epaisseur de bicouche (e.b). Le calcul s'effectue sur la même base que celle indiquée en **Figure 44.**

On a énoncé précédemment que la transformation inverse permet de revenir à une structure détaillée afin d'effectuer des analyses précises. Ainsi, la superposition de certaines structures affiche une mobilité des hélices TM5-7 mais TM6 ne présente aucune rotation qui traduirait l'activation du RCPG (**Figure 63A**). Lorsque l'on mesure le RMSD de la protéine, on obtient un graphe qui expose de légères fluctuations qui témoignent de sa dynamique (<RMSD> = **0,29 nm**, **Annexe 15**) et l'analyse individuelle du comportement des hélices démontre bien que **TM5**-7 sont les plus actifs (**Figure 63B**). En approfondissant l'analyse, on a déterminé que **H393**^{TM6}, **I397**^{TM6}, **F390**^{TM6}, **E368**^{TM6}, **Y408**^{TM7} et **W413**^{TM7} représentent les résidus les plus mobiles (**Annexe 5**).

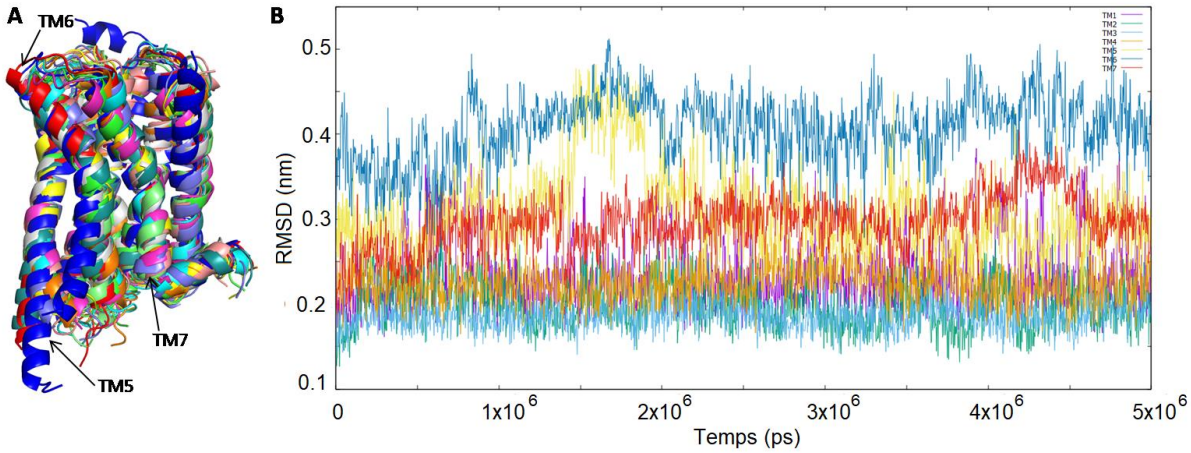


Figure 63 A) Superposition de structures après transformation inverse et **B**) RMSD des hélices : **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6** et **TM7**.

L'extraction et la superposition de structures à différents temps (où les fluctuations sont les plus importantes) donne une première information sur le comportement du récepteur, cependant des études supplémentaires ont dû être réalisées pour confirmer que RD2 ne passe pas par un état actif. Les résultats obtenus sont les suivants :

- L_G < **1 nm** (**Figure 64A**), ce qui atteste que la protéine ne s'ouvre pas au niveau intracellulaire,
- $d_{I\text{-}S}$ < **0,8** nm et $d_{L\text{-}P}$ ~ **1,1 nm** (**Figure 64B**), ces données affirment que la région $NPxxY^{TM7}$ ne se rapproche pas du coeur de la protéine (caractéristique de l'état activé).

Néanmoins, en présence de DPA-PC, le récepteur n'est pas stabilisé dans sa forme inactive mais se retrouve en équilibre entre un état inactif et des états intermédiaires. La **Figure 63A**, l'évolution de la distance entre les grains SC de R132 et E368 ("verrou ionique") au cours du temps (**Annexe 16**), le RMSD des acides aminés du coeur de triade (**Annexe 17**) et l'orientation de **Y426** (**Figure 64B**) valident cet équilibre.

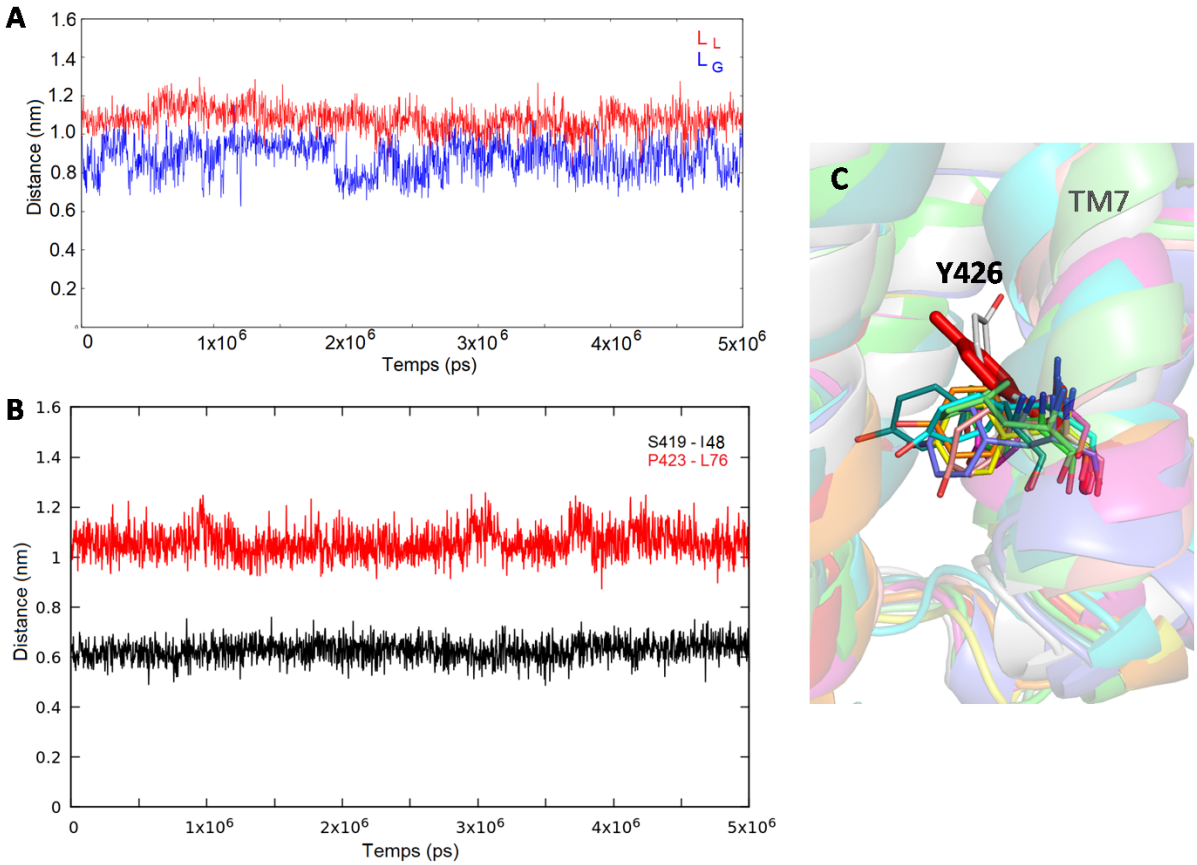


Figure 64 Evolution au cours du temps des distances entre les hélices **A**) TM3 et TM6 (L_G) et **B**) TM7 (S419, P423) et TM1 (I48) et TM2 (L76). En **C**) on perçoit la superposition du motif NPxxY de RD2 qui expose diverses configurations adoptées par Y426.

En absence de ligand, le site de liaison ne s'étend pas parce que **W386** reste dans une orientation qui rétrécit la cavité (**Figure 65A**). Puis **Y408** ne stabilise plus l'hélice TM6 puisqu'elle est dirigée vers le *bundle* et **F390** est déplacée par moment vers les lipides (**Figure 65A**). Concernant les résidus impliqués dans la liaison du ligand, **F110** se rapproche du coeur de la protéine ainsi que **V91** (*cristallisée*) (**Figure 65B**), la BEC2 (**I184**) demeure au-dessus du site alors que BEC1 est mobile, ce qui conduit **W100** à se retrouver parfois proche de TM1 et TM7 (**Figure 65C**). De même pour **L94**, l'acide aminé n'ayant pas de molécule avec laquelle interagir est très dynamique (**Figure 65B**).

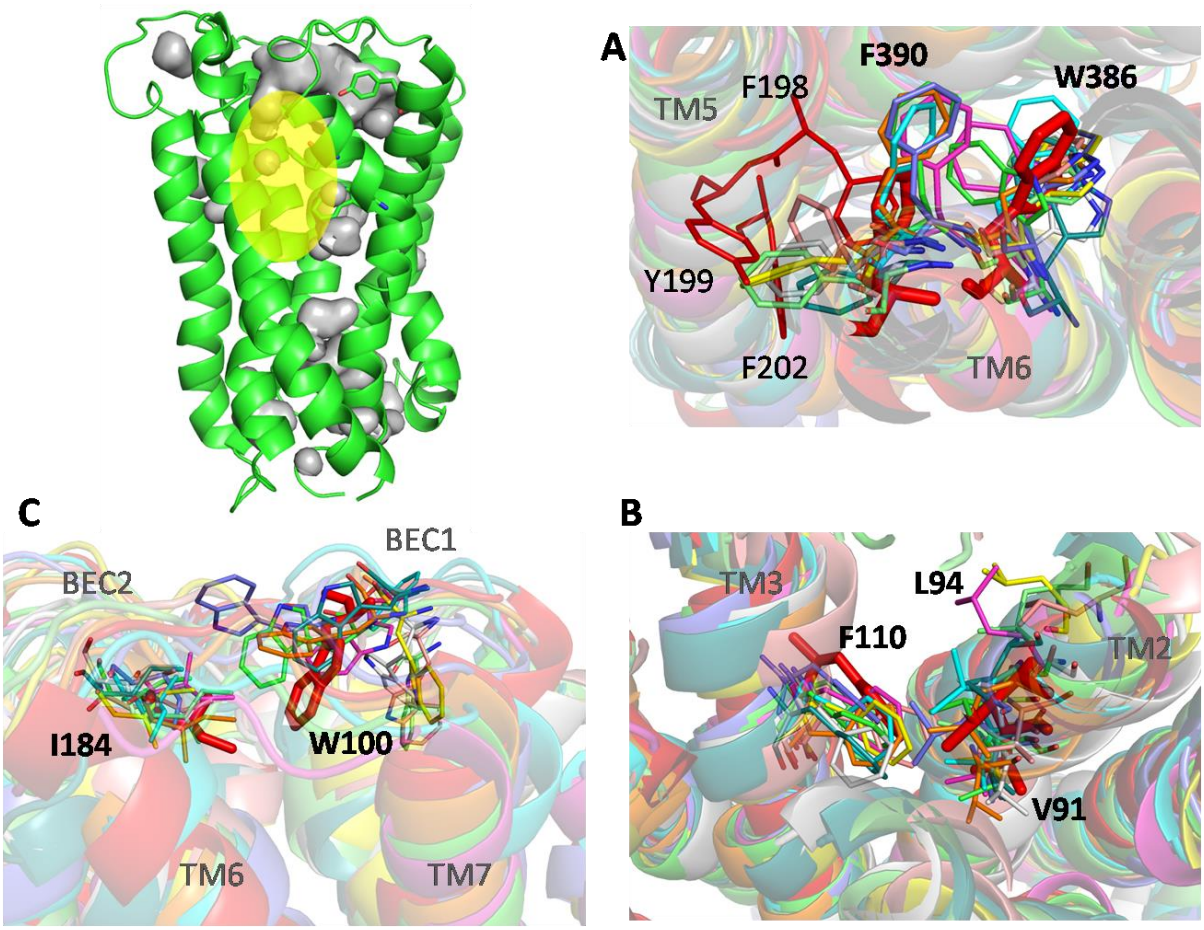


Figure 65 Etat du site de liaison. *EBP* a disparu comme on peut le voir en *haut à gauche* : cette poche étendue était localisée au niveau de la zone en surbrillance jaune (les cavités vides au sein de RD2 sont représentées en surface grise). Réarrangement des acides aminés **A**) jouant un rôle dans la fixation du ligand, **B**) et **C**) définissant le site de liaison.

Comme nous l'avons déjà vu, le DPA-PC ne s'agrège pas autour de RD2. Pourtant, le calcul du RDF du LPI par rapport au centre de masse des hélices montre qu'il occupe fréquemment des régions des hélices **TM4** et **TM5**, voire TM7 et TM1 (**Figure 66**) : région inférieure de TM4 et TM5, et celle supérieure de TM1 et TM7 (**Annexe 18**).

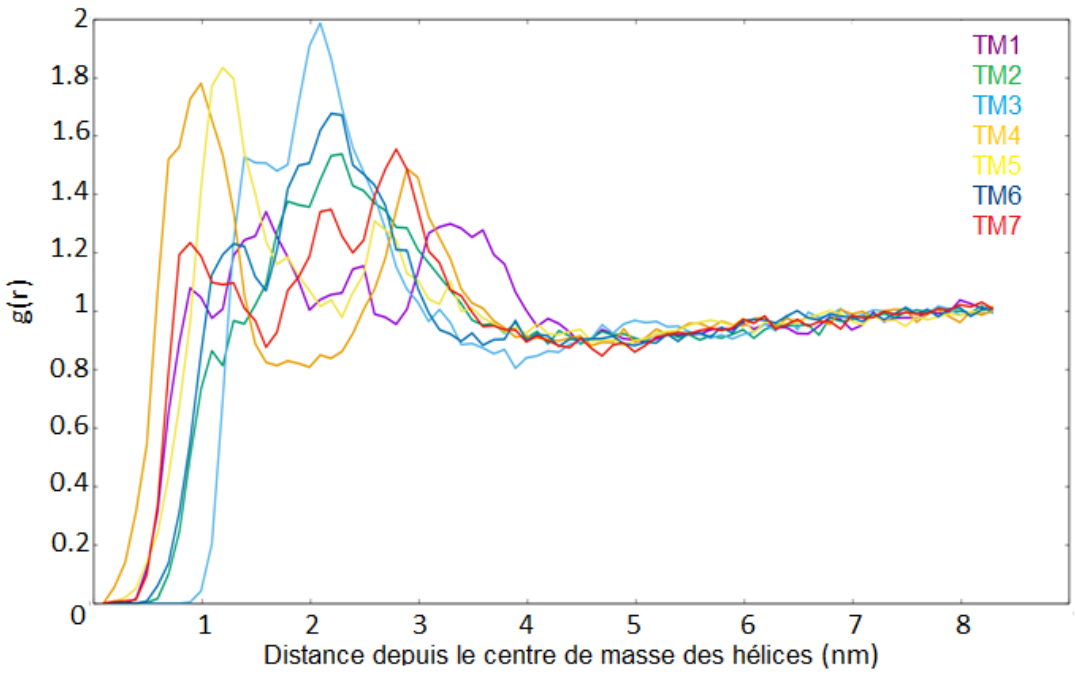


Figure 66 RDF de DPA-PC par rapport à chaque hélice. *Plus la courbe est haute, plus il y a de molécules de DDHA-PC, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

Bien que les résultats précédents permettent de conclure sur la différence « d'affinité » des deux LPI simples chaînes oméga 3 et 6 pour RD2, une étude impliquant une membrane de POPC enrichie en DHA-PC (5%) et DPA-PC (5%) a été lancée afin de justifier cette observation. Le calcul du RDF de chacun des LPI par rapport à chaque hélice démontre bien que DHA-PC interagit davantage avec le récepteur (**Figure 67**).

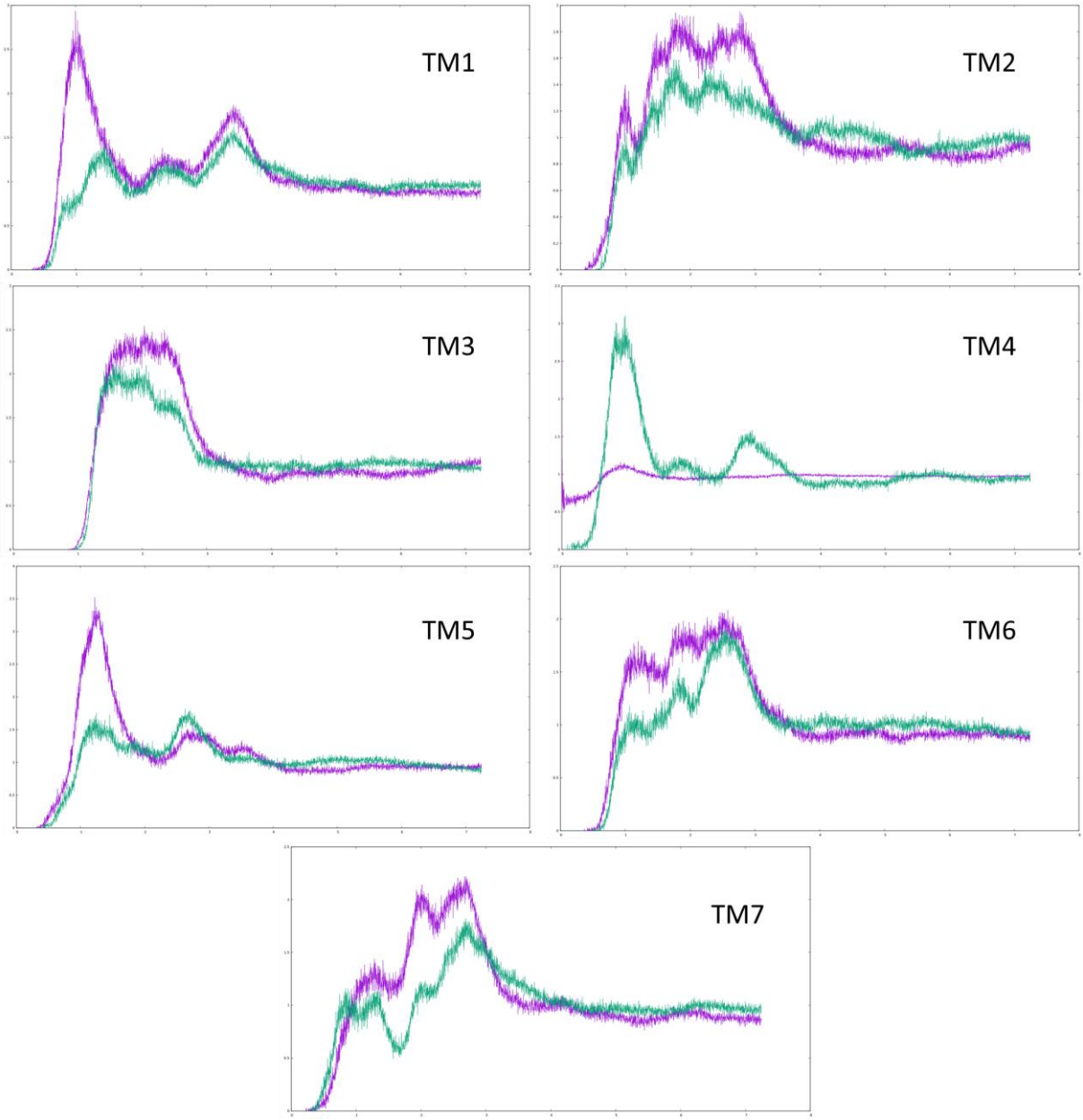


Figure 67 RDF de DHA-PC (violet) et de DPA-PC (vert) par rapport à chaque hélice. On retrouve en abscisse, la distance (en nm) et en ordonnée, la fonction g(r) (« probabilité de présence »).

II.4 Membrane constituée de POPC et 5 % DDPA-PC

La simulation impliquant DDPA-PC révèle que le LPI s'auto-assemble autour du RD2 mais une agrégation totale n'est jamais observée (**Figure 68**). Il s'agrège uniquement en petits domaines d'épaisseur **3,93 nm** (**Figure 68**) et dont le paramètre d'ordre vaut **0,075**. Ces amas de LPI se retrouvent dispersés dans la bicouche mais également autour de la protéine.

L'explication pour un tel comportement rejoint celle énoncée dans le **Chapitre III** - sous-partie **II.2**. De plus, le DDPA-PC ne comptant que cinq DL sur chacune de ses chaînes grasses et non six comme le DDHA-PC, il ne pourrait pas s'adapter convenablement à la surface de la PTM parce qu'il serait capable de présenter une conformation susceptible d'interagir correctement avec POPC et les autres molécules de DDPA-PC. La membrane quant à elle, mesure **3,82 nm** (e.b_{DDPA} = 3,81 nm, **Figure 68**) et l'aire par lipide a été déterminée comme pour les autres dynamiques : <A> = **7 nm²** (A_{DDPA} = 6,80 nm²).

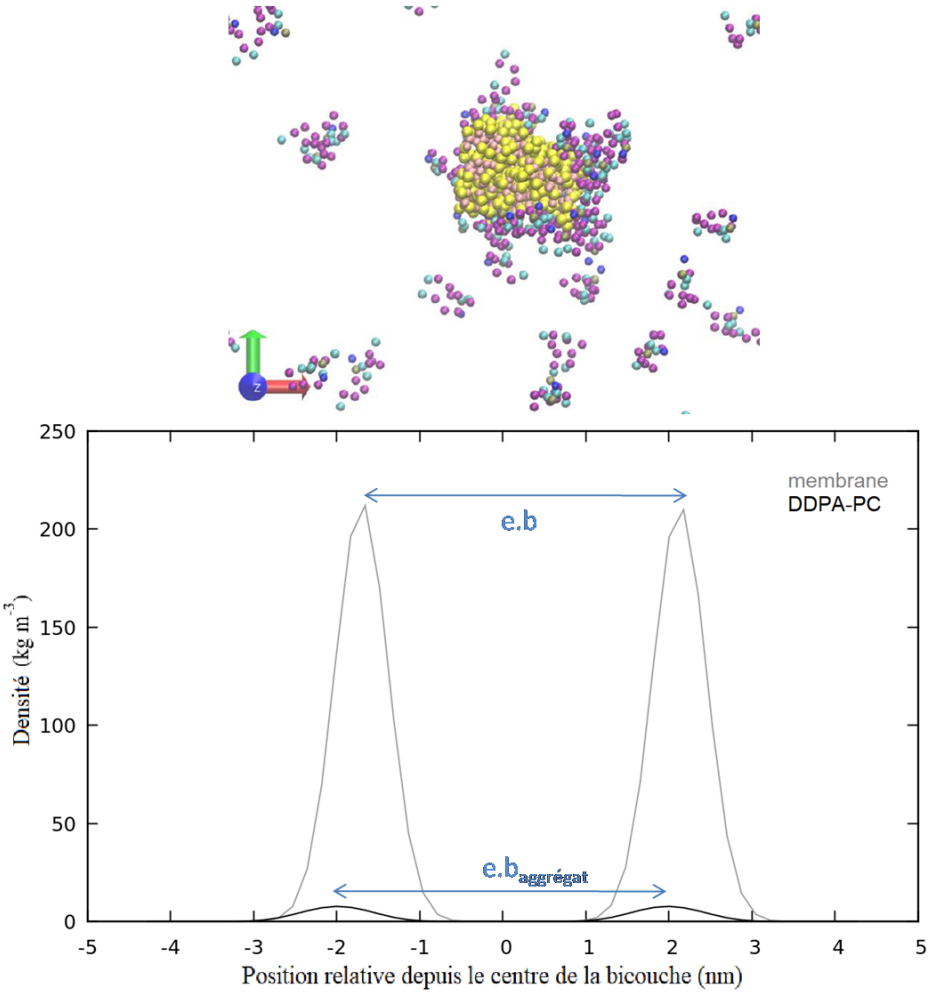


Figure 68 *Vue de dessus, image du haut* : système après 5 µs de dynamique (seul le LPI est visible). L'épaisseur de bicouche et celle des amas sont déduites du graphe du bas (le calcul pour générer les graphes s'effectue sur la même base que celle indiquée en **Figure 44**).

La superposition de certaines structures et le calcul du RMSD de RD2 montrent un caractère assez dynamique de ce dernier (<RMSD> = **0,26 nm**), et que les hélices TM1 et TM5-7 sont les plus flexibles (**Annexe 19**). L'analyse du RMSF conclut que **H393^{TM6}**, **I397^{TM6}**, **F390^{TM6}**

et **W413^{TM7}** fluctuent beaucoup comparé aux autres résidus des mêmes segments peptidiques (**Annexe 5**).

Néanmoins, les résultats attestent de la non-activation de la protéine. Comme précédemment, on a mesuré la distance entre les grains BB des acides aminés qui établissent le “verrou ionique” (R132 et E368) et le graphe en **Figure 69A** affiche aucun changement (L_G < **1,2 nm**), ce qui confirme l’absence d’un état actif. De même pour l’étude des distances d_{I-S} (< **0,85 nm**) et d_{L-P} (**~ 1,1 nm**) qui justifient que la région NPxxY^{TM7} est très peu dynamique (**Figure 69C**).

En s’intéressant à l’orientation des résidus qui caractérisent un état distinct, on remarque que *i*) R132 est mobile mais ne se positionne jamais de manière active, *ii*) E368 adopte différentes configurations (**Annexe 20a**), *iii*) Y426 est majoritairement inclinée (**Annexe 20b**) et *iv*) le coeur de triade opte pour un équilibre entre la forme active et la forme inactive (**Annexe 20c**).

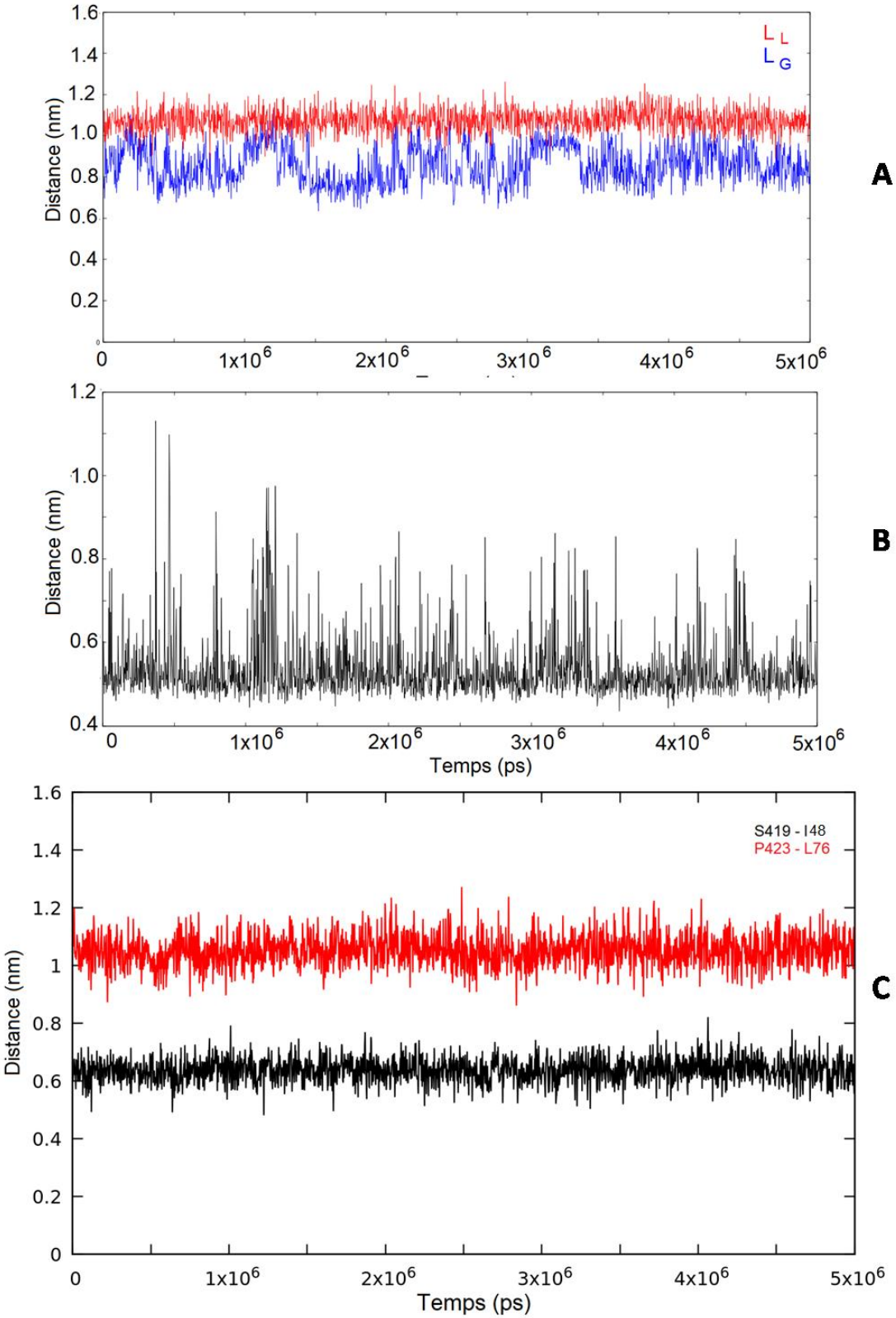


Figure 69 Evolution des distances entre **A**) les grains BB des résidus établissant le « verrou ionique » et définit comme la longueur L_G, **B**) les grains SC des résidus du « verrou ionique » qui justifie l'absence de ce dernier par moment et **C**) TM1, TM2 et TM3.

