HAL
open science

Etude de l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes et de leur impact sur la reconnaissance moléculaire, par simulation de dynamique moléculaire

Solène Lecot

▶ **To cite this version:**

Solène Lecot. Etude de l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes et de leur impact sur la reconnaissance moléculaire, par simulation de dynamique moléculaire. Autre. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEC041 . tel-03637027

HAL Id: tel-03637027

https://theses.hal.science/tel-03637027v1

Submitted on 11 Apr 2022

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.

N° d'ordre NNT : 2021LYSEC41

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de l'Ecole Centrale de Lyon

Ecole Doctorale 34
Ecole Doctorale Matériaux

Spécialité de doctorat : Chimie des matériaux

Soutenue publiquement le 8 Novembre 2021, par :

Solène LECOT

Étude de l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes et de leur impact sur la reconnaissance moléculaire, par simulations de dynamique moléculaire.

Devant le jury composé de :

Florent Barbault, MCF	ITODYS, Université de Paris	Rapporteur
Sophie Sacquin-Mora, CR	LBT, Université de Paris	Rapportrice
Karine Masenelli-Varlot, PU	MATEIS, INSA de Lyon	Présidente du jury
Elisabeth Charlaix, PU	LiPhy, Université Grenoble-Alpes	Examinatrice
Félix Rico, MCF	INSERM, LAI, Aix-Marseille Université	Invité
Tyler Reddy, Chercheur	Los Alamos National Laboratory	Invité
Magali Phaner-Goutorbe, PU	INL, Ecole Centrale de Lyon	Directrice de thèse
Christelle Yeromonahos, MCF	INL, Ecole Centrale de Lyon	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier Magali Phaner-Goutorbe, professeur à l'Ecole Centrale de Lyon et Christelle Yeromonahos, maître de conférences à l'Ecole Centrale de Lyon, pour votre encadrement tout au long de ces trois années de thèse. Un grand merci pour votre aide, vos encouragements et vos conseils.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Sophie Sacquin-Mora, chargée de recherche au Laboratoire de Biochimie Théorique et Florent Barbault, maître de conférences à l'université Paris Diderot, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie Elisabeth Charlaix, professeur à l'université Grenoble-Alpes et Karine Masenelli-Varlot, professeur à l'INSA de Lyon, d'avoir accepté d'être examinatrices de cette thèse. Merci également à Félix Rico, maître de conférences à l'université d'Aix-Marseille et dont les recherches ont inspiré une partie de ce travail ainsi qu'à Tyler Reddy, chercheur au Los Alamos National Laboratory, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie Stéphane Benayoun, directeur de l'Ecole Doctorale Matériaux, pour l'attribution de ma bourse de thèse. Je remercie également Bruno Masenelli, directeur de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon de m'avoir accueillie au laboratoire pour cette thèse. Merci au personnel administratif du laboratoire et notamment à Sylvie.

Je remercie Laurent Pouilloux et Anne Cadiou pour leur aide concernant l'utilisation du calculateur Newton de l'Ecole Centrale de Lyon et pour les formations. Merci également aux équipes du Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur (CINES) pour l'allocation de 5 500 000 heures de calcul sur le supercalculateur Occigen, qui nous a permis de réaliser d'importantes simulations.

Je remercie Yann Chevolot, directeur de l'équipe Dispositifs pour la Santé et l'Environnement, pour son aide tout au long de ma thèse. Merci également à tous les membres de l'équipe pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Merci à Isabel et à Virginie pour leur soutien en TP, merci à Thomas pour son aide au laboratoire et merci à Jean-Pierre pour les nombreux cours très intéressants auxquels j'ai assisté pendant mon cursus d'ingénieur. Merci à tous les doctorants et stagiaires pour les bons moments passés ensemble. Merci à Antonin pour son aide sur la partie expérimentale de ce travail, ainsi qu'à Ana-Maria, Zihua, Paule, Oleh, Georgii, Charles, Harris, Olha et bien sûr Rachael.

D'un point de vue plus personnel enfin, je remercie Marie-Ingrid de m'avoir accueillie il y a quelques années pour un stage passionnant qui m'a donné l'envie de faire une thèse. Je remercie mes amis et ma famille pour les bons moments partagés et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci à mes amis, en particulier à Myriam, Bérenger, Jiahua, Rémi et Irène. Un grand merci également à ma famille et à la famille de Benoît, notamment à ma petite

sœur Auriane, ainsi qu'à Martin, Elise, Franck, Pauline et David. Bisous à Iris et Sibylle. Je remercie Catherine et Didier pour votre accueil lors des confinements et périodes de télétravail. Un immense merci à mes parents pour votre soutien et vos encouragements tout au long de mes études. Merci Benoît, merci pour tout.

Table des matières

Remerciements **iii**

Liste des abréviations **ix**

Introduction **1**

I Synthèse bibliographique **5**

1 Principe des simulations de dynamique moléculaire et intérêt pour l'étude des interactions protéine - ligand **7**
1.1 Introduction 7
1.2 Étude expérimentale des interactions protéine - ligand 8
1.2.1 Protéines et acides aminés 8
1.2.2 Interactions protéine - ligand : définition des constantes thermodynamiques d'association et de dissociation 10
1.2.3 Caractérisation expérimentale des interactions protéine - ligand : l'AFM en mode SMFS 12
1.3 Principe des simulations de dynamique moléculaire 16
1.3.1 Introduction 16
1.3.2 Définition du modèle moléculaire 17
1.3.3 Équations à résoudre 17
1.3.4 Champ de force 18
1.3.5 Interactions à longue distance 21
1.3.6 Conditions périodiques aux frontières 21
1.3.7 Résolution des équations du mouvement 22
1.3.8 Les limites de la dynamique moléculaire 24
1.4 Étude des interactions protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire 24
1.4.1 Modélisation du détachement en simulations de dynamique moléculaire dirigées (SMD) 24
1.4.2 Calcul de l'énergie libre de liaison récepteur - ligand 25
1.5 Conclusion 30

2 Interactions protéine - surface en simulations de dynamique moléculaire et présentation des complexes étudiés **31**
2.1 Introduction 31
2.2 Caractérisation des monocouches de silanes 32

2.2.1 Caractérisation expérimentale 32
2.2.2 Modélisation des monocouches de silanes en simulations de dynamique moléculaire 35
2.3 Modélisation des interactions protéine - surface et protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire 39
2.3.1 Adsorption de biomolécules sur différents types de surfaces 39
2.3.2 Impact de l'immobilisation sur une surface sur les interactions protéine - ligand 40
2.4 Modélisation de l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface solide - liquide 42
2.4.1 Introduction 42
2.4.2 Étude des propriétés de l'eau *bulk* et des ions en simulations de dynamique moléculaire 43
2.4.3 Structure de l'eau et organisation des ions à proximité d'une interface . . 44
2.4.4 Impact de la structure de l'eau et des ions sur l'adsorption de biomolécules sur une surface 46
2.4.5 Conclusion 47
2.5 Le complexe streptavidine - biotine 47
2.5.1 Présentation du complexe 48
2.5.2 Étude des interactions streptavidine - biotine 48
2.5.3 Immobilisation de la streptavidine et impact sur ses interactions avec la biotine 51
2.5.4 Conclusion 53
2.6 Étude des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur de la protéine spike 53
2.6.1 Le rôle de la protéine spike et du récepteur cellulaire dans le processus d'infection par le SARS-CoV-2 53
2.6.2 Analyse des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike 58
2.6.3 Conclusion 62
2.7 Conclusion 64

II Méthodes 67

3 Modélisation des monocouches de silanes, protocoles de simulation et paramètres d'analyse 69
3.1 Introduction 69
3.2 Modélisation de la fonctionnalisation d'une surface de SiO_2 avec différentes monocouches de silanes 70
3.2.1 Présentation des quatre molécules de silane étudiées 70
3.2.2 Description de la structure des molécules de silane et du champ de force . 71
3.2.3 Présentation des monocouches de silanes obtenues 72
3.2.4 Les avantages et limites de la méthode 72
3.3 Préparation des systèmes initiaux et protocole de simulation 74
3.3.1 Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles : modélisation de l'arrangement des monocouches de silanes et de l'adsorption des protéines 74
3.3.2 Simulations SMD : modélisation du détachement dans les complexes protéine - ligand ou protéine - protéine 77
3.3.3 Les limites de notre méthode 78
3.4 Présentation des paramètres d'analyse des simulations 79
3.4.1 Structure et organisation des monocouches de silanes 79

3.4.2 Caractérisation des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- 82
3.4.3 Caractérisation des changements de conformation des protéines 84
3.4.4 Caractériation des interactions protéine-surface et protéine-ligand 85
3.5 Conclusion 86

III Résultats 87

4 Propriétés des monocouches de silanes et organisation de la couche d'eau à l'interface 89
4.1 Introduction 89
4.2 Méthode 91
4.2.1 Simulations de dynamique moléculaire 91
4.2.2 Matériels et méthodes pour l'étude expérimentale 92
4.3 Résultats et discussion : structure et organisation des monocouches de silanes . . 93
4.3.1 Résultats des simulations de dynamique moléculaire 95
4.3.2 Validation expérimentale de la morphologie des monocouches de silanes modélisées 103
4.3.3 Conclusion 109
4.4 Résultats et discussion : organisation et diffusion des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- à l'interface avec les monocouches de silanes 110
4.4.1 Distribution, structure d'hydratation et diffusion des ions Na^+ et Cl^- . . 110
4.4.2 Organisation et propriétés dynamiques des molécules d'eau 121
4.4.3 Conclusion 127
4.5 Conclusion 128

5 Adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes et impact sur ses interactions avec la biotine 131
5.1 Introduction 131
5.2 Étude de l'adsorption de la streptavidine dimérique sur cinq monocouches de silanes 133
5.2.1 Méthode 133
5.2.2 Résultats et discussion 136
5.3 Étude de l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur deux monocouches de silanes 152
5.3.1 Méthode 152
5.3.2 Résultats et discussion 156
5.4 Conclusion 182

6 Adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur des monocouches de silanes et effet sur ses interactions avec la protéine spike 185
6.1 Introduction 185
6.2 Méthode 187
6.2.1 Présentation du modèle 187
6.2.2 Protocole de simulation 188
6.2.3 Paramètres d'analyse 191
6.3 Résultats et discussion 192
6.3.1 Adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes, avec quatre orientations initiales 192
6.3.2 Effet de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur la structure du complexe formé avec le S-RBD 199
6.3.3 Effet de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les interactions qui s'établissent avec le S-RBD 204

6.4 Conclusion 213

Conclusion **217**

A Paramètres du champ de force **221**
A.1 Champ de force des molécules de silane CH_3 long, CH_3 court, NH_3^+ et COO^- . . 221
A.1.1 Distribution des charges 221
A.1.2 Paramètres associés aux interactions non liantes 226
A.1.3 Paramètres associés aux interactions liantes 226
A.2 Champ de force de la couche de SiO_2 amorphe 228
A.3 Champ de force du mur de Lennard-Jones 228

Bibliographie **229**

Autorisation de soutenance **242**

Résumé **244**

Abstract **244**

Liste des abréviations

ACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (*Angiotensin Converting Enzyme 2*)
AFM	Microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)
CH_3 court	Désigne la molécule de silane *n*-butyldimethylmethoxysilane ou une monocouche de silanes uniforme constituée de cette molécule.
CH_3 long	Désigne la molécule de silane octadecyldimethylmethoxysilane ou une monocouche de silanes uniforme constituée de cette molécule.
COO^-	Désigne la molécule de silane dimethylamino(dimethyl)silylundecanoate ou une monocouche de silanes uniforme constituée de cette molécule.
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform InfraRed spectroscopy*)
Mix court	Désigne une monocouche de silanes mixant les molécules CH_3 court et NH_3^+.
Mix long	Désigne une monocouche de silanes mixant les molécules CH_3 long et NH_3^+.
MM-GBSA	*Molecular Mechanics - Generalized Boltzmann Surface Area*
MM-PBSA	*Molecular Mechanics - Poisson-Boltzmann Surface Area*
NH_3^+	Désigne la molécule de silane 3-aminopropyldimethylethoxysilane (APDMES) ou une monocouche de silanes uniforme constituée de cette molécule.
NPT	Ensemble isotherme - isobare (nombre de particules, pression et température constants)
NVT	Ensemble canonique (nombre de particules, volume et température constants)
OPLS	Champ de force *Optimized Potentials for Liquid Simulations*
PMF	Potentiel de force moyenne (*Potential of Mean Force*)
RBD	Domaine de liaison au récepteur (*Receptor-Binding Domain*)
RMSD	Déviation par la méthode des moindres carrés (*Root-Mean-Square Deviation*)
RMSF	Fluctuation par la méthode des moindres carrés (*Root-Mean-Square Fluctuation*)
SAM	Monocouche auto-assemblée (*Self-Assembled Monolayer*)
SiO_2	Silice ou dioxyde de silicium
SMD	Dynamique moléculaire dirigée (*Steered Molecular Dynamics*)
SMFS	Spectroscopie de force à molécule unique (*Single-Molecule Force Spectroscopy*)
WHAM	Méthode d'analyse de l'histogramme pondéré (*Weighted Histogram Analysis Method*)
XPS	Spectrométrie de photoélectrons X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*)

Introduction

Un biocapteur est un dispositif permettant de capturer spécifiquement un biomarqueur puis de détecter cette capture, pour la réalisation d'un diagnostic par exemple. Le biocapteur doit être spécifique, autrement dit capturer uniquement l'analyte d'intérêt. Cette capture spécifique peut être réalisée par reconnaissance moléculaire, c'est-à-dire par interaction sélective entre l'analyte et une protéine adaptée, immobilisée sur une surface. Par exemple, le test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) permet de détecter et de quantifier la présence d'anticorps ou d'antigènes grâce à une interaction antigène - anticorps spécifique. En fonction du type de test ELISA, un antigène ou un anticorps est immobilisé sur une surface de polystyrène [1]. Afin de préserver la capacité des protéines immobilisées à interagir avec l'analyte d'intérêt par reconnaissance moléculaire, il nécessaire de pouvoir contrôler leur orientation sur la surface et de limiter les changements de conformation induits par leur immobilisation.

L'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) s'intéresse depuis plusieurs années à l'utilisation de monocouches auto-assemblées de molécules de silane pour l'immobilisation de protéines et de brins d'ADN sur des surfaces, dans le but de réaliser des biocapteurs et des puces à ADN. Les monocouches de silanes sont utilisées pour fonctionnaliser des surfaces d'oxyde et notamment de SiO_2. Elles permettent de modifier leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur hydrophobicité et leur charge de surface, en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle et la charge du groupement terminal des molécules de silane. Les surfaces fonctionnalisées par des monocouches de silanes présentent également l'avantage d'être disponibles commercialement. L'équipe a choisi de s'intéresser à la fonctionnalisation de surfaces par des molécules de silane monofonctionnelles, que l'on distingue des molécules trifonctionnelles par la présence d'un seul groupement hydrolysable. Celles-ci permettent en effet de former des monocouches plus reproductibles, car le mécanisme de greffage est plus simple et les molécules qui ne sont pas liées de façon covalente à la surface peuvent être facilement retirées.

En 2004, les travaux de Dugas *et al.* (INL) se sont intéressés à l'immobilisation par liaison covalente de brins d'ADN sur des mononocouches de silanes, pour la réalisation de puces à ADN [2]. Dans cette étude, les monocouches de silanes étaient préparées grâce à une méthode de fonctionnalisation en phase liquide, appelée protocole d'imprégnation. L'équipe a ensuite mis au point une méthode de fonctionnalisation en phase gazeuse, plus adaptée pour un procédé industriel puisqu'elle permet la préparation d'échantillons plus grands et plus nombreux, et ne requiert pas l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique. Les morphologies des monocouches de silanes préparées avec les deux protocoles ont été comparées, et il a été démontré que les monocouches préparées par silanisation en phase liquide présentent une rugosité moins élevée [3].

En 2013, les travaux d'Yang *et al.* (INL) se sont intéressés à l'immobilisation de protéines par liaison covalente et par adsorption sur différents types de monocouches de silanes pour la réalisation de biocapteurs. Une première étude s'intéresse au diagnostic du cancer du sein grâce à l'immobilisation d'antigènes sur différentes monocouches de silanes afin de détecter la présence d'auto-anticorps chez le patient [4]. Une seconde étude traite du diagnostic du cancer colorectal grâce à l'adsorption d'anticorps sur différentes monocouches de silanes pour la détection de marqueurs tumoraux (voir figure 1) [5]. Ces travaux ont démontré expérimentalement, en imagerie par fluorescence, que la nature de la monocouche de silanes influence à la fois l'efficacité de l'immobilisation de la protéine et son activité biologique. De plus, les résultats suggèrent que l'immobilisation de protéines par adsorption, et non par liaison covalente, peut permettre de bien conserver leur activité biologique. L'imagerie par fluorescence permet d'estimer le taux d'attachement d'une protéine sur une surface et l'efficacité de la reconnaissance moléculaire avec un autre anticorps ou antigène. Cependant, cette technique n'apporte pas d'informations sur les déformations induites par l'adsorption de la protéine immobilisée sur une monocouche de silanes.

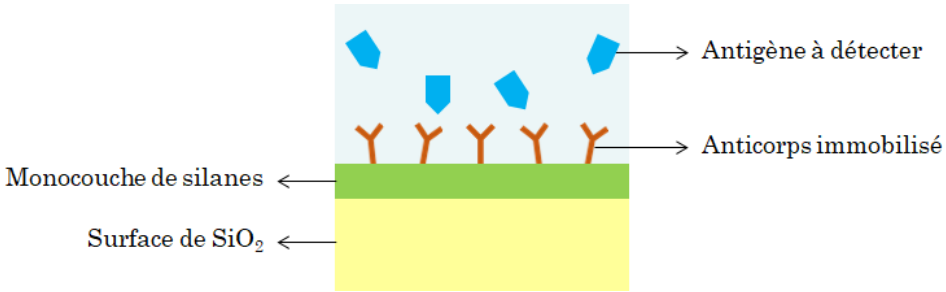


FIGURE 1 – *Schéma présentant un exemple de biocapteur étudié au sein de l'équipe Chimie et nanobiotechnologies de l'INL : une protéine (par exemple un anticorps) est immobilisée par adsorption ou par liaison covalente sur une surface de SiO_2 fonctionnalisée par une monocouche de silanes. Le biomarqueur à détecter (par exemple un antigène) est capturé par la protéine immobilisée, grâce au phénomène de reconnaissance moléculaire.*

Une autre technique est utilisée dans l'équipe afin de caractériser le phénomène de reconnaissance moléculaire : il s'agit de la microscopie à force atomique, ou *Atomic Force Microscopy* (AFM). En 2019, Zuttion *et al.* (INL) ont étudié différents complexes constitués de la lectine LecA et de glycoclusters de synthèse. Des images topographiques ont permis d'observer la structure des différents complexes à l'échelle nanométrique [6]. De plus, le phénomène de reconnaissance moléculaire entre la lectine LecA et un glycocluster a été analysé par AFM en mode spectroscopie de force à molécule unique, ou *Single Molecule Force Spectroscopy* (SMFS). Pour cela, la lectine LecA a été greffée sur la pointe de l'AFM et le glycocluster sur une surface de silice. Les courbes de force correspondant à l'interaction spécifique entre la lectine et le glycocluster ont mis en évidence la présence de plusieurs évènements lors de la séparation, pouvant être reliés aux détachements successifs de deux monomères de la lectine interagissant avec deux sites du même glycocluster [7]. Cette technique présente cependant des limites telles que l'établissement de nombreuses interactions non spécifiques entre la pointe et la surface. De plus, il n'est pas possible d'identifier précisément la nature des acides aminés qui interagissent ni l'ordre dans lequel les interactions se rompent lors du détachement.

