



**HAL**  
open science

## Comment les lipides polyinsaturés facilitent les déformations membranaires

Marion Tiberti

► **To cite this version:**

Marion Tiberti. Comment les lipides polyinsaturés facilitent les déformations membranaires. Biologie moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6020 . tel-02948950

**HAL Id: tel-02948950**

**<https://theses.hal.science/tel-02948950>**

Submitted on 25 Sep 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.

# THÈSE DE DOCTORAT

## Comment les lipides polyinsaturés facilitent les déformations membranaires

**Marion TIBERTI**

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
**docteur en** science de la vie et de la santé  
Mention : Interactions moléculaires et cellulaires  
d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par** : Bruno ANTONNY  
**Co-encadrée par** : Romain GAUTIER

**Soutenu le** : 11/12/2019

Devant le jury, composé de :

**Laurent COUNILLON**, Professeur, Université  
côte d'Azur, LP2M

**Isabelle CALLEBAUT**, Directrice de  
recherches, CNRS UPMC

**Marc BAADEN**, Directeur de recherches,  
CNRS IBPC

**Catherine ETCHEBEST**, Professeur,  
Université Paris Diderot INTS

**Thierry FEIRERA**, Maître de conférences,  
Université de Poitiers, STIM – Directeur  
scientifique ConicMeds Development

**Bruno ANTONNY**, Directeur de recherche,  
CNRS IPMC

**Romain GAUTIER**, Maître de conférences,  
Université Côte d'Azur CNRS IPMC



# Comment les lipides polyinsaturés facilitent les déformations membranaires

## **Jury :**

### **Président du jury**

Laurent COUNILLON, Professeur, Université côte d'azur - LP2M CNRS-UMR 7370  
Nice, France

### **Rapporteurs**

Isabelle CALLEBAUT, Directrice de recherche, UPMC CNRS-UMR 7590 Paris, France

Marc BAADEN, Directeur de recherche, IBPC CNRS-UPR 9080 Paris, France

### **Examineurs**

Catherine ETCHEBEST, Professeur, Université Paris Diderot, INSERM-UMR\_S 1134

Thierry FEIRERA, Maître de Conférences, Université de Poitiers, STIM Poitiers,  
France

### **Directeurs de thèse**

Bruno ANTONNY, Directeur de recherche, IPMC CNRS-UMR 7275 Valbonne France

Romain GAUTIER, Maître de Conférences, Université Côte-d'azur, IPMC CNRS-UMR  
7275 Valbonne France



---

# Résumé :

## Comment les lipides polyinsaturés facilitent la déformation membranaire

Les phospholipides polyinsaturés facilitent la déformation et la fission de la membrane par les protéines d'endocytose, ce qui suggère un lien entre l'enrichissement frappant de ces lipides dans les membranes plasmiques neuronales et la vitesse très rapide à laquelle l'endocytose survient dans les neurones. Afin d'explorer davantage l'impact des phospholipides polyinsaturés sur la déformation et la fission des membranes, des simulations de dynamique moléculaire sont réalisées sur des membranes modèles dans lesquelles la distribution des chaînes polyinsaturées est contrôlée de plusieurs façons.

Dans un premier temps, le profil des chaînes a été modifié de façon systématique en introduisant un nombre croissant d'insaturation sur les chaînes aliphatiques en position 1 et/ou 2. Dans un deuxième temps, la distribution des phospholipides polyinsaturés a été limitée à un seul feuillet de la membrane pour mimer l'asymétrie de composition des deux feuillets des membranes biologiques.

Ces approches ont montré que (i) les mouvements verticaux des chaînes aliphatiques le long de la membrane augmentent avec la polyinsaturation et sont responsables de la flexibilité croissante des membranes ; (ii) l'effet mécanique des phospholipides polyinsaturés augmente en fonction du nombre d'insaturation, avec notamment une différence entre les chaînes 20 :4 (omega-6) et 22 :6 (omega-3) ; (iii) la combinaison d'une chaîne aliphatique saturée et d'une chaîne aliphatique polyinsaturée dans les phospholipides permet un compromis entre imperméabilité et flexibilité membranaires ; (iv) les phospholipides polyinsaturés stimulent la déformation et la fission de la membrane s'ils sont présents dans le feuillet externe à la déformation (c'est-à-dire cytosolique dans le cas d'une endocytose) mais ils n'ont pas d'effet dans le feuillet opposé. Ces observations permettent de proposer un modèle dans lequel les chaînes polyinsaturées adaptent leur conformation à la courbure du feuillet convexe. Ces résultats concordent avec la distribution des chaînes aliphatiques polyinsaturées dans les membranes cellulaires.

**Mots clés :** membrane, lipides polyinsaturés, dynamique moléculaire



---

# Abstract :

## How polyunsaturated lipids facilitate membrane deformation

Polyunsaturated phospholipids facilitate the deformation and fission of membrane by endocytosis proteins. It suggests a link between the striking enrichment of these lipids in neuronal plasma membranes and the fast endocytosis. In order to further explore the impact of polyunsaturated phospholipids on membrane deformation, molecular dynamics simulations are performed on model membranes in which the distribution of polyunsaturated chains is controlled in several ways.

First, the acyl chain profile was systematically modified by introducing an increasing number of unsaturation on the acyl chains in position 1 and/or 2. In a second step, the distribution of polyunsaturated phospholipids was limited to only one leaflet of the membrane to mimic the asymmetric composition of biological membranes.

These approaches have shown that (i) the vertical movements of acyl chains along the membrane increase with polyunsaturation and are responsible for the increasing flexibility of membranes ; (ii) the mechanical effect of polyunsaturated phospholipids increases with the number of unsaturation, including a difference between chains 20 :4 (omega-6) and 22 :6 (omega-3) ; (iii) the combination of a saturated acyl chain and a polyunsaturated acyl chain in phospholipids allows a compromise between impermeability and membrane flexibility ; (iv) polyunsaturated phospholipids stimulate membrane deformation and fission if they are present in the outer leaflet to the deformation (i.e. cytosolic in the case of endocytosis) but they have no effect in the opposite leaflet. We propose a model in which polyunsaturated chains adapt their conformation to the curvature of the convex leaflet. These results are consistent with the distribution of polyunsaturated acyl chains in cell membranes.

**Keywords :** membrane, polyunsaturated lipids, molecular dynamics

---

# Remerciements

Je tiens à remercier le **Dr. Bruno Antonny** et le **Dr. Romain Gautier** pour m'avoir accordé leur confiance et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci **Romain** pour ces 3 années. Merci de m'avoir encadré tout au long de ma thèse et de m'avoir appris tant de chose depuis même les cours de Licence. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi toujours dans la bonne humeur et merci pour ton soutien dans les périodes de doutes. Promis, je ne te conduirai plus en (haute) montagne, continue de flotter sur l'eau et de diner face à la reine d'Angleterre ! Merci **Bruno** pour m'avoir appris à développer mon sens critique et m'avoir laissé la chance d'acquérir de nouvelles compétences expérimentales. Merci pour ton honnêteté, tes conseils et la bienveillance dont tu fais preuve. Pour finir : c'était *trop* bien de travailler avec toi, *genre* j'ai beaucoup appris pendant ces 3 ans même si j'ai parfois été au *bout de ma vie* !

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe pour leur gentillesse et les bons moments passés avec eux. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tous ! Je souhaite commencer par remercier le **Dr. Marco Manni** avec qui j'ai collaboré dès le début de ma thèse. Merci de m'avoir passé le relais en me transmettant quelques compétences expérimentales afin de poursuivre mon projet sous tous ses aspects. Merci à **Maud Magdeleine** pour tous les bons moments passés, les blagues (douteuses), les instants potins et ton soutien. Merci à petit poney référence essentielle à ma thèse grâce à ta jolie petite famille. Merci au **Dr. Bruno Mesmin** dont les jeux de mots « j'y go ! d'agneau ? » ont ponctué ces 3 années. Merci également pour ton aide, tes conseils et ta bonne humeur quotidienne. Merci au **Dr. Joëlle Bigay** pour ton aide lors de mes essais expérimentaux ainsi que pour nos conversations plus tardives et n'oublie pas « pense à rentrer chez toi ! ». Merci à **Joël Polidori** pour tous tes conseils, ta gentillesse et ton aide en mécanique pour mes (nombreuses) mésaventures de voiture. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci au **Dr. Hélène Barelli** pour nos conversations oméga 3 et celles plus personnelles. Merci au **Dr. Amanda Paitel** pour ta bonne humeur permanente. Thanks **Meng-Chen Tsai** and **Dr. David Kovacs** for your kindness and indulgence with my level of English. Good luck for the future and good luck Meng for the end of your thesis. Bonne chance aux nouveaux thésards **Mérodie Subra** et **Antoine Reynaud** je vous souhaite que les 3 prochaines années soient aussi enrichissantes que celles que je viens de passer.

---

Je remercie également la **plateforme d'analyse des biomolécules** de l'institut et particulièrement **Lucile Fleuriot**. Tu as toujours été conciliante, patiente et de bon conseil pour m'aider à avancer dans mes mises au point.

Je tiens également à remercier les équipes voisines du **Dr. Guillaume Drin** et des **Dr. Michel Franco et Frédéric Luton** pour leur sympathie et leur bonne humeur. Merci **Guillaume** de m'avoir appris à me cacher derrière une paille dans le désert malgré l'inflation du prix des madeleines; un drame pour nous durant ces 3 années. Merci au **Dr. Souade Ikhlef** pour ton soutien et bonne chance pour la suite. Merci au Dr. **Olfa Khalfallah** pour ta gentillesse et tes conseils.

Par ailleurs, je remercie mes camarades thésards pour les bons moments, soirées jeux, apéro, discussions et soutien tout au long de ces 3 années.

Merci au **Dr. Renaud Bussière**, le premier de la bande à avoir ton titre de docteur, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et tes renauderies comme on dit entre nous. Merci de nous avoir supporté aussi parfois (surtout avec Wejdane)! J'espère te revoir très vite à Tokyo ... Londres ... ou Berlin! Merci à **Audrey Valverde** pour les fous rires, ta bonne humeur et ton accent du sud qu'on adore. Merci de toujours t'investir à 100 % dans les organisations même si on ne te suit pas toujours;) reste comme tu es! Merci à **Ligia Ramos Dos Santos** de nous avoir apporté un peu du Brésil avec toi et de ta folie. Merci à **Méliné Simsir** mon acolyte en modélisation moléculaire, merci pour tes bons gâteaux, nos conversations modélo et autre. Bon courage pour la fin de ta thèse!

Merci à **Marie Deprez, au Dr. Alexandre Bourgeois et au Dr. Wejdane El mannaa** pour qui ces 3 années n'ont fait que renforcer une amitié déjà existante. **Marie** on a commencé ensemble en licence et on a réussi à soutenir notre thèse à un jour d'écart. Merci pour ton amitié et tous les bons moments passés en ta compagnie depuis toutes ces années. Ces 3 années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans ton soutien, notre complicité et nos messages « sushis? ». Je nous souhaite encore de longues années d'amitié et de fous rires mais je n'en doute pas!

Merci à mes *besta* **Alex et Wejdane**. Je ne pensais pas pouvoir rire autant et partager d'aussi bons moments. Je vous aime encore plus que J.J Goldman malgré vos remarques douteuses sur mon travail et mes figures. Si une page se tourne avec l'obtention de nos doctorats (enfin pour le mien je croise encore les doigts) et nos projets futurs, notre folie commune nous suivra. Je vous souhaite le meilleur dans vos vies professionnelles et personnelles et encore de merveilleux moments à partager ensemble. Les vacances à New York c'est pour quand? Après un Kitkat je suppose...

---

Je tiens également à remercier l'ensemble de **mes amis**, hors institut, qui ne m'ont pas tenu rigueur de mes nombreuses absences à des événements plus ou moins importants... particulièrement ces derniers mois. Merci pour votre amitié et votre affection depuis de nombreuses années.

Enfin, je remercie grandement **ma famille** pour leurs encouragements. Je remercie particulièrement **mes parents** pour votre soutien dans mes choix, mes études et merci pour l'amour que vous me portez. Si aujourd'hui j'en suis arrivée là, aussi bien sur le plan professionnel que personnel, c'est grâce à vous. J'espère que vous êtes fiers de moi.

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>Les membranes biologiques</b>	<b>25</b>
1.1	De la découverte des phospholipides au modèle de la <i>mosaïque fluide</i> . . . . .	25
1.2	Les lipides membranaires majeurs . . . . .	26
1.2.1	Les sphingolipides . . . . .	27
1.2.2	Les stérols . . . . .	28
1.2.3	Les glycérophospholipides . . . . .	28
1.3	Synthèse des acides gras chez les mammifères . . . . .	30
1.3.1	Cas des acides gras saturés et insaturés de type oméga 9 . . . . .	30
1.3.2	Cas des acides gras insaturés essentiels (oméga 3 et oméga 6) . . . . .	32
1.4	Incorporation des acides gras dans les phospholipides . . . . .	33
1.5	La structure membranaire . . . . .	35
1.5.1	L'architecture des membranes . . . . .	35
1.5.2	Répartition des lipides au sein des membranes . . . . .	41
<b>2</b>	<b>Les phospholipides polyinsaturés</b>	<b>47</b>
2.1	Propriétés physico-chimiques des phospholipides polyinsaturés . . . . .	48
2.1.1	Caractéristiques des phospholipides en fonction de l'insaturation . . . . .	48
2.1.2	Du DHA droit et rigide au DHA contorsioniste . . . . .	49
2.1.3	Différences entre les n-3 et les n-6 . . . . .	53
2.1.4	Oxydation des phospholipides . . . . .	54
2.2	Phospholipides polyinsaturés et propriétés physico-chimiques des membranes . . . . .	55
2.2.1	Perméabilité et <i>bending modulus</i> . . . . .	55
2.2.2	Interaction phospholipides polyinsaturés et cholestérol . . . . .	57
2.3	L'importance des AG polyinsaturés pour la santé . . . . .	58
2.3.1	Comment établir leur rôle? . . . . .	58
2.3.2	Importance de la balance n-6/n-3 . . . . .	59

---

2.4	L'importance des phospholipides polyinsaturés dans les fonctions cellulaires . . .	60
2.4.1	Le stockage des lipides . . . . .	60
2.4.2	Les récepteurs de la perception . . . . .	62
2.4.3	Vasorelaxation endothéliale . . . . .	64
2.5	Trafic vésiculaire . . . . .	65
2.5.1	Voie de sécrétion . . . . .	66
2.5.2	Endocytose . . . . .	67
<b>3</b>	<b>La dynamique moléculaire pour une étude à l'échelle atomique</b>	<b>73</b>
3.1	Fonctionnement et performances . . . . .	73
3.1.1	Comment modéliser des systèmes biologiques par dynamique moléculaire ?	73
3.1.2	Une évolution considérable en quelques années . . . . .	76
3.2	Simulation de DM et phospholipides polyinsaturés . . . . .	80
3.2.1	Généralité sur les simulations de membranes par dynamique moléculaire	80
3.2.2	Mise au point/validation des DM spécifiques aux polyinsaturés . . . . .	80
3.2.3	Apport de la dynamique moléculaire dans l'étude des phospholipides polyinsaturés . . . . .	82
3.2.4	Simulation de DM et interaction entre les phospholipides polyinsaturés et les protéines membranaires . . . . .	89
3.2.5	Simulation de DM et déformation membranaire . . . . .	91
3.3	Les différents axes abordés dans mon travail de thèse . . . . .	93
<b>II</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>95</b>
<b>1</b>	<b>Simulations de dynamique moléculaire</b>	<b>97</b>
1.1	Principe de la dynamique moléculaire . . . . .	97
1.1.1	Algorithme . . . . .	97
1.1.2	Notion de champ de force . . . . .	98
1.2	Description des systèmes . . . . .	100
1.2.1	Les systèmes tout atome . . . . .	100
1.2.2	Les systèmes gros grains . . . . .	102
<b>2</b>	<b>Méthodes d'analyse</b>	<b>107</b>
2.1	Propriétés membranaires . . . . .	107
2.1.1	Perméation à l'eau à travers les membranes . . . . .	107

2.1.2	Défauts de packing : . . . . .	108
2.1.3	Déformabilité . . . . .	109
2.2	Dynamique des phospholipides . . . . .	111
2.2.1	Diffusion de l'extrémité méthyl . . . . .	111
2.2.2	Protrusion de l'extrémité méthyl . . . . .	111
2.2.3	Torsion des chaînes aliphatiques . . . . .	112
2.2.4	Géométrie et conformations des phospholipides . . . . .	112
2.3	Analyse du cholestérol dans les membranes de phospholipides polyinsaturés . . .	114
<b>3</b>	<b>Liposomes asymétriques</b>	<b>115</b>
3.1	Conception des liposomes symétriques . . . . .	115
3.2	Conception des liposomes asymétriques . . . . .	115
3.2.1	Préparation des liposomes accepteurs et donneurs . . . . .	116
3.2.2	Formation de liposomes asymétriques . . . . .	117
3.3	Validation de l'asymétrie des liposomes et de leur intégrité . . . . .	119
3.3.1	Vérification de la composition lipidique . . . . .	119
3.3.2	Vérification de l'intégrité des liposomes asymétriques . . . . .	120
3.3.3	Validation de l'asymétrie . . . . .	121
3.4	Activité dynamine/endophiline . . . . .	121
<b>III</b>	<b>Résultats :</b>	
	<b>L'asymétrie pour atteindre l'équilibre</b>	<b>123</b>
<b>1</b>	<b>L'asymétrie des phospholipides</b>	<b>125</b>
1.1	Introduction . . . . .	125
1.2	Symétrie vs asymétrie des phospholipides . . . . .	126
1.3	Impact du niveau d'insaturation . . . . .	128
1.4	Une asymétrie contrôlée . . . . .	130
1.5	Conclusion générale . . . . .	132
<b>2</b>	<b>L'asymétrie des membranes</b>	<b>165</b>
2.1	Contexte biologique . . . . .	165
2.2	Impact de la répartition asymétrique des lipides au sein de la bicouche . . . . .	166
2.3	Effet des têtes polaires . . . . .	167
2.4	Adaptation de la conformation des phospholipides aux courbures positives . . .	168

2.5	Validation expérimentale . . . . .	168
2.6	Conclusion . . . . .	171
<b>3</b>	<b>Cholesterol et polyinsaturation</b>	<b>185</b>
3.1	Influence du cholestérol sur la dynamique des chaînes aliphatiques polyinsaturées	185
3.2	Cholestérol et déformation membranaire . . . . .	191
3.3	Conclusion . . . . .	193
<b>IV</b>	<b>Discussion, conclusion et perspectives</b>	<b>195</b>

<b>Introduction</b>	<b>23</b>
1.1 Affinement du modèle de la mosaïque fluide . . . . .	26
1.2 Exemple de sphingolipides et de stérols . . . . .	27
1.3 Structure et diversité des glycérophospholipides . . . . .	30
1.4 Synthèse des acides gras . . . . .	31
1.5 Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir de précurseurs . . . . .	33
1.6 Incorporation des acides gras dans les phospholipides . . . . .	34
1.7 Différents agencements possibles des lipides entre eux . . . . .	36
1.8 Changement de phase . . . . .	38
1.9 Géométrie et courbure . . . . .	40
1.10 Agencement des lipides et défauts de packing . . . . .	41
1.11 Répartition des lipides dans les membranes cellulaires . . . . .	42
1.12 Asymétrie des chaînes aliphatiques au sein des feuilletts, . . . . .	44
1.13 Territoires membranaires . . . . .	45
2.1 Première prédiction conformationnelle . . . . .	50
2.2 Rotation de la liaison C9 selon son environnemnt . . . . .	51
2.3 Effet de la polyinsaturation sur les paramètres d'ordre . . . . .	52
2.4 Répartition des chaînes au sein de la bicouche . . . . .	52
2.5 Différences entre les n-3 et les n-6 . . . . .	54
2.6 Peroxydation des phospholipides polyinsaturés . . . . .	55
2.7 Technique de microaspiration . . . . .	56
2.8 Visualisation des domaines ordonnés et désordonnés . . . . .	57
2.9 Importance de la balance n-6/n-3 dans la santé . . . . .	60
2.10 Formation des gouttelettes lipidiques . . . . .	61
2.11 L'arachidonate facilite la formation de lipoprotéines . . . . .	62
2.12 Effet du DHA sur l'activité de la rhodopsine . . . . .	63

2.13	Effet de la polyinsaturation sur la dynamique des canaux MeT . . . . .	64
2.14	Effet n-3 sur l'activité du canal TRPV4 . . . . .	65
2.15	Effet de la polyinsaturation sur la fixation de protéines périmembranaires . . . . .	67
2.16	Mécanismes d'endocytose au niveau des synapses . . . . .	69
2.17	Effet de la polyinsaturation des phospholipides sur l'activité GTPase de la dy- namine . . . . .	70
2.18	Les phospholipides polyinsaturés facilitent la déformation membranaire . . . . .	70
2.19	L'incorporation de 22 :6 dans les phospholipides cellulaires diminue la résistance de la membrane plasmique à la déformation . . . . .	71
3.1	Différents modèles de représentation d'un lipide . . . . .	74
3.2	Validation expérimentale des simulations . . . . .	77
3.3	Exemples de systèmes complexes réalisés en DM . . . . .	79
3.4	Amélioration du FF CHARMM36 pour les polyinsaturés . . . . .	81
3.5	Quelques conformations représentatives du DHA . . . . .	82
3.6	Distribution des chaînes au sein de la membrane . . . . .	83
3.7	Perméabilité augmentée en présence de lipides peroxydés . . . . .	84
3.8	Protection des lipides de la peroxydation par l' $\alpha$ toc. . . . .	85
3.9	Impact du cholestérol sur la distribution des chaînes . . . . .	86
3.10	Phospholipides polyinsaturés et interaction avec le cholestérol . . . . .	87
3.11	Cholestérol et phospholipides polyinsaturés . . . . .	88
3.13	Association DHA, cholestérol et rhodopsine . . . . .	90
3.14	Adaptation de la conformation des phospholipides polyinsaturés à la courbure . . . . .	93

## Matériels et Méthodes

**95**

1.1	Equation de l'énergie potentielle . . . . .	99
1.2	Conditions périodiques . . . . .	100
1.3	Description des systèmes tout atome . . . . .	102
1.4	Cartographie entre la structure chimique au niveau atomique et le modèle Mar- tini à grain grossier . . . . .	103
1.5	Description des système gros grains . . . . .	104
2.1	Propriétés membranaires analysées . . . . .	108
2.2	Exemple de cercle osculateur . . . . .	111

2.3	Analyse de la dynamique des phospholipides . . . . .	112
2.4	Analyse de la géométrie des phospholipides . . . . .	113
2.5	Analyse du cholestérol dans les membranes . . . . .	114
3.1	Représentation des différentes étapes de la préparation de liposomes par hydratation d'un film lipidique . . . . .	116
3.2	Représentation de la cage formée par la M $\beta$ CD . . . . .	117
3.3	Première étape de la formation de liposomes asymétriques : l'extraction . . . . .	118
3.4	Deuxième étape de la formation de liposomes asymétriques : le transfert . . . . .	118
3.5	Étapes de validation des liposomes asymétriques . . . . .	119

**Résultats :**

**L'asymétrie pour atteindre l'équilibre 122**

1.1	Représentation des différentes parties étudiées . . . . .	126
1.2	Phospholipides asymétriques vs phospholipides symétriques . . . . .	127
1.3	Organisation de la membrane en présence de phospholipides symétriques et asymétriques . . . . .	128
1.4	Déformation membranaire en simulation CG . . . . .	129
1.5	Dynamique des chaînes selon le niveau d'insaturation . . . . .	130
1.6	Impact d'une inversion des chaînes <i>sn1</i> et <i>sn2</i> . . . . .	131
1.7	Organisation du glycérol dans les membranes . . . . .	132
2.1	Analyse de l'effet de la polyinsaturation selon sa distribution au sein des bicouches	165
2.2	Représentation des courbures membranaires engendrées par la vésiculation . . .	166
2.3	Impact des phospholipides polyinsaturés selon leur distribution au sein de la membrane . . . . .	167
2.4	Explication moléculaire de l'adaptation des phospholipides polyinsaturés à la courbure positive . . . . .	168
2.5	Mise au point expérimentale . . . . .	169
2.6	Invalidation des liposomes asymétriques . . . . .	170
2.7	Activité GTPase de la dynamine selon la quantité de PS . . . . .	171
2.8	Modèle de l'impact de la distribution des phospholipides polyinsaturés sur la déformation membranaire . . . . .	172
3.1	Effet du cholestérol sur l'ordre et l'épaisseur des membranes . . . . .	186

3.2	Effet du cholestérol sur les torsions des chaînes . . . . .	187
3.3	Effet du cholestérol sur les torsions de chaque atome de carbone . . . . .	188
3.4	Effet du cholestérol sur l'interface eau/membrane . . . . .	189
3.5	Conformation et orientation du cholestérol dans les membranes . . . . .	190
3.6	Position du cholestérol dans les membranes . . . . .	191
3.7	Cholestérol et déformabilité membranaire par DM . . . . .	192
3.8	Cholestérol et assemblage de la dynamine . . . . .	193

**Discussion, conclusion et perspectives** **195**

1	Hypothèse de la place du cholestérol dans les déformations membranaires . . . .	202
2	Modèle de scission par friction . . . . .	203
3	Formation d'un dôme simulée en AA . . . . .	205
4	Impact du rayon du tube sur l'effet de la polyinsaturation dans le feuillet convexe	206
5	Artéfact de simulation . . . . .	207
6	Bilan : Distribution de la polyinsaturation au sein des phospholipides et de la membrane plasmique . . . . .	208

<b>Introduction</b>	<b>23</b>
2.1 Propriétés physico-chimiques des phospholipides . . . . .	48
2.2 Propriétés physico-chimiques des membranes . . . . .	56
3.1 Choix du champ de force . . . . .	75
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>95</b>
1.1 Composition en phospholipides mimant la membrane plasmique neuronale . . .	105

# Abréviations

$\alpha$ -toc	$\alpha$ -tocopherole
AA	<i>All atom</i> (tout atom)
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
AGPAT	1-acyl-G3P acyltransférase
ALA	Acide gras linoléique
ALPS	<i>Amphipatic lipid packing sensor</i>
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BSA	Albumine de sérum bovin
C27	CHARMM27
C36	CHARMM36
c36p	CHARMM 36 modifié pour les phospholipides polyinsaturés
CDP-DAG	Cytidine Diphosphate Diacylglycérol
CG	<i>Coarse-grained</i> (gros grains)
CINES	Centre informatique national de l'enseignement supérieur
CoA	coenzyme A
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
DAG	Diacylglycérol
DAPC	1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DHA	Acide docosahexaénoïque
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DM	Dynamique moléculaire
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPA	Acide docosapentaénoïque
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FEME	<i>Fast Endophilin-Mediated Endocytosis</i>
FF	<i>Force field</i> (champ de force)

FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
G3P	Glycéro-3-Phosphate
GL	Gouttelette lipidique
GMAP	<i>Golgi microtubule associated protein</i>
GPAT	G3P acyltransférase
GPMV	Giant Plasma Membrane Vesicles
GPU	Processeur graphique
GTP	Guanosine triphosphate
GUV	<i>Giant unilamellar Vesicle</i>
HA	Hélice amphipatique
HMVEC	<i>Human Lung Microvascular Endothelial Cells</i>
LA	Acide linoléique
Ld	Phase désordonnée
Lo	Phase ordonnée
LPA	Lysophosphatidic acid
LPLAT	Lysophospholipides acyltransférases
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrine
MeT	canaux à transduction mécano-électriques
MI	Métarhodopsine I
MII	Métarhodopsine II
MII-G	Complexe MII transducine
n-3, n-6, n-9	oméga 3, oméga 6, oméga 9
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBD	Nitrobenzoxadiazole
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
PS	Phosphatidylsérine

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RPE1	<i>Retinal Pigmented Epithelial Cells</i>
SAPC	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
TG	Triglycéride
Tm	Température de fusion
TRPV4	<i>Transient receptor potential vanilloide 4</i>
UA	<i>United atom</i> (atome unifié)
VDW	Van der waals

# Première partie

## Introduction



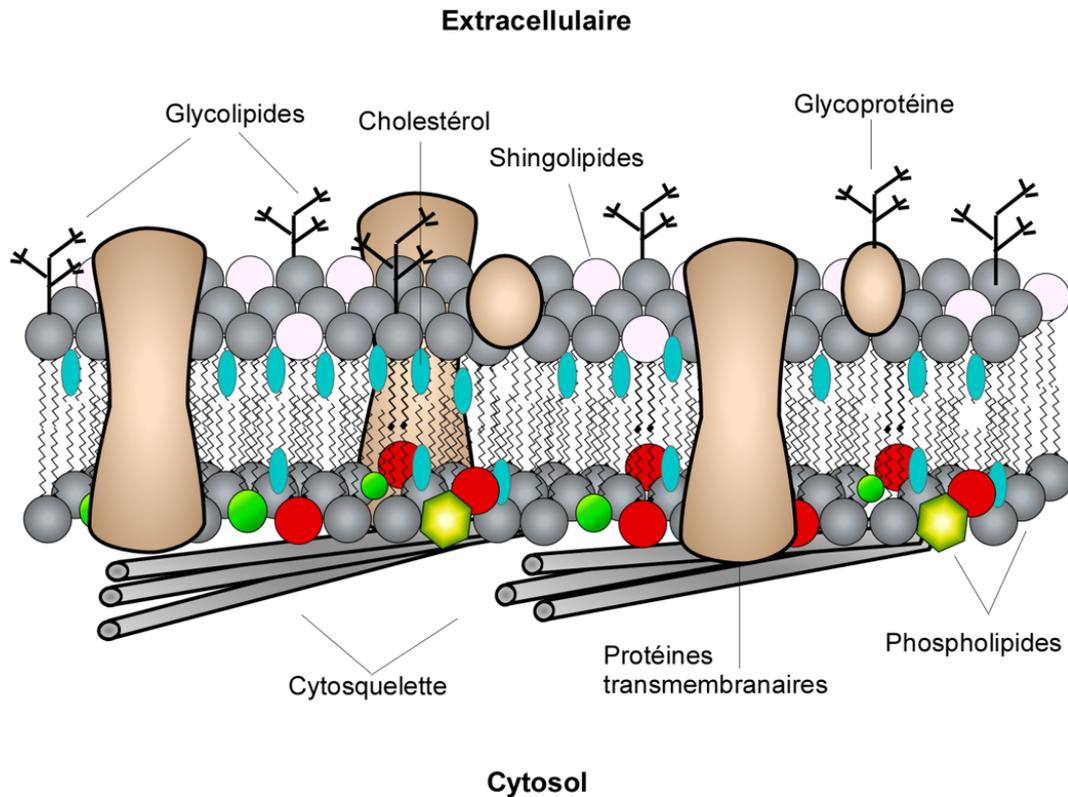
# Les membranes biologiques

## 1.1 De la découverte des phospholipides au modèle de la *mosaïque fluide*

En 1665, le terme de cellule biologique est défini pour la première fois par Robert Hooke [1]. Il faudra ensuite attendre 1847 pour découvrir les phospholipides, principaux composants des membranes, en analysant la lécithine du jaune d'œuf et de la cervelle de poulet [2]. En 1855, Von Nägeli et Carl Eduard Cramer expliquent les phénomènes osmotiques par la présence de membranes jouant le rôle de barrière [3]. Deux découvertes suivront pour expliquer l'agencement des corps gras entre eux. En 1917, Irving Langmuir étudie la structure des films d'huile à la surface de l'eau [4]. Il montre alors la formation d'une monocouche d'acide gras (AG). Quelques années plus tard, en 1924, Gorter et Grendel sont les premiers à démontrer la structure bilamellaire des membranes cellulaires [5]. En effet, la surface totale des lipides extraits à partir de globules rouges est égale à deux fois la surface de ces cellules. En 1972, pour la première fois, les membranes sont représentées sous un état fluide dans lequel lipides et protéines sont capables de se mouvoir. Les membranes ne sont plus considérées comme de simples barrières, elles révèlent également un aspect dynamique. Cette avancée importante donne naissance au célèbre modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson [6]. Dans ce modèle, la membrane est considérée comme une bicouche lipidique. Les têtes polaires des phospholipides sont directement en contact avec l'eau tandis que les chaînes aliphatiques se regroupent au centre de la bicouche. A cette bicouche lipidique s'ajoute la présence de protéines à la surface ou à travers les membranes.

La représentation actuelle des membranes cellulaires est toujours liée à ce modèle. Toutefois il a été affiné (Figure 1.1). Les membranes sont considérées comme un fluide bidimensionnel constitué d'une grande variété de lipides et de protéines qui interagissent entre eux par des interactions faibles. Elles sont soumises à des perturbations locales et ponctuelles. Ce sont donc des systèmes multi-moléculaires complexes, très hétérogènes et constamment hors équilibre [7].

A cette complexité intrinsèque s'ajoute le cytosquelette du côté interne assurant l'architecture de la cellule et le glycocalyx sur le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique [8]. Constitué d'un ensemble de glucides venant prendre place à la surface de la membrane, ce dernier renforce la protection de la cellule des agressions extérieures [9].



**FIGURE 1.1 – Affinement du modèle de la mosaïque fluide.** Une membrane asymétrique composée d'une très grande variété de lipides dans lesquels protéines péri- et trans-membranaires viennent s'ancrer. La forme de la membrane est assurée par le cytosquelette. L'ajout de glucide assure une meilleure protection de la membrane.

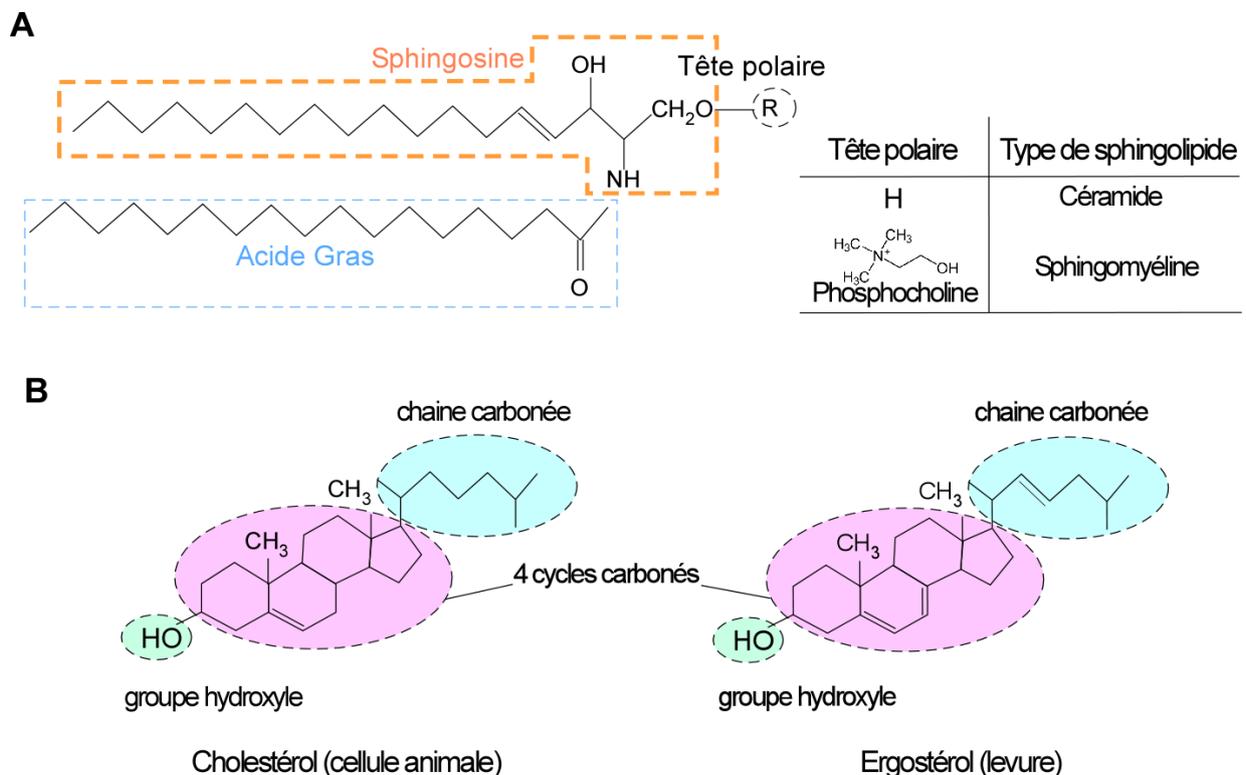
## 1.2 Les lipides membranaires majeurs

Les membranes sont composées d'un grand nombre de lipides. Ces derniers possèdent tous une propriété structurale commune : ce sont des molécules amphiphiles. Elles possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe qui peut se composer de cycles, d'une ou de plusieurs queues hydrophobes. Les membranes eucaryotes sont principalement composées de trois types de lipides : les sphingolipides, les stérols et les glycérophospholipides.

### 1.2.1 Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides dérivés de la sphingosine (Figure 1.2.A), un aminodiol de 18 carbones possédant une double liaison. Elle possède donc une fonction amine et deux fonctions hydroxyles. Elles permettent la fixation d'un AG constitué généralement de 16 à 24 carbones saturés et la fixation de différents groupements qui définissent la tête polaire et donc le type de sphingolipides [10]. Parmi les plus connus, nous retrouvons les céramides avec un groupement hydroxyle (-OH) et les sphingomyélines avec la fixation d'une phosphocholine par une liaison phosphodiester. Ces dernières sont les principaux constituants de la gaine de myéline. Les sphingolipides sont connus pour être des médiateurs dans les processus cellulaires comme l'apoptose [11].

Les sphingolipides forment des complexes très stables avec d'autres composants des membranes tels que les stérols [12].



**FIGURE 1.2 – Exemple de sphingolipides et de stérols.** A : Structure des sphingolipides et quelques exemples d'espèces de ce lipide selon la nature de la tête polaire. B : Deux exemples de stérol : le cholestérol et l'ergostérol

### 1.2.2 Les stérols

Absente des membranes procaryotes, la famille des stérols est présente à des taux variables dans toutes les membranes des cellules eucaryotes. On les retrouve sous forme de :

- cholestérol dans les cellules animales (Figure 1.2.B)
- stigmastérol, campestérol et  $\beta$ -sitostérol dans les cellules végétales
- ergostérol chez la levure (Figure 1.2.B)

Les stérols sont des lipides très hydrophobes comportant une courte chaîne carbonée liée à 4 cycles carbonés rigides rattachée à une petite tête polaire se réduisant à un groupement hydroxyle. Les stérols s'intercalent entre les phospholipides. Le cholestérol, par exemple, se positionne la plupart du temps parallèlement aux autres lipides [13]. Son groupement hydroxyle interagit avec la tête polaire des lipides environnants. Des études montrent qu'au contact avec des lipides doublement polyinsaturés (c.a.d avec deux queues hydrophobes polyinsaturées), son orientation change. Il se positionne perpendiculairement aux autres lipides et s'enfonce au centre de la bicouche [14, 15]. Il est tout de même important de garder à l'esprit que ces études ont été réalisées sur des membranes composées uniquement de ces lipides particuliers. Or, ils ne représentent qu'une proportion infime des lipides membranaires.

En s'intercalant entre les lipides, le cholestérol entraîne une rigidité de la membrane, une augmentation de l'épaisseur, une diminution de la fluidité et de la perméabilité des membranes. Associé aux sphingolipides, il favoriserait la formation de radeaux lipidiques. Ce concept, largement controversé dans la communauté, fera l'objet d'une discussion ultérieure [16, 17].

### 1.2.3 Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont les lipides majoritaires des membranes. C'est pourquoi ils sont les principaux sujets de mon travail de thèse. Communément appelés phospholipides, leur formation part d'un squelette glycérol sur lequel se greffent une tête polaire et deux queues hydrophobes.

#### Diversité phospholipidique dans le règne des êtres vivants

Avant de me focaliser sur les phospholipides eucaryotes, je souhaite brièvement présenter la diversité phospholipidique entre les trois domaines du monde vivant (archaebactérie, bactérie, et eucaryote). Si les phospholipides des membranes eucaryotes et des bactéries partagent la même structure chimique, ceux des archaebactéries s'en détachent [18]. Ces dernières

peuvent prospérer dans des conditions très extrêmes. Ces conditions de vie impactent directement la structure chimique des phospholipides. La stéréochimie du squelette glycérol est inversée (glycérol-1-phosphate *vs* glycérol-3-phosphates (G3P)). Les chaînes aliphatiques y sont liées par des liaisons *-ether* (R-O-R') plus résistantes à l'hydrolyse, et non *-ester* (R-COOR') comme pour la majorité des phospholipides eucaryotes. Elles sont également ramifiées par des groupements méthyl, afin d'être plus résistantes à l'oxydation. La présence de ces lipides diether et l'existence de lipides tétraether bipolaires permettent aux archaebactéries de s'adapter à des conditions extrêmes telles qu'une température élevée, un pH bas ou une concentration saline importante. Chez les mammifères, certains phospholipides formés par des liaisons *-ether*, appelés plasmalogènes, sont également présents dans les membranes.

### Les phospholipides eucaryotes

Concentrons-nous à présent sur les phospholipides des eucaryotes et sur leur structure.

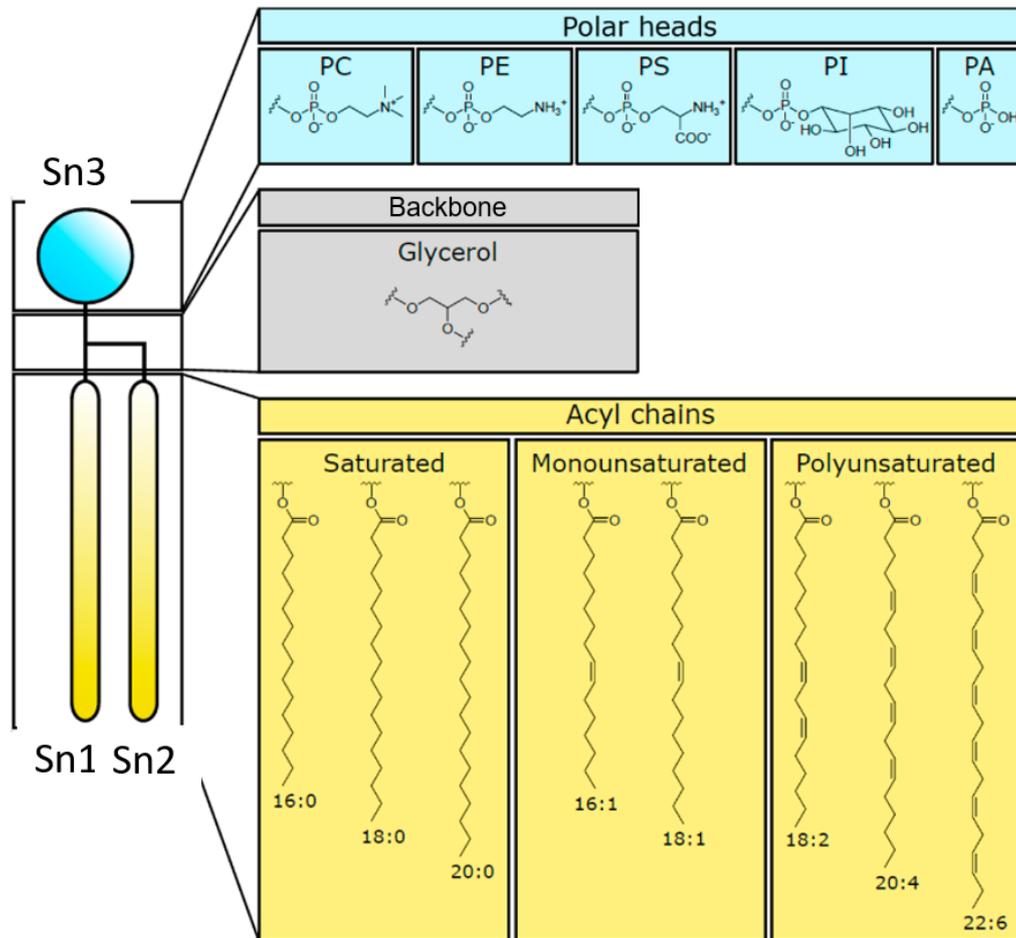
**La tête polaire** définit la nature du phospholipide (Figure 1.3). Il existe plusieurs composés plus ou moins encombrants, neutres ou chargés qui peuvent se fixer sur le glycérol en position 3 (*sn3*).

Les **deux queues hydrophobes** sont deux AG estérifiés en position 1 (*sn1*) et en position 2 (*sn2*). Ces chaînes aliphatiques sont constituées de 12 à 22 carbones. Trois familles se distinguent en fonction du nombre de double liaison (=insaturation) (Figure 1.3) reliant les atomes de carbones entre eux :

- aucune double liaison, les phospholipides sont dits saturés
- une double liaison, les phospholipides sont monoinsaturés
- à partir de deux doubles liaisons on parle de phospholipides polyinsaturés

Dans le cas des phospholipides polyinsaturés, deux doubles liaisons sont toujours séparées par deux liaisons simples. De plus, les doubles liaisons sont majoritairement en position *cis*, c'est à dire que les deux parties de la chaîne carbonée de part et d'autre de la double liaison sont du même côté. Les phospholipides polyinsaturés se subdivisent en deux sous-familles ; les omégas 3 (n-3) et les omégas 6 (n-6). La distinction se fait par le nombre de carbones qui sépare l'extrémité méthyl de la première insaturation ; 3 pour les n-3 et 6 pour les n-6. A noter qu'il existe également un phospholipide polyinsaturé de type oméga 9.

Les chaînes aliphatiques seront décrites tout au long de ma thèse de la manière suivante X:Yn-Z où X représente le nombre de carbone, Y le nombre d'insaturation et Z la famille des phospholipides polyinsaturés oméga 3,6 ou 9 (n-3, n-6 ou n-9).



**FIGURE 1.3 – Représentation schématique des possibilités combinatoires à l'origine de la diversité des glycérophospholipides**, adaptée de Vanni et al 2019 [19] La liste des exemples n'est pas exhaustive. PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PS, phosphatidylsérine ; PI, phosphatidylinositol ; PA, acide phosphatidique.

Comment sont synthétisés les AG précurseurs de cette diversité de chaînes aliphatiques ?

## 1.3 Synthèse des acides gras chez les mammifères

### 1.3.1 Cas des acides gras saturés et insaturés de type oméga 9

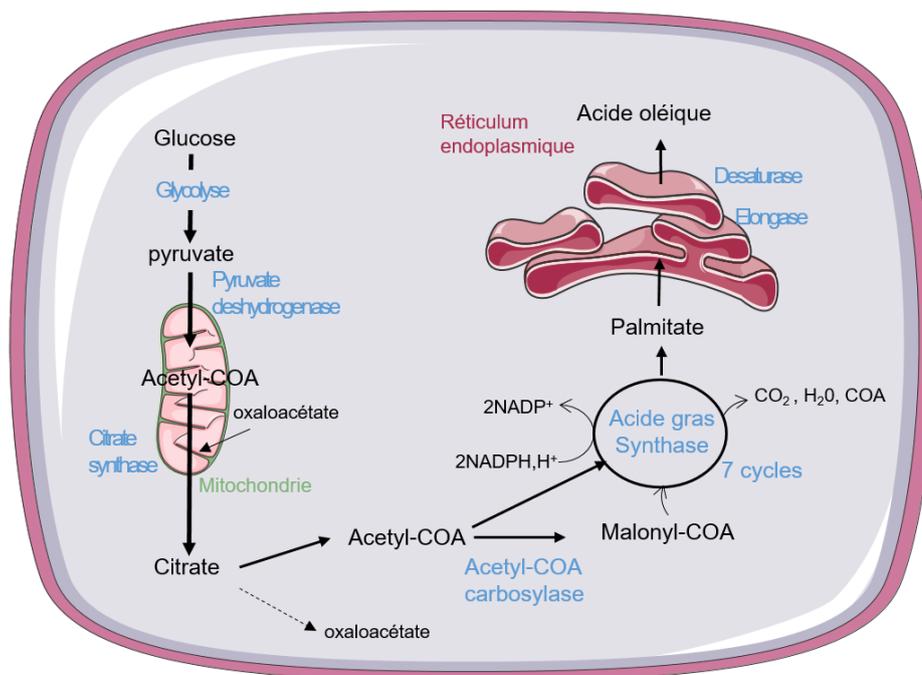
Les AG sont synthétisés *de novo* principalement dans le foie. Cependant, il n'est pas le seul organe de synthèse, il a été montré que le tissu adipeux pouvait également jouer ce rôle [20]. Je ne détaillerai pas ici tous les détails réactionnels mais voici les grandes étapes (Figure 1.4). La principale réserve de carbone provient de la dégradation du glucose jusqu'au pyruvate par la glycolyse. Une fois dans la mitochondrie, ce dernier est dégradé pour former l'**acétyl-CoA**. Cette petite molécule à 2 carbones est le précurseur de la lipogénèse. La synthèse des AG se produit dans le cytosol. L'acétyl-CoA y est transporté sous forme de citrate qui sera ensuite

clivé pour libérer à nouveau le précurseur [20].

- Une partie est ensuite transformée en **malonyl-CoA** à 3 carbones par l'**acetyl-CoA carboxylase**.
- Une deuxième partie est utilisée comme substrat par l'**acide gras synthase**. Cette dernière catalyse 7 cycles de réactions.

Lors du premier cycle, le malonyl-CoA est condensé à un acétyl-CoA formant un acyl-CoA à 4 carbones. Lors des cycles suivants, le procédé est réitéré en incrémentant deux carbones à l'acyl-CoA tour après tour. A la fin de ces 7 cycles, un AG de 16 carbones appelé palmitate est formé [21].

Comme discuté précédemment les chaînes aliphatiques des phospholipides peuvent être formées d'un plus grand nombre de carbones et peuvent présenter des insaturations. La formation de ces chaînes dépend d'étapes qui se déroulent dans le réticulum endoplasmique et qui impliquent de protéines élongases et désaturases. Les mammifères sont capables de synthétiser uniquement des AG insaturés de type n-9. Le plus courant, l'acide oléique 18:1, est obtenu par allongement de la chaîne 16:0 en 18:0 et par désaturation du carbone C9. L'absence des désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  chez les mammifères empêche la conversion d'un n-9 en n-3 ou n-6.



**FIGURE 1.4** – Cascade de réactions simplifiées entraînant la synthèse d'un acide gras au sein d'une cellule. Les enzymes et les voies métaboliques sont signalées en bleu.

En cas de déficience en AG polyinsaturés n-3 ou n-6, le 20:3n-9 (acide de mead) est synthétisé de façon endogène par désaturation séquentielle et allongement de la chaîne carbonée. Deux voies de synthèse ont été identifiées [22].

- $18:1n-9 \rightarrow$  désaturase  $\rightarrow 18:2n-9 \rightarrow$  élongase  $\rightarrow 20:2n-9 \rightarrow$  désaturase  $\rightarrow 20:3n-9$
- $18:1n-9 \rightarrow$  élongase  $\rightarrow 20:1n-9 \rightarrow$  désaturase  $\rightarrow 20:2n-9 \rightarrow$  désaturase  $\rightarrow 20:3n-9$

Le ratio Acide de mead (20:3n-9) /Acide Arachidonique (20:4n-6) sert d'indicateur pour diagnostiquer une déficience en AG polyinsaturés essentiels [23].

Cependant notre alimentation est riche en lipides, une biosynthèse permanente n'est pas nécessaire. Il existe plusieurs régulations (locale, allostérique, hormonale et génétique) qui vont activer ou inhiber l'acetyl-CoA carboxylase [24]. De plus, l'alimentation est le seul apport possible en AG polyinsaturés.

### 1.3.2 Cas des acides gras insaturés essentiels (oméga 3 et oméga 6)

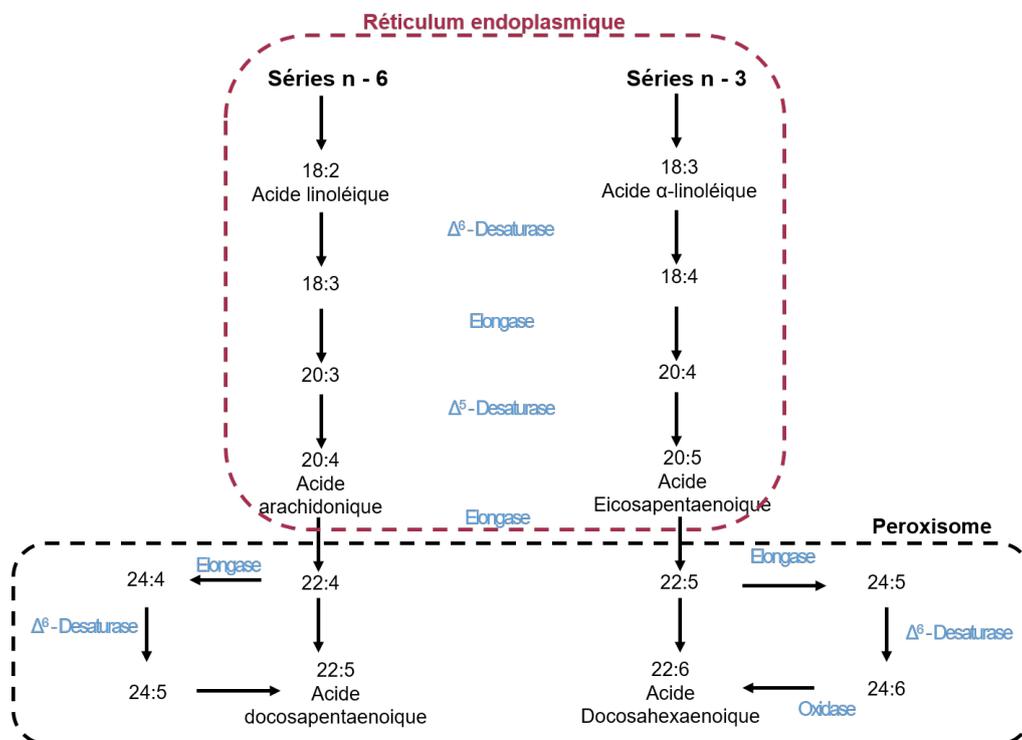
#### Apport nutritif

Comme je l'ai mentionné précédemment, les AG polyinsaturés n-3 et n-6 sont des nutriments essentiels car non synthétisés *de novo* par les mammifères bien qu'ils leur soient indispensables. Parmi les AG polyinsaturés incorporés dans les membranes cellulaires aux fonctions très spécifiques, on retrouve principalement des AG polyinsaturés d'une longueur de chaînes entre 20 et 22 atomes de carbones. Leur précurseurs, l'acide- $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3n-3) et l'acide linoléique (LA,18:2n-6) doivent préalablement être obtenus par un régime alimentaire approprié, pour ensuite être transformés en AG polyinsaturés à chaînes longues. LA est abondant dans les graines et la plupart des plantes comme le soja et le maïs, tandis que l'ALA se retrouve dans les légumes à feuilles vertes et les noix. Il est possible d'obtenir un apport direct en AG polyinsaturés à chaîne longue par les poissons et les fruits de mer. Selon le *UKScientific Advisory Committee on Nutrition guidelines* (2004), un adulte en bonne santé devrait consommer un minimum de deux portions de poisson par semaine pour obtenir des bienfaits sur sa santé. [25].

#### Synthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne à partir de précurseurs

LA et ALA sont les précurseurs métaboliques respectifs des AG polyinsaturés à longue chaîne pour la famille des n-3 et des n-6. La transformation se fait par une succession de désaturations et d'élongations dans le réticulum endoplasmique [26] (Figure 1.5). Ces réactions sont

catalysées par des enzymes ; deux désaturases  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$  et une élongase, qui peuvent être régulés en réponse à une carence en AG polyinsaturés à longues chaînes. Les doubles liaisons et atomes de carbones sont ajoutés à l'extrémité carboxyle afin de conserver la structure soit en n-3 soit en n-6. Les principaux AG polyinsaturés à longue chaîne sont l'acide arachidonique (20:4n-6) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3). Ces deux familles ne sont pas interconvertibles mais rentrent en compétition dans les étapes successives de désaturation/élongation de la chaîne. Lorsque l'apport en n-3 est suffisant, la voie de biosynthèse des n-6 s'arrête à l'acide arachidonique. En cas d'une déficience en DHA, elle peut se poursuivre jusqu'à la synthèse d'un 22:5n-6. Pour la synthèse de 22:5n-6 et de 22:6n-3 une étape terminale de  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes est nécessaire pour raccourcir de deux carbones les intermédiaires précédents 24:5n-6 et 24:6n-3 produits au niveau du réticulum endoplasmique.



**FIGURE 1.5 – Voies de synthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série des oméga 6 et des oméga 3 à partir de leurs précurseurs**

## 1.4 Incorporation des acides gras dans les phospholipides

Les phospholipides sont synthétisés dans la voie de synthèse *de novo* à partir d'une petite molécule précurseur : G3P. Les réactions séquentielles induites par la G3P acyltransférase (GPAT) et la 1-acyl-G3P acyltransférase (AGPAT), entraînent l'incorporation des AG sur la base du squelette G3P des phospholipides [27] (Figure 1.6).

La première étape est catalysée par les GPAT. Il s'agit de la **conversion du G3P en un acide lysophosphatidique (LPA)** par transfert d'un AG-CoA en position *sn1*. Il en existe deux types :

- les GPAT localisées dans les mitochondries ayant une meilleure affinité pour le palmitoyl-CoA (16:0) que pour l'oléoyl-CoA(18:1)
- les GPAT localisées dans les microsomes

La deuxième étape permet le transfert d'un deuxième AG en position cette fois-ci *sn2* . On forme alors un PA avec deux chaînes aliphatiques. La grande famille des AGPAT catalyse cette réaction. Certains homologues ont une affinité dépendante de la nature de la chaîne d'AG. L' AGPAT3, par exemple, a une plus grande affinité pour les longues chaînes insaturées telles que l'arachidonyle (20:4n-6)-CoA et le docosahexaénoyle (22:6n-3)-CoA.

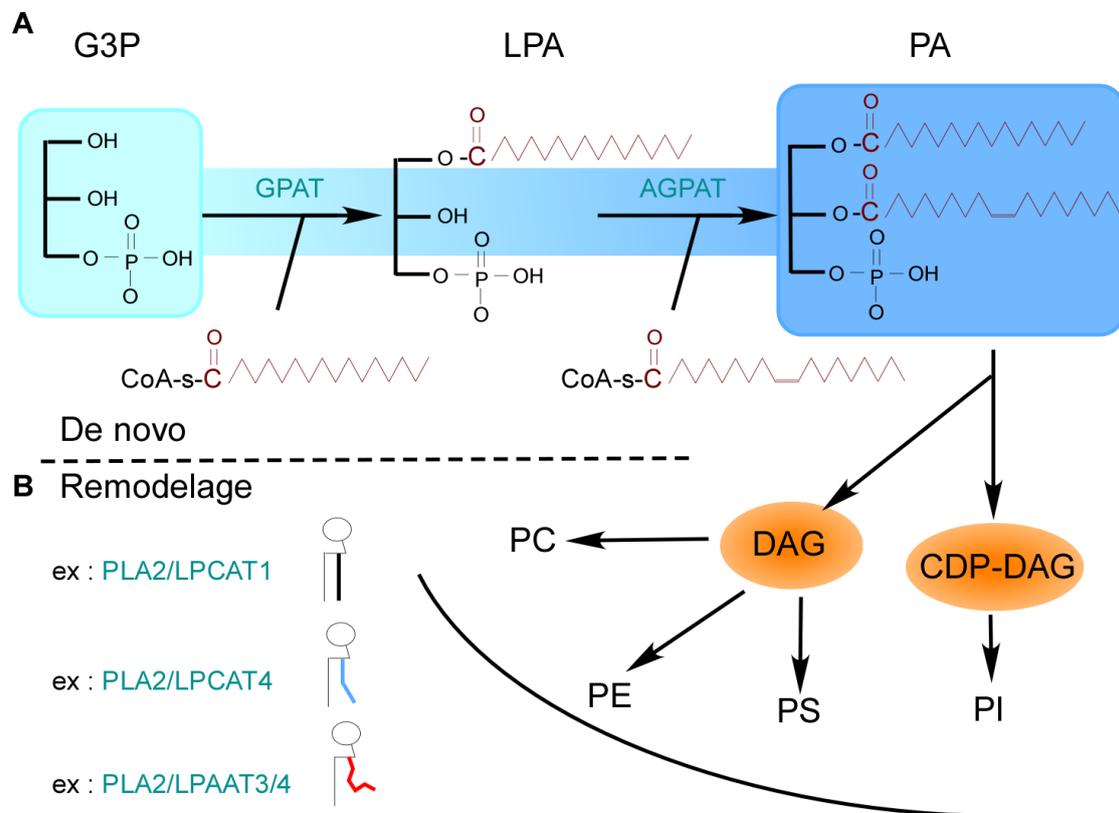


FIGURE 1.6 – Représentation simplifiée de la voie de synthèse de novo des phospholipides du G3P au PA et de la voie de remodelage. Les enzymes sont représentés en bleu. Quelques exemples d'enzymes de remodelage selon le type de chaîne d'AG sont indiqués.

Les phospholipides peuvent également être remodelés en modifiant la tête polaire et les chaînes aliphatiques (Figure 1.6.B).

- Afin de **modifier la tête polaire**, il est nécessaire de retirer le groupement phosphate soit.
  - par déphosphorylation du PA en diacylglycerol (DAG) qui permet par la suite la synthèse des PC et des PE
  - par son activation en cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-diacylglycérol) afin de synthétiser les PI.
- Pour la **modification des chaînes**, il existe des lysophospholipides acyltransférases (LPLAT) qui réincorporent une nouvelle chaîne aliphatique après l'hydrolyse de la précédente par les phospholipases A2.

En prenant l'exemple des PC, les LPCAT réincorporent une nouvelle chaîne aliphatique après l'ajout d'une tête polaire PC et l'hydrolyse, par les phospholipases A2, de la chaîne aliphatique à substituer. Là encore il existe différents homologues ayant plus ou moins d'affinité pour les chaînes aliphatiques insaturées.

Après s'être intéressé aux composants des membranes et à leur synthèse, il convient à présent de comprendre comment les phospholipides s'agencent les uns avec les autres.

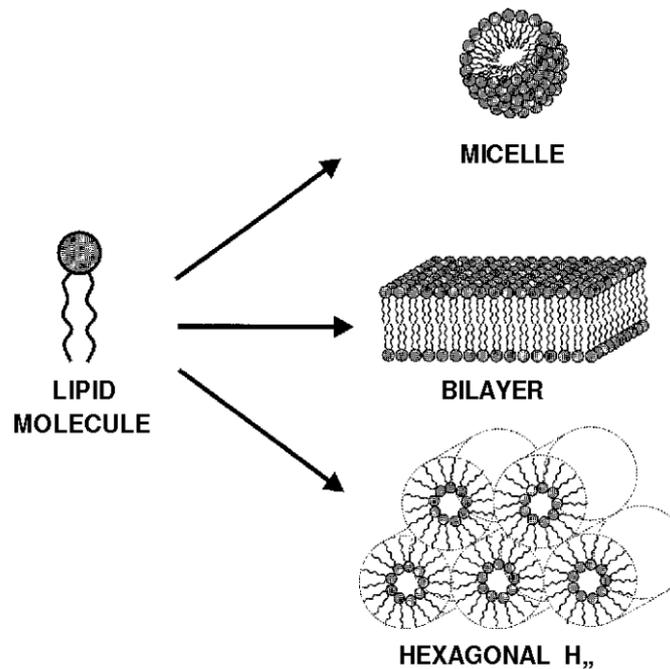
## 1.5 La structure membranaire

### 1.5.1 L'architecture des membranes

#### Auto-assemblage

L'auto-assemblage des lipides provient directement de leurs propriétés amphiphiles. La tête polaire hydrophile maximise ses contacts avec l'environnement aqueux tandis que la ou les queue(s) hydrophobe(s) tente(nt) de les minimiser ce qui impose une structure fermée, sans bord. Grâce à ces propriétés, ils peuvent s'agencer en micelle, en phase hexagonale inversée ou en bicouche lipidique (Figure 1.7) [28].

Biologiquement, la structure la plus pertinente est la bicouche lipidique, qui représente la principale partie constitutive des membranes cellulaires. Je vais donc m'intéresser plus particulièrement à celle-ci. Avec une épaisseur d'environ 5 nm, les bicouches lipidiques permettent la compartimentation des cellules et sont composées principalement de lipides et de protéines.



**FIGURE 1.7 – Différents agencements possibles des lipides entre eux**, extrait de Bailey et al. 1997 [29].

Les interactions hydrophobes et les forces de Van der Waals (VDW) favorisent l'interaction des chaînes aliphatiques tandis que les têtes polaires se stabilisent entre elles et avec le solvant par interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes. Ces interactions non liées entre les lipides maintiennent une certaine fluidité, propriété essentielle des membranes.

### Mobilité des lipides et fluidité

La fluidité d'une membrane lui permet de s'adapter facilement à des stimuli comme une déformation ou une cassure afin de conserver l'isolement des chaînes aliphatiques du milieu aqueux. Cette fluidité se traduit par la mobilité des lipides [30]. Elle est assurée par une diffusion latérale rapide des lipides au sein de leur feuillet ( $1\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) et de mouvements de rotation sur eux-mêmes. Plus rarement, les lipides peuvent basculer d'un feuillet à l'autre, on parle alors de *flip-flop*. Le temps de *flip-flop* est plus ou moins long selon les types de lipides. Les petits lipides très hydrophobes tels que les stérols peuvent basculer très rapidement d'un feuillet à l'autre grâce à leur petite tête polaire. En revanche, pour les phospholipides, plusieurs heures voire jours sont nécessaires pour se retourner dans la membrane. Pour ces lipides, il existe des protéines appelées "flippase" qui accélèrent la translocation. L'amplitude de ces mouvements dépend à la fois de la température et de la composition lipidique elle-même.

## Les transitions de phase

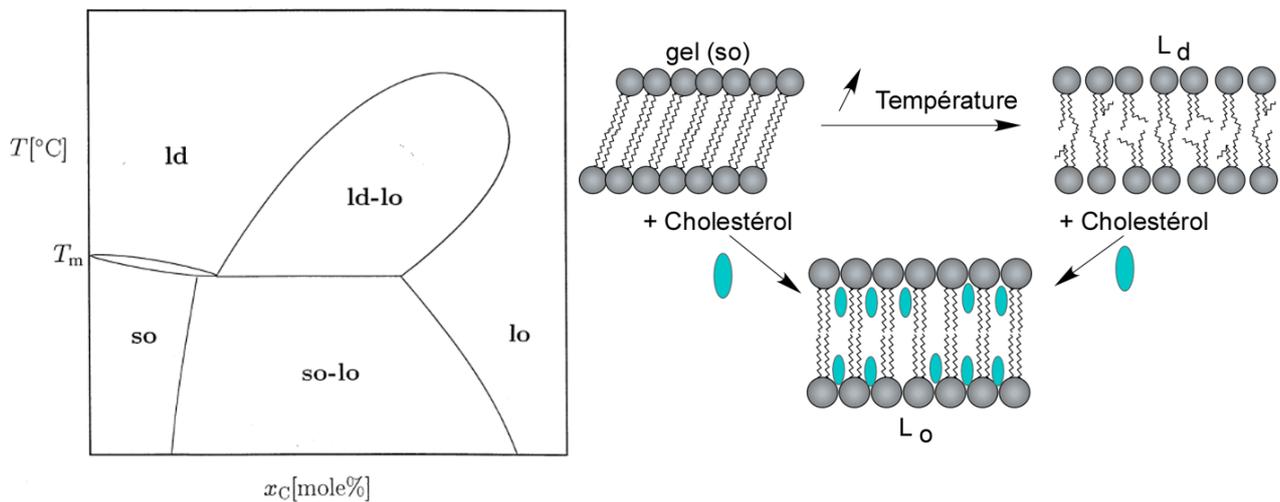
Le comportement en phase des bicouches lipidiques est largement déterminé par la force des interactions de VDW. A une température donnée, une bicouche lipidique peut être en phase liquide ou solide [16]. La phase solide est communément appelée phase "gel". Tous les lipides ont une température de fusion ( $T_m$ ) caractéristique à laquelle ils subissent une transition (fusion) de la phase gel à la phase liquide. Il existe deux états liquides pour les membranes biologiques : un état ordonné ( $L_o$ ) et un état désordonné ( $L_d$ ).

L'ampleur des interactions attractives de VDW entre molécules lipidiques adjacentes dépend de la longueur et de la saturation des chaînes aliphatiques. Les lipides à longues chaînes aliphatiques saturées ont plus de surface d'interaction, ce qui augmente la force de celles-ci et par conséquent diminue la mobilité des lipides. Autrement dit, la température de transition de la phase gel à la phase liquide augmente avec le nombre croissant de carbones dans les chaînes aliphatiques saturées.

Outre la longueur de la chaîne, la température de transition peut également être affectée par le degré d'insaturation des chaînes aliphatiques. Une double liaison forme un coude dans la chaîne, perturbant leur assemblage en structure périodique régulière. Cette perturbation crée de l'espace libre supplémentaire à l'intérieur de la bicouche, ce qui permet une flexibilité supplémentaire dans les chaînes adjacentes. Les membranes composées de phospholipides insaturés sont donc dans un état désordonné ( $L_d$ ) et la  $T_m$  de ces lipides est bien plus basse. Par exemple, la  $T_m$  d'un phospholipide saturé du type 18:0-18:0PC est de 55 ° C contre 0 ° C pour un phospholipide monoinsaturé avec des longueurs de chaînes et une tête polaire équivalentes (18:0 *vs* 18:1PC).

Le cholestérol par sa structure bien différente des autres lipides a un rôle complexe dans l'organisation des lipides au sein de la membrane. L'ajout de cholestérol à une bicouche en phase liquide diminue sa perméabilité à l'eau. En phase liquide, le cholestérol s'intercale entre les lipides et remplit ainsi les espaces libres, diminuant la flexibilité des membranes. En revanche, l'ajout de cholestérol aux bicouches en phase gel perturbe l'ordre de remplissage local, déplaçant la membrane vers un état ordonné (Figure 1.8) [31].

Les membranes biologiques avec une composition très variée sont des systèmes très complexes. Ces systèmes multicomposants présentent des propriétés propres à chacun. Si certains des composants sont liquides à une température donnée alors que d'autres sont en phase gel, les deux phases peuvent coexister dans des populations séparées spatialement. On parle dans ce cas de séparation de phase.



**FIGURE 1.8 – Changement de phase.** Gauche : Extrait de Lemmich et al. 1997 [31]. Diagramme de phase d’une membrane composée de 14:0-14:0PC en fonction de la température et de la concentration en cholestérol ( $x_C$ ).  $T_m$  représente la température de fusion du 14:0-14:0PC. So = phase gel, lo = phase liquide ordonnée et ld = phase liquide désordonnée. Droite : Représentation schématique des changements de phase.

### Les radeaux lipidiques

En 1997, Simons et Ikonen émettent l’hypothèse que des radeaux lipidiques existent au sein des membranes [32]. Ils sont définis comme étant des micro-domaines enrichis en cholestérols et en sphingolipides dont la température de fusion est élevée. Leur organisation structurale en phase ordonnée servirait de plateforme au milieu d’une membrane fluide pour concentrer certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation. Ce nouveau concept avait relancé les investigations sur les membranes mais l’existence des radeaux en eux-mêmes fait toujours l’objet de nombreuses controverses [16, 17].

L’élément principalement utilisé pour appuyer l’hypothèse des radeaux lipidiques est l’observation d’une solubilisation non homogène de la membrane plasmique par un détergent non ionique (Triton X-100). La solubilisation par les détergents consiste à induire la formation de trous au sein de la membrane, puis de fragments micellaires. Les portions non solubilisées sont assimilées à des radeaux dans lesquels sont ancrées des protéines de transduction du signal, résistants au Triton. Cette résistance est observée avec des liposomes contenant du cholestérol et des sphingolipides dans une phase ordonnée (faible température). Cependant plusieurs points sont rapidement discutés et remis en question par la communauté :

1. Les membranes résistantes aux détergents, obtenues après un traitement, peuvent être le résultat d’une solubilisation et d’un remodelage partiel en bicouche, micelle ou autres architectures possibles

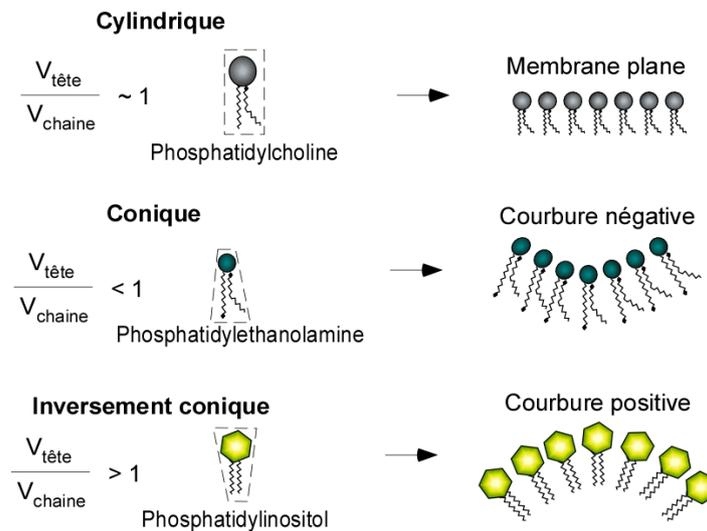
2. Le comportement de la phase lipidique dépend fortement de la température
3. La nature très asymétrique de la bicouche conduirait à des processus anormaux lors de la dissolution par les détergents. La formation de trous dans la bicouche entraînerait le mélange des deux feuillettes au début du processus d'extraction et, par conséquent, une perturbation importante de leur composition lipidique
4. Même sans mélange des feuillettes, ils peuvent être différemment sensibles au Triton en raison de leur composition lipidique différente.

Ainsi le nom "radeau" a fini par être associé à trop d'artefacts et d'inconsistances, avec des doutes fondamentaux qui restent encore non résolus plus de 20 ans après sa conceptualisation. Beaucoup d'auteurs préfèrent aujourd'hui parler de nanodomains transitoires [33].

### **La géométrie des lipides et les conséquences sur leur agencement**

Comme je l'ai présenté précédemment, les phospholipides peuvent être composés d'une diversité de têtes polaires et de chaînes aliphatiques. Ces différentes combinaisons possibles engendrent différentes formes géométriques. Elles sont définies par le rapport entre le volume occupé par la tête polaire et celui occupé par les chaînes aliphatiques. Ce ratio a des conséquences directes sur l'agencement des lipides (Figure 1.9) [34]. On distingue les phospholipides de forme cylindrique, conique et inversement conique.

Les phospholipides coniques inverses tels que les phosphatidylinositols (PI), adoptent spontanément une courbure positive. Les phospholipides coniques comme les phosphatidylethanolamine (PE), favorisent à l'inverse une courbure négative. Pour finir, les phosphatidylcholines (PC) sont cylindriques, avec une équivalence entre la taille des têtes polaires et des chaînes aliphatiques formant ainsi des membranes planes. Outre la taille de têtes polaires, les répulsions électrostatiques entre des groupements chargés négativement, tels que les PS, favorisent les courbures positives [35]. Le niveau d'insaturation des chaînes aliphatiques est également à prendre en considération dans la désignation de la géométrie des lipides. Un phospholipide de type PC composé de deux chaînes monoinsaturées (18:1-18:1) est très conique contrairement à un 18:0-18:0PC cylindrique.



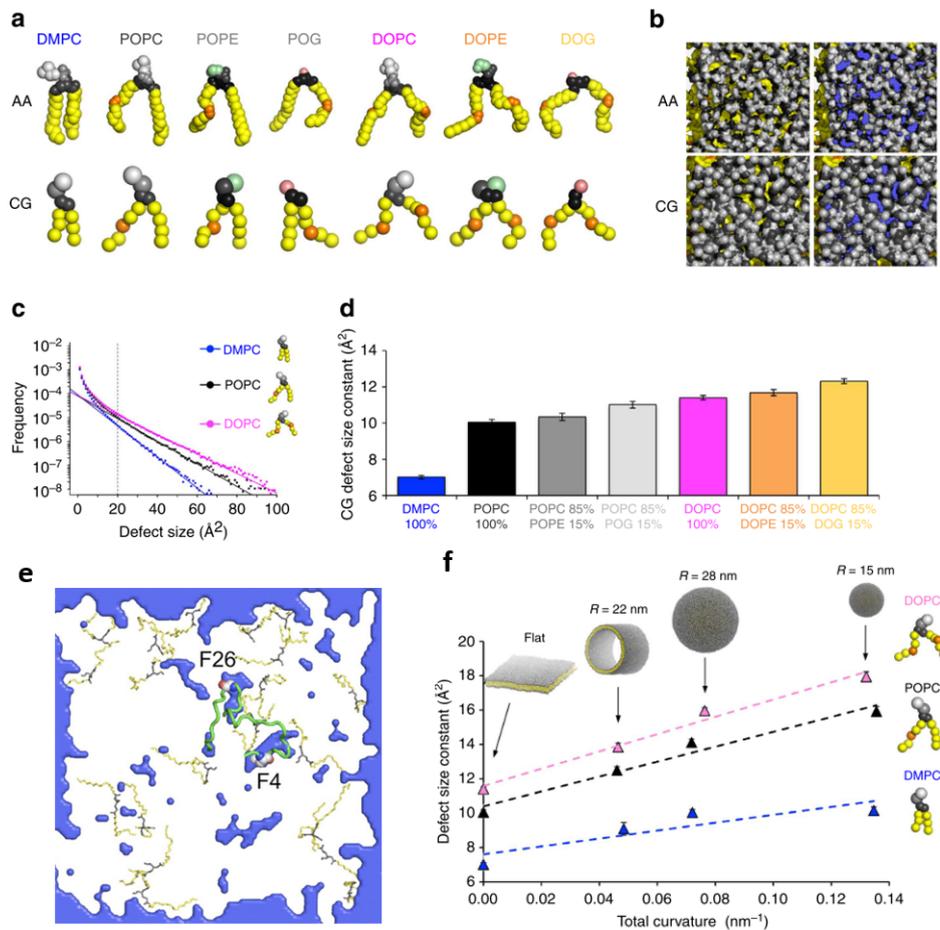
**FIGURE 1.9** – Lien entre géométrie des phospholipides et courbure membranaire, ( $V$ =volume).

Lorsque ces différents phospholipides forment une membrane plane, chaque phospholipide tend à optimiser son espace et ses forces de cohésion avec les autres. Cette agencement entraîne la formation plus ou moins importante de **défauts de *packing*** (DP) [36]. Les DP sont des zones dans la membrane où les chaînes aliphatiques sont accessibles au solvant, soit parce qu'elles sont remontées au niveau de la tête polaire (défauts superficiels) soit parce que les têtes polaires sont trop écartées créant ainsi "une cavité" au niveau de l'interface eau/tête polaire (défauts profonds). **La formation de DP dépend de la composition lipidique et de la courbure membranaire** (Figure 1.10).

Une augmentation de la formation des DP est observée lorsque que l'on diminue la taille des têtes polaires et lorsque l'on augmente le degrés d'insaturation des chaînes aliphatiques (Figure 1.10.A-D). Outre la composition membranaire, la courbure joue également un rôle. Plus une membrane est courbée, plus la formation de DP est importante (Figure 1.10E). Cependant, la composition et la courbure ont un effet cumulatif : c'est ainsi qu'une membrane composée de 14:0-14:0PC fortement courbée ne permettra pas d'obtenir un niveau de DP équivalent à celui d'une membrane plane composée de phospholipides monoinsaturés 18:0-18:1PC ou 18:1-18:1PC Figure 1.10.F) [38].

L'abondance relative des lipides saturés et insaturés est cruciale pour la fixation de certaines protéines périmembranaires. C'est le cas de protéines contenant des motifs senseurs de courbure (*Amphipathic Lipid Packing Sensor* (ALPS)) qui nécessitent plusieurs DP's rapprochés et profonds (Figure 1.10F) [37].

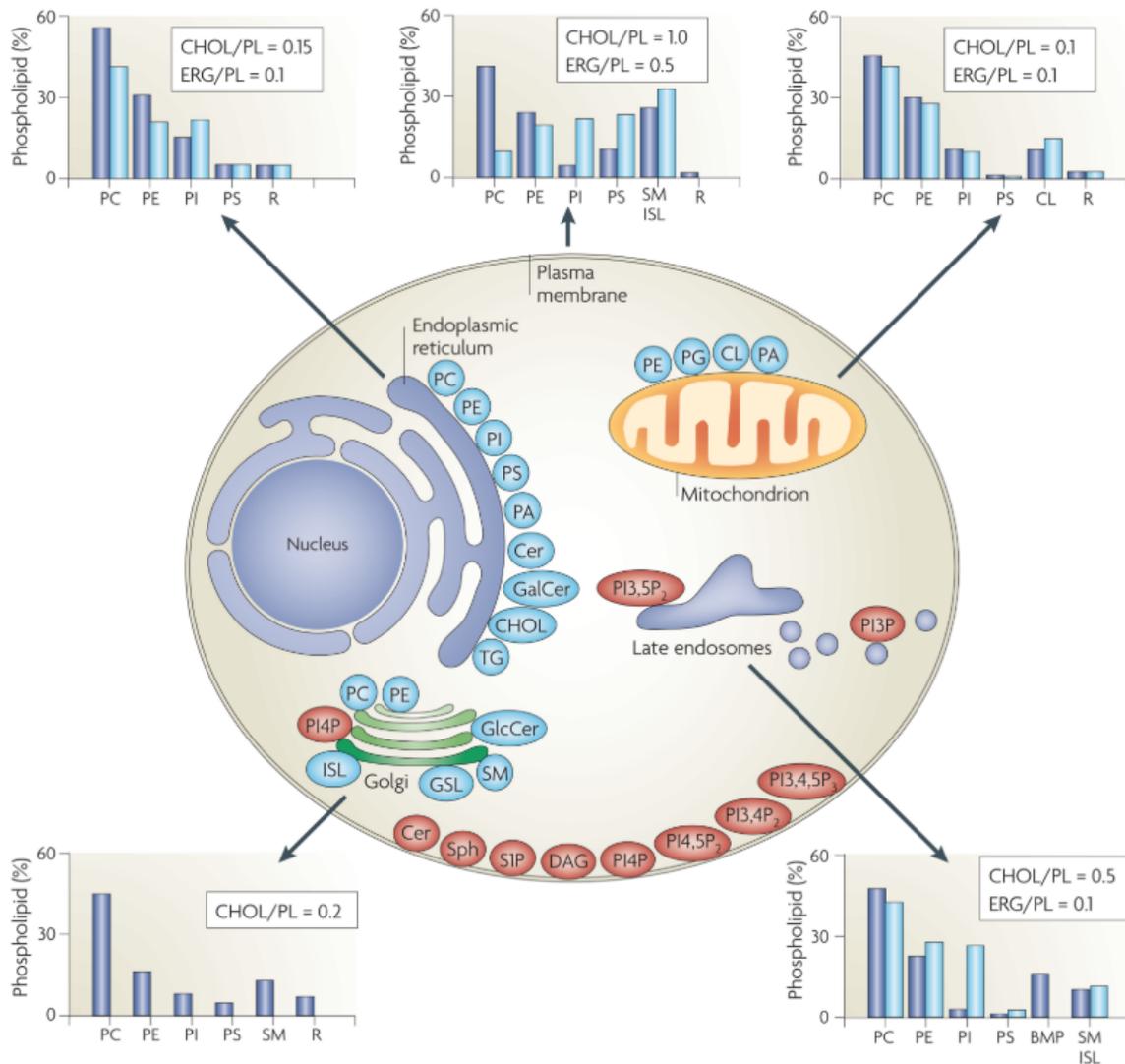
La chimie des phospholipides influence donc fortement les propriétés physico-chimiques des membranaires. Leur répartition au sein des différentes membranes n'est donc pas anodine.