Comme nous pouvions nous en douter, le site de liaison concerne seulement la région supérieure de RD2 lorsqu'aucun ligand n'est dans le milieu : **W386** et **Y408** rendent étroite la cavité de par leur réorientation (**Figure 70A**), la rotation de TM6 qui conduit à son rapprochement vers TM3 entraîne **F390** à s'avancer vers le coeur de RD2 (reste en contact avec F198) mais également à interagir avec Y199 et F202 (**Figure 70A**) et **F110** est renvoyée vers l'intérieur du récepteur ainsi que **V91** (**Figure 70B**). **L94** et **W100** sont très mobiles d'une part dû à la longueur de leur chaîne latérale et d'autre part, W100 est localisé sur BEC2 qui présente une liberté de mouvement : on observe donc plusieurs positions pour ces deux résidus (**Figure 70B** et **C**).

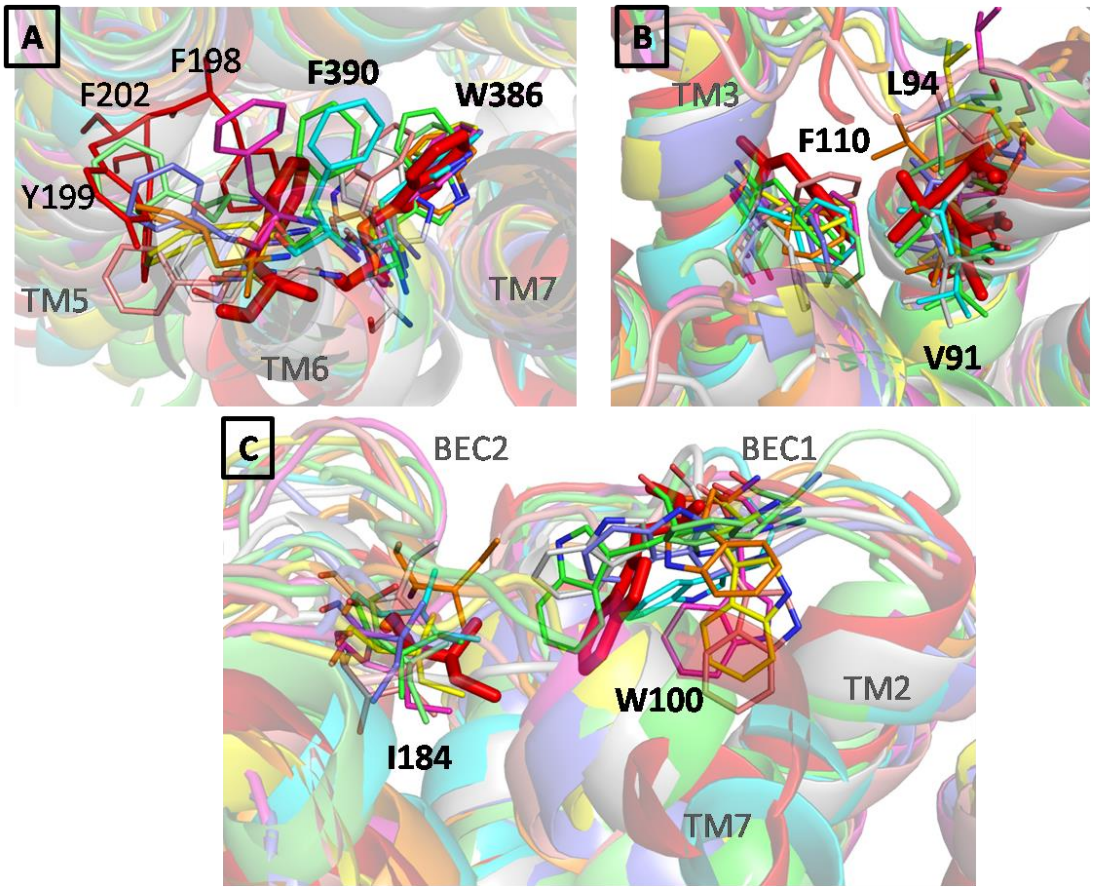


Figure 70 Conformations adoptées par les acides aminés impliqués **A**) dans le prolongement de *EBP*, **B**) et **C**) dans la liaison du ligand.

Il est difficile d'identifier visuellement les hélices avec lesquelles interagit le DDPA-PC. De fait, on a procédé au calcul du RDF du LPI par rapport au centre de masse de chaque hélice (**Figure 71**). Les graphes acquis et superposés démontrent que DDPA-PC entre

majoritairement en contact avec **TM4, TM2, TM5** et **TM1** et notamment la région intracellulaire de TM4 et la région extracellulaire de TM2, TM5 et TM1 (**Annexe 21**).

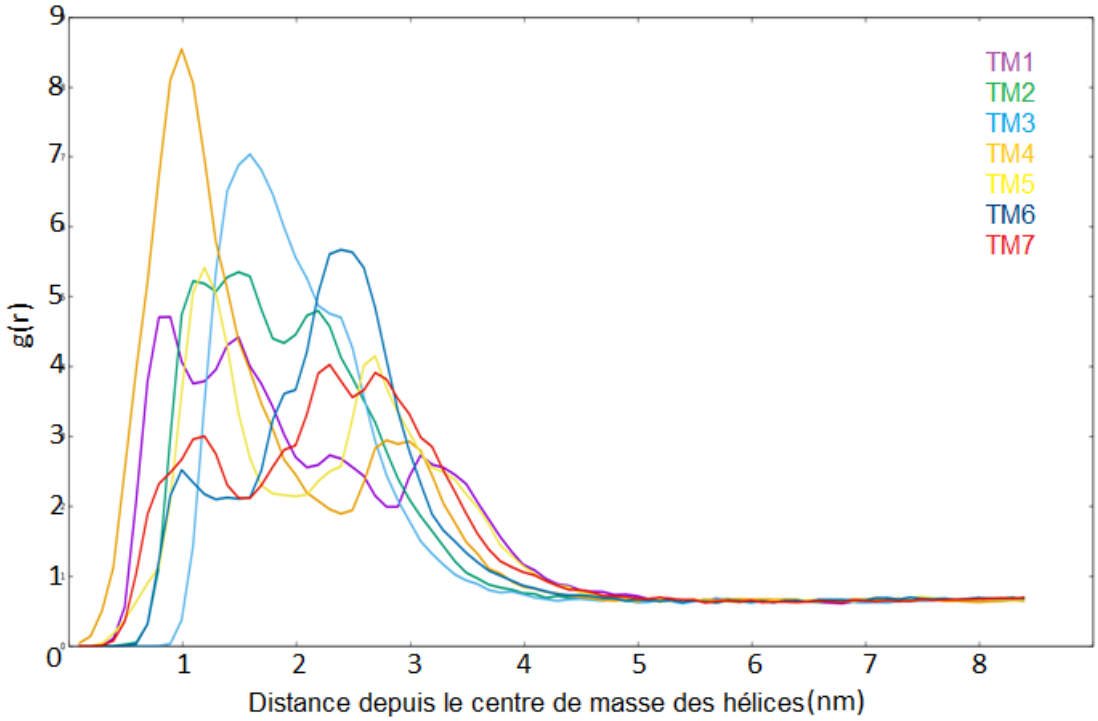


Figure 71 RDF de DDPA-PC par rapport à chaque hélice. *Plus la courbe est haute, plus il y a de molécules de DDHA-PC, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

II.5 Membrane simple de DDHA-PC

Après avoir analysé les simulations précédentes, nous nous sommes posé la question suivante : comment se comporterait le RD2 dans une membrane simple composée de LPI ? Pour répondre à cela, nous avons procédé à une DMGG qui met en jeu le RD2 insérée dans une bicouche de DDHA-PC. Ce LPI a été pris pour l'analyse puisqu'il présente le plus grand nombre d'insaturations, il est donc apte à s'adapter à la surface de la protéine et il interagit fortement avec le RD2 (*cf sous-partie **II.2***).

Après 5 µs de production, le RMSD de la protéine a été calculée et le graphe montre qu'elle est assez dynamique (<RMSD> = **0,26 nm**, **Annexe 22**) et notamment, TM5 et 6 (**Figure 72**). L'analyse du RMSF affiche une grande fluidité pour **H393^{TM6}**, **I397^{TM6}**, **F390^{TM6}**, **E368^{TM6}**, **Y408^{TM7}** et **W413^{TM7}** (**Annexe 22**). On a également déterminé les caractéristiques de la bicouche : e.b = **3,52 nm** (**Annexe 22**), <A> = **9,3 nm²** et <P> = **0,044**. On remarque bien

qu'une bicouche de LPI est moins haute et plus large qu'une membrane constituée majoritairement de lipides saturés.

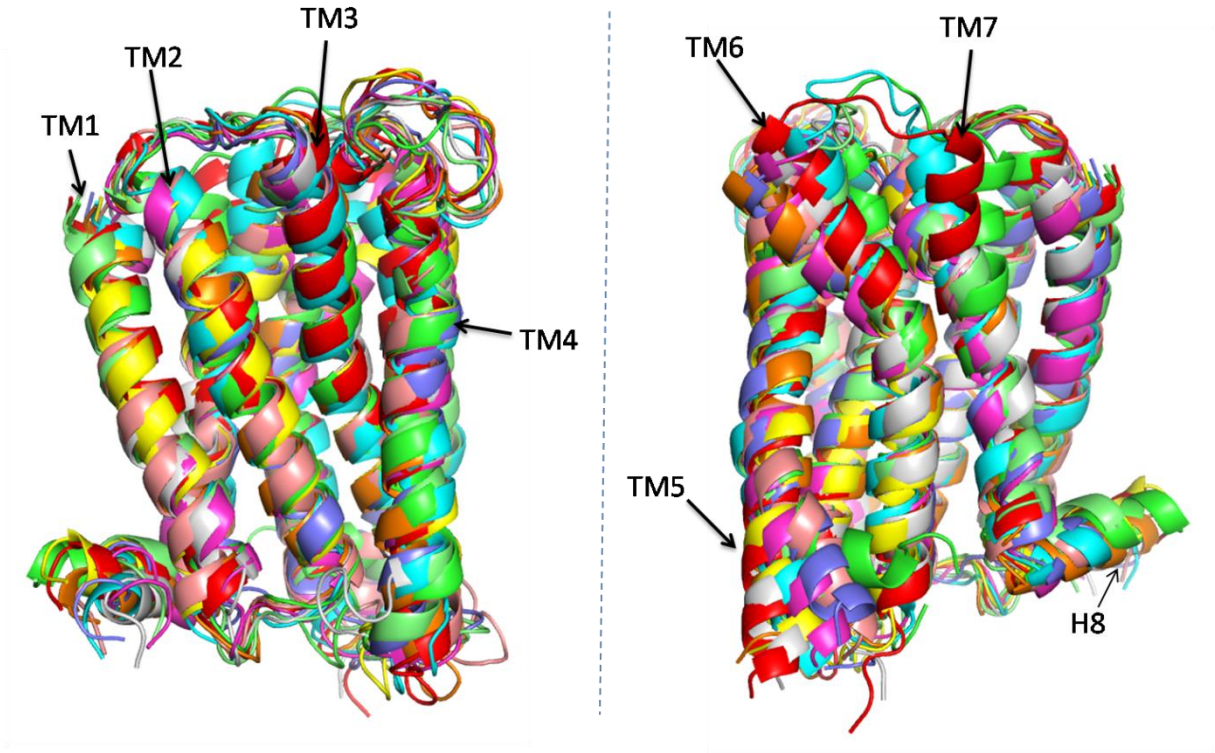


Figure 72 Superposition de structures (après transformation inverse) extraites aux temps où les fluctuations sont importantes (*gauche* : « face » formée par TM1-4 et *droite* : « face » TM5-7).

Lorsqu'on analyse les structures de RD2, aucun mouvement extérieur de TM6 n'est visible donc le RCPG ne passe pas par un état actif dans une membrane purement de LPI. Ce résultat est confirmé avec la mesure de L_G (**< 1,2 nm**, **Figure 73**) et des distances I48-S419 et L76-P423 : $d_{I\text{-}S}$ (**< 0,8 nm**) et $d_{L\text{-}P}$ (**~ 1,1 nm**) (**Figure 73**). Néanmoins, R132 et E368 adoptent différentes orientations qui entraîne la cassure du « verrou ionique » (**Figure 74A**, **Annexe 23**), Y426 maintient rarement un état inactif (**Figure 74B**) et le coeur de triade ne se retrouve pas dans un état spécifique (actif ou inactif) (**Figure 74C**), alors on conclut que RD2 est en équilibre entre une forme inactive et des états intermédiaires.

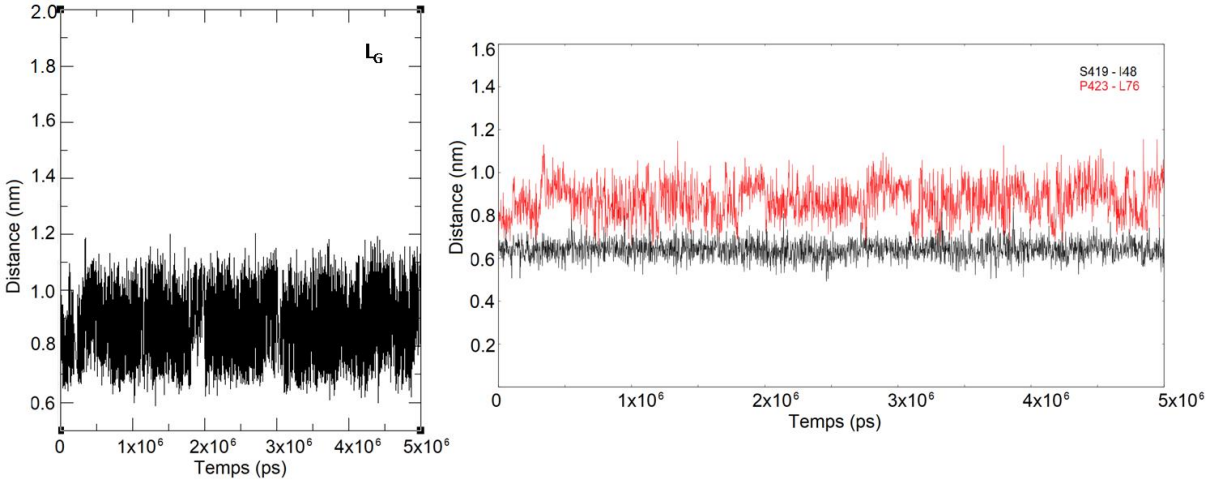


Figure 73 Evolution des distances qui permettent de caractériser l'état dans lequel est RD2.

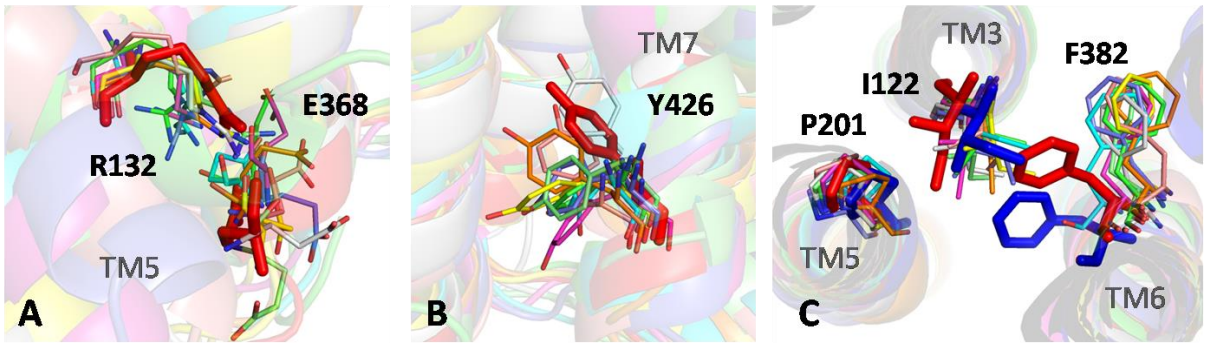


Figure 74 Réarrangement au cours de la dynamique de **A**) résidus établissant le « verrou ionique », **B**) Y426 du motif NPxxY et **C**) cœur de triade : I122 est essentiellement en configuration active contrairement à P201 et F382.

La poche de liaison quant à elle, est rétrécit au niveau du centre de la protéine en raison du réarrangement de **W386** et de la rotation de TM6 qui pousse **F390** à s'orienter principalement vers F202 et Y199 (**Figure 75A**). Une réorganisation des résidus **F110**, **V91** et **L94** impliqués dans la fixation du ligand est également visible : la valine s'approche de la phénylalanine qui vient se loger plus à l'intérieur de RD2 et L94 est très flexible due à une longue chaîne latérale (**Figure 75B**). Il en est de même pour **W100** bien qu'il se positionne majoritairement plus au-dessus du site.

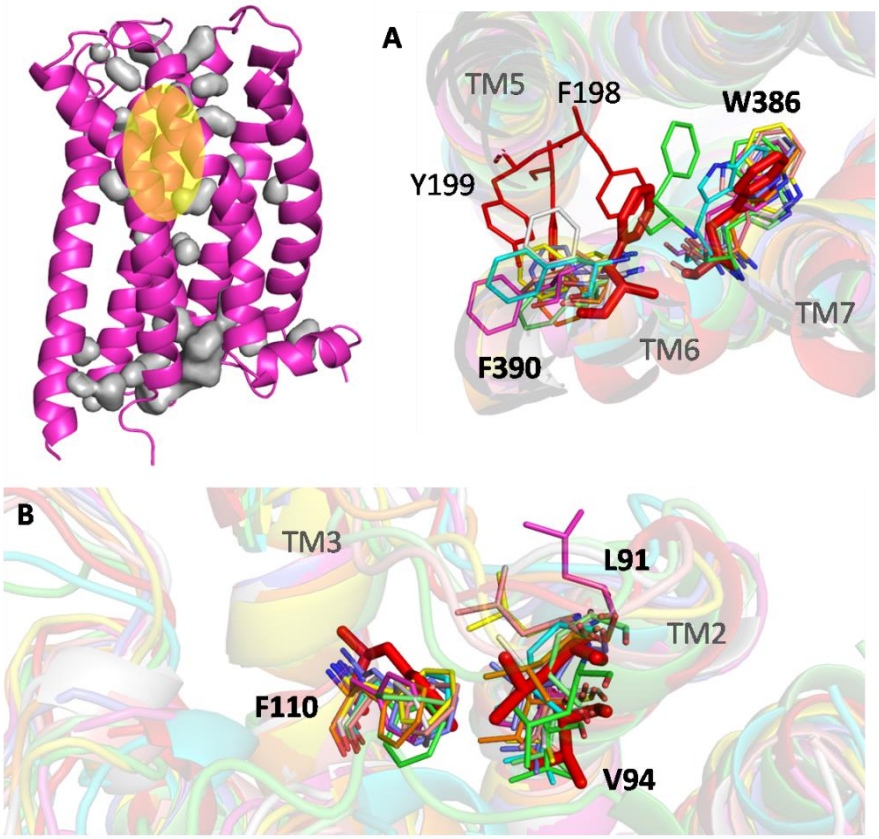


Figure 75 Etat du site de liaison. *EBP* a disparu comme on peut le voir en *haut à gauche* : cette poche étendue était localisée au niveau de la zone en surbrillance jaune (les cavités vides au sein de RD2 sont représentées en surface grise). Réarrangement des acides aminés **A**) jouant un rôle dans la fixation du ligand et **B**) impliqués dans la liaison de ce dernier.

III. Dynamique de RD2 dans une membrane complexe

Dans un second temps, des DMGG en milieu isotropique (pas de membrane préformée) et en présence de cholestérol (10 %) ont été lancées afin d'étudier l'impact du stérol sur **1**. l'assemblage de LPI et la dynamique de RD2 et **2**. son interaction avec ce RCPG.

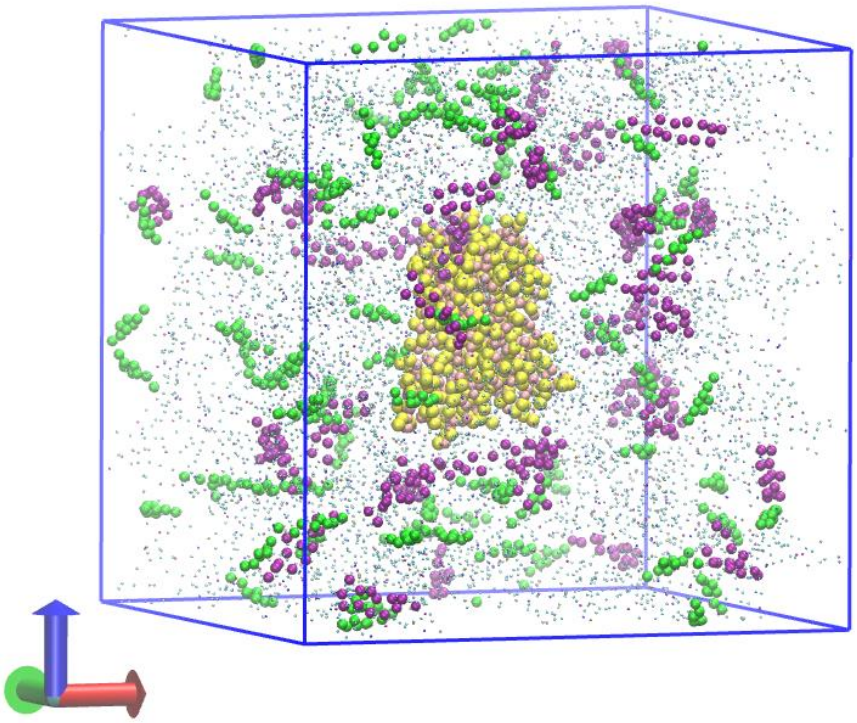


Figure 76 Système initial des DMGG. RD2 (jaune), POPC (point), 5 % d'un LPI (violet) et 10 % de cholestérol (vert) sont placés aléatoirement dans une boîte cubique. *Rappel : les molécules sont plongées dans un milieu aqueux avec des ions qui ne sont pas visibles sur la figure*.

III.1 Effets du cholestérol sur l'état de RD2 en présence d'oméga 3

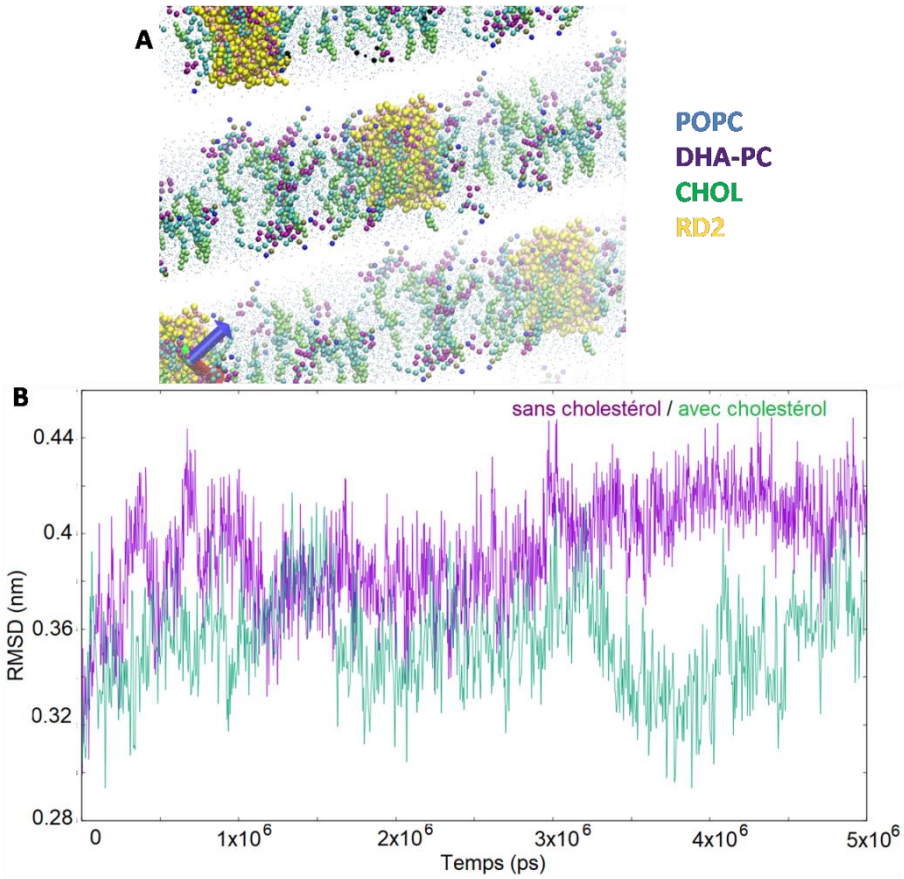


Figure 77 A) Système final après simulation (POPC apparaît en point) et **B**) superposition des RMSD de RD2.

On laisse évoluer les deux systèmes pendant 5 µs avant de procéder aux analyses. La visualisation des trajectoires sous VMD expose deux arrangements apparents suivant la nature du LPI ajouté dans la boîte de simulation : DHA-PC et DDHA-PC.

Le système qui comprend 5 % de DHA-PC s'organise en une bicouche plane (**Figure 77A**) qui intègre correctement la protéine en son sein avec le LPI et les molécules de cholestérol réparties dans toute la bicouche. Ces dernières ne s'agrègent pas autour du récepteur mais interagissent par moment avec lui. RD2 en présence du cholestérol expose une dynamique moindre (<RMSD> = **0,28 nm**, **Figure 77B**). Puis par le calcul du RDF des composés par rapport au centre de masse des différentes hélices, on déduit que le DHA-PC est préférentiellement en contact avec **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM1** et **TM7**, et le cholestérol interagit fréquemment avec **TM4**, **TM1**, **TM7** et **TM5** (**Figure 78**). Cette détermination est en accord avec les données communiquées dans certains articles qui illustrent que le DHA occupe des

sites du cholestérol (*cf* ***Chapitre I***, *sous-partie* ***IV.3***). En examinant plus précisément ces contacts, on a déduit que le DHA-PC se loge dans les sites opposés à ceux du cholestérol à l'exception de la partie cytoplasmique de TM4 et TM7 (**Tableau 8**).