De nombreuses autres méthodes peuvent aider à la caractérisation des changements de conformation associés à l'immobilisation d'une protéine sur une surface et de leur impact sur interactions protéine - ligand. Par exemple, le ToF-SIMS peut apporter des informations concernant la

conformation et l'orientation d'une protéine immobilisée sur une surface [8]. Cependant, leurs limites rendent nécessaire l'utilisation d'un faisceau de techniques afin de caractériser le plus finement possible les changements de conformation associés à l'immobilisation d'une protéine et leur impact sur le phénomène de reconnaissance moléculaire.

Nous nous intéressons dans ce travail, qui constitue la première étude de modélisation réalisée au sein de notre équipe, à l'apport des simulations de dynamique moléculaire pour compléter et améliorer la compréhension des résultats expérimentaux. La dynamique moléculaire permet en effet de modéliser l'adsorption d'une protéine sur une surface et de caractériser les changements de conformation de la protéine et les interactions protéine - ligand à l'échelle atomique. De plus, les simulations de dynamique moléculaire dirigées, ou *Steered Molecular Dynamics* (SMD), apportent des informations complémentaires sur les interactions protéine - ligand en modélisant à l'échelle atomique leur détachement comme dans une expérience d'AFM en mode SMFS. L'objectif de notre étude est de caractériser, en simulations de dynamique moléculaire, les changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine sur différents types de monocouches de silanes et leur impact sur la reconnaissance moléculaire, afin de comprendre pourquoi un type de monocouche serait plus adapté pour immobiliser une protéine donnée.

Nous proposons tout d'abord une méthode permettant de modéliser six types de monocouches de silanes monofonctionnels, dont quatre monocouches uniformes constituées de molécules qui diffèrent par la longueur de leur chaîne alkyle (de 3 à 18 atomes de carbone) et par la charge de leur groupement terminal (non chargé, chargé positivement ou chargé négativement), et deux monocouches mixant deux types de molécules de silane. Nous caractérisons la structure des monocouches obtenues à différentes densités et nous vérifions sa validité par comparaison avec des résultats expérimentaux obtenus dans l'équipe. De plus, les simulations de dynamique moléculaire sont réalisées en milieu aqueux et en présence d'ions Na^+ et Cl^- afin de reproduire les conditions physiologiques. Nous caractérisons donc également la structure de la couche d'hydratation des molécules de silane, qui joue un rôle important dans l'adsorption des protéines.

Nous explorons ensuite l'impact sur la reconnaissance moléculaire des changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine sur différentes monocouches de silanes, en nous intéressant au complexe streptavidine - biotine. Ce complexe constitue pour nous un système modèle puisqu'il a été largement étudié en solution, à la fois expérimentalement et en simulations. Cependant, à notre connaissance, l'adsorption de la streptavidine sur des monocouches de silanes et ses effets sur les interactions établies avec la biotine n'ont encore jamais été étudiés en simulations de dynamique moléculaire. L'étude de ce système nous permet de valider la méthodologie que nous avons développée, mais également d'observer les effets de l'adsorption de la streptavidine sur différents types de monocouches de silanes, sur les interactions streptavidine - biotine.

Nous nous intéressons enfin à une application de notre méthode en étudiant l'adsorption de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) sur différentes monocouches de silanes et l'impact sur ses interactions avec le domaine de liaison au récepteur, ou *Receptor Binding Domain* (RBD) de la protéine spike située sur la surface du SARS-CoV-2, virus responsable de la pandémie de Covid-19 depuis décembre 2019. L'intérêt d'un dispositif de diagnostic reposant sur la reconnaissance moléculaire entre le RBD de la protéine spike et ACE2, par rapport aux tests antigéniques actuels reposant sur la reconnaissance moléculaire avec des anticorps à haute affinité, serait que les différents variants ne pourraient pas perdre leur capacité à interagir avec ACE2, puisque le récepteur cellulaire constitue la porte d'entrée du virus dans les cellules hôtes.

Le présent manuscrit est divisé en six chapitres :

Chapitre 1 : Le premier chapitre présente tout d'abord une méthode de caractérisation ex-

périmentale des interactions protéine - ligand, l'AFM en mode SMFS. Nous introduisons ensuite le principe et les limites des simulations de dynamique moléculaire. Enfin, nous présentons différentes méthodes de caractérisation des interactions protéine - ligand en simulation.

Chapitre 2 : Le deuxième chapitre présente un état de l'art des travaux expérimentaux et de simulation en lien avec les systèmes que nous souhaitons modéliser. Nous détaillons la modélisation des monocouches de silanes, la modélisation des interactions protéine - surface et protéine - ligand, et la modélisation de l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface solide - liquide en simulations de dynamique moléculaire. De plus, nous présentons le complexe streptavidine - biotine et le complexe formé du récepteur cellulaire ACE2 et du RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2.

Chapitre 3 : Le troisième chapitre présente tout d'abord la méthode que nous avons élaborée pour la modélisation des monocouches de silanes et ses limites. Nous présentons ensuite le protocole employé pour les simulations de dynamique moléculaire. Enfin, nous évoquons les différents paramètres que nous avons étudiés pour analyser les résultats des simulations. Nous présentons en particulier les codes Python que nous avons développés pour compléter les outils d'analyse disponibles avec les logiciels Gromacs et VMD que nous utilisons.

Chapitre 4 : Dans le quatrième chapitre, nous modélisons différentes monocouches de silanes, nous caractérisons la structure des monocouches obtenues et nous vérifions leur cohérence avec des résultats expérimentaux afin de valider la méthode de modélisation développée. Nous étudions également l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface avec les différentes monocouches de silanes.

Chapitre 5 : Dans le cinquième chapitre, nous étudions l'adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes et nous analysons les changements de conformation associés à chaque monocouche et leur impact sur les interactions streptavidine - biotine.

Chapitre 6 : Enfin, le sixième chapitre est consacré à la modélisation de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 et du complexe ACE2 - RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2 sur différentes monocouches de silanes. Nous identifions les monocouches de silanes adaptées à l'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2, les changements de conformation associés et leur impact sur les interactions avec le RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2.

Première partie

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 1

Principe des simulations de dynamique moléculaire et intérêt pour l'étude des interactions protéine - ligand

1.1 Introduction

Nous nous intéressons dans ce premier chapitre aux interactions protéine - ligand. Pour cela, nous rappelons tout d'abord la structure des protéines et les propriétés physico-chimiques des différents acides aminés qui les composent. Nous présentons également la définition de l'énergie libre de liaison entre la protéine et le ligand. Nous nous intéressons ensuite à une technique expérimentale permettant de caractériser les interactions protéine - ligand, la microscopie à force atomique (AFM) en mode spectroscopie de force à molécule unique, ou *Single Molecule Force Spectroscopy* (SFMS). Après avoir rappelé le fonctionnement général de l'AFM, nous présentons le principe des courbes de force, qui permettent d'étudier l'adhérence entre la pointe d'AFM et la surface, puis le mode SMFS. Celui-ci apporte des informations plus précises sur la dynamique du détachement entre une protéine et un ligand, à l'échelle de l'interaction individuelle.

Cependant, les expériences d'AFM en mode SMFS ne permettent pas de caractériser la nature des acides aminés de la protéine qui interagissent avec le ligand et l'ordre dans lequel les liaisons entre le ligand et les différents acides aminés sont rompues au cours du détachement. Les simulations de dynamique moléculaire permettent de compléter les résultats expérimentaux, en apportant des informations sur les interactions protéine - ligand à l'échelle atomique. Nous présentons dans la deuxième partie de ce chapitre le principe général des simulations de dynamique moléculaire. Nous rappelons la façon dont le système moléculaire et les interactions entre atomes sont définis, puis les équations à résoudre et les différentes méthodes employées pour leur résolution. Nous présentons également les limites de cette méthode.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation des interactions protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire. Nous présentons le principe de la simulation de dynamique moléculaire dirigée, ou *Steered Molecular Dynamics* (SMD), qui est l'équivalent en simulations de l'AFM en mode SMFS. Ce type de simulation permet en effet de modéliser le détachement entre une protéine et un ligand (ou deux protéines par exemple), en appliquant une force sur l'un des éléments. Nous présentons également différentes méthodes de détermination de l'énergie libre de liaison protéine - ligand en simulations, en distinguant les méthodes de calcul le long du chemin de détachement des méthodes dites du point final.

1.2 Étude expérimentale des interactions protéine - ligand

1.2.1 Protéines et acides aminés

Les protéines sont des molécules organiques qui possèdent des fonctions biologiques extrêmement variées [9] et présentent un rôle central dans la structure et le fonctionnement des cellules [10]. Elles sont constituées d'un enchaînement de quelques dizaines à quelques milliers d'acides aminés [9], qui s'organisent en une structure en trois dimensions, appelée conformation. Cette structure compacte assure la stabilité et la spécificité des fonctions biologiques des protéines [10].

1.2.1.a Structure des protéines

La structure d'une protéine est décrite en distinguant quatre niveaux d'organisation : les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. La structure primaire correspond à l'enchaînement des acides aminés, tandis que les structures secondaire, tertiaire et quaternaire décrivent la conformation de la protéine [10], qui peut notamment être déterminée par diffraction aux rayons X [9].

Structure primaire. La structure primaire d'une protéine correspond à la succession de ses acides aminés, liés par des liaisons covalentes appelées liaisons peptidiques [9]. Les acides aminés engagés dans une liaison peptidique sont appelés résidus et peuvent être identifiés par un numéro [9]. Par convention, le premier résidu correspond à l'extrémité N-terminale, c'est-à-dire au résidu dont la fonction α amine est libre, tandis que le dernier résidu est appelé extrémité C-terminale [9].

Structure secondaire. La structure secondaire correspond à l'arrangement de la chaîne polypeptidique en structures régulières, formées par des liaisons hydrogène entre résidus. On distingue notamment deux types de structures périodiques dans les protéines : l'hélice α et les feuillets β [9, 10].

Structure tertiaire. La structure tertiaire correspond l'arrangement en trois dimensions de la chaîne polypeptidique. Il est grouverné par un effet hydrophobe : les résidus hydrophobes de la protéine se regroupent, ce qui induit la formation d'une structure compacte. Ce processus est appelé repliement de la protéine [10].

Structure quaternaire. La structure quaternaire correspond à l'assemblage de plusieurs chaînes, appelées monomères, en une protéine multimérique ou oligomère. Cette association est stabilisée par la formation de liaisons faibles entre les différentes chaînes (interactions de Van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes), mais aussi par la formation de ponts disulfures [10].

1.2.1.b Propriétés physico-chimiques des acides aminés

Les acides aminés possèdent un groupe amine primaire (ou secondaire pour la proline) et un groupe carboxyle liés au même atome de carbone, appelé carbone α (figure 1.1). Également liée au carbone α, la chaîne latérale (notée R) diffère en fonction de l'acide aminé considéré. La nature de la chaîne latérale détermine les propriétés physico-chimiques des acides aminés, notamment leur charge à pH donné et hydrophobicité [9]. Les vingt principaux acides aminés constituant les protéines sont présentés sur la figure 1.2, page 10, et leurs principales propriétés sont résumées dans le tableau 1.1, page 11.

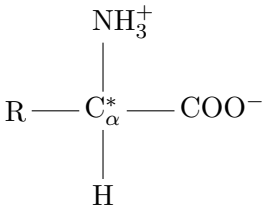
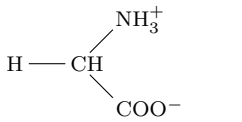
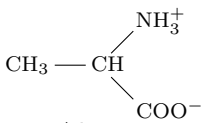
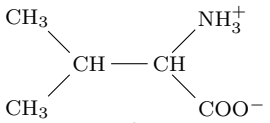
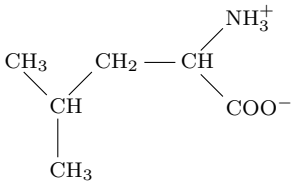


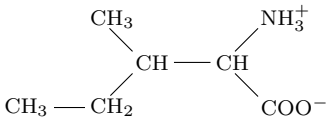
FIGURE 1.1 – *Structure générale d'un acide aminé. Image adaptée de Garrett et Grisham (2010) [10].*

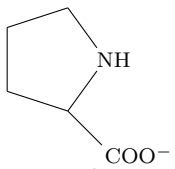

Glycine

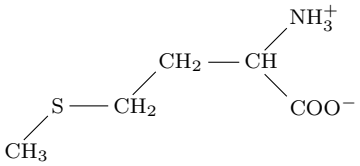

Alanine

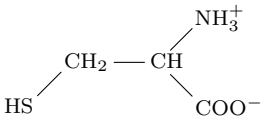

Valine

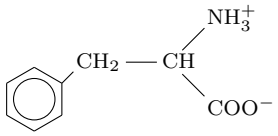

Leucine

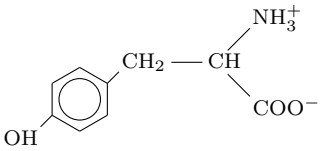

Isoleucine

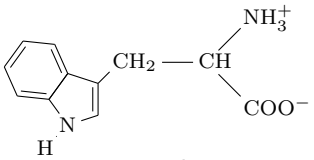

Proline

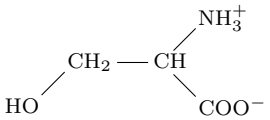

Méthionine

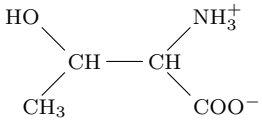

Cystéine

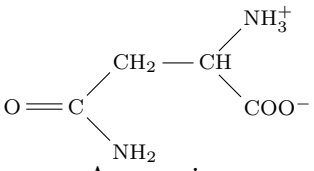

Phénylalanine

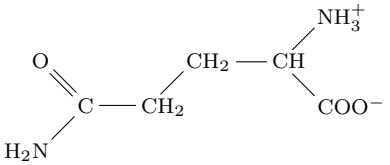

Tyrosine

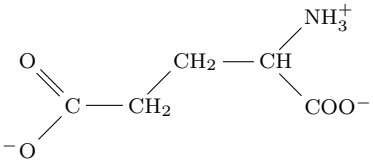

Tryptophane

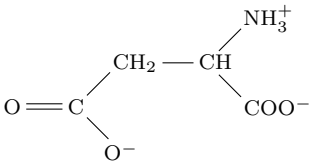

Sérine

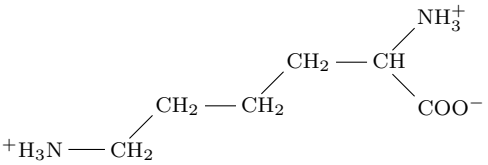

Thréonine


Asparagine


Glutamine


Acide glutamique


Acide aspartique


Lysine

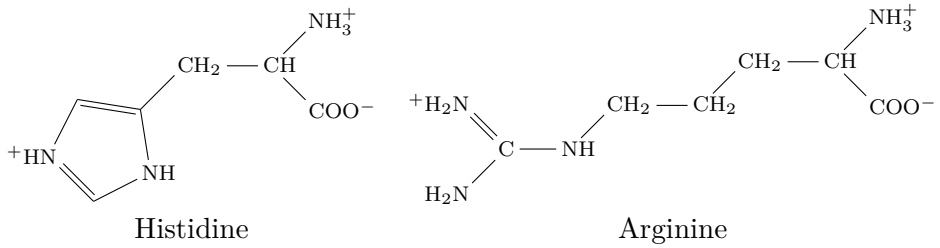


FIGURE 1.2 – *Les vingt principaux acides aminés constituant les protéines. Images adaptées de Gallet et al. (2020) [9] et Garrett et Grisham (2010) [10].*

1.2.2 Interactions protéine - ligand : définition des constantes thermodynamiques d'association et de dissociation

La capacité de nombreuses protéines à se lier avec un ligand (interactions protéine - ligand) ou une autre protéine (interactions protéine - protéine) est étroitement liée à leur fonction biologique. Par exemple, les protéines de transport se lient aux molécules qu'elles transportent à travers des membranes, les enzymes interagissent avec les réactifs des réactions qu'elles catalysent, et les protéines régulatrices peuvent se lier à l'ADN pour réguler l'expression d'un gène [10]. Le processus d'association entre une protéine et un ligand est appelé reconnaissance moléculaire. Cette association est sélective et nécessite une complémentarité de structure entre le ligand et le site de liaison au ligand de la protéine, par analogie avec le système clé-serrure, ainsi qu'une complémentarité des sites d'interaction (distribution des charges, donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène) [10, 12]. Lors de leur association avec un ligand, les protéines subissent généralement des changements de conformation qui stabilisent les interactions protéine - ligand [10].

Les protéines interagissent avec leur ligand de façon non covalente : la reconnaissance moléculaire est donc un processus réversible. Dans le cas de l'interaction entre une protéine P avec un seul site de liaison et un ligand L, la formation du complexe PL est décrite par la réaction d'association suivante [10] :

$$P + L \rightleftharpoons PL \tag{1.1}$$

Les constantes thermodynamiques d'association (K_a) et de dissociation (K_d) sont alors définies en fonction des concentrations des différentes espèces, par [10, 12] :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} = \frac{k_{on}}{k_{off}} \tag{1.2}$$

Ainsi, plus la constante d'association est grande (ou la constante de dissociation petite), plus la protéine est fortement liée au ligand. La constante de dissociation est typiquement comprise entre $10^{-3}\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$ et $10^{-12}\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$ [10].

L'enthalpie libre, ou énergie libre de Gibbs est définie par [12] :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \tag{1.3}$$

avec ΔH° la contribution enthalpique, T la température et ΔS° la contribution entropique. De plus, l'enthalpie libre est reliée à la constante d'association par [12] :

$$\Delta G^\circ = -RT\ln(K_a) \tag{1.4}$$

avec R la constante universelle des gaz parfaits ($R = 8,314\ \mathrm{J{\cdot}K^{-1}{\cdot}mol^{-1}}$), T la température (en K) et ΔG° l'énergie libre standard (dans les conditions standard, c'est-à-dire lorsque toutes les concentrations valent $1\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$, la température 298 K et la pression 1 atm) [12].