**FIGURE 1.10 – Agencement des lipides et défauts de packing**, adapté de Vanni et al. 2013 et 2014 [37] [38] A : Variété de phospholipides modélisés en tout atome et en gros grain avec une diversité de têtes polaires et de chaînes aliphatiques (jaune=liaison simple, orange=double liaison). B : Vue du dessus des bicouches de POPC (16:0-18:1) obtenues en simulation de dynamique moléculaire tout atome (haut) et gros grain (bas). Les DP profonds sont représentés en bleu C : Fréquence des DP en fonction de leur taille pour différentes membranes planes composées de phospholipides saturés (DMPC - 14:0-14:0), monoinsaturés (POPC) ou double monoinsaturés (DOPC - 18:1-18:1) D : Constantes de taille des DP déterminées à partir d’ajustements linéaires similaires à C dans les simulations gros grains en fonction de la composition lipidique des membranes E : Insertion d’un motif ALPS dans une membrane grâce à la présence de DP en bleu. F : Constante de taille des DP sur le feuillet extérieur des membranes composées de DMPC, POPC ou DOPC en fonction de la courbure.

### 1.5.2 Répartition des lipides au sein des membranes

Au sein des cellules eucaryotes, les membranes sont nombreuses. Les cellules sont délimitées par la membrane plasmique et sont compartimentées en différents organites, eux même délimités par une bicouche lipidique. **La répartition des phospholipides au sein des membranes dépend de la morphologie de celles-ci, de leur position dans la voie de sécrétion ainsi que du feuillet dans lequel ils se trouvent** (Figure 1.11).



**FIGURE 1.11 – Répartition des lipides dans les membranes cellulaires**, extrait de van Meer et al. 2009 [39]. Le pourcentage de chaque espèce de phospholipides est calculé à partir de la quantité totale de phospholipides des mammifères (bleu) et des levures (bleu clair). Le ratio cholestérol/phospholipides pour les mammifères et ergostérol/phospholipides pour les levures est indiqué.

### Asymétrie des membranes

Au réticulum endoplasmique la composition des deux feuillets est globalement identique [39], cependant ce n'est pas le cas pour la plupart des membranes.

L'asymétrie des membranes a été très souvent étudiée pour la membrane plasmique des érythrocytes. Le principe de base pour obtenir la composition spécifique de chaque feuillet est d'utiliser des enzymes telles que des phospholipases A2 ou des sphingomyelinases pour digérer uniquement les lipides présents du côté extracellulaire. Le lipidome du feuillet interne est déduit des espèces lipidiques restantes après digestion. A l'inverse, après digestion, la composition du feuillet externe est obtenue en soustrayant l'abondance de chaque espèce lipidique restante aux

témoins non traités. Le *flip-flop* spontané des phospholipides est négligeable sur l'échelle de temps expérimental.

Les PC et les sphingomyélines sont concentrés du côté extracellulaire tandis que les PE et les PS sont abondants du côté cytosolique. Cette asymétrie impacte directement les propriétés membranaires. Grâce à la présence de PS, le feuillet cytosolique est fortement chargé négativement [40, 41]. Cette électronégativité permet la fixation de certaines protéines par interactions électrostatiques. De plus, les PS sont également des signaux d'apoptose cellulaire s'ils apparaissent sur le feuillet extracellulaire. Ce dernier, composé d'une grande quantité de sphingomyélines saturées et de cholestérol, forme un feuillet plus compact constituant ainsi une barrière contrôlant les échanges entre la cellule et l'extérieur.

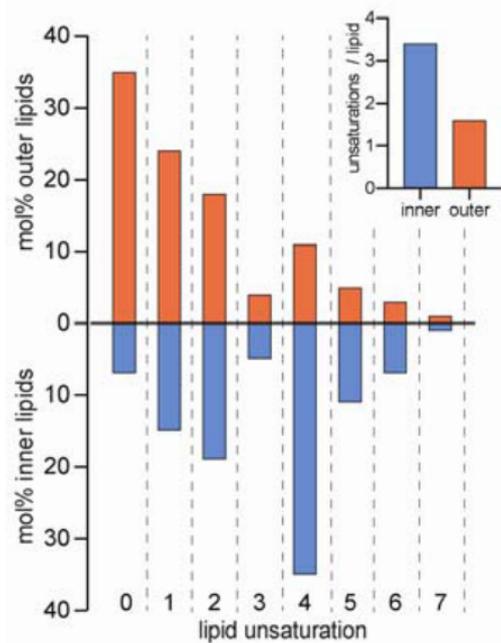
Cette asymétrie des espèces lipidiques s'accompagne possiblement d'une asymétrie en chaînes aliphatiques. Si on se focalise sur le lipidome d'une vésicule synaptique, la polyinsaturation concerne principalement les PS et les PE tandis qu'elle est rare dans le cas des PC [42]. Par extension, il semblerait qu'il y ait probablement davantage de lipides polyinsaturés du côté cytosolique. Si au début de ma thèse, aucun article à ma connaissance ne traitait de l'asymétrie des chaînes aliphatiques, en juillet 2019 le groupe Levental a mené une étude (pour le moment pré-publiée dans BioRxiv) sur la répartition non seulement des têtes polaires mais également des chaînes aliphatiques dans les érythrocytes [43] (Figure 1.12).

### **Territoires membranaires**

La composition lipidique des organites au sein d'une même cellule dépend de leur positionnement le long de la voie sécrétoire. Au sein d'une même cellule il existe un grand nombre de lipides différents. On peut définir deux principaux territoires [44] (Figure 1.13.A)

- Les membranes dites jeunes, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de golgi, sont peu chargées. Elles sont composées principalement de lipides coniques qui favorisent la formation de DP<sub>s</sub>.
- A l'inverse la membrane plasmique, dite tardive, est composée majoritairement de lipides cylindriques. Elle possède donc moins de DP<sub>s</sub>. Par ailleurs elle possède davantage de charges négatives.

Ces différences de composition s'expliquent par le rôle de ces membranes respectivement impliquées dans le transport vésiculaire et dans la protection du contenu de la cellule.

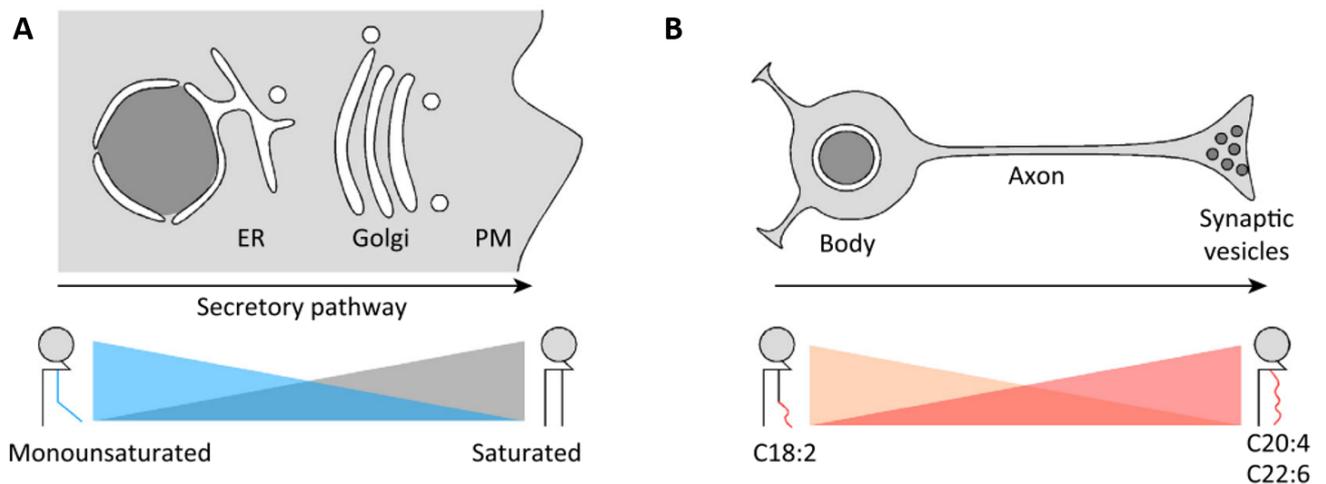


**FIGURE 1.12 – Asymétrie des chaînes aliphatiques au sein des feuillettes**, extrait de Lorent et al. 2019 [43] Les phospholipides dans le feuillet extracellulaire (outer) de la membrane plasmique des érythrocytes sont majoritairement saturés, alors que la majorité des phospholipides du feuillet cytosolique (inner) sont polyinsaturés. L'insaturation moyenne est 2 fois plus grande pour les phospholipides du feuillet cytosolique.

### Quel(s) territoire(s) pour les phospholipides polyinsaturés ?

L'essor de la **lipidomique** a permis de connaître plus précisément la répartition des AG au sein des différents tissus, organites mais également les variations au sein d'une même membrane. En 2015, des rats sont disséqués et les lipides sont extraits selon la méthode de Folch [45]. En quelques mots, il s'agit d'une extraction à froid basée sur l'utilisation d'un solvant organique tel que le méthanol. Cette étude révèle la grande variabilité des AG présents au sein des tissus [46]. Le corps entier du rat est composé principalement de chaînes acyles saturées (48,4 %) et de chaînes acyles monoinsaturées (34,8 %). Les familles des n-6 et des n-3 représentent respectivement 12% et 2,1% des AG totaux. Les AG 18:2n-6 et 20:4n-6 représentent respectivement 84 et 12 % du total des AG polyinsaturés n-6. Les AG 18:3n-3 et 22:6n-3 correspondent respectivement à 59% et 32 % des n-3. Ces familles de phospholipides se répartissent dans les différents tissus de façon inégale. Dans les reins et la rate, les 20:4n-6 représentent 21 à 25 % en poids, tandis que l'on retrouve les 22:6n-3 dans le cerveau (12 % en poids) et le cœur (7,9 % en poids). L'un des exemples les plus frappants montrant une inégalité d'enrichissement des AG polyinsaturés selon les tissus est la présence 63 fois plus importante d'AG 22:6n-3 dans le cerveau que dans le tissu adipeux blanc (0,08 %). Récemment, une autre étude, utilisant la spectroscopie de masse HPLC MS et MS/MS, rapporte l'analyse des phospholipides dans le cerveau, le cœur, les reins et le foie. Si le cerveau est connu pour être particulièrement riche en

phospholipides polyinsaturés, cette étude montre que ce n'est pas l'organe qui en contiendrait le plus. Les phospholipides polyinsaturés représentent environ 60 % des phospholipides totaux dans le cerveau, comparativement à plus de 90 % dans le cœur et les reins et environ 95 % dans le foie [47]. Cet enrichissement moindre dans le cerveau peut s'expliquer par la variété des types cellulaires et des structures qui le composent. Le profil des chaînes aliphatiques dépend des zones du cerveau. L'hippocampe de souris, par exemple, est composé de PS et de PE principalement polyinsaturés [48]. A l'échelle des cellules, la gaine de myéline, qui isole les fibres nerveuses, a une teneur élevée en 18:1 et une faible teneur en 22:6n-3 tandis que le profil des microsomes de la substance grise et de la substance blanche révèle un enrichissement en 22:6n-3 [49]. Il existe également des gradients au sein d'une même membrane. Les batonnets rétiens sont composés à 50% de phospholipides polyinsaturés [50] et l'imagerie lipidique par spectrométrie de masse a révélé un gradient du niveau d'insaturations des chaînes aliphatiques dans les neurones le long du corps cellulaire jusqu'à la synapse en passant par l'axone. Ce gradient se traduit par une accumulation le long des neurones de 20:4n-6 et 22:6n-3 PC au détriment de phospholipides moins polyinsaturés tels que le 18:2n-6. [51] (Figure 1.13.B). Les vésicules synaptiques, quant à elles, contiennent jusqu'à 80% de phospholipides polyinsaturés[42].



**FIGURE 1.13 – Territoires membranaires**, extrait de Antonny et al 2015 [52] Gauche : le profil des chaînes aliphatiques des phospholipides varie le long des organites suivant la voie de sécrétion. Droite : Un gradient en chaîne polyinsaturées remarquable du corps jusqu'à la synapse d'un neurone.

Des taux aussi élevés de phospholipides polyinsaturés dans certaines membranes bien spécifiques suggèrent que les phospholipides polyinsaturés pourraient conférer aux membranes des propriétés physico-chimiques particulières. Beaucoup de travaux ont tenté de comprendre leur dynamique et par conséquent leur impact sur celle des membranes.

# Les phospholipides polyinsaturés

Très tôt, les premières analyses sur l'impact d'une privation de ressources en AG polyinsaturés sur la santé ont été menées. En effet, en 1929, Burr et Burr étudient les conséquences chez le rat d'une alimentation dépourvue d'AG. Il en résulte des retards de croissance, des chutes de poils, un dessèchement de la peau, des altérations de la reproduction, etc. Ces observations leur suggèrent que des propriétés vitaminiques sont portées par certains acides gras alimentaires, d'où leur dénomination de vitamine F [53]. Une alimentation à base de LA (de la série des n-6) corrige complètement les symptômes tandis qu'une alimentation riche en ALA (de la série des n-3) ne les rétablit que partiellement. Les AG polyinsaturés en n-6 sont alors considérés comme essentiels à la différence des n-3. A partir des années 1970, l'idée d'un rôle physiologique propre aux n-3 émerge. Le DHA est identifié comme étant particulièrement abondant dans les phospholipides du système nerveux (cerveau et rétine) de tous les mammifères. Plusieurs travaux ont montré qu'une déficience alimentaire chronique en n-3 provoque des troubles fonctionnels du système nerveux et visuel [54]. Les AG n-3 sont alors également considérés comme essentiels.

**Afin de comprendre ces résultats frappants, des études se sont concentrées sur les propriétés chimiques des phospholipides polyinsaturés et d'autres sur l'effet de cette chimie si particulière sur la dynamique des membranes. Plus tard, des études plus complexes et complètes ont pu apporter des éléments de réponses sur leurs implications dans certaines maladies et fonctions cellulaires primordiales.**

Durant mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'effet des phospholipides polyinsaturés sur les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires. Néanmoins, je n'ai pas étudié les AG polyinsaturés ne s'incorporant pas dans les phospholipides, ils sont alors dits libres. Dans ce cas ce sont des précurseurs de nombreux messagers intra- et intercellulaires, impliqués dans divers phénomènes aussi différents que la réponse aux stimulations hormonales, l'inflammation et l'agrégation plaquettaire.

## 2.1 Propriétés physico-chimiques des phospholipides polyinsaturés

### 2.1.1 Caractéristiques des phospholipides en fonction de l'insaturation

En préalable, il faut noter qu'un lipide est défini par sa température de fusion ( $T_m$ ) et par l'aire qu'il occupe. Ce sont deux caractéristiques intrinsèques aux lipides et fortement dépendantes de la longueur des chaînes et de leur niveau d'insaturation.

L'analyse de lipides par **calorimétrie différentielle à balayage** a permis de déterminer les températures de transition de phase des phospholipides selon la longueur et le nombre d'insaturation de leurs chaînes aliphatiques [55]. Les  $T_m$  ont été calculées pour une série de PC ayant une chaîne *sn1* constante (18:0) et une chaîne *sn2* dont le nombre d'insaturation varie de 0 à 6. La présence d'une insaturation suffit à réduire considérablement la  $T_m$ . Une diminution moindre est observée suite à la présence d'une deuxième insaturation. A partir de 3 doubles liaisons la  $T_m$  reste globalement constante (Table2.1).

Afin de déterminer l'aire par lipide, des monocouches sont formées dans des cuves de Langmuir à l'interface eau/air (film de Langmuir). Ces cuves possèdent une barrière mobile dont le déplacement engendre une compression des lipides à une température donnée. Progressivement les lipides passent d'une phase liquide désordonnée à une phase gel jusqu'à ce que la monocouche se collapse et forme des structures tridimensionnelles qui diffusent en solution. L'analyse des courbes de pression permet de déterminer l'aire par lipide en fonction de la composition lipidique de la monocouche. La présence d'1 à 3 insaturations dans la chaîne *sn2* augmente la surface occupée par le lipide. Au delà de 3 insaturations l'aire par lipide reste du même ordre (Table2.1) [56].

Phospholipides	$T_m$ (C °)	Aire par lipide (Å)
18:0-18:0	-	51.5
18:0-18:1	-0.1	-
18:0-18:2	-14.6	63.2
18:0-18:3	-18.8	67.7
18:0-20:4	-13.2	67.6
18:0-22:6	-5.6	64.5

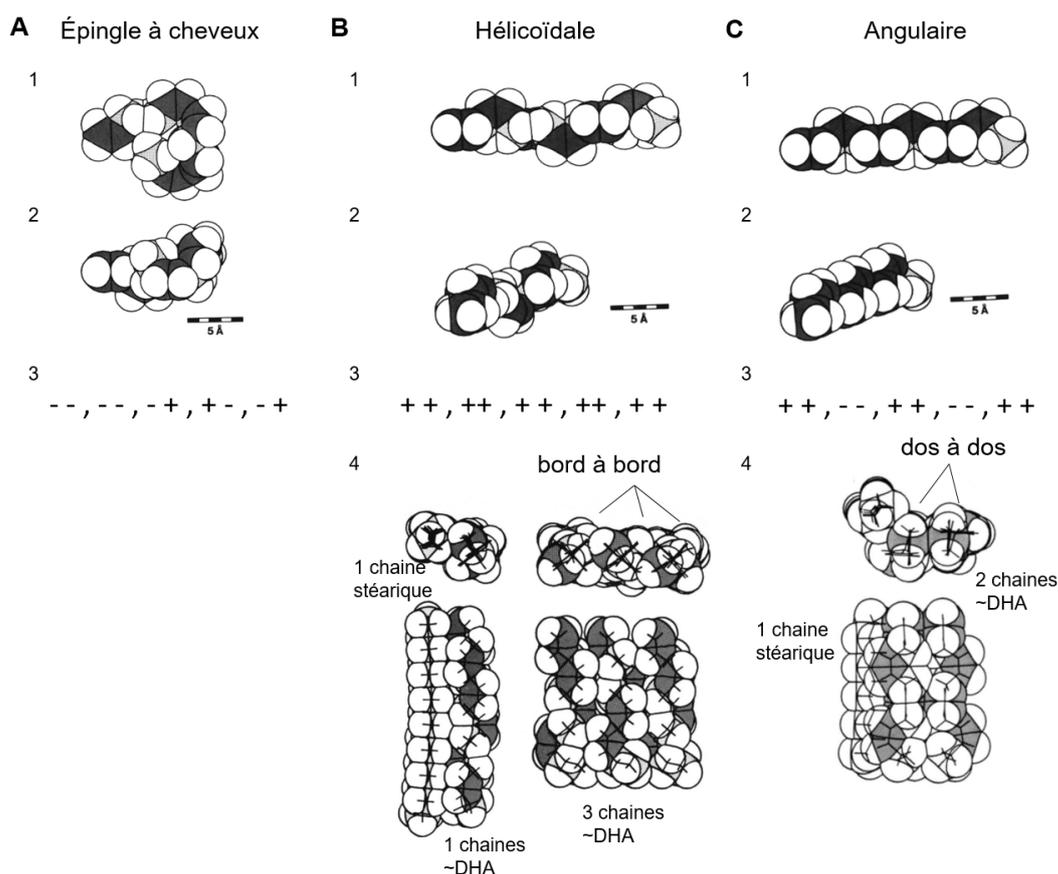
**TABLE 2.1 – Propriétés physico-chimiques des phospholipides ;** température de fusion ( $T_M$ ) à partir de Niebylski et al 1994 [55] et aire par lipide à partir de Smaby et al. 1997 [56].

### 2.1.2 Du DHA droit et rigide au DHA contorsioniste

Le motif  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$  plus ou moins répété le long des chaînes aliphatiques polyinsaturées est caractéristique des phospholipides polyinsaturés. La première tentative de **prédiction conformationnelle** en 1986 se base sur le composé 1,4 pentadienne, similaire au motif répété, dans le but de comprendre le comportement des phospholipides polyinsaturés. Ces prédictions révèlent que les angles de torsion des liaisons simples entourées de double liaisons sont de  $\pm 118^\circ$ . L'analyse de ces angles de torsion dans des chaînes de 19 carbones considérées analogues au DHA a permis d'identifier 3 conformations principales possibles [57] : les formes en épingle à cheveux, hélicoïdales et angulaires (Figure 2.1). La première, énergétiquement plus favorable, présente deux méthylènes (-CH<sub>2</sub>-) successifs avec des angles de torsion en miroir ( $+118^\circ -118^\circ$  ou  $-118^\circ +118^\circ$ ). Dans les conformations hélicoïdales, les angles de torsion sont les mêmes tout le long de la chaîne carbonée. Enfin dans le cas des conformations angulaires, le signe des angles de torsion s'alterne d'une paire d'angle à l'autre (ex :  $+118^\circ +118^\circ$  ;  $-118^\circ -118^\circ$  etc).

Les conformations hélicoïdales et angulaires, malgré leurs énergies plus élevées, ont été jugées plus adaptées aux contraintes biologiques. Ces conformations maximisent les interactions avec les chaînes saturées et interagissent entre elles en s'agencant "bord à bord" ou "dos à dos" (Figure 2.1). La conformation en épingle à cheveux, bien qu'ayant une énergie conformationnelle inférieure, a été exclue à cette époque ; considérée trop instable pour interagir avec d'autres chaînes polyinsaturées ou saturées et ainsi exister dans un contexte biologique. Cette étude suggère que les phospholipides composés de chaînes mixtes ; *sn1*-saturée et *sn2*-DHA peuvent former des réseaux de chaînes relativement serrés et droits.

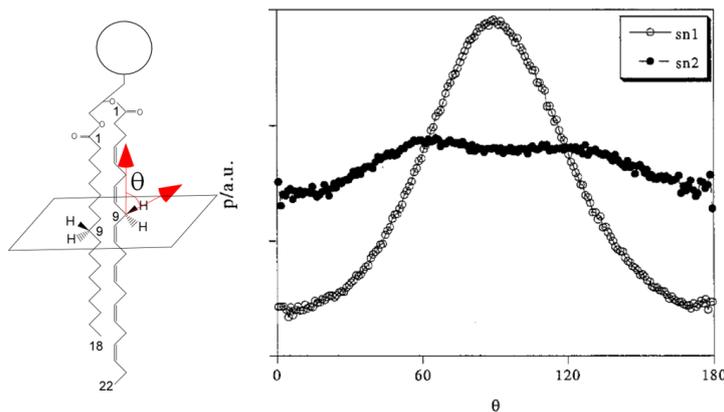
Au début des années 2000 plusieurs études ont apporté une meilleure compréhension du comportement des chaînes polyinsaturées au sein des membranes. L'hypothèse selon laquelle les chaînes polyinsaturées maximisent les interactions pour engendrer des membranes compactes est peu à peu invalidée. Pour comprendre avec précision la dynamique des chaînes aliphatiques, des calculs basés sur la **mécanique quantique** ont été entrepris [58]. La mécanique quantique permet de décrire très précisément la structure et l'évolution, dans le temps et dans l'espace, de composés à l'échelle atomique. Très couteux en calcul, les calculs de mécanique quantique sont applicables uniquement à de petits composés. Dans le cadre de l'étude de la polyinsaturation, cette méthode a permis de calculer les énergies de torsion sur le composé 2,5-heptadiene



**FIGURE 2.1 – Première prédiction conformationnelle**, adapté de Applegate et al. 1986 [57]. A : Conformation en épingle à cheveux B : Conformation hélicoïdale C : Conformation angulaire. Les doubles liaisons sont représentées par des sphères noires, les simples liaisons en gris et les hydrogènes en blanc. (1) Représentation de la chaîne dans son ensemble (2) vue oblique (3) séquences des signes des angles de torsion (4) Interaction avec des chaînes saturées ou d'autres chaînes polyinsaturées.

$(CH_3 - CH = CH - CH_2 - CH = CH - CH_3)$  mimant les successions de motifs que l'on retrouve dans les chaînes aliphatiques polyinsaturées ainsi que l'extrémité méthyl ( $-CH_3$ ). Les énergies de torsion permettent de déterminer les barrières énergétiques de rotation des liaisons simple autour des doubles liaisons. Il en résulte qu'elles sont considérablement diminuées par rapport à des composés saturés de type butane ( $CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_3$ ).

En élargissant ce résultat aux chaînes aliphatiques polyinsaturées, la succession de multiples alternances une double liaison/deux liaisons simples réduirait donc l'énergie de rotation des liaisons saturées, augmentant ainsi le nombre de conformations possibles (Figure 2.2). Par conséquent, les chaînes aliphatiques polyinsaturées auraient une propension intrinsèque à la flexibilité. **Parmi les 3 conformations initialement prédites, celle dite en épingle à cheveux, précédemment ignorée, seraient la plus probable [59].**



**FIGURE 2.2 – Rotation de la liaison C9 selon son environnement**, adapté de Feller et al. 2002 [58]. Probabilité de distribution de l'angle  $\theta$  entre le vecteur CH du carbone 9 et la normale à la membrane pour la chaîne *sn1* saturée et la chaîne *sn2* polyinsaturée.

Parallèlement, une propriété reflétant également la flexibilité des chaînes et très couramment étudiée en biologie des membranes est le paramètre d'ordre. Cette mesure sensible, obtenue par **résonance magnétique nucléaire** (RMN), permet de calculer l'orientation structurale et la flexibilité des chaînes aliphatiques. En RMN, les hydrogènes sont remplacés par l'isotope deutérium.

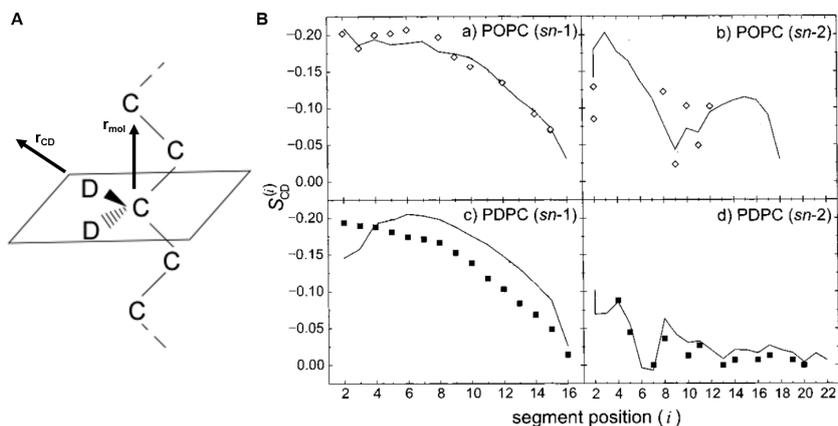
Les paramètres d'ordre des chaînes aliphatiques sont calculés à partir de l'équation suivante :

$$|S_{CD}| = \left| \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \right|$$

Ils sont moyennés dans le temps et pour toutes les chaînes aliphatiques de la bicouche. Si les chaînes aliphatiques sont peu flexibles, elles restent perpendiculaires au plan de la membrane, la valeur du paramètre d'ordre est alors de -0.5. En revanche, dans le cas de chaînes aliphatiques ayant une grande liberté de mouvement, cette valeur s'approche de 0. En règle générale pour les phospholipides, on observe une diminution graduelle de l'ordre du début de la chaîne aliphatique jusqu'à l'extrémité méthyl. A cela s'ajoute la présence de doubles liaisons qui font considérablement chuter la valeur des paramètres d'ordre. Cet effet est accentué plus il y a d'insaturations [59] (Figure 2.3).

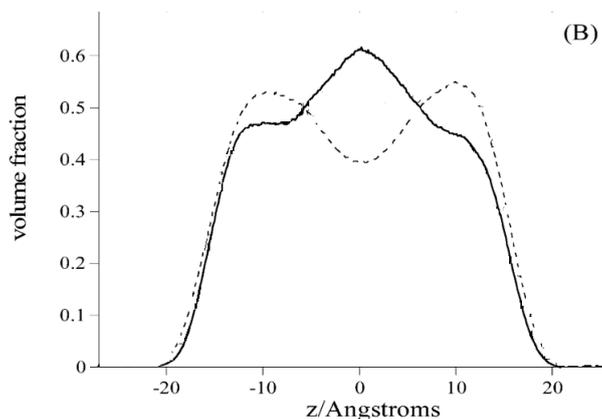
Cette flexibilité particulière joue un rôle dans la réorganisation des chaînes au sein de la bicouche.

Les profils de densité des membranes sont déterminés par **diffraction aux rayons X**. La répartition de la densité de chaque chaîne montre que la densité de la chaîne *sn1* est plus élevée au centre de la bicouche tandis que la densité de la chaîne *sn2* polyinsaturée occupe davantage l'interface eau/membrane [60, 61, 62]. La chaîne *sn1* saturée explorerait le centre de



**FIGURE 2.3 – Effet de la polyinsaturation sur les paramètres d'ordre.** A : Représentation du vecteur de la molécule ( $r_{mol}$ ) et du vecteur de la liaison CD ( $r_{cd}$ ) qui sont utilisés pour calculer les paramètres d'ordre pour chaque carbone.  $\theta$  étant l'angle formé entre ces deux vecteurs. B : Adapté de Huber et al. 2002 [59]. Paramètres d'ordre obtenus par simulation de DM (ligne) et par RMN (symbole) de la *sn1* saturée des POPC(16:0-18:1)(a), de la chaîne *sn2* monoinsaturée des POPC, (b) de la chaîne *sn1* saturée du PDPC (16:0-22:6) (c) et de la *sn2* polyinsaturées de PDPC (d)

la bicouche maintenant ainsi une épaisseur constante de la membrane tandis que la chaîne *sn2* polyinsaturées se rapprocherait davantage de l'interface eau/tête polaire. Cette répartition des chaînes aliphatiques au sein d'une bicouche a été observée pour les phospholipides 18:0-22:6 n-3PC (Figure 2.4).



**FIGURE 2.4 – Répartition des chaînes au sein de la bicouche.** Répartition des chaînes *sn1* saturées (ligne continue) et *sn2* polyinsaturées (22:6) (ligne en pointillé) au sein de la membrane, adapté de Eldho et al 2003 [60]. Le profil de densité a été obtenu par diffraction au rayon X.

Pour rappel, l'apport insuffisant en DHA (22:6 n-3) notamment dans le cerveau entraîne son remplacement par l'acide docosapentaénoïque (22:5 n-6, DPA). **Les propriétés citées précédemment sont-elles conservées lors de cette substitutions de n-3 en n-6 ?**

### 2.1.3 Différences entre les n-3 et les n-6

La première différence entre la famille des n-3 et des n-6 est dans leur définition : la présence d'une double liaison plus près de l'extrémité méthyl de la chaîne dans les cas des n-3 (au niveau d'une 3<sup>me</sup> carbone contre le 6<sup>me</sup> carbone pour les n-6).

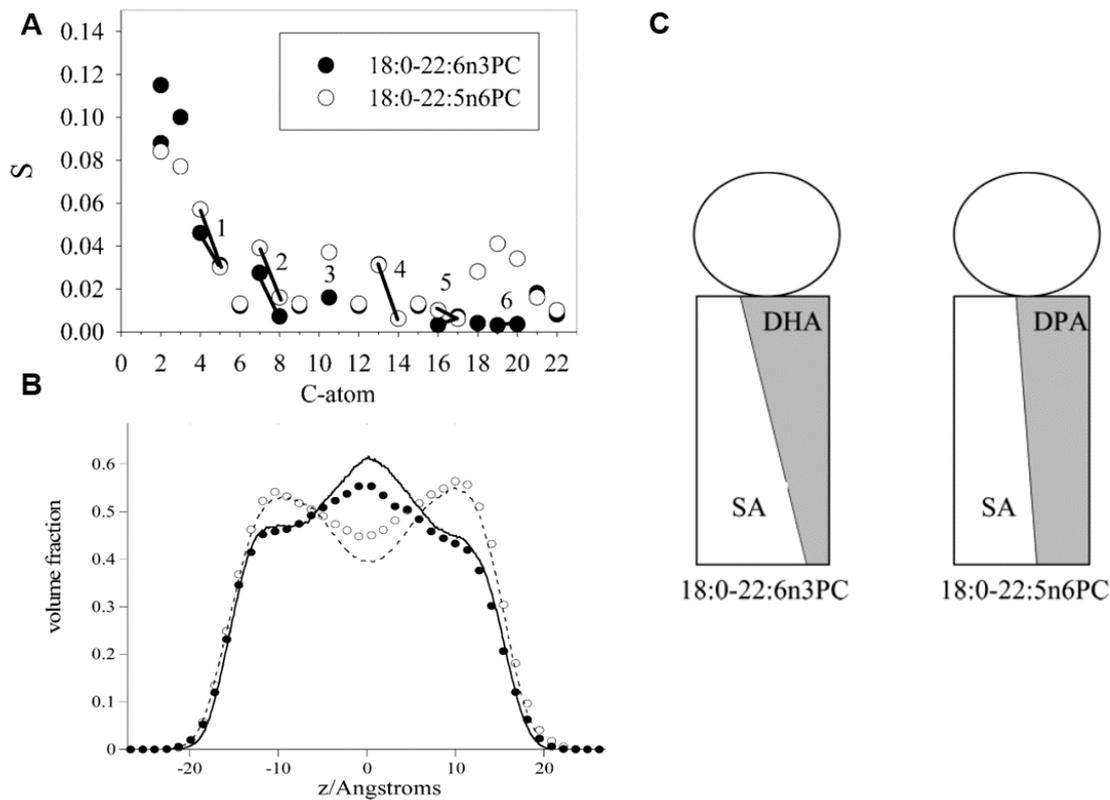
**Quelles conséquences cela a-t-il sur la dynamique des chaînes et leur répartition au sein des membranes ?** Plusieurs études qui seront présentées ultérieurement ont montré l'implication de la balance n-6/n-3 dans la maladie. En revanche peu d'études ont comparé ces deux familles sur le plan des propriétés physico-chimiques. Eldho et al. ont étudié des membranes composées de 18:0-22:6n-3 ou de 18:0-22:5n-6 (DPA) par RMN à l'état solide, diffraction aux rayons X et simulations de dynamique moléculaire pour déterminer si cette perte de double liaison modifie les propriétés physiques des membranes [60].

Le temps de relaxation nécessaire à chaque carbone pour revenir à sa position initiale, après application d'un champ magnétique, renseigne sur la dynamique des chaînes. Que ce soit dans le cas du DHA ou du DPA, un fort gradient est présent entre le C2 et le C21. En effet, les mouvements au niveau de l'extrémité C2 sont de l'ordre de la nanoseconde ce qui correspond à des mouvements de rotation tandis qu'à l'extrémité methyl les mouvements de l'ordre de la picoseconde sont dominés par les mouvements d'isomérisation de la chaîne. En revanche, la présence d'une double liaison plus proche de l'extrémité méthyl du DHA permet une isomérisation plus rapide. Ce résultat est confirmé par les paramètres d'ordre qui révèlent un ordre plus important au niveau du dernier segment de la chaîne du DPA vs DHA (Figure 2.5.A).

Les profils de densité de ces deux types de membrane montrent que les différences de dynamique observées à l'extrémité de ces chaînes, entraînent une réorganisation des chaînes au sein de la bicouche. La chaîne DHA a une densité plus élevée près de l'interface lipide/eau, tandis que la chaîne *sn1* saturée a une densité plus élevée au centre de la bicouche (Figure 2.5.B). La perte d'une double liaison simple entre le DHA et le DPA entraîne une distribution plus uniforme des densités (Figure 2.5.C).

Un modèle selon lequel certaines protéines transmembranaires pourraient être sensibles à ces différentes distributions des chaînes au sein de la bicouche, a alors été proposé.

Le désordre au sein de la bicouche apporté par les phospholipides polyinsaturés influence les propriétés membranaires et les interactions de la membrane avec l'environnement. Avant de s'y attarder, parlons en quelques mots d'une modification majeure que peuvent subir les chaînes aliphatiques polyinsaturées : la peroxydation.



**FIGURE 2.5 – Différences entre les n-3 et les n-6**, adapté de Eldho et al 2003 [60]. A : Paramètres d'ordre des chaînes polyinsaturées DHA (●) et DPA (○). B : Profil de densité des chaînes stériques du DHA (ligne continu) et du DPA (●) et des chaînes polyinsaturées DHA (ligne en pointillé) et DPA (○) C :Schéma représentatif de la distribution des chaînes au sein de la bicouche, SA représente la chaîne *sn1* saturée.

### 2.1.4 Oxydation des phospholipides

Les chaînes aliphatiques polyinsaturées sont majoritairement en position *sn2* et sont hautement oxydables. Dans le cas des plasmalogènes, la liaison *-ether* entre le glycérol et les chaînes aliphatiques est également oxydable. Dans le cas des lipides on parle de peroxydation. Des réactions enzymatiques et non enzymatiques peuvent être impliquées. Les enzymes oxydantes lipidiques comprennent la myéloperoxydase et la NADPH oxydase. Les premières étapes de la peroxydation des lipides consistent en l'abstraction d'hydrogène, suivi du réarrangement des doubles liaisons et enfin l'addition d'oxygène conduisant à des radicaux peroxydés très réactifs (Figure 2.6).

La présence de phospholipides oxydés entraîne une diminution de la diffusion latérale des lipides. Par la suite, ces phospholipides oxydés peuvent subir une grande variété de réactions dont la plupart conduisent à la modification de molécules importantes et ont donc une influence négative sur leur activité dans la cellule [64].

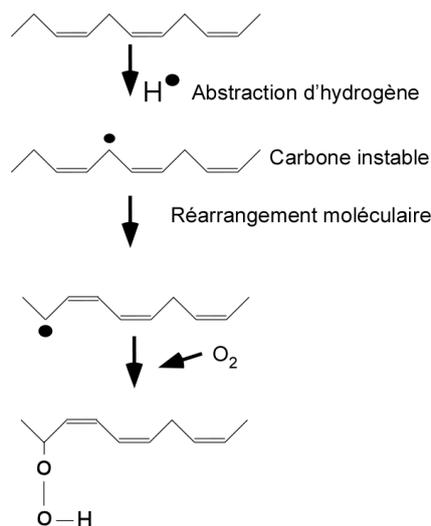


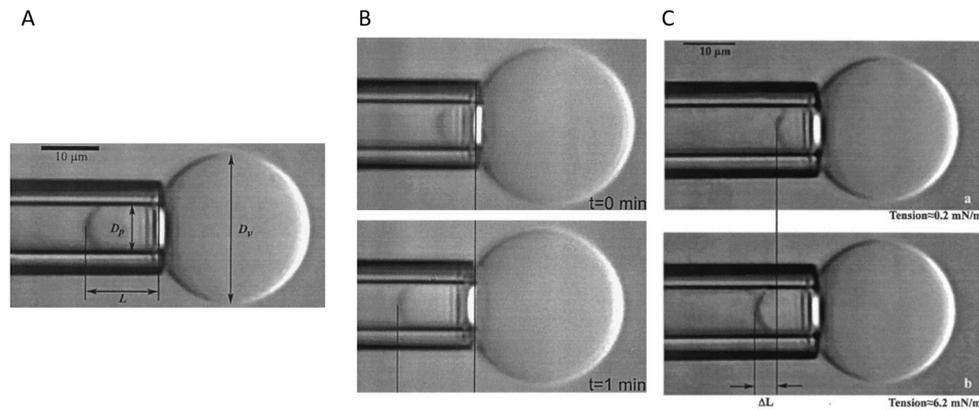
FIGURE 2.6 – Séquence réactionnelle de la peroxydation des lipides, adapté de Young et al. 2001 [63].

## 2.2 Phospholipides polyinsaturés et propriétés physico-chimiques des membranes

### 2.2.1 Perméabilité et *bending modulus*

En parallèle à l'étude de la dynamique des chaînes aliphatiques polyinsaturées, des études ont été menées pour comprendre leur impact sur les propriétés membranaires. En 1997, le groupe Gawrish s'est concentré sur la perméabilité des membranes contenant différents phospholipides mono ou polyinsaturés [65]. La RMN a permis d'évaluer le taux d'échange d'eau entre le compartiment interne et externe de liposomes en fonction de leur composition lipidique. Les coefficients de perméabilité augmentent considérablement avec l'introduction de doubles liaisons. Le groupe Evans continue dans cette voie grâce à la mise au point d'une approche combinant l'**utilisation de GUV** ( pour *Giant unilamellaire vesicles*) et leur manipulation par micropipette. Le principe est d'injecter de très faible concentration de GUV dans une micro chambre dont la pression et la température sont contrôlées. Des micropipettes en verre dont le diamètre est connu sont utilisées pour appliquer une aspiration sur les GUV. Une visualisation par microscopie permet de mesurer un certain nombre de paramètres présentés en Figure 2.7.A.

Afin de mesurer la perméabilité des membranes, les GUV sont placés dans une solution hyperosmotique. Pour atteindre l'équilibre, le solvant interne des GUV diffuse à travers leurs membranes, réduisant ainsi leur volume. La diminution du volume s'accompagne d'une augmentation de la longueur ( $L$ ) de la membrane aspirée à l'intérieur de la micropipette (Figure 2.7.B). L'inverse se produit lorsque l'on replace les GUV dans un milieu isotonique. Ces variations au



**FIGURE 2.7** – Technique de microaspiration permettant de déterminer la perméabilité et le *bending modulus* des membranes, extrait de Olbrich et al. [66] et Rawicz et al. 2000 [66]. A : Représentation de tous les paramètres mesurables. B : Effet d’un milieu hyperosmotique au cours du temps sur la longueur de membrane aspirée dans la micropipette C : Effet de la tension d’aspiration sur ce même paramètre.

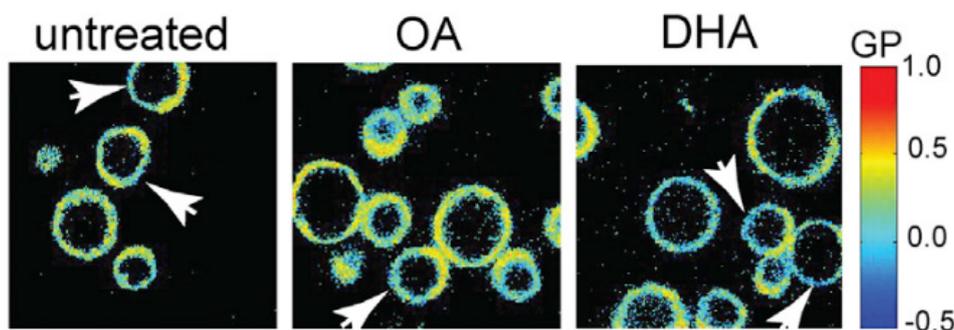
cours du temps permettent de déterminer la perméabilité des membranes selon la composition lipidique des GUV [66]. L’effet de la polyinsaturation est évalué pour des lipides de type 18:0-18:2/3 ou 18:2/3-18:2/3. Les phospholipides composés de 2 chaînes aliphatiques polyinsaturées présentent une plus grande perméabilité (Table2.2). Cette même technique d’aspiration a été utilisée afin de quantifier le *bending modulus* des membranes contenant des insaturations [67]. Cette mesure physique correspond à la capacité de la membrane à résister à la flexion. Plus la valeur du *bending modulus* est faible, plus la membrane est malléable. Dans ce cas, la pression d’aspiration reste contrôlée mais pas constante. Plus la pression est importante, plus la longueur de membrane aspirée par micropipette augmente (Figure 2.7.C). La valeur du *bending modulus* se déduit des variations de longueur en fonction de la large gamme de force d’aspiration exercée. En présence de phospholipides polyinsaturés, la malléabilité des membranes augmente d’un facteur 2 (Table2.2).

Phospholipides	Épaisseur (nm)	<i>Bending modulus</i> ( $10^{-19}$ J)	Perméabilité ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )
14:0-14:0	$3.52 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.07$	-
18:0-18:1	$4.07 \pm 0.06$	$0.90 \pm 0.06$	28
18:0-18:2	-	$0.46 \pm 0.07$	42
18:1-18:1	$3.69 \pm 0.04$	$0.85 \pm 0.10$	49
18:2-18:2	$3.49 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.07$	91
18:3-18:3	$3.43 \pm 0.06$	$0.38 \pm 0.04$	146

**TABLE 2.2** – Propriétés physico-chimiques des membranes selon le niveau d’insaturation des phospholipides ; les valeurs d’épaisseur et de *bending modulus* sont extraites de Olbrich et al. [66] et celles de la perméabilité des membranes sont extraites de Rawicz et al. 2000 [66]

## 2.2.2 Interaction phospholipides polyinsaturés et cholestérol

Toutes les études présentées jusqu'ici ont été réalisées sur des membranes comprenant uniquement des phospholipides polyinsaturés. Cependant, au sein des bicouches, ils sont en contact avec d'autres lipides dont des lipides saturés et du cholestérol. Dans la littérature, la plupart des études montre que la nature de la tête polaire et des chaînes aliphatiques influence la solubilité du cholestérol au sein des membranes. Par exemple les sphingomyelines ont une affinité plus forte pour le cholestérol que les PS  $\gg$  phosphatidylglycerol (PG)  $\gg$  PC  $\gg$  PE [68]. En ce qui concerne le niveau d'insaturation, les résultats sont variables selon les espèces lipidiques. Dans le cas des phospholipides polyinsaturés asymétriques (*sn1* saturée - *sn2* polyinsaturée), l'affinité avec le cholestérol diminue avec le niveau d'insaturation pour les PE alors qu'il y a moins d'impact avec les PC [69]. En revanche, l'orientation du cholestérol dans chacune des membranes semble être la même. Dans le cas de phospholipides polyinsaturés symétriques, moins communs dans les membranes cellulaires, l'affinité pour le cholestérol chute considérablement. Beaucoup envisagent ces différences d'affinité comme promouvant les séparations de phases et donc la formation de domaines. Une étude récente propose un modèle dans lequel les phospholipides polyinsaturés augmenteraient le désordre des domaines désordonnés sans modifier les domaines ordonnés riches en cholestérol et lipides ayant une forte affinité avec ce dernier [70] (Figure 2.8).



**FIGURE 2.8** – Exemples de cartes de polarisation généralisée de Laurdan utilisées pour visualiser l'ordre des domaines coexistants dans les GPMVs (*giant plasma membrane vesicles*). Les flèches identifient les domaines relativement désordonnés (Ld), Les couleurs plus froides de cas d'une supplémentation en DHA indiquent une augmentation du désordre. Barre d'échelle, 5  $\mu$ m.

## 2.3 L'importance des AG polyinsaturés pour la santé

Les n-3 et n-6 constituent depuis plusieurs années un enjeu de santé publique. Les modifications apportées à notre régime alimentaire ont modifié la balance entre n-3/n-6.

### 2.3.1 Comment établir leur rôle ?

Les bienfaits des phospholipides polyinsaturés sur la santé ont souvent été étudiés par un apport alimentaire supplémentée, en phospholipides ou AG [71]. Ces apports de phospholipides ou d'AG sont réalisés aussi bien *in vitro* en **culture cellulaire** que *in vivo* avec des **animaux modèles** comme la souris ou directement sur des **cohortes de patients**. Comme mentionné précédemment, l'importance biologique des AG polyinsaturés provient du fait que :

- les AG libres (AGL) sont les précurseurs de la production locale d'hormones impliquées dans la régulation, la viscosité du sang, la vasoconstriction et les réponses immunitaires et inflammatoires.
- les AG ensuite réestérifiés dans les phospholipides vont impacter la fluidité et la malléabilité des membranes cellulaires.

### Incorporation dans les cellules

*In vivo*, l'absorption des phospholipides ou AG se fait presque complètement dans l'intestin. Dans le cas des phospholipides, la plupart d'entre eux sont hydrolysés en position *sn2* par des phospholipases A2. Ils sont ensuite absorbés par les entérocytes sous forme d'AGL et de lyso phospholipides. Les deux fragments provenant des phospholipides peuvent être réestérifiés en phospholipides et pénétrer dans la circulation sanguine par le biais de lipoprotéines. Ils peuvent alors être transférés dans les membranes plasmiques de nombreuses cellules [71].

*In vitro*, en culture cellulaire un large éventail de méthodes est utilisé pour remodeler la composition lipidique des membranes [71]. La plus commune est le traitement des cellules avec des concentrations variables d'AGL en présence de BSA qui permet leur transport. Afin d'évaluer l'impact uniquement des suppléments en phospholipides sur les membranes, le sérum utilisé peut être traité en amont afin d'en retirer les AGL présents.

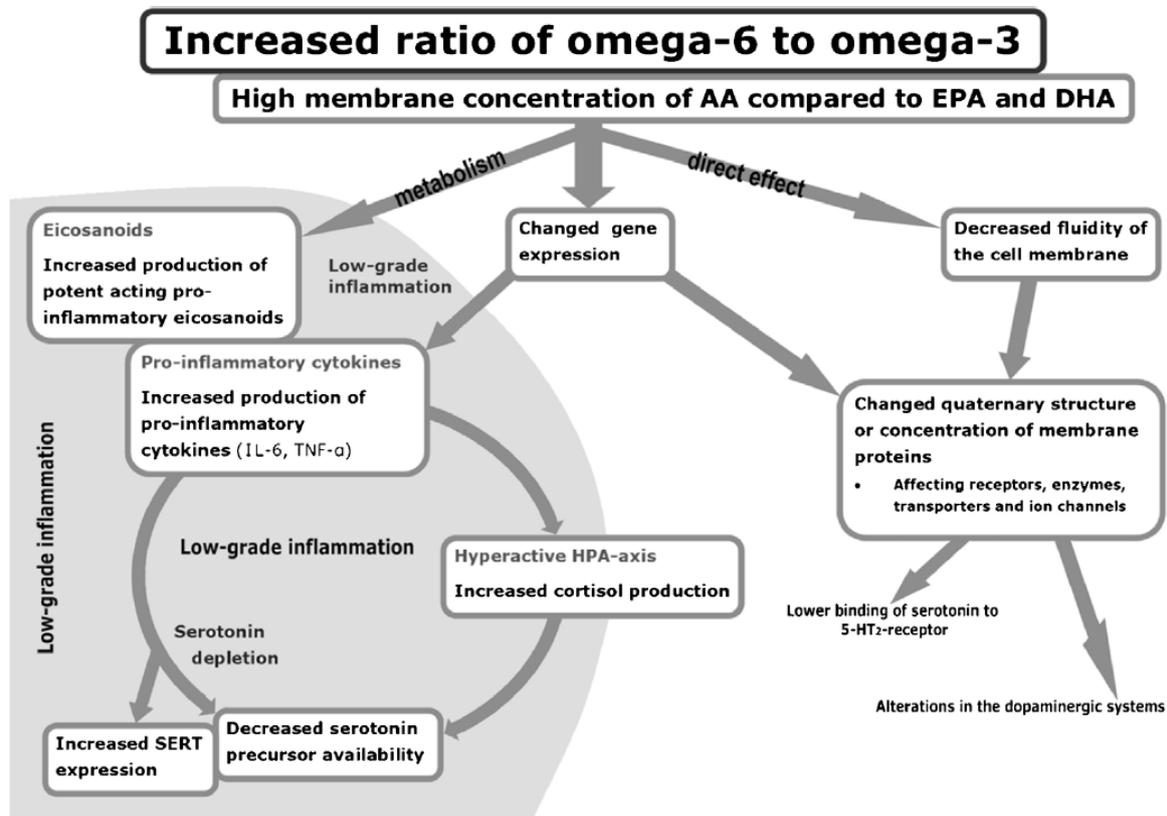
## Premier résultat d'une alimentation dépourvue de n-3 chez l'humain

C'est en 1982 que la première étude sur l'effet des n-3 a été réalisée sur une fillette de 6 ans qui après la perte d'une grande partie de son intestin a été nourrie par voie entérale pendant 5 mois avec une solution nutritive dépourvue d'ALA [72]. Cette enfant a présenté des troubles neurologiques des systèmes sensoriels et moteurs (engourdissement, faiblesse musculaire, troubles de la vision). L'introduction d'ALA dans la solution nutritive a permis de faire disparaître rapidement ces symptômes.

### 2.3.2 Importance de la balance n-6/n-3

L'évolution des habitudes alimentaires occidentales semblerait avoir un impact sur certaines maladies. Le mode de vie mené au paléolithique poussait les hommes à consommer beaucoup d'aliments pauvres en graisse saturée et avec des taux de n-6 et n-3 quasi équivalents. A l'heure actuelle, avec une diminution notamment de la consommation de poisson, la balance n-6/n-3 est déséquilibrée avec un rapport 20-30:1 [73]. Les familles d'AG polyinsaturés n-3 et n-6 ont souvent des fonctions physiologiques opposées et, par conséquent, leurs proportions relatives peuvent être impliquées dans certaines pathologies. Afin de présenter l'incidence de l'augmentation du rapport n-6/n-3, caractéristique de l'alimentation occidentale, sur la santé, j'ai choisi de décrire en quelques mots son impact sur les processus inflammatoires. Un ratio n-6/n-3 élevé prédispose ou exacerbe de nombreuses **maladies inflammatoires** (Figure 2.9). L'inflammation est une réponse biologique à des stimuli nocifs, tels que des agents pathogènes ou des cellules endommagées, qui est induite et entretenue par une cascade biochimique impliquant des médiateurs inflammatoires comme les cytokines, les chimiokines et les eicosanoïdes. L'évolution du ratio n-6/n-3 et l'augmentation de la consommation d'AG n-6 modifient la production de ces médiateurs et régulateurs conduisant à une réponse immunitaire pro-inflammatoire [74]. L'apport alimentaire accru en AG n-6 et un apport alimentaire diminué en n-3 est donc préjudiciable pour la santé. L'enrichissement alimentaire en AG n-3 agit sur le soulagement des maladies inflammatoires en contrant ces effets délétères par la diminution de la production de vasoconstricteurs, en limitant les signes d'inflammation et par l'augmentation de la concentration de vasodilatateurs [75]. Leurs effets immunosuppresseurs en font des molécules candidates pour le traitement des symptômes inflammatoires associés aux maladies cardiovasculaires, à l'obésité, à l'arthrite et à l'asthme. En revanche, l'immunosuppression par les AG n-3 pourrait accroître la sensibilité aux infections bactériennes et virales. Plusieurs études, aux résultats contradictoires, ont été menées dans ce sens en quantifiant la survie de l'hôte et l'élimination

des pathogènes [76]. Dans le cerveau, une déficience en n-3 affecte la transmission monoaminergique et promeut le déclin cognitif [77] (Figure 2.9).



**FIGURE 2.9 – Importance de la balance n-6/n-3 dans la santé**, extrait de Husted et al 2016 [77]. Rôle des AG polyinsaturés dans le développement de pathologies impliquant des processus inflammatoires et dépressifs (EPA, acide eicosapentaénoïque)

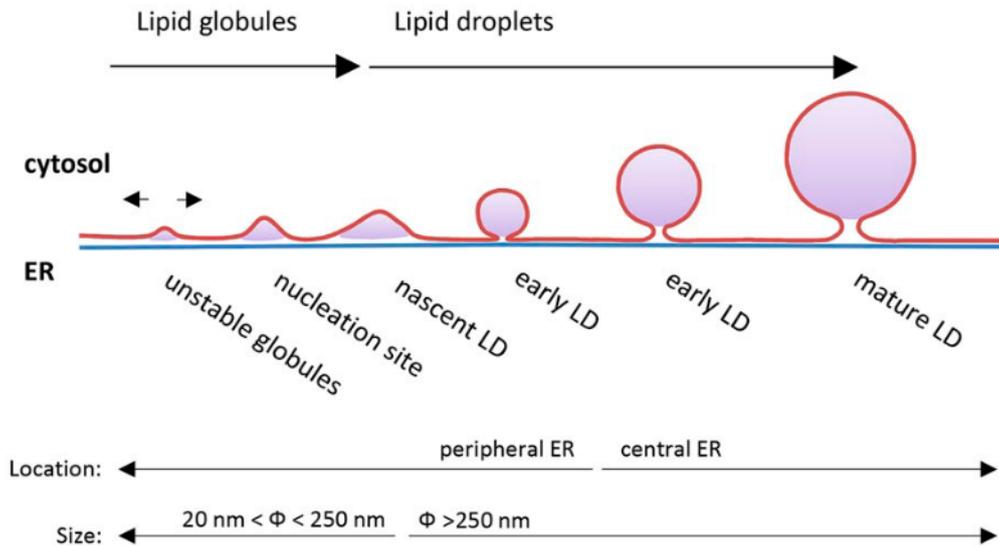
## 2.4 L'importance des phospholipides polyinsaturés dans les fonctions cellulaires

Outre leur importance dans les processus inflammatoires et dépressifs, les phospholipides polyinsaturés sont nécessaires à plusieurs fonctions cellulaires. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

### 2.4.1 Le stockage des lipides

Les gouttellettes lipidiques (GL) sont des organites au sein des cellules qui permettent le stockage des lipides. Elles sont présentes dans toutes les cellules et s'adaptent au besoin de la cellule en stockant l'excès d'AG sous forme de triglycérides (TG). Les TG sont des lipides neutres estérifiés par 3 AG. Les GL, régulent l'homéostasie lipidique, ils sont donc indispensables aux

cellules. Pol et al. ont décrit les étapes de leur formation (Figure 2.10) : les TG sont synthétisés au réticulum endoplasmique, entre les deux monocouches, générant un bourgeonnement de la membrane. Ils s'accumulent jusqu'à ce que la GL naissante se détache de la membrane [78].



**FIGURE 2.10 – Schéma décrivant de la biogenèse des GL**, extrait de Pol et al. 2014 [78]. Les TG sont produits entre les deux monocouches du RE entraînant un bourgeonnement qui va grossir dû à l'accumulation de TG jusqu'au détachement de la GL.

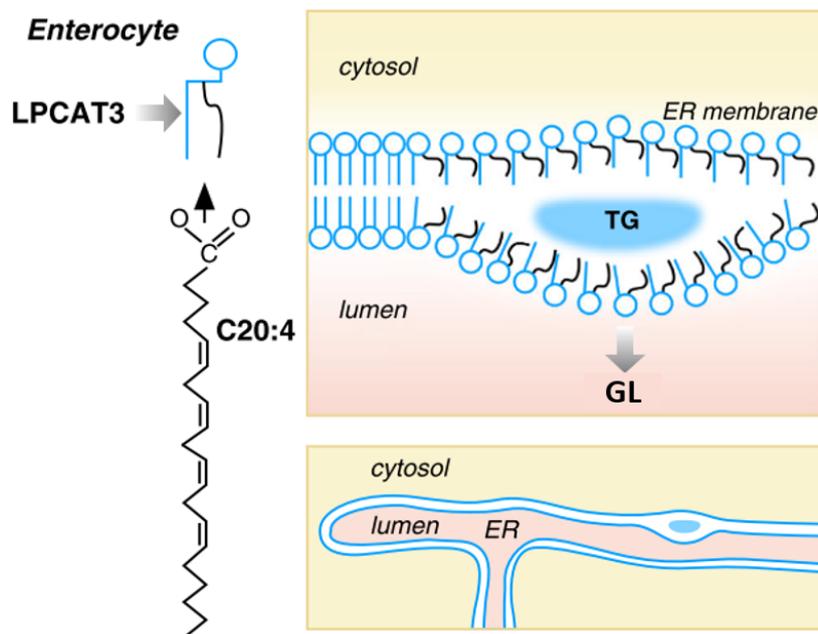
Hashidate-Yoshida, Harayama et al. ont établi un lien entre la formation de GL et les phospholipides polyinsaturés de type n-6 en prenant l'exemple de du 20:4n-6 [79].

Comme expliqué précédemment, l'incorporation des AG dans les phospholipides se fait grâce à des enzymes de remodelage : les LPLAT. Parmi cette famille très large, ils ont étudié le rôle de la LPCAT3 chez la souris nouveau-née. Les expériences montrent que cette enzyme se trouve à des niveaux élevés dans l'intestin et le foie. Les souris déficientes en LPCAT3 présentaient :

- des taux de 20:4n-6 beaucoup plus faibles que les souris contrôles.
- des signes de lésions intestinales graves dues à l'accumulation de lipides dans le lait maternel et les souris sont mortes quelques jours après leur naissance.
- des forts taux de triglycérides, dans leur intestin et leur foie.
- une incapacité des AG à s'assembler en TG et donc une accumulation dans les cellules intestinales et hépatiques.

Les expériences montrent également que des niveaux élevés de 20:4n-6 dans les membrane permettent aux molécules de TG de s'y regrouper ce qui augmente la production de GL.

Les résultats de Hashidate-Yoshida, Harayama et al. suggèrent que le LPCAT3 incorpore les chaînes d'AG 20:4n-6 dans la membrane des cellules intestinales et hépatiques, ce qui permet l'assemblage des TG et la formation de GL (Figure 2.11).



**FIGURE 2.11 – L’arachidonate facilite la formation de lipoprotéines**, adapté de Barelli et Antony 2016 [80]. La formation des lipoprotéines commence par le gonflement d’une gouttelette lipidique à l’intérieur de la bicouche du réticulum endoplasmique (ER) vers la lumière. Le LPCAT3, qui produit de l’arachidonate PC (en noir), facilite la formation de GL

## 2.4.2 Les récepteurs de la perception

### Sensibilité de l’œil à la lumière

Les bâtonnets rétiniens sont composés à 50% de phospholipides polyinsaturés. Ancrée dans ces membranes, se trouve la rhodopsine, une protéine membranaire photosensible. Elle est couplée à une protéine G : la transducine ; protéine utilisant l’échange du GTP en GDP comme un "interrupteur moléculaire" pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques dans la cellule. La rhodopsine est responsable de la sensibilité de l’œil à la lumière. La réception d’un photon la fait basculer d’une conformation *cis*, métarhodopsine I (MI), à une conformation *trans* métarhodopsine II (MII). Ce changement entraîne l’activation de la protéine G. Ce système, idéal pour déterminer le rôle de la polyinsaturation dans la modulation des fonctions des protéines membranaires, a été étudié par des expériences biochimiques sur **liposomes** [81]. Ils sont composés de PC ayant différents profils de chaînes aliphatiques (di14:0, 16:0-20:4, 16:0-22:6, di20:4 ou di22:6). L’ajout d’un surfactant (l’octylglucoside) permet l’incorporation de 0.25-0.3 mg/ml de rhodopsine. Le principe est de déterminer la constante d’équilibre entre la métarhodopsine I et la MII par **mesure d’absorbance** en fonction de la composition lipidique des liposomes. La quantité de MII formée augmente progressivement avec le niveau d’insaturation. L’ajout de 30% de cholestérol dans les membranes entraîne une augmentation drastique (400%) du temps

nécessaire à la formation de MII complexé à la transducine dans une membrane composée de PC monoinsaturé. En revanche, seul un très faible effet est observé en présence de cholestérol dans une membrane de phospholipides polyinsaturés [82] (Figure 2.12). Des mesures de RMN ont également montré que la fonction de la rhodopsine pourrait être influencée par des interactions spécifiques avec les lipides en contact avec des sites particuliers du récepteur [83] et par l'élasticité de la membrane [84].

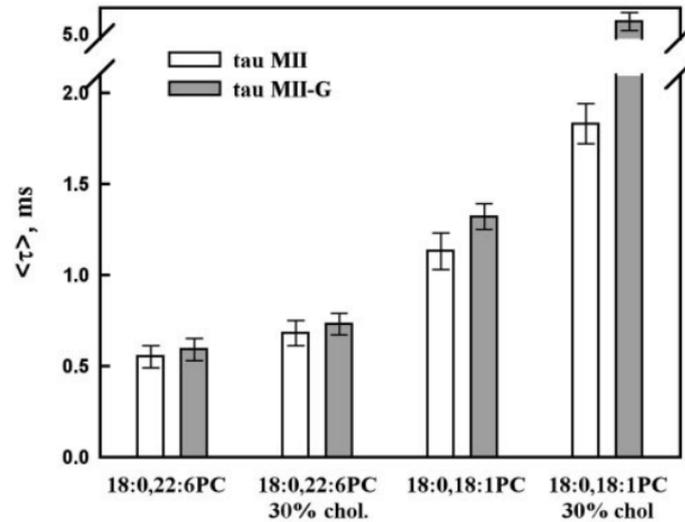


FIGURE 2.12 – Effet de la composition lipidique sur le temps de changement de conformation de la MI en MII ainsi que le temps de formation du complexe MII transducine (MII-G), extrait de Mitchell et al. 2001 [82]

### Sensibilité du toucher et proprioception

Les neurones sensoriels utilisent des canaux à transduction mécano-électriques (MeT) pour détecter des stimuli au toucher. Également présents dans les muscles et les articulations, ils aident à la proprioception. La plupart des canaux MeT appartiennent à des complexes macromoléculaires dont les constituants protéiques ont été identifiés chez *C. elegans*. Plusieurs techniques ont été utilisées afin d'établir l'implication de l'incorporation d'acide arachidonique (20:4n-6) dans les membranes des neurones de *C. elegans* dans l'activité MeT des récepteurs tactiles [85]. L'un des avantages à étudier la sensibilité tactile chez *C. elegans* est qu'ils génèrent des signaux électriques en réponse à la déviation des cuticules et transmettent des signaux principalement via des synapses électriques aux interneurons qui contrôlent la motricité. En utilisant des tests comportementaux, Vasquez et al. ont pu déterminer la contribution des lipides dans la sensibilité au toucher.

- L'utilisation d'une **série de mutants** inactivant les enzymes désaturases et élongases nécessaires à la synthèse des n-6 et n-3 montre une diminution entre 20 et 45% de la sensation de toucher.

- Ensuite, ils ont procédé à de la **complémentation chimique** sur les différents mutants en ajoutant au milieu de croissance des nématodes, soit du 20:4n-6 soit du 20:5n-3. L'enrichissement en 20:4n-6 rétablit totalement la sensibilité tactile.
- Associant l'optique à la génétique, **l'opto-génétique** permet de rendre les neurones sensibles à la lumière. Grâce à cette technique, ils ont conclu que l'altération de la réponse tactile des mutants, dépourvus d'AG polyinsaturés en 20 carbones, ne résulte pas de défauts flagrants dans le développement, la morphologie ou de la mauvaise localisation du complexe des canaux MeT.
- Enfin, **des mesures biomécaniques** sur la membrane plasmique des neurones sensoriels révèlent que les membranes des mutants sont plus résistantes que les cellules sauvages. Cette dernière technique permet de mettre en évidence que c'est bien l'intégration aux membranes de l'acide arachidonique, rendant les membranes moins rigides, qui permet le bon fonctionnement des canaux MeT (Figure2.13).

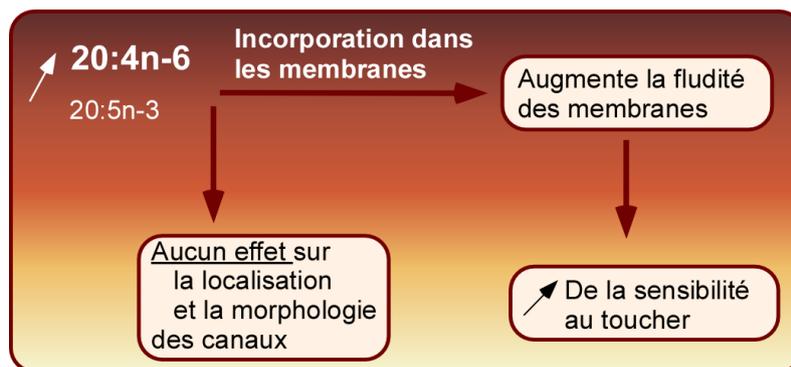


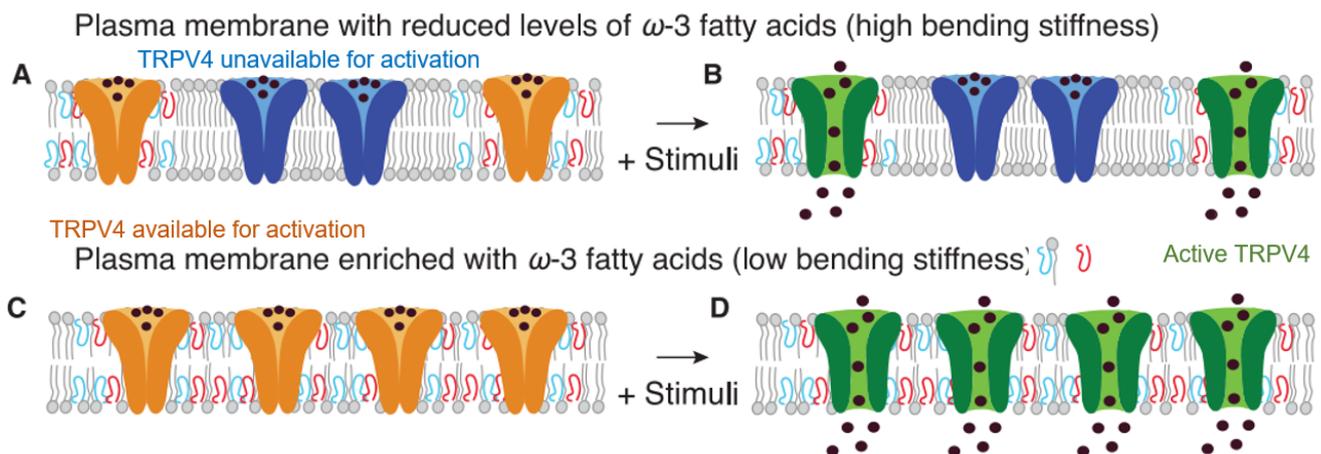
FIGURE 2.13 – Effet de la polyinsaturation sur la dynamique des canaux MeT

### 2.4.3 Vasorelaxation endothéliale

Les canaux TRPV4 (pour *transient receptor potential vanilloïde 4*) sont des récepteurs ionotropiques activés par des molécules de la famille des vanilloïdes. Ils sont impliqués dans la vasorelaxation endothéliale. En utilisant à nouveau l'organisme modèle *C. elegans*, il a été déterminé en 2017 que les AG n-3 sont nécessaires à l'activité de TRPV4 [86]. Des suppléments en AG n-3 améliorent l'activité de TRPV4. L'effet peut provenir de l'incorporation des AG n-3 dans les phospholipides des membranes ou en tant qu'AGL. Pour identifier quelle contribution était impliquée dans l'activité du canal, les enzymes de remodelage MBO4-6 (LPCAT3 chez les mammifères) ont été inactivés, rendant impossible l'incorporation des AG n-3 dans la membrane. Dans ces conditions, l'activité des TRPV4 est réduite de moitié. L'incorporation des n-3 dans la membrane est donc nécessaire pour promouvoir l'activité de TRPV4.

L'utilisation de cellules HMVEC (*Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells*) a permis (i) de confirmer que l'augmentation des courants TRPV4 (observés par électrophysiologie) dans les HMVEC, cultivées en présence de n-3, est due à l'ouverture de canaux auparavant silencieux dans la membrane plasmique, plutôt qu'à une augmentation de leur niveau d'expression (ii) d'évaluer l'impact des phospholipides n-3 sur les propriétés mécaniques des membranes par application d'une force de traction.

Le modèle proposé qui en découle est décrit dans la Figure 2.14. Les n-3 augmentent la fluidité de la membrane. Cela promeut l'ouverture des canaux TRPV4 et influence ainsi la réponse des cellules endothéliales.



**FIGURE 2.14 – Effet n-3 sur l'activité du canal TRPV4**, adapté de Caires et al. 2017 [86]. (A et B) Les membranes plasmiques avec des niveaux réduits d'acides gras n-3 présentent un faible nombre de canaux disponibles pour l'activation (A) ainsi qu'un nombre réduit de canaux actifs après stimulation (B). (C et D) les membranes plasmiques enrichies en acides gras n-3 augmentent le nombre de canaux disponibles pour l'activation (C) ainsi que le nombre de canaux actifs après stimulation (D)

## 2.5 Trafic vésiculaire

Les cellules eucaryotes se définissent par leur compartimentation délimitée par différentes membranes. Le contenu protéique et lipidique de chaque compartiment est maintenu et régulé par un trafic vésiculaire constant. Ce trafic implique le bourgeonnement d'une vésicule à partir de la membrane d'un compartiment donneur. Cette vésicule est ensuite transportée par le cytosquelette et par des moteurs moléculaires vers la membrane du compartiment accepteur. Une fois amarrée, il s'en suit une fusion des membranes de la vésicule du compartiment receveur. Du bourgeonnement à la fusion, en passant par le transport, des protéines sont nécessaires. **Comment peuvent-elles identifier les bons compartiments ?**

### 2.5.1 Voie de sécrétion

Une partie des protéines périmembranaires se fixe à la membrane par reconnaissance spécifique d'un lipide. L'autre partie des protéines, par l'intermédiaire de leurs hélices amphipathiques (HA), est sensible aux propriétés physico-chimique des membranes (forme ou charge).

Dans ce contexte, le motif ALPS (*Amphipathic Lipid Packing Sensor*) a été identifié par l'équipe [87]. Il se structure en HA et interagit avec une membrane courbée. Prenons l'exemple de GMAP (*Golgi microtubule associated protein*), une très longue protéine golgienne qui agit comme corde moléculaire grâce à sa structure en *coiled-coil*, idéale pour connecter deux membranes. Cette protéine est connue pour attacher transitoirement des vésicules pré ou post golgienne à leur compartiment cible, afin de les astreindre à fusionner avec le compartiment accepteur. Le motif ALPS est identifié à l'une des extrémités de GMAP et celle-ci se fixe uniquement sur des membranes très courbées [88].

Les HA de type ALPS ne sont pas les seules à être sensibles à la courbure. Les HA présentes dans la partie N-terminale de l' $\alpha$ -synucléine par exemple le sont également. En quelques mots, l' $\alpha$ -synucléine est une petite phosphoprotéine de 14 kDa<sup>1</sup>. Elle participe comme monomère à l'exocytose des vésicules synaptiques en améliorant l'amorçage, la fusion et la dilatation des pores de fusion exocytotique des vésicules [89].

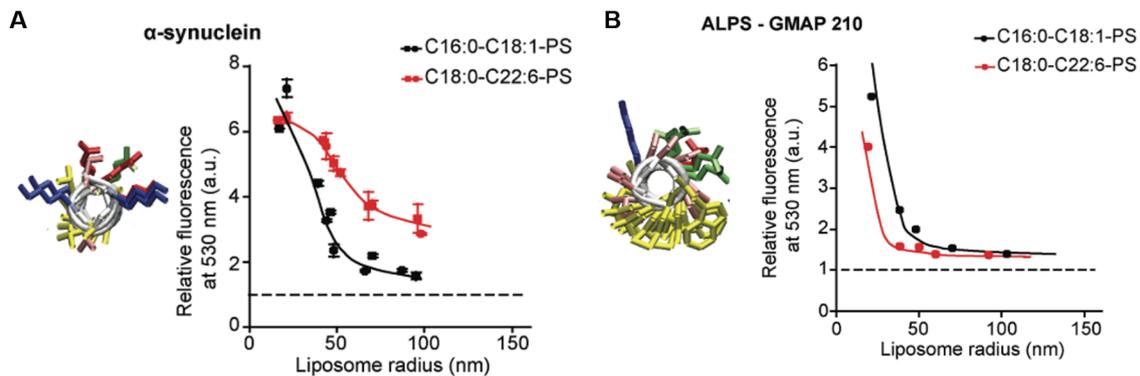
Dans une cellule, ces deux HA ciblent des vésicules très différentes : les vésicules de la voie de sécrétion précoce pour le motif ALPS et les vésicules d'exocytose/post-golgiennes qui sont chargées négativement pour l' $\alpha$ -synucléine [90]. Les chimies très spécifiques et contrastées de ces deux HA leur permettent une reconnaissance fine de l'environnement lipidique. Le motif ALPS, très peu chargé, est composé de résidus apolaires encombrants (Leucine, Phénylalanine) tandis que les HA de l' $\alpha$ -synucléine sont composées de résidus hydrophobes de petites tailles (Valine, Alanine) et de résidus chargés.

**Quel est l'impact de la composition membranaire sur la fixation de ces deux familles d'HA ?** La fixation d'une sonde fluorescente NBD sur ces deux protéines modèles a permis de quantifier leur insertion dans différentes membranes plus ou moins courbées. Les mesures de fluorescence ont révélé que si la fixation de l' $\alpha$ -synucléine est considérablement facilitée en présence de 18:0-22:6n-3 (Figure 2.15.A), les phospholipides polyinsaturés sont un frein à la fixation de GMAP (Figure 2.15.B) [91]. Cette observation est valable quelque soit la

---

1. l' $\alpha$ -synucléine est également le composant principal des agrégats de protéines appelés corps de Lewy, caractéristiques de la maladie de Parkinson.

courbure de la membrane et provient certainement du mode de fixation des HA à la membrane. Les HA ne se "posent" pas simplement sur les membranes mais y pénètrent plus profondément. De ce fait, leur insertion nécessite la formation de cavités transitoires au niveau de l'interface tête polaire /eau plus ou moins profondes, mentionnées précédemment sous l'appellation de DP. La dynamique très différente des chaînes aliphatiques mono et polyinsaturées engendre des DP plus adaptés à l'une ou l'autre des HA. Ces phénomènes seront expliqués, dans le prochain chapitre, par l'analyse de l'interface eau/membrane par simulations de dynamique moléculaire.



**FIGURE 2.15 – Effet de la polyinsaturation sur la fixation de protéines périmembranaires selon le type d'hélices amphipathiques**, adapté de Pinot et al. 2014 [91]. La fixation du motif APLS diminue en présence de liposomes comportant 60% 18:0-22:6n-3PS tandis que la fixation d'α-synucléine augmente. L'effet de la courbure est également visible. Plus les liposomes sont courbés, meilleure est la fixation.

## 2.5.2 Endocytose

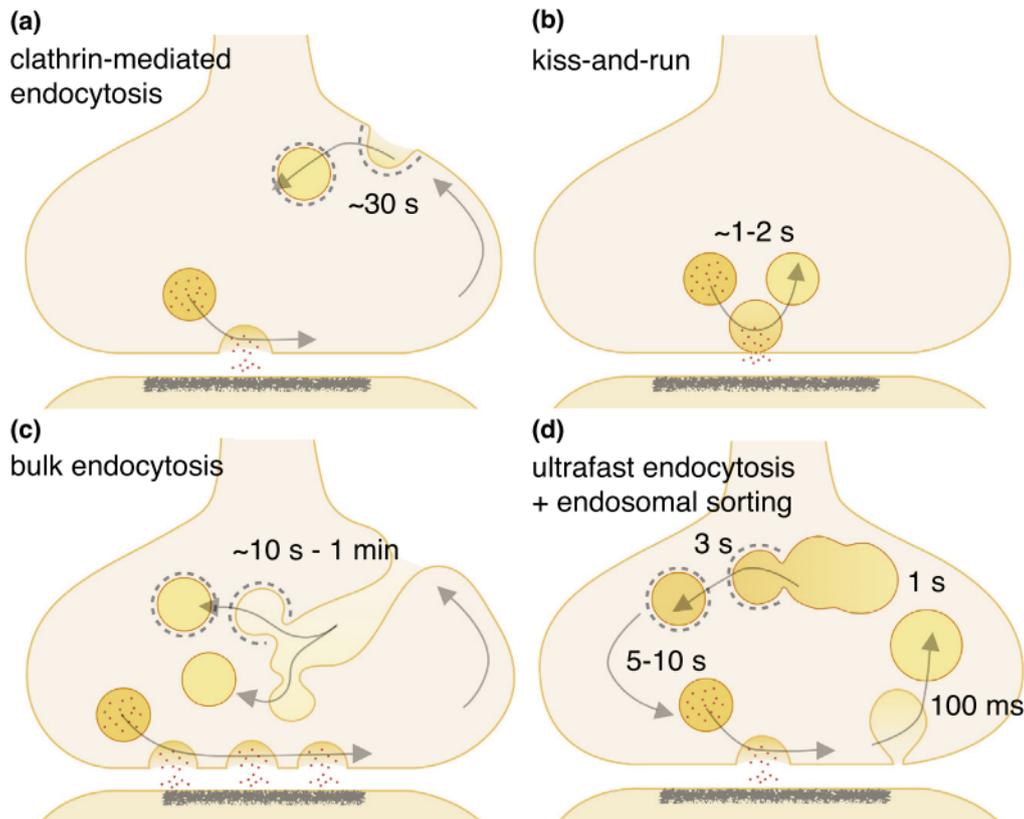
L'endocytose (ou internalisation) est le mécanisme de transport de molécules ou de recyclage membranaire vers l'intérieur de la cellule. Le bourgeonnement des membranes est l'étape cruciale de l'endocytose. Il existe deux grandes voies d'endocytose au niveau de la membrane plasmique ; le voie clathrine dépendante et la voie clathrine indépendante. La première nécessite la formation d'un manteau protéique dont la protéine structurale majeure est la clathrine. Constituée de trois chaînes lourdes et d'une chaîne légère, elles s'assemblent pour former un "triskèle". Ces derniers sont capables de s'auto-assembler pour former une "cage" [92]. L'endocytose clathrine dépendante est la voie dominante pour les fonctions de recyclage/nettoyage des membranes lorsqu'elles ne subissent aucun stimuli particulier. Cependant, certains processus physiologiques nécessitent une réponse cellulaire très rapide, évolutive et contrôlée. Ces processus incluent, de façon non exhaustive, la réaction aux hormones de stress ou l'endocytose compensatoire après exocytose de vésicules synaptiques. Plusieurs processus d'endocytose rapides, clathrine indépendante, ont été identifiés à ce jour [93] :

- la macropinocytose ou endocytose de masse
- l'endocytose rapide par l'intermédiaire d'une protéine médiatrice appelée l'endophiline (FEME pour *fast-endophilin-mediated endocytosis*). L'endophiline possède un domaine dimérique d'HA appelé domaine BAR. En forme de croissant, il se lie à la membrane par sa face concave et rigide, principalement par interactions électrostatiques. Sa fixation stabilise la membrane et initie sa déformation en la courbant. L'endophiline est assistée par la dynamine pour induire la scission.
- l'endocytose ultrarapide otant l'excès de membrane dû aux exocytoses fréquentes et rapides que l'on retrouve au niveau des synapses. Son mécanisme est encore peu connu mais quelques facteurs ont été découverts [94, 95].
  1. Bien que l'afflux de calcium puisse influencer le taux d'endocytose, il n'est lui-même pas suffisant pour induire une endocytose ultrarapide. En effet, en cas d'une déficience des mécanismes d'exocytose au niveau des synapses neuronaux, l'endocytose ultrarapide ne se déclenche pas après un afflux de calcium. Cela suggère que l'ajout de membrane, lors de l'exocytose par fusion de vésicules avec la membrane plasmique, est la condition nécessaire.
  2. Les filaments d'actine seraient nécessaires pour initier la courbure de la membrane
  3. La dynamine est indispensable pour engendrer la fission des vésicules
  4. L'endocytose ultrarapide se produit à proximité des sites de fusion (généralement à moins de 200 nm).