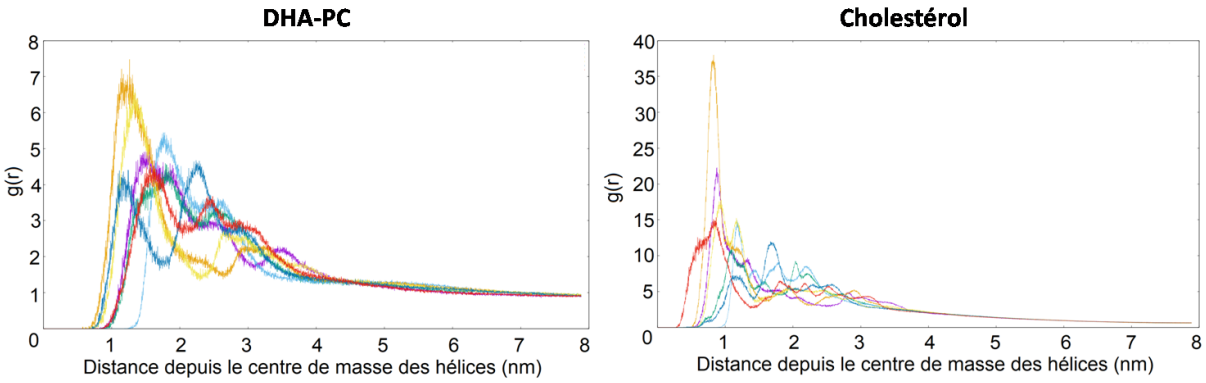


Figure 78 RDF de DDHA-PC et du cholestérol par rapport à chaque hélice (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7). Les données montrent qu'un plus grand nombre de molécules de cholestérol interagit avec RD2 et cela n'est pas surprenant puisqu'il y a plus de stérol que de LPI dans le milieu.

	TM1		TM2		TM3		TM4		TM5		TM6		TM7	
	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i
DHA-PC		*			*			*		*		*		*
Cholestérol				*		*		*	*		*			*

Tableau 8 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DHA-PC et cholestérol) par rapport aux deux régions de chaque hélice (e = extracellulaire et i = intracellulaire). * indique la partie avec laquelle interagit préférentiellement le composé.

La dynamique avec le LPI double chaîne oméga 3 prouve qu'il peut induire une courbure à la membrane et ainsi favoriser le processus d'endocytose. En fin de production, on obtient la formation d'une vésicule qui inclut le RD2 à l'intérieur de la bicouche, le DDHA-PC assemblé sur une face de la protéine et le cholestérol dispersé (**Figue 79A**). Le RMSD de la biomolécule traduit un dynamisme peu important lorsque du cholestérol est ajouté (<RMSD> = **0,27 nm**, **Figure 79B**). On a également effectué le calcul de RDF en vue d'identifier les hélices sur lesquelles vient s'auto-assembler le DDHA-PC : **TM4, TM1, TM2** et **TM7** (**Figure 80**). Le cholestérol, d'après la **Figure 80** s'associe avec **TM4, TM1, TM5** et **TM7**. Il n'est pas surprenant de voir une grande quantité de stérol autour du récepteur et cela s'explique par une concentration deux fois plus importante de cholestérol (10 %) par rapport à DDHA-PC (5 %). Néanmoins, le graphe de *gauche* de la **Figure 80** démontre bien la

formation d'un agrégat proche de RD2 (courbes très larges). Quoi qu'il en soit, le **Tableau 9** met en évidence la compétition entre ces deux composés.

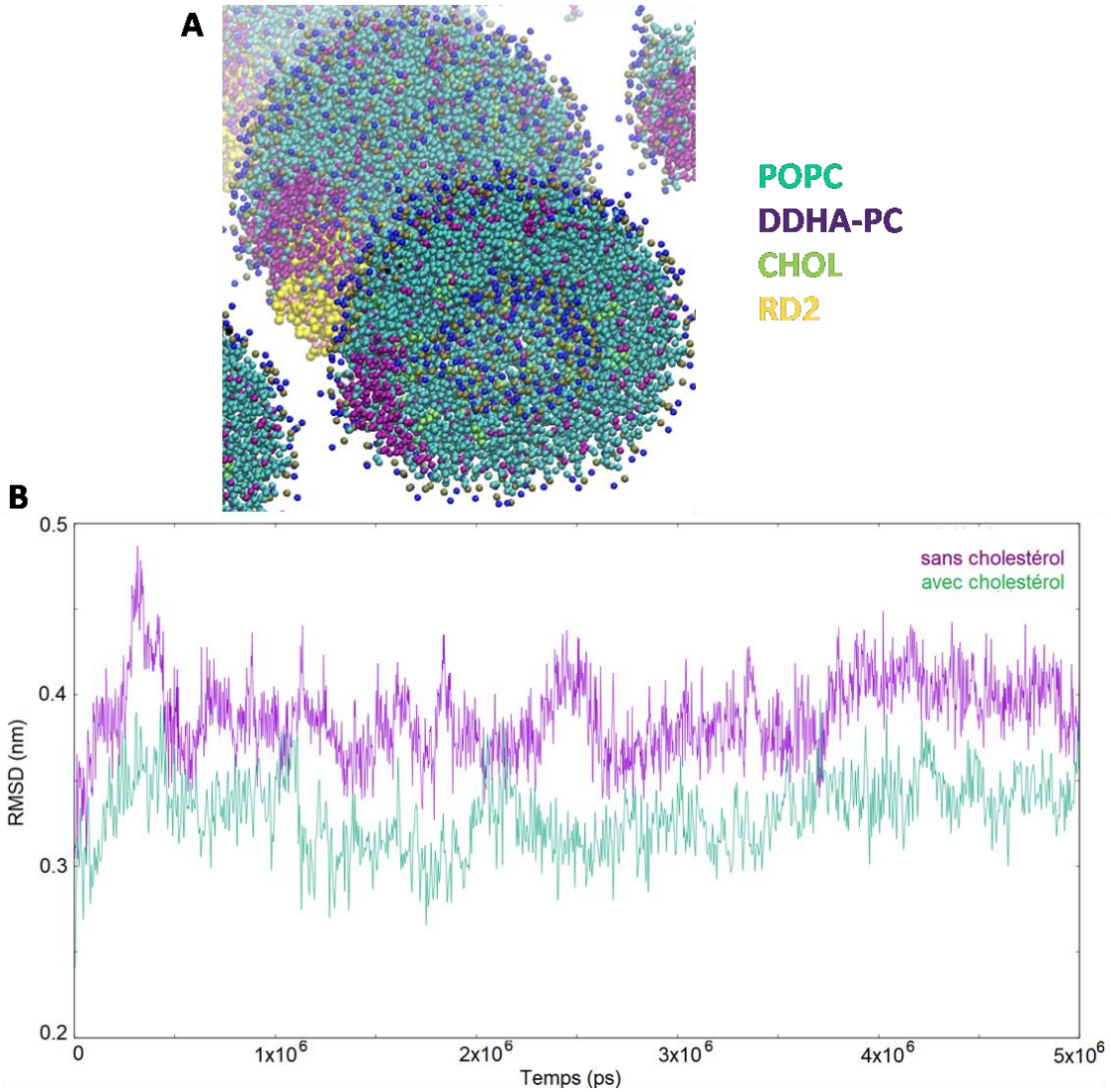


Figure 79 A) Système final : la visualisation avec VMD permet de voir l'intérieur de la vésicule. On notera que plusieurs vésicules sont visibles mais il s'agit de la même qui a été projetée suivant les trois axes xyz : elles sont images les unes des autres. **B)** superposition des RMSD de RD2.

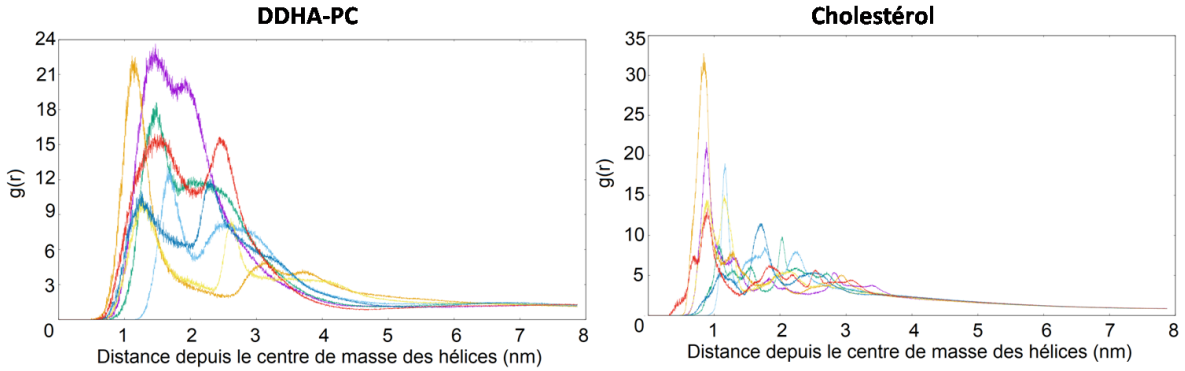


Figure 80 RDF de DDHA-PC et du cholestérol, par rapport au centre de masse de chaque hélice (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7). *Rappel : Plus la courbe d'un graphe est haute, plus il y a de molécules, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

	TM1		TM2		TM3		TM4		TM5		TM6		TM7	
	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i
DDHA-PC				*	*			*		*		*		*
Cholestérol	*		*			*		*	*		*			*

Tableau 9 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DDHA-PC et cholestérol) par rapport aux deux régions de chaque hélice (e = extracellulaire et i = intracellulaire).
* indique la partie avec laquelle interagit préférentiellement le composé.

Cela étant dit, afin de déterminer si les hélices fréquemment en contact avec l'acide gras DHA et le cholestérol ne dépendent pas de la concentration en composés, nous avons réalisé deux DMGG qui font intervenir des membranes type membrane neuronale "saine" et "malade" en s'appuyant sur les données de l'article de Guixà-González *et al.*[80] pour la constitution des bicouches (**Tableau 10**).

Phospholipid (tails)	Healthy (%)	Diseased (%)
DPPC (diC16:0)	21	33
DSPC (diC18:0)	7	15
DOPC (diC18:1)	15	11
SDPC (C22:6/C18:0)	21	6
SM (C18:1/C16:0)	36	36

Tableau 10 Tableau des concentrations lipidiques. Les systèmes contiennent 33 % de cholestérol. *Le composé que nous appelons DHA-PC porte le nom de SDPC.*

Les résultats après 5 µs de simulation dénoncent bien qu'en dépit de la variation de la concentration en DHA-PC *i*) DHA interagit préférentiellement avec les hélices **TM4, TM5, TM6** et **TM7**, et *ii*) le cholestérol occupe fortement les hélices **TM4, TM1** et **TM5** (**Annexes 24 et 25**) comme indiqué dans certains articles et identifié préalablement.

III.2 Effets du cholestérol sur l'état de RD2 en présence d'oméga 6

Les simulations avec les oméga 6 dévoilent des résultats semblables à ceux impliquant les oméga 3, à savoir que le simple chaîne et le double chaîne oméga 6 conduisent à des agencements différents.

Malgré le faible pourcentage de DPA-PC, le système évolue en une vésicule (**Figure 81A**) dans laquelle est intégrée la protéine. Comme attendu, le LPI ne présente que des interactions transitoires avec RD2 ainsi que le cholestérol. On a calculé un RMSD du récepteur de **0,26 nm** (**Figure 81B**), ce qui signifie qu'il est assez dynamique. Suite à cela, on a déterminé les hélices qui sont préférentiellement contactées par DPA-PC et le cholestérol (**Figure 82**) :

- DPA-PC : **TM4**, **TM5** et **TM6**,
- cholestérol : **TM4**, **TM1** et **TM5** voire TM7.

Comme attendu, le LPI simple chaîne oméga 6 et le cholestérol affichent une certaine compétition et principalement pour la région intracellulaire des hélices TM4 et TM7 (**Tableau 11**).

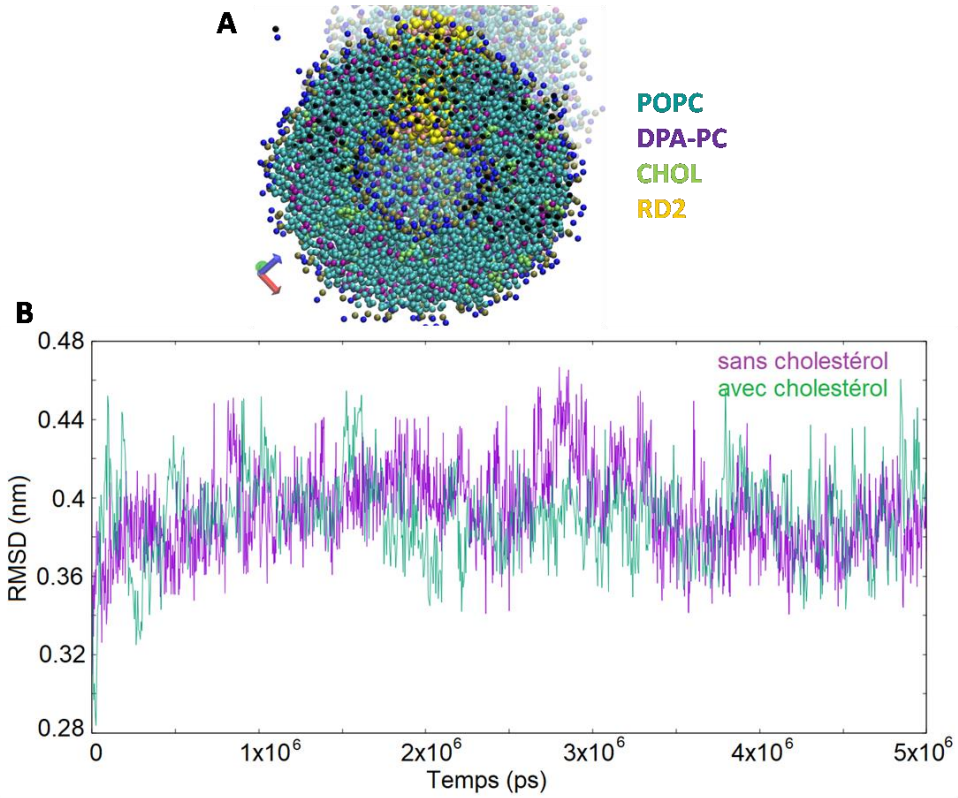


Figure 81 **A**) Système final après une production de 5 µs. On peut voir en arrière plan des lipides mais il s'agit de la même vésicule qui a été projetée suivant les trois axes xyz. **B**) superposition des RMSD de RD2 : un léger changement dans la dynamique de la protéine peut être observé.

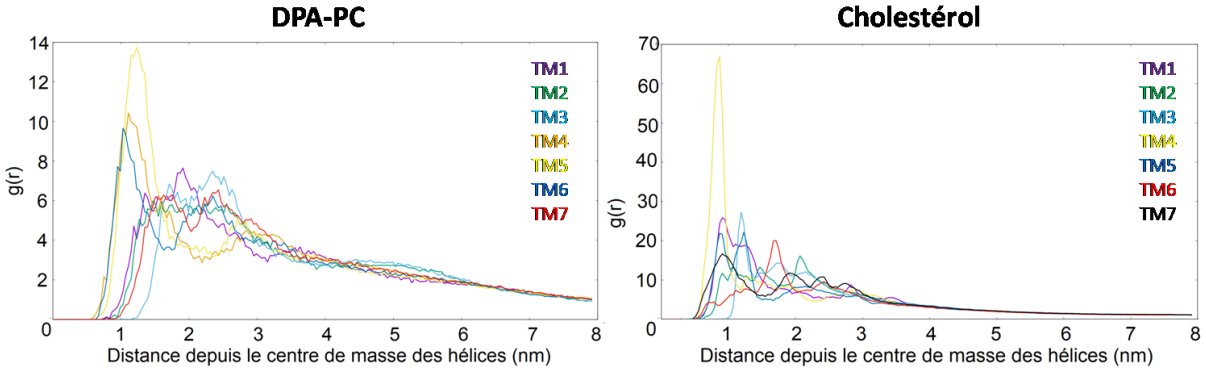


Figure 82 RDFs de DPA-PC et du cholestérol par rapport au centre de masse de chaque hélice. Les molécules de cholestérol interagissent davantage avec RD2 puisqu'il y a plus de stérol que de LPI dans le milieu. *Rappel : Plus la courbe d'un graphe est haute, plus il y a de molécules, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

	TM1		TM2		TM3		TM4		TM5		TM6		TM7	
	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i
DPA-PC	*			*		*		*		*		*		*
Cholestérol	*		*			*		*	*		*			*

Tableau 11 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DPA-PC et cholestérol) par rapport aux deux régions de chaque hélice (e = extracellulaire et i = intracellulaire). * indique la partie avec laquelle interagit préférentiellement le composé.

Un établissement en bicouche “arrondie aux extrémités” est observé pour le système qui contient du DDPA-PC. Le LPI forme de petits agrégats proches du récepteur alors que le cholestérol est localisé dans toute la bicouche (**Figure 83A**). En dépit de cette organisation, la protéine est assez dynamique due à l’interaction du cholestérol avec cette dernière (<RMSD> = **0,28 nm**, **Figure 83B**). Le stérol occupe fréquemment les hélices **TM4, TM1, TM7** et **TM5,** et le DDPA-PC les hélices **TM4, TM5, TM2** et **TM1** (**Figure 84**). L’analyse approfondie (RDF du LPI et du cholestérol par rapport à chaque région, extra-/intracellulaire, des hélices) révèle que les sites d’occupation des deux constituants sont opposés sur une même hélice, hormis celui au niveau intracellulaire de TM4 (**Tableau 12**).

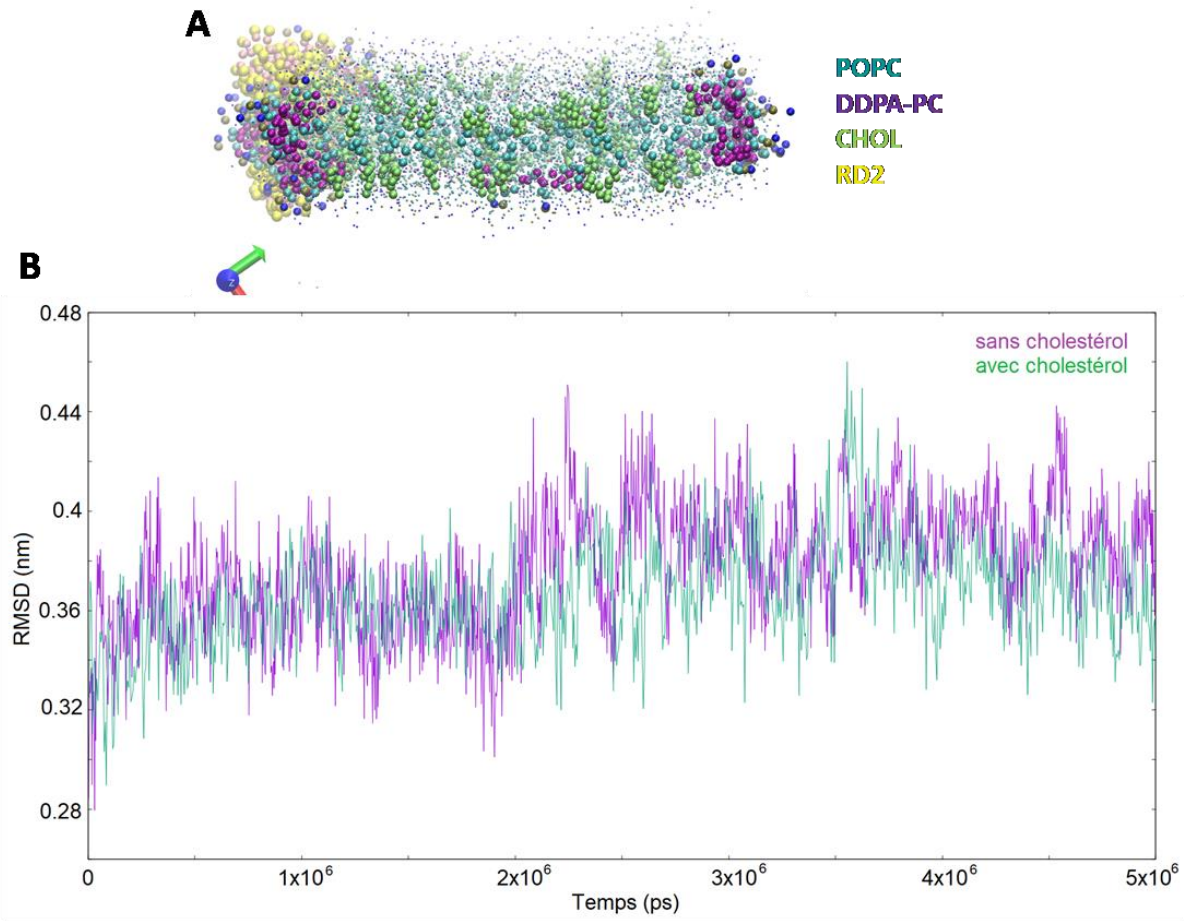


Figure 83 A) Etat du système après simulation et **B**) superposition des RMSD de RD2.

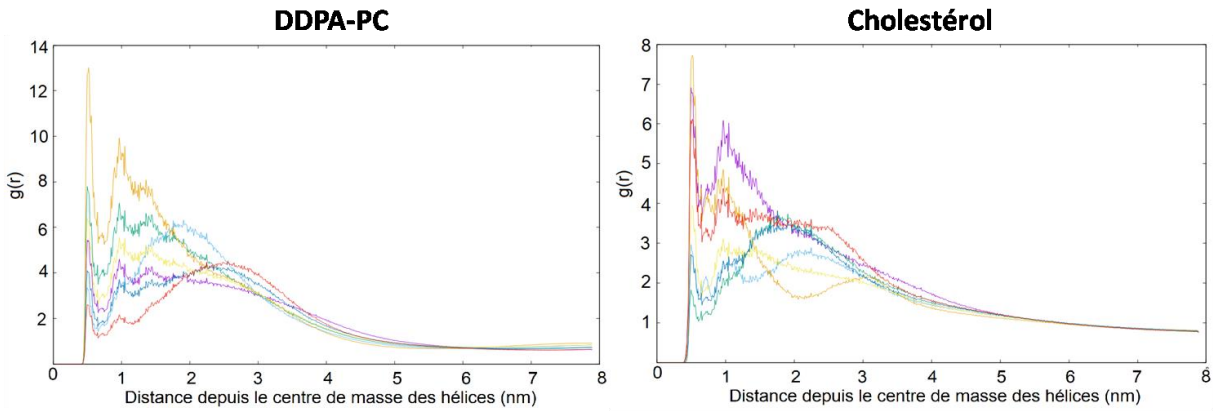


Figure 84 RDFs de DDPA-PC et du cholestérol par rapport au centre de masse de chaque hélice (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7). *Rappel : Plus la courbe d'un graphe est haute, plus il y a de molécules, et plus elle est proche de 1 nm, plus ces molécules sont en contact direct avec l'hélice considérée.*

	TM1		TM2		TM3		TM4		TM5		TM6		TM7	
	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i
DDPA-PC		*		*	*			*		*		*		*
Cholestérol	*		*			*		*	*		*			*

Tableau 12 Retranscription des résultats obtenus par le calcul des RDF des composés (DDPA-PC et cholestérol) par rapport aux deux régions de chaque hélice (e = extracellulaire et i = intracellulaire). * indique la partie avec laquelle interagit préférentiellement le composé.

Chapitre V Discussion des résultats

Les résultats obtenus des DMGG de l'auto-assemblage de lipides polyinsaturés (LPI) de la famille des oméga 3 (DHA-PC, DDHA-PC) et oméga 6 (DPA-PC et DDPA-PC) exposent deux organisations majoritaires des LPI selon la nature de la queue hydrophobe. Les simples chaînes oméga 3 et 6 (DHA-PC et DPA-PC respectivement) tendent à former une bicouche "plane" alors que les doubles chaînes oméga 3 et 6 (DDHA-PC et DDPA-PC respectivement) adoptent une structuration en "réseau à deux feuillets". En effet, les doubles chaînes oméga 3 et 6 comprennent deux chaînes carbonées insaturées de configuration "cis", ce qui impose des courbures et donc un agencement désordonné et aléatoire aux lipides. A la différence, DHA-PC et DPA-PC ont une chaîne saturée en position sn1, ce qui permet de "redresser" le lipide qui est plus ordonné.
L'épaisseur de la bicouche varie également, et comme attendu, la famille des oméga 6 conduit à des bicouches légèrement plus épaisses que celles établies par les oméga 3. L'absence d'une double liaison (DL) chez les oméga 6 est suffisante pour apporter un "ordre" au sein de la queue[57,58] et donc une meilleure structuration (moins de désordre) de ces derniers par rapport aux oméga 3.

Lorsqu'on intègre les LPI dans une membrane de POPC, et malgré leur faible quantité (5 %), il est possible de caractériser des attitudes distinctes chez ces quatre composés. Une similitude dans la dynamique de DHA-PC et DPA-PC est observée cependant, une dissemblance est visible dans leur organisation. Les valeurs du paramètre d'ordre (<P>) témoignent d'une rigidité plus importante de la queue hydrophobe de l'oméga 6 en comparaison à l'oméga 3 qui a une queue flexible due à un plus grand nombre d'insaturations en position sn2. En effet, le DPA-PC diffère du DHA-PC d'une DL et cela suffit pour qu'il puisse mieux s'aligner (*cf* ***Tableaux 6*** *et* ***7***) mais tous deux s'apparient assez fortement avec le POPC par la présence de leur chaîne saturée en position sn1. Concernant les doubles chaînes oméga 3 et 6, le composé DDPA-PC se comporte légèrement comme DDHA-PC, à savoir qu'il a tendance à s'auto-assembler. Cependant, contrairement à DDHA-PC, le double chaîne oméga 6 ne forme pas de domaines "stables" : les lipides passent d'un agrégat à un autre. Une explication plausible à cela est que l'interaction hydrophobe entre deux molécules de DDPA-PC est moins importante que celle entre deux DDHA-PC (**Annexe 26**). Effectivement, le DDPA-PC est plus rigide que le DDHA-PC compte tenu de deux chaînes grasses moins flexibles (*cf* ***Tableaux 6*** *et* ***7***), alors il pourra interagir davantage avec le POPC qui est dit rigide. Bien que les LPI montrent des comportements distincts au sein d'une même famille, voire deux familles différentes (oméga 3 et 6), ils ont peu d'effets sur l'épaisseur et l'aire par lipide de la

membrane en comparaison à la bicouche simple de POPC. Cela est sûrement dû à une très faible quantité en LPI (5 %) qui n'est pas suffisante pour observer un léger changement des propriétés membranaires. Ces caractéristiques (épaisseur et aire) sont également peu affectées par la présence de RD2 intégrée dans la bicouche lipidique enrichie ou non en LPI. De cette constatation, on déduit qu'il y a une adéquation entre la région intramembranaire de RD2 et l'épaisseur de la bicouche : on parle d'appariement hydrophobe (*hydrophibic matching* en anglais). Néanmoins, la hauteur d'une membrane uniquement constituée de double chaîne oméga 3 (DDHA-PC) est bien inférieure à celle d'une membrane simple de lipide saturé (POPC) et à celle du domaine *non-raft* identifié dans les systèmes enrichis en DDHA-PC (5%). La raison d'une telle différence de hauteur entre bicouches de DDHA-PC est que le LPI introduit en petite quantité dans une membrane constituée de lipides saturés (ordonnés) serait sous la contrainte de ces derniers qui vont empêcher le LPI de se déformer considérablement dû à un espace limité au sein de la membrane.