Acide aminé	Occurence moyenne dans les protéines (%) [9]	Poids moléculaire (Da) [9]	Hydrophobicité [11] [a]	Propriétés des chaînes latérales [9, 10]
Glycine (Gly, G)	7,1	75	-0,4	Absence de chaîne latérale, apporte de la flexibilité à la protéine (coudes ou tournants).
Chaîne latérale non polaire				
Alanine (Ala, A)	8,3	89	1,8	Les chaînes latérales non polaires et aliphatiques maintiennent la structure de la protéine (interactions hydrophobes).
Valine (Val, V)	6,9	117	4,2	
Leucine (Leu, L)	9,7	131	3,8	
Isoleucine (Ile, I)	6,0	131	4,5	
Méthionine (Met, M)	2,4	150	1,9	
Proline (Pro, P)	4,7	115	-1,6	La structure cyclique rigide impose des contraintes conformationnelles aux chaînes polypeptidiques.
Phénylalanine (Phe, F)	3,9	165	2,8	Les chaînes latérales aromatiques maintiennent la structure de la protéine (interactions hydrophobes).
Tryptophane (Trp, W)	1,1	204	-0,9	
Chaîne latérale polaire non chargée à pH = 7				
Tyrosine (Tyr, Y)	2,9	181	-1,3	Les groupements polaires peuvent établir des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau, d'autres acides aminés ou un ligand, et jouer un rôle nucléophile lors de réactions enzymatiques.
Sérine (Ser, S)	6,5	105	-0,8	
Thréonine (Thr, T)	5,3	119	-0,7	
Asparagine (Asn, N)	4,0	132	-3,5	
Glutamine (Gln, Q)	3,9	146	-3,5	
Cystéine (Cys, C)	1,4	121	2,5	La formation de ponts disulfure entre résidus cystéine permet le maintien de la conformation des protéines.
Chaîne latérale polaire chargée négativement à pH = 7				
Acide aspartique / aspartate (Asp, D)	5,4	132	-3,5	Les chaînes latérales chargées négativement peuvent se lier à des ions métalliques.
Acide glutamique / glutamate (Glu, E)	6,8	146	-3,5	
Chaîne latérale polaire chargée positivement à pH = 7				
Lysine (Lys, K)	5,9	147	-3,9	Les chaînes latérales participent aux interactions électrostatiques dans la protéine.
Arginine (Arg, R)	5,5	175	-4,5	
Histidine (His, H)	2,3	155	-3,2	La chaîne latérale peut intervenir comme donneur et accepteur de protons dans des réactions enzymatiques.

TABLE 1.1 – *Propriétés physico-chimiques des vingt principaux acides aminés. Tableau adapté de Gallet et al. (2020) [9].* [a] *Le caractère hydrophile ou hydrophobe des différents acides est lié à la charge et à la polarité de la chaîne latérale. L'échelle d'hydrophobicité des chaînes latérales établie par Kyte et Dolittle permet de comparer les différents acides aminés. Cette échelle varie entre -4,5 pour l'acide aminé le plus hydrophile (l'arginine) et 4,5 pour le plus hydrophobe (l'isoleucine) [11].*

1.2.3 Caractérisation expérimentale des interactions protéine - ligand : l'AFM en mode SMFS

Nous présentons tout d'abord le principe général de la microscopie à force atomique, avant de nous intéresser plus particulièrement au mode SMFS, qui permet notamment de caractériser les interactions protéine - ligand.

1.2.3.a La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique, ou *Atomic Force Microscopy* (AFM) est une technique d'analyse de surface à sonde locale, reposant sur la mesure de l'interaction mécanique entre l'extrémité d'une pointe et la surface d'un échantillon [13]. Cette technique est une extension de la microscopie à effet tunnel [14] et permet de déterminer la topographie de surface jusqu'à l'échelle atomique [15]. Il est possible de réaliser des images en mode contact (à force constante), mais également en mode dynamique à modulation d'amplitude (AM-AFM) ou à modulation de fréquence (FM-AFM).

Principe de fonctionnement à force constante Un schéma du principe de fonctionnement de l'AFM à force constante est présenté sur la figure 1.3. Une pointe, fixée à l'extrémité d'un levier, balaie la surface de l'échantillon [16]. La pointe se situe à une distance très faible de la surface (entre 0,2 et 10 nm [17]) et des interactions s'établissent entre les atomes de la pointe et la surface de l'échantillon. Cela engendre une déflexion Δz du levier, proportionnelle à la force établie ($F = k\ \Delta z$). Par asservissement de la déflexion, on maintient la force constante sur la surface. La mesure permet d'obtenir une cartographie de la grandeur étudiée [13, 16].

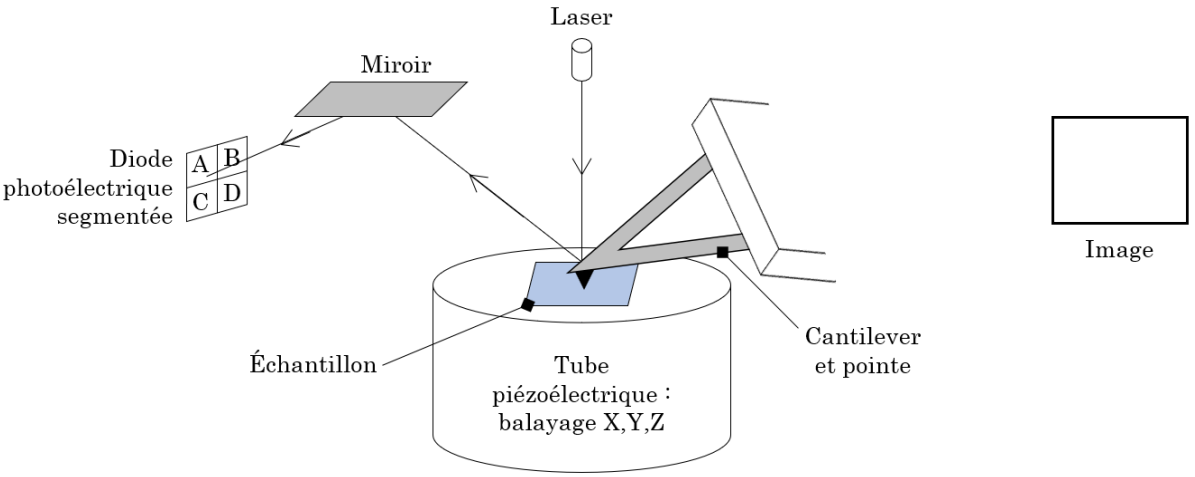


FIGURE 1.3 – *Principe du microscope à force atomique à force constante. L'échantillon, situé au-dessous de la pointe, est déplacé en (x,y) par le tube piézoélectrique. La déflexion et la torsion du levier sont déterminées grâce au déplacement du rayon laser sur la diode photoélectrique segmentée. Notons qu'il existe également des systèmes inverses, où l'échantillon est fixe et le levier se déplace en (x,y). Image adaptée de Aigouy et al. (2006) [13] et Rivoal et Frétigny (2005) [16].*

Les pointes d'AFM doivent présenter une extrémité très fine pour obtenir une bonne résolution latérale, avec un rayon de courbure généralement compris entre 2 et 50 nm [16]. Notons que la raideur du levier varie selon le mode de fonctionnement choisi (elle est généralement comprise entre 0,01 et 100 $N{\cdot}m^{-1}$ [16]).

Les courbes de force Les courbes de force, ou courbes force - distance, apportent des informations concernant les interactions qui s'établissent entre la pointe et la surface au cours d'un cycle approche - retrait, et donc sur les propriétés mécaniques et physico-chimiques de la surface [13]. Elles sont obtenues en faisant varier la position verticale z de l'échantillon, sans faire vibrer le levier, et en analysant les déflexions de celui-ci [13, 16].

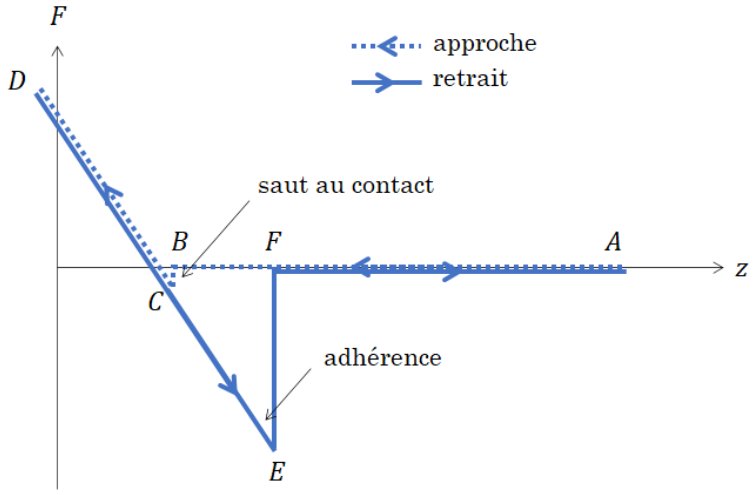


FIGURE 1.4 – *Courbe de force idéale sur un matériau rigide. Image adaptée de Aigouy et al. (2006) [13] et Rivoal et Frétigny (2005) [16].*

En phase d'approche, loin de la surface (entre les points A et B), il n'y a pas d'interaction entre la pointe et la surface, et la déflexion du levier est nulle. À mesure que la pointe s'approche de la surface, des interactions attractives de Van der Waals peuvent s'établir : il en résulte un saut au contact, visible entre les points B et C. L'échantillon étant supposé rigide, lorsque la pointe continue à s'approcher de la surface, la déflexion croît linéairement (entre les points C et D). Au retour, la force suit le même chemin qu'à l'aller, mais le contact n'est pas rompu lorsque la force devient nulle (hystérésis) : il faut tirer pour rompre le contact (entre les points E et F). Enfin, après le point F, il n'y a plus d'interaction entre la pointe et la surface et la déflexion du levier est nulle [13, 16].

La réalisation de ce cycle d'approche - retrait permet donc de mesurer la force d'adhésion entre la pointe et la surface, qui correspond à la valeur mesurée entre les points E et F. Notons enfin que la force choisie pour l'asservissement lors d'une expérience en mode contact à force constante se situe sur la courbe de force entre les points C et D.

1.2.3.b Le mode spectrocopie de force à molécule unique (SMFS)

Le mode spectrocopie de force à molécule unique (SMFS) constitue un développement spécifique des courbes de force pour l'étude des systèmes biologiques, puiqu'il permet par exemple de déterminer les forces intramoléculaires en jeu pour le dépliement d'une protéine. Cette technique permet également d'étudier le phénomène de reconnaissance moléculaire, en apportant des informations sur les interactions intermoléculaires qui s'établissent entre un récepteur et un ligand [18, 19]. Le principe de l'étude des interactions récepteur - ligand est le suivant : l'une des molécules (la protéine ou le ligand) est fixée sur la pointe située à l'extrémité du levier, tandis que l'autre est immobilisée sur une surface. Le levier est déplacé dans la direction verticale [18], afin d'observer l'association (en phase d'approche) puis la dissociation (en phase de retrait) du complexe protéine - ligand. Ce processus d'approche - retrait permet de déterminer une courbe

de force (voir figure 1.5).

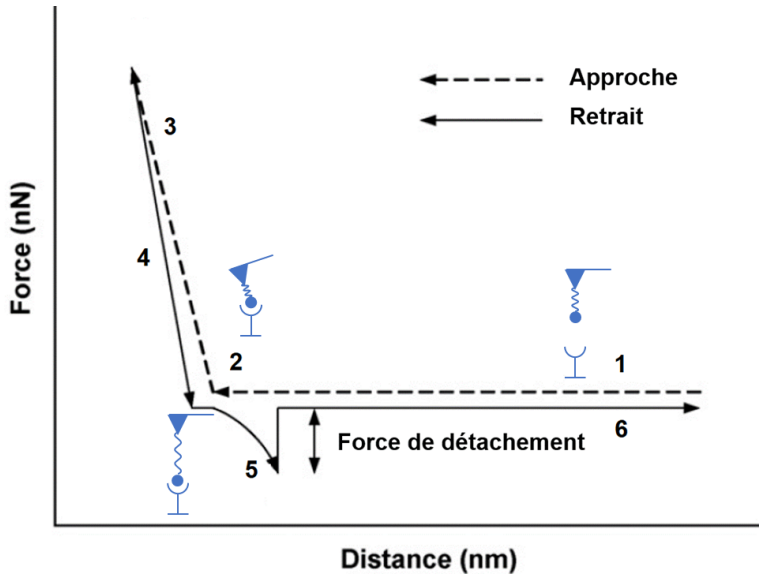


FIGURE 1.5 – *Courbe de force obtenue par AFM en mode SMFS : illustration des différentes étapes du cycle approche - retrait : (1) la pointe fonctionnalisée est positionnée quelques centaines de nm au-dessus de la surface et approchée de la surface par le tube piézoélectrique, (2) la pointe entre en contact avec la surface, (3) le tube piézoélectrique continue à s'approcher pour assurer la formation des liaisons entre la pointe fonctionnalisée et la surface, (4) la pointe est éloignée de la surface, (5) si une interaction spécifique récepteur - ligand est formée, une tension croissante est appliquée sur le complexe, jusqu'au moment où la liaison récepteur - ligand se rompt, puis (6) le levier retourne à sa position d'équilibre [18, 19]. Image adaptée de Lee et al. (2007) [19].*

Les courbes de force donnent accès à des informations quantitatives sur le processus de détachement, telles que la force de rupture et le travail de détachement, mais également qualitatives, concernant la nature des liaisons rompues pendant le détachement. La force de rupture est la différence entre la force obtenue au niveau de la déflexion maximale du levier (point 5) et celle obtenue quand la déflexion est nulle (points 1 et 6) [19]. En raison des orientations aléatoires du ligand et du récepteur sur la surface et sur la pointe, il est nécessaire de réaliser plusieurs centaines de courbes de force pour déterminer la distribution de la force de rupture [19].

De plus, les courbes de force peuvent être réalisées avec différentes vitesses de tirage, comprises entre quelques $nm \cdot s^{-1}$ et quelques $\mu m \cdot s^{-1}$ pour un microscope à force atomique conventionnel [18]. La réalisation des expériences de spectroscopie à plusieurs vitesses de tirage, c'est-à-dire pour différents *loading rates* (produit de la vitesse de tirage par la constante de force du levier) permet de déterminer le spectre de force dynamique du complexe étudié. Celui-ci présente l'évolution de la force de rupture la plus probable en fonction du *loading rate* [18] (voir figure 1.6).

Le spectre de force dynamique permet d'obtenir des informations concernant le chemin de détachement du complexe et les éventuels états intermédiaires. En effet, si le spectre de force dynamique présente une évolution linéaire en fonction du logarithme du *loading rate*, comme sur la figure 1.6 (a), le modèle de Bell-Evans peut être appliqué [18, 20]. Celui-ci décrit l'existence de deux états stables, l'un correspondant au complexe lié, et l'autre au ligand et au récepteur détachés, séparés par un état de transition correspondant à une barrière d'énergie libre, comme illustré sur la figure 1.7. De plus, la constante de dissociation k_{off} peut être déterminée à partir

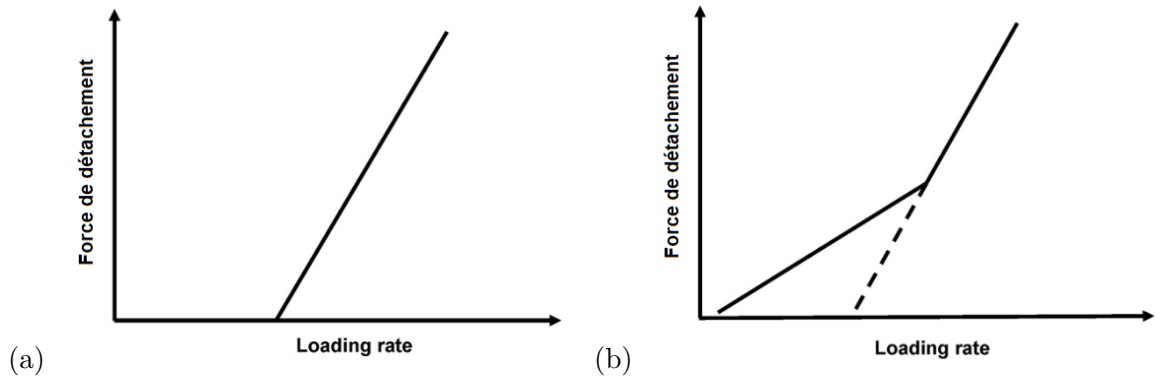


FIGURE 1.6 – *Spectre de force dynamique (force de rupture la plus probable en fonction du logarithme du loading rate) : (a) cas où le spectre de force dynamique est une droite et (b) cas où l'on observe une succession de deux régimes linéaires correspondant à un enchaînement de deux barrières d'énergie. Images adaptées de Lee et al. (2007) [19].*

du spectre de force dynamique grâce à la formule suivante [18] :

$$f^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln(\frac{x_\beta}{k_{off} k_B T}) + \frac{k_B T}{x_\beta} \ln(r_f) \tag{1.5}$$

avec f^* la force de rupture la plus probable, mesurée en fonction du *loading rate* r_f, k_B la constante de Boltzmann, T la température (en K) et x_β la distance entre l'état lié et l'état de transition (autre inconnue).

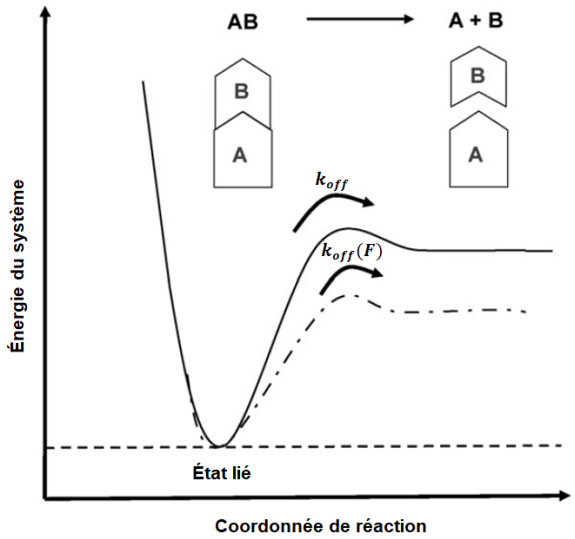


FIGURE 1.7 – *Schéma du chemin de détachement correspondant à la dissociation du complexe AB lorsqu'aucune force n'est appliquée (ligne continue) et lorsqu'une une force extérieure F est appliquée (ligne pointillée). Image adaptée de Lee et al. (2007) [19].*

En revanche, dans le cas où le spectre de force dynamique présente une évolution non linéaire de la force de rupture la plus probable en fonction du *loading rate*, comme sur la figure 1.6 (b), on peut l'interpréter comme l'enchaînement de plusieurs régimes linéaires. Cela correspond à l'existence de multiples barrières d'énergie le long du chemin de détachement (à une dimension)

[18, 19, 21]. Enfin, une autre explication possible pour l'existence d'un spectre de force dynamique non linéaire est l'emploi de vitesses de tirages très élevées (plus rapides que la relaxation des liaisons moléculaires). On peut rencontrer ce cas en simulations de dynamique moléculaire et éventuellement pour la spectroscopie de force à vitesse élevée, ou *High-Speed Force Spectroscopy* (HSFS) [18].