Les différents mécanismes d'endocytose au niveau des synapses neuronaux sont décrits dans la Figure 2.16.

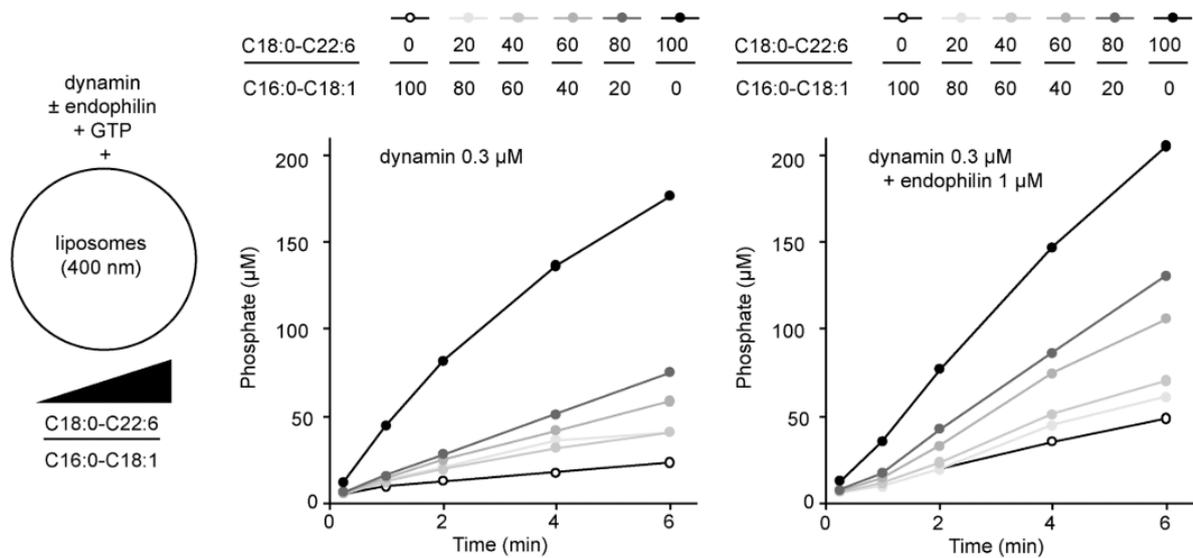
La dynamine est au cœur de la fission des vésicules d'endocytose rapides et ultra rapides dans les cellules végétales et animales. Elle s'assemble en polymère hélicoïdal contractile qui s'enroulent autour du cou d'une vésicule en formation pour provoquer sa scission du compartiment donneur. Les dynamines ont trois propriétés bien établies [96].

- Les dynamines s'assemblent et s'oligomérisent en hélice, entourant un tube membranaire.
- Les modifications de conformation, induites par l'oligomérisation en hélice, entraînent un rétrécissement de la membrane sous-jacente.
- L'oligomérisation est possible par hydrolyse du GTP grâce à leur domaine GTPase. En biochimie, cette dernière propriété a permis la mesure indirecte du taux de fission en mesurant la vitesse d'hydrolyse du GTP.



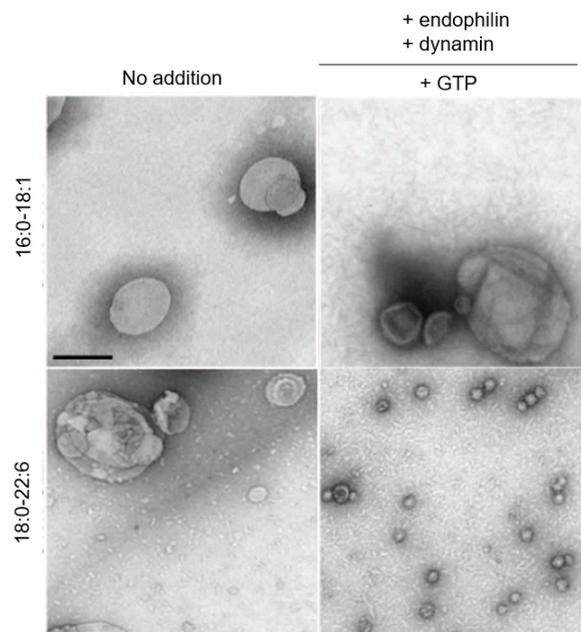
**FIGURE 2.16 – Compréhension actuelle des mécanismes d’endocytoses au niveau des synapses**, extrait de Watanabe et al. 2017 [93]. (a) Fusion complète des vésicules synaptiques suivie d’une **endocytose clathrine dépendante** dans des sites distaux. (b) **Kiss-and-run** : ouverture et fermeture de pores dans les vésicules synaptiques afin de libérer les molécules transportées dans la zone active. (c) Fusion intense par stimulation de plusieurs vésicules synaptiques, suivie d’une **endocytose rapide** et globale à partir des sites distaux. (d) Fusion complète des vésicules synaptiques suivie d’une **endocytose ultrarapide** à proximité de la zone de fusion

Comme détaillé ci-dessus, les mécanismes d’endocytose nécessitent le recrutement d’un ensemble de protéines permettant la déformation et la scission de vésicules. Mais **qu’en-est-il de l’impact de la composition membranaire**? Comme discuté précédemment, dans les neurones les phospholipides hautement polyinsaturés sont concentrés au niveau des terminaisons synaptiques, lieux des endocytoses rapides et ultra rapides. Une étude mêlant **biochimie, biologie cellulaire**, microscopie électronique et dynamique moléculaire a été entreprise par l’équipe [91]. Le taux d’hydrolyse du GTP en fonction de la composition lipidique des liposomes a révélé une capacité d’autoassemblage sur les membranes 7.5 fois plus rapide en présence de phospholipides polyinsaturés qu’en présence de monoinsaturés (Figure 2.17).



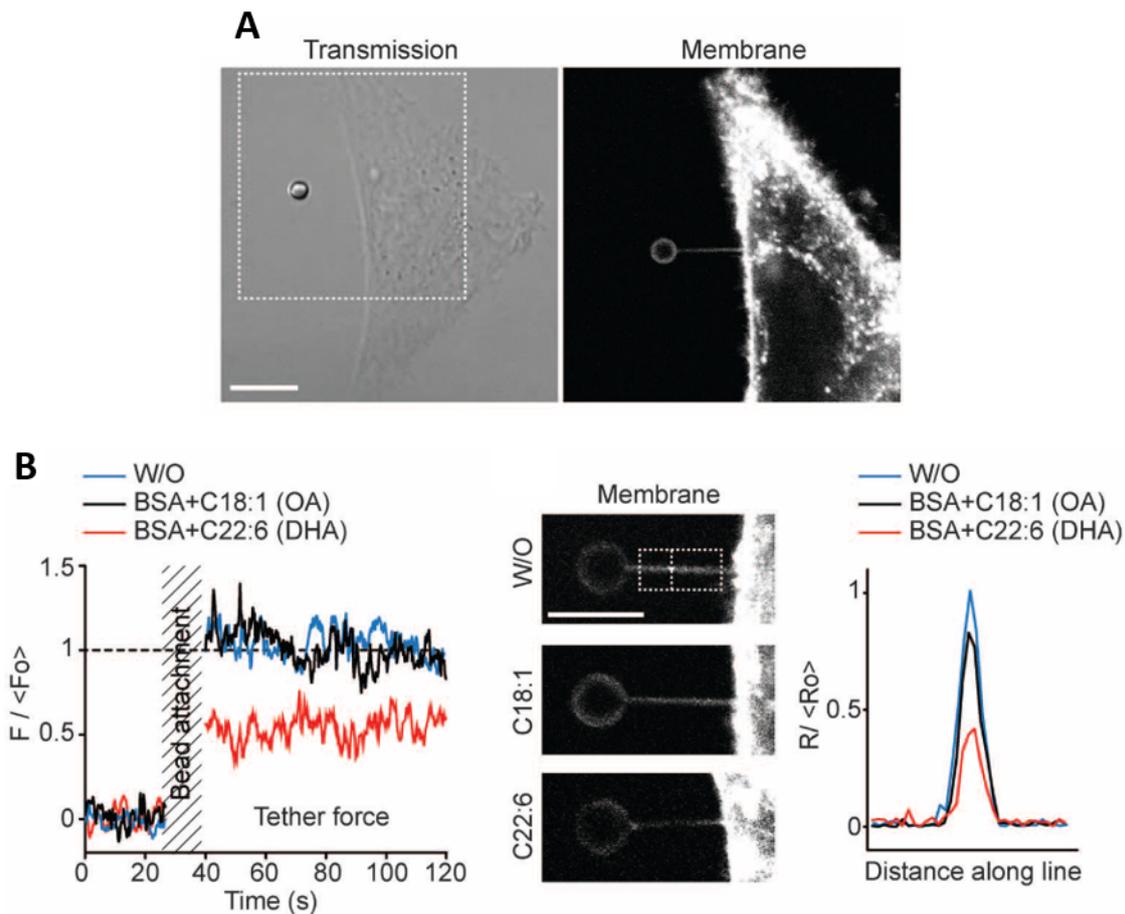
**FIGURE 2.17 – Effet de la polyinsaturation des phospholipides sur l’activité GTPase de la dynamine**, extrait de Pinot et al. 2014 [91]. Cinétique de l’hydrolyse du GTP par la dynamine ( $0,3 \mu\text{M}$ ) sans ou avec de l’endophiline ( $1 \mu\text{M}$ ) en présence de liposomes ( $0,1 \text{ mM}$ ) obtenus par extrusion à travers des filtres de  $400 \text{ nm}$  et contenant une concentration croissante de phospholipides polyinsaturés.

L’utilisation de la **microscopie électronique** a permis d’observer la fission, par des protéines de l’endocytose (endophiline et dynamine), des liposomes, composés de phospholipides polyinsaturés, en petites vésicules (Figure 2.18).



**FIGURE 2.18 – Les phospholipides polyinsaturés facilitent la déformation membranaire**, adapté de Pinot et al. 2014 [91]. Microscopie électronique de liposomes de C16:0-C18:1 ou C18:0-C22:6 ( $400\text{-nm}$  extrusion) avant ou après incubation avec de la dynamine ( $0,5 \text{ mM}$ ), de l’endophiline ( $1 \text{ mM}$ ) et du GTP ( $500 \text{ mM}$ ). Barre d’échelle,  $200 \text{ nm}$ .

Des pinces optiques ont été utilisées sur la membrane plasmique de cellules, ayant été ou non mises en culture avec des AG polyinsaturés, afin de déterminer sa résistance mécanique à la déformation (Figure 2.19). La présence de polyinsaturés facilite cette manipulation mécanique. Enfin, afin de visualiser directement les phénomènes d'endocytose, de la transferrine fluorescente est ajoutée. Se fixant sur les récepteurs de transferrine au niveau de la membrane plasmique, nous pouvons observer son internalisation par endocytose clathrine dépendante. Une fois encore, ce phénomène est favorisé après enrichissement en phospholipides polyinsaturés.



**FIGURE 2.19** – L'incorporation de 22:6 dans les phospholipides cellulaires diminue la résistance de la membrane plasmique à la déformation, adapté de Pinot et al. 2014 [91]. A : Contraste interférentiel et image confocale d'une cellule RPE1. Un tube a été retiré de la membrane plasmique à l'aide d'une bille de 3  $\mu\text{m}$  recouverte de concavalline et d'une pincette optique. Barre d'échelle, 10  $\mu\text{m}$ . B : Mesures typiques de la force ( $F$ ) et du rayon apparent ( $R$ ) des tubes cellulaires après incubation avec un acide gras 18:1 ou 22:6 pendant 1 heure.  $\langle F_0 \rangle$  et  $\langle R_0 \rangle$  sont respectivement la force moyenne et le rayon moyen avant l'addition d'acides gras. OA, acide oléique 18:1 ; DHA, acide docosahexaénoïque 22:6. Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ .

Les détails atomistiques permettant de comprendre les faits décrits tout au long de ce chapitre, ont été apportés par les simulations de DM.



# La dynamique moléculaire pour une étude à l'échelle atomique

## 3.1 Fonctionnement et performances

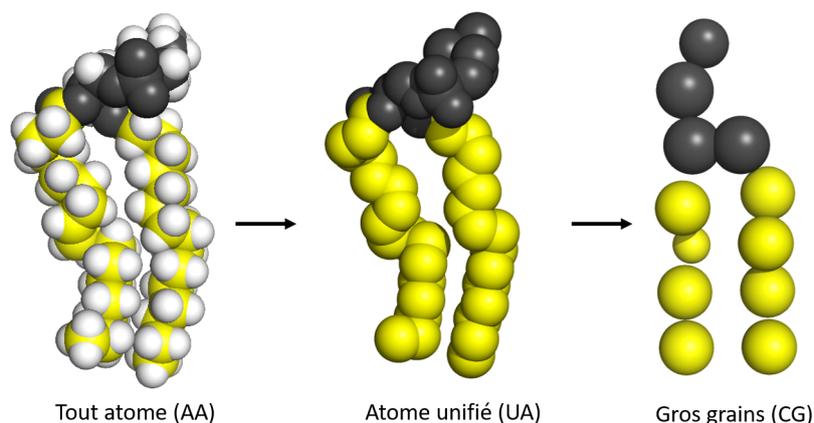
### 3.1.1 Comment modéliser des systèmes biologiques par dynamique moléculaire ?

Les simulations de DM permettent de prédire comment chaque atome d'un système moléculaire se déplace au fil du temps. La prédiction est possible grâce à un modèle de physique régissant les interactions entre les atomes [97]. Les simulations de DM peuvent prédire la façon dont les biomolécules réagissent au niveau atomique, à des variations environnementales telles que la composition lipidique pour les membranes ou à une mutation pour les protéines. L'idée de base derrière une simulation de DM est simple [98]. En donnant la position de tous les atomes d'un système biomoléculaire (par exemple, une bicouche lipidique entourée d'eau), on peut calculer la force exercée sur chaque atome par tous les autres atomes. On utilise pour cela la loi de mouvement de Newton afin de prédire la position de chaque atome en fonction du temps. La trajectoire résultante est un film tridimensionnel qui décrit la configuration au niveau atomique du système, à chaque intervalle de temps choisi, pendant toute la durée de la simulation. La trajectoire obtenue peut ensuite être visualisée et analysée en détail.

Au préalable, plusieurs choix s'offrent à nous afin de simuler au mieux nos systèmes en tenant compte de la question biologique à laquelle nous souhaitons répondre. Ces différents choix sont répertoriés dans une récente publication du Dr. Jeffery Klauda [99], en voici un résumé :

**Choix du champ de force :** La première étape consiste à choisir le niveau de précision des simulations dont nous avons besoin. La qualité du champ de force (FF pour *force field*),

c.à.d l'ensemble des paramètres dictant l'interaction des particules entre elles, est essentielle à la réussite d'une simulation de DM. Il en existe une grande variété. Une distinction importante entre les FF est le niveau de résolution considéré. Les simulations de DM les plus précises, dites **tout atome** (AA pour *all atom*), représentent tous les atomes d'une molécule y compris les atomes d'hydrogènes. Cependant, pour augmenter la portée spatio-temporelle des simulations, des FF de résolution inférieure ont été mis au point. Ces modèles vont des modèles **atome unifié** (UA pour *united-atom*) aux systèmes **gros grains** (CG pour *coarse-grained*) (Figure 3.1).



**FIGURE 3.1 – Différents modèles de représentation d'un POPC (16:0-181).** De gauche à droite : modèle tout-atome, modèle atome-unifié, modèle gros-grain. Les têtes polaire sont représentées en noir, les chaînes aliphatiques en jaune et les hydrogènes du modèle tout atome en blanc

Les FF UA regroupent les atomes hydrogènes non polaires et les atomes lourds auxquels ils sont liés en une même particule. Les systèmes CG simplifient encore davantage les représentations tout en conservant les propriétés chimiques. Dans ce type de FF, une particule prend en considération 4 à 5 atomes lourds et les hydrogènes qui y sont liés. Le niveau de précision choisi aura un impact direct sur les temps de calcul nécessaires pour générer la trajectoire. Ce choix dépendra donc également de l'échelle de temps exigée par l'étude. En effet, plus il y a de particules représentées, plus le nombre d'interactions est important. Par conséquent, le temps de calcul sera d'autant plus long. On utilisera un FF AA très précis dans le cas de petits systèmes et sur des temps de simulations plutôt courts. A l'inverse, pour des systèmes de taille conséquente et/ou sur des durées de simulation plus longues on favorisera davantage les simulations de types CG. On peut également recouper les informations obtenues par des simulations réalisées selon des degrés différents de précision différents. Le dernier critère qui entre en compte dans le choix du FF est la ou les familles de macromolécules biologiques (lipide, protéine, acide nucléique) que l'on souhaite simuler (Table3.1).

Nom	Niveau de détail	Protéine	Lipide	ADN/ARN
OPLS AA	AA	+	-	-
CHARMM	AA	+	+	-
AMBER	AA	+	-	+
OPLS UA	UA	+	-	-
Gromos	UA	+	+	-
Berger	UA	-	+	-
Martini	CG	+	+	+
OPEP	CG	+	-	+
Deserno	CG	+	+	-

**TABLE 3.1 – Choix du champ de force.** Les champs de force utilisés pour les protéines, lipides et acides nucléiques.

Dans mon travail de thèse, j'ai utilisé le FF AA CHARMM36 [100] et le FF CG MARTINI2 [101] car ils sont parfaitement adaptés pour simuler des membranes. De plus, une grande diversité de topologies de lipides est disponible [102]. Enfin, ils sont implémentés dans des outils en ligne facilitant la construction des systèmes membranaires.

**Choix de l'outil de construction des systèmes :** Il existe plusieurs plateformes facilitant la construction de systèmes membranaires. Elles se chargent de l'auto-assemblage des molécules entre-elles. Parmi elles, nous pouvons par exemple citer CHARMMM-GUI [103] [103], MemBuilder [104], insane [105] et plus récemment Mermaid [106]. **L'outil le plus populaire, CHARMMM-GUI** propose l'utilisation de deux FF ; CHARMM36 et MARTINI2. Il permet la construction de systèmes plus ou moins complexes allant, de la bicouche lipidique simple ou multi composants, à l'insertion de protéines transmembranaires au sein d'une membrane. Il prend également en considération les aires par lipides et prévient d'un éventuel déséquilibre d'aire entre les deux feuilletts. Dans un premier temps, l'utilisateur détermine la composition en lipides souhaitée pour les deux feuilletts. Il peut s'agir d'un nombre ou d'un rapport avec une taille de bicouche souhaitée. Ensuite des pseudo-atomes sont placés au hasard dans le plan XY de la membrane à des positions définies par les groupes de têtes lipidiques choisies. Une courte simulation est effectuée pour relaxer la position de ces atomes tout en maintenant leur position. Les lipides sont alors construits à la place des pseudo-atomes pour former une bicouche. Celle-ci est ensuite assemblée dans une boîte d'eau. L'ajout de l'eau peut se faire en considérant une hauteur de couche d'eau fixée par l'utilisateur ou un ratio eau/molécule. Les systèmes simulés doivent avoir une charge globale nulle pour le bon fonctionnement des algorithmes de DM ; si nécessaire, pour atteindre cette neutralité, des contre ions peuvent être ajoutés. Ce système initial est loin d'être stable dans la mesure où il peut y avoir des chevauchements ("clash" sté-

rique). Une procédure de minimisation et d'équilibration en six étapes a été mise au point pour relâcher lentement le système en maintenant la position des têtes polaires et la configuration des doubles liaisons (trans/cis). Après cette procédure, la membrane lipidique peut être simulée sans contrainte. En 2015, le groupe de Marrink développe son propre outil *insane*, optimisé pour la construction de membranes en CG. Cette méthode peut être utilisée, en complément du script de transformation d'un système AA en un modèle CG<sup>1</sup>, afin de travailler sur des protéines membranaires. Depuis quelques mois, une nouvelle plateforme **Mermaid** est disponible afin de construire et simuler en ligne de courte trajectoire comprenant une membrane entourant une protéine membranaire. Ce nouvel outil propose également des premières analyses classiques telles que le calcul du RMSD (*root-mean-square deviation*) des protéines. Il n'est pas adapté pour des systèmes membranaires sans protéine.

Durant mon travail de thèse, j'ai choisi l'outil en ligne CHARMM-GUI qui s'adapte aux deux FF les plus utilisés en simulation des membranes et qui propose un large catalogue de lipides. A la fin du processus de construction, il propose plusieurs formats de fichiers de sortie correspondant aux différents logiciels existants pour la production de simulations de DM.

**Choix du logiciel de simulation :** Les algorithmes de simulation MD ont été implémentés dans un certain nombre de logiciels de simulation ; les plus utilisés dans le domaine de la modélisation membranaire sont AMBER [107], CHARMM [108], NAMD [109], OpenMM [110] et GROMACS [111] [112]. GROMACS a été utilisé pour l'ensemble de mon travail. Il a l'avantage d'être en libre accès contrairement à AMBER. De plus, la documentation est riche et les forums d'utilisateurs sont très actifs. D'un point de vue performance, il est rapide et l'exécution via les processeurs graphiques (GPU) est de mieux en mieux optimisée avec des vitesses de simulation de plusieurs ns/jour [113].

### 3.1.2 Une évolution considérable en quelques années

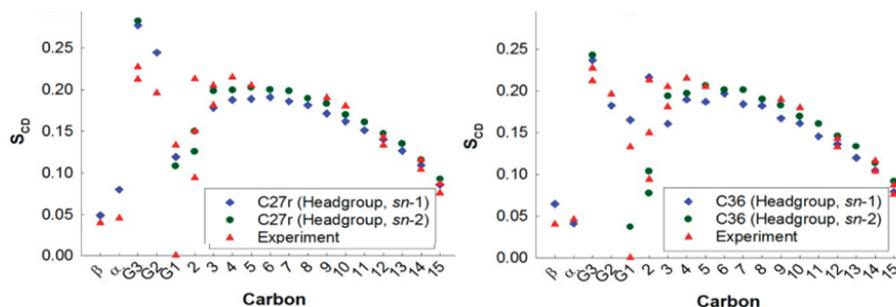
**Pourquoi la DM est-elle de plus en plus utilisée ?** D'une part les applications sont de plus en plus importantes. Si le point qui m'intéresse dans ce travail est l'impact de la composition lipidique sur les propriétés membranaires, il est également possible de comprendre le fonctionnement de protéines clés. D'autre part, les simulations de DM sont devenues beaucoup plus efficaces et accessibles depuis quelques années. Les logiciels permettant d'effectuer des simulations de DM sont également devenus plus faciles à utiliser, avec un meilleur support pour les non-experts ; c'est le cas des outils d'auto-assemblage cités précédemment. A noter qu'il

---

1. [1.http://cgmartini.nl/](http://cgmartini.nl/)

existe depuis peu une base de données appelée Limonada (**L**ipid **M**embrane **O**pen **N**etwork **A**nd **D**atabase)<sup>2</sup> qui recense un ensemble de paramètres pouvant faciliter l'accès aux simulations de DM. Elle regroupe par exemple 7 FF, 210 topologies de lipides ainsi que 22 membranes complexes correspondant à des compositions spécifiques de certains organites ou types cellulaires. Enfin, bien que les modèles physiques qui sous-tendent les simulations de DM sont des approximations, ils sont devenus de plus en plus précis et de plus en plus performants. Le niveau de précision a pu être évalué en confrontant des résultats expérimentaux à ceux obtenus en simulation (Figure 3.2). Il en découle une liste non exhaustive de méthodes expérimentales permettant d'évaluer la concordance des propriétés physiques des membranes. Certaines techniques de mesures physiques locales telles que la RMN ont permis de vérifier les propriétés physiques d'ordre des membranes obtenues en simulation [114]. L'aire par lipide, l'épaisseur de la bicouche et les profils de densité électronique des membranes peuvent être déterminés par diffraction aux rayons X [60]. Des expériences de fluorescence de type FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) ont permis de vérifier la bonne diffusion des lipides au sein d'une bicouche [115]. Enfin, les mesures de tension de membrane peuvent être vérifiées expérimentalement par aspiration des membranes par des micropipettes [67].

lipid	area [ $\text{\AA}^2/\text{lipid}$ ]	exptl area [ $\text{\AA}^2/\text{lipid}$ ]
DPPC	$62.9 \pm 0.3$	$63.0 \pm 1.0^{87}$
DMPC	$60.8 \pm 0.2$	$60.6 \pm 0.5^{16}$
DLPC	$64.4 \pm 0.3$	$63.2 \pm 0.5^{93}$
DOPC	$60.1 \pm 0.1$	$59.3 \pm 0.7^{105}$
POPC	$64.7 \pm 0.2$	$68.3 \pm 1.5^{94}$
POPE	$59.2 \pm 0.3$	$59.75-60.75^c$



**FIGURE 3.2 – Validation expérimentale des simulations.** Comparaison de l'aire par lipide et des paramètres d'ordre obtenus par le FF charmm36 et ceux obtenus expérimentalement, adapté de Klauda et al. 2010 [100]

2. <https://www.limonadamd.eu/>

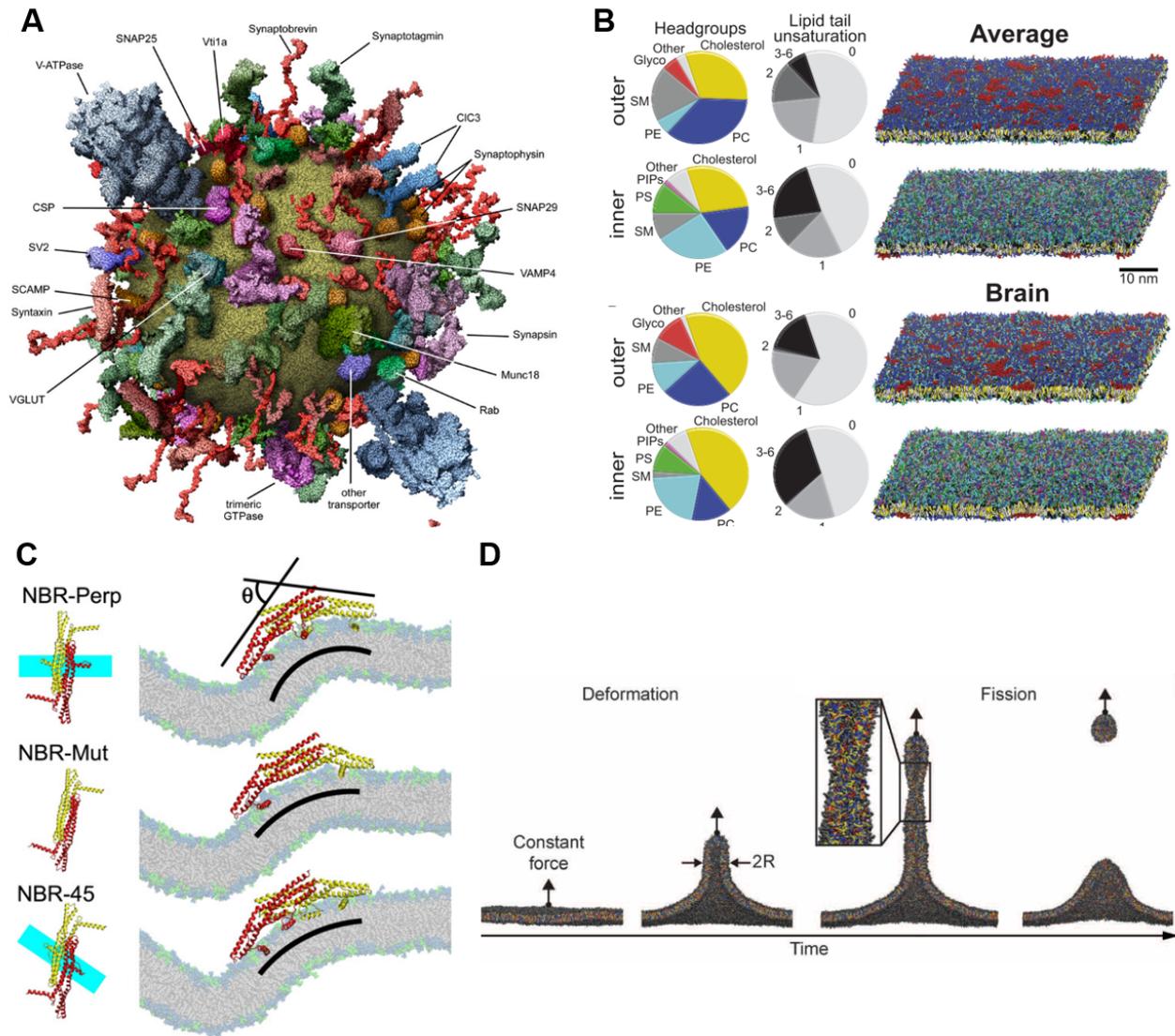
Revenons en quelques mots sur l'évolution des simulations de DM des membranes depuis ses débuts. Elle a été résumée en 2019 par le Dr. Marc Baaden [116].

**Entre 1980 et 1995**, les premières simulations de DM de systèmes membranaires ont fait leur apparition. Le premier système est une monocouche [117]. En 1993, la première simulation d'une bicouche de PC, réalisée par Richard Pastor et Rick Venable, dure 100 ps [118]. Ce calcul était coûteux à l'époque, alors que selon les normes actuelles, l'équilibrage initial de la bicouche nécessite au moins des dizaines de nanoseconde. Néanmoins, cette étude initiale a fourni une visualisation atomique simple et directe des systèmes membranaires. Ce premier pas a ouvert la voie à de futures simulations.

**De 1995 à 1999**, l'amélioration des performances algorithmiques ont permis de simuler l'insertion de peptides au sein d'une bicouche lipidique avec des simulations allant jusqu'à 600 ns [119]. Néanmoins, les calculs restent extrêmement coûteux en termes de ressources informatiques. Dans le but d'améliorer les performances, des méthodes spécifiques ainsi que des modèles simplifiés ont été développés. C'est le début des modèles CG **dans les année 2000** [120]. L'échelle de temps de 1 à 100 ns devient accessible, permettant la visualisation d'hémifusions entre deux vésicules [121]. Les champs d'application se développent conduisant à l'étude de phénomènes plus complexes tels que l'électroporation [122].

**Depuis 10 ans maintenant**, les temps de simulation se situent entre 100 ns et 10  $\mu$ s. Jusqu'à tout récemment, la plupart des travaux à fort impact, effectués à l'aide de simulations DM, nécessitaient un supercalculateur. Le matériel informatique récemment introduit, en particulier les cartes graphiques, permet d'exécuter localement des simulations puissantes à un coût modeste [107]. En découle une complexité des systèmes, toujours plus importante, pour atteindre d'impressionnants assemblages moléculaires multiples. C'est le cas de la réalisation d'un modèle de vésicule synaptique incluant sa diversité lipidique et protéique réalisée en 2006 [42] (Figure 3.3.A). Des systèmes AA modélisant des virus dans leur intégralité font leur apparition depuis quelques années et promettent également de belles avancées [123]. Par ailleurs, l'essor de la lipidomique a entraîné un regain d'intérêt pour les membranes biologiques. Certains ont modélisé des systèmes se rapprochant le plus possible de la composition lipidique réelle [124, 125] (Figure 3.3.B) d'autres avec des systèmes plus simples ont apporté une vision plus fine du rôle des compositions lipidiques. Le comportement des lipides au sein d'une membrane est de plus en plus étudié afin de comprendre leur impact dans l'insertion de protéines

[38] ou de nanoparticules au sein de la membrane [126]. Un autre axe essentiel dans l'étude des membranes concerne leur capacité à se déformer afin d'engendrer tube et bourgeonnement, état intermédiaire essentiel lors du trafic cellulaire. Cette aptitude a été étudiée à plusieurs reprises en DM à l'aide de domaines protéiques induisant une courbure membranaire [127, 128] (Figure 3.3.C) ou de contraintes de force [91] (Figure 3.3.D).



**FIGURE 3.3 – Exemples de systèmes complexes réalisés en DM.** A : Modèle moléculaire d'une vésicule synaptique, extrait de Takamori et al. 2006 [42] B : Modélisation réaliste en CG de la membrane plasmique moyenne et de la membrane plasmique neuronale, extraite de Ingolfsson et al. 2017 [125] C : Simulation AA de la déformation membranaire induite par la fixation de domaines BAR, extrait de Cui et al. 2009 [127] D : Simulation en CG d'une bicouche de PC soumise à une force de traction : un tube se forme et finit par subir une fission, extrait de Pinot et al. 2014 [91]

Toutes ces possibilités vont continuer à croître à mesure que les simulations deviendront encore plus rapides, moins coûteuses, plus accessibles et plus précises. Concentrons-nous maintenant sur les simulations de membranes contenant des phospholipides polyinsaturés.

## 3.2 Simulation de DM et phospholipides polyinsaturés

### 3.2.1 Généralité sur les simulations de membranes par dynamique moléculaire

La modélisation de bicouche lipidique se fait la plupart du temps en conditions NPT (quantité, pression et température constantes). **La taille de la membrane** simulée peut varier selon les analyses que l'on souhaite faire. Par exemple, pour calculer le *bending modulus* par des simulations de DM, il existe différentes méthodes qui prennent en considération la capacité ondulatoire des membranes. Pour ce faire, les membranes simulées doivent être suffisamment grandes. La méthode Deserno a été appliquée sur des membranes comprenant de 5 000 à 20 000 lipides [129]. Une autre méthode utilisant également l'inclinaison des lipides pour déterminer le *bending modulus* réduit le nombre de lipides à  $\approx 700$  lipides [130]. A l'inverse, pour calculer la compressibilité des membranes, de petites membranes sont nécessaires pour ne pas prendre en compte leurs ondulations [131]. Il en est de même pour **les temps de simulation**. Par exemple, pour avoir des statistiques suffisantes, des simulations d'au moins 300 ns sont conseillées afin de quantifier la présence de DP [132]. Les membranes sont simulées entourées de molécules d'eau et une certaine **concentration d'ions** peut être ajoutée. Une étude a montré que la présence de cations modifie l'orientation des têtes polaires et diminue l'aire par lipide en se liant à leurs oxygènes [133].

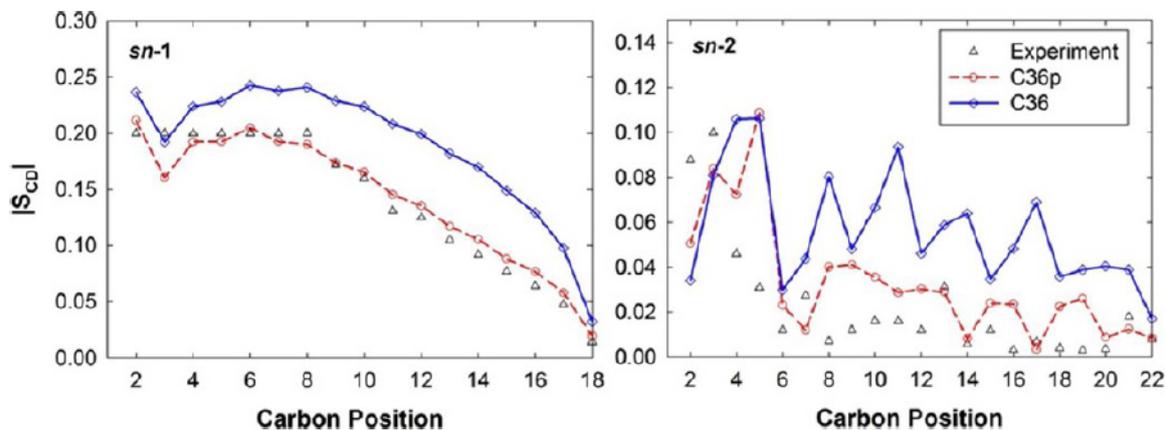
### 3.2.2 Mise au point/validation des DM spécifiques aux polyinsaturés

Les paramètres, tels que la longueur des liaisons nécessaires à la modélisation de biomolécules par DM, sont obtenus par des calculs de mécanique quantique sur de petit composant mimant les liaisons d'intérêt. Pour les lipides polyinsaturés, ils sont obtenus à partir du calcul des énergies potentielles des conformations des composés 1,4-pentadiène et 2,7-heptadiène.

Les premières simulations de membrane AA, au le début des années 2000, utilisent le FF CHARMM27 (C27) [134]. Employé en parallèle à la RMN et la diffraction au rayon X, un certain nombre de paramètres ont pu être vérifiés comme les paramètres d'ordre. La fluidité des lipides au sein d'une bicouche est due à divers mouvements à différentes échelle de temps : (i) l'isomérisation (ps) (ii) la rotation autour de l'axe des lipides (ns) (iii) la diffusion latérale ( $\mu$ s) (iv) les mouvements de *flip-flop* à travers la membrane (ms). La plupart de ces mouvements influencent les paramètres d'ordre des chaînes aliphatiques. Comme expliqué précédemment,

en RMN, les paramètres d'ordre sont obtenus par mesure de l'orientation et de la mobilité de la liaison C-D (D pour le deutérium qui remplace l'hydrogène en RMN). Pour cela, l'angle entre cette liaison et l'axe de référence (normal à la membrane) est calculé et moyenné pour toutes les liaisons au cours du temps. En simulation de DM utilisant des FF simplifiés comme l'UA, l'absence d'hydrogène nécessite la reconstruction du vecteur C-D. Pour ce faire, le vecteur  $C(i-1) - C(i+1)$  est considéré comme l'axe des  $z$ . L'axe  $x$  et l'axe  $y$  sont définis comme étant perpendiculaire à l'axe  $z$  et entre eux ; l'axe  $y$  étant situé dans le plan  $C_{i-1} - C_i - C_{i+1}$ . En utilisant la formule suivante,  $S = (2/3)S_{xx} + (1/3)S_{yy}$  il peut être comparé directement aux données RMN [114]. En revanche, dans le cas de FF AA, le paramètre d'ordre  $S_{CD}$  est calculé selon le même principe qu'en RMN en considérant les liaisons C-H.

La correspondance des paramètres entre ceux obtenus par RMN et par DM permet de valider les simulations de DM pour les phospholipides polyinsaturés avec le FF AA C27 (Figure 2.3 Chap.2). La contrainte majeure de ce FF provient du fait que pour prévenir la condensation de la membrane, il est nécessaire d'imposer une tension superficielle ou une aire de surface par lipide. Ce problème a été résolu dans la version plus récente du FF : CHARMM36 (C36) qui représente avec précision la structure et la dynamique de divers lipides à chaînes lipidiques entièrement saturées et monoinsaturées [100]. Si les paramètres pour les chaînes aliphatiques saturées sont transférables de C27 à C36, il a fallu ajuster les paramètres des chaînes insaturées. Des méthodes *ab initio* de mécanique quantique ont été utilisées pour guider l'adaptation de deux potentiels dièdres pour les chaînes polyinsaturées [135]. L'amélioration de ce champ de force, appelée C36p, est évalué par comparaison aux expériences de RMN et de diffraction des rayons X pour des bicouches contenant du 18:0-22:6 (Figure 3.4) et 22:6-22:6.



**FIGURE 3.4 – Amélioration du FF CHARMM36 pour les phospholipides polyinsaturés**, extrait de Klauda et al. 2012 [135] Comparaison des paramètres d'ordre obtenus par simulations de DM avec les paramètres du FF c36, le FF amélioré c36p et les résultats obtenus expérimentalement par RMN pour les chaînes *sn1* 18:0 et *sn2* 22:6.

### 3.2.3 Apport de la dynamique moléculaire dans l'étude des phospholipides polyinsaturés

#### Conformation des chaînes polyinsaturées

Les études de la dynamique des chaînes aliphatiques polyinsaturées ont très souvent été menées sur le DHA (22:6 n-3). Les calculs de mécanique quantique évaluaient la grande flexibilité du DHA en passant par de petits composés chimiquement analogues. Les simulations de DM ont apporté une description visuelle et quantitative des différents conformères possibles. L'analyse détaillée de ces conformations par simulation a facilité l'interprétation des données expérimentales [58]. La répétition du motif  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , tout au long des chaînes polyinsaturées, est analogue aux structures des polypeptides. Cette similitude a permis une analyse de type Ramachandran. En effet, l'angle dièdre, formé entre chaque plan des doubles liaisons, peut décrire la conformation locale. Grâce à un regroupement simplifié des angles dièdres, 1024 conformères ont été calculés et décrits par simulation de DM pour le DHA [59] (Figure 3.5).

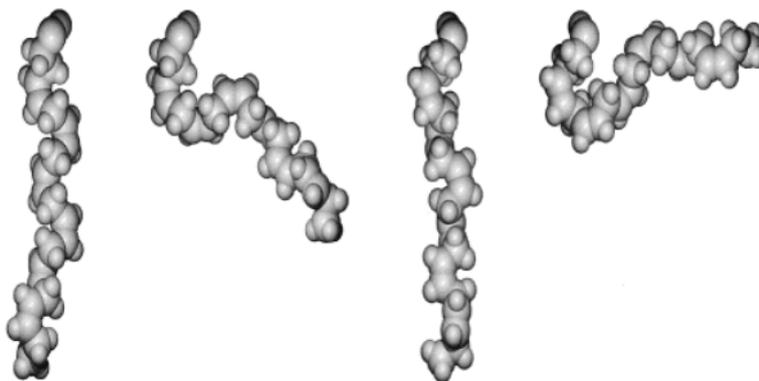
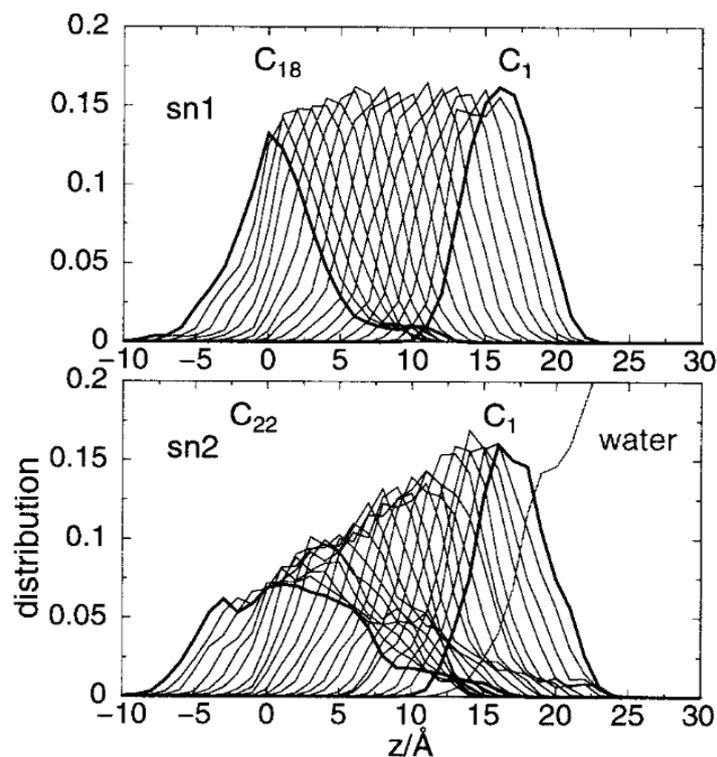


FIGURE 3.5 – Quelques conformations représentatives du DHA, obtenues par simulation de DM, extrait de Feller et al. 2002 [58]

Les différentes conformations obtenues et visualisées, l'étape suivante a consisté à déterminer l'organisation de ces chaînes particulièrement dynamiques au sein de la membrane. Les profils de densité obtenus par diffraction au rayon X ont montré une densité des chaînes aliphatiques polyinsaturées plus importante au niveau de l'interface membrane/eau que les chaînes monoinsaturées et saturées. Une question est restée en suspens : **quelle contribution chaque atome de carbone apporte-il à cet agencement particulier des chaînes ?**

### Distribution des chaînes polyinsaturées au sein de la bicouche

Les simulations de DM ont permis de calculer le profil de densité, le long de la normale à la bicouche, pour chaque atome de carbone des chaînes aliphatiques, en fonction de leur position dans la chaîne [136]. La Figure 3.6 montre la répartition des chaînes au sein d'un feuillet. Les deux chaînes, *sn1* saturée et *sn2* polyinsaturée, montrent la présence d'atomes de carbone à une distance plus profonde que le centre de la bicouche ( $z < 0$ ). Ceci traduit une interdigitation des chaînes au sein de la bicouche. Malgré ce point commun, la distribution des carbones d'une chaîne saturée et polyinsaturée diffère complètement. Le profil de densité des carbones le long des chaînes aliphatiques polyinsaturées, notamment ceux après la première double liaison, montre des distributions beaucoup plus larges que dans le cas des chaînes saturées. Ces résultats corroborent avec ceux montrant le désordre des chaînes polyinsaturées et laissent apparaître la capacité des carbones, en fin de chaîne, à atteindre l'interface lipide/eau.

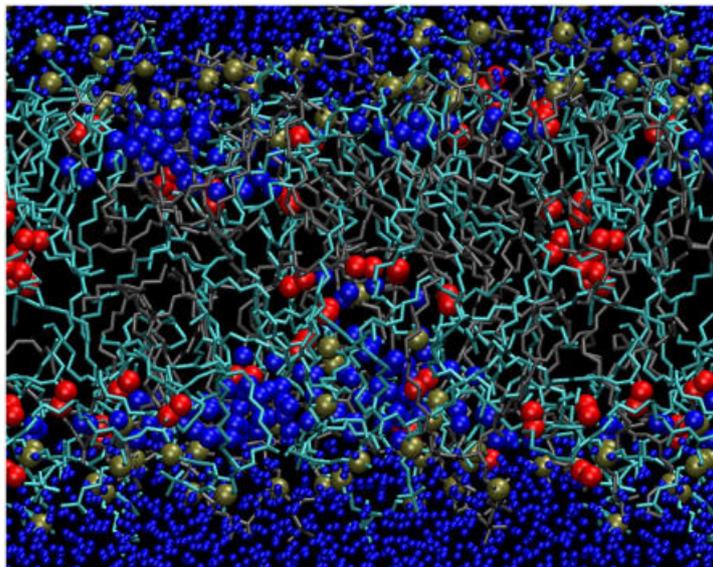


**FIGURE 3.6** – Profil de densité des atomes de carbone le long de la normale à la bicouche pour les chaînes *sn1* saturées (en haut) et *sn2* polyinsaturées (en bas) et les molécules d'eau (en bas). Les courbes en gras représentent les atomes situés au début et à la fin des chaînes et le centre de la bicouche est situé à  $z = 0$  Å, extrait de Saiz et al. 2001 [136]

Les lipides polyinsaturés pourraient voir leur organisation et leur dynamique perturbées par des réactions de peroxydation.

### Peroxydation des phospholipides polyinsaturés et mécanisme de protection

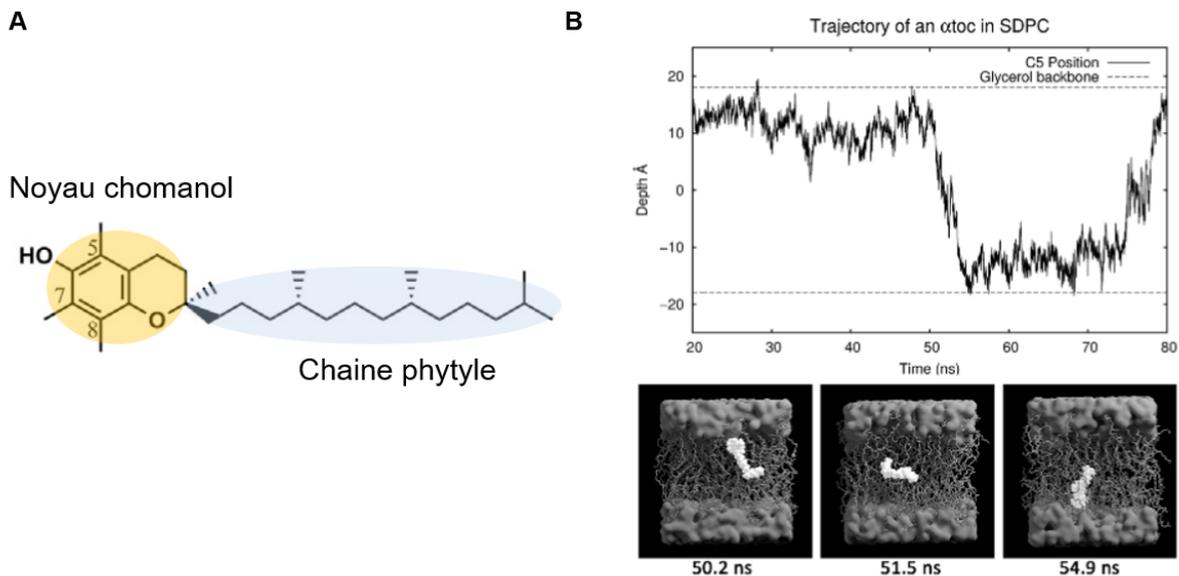
La peroxydation lipidique joue un rôle délétère sur l'intégrité des membranes cellulaires. L'effet de l'oxydation des lipides sur les propriétés des bicouches lipidiques du 16:0-18:2 a été étudié par des simulations de DM. Les propriétés des bicouches lipidiques ont été caractérisées en fonction de la concentration des lipides oxydés, avec des concentrations allant de 2,8 % à 50 % [137]. L'introduction de groupes fonctionnels oxydés dans les chaînes aliphatiques entraîne un important changement de conformation des lipides : les chaînes oxydées se courbent vers la phase aqueuse et les atomes d'oxygène forment des liaisons hydrogène avec l'eau et les groupes lipidiques polaires. Ce changement de conformation entraîne une augmentation de l'aire par lipide et du désordre. La conséquence de ces modifications est une augmentation du volume libre au sein des membranes qui amplifie considérablement leur perméabilité (Figure 3.7).



**FIGURE 3.7 – Perméabilité augmentée en présence de lipides peroxydés**, extrait de Wong-ekkabut et al. 2007 [137] Image montrant l'insertion d'eau dans une bicouche de 16:0-18:2 contenant 50% de lipides peroxydés. Les lipides sont représentés sous forme de bâtonnets en gris, les peroxydés en cyan ; tous les atomes de phosphate des lipides sont représentés sous forme de sphères beige, les atomes d'oxygène dans le groupe hydroperoxyde sous forme de sphères rouges et les atomes d'oxygène dans l'eau sous forme de sphères bleues.

Pour protéger les lipides de la peroxydation, il existe l' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ toc) ; un lipide antioxydant (Figure 3.8.A). Il est composé d'une tête polaire chromanol méthylée sur les trois positions disponibles sur un cycle benzénique et auquel une chaîne phytyle saturée de 16 atomes de carbone est fixée. Le groupe hydroxyle, présent sur le cycle benzénique, est responsable de l'activité antioxydante. Le groupe hydrophile peut interagir avec l'interface tandis que la chaîne s'ancre dans la membrane. Cependant, le mécanisme par lequel il exerce son pouvoir antioxydant, était peu connu. L'utilisation de la DM sur des membranes contenant des phospholipides

18:0-22:6, ou des phospholipides monoinsaturés comme contrôle et supplémentées avec 20%  $\alpha$ toc, a permis d'apporter des éléments de réponse [138]. La probabilité que les chaînes s'élèvent jusqu'à l'interface est plus importante pour les chaînes DHA en position *sn2*, ce qui leur permet d'interagir avec le groupe chromanol de l' $\alpha$ toc. Le profil de densité a révélé que les  $\alpha$ toc sont plus profondément enfouis dans une membrane. Les interactions entre les chaînes DHA et l' $\alpha$ toc sont facilitées par le désordre rendant les interactions de VDW énergétiquement plus favorables. Les simulations de DM ont révélé la capacité de l' $\alpha$ toc à traverser les membranes sur une échelle de temps inférieure à la microseconde (Figure 3.8.B). Ces résultats ont mis en évidence que le groupe de chromanol est à "l'affût" de chaînes polyinsaturées qui remontent à la surface de la bicouche et peuvent également s'enfoncer à l'intérieur de la bicouche. L' $\alpha$ toc peut donc non seulement intercepter les radicaux peroxydés à la surface d'une membrane mais aussi "patrouiller" à l'intérieur de celle-ci.



**FIGURE 3.8 – Protection des lipides de la peroxydation par l' $\alpha$ toc**, A : Structure de l' $\alpha$ toc B : extrait de Leng et al. 2015 [138] Trajectoire au sein de la bicouche d'une molécule représentative d' $\alpha$ -toc. Les lignes en pointillé représentent le squelette glycérol délimitant la membrane.

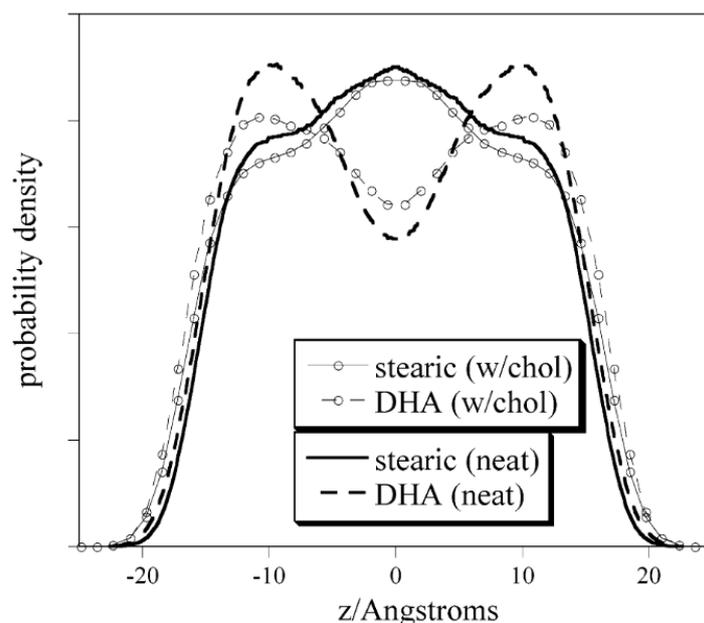
L'oxydation des lipides augmentant le désordre des chaînes aliphatiques polyinsaturées, la perméabilité accrue qu'elle engendre dégrade considérablement l'intégrité de la membrane. Un autre facteur qui peut influencer leur dynamique est la présence de cholestérol.

### Interaction phospholipides polyinsaturés et cholestérol

Il a été montré par lipidomique que le cholestérol est présent au sein de membranes très spécifiques, riches en phospholipides polyinsaturés. Les ratios cholestérol/phospholipides peuvent

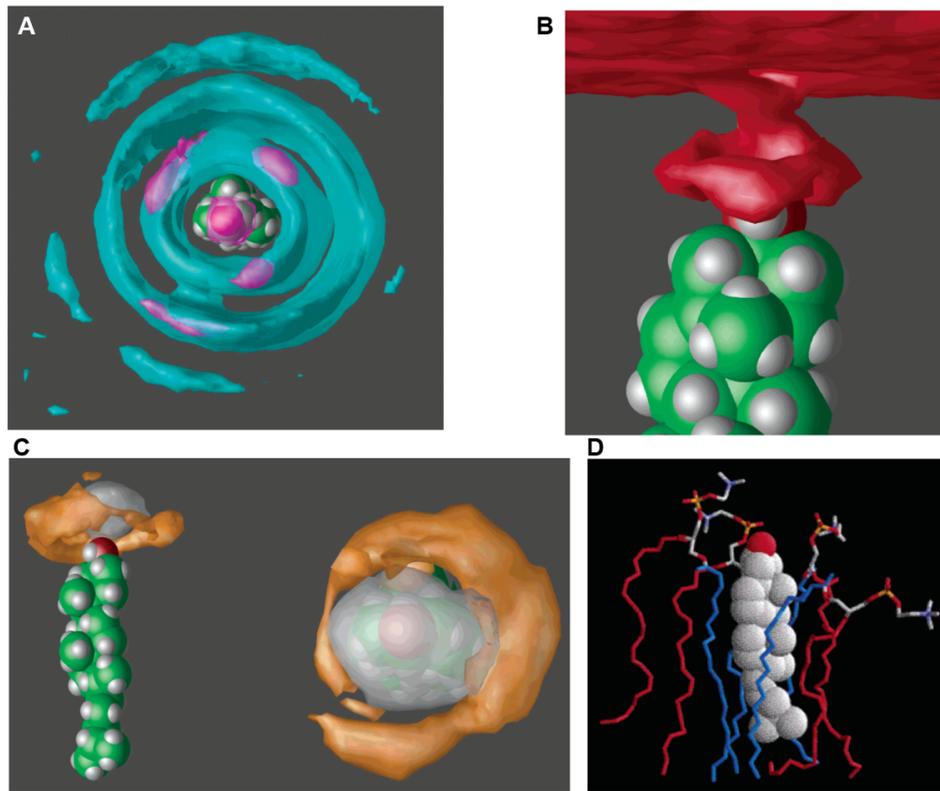
varier en moyenne de 1:3 dans les membranes synaptiques [42] et dans les disques basaux des bâtonnet rétiens, à un ratio 1:20 dans l'extrémité apicale de ces bâtonnets [139]. Expérimentalement, il a été montré que le cholestérol avait une faible affinité pour les phospholipides polyinsaturés. **Comment le cholestérol, en quantité importante dans les membranes, interagit-il avec les phospholipides malgré une faible affinité pour les chaînes aliphatiques polyinsaturées ?**

En 2004, Pitman et al. étudie l'agencement du DHA dans des membranes simulées contenant un ratio cholestérol/18:0-22:6-PC égal à 1:3 [140]. Le profil de densité et les paramètres d'ordre montrent peu d'effet sur la chaîne *sn1* saturée. En revanche, la chaîne *sn2* (22:6) se réorganise au sein de la bicouche laissant un espace suffisamment vacant au niveau de l'interface pour que le groupement -OH du cholestérol puisse l'occuper (Figure 3.9).



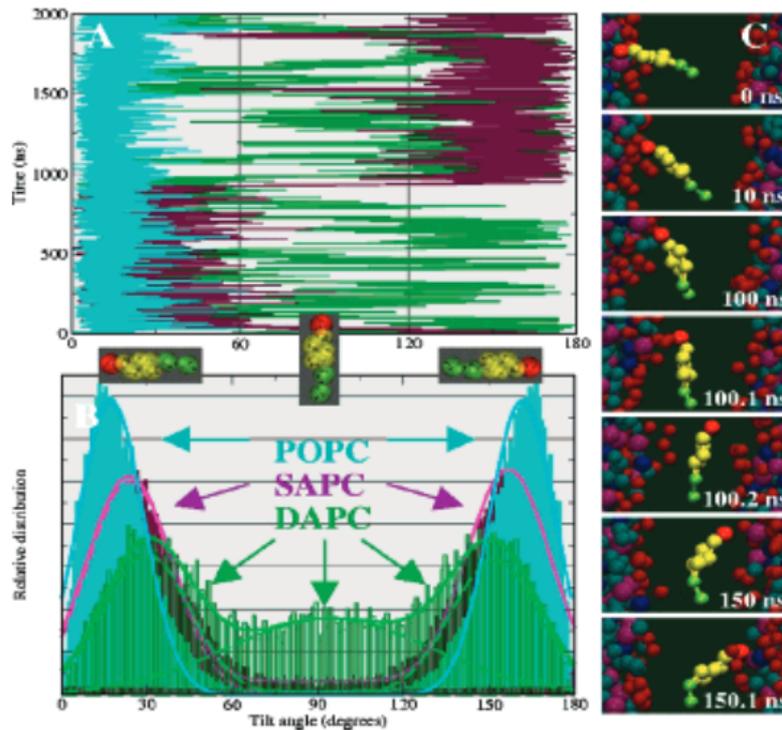
**FIGURE 3.9 – Impact du cholestérol sur la distribution des chaînes**, extrait de Pitman et al. 2004 [140] Distribution de la chaîne *sn1* (lignes pleines) et de la chaîne *sn2* polyinsaturée (lignes pointillées) en fonction de la position le long de la coordonnée  $z$  (normale à la bicouche). Les lignes avec des cercles représentent les résultats obtenus pour le système phospholipides/-cholestérol.

En analysant l'environnement direct des cholestérols au sein de la membrane, ils ont pu représenter sous forme de cartes de densité de probabilité, les interactions entre le cholestérol et les lipides ou le solvant. Un cholestérol est entouré par plusieurs couches de phospholipides (Figure 3.10.A) mais comment s'agence-t-il avec eux ? Le groupement hydroxyle interagit à 50% avec l'eau et à 50% avec les tête polaires des phospholipides ; groupement phosphate ou carbonyle (Figure 3.10.B-C). En ce qui concerne les cycles carbonés, ils interagissent préférentiellement avec la chaîne *sn1* saturée (Figure 3.10.D).



**FIGURE 3.10 – Phospholipides polyinsaturés et interaction avec le cholestérol** A : cartes de densité de probabilité des interactions entre le cholestérol et les chaînes aliphatiques (cyan) et les autres molécules de cholestérol (magenta), montrant plusieurs couches de lipides entourant le stérol. B : cartes de densité de probabilité de l'interaction entre le cholestérol et l'eau (rouge) L'isosurface de densité de probabilité pour l'eau (rouge), montrant les interactions fréquentes entre les molécules d'eau et le groupe hydroxyde du cholestérol. C : cartes de densité de probabilité d'interaction entre le cholestérol et les atomes de phosphate (gris) et de choline (or), montrant la liaison hydrogène entre les fonctions hydroxyles du cholestérol et les oxygènes des phosphates et le recouvrement du stérol par la choline D : Image d'une simulation de MD montrant la solvation préférentielle du cholestérol par les acides gras saturés (bleu) comparativement aux chaînes polyinsaturées (rouge), adapté de [140]

Souvent l'analyse de l'impact de phospholipides polyinsaturés se réduit à l'analyse du DHA. Une question persiste alors : **ces observations dépendent-elles donc du nombre d'insaturation ?** En 2007, Marrink et al. utilisent des membranes en gros grain contenant 10% de cholestérol [101]. Ils étudient la position du cholestérol au sein de membranes contenant du POPC (16:0-18:1), du SAPC (18:0-20:4n-6) ou du DAPC (di20:4n-6). La vitesse de *flip-flop* du cholestérol dans les membranes DAPC atteint les  $10^7 s^{-1}$ , le remplacement de la chaîne *sn1* polyinsaturées en chaîne saturée (cas du SAPC) augmente le temps de flip flop à 500 ns. Enfin, dans le cas des phospholipides monoinsaturés, l'échelle de temps du *flip flop* est de l'ordre de la  $\mu s$ . La présence de chaînes polyinsaturées favoriserait les changements d'orientation du cholestérol dans les membranes et le cholestérol se positionnerait davantage au centre de la bicouche (Figure 3.11).

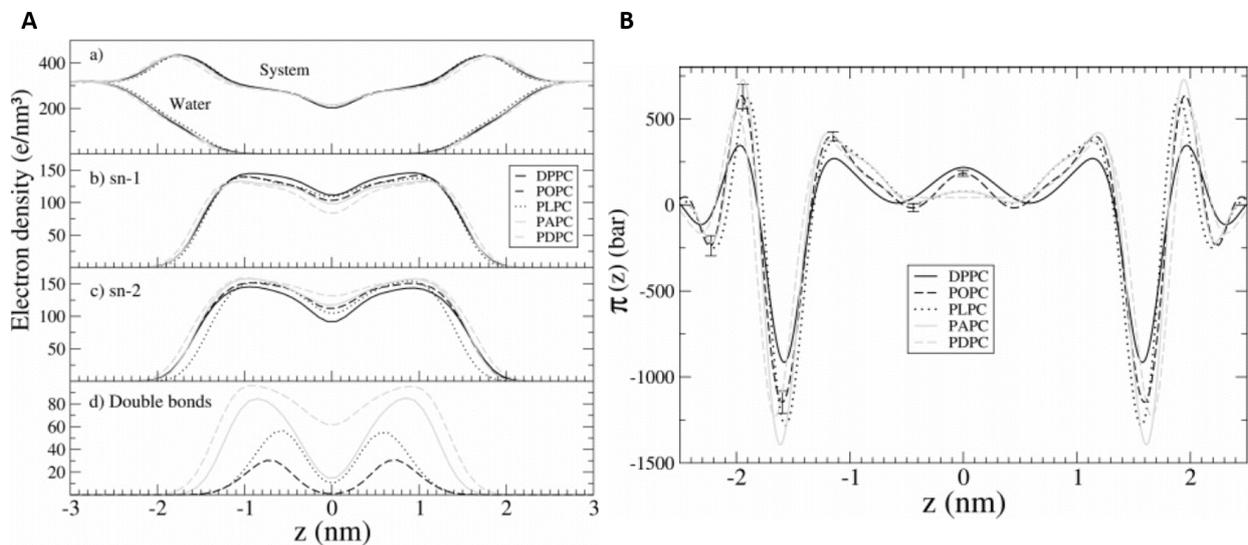


**FIGURE 3.11 – Caractérisation de l'orientation du cholestérol selon la composition lipidique**, extrait de Marrink et al. 2008 [101] Les membranes modèles utilisées sont composées de POPC (bleu), de SAPC (violet) ou de DAPC (vert). Les valeurs de 0 et 180° indiquent l'alignement du cholestérol avec la normale de la membrane dans l'une ou l'autre des monocouches ; 90° indique une position perpendiculaire. (A) Orientation de chaque cholestérol en fonction du temps. (B) Répartition moyenne dans le temps (C) Séquence temporelle d'un basculement de cholestérol dans une bicouche de DAPC.

### Tous les phospholipides polyinsaturés sont-ils équivalents ?

Peu d'études ont comparé les différents phospholipides polyinsaturés et leurs conséquences sur les propriétés membranaires. En 2006, Ollila et al. ont comparé des membranes simulées par DM en AA, composée de phospholipides ayant une chaîne *sn1* saturée et une chaîne *sn2* ayant entre 0 et 6 insaturations. Ils prennent alors en considération les chaînes aliphatiques 18:0, 18:1, 18:2, 20:4, 22:6 [141]. L'épaisseur de la membrane est peu impactée par le niveau d'insaturation ; en revanche, le désordre augmente avec celui-ci. La conséquence de ce désordre est une réorganisation des chaînes au sein de la bicouche. Les chaînes aliphatiques polyinsaturées occupent moins le centre de la bicouche au profit de l'interface eau/membrane. Cet effet est compensé par un enfouissement des chaînes *sn1* (Figure 3.12). La pression exercée au sein des membranes varie tout au long de la membrane. En raison de la tension superficielle, les têtes hydrophiles et les chaînes hydrophobes des phospholipides tendent à minimiser leurs surfaces de contact. Cela génère une forte pression négative qui agit latéralement dans les régions situées à l'interface des deux feuilletts de la bicouche avec l'eau. Plus il y a d'insaturations plus cette

pression diminue. Elle est équilibrée par une augmentation de la pression latérale positive des têtes hydrophiles et des chaînes hydrophobes des phospholipides au niveau de l'interface. Ces différences dans le profil latéral de pression, apportées par la polyinsaturation des chaînes, pourraient impacter le fonctionnement des protéines membranaires.

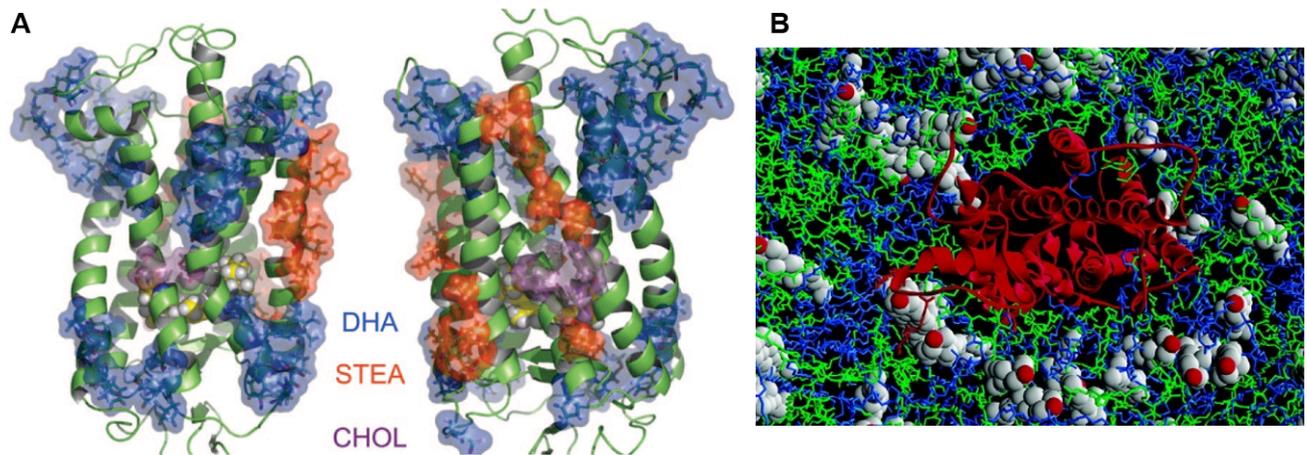


**FIGURE 3.12 –** Différence au sein de la famille de polyinsaturés, extrait de Ollila et al. 2006 [141] Profils de densité à travers la bicouche pour (A) l'ensemble du système avec le profil pour l'eau, (B) les chaînes *sn1*, (C) les chaînes *sn2*, et (D) les doubles liaisons.

### 3.2.4 Simulation de DM et interaction entre les phospholipides polyinsaturés et les protéines membranaires

**Récepteur couplé aux protéines G et phospholipides polyinsaturés :** La rhodopsine est largement étudiée comme exemple de récepteur membranaire couplé aux protéines G au sein de membrane comprenant un fort taux de phospholipides polyinsaturés et de cholestérol. Expérimentalement, l'interaction direct de la rhodopsine avec des lipides avait été suggérée . En 2004 et 2006 deux études de DM ont permis de confirmer les interactions lipides/rhodopsine [142, 143]. Toutes deux utilisent des systèmes comportant une membrane composée de 18:0-22:6 PC - PE et de cholestérol (2 :2 :1) en présence de rhodopsine. Ces simulations ont montré que la rhodopsine était préférentiellement entourée par les chaînes polyinsaturées (DHA) (Figure 3.13.A). Le DHA pénètre dans la structure entre les hélices ce qui affaiblit les liaisons inter hélices. La fixation du DHA, dans ces zones précises, suggère un rôle direct de celui-ci dans la modulation de la stabilité, de la cinétique et de la fonction de la rhodopsine. En revanche,

la fixation de la chaîne *sn1* saturée et du cholestérol ne semble pas spécifique. Le cholestérol quant-à lui suit l'asymétrie créée par la protéine le long de la normale à la membrane. Il est suggéré qu'il stabiliserait la conformation native de la rhodopsine, en optimisant l'agencement des lipides, sans pour autant interagir directement avec la protéine (Figure 3.13).



**FIGURE 3.13 – Association DHA, cholestérol et rhodopsine.** A : Groupes de résidus qui interagissent de préférence avec la DHA (bleu) , la chaîne saturée (STEA orange) ou le cholestérol (violet). projetés sur la structure cristalline (PDB ID = 1U19). Les résidus en vert de la rhodopsine n'ont pas de préférence significative , extrait de Grassfield et al. 2006 [142]. B : La rhodopsine est représentée sous forme de cartoon rouge, les chaînes DHA sont représentées en batonnets verts, les chaînes saturées en bleu et les cholestérols sont représentés en sphères, extrait de Pitman et al. 2005 [143]

**Hélice amphipatique des protéines périmembranaires et phospholipides polyinsaturés :** L'un des mécanismes d'insertion d'une protéine dans une membrane est la concordance entre l'agencement des lipides et la chimie des HA. Dans le chapitre précédent, je vous ai présenté deux protéines, GMAP et l' $\alpha$ -synucléine, ayant toutes deux des HA s'insérant dans la membrane. La chimie spécifique de chacune d'entre elles répond de façon opposée à la présence de phospholipides polyinsaturés mais toutes deux sont sensibles à la courbure membranaire. La cartographie, vue du-dessus, de membranes simulées avec ou sans phospholipides polyinsaturés a permis d'expliquer leur sensibilité ou non aux membranes riches en phospholipides polyinsaturés. En effet, l'agencement des lipides au sein de la membrane dépend de l'insaturation des chaînes aliphatiques. En présence de phospholipides polyinsaturés, l'analyse des DP dans des membranes planes, tubules ou vésicules avec différents rayons de courbure montre l'augmentation des défauts superficiels avec celle de la courbure. Ces DPs superficiels vont favoriser l'insertion de petits résidus hydrophobes comme ceux présents dans l'HA de  $\alpha$ -synucléine. A l'inverse les DP profonds sont davantage formés par des membranes contenant des phospho-

lipides monoinsaturés. Ces DP profonds augmentent également avec la courbure. Ces cavités permettent l'insertion de gros résidus hydrophobes présents dans les motifs ALPS. La quantification des DP de ces deux types de membranes sont présentés plus loin dans ce chapitre (cf Figure 3.14.D).

### 3.2.5 Simulation de DM et déformation membranaire

Les simulations de DM en CG permettent de simuler d'importants systèmes. Elles ont donc, à plusieurs reprises, été utilisées pour étudier l'organisation des phospholipides en cas de courbure ou déformation membranaire. Ces dernières entraînent un changement de répartition des volumes au sein de la bicouche. Ces variations contraignent la forme géométrique des lipides. Pour qu'il y est une adéquation entre le volume disponible et la géométrie des lipides il existe deux possibilités : soit les lipides se regroupent au sein des membranes en fonction de leur géométrie intrinsèque, on parle de *sorting* des lipides, soit les lipides ont la capacité d'adapter leur conformation à la courbure. La simulation de vésicules ayant une courbure très élevée (diamètre  $< 20$  nm) montre l'impact de la composition lipidique sur cette organisation [144]. La courbure induit un amincissement de la membrane. Dans la monocouche interne, les têtes polaires sont très serrées et déshydratées, et les chaînes aliphatiques sont relativement désordonnées. L'effet inverse est observé pour les têtes polaires du feuillet externe. Dans les membranes composées de PC et PE saturés et de PC polyinsaturés, un remodelage des feuillets est observé. Le feuillet interne est enrichi en phospholipides saturés PE (60% des PE dans le feuillet interne). Ce fait est corrélé à la géométrie conique des PE qui s'adapte plus facilement aux courbures négatives. En revanche, dans le cas des polyinsaturés, un équilibre est atteint très rapidement (51 % dans le feuillet interne et 49 % dans le feuillet externe). Une adaptation de la géométrie des phospholipides polyinsaturés pourrait les stabiliser dans un feuillet avec une courbure positive ou une courbure négative.

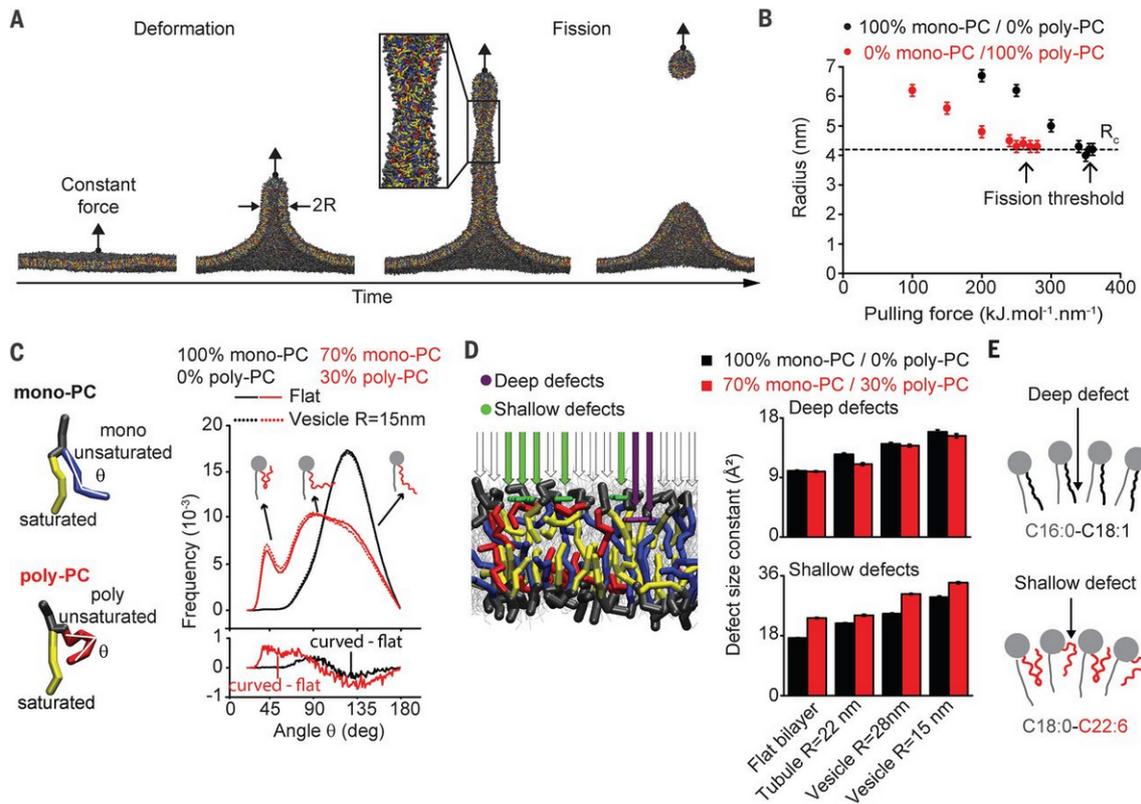
En 2012, la mise au point d'un protocole de simulation de DM a permis de reproduire la formation d'un nanotube à partir d'une membrane plane [145]. Ces systèmes ont été utilisés ultérieurement par l'équipe afin de comprendre l'implication et les avantages des phospholipides polyinsaturés dans la déformation membranaire. En effet, une des caractéristiques des chaînes aliphatiques polyinsaturées est d'adopter des conformations en "épingle à cheveux". La façon dont cette caractéristique varie en fonction de la courbure étant difficile à traiter expérimentalement, les simulations de DM en CG ont apporté un niveau de détail supplémentaire [91] (Figure 3.14). Le processus de déformation membranaire a été modélisé par application d'une force de

traction perpendiculaire à la membrane (Figure 3.14.A). L'étude menée par l'équipe montre que le tube obtenu était plus fin lorsque la bicouche était composée de phospholipides polyinsaturés (18:0-22:6n-3) en comparaison aux membranes composées de monoinsaturés (18:0-18:1). Cela suggère une diminution de la force nécessaire pour courber la membrane. L'augmentation graduelle de la force de traction montre que la force nécessaire pour observer une fission est moindre en présence de 18:0-22:6n-3. Cependant le rayon seuil pour observer une fission reste le même (Figure 3.14.B).

L'analyse des conformations des chaînes aliphatiques 22:6n-3 dans ces vésicules révèle plusieurs profils (fortement courbée, moyennement courbée, droite) contrairement à celles du 18:1 majoritairement droite (Figure 3.14.C). Enfin, l'augmentation des DP superficiels avec celle de la courbure montre l'adaptation des phospholipides polyinsaturés qui grâce à la flexibilité de leur chaîne peuvent combler les espaces libres au niveau de l'interface, causés par la courbure (Figure 3.14.D-F).

Une autre étude concernant le tri des lipides lors de la création d'un tube à partir d'une membrane plane a été entreprise par Baoukina et al. en 2018 [146]. Ils utilisent une composition membranaire complexe mimant la membrane plasmique qui inclue phospholipides, lysophospholipides, cholestérol, shingomyéline, etc. Le feuillet interne du tube est défavorable aux lipides coniques inversés comme les lysophospholipides et favorable aux lipides coniques comme le DAG. En dépit de cela, les PE, considérés comme coniques de part leur petite tête polaire, ne sont que très peu recrutés du côté interne au profit du feuillet externe. Cet effet peut s'expliquer par la nature des chaînes aliphatiques. Les PE du feuillet cytosolique (à l'extérieur du tube), principalement polyinsaturés, pourraient, au vu des études précédentes, adapter leur forme grâce à la polyinsaturation des chaînes au volume inversement conique imposé par la courbure positive.

Le rôle du DHA dans la déformation membranaire a ainsi été évalué par l'équipe. Cependant, il n'est pas le seul AG polyinsaturé qui peut s'incorporer dans les membranes. En effet, dans les membranes plasmiques neuronales par exemple, des chaînes de type n-6 sont également présentes.



**FIGURE 3.14 – Adaptation de la conformation des phospholipides polyinsaturés à la courbure.** (A) Simulation en CG d'une bicouche de PC soumise à une force de traction : un tube se forme et finit par subir une fission. R, rayon. (B) Rayon du tube en fonction de la force de traction pour des bicouches contenant du PC mono ou polyinsaturé. La ligne en pointillés indique le rayon critique pour la fission. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de chaque moyenne. (C) Distribution de l'angle d'inclinaison ( $\theta$ ) de la chaîne aliphatique mono ou polyinsaturée en bicouches plates ou sphériques ( $R = 15$  nm). (D) Constante de taille des DP. DP's profonds et superficiels dans les bicouches de la forme indiquée et contenant 0 ou 30 mol % de PC polyinsaturés. (E) Modèles montrant que les phospholipides polyinsaturés adaptent leur conformation à la courbure de la membrane, favorisant ainsi la formation de défauts superficiels au détriment des défauts profonds.

### 3.3 Les différents axes abordés dans mon travail de thèse

Mon première objectif a donc été de comprendre **l'influence du nombre d'insaturations** sur la structure des membranes et par conséquent sur leurs propriétés. Pour cela, il m'a fallu modéliser et simuler par DM AA ou CG, plusieurs membranes avec différentes compositions lipidiques. Le développement de nouveaux descripteurs m'a permis d'analyser précisément la dynamique des chaînes aliphatiques en fonction du niveau d'insaturation. J'ai travaillé sur une très large gamme de phospholipides ayant une ou deux chaînes polyinsaturées avec de 2 à 6 insaturations. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus pour des phospholipides portant des chaînes aliphatiques saturées ou monoinsaturées.

Si l'étude de l'impact du nombre d'insaturations sur les déformations membranaires était mon premier objectif, je me suis rapidement tournée vers une étude plus large afin d'apporter des éléments de réponse sur **l'origine de la distribution des chaînes aliphatiques polyinsaturées au sein des phospholipides**. En effet, depuis les années 1960, les chaînes polyinsaturées sont connues comme étant majoritairement en position *sn2*. Pourquoi une répartition aussi stricte ?

Enfin, si la répartition des espèces lipidiques est connue, la répartition du profil des chaînes aliphatiques reste davantage floue. C'est pourquoi la fin de ma thèse s'est orientée vers la question suivante : **quel est l'impact des phospholipides polyinsaturés sur la membrane et ses propriétés selon leur position au sein de celle-ci (dans le feuillet interne ou externe) lors de déformation ?** Durant cette partie, je me suis également intéressée à l'impact des têtes polaires sur le processus de déformation membranaire. Mes simulations ont permis de proposer un modèle dans lequel les phospholipides polyinsaturés adaptent leur conformation aux courbures positives, grâce à la flexibilité de leur chaîne *sn2* polyinsaturée. Ils seraient donc un atout considérable dans le feuillet cytosolique.

Par ailleurs, **la cohabitation** surprenante **des phospholipides polyinsaturés**, favorisant la malléabilité de la membrane et **du cholestérol**, régissant l'ordre, a également attiré ma curiosité. En effet, un fort taux de cholestérol est présent au niveau des synapses en complément des phospholipides polyinsaturés. On retrouve un ratio phospholipides/cholestérol de 3/1. Pour le moment seul quelques résultats préliminaires ont été obtenus montrant le plus faible impact du cholestérol sur la dynamique des chaînes polyinsaturées en comparaison avec celui sur des chaînes saturées et monoinsaturées.