La simulation de RD2 dans une bicouche préformée de POPC démontre que la protéine ne passe pas par un état actif mais expose un grand nombre de conformations dites intermédiaires. Ces conformations sont décrites par :

- l'absence du "verrou ionique" formé entre une arginine située dans la région intracellulaire de TM3 (R132) et un glutamate de TM6 (E368), sans mouvement significatif de cette dernière et/ou
- un coeur de triade dont les trois acides aminés (I122, P201 et F382) n'adoptent pas un même état et/ou
- l'inclinaison de la tyrosine du motif NPxxY^{TM7} (Y426), sans rapprochement de cette région vers le centre de la protéine (*cf* ***Chapitre I***, *sous-partie* ***II.3***).

Le résultat énoncé coïncide avec ceux de la littérature qui indiquent que le DOPC et POPC ne stabilisent pas un état particulier (actif ou inactif) de la rhodopsine et β2AR.[47,53] Des études de DM (tout-atome et gros grains) ont aussi révélé que ces RCPG présentent des états intermédiaires.[48] De fait, on peut conclure que le POPC a le même effet sur les propriétés conformationnelles de RD2 que sur celles de la rhodopsine et β2AR.

En analysant les systèmes enrichis en LPI (5 %) de la famille des oméga 3 et 6, la première observation que nous faisons se rapporte au comportement des LPI au sein de la bicouche qui comporte le RD2. Comme dans les dynamiques démunies de protéine (***Chapitre III***, *partie* ***II***), les simples chaînes oméga 3 et 6 ne s'auto-assemblent pas : ils sont temporairement en contact avec le RD2. Malgré une attitude similaire, la visualisation de leur trajectoire montre

que le DPA-PC interagit faiblement avec RD2 contrairement à DHA-PC et le calcul du RDF (probabilité de présence des LPI par rapport à RD2 ou chaque hélice) permet de confirmer cette observation (**Annexe 27**). Cela peut s'expliquer par le DHA qui est plus insaturé que le DPA et de fait, il pourra mieux s'adapter à la surface de la protéine. Néanmoins, la présence de la chaîne saturée entraîne une compétitivité entre les divers composants de la bicouche : la partie insaturée favorise son interaction avec le récepteur non rigide et pourvu d'un grand nombre de résidus aromatiques hydrophobes, alors que la partie saturée "rigide et ordonnée" préfère s'assembler aux autres chaînes saturées qui se trouvent en grande quantité. Les doubles chaînes oméga 3 et 6 quant à eux, forment des domaines. Dans le cas du DDHA-PC, ce LPI va s'agréger totalement sur une face de la protéine alors que de petits amas de DDPA-PC sont perceptibles au sein de la membrane et autour de RD2. Notons également que l'auto-assemblage de DDHA-PC est majoritaire sur la même face de RD2 quelle que soit sa concentration dans le milieu (5 %, 25 %) et cela est dû à une face qui comprend de nombreuses cavités permettant un « ancrage » temporaire ou prolongé dans lesquelles vient se loger les molécules de DDHA-PC. Et rappelons que l'interaction entre deux DDHA-PC est plus forte que celle entre deux DDPA-PC.

Les hélices préférentiellement contactées par les LPI ont pu être identifiées en procédant au calcul du RDF. Les simples chaînes oméga 3 et 6 vont essentiellement occuper les hélices TM4, TM5 et TM1 et les doubles chaînes interagissent de préférence avec TM4, TM2 et TM1 qui forment une face plus concave. Ces données se rapprochent de celles publiées dans des articles qui énoncent les hélices (rhodopsine) avec lesquelles interagit le DHA.[78] Par ces analyses, on conclut qu'il n'y a pas de différenciations marquantes entre un oméga 3 et un oméga 6. Cependant, le fait que les LPI soient doublement substitués (DDHA-PC et DDPA-PC), ils s'apparieront fortement à certaines hélices non impliquées dans l'interaction avec les simples chaînes (DHA-PC et DPA-PC). Nous pouvons préciser que les régions hélicoïdales concernées dans l'interaction LPI-RD2 sont la partie intracellulaire des hélices TM4, TM5 et TM1, et la partie extracellulaire de TM2. Cela n'est pas surprenant puisque TM4 et TM2 possèdent un tryptophane dans ces parties respectives ($W90^{TM2}$ et $W160^{TM4}$). Puis la face exposée aux lipides des hélices TM1-4 comprend des résidus aromatiques donc très hydrophobes, ce qui favorise les interactions avec le DDHA-PC et DDPA-PC qui possèdent deux chaînes instaurées à la différence de DHA-PC et DPA-PC.

L'analyse des RMSD de RD2 calculés pour chaque système montre que les LPI ne semblent pas énormément impacter la dynamique du récepteur possiblement en raison de leur faible concentration. Seule la cavité du site de liaison se « contracte » rapidement pour ne plus trop

bouger étant démuni de ligand. Néanmoins, les RMSD de chaque hélice affichent un comportement intéressant de la protéine : les hélices TM5-7 exposent les plus grandes dynamiques. Ce résultat permet d'appuyer l'interprétation visuelle de la superposition de structures (après transformation inverse) extraites à différents temps. Dans le cas où la membrane comprend 5% de DDHA-PC, cette observation peut être expliquée par l'auto-assemblage préférentiel du LPI sur la face formée par les hélices TM1-4. Le contact des molécules de DDHA-PC avec ces hélices serait plus intense que celui entre acides aminés, ainsi pour maximiser les effets hydrophobes qui régissent la "stabilité" du système, les mouvements hélicoïdaux sont restreints. Or, TM1-4 ne semblent pas énormément bouger dans les autres simulations qui montrent des interactions transitoires du LPI avec RD2. Une explication à cela est, d'une part, que les hélices TM5-6 présentent des résidus proline et/ou glycine en leur centre qui induisent une grande flexibilité de l'hélice à l'endroit où ils sont localisés :

- la proline diffère structurellement des autres acides aminés car elle ne détient pas de chaîne latérale, ainsi elle impose une courbure au peptide,
- la glycine est un résidu naturel particulier puisque son C_α est achiral, ce qui signifie qu'elle n'a pas de configuration propre/fixe. De fait, elle est plus flexible que les autres résidus et les atomes d'hydrogène sont beaucoup moins encombrants donc ils ne limitent pas le mouvement du peptide.

D'autre part, la majorité des acides aminés aromatiques situés sur TM5-7 font face vers l'intérieur de la protéine alors que ceux sur les hélices TM1-4 sont exposés à l'environnement lipidique (**Annexe 28**), ce qui permet aux LPI d'interagir davantage avec eux et ainsi prévenir le mouvement des hélices qui sont relativement sollicitées par les LPI. Ce raisonnement est justifié par la mesure du RDF (*cf* ***Chapitre IV*** *- parties* ***II*** *et* ***III***).

Outre cela, il est possible de suggérer que les simples chaînes oméga 3 et 6 (DHA-PC et DPA-PC) accentuent le dynamisme de RD2. Malgré cette distinction, lorsqu'on compare le RMSF des systèmes (fluctuation atomiques de RD2 au cours du temps), les domaines au sein du récepteur qui présentent une grande flexibilité sont identiques quel que soit le LPI du milieu. Ils correspondent aux boucles et à l'extrémité inférieure de TM5 et TM6 (régions intracellulaires).

La même déduction est faite sur le comportement (états conformationnels) de la protéine. Cette dernière n'admet à aucun moment une forme *active* et ne maintient pas constamment sa conformation *inactive* : elle passe par divers états dits intermédiaires au cours du temps. Ces états sont définis par l'absence du "verrou ionique" établi entre R132 et E368 (sans

mouvement extérieur de TM6) et/ou la tyrosine Y426^{TM7} en position inactive mais qui s'oriente vers le cytoplasme et/ou un coeur de triade dont les résidus (I122, P201 et F382) ne présentent pas le même état.
Le site de liaison de RD2 a également été examiné. Puisque le récepteur a été cristallisé complexé à un ligand, le site de fixation "natif" reste méconnu. La dynamique moléculaire nous a permis d'observer, dans tous les systèmes (avec ou sans LPI), la disparition de la poche de liaison étendue (*EPD*) causée par **i**) le rapprochement de TM6 vers TM3, qui induit un réarrangement de F390, **ii**) Y408 qui s'oriente vers le *bundle* (contact avec H393 affaibli) et retrouve son état initial comme observé chez RD3 et **iii**) W386 qui bascule vers le milieu cytoplasmique, ce qui bloque le prolongement du site de liaison. Un décalage vers l'intérieur de RD2 des acides aminés F110 et V91, impliqués dans l'interaction avec le ligand, est également identifié.

L'ajout de cholestérol (10%) a une influence sur la dynamique de RD2 comme décrit dans la littérature pour d'autres RCPG[91,94] : ce stérol, par sa petite structure rigide, induit la perte des fluidités membranaire et protéique. Il peut ainsi impacter l'affinité d'un ligand pour son récepteur (diminution) en augmentant la rigidité hélicoïdale. De cette manière, les changements conformationnels de la protéine activée pourraient être affectés en termes de durée pendant laquelle le récepteur reste dans chaque conformation « intermédiaire ». Puis il a été révélé que le récepteur est plus compact en présence de cholestérol. Toujours est-il que l'effet des LPI n'est pas apparent avec l'insertion de ce composé.
La membrane étant plus complexe, les différents composés devraient agir les uns avec les autres et de ce fait, le cholestérol et les LPI seraient tous les deux en contact avec le récepteur. L'analyse des RDF de chacun des constituants (LPI et cholestérol) par rapport à RD2 ou des hélices démontre une compétition entre ces deux types de molécules : ils interagissent avec les hélices TM4, TM1, TM5 et TM7. Cette observation concorde avec les résultats de Grossfield *et al*. et Horn *et al*.[78,88] Ceci étant dit, un discernement est fait entre les hélices préférentiellement contactées par les simples chaînes oméga 3 et 6 et les doubles chaînes oméga 3 et 6. Ces derniers rencontrent essentiellement TM4, TM1 et TM2 comme il a été montré précédemment en l'absence de cholestérol, tandis que DHA-PC et DPA-PC se rapprochent fortement de TM4, TM5 et TM6 et non plus de TM1. Dû à une plus grande quantité de cholestérol dans le milieu, les petites molécules rigides vont fréquemment s'apparier avec TM1, ce qui empêcherait aux LPI simples chaînes oméga 3 et 6 d'interagir avec elle. Notons que le résultat pour DHA est supporté par l'étude de deux systèmes dont la

bicouche est très complexe (membranes plasmiques neuronales saine et malade, *cf* ***Chapitre IV*** - *sous-partie* ***III.1***). En examinant les contacts pour chaque simulation, on a remarqué que les LPI se placent dans les sites hélicoïdaux opposés à ceux du cholestérol à l'exception de la partie intracellulaire de TM4 et TM7 pour lesquelles les LPI et le stérol sont en compétition.

Chapitre VI Conclusion et perspectives

Une multitude de pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie sont causées par un dysfonctionnement des neurones dopaminergiques et/ou une altération de l'activité du RD2 et/ou de la composition lipidique neuronale.[26,27,31–33] Cela a donc conduit des équipes de neurologie et biophysique bordelaises à étudier ces aspects. L'implication de la modélisation dans ce projet est de simuler les systèmes modèles biophysiques en utilisant la dynamique moléculaire gros grain (DMGG) afin d'illustrer l'influence de l'environnement lipidique sur les propriétés conformationnelles du RD2. Ainsi, nous avons travaillé avec des systèmes qui exposent le RD2 inactif et sans ligand intégré au centre d'une membrane de POPC enrichie ou non en LPI (5%). Les LPI examinés possèdent la même longueur de chaînes (C18 en position sn1 et C22 en sn2) et diffèrent d'une double liaison (DL) sur la plus longue chaîne grasse qui témoigne de la famille à laquelle ils appartiennent (oméga 3 avec six DL et oméga 6 avec 5 DL).
Suite à ces trois années de recherches, nous avons pu analyser divers aspects non perceptibles expérimentalement comme le comportement de LPI, les interactions LPI-RD2 et la compétition entre les LPI et le cholestérol, au sein d'une membrane majoritairement composée de POPC.

Il a été démontré dans la littérature que les lipides suivant la nature de leurs chaînes grasses ont un impact sur les propriétés de la membrane telles la fluidité voire l'épaisseur de bicouche.[85–87] Les dynamiques réalisées avec une bicouche préformée de POPC contenant 5% d'un LPI (DHA-PC ou DPA-PC ou DDHA-PC ou DDPA-PC) affichent dans un premier temps, une organisation spécifique des quatre LPI. De plus, ces simulations attestent que l'effet des LPI sur l'épaisseur de la membrane et l'aire par lipide est très peu marquant lorsqu'ils sont en faible concentration. L'organisation des lipides mono- ou di-insaturés est néanmoins remarquable avec une structuration aléatoire des chaînes à plusieurs DL alors que les chaînes saturées gardent une certaine linéarité. Ces dernières ont tendance à interagir préférentiellement entre elles afin de maximiser les effets hydrophobes et aussi, "qui se ressemble s'assemble".

Les résultats obtenus pour les systèmes qui prennent en compte le récepteur sont intéressants puisqu'ils démontrent que suivant la nature des LPI (oméga 3 ou 6, mono- ou di-substitués), ces derniers ont un comportement distinct en présence de RD2. Les oméga 3 interagissent davantage avec la protéine par comparaison aux oméga 6 mais les doubles chaînes oméga 3 et 6 forment des agrégats contrairement aux simple chaînes qui interfèrent transitoirement avec RD2. Néanmoins, il semblerait que le dynamisme du récepteur ne soit pas impacté par la

présence des LPI. Le calcul du RMSD de chaque hélice et l'étude de la superposition de structures extraites à différents temps affichent une dynamique importante uniquement de TM5-7 dans tous les systèmes. La faible mobilité des hélices TM1-4 est due à *i*) l'absence d'acides aminés sur des hélices pouvant induire un mouvement de torsion (glycine, proline) et *ii*) la présence de résidus aromatiques sur leur face extérieure avec lesquels interagissent fortement les chaînes grasses insaturées.

La dynamique moléculaire permet d'étudier l'évolution d'un système au cours du temps, c'est pourquoi il nous a été possible de déterminer des changements conformationnels de la protéine suivant son environnement. En dépit des lipides élaborant la bicouche, le RD2 ne s'active pas, ni ne reste ni sous sa forme inactive : il présente un grand nombre de conformations qualifiées d'états intermédiaires. Effectivement, l'hélice TM6 ne s'éloigne pas de TM3 au niveau cytoplasmique (pas d'ouverture) mais le "verrou ionique" est parfois absent dû à une mobilité de la chaîne latérale de E368, et la région intracellulaire de TM7 maintient sa position inactive sans jamais se rapprocher du coeur de la protéine avec Y426 qui s'oriente par moment vers le milieu cytoplasmique. Cependant, l'hélice TM5 affiche une grande flexibilité au niveau intracellulaire (se décale vers TM6) et la partie extracellulaire de TM6 est très dynamique. Toutes ces observations faites dans les différentes simulations permettent de conclure qu'un lipide à tête polaire PC, quelle que soit la nature de ses chaînes grasses (queue hydrophobe), ne favorisera ni la forme active, ni la forme inactive de RD2 mais conduira à son inactivation. Ce résultat est possiblement dû à ***i)*** l'absence de la BIC3 qui jouerait un rôle essentiel dans le processus et/ou ***ii)*** l'absence de la protéine G. Effectivement, cette dernière s'avère être importante pour l'activation des RCPG puisqu'un RCPG démuni de cette unité est fermé au niveau cytoplasmique même s'il est complexé à un ligand. Outre cela, la conformation du site de liaison natif de RD2 a été identifiée ainsi que l'implication de F390 et W386 qui joueraient un rôle dans la fixation du ligand. Ces deux résidus participent à l'établissement de la poche de liaison étendue (EBP) tout comme Y408.

En regard de ces données, nous avons déterminé que les simples et doubles chaînes oméga 3 et 6 ne s'apparient pas avec les mêmes hélices et les doubles chaînes interagissent beaucoup plus avec RD2 que leurs semblables mono-substitués. Cependant, aucune distinction entre les deux familles n'a pu être faite. Les simulations avec 10 % de cholestérol ont démontré que les LPI DHA-PC et DPA-PC entrent en contact avec les mêmes hélices malgré la présence du stérol et que ces dernières ont été caractérisées comme celles pour lesquelles le cholestérol a une meilleure affinité. Les LPI et le cholestérol se logent néanmoins de façon transitioire sur

des régions opposées à l'exception de TM4 et TM7 où une compétition peut être observée entre ces deux biomolécules. En addition, nous avons bien montré que le cholestérol conduit à la perte de fluidité de la protéine.

Ainsi, bien que les LPI ne semblent pas impacter la dynamique de RD2 et n'influencent pas différemment les propriétés conformationnelles du récepteur, nous supposons que leurs effets seraient perceptibles sur le complexe trimérique (RD2 lié à un ligand et à la protéine G). Ceci étant dit, nous avons pu affirmer par la DMGG que :

- la conformation de RD2 qui est aussi un RCPG de la Classe A telles que la rhodopsine et β2AR, est déstabilisée par des lipides (saturés et insaturés) à tête polaire PC. Soit, RD2 présente des états intermédiaires sans adopter une conformation active et maintenir sa forme inactive.

Egalement, il a été possible de :

- déterminer le comportement des quatre LPI et de RD2,
- identifier les hélices préférentiellement contactées par chacun des LPI et le cholestérol,
- observer les changements structuraux locaux ("verrou ionique", coeur de triade et Y426) comme décrit dans la littérature en employant la DMTA/UA et
- étudier la flexibilité du site de liaison qui a été énoncé dans l'article de Wang *et al.* en 2018.

Ces trois années ont permis de confirmer l'utilisation de la DMGG pour l'étude du comportement de protéines transmembranaires et de lipides, et d'acquérir des données préliminaires pour comprendre l'impact des LPI sur les propriétés de RD2.

Afin d'approfondir ces recherches et par conséquent, répondre rigoureusement à la problématique, il serait intéressant d'effectuer, dans un premier temps, des dynamiques par la méthode du gros grains en ajoutant un ligand tout en gardant le ratio de lipides. Les systèmes comprendront le ligand à l'extérieur du site orthostérique de RD2 d'une part, et à l'intérieur d'autre part, pour étudier le comportement du récepteur en présence d'une petite molécule d'affinité. Cela permettra également d'observer si les LPI ont un impact sur ses états et de vérifier si RD2 a besoin de la protéine G pour s'activer. Bien entendu ces analyses seront effectuées en l'absence et en compagnie du cholestérol.

Dans un second temps, les simulations de *i*) RD2 seul et *ii*) du complexe RD2-ligand, ancrés à la protéine G au niveau cytoplasmique du récepteur, voire dans le milieu intracellulaire afin d'observer l'appariement, seront essentielles puisqu'elles permettront de déterminer l'importance de cette unité dans les modifications conformationnelles d'un RCPG sous l'effet de son environnement lipidique. Néanmoins, ces analyses nécessitent la structure cristallographique des complexes et d'une puissance de calcul importante.

Il serait également intéressant d'étudier des systèmes se rapprochant de la composition neuronale en vue d'avoir des données pertinentes par rapport au contexte biologique.

ANNEXES

Annexe 1 : Alignement de RD2 (1ère ligne) et β2AR (2nd ligne) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/**).** Ces deux RCPG de la classe A présentent une similarité de 40 %.

```
  1 ----NYYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMAVSREKALQTTTNYLIVSLAVAD     46
        .....:::|::..|||||||..|:::.:.|||.|||.|.|||.||
  1 EVWVVGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIAKFERLQTVTNYFITSLACAD     50

 47 LLVATLVMPWVVYLEVVGEWKFSRIHCDIFVTLDVMMCTASALNLCAISI     96
    |::...|:|:.....:...|.|....|:.:.::||:..|||...||.|::
 51 LVMGLAVVPFGAAHILTKTWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIETLCVIAV    100

 97 DRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVWVLS-FTISCPLLFGLNNADQ    145
    |||.|:..|..|.: ..:|.:..|:|.:||::| .|...|:.....|..
101 DRYFAITSPFKYQS-LLTKNKARVIILMVWIVSGLTSFLPIQMHWYRATH    149

146 NECI-----------IANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRR    184
    .|.|           ..|.|:.:.|||||||||.::.:.||.:::
150 QEAINCYAEETCCDFFTNQAYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYSRVF-----    194

185 RRKRNIFEMLRIDEGLRLKIYKDTEGYYTIGIGHLLTKSPSLNAAKSELD    234
                                                ..||.:|.
195 ----------------------------------------QEAKRQLQ    202

235 KAIGRNTNGVITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRA    284
    |.           |::|..|:          ::|
203 KI-----------DKSEGRFH----------VQN----------------    215

285 ALINMVFQMGETGVAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLAKSRWYNQTPNRAK    334
      ::.|.|.|.||     :.||                        |:.
216 --LSQVEQDGRTG-----HGLR-------------------------RSS    233

335 RVITTFRTGTWDAYKLSQQKEKKATQMAAIVAGVFIICWLPFFITHILNI    384
    :...               ||.||.:...|:.|.|.:|||||||.:|:::
234 KFCL---------------KEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNIVHV    268

385 HCDCNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNPIIYTTFNIEFRKAFLKILHC    430
    ..|..|...:|....|:|||||..||:||.. :.:||.||.::| |
269 IQDNLIRKEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCR-SPDFRIAFQELL-C    312
```

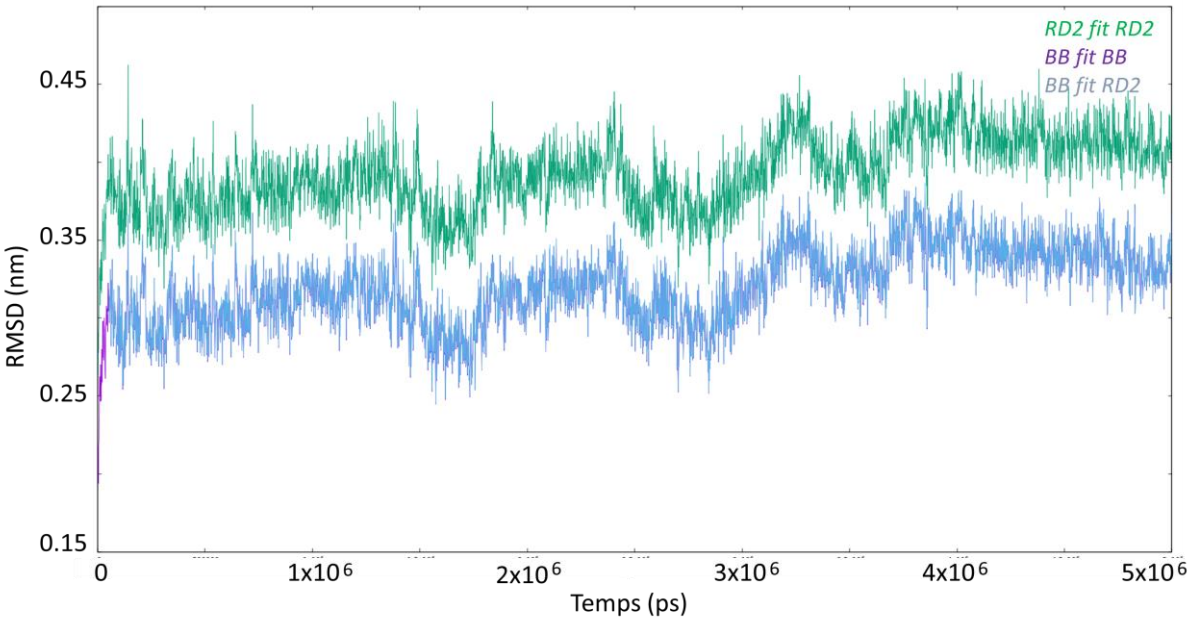
Annexe 2 : Températures de transition de lipides (en °C).[55]

Phosphatidylcholine		Phosphatidylglycerol (Sodium Salt)		
Product	T_m (°C)	Product	T_m (°C)	
12:0 PC (DLPC)	-2	12:0 PG (DLPG)	-3	
13:0 PC	14	14:0 PG (DMPG)	23	
14:0 PC (DMPC)	24	16:0 PG (DPPG)	41	
15:0 PC	35	18:0 PG (DSPG)	55	
16:0 PC (DPPC)	41	18:1 PG (DOPG)	-18	
17:0 PC	50	16:0-18:1 PG (POPG)	-2	
18:0 PC (DSPC)	55	**Phosphatidylserine (Sodium Salt)**		
19:0 PC	62	14:0 PS (DMPS)	35	
20:0 PC	66	16:0 PS (DPPS)	54	
21:0 PC	71	18:0 PS (DSPS)	68	
22:0 PC	75	18:1 PS (DOPS)	-11	
23:0 PC	79.5	16:0-18:1 PS (POPS)	14	
24:0 PC	80.3	**Phosphatidic Acid (Sodium Salt)**		
16:1 PC	-36	12:0 PA (DLPA)	31	
18:1c9 PC (DOPC)	-17	14:0 PA (DMPA)	52	
18:1t9 PC	12	16:0 PA (DPPA)	65	
18:1c6 PC	1	18:0 PA (DSPA)	75	
22:1c13 PC	13	18:1 PA (DOPA)	-4	
18:2 PC	-57	16:0-18:1 PA (POPA)	28	
18:3 PC	-60	**Cardiolipin**		
		14:0 CL	47	
		16:0 CL	62.2	
20:4 PC	-69	**Phosphatidylethanolamine**		
14:0-16:0 PC	35		T_m (°C)	T_h (°C)
14:0-18:0 PC	40	12:0 PE (DLPE)	29	
16:0-14:0 PC	27	14:0 PE (DMPE)	50	
16:0-18:0 PC	49	16:0 PE (DPPE)	63	118
16:0-18:1 PC (POPC)	-2	18:0 PE(DSPE)	74	100
16:0-22:6 PC	-27	20:0 PE	83	96
18:0-14:0 PC	30	18:1c9 PE (DOPE)	-16	10
18:0-16:0 PC	44	18:1t9 PE	38	64
18:0-18:1 PC	6	18:2 PE	-40	-15
18:1-16:0 PC	-9	18:3 PE		-30
18:1-18:0 PC	9	16:0-18:1 PE (POPE)	25	71