L'AFM en mode SMFS permet donc de caractériser les interactions protéine - ligand en mesurant les courbes de force à différents *loading-rates* et en déterminant le spectre de force dynamique du complexe étudié. L'allure des courbes de force peut également apporter des informations sur le processus de détachement. Cependant, cette technique ne permet pas d'identifier la nature des résidus de la protéine qui interagissent avec le ligand (ou la nature des résidus de deux protéines qui interagissent entre elles), ni l'ordre dans lequel ces liaisons sont rompues pendant le détachement. Les simulations de dynamique moléculaire peuvent compléter les informations obtenues expérimentalement, puisqu'elles permettent de décrire la conformation des protéines et les interactions protéine - ligand à l'échelle atomique. De plus, le détachement entre une protéine et un ligand peut être modélisé grâce des simulations de dynamique moléculaire spécifiques, appelées simulations SMD, et l'énergie libre de liaison peut être calculée.

1.3 Principe des simulations de dynamique moléculaire

Dans cette partie, nous présentons le principe général des simulations de dynamique moléculaire. Le principe des simulations SMD, ainsi que différentes méthodes de calcul de l'énergie libre de liaison entre la protéine et le ligand, sont détaillés à la partie 1.4, page 24.

1.3.1 Introduction

Il existe différents types de simulations moléculaires, qui diffèrent par leur échelle de temps, la taille du système considéré et leur précision (voir figure 1.8). L'accroissement de ces trois facteurs est rendu possible par l'augmentation toujours plus importante des capacités de calcul, les simulations étant réalisées grâce à des supercalculateurs.

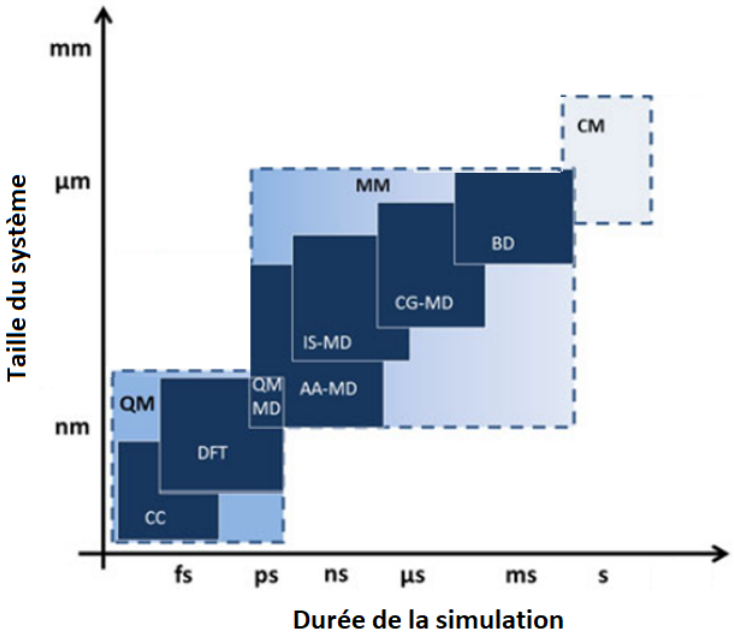


FIGURE 1.8 – *Schéma présentant différentes techniques de simulation et les échelles de taille*

et de temps approximatives associées : mécanique quantique (QM) avec les méthodes du cluster couplé (CC) et de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), mécanique moléculaire (MM) avec les méthodes de la dynamique moléculaire tout-atome (AA-MD), solvant implicite (IS-MD) et gros grain (CG-MD) et de la dynamique brownienne (BD), et enfin la mécanique continue (CM). Image adaptée d'Ozboyaci et al. (2016) [22].

Nous réalisons des simulations de dynamique moléculaire dites tout-atome, c'est-à-dire que tous les atomes présents dans le système sont explicitement pris en compte. Ces simulations permettent de déterminer l'évolution d'un système comprenant différents types de molécules (peptides, protéines, molécules d'eau, ions) vers un état d'équilibre thermodynamique. Cette technique permet d'étudier de nombreux phénomènes physico-chimiques et constitue un outil particulièrement utile pour l'étude des protéines. Elle permet de déterminer la conformation d'une protéine à l'équilibre en solution aqueuse, à partir de la structure cristallographique, de caractériser ses interactions avec une autre biomolécule (une protéine ou un ligand) mais aussi d'observer les effets de mutations sur la stabilité de la protéine ou sur les interactions qui s'établissent avec une autre protéine ou un ligand. Pour cela, les molécules étudiées sont modélisées comme un assemblage d'atomes interagissant entre eux et avec les molécules environnantes, et dont les positions varient au cours du temps. L'évolution du système est calculée en résolvant les équations de Newton pour chaque atome du système, les interactions entre atomes étant définies à l'aide d'un champ de force. Les simulations de dynamique moléculaire tout-atome sont actuellement réalisées avec une durée typique de quelques centaines de nanosecondes, pour des systèmes comportant quelques dizaines à quelques centaines de milliers d'atomes.

1.3.2 Définition du modèle moléculaire

La première étape d'une simulation de dynamique moléculaire consiste à définir la topologie du système étudié, c'est-à-dire l'ensemble des atomes présents dans la boîte de simulation et les liaisons covalentes qui les relient. La conformation initiale des molécules peut être obtenue grâce à un modèle théorique ou bien déterminée expérimentalement. De plus, les interactions entre les différents atomes sont décrites à l'aide d'un champ de force, qui traduit leurs propriétés physico-chimiques. Enfin, les propriétés thermodynamiques du système sont définies, c'est-à-dire les conditions de température et de pression, ainsi que la présence de forces extérieures ou d'un mur [23]. Une fois que le système étudié est correctement défini, son évolution en fonction du temps peut être calculée.

1.3.3 Équations à résoudre

On considère un système composé de N atomes de coordonnées $\boldsymbol{r} = (\boldsymbol{r}_1, \ldots, \boldsymbol{r}_n)$. La trajectoire de chaque atome i du système est déterminée en intégrant les équations du mouvement issues de la deuxième loi de Newton :

$$\frac{d^2\boldsymbol{r}_i}{dt^2} = \frac{\boldsymbol{F}_i}{m_i} \tag{1.6}$$

avec m_i la masse de l'atome i considéré, et $\boldsymbol{F}_i$ l'ensemble des forces s'exerçant sur cet atome [24].

La force $\boldsymbol{F}_i$ exercée sur chaque atome i peut être exprimée comme le gradient de l'énergie potentielle $\mathcal{U}(\boldsymbol{r}_1 \ldots, \boldsymbol{r}_n)$ du système [25] :

$$\boldsymbol{F}_i = -\frac{\partial \mathcal{U}(\boldsymbol{r}_1 \ldots, \boldsymbol{r}_n)}{\partial \boldsymbol{r}_i} \tag{1.7}$$

Ainsi, il est possible de déterminer la trajectoire des atomes en fonction de l'énergie potentielle du système [26] :

$$m_i \frac{d^2\boldsymbol{r}_i}{dt^2} = -\frac{\partial \mathcal{U}(\boldsymbol{r}_1 \ldots, \boldsymbol{r}_n)}{\partial \boldsymbol{r}_i} \tag{1.8}$$

1.3.4 Champ de force

L'énergie potentielle est modélisée grâce à un champ de force, qui décrit les interactions s'exerçant entre les différents atomes du système grâce à plusieurs fonctions différentiables, qui représentent les forces intramoléculaires (liantes) et les forces intermoléculaires (non liantes) [24, 23]. Un champ de force est caractérisé par deux éléments : premièrement, par la forme analytique des termes de la fonction énergie potentielle, et deuxièmement, par les valeurs données aux différents paramètres [27].

Les valeurs des paramètres sont définies pour chaque type d'atome, en fonction de son numéro atomique, mais également de son environnement chimique. Par exemple, des atomes de carbone impliqués dans une liaison C − C ou C = O seront décrits différemment dans le champ de force. Les valeurs des paramètres sont déterminées à partir de calculs théoriques de mécanique quantique, mais aussi de résultats expérimentaux (diffraction de rayons X, RMN ou spectroscopie Raman par exemple) [23]. On parle de champs de force semi-empiriques [27].

1.3.4.a Termes associés aux interactions liantes

Les interactions entre atomes liés par des liaisons covalentes sont décrites par trois termes caractérisant l'élongation, la flexion et la torsion (voir figure 1.9). Un quatrième terme, associé aux angles impropres, peut être ajouté.

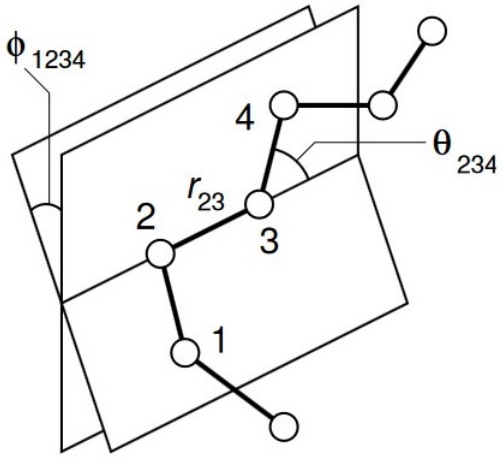


FIGURE 1.9 – *Schéma présentant les différents paramètres d'étude des liaisons dans une molécule linéaire : distance interatomique r_{ij}, angle de flexion θ_{ijk} et angle de torsion ϕ_{ijkl}. Image d'Allen (2004) [25].*

Élongation L'élongation de la liaison entre deux atomes i et j est décrite par un potentiel harmonique [25] :

$$\upsilon(r_{ij}) = \frac{k_{ij}^r}{2}(r_{ij} - r_{eq})^2 \tag{1.9}$$

avec $r_{ij} = |\boldsymbol{r}_i - \boldsymbol{r}_j|$ la distance entre les deux atomes i et j, r_{eq} la distance à l'équilibre (en nm) et k_{ij}^r la constante d'élongation (en kJ·mol^{-1}nm^{-2}).

Flexion L'angle entre trois atomes i, j et k est décrit par un potentiel harmonique [25] :

$$\upsilon(\theta_{ijk}) = \frac{k_{ijk}^\theta}{2}(\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \tag{1.10}$$

avec θ_{ijk} l'angle entre les trois atomes, θ_{eq} l'angle à l'équilibre (en °) et k^{θ}_{ijk} la constante de flexion (en kJ·mol^{-1}rad^{-2}).

Torsion ou angle dièdre propre Le potentiel associé à la torsion, ou à l'angle dièdre propre, décrit les barrières énergétiques rencontrées lors de la rotation autour d'une liaison simple. Pour quatre atomes i, j, k et l liés linéairement, l'énergie potentielle associée à la torsion est décrite par une somme de potentiels exprimés à l'aide de fonctions cosinus [25] :

$$\upsilon(\phi_{ijkl}) = \sum_m \frac{k^{\phi,m}_{ijkl}}{2} \left(1 + \cos(m\ \phi_{ijkl} - \gamma_m)\right) \tag{1.11}$$

avec ϕ_{ijkl} l'angle de torsion, m la multiplicité, c'est-à-dire le nombre de minima (sans unité), γ_m le facteur de phase (en °) et $k^{\phi,m}_{ijkl}$ la hauteur de la barrière de potentiel (en kJ·mol^{-1}).

Angle dièdre impropre Un potentiel associé à un angle dièdre impropre peut être ajouté pour modéliser l'impossibilité pour une liaison de sortir d'un plan donné, afin de préserver la planéité d'un cycle aromatique ou bien la stéréochimie d'une molécule par exemple [24]. L'énergie potentielle associée à ces torsions impropres peut être modélisée, par exemple, par un potentiel harmonique [27] :

$$\upsilon(\omega) = \frac{k_{imp}}{2}(\omega - \omega_0)^2 \tag{1.12}$$

avec ω l'angle impropre, c'est-à-dire la déviation par rapport à une structure plane, ω_0 l'angle à l'équilibre (en °) et k_{imp} la constante de l'angle dièdre impropre (en kJ·mol^{-1}rad^{-2}).

1.3.4.b Termes associés aux interactions non liantes

Les interactions non liantes qui s'établissent entre les différents atomes du système sont divisées en deux termes décrivant les interactions électrostatiques et les interactions de Van der Waals. Notons que seules les interactions entre paires d'atomes sont prises en compte (les interactions d'ordre supérieur sont négligées). De plus, un troisième terme peut être ajouté, pour représenter les effets d'un champ de potentiel extérieur ou d'un mur [25].

Forces de Van der Waals Les interactions de Van der Waals sont modélisées par un potentiel de Lennard-Jones (figure 1.10) :

$$\upsilon(r_{ij}) = 4\ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6} \right] \tag{1.13}$$

avec r_{ij} la distance entre les deux atomes qui interagissent, ϵ_{ij} la profondeur du puits de potentiel (en kJ·mol^{-1}) et σ_{ij} son diamètre (en nm).

À faible distance, le potentiel élevé montre un effet répulsif entre atomes, tandis qu'à une distance plus élevée, le potentiel représente un effet attractif et modélise les interactions entre dipôles induits (forces de London et de Debye) [23, 24]. En général, les champs de force ne donnent pas les valeurs de ϵ_{ij} et σ_{ij} pour toutes les paires d'atomes possibles, mais des valeurs individuelles pour chaque atome. En notant ϵ_i et σ_i (respectivement ϵ_j et σ_j) les valeurs associées à l'atome i (respectivement à l'atome j), les valeurs de ϵ_{ij} et σ_{ij} sont déterminées par les règles de mélange suivantes [27] :

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i\ \epsilon_j} \tag{1.14}$$

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_i + \sigma_j) \tag{1.15}$$

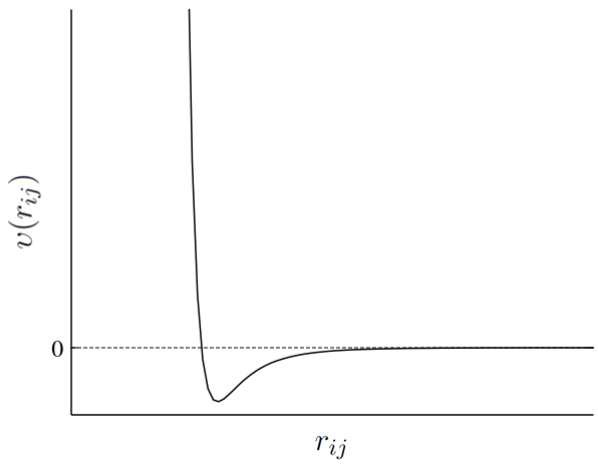


FIGURE 1.10 – *Le potentiel de Lennard-Jones. Image adaptée de Parton (2011) [24].*

Forces électrostatiques Le potentiel entre deux charges ponctuelles, ou dipôles permanents, i et j est décrit par la loi de Coulomb [23, 24] :

$$\upsilon_{i,j} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \tag{1.16}$$

avec q_i et q_j les valeurs des charges, r_{ij} la distance entre elles, $\epsilon_0 = 8{,}854 \times 10^{-12}$ F·m^{-1} la permittivité du vide et ϵ_r la permittivité relative du milieu ($\epsilon_r = 1$ dans le vide, $4 \leq \epsilon_r \leq 20$ dans les protéines, et $\epsilon_r = 80$ dans l'eau [23]).

1.3.4.c Champ de force total et force s'exerçant sur chaque atome

La fonction énergie potentielle totale peut donc être définie comme la somme de tous les potentiels du système de N particules [24, 25] :

$$\mathcal{U}(\boldsymbol{r}) = \sum_{\text{liaisons}} \frac{k^r_{ij}}{2}(r_{ij}-r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k^\theta_{ijk}}{2}(\theta_{ijk}-\theta_{eq})^2 + \sum_{\text{dihèdres}} \sum_m \frac{k^{\phi,m}_{ijkl}}{2}\left(1+\cos(m\ \phi_{ijkl}-\gamma_m)\right) + \sum_{\text{impropres}} \frac{k_{imp}}{2}(\omega-\omega_0)^2 + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N} 4\epsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \tag{1.17}$$

1.3.4.d Choix du champ de force

Il existe différents champs de force classiques, chacun proposant des paramètres adaptés à l'étude des protéines, des lipides, des sucres ou de l'ADN par exemple [23]. On peut notamment citer les champs de force CHARMM [28], AMBER [29], GROMOS [30] ou OPLS [31].

Le SiO_2 et les molécules de silane ne sont pas décrits dans les champs de force classiques, cependant, des adaptations du champ de force OPLS ont déjà été développées pour ces molécules, comme nous le verrons au paragraphe 2.2.2, page 35. Nos simulations sont donc réalisées avec le champ de force OPLS pour la description des protéines, des ions et des molécules d'eau, et des adaptations spécifiques pour le SiO_2 et les molécules de silane (voir paragraphe 3.2, page 70).

1.3.5 Interactions à longue distance

Les interactions non liantes pourraient en théorie être calculées pour toutes les paires d'atomes du système, mais cela engendrerait des calculs très importants, avec une complexité en $O(N^2)$ [24]. En pratique, puisque les interactions électrostatiques et de Van der Waals tendent vers 0, les calculs sont simplifiés à longue distance et ne sont réalisés précisément que pour les atomes situés à une distance inférieure à une valeur donnée, autour de l'atome considéré. Cette distance est appelée *cut-off* et vaut généralement entre 8 et 14 Å [23].

Le potentiel de Lennard-Jones associé aux interactions de Van der Waals, qui converge rapidement vers 0, peut être tronqué à partir d'une certaine distance [24, 32] :

$$\upsilon(r_{ij}) = \begin{cases} 4\epsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] & \text{si } r_{ij} < r_c \\ 0 & \text{si } r_{ij} \geq r_c \end{cases} \tag{1.18}$$

avec r_c le rayon de *cut-off*.

En revanche, les forces électrostatiques convergent vers 0 beaucoup plus lentement et ne peuvent être simplement tronquées. Dans ce cas, la technique utilisée pour diminuer les calculs consiste à réaliser une évaluation précise des forces électrostatiques tant que la distance entre les deux atomes considérés est inférieure à la valeur du *cut-off*, et un calcul moins détaillé à longue distance [24]. Nous utilisons la méthode *particle-mesh-Ewald* (PME), qui permet de calculer les interactions électrostatiques à longue distance avec une complexité en $O(N \cdot \log(N))$. Cette méthode repose sur une interpolation des charges et l'utilisation d'un algorithme FFT (*Fast Fourier Transform*) [24, 33, 34].