# Deuxième partie

## Matériels et Méthodes



# Simulations de dynamique moléculaire

## 1.1 Principe de la dynamique moléculaire

### 1.1.1 Algorithme

Mon travail de thèse se base principalement sur l'utilisation de la DM. Présentée précédemment, la DM est une méthode mêlant physique et informatique pour simuler le mouvement des atomes au cours du temps. Dans cette partie, je souhaite expliquer plus précisément les concepts mathématiques et physiques qui le permettent. Le mouvement d'un atome est déterminé par la résolution de l'équation du mouvement de Newton :

$$F_i = m_i a_i \quad (1.1)$$

où  $F$  est la force résultante exercée sur l'atome  $i$ ,  $m$  sa masse et  $a$  son accélération.

La force agissant sur un atome est obtenue à partir du calcul de l'énergie potentielle  $E$  du système et des coordonnées cartésiennes  $x$  de l'atome  $i$  de la façon suivante :

$$F_i = -\frac{\delta E_{pot}}{\delta x_i} \quad (1.2)$$

L'accélération  $a$  (eq. 1.1) peut également se traduire par la dérivée seconde de la position de l'atome en fonction du temps ( $\frac{\delta^2 x_i}{\delta t^2}$ ). Sur ce principe et en combinant les équations 1.1 et 1.2 on obtient :

$$\frac{\delta^2 x_i}{\delta t^2} = m_i a_i = \frac{F_i}{m_i} \quad (1.3)$$

La position de chaque atome du système est obtenue en résolvant ce système d'équation simultanément pour tous les atomes simulés. Le temps, la masse et les coordonnées des atomes étant connus, il ne reste plus qu'à obtenir l'énergie potentielle. C'est là qu'intervient la notion de champ de force (FF).

### 1.1.2 Notion de champ de force

L'énergie potentielle du système est décrite par un FF. Il comprend les termes des interactions liées et non liées. Les interactions liées regroupent les liaisons covalentes entre 2 atomes, les angles de valence entre 3 atomes liés et les angles dièdres entre 4 atomes liés. Les interactions non liées rassemblent les interactions électrostatiques et de VDW. Dans le but de calculer la force de ces interactions, les atomes sont représentés comme des sphères et les liaisons covalentes sont modélisées par des ressorts.

- La déformation des liaisons et des angles de valence est ainsi représentée par un oscillateur harmonique.
- Les angles dièdres entre 4 atomes liés décrivant la rotation des liaisons suivent une fonction périodique. Elle permet d'autoriser plusieurs minima locaux représentant les différents rotamères possibles.
- Les interactions électrostatiques sont décrites par la loi de Coulomb.
- Les interactions de VDW sont exprimées par le potentiel de Lennard-Jones. Ce potentiel se décline en deux régimes : des forces répulsives à courte portée traduisant le recouvrement des nuages électroniques à courte distance et des forces attractives à longue portée induites par les fluctuations des nuages électroniques (force de London).

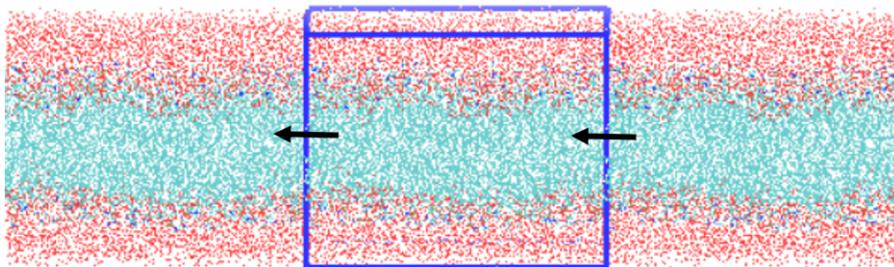
Le FF regroupe l'ensemble des paramètres nécessaires aux calculs de chacun de ces termes. Pour chaque atome, un grand nombre d'informations est donc renseigné tel que la masse atomique, le rayon de VDW et la longueur d'équilibre des liaisons. Ces informations peuvent dépendre de l'environnement de l'atome. En effet, un atome d'oxygène peut être modélisé de plusieurs façons selon s'il est inclus dans un groupe carbonyle ou dans un groupe hydroxyle. Les interactions peuvent ainsi être modulées pour reproduire au mieux les spécificités de chaque fonction chimique. L'ensemble de ces paramètres et fonctions sont représentés comme une somme de fonctions mathématiques permettant de calculer l'énergie potentielle d'un système moléculaire (Figure1.1)

Pour chaque paire d'atomes, liés de façon covalente, les longueurs des liaisons ont une valeur de référence notée  $l_0$ . Durant la simulation, les longueurs de liaisons  $l$  vont osciller autour de cette valeur d'équilibre. Pour éviter de s'en éloigner, il existe une constante de raideur  $k_l$ . Sur le même principe, on retrouve les constantes  $\theta_0$  et  $k_\theta$  pour les angles de valence entre 3 atomes liés. Dans le cas des angles dièdres reliant 4 atomes liés successivement,  $\varphi_0$  représente l'angle de phase,  $m$  la périodicité de rotation et  $k_\varphi$  la constante de torsion.

$$\begin{aligned}
 E_{pot} = & \sum_{liaisons} \frac{k_l}{2} (l - l_0)^2 & \begin{array}{c} \longleftrightarrow \\ \bullet \text{---} \text{---} \text{---} \bullet \end{array} \\
 + & \sum_{angles} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 & \begin{array}{c} \curvearrowright \\ \bullet \text{---} \text{---} \text{---} \bullet \\ \quad \quad \quad \bullet \end{array} \\
 + & \sum_{diedre} \sum_{m=1}^M \frac{k_\varphi}{2} [1 + \cos(m\varphi - \varphi_0)] & \begin{array}{c} \bullet \quad \bullet \\ \quad \quad \curvearrowright \\ \bullet \quad \bullet \end{array} \\
 + & \sum_{i=1}^N -1 \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[ \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}} \right] & \begin{array}{c} \bullet \quad \bullet \\ \quad \quad \longleftrightarrow \\ \quad \quad \leftarrow \quad \rightarrow \end{array} \\
 + & \sum_{i=1}^N -1 \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} & \begin{array}{c} \bullet^+ \quad \bullet^- \\ \quad \quad \longleftrightarrow \\ \quad \quad \leftarrow \quad \rightarrow \end{array}
 \end{aligned}$$

**FIGURE 1.1 – Exemple d'équation de l'énergie potentielle** regroupant les termes liés et non liés

Pour chaque paire d'atomes, non liés, le potentiel de Lennard-Jones est défini par différents paramètres:  $\sigma$  qui correspond à la distance ( $r$ ) entre les deux atomes  $i$  et  $j$  où les forces répulsives et attractives sont identiques,  $\varepsilon_{ij}$  correspond à l'énergie la plus basse entre les deux particules. L'intensité de la force électrostatique est proportionnelle à la somme des deux charges  $q_i$  et  $q_j$  et inversement proportionnelle à la distance  $r$  entre les deux particules chargées  $i$  et  $j$ . Les interactions non liées sont très nombreuses puisqu'elles prennent en considération toutes les paires d'atomes non liées de façon covalente. Cependant, elles sont dépendantes de la distance ( $r$ ). Plus les atomes sont éloignés, plus la force d'interaction est négligeable. Pour limiter le temps de calcul, nous utilisons une distance seuil, appelée *cutoff* au-delà de laquelle les interactions non liées ne sont plus calculées. Cependant, escamoter une parties des interactions électrostatiques peut provoquer des discontinuités trop radicales dans le calcul de l'énergie potentielle. La méthode *Particle Mesh Ewald* [147] permet de calculer les interactions électrostatiques supérieures au cutoff en utilisant non pas le système lui-même mais son image. Cette méthode est applicable en conditions périodiques (Figure 1.2). Le système simulé en dynamique moléculaire est répété à l'infini dans toutes les directions (x,y,z), pour éviter que les bords du système soit en contact avec du vide. Sur ce principe, lorsqu'un atome sort de la "boite de simulation", il entre de nouveau dans la boîte du côté opposé.



**FIGURE 1.2 – Simulation de membrane en condition périodique.** Les contours de la boîte de simulation sont représentés en bleue. Les flèches indiquent que si une molécule sort de cette boîte du côté gauche, elle entre à nouveau par la droite.

## 1.2 Description des systèmes

Dans mon travail de thèse, j’ai utilisé un FF AA et un FF CG pour des systèmes plus complexes. Tous les systèmes basés sur des bicouches lipidiques, entourées d’un solvant explicite, sont construits à partir de l’outil en ligne Charmm-gui. Si la charge totale du système est non nulle, des contre ions ( $\text{Na}^+$ ) sont ajoutés afin de rendre le système neutre. Les systèmes AA comportent 120 mM d’ions NaCl. Les membranes ont subi 6 étapes d’équilibration, comme préconisé par Charmm-gui avant la phase de production, au cours desquelles les contraintes sur les phospholipides sont progressivement libérées. Toutes les simulations de DM ont été réalisées par le logiciel GROMACS. Nous travaillons systématiquement en conditions NPT c.a.d. que la température et la pression sont maintenues constantes au cours du temps. Les simulations de DM ont été réalisées sur le supercalculateur OCCIGEN, hébergé par le Centre Informatique National de l’Enseignement Supérieur (CINES). Quatre demandes de ressource de calculs ont été faites pour mon projet de thèse pour un total de 8 500 000 heures de calculs. Plus récemment, en complément d’OCCIGEN, j’ai utilisé les ressources du mésocentre de l’observatoire de Nice.

### 1.2.1 Les systèmes tout atome

#### Paramètres des simulations

Pour analyser le comportement des phospholipides au sein d’une membrane plane, j’ai utilisé le FF AA CHARMM36 [100] corrigé pour les phospholipides polyinsaturés [135]. Les membranes planes, composées de 144 phospholipides par feuillet, sont simulées pendant 400 ns avec GROMACS 5 [148]. L’hydratation du système est assurée par une couche d’eau d’une épaisseur de 2.25 nm de part et d’autre de la membrane. Le solvant utilisé est de l’eau de type TIP3P [149]. Ce modèle est classiquement utilisé en DM, il comprend trois sites d’interactions, correspondant

aux trois atomes de la molécule d'eau. La température et la pression sont maintenues constantes tout au long des simulations. Toutes les simulations ont été équilibrées à l'aide du thermostat et du barostat de Berendsen [150] respectivement à 303 ° K et 1 bar à l'exception des bicouches 14:0-14:0, qui ont été équilibrées à 310 ° K, pour se positionner au-dessus de leur  $T_m$ . L'algorithme de Berendsen corrige la température et la pression du système à chaque incrément de temps si elles s'éloignent des conditions initialement fixées. Le contrôle de la pression se fait en ajustant le volume. Les simulations de membranes nécessitent de coupler les dimensions  $x$  et  $y$  indépendamment de la dimension  $z$  (conditions semi-isotropiques). L'algorithme de Berendsen est efficace mais ne reproduit pas exactement les fluctuations de température et de pression. Il est donc utilisé uniquement lors de l'équilibration. Le thermostat V-rescale [151] et le barostat Parrinello-Rahman [152] sont ensuite utilisés pour la phase de production. La production de ces systèmes AA nécessite 5 jours de calcul sur 168 CPU sur le CINES. Une simulation par condition a été entreprise. Les analyses se décomposent sur 3 blocs de 100 ns.

## Composition des systèmes

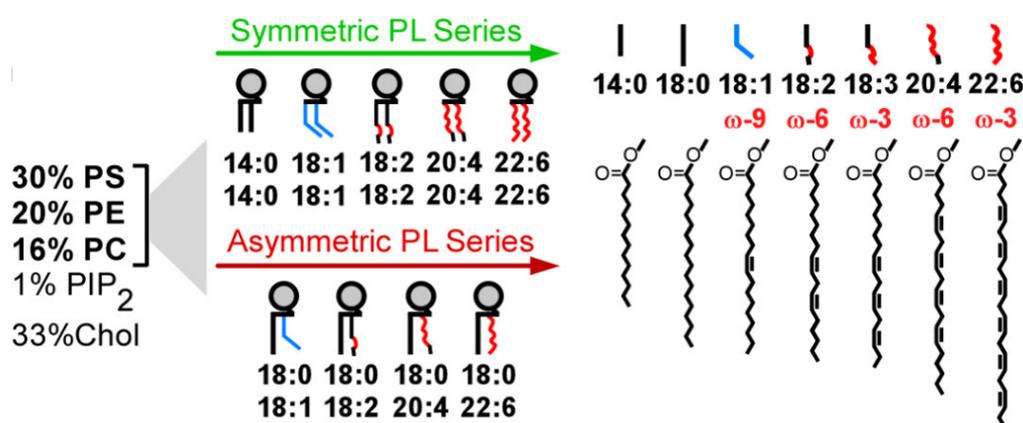
Le but étant d'étudier l'impact du niveau d'insaturation sur les propriétés membranaires j'ai utilisé différents profils de chaînes aliphatiques avec de 0 à 6 insaturations.

J'ai évalué **l'influence du nombre d'insaturations** sur uniquement la chaîne *sn2* ou sur les deux chaînes aliphatiques. En combinant les chaînes aliphatiques 14:0, 18:1, 18:2, 18:3 20:4 et 22:6, j'ai obtenu une série de phospholipides asymétriques, avec une chaîne *sn1* saturée et une chaîne *sn2* insaturée et une série de phospholipides symétriques, avec les deux chaînes aliphatiques *sn1* et *sn2* insaturées. Certains phospholipides n'étaient pas présents dans la base de donnée de Charmm-Gui [153]. C'est le cas des phospholipides 18:0-18:2, 18:0-18:3, 18:3-18:3, et 22:6-22:6. Ils ont été construits en ajoutant des insaturations aux phospholipides référencés 18:0-18:1, 18:1-18:1 ou 22:1-22:1. Pour ce faire, il est nécessaire de supprimer de la topologie un atome d'hydrogène, lié aux carbones que l'on souhaite être insaturés. Cette délétion entraîne un décalage dans les liaisons, les angles de valence et les angles dièdres ; il est donc indispensable de réassigner chaque liaison au bon numéro d'atome. Le 18:0-18:2 est maintenant disponible sur Charmm-gui et la topologie est la même que celle utilisée dans mes systèmes.

Nous avons également analysé les **conséquences d'une inversion des chaînes aliphatiques *sn1* et *sn2***. Il a fallu également construire les topologies de ces phospholipides. Le 22:6-18:0 et le 20:4-18:0 proviennent respectivement du 22:1-22:1 et du 20:1-20:1. La chaîne *sn2* est ainsi obtenue en supprimant des atomes afin de réduire la longueur de la chaîne et

en ajoutant 3 hydrogènes pour saturer les 2 carbones insaturés et pour compléter l'extrémité méthyl. La chaîne *sn1* est obtenue en supprimant des hydrogènes afin de former les insaturations souhaitées. C'est également le cas pour la chaîne *sn1* du 18:1-18:0 construite à partir du 18:0-18:0. Une fois encore, ces ajouts et délétions d'atomes entraînent un grand nombre de décalages dans les interactions qu'il a fallu corriger.

La première partie de ce projet étant en collaboration avec le Dr. Marco Manni, j'ai adapté la composition de mes membranes simulées à celle qu'il utilisait expérimentalement sous forme de liposomes. Les compositions sont détaillées dans la Figure 1.3



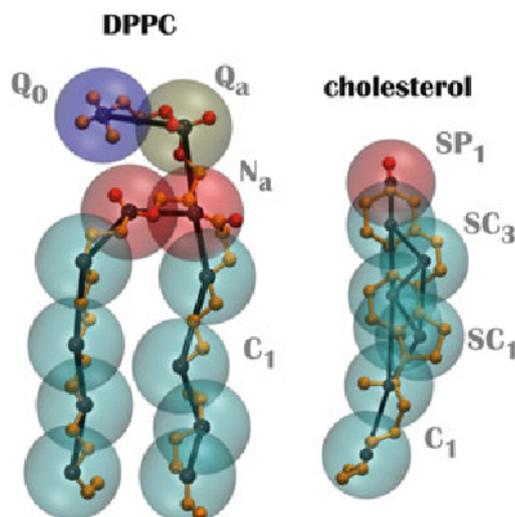
**FIGURE 1.3** – Description de la composition des membranes planes tout atome avec une diversité de tête polaire et une large gamme de chaînes aliphatiques, extrait de Manni et al. 2018 [154]

Pour évaluer l'impact du cholestérol sur des membranes contenant des phospholipides polyinsaturés, j'ai travaillé sur des membranes simplifiées contenant uniquement des PC et 30% de cholestérol. La gamme de lipides sur laquelle j'ai travaillé inclut des phospholipides saturés (14:0-14:0), monoinsaturés (18:0-18:1 et 18:1-18:1) et ayant une ou deux chaînes aliphatiques polyinsaturés (18:2, 18:3, 20:4, 22:6).

## 1.2.2 Les systèmes gros grains

Pour étudier la déformabilité des membranes, j'ai mis en place des systèmes beaucoup plus grand afin de générer des tubes à partir d'une membrane plane. Pour cela je devais travailler sur des systèmes beaucoup plus conséquents pour avoir un "réservoir" de phospholipides suffisamment important. C'est pourquoi, j'ai utilisé le FF MARTINI22 [101] de type CG. La modélisation en CG impose une perte de résolution et ne permet pas de distinguer tous les lipides. A titre d'exemple, une chaîne 16:0 est modélisée de la même manière qu'une chaîne 18:0 (Figure 1.4). Ces simulations m'auront tout de même permis de travailler distinctement sur les

phospholipides monoinsaturés  $\approx 18:0-18:1$  les phospholipides ayant 2 insaturations  $\approx 18:0-18:2$ , les phospholipides n-6 à longue chaîne  $\approx 18:0-20:4$  et les phospholipides n-3 à longue chaîne  $\approx 18:0-22:6$ . Le protocole utilisé pour déformer la membrane est adapté d'une étude antérieure [145].



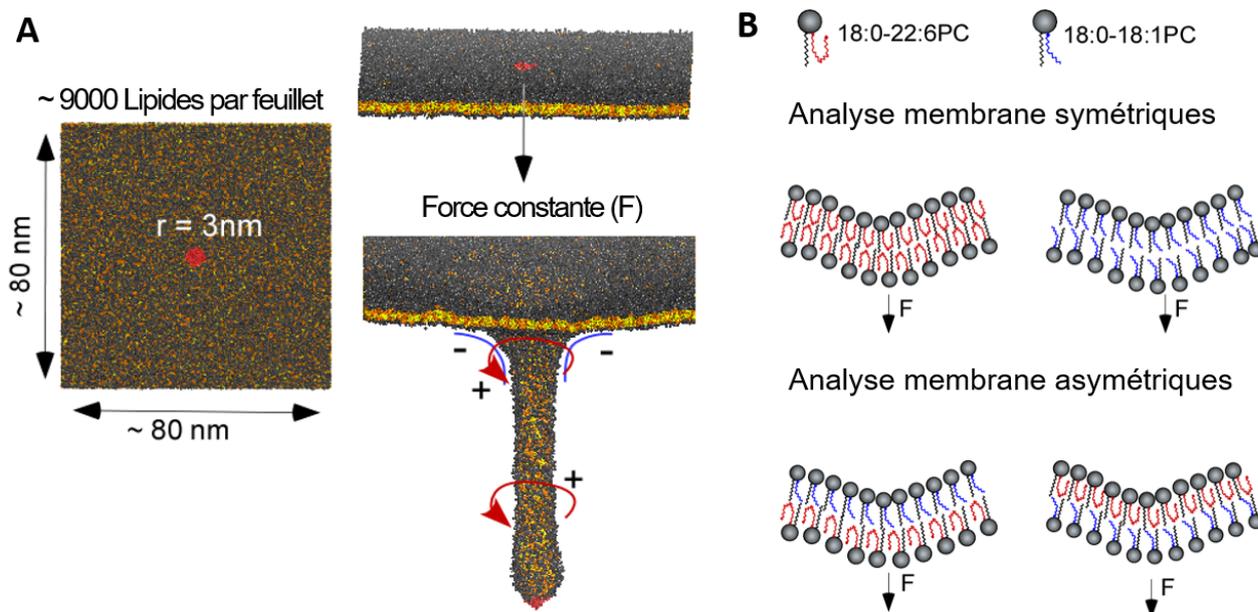
**FIGURE 1.4 – Cartographie entre la structure chimique au niveau atomique (AA) et le modèle Martini à grain grossier (CG) pour le 16:0-16:0 PC et le cholestérol, extrait de Periole et al. 2012 [155]**

La production de ces systèmes CG nécessite 3 jours de calcul sur 280 CPU sur le CINES et le mésocentre. Trois à cinq simulations par condition ont été entreprises.

### Paramètres des simulations

Toujours en condition NPT, les algorithmes V-rescale [151] et Berendsen [150] contrôlent la température et la pression lors de la production. La plupart des membranes utilisées dans cette étude sont composées de 2 x 9000 phospholipides avec une couche hydratation de 100 nm d'épaisseur, répartie de part et d'autre de la membrane. La polarité de l'eau n'est pas prise en compte. L'obtention de ces systèmes se déroule selon plusieurs étapes. J'ai commencé par construire un système 2 x 1000 phospholipides via Charmm-Gui [156]. Je l'ai ensuite dupliqué 3 fois dans les directions x et y avec l'option *genconf* de GROMACS. Sur ces larges membranes, les phospholipides au centre, dans un rayon de 3 nm, sont sélectionnés. Leur diffusion latérale est bloquée par l'application de contraintes sur les têtes polaires. En revanche, une force allant de 150 à 250 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup> leur est appliquée perpendiculairement au plan de la membrane, initiant la formation d'un tube pendant 200 ou 400 ns (Figure 1.5A). Cette option de *pulling* ne fonctionnant pas en GROMACS 5, j'ai dû utiliser une version antérieure GROMACS 4.5 [157]. Il semblerait que le problème soit résolu dans les versions 2018 et 2019. Cependant pour assurer

une cohérence, j'ai continué avec la version 4.5. Afin de vérifier que la taille de la membrane, ainsi que celle de la portion de lipides sur laquelle on tire, n'a que peu d'impact sur la capacité de déformation des membranes simulées, j'ai réalisé plusieurs contrôles. J'ai, dans un premier temps, dupliqué la membrane initiale de 2 x 1000 phospholipides par 4 en maintenant un rayon de 3nm pour appliquer la force de traction. Dans un deuxième temps je l'ai copié 12 fois et j'ai augmenté le rayon de sélection des phospholipides centraux à 12nm.



**FIGURE 1.5 – Description des systèmes gros grains**, adapté de Tiberti et al 2019 (soumis). A : Construction de grandes membranes planes, sélection des lipides au centre de la bicouche dans un rayon de 3nm sur lesquels imposer une force. B : Exemples de membranes symétriques et asymétriques pour lesquels les simulations de pulling ont été réalisées.

## Composition des systèmes

Ces simulations, visant à évaluer la capacité de déformation des membranes, ont été appliquées sur des **membranes symétriques** (même composition des deux feuillets) et **asymétriques** (composition distincte d'un feuillet à l'autre)(Figure1.5B). L'utilisation de membranes asymétriques, ayant des compositions différentes d'un feuillet à l'autre, génèrait des problèmes d'incompatibilité d'aire par monocouche. Pour les équilibrer, il a été nécessaire d'ajouter des phospholipides d'un côté du feuillet ou de l'autre.

Dans un premier temps, j'ai maintenu une tête polaire PC constante et j'ai varié le type de chaîne *sn2* ayant de 1 à 6 doubles liaisons. Les topologies des lipides inversés (*sn1*-insaturée, *sn2*-saturée) ont également été construites en CG. Dans un deuxième temps, lors de mon

étude sur les membranes asymétriques, j'ai également joué sur **l'effet des têtes polaires** (PC vs PS vs PE). J'ai par ailleurs étendu ce système de simulations à une composition membranaire plus complexe, se rapprochant davantage de la composition de la membrane plasmique neuronale. J'ai construit une membrane complexe à plusieurs composants en utilisant les têtes polaires et les taux d'insaturation fournis par une récente étude sur la lipidomique de la membrane plasmique neuronale [125]. Je me suis concentrée uniquement sur les phospholipides. J'ai donc éliminé le cholestérol, les glycolipides et la sphingomyéline. Mon étude sur l'asymétrie des membranes a montré que la composition du feuillet convexe, lors d'une vésiculation, a plus d'incidence que celle du feuillet concave (cf chapitre 2 des résultats). J'ai donc simplifié la composition du feuillet amené à devenir concave en 100% 18:0-18:1PC. Le futur feuillet convexe est composé quant à lui d'une diversité de phospholipides ayant différents profils de chaînes aliphatiques. La composition de ce feuillet est recensée dans la Table 1.1. Afin d'évaluer l'impact de la composition de la chaîne aliphatique dans le feuillet convexe de la membrane plasmique neuronale, j'ai construit un système de contrôle avec la même distribution de têtes polaires. Cependant, les chaînes aliphatiques n-6 et n-3 ont été remplacées par des chaînes aliphatiques monoinsaturées (18:0-18:1).

membrane plasmique neuronale modèle				
	PC (27.3%)	PE(41.8%)	PS(20%)	PI(10.2%)
18 :0-18 :0	23.1%	-	4.6%	-
18 :0-18 :1	37.2%	12.1%	19.5%	27.9%
18 :1-18 :1	10%	-	21.8%	-
18 :1-20 :4	20.2%	35.2%	21.8%	27.9%
18 :1-22 :6	9.5%	52.7%	23.2%	44.1%
membrane contrôle				
	PC (27.9%)	PE(41.6%)	PS(20.5%)	PI(10.2%)
18 :0-18 :0	23.5%	-	4%	-
18 :0-18 :1	66.9%	100%	74%	100%
18 :1-18 :1	9.6%	-	22%	-

**TABLE 1.1 – Composition en phospholipides mimant celle du feuillet cytosolique de la membrane plasmique neuronale et d'une membrane contrôle.**



Une fois les simulations obtenues, différents descripteurs ont été développés pour faire le lien entre les propriétés des membranes et la dynamique des phospholipides selon le profil des chaînes aliphatiques et des têtes polaires. Si des analyses classiques, telles que l'épaisseur, le profil de densité des membranes ainsi que les paramètres d'ordres, ont été réalisées pour vérifier la conformité de nos simulations à la littérature, je ne m'attarderai pas sur ces techniques connues.

Toutes les analyses décrites ci-dessous ont été obtenues à l'aide de scripts python développés au cours de ma thèse. Pour représenter la variabilité des données, les barres d'erreur de chacune de nos analyses AA ont été obtenues en divisant les 300 dernières nanosecondes de simulation en 3 blocs. Les différentes analyses réalisées sur les 3 blocs sont ensuite moyennées et la variabilité des résultats est obtenue en calculant l'écart-type. Dans le cas des simulations CG, les simulations de déformation ont été réalisées de 3 à 5 fois par condition afin d'analyser la dispersion des résultats.

## 2.1 Propriétés membranaires

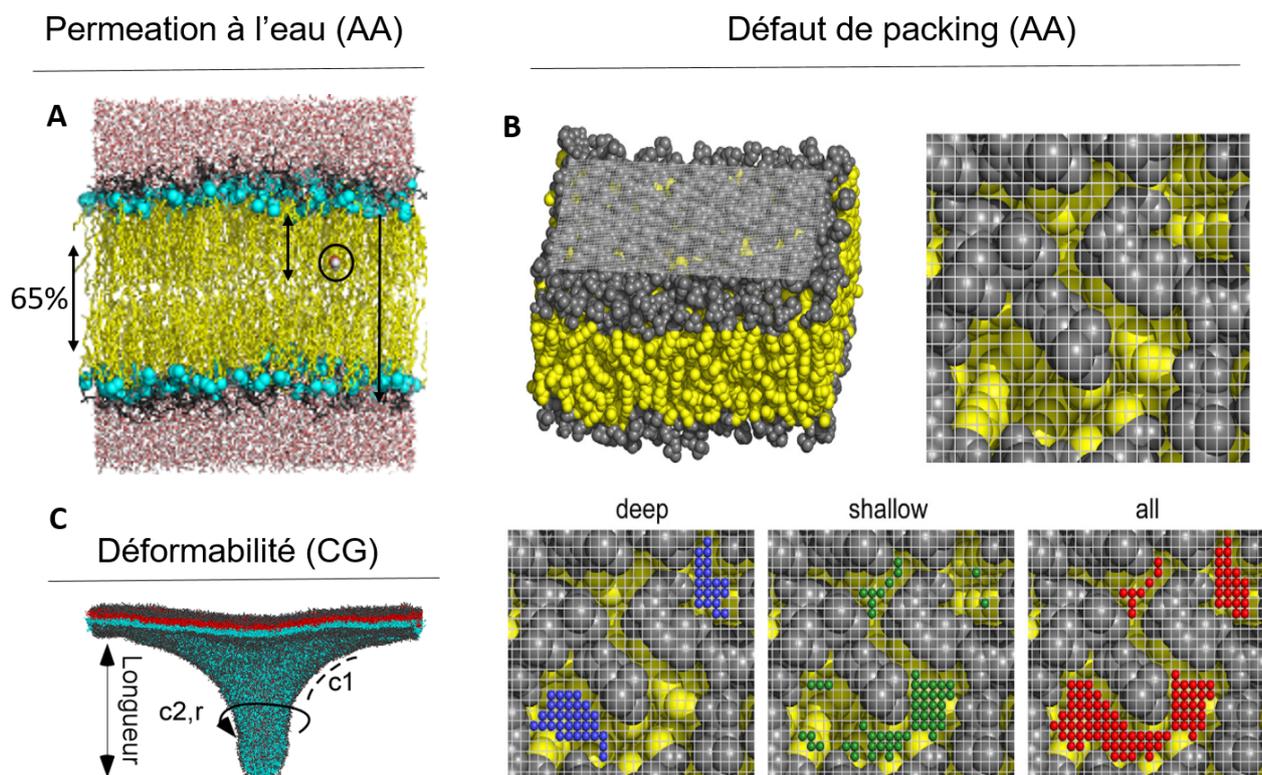
Les membranes planes simulées en AA nous ont permis de quantifier la perméation des membranes et la présence de DP selon la composition lipidique.

### 2.1.1 Perméation à l'eau à travers les membranes

Afin d'avoir une information sur la perméabilité des membranes, nous avons compté le nombre de molécules d'eau qui ont visité le centre de la membrane (correspondant à 65% de l'épaisseur de celle-ci) pendant des périodes de 100 ns. Les molécules d'eau ont été séparées en deux classes selon leur mouvement (Figure 2.1A) :

- celles qui ont entièrement traversé la bicouche
- celles qui sont entrées dans la région hydrophobe de la membrane puis en sont ressorties du même côté

Les résultats ont été normalisés par rapport au nombre total de molécules d'eau.



**FIGURE 2.1 – Propriétés membranaires analysées.** A : Mesure de la perméation à l'eau de membranes planes tout atome. Distinction des molécules de passage dans la membrane et celles qui la traversent. B : Extrait de Gautier et al 2018 [132] Principe de la détection des défauts de packing. Projection d'une grille à l'interface membrane/eau. Scan vertical dans chacune des cases et détection des défauts (all) superficiels (shallow), profonds (deep). C : Représentation des différents paramètres étudiés pour l'analyse de la déformabilité des membranes grâce à des simulations CG ( $c$  = courbure,  $r$  = rayon) adapté de Tiberti et al. 2019 (soumis)

### 2.1.2 Défauts de packing :

Pour déceler les DP et les quantifier, l'outil PackMem a été développé au sein du laboratoire [132]. Il est maintenant accessible en ligne<sup>1</sup>. Le principe de base est de cartographier la surface de la membrane en projetant une grille dans laquelle chaque case à une dimension de  $1 \times 1$  Å (Figure 2.1B). Chaque case est initialisée à 0. En regardant cette grille vue du dessus, une valeur de 0.0001 est affectée si l'atome détecté verticalement est un atome aliphatique, dans le cas contraire la valeur attribuée est de 1. Une profondeur seuil, de 1 Å au dessous du glycérol, est fixée. Si aucun atome n'est détecté jusqu'à ce seuil (la valeur de la case reste à 0) on parle de défaut profond. En revanche si les atomes scannés verticalement, avant cette limite, sont des

1. <http://packmem.ipmc.cnrs.fr/>

atomes hydrophobes (la valeur de la case est entre 0 et 1), il s'agit d'un défaut superficiel. Cet outil permet de déterminer le type et la quantité de DP formés en fonction de la composition lipidique. Il est applicable pour des membranes simulées avec des FF différents (MARTINI (CG), BERGER (UA), CHARMM36 (AA)). Durant mon stage de master, j'ai également participé à ce projet en déterminant la durée de vie des DP.

### 2.1.3 Déformabilité

Ensuite, pour analyser la capacité de déformation des membranes, j'ai utilisé des simulations CG. Comme expliqué précédemment, le but est d'appliquer une force perpendiculaire au plan de la membrane sur quelques lipides au centre de la bicouche afin d'induire un tube à partir d'une membrane initialement plane. A force constante, plus la membrane est facilement déformable, plus le tube est long et fin (Figure 2.1C).

**Longueur du tube et vitesse d'élongation :** La **longueur du tube**, base incluse, est définie tout au long de la trajectoire par la différence entre les coordonnées  $z_{min}$  et  $z_{max}$  de l'ensemble des pseudos-atomes. A cette valeur est soustraite l'épaisseur de la membrane, calculée avant l'application de la force. L'élongation du tube se fait en 3 phases. Les deux premières sont décrites par des modèles théoriques ; une déformation viscoélastique initiale de la membrane, suivie d'un déplacement des lipides dans le tube [158]. Le passage d'un régime de protubérance à un régime de croissance se manifeste par un changement de la pente de l'élongation du tube en fonction du temps. La troisième phase est due à un biais de simulation. La taille de la bicouche étant finie l'allongement linéaire du tube est ensuite limité par la taille de la membrane. La vitesse d'allongement du tube est donc calculée à partir de la pente de la courbe d'élongation du tube en fonction du temps entre 20 ns et 100 ns. Cela permet de se situer entre la phase de protrusion et la phase de freinage de l'allongement due au réservoir lipidique limité.

**Rayon et aire par lipide :** Le **rayon du tube** a été calculé pour des longueurs de tube supérieures à 40 nm. Les tubes sont divisés en tranches de 4 nm. Le rayon de chaque fraction est obtenu par la distance moyenne entre le centre du tube et les sphères "Azote" (NC3 pour les PC, NH3 pour les PE et CNO pour les PS) qui composent le feuillet externe (rayon externe) ou le feuillet interne du tube (rayon interne). La disparité des données est obtenue grâce à ce fractionnement. En revanche, **l'aire par lipide** (APL) est calculée à partir de la surface

latérale du tube entier selon la formule suivante :

$$APL = 2 * \Pi * r * h/n \quad (2.1)$$

où h est la hauteur du tube, r le rayon et n le nombre de lipides dans le tube.

**Courbure :** L'inverse du rayon du tube nous informe sur sa **courbure**. La courbure décrivant la base du tube a été obtenue à partir du rayon du cercle osculateur ou cercle de courbure. Le cercle osculateur est le cercle tangent en un point qui épouse le mieux la courbe. La première étape est d'obtenir le contour du système incluant la membrane plane, la base du tube et le tube lui-même. Pour cela les coordonnées initialement en 3 dimensions x,y,z ont été réduites à 2 dimensions x,z de la manière suivante.

$$\begin{cases} x = x \\ y = 0 \\ z = z \end{cases} \quad (2.2)$$

Une fois les coordonnées "écrasées", la membrane est divisée en tranche régulière de  $x_{min}$  au  $x_{max}$ . Pour chaque tranche, un seul point est conservé. L'abscisse de ce point correspond aux coordonnées x moyennes de cette tranche. L'ordonnée correspond à la coordonnée z maximale.

$$\begin{cases} x = x_{mean} \\ z = z_{max} \end{cases} \quad (2.3)$$

Une fois le contour du système obtenu, je conserve les points décrivant la courbure de la base du tube. Cette zone est définie entre les points de l'horizontalité de la membrane plane et de la verticalité du tube. C'est sur cette portion du tube que le cercle osculateur est déterminé.

D'un point de vue géométrique, pour obtenir le cercle osculateur, on trace la droite normale à la courbe, au niveau du point le plus bas. Tous les cercles passant par ce point et ayant pour centre un point de cette droite sont des cercles tangents à la courbe. Le rayon du cercle épousant au mieux la courbe s'appelle le rayon de courbure (Figure 2.2). D'un point de vue mathématique, on cherche à minimiser la distance entre le centre du cercle tangent et les points de la courbe. La valeur de la courbure est ensuite définie par  $1/r_{cercle-osculeur}$

Pour comprendre les différentes propriétés membranaires il est nécessaire de comprendre la dynamique des phospholipides

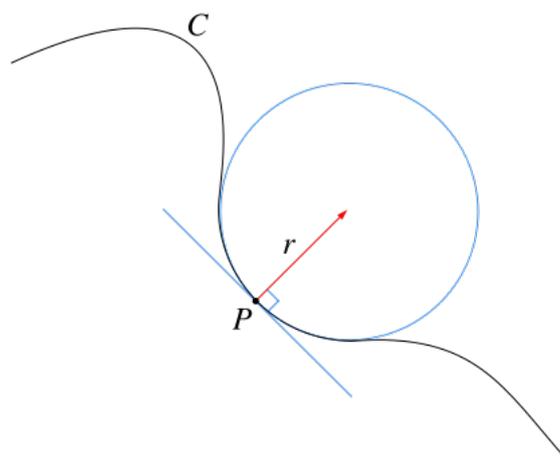


FIGURE 2.2 – Cercle osculateur épousant au mieux la courbure représentée

## 2.2 Dynamique des phospholipides

Pour ce faire, j'ai utilisé la précision atomistique des simulations AA pour décrire les mouvements des chaînes aliphatiques des phospholipides en fonction du nombre d'insaturations (Figure 2.3). Chaque chaîne aliphatique a été analysée de façon indépendante.

### 2.2.1 Diffusion de l'extrémité méthyl

Pour évaluer le déplacement des chaînes aliphatiques au cours du temps, nous avons mesuré la vitesse de déplacement du groupe méthyl terminal. Cette vitesse a été calculée à partir de la somme des distances parcourues tous les 10 ps par chaque groupe méthyl. J'ai pris en considération deux types de déplacement : ceux dans le plan de la membrane (axe x) et ceux se faisant perpendiculairement à la membrane (axe z).

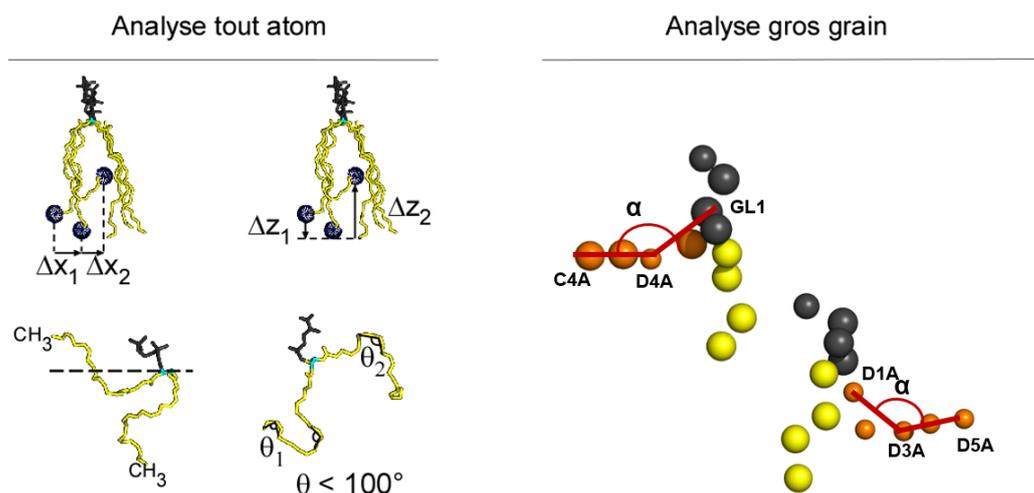
### 2.2.2 Protrusion de l'extrémité méthyl

Pour les mouvements en z, je me suis attardée sur la capacité des chaînes aliphatiques à remonter dans la partie hydrophile au-dessus du glycérol. Pour ce faire, j'ai analysé la trajectoire toutes les 100 ps et j'ai donc comptabilisé le nombre de fois où la chaîne aliphatique atteint une position z au-dessus du carbone central du glycérol du même phospholipide. J'ai distingué plusieurs cas (i) je comptabilise un évènement de protrusion quel que soit l'atome de carbone de la chaîne aliphatique qui remonte dans la partie hydrophile (ii) je comptabilise le nombre de protrusion propre à chaque atome de carbone de la chaîne aliphatique. Cela me permet d'obtenir le nombre total de protrusion et le nombre d'évènements observé pour chaque carbone.

### 2.2.3 Torsion des chaînes aliphatiques

Pour quantifier la flexibilité des chaînes aliphatiques, j'ai évalué la proportion de torsion de chaque chaîne aliphatique. Ainsi, j'ai calculé les angles formés tout au long de la chaîne entre 3 atomes dont les positions relatives sont  $i-2$ ,  $i$ , et  $i+2$ . La valeur de l'angle est associée à l'atome  $i$ . Une torsion est comptabilisée lorsque l'angle formé est inférieur à  $100^\circ$ . Le pourcentage est ensuite calculé en fonction du nombre de torsions possibles par chaîne. De même que pour l'analyse des protrusions, les phospholipides sont analysés tous les 100 ps et je m'intéresse soit au nombre total de torsion, soit au nombre de torsion spécifique à chaque carbone.

L'approche par simulation CG simplifie considérablement la structure des phospholipides ce qui simplifie l'analyse conformationnelle.



**FIGURE 2.3 – Analyse de la dynamique des phospholipides.** Tout atome : Analyse de la diffusion du groupement méthyle dans le plan de la membrane et suivant la normale à la membrane, du nombre de protrusion et de la capacité de torsion des chaînes aliphatiques. Gros grain : Mesure de l'angle d'inclinaison ( $\alpha$ ) de la chaîne *sn2* (orange).

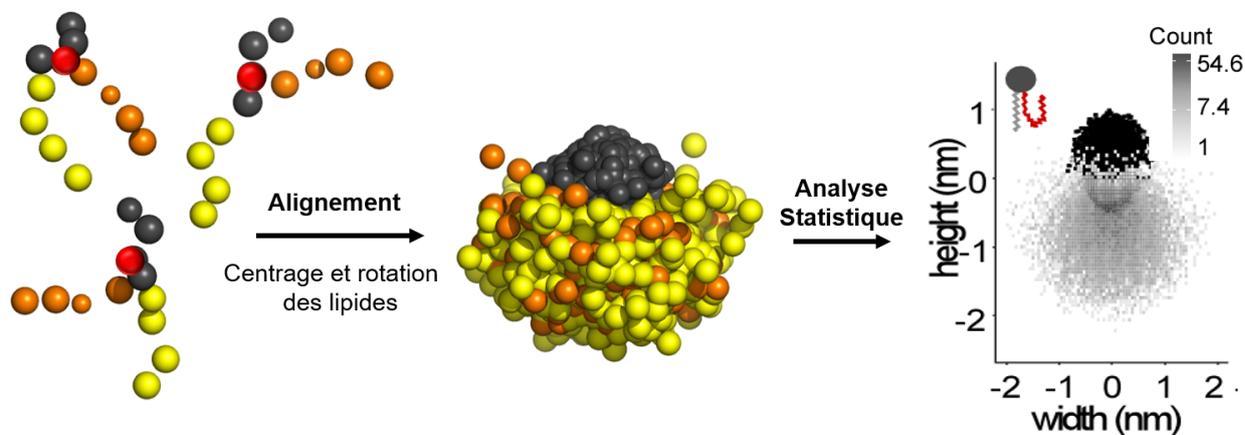
### 2.2.4 Géométrie et conformations des phospholipides

Pour l'analyse des conformations des phospholipides, j'ai utilisé deux méthodes. La première donne les conformations des chaînes aliphatiques (Figure 2.3), la seconde fournit des informations sur la géométrie globale des phospholipides (Figure 2.4).

**Conformations des phospholipides :** J'ai regroupé les conformations des phospholipides en 3 groupes. La chaîne *sn2* étant plus flexible, c'est sur elle que je me base pour les distinguer.

Le niveau de courbure de la chaîne insaturée est mesuré par deux angles seuils  $70^\circ$  et  $120^\circ$ . Ils ont été déterminés à partir de la distribution des angles formés par la chaîne *sn2*. L'angle d'inclinaison des chaînes aliphatiques *sn2*, dans le cas des phospholipides monoinsaturés, est calculé entre les pseudo atomes représentant les atomes du glycérol reliés à la chaîne *sn2*, la double liaison centrale et le groupe terminal (GL1-D2A-C4A). Sur le même principe j'utilise les sphères représentant le début, le milieu et la fin de la chaîne polyinsaturées (D1A-D3A-D5A)(Figure 2.3).

**Géométrie :** Nos systèmes CG, utilisés pour évaluer la déformation membranaire, permettent également une comparaison de la géométrie des phospholipides selon la courbure positive ou négative du feuillet. Pour cela, je travaille uniquement sur le tube et je sépare le feuillet externe (courbure positive) du feuillet interne (courbure négative). Ensuite, tous les phospholipides sont superposés dans chaque condition. Pour ce faire, tous les phospholipides sont centrés sur la sphère GL1 et ils subissent tous une rotation pour être dans la même direction (Figure 2.4). Nous avons défini une grille divisée en  $75 \times 75$  cases. On s'intéresse ensuite à la densité de chaque case. Une échelle logarithmique d'un gradient de couleurs grises représente le nombre de pseudo-atomes dans chaque case. Les résultats de ces superpositions ont été représentés de deux façons. Afin de comprendre la contribution de chaque chaîne aliphatique, on les analyse séparément. Par la suite pour avoir une géométrie d'ensemble, nous avons superposé l'ensemble des pseudo-atomes de la chaîne *sn1* et de la chaîne *sn2* sans distinction.



**FIGURE 2.4** – Analyse de la géométrie des phospholipides en 2 étapes. Exemple d'alignement de tous les phospholipides monoinsaturés d'un feuillet convexe suivi du calcul de la densité d'atome observés à chaque position de la grille.

## 2.3 Analyse du cholestérol dans les membranes de phospholipides polyinsaturés

Dans le but de comprendre plus précisément l'interaction entre le cholestérol et les phospholipides polyinsaturés, je me suis intéressée à l'impact du cholestérol sur la dynamique des phospholipides polyinsaturés mais également à l'impact des phospholipides polyinsaturés sur l'orientation, la conformation et la localisation du cholestérol au sein des membranes (Figure 2.5). Les analyses de la dynamique des chaînes aliphatiques ayant déjà été présentées, je vais m'attarder sur les analyses concernant les propriétés du cholestérol :

- Son **orientation** a été déterminée par l'angle entre le vecteur définissant les cycles du cholestérol et celui indiquant la normale à la membrane.
- Sa **conformation** a été définie par l'angle formé entre son noyau à quatre cycles et sa chaîne carbonée.
- Sa **position** dans la bicouche a été suivie au cours de la trajectoire en suivant les coordonnées des groupements -OH selon l'axe des  $z$ . Une autre analyse s'est concentrée sur la proportion de carbone 17 (carbone entre les cycles et la chaîne carbonée) présent au centre de la bicouche. Le centre de la bicouche considéré est une portion de la membrane délimitée, de part et d'autre du centre, par 10 % de son épaisseur.

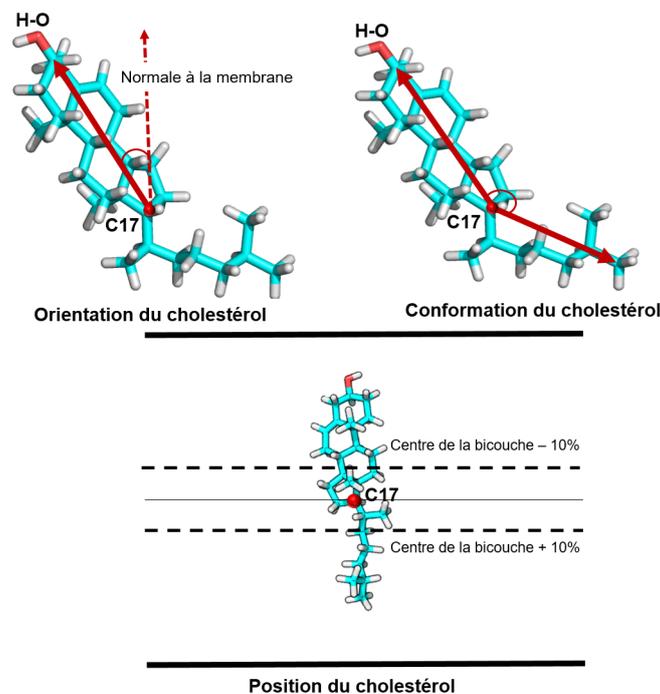


FIGURE 2.5 – Analyse du cholestérol dans les membranes : son orientation, sa conformation et sa localisation

# Liposomes asymétriques

Afin de valider mes résultats *in silico* sur les membranes asymétriques, j'ai essayé de fabriquer des liposomes asymétriques avec un feuillet interne monoinsaturé et un feuillet externe polyinsaturé. Les liposomes asymétriques devaient ensuite subir des vésiculations par le biais de la dynamine et de l'endophiline. Dans ce chapitre, je m'attarderai sur le protocole utilisé, les résultats obtenus feront l'objet d'une discussion ultérieure.

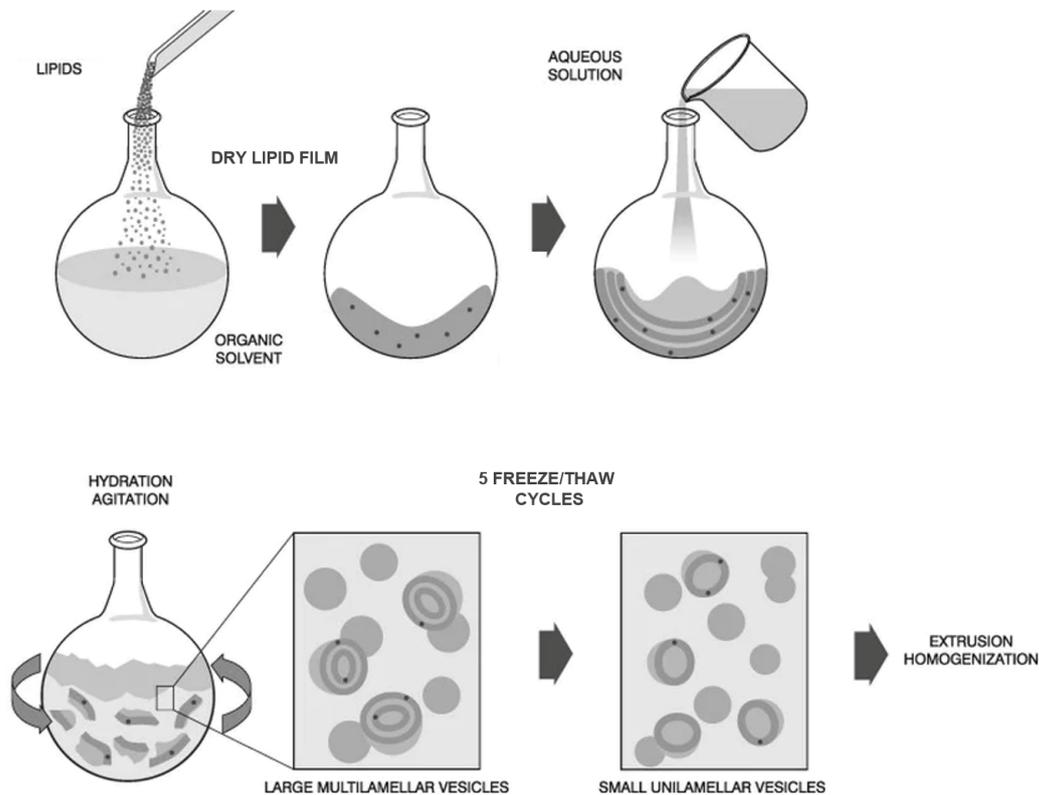
## 3.1 Conception des liposomes symétriques

Avant de décrire la formation des liposomes asymétriques, il est indispensable de présenter en quelques mots la méthode de formation des liposomes symétriques (Figure 3.1). La méthode la plus utilisée pour former des liposomes symétriques consiste à dissoudre des phospholipides dans un solvant organique comme un mélange de chloroforme/méthanol. Le solvant organique est ensuite évaporé pour aboutir à la formation d'un film lipidique. Enfin, on place le film dans un milieu aqueux. Le film lipidique s'hydrate alors et les phospholipides s'auto-assemble de manière à former des bicouches emprisonnant du solvant. A cette étape, la plus part des liposomes sont composées de plusieurs couches. Des cycles de congélation/décongélation permettent de casser ces différentes couches. L'extrusion des liposomes permet enfin d'homogénéiser la taille des liposomes.

## 3.2 Conception des liposomes asymétriques

Le protocole utilisé pour fabriquer des liposomes asymétriques a été adapté d'une récente méthode publiée en 2018 [159]. Le principe de base est d'avoir deux populations de liposomes :

- Des liposomes accepteurs : 100% POPC (16:0-18:1PC)
- Des liposomes donneurs : 99% SDPS (180-22:6PS) et 1% NDB-PE. Le NDB-PE est un lipide fluorescent qui permettra de vérifier l'asymétrie de mes liposomes. Un contrôle a été réalisé avec des liposomes donneurs POPS. La charge négative du PS est obligatoire pour observer une activité de la dynamine aux étapes suivantes.



**FIGURE 3.1 – Représentation des différentes étapes de la préparation de liposomes par hydratation d'un film lipidique**

Tous les lipides utilisés proviennent d'*Avanti Polar Lipid*.

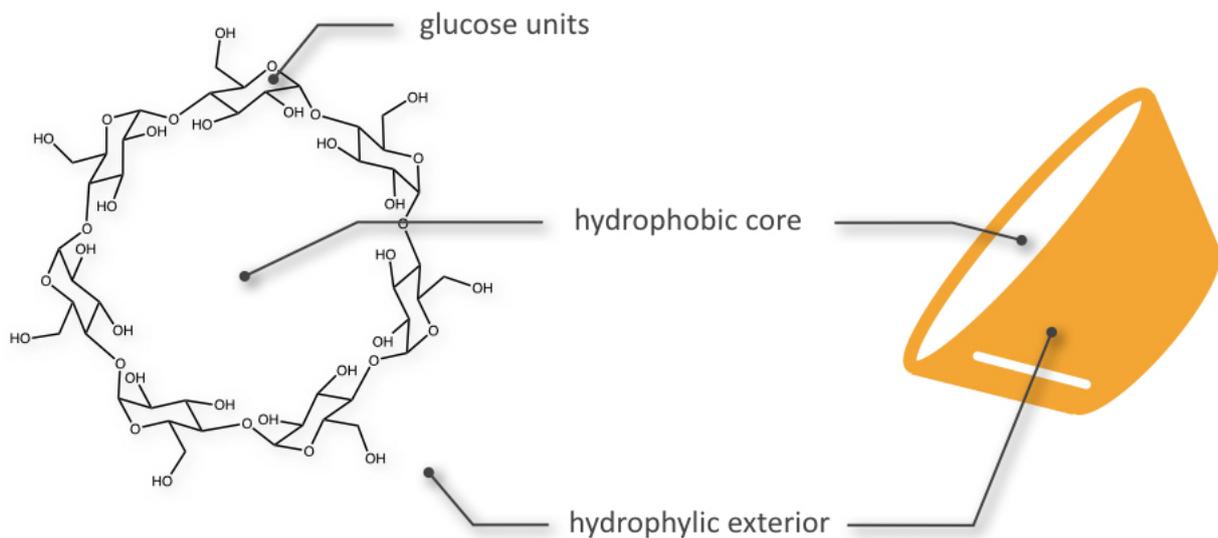
### 3.2.1 Préparation des liposomes accepteurs et donneurs

Les liposomes accepteurs et donneurs sont préparés de la même manière à l'exception du tampon de resuspension. Le mélange des lipides souhaités se fait dans des tubes en verre dans un solvant organique tel que le chloroforme. Ce solvant est ensuite évaporé sous azote. Ceci donne alors un film lipidique qui est repris dans un tampon aqueux. Les films donneurs sont resuspendus dans une solution à 210 mM de sucrose. Les films en suspension forment des vésicules multilamellaires hétérogènes en taille. Ces vésicules subissent ensuite 5 cycles de congélation (dans de l'azote liquide)/ décongélation (37 °C). Ces transitions radicales de température cassent les membranes et réduisent ainsi le nombre de bicouches de chaque liposome. Ensuite pour calibrer tous les liposomes à une taille donnée, nous utilisons un extrudeur qui applique une force mécanique sur la suspension et assure son passage à travers des filtres de polycarbonate dont la taille des pores est de  $0.4\mu\text{m}$  de diamètre.

### 3.2.2 Formation de liposomes asymétriques

Les liposomes donneurs subissent un lavage, avec une dilution au 1/5 dans un tampon aqueux dépourvu de sucrose. Ils sont ensuite ultra-centrifugés à 100 000 rpm pendant 30 min à 20 ° C. En resuspendant le culot dans un volume équivalent au volume initial, pour conserver la concentration de 2 mg/ml, le sucrose de l'extérieur des liposomes est éliminé.

**Extraction :** Les liposomes donneurs sont ensuite incubés 30 min avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD). La M $\beta$ CD est un sucre formant une cage (Figure 3.2). Très connue pour sa capacité à extraire le cholestérol, à plus forte concentration, elle est également capable d'extraire des phospholipides [160].

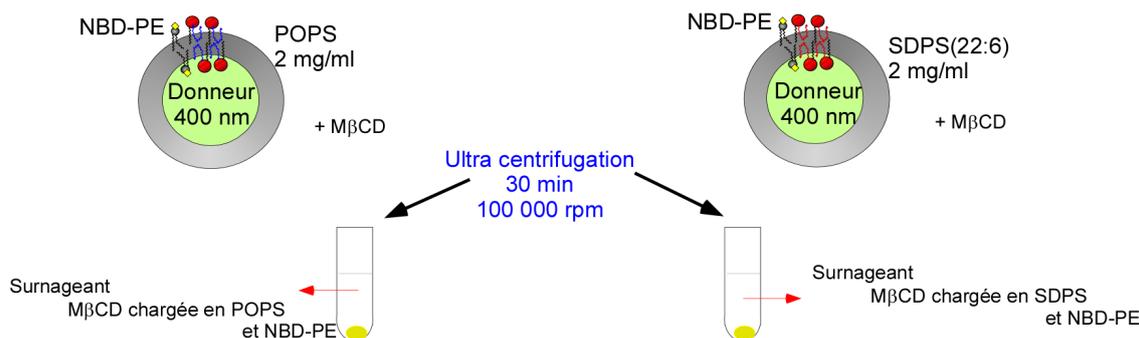


**FIGURE 3.2 – Représentation de la cage formée par la M $\beta$ CD**

J'ai utilisé cette propriété pour extraire les phospholipides PS polyinsaturés ou monoinsaturés selon les conditions. L'intégrité des liposomes donneurs m'important peu, j'ai utilisé 60 mM de M $\beta$ CD pour extraire au maximum les phospholipides d'intérêt. Cette concentration dissout 50 à 60 % des liposomes donneurs.

Après cette incubation, une ultra-centrifugation de 30 min à 100 000 rpm à 20 ° C entraîne la sédimentation des liposomes chargés en sucrose tandis que le surnageant contient la M $\beta$ CD chargée (Figure 3.3).

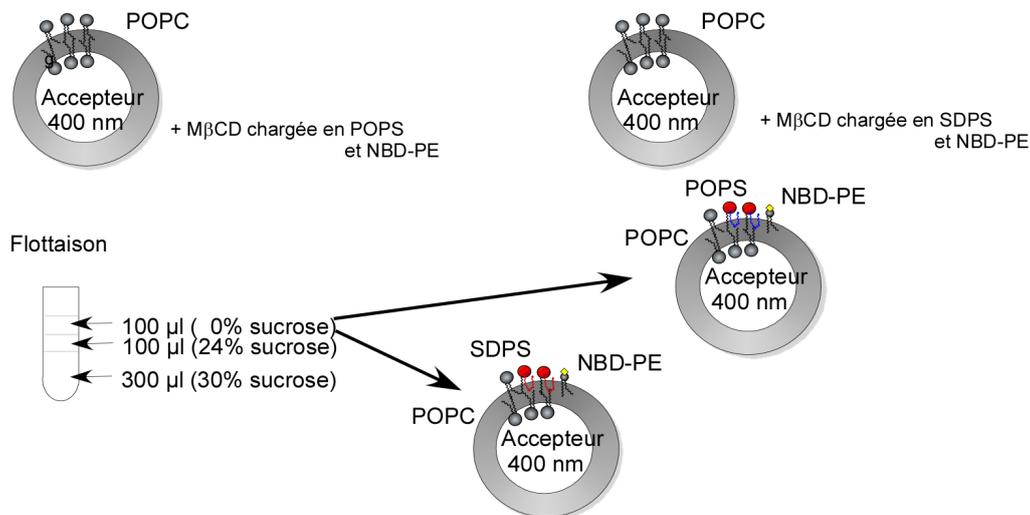
1- Extraction PS



**FIGURE 3.3 – Première étape de la formation de liposomes asymétriques : Extraction des PS par la MβCD depuis les liposomes donneurs**

**Transfert :** Les liposomes accepteurs à 3 mg/ml sont incubés 30 min avec 30 mM de MβCD chargés en phospholipides provenant des donneurs. Seul le feuillet externe des liposomes accepteurs est accessible à la MβCD donc seul ce feuillet devrait être soumis à des modifications. La MβCD et les liposomes asymétriques formés sont ensuite séparés par flottaison (Figure 3.4). A cette suspension est ajoutée 30 % (masse/volume) de sucrose dans un volume totale de 300 μl. Ce mélange est ensuite recouvert par 100 μl à 24 % de sucrose et d'une dernière couche de 100 μl de tampon sans sucrose (0 %). Les tubes sont ultra-centrifugés durant 1 h à 55 000 rpm avec une accélération et une décélération par tranche de 5 rpm à 20 °C. A la fin de cette étape, trois fractions sont récupérées en partant du bas vers le haut du tube où les liposomes asymétriques sont attendus. Dans certains cas, j'ai procédé à une deuxième étape de transfert de PS par la MβCD. Dans les liposomes donneurs il y a 1% de NBD-PE. Ce dernier a également dû être transféré uniquement sur le feuillet externe accessible.

2- Transfert PS



**FIGURE 3.4 – Deuxième étape de la formation de liposomes asymétriques : Transfert des PS par la MβCD dans les liposomes accepteurs**

### 3.3 Validation de l'asymétrie des liposomes et de leur intégrité

Afin de valider la formation de liposomes asymétriques, il faut vérifier l'incorporation des PS par des analyses lipidomiques, vérifier la taille des liposomes (DLS) et s'assurer de l'asymétrie des membranes (Figure 3.5).

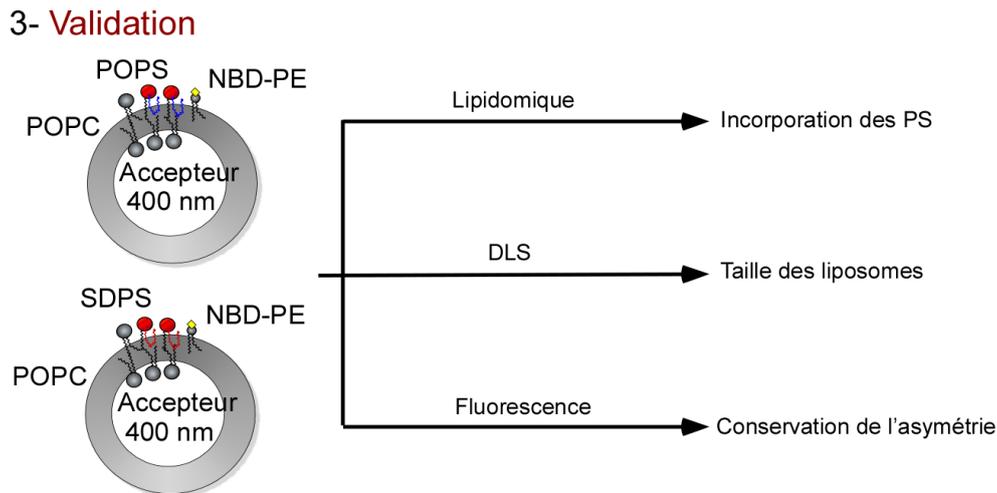


FIGURE 3.5 – Étapes de validation des liposomes asymétriques

#### 3.3.1 Vérification de la composition lipidique

##### Analyse lipidomique

La composition lipidique précise des liposomes nous est donnée par la plateforme d'analyse des biomolécules présente au sein de l'institut. Les lipides sont dans un premier temps extraits selon le protocole de Bligh et Dyer [161]. Leur analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un système UPLC Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplé à un Q-exactive Plus (ThermoFisher). Ils sont séparés en phase inverse à l'aide d'une colonne Accucore C18 et l'acquisition des spectres MS est obtenue par un Full Scan dd MS2; Top 15. Autrement dit, les lipides sont séparés selon leur hydrophobicité et tous les ions sont analysés mais seul les 15 plus intenses sont ensuite fragmentés. Afin de parfaire l'analyse, les données sont retraitées à l'aide du logiciel Lipid Search 4.1.16 (ThermoFisher).

### Analyse des différentes classes de phospholipides

Dans le but de m'affranchir des analyses lipidomiques durant les premières mises au point j'ai séparé les différentes classes de phospholipides par chromatographie sur couche mince (TLC) unidimensionnelle. Le protocole m'a été communiqué par le Dr. Thierry Ferreira. Il nécessite des plaques de verre sur lesquelles se trouve une couche de silice (Silica gel 60, Meck) avec une zone de concentration. Les impuretés sont éliminées par une première migration de solvant méthanol/chloroforme (1/1, v/v). La plaque est ensuite imprégnée d'une solution d'acide borique, 2,3%, w/v<sub>ethanol</sub> qui améliore la séparation des phospholipides. Une fois la plaque chauffée durant 15 min à 100°C, les échantillons repris dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) sont rapidement déposés dans la zone de concentration. Le solvant de migration utilisé, entraînant la séparation des phospholipides selon leur polarité, est composé de chloroforme/éthanol/eau/-triéthylamine (30/35/7/35, v/v). La migration dure environ 2 h. Une fois, le solvant évaporé, la révélation se fait par pulvérisation d'une solution de primuline (5 mg de primuline dans 100 ml d'un mélange acétone/eau, 80:20, v/v). La primuline émet de la fluorescence en présence de molécules à longue chaîne carbonée visible aux ultra violets.

### 3.3.2 Vérification de l'intégrité des liposomes asymétriques

Un bon moyen de vérifier l'intégrité des liposomes est de contrôler leur taille. La distribution des tailles des liposomes est déterminée par diffusion quasi-élastique de la lumière aussi appelée DLS pour *dynamic light scattering*. Lorsque la lumière d'un laser atteint une particule, la lumière diffuse dans toutes les directions. Cette méthode mesure la vitesse de déplacement des particules dans un solvant en tenant compte de la température et de la viscosité de celui-ci selon la formule suivante :

$$D = \frac{KT}{6\pi\vartheta R_h} \quad (3.1)$$

où D est la constante de diffusion, T la température et  $6\pi\vartheta R_h$  le coefficient de friction dépendant de la viscosité du solvant  $\vartheta$  et de la dimension de l'objet  $R_h$ . Une autre manière de comprendre cette formule est que plus une particule est grosse, moins elle diffuse dans le solvant. La constante de diffusion est obtenue par le calcul de fonctions d'auto corrélation qui permet d'extraire des fluctuations d'intensité de la lumière émise par la diffusion des particules. J'ai fixé ce nombre d'auto corrélations calculées à 10. A partir de celles-ci, une distribution de la taille des liposomes est déterminée.

### 3.3.3 Validation de l'asymétrie

Le NBD-PE est un 16:0-16:0PE sur lequel est greffé, au niveau de sa tête polaire, un groupement 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl le rendant fluorescent. La dithionite ou hydrosulfite de sodium  $Na_2S_2O_4$  éteint le signal fluorescent du NBD. Si les liposomes ont bien conservé leur asymétrie, tout le signal devrait s'éteindre. En revanche, si du *flip-flop* a eu lieu, un signal persistera car non accessible par la dithionite. L'ajout de détergent détruisant les membranes dégagera ainsi les dernières molécules fluorescentes afin d'éteindre complètement le signal. Du tampon aqueux est placé dans une cuve de 600  $\mu\text{l}$  à 37 ° C avec une agitation à 600 rpm. Le fluorimètre est paramétré de la façon suivante : une longueur d'onde excitation de 505 nm avec une bande passante de 1 nm et une longueur d'onde d'émission à 540 nm avec une bande passante de 10 nm. Après 100 secondes de mesure, j'ajoute les liposomes pour une concentration finale à 0.1 mM. 100 secondes plus tard, l'extinction du signal par 10 mM de dithionite est suivie pendant plus de 3 min. La réaction se termine par l'addition de 0,1% du détergent (Thesit).

## 3.4 Activité dynamine/endophiline

Comme expliqué précédemment dans l'introduction, la dynamine est une protéine indispensable au processus d'endocytose. Pour s'auto-assembler autour de la membrane et provoquer ainsi sa scission, elle consomme du GTP. Cette propriété est utilisée afin de quantifier l'activité de la dynamine sur les liposomes. L'hydrolyse du GTP par la dynamine a été mesurée par dosage colorimétrique. Un tampon HK est complété par 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de DTT et 500 mM de GTP et 0.1 mM de liposomes. Juste avant la mesure, 0.6 mM d'endophiline ont été ajoutées et la réaction a été initiée par l'addition et le mélange de 0.3 mM de dynamine. A 37 ° C et sous agitation constante, des aliquots de 7,5  $\mu\text{l}$  ont été prélevés à 15, 45, 75, 120, 180, 240 et 360 secondes et immédiatement mélangés à une goutte d'EDTA (5  $\mu\text{l}$ , 250 mM) dans une plaque 96 puits pour stopper la réaction. A la fin de l'expérience, 150  $\mu\text{l}$  d'une solution mère de malachite verte ont été ajoutés dans chaque puits. L'absorbance à 650 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques et comparée à celle d'une courbe standard de phosphate (0-200 mM) afin de déterminer la concentration en GTP hydrolysé par la dynamine. Des cinétiques types que l'on peut obtenir de ces expériences ont été présentées dans l'introduction (Figure 2.17)



## Troisième partie

### Résultats :

## L'asymétrie pour atteindre l'équilibre



# L'asymétrie des phospholipides

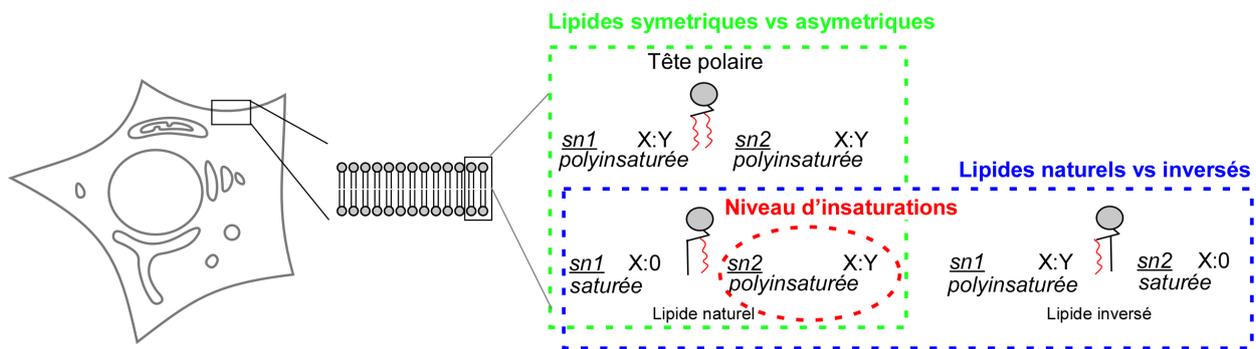
## 1.1 Introduction

Des études précédemment menées par l'équipe ont montré une adaptation de la chaîne aliphatique polyinsaturée DHA facilitant la déformation et la fission membranaire par une protéine de l'endocytose telle que la dynamine. Le but à présent est de poursuivre cette étude, de façon plus systématique en travaillant avec une large gamme de phospholipides ayant de 0 à 6 insaturations afin d'évaluer comment le niveau d'insaturation impacte les déformations membranaires (Figure 1.1). Ce projet a commencé expérimentalement avec l'arrivée d'un post-doctorant, le Dr. Manni au sein de l'équipe. Mon arrivée en thèse un an plus tard a permis d'allier expériences biochimiques et simulations de DM afin de comprendre **comment les membranes peuvent être une barrière de protection tout en étant suffisamment malléables pour faciliter la formation de vésicules.**

Toutes les expériences entreprises sont basées sur la fabrication de liposomes. Dans le but d'évaluer la **capacité de fission** des membranes, deux approches expérimentales ont été utilisées : (i) la détermination du taux d'hydrolyse du GTP, traduisant l'auto-assemblage de la dynamine, en fonction du profil des chaînes aliphatiques des liposomes (ii) la visualisation de la fission de GUV en présence de dynamine. Afin de déterminer la **perméabilité** de chaque membrane des expériences de fluorescence ont été réalisées.

En parallèle à l'expérimentation, j'ai réalisé différentes simulations AA pour comprendre la dynamique des chaînes à une échelle atomistique et des simulations CG afin de modéliser la formation d'un tube à partir d'une membrane plane. Ces dernières simulations ont une composition simplifiée en phospholipides (uniquement PC). En revanche, les simulations AA prennent en compte la composition lipidique utilisée expérimentalement : 30 % de PS, 20 % de PE, 16 % de PC, 1 % PIP<sub>2</sub> et 33 % de cholestérol (cf Matériel et Méthode) avec néanmoins un profil en chaînes aliphatiques variable.

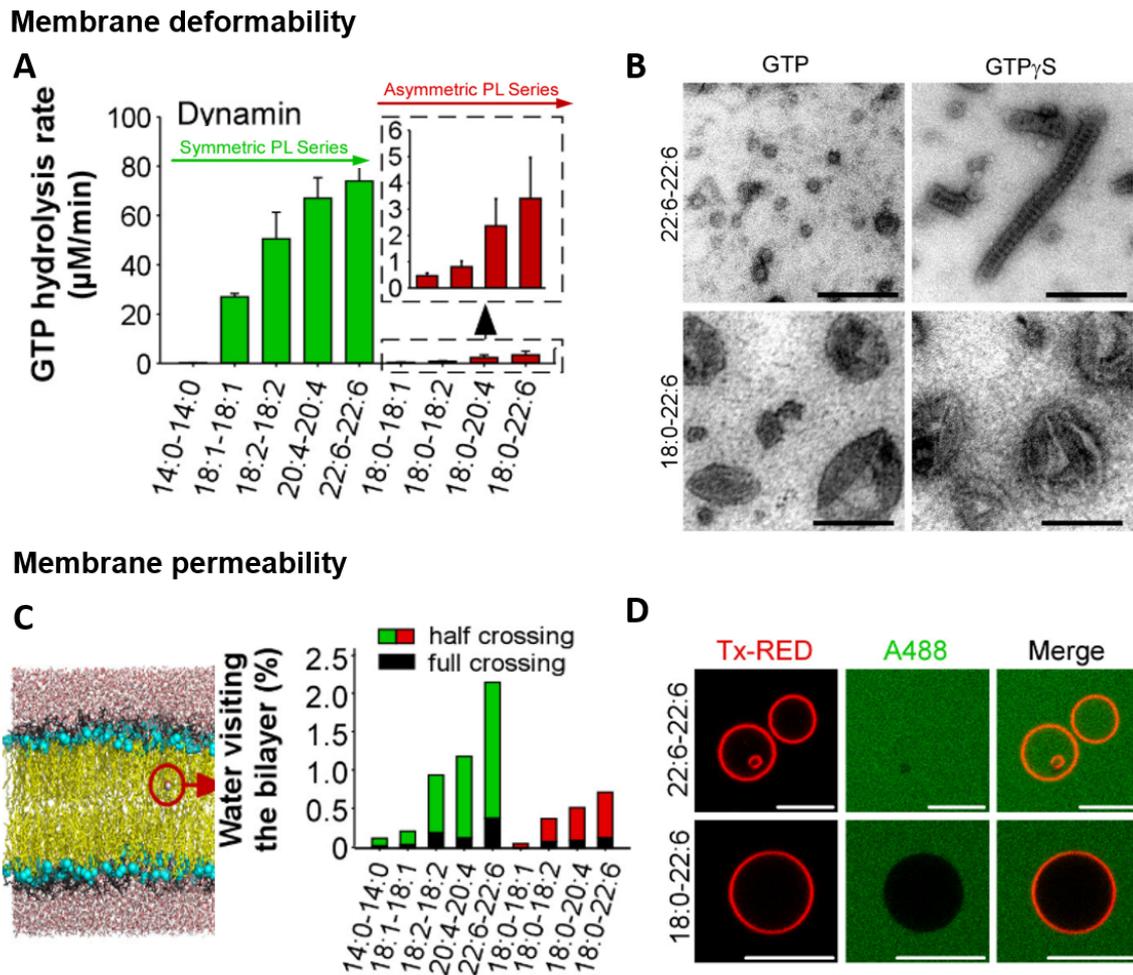
La grande variabilité des chaînes aliphatiques est connue depuis longtemps ainsi que leur répartition en position *sn1* ou *sn2*. Expérimentalement, il a été montré que le profil des chaînes aliphatiques en position *sn1* se limitait aux chaînes saturées et monoinsaturées. Les chaînes aliphatiques polyinsaturées quant à elles se trouvent en position *sn2* [162, 163]. Pour comprendre cette incorporation spécifique (*sn1* saturée - *sn2* polyinsaturée) j'ai travaillé aussi bien avec des phospholipides naturels que des phospholipides symétriques (même profil de chaînes aliphatiques en *sn1* et *sn2*) ou des phospholipides dont l'asymétrie a été inversée (*sn1* insaturée - *sn2* saturée) (Figure 1.1). Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *eLife* dont je suis 2<sup>ème</sup> auteur [154]



**FIGURE 1.1 – Représentation des différentes parties étudiées.** Analyse de l'effet de la polyinsaturation selon sa distribution au sein des phospholipides.

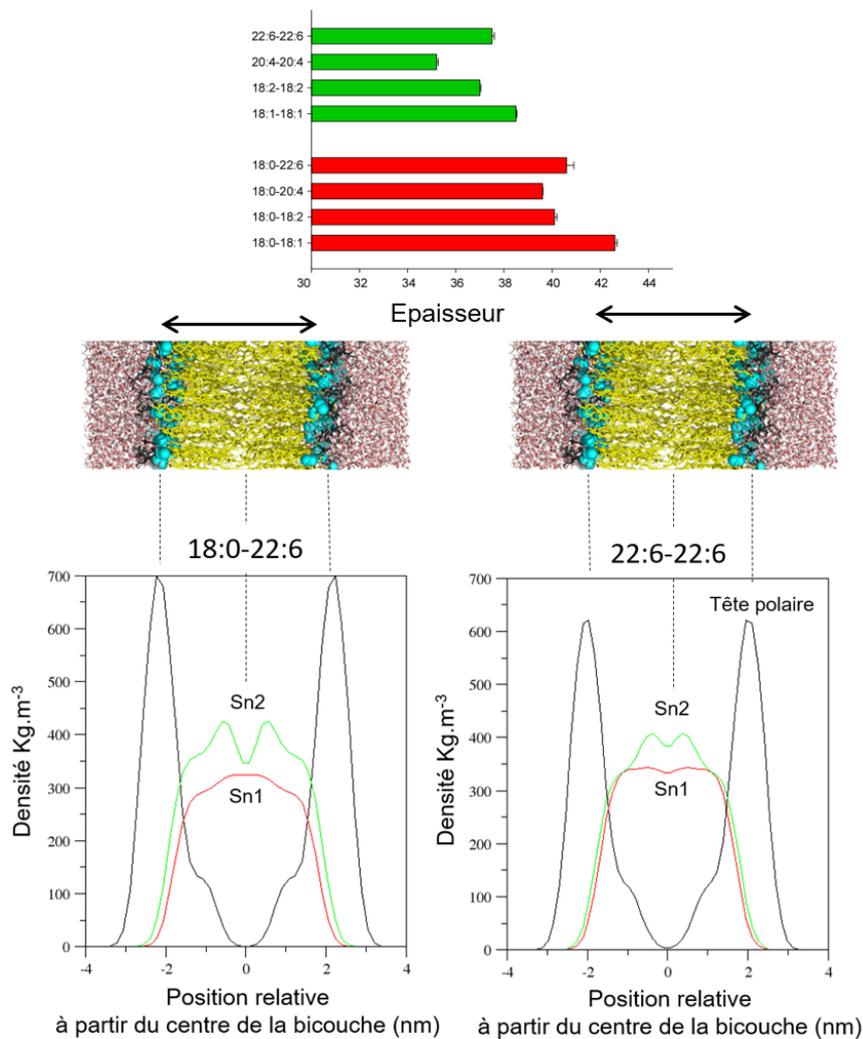
## 1.2 Symétrie vs asymétrie des phospholipides

Si la présence d'une chaîne 22:6n-3 facilite la déformation membranaire, qu'en est-il si les deux chaînes aliphatiques sont polyinsaturées ? Pour rappel, l'activité GTPase de la dynamine, nécessaire à son auto-assemblage sur les membranes, nous permet de quantifier indirectement la fission des membranes. Dans un premier temps, nous avons comparé la vitesse d'hydrolyse du GTP par la dynamine en présence de liposomes composés de phospholipides symétriques et d'autres composés de phospholipides asymétriques. L'auto-assemblage de la dynamine est radicalement plus rapide en présence de phospholipides polyinsaturés symétriques (Figure 1.2A). La capacité de vésiculation en est d'autant plus importante et est observable directement par microscopie électronique (Figure 1.2B). En revanche, des expériences de fluorescence ainsi que l'analyse de la perméation à l'eau des membranes simulées en AA ont révélé la faible barrière de protection formée par les phospholipides polyinsaturés symétriques engendrant une forte perméabilité des membranes (Figure 1.2CD).



**FIGURE 1.2 – Phospholipides asymétriques vs phospholipides symétriques.** Adapté de Manni et al. 2018 [154]. A : Taux d'hydrolyse du GTP par la dynamine (0,3 mM) avec des liposomes contenant des phospholipides à chaînes aliphatiques symétriques (vertes) ou asymétriques (rouges). B : Analyse au microscope électronique des liposomes 22:6-22 :6 ou 18:0-22:6. Après incubation avec de la dynamine (0,5 mM) et du GTP ou GTP $\gamma$ S. C : Gauche : photo d'une bicouche lipidique ayant la même composition que celle utilisée expérimentalement. Le cercle rouge met en évidence une molécule d'eau dans la région hydrophobe de la membrane. Droite : % de molécules d'eau visitant la région hydrophobe de la membrane par tranche de simulation de 100 ns en fonction de la composition de la chaîne acyle phospholipidique. D : Mesures de perméabilité des GUVs contenant 55 % moles de phospholipides polyinsaturés 18:0-22:6 ou 22:6-22:6, incubés avec de l'Alexa488 soluble. Visualisation par microscopie confocale.