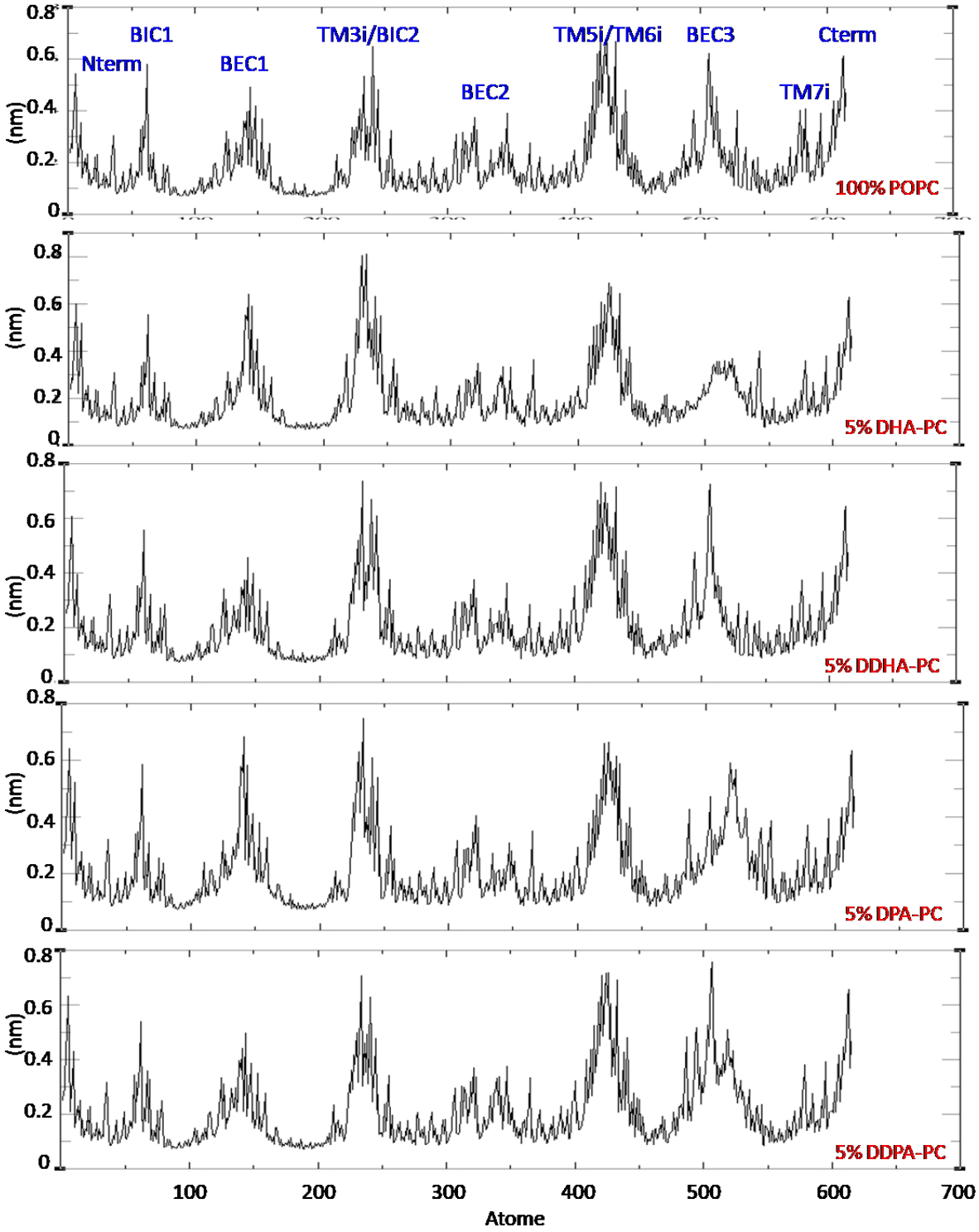
Annexe 3 : Alignement de RD3 (1ère ligne) et RD2 (2nd ligne) avec Modeller.

```
  1 YALSYCALILAIVFGNGLVCMAVLKERALQTTTNYLVVSLAVADLLVATL     50
    ||.....||..|||||.||||||.:|:||||||||||:||||||||||||||
  1 YATLLTLLIAVIVFGNVLVCMAVSREKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATL     50
            TM1                                   TM2
 51 VMPWVVYLEVTGGVWNFSRICCDVFVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTA    100
    ||||||||||.|. |.||||.||:||||||||||||||||||||||||||||
 51 VMPWVVYLEVVGE-WKFSRIHCDIFVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTA     99
                                            TM3
101 VVMPVHYQHGTGQSSCRRVALMITAVWVLAFAVSCPLLFGFNTTGDPTVC    150
    |.||:.|.  |..||.|||.:||:.||||:|.:||||||||.|.. |...|
100 VAMPMLYN--TRYSSKRRVTVMISIVWVLSFTISCPLLFGLNNA-DQNEC    146
                          TM4
151 SISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRVPLREKKATQMVA    200
    .|:||.||:|||:||||:||.||:|||.:||:||::|...:||||||||:|
147 IIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRSQQKEKKATQMLA    196
                          TM5
201 IVLGAFIVCWLPFFLTHVLNTHCQTCHVSPELYSATTWLGYVNSALNPVI    250
    ||||.||:||||||:||:||.||. |::.|.||||.||||||||||:||:|
197 IVLGVFIICWLPFFITHILNIHCD-CNIPPVLYSAFTWLGYVNSAVNPII    245
      TM6                                   TM7
251 YTTFNIEFRKAFLKILSC    268
    ||||||||||||||||.|
246 YTTFNIEFRKAFLKILHC    263
            H8
```

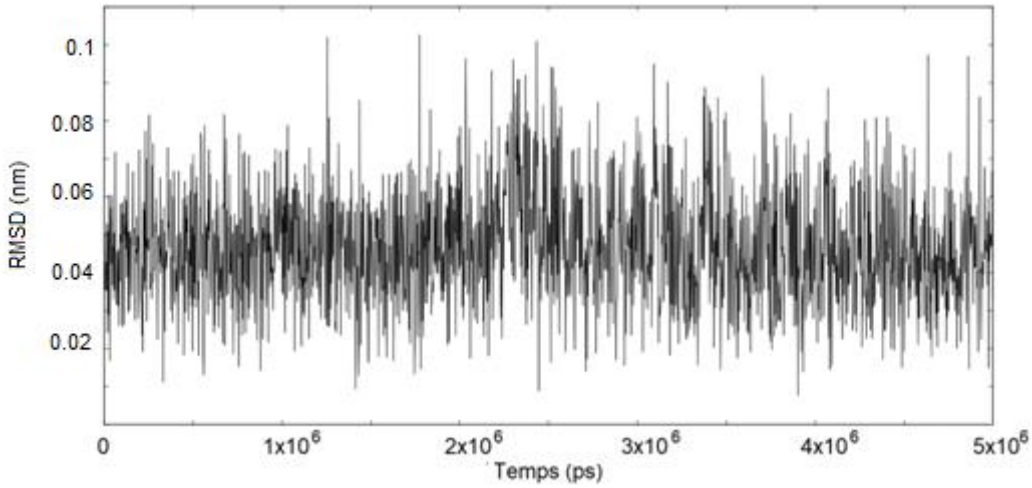
Annexe 4 : RMSD de RD2 dans une bicouche de POPC. Divers calculs ont été effectués en tenant compte de 1. la protéine entière (vert) ou 2. les grains BB (violet). Il est possible de comparer deux structures en mesurant la déviation standard de particules (ex: BB) par rapport à leur position initiale dans la protéine entière et le résultat apparaît en bleu et se superpose au graphe violet. La seule différence observée est la valeur du RMSD : elle n'est pas la même si on prend uniquement en compte les grains BB ou tous les grains. Le RMSD résultant de la moyenne, il n'est pas surprenant d'avoir cet écart car un plus grand nombre de positions est considéré dans le cas de la protéine entière. Cependant, la tendance des courbes (les fluctuations) est identique, ce qui signifie qu'il est possible d'effectuer la mesure sur un des deux critères (BB ou RD2 entier). En effet, nous nous intéressons aux fluctuations survenant chez RD2 qui témoignent de sa flexibilité, ainsi tous les graphes de RMSD présentés dans le présent mémoire illustreront l'évolution de la protéine entière.



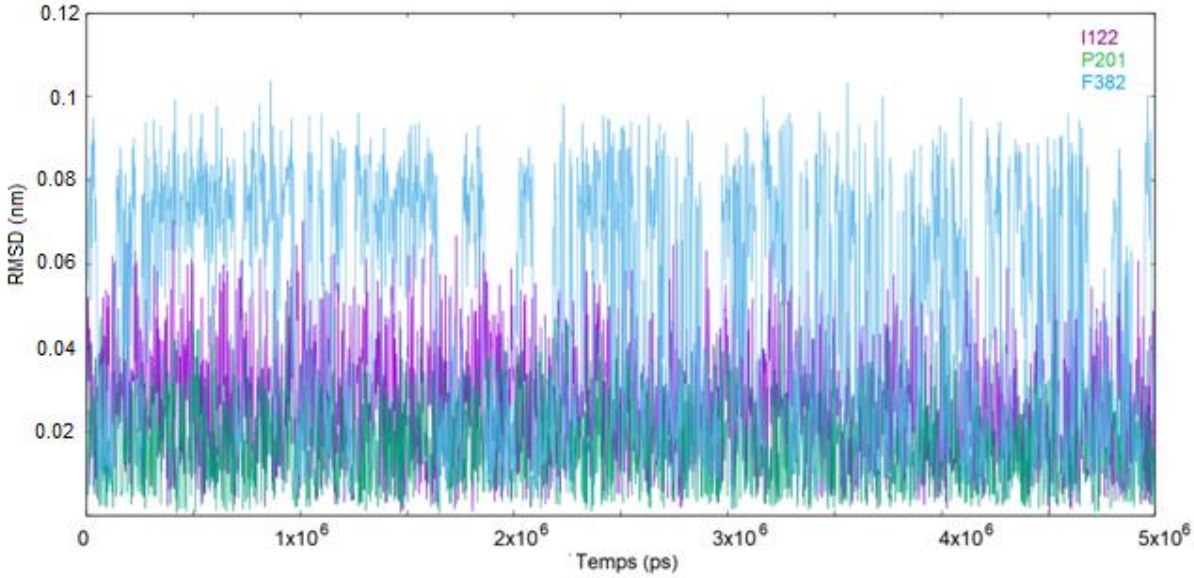
Annexe 5 : RMSF de RD2 de chaque système prenant en compte tous les grains de la protéine. La structure que nous avons étudié est constituée de 268 résidus et 615 particules. Les régions correspondant aux grandes fluctuations sont indiquées en bleu avec i qui signifie intracellulaire, soit la partie intracellulaire de l'hélice. Pour rappel, BEC et BIC sont les abréviations de boucle extracellulaire et boucle intracellulaire respectivement.



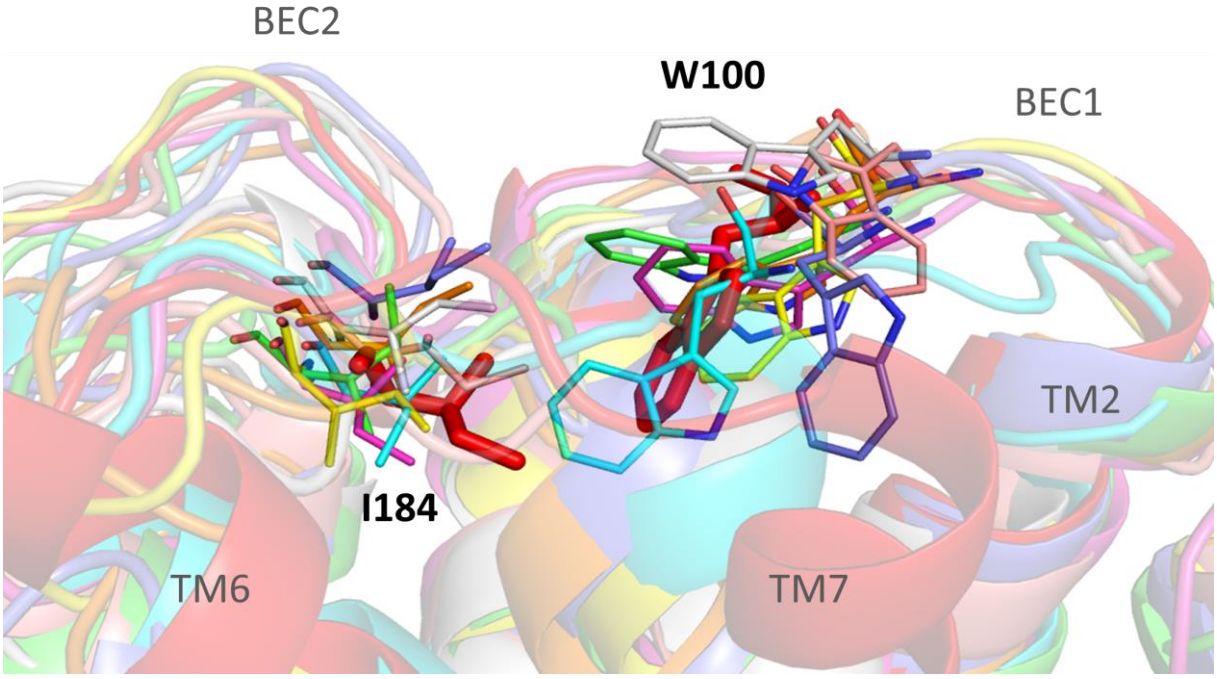
Annexe 6 : RMSD de la région NPxxY sous l'influence des molécules de POPC.



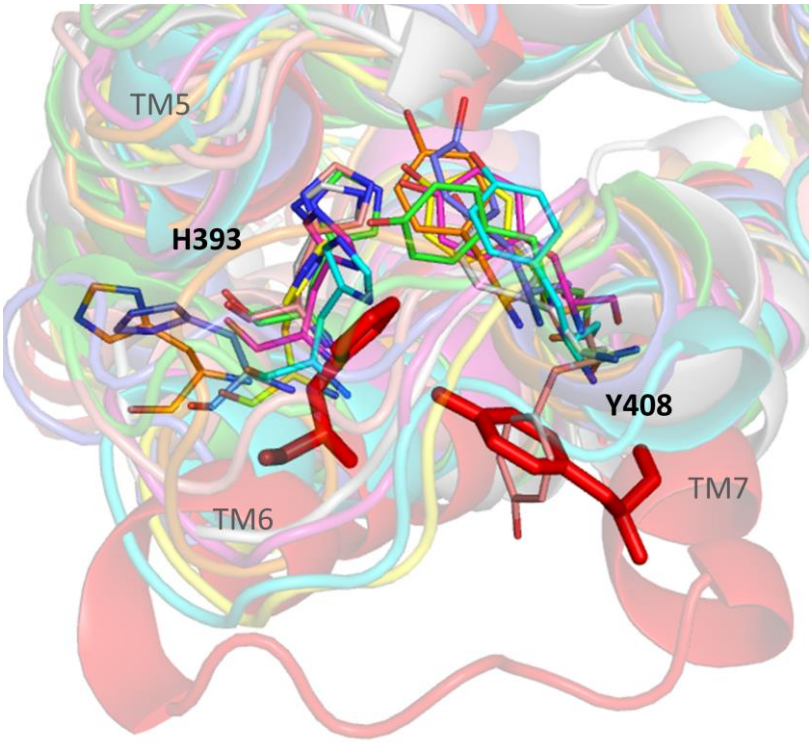
Annexe 7 : RMSD du cœur de triade dans une membrane de POPC. On remarque bien que la phénylalanine est plus flexible que les deux autres résidus. I122 qui possède également une longue chaîne latérale est assez dynamique lorsque RD2 n'est complexé à aucun de ses partenaires.



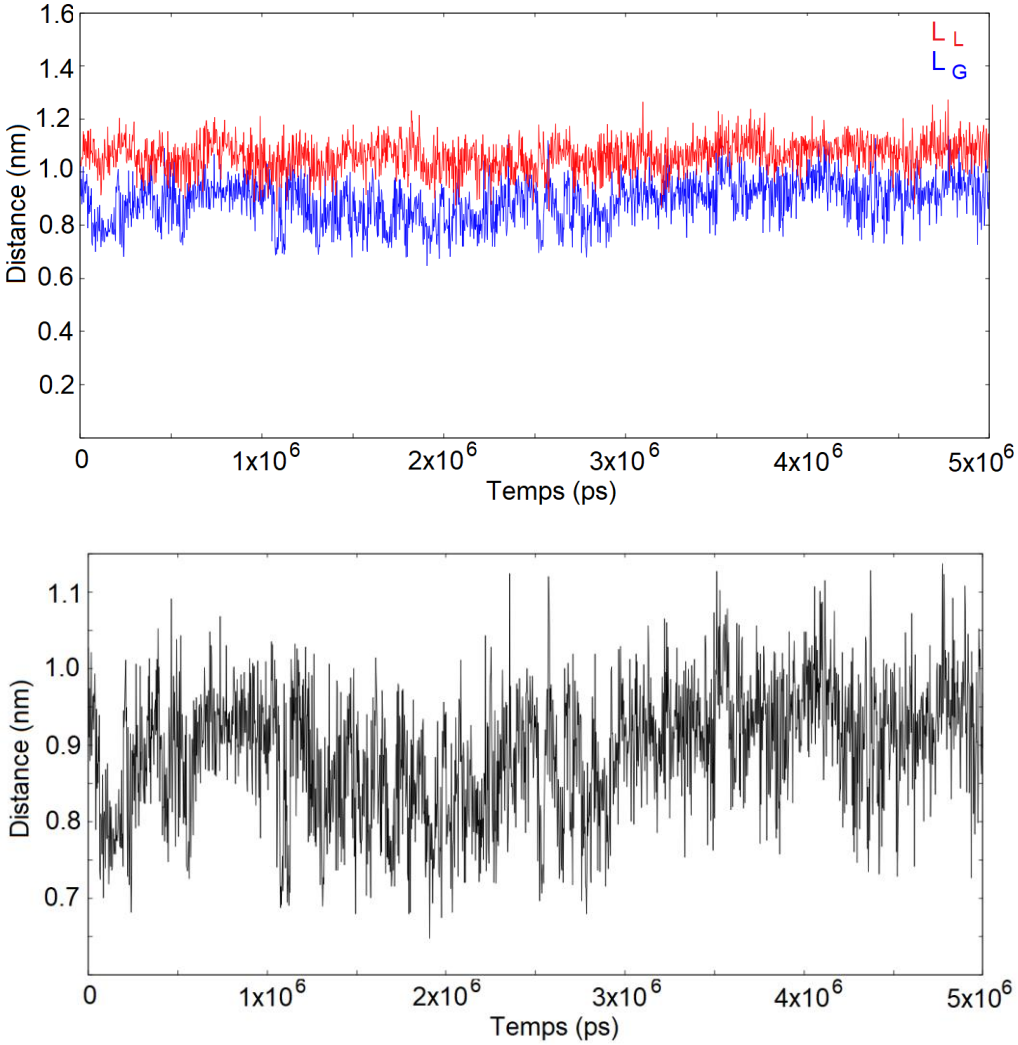
Annexe 8 : Arrangements de I184 et W100 au cours du temps.



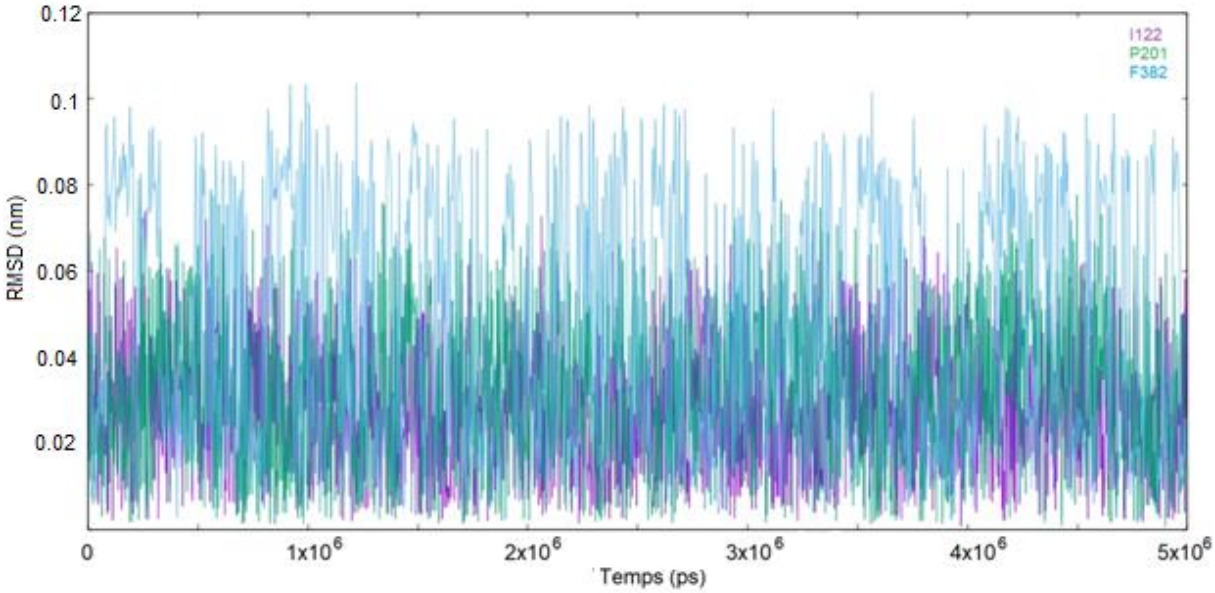
Annexe 9 : Réarrangement de H393 et Y408 au cours du temps lorsque RD2 est démuni de ligand. Malgré une proximité des résidus par moment, ils ne sont pas orientés de manière à interagir entre eux et donc stabiliser l'hélice TM6 comme décrit dans la littérature.



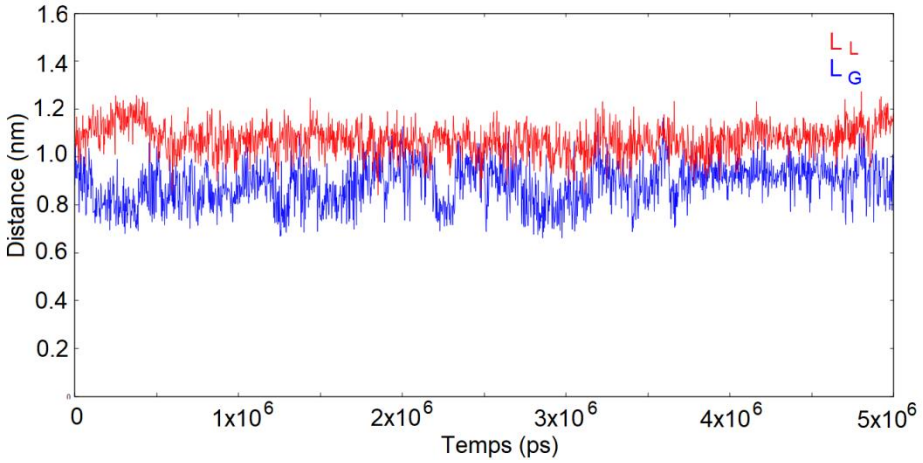
Annexe 10 : Evolution de la distance R132 – E368 en prenant en compte les grains BB (L_G, *graphe du haut*) et les grains SC (*graphe du bas*). *Rappel : L_L caractérise l'état de la région extracellulaire du récepteur et précisément du site de liaison du ligand.*



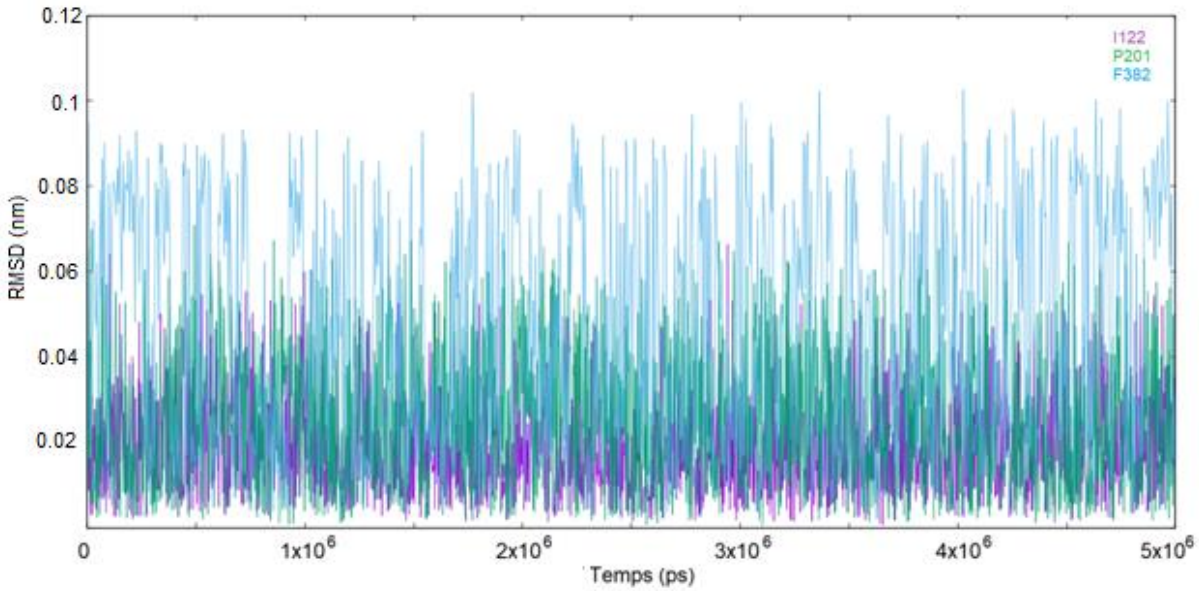
Annexe 11 : RMSD du cœur de triade dans une membrane de POPC enrichie en DHA-PC (5%). On remarque que la phénylalanine est plus flexible que les deux autres résidus.