1.3.6 Conditions périodiques aux frontières

Lors d'une simulation de dynamique moléculaire, l'ensemble des atomes du système étudié sont placés dans une boîte de simulation. Cette boîte comporte généralement un nombre d'atomes limité, afin que les temps de calcul soient raisonnables. Pour éviter les effets de bords associés à la petite taille de la boîte, et pouvoir comparer les propriétés obtenues en simulations à celles déterminées expérimentalement sur un échantillon macroscopique, il faut ajouter au modèle moléculaire des conditions périodiques aux frontières [35]. Cela signifie que le système effectivement simulé n'est pas uniquement constitué des atomes de la boîte de simulation, mais est un système périodique comprenant des répliques à l'infini de cette boîte [27] (voir figure 1.11). Ainsi, si un atome sort d'un côté de la boîte, un atome image rentre simultanément au niveau de la face opposée, avec la même vitesse [24, 27].

Le calcul des forces non liantes entre les différents atomes vérifie la convention de l'image minimale, qui impose qu'un atome donné ne peut interagir qu'avec la plus proche de toutes les répliques d'un autre atome [25]. Notons que malgré les conditions périodiques aux frontières, les fluctuations qui s'effectuent à des échelles supérieures à la taille de la boîte de simulation ne peuvent pas être observées [24, 27].

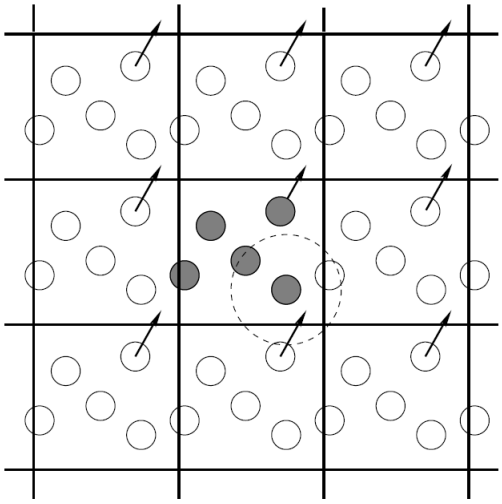


FIGURE 1.11 – *Illustration des conditions périodiques aux frontières. Lorsqu'un atome sort d'un côté de la boîte, un atome image rentre simultanément au niveau de la face opposée. Le cercle en pointillés indique le cut-off pris en compte pour le calcul des interactions, qui tient compte à la fois des atomes réels et des atomes images. Image d'Allen (2004) [25].*

1.3.7 Résolution des équations du mouvement

Le champ de force permet de déterminer l'expression complète de la fonction énergie potentielle : le terme de force de l'équation issue de la deuxième loi de Newton (équation 1.6, page 17) est donc connu. Les accélérations, les vitesses et les positions de tous les atomes de la boîte peuvent ainsi être déterminés au cours du temps en résolvant les équations du mouvement.

1.3.7.a Méthode des différences finies

Il n'existe généralement pas de solution analytique aux équations du mouvement, du fait de la forme complexe de l'énergie potentielle, qui dépend de la position des N atomes de la boîte. C'est pourquoi les équations sont résolues numériquement, grâce à la méthode des différences finies [24, 26]. Plusieurs algorithmes permettent de résoudre ces équations. Nous présentons l'algorithme classique de Verlet, ainsi que l'algorihme *leap-frog*, que nous avons utilisé dans nos simulations. Ces méthodes reposent sur une approximation des positions, des vitesses et des accélérations par un développement de Taylor [24, 26] :

$$\boldsymbol{r}(t+\delta t) = \boldsymbol{r}(t) + \boldsymbol{v}(t)\ \delta t + \frac{1}{2}\ \boldsymbol{a}(t)\ \delta t^2 + \frac{1}{6}\ \boldsymbol{b}(t)\ \delta t^3 + \dots \tag{1.19a}$$

$$\boldsymbol{v}(t+\delta t) = \boldsymbol{v}(t) + \boldsymbol{a}(t)\ \delta t + \frac{1}{2}\ \boldsymbol{b}(t)\ \delta t^2 + \dots \tag{1.19b}$$

$$\boldsymbol{a}(t+\delta t) = \boldsymbol{a}(t) + \boldsymbol{b}(t)\ \delta t + \dots \tag{1.19c}$$

avec $\boldsymbol{v}(t)$ la vitesse à l'instant t, $\boldsymbol{a}(t)$ l'accélération et $\boldsymbol{b}(t)$ la dérivée troisième de la position.

Algorithme de Verlet L'agorithme de Verlet calcule les nouvelles positions à l'instant $t+\delta t$ à partir des positions aux instants t et $t-\delta t$, et des accélérations à l'instant t, déterminées à

l'aide du champ de force. En effet, avec les développements de Taylor, on a [24, 26] :

$$\boldsymbol{r}(t-\delta t) = \boldsymbol{r}(t) - \boldsymbol{v}(t)\ \delta t + \frac{1}{2}\ \boldsymbol{a}(t)\ \delta t^2 - \dots \tag{1.20a}$$

$$\boldsymbol{r}(t+\delta t) = \boldsymbol{r}(t) + \boldsymbol{v}(t)\ \delta t + \frac{1}{2}\ \boldsymbol{a}(t)\ \delta t^2 + \dots \tag{1.20b}$$

En sommant ces deux équations, on en déduit [24, 26] :

$$\boldsymbol{r}(t+\delta t) = 2\ \boldsymbol{r}(t) - \boldsymbol{r}(t-\delta t) + \boldsymbol{a}(t)\ \delta t^2 \tag{1.21}$$

On remarque que l'algorithme de Verlet ne calcule pas explicitement les vitesses, mais il est possible de les calculer à l'aide de la formule suivante [24] :

$$\boldsymbol{v}(t) = \frac{\boldsymbol{r}(t+\delta t) - \boldsymbol{r}(t-\delta t)}{2\ \delta t} \tag{1.22}$$

Algorithme *leap-frog* L'algorithme *leap-frog* (ou « saut de grenouille ») est appelé ainsi car les positions et les vitesses sont calculées à des instants décalés : en effet, les positions à l'instant $t+\delta t$ sont déduites des positions à l'instant t et des vitesses à l'instant $t+\frac{1}{2}\delta t$. Les expressions des positions et des vitesses sont [24, 26] :

$$\boldsymbol{r}(t+\delta t) = \boldsymbol{r}(t) + \boldsymbol{v}(t+\frac{1}{2}\delta t)\ \delta t \tag{1.23a}$$

$$\boldsymbol{v}(t+\frac{1}{2}\delta t) = \boldsymbol{v}(t-\frac{1}{2}\delta t) + \boldsymbol{a}(t)\ \delta t \tag{1.23b}$$

1.3.7.b Conditions initiales

Les trajectoires et les vitesses des atomes peuvent donc être déterminées à tout instant grâce à la résolution des équations de Newton par la méthode des différences finies. Cette méthode est dite déterministe, c'est-à-dire qu'en connaissant les positions et les vitesses à l'instant initial, on peut les calculer à tout instant [26]. Les positions initiales des atomes sont connues, puisqu'elles sont fixées lorsque la topologie du système est définie. En revanche, les vitesses initiales sont déterminées à partir d'une distribution aléatoire. Les valeurs des vitesses suivent une distribution de Maxwell-Boltzmann centrée sur la température T, c'est-à-dire que la densité de probabilité de la vitesse dans un milieu à l'équilibre thermodynamique vaut [26, 27, 36] :

$$p(\boldsymbol{v}) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{3/2}\ e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}} \tag{1.24}$$

De plus, la distribution initiale des vitesses est telle que le moment global P soit nul [26] :

$$\boldsymbol{P} = \sum_{i=1}^{N} m_i \boldsymbol{v}_i = \boldsymbol{0} \tag{1.25}$$

Nous étudions la variabilité de l'évolution d'un système en réalisant plusieurs répliques de simulations, qui présentent le même état initial mais des vitesses initiales modifiées aléatoirement.

1.3.7.c Pas de temps

La résolution des équations de Newton permet de calculer l'évolution au cours du temps d'un système dont on connaît les positions et les vitesses des atomes à l'instant initial. Le pas de temps d'une simulation, c'est-à-dire l'intervalle de temps δt qui s'écoule entre deux calculs des positions des atomes, doit être choisi avec attention. En effet, un pas de temps très petit

donne des résultats plus précis mais engendre des calculs très longs. En revanche, un pas de temps trop grand ne permet pas de prendre en compte certains mouvements très rapides, tels que les vibrations intramoléculaires. De plus, cela peut conduire à une simulation instable et à une dérive de l'énergie. La durée du pas de temps est en général de l'ordre de la femtoseconde [27], typiquement 2 fs.

1.3.8 Les limites de la dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire permettent donc de calculer l'évolution au cours du temps d'un système moléculaire, grâce à la résolution des équations du mouvement pour chacun des atomes. Les interactions liantes et non liantes qui s'exercent entre les différents atomes du système sont décrites à l'aide d'un champ de force, qui contient des valeurs spécifiques pour chaque type d'atome en fonction de son environnement chimique. Cette technique présente cependant plusieurs limites.

Tout d'abord, il peut exister une imprécision concernant les valeurs données aux différents paramètres du champ de force, dont les valeurs sont déduites soit de considérations empiriques, soit de simulations de mécanique quantique. De plus, la description des interactions entre atomes présente des simplifications : par exemple, les interactions non liantes à plus de deux atomes sont négligées. Enfin, nous ne considérons que des champs de forces classiques qui, contrairement aux champs de force réactifs, ne permettent pas de modéliser la création ou la rupture de liaisons chimiques. L'évolution des systèmes moléculaires n'est donc expliquée que par l'établissement d'interactions faibles entre les différents atomes modélisés.

Une autre limite est liée aux échelles de temps et à la taille des systèmes considérés. En effet, pour conserver un temps de calcul raisonnable, il est nécessaire de limiter la durée des simulations (typiquement à quelques centaines de nanosecondes), ce qui ne permet pas d'observer des phénomènes plus lents. De plus, toujours en raison du temps de calcul, le nombre d'atomes pouvant être contenus dans le système est restreint, et donc la taille des systèmes étudiés est limitée.

Enfin, les simulations de dynamique moléculaire ne permettent pas la réalisation de calculs de mécanique quantique. Les atomes sont représentés comme des sphères dures interagissant entre elles et il n'est pas possible modéliser la déformation de leur nuage électronique par exemple.

1.4 Étude des interactions protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire

Dans cette partie, nous nous intéressons tout d'abord au principe des simulations SMD, qui apportent des informations sur le phénomène de reconnaissance moléculaire puisqu'elles permettent notamment d'étudier le détachement entre un récepteur et un ligand, par analogie avec une expérience d'AFM en mode SMFS. Nous présentons ensuite différentes méthodes permettant de calculer l'énergie d'interaction protéine - ligand grâce à des simulations de dynamique moléculaire.

1.4.1 Modélisation du détachement en simulations de dynamique moléculaire dirigées (SMD)

Les simulations de dynamique moléculaire dirigées, ou *steered molecular dynamics simulations* (SMD) sont des simulations dans lesquelles le comportement du système est modifié, en appliquant une force, pour permettre l'observation de phénomènes qui ne seraient pas observables en simulations de dynamique moléculaire conventionnelles [37, 38]. Par exemple, la

force appliquée peut induire le dépliement d'une protéine, afin d'observer les changements de conformation associés [38]. Dans notre cas, la force est appliquée au ligand afin d'observer son détachement de la protéine, comme dans une expérience d'AFM en mode SMFS.

On distingue deux protocoles de simulations SMD : le protocole à force constante et celui à vitesse de tirage constante. Le protocole à force constante consiste à appliquer une force constante à un atome ou groupe d'atomes, en plus du potentiel décrit par le champ de force [18]. Le protocole à vitesse de tirage constante consiste à appliquer un potentiel externe entre un atome ou groupe d'atomes (le ligand) et un point fictif, et à déplacer ce point fictif à vitesse constante dans la direction choisie, pour engendrer un mouvement le long de la coordonnée de réaction [18, 37]. S'il n'y a qu'une seule coordonnée de réaction x et que le potentiel appliqué est harmonique, celui-ci est exprimé par [37, 39] :

$$U = \frac{K}{2}(x - x_0)^2 \tag{1.26}$$

avec K la constante de force et x_0 la position initiale du point fictif. Celui-ci étant déplacé à une vitesse constante v, la force externe exercée sur le système vaut [37, 39] :

$$F = K(x_0 + vt - x) \tag{1.27}$$

Cette force modélise le fait que le ligand soit tiré par un ressort de constante de raideur K, dont l'extrémité est déplacée à la vitesse v [37]. Le ligand peut ainsi être détaché de sa position initiale dans la protéine et créer de nouveaux contacts le long de son chemin de détachement [18, 37]. Ces simulations permettent notamment d'observer la dissociation entre le ligand et la poche de liaison, et de déterminer la force appliquée sur le ligand et sa position au cours du temps [37]. Notons que le choix de la direction de tirage est très important car il influence les résultats obtenus.

Pour éviter des calculs trop importants, les vitesses de tirage utilisées en simulations SMD (typiquement entre 10^3 et 10^7 μm·s^{-1}) sont beaucoup plus élevées que celles employées en AFM conventionnel (entre nm·s^{-1} et quelques μm·s^{-1}) [18, 40]. Cependant, la valeur de la force de rupture augmente avec la force de tirage, comme le montre l'allure du spectre de force dynamique. Les forces de rupture obtenues en simulations sont donc également plus élevées que les valeurs expérimentales [18]. De plus, le processus de détachement modélisé étant très rapide, les variations entre les différents états du système ne sont pas quasi-statiques (infiniment lentes), et le système n'est pas l'équilibre. Les simulations SMD sont donc des simulations hors-équilibre : elles permettent de déterminer des forces de rupture, mais on ne peut pas directement en déduire de variation d'énergie libre [18, 41].

1.4.2 Calcul de l'énergie libre de liaison récepteur - ligand

Le calcul de l'énergie libre de liaison d'un complexe récepteur - ligand peut être réalisé à l'aide de différentes méthodes. On distingue notamment les méthodes du point final et les méthodes de calcul le long du chemin de détachement [42].

Les méthodes du point final permettent de calculer l'énergie libre de liaison en ne considérant que les états libre (récepteur et ligand séparés) et lié (complexe récepteur - ligand). On pourra notamment citer les méthodes MM-PBSA (*Molecular Mechanics - Poisson-Boltzmann Surface Area*) et MM-GBSA (*Molecular Mechanics - Generalized Born Surface Area*), ainsi que la méthode LIE (*Linear Interaction Energy*). Ces méthodes sont assez rapides, mais leur précision est limitée [42]. En effet, pour les méthodes MM-PBSA et MM-GBSA, le résultat obtenu dépend très fortement de la valeur de la constante diélectrique du soluté, qui peut être difficile à

identifier (le choix devant tenir compte à la fois des propriétés de la protéine et du ligand) [42]. De plus, si les calculs pour les états libre et lié sont réalisés à partir d'une seule trajectoire, on ne tient pas compte des changements de conformation au niveau du site de liaison de la protéine selon que celle-ci est liée ou non au ligand [42].

Les méthodes de calcul le long du chemin de détachement consistent à échantillonner le chemin de dissociation du complexe, à partir de l'état lié [42]. Elles permettent de déterminer le potentiel de force moyenne, ou *potential of mean force* (PMF), qui correspond à la variation d'énergie libre déterminée le long de la coordonnée de réaction choisie pour le détachement [18] (voir paragraphe 1.4.2.b). Par exemple, l'égalité de Jarzynski [43] et l'*umbrella sampling* [38] sont des méthodes permettant de calculer le PMF à partir de simulations SMD.

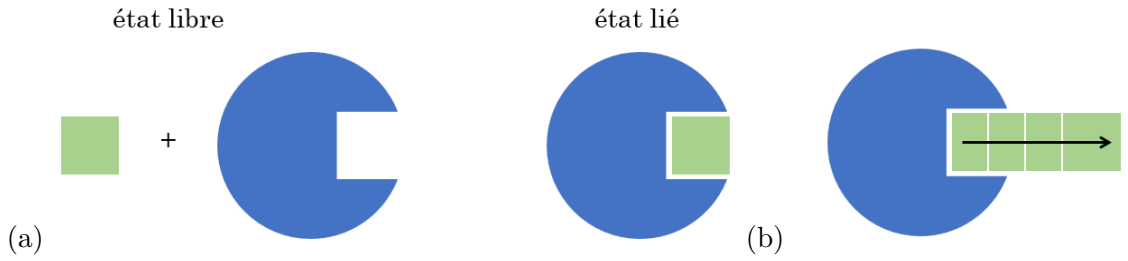


FIGURE 1.12 – *Représentation des méthodes (a) du point final et (b) du chemin de détachement. Pour les méthodes du point final, l'énergie libre est déterminée pour les états libre et lié séparément. Pour les méthodes du chemin de détachement, le ligand (en vert) est progressivement dissocié de la protéine (en bleu) et le PMF est calculé le long du chemin de détachement. Image adaptée de de Ruiter et Oostenbrink (2011) [42].*

1.4.2.a L'égalité de Jarzynski

L'égalité de Jarzynski permet de déterminer la variation d'énergie libre ΔF, qui est une propriété à l'équilibre, à partir des résultats de plusieurs réalisations de simulations SMD, bien que celles-ci soient des simulations hors-équilibre [43, 44]. En effet, les simulations SMD permettent de déterminer W, le travail total exercé sur le système. D'après le deuxième principe de la thermodynamique, pour un système maintenu en contact avec un thermostat à la température T, initialement dans un état A à l'équilibre et amené dans un état B également à l'équilibre, mais de façon non quasi-statique, on a l'inégalité suivante [43, 44, 45] :

$$< W > \geq \Delta F \tag{1.28}$$

avec ΔF la variation de l'énergie libre de Helmhotz. Notons que $< W > - \Delta F$ correspond au travail dissipé, lié à l'accroissement de l'entropie au cours du processus irréversible. De plus, on a l'égalité $< W > = \Delta F$ dans le cas d'un processus quasi statique (infiniement lent) [44, 45].

L'égalité de Jarzynski permet de calculer la valeur de la variation d'énergie libre à partir de plusieurs réalisations de simulations SMD hors-équilibre [44] :

$$\mathrm{e}^{-\beta \Delta \mathrm{F}} = < \mathrm{e}^{-\beta \mathrm{W}} > \tag{1.29}$$

avec $\beta = \frac{1}{k_B T}$.

Remarque : Dans ce paragraphe uniquement, F ne désigne pas une force mais l'énergie libre de Helmholtz F, déterminée pour un système à nombre de particules, volume et température constants. On la distingue de l'énergie libre de Gibbs, ou enthalpie libre G, qui est déterminée à

nombre de particules, pression et température constants (voir paragraphe 1.2.2, page 10). Enfin, dans la suite, le PMF est noté $\mathcal{W}$.