La forte perméabilité des membranes composées de phospholipides polyinsaturés symétriques pourrait provenir de la dynamique très importante issue des deux chaînes aliphatiques . En perpétuel mouvement, elles occupent davantage l'interface membrane/eau. En l'absence d'une chaîne droite plus rigide, les membranes formées sont plus fines et perméables (Figure 1.3).



**FIGURE 1.3 – Organisation de la membrane en présence de phospholipides symétriques et asymétriques.** Epaisseur de la membrane composée de phospholipides symétriques (vert) et asymétriques (rouge). Répartition de la densité des chaînes *sn1* en rouge et *sn2* en vert. Les courbes de densité noires représentent les groupements phosphates

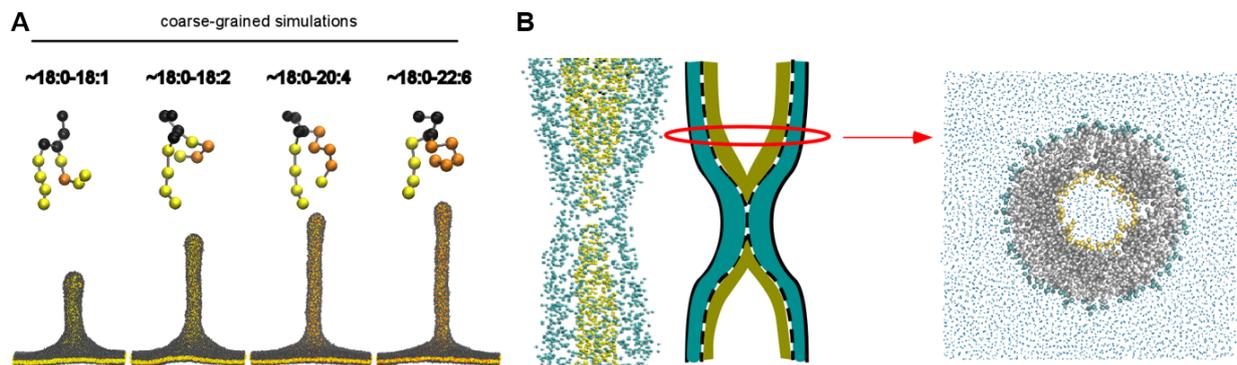
### Conclusion :

Les phospholipides polyinsaturés symétriques sont rares dans les membranes des mammifères [162]. Leur faible fréquence pourrait s'expliquer par la formation de membranes beaucoup trop permmissives. De plus, les membranes formées plus fines et pourraient avoir des conséquences sur le fonctionnement des protéines transmembranaires.

## 1.3 Impact du niveau d'insaturation

Par la suite, nous avons évalué l'impact du niveau d'insaturation des phospholipides polyinsaturés asymétriques sur la dynamique des chaînes aliphatiques et la déformabilité membranaire. Pour ce faire, les phospholipides utilisés comportent de 1 à 6 insaturations. Le taux

d'hydrolyse du GTP augmente avec le niveau d'insaturation en présence de dynamine et d'endophiline. *In silico*, j'ai pu modéliser la formation d'un tube à partir d'une membrane plane conformément au protocole détaillé précédemment dans la partie matériels et méthodes. En utilisant des modèles approximant les phospholipides 18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-20:4, 18:0-22:6 j'ai pu montrer la différence de flexibilité d'une membrane à l'autre, en fonction du niveau d'insaturation des phospholipides qui la composent. A force constante, plus il y a d'insaturation, plus le tube formé est long et fin (Figure 1.4.A). Nous avons pu également observer des fissions dans le cas des membranes 18:0-20:4 et 18:0-22:6 (Figure 1.4.B).



**FIGURE 1.4 – Déformation membranaire en simulation CG** A : Déformabilité croissante de la membrane avec le niveau d'insaturation des chaînes *sn2*. B : Représentation d'une hémifission observée dans une membrane composée de 18:0-20:4. Coupe transversale de la vésicule en devenir entourée d'eau. Les têtes polaires du feuillet externe sont représentées par des sphères bleues, celles du feuillet interne par des sphères jaunes. Les chaînes aliphatiques sont représentées en gris

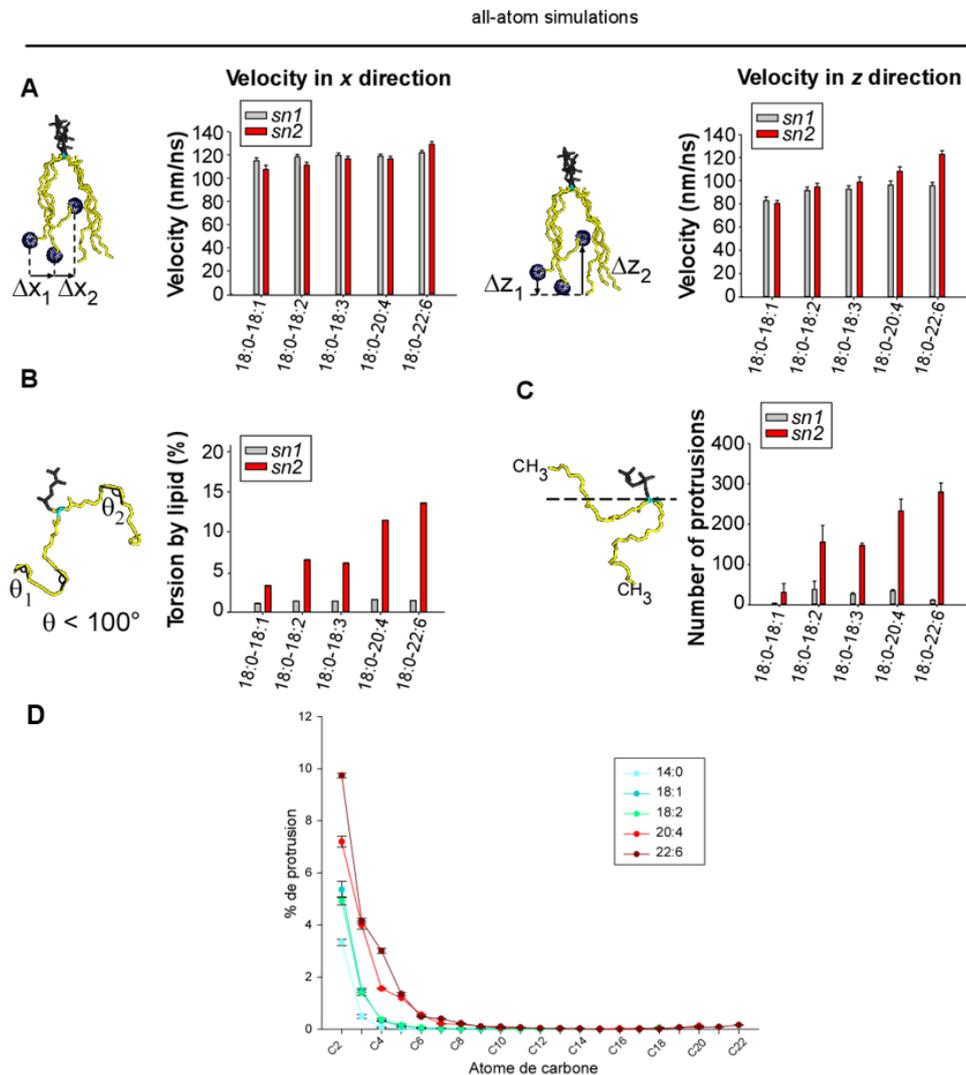
Les simulations AA m'ont permis de montrer la dynamique si particulière des phospholipides polyinsaturés. Tous les paramètres étudiés (vitesse de diffusion du groupement méthyl selon  $z$ , nombre de protrusion du groupement méthyl au dessus du glycérol et proportion de torsion) révèlent un mouvement supplémentaire apporté par la polyinsaturation dans la direction  $z$  suivant la normale à la membrane. Ces mouvements s'accroissent avec le niveau d'insaturation (Figure 1.5.A-C).

Le pourcentage de protrusion a été calculé pour l'ensemble des carbones des chaînes aliphatiques. La partie supérieure de la chaîne, des carbones 3 à 10 est sujette à davantage d'évènements de protrusion. Les évènements plus rares au niveau des derniers carbones sont accentués par le degré de polyinsaturation (Figure 1.5.D).

## Conclusion :

Les insaturations apportent une flexibilité aux chaînes en permettant des mouvements dans

la direction  $z$ . Ces mouvements facilitent la déformation membranaire en rendant la membrane plus malléable. Ces mouvements et donc cette malléabilité augmentent avec le niveau d'insaturation.

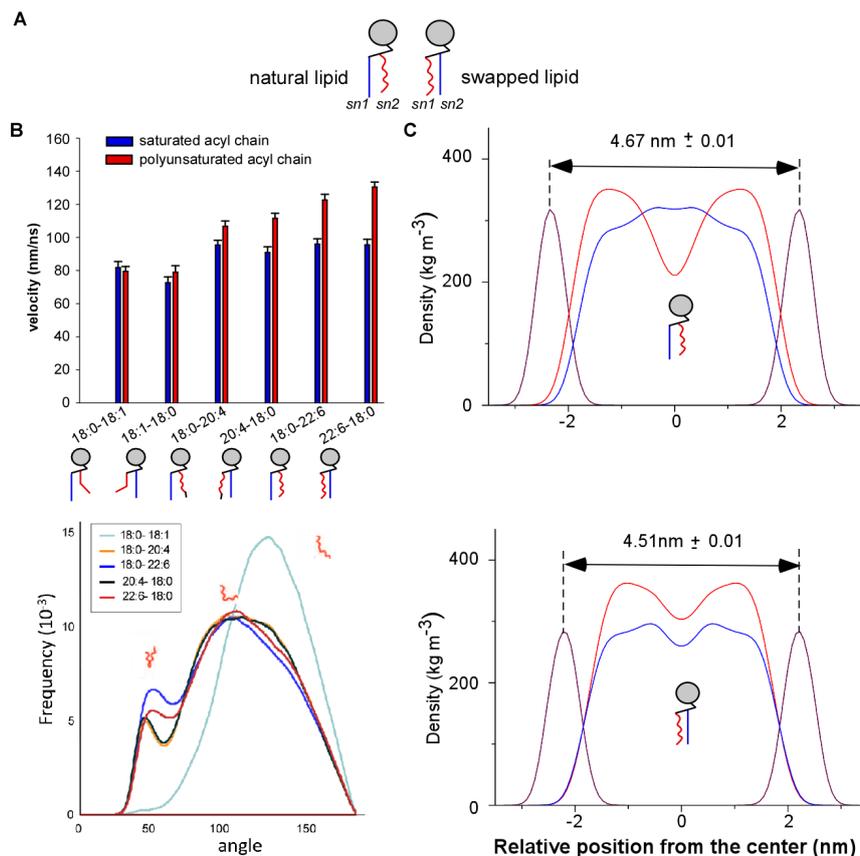


**FIGURE 1.5 – Dynamique des chaînes selon le niveau d'insaturation.** , adapté de Manni et al. 2018 [154]. A : Vitesse de diffusion du groupe terminal  $-CH_3$  de la chaîne aliphatique dans le plan de la membrane (direction x-y) ou le long de la normale à la membrane (direction  $z$ ). B : Fréquence des torsions (angle  $< 100^\circ$ ). C : Nombre de protrusions observées du groupement méthyle terminal au-dessus du glycérol du même lipide. D : Pourcentage de protrusion pour chaque carbone de la chaîne en position *sn2*.

## 1.4 Une asymétrie contrôlée

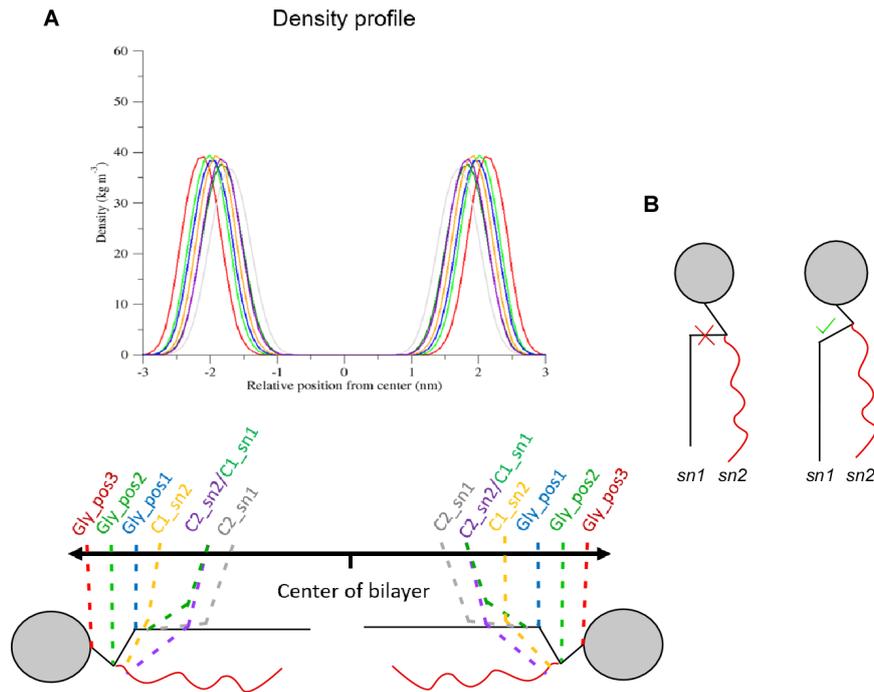
Enfin, la dernière question que l'on s'est posé est : **Est-ce-que la chaîne aliphatique polyinsaturée a le même effet si elle se trouve en position *sn1* plutôt qu'en position *sn2* ?** En raison de la difficulté à synthétiser des phospholipides "inversés", cette question a

été seulement étudiée par simulations de dynamique moléculaire (Figure 1.6.A). Les analyses de la dynamique de la chaîne aliphatique polyinsaturée reste inchangées (Figure 1.6.B). En revanche, l'organisation des chaînes, les unes par rapport aux autres, diffère (Figure 1.6.C). Comme discuté dans l'introduction, dans le cas des phospholipides naturels, la chaîne saturée *sn1* occupe le centre de la bicouche tandis que la chaîne *sn2* remonte vers l'interface. Avec les phospholipides polyinsaturés "inversés", cette différence de densité disparaît et la membrane semble plus mince qu'avec les phospholipides naturels. Peu de différences ont été observées quant à la déformabilité de la membrane.



**FIGURE 1.6 – Impact d'une inversion des chaînes *sn1* et *sn2***, adapté de Manni et al 2018 [154]. A : schéma représentant les lipides naturels et les lipides "inversés" B. Haut : Vitesse de diffusion du groupe méthyle terminal des chaînes aliphatiques le long de la normale à la membrane (direction  $z$ ). Bas : Distribution de l'angle formé par les chaînes *sn2* selon leur insaturation et leur position d'estérification sur le glycérol C. Profil de densité des chaînes aliphatiques à travers la bicouche de membrane. Les profils de densité du groupe phosphate, qui ont été utilisés pour estimer l'épaisseur de la bicouche, sont également illustrés.

Cette différence d'organisation des chaînes provient probablement de l'inclinaison du glycérol. En effet, les sites d'estérification ne sont pas dans le même plan selon  $z$ . Naturellement, la position *sn3*, rattachée à la tête polaire, se trouve près de la surface de la membrane. La position *sn2* se situe au niveau du début de la partie hydrophobe, s'en suit enfin la chaîne *sn1* qui s'enfonce plus profondément dans la membrane (Figure 1.7).



**FIGURE 1.7 – Organisation du glycérol dans les membranes.** A : Profil de densité des sites d'estérification du glycérol et des premiers carbones des chaînes en position *sn1* et *sn2* B : Représentation schématique correcte d'un phospholipide.

### Conclusion :

Ainsi, la position relative d'estérification des acides gras, saturés en *sn1* et polyinsaturés en *sn2*, dans les lipides naturels, facilite les mouvements z compensatoires, dans le but d'équilibrer la répartition de la densité au sein de la bicouche.

## 1.5 Conclusion générale

Une membrane doit former une barrière de protection suffisamment malléable pour être apte à former des vésicules dans un but de recyclage ou d'internalisation de signaux de façon rapide et contrôlée. La polyinsaturation des chaînes aliphatiques facilite considérablement ces déformations membranaires grâce à des mouvements verticaux qui s'amplifient avec le niveau d'insaturation. Par ailleurs, l'asymétrie des phospholipides semble être un facteur crucial pour garantir une certaine imperméabilité des membranes. Cette asymétrie ne suffit pas, elle est contrôlée par des enzymes de remodelage favorisant l'estérification d'AG saturé ou monoinsaturé en position *sn1* tout en laissant davantage de liberté pour la chaîne aliphatique en position *sn2*.

# Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage

Marco M Manni<sup>1,2</sup>, Marion L Tiberti<sup>1</sup>, Sophie Pagnotta<sup>3</sup>, Hélène Barelli<sup>1</sup>, Romain Gautier<sup>1</sup>, Bruno Antony<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur et CNRS, Valbonne, France; <sup>2</sup>Instituto Biofisika (UPV/EHU, CSIC), Leioa, Spain; <sup>3</sup>Centre Commun de Microscopie Appliqu e, Université Côte d'Azur, Nice, France

**Abstract** Phospholipid membranes form cellular barriers but need to be flexible enough to divide by fission. Phospholipids generally contain a saturated fatty acid (FA) at position *sn1* whereas the *sn2*-FA is saturated, monounsaturated or polyunsaturated. Our understanding of the impact of phospholipid unsaturation on membrane flexibility and fission is fragmentary. Here, we provide a comprehensive view of the effects of the FA profile of phospholipids on membrane vesiculation by dynamin and endophilin. Coupled to simulations, this analysis indicates that: (i) phospholipids with two polyunsaturated FAs make membranes prone to vesiculation but highly permeable; (ii) asymmetric *sn1*-saturated-*sn2*-polyunsaturated phospholipids provide a tradeoff between efficient membrane vesiculation and low membrane permeability; (iii) When incorporated into phospholipids, docosahexaenoic acid (DHA; omega-3) makes membranes more deformable than arachidonic acid (omega-6). These results suggest an explanation for the abundance of *sn1*-saturated-*sn2*-DHA phospholipids in synaptic membranes and for the importance of the omega-6/omega-3 ratio on neuronal functions.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.001>

\*For correspondence:  
antonny@ipmc.cnrs.fr

**Competing interests:** The authors declare that no competing interests exist.

**Funding:** See page 19

**Received:** 15 December 2017

**Accepted:** 14 March 2018

**Published:** 15 March 2018

**Reviewing editor:** Patricia Bassereau, Institut Curie, France

  Copyright Manni et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

## Introduction

Although it is common knowledge that polyunsaturated fatty acids (PUFAs) especially omega-3 FAs are important for health, the underlying mechanisms are not fully understood (**Bazinet and Lay , 2014; Marszalek and Lodish, 2005; Stillwell and Wassall, 2003**). PUFAs act through three different states: as free molecules, as precursors of biological mediators, or as esters in membrane phospholipids. The third form results from the activity of acyl transferases, which selectively incorporate defined fatty acids into phospholipids (**Harayama et al., 2014; Shindou et al., 2013**). This allows cells to control the acyl chain profile of their phospholipids, which varies tremendously among organisms, tissues and cells, and even among organelles (**Harayama et al., 2014; Hulbert, 2003; Shindou et al., 2013**). Interestingly, the FA diversity in phospholipids applies mostly to the *sn2* position of the glycerol backbone, hence resulting in asymmetric phospholipids containing a saturated FA at position *sn1* and an unsaturated FA at position *sn2* (**Hanahan et al., 1960; Lands and Merkl, 1963; Tattrie, 1959; Yabuuchi and O'Brien, 1968**).

For example, the brain is enriched in phospholipids with PUFAs, notably in the case of phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS) (**Tam and Innis, 2006; Yabuuchi and O'Brien, 1968**). Moreover, an interesting pattern has been detected in neurons, where the axon tip is enriched in phosphatidylcholine (PC) molecules containing arachidonate (AA or 20:4 omega-6) or

**eLife digest** Surrounding each living cell is a membrane that is mainly made of fat molecules called phospholipids. Similar membranes also surround many of the structures inside cells. It is important for life that these membranes are impermeable to many molecules; for example, they do not allow ions to cross them freely. The membranes also need to be flexible and allow cells to form different shapes. Flexible membranes also allow cells to move molecules around and to divide to produce new cells.

Each phospholipid includes two long chains of atoms called fatty acids. There are many fatty acids but they are typically grouped into saturated and unsaturated based on their chemical structures. The omega-3 and omega-6 fats are both groups of unsaturated fatty acids that are found in brain cells. Many phospholipids in cell membranes contain one saturated and one unsaturated fatty acid but it is not clear why.

By studying fat molecules in the laboratory and combining this with simulations, Manni et al. have now examined the effects of fatty acids on membranes. The investigation showed that phospholipids with both saturated and unsaturated fatty acids strike a balance between impermeable and flexible membranes. More unsaturated fatty acids make more flexible membranes but they are too permeable to be used in cells. The experiments also revealed that omega-3 unsaturated fats aid flexibility more than omega-6. This finding may help to explain why the relative amounts of omega-3 and -6 are so important in the membranes of brain cells.

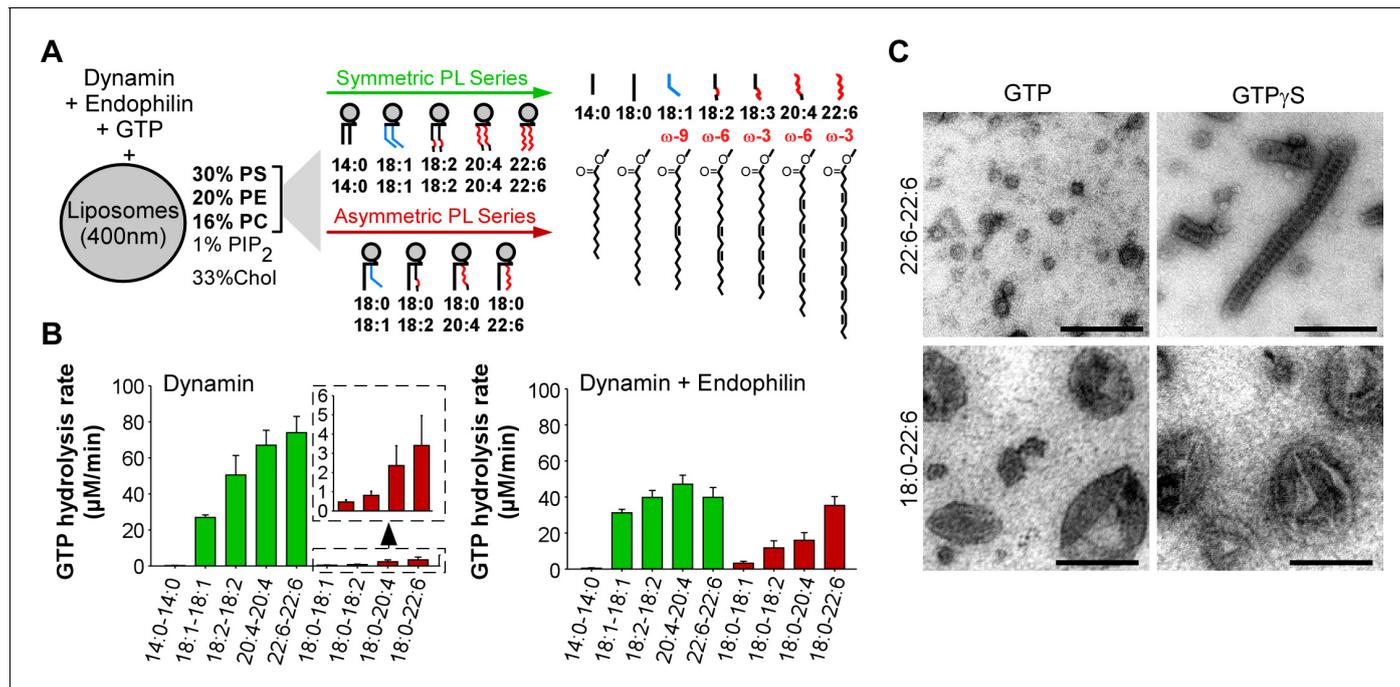
The connection between the fats we eat and the fatty acids in our cells is complex. Yet, findings like these serve to remind us that we need a balanced diet of different fats to keep all our cells healthy.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.002>

docosahexaenoate (DHA or 22:6 omega-3) at the expense of less unsaturated PC species (Yang et al., 2012). Thus, phospholipids with PUFAs are found at very high concentration in synaptic vesicles, where they account for up to 70 mol% of the phospholipid pool (Takamori et al., 2006). Retinal discs also show very high concentrations of phospholipids containing PUFAs (Boesze-Battaglia and Schimmel, 1997; Rice et al., 2015). These striking enrichments suggest that the fatty acyl chain profile of phospholipids could impact on the properties of cellular membranes.

We previously showed that phospholipids with the *sn*2 PUFA DHA facilitate the membrane shaping and fission activities of dynamin and endophilin (Pinot et al., 2014). These proteins are involved in the formation of endocytic vesicles by assembling into spirals around the neck of membrane buds (Antonny et al., 2016; Boucrot et al., 2015; Farsad et al., 2001; Slepnev and De Camilli, 2000; Sundborger et al., 2011). Physical manipulations, molecular dynamics simulations and biochemical measurements revealed that DHA-containing phospholipids decrease membrane-bending rigidity by adapting their conformation to membrane curvature, hence providing an advantage for membrane deformation and fission by the dynamin endophilin complex (Pinot et al., 2014) in contrast to more rigid membranes, which are less prone to fission (Morlot et al., 2012). More generally, the flexibility of polyunsaturated phospholipids along the membrane normal (*z* direction) might soften various mechanical stresses in the membrane (Barelli and Antonny, 2016).

The activity of dynamin and endophilin was previously determined on extreme membrane compositions: the phospholipids were either saturated-monounsaturated (16:0-18:1) or saturated-DHA (18:0-22:6?3) (Pinot et al., 2014). However, others PUFAs are found in phospholipids (Harayama et al., 2014; Tam and Innis, 2006; Yabuuchi and O'Brien, 1968). The most common are 18:2 omega-6 (linoleate), 18:3 omega-3 (linolenate), and 20:4 omega-6 (arachidonate), which differ by the number of double bonds and their position along the chain (Figure 1A). Here, we present a comprehensive study of the impact of phospholipid unsaturation on the mechanical activities of dynamin and endophilin where we varied both the degree of FA unsaturation and the combination of FAs at position *sn*1 and *sn*2 of phospholipids considering that most natural phospholipids have an asymmetric FA distribution (Hanahan et al., 1960; Lands and Merkl, 1963; Tattrie, 1959; Yabuuchi and O'Brien, 1968). The analysis reveals that the combination of an *sn*1 saturated acyl



**Figure 1.** GTPase activity of dynamin on liposomes made of phospholipids with different combinations of acyl chains. (A) Principle of the experiments and chemical structure of the various phospholipid species used in this study. (B) Rate of GTP hydrolysis by dynamin (0.3 µM) ±endophilin (0.6 µM) with large liposomes (400 nm extrusion) containing phospholipids with symmetric (green) or asymmetric (red) acyl chains at positions *sn1* and *sn2* as shown in A. Data are mean ± SD from three independent experiments. All lipid compositions are detailed in **Supplementary file 1**. (C) Electron microscopy analysis of 22:6-22:6 or 18:0-22:6 liposomes after incubation with dynamin (0.5 µM) and with GTP or GTPγS. With GTPγS, numerous dynamin spirals formed on 22:6-22:6 liposomes but not on 18:0-22:6 liposomes. With GTP, almost all 22:6-22:6 liposomes were transformed into very small (radius <20 nm) structures, whereas large parental profiles were still abundant in the case of 18:0-22:6 liposomes. Scale bar, 200 nm.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.003>

The following figure supplement is available for figure 1:

**Figure supplement 1.** Time course of GTP hydrolysis by dynamin in the presence of phospholipids with different acyl chains and EM analysis.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.004>

chain and an *sn2* polyunsaturated acyl chain solves the conundrum between making a membrane very permissive to vesiculation while maintaining a proper control of membrane permeability.

## Results

### Comprehensive analysis of the effect of phospholipid unsaturation on dynamin GTPase activity

GTP hydrolysis in the dynamin spiral occurs by a mutual nucleophilic attack between dynamin molecules from adjacent rungs (Chappie *et al.*, 2011). Consequently, the rate of GTP hydrolysis depends on dynamin self-assembly and, in effect, increases from negligible values in solution where dynamin is not polymerized, to rates in the range of 2 to 5 s<sup>-1</sup> on optimal membrane templates where dynamin forms spirals (Stowell *et al.*, 1999). We reasoned that GTPase measurements should provide a robust, although indirect, assay to survey a comprehensive library of liposomes made of phospholipids of defined acyl chains for their permissibility to the mechanical activity of dynamin. Dynamin was purified from rat brain, which contains mostly the neuron-specific dynamin-1 isoform, which has a higher membrane curvature generating activity than dynamin-2, the ubiquitous isoform (Liu *et al.*, 2011). This screen could also be performed in the presence of proteins that cooperate with dynamin (e.g. BAR domains). Thereafter, the most interesting membrane parameters could be further analyzed by more direct assays of dynamin mechanical activity (e.g. EM observations or assays with Giant Unilamellar Vesicles (GUVs)), which are difficult to standardize for large screens. This second

round of analysis is important because conditions exist where dynamin readily self-assembles and undergoes fast GTP hydrolysis and yet does not efficiently promote membrane vesiculation (Neumann and Schmid, 2013; Stowell et al., 1999).

We prepared large unilamellar vesicles (extrusion 400 nm) made of five lipids: PC, PE, PS, phosphatidylinositol(4,5)bispophosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) and cholesterol (Figure 1A). The relative amount of these lipids was kept constant and was chosen to be compatible with the recruitment of both dynamin, which interacts with PI(4,5)P<sub>2</sub>, and of BAR domain proteins, which interacts with negatively charged lipids (e.g. PS and PI(4,5)P<sub>2</sub>). However, PI(4,5)P<sub>2</sub> was present at low density (1 mol %; close to physiological values) to amplify the need for other facilitating factors such as cooperation with endophilin and membrane flexibility. The only variable in the liposome formation was the acyl chain profile of PC, PE and PS, which accounted for 99% of total phospholipids. Using commercially available or custom lipids, we systematically changed the acyl chain profile in two ways (Supplementary file 1 and Figure 1A). First, we gradually increased the length and unsaturation level of both the *sn1* and *sn2* acyl chains of PC, PE and PS according to the series 14:0-14:0, 18:1-18:1 (omega-9), 18:2-18:2 (omega-6), 20:4-20:4 (omega-6), and 22:6-22:6 (omega-3). Considering that most physiological phospholipids have different acyl chains at positions *sn1* and *sn2* (Hanahan et al., 1960; Lands and Merkl, 1963; Tattrie, 1959; Yabuuchi and O'Brien, 1968), we performed a second series in which we maintained a saturated (18:0) acyl chain at position *sn1* and solely changed the *sn2* chain (18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-20:4, 18:0-22:6). These asymmetric combinations are most frequent in mammalian lipids. The parallel increase in acyl chain length and unsaturation enabled all lipid mixtures to be fluid above 20°C (Huang, 2001).

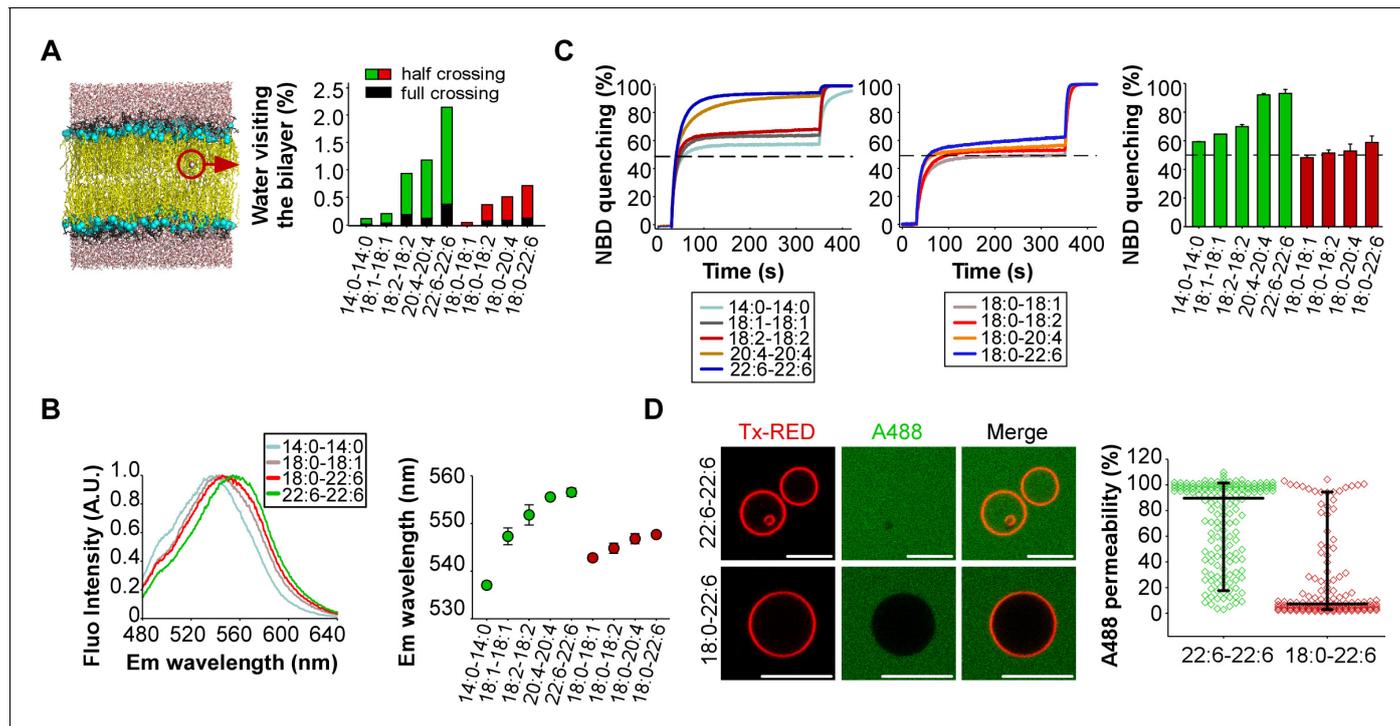
The result of this comprehensive analysis is shown in Figure 1B (typical GTPase experiments are provided in Figure 1—figure supplement 1A). Despite the identical composition of all liposomes in term of lipid polar head groups, the rate of GTP hydrolysis by dynamin varied up to 300-fold indicating that dynamin is very sensitive to the acyl chain content of the lipid membrane on which it acts. Two parameters emerged: acyl chain asymmetry and acyl chain unsaturation. First, the GTPase activity of dynamin increased dramatically (x 20) on membranes made of symmetric diunsaturated phospholipids compared to asymmetric saturated-unsaturated phospholipids. Second, the GTPase activity of dynamin increased with the unsaturated level of phospholipids (18:1 < 18:2 < 20:4 < 22:6), a trend that was observed in both symmetric and asymmetric phospholipid series.

## Membranes with symmetric polyunsaturated phospholipids are highly permeable to solutes

How to explain the spectacular effect of symmetric diunsaturated phospholipids on the GTPase activity of dynamin? By negative staining electron microscopy, we observed that dynamin alone extensively deformed 22:6-22:6 liposomes, whereas 18:0-22:6 liposomes were largely unaffected (Figure 1C and Figure 1—figure supplement 1B). The analysis was performed either in the presence of GTPγS, where dynamin self-assembles into stable spirals on membranes, or in the presence of GTP, where dynamin spirals further constrict to promote liposome vesiculation into round profiles of ≈ 20 nm in diameter. Liposomes containing phospholipids with two polyunsaturated acyl chains appeared exceptionally malleable as compared to liposomes made of phospholipids with one saturated and one polyunsaturated acyl chain.

Deformation of spherical liposomes is necessarily accompanied by a diminution of volume of the encapsulated solution. For example, the COPI coat is more efficient at making vesicles from liposomes that have been permeabilized with a pore-forming toxin (Manneville et al., 2008). Because a previous study reported that membranes made of 18:2-18:2-PC or 18:3-18:3 PC showed a two to three fold higher water permeability than membranes made of 18:0-18:1-PC or 18:0-18:2-PC (Olbrich et al., 2000), we suspected that membranes with dipolyunsaturated phospholipids might be very permissive to deformation by dynamin due to higher permeability.

To assess the permeability of our artificial membranes, we combined molecular dynamics simulations with various measurements. The simulations were performed at the all-atom scale on bilayers containing 2 × 144 phospholipids with the same composition as that used in the experiments. To evaluate water permeability, we determined the number of water molecules that visit the hydrophobic part of the membrane during a period of 100 ns (Figure 2A). These movements were subdivided into two classes: events in which the water molecule fully crosses the lipid bilayer; events in which the water molecule enters into the hydrophobic region of the bilayer and then exists on the same



**Figure 2.** Membranes with symmetrical but not asymmetrical polyunsaturated phospholipids are highly permeable. (A) Left: snapshot of a lipid bilayer with the same composition as that used in the dynamin GTPase assay. The red circle highlights a water molecule in the membrane hydrophobic region. Right: % of water molecules visiting the membrane hydrophobic region during a 100 ns simulation as a function of phospholipid acyl chain composition. (B) Hydration of the interfacial region of the same liposomes as that used in **Figure 1** as measured by the fluorescence of the push-pull pyrene dye PA. Left: typical emission fluorescence spectra. Right: emission wavelength as a function of phospholipid acyl chain composition. (C) Dithionite-mediated NBD quenching assay. At  $t = 30$  s, dithionite was added to the same liposomes as that used in the GTPase assay but also containing PE-NBD. The dotted line indicates 50% of quenching, which is the expected value if only externally orientated PE-NBD molecules are quenched by dithionite. At  $t = 350$  s, 0.1% Triton X-100 was added to allow the quenching of all PE-NBD molecules. Data on the right bar plot are mean  $\pm$  variation from two independent experiments. (D) GUVs permeability measurements. GUVs containing the 55 mol % of the indicated polyunsaturated phospholipids were incubated with soluble Alexa488 and imaged by confocal microscopy. Data show all GUVs measured from six independent experiments and from two independent GUV preparations (large horizontal bar: mean; vertical bar SD). All lipid compositions are detailed in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.005>

The following figure supplement is available for figure 2:

**Figure supplement 1.** Emission fluorescence spectrum of the push-pull pyrene dye PA.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.006>

side. In saturated (14:0-14:0) membranes, only few water movements were detected. In membranes made of phospholipids with one unsaturated FA, the number of moving water molecules increased up to 10-fold with the level of acyl chain unsaturation (18:1 < 18:2 < 20:4 < 22:6) (**Figure 2A**). Importantly, membranes with phospholipids containing two unsaturated FA showed a further 2 to 3-fold increase in the number of moving water molecules as compared to membranes with asymmetric saturated-unsaturated phospholipids. This increase occurred whatever the acyl chain considered (e.g. 20:4-20:4 vs 18:0-20:4 or 22:6-22:6 vs 18:0-22:6).

If membranes with symmetric polyunsaturated phospholipids are more hydrated than membranes with asymmetric saturated-unsaturated phospholipids, this should influence the fluorescence of polarity-sensitive dyes at the membrane interface. To investigate this possibility, we used a recently synthesized push-pull pyrene (PA). This probe, similarly to the popular probe Laurdan, changes its emission maximum as a function of membrane hydration and solvent relaxation, which are parameters linked to lipid order (**Niko et al., 2016**). PA showed a gradual red shift in emission when the number of double bonds in the *sn2* acyl chain increased (18:0-18:1 < 18:0-18:2 < 18:0-20:4 < 18:0-

22:6) (**Figure 2B** and **Figure 2—figure supplement 1**). However, replacing asymmetric saturated-polyunsaturated phospholipids with dipolyunsaturated phospholipids caused a much larger red shift (**Figure 2B** and **Figure 2—figure supplement 1**; e.g. 18:0-22:6 << 22:6-22:6), suggesting that duplication of the PUFA in phospholipids dramatically increased membrane hydration.

Considering the importance of maintaining ion gradients across biological membranes, we next assessed the permeability of our liposomes to the oxoanion dithionite ( $[S_2O_4]^{2-}$ ) by an NBD quenching assay. When added to liposomes, dithionite (MW = 128 Da) immediately quenches the fraction of (C16:0-C16:0) PE-NBD that is present in the outer leaflet. This fraction is about 50% but varies depending on factors like membrane curvature or the presence of multi-lamellar liposomes (**Kamal et al., 2009**). Thereafter, dithionite slowly quenches the remaining PE-NBD molecules. This process occurs either by penetration of dithionite into the liposomes or because of PE-NBD flip-flop. Previous work established that dithionite entry is about 1000 times faster than lipid flip-flop (**Armstrong et al., 2003**). Therefore, the slow phase in PE-NBD quenching experiments should reflect dithionite permeability. **Figure 2C** shows that membrane permeability to dithionite modestly increased with the level of polyunsaturation in asymmetric phospholipids (18:0-18:1 < 18:0-18:2 < 18:0-20:4 < 18:0-22:6) and that liposomes with symmetric polyunsaturated phospholipids showed a > 10 fold higher permeability. This effect was particularly evident for 20:4-20:4 and 22:6-22:6 membranes: 95% of PE-NBD was quenched after 300 s incubation with dithionite as compared to 55–60% in the case of 20:4 and 18:0-22:6 membranes. Note that the liposomes used in the dithionite experiments were the same as that used in the dynamin experiments (see **Figure 1B**) to allow a direct comparison between the two assays. However, a drawback of liposomes obtained by extrusion through large pore size filters (here 400 nm), is the presence of multi-lamellar species (**Kamal et al., 2009**). For such species, dithionite has to cross several bilayers to fully quench all PE-NBD molecules. This effect probably explains why the second phase of PE-NBD quenching, although quite fast in the case of 20:4-20:4 and 22:6-22:6 liposomes, was not complete; a small percentage ( $\approx$  5%) of NBD signal remained unquenched after 300 s incubation (**Figure 2C**). Despite these limitations, these experiments suggest that the presence of two polyunsaturated acyl chains in phospholipids strongly compromise membrane impermeability to ions.

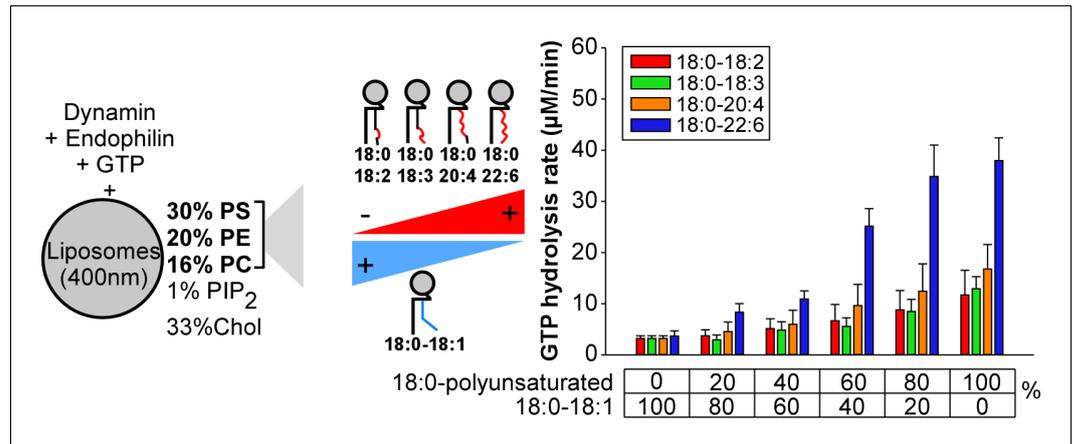
Last, we visualized the permeability of GUVs to the large fluorescent solute Alexa A488 maleimide (MW = 720 Da). This compound was added externally to the GUVs, which were imaged by fluorescence microscopy (**Figure 2D**). Again, the difference between symmetric and asymmetric polyunsaturated phospholipids was clear-cut. GUVs containing 55 mol% 22:6-22:6 phospholipids were about 10 times more permeable to Alexa A488 maleimide than GUVs containing 55 mol% 18:0-22:6 phospholipids.

Altogether, these experiments revealed a remarkable correlation between the ability of dynamin alone to readily vesiculate membranes and the permeability of these membranes to water and even to large or charged solutes.

## Dynamin GTPase activity on asymmetric saturated-polyunsaturated phospholipids

If membranes with symmetric diunsaturated phospholipids appear exceptionally prone to vesiculation by dynamin, their high permeability to ions and large solutes disqualify them for the formation of selective membrane barriers. The GTPase assay of **Figure 1B** and the membrane permeability experiments of **Figure 2** suggest that asymmetric saturated-polyunsaturated phospholipids offer a compromise between low permeability and dynamin activity. Even though the intrinsic GTPase activity of dynamin on such liposomes was low, it increased about 10 times in the presence endophilin-A1 (**Figure 1B**).

In cells, endophilin works in close partnership with dynamin both through protein/protein interactions and through the ability of the two proteins to form membrane-deforming spirals (**Boucrot et al., 2015; Farsad et al., 2001; Sundborger et al., 2011**). The BAR domain of endophilin is followed by an SH3 domain, which interacts with the proline-rich region of dynamin leading to cooperative BAR/dynamin membrane recruitment (**Farsad et al., 2001; Meinecke et al., 2013; Sundborger et al., 2011**). In addition, membrane deformation by BAR domains facilitates dynamin self-assembly, which by itself is a relatively weak membrane deforming protein and which preferentially self-assembles on pre-curved membranes (**Neumann and Schmid, 2013; Roux et al., 2010**),



**Figure 3.** Higher activity of dynamin on liposomes containing 18:0-22:6 phospholipids as compared to other polyunsaturated phospholipids. GTPase activity of dynamin (0.3 μM) in the presence of endophilin (0.6 μM) and with large liposomes (400 nm extrusion) containing increasing amounts of the indicated asymmetric polyunsaturated phospholipids at the expense of 18:0-18:1 phospholipids. Data are mean ±SD from three independent experiments. All lipid compositions are shown in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.007>

The following figure supplement is available for figure 3:

**Figure supplement 1.** Dynamin activity at different PIP<sub>2</sub> levels or with different BAR domains on polyunsaturated membranes.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.008>

unless the membranes are particularly deformable as observed with symmetric unsaturated phospholipids (**Figure 1C**).

These considerations and the fact that asymmetric polyunsaturated phospholipids are much more frequent than symmetric ones in biological membranes prompted us to focus on reconstitutions in which both dynamin and endophilin were present and acted on membranes with asymmetric phospholipids. Under such conditions, the exact nature of the sn2 acyl chain appeared very important: significant differences in the dynamin GTPase activity were observed between acyl chain combinations that are chemically very close (e.g. 18:0-20:4 vs 18:0-22:6) (**Figure 1A**).

To better analyze these differences, we repeated the GTPase assay under conditions where we gradually increased the amount of asymmetric polyunsaturated phospholipids at the expense of 18:0-18:1 phospholipids (**Figure 3**). Two omega-3 combinations (18:0-18:3 and 18:0-22:6) and two omega-6 combinations (18:0-18:2 and 18:0-20:4) were included in the analysis to evaluate the importance of the double bond position. All polyunsaturated phospholipids facilitate dynamin GTPase activity. However, the effect of 18:0-22:6 phospholipids surpassed by 2 to 4-fold that observed with the less complex asymmetric polyunsaturated phospholipids (18:0-18:2, 18:0-18:3 and 18:0-20:4) (**Figure 3**). Dynamin GTPase activity plateau at about 60 mol% of 18:0-22:6 phospholipids, close to the amount of polyunsaturated lipids in synaptic vesicles (*Takamori et al., 2006*).

To check that the effect of asymmetric polyunsaturated phospholipids was not restricted to our particular conditions, we modified several parameters. First, we varied the % of PI(4,5)P<sub>2</sub>. In a background of 18:0-18:1 phospholipids, the GTPase activity of dynamin in the presence of endophilin was low and increased with the % of PI(4,5)P<sub>2</sub> (from 0% to 5%; **Figure 3—figure supplement 1A**). In a background of 18:0-18:2, 18:0-18:3 or 18:0-20:4 phospholipids, the GTPase activity was much higher and required not more than 1 mol% PI(4,5)P<sub>2</sub>. Strikingly, the activity of dynamin was almost maximal with 18:0-22:6 phospholipids even in the absence of PI(4,5)P<sub>2</sub> (**Figure 3—figure supplement 1A**). Next, we replaced endophilin by SNX9, another BAR-domain containing protein that interacts with dynamin. Both endophilin and SNX9 increased dynamin activity much more efficiently on membranes containing 18:0-22:6 phospholipids or 18:0-20:4 than 18:0-18:1 phospholipids (**Figure 3—figure supplement 1B**). In addition, SNX9 was more efficient than endophilin for assisting dynamin activity in agreement with a previous study (*Neumann and Schmid, 2013*). All these

experiments converge towards the same conclusions. First, all asymmetric saturated-polyunsaturated phospholipids favor dynamin GTPase activity, notably under conditions close to physiological conditions (low concentration of  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , low protein concentration, cooperation with BAR-domain proteins). Second, docosahexaenoic acid (22:6), which is the most polyunsaturated species of the omega-3 family, surpasses all other tested species including arachidonate (20:4), the most polyunsaturated species of the omega-6 family.

### Membrane fission by dynamin and endophilin is sensitive to the omega-6/omega-3 ratio

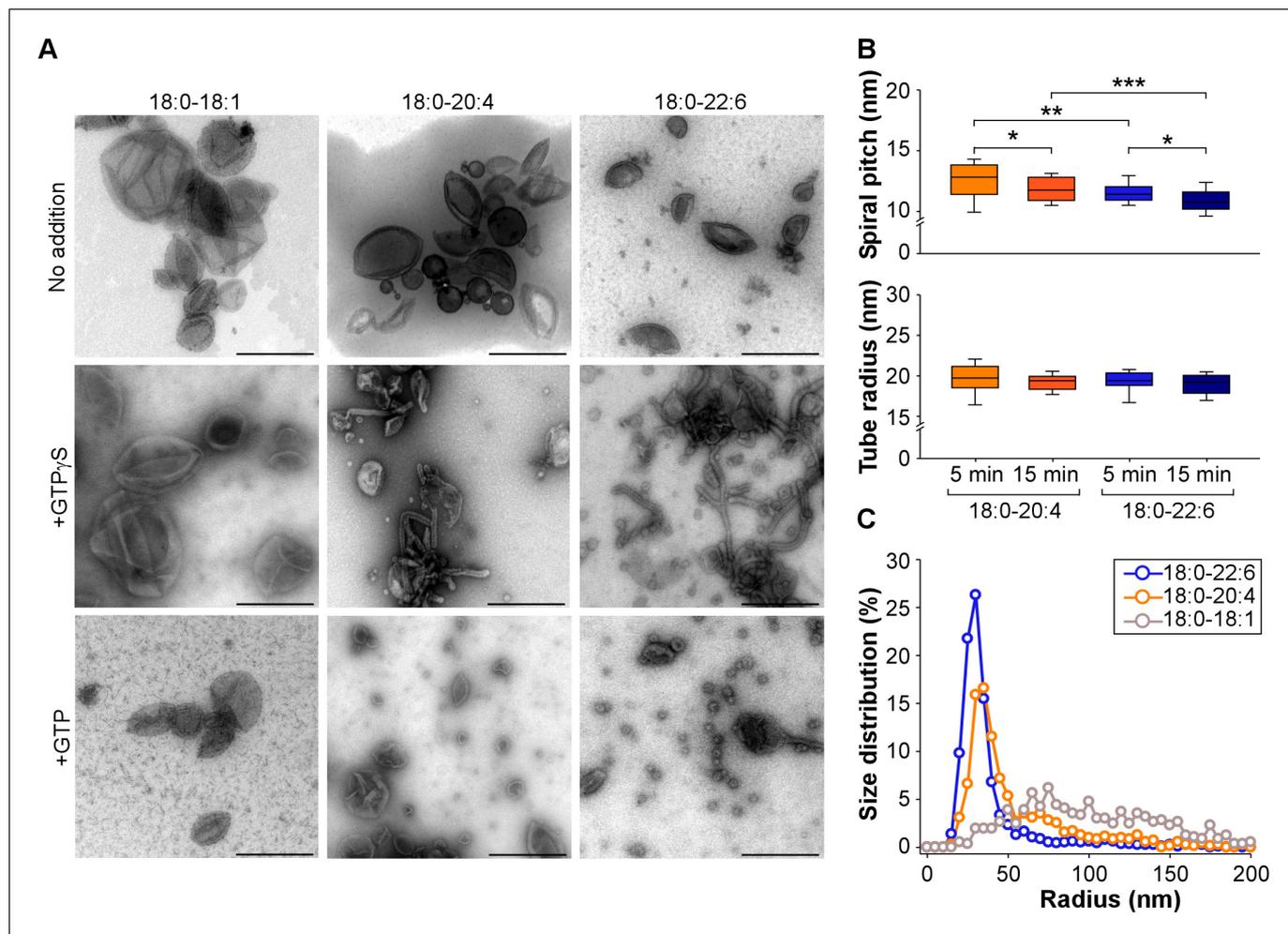
18:0-20:4 and 18:0-22:6 phospholipids are abundant in specialized membranes (e.g. synaptic vesicles; *Takamori et al., 2006*). Considering the importance of the omega-6/omega-3 ratio for health, we next focused on these acyl chain combinations and used 18:0-18:1 membranes as negative control.

By transmission electron microscopy (TEM) we observed that both 18:0-20:4 and 18:0-22:6 liposomes but not 18:0-18:1 liposomes, became extensively deformed after incubation with dynamin, endophilin and  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  or GTP. With  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , membrane tubulation dominated (*Figure 4A*). The tubes were surrounded by a protein spiral with a pitch of ~20 nm characteristic of the endophilin-dynamin complex (*Farsad et al., 2001; Pinot et al., 2014; Sundborger et al., 2011*) (*Figure 4B* and *Figure 4—figure supplement 1A*). However, the tubes formed from 18:0-22:6 membranes were significantly thinner than the tubes formed from 18:0-20:4 membranes (*Figure 4B*). With GTP present, liposome vesiculation dominated (*Figure 4A*). The size distribution of the membrane profiles was different between 18:0-20:4 and 18:0-22:6 phospholipids (*Figure 4C*). With 18:0-20:4 phospholipids, there was a remaining peak of large membrane profiles ( $R > 50$  nm), which coexisted with a peak of small vesicles ( $R < 50$  nm). With 18:0-22:6 phospholipids, the liposomes were almost fully transformed into small vesicles. In addition, the vesicles formed from 18:0-22:6 membranes were slightly smaller than that formed from 18:0-20:4 membranes (*Figure 4C*). Note that after short incubation with GTP, some tubes were observed both with 18:0-20:4 and 18:0-22:6 liposomes (*Figure 4—figure supplement 1B*). These tubes were not straight as with  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  but showed constrictions, suggesting snapshots in the process of membrane fission (black arrows in *Figure 4—figure supplement 1B*).

Considering the technical limitations caused by spontaneous membrane fission on TEM grids (*Danino et al., 2004*), we next performed a GUV shrinking assay (*Meinecke et al., 2013*). In these experiments, dynamin, endophilin and GTP were added to GUVs containing 55 mol% of polyunsaturated phospholipids, which were pre-stabilized in buffer at the reaction temperature (37°C). Dynamin, endophilin and GTP caused GUV consumption over time for both 18:0-20:4 and 18:0-22:6 membranes (*Figure 5A*) but not for the control GUVs that contained only 18:0-18:1 phospholipids (*Figure 5—figure supplement 1A and B*). After 1 hr of incubation, the difference between 18:0-20:4 and 18:0-22:6 phospholipids was significant, as we detected a larger population of shrunk 18:0-22:6 GUVs and a higher amount of intact 18:0-20:4 GUVs (*Figure 5B*). The difference in GUV shrinking between 18:0-20:4 and 18:0-22:6 phospholipids was already evident after 15 min and increased over time (*Figure 5C*).

### Differences between asymmetric polyunsaturated phospholipids as captured by MD simulations

To better understand the advantage provided by asymmetric polyunsaturated phospholipids on membrane deformation and fission, we conducted MD simulations on lipid bilayers. In the coarse-grained mode, we considered large membrane patches and imposed a pulling force to deform them into a tube, which might undergo fission (*Baoukina et al., 2012; Pinot et al., 2014*) (*Figure 6A and B*). This approach is informative in terms of membrane mechanics, but the 1:4 scale of the MARTINI force field (one elementary bead for 3 to 4 bonded atoms) makes the depiction of the chemistry of polyunsaturated phospholipids quite imprecise. Nevertheless, we could construct PC bilayers in which acyl chains made of 4 or five beads approximate the series 18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-20:4 and 18:0-22:6 (*Figure 6A and B*). In the all-atom mode, we considered membrane patches of  $2 \times 144$  phospholipids with the same composition as that used in the experiments. This approach is limited



**Figure 4.** Higher vesiculation activity of dynamin and endophilin on liposomes containing 18:0-22:6 phospholipids compared to 18:0-20:4 phospholipids. (A) Electron micrographs of 18:0-18:1, 18:0-20:4 and 18:0-22:6 liposomes (400 nm extrusion) before or after incubation with dynamin (0.5  $\mu$ M), endophilin (1  $\mu$ M), and GTP or GTP $\gamma$ S (500  $\mu$ M). Scale bar, 500 nm. (B–C) Quantification of membrane tubulation (B) and vesiculation (C) from three independent experiments similar to that shown in A. In B, the tube radius and the protein spiral pitch was determined after 5 or 15 min incubations of the liposomes with dynamin, endophilin and GTP $\gamma$  (see also **Figure 4—figure supplement 1**). In C, the size distribution of the membrane profiles was determined after 30 min incubation of the liposomes with dynamin, endophilin and GTP. All lipid compositions are showed in **Supplementary file 1**. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.009>

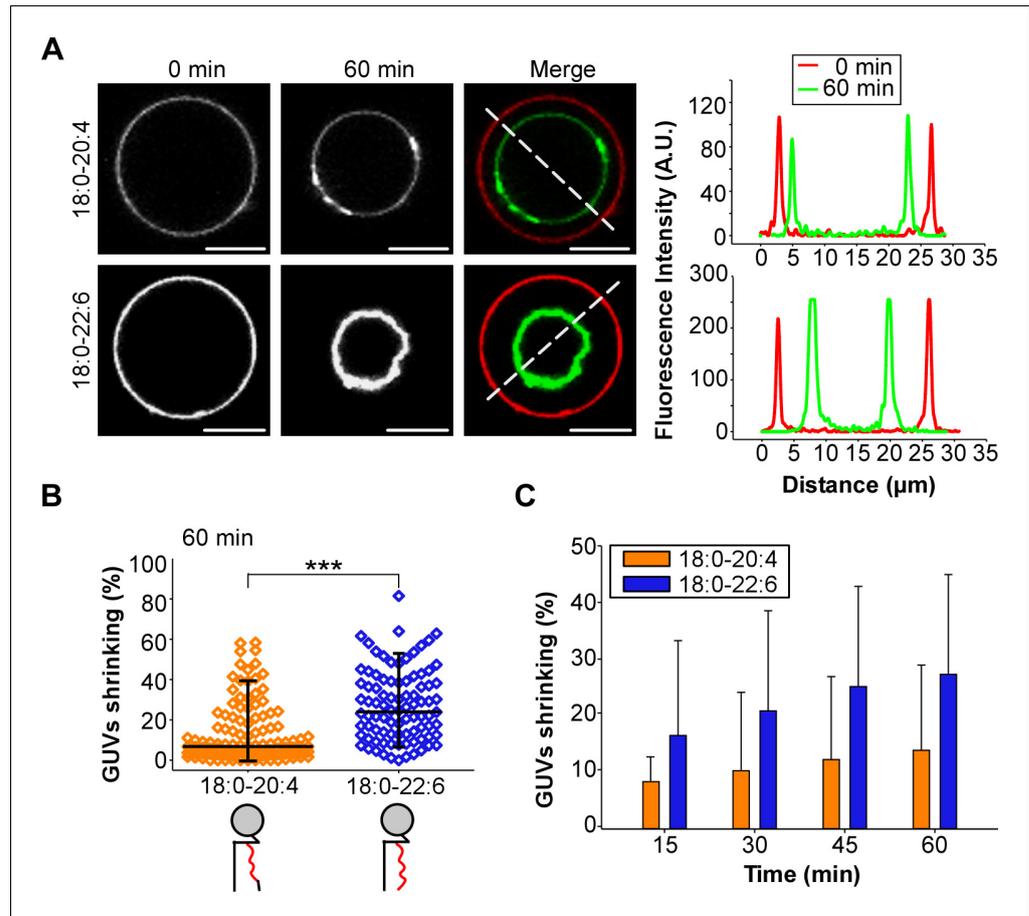
The following figure supplement is available for figure 4:

**Figure supplement 1.** EM analysis of the dynamin, endophilin and liposome mixtures.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.010>

to flat membranes but enables an accurate description of the slight chemical differences between polyunsaturated acyl chains (**Figure 6C–E**).

For all coarse-grained membranes tested, applying a constant force above a threshold of 175  $\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-1}$  induced the formation of a tube, which grew by a fast protrusion phase followed by a linear phase as previously observed (**Baoukina et al., 2012**). Increasing the degree of phospholipid polyunsaturation (18:0-18:1 < 18:0-18:2 < 18:0-20:4 < 18:0-22:6) accelerated the linear phase and resulted in the formation of longer and thinner tubes (**Figure 6A** and **Figure 6—figure supplement 1A and B**). Because the bending energy of a membrane tube is proportional to the ratio between tube length and radius ( $E_b = \pi K_b L/R$ ), we plotted  $L/R$  as a function of the applied force (**Figure 6A**). At  $t = 200$  ns and for  $F = 200 \text{ kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-1}$ ,  $L/R = 6, 12, 16$  and  $20 \text{ nm/nm}$  for 18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-20:4 and 18:0-22:6 tubes, respectively. Considering that these tubes should have stored



**Figure 5.** GUV shrinkage assay. GUVs containing 18:0-20:4 or 18:0-22:6 phospholipids were incubated with dynamin (0.5  $\mu\text{M}$ ) and endophilin (1  $\mu\text{M}$ ) in presence of GTP (500  $\mu\text{M}$ ) for 60 min at 37°C. (A) Colored images showing overlays of the GUVs containing 18:0-22:6 after 60 min incubation with the protein-nucleotide mixture. (B–C) Quantification of the experiment shown in (A) showing the GUV shrinking distribution after 60 min and mean  $\pm$ SD over the time. Data are obtained from  $\sim$ 100 GUVs from five independent preparations. All lipid compositions are showed in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.011>

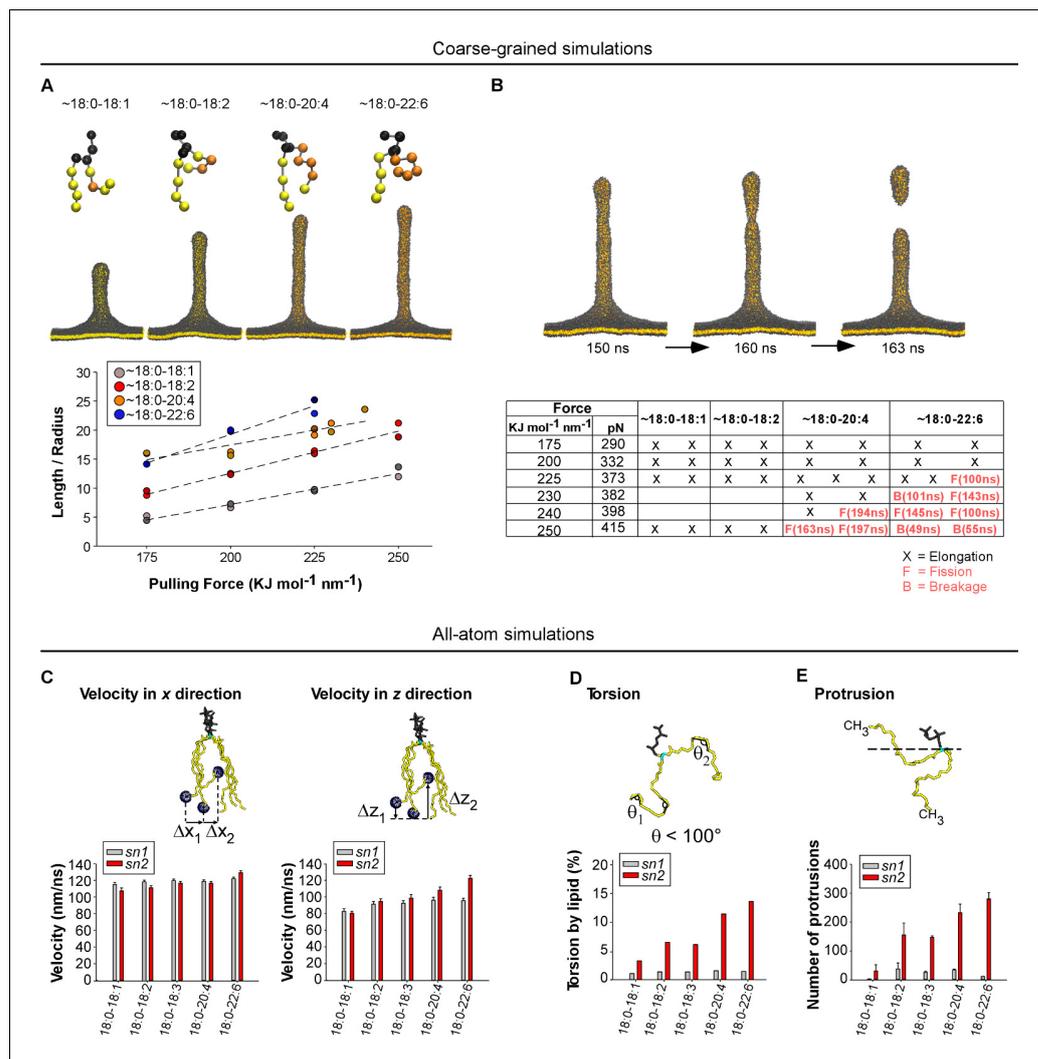
The following figure supplement is available for figure 5:

**Figure supplement 1.** GUV shrinking assay with control monounsaturated membranes.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.012>

the same curvature energy, these changes in L/R suggested inverse changes in membrane bending rigidity: 18:0-18:2, 18:0-20:4 and 18:0-22:6 membranes had relative values of  $K_b$  equal to 50%, 35% and 30% of  $K_b$  for 18:0-18:1 membranes, respectively.

During the time of the simulations (200 ns), we observed fission events for some tubes formed from 18:0-20:4 and 18:0-22:6 membranes but not from 18:0-18:1 or 18:0-18:2 membranes (**Figure 6B**, **Figure 6—figure supplement 1A** and **Video 1**). Although the number of simulations did not allow us to establish robust statistics, we noticed that the force threshold at which fission occurred was lower for 18:0-22:6 membranes than for 18:0-20:4 membranes (**Figure 6B** and **Figure 6—figure supplement 1B**). Moreover, fission occurred sooner for 18:0-22:6 tubes as compared to 18:0-20:4 tubes. Thus, the coarse-grained simulations agreed well with the experiments: the propensity of membranes to undergo deformation and fission correlates with the unsaturation level of the phospholipid *sn2* acyl chain.



**Figure 6.** Molecular dynamics simulations. (A) Top: snapshots at  $t = 200$  ns of tubes as pulled with a  $200 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  force from coarse-grained models of membranes with the indicated asymmetric polyunsaturated PC. Bottom: plot of  $L/R$  as a function of the pulling force. The tube geometry was analyzed at  $t = 200$  ns. (B) Top: snapshots of a tube pulling coarse-grained simulation (Force =  $250 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ ) obtained from a membrane with 18:0-20:4 PC and showing elongation and fission. See also **Video 1**. Bottom: summary of all simulations. Elongation, fission (F) and breakage events (B) are indicated. In contrast to fission, a breakage event corresponds to a rupture at the level of the lipids where the pulling force is applied. (C–F) Dynamics of the acyl chains of asymmetric polyunsaturated phospholipids from all-atom simulations. The analysis was performed on flat membrane patches with the same composition as that used in the experiments. (C) Velocity rate of the terminal  $\text{CH}_3$  group of the acyl chain along either the membrane normal (z velocity) or in the membrane plane (x-y velocity). (D) Frequency of acyl chain torsions as defined as conformations for which the acyl chain displays an angle  $< 100^\circ$ . (E) Number of protrusions of the  $\text{CH}_3$  group above the glycerol group of phospholipids. Color code for coarse-grained simulations: grey: lipid polar head and glycerol; orange: acyl chain regions with double carbon bonds; yellow: acyl chain regions with single carbon bonds. Color code for all-atom simulations: Grey: lipid polar head; cyan: glycerol; yellow: sn1 or sn2 acyl chains.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.013>

The following figure supplements are available for figure 6:

**Figure supplement 1.** Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane deformation and fission.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.014>

Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

**Figure supplement 2.** Distribution of deep and shallow lipid packing defects in all-atom simulations of membranes with the same composition as that used in the experiments of **Figure 1** and detailed in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.015>

**Figure supplement 3.** Comparison of phospholipids with a natural *sn1*-saturated-*sn2*-polyunsaturated profile and with a swapped *sn1*-polyunsaturated-*sn2*-saturated profile.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.016>

For all-atom bilayers, we focused on parameters informative for the tendency of the phospholipid acyl chains to depart from the straight conformation. This tendency allows phospholipids to adopt different shapes and, consequently, to reduce the stress induced by membrane curvature (**Pinot et al., 2014**). We determined (i) the speed at which the terminal CH<sub>3</sub> group moves along the membrane normal (*z* velocity) vs membrane plane (*x* velocity); (ii) the frequency of FA torsions (when the acyl chain displays an angle <100°), (iii) the number of protrusions of the terminal CH<sub>3</sub> group above the glycerol during 100 ns; and (iv) the density of lipid packing defects, that is interfacial regions where aliphatic carbons are directly accessible to the solvent. **Figure 6C–E** and **Figure 6—figure supplement 2** show that whatever the parameter considered, the calculated value always increased with the polyunsaturation level of the *sn2* chain, with 22:6 clearly surpassing all other polyunsaturated FAs. In contrast, the behavior of the *sn1* 18:0 chain was relatively constant and appeared poorly dependent on the nature of the neighboring *sn2* chain. Altogether, these various analyses show that the main effect of having an *sn2* polyunsaturated chain in phospholipids is to increase the probability of fast movements of along the *z*-axis.

0 ns



**Video 1.** Simulation of the formation of a tubule and its subsequent fission from a coarse-grained model of a membrane containing 18:0-20:4 phospholipids (see also **Figure 6B**) and submitted to a pulling force of 250 KJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.017>

0 ns

0 ns



22:6-18:0

18:0-22:6



**Video 2.** Simulation of the formation of a tubule from a coarse-grained bilayer containing 18:0-22:6 or 22:6-18:0 phospholipids (see also **Figure 6—figure supplement 3C**) and submitted to a pulling force of 200 KJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.018>

To determine whether the membrane features endowed by the polyunsaturated acyl chain depend on its esterification at position *sn2* as observed in natural lipids, we performed molecular dynamics simulations on phospholipid bilayers in which we swapped the *sn1* and *sn2* acyl chains (**Figure 6—figure supplement 3**). In all atom simulations, we observed that the rough features distinguishing the saturated and the polyunsaturated acyl chains remained after having permuted their position. These include *z* velocity, acyl chain torsions, and number of protrusions (**Figure 6—figure supplement 3A**). However, measurements of the acyl chain density across the bilayer indicated that acyl chain swapping modified the mean position of the saturated and polyunsaturated acyl chains across the bilayer (**Figure 6—figure supplement 3B**). This effect probably resulted from the tilted orientation of glycerol, which makes the *sn1* and *sn2* positions not equivalent in term of *z* coordinates. In natural phospholipids, the density profile of the *sn1* saturated FA showed a peak in the bilayer center whereas the *sn2* polyunsaturated FA showed a characteristic dip. This shift indicates that the *sn1* saturated FA tail invaded the central region of the bilayer left vacant by the *sn2* polyunsaturated FA, which goes up (**Eldho et al., 2003**). With swapped 22:6-18:0 phospholipids, this difference in density disappeared and the membrane appeared thinner than with natural 18:0-22:6 phospholipids (**Figure 6—figure supplement 3B**). Thus, the relative esterification position of the saturated and polyunsaturated FAs in natural lipids facilitates compensatory *z* movements where the polyunsaturated FA explores the interfacial region while the saturated FA explores the bilayer center. In coarse-grained simulations, the propensity of the membrane to undergo tubulation and fission increased with the level of phospholipid polyunsaturation (18:1-18:0 < 20:4-18:0  $\approx$  22:6-18:0), that is the same trend as that observed on classical *sn1*-saturated-*sn2*-unsaturated membranes (**Figure 6—figure supplement 3C**). In addition, acyl chain swapping did not significantly modify membrane fission (**Figure 6—figure supplement 3C** and **Video 2**).

## Discussion

Although a wealth of information is available on the interactions between endocytic proteins and specific lipids (**Puchkov and Haucke, 2013**), the role of the hydrophobic membrane matrix has been poorly investigated. In vivo, manipulating the acyltransferases that are responsible for the large differences in the acyl chain profile of differentiated cells is challenging and is just starting to emerge (**Hashidate-Yoshida et al., 2015; Rong et al., 2015**). In vitro, purified lipids are generally available from disparate sources (e.g. egg PC, brain PS), implying different acyl chain profiles. Synthetic lipids provide the best alternative but the most affordable ones generally display symmetric acyl chain combinations. This is exemplified by DOPS (18:1-18:1 PS), which has allowed spectacular advances in our understanding of the structure of the dynamin spiral (**Chappie et al., 2011**), but is very rare in mammalian membranes (**Yabuuchi and O'Brien, 1968**). Overall, the membrane templates on which dynamin and its partners have been studied are generally ill defined in terms of acyl chain profiles. Our comprehensive analysis indicates that acyl chain asymmetry and acyl chain polyunsaturation have major effects on the mechanical activity of dynamin.

A few studies have established that polyunsaturated phospholipids considerably modify the properties of membranes (**Armstrong et al., 2003; Eldho et al., 2003; Garcia-Manyes et al., 2010; Huang, 2001; Olbrich et al., 2000; Rawicz et al., 2000**). For LUVs, a high dithionite permeability of membranes containing 18:3-18:3 phospholipids has been reported (**Armstrong et al., 2003**). For GUVs, micropipette manipulations indicate that the presence of at least one polyunsaturated acyl chain results in a drop of the membrane bending modulus whereas the presence of two polyunsaturated acyl chains causes a jump in water permeability (**Olbrich et al., 2000; Rawicz et al., 2000**). These pioneer studies were performed on membranes made of a single lipid (PC) with a limited combination of acyl chains and in the absence of mechanically active proteins. By using lipid mixtures covering a larger spectrum of acyl chain profiles and by including membrane shaping/fission proteins, our study underlines the importance of both phospholipid polyunsaturation and phospholipid acyl chain asymmetry in membrane mechanics.

Depending on its acyl chain profile, a membrane can be either very resistant or very permissive to dynamin-mediated membrane vesiculation despite harboring the proper repertoire of polar head groups for protein recruitment. However, these manipulations can also cause large changes in membrane permeability. Our analysis uncovers a narrow chemical window that allows phospholipid membranes to be both highly deformable and still impermeable to small solutes. Membranes with

asymmetric saturated-polyunsaturated phospholipids such as 18:0-20:4 or 18:0-22:6 phospholipids are much less leaky than membranes with symmetrical 20:4-20:4 or 22:6-22:6 phospholipids but can still be readily vesiculated by dynamin provided that BAR-domain proteins are present. Evidently, these features are advantageous for membranes such as synaptic membranes that undergo super-fast endocytosis (Watanabe and Boucrot, 2017). Furthermore, the fact that membranes with 18:0-22:6 phospholipids are systematically more permissive to the mechanical activity of dynamin and endophilin than membranes with 18:0-20:4 phospholipids is of interest given the importance of the omega-6/omega-3 ratio for health and notably for brain function.

The distinctive chemical feature of polyunsaturated acyl chains is the presence of saturated carbons ( $\text{CH}_2$ ) sandwiched between two unsaturated ones ( $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ). Rotational freedom around these  $\text{CH}_2$  groups is exceptionally high as compared to rotation around the  $\text{CH}_2$  groups of monounsaturated or saturated acyl chains (Feller et al., 2002). Our MD simulations indicate that motions of the acyl chain along the normal of the membrane (z movements) increase in speed and in amplitude with the level acyl chain polyunsaturation ( $18:2 < 18:3 < 20:4 < 22:6$ ). Such movements should allow phospholipids to readily adapt their conformation to membrane curvature (Barelli and Antonny, 2016; Pinot et al., 2014), hence explaining the gradual decrease in membrane bending rigidity. Concurrently, the presence of a neighboring saturated acyl chain should secure lipid packing and prevents the passage of small molecules. Whether this model also accounts for the facilitation of the fission step per se remains, however, difficult to assess. This step involves a change in membrane topology for which rare events such as protrusions of the terminal  $\text{CH}_3$  groups could be decisive as they could nucleate bilayer merging or favor friction effects by proteins (Simunovic et al., 2017).

Other variations in the acyl chain content of mammalian phospholipids will deserve further investigations. First, we did not consider C22:5 acyl chains (omega-6 or omega-3), which are closer to C22:6 than C20:4 (Eldho et al., 2003). Although not abundant, C22:5 acyl chains are present in brain phospholipids (Yabuuchi and O'Brien, 1968). Second, we did not study the influence of the linkage between the acyl chains and glycerol. Plasmalogens, which form a large subclass of PE in the brain, harbor a *sn1* saturated acyl chain that is bound to the glycerol through an ether-vinyl bond. Interestingly, ether-vinyl phospholipids considerably decrease the permeability of model membranes to ions because these lipids pack more tightly than their ester counterparts (Zeng et al., 1998). The influence of plasmalogens on membrane flexibility and fission remains to be investigated. Last, we only partially addressed the bias observed in natural phospholipids, where saturated and polyunsaturated acyl chains are preferentially esterified on different positions of the glycerol backbone (*sn1* and *sn2*, respectively). Our simulations suggest that some general traits provided by the combination of one saturated acyl chain and one unsaturated acyl chain are preserved when the acyl chains are swapped between the *sn1* and *sn2* positions; notably the fact that membrane deformation and fission is facilitated by the level of polyunsaturation ( $18:1-18:0 < 20:4-18:0 \approx 22:6-18:0$ ). Testing this hypothesis by in vitro reconstitutions will require considerable efforts in lipid synthesis since swapped phospholipids are not commercially available.

The abilities to vesiculate and to act as selective barriers are two fundamental properties of cellular membranes. Without membrane vesiculation, a cell cannot divide; without selective permeability, it cannot control the concentration of its nutrients. Experiments aimed at mimicking the emergence of primitive membranes have illuminated how these properties need to be finally balanced. Single chain amphiphilic molecules (e.g. fatty acids), the most plausible building blocks for primitive membranes, can self-assemble into bilayers, which spontaneously vesiculate (Bruckner et al., 2009). However, these bilayers are very leaky to even large solutes (in the  $10^3$  Da range). Later, the shift from single chain to dual chain lipids has probably allowed primitive cells to reduce the general permeability of their membrane, thereby imposing an evolutionary pressure for the emergence of specialized transporters (Budin and Szostak, 2011). The experiments presented here suggest that phospholipids with one saturated and one polyunsaturated acyl chain, which are absent in many eukaryotes (e.g. yeast) but abundant in some highly differentiated cells (e.g. neurons, photoreceptors, sperm) provide a solution to an early dilemma in evolution: finding the right balance between efficient membrane vesiculation without loss in membrane permeability. Moreover, the fact that saturated-DHA (omega-3) phospholipids are systematically better for membrane vesiculation than many other saturated-polyunsaturated phospholipids, including saturated-arachidonate (omega-6), is informative considering the importance of the omega-6/omega-3 ratio for health.

## Materials and methods

## Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Phosphatidylcholine	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-18:1 PC   850467	
Phosphatidylcholine	1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-18:2 PC   850468	
Phosphatidylcholine	1-stearoyl-2-linolenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids		18:0-18:3 PC Custom
Phosphatidylcholine	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-20:4 PC   850469	
Phosphatidylcholine	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-22:6 PC   850472	
Phosphatidylcholine	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 14:0 PC (DMPC)   850345	
Phosphatidylcholine	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:1 ( $\Delta$ 9-Cis) PC (DOPC)   850375	
Phosphatidylcholine	1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:2 (Cis) PC (DLPC)   850385	
Phosphatidylcholine	1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	20:4 (Cis) PC   850397	
Phosphatidylcholine	1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Avanti Polar Lipids	22:6 (Cis) PC   850400	
Phosphoethanolamine	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	18:0-18:1 PE   850758	
Phosphoethanolamine	1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	18:0-18:2 PE   850802	
Phosphoethanolamine	1-stearoyl-2-linolenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids		18:0-18:3 PE Custom
Phosphoethanolamine	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-20:4 PE   850804	
Phosphoethanolamine	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-22:6 PE   850806	
Phosphoethanolamine	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 14:0 PE   850745	
Phosphoethanolamine	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:1 ( $\Delta$ 9-Cis) PE (DOPE)   850725	
Phosphoethanolamine	1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:2 PE   850755	
Phosphoethanolamine	1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 20:4 PE   850800	
Phosphoethanolamine	1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Avanti Polar Lipids	Ref 22:6 PE   850797	
Phosphatidylserine	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-18:1 PS   840039	
Phosphatidylserine	1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-18:2 PS   840063	
Phosphatidylserine	1-stearoyl-2-linolenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids		18:0-18:3 PS Custom
Phosphatidylserine	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-20:4 PS   840064	
Phosphatidylserine	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:0-22:6 PS   840065	

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Phosphatidylserine	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 14:0 PS   840033	
Phosphatidylserine	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:1 PS (DOPS)   840035	
Phosphatidylserine	1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 18:2 PS   840040	
Phosphatidylserine	1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 20:4 PS   840066	
Phosphatidylserine	1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Avanti Polar Lipids	Ref 22:6 PS   840067	

### Protein purification and labelling

Proteins were purified as described (*Pinot et al., 2014; Stowell et al., 1999*). Dynamin was purified from rat brain using a recombinant amphiphysin-2 SH3 domain as an affinity ligand. Brain extracts were incubated with 10 mg ml<sup>-1</sup> glutathione-S-transferase-tagged amphiphysin-2 SH3 domain on glutathione-agarose beads at 4°C. After extensive washing of the matrix in buffer A (100 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.3, 1 mM dithiothreitol (DTT)), dynamin was eluted in 3 ml buffer B (1.2 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 6.5, 1 mM DTT), and dialysed overnight into 200 mM NaCl, 20 mM HEPES, 20% glycerol. Full-length mouse endophilin A1 in pGEX-6p1 (gift of A. Schmidt) was expressed in E coli for 3 hr at 37°C after induction with 1 mM IPTG. Cells were lysed in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl using a French press in the presence of antiproteases and spun at 40,000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was incubated with glutathione-Sepharose 4B beads followed by extensive washes in lysis buffer. PreScission protease was directly added to the beads at 4°C overnight under gentle agitation to cleave the fusion protein. Endophilin was recovered in supernatant and further purified on a Superdex 200 column in 20 mM Tris pH 7.4, 300 mM KCl, 5 mM imidazole, 1 mM DTT.