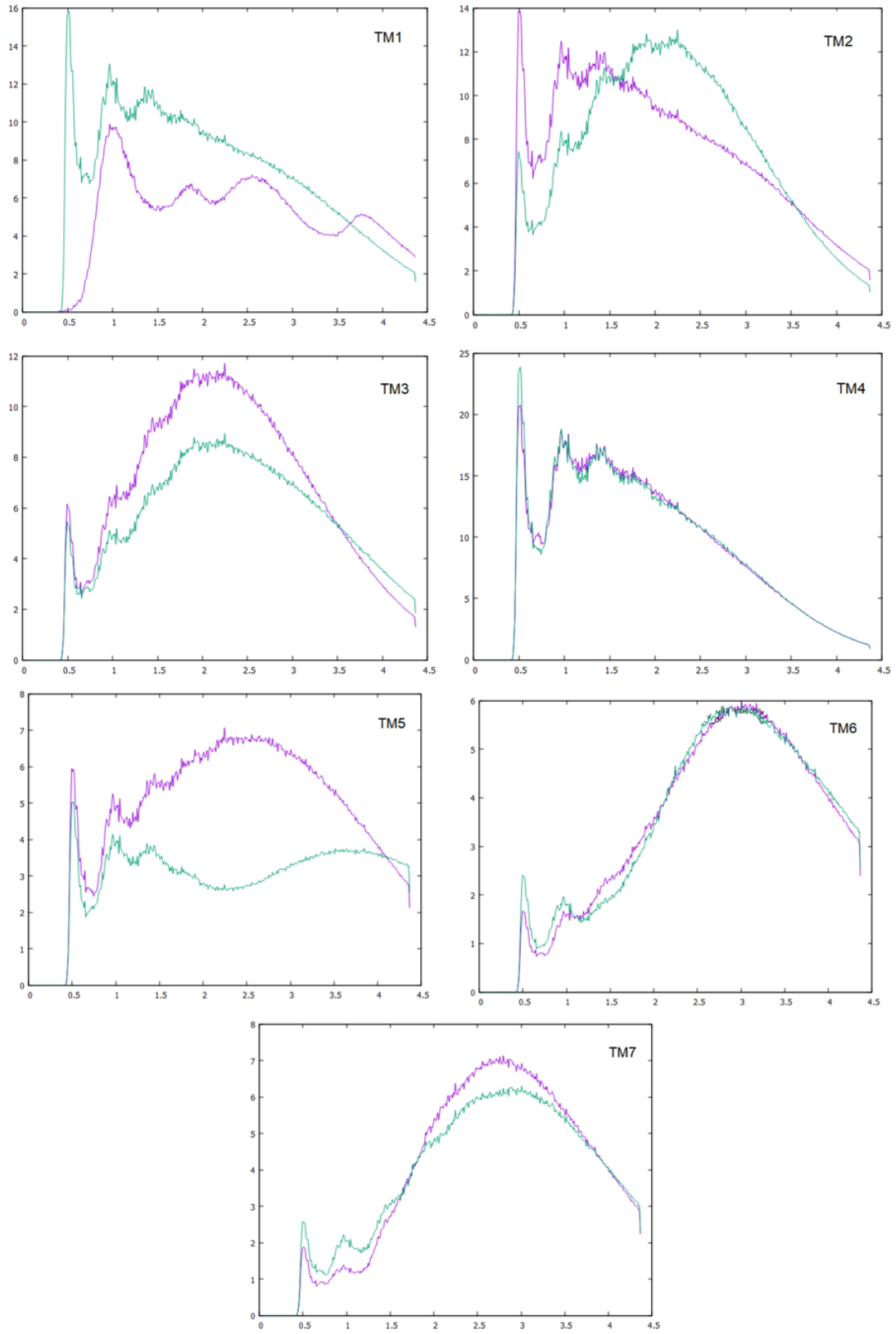
Annexe 12 : Evolution de la distance R132 – E368 en prenant en compte les grains BB (L_G). *Rappel : L_L caractérise l'état de la région extracellulaire du récepteur et précisément du site de liaison du ligand.*



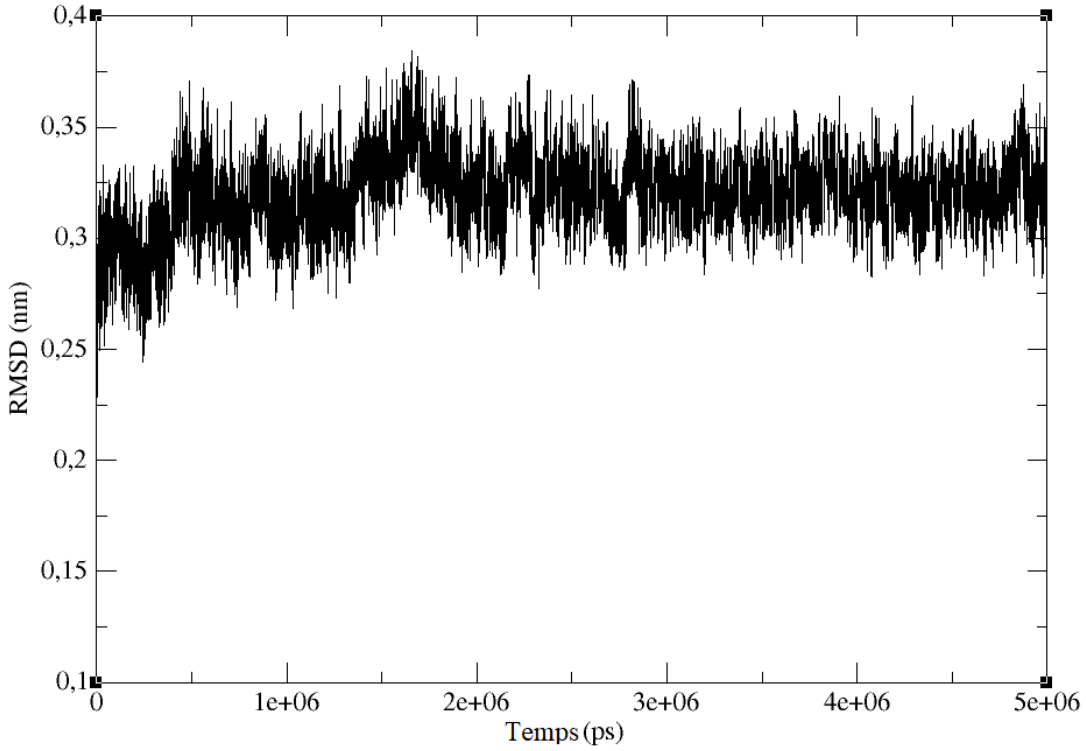
Annexe 13 : RMSD des résidus composant le cœur de triade.



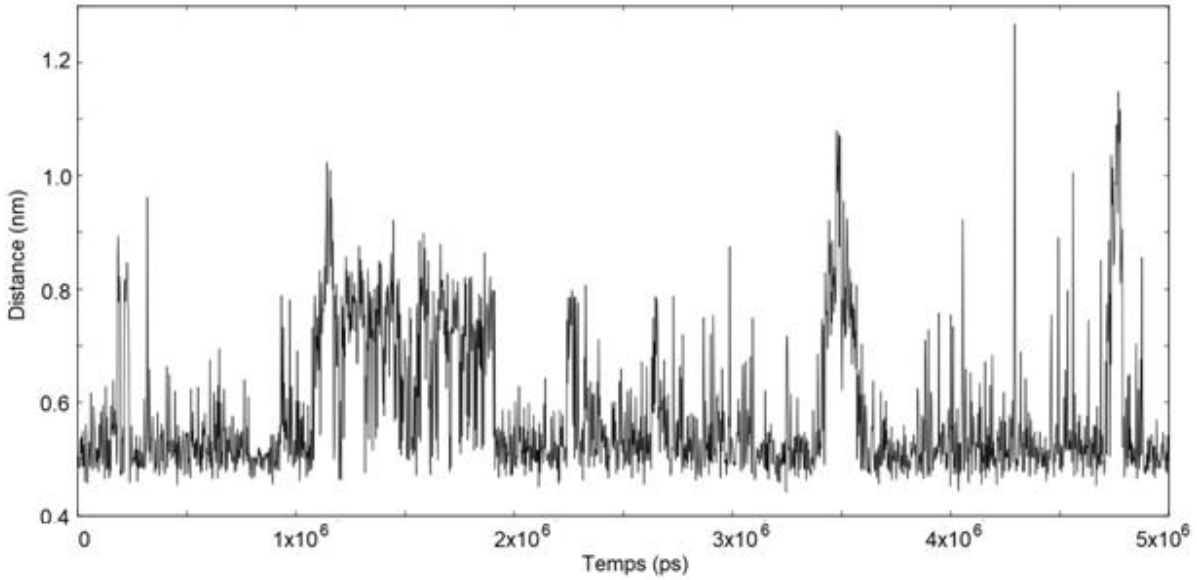
Annexe 14 : RDF de DDHA-PC par rapport à la surface de chaque extrémité (extracellulaire/ intracellulaire) des hélices. On retrouve en abscisse, la distance (en nm) et en ordonnée, la fonction g(r) (« probabilité de présence »). Les résultats du calcul par rapport à la région extracellulaire des hélices apparaissent en violet, et ceux par rapport à la région intracellulaire en vert.



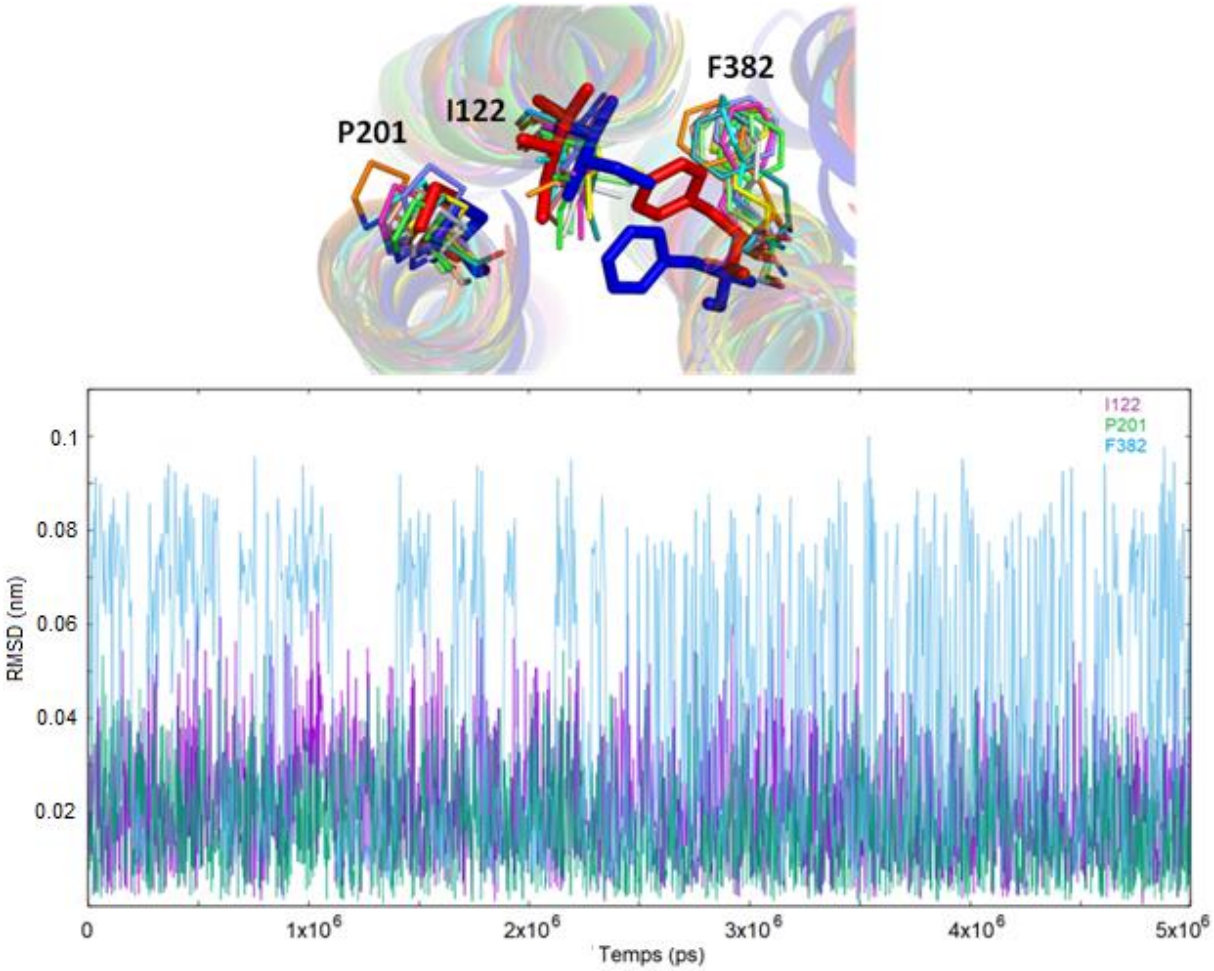
Annexe 15 : RMSD de RD2 dans une membrane constituée de POPC enrichie en DPA-PC à 5 %.



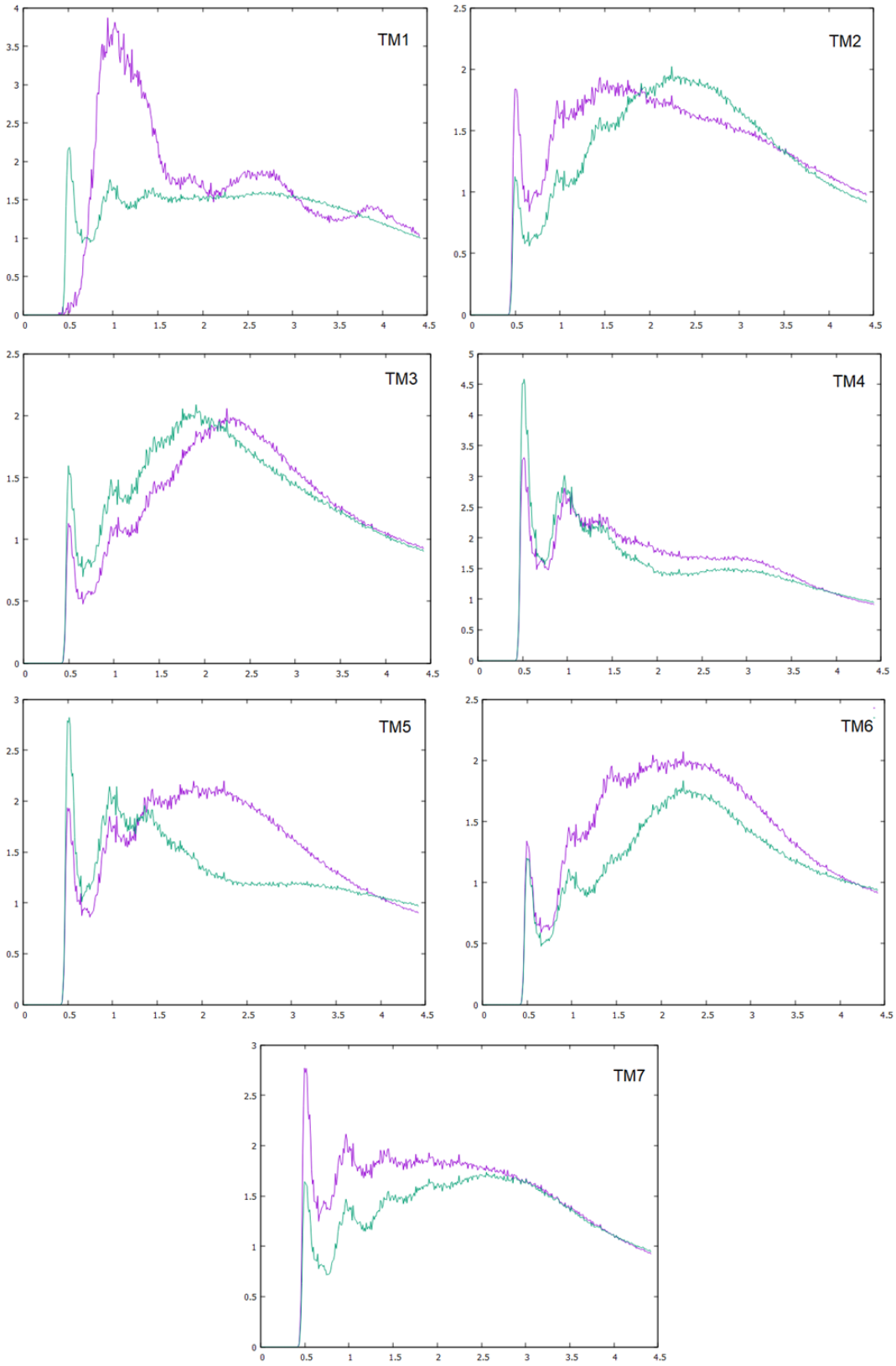
Annexe 16 : Evolution de la distance R132 – E368 en prenant en compte les grains SC.



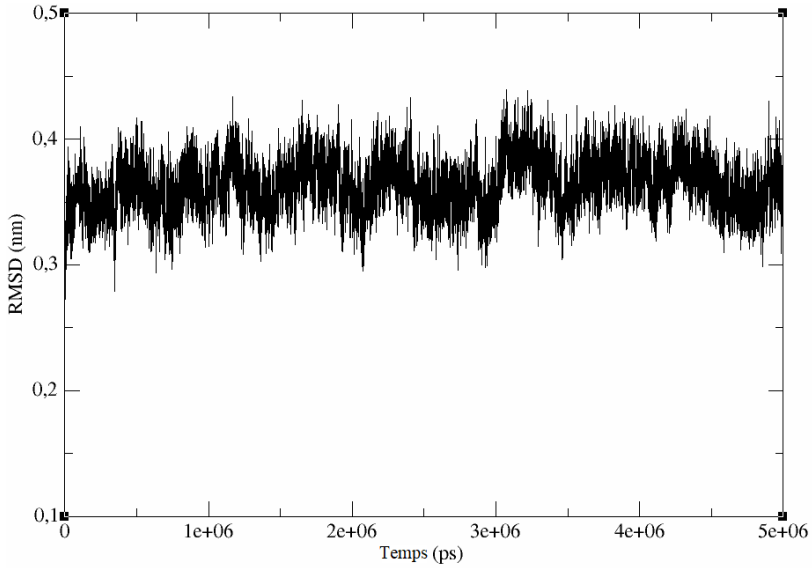
Annexe 17 : RMSD et superposition du cœur de triade. Cette dernière est réalisée sur les structures cristallographiques de la β2AR active (bleu) et le RD2 inactif (rouge).

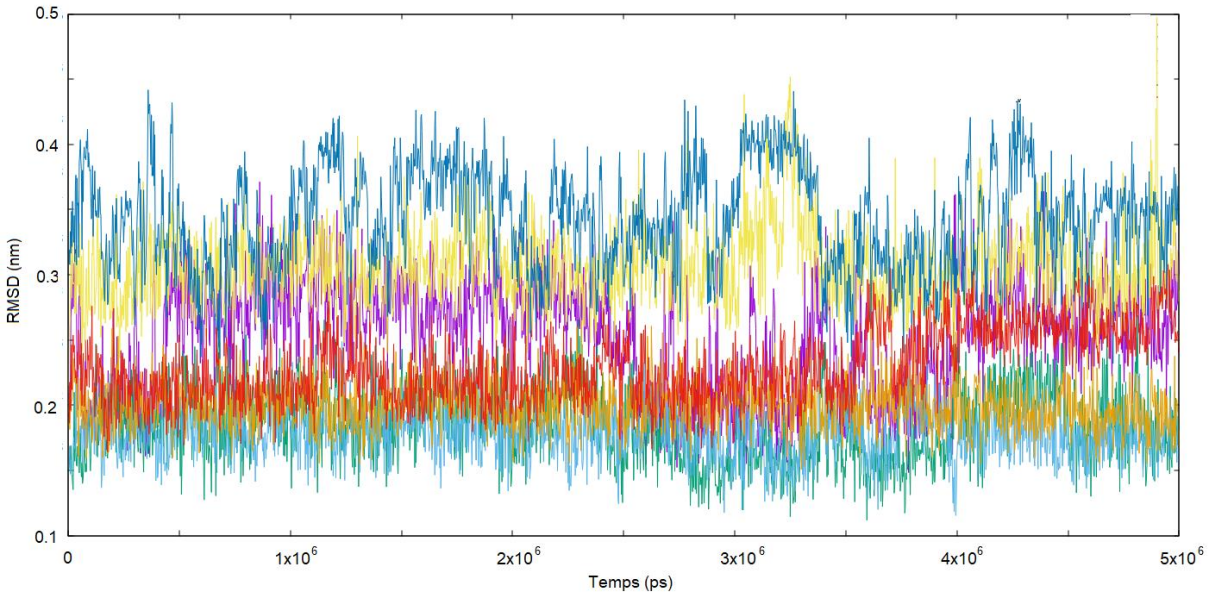


Annexe 18 : RDF de DPA-PC par rapport à la surface de chaque extrémité (extracellulaire/ intracellulaire) des hélices. On retrouve en abscisse, la distance (en nm) et en ordonnée, la fonction g(r) (« probabilité de présence »). Les résultats du calcul par rapport à la région extracellulaire des hélices apparaissent en violet, et ceux par rapport à la région intracellulaire en vert.

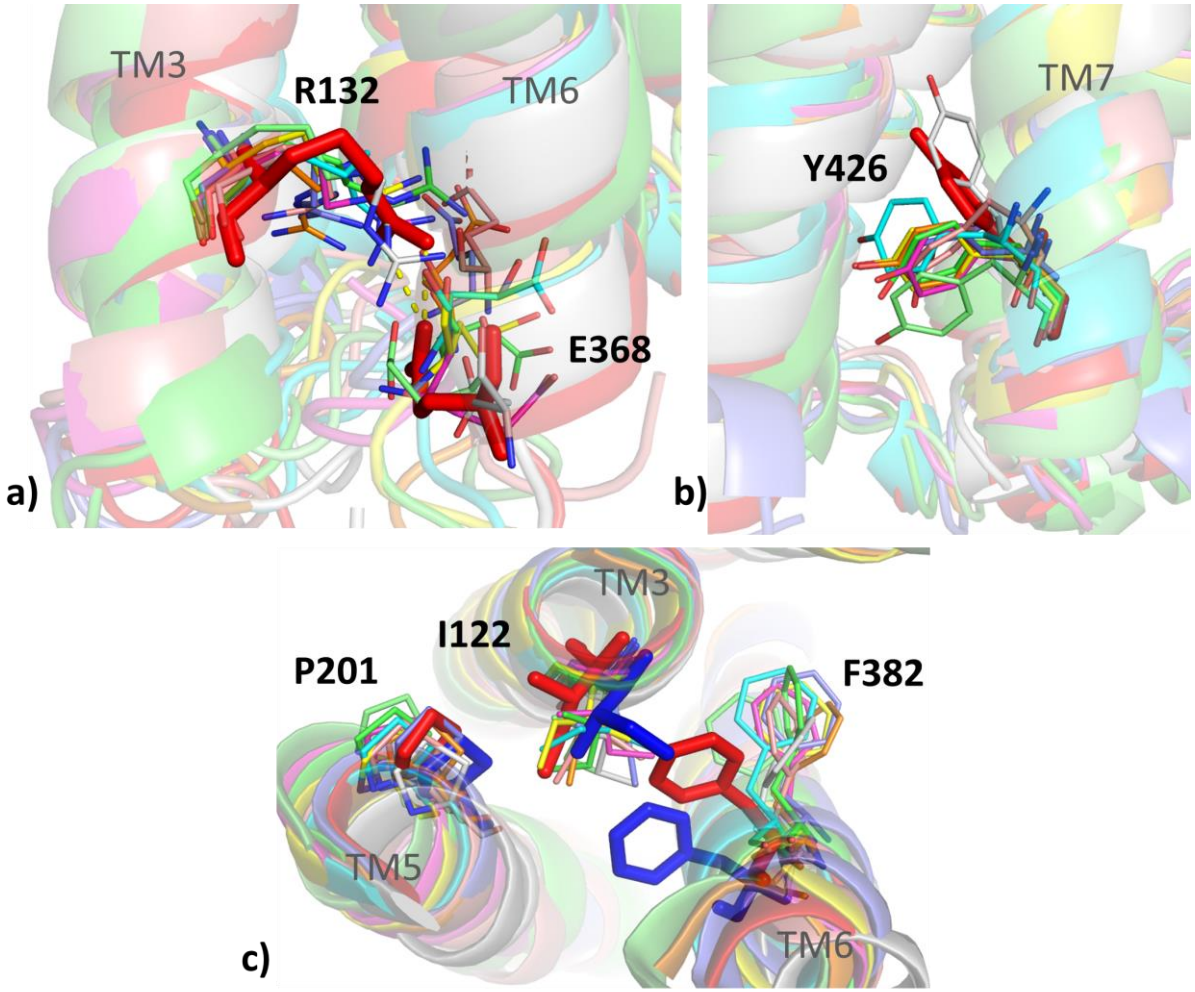


Annexe 19 : RMSD de RD2 entier et de chaque hélice dans une membrane enrichie en DDPA-PC (5 %). Ces dernières peuvent être repérées par une couleur distincte : TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7**.**

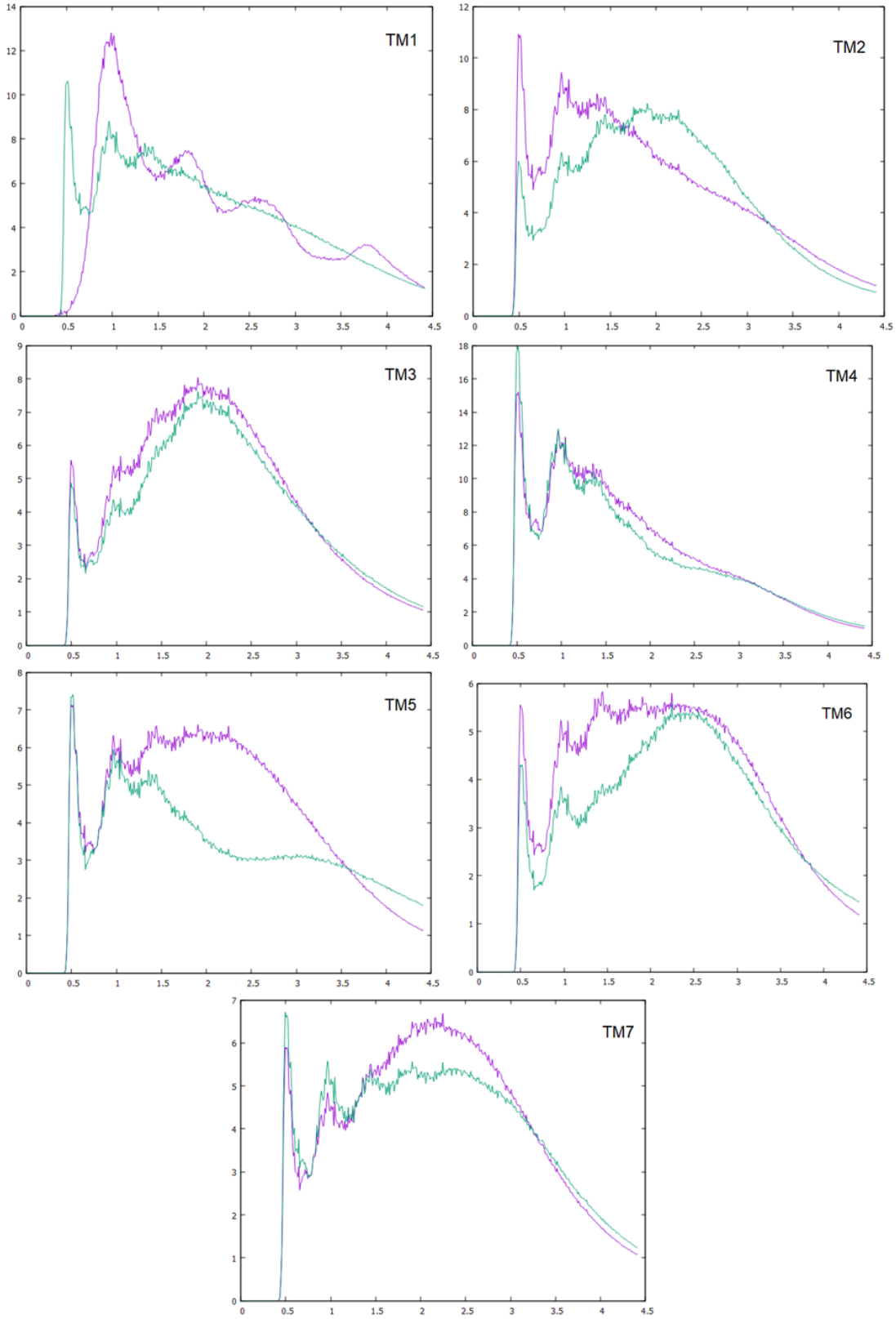




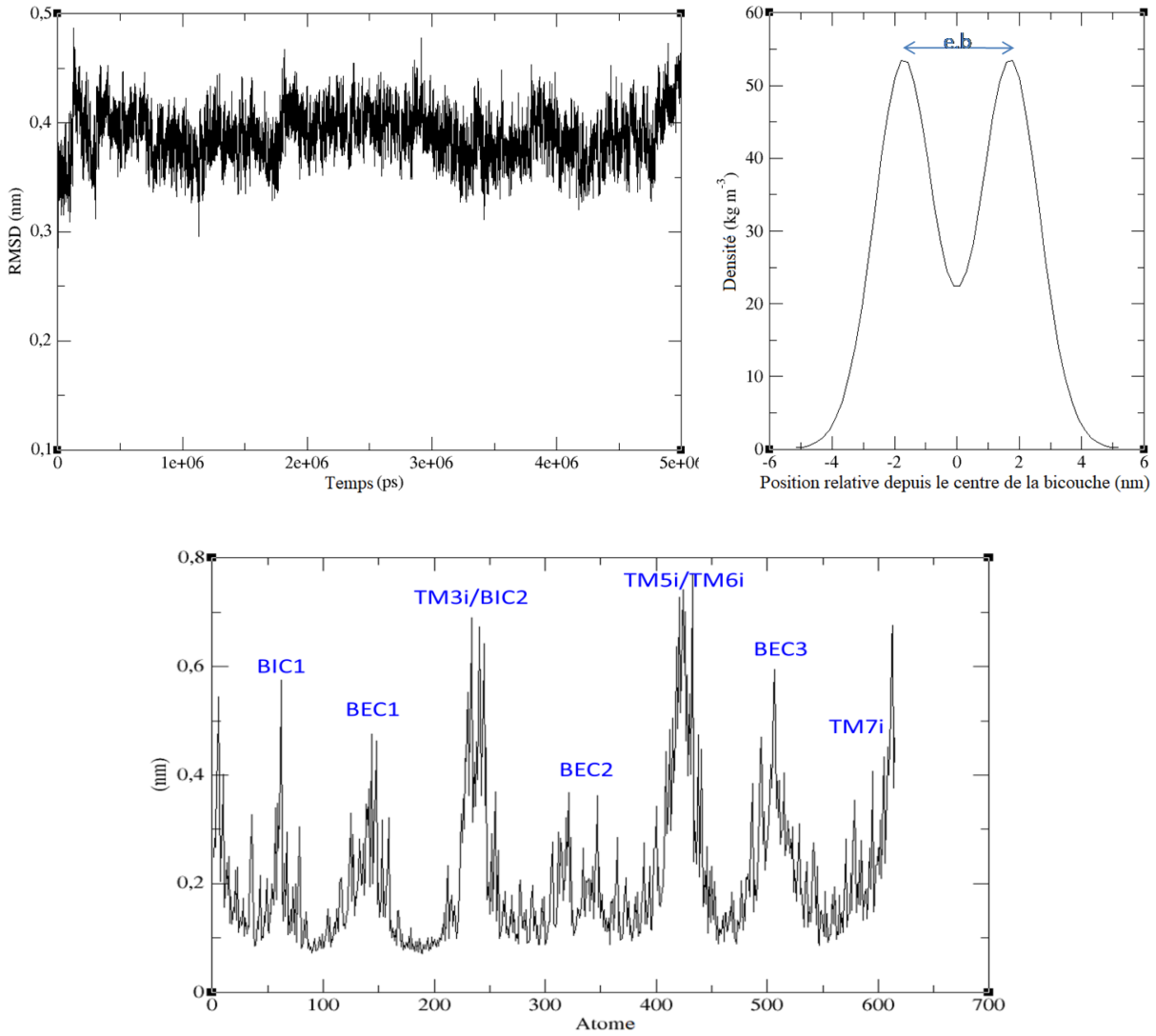
Annexe 20 : Critères caractérisant l'état du RD2 dans une membrane de POPC avec 5 % de DDPA-PC. **a)** Formation du « verrou ionique », **b)** rapprochement du motif NPxxY vers le centre du récepteur avec Y426 orienté vers le haut et **c)** cœur de triade.