1.4.2.b L'*umbrella sampling*

L'*umbrella sampling* est une méthode d'échantillonnage dite à l'équilibre [46, 47]. Elle permet en effet de déterminer le potentiel de force moyenne (PMF) entre une protéine et un ligand à partir d'une seule simulation SMD modélisant la dissociation du complexe, en échantillonnant cette trajectoire pour déterminer le chemin à l'équilibre.

Potentiel de force moyenne Pour déterminer une différence d'énergie libre entre deux états thermodynamiques (dans notre cas, les états libre et lié), il est nécessaire de pouvoir les caractériser. Pour cela, on définit une coordonnée de réaction ξ, c'est-à-dire un paramètre continu à une ou plusieurs dimensions qui varie en fonction de l'état thermodynamique du système. ξ est généralement un critère géométrique, par exemple une distance (la distance entre le centre de masse de la protéine et le centre de masse du ligand) ou un angle [48]. On peut ainsi définir l'énergie libre le long de la coordonnée de réaction, c'est-à-dire le PMF [48], noté $\mathcal{W}(\xi)$, par [49] :

$$\mathcal{W}(\xi) = \mathcal{W}(\xi^*) - k_B T \ln(\frac{< \rho(\xi) >}{< \rho(\xi^*) >}) \tag{1.30}$$

avec ξ^* et $\mathcal{W}(\xi^*)$ des constantes arbitraires et $< \rho(\xi) >$ la fonction de distribution moyenne. Ainsi, $< \rho(\xi) > d\xi$ représente la probabilité que le système se trouve dans le petit intervalle $d\xi$ autour de ξ [48].

Nécessité d'un échantillonnage spécifique Au cours, d'une simulation de dynamique moléculaire, l'espace des configurations est bien échantillonné dans les régions de faible énergie (états stables, par exemple le complexe lié d'une part et la protéine et le ligand détachés de l'autre), mais pas dans les régions d'énergie élevée (état de transition) [48]. Cela permet de déterminer la configuration la plus stable du système étudié. En revanche, l'échantillonnage des régions d'énergie élevée, qui correspondent aux barrières d'énergie le long de la coordonnée de réaction, est nécessaire pour le calcul de la fonction de distribution $< \rho(\xi) >$ et du PMF $W(\xi)$ [48]. Il est donc nécessaire d'utiliser une technique d'échantillonnage spéciale pour calculer le PMF le long de la coordonnée de réaction. C'est l'objectif de l'*umbrella sampling* [49], dont le principe est présenté dans la suite.

Définition des fenêtres d'échantillonnage Pour déterminer le chemin à l'équilibre reliant les deux états thermodynamiques correspondant d'une part au complexe lié et d'autre part au récepteur et au ligand séparés, le chemin hors-équilibre obtenu à l'aide de la simulation SMD est divisé en plusieurs fenêtres d'échantillonnage, situées à des distances croissantes entre les centres de masse du ligand et de la protéine, comme illustré sur la figure 1.13 (a).

Introduction d'un potentiel de biais Une fois que les fenêtres sont définies, on réalise une simulation de dynamique moléculaire pour chacune, afin de déterminer la configuration à l'équilibre du ligand et du récepteur à cette étape du détachement. Pour contraindre le système à rester dans la fenêtre considérée même si elle est défavorable énergétiquement, un potentiel additionnel, appelé potentiel de biais, est ajouté [50]. Ce potentiel, noté $w(\xi)$, permet de confiner l'échantillonnage des configurations autour d'une valeur précise de la coordonnée de réaction ξ_i^{ref}. Le potentiel de biais est généralement harmonique [49] :

$$w_i(\xi) = \frac{K_i}{2}(\xi - \xi_i^{ref})^2 \tag{1.31}$$

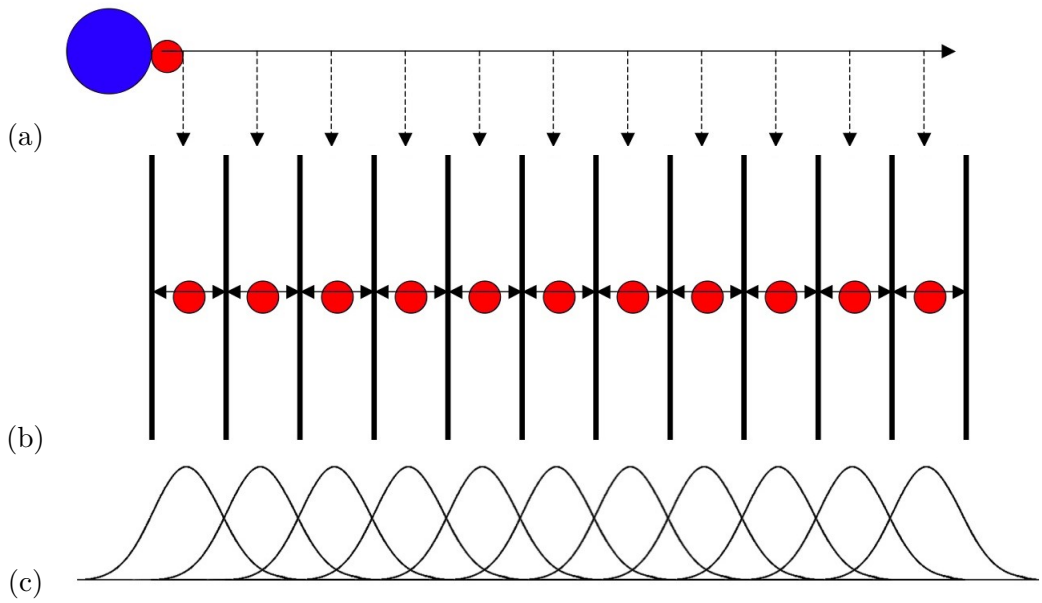


FIGURE 1.13 – *Schéma présentant le principe de l'umbrella sampling : (a) des fenêtres d'échantillonnage sont définies le long de la coordonnée de réaction, (b) des simulations indépendantes sont effectuées, en contraignant la protéine dans chaque fenêtre à l'aide d'un potentiel de biais, et (c) l'histogramme idéal des configurations obtenues montre une superposition pour les différentes fenêtres. Images de Lemkul (2019) [41].*

avec K_i la constante de force. Au total, un ensemble de N_w simulations centrées sur différentes positions ξ_i^{ref}, $i \in [1, N_w]$ sont réalisées [49, 50], comme illustré sur la figure 1.13 (b).

Le choix de la valeur de K_i est une étape importante et assez difficile, car elle doit être réalisée avant les simulations. La valeur de K_i doit être suffisamment grande pour permettre au système de franchir les barrières de potentiel, mais si la valeur de K_i est trop grande, l'échantillonnage est centré trop étroitement autour de ξ_i^{ref} et il n'y a pas de recouvrement entre les différentes fenêtres. Or ce recouvrement est nécessaire lors de l'étape suivante [48].

Méthode d'analyse de l'histogramme pondéré À l'issue des N_w simulations, les résultats sont assemblés afin d'obtenir le profil du PMF le long de la coordonnée de réaction ξ [48]. En effet, on obtient pour chaque fenêtre de simulation un histogramme $h_i(\xi)$ qui présente la distribution de probabilité des configurations $P_i^b(\xi)$ le long de la coordonnée de réaction, biaisée par le potentiel $w_i(\xi)$ [50], comme illustré sur la figure 1.13 (c). Il faut ensuite déterminer les valeurs non biaisées $P_i(\xi)$ de la probabilité de distribution, en recombinant les valeurs obtenues dans les différentes fenêtres, afin d'en déduire une fonction de distribution continue de toutes les configurations et donc le profil du potentiel de force moyenne (PMF) le long de la coordonnée de réaction [49, 50].

La technique la plus utilisée pour déterminer le PMF à partir des histogrammes $h_i(\xi)$, c'est-à-dire pour retirer le biais des distributions $P_i^b(\xi)$, est la méthode d'analyse de l'histogramme pondéré, ou *Wheighted Histogram Analysis Method* (WHAM) [51]. Cette méthode consiste à construire, par itérations, une estimation optimale de la fonction de distribution non biaisée [49, 50]. La présence d'un recouvrement entre les différentes fenêtres est essentielle pour pouvoir déterminer toutes les constantes. En fonction du nombre d'histogrammes et de la hauteur des barrières de PMF, les équations peuvent être résolues en une dizaine d'itérations ou en nécessiter

jusqu'à des dizaines de milliers [50].

1.4.2.c La méthode MM-PBSA

La méthode MM-PBSA (*Molecular Mechanics - Poisson-Boltzmann Surface Area*) est une technique permettant de calculer l'énergie libre de liaison entre un récepteur et un ligand. Cette méthode est dite du point final, puisque la variation d'énergie est calculée en ne considérant que l'état initial et l'état final, c'est-à-dire le complexe, ainsi que le récepteur et le ligand pris séparément [52]. L'énergie libre de liaison correspond à la variation d'énergie libre au cours de la réaction [52] :

$$P + L \rightleftharpoons PL \tag{1.32}$$

avec P la protéine (récepteur) et L le ligand. La variation d'énergie libre ΔG est donc déterminée à partir de l'énergie libre des réactifs (G_P et G_L) et du produit (G_{PL}) de cette réaction [52] :

$$\Delta G =< G_{PL} > - < G_P > - < G_L > \tag{1.33}$$

L'énergie libre associée à chaque état (protéine P seule, ligand L seul ou complexe protéine - ligand PL) est déterminée en tenant compte de l'énergie mécanique moléculaire, de l'énergie libre de solvatation et de l'entropie conformationnelle [42, 52] :

$$G = E_{liaisons} + E_{elec} + E_{VdW} + G_{pol} + G_{np} - TS \tag{1.34}$$

avec $E_{liaisons}$, E_{elec} et E_{VdW} les termes associés aux interactions liantes (élongation, flexion et torsion), aux interactions électrostatiques et aux interactions de Van der Waals, respectivement. L'énergie libre de solvatation est déterminée à partir d'un modèle implicite (PBSA), dont G_{pol} et G_{np} sont les contributions polaire et non polaire [52]. La contribution polaire G_{pol} est déterminée en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann, tandis que la contribution non-polaire est généralement estimée à l'aide de la méthode SASA (*solvent accessible surface area*) [52]. Enfin, T est la température et S l'entropie [52]. Notons que le terme entropique est très long à calculer et souvent omis [52].

On distingue deux protocoles pour déterminer l'énergie libre de liaison. Le premier protocole, appelé protocole à trajectoires multiples, nécessite l'utilisation de trois simulations différentes pour évaluer l'énergie libre du complexe, du ligand et du récepteur séparément [52, 53] :

$$\Delta G =< G_{PL} >_{PL} - < G_P >_P - < G_L >_L \tag{1.35}$$

Le second protocole, ou protocole à trajectoire unique, ne considère qu'une seule simulation décrivant le complexe lié [52, 53] :

$$\Delta G =< G_{PL} - G_P - G_L >_{PL} \tag{1.36}$$

Ce deuxième protocole requiert moins de simulations et augmente la précision par rapport au protocole à trajectoires multiples. Notons que le terme $E_{liaisons}$ s'annule, car les conformations des états libre et lié sont les mêmes [52]. Ce protocole n'est donc approprié que lorsque les conformations de la protéine et du ligand sont proches dans les états libre et lié [53].

La méthode MM-PBSA est simple à mettre en œuvre, puisqu'il existe des programmes de calcul dédiés (par exemple g_mmpbsa [54] ou gmx_MMPBSA [55] pour le logiciel Gromacs). Elle soulève cependant toujours des questions quant à sa fiabilité et sa précision. En effet, la constance diélectrique du soluté, par exemple, influence fortement les résultats, mais le choix de la valeur la plus appropriée peut s'avérer difficile [42]. De plus, la qualité des résultats dépend du système étudié, et l'allongement de la simulation n'améliore pas forcément la corrélation avec les données expérimentales [42, 56].

1.5 Conclusion

En conclusion, ce chapitre présente l'apport des simulations de dynamique moléculaire pour l'étude des interactions protéine - ligand. Après avoir rappelé la notion de protéine, les propriétés physico-chimiques des acides aminés et la définition de l'énergie libre de liaison, nous avons décrit le principe de l'AFM en mode SMFS et son intérêt pour l'étude des interactions protéine - ligand. Cette technique s'intéresse en effet au détachement entre la protéine et le ligand, et permet de déterminer la force de rupture à un *loading rate* donné (produit de la vitesse de tirage par la constante de force du levier), mais également le spectre de force dynamique, c'est-à-dire l'évolution de la force de rupture en fonction du *loading rate*. Des informations sur le processus de détachement peuvent ainsi être obtenues, à l'échelle de l'interaction individuelle entre une protéine et un ligand.

La seconde partie de ce chapitre décrit le principe des simulations de dynamique moléculaire, qui peuvent apporter des informations sur les interactions protéine - ligand à l'échelle atomique. Nous avons rappelé la façon dont les interactions entre atomes sont décrites par le champ de force, et nous avons présenté les méthodes employées pour la résolution des équations du mouvement. Nous avons notamment évoqué le calcul des interactions à longue distance, les conditions périodiques aux frontières et les algorithmes de résolution des équations. Enfin, nous avons présenté quelques limites des simulations de dynamique moléculaire.

La dernière partie de ce chapitre s'intéresse aux méthodes de caractérisation des interactions protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire. Nous avons décrit le principe des simulations SMD, des simulations hors-équilibre permettant de modéliser le détachement entre la protéine et le ligand étudiés. Nous avons également évoqué différentes méthodes de calcul de l'énergie libre de liaison entre la protéine et le ligand. En particulier, nous avons présenté l'égalité de Jarzynski, qui permet de calculer l'énergie libre à partir de plusieurs réalisations de simulations SMD modélisant la dissociation du complexe, ainsi que l'*umbrella sampling*, une méthode d'échantillonnage à l'équilibre permettant de calculer le PMF (*Potential of Mean Force,* c'est-à-dire la variation d'énergie libre déterminée le long de la coordonnée de réaction choisie pour le détachement) à partir d'une simulation SMD. Enfin, nous avons présenté la méthode MM-PBSA, qui permet de calculer l'énergie libre de liaison à partir des seuls états libre et lié du complexe, sans modéliser le détachement entre la protéine et le ligand. Les méthodes de détermination de l'énergie de liaison le long du chemin de détachement requièrent des temps de calcul plus importants, mais sont plus précises que la méthode MM-PBSA.

CHAPITRE 2

Interactions protéine - surface en simulations de dynamique moléculaire et présentation des complexes étudiés

2.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les simulations de dynamique moléculaire sont bien adaptées à l'étude des interactions protéine - ligand, puisqu'elles apportent des informations à l'échelle atomique sur les interactions qui s'établissent entre les deux. Pour se rapprocher du biocapteur que nous souhaitons étudier, on s'intéresse à présent à l'étude de l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes, aux changements de conformation induits par cette immobilisation et à leur éventuel impact sur les interactions protéine - ligand.

La première partie de ce chapitre est consacrée aux monocouches de silanes. Nous présentons tout d'abord trois techniques classiques de caractérisation expérimentale des monocouches de silanes et les informations qu'elles permettent d'obtenir sur leur structure. Nous nous intéressons ensuite à leur modélisation en simulations de dynamique moléculaire. Nous présentons un état de l'art des différentes méthodes développées pour les modéliser, avec l'objectif de reproduire le plus fidèlement possible les structures obtenues expérimentalement.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous intéressons à la modélisation en simulations de dynamique moléculaire de l'adsorption des protéines sur différents types de surfaces et à l'impact de cette immobilisation sur les interactions protéine - ligand. Nous nous intéressons plus particulièrement à l'adsorption sur des monocouches de silanes.

Dans la troisième partie, nous évoquons l'organisation de l'eau et des ions aux interfaces et son impact sur l'adsorption des protéines ou des biomarqueurs. Nous présentons tout d'abord la structure de l'eau *bulk* observée en simulations de dynamique moléculaire. Nous nous intéressons ensuite à la perturbation de cette organisation au niveau de l'interface avec différents types de surfaces, et enfin à son impact sur le processus d'adsorption des biomolécules.

La quatrième partie de ce chapitre est dédiée au complexe streptavidine - biotine. Nous présentons le complexe et différentes études expérimentales et de simulations de dynamique moléculaire ayant permis de caractériser les interactions qui s'établissent entre la protéine et son ligand. Nous nous intéressons également à différents travaux ayant étudié l'impact de l'immobilisation de la streptavidine, par adsorption ou par liaison covalente, sur les interactions streptavidine - biotine.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est dédiée au complexe comprenant le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur de la protéine spike du SARS-CoV-2. Ce complexe n'a été étudié que très récemment, depuis le début de la pandémie de Covid-19, et nous présentons différents travaux expérimentaux et de simulations ayant permis de caractériser la structure du complexe et les interactions qui s'établissent entre les deux protéines.

2.2 Caractérisation des monocouches de silanes

Cette partie présente différentes techniques expérimentales de caractérisation des monocouches de silanes et des travaux ayant développé des méthodes de modélisation en simulations de dynamique moléculaire. Nous nous intéressons également aux différentes méthodes de caractérisation des monocouches de silanes présentées dans ces travaux et qui permettent de vérifier que la structure des monocouches modélisées correspond bien à celle observée expérimentalement.

2.2.1 Caractérisation expérimentale

2.2.1.a La fonctionnalisation de surface par des monocouches de silanes

Les organosilanes (désignés par le terme « molécules de silane ») forment des monocouches auto-assemblées, ou *Self-Assembled Monolayers* (SAM) et peuvent être utilisés pour fonctionnaliser de nombreux types de surfaces tels que des *wafers* de silicium, du mica, du verre ou même certains métaux permettant la création de liaisons Si-O (par exemple l'aluminium, grâce à sa couche d'oxyde en surface) [57].

Les organosilanes sont des composés de formule générale R_nSiX_{4-n} ($n = 1$, 2 ou 3) avec X un groupement hydrolysable (par exemple Cl-, CH_3O- ou CH_3CH_2O-) et R un groupement organique non hydrolysable. Le terme de fonctionnalité désigne le nombre de groupements hydrolysables de la molécule [58]. On appelle donc silane monofonctionnel une molécule présentant un seul groupement hydrolysable, et silane trifonctionnel, une molécule présentant trois groupements hydrolysables.

Le groupement non hydrolysable peut être porteur d'une fonction [58], permettant de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface fonctionnalisée. Cela permet de contrôler par exemple la mouillabilité de la surface : en fonction du groupement terminal, celle-ci peut présenter un caractère hydrophobe ou hydrophile [57]. Si elles sont préparées sur des surfaces lisses, les monocouches de silanes sont homogènes et présentent une rugosité très faible. De plus, elles sont robustes mécaniquement et stables à haute température [57]. Pour toutes ces raisons, les monocouches de silanes sont utilisées dans de nombreux domaines, notamment en tribologie (lubrification) ou pour des dispositifs microfluidiques [57]. Enfin, ces monocouches peuvent être utilisées dans la fabrication de biocapteurs, leur capacité à immobiliser des protéines ou de l'ADN ayant été démontrée [2, 3].