### Preparation of liposomes

Lipids were purchased from Avanti Polar Lipids as chloroform solutions (see Key resources table). These included the following species of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS): 14:0-14:0, 18:0-18:1, 18:1-18:1, 18:0-18:2, 18:2-18:2, 18:0-18:3, 18:0-20:4, 20:4-20:4, 18:0-22:6 and 22:6-22:6. Note that 18:0-18:3 phospholipid species were custom-made lipids from Avanti. Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) was from natural source (brain). Submicrometer liposomes used for biochemical experiments and for electron microscopy were prepared by extrusion. A lipid film containing phospholipids and cholesterol at the desired molar ratio (see Table S1-3 in *supplementary file 1*) was formed in a rotary evaporator and hydrated at a final lipid concentration of 1 mM in a freshly degassed HK buffer (50 mM Hepes pH 7.2, 120 mM K Acetate) supplemented with 1 mM DTT. The suspension was submitted to five cycles of freezing and thawing and stored at -20°C under argon to avoid lipid oxidation. Calibrated liposomes were obtained by extrusion through 400 or 100 nm polycarbonate filters using a hand extruder (Avanti Polar Lipids). The size distribution of the liposomes was determined by dynamic light scattering at a final concentration of 0.1 mM lipids in HK buffer. All liposome suspensions were used within 1–2 days after extrusion. Special care was taken to minimize lipid oxidation by using freshly degassed buffer (supplemented with 1 mM DTT) and by storing the liposome suspensions under argon.

### Preparation of GUVs

Giant unilamellar vesicles were generated by electroformation as described (*Pinot et al., 2014*) with the following modifications. Lipid mixtures (0.5 mg/ml; see Table S4 in *supplementary file 1*) in chloroform were deposited on indium tin oxide coated glass slides at 50°C to prevent lipid de-mixing and dried under vacuum for 1 hr to remove all solvents. After this step, sucrose 250 mM osmotically equilibrated with buffers was added to the chamber. GUVs were electroformed (*Angelova et al., 1992*) with Vesicle Prep Pro (Nanion Technologies GmbH, Munich, Germany), applying an AC electric field with 3 V and 5 Hz for 218 min at 37°C.

### GTPase assay

GTP hydrolysis in dynamin was measured using a colorimetric assay (Leonard *et al.*, 2005). The sample (60  $\mu$ l) initially contained 400 nm extruded liposomes (0.1 mM) of defined composition (see *Supplementary file 1*) in HK buffer supplemented with 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT and 500  $\mu$ M GTP. Just before measurement, endophilin (0.6  $\mu$ M) was added and the reaction was initiated by the addition and mixing of 0.3  $\mu$ M dynamin. At the indicated times (15, 45, 75, 120, 180, 240 and 360 s), aliquots (7.5  $\mu$ l) were withdrawn and immediately mixed with a drop of EDTA (5  $\mu$ l, 250 mM) in a 96 well plate. At the end of the experiment, 150  $\mu$ l of a malachite green stock solution was added to each well and the absorbance at 650 nm was measured using a microplate reader and compared to that of a standard curve of phosphate (0–200  $\mu$ M) in order to determine the concentration of GTP hydrolyzed by dynamin.

### Push-pull pyrene (PA) fluorescence on LUVs

Fluorescence spectra of the PA probe with liposomes was performed as described (Niko *et al.*, 2016). The sample (600  $\mu$ l) initially contained 0.1 mM extruded liposomes (100 nm) of defined composition (see *Supplementary file 1*). After 5 min incubation of the liposomes solution with 1  $\mu$ M PA probe at 37°C, a fluorescence emission spectrum (450–700 nm; bandwidth 1 nm) was recorded upon excitation at 430 nm (bandwidth 5 nm). All spectra were corrected for the corresponding blank (suspension of liposomes without the probe).

### Dithionite-mediated NBD quenching assay

The extent of dithionite quenching of the NBD-labeled PE was performed as described (Angeletti and Nichols, 1998). Briefly, the sample (600  $\mu$ l) that initially contained 400 nm extruded liposomes (0.1 mM) of defined composition (see *Supplementary file 1*) were let equilibrating in HK buffer 5 min at 37°C with 600 rpm stirring. After 30 s of fluorescence measurements (excitation 505 nm, bandwidth 1 nm; emission 540 nm, bandwidth 10 nm), NBD quenching was started by adding 10 mM dithionite and the reaction was followed during 5 min at 37°C with 600 rpm stirring. The percentage of NBD quenching was calculated by the equation: Quenching NBD (%) =  $(F_i - F_0) / (F_T - F_0) \times 100$  where  $F_0$  corresponds to the fluorescence of the vesicles at time 0–30 s;  $F_i$  is the fluorescence after a certain period of incubation with dithionite, and  $F_T$  is the maximum quenching that corresponds to the fluorescence value obtained after addition of 0.1% Triton X-100.

### Electron microscopy

Mixtures containing liposomes, dynamin, endophilin and nucleotides were prepared in HK buffer supplemented with 2.5 mM  $MgCl_2$  and 1 mM DTT (final volume 50  $\mu$ l). For the tubulation experiments in presence of the non-hydrolyzable analog GTP $\gamma$ S, vesicles were incubated for 5 or 15 min at room temperature. For the fission experiments in presence of GTP, vesicles were incubated for 30 min at room temperature. Thereafter, an EM grid was put on the protein-liposome mixture for 5 min, rinsed with a droplet of 100 mM Hepes (pH 7.0) for 1 min, and then stained with 1% uranyl acetate. The grid was observed in a JEOL JEM1400 transmission electron microscope equipped with a MORADA SIS camera. To determine the size distribution of the liposomes or of the protein-liposome profiles, 500 to 1000 profiles for each condition and from three independent experiments were analyzed using the ellipse tool of the NIH Image J software. The apparent radius was calculated as  $R = (A/\pi)^{1/2}$  where A is the apparent area of the profile. All experiments were performed with 0.5  $\mu$ M dynamin, 1  $\mu$ M endophilin, 500  $\mu$ M nucleotide and 0.1 mM lipids.

### GUV permeability and size assay

GUV permeability was studied in 18:0-22:6 and 22:6-22:6 liposomes using a previously developed assay with some modifications (Jiménez-Rojo *et al.*, 2014). After GUVs stabilization soluble Alexa488 was externally added to follow the entrance of the probe over time. After 15 min incubation, vesicles were imaged by confocal microscopy and permeability was quantified using the following equation: Permeability (%) =  $I_{in}/I_{ex} \times 100$  where  $I_{in}$  is the average of the fluorescence inside the individual GUV and  $I_{ex}$  is the average of external fluorescence of the probe in solution.

Membrane fission induced by dynamin and endophilin in the presence of GTP was followed indirectly by monitoring the size of GUVs over time since the vesicles produced by the proteins are too

small to be optically resolved. We used a previously developed assay with some modifications (Meinecke *et al.*, 2013). After GUVs stabilization, dynamin, endophilin and GTP were added and incubated for 1 hr at 37°C before and imaging by confocal microscopy. All experiments were performed with 0.5  $\mu\text{M}$  dynamin, 1  $\mu\text{M}$  endophilin, 500  $\mu\text{M}$  nucleotide and 0.1 mM lipids. Shrinking percentage was calculated by the equation: Shrinking (%) =  $100 \times A_0/A_i$  where  $A_0$  is the vesicles area at time 0 and  $A_i$  is vesicles area after a defined period of incubation.

## Molecular dynamics

All-atom simulations were performed with GROMACS 5 (Abraham *et al.*, 2015) software and CHARMM36 (Klauda *et al.*, 2010) force field. The various systems were built with the Charmm-Gui tool (Lee *et al.*, 2016) with 33% Cholesterol, 1% PI(4,5)P<sub>2</sub>, and with 30% PS, 20% PE, and 16% PC, harboring defined acyl chains (18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-18:3, 18:0-20:4, 18:0-22:6, 14:0-14:0, 18:2-18:2, 20:4-20:4, 22:6-22:6). Lipids not present in the Charmm-Gui database (18:0-18:2, 18:0-18:3, 18:2-18:2 and 22:6-22:6 and swapped lipids) were built by adding unsaturations to related lipids (i.e. 18:0-18:1, 18:1-18:1 or 22:1-22:1). Note that one of this lipid (18:0-18:2) is now present in the database and has the same topology as the one used here. The bilayers contained  $2 \times 144$  phospholipids with counter ions to neutralize the system and with 120 mM NaCl.

The simulation parameters were those of Charmm-Gui under semi isotropic conditions within the NPT ensemble: x and y directions were coupled, whereas z direction was independent. Periodic boundaries applied to all directions. We first equilibrated the membranes for 200 ps using the standard Charmm-Gui six-step process during which constraints on lipids were gradually released. Next, an additional equilibration step was performed to equilibrate the TIP3P model of water. All simulations were equilibrated using the Berendsen thermostat and barostat at 303 K and 1 bar, respectively, except for 14:0-14:0 bilayers, which were equilibrated at 310 K. Lipids and water+ions were coupled separately.

Production runs were performed with the V-rescale thermostat at 303 K except for 14:0-14:0 bilayers (310 K). The Parrinello-Rahman thermostat was used to stabilize the pressure at 1 bar with a time constant of 5 ps and a compressibility of  $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (Parrinello and Rahman, 1981). Again, lipids and water+ions were coupled separately. The time step was set at 2 fs. Bond lengths were constrained using the P-LINCS algorithm (Hess, 2008). Cutoff was fixed at 1.2 nm for the Lennard-Jones and electrostatic interactions. The smooth particle-mesh was used to evaluate the electrostatic interactions. Frames were saved every 10 ps.

Trajectory analyses were performed from 400 ns simulations from which we discarded the first 100 ns in order to rule out processes that are not at equilibrium. The remaining 300 ns trajectory was divided in 3 blocks of 100 ns to determine the standard deviation. Frames were analyzed every 100 ps except for the velocity and permeability analysis for which we used 10 ps frames.

Coarse-grained simulations were performed with GROMACS 4.5 (Hess *et al.*, 2008) using the Martini force field (Wassenaar *et al.*, 2015). The systems were built with the Charmm-Gui tool adapted to coarse-grained simulations (Qi *et al.*, 2015). In all simulations, we varied the acyl chains composition while keeping the PC polar head constant. We used four lipids to approximate the asymmetric lipids 18:0-18:1, 18:0-18:2, 18:0-20:4, and 18:0-22:6. Note that the coarse-grained simplification does not distinguish C16:0 from C18:0, C20:4 from C20:5, and C22:6 from C22:5. We built coarse-grained models of swapped phospholipids from natural phospholipids having acyl chains of the same length. The systems contained 18 000 lipids and were solvated with a 100 nm thick layer of water.

The systems were equilibrated with the standard Charmm-Gui six-step process. Production runs were performed with the V-rescale thermostat at 303K. The Berendsen barostat was used to stabilize the pressure at 1 bar with a time constant of 4ps and compressibility of  $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (Berendsen *et al.*, 1984). The different membranes were simulated under a semi-isotropic condition and the periodic boundaries were applied in all directions. Lipids and water/ions were coupled separately. The time step was fixed at 20 fs and the cutoff for the Lennard-Jones and electrostatic interactions was set at 1.2 nm. The smooth particle-mesh was used to evaluate the electrostatic interactions.

To simulate membrane deformation and fission, we applied a force perpendicular to the initially flat bilayer (Baoukina *et al.*, 2012). The force (from 175 to 250  $\text{KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ ) was applied to the center of mass of a lipid patch of radius = 3 nm, in which lipids were restrained in the lateral (x,y)

directions. The simulations were performed for 200 ns and were repeated two to three times under most conditions.

For further information on all molecular dynamics simulations, refer to the Gromacs mdp files (*supplementary files 2 and 3*).

## Simulation analysis

To evaluate membrane permeability, we counted the number of water molecule(s) that have visited the center of membrane (corresponding to 65% of the thickness) during 100 ns time frames. These water molecules were separated in two classes: those that fully crossed the bilayer and those that entered the hydrophobic region and then exited from the same side. Results were normalized to the total number of water molecules. The velocity rate of the terminal methyl group of the acyl chains was calculated from the sum of distances traveled by each methyl group in the x or in the z direction every 10 ps. For protrusions, we calculated the number of events during 100 ns blocks where the CH<sub>3</sub> terminal group of the acyl chain reached a z position above the central carbon of glycerol from the same lipid. An acyl chain torsion corresponds to an angle below 100° between carbons that have relative positions of n-2, n and n+2 along the acyl chain. Packing defect analysis was performed as previously described (*Vamparys et al., 2013*). This membrane scanning procedure allows the detection of aliphatic atoms that are directly accessible to the solvent and that are either <1 Å (shallow defect) or >1 Å (deep defect) below the nearest glycerol.

## Acknowledgements

We thank Andrey Klymchenko for the PA probe, Wen-Ting Lo and Volker Haucke for the SNX9 protein, Guillaume Drin for help with GUVs preparation and Alenka Copic for comments on the manuscript. We are very grateful to Hugues Chap, Michel Lagarde, and Gérard Lambeau for their insights into the history of acyl chain asymmetry of phospholipids. This work was supported in part by an ERC grant (268 888) and is currently supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0028-01) and the HPC resources of CINES under the allocations 2016-c2016077362 and 2017-A0020707362 made by GENCI. MM is supported by a postdoctoral fellowship from the Basque Government.

---

## Additional information

### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-11-LABX-0028-01	Bruno Antony
European Commission	ERC advanced grant 268888	Bruno Antony
Eusko Jaurlaritza	Post-doctoral fellowship	Marco M Manni

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### Author contributions

Marco M Manni, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft; Marion L Tiberti, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology; Sophie Pagnotta, Investigation, Methodology; Hélène Barelli, Supervision; Romain Gautier, Conceptualization, Software, Formal analysis, Supervision, Investigation, Methodology; Bruno Antony, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

### Author ORCIDs

Bruno Antony  <http://orcid.org/0000-0002-9166-8668>

**Decision letter and Author response**Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.024>Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.025>

---

**Additional files****Supplementary files**

- Supplementary file 1. Tables of the lipid composition of the various bilayers used in this study.  
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.019>
- Supplementary file 2. Mdp input file of the all atom simulations.  
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.020>
- Supplementary file 3. Mdp input file of the coarse-grained simulations  
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.021>
- Transparent reporting form  
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.022>

---

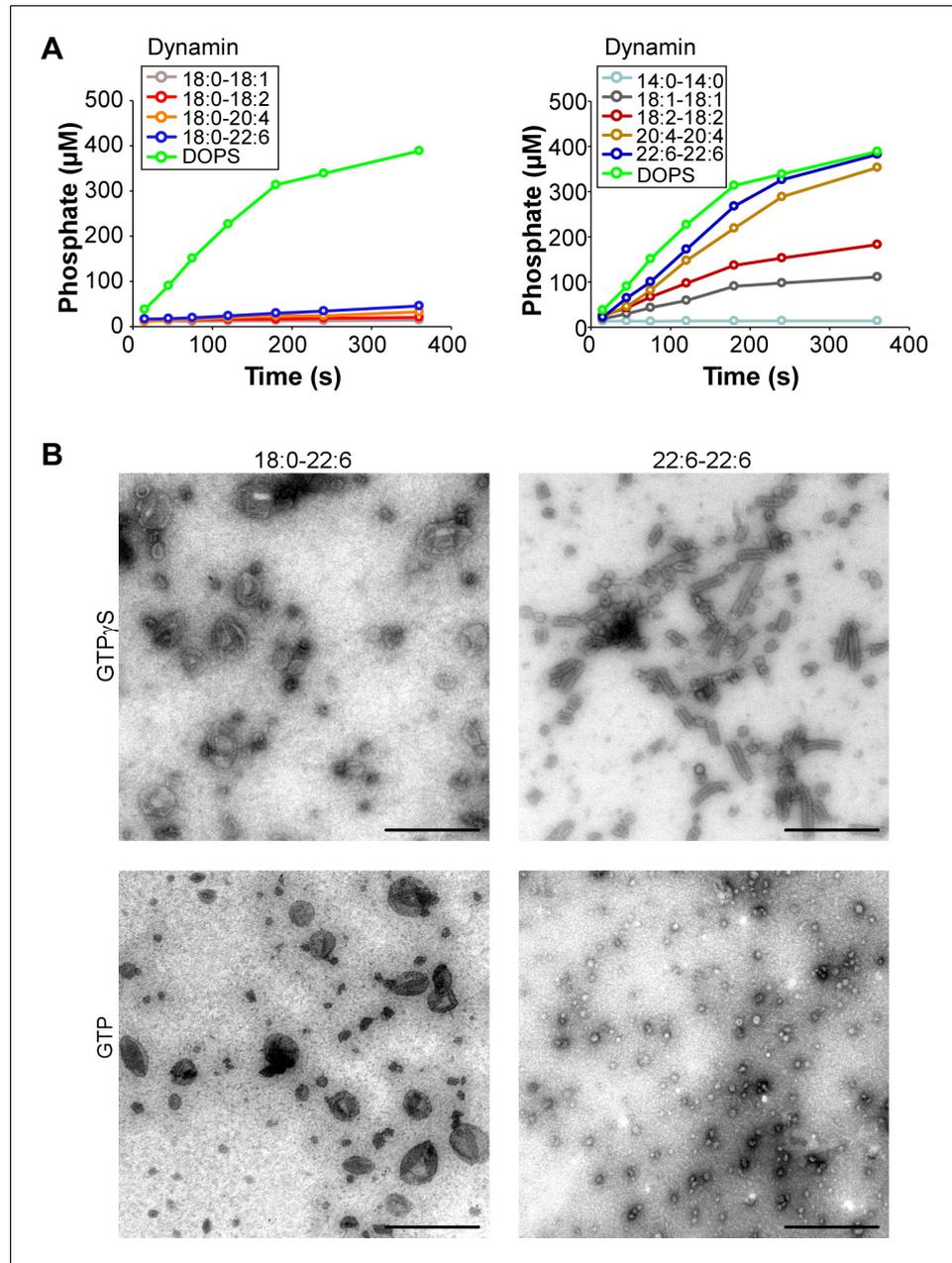
**References**

- Abraham M, Hess B, Spoel D, Lindahl E. 2015. GROMACS. 5.0.
- Angeletti C, Nichols JW. 1998. Dithionite quenching rate measurement of the inside-outside membrane bilayer distribution of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled phospholipids. *Biochemistry* **37**:15114–15119. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi9810104>, PMID: 9790674
- Angelova M, Soléau S, Méléard P, Faucon F, Bothorel P. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. In: *Trends in Colloid and Interface Science VI*. Springer. p. 127–131. DOI: <https://doi.org/10.1007/BFb0116295>
- Antony B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, Faelber K, Ford M, Frolov VA, Frost A, Hinshaw JE, Kirchhausen T, Kozlov MM, Lenz M, Low HH, McMahon H, Merrifield C, Pollard TD, Robinson PJ, Roux A, Schmid S. 2016. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal* **35**:2270–2284. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201694613>, PMID: 27670760
- Armstrong VT, Brzustowicz MR, Wassall SR, Jenki LJ, Stillwell W. 2003. Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosaehaenoate) phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **414**:74–82. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00159-0), PMID: 12745257
- Baoukina S, Marrink SJ, Tieleman DP. 2012. Molecular structure of membrane tethers. *Biophysical Journal* **102**:1866–1871. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.048>, PMID: 22768942
- Barelli H, Antony B. 2016. Lipid unsaturation and organelle dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* **41**:25–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.012>, PMID: 27062546
- Bazinnet RP, Layé S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience* **15**:771–785. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn3820>, PMID: 25387473
- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **81**:3684–3690. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Boesze-Battaglia K, Schimmel R. 1997. Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *The Journal of Experimental Biology* **200**:2927–2936. PMID: 9359876
- Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, Bertot L, Sauvonnnet N, McMahon HT. 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **517**:460–465. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14067>, PMID: 25517094
- Bruckner RJ, Mansy SS, Ricardo A, Mahadevan L, Szostak JW. 2009. Flip-flop-induced relaxation of bending energy: implications for membrane remodeling. *Biophysical Journal* **97**:3113–3122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.025>, PMID: 20006948
- Budin I, Szostak JW. 2011. Physical effects underlying the transition from primitive to modern cell membranes. *PNAS* **108**:5249–5254. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1100498108>, PMID: 21402937
- Chappie JS, Mears JA, Fang S, Leonard M, Schmid SL, Milligan RA, Hinshaw JE, Dyda F. 2011. A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* **147**:209–222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.003>, PMID: 21962517
- Danino D, Moon KH, Hinshaw JE. 2004. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *Journal of Structural Biology* **147**:259–267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.04.005>, PMID: 15450295
- Eldho NV, Feller SE, Tristram-Nagle S, Polozov IV, Gawrisch K. 2003. Polyunsaturated docosaehaenoic vs docosapentaenoic acid-differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *Journal of the American Chemical Society* **125**:6409–6421. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja029029e>, PMID: 12785780

- Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P. 2001. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *The Journal of Cell Biology* **155**:193–200. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200107075>, PMID: 11604418
- Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD. 2002. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *Journal of the American Chemical Society* **124**:318–326. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0118340>, PMID: 11782184
- Garcia-Manyès S, Redondo-Morata L, Oncins G, Sanz F. 2010. Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails? *Journal of the American Chemical Society* **132**:12874–12886. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja1002185>, PMID: 20799688
- Hanahan DJ, Brockerhoff H, Barron EJ. 1960. The site of attack of phospholipase (lecithinase) A on lecithin: a re-evaluation. Position of fatty acids on lecithins and triglycerides. *The Journal of Biological Chemistry* **235**:1917–1923. PMID: 14399412
- Harayama T, Eto M, Shindou H, Kita Y, Otsubo E, Hishikawa D, Ishii S, Sakimura K, Mishina M, Shimizu T. 2014. Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. *Cell Metabolism* **20**:295–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.019>, PMID: 24981836
- Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Eto M, Tamura-Nakano M, Yanobu-Takanashi R, Mukumoto Y, Kiyonari H, Okamura T, Kita Y, Shindou H, Shimizu T. 2015. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *eLife* **4**:e06328. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.06328>
- Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. 2008. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**:435–447. DOI: <https://doi.org/10.1021/ct700301q>, PMID: 26620784
- Hess B. 2008. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**:116–122. DOI: <https://doi.org/10.1021/ct700200b>, PMID: 26619985
- Huang CH. 2001. Mixed-chain phospholipids: structures and chain-melting behavior. *Lipids* **36**:1077–1097. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0818-1>, PMID: 11768152
- Hulbert AJ. 2003. Life, death and membrane bilayers. *Journal of Experimental Biology* **206**:2303–2311. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.00399>, PMID: 12796449
- Jiménez-Rojo N, Sot J, Viguera AR, Collado MI, Torrecillas A, Gómez-Fernández JC, Goñi FM, Alonso A. 2014. Membrane permeabilization induced by sphingosine: effect of negatively charged lipids. *Biophysical Journal* **106**:2577–2584. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.038>, PMID: 24940775
- Kamal MM, Mills D, Grzybek M, Howard J. 2009. Measurement of the membrane curvature preference of phospholipids reveals only weak coupling between lipid shape and leaflet curvature. *PNAS* **106**:22245–22250. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0907354106>, PMID: 20080790
- Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, Vorobyov I, MacKerell AD, Pastor RW. 2010. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**:7830–7843. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp101759q>, PMID: 20496934
- Lands WE, Merkl I. 1963. Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **238**:898–904. PMID: 13928489
- Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, Wei S, Buckner J, Jeong JC, Qi Y, Jo S, Pande VS, Case DA, Brooks CL, MacKerell AD, Klauda JB, Im W. 2016. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/Openmm simulations using the charmm36 additive force field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **12**:405–413. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>, PMID: 26631602
- Leonard M, Song BD, Ramachandran R, Schmid SL. 2005. Robust colorimetric assays for dynamin's basal and stimulated GTPase activities. *Methods in Enzymology* **404**:490–503. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)04043-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)04043-7), PMID: 16413294
- Liu YW, Neumann S, Ramachandran R, Ferguson SM, Pucadyil TJ, Schmid SL. 2011. Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *PNAS* **108**:E234–E242. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1102710108>, PMID: 21670293
- Manneville JB, Casella JF, Ambroggio E, Gounon P, Bertherat J, Bassereau P, Cartaud J, Antonny B, Goud B. 2008. COPI coat assembly occurs on liquid-disordered domains and the associated membrane deformations are limited by membrane tension. *PNAS* **105**:16946–16951. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0807102105>, PMID: 18974217
- Marszalek JR, Lodish HF. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**:633–657. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120624>, PMID: 16212510
- Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, Hon WC, Mittal R, McMahon HT. 2013. Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *Journal of Biological Chemistry* **288**:6651–6661. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444869>, PMID: 23297414
- Morlot S, Galli V, Klein M, Chiaruttini N, Manzi J, Humbert F, Dinis L, Lenz M, Cappello G, Roux A. 2012. Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* **151**:619–629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.017>, PMID: 23101629

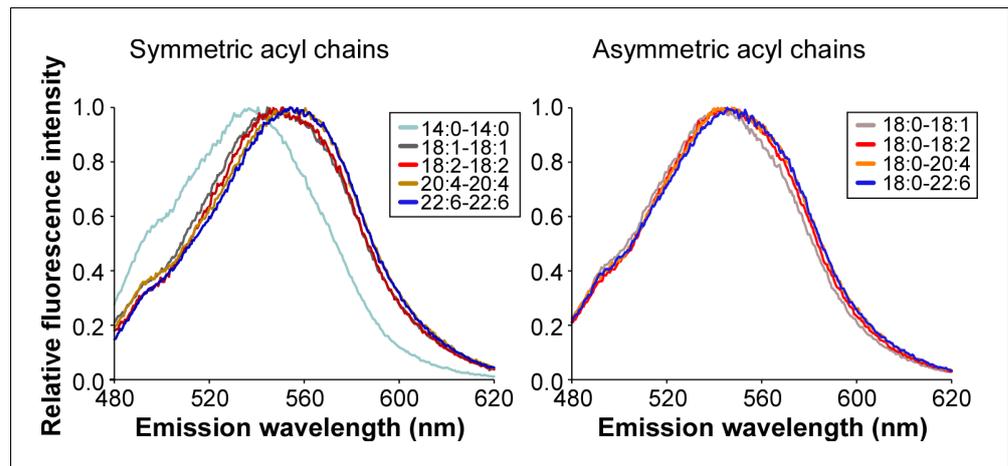
- Neumann S**, Schmid SL. 2013. Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2. *Journal of Biological Chemistry* **288**:25119–25128. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490474>, PMID: 23861397
- Niko Y**, Didier P, Mely Y, Konishi G, Klymchenko AS. 2016. Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. *Scientific Reports* **6**:18870. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep18870>, PMID: 26750324
- Olbrich K**, Rawicz W, Needham D, Evans E. 2000. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal* **79**:321–327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76294-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76294-1), PMID: 10866958
- Parrinello M**, Rahman A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* **52**:7182–7190. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Pinot M**, Vanni S, Pagnotta S, Lacas-Gervais S, Payet LA, Ferreira T, Gautier R, Goud B, Antony B, Barelli H. 2014. Lipid cell biology. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* **345**:693–697. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1255288>, PMID: 25104391
- Puchkov D**, Haucke V. 2013. Greasing the synaptic vesicle cycle by membrane lipids. *Trends in Cell Biology* **23**:493–503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.002>, PMID: 23756446
- Qi Y**, Ingólfsson HI, Cheng X, Lee J, Marrink SJ, Im W. 2015. CHARMM-GUI martini maker for coarse-grained simulations with the martini force field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **11**:4486–4494. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00513>, PMID: 26575938
- Rawicz W**, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical Journal* **79**:328–339. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76295-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76295-3), PMID: 10866959
- Rice DS**, Calandria JM, Gordon WC, Jun B, Zhou Y, Gelfman CM, Li S, Jin M, Knott EJ, Chang B, Abuin A, Issa T, Potter D, Platt KA, Bazan NG. 2015. Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival. *Nature Communications* **6**:6228. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms7228>
- Rong X**, Wang B, Dunham MM, Hedde PN, Wong JS, Gratton E, Young SG, Ford DA, Tontonoz P. 2015. Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *eLife* **4**:e06557. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.06557>
- Roux A**, Koster G, Lenz M, Sorre B, Manneville JB, Nassoy P, Bassereau P. 2010. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *PNAS* **107**:4141–4146. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913734107>, PMID: 20160074
- Shindou H**, Hishikawa D, Harayama T, Eto M, Shimizu T. 2013. Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. *Journal of Biochemistry* **154**:21–28. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvt048>, PMID: 23698096
- Simunovic M**, Manneville JB, Renard HF, Evergren E, Raghunathan K, Bhatia D, Kenworthy AK, Voth GA, Prost J, McMahon HT, Johannes L, Bassereau P, Callan-Jones A. 2017. Friction Mediates Scission of Tubular Membranes Scaffolded by BAR Proteins. *Cell* **170**:172–184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.047>, PMID: 28648660
- Slepnev VI**, De Camilli P. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nature Reviews Neuroscience* **1**:161–172. DOI: <https://doi.org/10.1038/35044540>, PMID: 11257904
- Stillwell W**, Wassall SR. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* **126**:1–27. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4), PMID: 14580707
- Stowell MH**, Marks B, Wigge P, McMahon HT. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biology* **1**:27–32. DOI: <https://doi.org/10.1038/8997>, PMID: 10559860
- Sundborger A**, Soderblom C, Vorontsova O, Evergren E, Hinshaw JE, Shupliakov O. 2011. An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Science* **124**:133–143. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.072686>, PMID: 21172823
- Takamori S**, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, et al. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**:831–846. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>, PMID: 17110340
- Tam O**, Innis SM. 2006. Dietary polyunsaturated fatty acids in gestation alter fetal cortical phospholipids, fatty acids and phosphatidylserine synthesis. *Developmental Neuroscience* **28**:222–229. DOI: <https://doi.org/10.1159/000091920>, PMID: 16679769
- Tattrie N**. 1959. Positional distribution of saturated and unsaturated fatty acids on egg lecithin. *Journal of Lipid Research* **1**:60–65.
- Vamparys L**, Gautier R, Vanni S, Bennett WF, Tieleman DP, Antony B, Etchebest C, Fuchs PF. 2013. Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophysical Journal* **104**:585–593. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3836>, PMID: 23442909
- Wassenaar TA**, Ingólfsson HI, Böckmann RA, Tieleman DP, Marrink SJ. 2015. Computational lipidomics with insane: a versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **11**:2144–2155. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00209>, PMID: 26574417
- Watanabe S**, Boucrot E. 2017. Fast and ultrafast endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* **47**:64–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.013>, PMID: 28391090
- Yabuuchi H**, O'Brien JS. 1968. Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *Journal of Lipid Research* **9**:65–67. PMID: 5637431

- Yang HJ**, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M. 2012. Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **287**:5290–5300. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316877>, PMID: 22207757
- Zeng Y**, Han X, Gross RW. 1998. Phospholipid subclass specific alterations in the passive ion permeability of membrane bilayers: separation of enthalpic and entropic contributions to transbilayer ion flux. *Biochemistry* **37**: 2346–2355. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi9725172>, PMID: 9485381



**Figure 1—figure supplement 1.** Time course of GTP hydrolysis by dynamin in the presence of phospholipids with different acyl chains and EM analysis. (A) Time course of GTP hydrolysis by dynamin (0.3  $\mu\text{M}$ ) with large liposomes (400 nm extrusion) containing phospholipids with asymmetric (left panel) or symmetric (right panel) acyl chains at positions sn-1 and sn-2 as shown in **Figure 1A**. (B) Electron microscopy analysis of 22:6-22:6 or 18:0-22:6 liposomes after incubation with dynamin and with GTP or GTP $\gamma$ S. With GTP $\gamma$ S, numerous dynamin spirals formed and tubulated 22:6-22:6 liposomes but not in the presence of 18:0-22:6 liposomes. With GTP, dynamin extensively vesiculated 22:6-22:6 liposomes into very small (radius < 20 nm) structures, whereas large parental profiles were still abundant in the case of 18:0-22:6 liposomes. Scale bar, 500 nm. All lipid compositions are shown in **Supplementary file 1**.

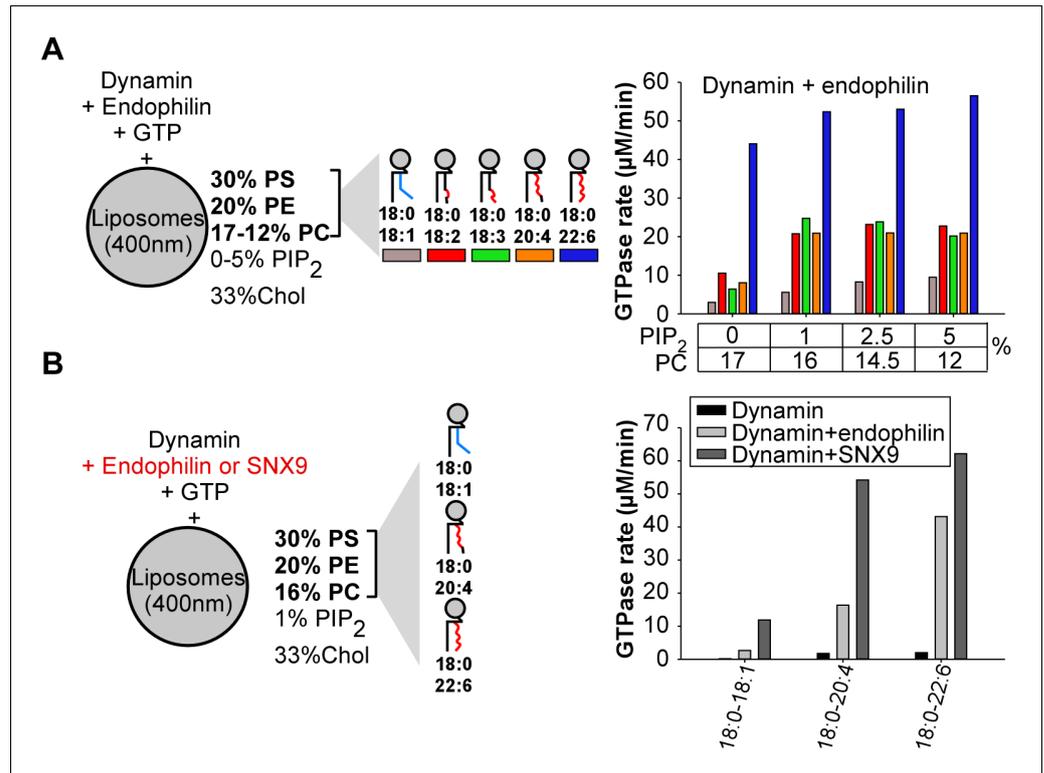
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.004>



**Figure 2—figure supplement 1.** Emission fluorescence spectrum of the push-pull pyrene dye PA. The experiment was performed in the presence of the same liposomes as that used in **Figure 1** to determine the hydration of the membrane interfacial region.

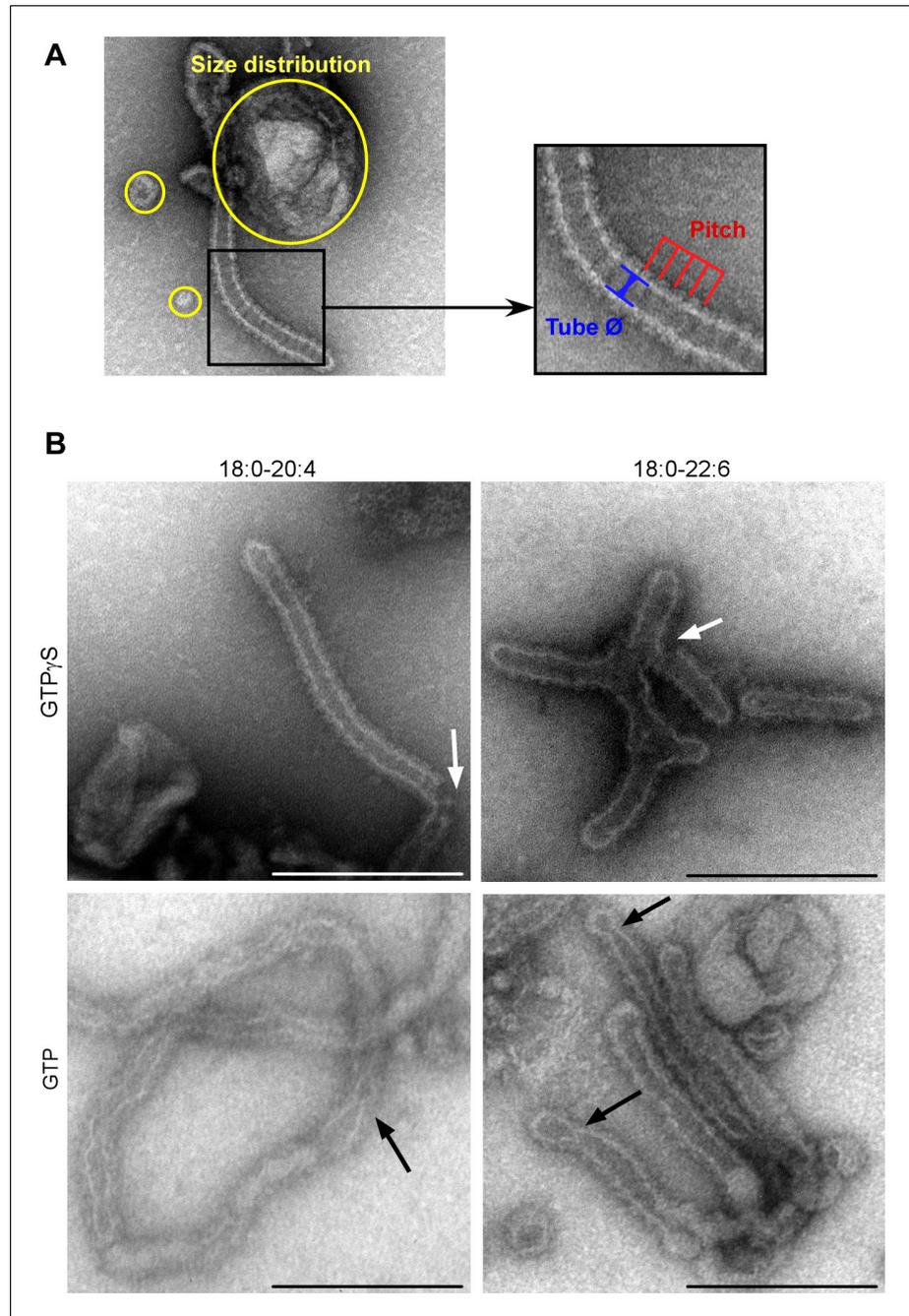
All lipid compositions are shown in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.006>



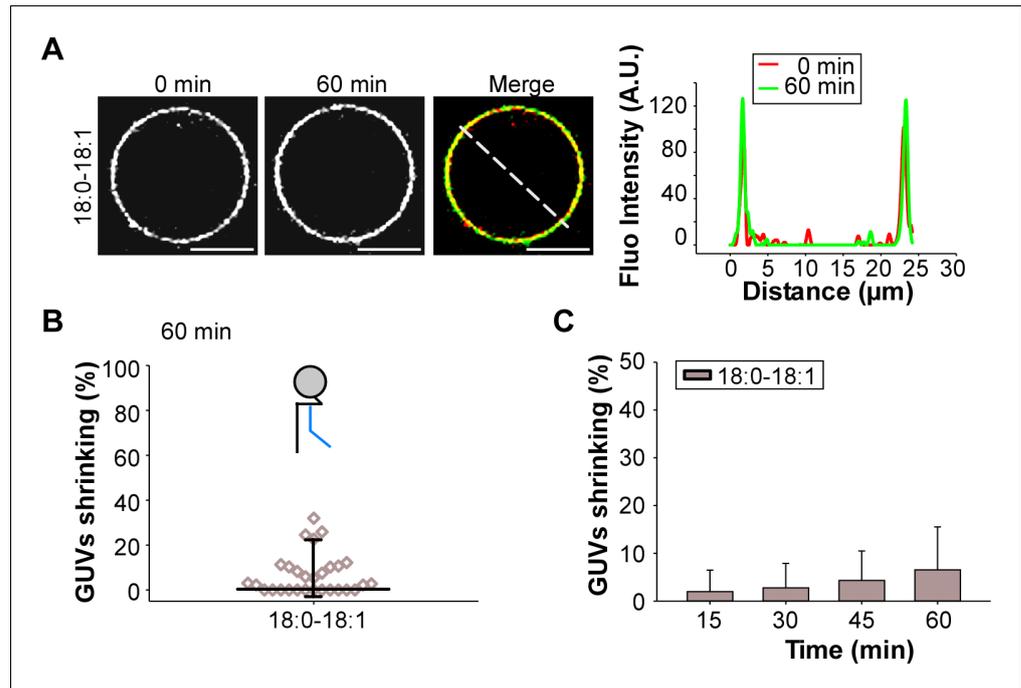
**Figure 3—figure supplement 1.** Dynamin activity at different PIP<sub>2</sub> levels or with different BAR domains on polyunsaturated membranes. (A) GTPase rate of dynamin (0.3 µM)+endophilin (0.6 µM) with large liposomes (400 nm extrusion) containing PS, PE, and PC with the indicated acyl chains, cholesterol and supplemented with 0% to 5% PIP<sub>2</sub> at the expense of PC (see **Supplementary file 1** for the exact lipid composition). (B) GTPase rate of dynamin (0.3 µM) in the absence of in the presence of endophilin (0.6 µM) or SNX9 (0.6 µM) and with liposomes of fixed polar head composition but different acyl chain profiles.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.008>



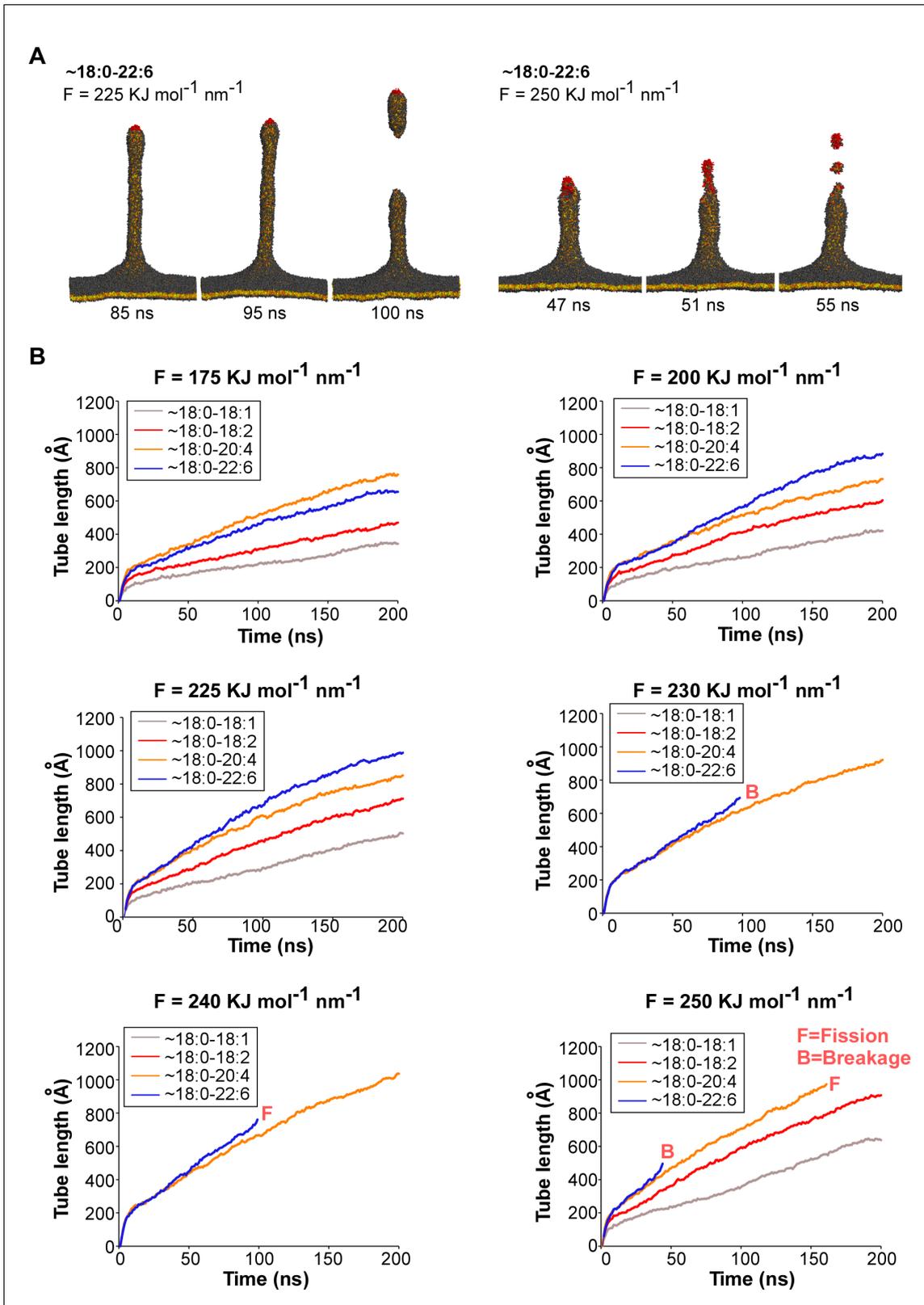
**Figure 4—figure supplement 1.** EM analysis of the dynamin, endophilin and liposome mixtures. (A) Illustration of the measurements used to quantify the effect of dynamin and endophilin on liposomes in TEM experiments. These include the tube radius, the pitch of the dynamin + endophilin spiral and the size of the circular profiles. (B) Electron micrographs of C18:0-C20:4 or C18:0-C22:6 liposomes (400-nm extrusion) after 15 min incubation with dynamin (0.5  $\mu$ M), endophilin (1  $\mu$ M), and GTP or GTP $\gamma$ S (500  $\mu$ M) at room temperature. Black arrows show membrane constructions; white arrows show tube breakages. Scale bar, 200 nm. All lipid compositions are shown in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.010>



**Figure 5—figure supplement 1.** GUV shrinking assay with control monounsaturated membranes. GUVs containing the indicated amounts of C18:0-C18:1 were incubated with dynamin (0.5  $\mu\text{M}$ ) and endophilin (1  $\mu\text{M}$ ) in presence of GTP (500  $\mu\text{M}$ ) for 60 min at 37°C. (A) The colored images show overlays of the GUVs at time 0 (red) and after 60 min incubation (green). No significant effect was detected on these GUVs as compared to GUVs with polyunsaturated phospholipids (see **Figure 5**). (B–C) Quantification of the experiment shown in (A) showing the GUV shrinking distribution after 60 min and mean  $\pm$ SD over the time. Data are obtained from  $\sim$ 20 GUVs from one preparation. Lipid composition is shown in **Supplementary file 1**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.012>

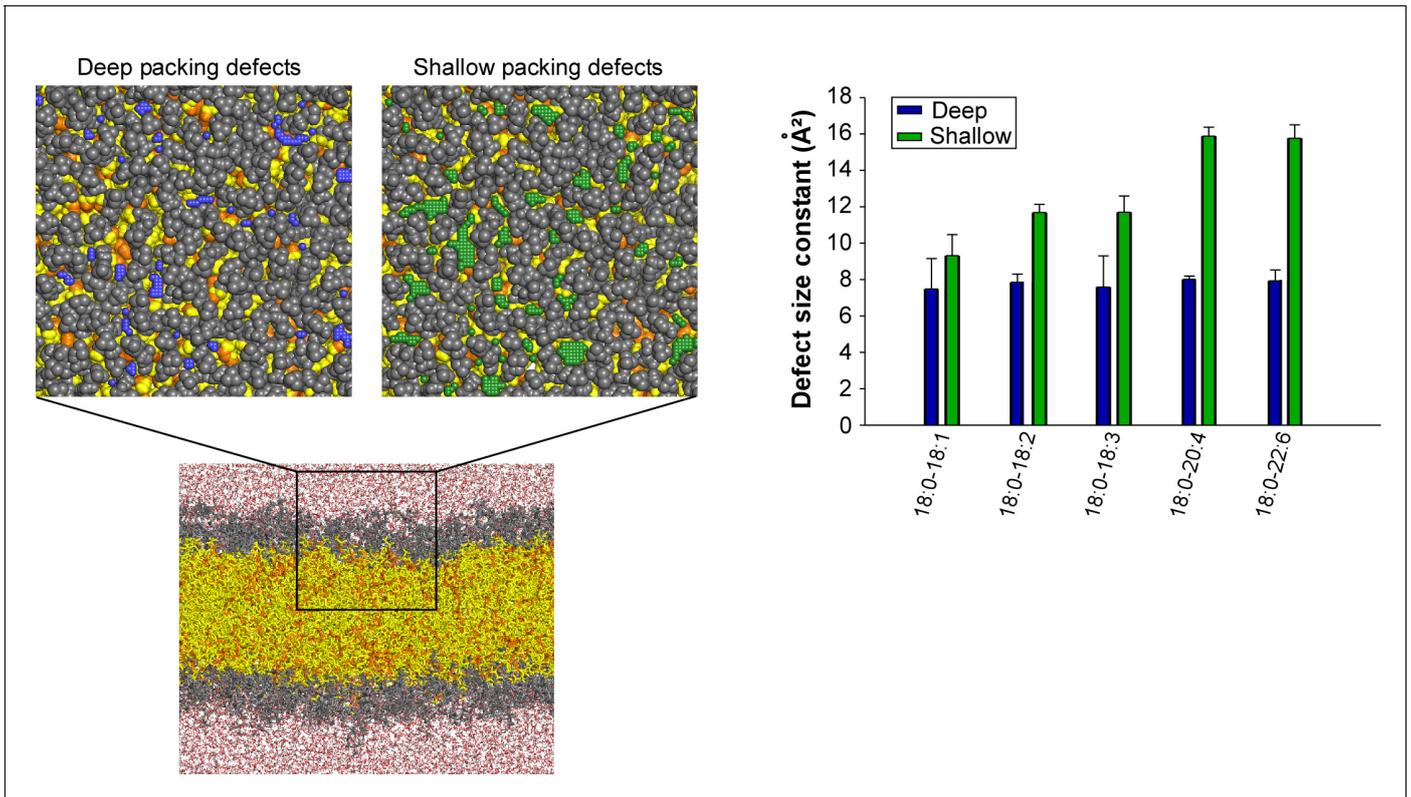


**Figure 6—figure supplement 1.** Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane deformation and fission. (A) Comparison of an authentic fission event and a breakage event. In the first case, the membrane divides below the phospholipid patch (red) that endures the pulling force. *Figure 6—figure supplement 1 continued on next page*

Figure 6—figure supplement 1 continued

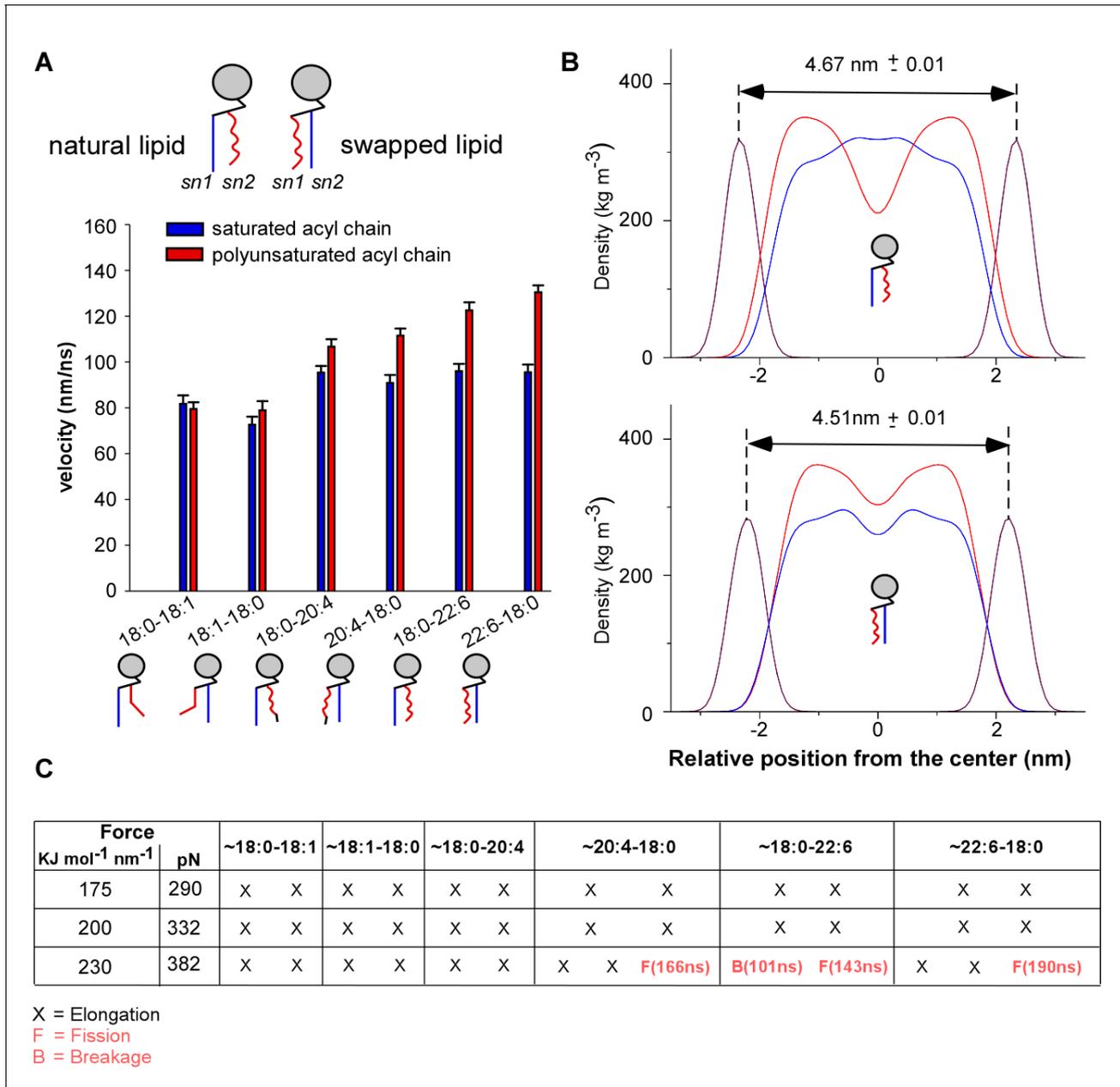
In the second case, the membrane divides within the phospholipid patch (red) that endures the pulling force (B) Time course of tube pulling from coarse-grained models of membranes with asymmetric polyunsaturated phospholipids. Traces ending before 200 ns correspond to tubes that underwent breakage (B) or fission (F). See also **Figure 6A–B**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.014>



**Figure 6—figure supplement 2.** Distribution of deep and shallow lipid packing defects in all-atom simulations of membranes with the same composition as that used in the experiments of *Figure 1* and detailed in *Supplementary file 1*.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.015>



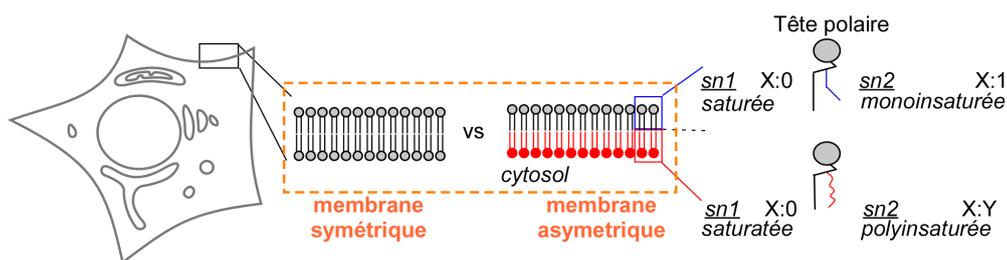
**Figure 6—figure supplement 3.** Comparison of phospholipids with a natural  $sn1$ -saturated- $sn2$ -polyunsaturated profile and with a swapped  $sn1$ -polyunsaturated- $sn2$ -saturated profile. (A) Velocity rate of the terminal  $\text{CH}_3$  group of the acyl chains along the membrane normal ( $z$  velocity). For comparison, the values shown in **Figure 6** for natural phospholipids have been reported. (B) Density profile of the acyl chains across the membrane bilayer. Also shown are the density profiles of the phosphate group, which were used to estimate the bilayer thickness. (C) Summary of the membrane tether pulling simulations. See also **Video 2**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34394.016>

# L'asymétrie des membranes

## 2.1 Contexte biologique

On sait que les phospholipides polyinsaturés s'adaptent et facilitent la déformation membranaire. Cette capacité augmente avec le niveau d'insaturation. L'asymétrie de ces phospholipides est primordiale pour maintenir la balance entre barrière de protection et malléabilité. **La question restante est : dans quel sens se produit l'adaptation des phospholipides polyinsaturés ? Est-ce dans le feuillet convexe ou concave ?** Cette étude vient d'être soumise dans une *special issue*, *Remodeling of biomembranes*, du journal *Soft Matter*. Comme présenté dans l'introduction, les membranes biologiques présentent une asymétrie dans la répartition des espèces lipidiques. Cette asymétrie suggérait jusqu'à présent une probable asymétrie du profil des chaînes aliphatiques. C'est pourquoi nous avons mené une étude sur de l'impact des phospholipides polyinsaturés selon leur répartition au sein du feuillet interne ou externe. Le principe de base a été de simuler en CG des membranes avec une composition asymétrique ; 18:0-18:1 pour un feuillet et 18:0-22:6 pour le feuillet opposé.

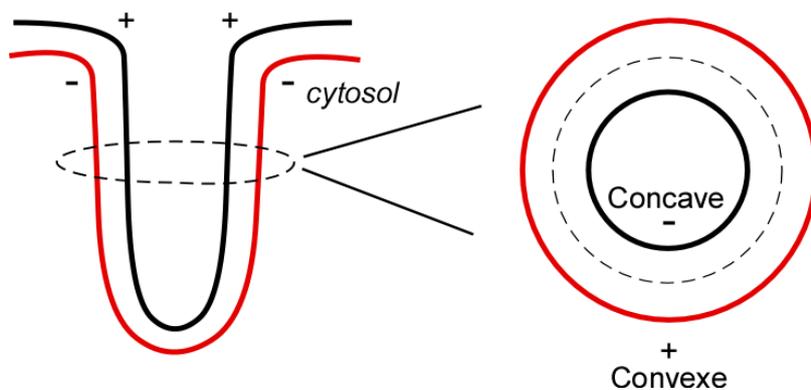


**FIGURE 2.1 – Analyse de l'effet de la polyinsaturation selon sa distribution au sein des bicouches.**

Ensuite, par application d'une force constante au centre de la membrane, un tube est formé d'un côté ou de l'autre. Ces simulations m'ont permis d'étudier tour à tour **l'impact de la polyinsaturation sur la déformation membranaire en courbure positive ou négative**. Une **dose réponse** (0-25-50-75-100%) a également été entreprise afin de déterminer si un seuil de concentration en phospholipides polyinsaturés est nécessaire pour avoir un effet positif sur la déformation membranaire. L'effet des têtes polaires PS et PE a été étudié sur des systèmes

18:0-18:1 dans lesquels 50% de PS ou PE ayant pour chaînes aliphatiques 18:0-18:1 ou 18:0-22:6 ont été ajoutés dans un feuillet.

Durant ce projet j'ai essayé d'allier ces analyses à des expériences biochimiques qui n'ont malheureusement pas aboutis, elles seront discutées dans ce chapitre. Le groupe Levental a entrepris des analyses de lipidomique poussées qui appuient considérablement mes résultats en confirmant une asymétrie du profil de chaînes aliphatiques au niveau de la membrane plasmique des erythrocytes [43]. En effet, cette étude montre la présence d'un fort taux de phospholipides polyinsaturés dans le feuillet cytosolique contrairement au feuillet extracellulaire. Lors de l'endocytose ce dernier se retrouve à l'extérieur du tube ou de la vésicule en formation. Ce feuillet adopte majoritairement une courbure positive. Le feuillet opposé (extracellulaire dans le cas de la membrane plasmique) subit une courbure dans l'ensemble négative (Figure 2.2).

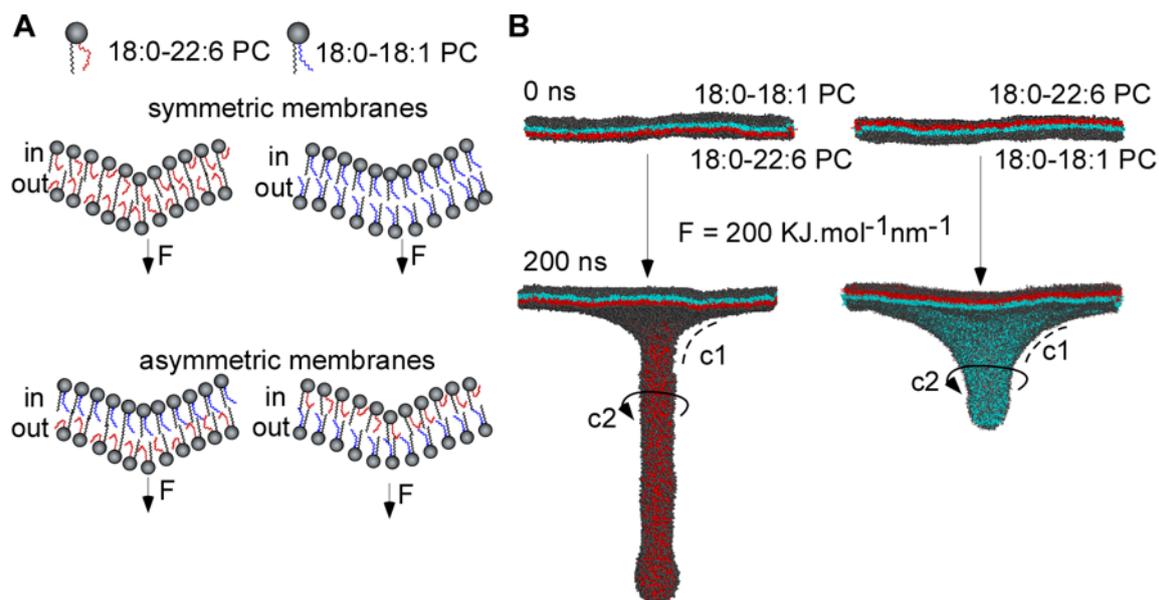


**FIGURE 2.2 – Représentation des courbures membranaires engendrées par la vésiculation** Les courbures négatives sont représentées en trait plein noir et les courbures positives en rouge. Les portions de membranes planes sont en pointillé

## 2.2 Impact de la répartition asymétrique des lipides au sein de la bicouche

Le premier résultat frappant qui m'a conduit à approfondir cet axe est qu'il n'est pas nécessaire que les deux feuillets soient riches en phospholipides polyinsaturés pour faciliter la déformation des membranes. En effet, leur seule présence dans le feuillet convexe lors de la déformation suffit à obtenir un tube de même longueur et épaisseur que les membranes symétriques composées de phospholipides polyinsaturés. Nous avons tout de même remarqué que le début de la déformation, assimilable à la formation du dôme, est plus lente. À l'inverse, lorsqu'ils sont à l'intérieur du tube, la formation du dôme est facilitée. En revanche, sa transformation et son extension en tube sont considérablement ralenties de façon similaire aux membranes symétriques

monoinsaturées (Figure 2.3). De plus, la dose réponse a montré que la réponse positive des phospholipides polyinsaturés à l'extérieur du tube était visible dès l'ajout de phospholipides polyinsaturés (25%).



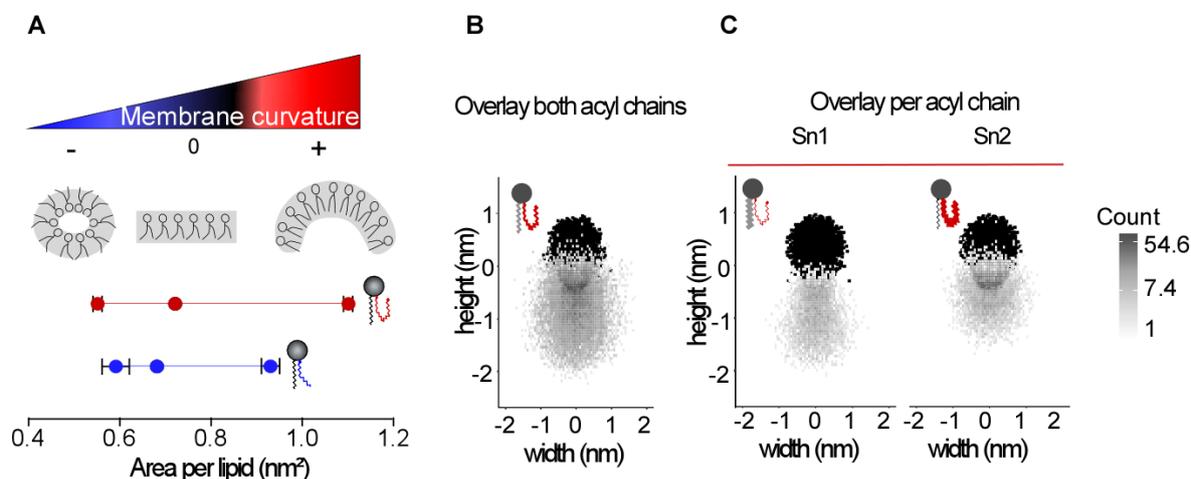
**FIGURE 2.3 – Impact des phospholipides polyinsaturés selon leur distribution au sein de la membrane**, adapté de Tiberti et al 2019 (soumis) A : schémas de modèles membranaires symétriques et asymétriques composés de chaînes aliphatiques polyinsaturées (rouges) et monoinsaturées (bleues) B : Image de la déformation de ces deux types de membranes asymétriques à 0 ns et 200 ns de simulation.

## 2.3 Effet des têtes polaires

Le remplacement des PC en PS ou en PE ont confirmé les résultats précédents. Cependant, un effet favorable des PE polyinsaturés a été observé lorsqu'ils sont à l'intérieur du tube. Ce phénomène est sans doute dû à la taille de la tête polaire du PE plus petite que celle du PC. Pour les phospholipides monoinsaturés, l'effet du PS a été notable avec un effet favorable à l'extérieur du tube. Son électronégativité en est sans doute responsable. En effet, les répulsions électrostatiques présentes entre les PS favoriseraient la formation d'une courbure positive [35]. Les têtes polaires jouent un rôle dans la géométrie des lipides et donc dans leur agencement au sein d'une bicouche. Cependant, cette étude permet de mettre davantage en avant l'impact de la nature des chaînes aliphatiques sur leur adaptation en courbure positive. La répétition de ces simulations sur des membranes beaucoup plus complexes, modélisant la membrane plasmique des neurones, a une fois encore confirmé l'importance des phospholipides polyinsaturés dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique .

## 2.4 Adaptation de la conformation des phospholipides aux courbures positives

Ces analyses, à l'échelle de la membrane, ont montré que l'adaptation des phospholipides se fait plutôt en courbure positive. Des analyses plus précises à l'échelle du phospholipide a permis de montrer l'adaptation conformationnelle des chaînes aliphatiques. L'aire par lipide à l'intérieur du tube reflète une capacité similaire de compression des têtes polaires. L'aire par lipide à l'extérieur du tube reflète une meilleure capacité d'extension des phospholipides polyinsaturés en courbure positive (Figure 2.4.A). Cette plus grande expansion provient de la conformation des chaînes aliphatiques polyinsaturées qui peuvent se replier sur elles mêmes et ainsi former un collier autour de la tête polaire (Figure 2.4.B-C).



**FIGURE 2.4 – Explication moléculaire de l'adaptation des phospholipides polyinsaturés à la courbure positive**, adapté de Tiberti et al. 2019 (soumis) A : Représentation de l'aire par lipide pour chaque espèce dans le feuillet externe et interne B : Superposition de tous les phospholipides en courbure positive. C : Superposition en séparant l'analyse de la chaîne *sn1* et de la chaîne *sn2*. Les points noirs représentent les pseudos atomes de la tête polaire, les points gris le nombre de pseudo atomes de ces chaînes aliphatiques dans chaque case de la grille (=75 x 75). B : Superposition sans distinction *sn1/sn2*.

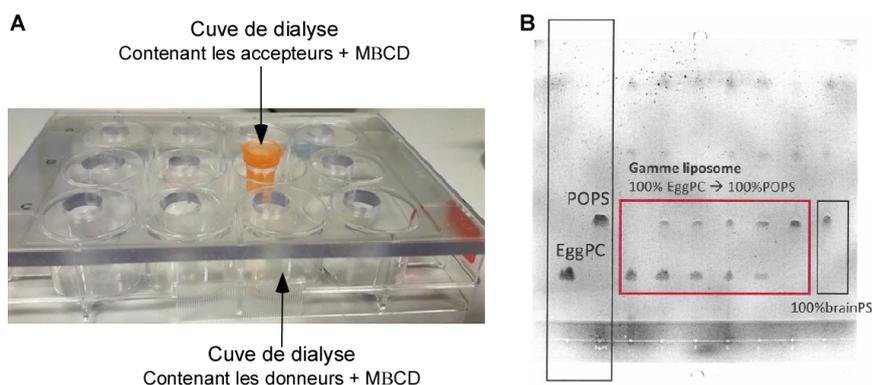
## 2.5 Validation expérimentale

Au vue de ces résultats, l'idée d'une validation expérimentale a été très rapidement soulevée. Le principe était dans un premier temps de former des **liposomes asymétriques** et dans un deuxième temps de mesurer l'activité GTPase de la dynamine sur ces liposomes.

Comme expliqué dans le Matériel et Méthode, le principe est de former des liposomes asymétriques à partir de la M $\beta$ CD assurant le transport de PS entre les liposomes donneurs et accepteurs. Par simplicité, nous avons réduit le nombre d'espèces lipidiques aux PC et PS

dont la charge négative est nécessaire au fonctionnement de la dynamine. Le point critique est d'arriver à séparer dans leur totalité les liposomes donneurs et accepteurs après transfert par la  $M\beta CD$ . En effet, une contamination des liposomes supposés symétriques par des donneurs 100% PS pourrait fausser complètement l'activité de la GTPase.

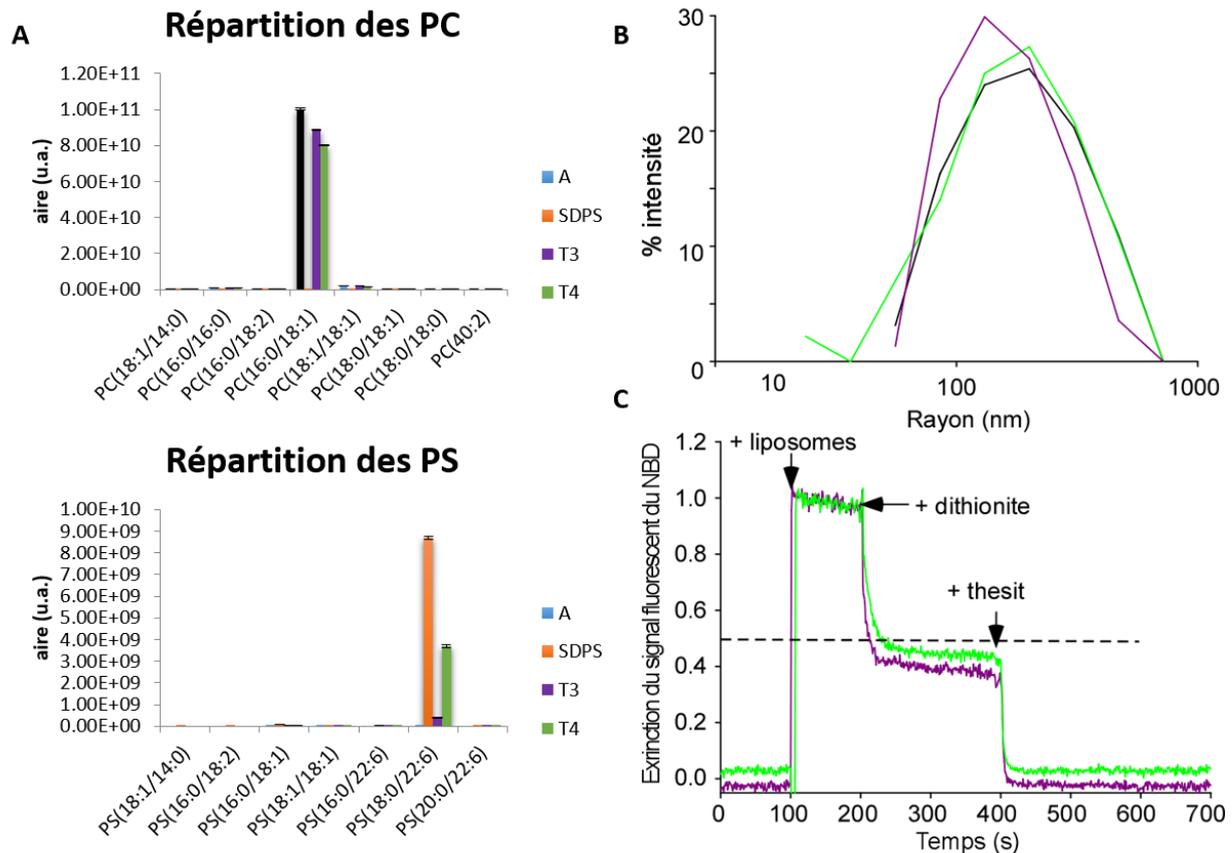
Pour ce faire, nous avons dans un premier temps, pensé à un système de dialyse afin de ne jamais mettre en contact les donneurs avec les accepteurs. Les donneurs sont placés dans des plaques 24 puits tandis que les cuves de dialyse, dont la membrane ne laisse passer que des molécules ayant un poids moléculaire  $<$  à 10 kDa, contiennent les accepteurs (Figure 2.5.A). Cette technique m'a permis d'observer de faibles transferts de lipides des donneurs vers les accepteurs. Cependant, le rendement au bout de 24 h était réellement trop faible. La seconde méthode consistait à procéder en deux temps ; (i) extraction des PS depuis les liposomes donneurs (ii) transfert de PS extrait dans les liposomes accepteurs. Cette dernière méthode aux résultats prometteurs a été choisie. Lors de la première phase de mise au point, j'ai utilisé des lipides fluorescents tels que la rhodamine-PE (5%) afin de visualiser rapidement le transfert ou non de lipides des donneurs vers les accepteurs. Une autre technique a été de séparer les phospholipides de mes liposomes supposés asymétriques par TLC (Figure 2.5.B). Ces deux éléments m'ont permis de m'affranchir des analyses lipidomiques réalisables uniquement par la plateforme d'analyse des biomolécules de l'institut pour les premières mises au point.



**FIGURE 2.5 – Mise au point expérimentale.** A : Représentation du système de dialyse mise en place à partir de plaque 24 puits permettant de séparer les liposomes accepteurs et donneurs tout en permettant les échanges à travers la cuve de dialyse B : Exemple d'une révélation réalisée en TLC afin de séparer le PC du PS sur une gamme de liposomes à la concentration en PS constante

Une fois le transfert de lipides observés, je me suis reconcentrée sur les compositions utiles à mon projet : PS mono ou polyinsaturés pour les donneurs et PC monoinsaturés pour les

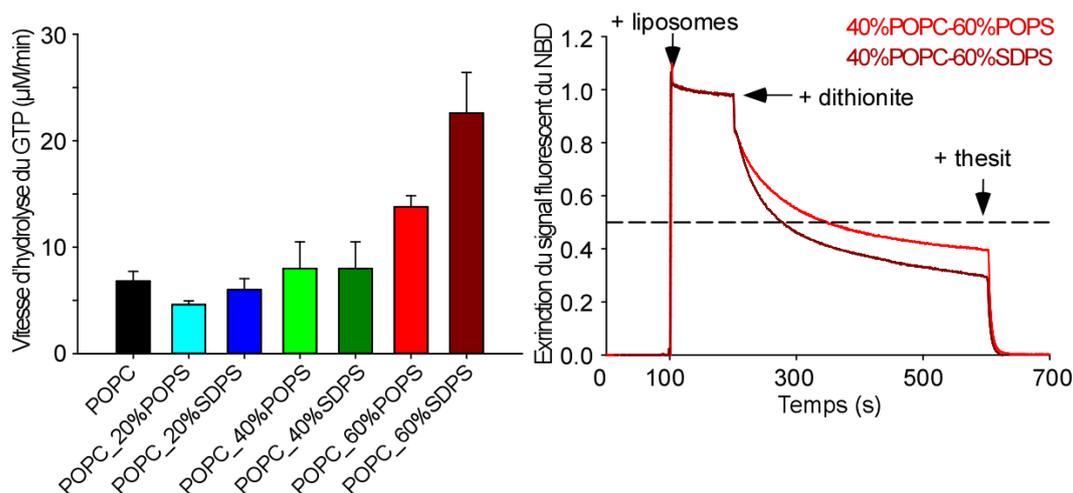
accepteurs. Le transport des PS a été avéré par les analyses lipidomiques (Figure 2.6.A). De plus, la taille des liposomes a été conservée au cours des échanges lipidiques (Figure 2.6.B). En revanche, le maintien de l'asymétrie des liposomes, n'a pu être validé. En effet, l'ajout de 1% de NBD-PE dans les liposomes donneurs devait nous permettre de valider l'asymétrie. Transporté par la  $M\beta CD$ , comme les phospholipides PS, nous devions le retrouver uniquement dans le feuillet externe. Le signal fluorescent du NBD accessible peut être immédiatement éteint par la dithionite. L'extinction du signal n'a été que partielle. Seul l'ajout de détergent destructurant les membranes a permis d'éteindre le signal (Figure 2.6.C). Au vu de ces résultats, des molécules de NBD-PE étaient également présentes dans le feuillet interne. Tout le protocole est réalisé à la suite. Le temps de *flip-flop* d'un phospholipide étant de plusieurs heures voire d'une journée, les liposomes ont donc sans doute subi des dommages, comme la formation de pores par la  $M\beta CD$ .



**FIGURE 2.6 – Invalidation des liposomes asymétriques.** A : Transfert de SDPS révélé dans les fractions T3 et T4 correspondant aux liposomes asymétriques obtenus en utilisant différentes concentrations de  $M\beta CD$  (respectivement 30mM et 40mM). Les accepteurs (A) et le donneur (SDPS) sont également représentés. B : Vérification de la taille des liposomes C : Extinction du signal du NBD-PE en présence de dithionite avant et après ajout de détergent (Thesit)

Il a fallu alors ajuster la quantité de  $M\beta CD$  nécessaire pour atteindre un équilibre entre

transport suffisant de PS et conservation de l'intégrité des liposomes. Afin de déterminer la quantité de PS nécessaire pour mesurer une activité GTPase de la dynamine, j'ai travaillé sur des **liposomes symétriques** sur un fond de 16:0-18:1PC contenant 20-40 ou 60% de PS mono ou polyinsaturés (Figure 2.7). Les résultats ont montré une activité GTPase approximant les 15 et 25  $\mu\text{mol}/\text{min}$  pour respectivement des liposomes formés de 60% de 16:0-18:1PS et 18:0-22:6PS. L'ajout d'1% de NBD-PE m'a permis de contrôler la perméabilité des membranes. Il s'est avéré que les deux types de membrane à 60% de PS étaient fortement perméable.



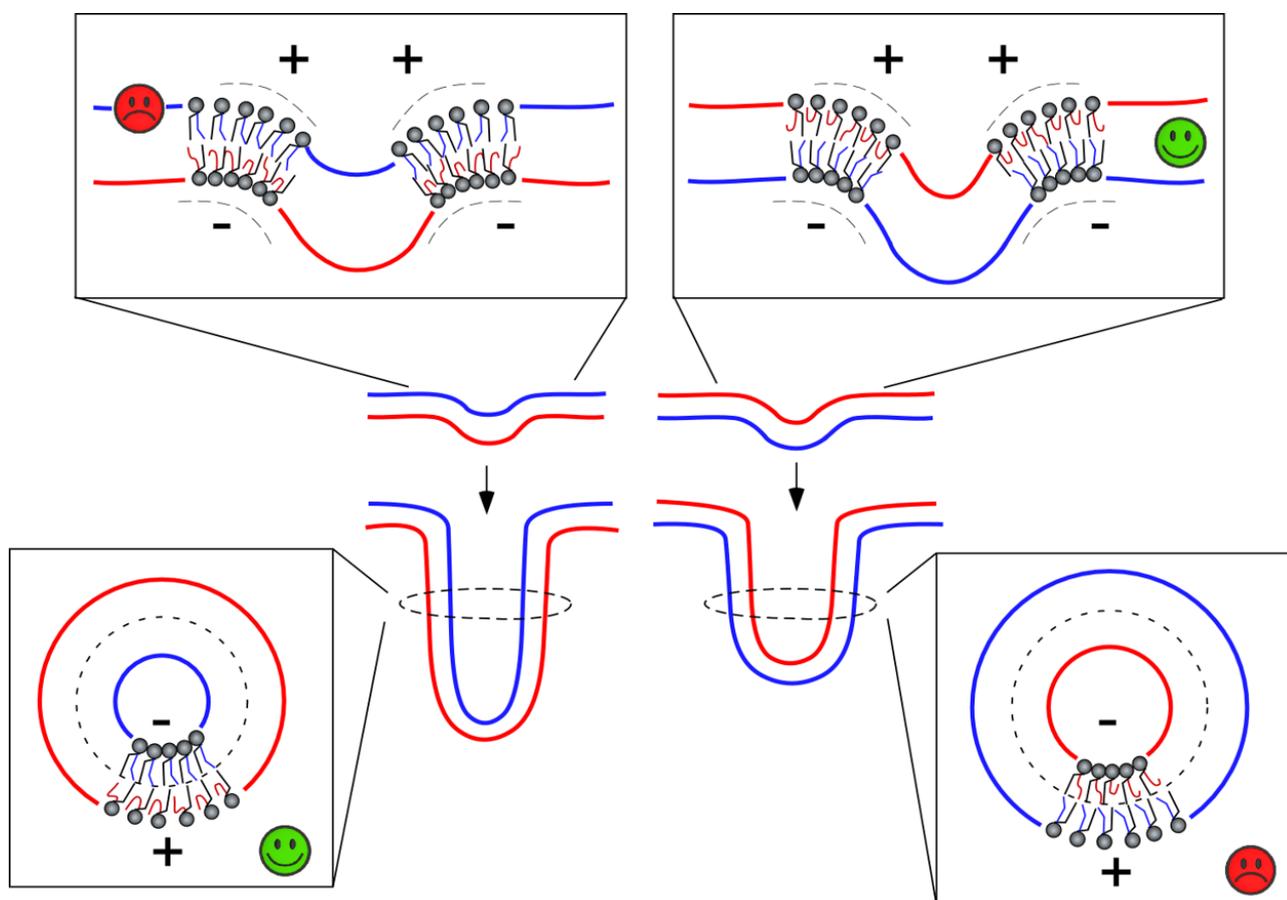
**FIGURE 2.7** – **Activité GTPase de la dynamine selon la quantité de PS** mono ou polyinsaturés en présence d'endophiline et vérification de l'imperméabilité des membranes contenant 60% de PS.