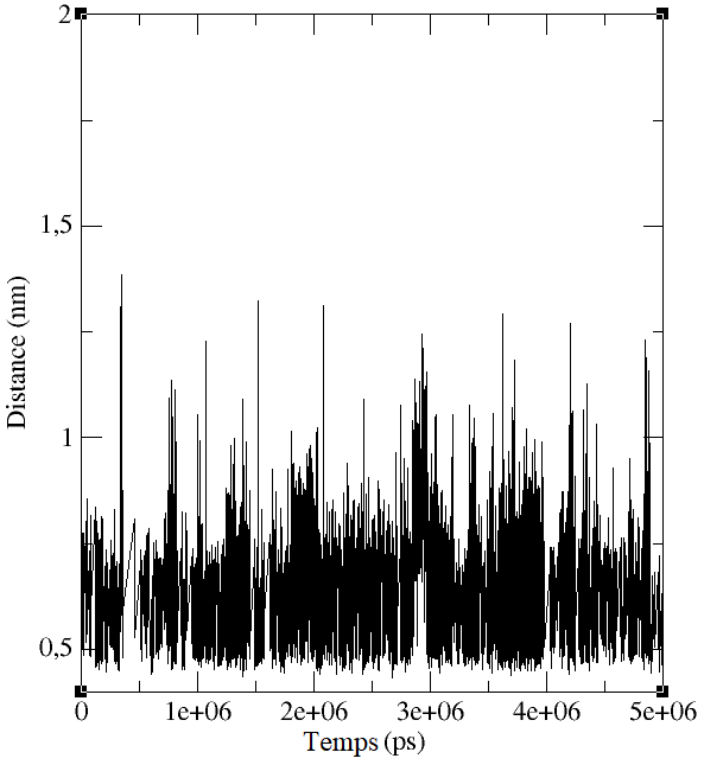
Annexe 21 : RDF de DDPA-PC par rapport à la surface de chaque extrémité (extracellulaire/ intracellulaire) des hélices. On retrouve en abscisse, la distance (en nm) et en ordonnée, la fonction g(r) (« probabilité de présence »). Les résultats du calcul par rapport à la région extracellulaire des hélices apparaissent en violet, et ceux par rapport à la région intracellulaire en vert.



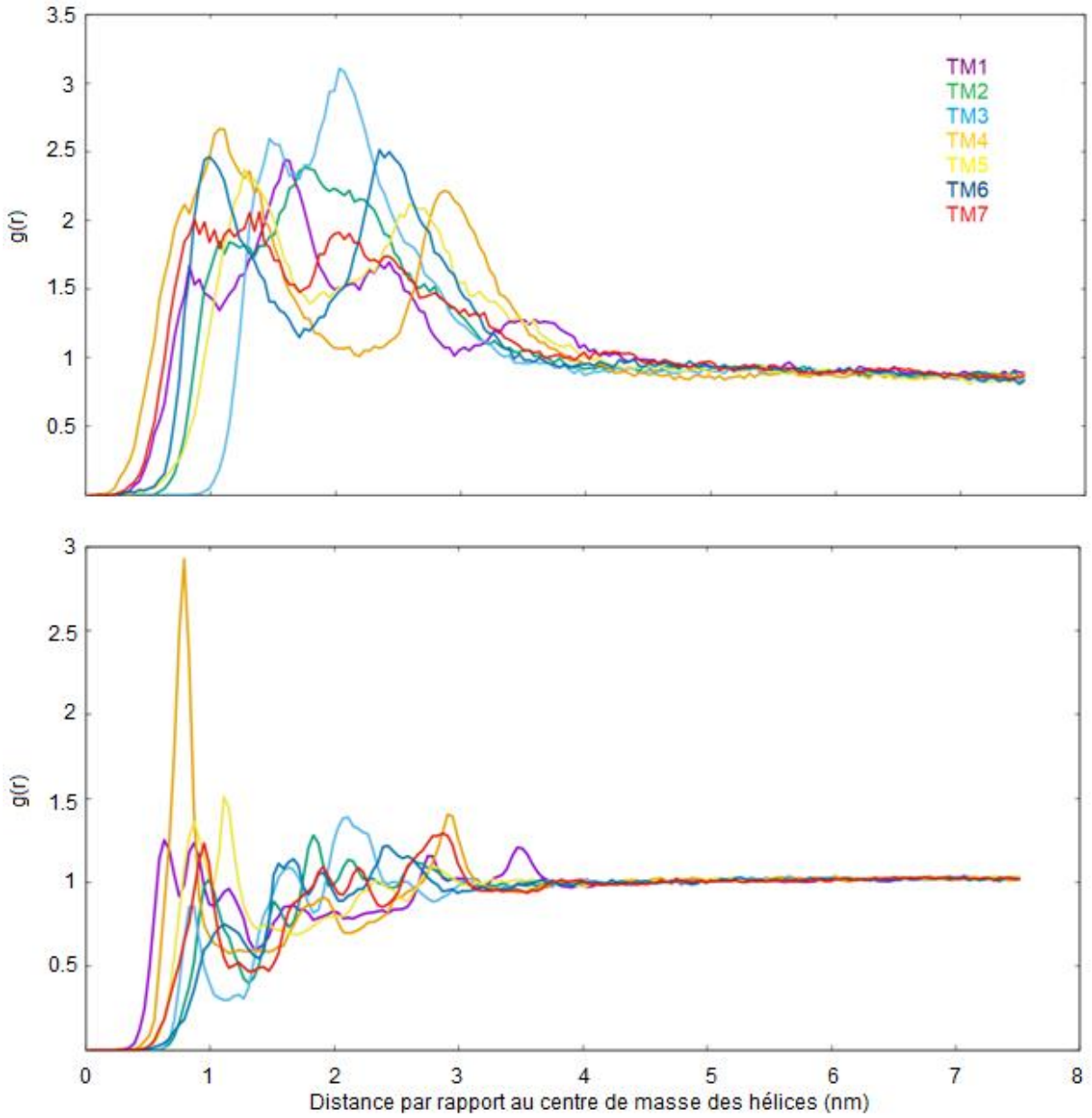
Annexe 22 : Epaisseur d'une membrane de DDHA-PC (*en haut à droite*) et RMSD (*en haut à gauche*) et RMSF (*en bas*) de RD2 dans une membrane simple de DDHA-PC. La structure que nous avons étudié est constituée de 268 résidus et 615 particules. Les régions correspondant aux grandes fluctuations sont indiquées en bleu avec i qui signifie intracellulaire, soit la partie intracellulaire de l'hélice. Pour rappel, BEC et BIC sont les abréviations de boucle extracellulaire et boucle intracellulaire respectivement, et le calcul pour générer le graphe de densité s'effectue sur la même base que celle indiquée en **Figure 44.**



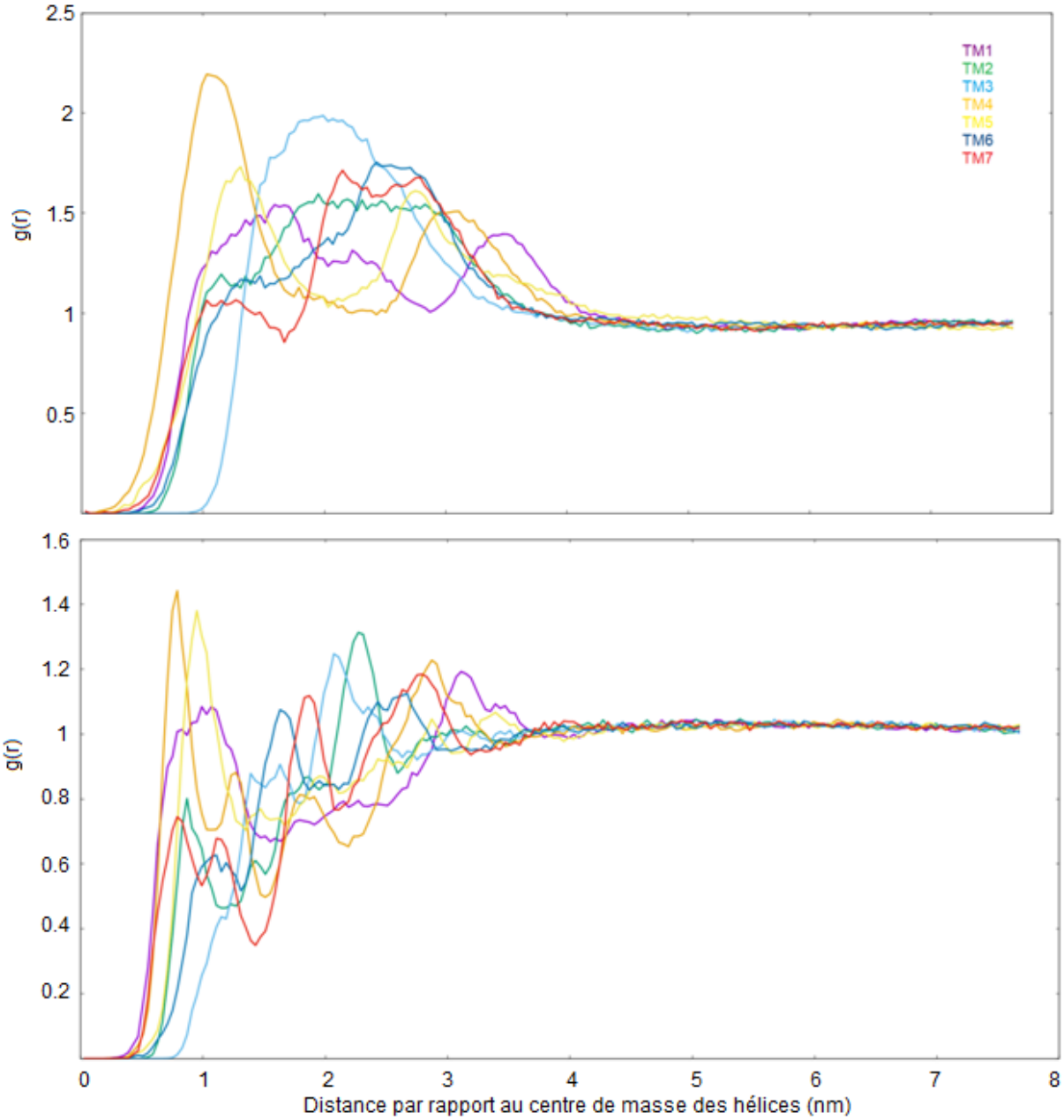
Annexe 23 : Evolution de la distance N-O des résidus R132 et E368 respectivement dans une membrane simple de DDHA-PC.



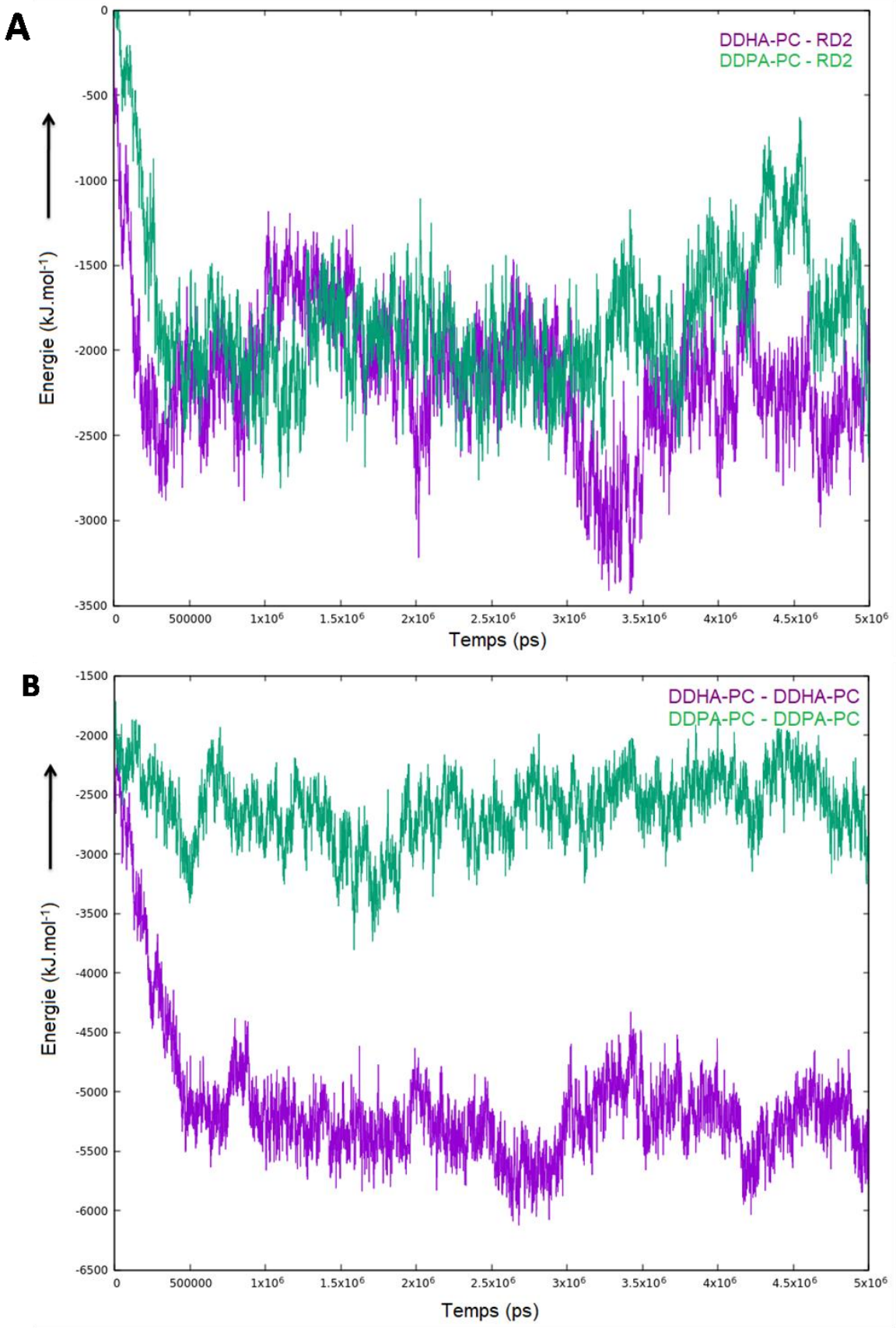
Annexe 24 : RDF de DHA-PC (haut) et du cholestérol (bas ; membrane « malade »).



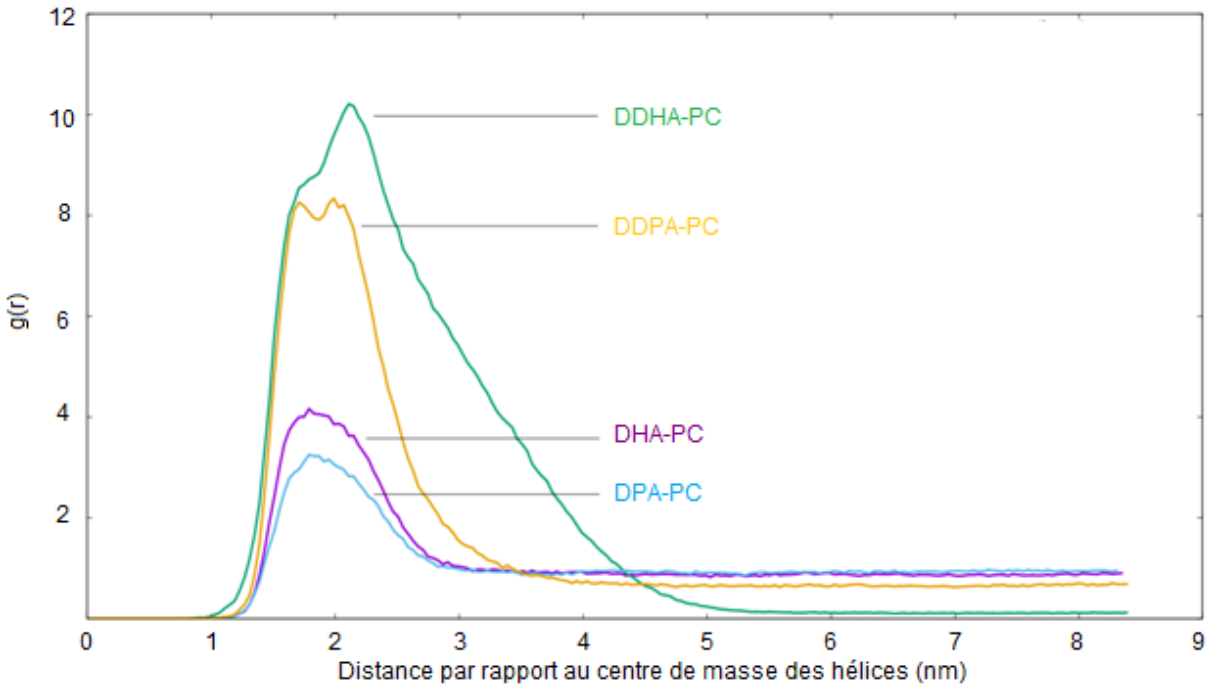
Annexe 25 : RDF de DHA-PC (haut) et du cholestérol (bas ; membrane « saine »).



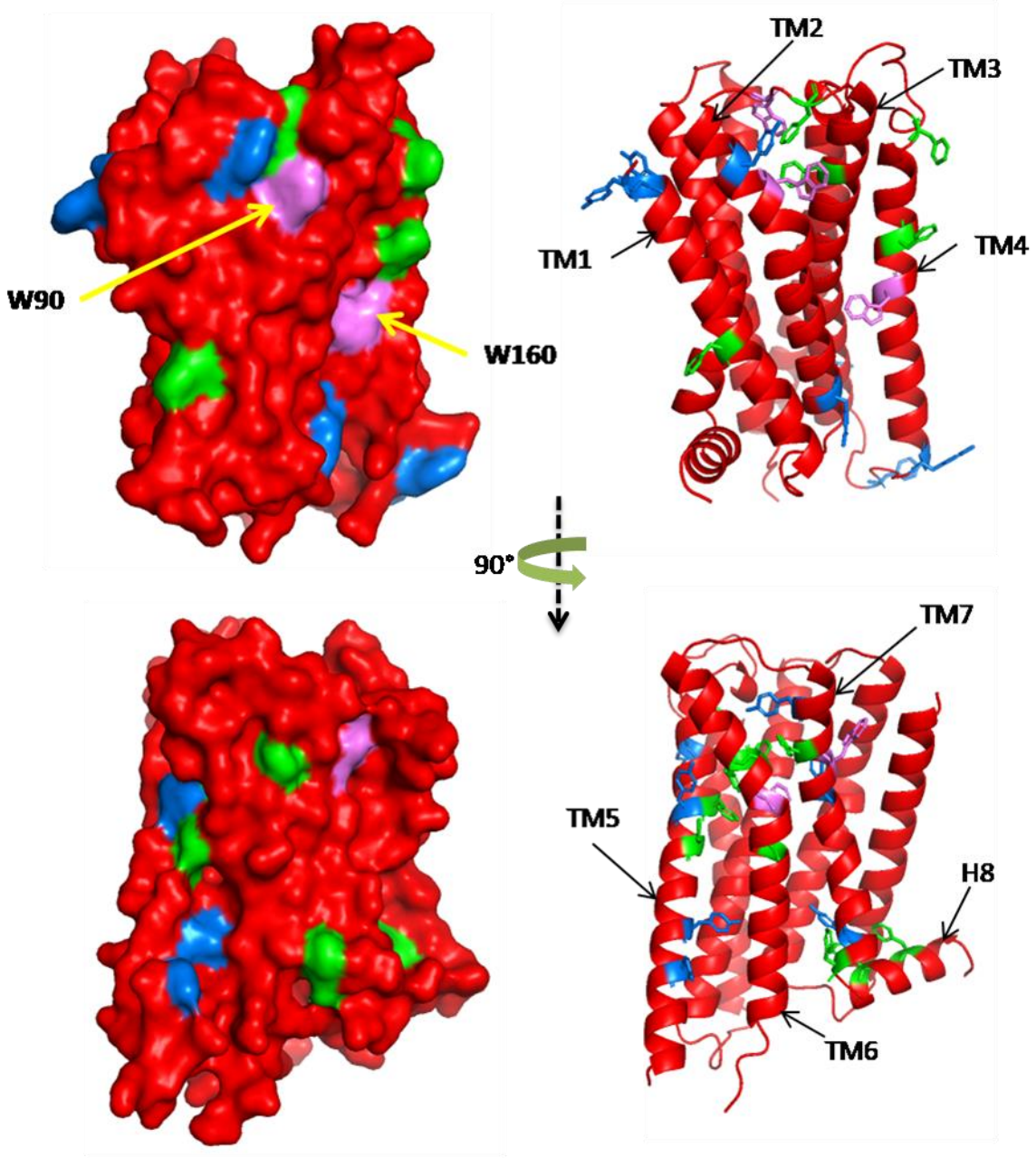
Annexe 26 : Diagrammes énergétiques traduisant A) l'interaction LPI-RD2 et B) l'interaction entre molécules de LPI. Les interactions de DDHA-PC avec RD2 et entre molécules de DDHA-PC sont plus favorables parce qu'elles sont plus basses en énergie.



Annexe 27 : RDF des LPI par rapport au RD2.



Annexe 28 : Surface de RD2 mettant en évidence les résidus aromatiques hydrophobes. Les phénylalanines sont représentées en *stick* vert, les tyrosines en bleu et les tryptophanes en rose.



Projets annexes

Etude de l'affinité d'une molécule nucléaire synthétisée pour les récepteurs à oestrogène – projet de collaboration (Philippe Hermange, ISM, Talence)

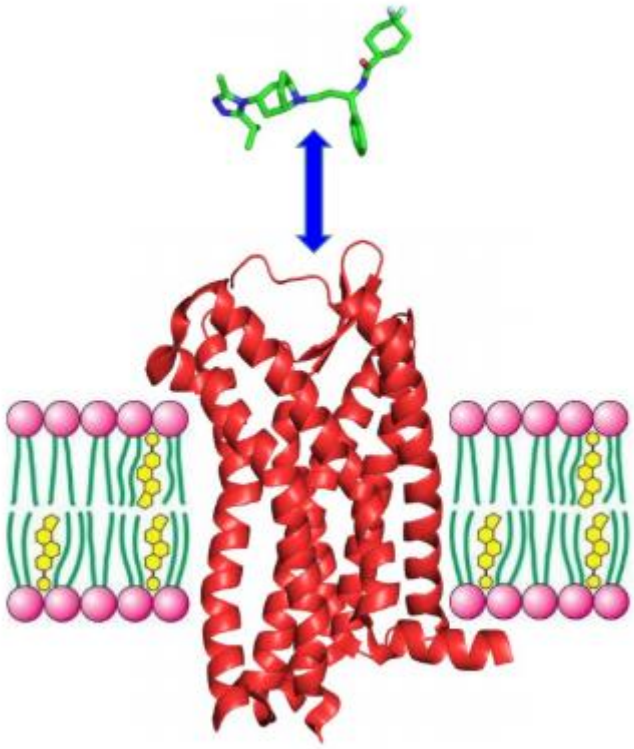
Résumé

The fast, efficient, and functional group tolerant last-step radiolabeling of bioconjugates is crucial for positron emission tomography (PET) applications. In this context, *o*-iodobenzyl alcohol based structures were identified as ideal tags for an easy Pd-catalyzed carbonylation after bioconjugation, and a moxestrol-conjugated precursor was chosen as the model compound for the further studies. Despite scale and time constraints, conditions developed with [^{12}C]CO and [^{13}C]CO were easily transferred to the ^{11}C isotope, and the desired radioactive product was obtained in amounts up to 740 MBq with radiochemical purities higher than 99%. Radio-high-performance liquid chromatography analyses of rat blood samples demonstrated excellent in vivo stability within the time of the acquisition. MicroPET−magnetic resonance imaging showed excretion pathways similar to moxestrol, and molecular modeling was also performed to evaluate the potential ability of this conjugate to bind estrogen receptors α. Thus, being both synthetically and biologically suitable, this strategy clears the path to potential novel biotracers for preclinical PET imaging.

Article : Last-Step Pd-Mediated [^{11}C]CO Labeling of a Moxestrol-Conjugated o-Iodobenzyl Alcohol : From Model Experiments to in Vivo Positron Emission Tomography Studies

T. Cornilleau, M. Simonsen, M. Vang, N. Taib-Maamar, J. Dessolin, H. Audrain,* P. Hermange,* E. Fouquet,* *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2887-2894

Etude de l'impact du cholestérol sur les propriétés conformationnelles du récepteur CCR5 – projet de collaboration (Isabel Alves, CBMN, Pessac)



Résumé

The chemokine CCR5 receptor is target of maraviroc, a negative allosteric modulator of CCR5 that blocks the HIV protein gp120 from associating with the receptor, thereby inhibiting virus cellular entry. As noted with other GPCRs members, the role of the lipid environment in CCR5 signaling remains obscure and very modestly investigated. Controversial literature on the impact of cholesterol depletion in HIV infection and CCR5 signaling, including the hypothesis that cholesterol depletion could inhibit HIV infection, lead us to focus on the understanding of cholesterol impact in the first stages of receptor activation.