2.2.1.b Principe de la silanisation

Le mécanisme de greffage d'une molécule de silane trifonctionnelle sur une surface de SiO_2 est présenté sur la figure 2.1. Après l'hydrolyse d'un groupement hydrolysable (par exemple CH_3CH_2O-), une réaction de condensation permet la libération d'une molécule d'eau et la création d'une liaison siloxane [59], qui fixe de façon covalente la molécule de silane sur la surface.

Les molécules de silane multifonctionnelles sont connectées entre elles par des liaisons siloxane intermoléculaires, qui se forment par condensation [3] (figure 2.2). Ces réactions sont appelées

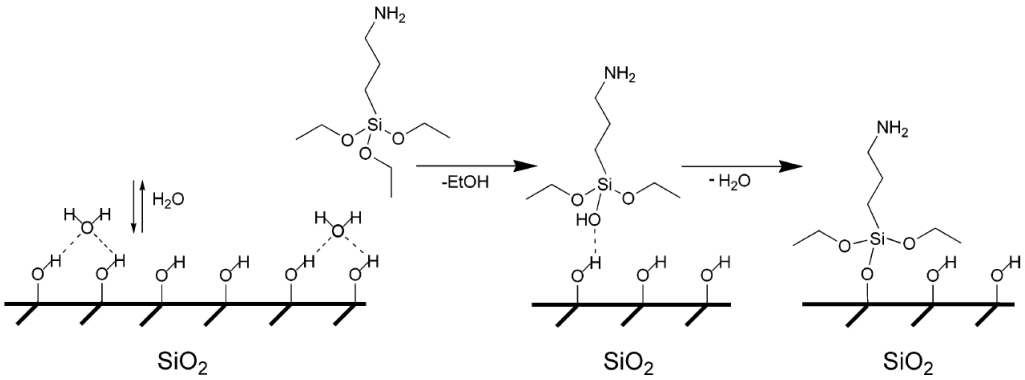


FIGURE 2.1 – *Mécanisme de greffage d'une molécule d'APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) sur une surface de SiO_2 présentant des groupements silanols : la molécule est d'abord hydrolysée puis liée à la surface de façon covalente par une réaction de condensation. Image de Howarter et Youngblood (2006) [60].*

réactions de réticulation (ou *cross-linking*) [57]. Les molécules multifonctionnelles présentent une réactivité plus élevée que les molécules monofonctionnelles et aboutissent à la formation d'une couche dense et compacte. De plus, sous certaines conditions, les longues chaînes aliphatiques peuvent interagir et aboutir à la formation d'une monocouche très ordonnée [3]. Cependant, ces réactions de réticulation peuvent entraîner la formation d'une couche de silanes épaisse et inhomogène, c'est pourquoi la maîtrise des conditions de réaction est primordiale [3]. En particulier, les molécules de silane doivent être conservées et manipulées sous atmosphère inerte [57].

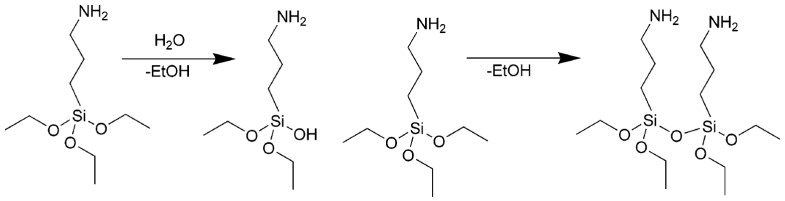


FIGURE 2.2 – *Mécanisme d'hydrolyse et de condensation de molécules d'APTES en solution. Image de Howarter et Youngblood (2006) [60].*

Les molécules de silane monofonctionnelles forment généralement des monocouches moins denses, la densité étant limitée par la présence de plusieurs groupements non hydrolysables. Elles sont cependant plus reproductibles que les monocouches multifonctionnelles, car le mécanisme de greffage est plus simple. En effet, les dimères qui peuvent se former en présence d'eau ne sont pas liés à la surface de façon covalente, et en sont facilement retirés [3]. C'est pourquoi nous étudions, au sein de notre équipe, des monocouches de silanes formées de molécules monofonctionnelles.

2.2.1.c Présentation des techniques expérimentales de caractérisation des monocouches de silanes

Spectrométrie de photoélectrons X (XPS) La spectrométrie de photoélectrons X, ou *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (XPS) est une technique d'analyse de surface permettant de déterminer la composition chimique de l'échantillon. Cette technique repose sur l'effet photoélectrique : des photons (rayons X) sont absorbés par l'échantillon et leur énergie permet l'émission d'électrons, dont l'énergie est caractéristique d'un élément chimique, qui sont ensuite détectés.

Plus précisément, l'échantillon placé sous ultravide est irradié par des rayons X d'énergie donnée, issus soit d'une source conventionnelle Mg Kα (1253,6 eV) ou Al Kα (1486,6 eV), soit d'une source de lumière synchrotron. Les rayons X interagissent avec les atomes de la surface, et il en résulte l'émission de photoélectrons dont l'énergie cinétique est mesurée par le détecteur. On obtient un spectre présentant le nombre de photoélectrons détectés en fonction de leur énergie cinétique. Le spectre de l'échantillon est approximativement la somme des spectres de ses constituants. En effet, chaque élément chimique possède un spectre unique, puisque l'énergie cinétique des photoélectrons E_C est reliée à l'énergie des rayons X ($h\nu$) et à l'énergie de liaison (E_L) correspondant à l'orbitale atomique dont l'électron est issu par la relation [61] :

$$h\nu = E_L + E_C + \Phi_S \tag{2.1}$$

avec Φ_S le travail de sortie du spectrophotomètre.

La spectrométrie de photoélectrons X permet donc d'identifier les éléments chimiques situés sur la surface de l'échantillon, mais également les liaisons chimiques entre ces éléments. En effet, les liaisons chimiques engendrent une légère modification de la position des pics du spectre, appelée déplacement chimique, qui dépend du type de liaison. La concentration des différents constituants de l'échantillon peut aussi être déterminée, grâce à la mesure de la hauteur ou de l'aire des différents pics. La concentration relative de l'élément x, notée c_x, est donnée par la relation [61] :

$$c_x = \frac{I_x/S_x}{\sum_i I_i/S_i} \tag{2.2}$$

avec I_i, le nombre de photoélectrons par seconde pour le pic du spectre associé au constituant i et S_i, le facteur de sensitivité associé à ce constituant.

Notons que, bien que les rayons X puissent pénétrer la surface sur 1 à 10 μm, la spectrométrie de photoélectrons X ne permet d'étudier que les premières couches atomiques de la surface, en raison du libre parcours moyen des électrons [61].

Plusieurs études [62] ont montré la possibilité de détecter des monocouches de silanes par XPS, en particulier grâce à l'étude de la composante Si - O - Si qui apparaît dans le spectre de l'élément Si2p. Il est également possible de déterminer la quantité de silanes greffés par unité de surface [63]. Cependant, cette quantification présente de grosses incertitudes, liées à la détermination des libres parcours moyens et à la présence de plusieurs couches de différents éléments (molécules de silane, SiO_2, Si).

ATR - FTIR La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée, ou *Attenuated Total Reflection - Fourier Transform InfraRed spectroscopy* (FTIR) est une technique de spectroscopie d'adsorption simple et non destructive, particulièrement intéressante pour l'étude des monocouches auto-assemblées (SAM) sur des surfaces, puisqu'elle donne accès à de nombreuses informations concernant les liaisons chimiques, mais également la conformation des chaînes alkyles ou l'orientation des groupes fonctionnels, lorsque le faisceau incident est polarisé [64].

Le principe de cette technique est le suivant : l'échantillon est éclairé par un faisceau infrarouge et une partie de la lumière incidente est absorbée, pour des nombres d'ondes spécifiques, caractéristiques des différentes liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. En effet, les liaisons chimiques vibrent à des fréquences de résonance spécifiques, et la plupart des modes de vibration et de rotation se trouvent dans le moyen infrarouge (c'est-à-dire pour des nombres

d'onde compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1}). On peut observer différents modes de vibration, notamment ceux correspondant à l'élongation et à la flexion des liaisons chimiques, avec des composantes symétriques et asymétriques pour chacun.

Les travaux de Porter *et al.* [65] et Barrett et Petersen [66] ont montré qu'il est possible de déduire des spectres de spectroscopie infrarouge l'angle d'inclinaison et le nombre de défauts gauches des chaînes alkyles de molécules formant des monocouches auto-assemblées. En particulier, Barrett et Petersen ont observé que les molécules de silane avec de courtes chaînes alkyles présentent plus de défauts gauches que les molécules avec de longues chaînes alkyles.

Microscopie à force atomique La microscopie à force atomique (AFM), dont le principe est présenté au paragraphe 1.2.3.a, page 12, permet d'étudier la rugosité des surfaces mais également les interactions qui peuvent s'établir avec la pointe, en réalisant des courbes force - distance.

Le taux de couverture et la rugosité de surface des monocouches de silanes peuvent être évalués par AFM. Lessel *et al.* [57] ont montré que, pour un wafer de silicium présentant une rugosité de 0,14 ± 0,02 nm, la monocouche d'octadecyltrichlorosilane (OTS) présente une rugosité de 0,17 ± 0,03 nm et un très faible retard de phase (moins de 2 °), démontrant l'homogénéité de la surface. De plus, Phaner-Goutorbe *et al.* [3] ont comparé la structure de monocouches de silanes fabriquées par silanisation en phase liquide ou en phase gazeuse. Cette étude a montré que la monocouche de silanes fabriquée par silanisation en phase liquide présente la même rugosité que le substrat de silice non fonctionnalisé, avec une valeur de RMS de $0,24 \pm 0,05$ nm, tandis que la monocouche issue de la silanisation en phase gazeuse présente une rugosité accrue, avec une valeur de RMS de $0,45 \pm 0,05$ nm.

2.2.2 Modélisation des monocouches de silanes en simulations de dynamique moléculaire

Les champs de force communément utilisés en simulations de dynamique moléculaire permettent de décrire les interactions entre molécules biologiques ou avec des petits composés chimiques, en solution aqueuse [22]. Ils ne sont cependant pas parfaitement adaptés à l'étude des interactions protéine - surface. Différents champs de force ont donc été développés afin de caractériser les interactions entre molécules biologiques et surfaces, notamment pour des surfaces cristallines métalliques (Au, Al), des surfaces de TiO_2, des surfaces minérales, des nanotubes de carbone ou encore des surfaces de SiO_2 amorphes ou cristallines [22]. Des monocouches auto-assemblées ont également été étudiées, et notamment des monocouches de thiols. Il s'agit de composés de formule R-SH, qui sont utilisés pour former des monocouches sur des surfaces d'or [67].

La modélisation du processus de fonctionnalisation d'une couche de SiO_2 par des molécules de silane constitue une question centrale car de nombreux paramètres influencent la structure de la monocouche obtenue, notamment la structure de la couche de SiO_2 [68, 69], la définition des interactions des molécules de silane entre elles et avec la surface de SiO_2 [70] et le champ de force [71]. Différentes méthodes ont récemment été développées mais, à notre connaissance, il existe assez peu d'études sur le sujet et aucune méthode n'est communément admise. Ce paragraphe présente différentes méthodes permettant de modéliser des monocouches de silanes et les propriétés des monocouches obtenues. On distingue notamment les méthodes utilisant un champ de force classique de celles ayant recours à un champ de force réactif, qui permet de modéliser des réactions chimiques.

2.2.2.a Méthodes utilisant un champ de force réactif

En 2015, les travaux de Black *et al.* [71] ont comparé les propriétés de monocouches de n-alkylsilanes, avec $n = 6$, 10, 14 ou 18, modélisées en simulations de dynamique moléculaire avec un champ de force réactif (ReaxFF) et un champ de force classique (OPLS tout-atome). Toutes les simulations ont été réalisées avec le logiciel LAMMPS. Pour les simulations utilisant le champ de force classique, différents types de surfaces de silice ont été considérés (silice cristalline, silice amorphe avec une rugosité plus ou moins importante), ainsi que la présence de défauts dans les monocouches de silanes (des molécules de silane ont été retirées). Avec le champ de force réactif, une procédure de simulation visant à modéliser la synthèse expérimentale a été développée. Tout d'abord, une couche de SiO_2 amorphe a été générée à partir d'une couche de SiO_2 cristalline, en chauffant le système jusqu'à 5000 K. Celle-ci a ensuite été exposée à des molécules de H_2O_2 afin d'observer la formation de groupes hydroxyles, par analogie avec le traitement des surfaces par une solution piranha dans la procédure expérimentale. Enfin, les molécules de silane ont été ajoutées au niveau des groupes hydroxyles, avec une densité comprise entre 3,9 et 4,9 nm^{-2}. Différents paramètres ont été analysés afin de comparer les propriétés de structure et de friction des différentes monocouches obtenues, notamment l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles, le paramètre d'ordre, la rugosité RMS et le coefficient de friction. Les résultats de cette étude ont montré que les propriétés des monocouches de silanes obtenues avec le champ de force classique et le champ de force réactif sont très proches. Cependant, l'introduction de défauts dans la monocouche entraîne une légère diminution de l'organisation et une légère augmentation de la friction, tandis que l'augmentation de la rugosité des monocouches de silanes entraîne une nette diminution de l'organisation et une augmentation de la friction.

En 2016, Deetz *et al.* [59] ont modélisé la formation de monocouches de silanes sur une surface de SiO_2 amorphe en simulations de dynamique moléculaire avec le champ de force réactif ReaxFF. Quatre types de molécules de silane ont été étudiées : le butyl-, l'octyl- et le dodecyltrimethoxysilane ainsi que le dodecyltrihydroxysilane, afin d'observer les effets de la longueur de la chaîne alkyle et de la nature des groupements hydrolysables sur la formation de la monocouche. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel LAMMPS et une procédure en plusieurs étapes a été définie pour modéliser la formation des monocouches de silanes. Tout d'abord, la formation de la couche de SiO_2 amorphe à partir d'une couche cristalline d'α-cristobalite a été modélisée à l'aide d'un cycle de chauffage et de refroidissement. La formation des groupements silanols sur la surface de SiO_2 a ensuite été modélisée en la mettant en contact avec des molécules d'eau. Enfin, la formation de la monocouche de silanes a été modélisée en mettant la surface en contact avec un mélange de molécules d'hexane et de silane (avec une molécule de silane pour 30 molécules d'hexane). Un réservoir infini de réactif a été modélisé, en ajoutant et en retirant périodiquement des molécules d'hexane et de silane loin de la surface. Ces travaux ont montré que la cinétique de fonctionnalisation est plus rapide avec les molécules d'hydroxysilane qu'avec les molécules de méthoxysilane. De plus, la structure des monocouches obtenues a été caractérisée grâce à l'angle d'inclinaison et à la distribution radiale de certains atomes sur la surface. Des morphologies similaires ont été observées pour les monocouches formées d'hydroxysilanes et de méthoxysilanes.

Les méthodes utilisant un champ de force réactif visent donc à reproduire le plus fidèlement possible le protocole expérimental de fabrication des monocouches de silanes. Cependant, les monocouches de silanes obtenues par Black *et al.* présentent des angles d'inclinaison plus élevés que les valeurs attendues [69]. De plus, ces simulations requièrent un temps de calcul environ 50 fois plus important que les simulations utilisant un champ de force classique. Des méthodes utilisant un champ de force classique ont donc également été développées.

2.2.2.b Méthodes utilisant un champ de force classique

Nous présentons dans ce paragraphe différentes méthodes permettant de modéliser des monocouches de silanes avec un champ de force classique et les propriétés des monocouches obtenues. Ces méthodes nécessitent de définir la structure de la monocouche à l'état initial de la simulation, ce qui peut fortement influencer la structure obtenue à l'état final, en fonction du modèle choisi. Tous les travaux présentés s'intéressent à des molécules de silane trifonctionnelles, cependant, les premiers travaux présentés (ceux de Castillo *et al.* [72] et Roscioni *et al.* [69]) ne prennent pas en compte les réactions de réticulation entre les différentes molécules de silane, tandis que les travaux de Kong *et al.* [70] et Black *et al.* étudient leurs effets sur la structure des monocouches obtenues.

En 2015, Castillo *et al.* [72] se sont intéressés à l'arrangement des molécules de silane dans des monocouches de dodecyltrichlorosilane (DTS) et d'octadecyltrichlorosilane (OTS) immobilisées sur une surface de SiO_2 sous forme cristobalite de dimensions 11,5 nm × 11,1 nm × 2,3 nm, avec différentes densités entre 1,0 et 5,52 nm^{-2}. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel Gromacs et un champ de force issu de OPLS tout-atome, et la structure initiale de la monocouche de silanes a été définie avec la méthode suivante : le nombre de molécules de silane correspondant à la densité souhaitée a été placé aléatoirement sur le SiO_2, à la place de certains groupements silanols (densité de 5,52 nm^{-2}), avec une conformation *trans* et une orientation aléatoire. De plus, une liaison covalente a été définie avec l'un des atomes d'oxygène du substrat. Différents paramètres ont été analysés, notamment l'épaisseur, la rugosité et la densité électronique des monocouches, ainsi que l'angle d'inclinaison et les défauts gauches des molécules de silane. Ces travaux ont montré que, pour une densité supérieure à 1 nm^{-2}, l'épaisseur des monocouches augmente avec leur densité suivant une loi quadratique, mais ne dépend pas de la longueur de la chaîne alkyle des molécules de silane. De plus, pour une densité supérieure à 1 nm^{-2}, l'angle d'inclinaison des molécules de silane dimininue avec la densité, toujours selon une loi quadratique, et ne dépend pas non plus de la longueur de la chaîne alkyle. La rugosité des monocouches de silanes dépend à la fois de la densité et de la longueur de la chaîne alkyle des molécules de silane. Pour les deux types de molécules de silane, la rugosité est maximale à une densité intermédiaire (environ 2 à 2,5 nm^{-2}), et plus faible à basse densité (à partir de 1,0 nm^{-2}) et à haute densité (jusqu'à 5,52 nm^{-2}). Par ailleurs, le nombre de défauts gauches diminue lorsque la densité des molécules de silane augmente. Enfin, la densité électronique des monocouches est qualitativement en accord avec les résultats expérimentaux. En revanche, les angles d'inclinaison obtenus sont inférieurs d'environ 10° à ceux mesurés expérimentalement, probablement à cause de la surface de SiO_2 choisie, qui est parfaitement cristalline.

En effet, l'impact de la rugosité de la couche de SiO_2 sur la structure d'une couche mince a été étudié par Roscioni *et al.* en 2013 [68]. Ces travaux étudient la fonctionnalisation d'une couche de SiO_2 cristalline sous force de cristobalite (001), et de deux couches de SiO_2 amorphe, l'une lisse et l'autre rugueuse, par des molécules de 4-*n*-pentyl-4'-cyano biphenyl (5CB). Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées pour une durée de 90 à 160 ns avec le logiciel NAMD et un champ de force spécifique, issu de prédécentes études, pour les différents éléments étudiés. Différents paramètres ont été analysés, notamment l'orientation des molécules de 5CB et les interactions qui s'établissent avec la surface. Les résultats ont montré que la structure de la couche de SiO_2 impacte à la fois l'orientation des molécules de la couche mince et la longueur de persistance de l'organisation obtenue.