Arrivé à ce stade, j'ai décidé de ne pas recourir à la validation expérimentale. En effet, 60% de PS étaient nécessaires pour observer une activité GTPase, quantité bien trop importante pour trouver un équilibre avec la  $M\beta\text{CD}$ , entre transport des PS et maintien de l'intégrité des liposomes. De plus, les différences d'activité observées sont dues plus à la perméabilité des membranes qu'à un effet réel des chaînes aliphatiques.

## 2.6 Conclusion

Les mouvements en  $z$ , observés précédemment, facilitent leur adaptation aux courbures positives. Les phospholipides polyinsaturés n'ont pas de forme définie ; aussi bien adeptes des membranes planes que des courbures négatives, ils sont fortement avantageux en courbure positive, là où d'autres lipides sont de véritables freins à la tubulation. La répartition des surfaces concaves et convexes dans un tube en formation ou dans un bourgeon est plus complexe que dans une structure fermée comme une vésicule. Au niveau de la liaison entre le tube et la membrane plane, la bicouche présente une courbure en selle de cheval où les deux courbures

principales sont de signe opposé, c'est-à-dire positive et négative. Cette géométrie pourrait expliquer pourquoi l'impact des lipides polyinsaturés est différent entre le début de la déformation de la membrane (quand un dôme se forme) et pendant l'extension du tube. Lors de la formation d'un dôme, les courbures formées par la base du tube en formation prédominent ce qui rend les lipides polyinsaturés du feuillet opposée à la force de traction avantageux pour la formation du dôme. Lorsqu'un tube s'est formé, la géométrie de la base demeure, mais sa contribution à l'énergie globale du tube devrait devenir négligeable par rapport aux contraintes de la partie tubulaire elle-même. Dans ces conditions, les lipides polyinsaturés du feuillet externe du tube sont avantageux pour son allongement (Figure 2.8).



**FIGURE 2.8** – Modèle de l'impact de la distribution des phospholipides polyinsaturés sur la déformation membranaire, extrait de Tiberti et al. 2019 (soumis).





**The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation**

Journal:	<i>Soft Matter</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tiberti, Marion; Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275; CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 Antony, Bruno; Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275; CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 Gautier, Romain; Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275; CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275

## ARTICLE

# The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their facilitating effect on membrane deformation

Marion Tiberti <sup>a</sup> Bruno Antony <sup>\*a</sup> and Romain Gautier <sup>\*a</sup>

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

In the cell, membrane deformation and fission (collectively referred to as 'budding') is driven by specific protein machineries but is also influenced by lipid composition. We previously reported that phospholipids with polyunsaturated acyl chains facilitate membrane budding because they adapt their shape to membrane curvature, thereby decreasing membrane bending rigidity. The facilitating effect of polyunsaturated lipids was observed in experiments and simulations performed on membranes where the two bilayer leaflets had the same lipid composition. However, biological membranes are generally asymmetric. Here, we present coarse-grained molecular dynamics simulations on asymmetric phospholipid bilayers undergoing deformation *via* a pulling force along the bilayer normal. One leaflet contains monounsaturated C18:0-C18:1-phospholipids, whereas the opposite leaflet contains polyunsaturated C18:0-C22:6-phospholipids. When present in the monolayer orientated towards the pulling force and thereby in the convex face of the forming tube, C18:0-C22:6-phospholipids facilitate membrane tubulation. In contrast, C18:0-C22:6-phospholipids in the concave face of the tube have no effect. Analysis of lipid shape indicates that these contrasting effects arise from the superior ability of polyunsaturated phospholipids to swell in the convex leaflet, whereas mono and polyunsaturated phospholipids behave similarly in the concave leaflet. The leaflet-dependent effect of polyunsaturated phospholipids matches well their asymmetric distribution in biological membranes, notably in synaptic vesicles, which are produced by the fastest budding event in the body.

## 1 Introduction

Formation of transport vesicles on membrane-bound organelles and at the plasma membrane is driven by the assembly of protein coats, which impose a spherical shape to the membrane, and by proteins acting at the bud neck to promote membrane fission<sup>1</sup>. In addition to these specific machineries, other factors contribute to the efficiency of vesicle formation. These include cytoskeleton proteins, molecular motors, and intrinsic physical membrane properties such as protein crowding, membrane tension or membrane bending rigidity<sup>2</sup>. Rigidity, which describes the resistance of the membrane to bending, depends on the lipid composition<sup>3</sup>. For example, saturated lipids, which increase membrane rigidity, reduce the efficiency of protein coat-mediated membrane budding<sup>4</sup>, whereas polyunsaturated phospholipids, which reduce membrane rigidity, facilitate membrane deformation and fission<sup>3,5,6</sup>. The effects of lipid unsaturation on membrane budding might be physiologically relevant since the acyl chain profiles of phospholipids shows striking differences between cell types and between organelles<sup>7,8</sup>. Notably, synaptic vesicles, which are the smallest transport vesicles and form by an

ultrafast endocytic event, are extremely rich in phospholipids with a polyunsaturated acyl chain (C20:4 or C22:6) at position sn2 of the glycerol backbone<sup>9,10</sup>. Furthermore, manipulating the acyl chain profile of the membranes of model cell lines affects endocytosis<sup>5,11</sup>.

Numerous experimental approaches have been developed to study membrane budding events, from cellular observations to reconstitutions with well-defined lipid and protein components<sup>12</sup>. In addition, coarse-grained molecular dynamics simulations have been designed to mimic membrane deformation<sup>13</sup>.

By combining experiments and simulations, we previously addressed the impact of phospholipid polyunsaturation on membrane budding<sup>5,6</sup>. Membrane enrichment in C22:6-containing phospholipids dramatically increases the budding efficiency of the endocytic proteins endophilin and dynamin both in cells and *in vitro*. In addition, a comprehensive analysis coupled to molecular dynamics simulations indicates that the efficiency of membrane deformation increases by two orders of magnitude depending on the number of polyunsaturated acyl chains carried by the phospholipids ( $0 < 1 < 2$ ) and the degree of acyl chain unsaturation (series 14:0 < 18:1 < 18:2 < 18:3 < 20:4 < 22:6). This large range results from the combination of two effects: a decrease in membrane rigidity *per se*, but also an increase in membrane permeability. Overall, lipids with one saturated acyl chain and one polyunsaturated acyl chain (e.g.

<sup>a</sup> Université Côte d'Azur et CNRS, IPMC, 660 route des Lucioles 06560 Valbonne France

\*Corresponding authors: [antony@ipmc.cnrs.fr](mailto:antony@ipmc.cnrs.fr); [gautier@ipmc.cnrs.fr](mailto:gautier@ipmc.cnrs.fr)

† Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

18:0-22:6) provide the best compromise for keeping the permeability of the membrane at low levels, while facilitating membrane budding<sup>5</sup>.

Our previous in vitro reconstitutions and simulations were performed with symmetric lipid bilayers. However, biological membranes are asymmetric. Historically, the transbilayer distribution of the main lipid classes was studied on the plasma membrane of erythrocyte cells<sup>14</sup>. Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) are mainly found in the inner (cytosolic) leaflet, whereas sphingomyelin (SM) and phosphatidylcholine (PC) are mostly present in the outer leaflet<sup>15</sup>. This asymmetry in lipid classes should be accompanied by a strong asymmetry in the acyl chains. Indeed, PS and PE are the most polyunsaturated lipid classes in biological membranes. For example, PS and PE species containing 4 to 6 double bonds account for about 60 to 80 mol % of these phospholipids in the brain including synaptic vesicles<sup>10</sup>. In contrast, polyunsaturated PC species are less abundant ( $\approx 15$  mol%) and SM is mostly saturated. Thus, the asymmetry of the plasma membrane in term of lipid classes should translate into a strong asymmetry in acyl chain content. This possibility was recently addressed by the Levental group who performed a comprehensive lipidomics analysis of the erythrocyte membrane<sup>16</sup>. Phospholipids with more than two unsaturations are much more abundant in the cytosolic leaflet than in the outer leaflet, notably due to the exclusive distribution of polyunsaturated PS and PE species such as 16:0-20:4 PS and 16:0-22:6 PE in the cytosolic leaflet. Differences in the diffusion rate of model peripheral proteins as well in the fluorescence properties of probes, which were added externally or internally, indicate that the cytosolic leaflet of plasma membrane of several cell types is more fluid than the outer leaflet<sup>16</sup>. Thus, the compositional differences between the two leaflets of the plasma membrane might contribute to distinct biophysical properties. However, whether the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids has an influence on membrane bending rigidity has not been tested.

In this study, we used molecular dynamics simulations to examine whether the transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids in model membranes impacts membrane mechanics. We observed that polyunsaturated lipids facilitate membrane deformation when they are present in the convex leaflet (positive curvature) but not in the concave leaflet (negative curvature). This topology makes the plasma membrane of neurons well adapted to fast endocytosis.

## 2 Computational Methods

### Molecular dynamics simulations

Our simulations were performed according to a previously described procedure<sup>13</sup> that we adapted to membranes with a specific acyl chain profile<sup>5,6</sup>. Specifically, we used Martini coarse-grained lipid models (Wassenaar et al., 2015) to approximate monounsaturated 18:0-18:1 and polyunsaturated phospholipids 18:0-22:6 (Fig. 1A). The systems, which contained

$\approx 18\,000$  lipids solvated with a 100 nm-thick water layer, were built by the Charmm-Gui tool adapted to coarse-grained simulations and were equilibrated with a standard six-step process<sup>17</sup>.

To simulate membrane deformation, we applied a force perpendicular to the initially flat bilayer (Fig. 1B). The force varied from 150 to 225  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$  and was applied to a lipid patch of 3 nm in radius (Fig. 1B). These lipids were restrained in the lateral plane ( $x,y$ ). Pulling simulations were performed with GROMACS 4.5<sup>17</sup>. The different membranes were simulated under a semi-isotropic condition and the periodic boundaries were applied in all directions. Lipids and water/ions were coupled separately. The time step was fixed at 20 fs and the cut-off for the Lennard-Jones and electrostatic interactions was set at 1.2 nm. The smooth particle-mesh was used to evaluate the electrostatic interactions. During the production runs, the V-rescale thermostat and Berendsen barostat<sup>18</sup> stabilized the temperature at 310K and pressure at 1bar, respectively. The simulations were performed for 200 ns or 400ns and were repeated three to five times for all conditions.

### Membrane composition

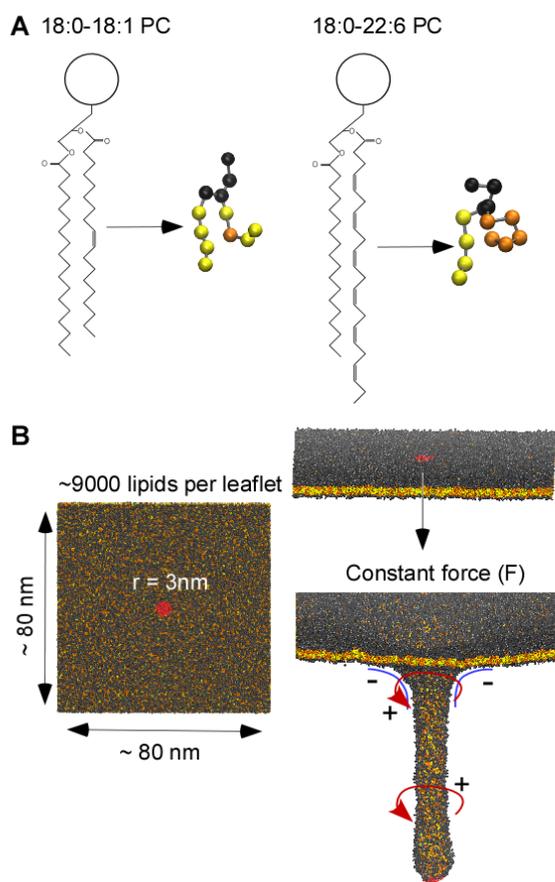
All simulations with bilayers displaying symmetric lipid composition have been published and were used here for comparison<sup>5</sup>.

To study the impact of the distribution of the polyunsaturated phospholipids between the two membrane leaflets, we prepared PC bilayers in which one leaflet contained 0, 25, 50, 75 or 100 mol % of 18:0-22:6 PC whereas all other lipids were 18:0-18:1 PC. The resulting asymmetric system required slight adjustment of the total lipid number in each leaflet to maintain the area of the two leaflets equal.

To evaluate the impact of the polar head, we prepared asymmetric bilayers in which one leaflet was made solely of 18:0-18:1 PC, whereas the opposite leaflet contained 50 mol% 18:0-18:1 PC and 50 mol% of another phospholipid (PE or PS) with a defined acyl chain profile (either 18:0-18:1 or 18:0-22:6). To better approach the composition of biological membranes, we built a multi-component system in which one leaflet consisted of 18:0-18:1 PC whereas the opposite leaflet mimicked the phospholipids of the neuronal plasma membrane both in term of polar head and acyl chain profile<sup>19</sup>. This leaflet is described in Table 1. As a control, we built a similar bilayer in which all polyunsaturated phospholipids were replaced by 18:0-18:1 phospholipids (Table 1). We used counter ions to neutralize all systems containing anionic lipid.

### Simulation analysis

For each tube, we measured the following geometrical parameters. We estimated the length of the tube (including the base) by calculating the difference between  $z_{\text{max}}$  and  $z_{\text{min}}$  of the bilayer and subtracting membrane thickness. We calculated the elongation velocity from the slope between  $t = 20$  ns and  $t = 100$  ns



**Fig 1** Principle of the molecular dynamics simulations. **A.** Phospholipid coarse-grained models. Black beads are polar head, yellow beads are saturated carbon and orange beads are unsaturated carbon. **B.** The pulling system. The phospholipids shown in red are the central patch from which we applied a constant pulling force, perpendicular to the initially flat membrane (left) to induce deformations leading different curvature of membrane (right): positive curvature in red and negative curvature in blue.

of the tube kinetics. We estimated the tube radius ( $r$ ) for tubes longer than 40 nm. For this, we divided each tube into 4 nm slices and the radius of each slice was obtained by averaging the distance between the center of the tube and the nitrogen beads (NC3 in PC, NH3 in PE and CNO in PS) that compose the outer leaflet (outer radius) or the inner leaflet (inner radius). The final radius ( $r$ ) was the average of the radius of all slices. The tube curvature ( $c_2$ ) was given by  $1/r$ .

To obtain the curvature at the base of the tube ( $c_1$ ), we determined the radius of an osculating circle.

The area per lipid (APL) was calculated from the lateral surface of the entire tube by the following formula:

$$APL = 2\pi r h / n$$

where  $h$  is the estimated height of tube (without the base and dome),  $r$  is the radius and  $n$  is the number of lipids in this region. For the conformation analysis, we used two methods. One to provide information on the conformation of the *sn2* acyl chains. The second one provided information on the overall phospholipid geometry.

The bending angle of *sn2* acyl chains was calculated between GL1-D2A-CA4 and between D1A-D3A-D5A for monounsaturated and polyunsaturated phospholipids, respectively. To cluster the acyl chain conformations, we divided them into 3 groups: straight ( $> 120^\circ$ ), moderately kinked (between  $70^\circ$  and  $120^\circ$ ), and highly kinked ( $< 70^\circ$ ).

To assess the effect of membrane curvature on phospholipid geometry, we overlapped all lipids of the tube that are in the same leaflet (excluding the base and the dome). To do this, we used the lipid cylindrical coordinates. By rotation and translation operations, all lipids were aligned on their GL1 bead without modifying their intrinsic geometry. Thereafter, we projected the lipids onto a grid (75 x 75 squares) and used a grey color logarithmic scale to represent the number of beads in each square. The resulting overlays were represented in two ways; one in which we separately analyzed the *sn1* and *sn2* chains; one in which we considered all beads from the two acyl chains.

**Table 1** : Composition of the outer leaflet of the multicomponent system. Top: neuronal plasma membrane; Bottom: control. PI: phosphatidylinositol.

	PC(27.3%)	PE (41.8%)	PS (20%)	PI (10.2%)
<b>18:0-18:0</b>	23.1%	-	4.6%	-
<b>18:0-18:1</b>	37.2%	12.1%	19.5%	27.9%
<b>18:1-18:1</b>	10%	-	21.8%	-
<b>18:0-20:4</b>	20.2%	35.2%	21.8%	27.9%
<b>18:0-22:6</b>	9.5%	52.7%	23.2%	44.1%

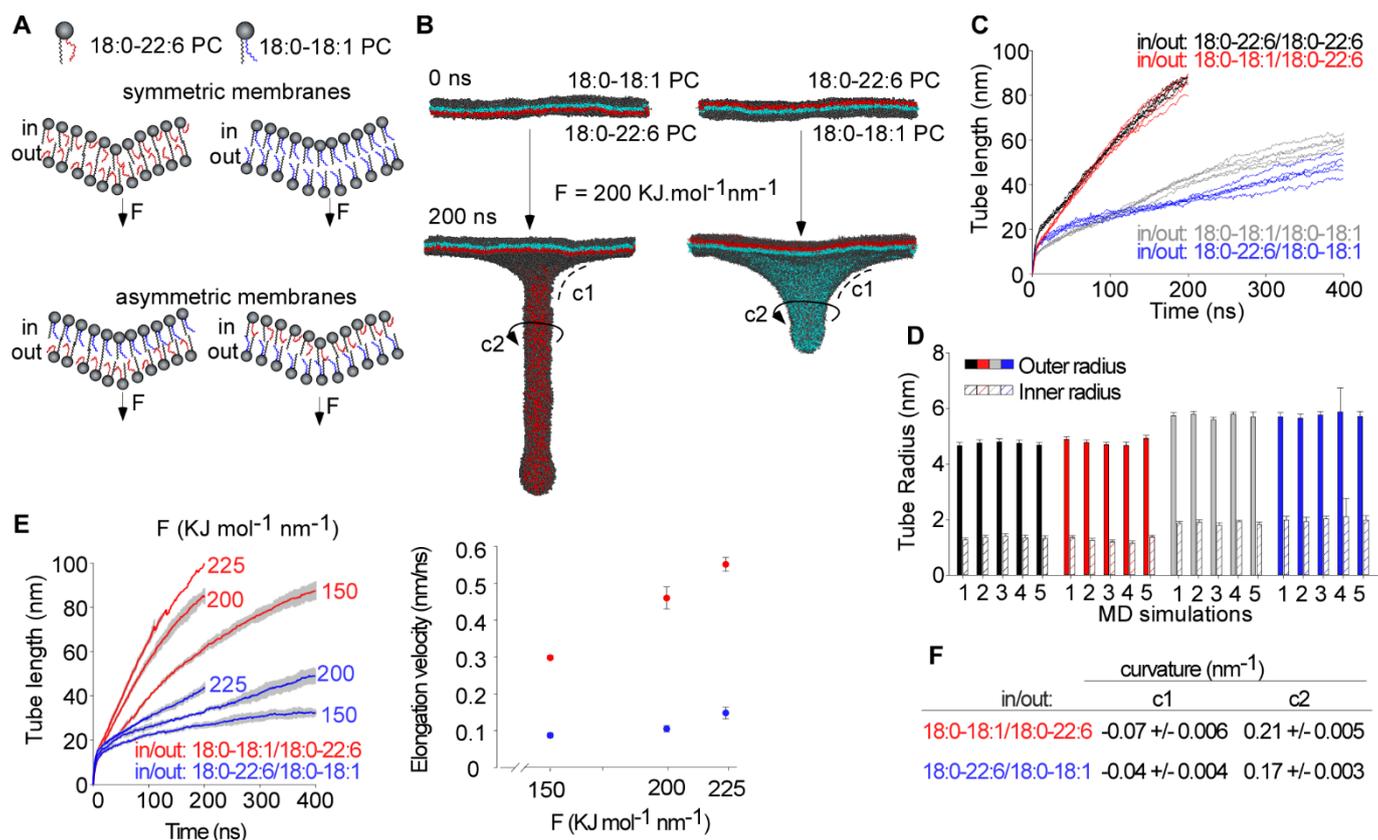
	PC (27.9%)	PE (41.6%)	PS(20.5%)	PI(10.2%)
<b>18:0-18:0</b>	23.5%	-	4%	-
<b>18:0-18:1</b>	66.9%	100%	74%	100%
<b>18:1-18:1</b>	9.6%	-	22%	-

## 3 Results

### 3.1 The transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids determines their effect on membrane deformation

In previous simulations performed with symmetric PC membranes, we reported a strong facilitating effect of polyunsaturated lipids on membrane deformation<sup>5,6</sup>. Specifically, the rate of tube elongation (induced by a constant perpendicular force), was 3-4 times higher with 18:0-22:6 PC membranes compared to 18:0-18:1 PC membranes. To determine if this effect depends on the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids, we performed similar simulations with asymmetric membranes. One leaflet contained monounsaturated 18:0-18:1 PC, whereas the other leaflet contained polyunsaturated 18:0-22:6 PC. We applied a constant force on one side or the other (Fig. 2A). Therefore, the polyunsaturated lipids were either in the outer (Fig. 2B left) or inner (Fig. 2B right) leaflet of the tube.

The snapshots of Fig. 2B and the quantifications of Fig. 2C-D show that the transbilayer distribution of polyunsaturated phospholipids had a dramatic effect on membrane



**Fig 2** The transbilayer distribution of polyunsaturated PC determines its facilitating effect on membrane deformation. **A.** Schemes of the membrane models composed of 18:0-18:1 (blue) and/or 18:0-22:6 (red). **B.** Snapshots of membrane deformation at 0 or 200 ns. **C.** Time course of tube pulling from symmetric 18:0-22:6 (black) or 18:0-18:1 (grey) PC membranes and from asymmetric PC membranes with 18:0-22:6 PC outside (red) or inside the tube (blue). **D.** Outer and inner tube radius for each membrane system and each replicate of pulling simulations. **E.** Left: time course of tube pulling from asymmetric membrane under increasing pulling forces. Right: Tube elongation velocity as a function of pulling force. **F.** Curvature values at the base and at the middle of the tube for each asymmetric membrane system (see panel A for the definition of c1 and c2). Errors bars in D show standard deviation of the tube radius as measured from 80-100 snapshots of the same simulation over time. Error bars in E and F show standard deviation from three simulations (E, F)

deformation. When 18:0-22:6 PC was present in the outer leaflet of the tube, the overall process of elongation was fast and similar to that observed with pure symmetric 18:0-22:6 PC membranes (Fig. 2C). When 18:0-22:6 PC was present in the inner leaflet of the tube, elongation was slow and comparable to that observed with pure symmetric 18:0-18:1 PC membranes (Fig. 2C). Tube radius analysis showed that tubes with 18:0-22:6 PC in the outer leaflet and 18:0-18:1 PC in the inner leaflet were as thin as pure 18:0-22:6 PC tubes. In contrast, tubes with 18:0-18:1 PC in the outer leaflet and 18:0-22:6 PC in the inner leaflet had a larger diameter, similar to that observed with pure 18:0-18:1 PC tubes (Fig. 2D).

We repeated the tube extrusion protocol at varying forces, from 150 to 225  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$  (Fig. 2E). The elongation velocity increased with the applied vertical force and was always much faster when polyunsaturated lipids were present in the outer leaflet of the tube compared to the opposite distribution. In addition, membrane curvature at both the base and along the tube (Fig. 2B) was greater when 18:0-22:6 PC was on the outer leaflet of the tube (Fig. 2F).

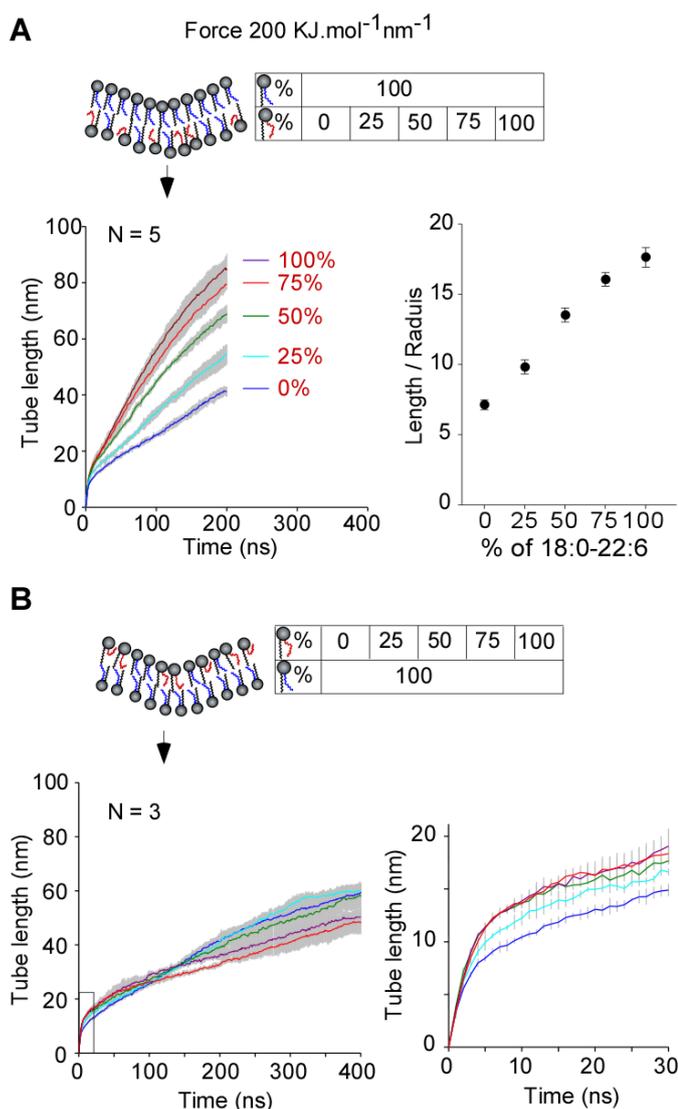
To check that these results were not biased by the limiting membrane surface or the pulling area, we performed simulations under other conditions. First, we doubled the surface of the membrane.

Second, we enlarged both the membrane surface and the pulling area by 4-fold. As shown in Fig. S1, 18:0-22:6 PC facilitated membrane deformation in these systems only if present in the outer leaflet of the tube or the bud.

Altogether, these simulations indicate that it is not necessary to have polyunsaturated lipids on both leaflets to facilitate membrane deformation: polyunsaturated phospholipids are beneficial solely when present in the outside, i.e. convex, leaflet of the tube.

### 3.2 Dose-dependent effect of 18:0-22:6 PC

The concentration of polyunsaturated phospholipids in biological membranes varies from a few mol % to up to 80 mol % depending on the organism, the tissue or the organelle<sup>7-9,20</sup>. We performed simulations in which we increased the amount of 18:0-22:6 PC from 0 to 100% in the outer or in the inner

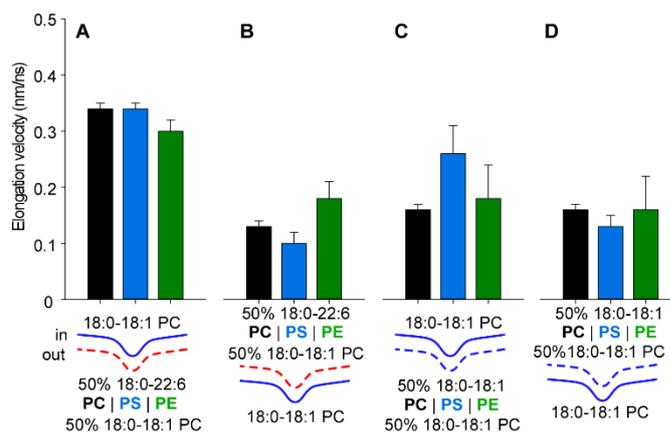


**Fig 3** Dose response of the effect of 18:0 22:6 PC when present in the outer (A) or in the inner (B) leaflet of the tube. The left panels show the times course of tube pulling as averaged from 3 or 5 replicas; the shaded area shows the SD. The right panel in A shows length/radius ratio of the tube at 200 ns. The right panel in B shows a zoom of the deformation kinetics at early stage.

leaflet of the tube. We observed a monotonous increase in the deformability of the membrane, both in length and in radius, when the fraction of 18:0-22:6 PC increased in the outer leaflet of the tube (Fig. 3A). In contrast, the presence of polyunsaturated phospholipids inside the tube was not beneficial for tube elongation (Fig. 3B). In the latter case, we noticed that the curves of tube elongation crossed (Fig. 2C and 3B). For the first 100 ns, when a dome but not a full tube had just formed, the presence of 18:0-22:6 PC in the leaflet opposite to the pulling force facilitated membrane deformation. Thereafter, that is during tube elongation, the presence of 18:0-22:6 PC was slightly inhibitory.

### 3.3 Influence of the lipid polar head

To determine if the effect of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids depends on the nature of the polar head,



**Fig 4** Effect of the lipid polar head group. Tube pulling was performed as in Figure 2B with bilayers in which 50 % of PC in one leaflet was replaced by PE or PS. **A, B.** With 50% 18:0-22:6 PC, PS or PE in the outer (A) or inner (B) leaflet of the deformation. **C, D.** With 50% 18:0-18:1 PC, PS or PE in the outer (C) or inner (D) leaflet of the deformation. Error bars: standard deviations from three replica

we next moved to more complex bilayers. The first system consisted in bilayers in which one leaflet contained 100 % 18:0-18:1 PC whereas the other leaflet contained 50% 18:0-18:1 PC and 50% PS or PE with a defined acyl chain profile (18:0-18:1 or 18:0-22:6).

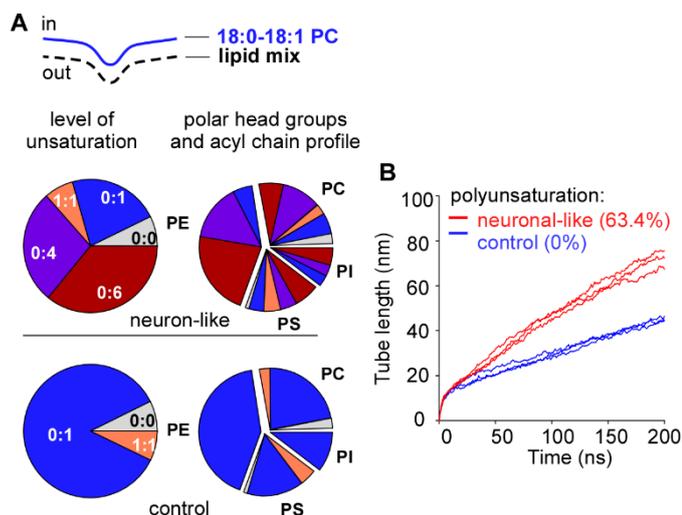
In all cases, we observed that the chosen polyunsaturated phospholipid (PC, PE or PS) in the outer tube leaflet favored membrane deformation, whereas the opposite distribution did not (compare panels A and B in Fig. 4). In addition, the polar head had a slight impact. There was less difference in tube velocity when we inverted the inner/outer distribution of 18:0-22:6 PE as compared to what we observed with 18:0-22:6 PC or 18:0-22:6 PS. Owing to its small polar, PE might be more adapted to the inner leaflet of the tube than PC or PS.

We also evaluated the impact of the polar head in the context of pure monounsaturated phospholipids (Fig. 4C and D). Under these conditions, the elongation rates were very similar, except when 18:0-18:1 PS was present in the outer leaflet of the tube. Under this condition, membrane deformation was accelerated. The negative charge of the polar head might promote repulsion between neighboring lipids in the outer leaflet, thereby facilitating the growth of tube as experimentally observed<sup>21</sup>.

We concluded that the intrinsic impact of lipid polyunsaturation on membrane deformation weakly depends on the nature of the polar head. Moreover, this facilitating effect of 18:0-22:6 on membrane deformation is greater than those promoted by other physicochemical properties, such as size and charge of the polar head.

### 3.4 Effect of polyunsaturated phospholipids in a model neuronal plasma membrane

We next moved to the composition of the neuronal plasma membrane as previously used by the Marrink group in simulations<sup>19</sup>. We focused only on the cytosolic leaflet, which, during endocytosis, becomes the outer leaflet of the tube



**Fig 3** Tube elongation velocity from a bilayer with one leaflet mimicking the composition of the cytosolic leaflet of the neuronal plasma membrane. **A.** Scheme of the lipid composition. The inner leaflet of the tube contained 100% 18:0-18:1 PC. The outer leaflet contained a fixed ratio of PC, PE, PS and PI with a defined acyl chain profile. The acyl chains were either highly polyunsaturated as found in neurons (top), or saturated/monosaturated (bottom). **B.** Time course of tube pulling from the bilayer described in **A.** Force = 200 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>. For each composition, three independent simulations are shown.

generated in our simulations. The phospholipid composition of the cytosolic leaflet, which showed a high level of polyunsaturation (64 mol%), is given in Table 1. For simplicity, the opposite leaflet was made of 18:0-18:1 PC. To evaluate the importance of lipid polyunsaturation, we prepared a control system, in which we replaced all polyunsaturated acyl chains (20:4 and 22:6) by monounsaturated (18:1) ones (Fig. 5A). Again, lipid polyunsaturation in the outer tube leaflet strongly favored elongation (Fig. 5B), suggesting that our results could be extended to more realistic membranes.

### 3.5 Polyunsaturated phospholipids show conformational plasticity in the convex leaflet

We suspected that the key role of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids on membrane deformation, might arise from a better adaptation of these lipids to positive curvature than to negative curvature. To address this hypothesis, we performed a molecular analysis by computing various parameters, including the area per lipid, the acyl chain flexibility, and the lipid shape.

The area per lipid, which corresponds to the ratio between the number of lipids in a given leaflet and the surface of this leaflet is shown in Figure 6A. Note that the surface area was determined at the level of the lipid polar head (choline). In the concave membrane region (inner tube leaflet), the area per lipid of mono and polyunsaturated PC was very close, suggesting a similar ability of the two PC species to compress at the level of the polar head. In contrast, we observed a strong difference for the convex (outer) leaflet: polyunsaturated lipids occupied a 20% larger surface than monounsaturated lipids. We also compared these values to the standard values observed on flat

membrane. The transition from flat to convex leaflet is accompanied by a 53% increase in the surface area of polyunsaturated phospholipids as compared to 36% for monounsaturated ones (Fig. 6A). This analysis suggests that polyunsaturated lipids have a better ability to swell in the convex leaflet than monounsaturated lipids.

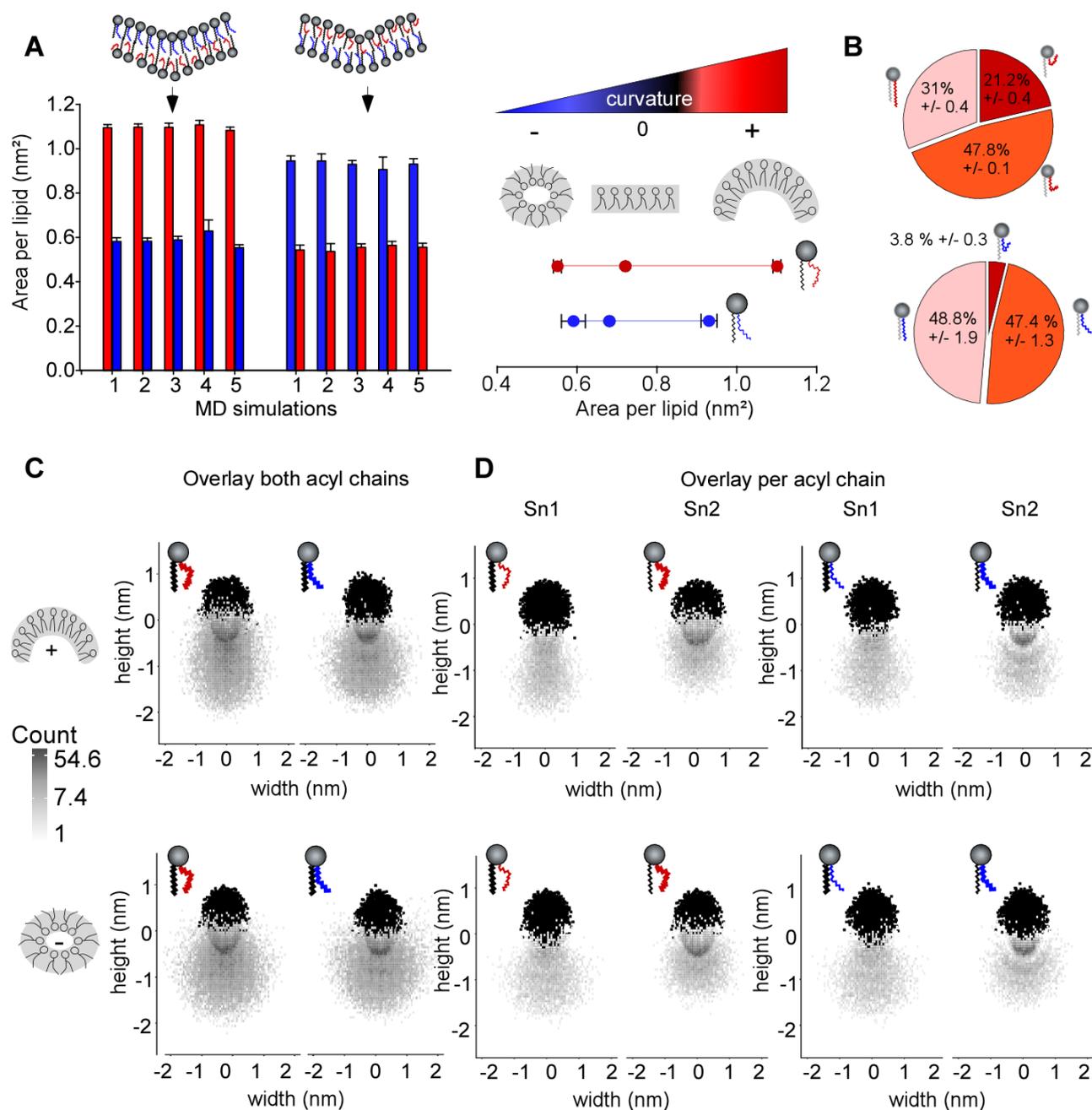
Figure 6B shows how the *sn2* acyl chain of PC in the convex (outer) leaflet distributes between three main conformations (straight, moderately kinked, and highly kinked). Compared to 18:0-18:1 PC, 18:0-22:6 PC showed a 5-6-fold increase in the highly kinked conformation at the expense of the straight one. Last, we analyzed the geometry of PC as a function of its acyl chain content and its distribution between the inner and outer leaflets of the tube. By translation and rotation transformations, we overlapped all PC molecules present in one leaflet such as to get a side projection of the lipid. This projection gives the overall shape of 18:0-22:6 PC or 18:0-18:1 PC in regions of positive or negative curvature (Fig. 6C).

In the concave leaflet, the 2D projections of 18:0-22:6 PC or 18:0-18:1 PC were very similar, suggesting that the acyl chains explored a similar volume. In the convex leaflet, the 2D projections of 18:0-22:6 PC or 18:0-18:1 PC were different. The polar head region of 18:0-22:6 PC was partially masked by its acyl chains, whereas the polar head of 18:0-18:1 PC was more visible. Performing the same analysis on either the *sn1* or *sn2* chains shows that this effect arose from the ability of the *sn2* polyunsaturated acyl chain to form a collar around the polar head, whereas the neighboring *sn1* saturated acyl chain was rather straight and sank deeper in the bilayer (Fig. 6D).

Overall, this geometrical analysis indicates that, when present in the convex face of the membrane deformation, polyunsaturated phospholipids adapt their shape to membrane curvature.

## 4 Discussion

Our simulations suggest that the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids is decisive for their facilitating effect on membrane deformation. When present in the concave face, polyunsaturated phospholipids provide no advantage over monounsaturated ones. When present in the convex face, polyunsaturated phospholipids have a positive effect, which is as large as that observed when these lipids are present on the two leaflets. This clear-cut effect of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids is observed whatever the lipid class (PC, PE or PS) and occurs at concentrations similar than in some differentiated membranes. Molecular analysis suggests that polyunsaturated phospholipids are well adapted to regions of positive curvature because their acyl chains tend to invade the space left vacant by the polar head group. Thus, our simulations suggest a rationale for the enrichment of polyunsaturated lipids in the cytosolic leaflet of the plasma membrane<sup>16</sup>: to make the

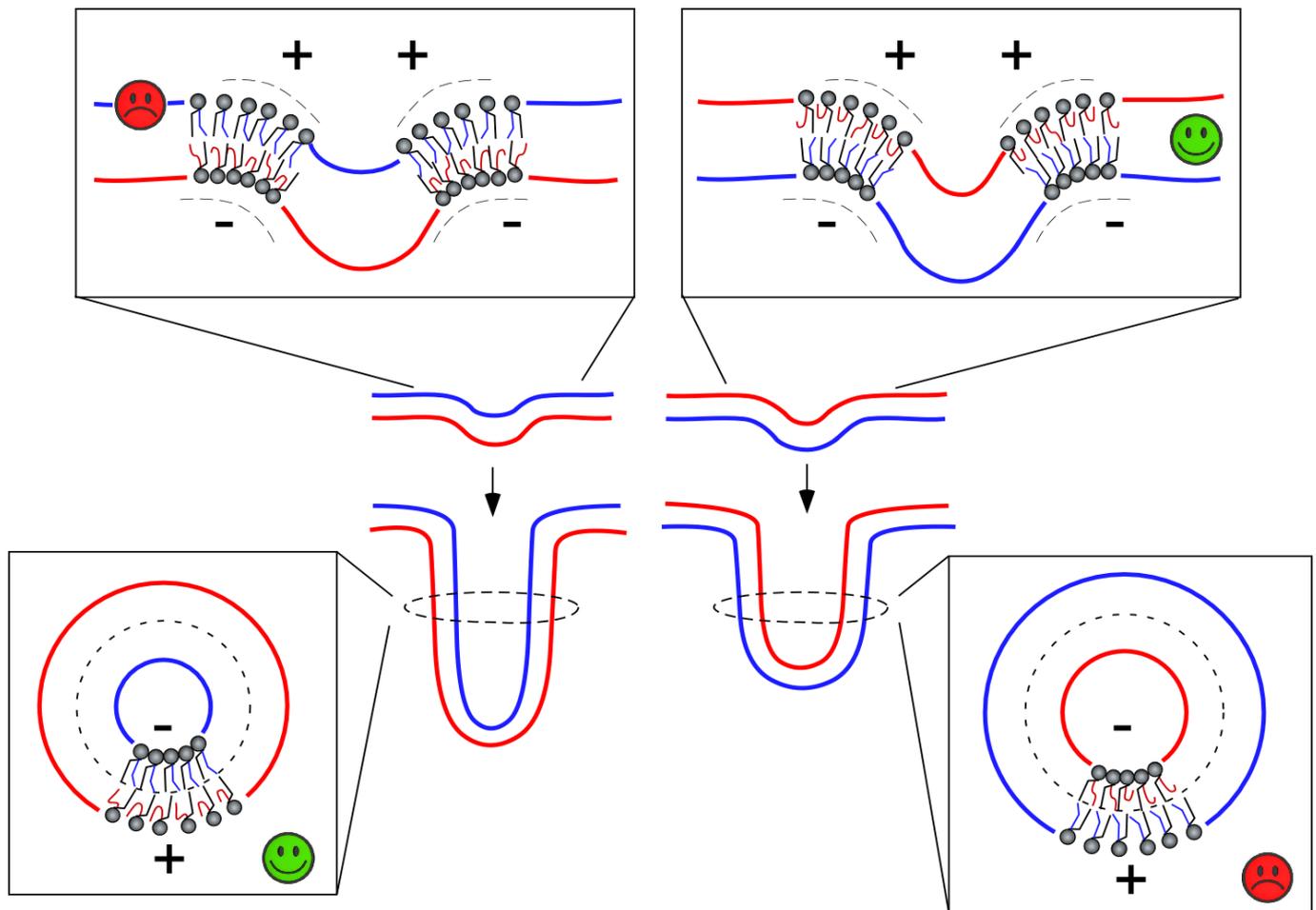


**Fig 4** Conformation analysis. **A.** Area per lipid for each species in the outer and inner leaflets of the tube. The scheme represents the ability of each lipid to compress or dilate its area as a function of membrane geometry. **B.** Conformation distribution of mono or polyunsaturated PC when present in a convex membrane region. **C, D.** Overlay of the side projection of the indicated PC species according to the acyl chain profile and distribution in the outer (top) or inner leaflet of the tube. The polar head beads are shown in black, the acyl chain beads are shown in grey. The grey intensity reflects the number of events where a bin of the grid is occupied by a bead from the two acyl chains (C) or only from the indicated acyl chain

membrane well adapted to fast inward deformation, such as endocytosis.

Membrane deformation necessarily constrains the geometry of phospholipids<sup>22</sup>. The elementary volume available for a lipid in a convex leaflet has the shape of an inverted cone, whereas the elementary volume available for a lipid in a concave leaflet has a conical shape. One possibility to resolve these constraints is lipid sorting to match these elementary volumes and lipid

shape: a lipid with a conical shape might preferentially reside in the concave leaflet, whereas a lipid with an opposite shape might preferentially reside in the convex leaflet<sup>23</sup>. However, lipid sorting by curvature is readily counteracted by entropy as lipids diffuse rapidly and, in general, tend to mix<sup>24</sup>. Experimentally, lipid sorting by curvature is observed under stringent conditions such as extreme curvature or when the membrane is close to phase transition<sup>24-28</sup>.



**Fig 5** Model of the impact of polyunsaturated lipids on membrane deformation as a function of their asymmetric distribution.

Polyunsaturated lipids offer an alternative mechanism for the adaptation of lipid composition to membrane shape. Instead of displaying an intrinsic shape, lipids with polyunsaturated acyl chains behave as contortionists: they adapt their conformation to membrane curvature<sup>7,29,30</sup>. The present study suggests that this adaptation occurs mostly in the convex leaflet. The analysis of the area per lipid (Fig. 6A) suggests that, in the concave leaflet, the main constraint for lipid packing is the size of the polar head group not the volume occupied by the acyl chains. In contrast, phospholipids in the convex leaflet have to occupy a large surface area at the level of the polar head group. Geometrical analysis suggest that the various kinked conformations of polyunsaturated acyl chains allow them to populate the interfacial region. Interestingly, this effect could explain the unexpected enrichment of PE in the outer surface of membrane tubes as observed in simulations<sup>31</sup>. Protrusions of the *sn2* polyunsaturated acyl chain toward the interfacial region could alleviate the interfacial stress arising from the small area occupied by the polar head of PE.

The distribution of concave and convex surfaces in a forming tube or in a bud is more complex than in a closed structure such as a vesicle. At the connection between the tube and the flat

parental membrane, the bilayer exhibits a saddle curvature where the two principal curvatures are opposite in sign, i.e. positive and negative. This geometry might explain why the impact of polyunsaturated lipids is different between the onset of membrane deformation (when a dome is forming) and during tube extension. As depicted in Figure 7, there are constraints in lipid packing that are specific to the saddle geometry and which make polyunsaturated lipids in the leaflet opposite to the pulling force advantageous for dome formation. When a tube has formed, the saddle geometry at the base remains, but its contribution to the overall energy of the tube should become negligible compared to the constraints in the tubular part itself. Under these conditions, polyunsaturated lipids in the outer leaflet of the tube are advantageous for elongation.

In the future, testing the impact of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids on membrane mechanics will require preparing asymmetric membranes, which is notoriously difficult. We note, however, that new protocols have recently been published to form asymmetric lipid bilayers<sup>32-35</sup>.

## 5 Conclusions

Biological membranes are asymmetric not only for the main lipid classes, which are defined by the polar head regions, but also for the lipid species, which are defined by the acyl chain profile. Lipids with polyunsaturated acyl chains preferentially reside in the cytosolic leaflet<sup>16</sup>. Our coarse-grained pulling simulations suggest that this distribution is highly favorable for endocytosis, because polyunsaturated phospholipids are well adapted to positive curvature. The presence of polyunsaturated phospholipids in the cytosolic side of the neuronal plasma membrane might contribute to the exceptional speed at which this membrane undergoes endocytosis<sup>36</sup>.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

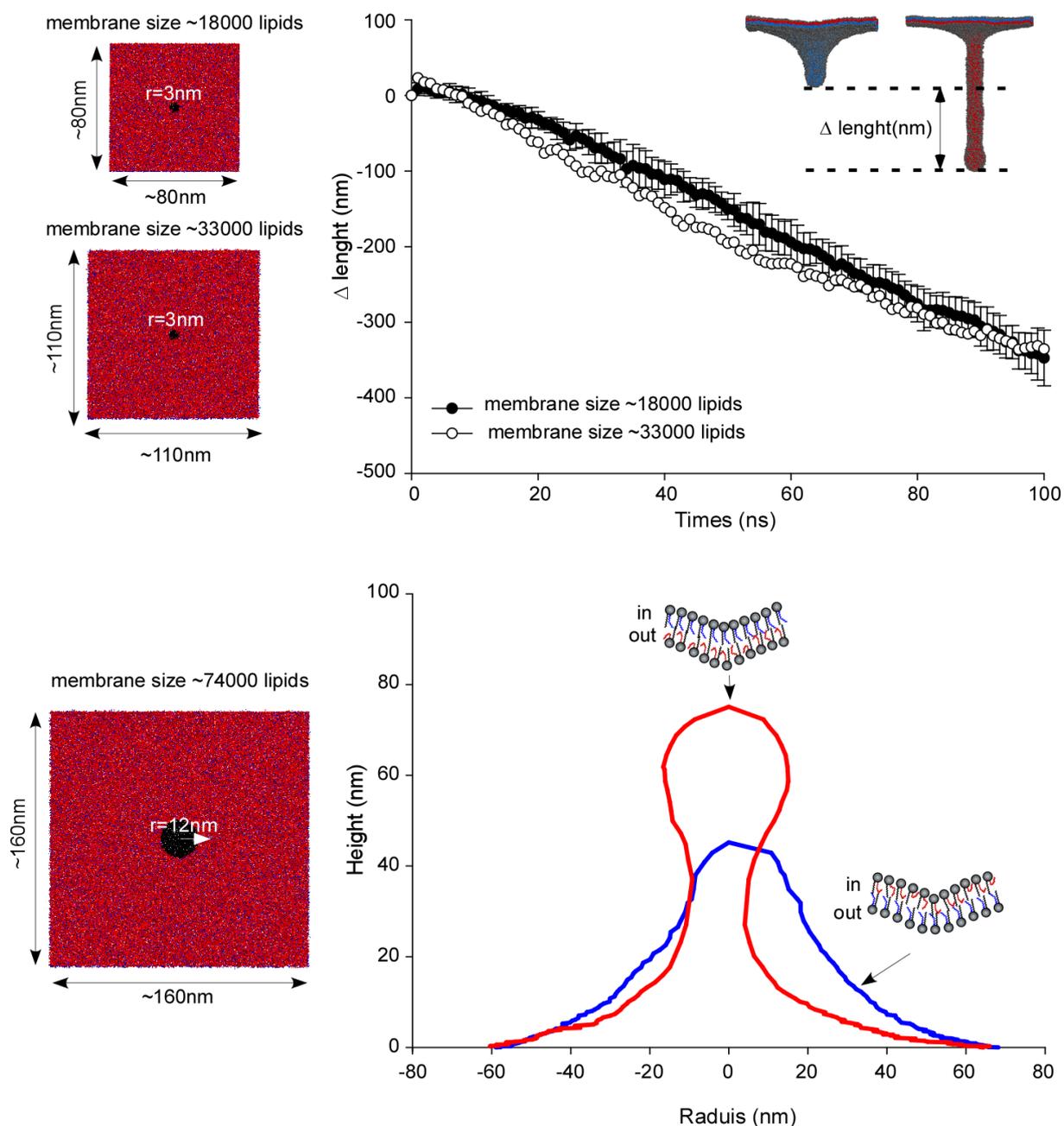
## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Fondation pour la recherche médicale (Convention DEQ20180339156 Equipes FRM 2018), and was granted by the HPC resources of CINES under the allocations A0040707362 and A0060707362 made by GENCI. Computations have also been done on the Mesocentre SIGAMM machine hosted by the Observatoire de la Côte d'Azur. Marion Tiberti is a recipient of PhD fellowship from the ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. We thank Meng-Chen Tsai and Hélène Barelli for comments on the manuscript.

## Notes and references

† Footnotes relating to the main text should appear here.

- J. H. Hurley, E. Boura, L.-A. Carlson and B. R ozycki, *Cell*, 2010, 143, 875–887.
- M. M. Manni, J. Derganc and A.  opi , *Bioessays*, 2017, 39.
- W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. J. McIntosh, D. Needham and E. Evans, *Biophys. J.*, 2000, 79, 328–339.
- S. Morlot, V. Galli, M. Klein, N. Chiaruttini, J. Manzi, F. Humbert, L. Dinis, M. Lenz, G. Cappello and A. Roux, *Cell*, 2012, 151, 619–629.
- M. M. Manni, M. L. Tiberti, S. Pagnotta, H. Barelli, R. Gautier and B. Antonny, *eLife*, 2018, 7, 15114.
- M. Pinot, S. Vanni, S. Pagnotta, S. Lacas-Gervais, L.-A. Payet, T. Ferreira, R. Gautier, B. Goud, B. Antonny and H. Barelli, *Science*, 2014, 345, 693–697.
- B. Antonny, S. Vanni, H. Shindou and T. Ferreira, *Trends in Cell Biology*, 2015, 25, 427–436.
- T. Harayama and H. Riezman, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19, 281–296.
- H. Yabuuchi and J. S. O'Brien, *The Journal of Lipid Research*, 1968, 9, 65–67.
- S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gr nberg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S. A. M ller, B. Rammner, F. Gr ter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. T. Wieland and R. Jahn, *Cell*, 2006, 127, 831–846.
- T. Ben Gedalya, V. Loeb, E. Israeli, Y. Altschuler, D. J. Selkoe and R. Sharon, *Traffic*, 2009, 10, 218–234.
- T. J. Lagny and P. Bassereau, *Interface Focus*, 2015, 5, 20150038.
- S. Baoukina, S. J. Marrink and D. P. Tieleman, *Biophys. J.*, 2012, 102, 1866–1871.
- J. A. Op den Kamp, *Annu. Rev. Biochem.*, 1979, 48, 47–71.
- A. J. Verkleij, R. F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn and L. L. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 323, 178–193.
- J. H. Lorent, L. Ganesan, G. Rivera-Longsworth, E. Sezgin, K. R. Levental, E. Lyman and I. Levental, *bioRxiv*, 2019, 698837.
- B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, *J Chem Theory Comput*, 2008, 4, 435–447.
- H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola and J. R. Haak, *The Journal of Chemical Physics*, 1984, 81, 3684–3690.
- H. I. Ingólfsson, T. S. Carpenter, H. Bhatia, P.-T. Bremer, S. J. Marrink and F. C. Lightstone, *Biophys. J.*, 2017, 113, 2271–2280.
- T. Harayama, M. Eto, H. Shindou, Y. Kita, E. Otsubo, D. Hishikawa, S. Ishii, K. Sakimura, M. Mishina and T. Shimizu, *Cell Metabolism*, 2014, 20, 295–305.
- T. Hirama, S. M. Lu, J. G. Kay, M. Maekawa, M. M. Kozlov, S. Grinstein and G. D. Fairn, *Nature Communications*, 2017, 8, 1393.
- C. Huang and J. T. Mason, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978, 75, 308–310.
- L. V. Chernomordik and M. M. Kozlov, *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72, 175–207.
- M. M. Kamal, D. Mills, M. Grzybek and J. Howard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106, 22245–22250.
- A. Tian and T. Baumgart, *Biophys. J.*, 2009, 96, 2676–2688.
- J. Derganc, *Phys Biol*, 2007, 4, 317–324.
- I. R. Cooke and M. Deserno, *Biophysj*, 2006, 91, 487–495.
- B. Sorre, A. Callan-Jones, J.-B. Manneville, P. Nassoy, J.-F. Joanny, J. Prost, B. Goud and P. Bassereau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106, 5622–5626.
- H. J. Risselada and S. J. Marrink, *Phys Chem Chem Phys*, 2009, 11, 2056–2067.
- H. Barelli and B. Antonny, *Nature*, 2009, 458, 159–160.
- S. Baoukina, H. I. Ingólfsson, S. J. Marrink and D. P. Tieleman, *Adv. Theory Simul.*, 2018, 1, 1800034–4.
- M. Doktorova, F. A. Heberle, B. Eicher, R. F. Standaert, J. Katsaras, E. London, G. Pabst and D. Marquardt, *Nat Protoc*, 2018, 13, 2086–2101.
- T. A. Enoki and G. W. Feigenson, *Biophys. J.*, 2019, 117, 1037–1050.
- P. Heo, S. Ramakrishnan, J. Coleman, J. E. Rothman, J. B. Fleury and F. Pincet, *Small*, 2019, 15, e1900725.
- S. Pautot, B. J. Frisken and D. A. Weitz, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, 10718–10721.
- S. Watanabe, Q. Liu, M. W. Davis, G. Hollopeter, N. Thomas, N. B. Jorgensen and E. M. Jorgensen, *eLife*, 2013, 2, e00723.



**Fig S1.** Top: the membrane size does not influence the impact of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids. The pictures on the left illustrate the two systems used for the pulling simulations. As in Fig 2, we pulled a tube from a  $r = 3\text{ nm}$  patch either on the direction of the monounsaturated leaflet or on the direction the polyunsaturated leaflet. The graph on the right shows the difference in length between the two pulling configurations and between the two lipid systems. Bottom: the patch size does not influence the impact of the transbilayer distribution of polyunsaturated lipids. Here, we used a giant membrane surface and performed the pulling simulation from a very large ( $r = 12\text{ nm}$ ) membrane patch. The red and blue lines show the contour of the membrane deformation obtained at  $t = 200\text{ ns}$ .

# Cholesterol et polyinsaturation

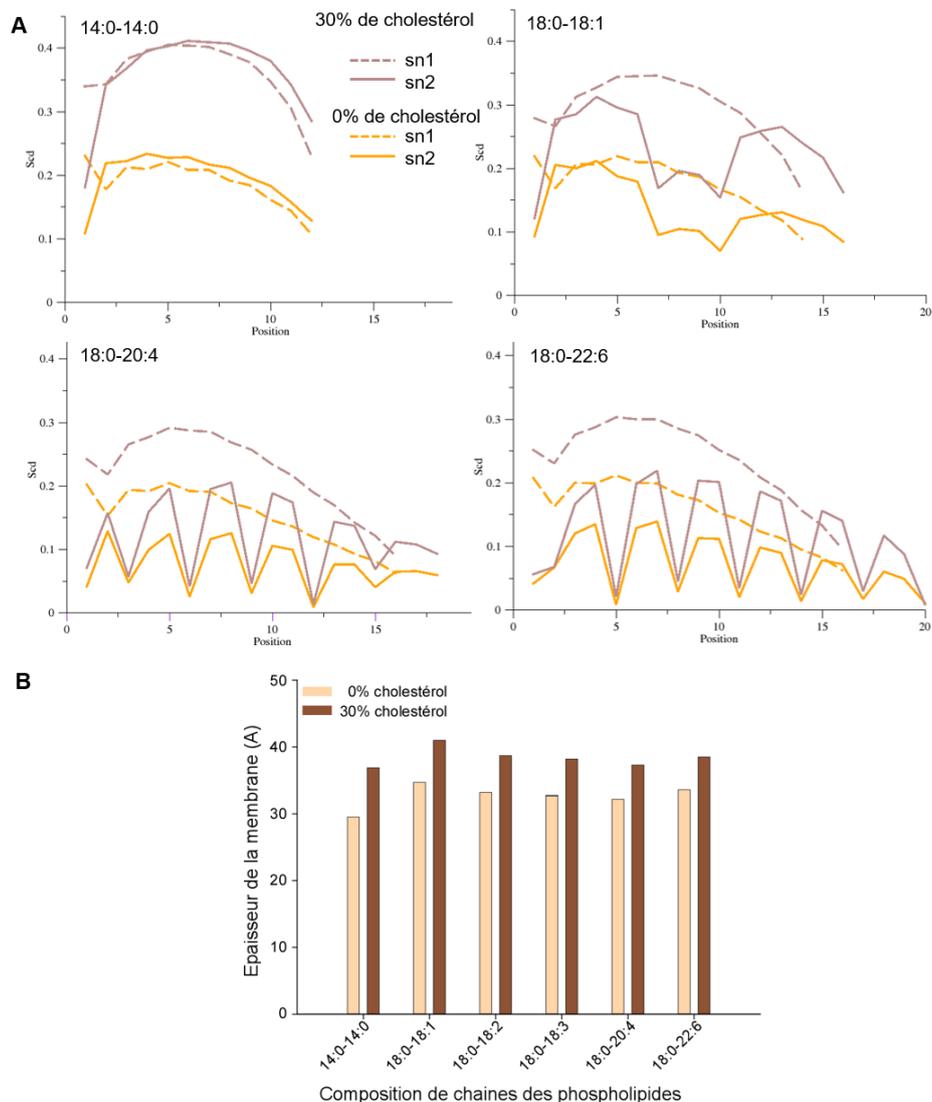
Le cholestérol est le lipide le plus abondant dans les membranes des mammifères après les phospholipides. 80% à 95% du cholestérol cellulaire se trouvent au niveau de la membrane plasmique [164]. Le cholestérol représente jusqu'à 45% en moles du contenu lipidique total de la membrane synaptique [165]. Cette forte proportion de cholestérol est associée à 70% de phospholipides polyinsaturés dans les membranes synaptiques. Le cholestérol est associé à une rigidité de la membrane tandis que les phospholipides polyinsaturés sont associés à une fluidité membranaire. Leur cohabitation au sein d'une membrane peut paraître, au premier abord, contre-intuitif d'autant que l'affinité du cholestérol avec les phospholipides décroît avec la polyinsaturation. Dans le but de comprendre cette distribution naturelle dans les membranes, j'ai commencé à entreprendre quelques analyses en comparant des membranes simulées avec ou sans cholestérol. Comme pour les études précédentes, les membranes planes simulées en AA m'ont permis d'étudier l'influence du cholestérol sur la dynamique des chaînes aliphatiques polyinsaturées et les simulations de déformation membranaire en gros grain m'ont permis d'étudier leur influence sur la malléabilité de la membrane. Pour cette partie, j'ai travaillé sur des membranes beaucoup moins complexes en limitant leur composition à des lipides de type PC.

## 3.1 Influence du cholestérol sur la dynamique des chaînes aliphatiques polyinsaturées

### Ordre et épaisseur

Le cholestérol a largement été étudié pour son rôle dans la rigidité des membranes. En s'intercalant entre les phospholipides, il provoque un agencement plus compacte de ces derniers et entraîne une augmentation de l'ordre des membranes et de leur épaisseur (Figure 3.1). J'ai également observé cela quelque soit la composition phospholipidique (saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés). Cependant l'augmentation de l'ordre des chaînes aliphatiques n'est pas du même ordre de grandeur pour tous les phospholipides. Dans le cas des phospholipides saturés

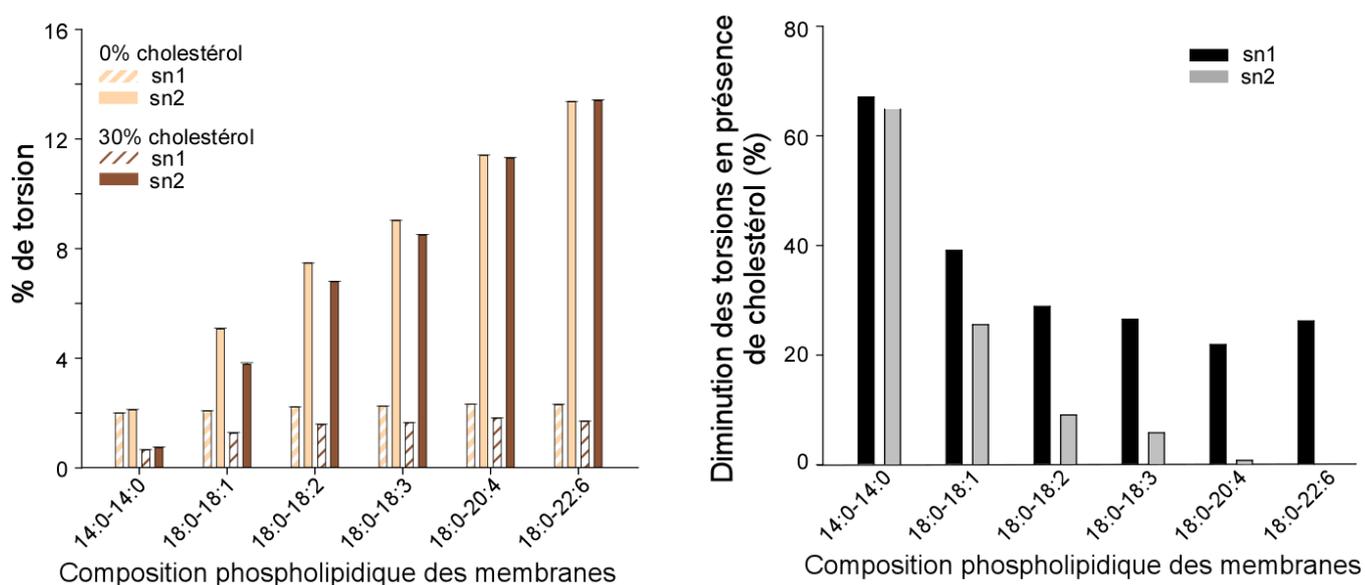
tels que le DMPC (14:0-14:0), la hausse des paramètres d'ordre est d'environ un facteur 2. L'augmentation de l'ordre des chaînes *sn1* saturées décroît en fonction de la nature de la chaîne *sn2*. Par exemple, on observe une augmentation d'un facteur 1.5 lorsque la chaîne *sn2* est monoinsaturée. Ce facteur diminue encore en présence d'une chaîne *sn2* polyinsaturée. Si l'on s'intéresse maintenant aux chaînes *sn2* insaturées, on observe une élévation constante de l'ordre tout au long de la chaîne monoinsaturée. En revanche pour les chaînes aliphatiques polyinsaturées seules les liaisons simples sont concernées par une augmentation de l'ordre. Pour les n-6, on observe donc une raideur supplémentaire au niveau du dernier fragment de 6 carbones saturés. Cette hausse de l'ordre s'accompagne d'une augmentation de l'épaisseur de 25% dans le cas de phospholipides saturés et de  $\approx 15\%$  pour les phospholipides polyinsaturés.



**FIGURE 3.1 – Effet du cholestérol sur l'ordre et l'épaisseur des membranes.** A : Représentation des paramètres d'ordre des phospholipides PC plus ou moins insaturés dans des membranes comprenant ou non 30% de cholestérol. B : Épaisseur de la partie hydrophobe de membranes composées de PC ayant de 0 à 6 insaturations sur leur chaîne *sn2* en présence ou non de cholestérol.

## Mouvements verticaux

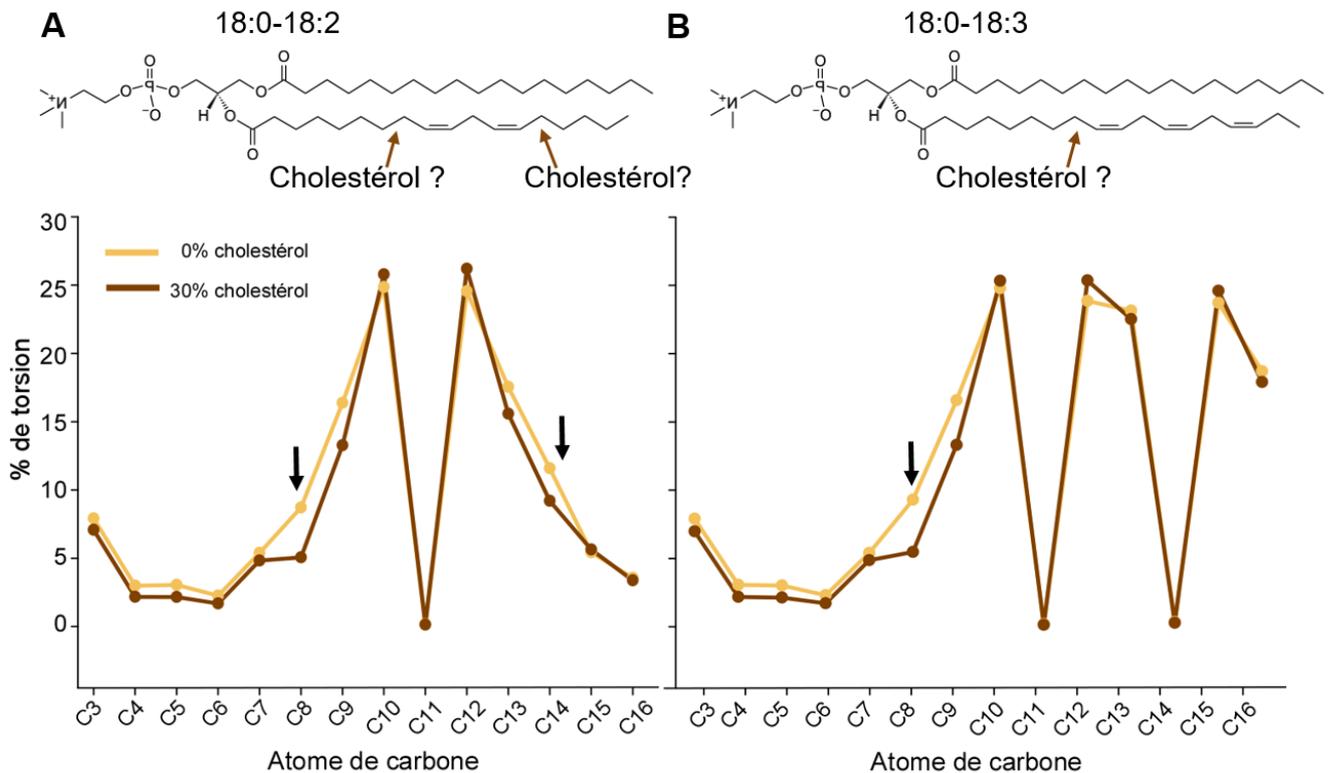
Afin d'évaluer l'incidence du cholestérol sur la flexibilité des chaînes aliphatiques, j'ai comparé les pourcentages de torsion des chaînes en présence ou en absence de 30% de cholestérol (Figure 3.2). Le pourcentage de torsion est quasi-inchangé (diminution  $< 10\%$ ) dans le cas **des chaînes *sn2*** polyinsaturées. Dans le cas des chaînes monoinsaturées et saturées, le pourcentage de torsion décroît respectivement de 25% et 65%. Plus la chaîne *sn2* est insaturée, moins le cholestérol a d'impact sur sa flexibilité. La flexibilité, déjà faible, **des chaînes *sn1*** saturées est quant à elle, plus influencée par la présence de cholestérol. Cependant, un effet coopératif entre la chaîne *sn1* et la chaîne *sn2* est observé. En effet, la baisse du pourcentage de torsion n'est pas équivalente pour toutes les chaînes *sn1* ; de 60% lorsque la chaîne *sn2* est saturé à 20% lorsqu'elle est polyinsaturée. Ces résultats sont en adéquation avec les paramètres d'ordre présentés précédemment.



**FIGURE 3.2 – Effet du cholestérol sur les torsions des chaînes.** Gauche : Pourcentage total de torsion observé (angle  $< 100^\circ$ ) pour chaque chaîne *sn1* et *sn2* selon leur niveau d'insaturation et la présence ou non de 30% de cholestérol dans les membranes. Droite : les résultats sont présentés différemment en mettant en avant le pourcentage de diminution du nombre de torsion par la présence du cholestérol.

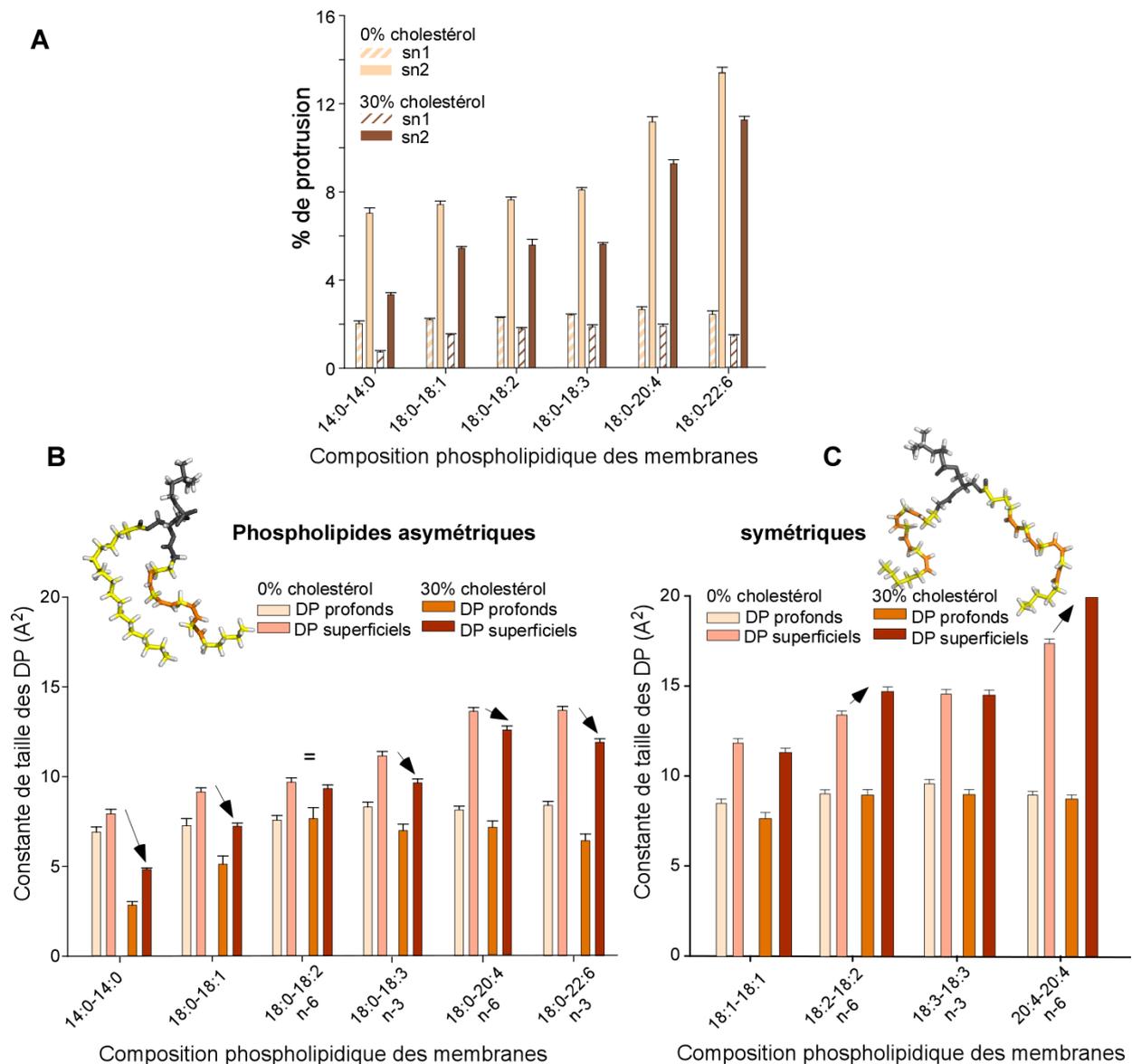
En s'attardant sur le nombre de torsion par carbone pour des chaînes saturées ou monoinsaturées, une diminution constante des torsions est présente tout au long de la chaîne. En revanche, pour les chaînes polyinsaturées une diminution des torsions est observable uniquement de part et d'autre des doubles liaisons. Prenons l'exemple du 18:2 n-6, le cholestérol semble interagir préférentiellement avec le début et la fin de la chaîne aliphatique insaturée (Figure ??A). L'ajout d'une double liaison à l'extrémité méthyl pour former un 18:3 n-3 change cette

tendance. En effet, seule une diminution des torsions est observée au début de la chaîne aliphatique en amont des 3 doubles liaisons. Le segment final, composé de 3 carbones saturés, ne semble pas être suffisant pour interagir fortement avec le cholestérol (Figure ??B).



**FIGURE 3.3 – Effet du cholestérol sur les torsions de chaque atome de carbone**  
 Représentation du pourcentage d'angle de torsion observé pour chaque carbone en présence ou en absence de cholestérol dans les membranes pour les lipides 18:0-18:2 et 18:0-18:3. Les hypothèses de fixation du cholestérol sur les portions de chaînes composées de carbones saturés sont également représentées. Ces zones correspondent aux carbones, indiquées par des flèches, subissant moins de torsions en présence de cholestérol

Si les torsions sont peu modifiées par la présence de cholestérol, les phénomènes de protrusion se font plus rares dans le cas des phospholipides polyinsaturés asymétriques (Figure 3.3.A). Pour ces lipides, la présence de cholestérol diminue la formation de DP (Figure 3.3.B). Nous pouvons remarquer un effet potentiellement moindre dans le cas n-6. En ce qui concerne les lipides symétriques un comportement remarquable des "double n-6" est à noter avec une forte augmentation des DP superficiels (Figure 3.3.C). L'effet du cholestérol sur les phospholipides polyinsaturés a été réalisé en parallèle de la première partie de ma thèse concernant l'effet du niveau d'insaturation sur la dynamique des chaînes et les propriétés membranaires. C'est pourquoi, l'effet du cholestérol sur les phospholipides a également été évalué sur les phospholipides polyinsaturés symétriques malgré la perméabilité des membranes qu'ils engendrent.

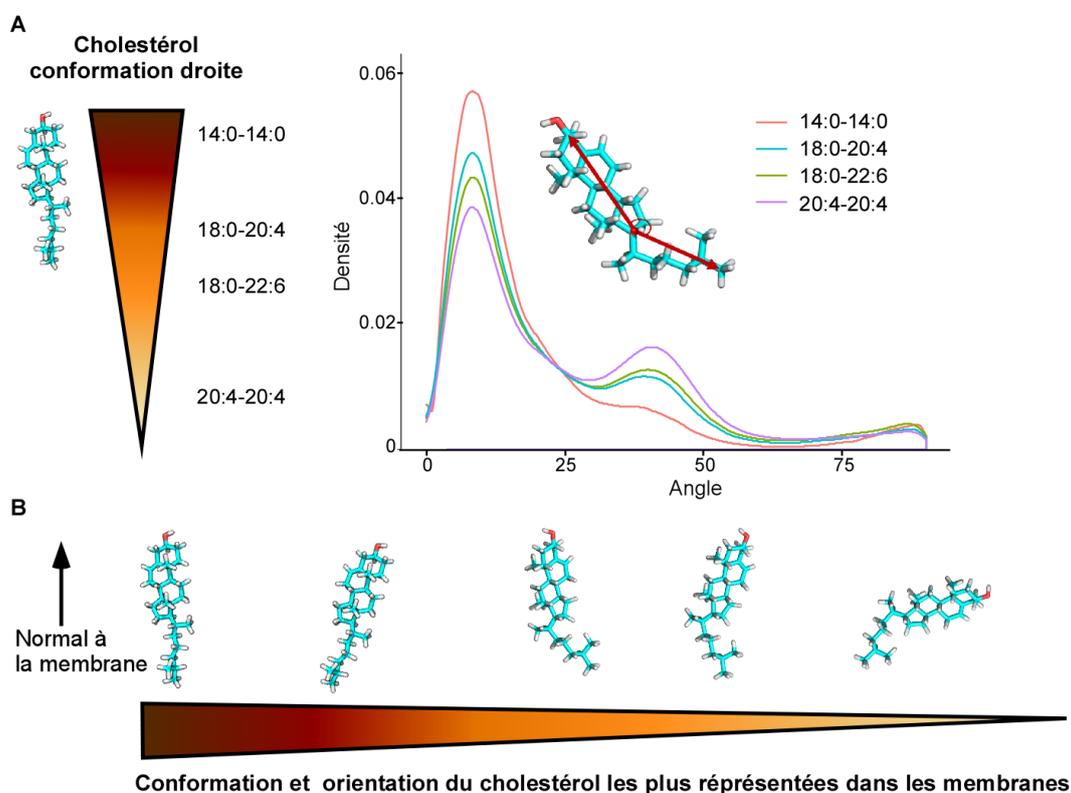


**FIGURE 3.4 – Effet du cholestérol sur l’interface eau/membrane.** A : Représentation du pourcentage de protrusion observé quelque soit l’atome de carbone, pour chaque chaîne *sn1* ou *sn2* en présence ou non de cholestérol. B : Constante de taille des DP profonds et superficiels en présence ou non de cholestérol pour des membranes composées de phospholipides asymétriques C : Constante de taille des DP profonds et superficiels en présence ou non de cholestérol pour des membranes composées de phospholipides symétriques

A la suite de cette dynamique presque inchangée des chaînes aliphatiques polyinsaturées je me suis intéressée à l’agencement du cholestérol dans les membranes. **Dans quelle conformation, dans quelle orientation et à quelle profondeur se positionne le cholestérol selon l’environnement lipidique ?**

Une étude a montré que l’orientation du cholestérol par rapport à l’axe de la normale à la membrane est inchangée en fonction du niveau d’insaturation dans le cas des phospholipides polyinsaturés asymétriques [69]. Je me suis donc, dans un premier temps, non pas intéressée à leur orientation mais à leur conformation. J’ai alors analysé la distribution des angles entre les

cycles carbonés et la chaîne carbonée du cholestérol (Figure 3.5.A). Cette distribution montre que les chaînes aliphatiques saturées des phospholipides maintiennent un cholestérol droit au sein des membranes. L'ajout d'insaturation révèle la présence d'une conformation plus coudée avec l'apparition d'un second pic à  $45^\circ$ . En présence de deux chaînes aliphatiques polyinsaturées l'effet est d'autant plus marqué. La présence d'insaturations favoriserait une isomérisation du cholestérol d'une forme droite à une forme coudée. Une analyse plus poussée prenant également en compte l'orientation du cholestérol par rapport au plan de la membrane a permis d'observer les 5 conformations et agencements majeurs du cholestérol au sein des membranes (Figure 3.5.B).

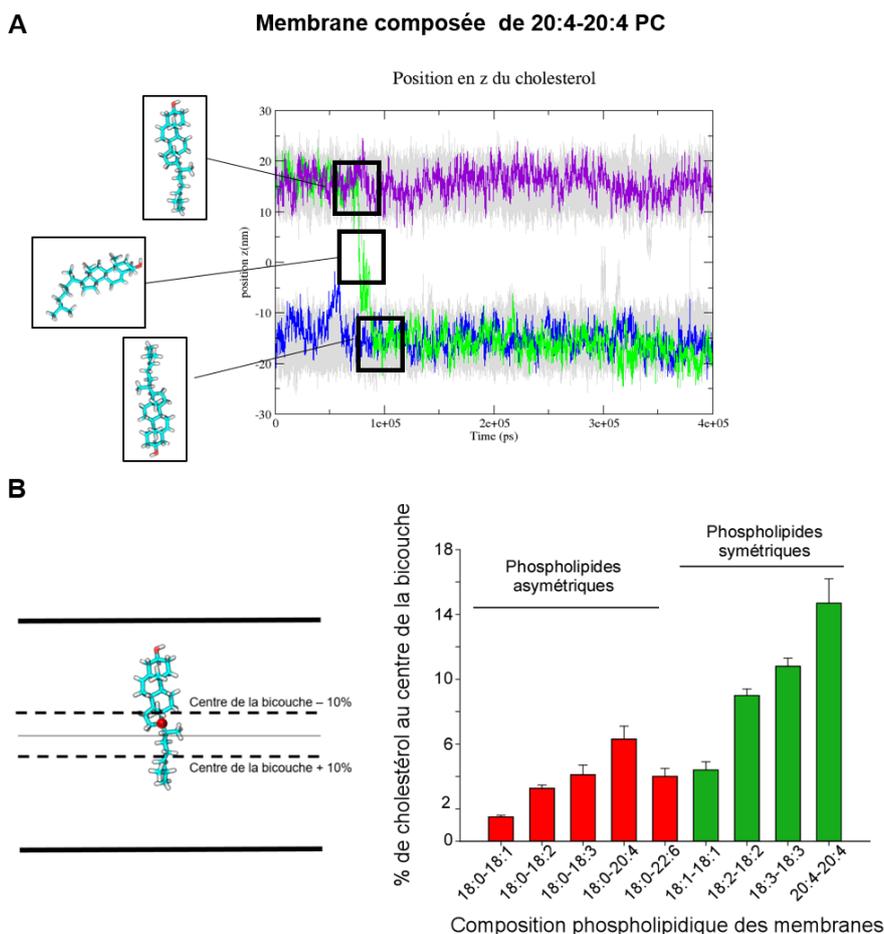


**FIGURE 3.5 – Conformation et orientation du cholestérol dans les membranes.** A : Distribution des angles entre les cycles et la chaîne carbonée du cholestérol B : Représentation des 5 conformations/orientations les plus présentes du cholestérol dans les membranes.