Article : Cholesterol impacts chemokine CCR5 receptor ligand binding activity
Pierre Calmet, Christophe Cullin, Sandra Cortès, Maylou Vang, Nada Caudy, Rim Baccouch, Jean Dessolin, Nada Taib Maamar, Sophie Lecomte, Bruno Tillier, Isabel D. Alves, *FEBS J.* **2019**

Références

(1) Zimmerman, M.; Snow, B. An Introduction to Nutrition **2012**, *1.0*.

(2) Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M. ; Roberts K.; Walter P. Protein function. Molecular Biology of the Cell. 4th edition **2002**.

(3) Pauling, L.; Corby, R. B. The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group.*PNAS* **1951**, *37*, 272-281.

(4) Kendrew, J. C. Myoglobin and the structure of proteins. Nobel Lecture, **1962**.

(5) Engelman, D. M.; Steitz, T. A.; Goldman, A. Identifying Nonpolar Transbilayer Helices in Amino Acid Sequences of Membrane Proteins. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **1986**, *15*, 321-353.

(6) Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Section 3.4 Membrane proteins. Molecular Cell Biology. 4th edition, **2000**.

(7) Cournia, Z.; Allen, T. W.; Andricioaei, I.; Antonny, B.; Baum, D.; Brannigan, G.; Buchete, N.-V.; Deckman, J. T.; Delemotte, L.; del Val, C.; et al. Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: A Perspective from Experiments and Theory. *J. Membr. Biol.* **2015**, *248* (4), 611–640.

(8) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459* (7245), 356–363.

(9) Insel, P. A.; Tang, C.-M.; Hahntow, I.; Michel, M. C. Impact of GPCRs in Clinical Medicine: Monogenic Diseases, Genetic Variants and Drug Targets. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1768* (4), 994–1005.

(10) Malo, M.; Brive, L.; Luthman, K.; Svensson, P. Investigation of D2 ReceptorAgonist Interactions Using a Combination of Pharmacophore and Receptor Homology Modeling.*ChemMedChem* **2012**, *7*, 471-482.

(11) Hübner, H. Structure-Guided Development of Heterodimer-Selective GPCR Ligands. *Nat. Commun.* **2015**, 1-12.

(12) Kaczor, A. A.; Silva, A. G.; Loza, M. I.; Kolb, P.; Castro, M.; Poso, A. Structure-Based Virtual Screening for Dopamine D2 Receptor Ligands as Potential Antipsychotics. *ChemMedChem* **2016**, 718-729.

(13) Basith, S.; Cui, M.; Macalino, S. J. Y.; Park, J.; Clavio, N. A. B.; Kang, S.; Choi, S. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space *via* Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1-26.

(14) Fredriksson, R.; Lagerström M. C.; Lundin L. G.; Schiöth H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. Mol. Pharmacol. **2003**, *63* (6), 1256-1272.

(15) Miller, L. J.; Dong, M.; Harikumar, K. G. Ligand Binding and Activation of the Secretin Receptor, a Prototypic Family B G Protein-Coupled Receptor: Secretin Receptor Structure and Function. *J. Pharmacol.* **2012**, *166* (1), 18–26.

(16) Wu, H.; Wang, C.; Gregory, K. J.; Han, G. W.; Cho, H. P.; Xia, Y.; Niswender, C. M.; Katritch, V.; Meiler, J.; Cherezov, V.; et al. Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator. *Science* **2014**, *344* (6179), 58–64.

(17) Paavola, K. J.; Hall, R. A. Adhesion G Protein-Coupled Receptors: Signaling, Pharmacology, and Mechanisms of Activation. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82* (5), 777–783.

(18) Lin, H.-H.; Stacey, M.; Yona, S.; Chang, G.-W. GPS Proteolytic Cleavage of Adhesion-GPCRs. Adhesion-GPCRs : Structure to Function, Chapter 4 **2010**, *706*, 49–58.

(19) Huang, H.-C.; Klein, P. S. The Frizzled Family: Receptors for Multiple Signal Transduction Pathways. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 234.
(20) Nichols, A. S.; Floyd, D. H.; Bruinsma, S. P.; Narzinski, K.; Baranski, T. J. Frizzled Receptors Signal through G Proteins. *Cell. Signal.* **2013**, *25* (6), 1468–1475.
(21) Barnes, M. R.; Duckworth D. M.; Beeley, L. J. Frizzled Proteins Constitute a Novel Family of G Protein-Coupled Receptors, most closely related to the secretin family. *Trends Pharmacol. Sci*. **1998**, *19*(10), 399-400.
(22) Mirzadegan, T.; Benko, G. Sequence Analyses of G-Protein-Coupled Receptors: Similarities to Rhodopsin.*Biochemistry* **2003**, *43*(10), 2759-2767.
(23) Deupi, X.; Dölker, N.; López-Rodríguez M. L.; Campillo M.; Ballesteros J. A.; Mardo L. Structural Models of Class a G Protein-Coupled Receptors as a Tool for Drug Design: Insights on Transmembrane Bundle Plasticity. *Curr. Top. Med. Chem*. **2007,** *7*(10), 991-998.
(24) Seeman, P. Targeting the Dopamine D_2 Receptor in Schizophrenia. *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10* (4), 515–531.
(25) Sokoloff, P.; Giros, B.; Martres, M.-P.; Bouthenet, M.-L.; Schwartz, J.-C. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dopamine Receptor (D3) as a Target for Neuroleptics. *Nature* **1990**, *347* (6289), 146–151.
(26) Rangel-Barajas, C.; Coronel, I.; Florán, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis.* **2015**, *6* (5), 349-368.
(27) Marsden, C. A. Dopamine: The Rewarding Years. **2006**, *147*, S136-S144.
(28) Carlsson, A. La dopamine dans tous ses états. PRIX NOBEL DE MÉDECINE 2000.*médecine/sciences* **2000**, *16*, 1285-1288.
(29) Daubner, S. C.; Le, T.; Wang, S. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch. Biochem. Biophys* .**2011**, *508* (1), 1–12.
(30) Ford, C. P. The Role of D2-Autoreceptors in Regulating Dopamine Neuron Activity and Transmission.*Neuroscience* **2014**, 1-21.
(31) Tripp, G.; Wickens, J. R. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* **2009**, *57* (7–8), 579–589.
(32) Prediger, R. D.; Bortolanza, M.; de Castro Issy, A. C.; dos Santos, B. L.; Del Bel, E.; Raisman-Vozari, R. Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. Handbook of Neurotoxicity **2014**, 753–788.
(33) Müller, C. P.; Reichel, M.; Mühle, C.; Rhein, C.; Gulbins, E.; Kornhuber, J. Brain Membrane Lipids in Major Depression and Anxiety Disorders. *Biochim. Biophys. Acta1851* **2015**, 1052-1065.
(34) Sokoloff, P.; Martres, M. P.; Schwartz, J. C. La famille des récepteurs de la dopamine. *médecine/sciences* **1993**, *9* (1), 12-20.
(35) Lefkowitz, R. J. Transduction of Receptor Signals by -Arrestins. *Science* **2005**, *308* (5721), 512–517.
(36) Dobbs, L. K.; Kaplan, A. R.; Lemos, J. C.; Matsui, A.; Rubinstein, M.; Alvarez, V. A. Dopamine Regulation of Lateral Inhibition between Striatal Neurons Gates the Stimulant Actions of Cocaine. *Neuron* **2016**, *90* (5), 1100–1113.
(37) Laruelle, M.; Abi-Dargham, A.; van Dyck, C. H.; Gil, R.; D'Souza, C. D.; Erdos, J.; McCance, E.; Rosenblatt, W.; Fingado, C.; Zoghbi, S. S.; et al. Single Photon Emission Computerized Tomography Imaging of Amphetamine-Induced Dopamine Release in Drug-Free Schizophrenic Subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (17), 9235–9240.
(38) Wang, S. Structure of the D2 Dopamine Receptor Bound to the Atypical Antipsychotic Drug Risperidone. *Nature* **2018**, *555*, 269-273.

(39) Wheatley, M.; Wootten, D.; Conner, M.; Simms, J.; Kendrick, R.; Logan, R.; Poyner, D.; Barwell, J. Lifting the Lid on GPCRs: The Role of Extracellular Loops: GPCR Extracellular Loops. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165* (6), 1688–1703.
(40) Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Yao, X.-J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C.; et al. GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into B2-Adrenergic Receptor Function. **2007**, *318*, 1266-1273.
(41) Huang, W.; Manglik, A.; Venkatakrishnan, A. J.; Laeremans, T.; Feinberg, E. N.; Sanborn, A. L.; Kato, H. E.; Livingston, K. E.; Thorsen, T. S.; Kling, R. C.; et al. Structural Insights into M-Opioid Receptor Activation. *Nature* **2015**, *524* (7565), 315–321.
(42) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Trong, I. L.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; et al. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein–Coupled Receptor.*Science* **2000**, *289*, 739-745.
(43) Standfuss, J.; Edwards, P. C.; D'Antona, A.; Fransen, M.; Xie, G.; Oprian, D. D.; Schertler, G. F. X. The Structural Basis of Agonist-Induced Activation in Constitutively Active Rhodopsin. *Nature* **2011**, *471* (7340), 656–660.
(44) Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.-J.; Fung, J. J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; DeVree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; et al. Structure of a Nanobody-Stabilized Active State of the B2 Adrenoceptor. *Nature* **2011**, *469* (7329), 175–180.
(45) Kobilka, B. The Structural Basis of G-Protein-Coupled Receptor Signaling (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (25), 6380–6388.
(46) Nygaard, R.; Zou, Y.; Dror, R. O.; Mildorf, T. J.; Arlow, D. H.; Manglik, A.; Pan, A. C.; Liu, C. W.; Fung, J. J.; Bokoch, M. P.; et al. The Dynamic Process of B2-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* **2013**, *152* (3), 532–542.
(47) Dror, R. O.; Arlow, D. H.; Maragakis, P.; Mildorf, T. J.; Pan, A. C.; Xu, H.; Borhani, D. W.; Shaw, D. E. Activation Mechanism of the B2-Adrenergic Receptor. *Biophys. J.* **2012**, *102* (3), 239a.
(48) Latorraca, N. R.; Venkatakrishnan, A. J.; Dror, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem. Rev.* **2017**, 139-155.
(49) Ballesteros, J. A.; Jensen, A. D.; Liapakis, G.; Rasmussen, S. G. F.; Shi, L.; Gether, U.; Javitch, J. A. Activation of the β_2 -Adrenergic Receptor Involves Disruption of an Ionic Lock between the Cytoplasmic Ends of Transmembrane Segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (31), 29171–29177.
(50) Lefkowitz, R. J.; Sun, J.-P.; Shukla, A. K. A Crystal Clear View of the B2-Adrenergic Receptor. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (2), 189–191.
(51) Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. X. Structure of a B1-Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **2008**, *454* (7203), 486–491.
(52) Dror, R. O.; Arlow, D. H.; Borhani, D. W.; Jensen, M. Ø.; Piana, S.; Shaw, D. E. Identification of Two Distinct Inactive Conformations of the β_2-Adrenergic Receptor Reconciles Structural and Biochemical Observations. *PNAS* **2009**,*106* (12), 4689-4694.
(53) Bruzzese, A.; Gil, C.; Dalton J. A. R.; Giraldo J. Structural Insights into Positive and Negative Allosteric Regulation of a G Protein-Coupled Receptor through Protein-Lipid Interactions. *Sci. Rep.* **2018**, 1-14.
(54) Miljanich, G. P.; Sklar L. A.; White D. L.; Dratz E. A. Disaturated and Dipolyunsaturated Phospholipids in the Bovine Retinal Rod Outer Segment Disk Membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1979**, *552*(2), 294-306.
(55) http://www.avantilipids.com/.

(56) Eze, M. O. Phase Transitions in Phospholipid Bilayers: Lateral Phase Separations Play Vital Roles in Biomembranes. *Biochem. Educ.* **1991**, *19* (4), 204–208.
(57) Slater, S. J.; Kelly M. B.; Taddeo F. J.; Ho C.; Rubin E.; Stubbs C. D. The Modulationof Protein Kinase C Activity by Membrane Lipid.*J. Biol. Chem.* **1994**, *269*(7), 4866-4871.
(58) Shaikh, S. R.; Kinnun, J. J.; Leng, X.; Williams, J. A.; Wassall, S. R. How Polyunsaturated Fatty Acids Modify Molecular Organization in Membranes: Insight from NMR Studies of Model Systems. *Biochim. Biophys. Acta*1848 **2015**, 211-219
(59) Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Biotechnol Agron Soc Env.* **2010**, *11*(4), 719-736.
(60) Kornhuber, J.; Schultz, A.; Wiltfang, J.; Meineke, I.; Gleiter, C. H.; Zöchling, R.; Boissl, K.-W.; Leblhuber, F.; Riederer, P. Persistence of Haloperidol in Human Brain Tissue. *Am. J. Psychiatry* **1999**, *156* (6), 885–890.
(61) Alves, I.; Staneva G. Tessier C.; Salgado G. F. Nuss P. The Interaction of Antipsychotic Drugs with Lipids and Subsequent Lipid Reorganization Investigated Using Biophysical Methods. *Biochim. Biophys. Acta1808* **2011**, 2009-2018.
(62) Pinot, M.; Vanni, S.; Pagnotta, S.; Lacas-Gervais, S.; Payet, L.-A.; Ferreira, T.; Gautier, R.; Goud, B.; Antonny, B.; Barelli, H. Polyunsaturated Phospholipids Facilitate Membrane Deformation and Fission by Endocytic Proteins. *Science* **2014**, *345* (6197), 693–697.
(63) Villar, V. A. M.; Cuevas, S.; Zheng, X.; Jose, P. A. Localization and Signaling of GPCRs in Lipid Rafts. Methods in Cell Biology **2016**, *132*, 3–23.
(64) Wassal, S. R.; Stillwell, W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, 57-63.
(65) Polozova, A.; Litman, B. J. Cholesterol Dependent Recruitment of Di22:6-PC by a G Protein-Coupled Receptor into Lateral Domains. *Biophys. J.* **2000**, *79* (5), 2632–2643.
(66) Calder, P. C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.* **2012**, *142* (3), 592S-599S.
(67) Liu, J. J.; Green, P.; John Mann, J.; Rapoport, S. I.; Sublette, M. E. Pathways of Polyunsaturated Fatty Acid Utilization: Implications for Brain Function in Neuropsychiatric Health and Disease. *Brain Res.* **2015**, *1597*, 220–246.
(68) Sinclair, A. J. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Mammalian Brain. *Proc. Nutr. Soc.* **1975**, *34* (3), 287–291.
(69) Rustan, A. C.; Drevon, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. Encyclopedia of Life Sciences **2005**, 1-7.
(70) Moriguchi, T.; Greiner, R. S.; Salem, N. Behavioral Deficits Associated with Dietary Induction of Decreased Brain Docosahexaenoic Acid Concentration. *J. Neurochem.* **2008**, *75* (6), 2563–2573.
(71) Chalon, S. Omega-3 Fatty Acids and Monoamine Neurotransmission.*Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* **2006**, 259-269.
(72) Akter, K.; Gallo D. A.; Martin S. A.; Myronyuk N.; Roberts R. T.; Stercula K.; Raffa R. B. A Review of the Possible Role of the Essential Fatty Acids and Fish Oils in the Aetiology, Prevention or Pharmacotherapy of Schizophrenia. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2012**, *37*, 132-139.
(73) Sun, G. Y.; Simonyi, A.; Fritsche, K. L.; Chuang, D. Y.; Hannink, M.; Gu, Z.; Greenlief, C. M.; Yao, J. K.; Lee, J. C.; Beversdorf, D. Q. Docosahexaenoic Acid (DHA): An Essential Nutrient and a Nutraceutical for Brain Health and Diseases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2018**, *136*, 3–13.
(74) Kim, H.-Y. Biochemical and Biological Functions of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System: Modulation by Ethanol.*Chem. Phys. Lipids* **2008**,*153*(1), 34-46.

(75) Gawrisch, K.; Soubias, O. Structure and Dynamics of Polyunsaturated Hydrocarbon Chains in Lipid Bilayers—Significance for GPCR Function. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *153* (1), 64–75.
(76) Carrié, I.; Clément, M.; de Javel, D.; Francès, H.; Bourre, J.-M. Specific Phospholipid Fatty Acid Composition of Brain Regions in Mice: Effects of n–3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency and Phospholipid Supplementation. *Journal of Lipid Research* **2000**, *41*, 465-472.
(77) Jassawalla, M. J. DHA - The new vital molecule on the block.*J. Obstet. Gynecol. India* **2008**, *58*(6), 479-481.
(78) Grossfield, A.; Feller, S. E.; Pitman, M. C. A Role for Direct Interactions in the Modulation of Rhodopsin by ω-3 Polyunsaturated Lipids. *PNAS* **2006**, *103*(13), 4888-4893.
(79) Sadiq, S. K.; Guixà-González, R.; Dainese, E.; Pastor, M.; Fabritiis, G. D.; Selent, J. Molecular Modeling and Simulation of Membrane Lipid-Mediated Effects on GPCRs. *Curr. Med. Chem*. **2013**, *20*, 22-38.
(80) Guixà-González, R. Membrane Omega-3 Fatty Acids Modulate the Oligomerisation Kinetics of Adenosine A2A and Dopamine D2 Receptors. *Sci. Rep.* **2016**, 1-13.
(81) Niu, S.-L.; Mitchell, D. C.; Lim, S.-Y.; Wen, Z.-M.; Kim, H.-Y.; Salem, N.; Litman, B. J. Reduced G Protein-Coupled Signaling Efficiency in Retinal Rod Outer Segments in Response to *n* -3 Fatty Acid Deficiency. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (30), 31098–31104.
(82) Cordomí, A.; Perez, J. J. Molecular Dynamics Simulations of Rhodopsin in Different One-Component Lipid Bilayers. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (25), 7052–7063.
(83) Feller, S. E.; Gawrisch K.; Woolf T. B. Rhodopsin Exhibits a Preference for Solvation by Polyunsaturated Docosohexaenoic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(15), 4434-4435.
(84) Pitman, M. C.; Grossfield A.; Suits F.; Feller S. E. Role of Cholesterol and Polyunsaturated Chains in Lipid-Protein Interactions: Molecular Dynamics Simulation of Rhodopsin in a Realistic Membrane Environment. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(13), 4576-4577.
(85) Javanainen, M.; Enkavi, G.; Guixà-Gonzaléz, R.; Kulig, W.; Martinez-Seara, H.; Levental, I.; Vattulainen, I. Reduced Level of Docosahexaenoic Acid Shifts GPCR Neuroreceptors to Less Ordered Membrane Regions. *PLOS Comput. Biol.* **2019**, *15* (5), e1007033.
(86) Hashimoto, M.; Hossain, M. S.; Shimada, T.; Yamasaki, H.; Fujii, Y.; Shido, O. Effects of Docosahexaenoic Acid on Annular Lipid fluidity of the Rat Bile Canalicular Plasma Membrane. *Journal of Lipid Research* **2001**, *42*, 1160-1168.
(87) Levental, K. R.; Lorent, J. H.; Lin, X.; Skinkle, A. D.; Surma, M. A.; Stockenbojer, E. A.; Gorfe, A. A.; Levental, I. Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order. *Biophys. J.* **2016**, *110* (8), 1800–1810.
(88) Horn, J. N.; Kao, T.; Grossfield, A. Coarse-Grained Molecular Dynamics Provides Insight into the Interactions of Lipids and Cholesterol with Rhodopsin.*Adv. Exp. Med. Biol*. **2014**, *796*, 75-94.
(89) Dawaliby, R.; Trubbia, C.; Delporte, C.; Masureel, M.; Van, P.; Kobilka, B. K.; Govaerts, C. Allosteric regulation of GPCR activity by phospholipids.*Nat. Chem. Biol.* **2016**,*12*(1), 35–39.
(90) Periole, X. Interplay of G Protein-Coupled Receptors with the Membrane: Insights from Supra-Atomic Coarse Grain Molecular Dynamics Simulations. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (1), 156–185.

(91) Calmet, P.; Cullin, C.; Cortès, S.; Vang, M.; Caudy, N.; Baccouch, R.; Dessolin, J.; Taib-Maamar, N.; Lecomte, S.; Tillier, B.; Alves, I. Cholesterol impacts chemokine CCR5 receptor ligand binding activity. *FEBS Journal*.

(92) Soubias, O.; Gawrisch, K. Probing Specific Lipid−Protein Interaction by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13110–13111.

(93) Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V.-P.; Chien, E. Y. T.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A Specific Cholesterol Binding Site Is Established by the 2.8 Å Structure of the Human β_2-Adrenergic Receptor. *Structure* **2008**, *16*, 897-905.

(94) Lyman, E.; Higgs, C.; Kim, B.; Lupyan, D.; Shelley, J. C.; Farid, R.; Voth, G. A. A Role for a Specific Cholesterol Interaction in Stabilizing the Apo Configuration of the Human A 2A Adenosine Receptor. *Structure* **2009**, *17* (12), 1660–1668.

(95) Khelashvili, G.; Grossfield, A.; Feller, S. E.; Pitman, M. C.; Weinstein, H. Structural and Dynamic Effects of Cholesterol at Preferred Sites of Interaction with Rhodopsin Identified from Microsecond Length Molecular Dynamics Simulations. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *76* (2), 403–417.

(96) Zhukovsky, M. A.; Lee, P. H.; Ott, A.; Helms, V. Putative Cholesterol-Binding Sites in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Coreceptors CXCR4 and CCR5. *Proteins* **2013**, *81*(4), 555-567.

(97) Sengupta, D.; Chattopadhyay, A. Molecular Dynamics Simulations of GPCR–Cholesterol Interaction: An Emerging Paradigm. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848* (9), 1775–1782.

(98) Gimpl, G. Interaction of G Protein Coupled Receptors and Cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **2016**, 61-73.

(99) Manna, M.; Niemela, M.; Tynkkynen, J.; Javanainen, M.; Kulig, W.; Müller, D. J.; Rog, T.; Vattulainen, I. Mechanism of Allosteric Regulation of B2- Adrenergic Receptor by Cholesterol. *eLife* **2016**, 1-21.

(100) Mohole, M.; Prasanna, X.; Sengupta, D.; Chattopadhyay, A. Molecular Signatures of Cholesterol Interaction with Serotonin Receptors. Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules **2018**, *1112*, 151–160.

(101) Sengupta, D.; Prasanna, X.; Mohole, M.; Chattopadhyay, A. Exploring GPCR–Lipid Interactions by Molecular Dynamics Simulations: Excitements, Challenges, and the Way Forward. *J. Phys. Chem. B* **2018**,*122*(22), 5727-5737.

(102) Song, W.; Yen, H.-Y.; Robinson, C. V.; Sansom, M. S. P. State-Dependent Lipid Interactions with the A2a Receptor Revealed by MD Simulations Using In Vivo-Mimetic Membranes. *Structure* **2019**, *27* (2), 392-403.e3.

(103) Klein-Seetharaman, J.; Getmanova, E. V.; Loewen, M. C.; Reeves, P. J.; Khorana, H. G. NMR Spectroscopy in Studies of Light-Induced Structural Changes in Mammalian Rhodopsin: Applicability of Solution 19F NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (24), 13744–13749.

(104) Tapaneeyakorn, S.; Goddard, A. D.; Oates, J.; Willis, C. L.; Watts, A.. Solution- and Solid-State NMR Studies of GPCRs and Their Ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1462-1475.

(105) Shimada, I.; Ueda, T.; Kofuku, Y.; Eddy, M. T.; Wüthrich, K. GPCR Drug Discovery: Integrating Solution NMR Data with Crystal and Cryo-EM Structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (1), 59–82.

(106) Hansson, T.; Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. F. Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 190-197.

(107) Karplus, M.; Kuriyan, J. Molecular Dynamics and Protein Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (19), 6679–6685.
(108) Kmiecik, S.; Gront, D.; Kolinski, M.; Wieteska, L.; Dawid, A. E.; Kolinski, A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (14), 7898–7936.
(109) van Montfort, R. L. M.; Workman, P. Structure-Based Drug Design: Aiming for a Perfect Fit. *Essays Biochem.* **2017**, *61* (5), 431–437.
(110) abraham. Manual-5.0.1.Pdf.
(111) van Gunsteren et al. Biomolecular Simulation: The GROMOS 96 Manual and User Guide.
(112) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.
(113) 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* (19), 8577–8593.
(114) van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.; Rullmann, J. A. C. Inclusion of Reaction Fields in Molecular Dynamics. Application to Liquid Water. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1978**, *66*, 58.
(115) 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.
(116) Hockney, R. W.; Goel, S. P.; Eastwood, J. W. Quiet High-Resolution Computer Models of a Plasma.*J. Comp. Phy.* **1974**, *14*(2), 148-158.
(117) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (12), 1463–1472.
(118) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. Intermolecular Forces **1981**, *14*, 331–342.
(119) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935.
(120) Berendsen, H. J. C. Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath. Computer Simulation in Materials Science **1991**, 139–155.
(121) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (1), 014101.
(122) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52* (12), 7182–7190.
(123) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–3690.
(124) 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.* **2007**, *111*, 7812-7824.
(125) Marrink, S. J.; de Vries, A. H.; Mark, A. E. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*(2), 750-760.
(126) Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (5), 819–834.

(127) de Jong, D. H.; Singh, G.; Bennett, W. F. D.; Arnarez, C.; Wassenaar, T. A.; Schäfer, L. V.; Periole, X.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J. Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**,*9*, 687-697.
(128) Yesylevskyy, S. O.; Schäfer, L. V.; Sengupta, D.; Marrink, S. J. Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (6), 1-17.
(129) Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Perspective on the Martini Model. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6801-6822.
(130) Martini 3.0. **2018** (http://cgmartini.nl/index.php?start=12).
(131) Bradley, R.; Radhakrishnan, R. Coarse-Grained Models for Protein-Cell Membrane Interactions. *Polymers* **2013**, *5* (3), 890–936.
(132) Periole, X.; Cavalli, M.; Marrink, S.-J.; Ceruso, M. A. Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (9), 2531–2543.
(133) López, C. A.; rzepiela, A. J.; de Vries, A. H.; Dijkhuizen, L.; Hünenberger, P. H.; Marrink, S. J. Martini Coarse-Grained Force Field: Extension to Carbohydrates.*J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*(12), 3195-3210.
(134) Uusitalo, J. J.; Ingólfsson, H. I.; Akhshi, P.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J. Martini Coarse-Grained Force Field: Extension to DNA. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), 3932–3945.
(135) Discovery Studio Modeling Environment,Release 3.1, AccelrysSoftware Inc., San Diego, CA, **2012**.
(136) Wassenaar,T. A.; Ingólfsson, H. I.; Böckmann, R. A.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J.Computational Lipidomics with Insane: A Versatile Tool for Generating Custom Membranes for Molecular Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 2144-2155.
(137) 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* (7), 843–856.
(138) Wassenaar, T. A.; Pluhackova, K.; Böckmann, R. A.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Going Backward: A Flexible Geometric Approach to Reverse Transformation from Coarse Grained to Atomistic Models. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 2676-2690.
(139) Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. Fluid Phase Lipid Areas and Bilayer Thicknesses of Commonly Used Phosphatidylcholines as a Function of Temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808* (11), 2761–2771.