Certaines études sur l'influence de deux chaînes aliphatiques polyinsaturées montrent que le cholestérol se positionne plus au centre de la membrane et son orientation est perpendiculaire au plan de la membrane [101, 14, 15]. J'ai suivi la position en  $z$  du groupement  $-OH$  de chaque cholestérol au cours de la trajectoire. Cela m'a permis d'observer quelques cas de *flip-flop* dans le cas des membranes composées de phospholipides polyinsaturés symétriques (Figure 3.6.A).

J'ai ensuite quantifié la présence de cholestérol au centre de la bicouche en fonction de la composition membranaire. Le cholestérol a été considéré au centre lorsque le carbone, commun au cycle et à la chaîne carbonée, se situait dans une tranche au centre de la bicouche,

correspondant à 10% de l'épaisseur de celle-ci (Figure 3.6.B). En dépit des phospholipides polyinsaturés symétriques pour lesquels la présence du cholestérol au centre de la bicouche peut s'expliquer par leur affinité quasi nul avec les stérols, la présence de phospholipides asymétriques n-6 semblent favoriser également la présence du cholestérol au centre de la bicouche (Figure 3.6.B). Le segment de 6 carbones rigides en bout de chaîne pourrait faciliter les interactions hydrophobes avec le cholestérol. Ce phénomène pourrait se rapprocher des interactions n-6 avec les TG initiant la formation des gouttelettes lipidiques [79].

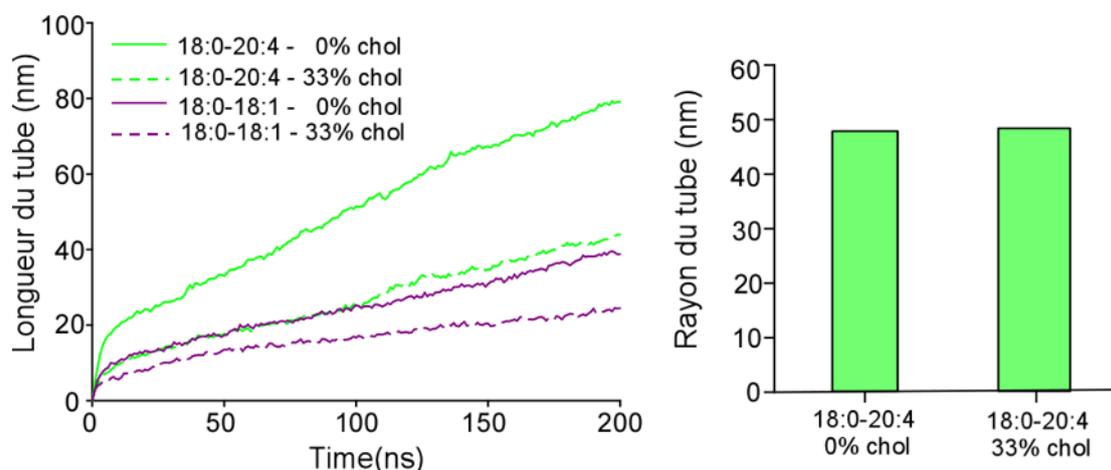


**FIGURE 3.6 – Position du cholestérol dans les membranes.** A : suivi du groupement hydroxyle des cholestérols au cours du temps au sein d'une membrane composée de phospholipides symétriques (20:4-20:4). Certains déplacements ont été mis en évidence en couleur. Le tracé vert montre le *flip-flop* très rapide d'un cholestérol. B : Pourcentage de cholestérol positionné au centre de la bicouche dans des membranes composées de phospholipides asymétriques (rouge) et symétriques (vert)

## 3.2 Cholestérol et déformation membranaire

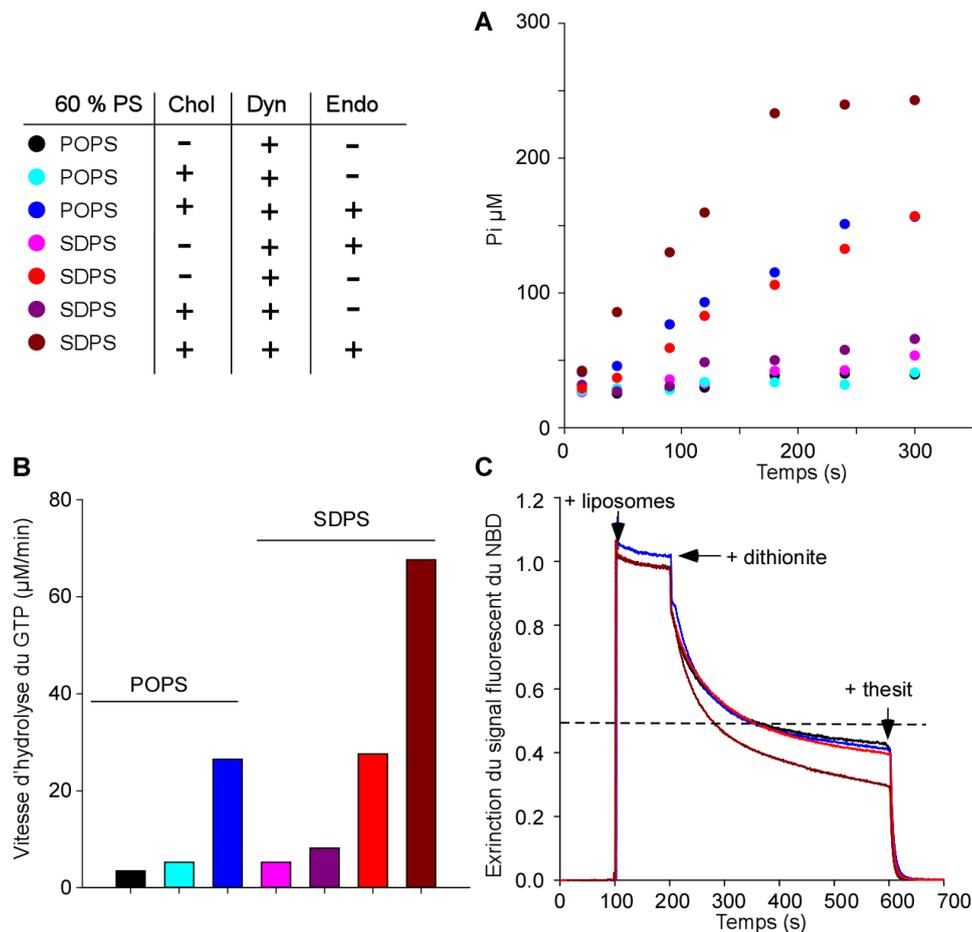
Afin d'étudier l'impact du cholestérol sur la malléabilité de la membrane, j'ai supplémenté les membranes contenant des phospholipides monoinsaturés (18:0-18:1) ou des phospholipides

polyinsaturés de la famille des n-6 (18:0-20:4) par 33 % de cholestérol. Des membranes contenant du cholestérol et des phospholipides de type 18:0-22:6 ont également été construites. Cependant, durant les étapes de minimisation et d'équilibration, un trou s'est formé au sein de la membrane. Durant ces étapes, la position des lipides est contrainte. Cette déchirure est sans doute due à une modification de l'aire par lipide, en présence de cholestérol, incompatible avec les contraintes de position initialement définies par Charmm-gui. A ce jour, l'impact du cholestérol sur ce type de membrane n'a pas été étudié dans mon travail de thèse. En présence de cholestérol, les membranes composées de phospholipides polyinsaturés sont toujours plus facilement déformable que les membranes composées de phospholipides monoinsaturés supplémentée de 33% en cholestérol. En revanche, l'élongation du tube est considérablement ralentie. Les membranes n-6, en présence de cholestérol, ont la même capacité de déformation qu'une membrane de phospholipides monoinsaturés sans cholestérol (Figure 3.8). Toutefois, le rayon du tube formé par des membranes 18:0-20:4 avec ou sans cholestérol reste le même (Figure 3.8).



**FIGURE 3.7 – Cholestérol et déformabilité membranaire par DM.** Longueur du tube formé au cours du temps selon la composition lipidiques et rayon du tube formé par les phospholipides polyinsaturés avec ou sans cholestérol.

Expérimentalement sur liposomes, un résultat préliminaire qui n'a pas encore été reproduit par manque de temps montre une tout autre conclusion. En effet, il révèle que la présence de cholestérol dans des membranes contenant 60% de PS faciliterait l'auto-assemblage de la dynamique et donc la fission des liposomes (Figure 3.8.AB). L'effet est d'autant plus frappant en présence de polyinsaturés. La présence de cholestérol réduit la perméabilité des membranes (Figure 3.8.C)



**FIGURE 3.8 – Cholestérol et assemblage de la dynamine** Activité GTPase de la dynamine (dyn) selon la composition lipidique et en présence ou non d'endophiline (endo) A : Cinétique de l'hydrolyse du GTP par mesure de la concentration en phosphate libre. B : Vitesse d'hydrolyse du GTP calculée à partir des cinétiques obtenues en A, réparti selon la composition lipidique C : Extinction du signal fluorescent du NBD après ajout de dithionite et de thésit (détergent)

### 3.3 Conclusion

Le cholestérol semble avoir moins d'impact sur les chaînes aliphatiques polyinsaturées que sur celles saturées ou monoinsaturées. Malgré une augmentation de l'épaisseur des membranes la dynamique des chaînes ne semble pas subir les mêmes contraintes selon leur insaturation. En effet, pour les chaînes saturées et monoinsaturées la raideur des chaînes associée au cholestérol s'accompagne d'une diminution des torsions. En revanche, plus il y a d'insaturations, plus l'effet sur la dynamique des chaînes s'estompe. Pour les n-6 à longue chaîne tels que le 20 :4 il semblerait que la partie plus rigide des 6 derniers carbones facilite les interactions avec le cholestérol. Dans le cas où les deux chaînes aliphatiques sont des 20:4 le cholestérol se place bien plus profondément dans la bicouche faisant remonter les chaînes aliphatiques au niveau de l'interface eau/membrane augmentant ainsi les DP superficiels. Les interactions cholestérol/phospholipides sont donc bien plus complexes qu'une simple juxtaposition de la présence du cholestérol

à une rigidité des membranes. Malgré la flexibilité des chaînes aliphatiques polyinsaturées qui semble peu impactée par la présence de cholesterol, il est vrai que lors des simulations de *pulling* la présence de cholestérol s'est tout de même présenté comme étant un frein considérable à l'élongation du tube. Cette observation est contradictoire avec celles faites expérimentalement. Cependant mes temps de simulation ne permettent pas d'observer le *flip-flop* du cholestérol. Le *flip-flop* du cholestérol est rapide et ne nécessite pas d'enzyme pour catalyser son transfert d'un feuillet à l'autre. Il pourrait alors avoir un rôle considérable dans la déformabilité de la membrane. Ce point sera discuté dans la partie suivante.

# Quatrième partie

## Discussion, conclusion et perspectives



---

## Contexte biologique et résultats

Les chaînes aliphatiques polyinsaturées sont connues pour leur grande flexibilité. Très souvent l'étude de ces chaînes est réduite aux chaînes polyinsaturées à longue chaîne à l'image de l'AA (20:4n-6) ou du DHA (22:6n-3). La présence de doubles liaisons, séparées entre elles par deux liaisons simples, confère aux chaînes aliphatiques polyinsaturées un plus grand degré de liberté de mouvement. La pression exercée par les chaînes aliphatiques polyinsaturées à l'intérieur de la membrane, plus faible que celle exercée par les chaînes saturées ou monoinsaturées, semble faciliter les changements conformationnels et donc le fonctionnement de protéines transmembranaires.

La présence accrue de phospholipides polyinsaturés dans la membrane plasmique des neurones au niveau des synapses s'accompagne de mécanismes d'endocytose rapides. En effet, le fort taux d'exocytose engendre la fusion de vésicule avec la membrane plasmique ce qui entraîne une augmentation de sa surface. Afin de maintenir une surface constante, des mécanismes d'endocytose rapide se mettent en place pour recycler la membrane plasmique en excès. Pour y parvenir, ce type d'endocytose est 200 fois plus rapide que l'endocytose « classique » clathrine dépendante [166] et se produit à quelque nanomètres du lieu de fusion des membranes. En 2014, l'équipe fait un lien entre l'enrichissement frappant en lipides polyinsaturés dans les membranes plasmiques neuronales et la vitesse très rapide à laquelle l'endocytose survient dans les neurones.

Durant ma thèse j'ai confirmé leur implication dans la déformation membranaire et grâce à une étude systématique en collaboration avec le Dr. Marco Manzi, une large gamme de phospholipides polyinsaturés a pu être analysée et comparée. Nous avons pu ainsi expliquer leur abondance plus ou moins importante dans les membranes cellulaires. Tous les phospholipides polyinsaturés sont des contorsionnistes de par la flexibilité de leur(s) chaîne(s) polyinsaturée(s). Cependant, la nature a fait en sorte que la plupart du temps cette grande flexibilité soit compensé par une chaîne saturée avec une dynamique plus rigide. Cet effet compensatoire est indispensable pour garantir une certaine malléabilité des membranes en cas de stress tout en conservant une imperméabilité des membranes afin de contrôler l'accès à la cellule. Cette asymétrie des chaînes est dirigée dans un seul sens (*sn1* saturée – *sn2* insaturée). L'enfouissement de la chaîne *sn2* insaturée plus au centre de la membrane ne semble pas aussi favorable à la membrane, notamment en réduisant son épaisseur.

---

Les mouvements des chaînes aliphatiques polyinsaturées particulièrement dans la direction  $z$ , correspondant à la normale à la membrane, facilitent leur adaptation à la courbure. Cette capacité d'adaptation augmente avec le niveau d'insaturation. Par conséquent l'optimisation de la géométrie des phospholipides polyinsaturés par rapport à la courbure membranaire s'intensifie avec le nombre de doubles liaisons. Les phospholipides polyinsaturés à courtes chaînes, les précurseurs 18:2n-6 et 18:3n-3, facilitent donc la déformation des membranes par rapport au phospholipides saturés et monoinsaturés mais de façon moindre que les phospholipides polyinsaturés à longues chaînes (20:4n-6, 22:6n-3).

L'utilisation de membranes asymétriques, plus conforme à la réalité, a permis de montrer que la compressibilité du feuillet concave lors d'une déformation est limitée par les têtes polaires. Les chaînes aliphatiques polyinsaturées n'ont alors pas d'effet. En revanche, le feuillet convexe s'étend. La géométrie adéquat pour occuper le volume du feuillet convexe est inversement conique. Dans ce cas, la flexibilité des chaînes aliphatiques polyinsaturées selon l'axe des  $z$  permet d'adapter la géométrie des phospholipides au volume disponible.

## Du modèle *in silico* à la validation expérimentale

Les simulations de DM sont utilisées, d'une part, pour expliquer les mécanismes à l'échelle atomique de phénomènes observés expérimentalement à une échelle plus macroscopique. C'est le cas de la première partie de mon projet sur l'impact de la distribution des chaînes polyinsaturées dans les phospholipides sur les propriétés membranaires. D'autre part, les simulations de DM peuvent également permettre de formuler des hypothèses sur un large éventail de problèmes qui ne se prêtent pas toujours aisément à une étude expérimentale directe. C'est le cas pour la deuxième partie de mon projet traitant de l'asymétrie des membranes. En effet, mon travail a conduit à un modèle dans lequel les phospholipides polyinsaturés facilitent la déformation membranaire lorsqu'ils sont dans le feuillet convexe. Il serait intéressant de le valider par des résultats expérimentaux. Malheureusement, réaliser des membranes asymétriques artificiellement n'est pas chose aisée, malgré la diversité de méthodes et techniques développées [167]. Ci-dessous je vous présente une liste non exhaustive de méthodes permettant la fabrication de membranes asymétriques plus ou moins adaptées à mon projet. En 2014, Watanabe et al. adapte la **méthode Langmuir/Blodgett** [168] pour former des membrane planes asymétriques [169]. Le principe est de déposer une première couche de lipides sur un support en silicium pour ensuite le replonger dans un milieu aqueux contenant les lipides pour le second feuillet. En 2019, Heo et al. construisent un **système en impression 3D, permettant des méthodes micro-**

---

**fluidiques**, adaptable au microscope [170]. Le principe est de créer à partir de petits liposomes des monocouches de part et d'autre d'une couche d'huile (squalene). Cette huile est ensuite drainée et les deux monocouches se joignent afin de former une membrane plane symétrique ou asymétrique en fonction de la composition des liposomes de départ. Ces deux techniques sont valables uniquement pour des membranes planes. Afin de mesurer l'activité GTPase de la dynamine dans le but de la corrélérer à la capacité de déformation des membranes obtenue par simulation, il est nécessaire de travailler sur des vésicules asymétriques. Pour ce faire plusieurs méthodes ont aussi été développées.

- une méthode faisant appel à la microfluidique existe [171]. Le principe est de déposer des gouttelettes aqueuses dans un milieu hydrophobe incluant les lipides du feuillet interne. Les gouttelettes vont alors être entourées d'une monocouche inverse de lipide. Les têtes polaires interagissent avec l'eau et les chaînes aliphatiques sont alors dirigées vers l'extérieur. Ces gouttelettes sont ensuite transposées dans un second milieu hydrophobe contenant les lipides de la couche externe. L'excès d'huile est ensuite drainé mais, la plupart du temps, une **contamination** persiste [167].
- L'utilisation d'un gradient de pH peut permettre de diriger les lipides chargés négativement (PA,PG,PS) préférentiellement dans un feuillet [172]. En revanche, la distribution des lipides zwitterionique (PE, PC) n'est pas contrôlée. Cette technique est possible pour un **pourcentage faible de lipides anioniques** (< 10 %). Elle est donc incompatible avec une activité GTPase de la dynamine nécessitant davantage de charge négative.
- La dernière méthode fait appel aux propriétés de la cyclodextrine [173, 174, 159]. A forte concentration la cage qu'elle forme peut extraire et relarguer des lipides. Le principe est de forcer des échanges lipidiques par le cyclodextrine entre :
  - une population de liposomes multilamellaires en sucrose composé des lipides souhaités dans le feuillet externe
  - une population de liposomes composés des lipides souhaités dans le feuillet interneCette méthode se divise donc en une étape d'extraction/transfert puis de séparation des deux populations de liposomes (donneurs et accepteurs devenus asymétriques) et enfin une étape de lavage pour séparer la cyclodextrine libre des liposomes asymétriques. J'ai choisi cette méthode prometteuse pour mon étude en ajustant certains paramètres notamment la séparation de la phase d'extraction et de transfert afin de limiter les contaminations.

---

Malheureusement, pour observer une activité GTPase de la dynamine sur les liposomes asymétriques, le taux de PS à transférer sur le feuillet externe des liposomes accepteurs devait être important (60%). De plus l'activité GTPase mesurée aurait été sans doute étroitement liée à une perméabilité des membranes. Cela a engendré l'arrêt de mes essais.

En revanche, durant la rédaction de mon article, le groupe Levental a pré-publié dans BioRxiv une étude qui confirme l'asymétrie des espèces lipidiques mais également la présence d'une asymétrie dans le profil des chaînes aliphatiques qui composent les feuillets de la membrane plasmique des erythrocytes [43]. L'utilisation d'une sonde dont le temps de fluorescence dépend de l'assemblage plus ou moins compact des lipides, montre que cette différence de profil impacte directement la fluidité membranaire. Le feuillet cytosolique, composé de 2 fois plus de chaînes aliphatiques polyinsaturées, est plus fluide que le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique. Cette asymétrie d'agencement des lipides au niveau de la membrane plasmique est conservé lors de l'endocytose. Cette étude renforce mes résultats obtenus en simulation qui suggèrent qu'une distribution des phospholipides polyinsaturés est beaucoup plus avantageuses dans le feuillet cytosolique, afin de faciliter l'endocytose.

## Place du cholestérol dans les déformations membranaires

Les membranes biologiques ne sont pas seulement composées de phospholipides. Ils incorporent également une variété de molécules amphiphiles comme le cholestérol. Les membranes plasmiques neuronales sont enrichies en phospholipides polyinsaturés mais aussi en cholestérol et en sphingolipides. Au cours des 60 premiers jours postnataux, on observe une accumulation de cholestérol [175] dans les membranes neuronales jusqu'à un rapport phospholipides/cholestérol 3:1. Dans les membranes planes, le cholestérol augmente la rigidité et réduit la perméabilité de la membrane [176]. Cependant, la déformation de la membrane induit un déséquilibre du potentiel chimique. La compression du feuillet interne entraîne une augmentation de la concentration des composants. Des tests RMN et FRET ont démontré que le *flip-flop* du cholestérol du feuillet concave vers le feuillet convexe permet d'équilibrer la concentration des lipides facilitant le remodelage de la membrane [177]. Le temps de formation des vésicules de recyclage endocyttaire dans la membrane plasmique neuronale est rapide entre 50 et 100 ms [178, 166] tandis que le temps de *flip-flop* spontané (sans l'intermédiaire de *flippase*) du cholestérol est estimé à  $\approx 0,6$  ms [177]. De plus, l'affinité entre les phospholipides polyinsaturés et le cholestérol est plus faible qu'entre le cholestérol et les chaînes saturées et monoinsaturées [69]. Par conséquent, le temps de *flip-flop* du cholestérol est plus rapide en présence de phospholipides polyinsaturés [101]. La

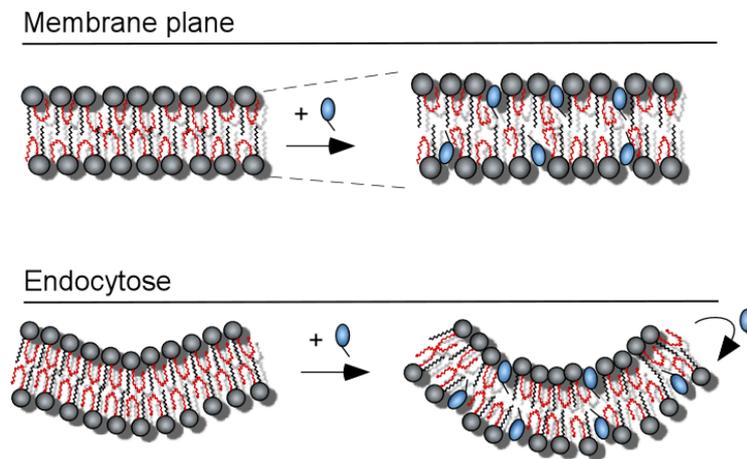
---

présence de phospholipides polyinsaturés dans les membranes neuronales pourrait également accélérer le *flip-flop* du cholestérol lors de déformation membranaire. Ce remodelage pourrait permettre d'augmenter la compressibilité du feuillet concave et d'augmenter la capacité de dilatation du feuillet convexe par insertion du cholestérol entre les phospholipides de ce dernier (Figure 1).

Dans mes simulations de *pulling*, j'utilise des forces de traction élevées (de 175 à 250  $kJ.mol^{-1}.nm^{-1}$ ). Le tube se forme alors très rapidement en quelques centaines de nanosecondes. Ces temps courts de simulation me permettent d'observer rapidement l'effet des chaînes aliphatiques sur la déformation membranaire. Cependant, ils ne me permettent pas d'observer des évènements de *flip-flop* du cholestérol. L'ajout de cholestérol au sein de ces simulations me permet d'observer uniquement l'augmentation de l'ordre des membranes ce qui ralentit la formation du tube et non l'avantage que pourrait engendrer le transfert des cholestérols d'un feuillet à l'autre. Dans une cellule, la force verticale exercée sur la membrane provoquant l'invagination de celle-ci est due à l'action synergique du cytosquelette et des protéines à domaine BAR. Une étude estime que pour de vésicules, induites par la voie clathrine dépendante, la force exercée par l'actine et les domaines BAR dans les levures est de  $\approx 190$  pN [179] soit  $\approx 1.7$  fois moins que la force la plus utilisée dans mes simulations (200 soit 332 pN).

Les interactions entre les phospholipides polyinsaturés et le cholestérol semblent particulièrement complexes. Afin d'évaluer, en simulation de DM, leur impact sur la déformation membranaire, il serait envisageable de réduire considérablement la force de traction exercée sur la membrane plane (par exemple entre 50 et 100  $kJ.mol^{-1}.nm^{-1}$ ). Ainsi, la formation du tube serait considérablement ralentie. Sans changer la taille du système, déjà conséquente, je pourrais effectuer des simulations sur des durées de temps plus longues et ainsi analyser les mouvements du cholestérol au sein des bicouches lipidiques en fonction de la composition en phospholipides. Par conséquent, je pourrais analyser l'implication de ces mouvements sur la déformation membranaire. Expérimentalement, des mesures du taux d'hydrolyse du GTP de la dynamine sur des liposomes supplémentés par une concentration croissante de cholestérol, seraient envisageables et facilement réalisables.

**Le mélange phospholipides polyinsaturés-cholestérol est intuitivement incompatible au vu de leur propriété première (malléabilité *vs* rigidité). Ce mélange retrouvé spécifiquement dans les membranes synaptiques pourrait en réalité s'expliquer par une plus grande adaptabilité des membranes dans le but de restaurer rapidement la surface membranaire (Figure 1)**

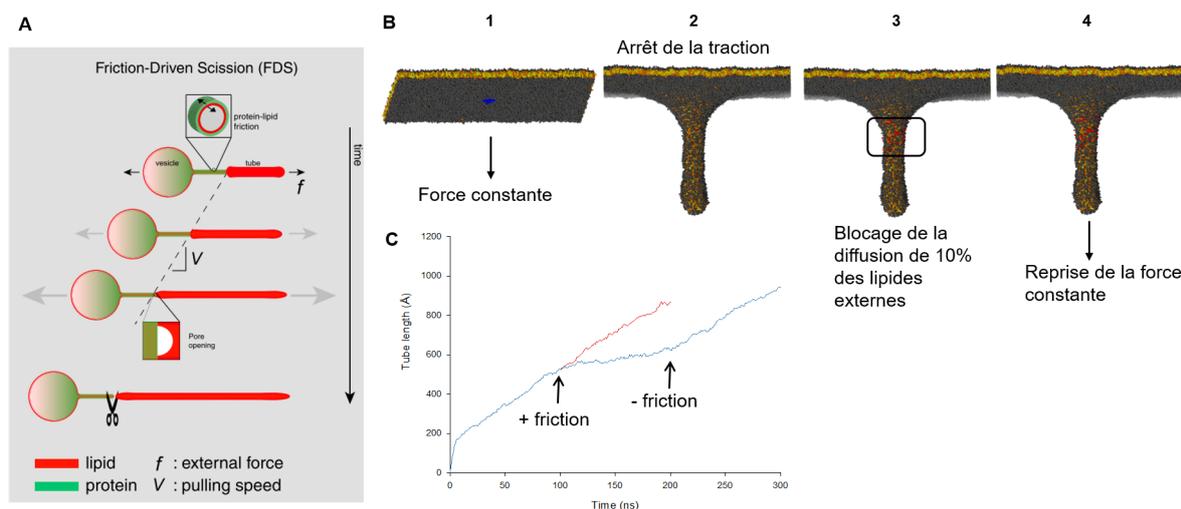


**FIGURE 1 – Hypothèse de la place du cholestérol dans les déformations membranaires.** Dans les membranes planes, le cholestérol (en bleu) augmente l'épaisseur de la bicouche. En cas de déformation, le *flip flop* du cholestérol du feuillet concave vers le feuillet convexe pourrait faciliter le remodelage des membranes. Diminuant le nombre de lipide dans le feuillet concave il favoriserait sa compressibilité. A l'inverse, l'augmentation du nombre de lipides dans le feuillet convexe pourrait favoriser son extension.

## Implication du cytosquelette et des protéines d'endocytose

L'application d'une force perpendiculaire au plan de la membrane permet de reproduire la force de traction engendrée par le cytosquelette et les protéines à domaine BAR telles que l'endophiline. La famille des protéines BAR en interagissant avec la membrane stabilise cette dernière et induit sa courbure. Dans le cas des endocytoses clathrine indépendantes, elles seraient également impliquées dans la scission. L'association des microtubules avec des moteurs moléculaires induirait une force vertical entrainant l'invagination de la membrane tandis que la polymérisation des domaines BAR créerait une force de friction. La conséquence de ces deux forces opposées serait la formation d'une tension au niveau de la membrane entrainant sa scission [180] (Figure 2.A). En mimant ce modèle par un système expérimental à base de GUV, Simunovic et al. ont pu démontrer que la friction due au domaine BAR augmentait la tension de la membrane jusqu'à rupture du tube [181].

Cette force de friction n'est pas prise en compte dans mes simulations publiées. J'ai abordé cet aspect en ajoutant une force de friction à mes systèmes. Pour cela, j'initie la formation d'un tube. Au bout de 100 ns d'élongation, j'ajoute des contraintes de (non) diffusion (en  $x, y$  et  $z$ ) sur 10% des phospholipides présents sur le feuillet externe à la base du tube (correspondant au feuillet cytosolique). Les temps de simulation ont peut-être été trop courts (Figure 2.C). Enfin je réapplique la même force de traction pour reprendre l'élongation (Figure 2.B). Grâce à ce système, j'ai observé un arrêt de l'élongation mais je n'ai pas pu observer de scission.



**FIGURE 2 – Modèle de scission par friction.** A : Tube partiellement recouvert de protéines BAR. Elles imposent une force de frottement sur le tube sous-jacent. Lorsque le tube est allongé à vitesse constante  $V$ , la diffusion des lipides dans cette zone est très lent. Leur passage dans le reste du tube non recouvert de protéines est limité. Il se met alors en place une tension de membrane qui favorise la formation de pores et donc la scission de la membrane, extrait de [181]. B : Différentes étapes pour modéliser les phénomènes de friction en simulation de DM. Les lipides subissant une force de friction sont représentés en rouge dans les étape 3 et 4. C : Elongation du tube en présence (courbe bleue) ou absence de friction (courbe rouge) pour des membranes symétriques composées de 18:0-22:6

## Têtes polaires des phospholipides et déformation membranaire

Au sein des membranes, les lipides sont capables de diffuser dans la bicouche pour que leur géométrie intrinsèque soit en adéquation avec la courbure membranaire. L'échelle de temps de mes simulations ne permet pas d'observer le *sorting* des lipides. Cela pourrait expliquer la variabilité observée dans mes simulations contenant 50 % de lipides PS ou PE dans l'un des feuillet. Cependant, l'étude menée en 2018 par Baoukina et al. montre un enrichissement du feuillet convexe, lors de l'invagination de la membrane vers l'intérieur de la cellule, par les phospholipides polyinsaturés principalement PE et PS [146]. Cette étude couplée à mes résultats suggère que la composition des chaînes aliphatiques ont un impact, dans les déformations membranaires, aussi important voir plus que la nature de la tête polaire des lipides. En effet, les chaînes aliphatiques polyinsaturées, par leur flexibilité, adaptent leur géométrie à la forme de la membrane et notamment aux courbures positives quelles que soient les propriétés de têtes polaires.

---

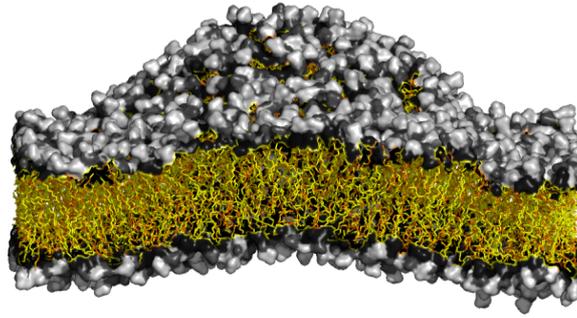
## Différence n-3/n-6

La différence par définition entre le n-6 et n-3 est la chimie du dernier fragment de la chaîne. Ce dernier est composé de 6 carbones saturés dans le cas des n-6 ce qui rigidifie davantage l'extrémité des chaînes aliphatiques polyinsaturés. Je n'ai pas identifié de différences majeures entre la famille de n-6 et n-3 dans son ensemble. Cependant si l'on compare les polyinsaturés à longue chaîne 20:4n-6 vs 22:6n-3, quelques différences sont notables. De part sa flexibilité supplémentaire en fin de chaîne, le 22:6 est capable de plus de "contorsion" et occupe alors davantage l'interface eau/membrane. Cette flexibilité plus accentuée pour le 22:6 est un atout pour faciliter la déformation membranaire. Les chaînes aliphatiques polyinsaturées en perpétuels mouvements, n'ont pas une grande affinité pour d'autres molécules hydrophobes au sein de la membrane. Par exemple, leur affinité avec le cholestérol est moindre que pour les phospholipides saturés ou monoinsaturés. Une amélioration est observée en présence de 20:4. Le 20:4 a tendance à repousser le cholestérol au centre de la bicouche interagissant ainsi avec le fragment terminal plus rigide. Il a également été montré que l'absence de 20:4 compromettrait fortement la formation de gouttelettes lipidiques et donc le stockage des TG entre deux monocouches. Le dernier fragment de 6 carbones plus rigide pourrait faciliter l'interaction et la stabilité des cholestérol et TG au sein de la bicouche.

## Limite des simulations

Les simulations de DM modélisent au mieux le comportement des macromolécules. Cependant quelques ajustements et vérifications sont nécessaires.

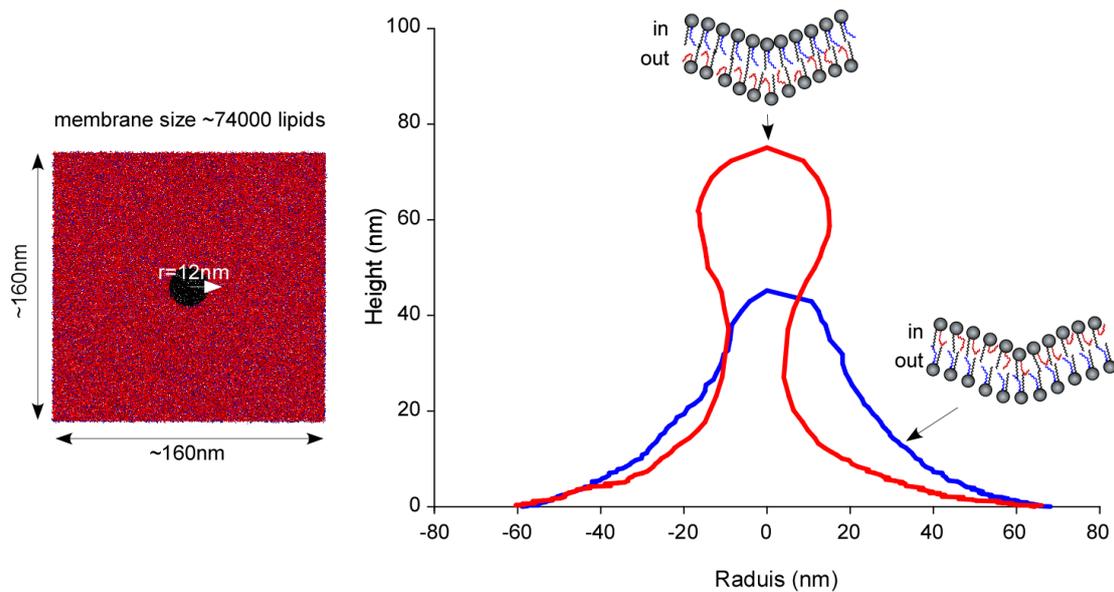
Les simulations de *pulling* qui ont été réalisées au cours de ma thèse utilise le **FF gros grain MARTINI**. Ce FF simplifie la représentation d'un phospholipide à 12 et 13 pseudo-atomes contre 134 et 142 atomes en AA pour respectivement un POPC (16:0-18:1PC) et un SDPC (18:0-22:6PC). Cette approximation ne permet pas de distinguer un 16:0 d'un 18:0 ou un 22:6 d'un 22:5. Cependant la différence entre un n-3 et un n-6 est identifiable grâce au type d'atome associé au dernier pseudo atome de la chaîne ; caractéristique, respectivement, d'une double liaison ou d'une simple liaison. La construction de système AA sur le même principe est difficilement réalisable. Elle nécessite un large réservoir lipidique et une boîte d'eau suffisamment importante pour permettre la déformation de la membrane. J'ai réalisé un premier essai sur des membranes contenant 500 lipides par feuillet ce qui m'a permis d'observer uniquement la formation d'un dôme (Figure 3).



**FIGURE 3 – Formation d'un dôme simulée en AA** pour une membrane composée de phospholipides 18:0-22:6n-3 avec une force de traction de  $200 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$ . Les chaînes aliphatiques sont représentées en stick les chaînes *sn1* en jaunes, les chaînes *sn2* en orange les têtes polaires en gris et noir sont représentées en surface.

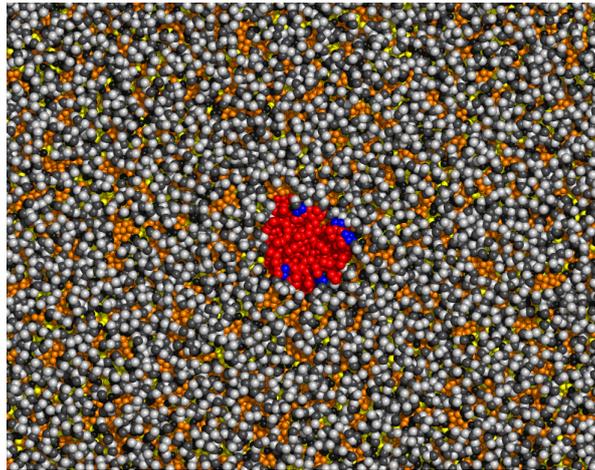
En CG, dans le but d'avoir un réservoir de lipides suffisant provenant de ma membrane, j'applique la force de traction uniquement sur quelques lipides au sein de la bicouche dans un rayon de 3 nm. Les tubes formés par mes simulations ont alors un rayon  $\approx 5-6$  nm tandis qu'en réalité les vésicules synaptiques ont un rayon de  $\approx 20$  nm [42, 182]. La conséquence première de ces faibles rayons est la visualisation de phénomènes de fission sans l'appui de protéines de scission telles que la dynamine. Mes systèmes se composent de  $\approx 18\,000$  lipides et comportent plus de 5 millions de particules. Il était difficile de faire plus, pour allier bénéfices et performances, dans le but d'une étude systématique avec suffisamment de réplicats. La question que l'on peut alors se poser est : **Est-ce que l'effet observé d'une composition lipidique à l'autre n'est pas dû à une très forte courbure engendrée par ces rayons particulièrement fins ?** C'est pourquoi j'ai construit un plus grand système de membranes asymétriques, en élargissant ma zone de sélection à un rayon de 12 nm. La présence de phospholipides polyinsaturés dans le feuillet convexe facilite encore une fois la déformation membranaire. Les membranes atteignent même un équilibre, au niveau de l'extension du tube, pour faire place à la formation d'une zone d'étranglement accompagnée de celle d'une vésicule en formation de  $\approx 20$  nm de rayon (Figure 4) L'impact du rayon de déformation ne semble donc pas influencer la tendance observée.

Outre les phénomènes de fission "forcée" par un faible rayon, j'ai également dû faire face à certains **phénomènes de cassure**. Dans les deux cas une partie de la membrane se détache. Cependant dans le cas d'une "fission", la portion de membrane extraite possède bien les caractéristiques d'une vésicule : une bicouche lipidique contenant des molécules d'eau. Dans le cas d'une cassure, il s'agit d'une véritable déchirure de la membrane formant non plus une vésicule mais une micelle. Il a été important de distinguer ces deux éventualités car si la première survient à partir d'un rayon seuil du tube de  $\approx 3$  nm reflétant la déformabilité de la membrane, la déchirure provient, elle, d'une force de traction trop importante ou la formation d'une tension



**FIGURE 4 – Impact du rayon du tube sur l'effet de la polyinsaturation dans le feuillet convexe.** Contour des déformations membranaires obtenues à partir d'un rayon de traction de 12 nm dans le cas de membranes asymétriques

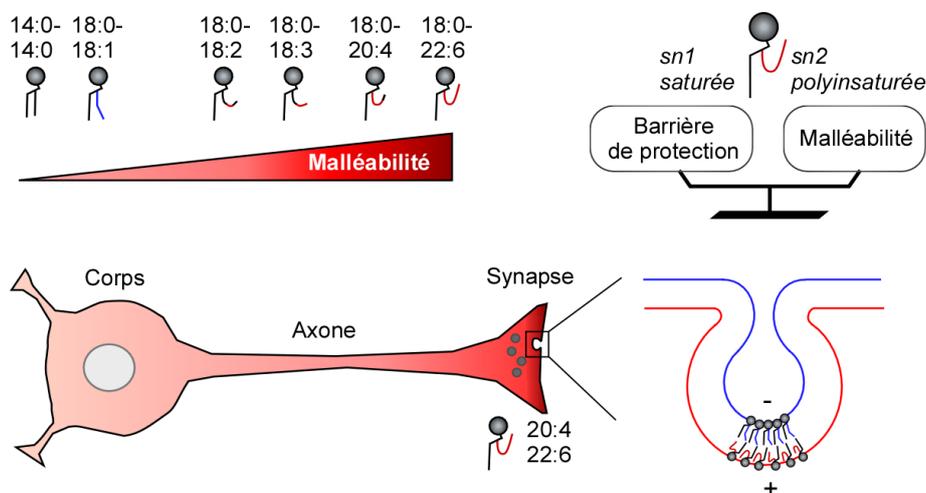
de ligne. En effet, les cassures ont été observées soit au cours de la déformation lors de l'utilisation de force élevée  $\geq 230 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$  (cf figure 6 Manni et al 2018) soit dès l'initiation de la déformation dans le cas d'une composition lipidique mixte. Dans le cas des membranes multicomposants, les différents lipides sont disposés aléatoirement au sein de chaque feuillet au moment de la construction du système. La zone de sélection au centre ne comporte alors pas nécessairement le même ratio de lipides que la membrane dans sa globalité. Ceci peut engendrer des problèmes lorsque les composants de la membrane n'ont pas la même malléabilité. Prenons l'exemple de la dose réponse présenté dans l'article soumis (Tiberti et al. 2019 (soumis) - Figure 3), a nécessité un ajustement. Lorsque le feuillet extérieur au tube était composé de 75% de phospholipides polyinsaturés, la zone sélectionnée au centre en comportait 88%. De plus, les phospholipides monoinsaturés, déjà peu nombreux (12% restant), étaient présents uniquement sur les bords de la sélection (Figure 5). La différence de pourcentage des phospholipides mono et polyinsaturés au sein de cette sélection ainsi que leur répartition ont créé une tension de ligne. Cette tension a engendré la cassure du système très rapidement, dès les premières nanosecondes. En décalant la zone de sélection, dans une zone où le ratio 75%-25% était respecté, ou en reconstruisant un nouveau système, le problème a été résolu.



**FIGURE 5 – Artéfact de simulations.** Zoom sur la distribution aléatoire des lipides répartis, au centre de la bicouche, avec une grande majorité de phospholipides polyinsaturés (en rouge) et quelques phospholipides monoinsaturés (en bleu) au bord de cette sélection créant une tension de ligne. Les lipides qui ne subissent pas directement l'application de la force sont représentés par des sphères blanches : "azote", sphères noires : "phosphate" et "glycérol", sphères jaunes : "carbone saturé" et sphères oranges "carbone insaturé"

# Conclusion

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence les **mécanismes atomistiques** expliquant l'implication des phospholipides polyinsaturés dans les mécanismes d'**endocytose rapides**. Dans un premier temps, les simulations de DM et les expériences biochimiques menées en collaboration avec le Dr. Manni ont permis de comprendre que la **répartition naturelle des chaînes aliphatiques au sein des phospholipides** dans les membranes leur permet de remplir deux fonctions principales : être une barrière de protection et être suffisamment malléable pour s'adapter à leur environnement. Cette étude systématique a permis d'évaluer l'**impact d'une large gamme de phospholipides polyinsaturés** sur ces fonctions. Dans un deuxième temps, les simulations de DM ont permis de suggérer l'**importance de la répartition asymétrique des phospholipides polyinsaturés au sein des membranes**. En effet, la chaîne polyinsaturée remonte à la surface élargissant le volume occupé par la partie supérieure des lipides. Les phospholipides polyinsaturés peuvent ainsi facilement **adapter leur conformation aux courbures positives** nécessitant des géométries principalement inversement coniques. Ces avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires des phospholipides polyinsaturés dans les membranes, sont primordiales pour comprendre leur nécessité dans le fonctionnement de la rétine, du cerveau et leur importance dans les maladies cardiovasculaires. L'évolution de notre alimentation au cours du temps a créé un déséquilibre dans la balance n-6/n-3 avec une chute considérable du taux de n-3. Aujourd'hui, ce déséquilibre fait de la consommation des n-3 et n-6 un **enjeu majeur de santé publique**.



**FIGURE 6 – Bilan : Distribution de la polyinsaturation au sein des phospholipides et de la membrane plasmique**

- [1] Robert Hooke. *Micrographia*. Royal Society, 1665.
- [2] T N Gobley. Recherches chimiques sur le jaune d'œuf - examen comparatif du jaune d'œuf et de la matière cérébrale. *J Pharm Chim*, 11 :409–411, 1847.
- [3] Jonathan Lombard. Once upon a time the cell membranes : 175 years of cell boundary research. *Biology direct*, 9 :32, 2014.
- [4] Irving Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 39(9) :1848–1906, 1917.
- [5] E. Gorter and F. Grendel. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Forbes*, page 439, 1924.
- [6] S. J. Singer and Garth. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. 175(4023) :720–731, 1972.
- [7] Félix M. Goñi. The basic structure and dynamics of cell membranes : An update of the Singer-Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6) :1467–1476, 2014.
- [8] Garth L. Nicolson. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure : Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6) :1451–1466, 2014.
- [9] Prabhani U. Atukorale, Yu Sang Yang, Ahmet Bekdemir, Randy P. Carney, Paulo J. Silva, Nicki Watson, Francesco Stellacci, and Darrell J. Irvine. Influence of the glycocalyx and plasma membrane composition on amphiphilic gold nanoparticle association with erythrocytes. *Nanoscale*, 7(26) :11420–11432, 2015.
- [10] Takeshi Harayama and Howard Riezman. Understanding the diversity of membrane lipid composition, 2018.
- [11] Albert Morales, Hyunmi Lee, Felix M. Goñi, Richard Kolesnick, and José C. Fernandez-Checa. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12(5) :923–939, 2007.

- 
- [12] Aneta Dorota Petelska and Zbigniew Artur Figaszewski. The equilibria of sphingolipid-cholesterol and sphingolipid-sphingolipid in monolayers at the air-water interface. *Journal of Membrane Biology*, 246(1) :13–19, 2013.
- [13] Drew Marquardt, Norbert Kučerka, Stephen R. Wassall, Thad A. Harroun, and John Katsaras. Cholesterol’s location in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 199 :17–25, 2016.
- [14] Norbert Kučerka, Drew Marquardt, Thad A. Harroun, Mu Ping Nieh, Stephen R. Wassall, Djurre H. De Jong, Lars V. Schäfer, Siewert J. Marrink, and John Katsaras. Cholesterol in bilayers with PUFA chains : Doping with DMPC or POPC results in sterol reorientation and membrane-domain formation. *Biochemistry*, 49(35) :7485–7493, 2010.
- [15] Inna Ermilova and Alexander P. Lyubartsev. Cholesterol in phospholipid bilayers : positions and orientations inside membranes with different unsaturation degrees. *Soft Matter*, 15(1) :78–93, 2019.
- [16] Sean Munro. ScienceDirect - Cell : Lipid Rafts : Elusive or Illusive ? *Cell*, 115 :377–388, 2003.
- [17] Félix M. Goñi. “Rafts” : A nickname for putative transient nanodomains. *Chemistry and Physics of Lipids*, 218(October 2018) :34–39, 2019.
- [18] Y. H. Itoh, A. Sugai , I. Uda and T. Itoh. THE EVOLUTION OF LIPIDS. 28(4) :719–724, 2001.
- [19] Stefano Vanni, Laura Riccardi, Giulia Palermo, and Marco De Vivo. Structure and Dynamics of the Acyl Chains in the Membrane Trafficking and Enzymatic Processing of Lipids. *Accounts of Chemical Research*, 2019.
- [20] Fatima Ameer, Lisa Scanduzzi, Shahida Hasnain, Hubert Kalbacher, and Nousheen Zaidi. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism : Clinical and Experimental*, 63(7) :895–902, 2014.
- [21] Stuart Smith, Andrzej Witkowski, and Anil K. Joshi. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*, 42(4) :289–317, 2003.
- [22] Ikuyo Ichi, Nozomu Kono, Yuka Arita, Shizuka Haga, Kotoko Arisawa, Misato Yamano, Mana Nagase, Yoko Fujiwara, and Hiroyuki Arai. Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20 :3n - 9), an indicator of essential fatty acid deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1) :204–213, 2014.

- 
- [23] R T Holman. The ratio of trienoic-tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement. *Journal of Nutrition*, 70(3) :405–410, 1960.
- [24] Ki Han Kim. Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase. *Current Topics in Cellular Regulation*, 22(C) :143–176, 1983.
- [25] Sarah K. Gebauer, Tricia L. Psota, William S. Harris, and Penny M. Kris-Etherton. n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6) :1526–1535, 2006.
- [26] Je Min Lee, Hyungjae Lee, Seok Beom Kang, and Woo Jung Park. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1) :1–13, 2016.
- [27] Atsushi Yamashita, Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Makoto Ito, Saori Oka, Takashi Tanikawa, Keizo Waku, and Takayuki Sugiura. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Progress in Lipid Research*, 53(1) :18–81, 2014.
- [28] Juliette Jouhet. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science*, 4(December) :1–5, 2013.
- [29] Austin Lou Bailey and Pieter R Cullis. Chapter 9 liposome fusion. 1997.
- [30] G. van Meer and A. I. P. M. de Kroon. Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1) :5–8, 2011.
- [31] Jesper Lemmich, Kell Mortensen, John Hjort Ipsen, Thomas Hønger, Rogert Bauer, and Ole G. Mouritsen. The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition. *European Biophysics Journal*, 25(4) :293–304, 1997.
- [32] Simons K and Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633) :569–572, 1997.
- [33] Marek Cebecauer, Mariana Amaro, Piotr Jurkiewicz, Maria Joao Sarmiento, Radek Šachl, Lukasz Cwiklik, and Martin Hof. Membrane Lipid Nanodomains. *Chemical Reviews*, 118(23) :11259–11297, 2018.
- [34] Vadim A. Frolov, Anna V. Shnyrova, and Joshua Zimmerberg. Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11) :1–14, 2011.

- [35] Takashi Hirama, Stella M. Lu, Jason G. Kay, Masashi Maekawa, Michael M. Kozlov, Sergio Grinstein, and Gregory D. Fairn. Membrane curvature induced by proximity of anionic phospholipids can initiate endocytosis. *Nature Communications*, 8(1), 2017.
- [36] Bruno Antonny, Irit Huber, Sonia Paris, Marc Chabre, and Dan Cassel. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49) :30848–30851, 1997.
- [37] Stefano Vanni, Lydie Vamparys, Romain Gautier, Guillaume Drin, Catherine Etchebest, Patrick F.J. Fuchs, and Bruno Antonny. Amphipathic lipid packing sensor motifs : Probing bilayer defects with hydrophobic residues. *Biophysical Journal*, 104(3) :575–584, 2013.
- [38] Stefano Vanni, Hisaaki Hirose, Hélène Barelli, Bruno Antonny, and Romain Gautier. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment. *Nature Communications*, 5, 2014.
- [39] Gerrit Van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W Feigenson. Membrane lipids : where they are. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1) :1–4, 2009.
- [40] Mark S. Bretscher. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biology*, 236(61) :11–12, 1972.
- [41] Alain ZACHOWSKI. Phospholipids in animal eukaryotic membranes : transverse asymmetry and movement. page 294, 1993.
- [42] Shigeo Takamori, Matthew Holt, Katinka Stenius, Edward A. Lemke, Mads Gr onborg, Dietmar Riedel, Henning Urlaub, Stephan Schenck, Britta Brügger, Philippe Ringler, Shirley A. Müller, Burkhard Rammner, Frauke Gr ater, Jochen S. Hub, Bert L. De Groot, Gottfried Mieskes, Yoshinori Moriyama, Jürgen Klingauf, Helmut Grubmüller, John Heuser, Felix Wieland, and Reinhard Jahn. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, 127(4) :831–846, 2006.
- [43] JH Lorent, L Ganesan, G Rivera-Longsworth, E Sezgin, KR Levental, E Lyman, and I Levental. The Molecular and Structural Asymmetry of the Plasma Membrane. *bioRxiv*, page 698837, 2019.
- [44] Jo elle Bigay and Bruno Antonny. Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles : Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Developmental Cell*, 23(5) :886–895, 2012.

- [45] J. FOLCH, M. LEES, and G. H. SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1) :497–509, 1957.
- [46] N.M. Salem, Y.H. Lin<sup>1</sup>, T. Moriguchi<sup>2</sup>, S.Y. Lim<sup>3</sup>, N. Salem, and J. R. Hibbeln<sup>1</sup>. HHS Public Access. pages 1–18, 2015.
- [47] Jaewoo Choi, Tai Yin, Koichiro Shinozaki, Joshua W. Lampe, Jan F. Stevens, Lance B. Becker, and Junhwan Kim. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver : brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 442(1-2) :187–201, 2018.
- [48] Reinaldo Almeida, Zane Berzina, Eva C. Arnspang, Jan Baumgart, Johannes Vogt, Robert Nitsch, and Christer S. Ejsing. Quantitative spatial analysis of the mouse brain lipi-dome by pressurized liquid extraction surface analysis. *Analytical Chemistry*, 87(3) :1749–1756, 2015.
- [49] Y. Kishimoto, B. W. Agranoff, N. S. Radin, and R. M. Burton. Comparison of the Fatty Acids of Lipids of Subcellular Brain Fractions. *Journal of Neurochemistry*, 16(3) :397–404, 1969.
- [50] Mark S. Bretscher. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biology*, 236(61) :11–12, 1972.
- [51] Hyun Jeong Yang, Yuki Sugiura, Koji Ikegami, Yoshiyuki Konishi, and Mitsutoshi Setou. Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8) :5290–5300, 2012.
- [52] Bruno Antonny, Stefano Vanni, Hideo Shindou, and Thierry Ferreira. From zero to six double bonds : Phospholipid unsaturation and organelle function. *Trends in Cell Biology*, 25(7) :427–436, 2015.
- [53] Andrew J Sinclair. *Introduction : More Than 50 Years of Research on Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. Elsevier Inc., 2018.
- [54] J Tinoco.  $\omega$ -Linolenic Acid in Animals. 21, 1982.
- [55] C. D. Niebylski and N. Salem. A calorimetric investigation of a series of mixed-chain poly-unsaturated phosphatidylcholines : effect of sn-2 chain length and degree of unsaturation. *Biophysical Journal*, 67(6) :2387–2393, 1994.
- [56] Janice M. Smaby, Maureen M. Momsen, Howard L. Brockman, and Rhoderick E. Brown. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophysical Journal*, 73(3) :1492–1505, 1997.

- [57] Kenneth R Applegate and John A Glomset. Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. 27 :658–680, 1986.
- [58] Scott E Feller, Klaus Gawrisch, and Alexander D Mackerell. Polyunsaturated Fatty Acids in Lipid Bilayers : Intrinsic and Environmental Contributions to Their Unique Physical Properties. (13), 2002.
- [59] Thomas Huber, Kannan Rajamoorthi, Volker F Kurze, Klaus Beyer, and Michael F Brown. Structure of Docosahexaenoic Acid-Containing Phospholipid Bilayers as Studied by  $^2\text{H}$  NMR and Molecular Dynamics Simulations. 8(2), 2002.
- [60] Nadukkudy V. Eldho, Scott E. Feller, Stephanie Tristram-Nagle, Ivan V. Polozov, and Klaus Gawrisch. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid - Differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *Journal of the American Chemical Society*, 125(21) :6409–6421, 2003.
- [61] Kannan Rajamoorthi, Horia I Petrache, Thomas J McIntosh, and Michael F Brown. Packing and Viscoelasticity of Polyunsaturated  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Lipid Bilayers as Seen by  $^2\text{H}$  NMR and X-ray Diffraction. (7) :1576–1588, 2005.
- [62] H. I. Petrache, A. Salmon, and M. F. Brown. Structural properties of docosahexaenoyl phospholipid bilayers investigated by solid-state  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 123(50) :12611–12622, 2001.
- [63] I. S. Young and J. McEneny. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(2) :358–362, 2001.
- [64] Gilbert O. Fruhwirth, Alexandra Loidl, and Albin Hermetter. Oxidized phospholipids : From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(7) :718–736, 2007.
- [65] Daniel Huster, Albert J Jin, Klaus Arnold, and Klaus Gawrisch. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by  $^{17}\text{O}$  NMR. *Biophysical Journal*, 73(2) :855–864, 1997.
- [66] K Olbrich, W Rawicz, D Needham, and E Evans. Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. 2000.
- [67] W Rawicz, K C Olbrich, T McIntosh, D Needham, and E Evans. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79 :328–339, 2003.
- [68] Piet W.M. Van Dijck. Negatively charged phospholipids and their position in the cholesterol affinity sequence. *BBA - Biomembranes*, 555(1) :89–101, 1979.

- [69] Saame Raza Shaikh, Vadim Cherezov, Martin Caffrey, Smita P. Soni, Daniel LoCas-  
cio, William Stillwell, and Stephen R. Wassall. Molecular organization of cholesterol in  
unsaturated phosphatidylethanolamines : X-ray diffraction and solid state  $^2\text{H}$  NMR re-  
veal differences with phosphatidylcholines. *Journal of the American Chemical Society*,  
128(16) :5375–5383, 2006.
- [70] Kandice R. Levental, Joseph H. Lorent, Xubo Lin, Allison D. Skinkle, Michal A. Surma,  
Emily A. Stockenbojer, Alemayehu A. Gorfe, and Ilya Levental. Polyunsaturated lipids  
regulate membrane domain stability by tuning membrane order. *Biophysical Journal*,  
110(8) :1800–1810, 2016.
- [71] Daniela Küllenberg, Lenka A. Taylor, Michael Schneider, and Ulrich Massing. Health  
effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease*, 11(1) :3, 2012.
- [72] R T Holman, S B Johnson, and T F Hatch. A case of human linolenic acid deficiency invol-  
ving neurological abnormalities. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 35(3) :617–  
623, 03 1982.
- [73] A. P. Simopoulos. Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum of nutrition*,  
56 :67–70, 2003.
- [74] E. Patterson, R.Wall, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross and C. Stanton. Health Implications of-  
High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*  
*concluded*, 4(11) :1554–1565, 2011.
- [75] B. M. Yashodhara, S. Umakanth, J. M. Pappachan, S. K. Bhat, R. Kamath, and B. H.  
Choo. Omega-3 fatty acids : A comprehensive review of their role in health and disease.  
*Postgraduate Medical Journal*, 85(1000) :84–90, 2009.
- [76] Michele Anderson and Kevin L. Fritsche. (n-3) Fatty Acids and Infectious Disease Resis-  
tance. *The Journal of Nutrition*, 132(12) :3566–3576, 2002.
- [77] Kristian Søbørg Husted and Elena V. Bouzinova. The importance of n-6/n-3 fatty acids  
ratio in the major depressive disorder. *Medicina (Lithuania)*, 52(3) :139–147, 2016.
- [78] Albert Pol, Steven P. Gross, and Robert G. Parton. Biogenesis of the multifunctional  
lipid droplet : Lipids, proteins, and sites. *Journal of Cell Biology*, 204(5) :635–646, 2014.
- [79] Tomomi Hashidate-Yoshida, Takeshi Harayama, Daisuke Hishikawa, Ryo Morimoto, Fu-  
mie Hamano, Suzumi M. Tokuoka, Miki Eto, Miwa Tamura-Nakano, Rieko Yanobu-  
Takanashi, Yoshiko Mukumoto, Hiroshi Kiyonari, Tadashi Okamura, Yoshihiro Kita, Hi-  
deo Shindou, and Takao Shimizu. Fatty acyl-chain remodeling by LPCAT3 enriches

- arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *eLife*, 2015(4) :1–75, 2015.
- [80] Hélène Barelli and Bruno Antonny. Lipid unsaturation and organelle dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 41 :25–32, 2016.
- [81] Burton J. Litman and Drake C. Mitchell. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids*, 31(1) :S193–S197, 1996.
- [82] Drake C. Mitchell, Shui Lin Niu, and Burton J. Litman. Optimization of receptor-G protein coupling by Bilayer lipid composition I : Kinetics of rhodopsin-transducin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46) :42801–42806, 2001.
- [83] Olivier Soubias, Walter E. Teague, and Klaus Gawrisch. Evidence for specificity in lipid-rhodopsin interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44) :33233–33241, 2006.
- [84] Olivier Soubias, Walter E. Teague, Kirk G. Hines, Drake C. Mitchell, and Klaus Gawrisch. Contribution of membrane elastic energy to rhodopsin function. *Biophysical Journal*, 99(3) :817–824, 2010.
- [85] Valeria Vásquez, Michael Krieg, Dean Lockhead, and Miriam B. Goodman. Phospholipids that contain polyunsaturated fatty acids enhance neuronal cell mechanics and touch sensation. *Cell Reports*, 6(1) :70–80, 2014.
- [86] Rebeca Caires, Francisco J. Sierra-Valdez, Jonathan R.M. Millet, Joshua D. Herwig, Esra Roan, Valeria Vásquez, and Julio F. Cordero-Morales. Omega-3 Fatty Acids Modulate TRPV4 Function through Plasma Membrane Remodeling. *Cell Reports*, 21(1) :246–258, 2017.
- [87] Jo elle Bigay, Jean François Casella, Guillaume Drin, Bruno Mesmin, and Bruno Antonny. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO Journal*, 24(13) :2244–2253, 2005.
- [88] Guillaume Drin, Jo elle Bigay, and Bruno Antonny. R egulation du transport vésiculaire par la courbure membranaire. *Medecine/Sciences*, 25(5) :483–488, 2009.
- [89] Todd Logan, Jacob Bendor, Chantal Toupin, Kurt Thorn, and Robert H. Edwards.  $\alpha$ -Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nature Neuroscience*, 20(5) :681–689, 2017.
- [90] Iwona M. Pranke, Vincent Morello, Jo elle Bigay, Kimberley Gibson, Jean Marc Verbavatz, Bruno Antonny, and Catherine L. Jackson.  $\alpha$ -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *Journal of Cell Biology*, 194(1) :89–103, 2011.

- [91] Mathieu Pinot, Stefano Vanni, Sophie Pagnotta, Sandra Lacas-Gervais, Laurie Anne Payet, Thierry Ferreira, Romain Gautier, Bruno Goud, Bruno Antonny, and Helene Barrelli. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science*, 345(6197) :693–697, 2014.
- [92] James H. Hurley, Evzen Boura, Lars Anders Carlson, and Bartosz Róycki. Membrane budding. *Cell*, 143(6) :875–887, 2010.
- [93] Shigeki Watanabe and Emmanuel Boucrot. Fast and ultrafast endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 47 :64–71, 2017.
- [94] Shigeki Watanabe, Benjamin R. Rost, Marcial Camacho-Pérez, M. Wayne Davis, Berit Söhl-Kielczynski, Christian Rosenmund, and Erik M. Jorgensen. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504(7479) :242–247, 2013.
- [95] Shigeki Watanabe, Qiang Liu, M Wayne Davis, Gunther Hollopeter, Nikita Thomas, Nels B Jorgensen, and Erik M Jorgensen. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *eLife*, 2 :1–24, 2013.
- [96] Bruno Antonny, Christopher Burd, Pietro De Camilli, Elizabeth Chen, Oliver Daumke, Katja Faelber, Marijn Ford, Vadim A Frolov, Adam Frost, Jenny E Hinshaw, Tom Kirchhausen, Michael M Kozlov, Martin Lenz, Harry H Low, Harvey McMahon, Christien Merrifield, Thomas D Pollard, Phillip J Robinson, Aurélien Roux, and Sandra Schmid. Membrane fission by dynamin : what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*, 35(21) :2270–2284, 2016.
- [97] Karplus and McCammon. Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Journal of the Society of Mechanical Engineers*, 116(1131) :78–80, 2002.
- [98] Scott A. Hollingsworth and Ron O. Dror. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6) :1129–1143, 2018.
- [99] Jeffery B. Klauda. Perspective : Computational modeling of accurate cellular membranes with molecular resolution. *Journal of Chemical Physics*, 149(22), 2018.
- [100] Jeffery B. Klauda, Joseph W. O’Connor, Richard M. Venable, Richard W. Pastor, J. Alfredo Freites, Douglas J. Tobias, Carlos Mondragon-Ramirez, Igor Vorobyov, and Alexander D. Mackerell Jr. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids : Validation on Six Lipid Types. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(23) :7830–7843, 2010.

- [101] Siewert J. Marrink, H. Jelger Risselada, Serge Yefimov, D. Peter Tieleman, and Alex H. De Vries. The MARTINI force field : Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(27) :7812–7824, 2007.
- [102] Alison N. Leonard, Eric Wang, Viviana Monje-Galvan, and Jeffery B. Klauda. Developing and Testing of Lipid Force Fields with Applications to Modeling Cellular Membranes. *Chemical Reviews*, 119(9) :6227–6269, 2019.
- [103] Sunhwan Jo, Taehoon Kim, and Wonpil Im. Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*, 2(9), 2007.
- [104] Mohammad Mehdi Ghahremanpour, Seyed Shahriar Arab, Saman Biok Aghazadeh, Jin Zhang, and David Van Der Spoel. Structural bioinformatics MemBuilder : a web-based graphical interface to build heterogeneously mixed membrane bilayers for the GROMACS biomolecular simulation program. 30(3) :439–441, 2014.
- [105] Tsjerk A. Wassenaar, Helgi I. Ingólfsson, Rainer A. Böckmann, D. Peter Tieleman, and Siewert J. Marrink. Computational lipidomics with insane : A versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(5) :2144–2155, 2015.
- [106] Mangesh Damre, Alessandro Marchetto, and Alejandro Giorgetti. MERMAID : dedicated web server to prepare and run coarse-grained membrane protein dynamics. *Nucleic Acids Research*, 47(W1) :W456–W461, 2019.
- [107] Romelia Salomon-Ferrer, David A. Case, and Ross C. Walker. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, 3(2) :198–210, 2013.
- [108] B.R. Brooks, C.L Brooks, A. D Mackerell, L Nilsson, R. J Petrella, B Roux, Y Won, G Archontis, C Bartels, S Boresch, A Caffisch, L Caves, Q Cui, A. R Dinner, M Feig, S Fischer, J Gao, M Hodoscek, W Im, K Kuczera, T Lazaridis, J Ma, V Ovchinnikov, E Paci, R. W Pastor, C. B Post, J. Z Pu, M Schaefer, B Tidor, R. M Venable, H. L Woodcock, X Wu, W Yang, York D.M, and M Karplus. CHARMM : Molecular dynamics simulation package. *Journal of computational chemistry*, 30(10) :1545–1614, 2009.
- [109] James C Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D Skeel, Laxmikant Kalé, and Klaus Schulten. Scalable molecular dynamics with \uppercase{NAMD}. *J. Comput. Chem.*, 26(16) :1781–1802, 2005.

- [110] Peter Eastman, Jason Swails, John D. Chodera, Robert T. McGibbon, Yutong Zhao, Kyle A. Beauchamp, Lee Ping Wang, Andrew C. Simmonett, Matthew P. Harrigan, Chaya D. Stern, Rafal P. Wiewiora, Bernard R. Brooks, and Vijay S. Pande. OpenMM 7 : Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS Computational Biology*, 13(7) :1–17, 2017.
- [111] H. J.C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen. GROMACS : A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1-3) :43–56, 1995.
- [112] Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, and Erik Lindah. Gromacs : High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2 :19–25, 2015.
- [113] Carsten Kutzner, Szilárd Páll, Martin Fechner, Ansgar Esztermann, Bert L. de Groot, and Helmut Grubmüller. More bang for your buck : Improved use of gpu nodes for gromacs 2018. *Journal of Computational Chemistry*, 40(27) :2418–2431, 2019.
- [114] Louic S. Vermeer, Bert L. De Groot, Valérie Réat, Alain Milon, and Jerzy Czaplicki. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers : Computation from molecular dynamics simulations and comparison with <sup>2</sup>H NMR experiments. *European Biophysics Journal*, 36(8) :919–931, 2007.
- [115] Minchul Kang, Charles A. Day, Anne K. Kenworthy, and Emmanuele DiBenedetto. Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data. *Traffic*, 13(12) :1589–1600, 2012.
- [116] Marc Baaden. Visualizing Biological Membrane Organization and Dynamics. *Journal of Molecular Biology*, 431(10) :1889–1919, 2019.
- [117] J.P. J. Michels A. J. Kox and F. W. Wiegel. Simulation of a lipid monolayer using molecular dynamics. *Nature*, 287(5780) :317–319, 1980.
- [118] Richard M Venable, Yuhong Zhang, Barry J Hardy, and Richard W Pastor. Molecular Dynamics Simulations of a Lipid Bilayer and of Hexadecane : An Investigation of Membrane Fluidity Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2882332>. 262(5131) :223–226, 1993.
- [119] Thomas B. Woolf and Benoît Roux. Structure, energetics, and dynamics of lipid-protein interactions : A molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer. *Proteins : Structure, Function and Genetics*, 24(1) :92–114, 1996.

- [120] John C. Shelley, Mee Y. Shelley, Robert C. Reeder, Sanjoy Bandyopadhyay, Preston B. Moore, and Michael L. Klein. Simulations of phospholipids using a coarse grain model. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(40) :9785–9792, 2001.
- [121] Volker Knecht and Siewert Jan Marrink. Molecular dynamics simulations of lipid vesicle fusion in atomic detail. *Biophysical Journal*, 92(12) :4254–4261, 2007.
- [122] D. Peter Tieleman. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochemistry*, 5 :1–12, 2004.
- [123] Elvira Tarasova and Dmitry Nerukh. All-Atom Molecular Dynamics Simulations of Whole Viruses. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(19) :5805–5809, 2018.
- [124] Helgi I. Ingólfsson, Manuel N. Melo, Floris J. Van Eerden, Clément Arnarez, Cesar A. Lopez, Tsjerk A. Wassenaar, Xavier Periole, Alex H. De Vries, D. Peter Tieleman, and Siewert J. Marrink. Lipid organization of the plasma membrane. *Journal of the American Chemical Society*, 136(41) :14554–14559, 2014.
- [125] Helgi I. Ingólfsson, Timothy S. Carpenter, Harsh Bhatia, Peer Timo Bremer, Siewert J. Marrink, and Felice C. Lightstone. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophysical Journal*, 113(10) :2271–2280, 2017.
- [126] Reid C. Van Lehn and Alfredo Alexander-Katz. Membrane-embedded nanoparticles induce lipid rearrangements similar to those exhibited by biological membrane proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(44) :12586–12598, 2014.
- [127] Haosheng Cui, Gary S. Ayton, and Gregory A. Voth. Membrane binding by the endophilin N-BAR domain. *Biophysical Journal*, 97(10) :2746–2753, 2009.
- [128] Anthony R Braun, Michael M Lacy, Vanessa C Ducas, Elizabeth Rhoades, and Jonathan N Sachs.  $\alpha$ -Synuclein-Induced Membrane Remodeling Is Driven by Binding. *Journal of the American Chemical Society*, 136(28) :9962–9972, 2014.
- [129] V A Harmandaris and Markus Deserno. A novel method for measuring the bending rigidity of model lipid membranes by simulating tethers. (December 2006), 2017.
- [130] Zachary A. Levine, Richard M. Venable, Max C. Watson, Michael G. Lerner, Joan Emma Shea, Richard W. Pastor, and Frank L.H. Brown. Determination of biomembrane bending moduli in fully atomistic simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 136(39) :13582–13585, 2014.
- [131] Qaiser Waheed and Olle Edholm. Undulation Contributions to the Area Compressibility in Lipid Bilayer Simulations. *Biophysj*, 97(10) :2754–2760, 2009.

- [132] Romain Gautier, Amélie Bacle, Marion L. Tiberti, Patrick F. Fuchs, Stefano Vanni, and Bruno Antony. PackMem : A Versatile Tool to Compute and Visualize Interfacial Packing Defects in Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 1 :436–444, 2018.
- [133] Olle Edholm and Juan J Perez. Effect of Ions on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayer . A Molecular Dynamics Simulation Study. pages 1397–1408, 2008.
- [134] Scott E Feller and Alexander D Mackerell. An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. pages 7510–7515, 2000.
- [135] B Klauda, Viviana Monje, Taehoon Kim, and Wonpil Im. Improving the CHARMM Force Field for Polyunsaturated Fatty Acid Chains. 2012.
- [136] Leonor Saiz and Michael L Klein. Structural Properties of a Highly Polyunsaturated Lipid Bilayer from Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*, 81(1) :204–216, 2001.
- [137] Jirasak Wong-ekkabut, Zhitao Xu, Wannapong Triampo, I-ming Tang, and D Peter Tieleman. Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers : A Molecular Dynamics Study. 93(December), 2007.
- [138] Xiaoling Leng, Jacob J Kinnun, Drew Marquardt, Mikel Gheffi, Norbert Ku, John Katsaras, Jeffrey Atkinson, Thad A Harroun, Scott E Feller, and Stephen R Wassall. Article a -Tocopherol Is Well Designed to Protect Polyunsaturated Phospholipids : MD Simulations. 109(October) :1608–1618, 2015.
- [139] K. Boesze-Battaglia, T. Hennessey, and A. D. Albert. Cholesterol heterogeneity in bovine red outer segment disk membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14) :8151–8155, 1989.
- [140] Michael C. Pitman, Frank Suits, Alexander D. MacKerell, and Scott E. Feller. Molecular-level organization of saturated and polyunsaturated fatty acids in a phosphatidylcholine bilayer containing cholesterol. *Biochemistry*, 2004.
- [141] Samuli Ollila and Marja T Hyvo. Polyunsaturation in Lipid Membranes : Dynamic Properties and Lateral Pressure Profiles. pages 3139–3150, 2007.
- [142] Alan Grassfield, Scott E. Feller, and Michael C. Pitman. A role for interactions in the modulation of rhodopsin by  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13) :4888–4893, 2006.
- [143] Michael C Pitman, Alan Grossfield, Frank Suits, and Scott E Feller. Role of Cholesterol and Polyunsaturated Chains in Lipid - Protein Interactions : Molecular Dynamics Simulation of Rhodopsin in a Realistic Membrane Environment. pages 4576–4577, 2005.

- [144] H Jelger Risselada and Siewert J Marrink. Coarse-grained modeling of soft condensed matter polymers phases Determination of pair-wise inter-residue interaction forces from folding pathways and their implementation in coarse-grained foldi. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009.
- [145] Svetlana Baoukina, Siewert J. Marrink, and D. Peter Tieleman. Molecular structure of membrane tethers. *Biophysical Journal*, 102(8) :1866–1871, 2012.
- [146] Svetlana Baoukina, Helgi I. Ingólfsson, Siewert J. Marrink, and D. Peter Tieleman. Curvature-Induced Sorting of Lipids in Plasma Membrane Tethers. *Advanced Theory and Simulations*, 1(8) :1800034, 2018.
- [147] Pedersen Darden, York. Particle mesh Ewald : An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98, 1993.
- [148] Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, and Erik Lindah. Gromacs : High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2 :19–25, 2015.
- [149] L Jorgensen William, Chandrasekhar Jayaraman, D Madura Jeffry, W Impey Roger, and L Klein Michael. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2) :926–935, 1983.
- [150] H. J.C. Berendsen, J. P.M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8) :3684–3690, 1984.
- [151] Giovanni Bussi, Davide Donadio, and Michele Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, 126(1), 2007.
- [152] M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12) :7182–7190, 1981.
- [153] Jumin Lee, Xi Cheng, Jason M. Swails, Min Sun Yeom, Peter K. Eastman, Justin A. Lemkul, Shuai Wei, Joshua Buckner, Jong Cheol Jeong, Yifei Qi, Sunhwan Jo, Vijay S. Pande, David A. Case, Charles L. Brooks, Alexander D. MacKerell, Jeffery B. Klauda, and Wonpil Im. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1) :405–413, 2016.
- [154] Marco M. Manni, Marion L. Tiberti, Sophie Pagnotta, Hélène Barelli, Romain Gautier, and Bruno Antony. Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *eLife*, 7 :1–23, 2018.

- [155] Xavier Periole and Siewert-Jan Marrink. Chapter 20 the martini coarse-grained force field. 2012.
- [156] Yifei Qi, Helgi I. Ingólfsson, Xi Cheng, Jumin Lee, Siewert J. Marrink, and Wonpil Im. CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(9) :4486–4494, 2015.
- [157] Berk Hess, C Kutzner, David van der Spoel, and Erik Lindahl. Gromacs 4 : algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*, 4 :435–447, 03 2008.
- [158] Maria K. Pospieszalska, Irena Lasiecka, and Klaus Ley. Cell protrusions and tethers : A unified approach. *Biophysical Journal*, 100(7) :1697–1707, 2011.
- [159] Milka Doktorova, Frederick A. Heberle, Barbara Eicher, Robert F. Standaert, John Katsaras, Erwin London, Georg Pabst, and Drew Marquardt. Preparation of asymmetric phospholipid vesicles for use as cell membrane models. *Nature Protocols*, 13(9) :2086–2101, 2018.
- [160] Zhen Huang and Erwin London. Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. *Langmuir*, 29(47) :14631–14638, 2013.
- [161] W.J. Bligh, E.G. and Dyer. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 1959.
- [162] H. Yabuuchi and J. S. O'Brien. Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *Journal of Lipid Research*, 9(1) :65–67, 1968.
- [163] N H Tattie. and Unsaturated Fatty Acids on Egg Lecithin \*. 1969.
- [164] Y. Lange and B. V. Ramos. Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *Journal of Biological Chemistry*, 258(24) :15130–15134, 1983.
- [165] W C Breckenrldge, G Gombos, and I G Morgan. the Lipid Composition of Adult Rat Brain Synaptosomal Plasma Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 266 :695–707, 1972.
- [166] Shigeki Watanabe, Benjamin R. Rost, Marcial Camacho-Pérez, M. Wayne Davis, Berit Söhl-Kielczynski, Christian Rosenmund, and Erik M. Jorgensen. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504(7479) :242–247, 2013.
- [167] Jean-Marie Epand, Richard M. ; Ruyschaert. *The biophysics of cell membranes : biological consequences*. Springer series in biophysics 19. Springer, 2017.

- [168] Katharine B. Blodgett. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers. *621(6)*, 1935.
- [169] Rikiya Watanabe, Naoki Soga, Tomoko Yamanaka, and Hiroyuki Noji. High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition. pages 1–6, 2014.
- [170] Paul Heo, Sathish Ramakrishnan, Jeff Coleman, James E. Rothman, Jean-Baptiste Fleury, and Frederic Pincet. Highly reproducible physiological asymmetric membrane with freely diffusing embedded proteins in a 3d-printed microfluidic setup. *Small*, 15(21) :1900725, 2019.
- [171] Peichi C Hu, Su Li, and Noah Malmstadt. Microfluidic Fabrication of Asymmetric Giant Lipid Vesicles. pages 1434–1440, 2011.
- [172] Michael J Hope, Tom E Redelmeier, Kim F Wong, Wendi Rodriguez, and Pieter R Cullist. Phospholipid Asymmetry in Large Unilamellar Vesicles Induced by Transmembrane pH Gradients. (1980) :4181–4187, 1989.
- [173] Salvatore Chiantia, Petra Schwille, Andrey S Klymchenko, and Erwin London. Asymmetric GUVs Prepared by M b CD-Mediated Lipid Exchange : An FCS Study. *Biophysj*, 100(1) :L1–L3, 2011.
- [174] Marie Markones, Carina Drechsler, Michael Kaiser, Louma Kalie, Heiko Heerklotz, and Sebastian Fiedler. Engineering Asymmetric Lipid Vesicles : Accurate and Convenient Control of the Outer Leaflet Lipid Composition. 2018.
- [175] Karolina Tulodziecka, Barbara B. Diaz-Rohrer, Madeline M. Farley, Robin B. Chan, Gilbert Di Paolo, Kandice R. Levental, M. Neal Waxham, and Ilya Levental. Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development. *Molecular Biology of the Cell*, 27(22) :3480–3489, 2016.
- [176] Henna Ohvo-Rekilä, Bodil Ramstedt, Petra Leppimäki, and J. Peter Slotte. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1) :66–97, 2002.
- [177] R. J. Bruckner, S. S. Mansy, A. Ricardo, L. Mahadevan, and J. W. Szostak. Flip-flop-induced relaxation of bending energy : Implications for membrane remodeling. *Biophysical Journal*, 97(12) :3113–3122, 2009.
- [178] Shigeki Watanabe, Qiang Liu, M Wayne Davis, Gunther Hollopeter, Nikita Thomas, Nels B Jorgensen, and Erik M Jorgensen. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *eLife*, 2 :1–24, 2013.

- [179] Nikhil Walani, Jennifer Torres, and Ashutosh Agrawal. Endocytic proteins drive vesicle growth via instability in high membrane tension environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(12) :E1423–E1432, 2015.
- [180] Ludger Johannes, Robert G. Parton, Patricia Bassereau, and Satyajit Mayor. Building endocytic pits without clathrin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5) :311–321, 2015.
- [181] Mijo Simunovic, Jean Baptiste Manneville, Henri François Renard, Emma Evergren, Krishnan Raghunathan, Dhiraj Bhatia, Anne K. Kenworthy, Gregory A. Voth, Jacques Prost, Harvey T. McMahon, Ludger Johannes, Patricia Bassereau, and Andrew Callan-Jones. Friction Mediates Scission of Tubular Membranes Scaffolded by BAR Proteins. *Cell*, 170(1) :172–184.e11, 2017.
- [182] Lei Qu, Yulia Akbergenova, Yunming Hu, and Thomas Schikorski. Synapse-to-synapse variation in mean synaptic vesicle size and its relationship with synaptic morphology and function. *Journal of Comparative Neurology*, 514(4) :343–352, 2009.