En 2016, Roscioni *et al.* [69] ont caractérisé la structure de monocouches d'octadecyltrichlorosilane (OTS) et de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) sur des surfaces de SiO_2 amorphes, avec différentes densités comprises entre 2,5 et 4,5 nm^{-2}. L'étude a été réalisée avec le logiciel NAMD et un champ de force adapté de AMBER et OPLS et de calculs de chimie

quantique. Dans cette étude, aucune liaison covalente n'a été définie entre les molécules de silane et la surface de SiO_2. En effet, les molécules de silane trifonctionnelles totalement hydroxylées dont l'un des atomes d'hydrogène est retiré (c'est-à-dire une structure -OSi(OH)$_2$R) ont été directement placées sur la surface de SiO_2 à l'état initial, la liaison avec la surface étant assurée par d'importantes interactions électrostatiques et de Lennard-Jones entre l'atome d'oxygène du silane et un atome de silicium de la surface. Cette méthode a permis d'observer l'organisation spontanée des molécules sur la surface, une diffusion de quelques dizaines d'Å étant observée au cours de la simulation. La rugosité, l'épaisseur et la densité de charges des monocouches ont été étudiées en fonction de la densité, ainsi que l'angle d'inclinaison, la longueur, le paramètre d'ordre et la fonction de distribution radiale en deux dimensions des molécules de silane. Ces travaux ont montré que les monocouches de silane sont plutôt désordonnées à basse densité ($d < 3,2$ nm^{-2} pour FTDS, et $d < 3,6$ nm^{-2} pour OTS), et très ordonnées à haute densité. De plus, l'angle d'inclinaison des molécules d'OTS dépend fortement de leur densité, tandis que les molécules de FDTS sont plutôt orientées verticalement. Par exemple, la monocouche d'OTS à $d = 3,0$ nm^{-2} présente un angle d'inclinaison de 38°, une rugosité de 0,42 nm et 17 % des molécules sont en configuration *trans*. Il existe également un ordre de positionnement des molécules de silane, avec un arrangement présentant des domaines cristallins qui fusionnent à haute densité. Enfin, les monocouches d'OTS ne modifient pas le potentiel électrostatique du SiO_2, contrairement aux monocouches de FDTS. Notons que les monocouches obtenues avec cette méthode présentent une structure en accord avec les résultats expérimentaux concernant l'angle d'inclinaison, l'épaisseur et la distribution des molécules sur la surface.

En 2013, Kong *et al.* [70] ont étudié les effets de la méthode de liaison à la surface, de la longueur de la chaîne alkyle et du groupement terminal sur les propriétés de monocouches de silanes fonctionnalisant des surfaces de silice hydroxylées en simulations de dynamique moléculaire. Le logiciel Tinker-Linux a été utilisé, ainsi que le champ de force OPLS-AA avec une extension spécifique pour décrire le dioxyde de silicium cristallin et le champ de force UFF (*universal force field*) pour la description des molécules de silane. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées pour une durée de 1 ns. Trois couches de silice cristalline ont été étudiées : la β-cristobalite (111), la β-cristobalite (100) et la α-quartz (100). Les surfaces ont été fonctionnalisées avec des monocouches de silanes -Si(OH)$_2$(CH$_2$)$_n$CN et -Si(OH)$_2$(CH$_2$)$_n$COOH (avec $n = 2$, 6 ou 11). Enfin, six modes d'accroche ont été définis, reposant tous sur la définition de liaisons Si-O entre les molécules de silane et la surface, certains prenant en compte les effets des groupements hydroxyles de la surface et d'autres des réactions de réticulation entre les molécules de silane. Différents paramètres ont été étudiés, notamment l'épaisseur et la rugosité de la monocouche. Les résultats de cette étude ont montré que les valeurs de l'épaisseur des monocouches correspondent mieux aux données expérimentales lorsque les réactions de réticulation sont prises en compte, que lorsqu'une seule liaison à la surface est considérée. De plus, pour les systèmes tenant compte des réactions de réticulation, les monocouches sont plus ordonnées avec de courtes chaînes alkyles, contrairement aux systèmes avec une seule liaison, pour lesquels la monocouche est plus ordonnée avec une longue chaîne alkyle. Enfin, les résultats de ces travaux suggèrent que la nature des groupements terminaux a un effet assez faible sur l'arrangement des molécules et la morphologie de la surface.

En 2019, Black *et al.* [73] ont étudié l'impact de la prise en compte des réactions de réticulation entre les molécules de silane sur la structure de la monocouche et sur ses propriétés de friction. Différentes monocouches ont été considérées : des monocouches où toutes les molécules sont liées de façon covalente à la couche de SiO_2 et où les molécules suffisamment proches sont également réliées par des liaisons siloxane (Si-O-Si), et des monocouches où seulement certaines molécules de silane sont liées de façon covalente à la surface, les autres molécules étant reliées uniquement à d'autres molécules de silane, par liaisons siloxane (Si-O-Si). L'impact de la lon-

gueur de la chaîne alkyle a également été pris en compte. Les simulations ont été réalisées avec les logiciels LAMMPS et Gromacs et le champ de force OPLS tout-atome, avec des valeurs spécifiques pour décrire la silice et les molécules de silane. La structure des monocouches de silanes a été caractérisée par différents paramètres, notamment l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles, le paramètre d'ordre nématique et la proportion de défauts gauche. Ces simulations ont montré que la prise en compte des réactions de réticulation n'a pas d'effet sur les propriétés de friction. De plus, elle influence la structure des monocouches de silane, notamment l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles et le paramètre d'ordre nématique, mais de façon assez faible.

En conclusion, différentes méthodes ont été développées pour modéliser les monocouches de silanes. Les méthodes utilisant un champ de force classique requièrent des temps de calcul beaucoup moins importants que les méthodes utilisant un champ de force réactif, qui de plus ne permettent pas toujours de bien reproduire la structure attendue pour les monocouches de silanes. Cependant, les travaux présentés mettent en évidence la forte influence de la structure de la couche de SiO_2, cristalline ou amorphe, sur la structure des monocouches obtenues. Enfin, une étude se distingue parmi les travaux présentés : dans la méthode proposée par Roscioni *et al.* [69], aucune liaison covalente n'est définie entre les molécules de silane et la surface, la liaison étant assurée par d'importantes interactions électrostatiques et de Van der Waals. Cette méthode présente l'avantage de laisser les molécules s'organiser spontanément sur la surface de SiO_2.

2.3 Modélisation des interactions protéine - surface et protéine - ligand en simulations de dynamique moléculaire

Nous nous intéressons dans cette partie à l'étude, en simulations de dynamique moléculaire, de l'adsorption de biomolécules sur des surfaces et de l'impact des changements de conformation induits par cette immobilisation sur les interactions protéine - ligand.

2.3.1 Adsorption de biomolécules sur différents types de surfaces

Les simulations de dynamique moléculaire sont bien adaptées à l'étude du phénomène d'adsorption de protéines sur des surfaces, puisqu'elles permettent de caractériser les interactions protéine - surface et les changements de conformation induits dans les protéines à l'échelle atomique [22]. L'adsorption de protéines et de peptides sur des surfaces a été étudiée dans de nombreux travaux de dynamique moléculaire, avec des applications dans plusieurs domaines tels que la biocompatibilité des biomatériaux [74], la production d'énergie [75] ou les biocapteurs [76]. Différents travaux se sont intéressés à l'adsorption de biomolécules sur des surfaces cristallines, notamment d'or [77, 78], de graphite [74] ou de SiO_2 [79].

Concernant les monocouches auto-assemblées, de nombreux travaux de dynamique moléculaire se sont intéressés à l'adsorption de peptides et de protéines sur des monocouches de thiols. Par exemple, en 2002, Nordgren *et al.* [80] ont étudié l'adsorption du cytochrome c sur des monocouches de thiols avec un groupement terminal -CH_3 ou -OH. En 2005, Sun *et al.* [81] ont étudié l'adsorption du lysozyme sur des monocouches de thiols avec des groupements terminaux -CH_3, -OH, -COOH et -NH_2. En 2008, Hsu *et al.* [82] se sont intéressés à l'adsorption de la sérum-albumine humaine sur des molécules de thiol avec un groupement terminal -OH. En 2010, Wang *et al.* [83, 84] ont analysé l'adsorption du peptide β-amyloïde sur des monocouches de thiols avec des groupements terminaux -CH_3, -OH, -COOH et -NH_2. En 2013, Utesch *et al.* [75] ont caractérisé l'adsorption de l'hydrogénase [NiFe] sur des monocouches de thiols avec des groupements terminaux amine et différents niveaux de protonation. Ces études ont mis en évidence les effets de l'orientation inititale de la biomolécule et de la nature des groupements

terminaux des molécules de thiols sur les interactions entre la protéine et la surface.

De plus, en 2020, Xie *et al.* [76] ont montré, en simulations de dynamique moléculaire, la possibilité de contrôler l'orientation avec laquelle le lysozyme s'adsorbe sur une monocouche de thiols en appliquant un champ électrique. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel CHARMM et une monocouche de thiols mixant des molécules -$S(CH_2)_{10}COOH$ et -$S(CH_2)_3OH$. Cette étude a montré que l'application d'un champ électrique modifie l'hydrophobicité de la couche, les molécules ayant tendance à se courber et à exposer leur chaîne alkyle hydrophobe en surface sous l'effet d'un champ électrique négatif. Il est ainsi possible de modifier l'orientation la plus favorable du lysozyme adsorbé sur la surface.

Quelques travaux se sont également intéressés à l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes en simulations de dynamique moléculaire, notamment ceux d'Oliveira *et al.* [85] et To *et al.* [86].

En 2013, Oliveira *et al.* [85] ont étudié l'immobilisation de l'enzyme ACC *(acetyl coenzyme A carboxylase)* sur une surface de SiO_2 fonctionnalisée par un complexe APTES - glutaraldéhyde, par simulations de dynamique moléculaire. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel NAMD et les différentes molécules ont été décrites à l'aide du champ de force OPLS-AA et de paramètres spécifiques pour décrire l'APTES et le glutaraldéhyde. Cette étude a montré que des liaisons hydrogène apparaissent entre l'enzyme et la surface, principalement entre le groupe aldhéhyde et les acides aminés arginine et lysine. De plus, l'orientation finale de l'enzyme par rapport à la surface permet de conserver son activité biologique, c'est-à-dire sa capacité à interagir avec d'autres molécules. Enfin, la déformation de la structure de la protéine a été étudiée en analysant les angles dihédraux et en traçant un diagramme de Ramachandran, et aucun changement significatif de structure n'a été détecté.

En 2015, To *et al* [86] ont étudié la fonctionnalisation de surface avec deux types de silanes, le 3-(aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) et le 3-(glycidyloxypropyl)dimethylethoxysilane (GO PES), pour l'immobilisation d'un anticorps MACF (*monoclonal anti-cytokeratin-FITC*). Cette étude couple des résultats expérimentaux et des simulations. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel Materials Studio et le champ de force COMPASS. Il a été montré par AFM que l'immobilisation de l'anticorps est plus efficace sur le silane APTES que sur le GOPES. De plus, l'étude de l'énergie de liaison entre les silanes et le SiO_2 en simulations montre que l'immobilisation de l'APTES sur la surface de SiO_2 est thermodynamiquement plus favorisée que l'immobilisation du GOPES.

En conclusion, de nombreux travaux se sont intéressés à l'étude du phénomène d'adsorption des biomolécules sur différents types de surfaces. Ils ont mis en évidence les effets de la charge de la surface ou de son hydrophobicité sur le processus d'adsorption des biomolécules, leur orientation finale sur la surface et les changements de conformation induits par l'adsorption. De plus, des études modélisant l'adsorption de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées de thiols ou de silanes ont mis en évidence l'influence du groupement terminal des molécules sur les interactions protéine - surface.

2.3.2 Impact de l'immobilisation sur une surface sur les interactions protéine - ligand

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent (voir paragraphe 1.4, page 24), les simulations de dynamique moléculaire sont bien adaptées à l'étude des interactions protéine - ligand ou protéine - protéine puisqu'elles permettent de déterminer la conformation du complexe à l'équilibre, mais également de caractériser le phénomène de reconnaissance moléculaire à l'échelle

atomique. De nombreux travaux de dynamique moléculaire se sont intéressés à la caractérisation de différents types de complexes, grâce à l'étude de leur détachement en simulations SMD [87, 88, 89] ou bien avec la détermination de leur énergie libre de liaison [90, 91, 92]. Si la plupart des études s'intéressent à des complexes en solution, quelques travaux caractérisent l'impact de l'immobilisation d'une des deux biomolécules sur une surface sur les interactions établies au sein du complexe. Nous présentons ici deux travaux s'intéressant à l'immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées (l'une de thiols, l'autre de silanes) et qui caractérisent l'impact de cette immobilisation sur les interactions dans les complexes étudiés.

En 2017, Ruan *et al.* [93] se sont intéressés à l'immobilisation du complexe aptamère ARN - flavine mononucléotide sur une surface d'or Au(111) fonctionnalisée par une monocouche auto-assemblée d'hexanolthiol par l'intermédiaire d'un lien chimique composé de six nucléotides thymine (T6). Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel amber12 et les champs de force ff99SBildn et GAFF. De plus, l'énergie libre de liaison entre l'aptamère et la flavine a été déterminée par MM-GBSA. Cette étude a montré que l'énergie de liaison obtenue pour le complexe en solution ($-24,7$ kcal·mol^{-1}) est cohérente avec les valeurs expérimentales, et que l'ajout du lien chimique T6 à l'aptamère ne modifie pas les interactions avec la flavine. Lorsque l'apatmère est immobilisé par l'intermédiaire du lien T6, celui-ci reste éloigné et n'interagit pas avec la surface. Cependant, l'aptamère subit des changements de structure qui induisent une diminution de l'affinité avec la flavine, avec une énergie libre de liaison de $-11,6$ kcal·mol^{-1}. Ceux-ci ont notamment été reliés à une distribution inhomogène des cations dans la direction normale à la surface.

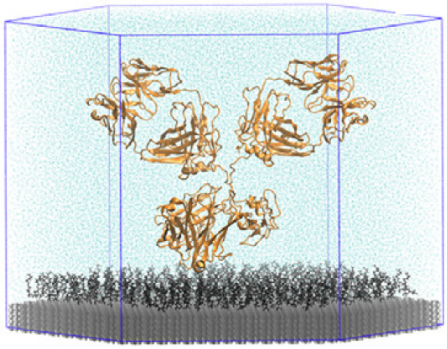


FIGURE 2.3 – *Illustration du système étudié par Oliveira et al. [94] : l'anticorps IgG sur la surface fonctionnalisée par des molécules d'APTES avec l'une des trois orientations favorables identifiées. Image de Oliveira et al. (2019) [94].*

En 2019, Oliveira *et al.* [94] ont étudié les interactions entre l'anticorps immunoglobuline G (IgG) immobilisé sur une surface et le phénobarbital en couplant des expériences d'AFM et des simulations. En AFM, le phénobarbital a été immobilisé sur la pointe et les anticorps IgG ont été adsorbés sur une surface de mica fonctionnalisée par des molécules d'APTES. En simulations, la procédure suivante a été adoptée. Tout d'abord, les configurations stables pour l'anticorps immobilisé sur la surface ont été déterminées par *docking* et par simulations de dynamique moléculaire. Trois configurations ont été retenues parmi celles identifiées car elles permettent que le fragment de liaison à l'antigène (Fab) soit accessible. Les systèmes ont ensuite été équilibrés par simulations de dynamique moléculaire et l'énergie d'interaction entre l'anticorps IgG et la surface a été déterminé par LIE. Le phénobarbital a ensuite été ajouté aux systèmes étudiés par *docking*, et les systèmes ont été à nouveau équilibrés par simulations de dynamique moléculaire. Enfin, des simulations SMD ont été réalisées afin d'identifier le chemin de détachement du phé-

nobarbital. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel NAMD et le champ de force CHARMM27. Les simulations SMD ont été réalisées avec une constante de force de $385\,\mathrm{kJ{\cdot}mol^{-1}{\cdot}nm^{-1}}$ et une vitesse de tirage de $0.001\,\mathrm{nm{\cdot}ps^{-1}}$. Les énergies d'interaction suivantes ont été obtenues entre la surface et l'anticorps IgG pour les trois configurations : $-62,4\pm2,4\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$, $-54,3\pm5,7\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$ et $-360,9\pm4,2\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$. De plus, les forces de rupture correspondantes valent respectivement 591 ± 13 pN, 605 ± 18 pN et 610 ± 45 pN. Il a ainsi été montré que la force de rupture obtenue en simulations pour la configuration la plus favorable est en accord avec la force de rupture déterminée expérimentalement, qui vaut $641,6\pm363,3$ pN.

Ces deux études montrent que les simulations de dynamique moléculaire permettent d'observer les changements de conformation induits par l'immobilisation d'une biomolécule sur une monocouche auto-assemblée et de caractériser leurs effets sur l'affinité du complexe. De plus, elles mettent en évidence que l'orientation de la biomolécule sur la surface joue un rôle déterminant, de même que la présence d'ions à proximité de la surface.

2.4 Modélisation de l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface solide - liquide

2.4.1 Introduction

Nous nous intéressons à présent à la modélisation de l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface solide - liquide en simulations de dynamique moléculaire. En effet, il a été observé expérimentalement que les propriétés des molécules d'eau situées à proximité d'une interface diffèrent significativement des molécules d'eau situées dans le *bulk*, l'interface provoquant notamment une rupture du réseau de liaisons hydrogène qui s'établit entre les molécules d'eau [95]. De plus, en présence d'une surface chargée, celle-ci crée un champ électrostatique, qui influence à la fois l'orientation des molécules d'eau et la distribution des ions à l'interface [95]. En particulier, la répartition des ions à proximité d'une surface chargée peut être décrite à l'aide du modèle de Gouy-Chapman-Stern (voir chapitre 4, paragraphe 4.4.1.a, page 110).

Plusieurs techniques expérimentales, sensibles à l'interface, permettent d'obtenir des informations sur l'orientation des molécules d'eau ou la distribution des ions à proximité d'une surface ou d'une interface. Par exemple, en 2009, Nihonyanagi *et al.* ont étudié par HD-VSFG (*heterodyne-detected vibrational sum-frequency generation*) l'orientation des molécules d'eau à proximité d'interfaces chargées, et ont montré qu'à proximité d'une interface chargée négativement, les molécules d'eau s'orientent avec leurs atomes d'hydrogène pointant vers l'interface, tandis qu'à proximité d'une interface chargée positivement, les molécules d'eau s'orientent avec leur atome d'oxygène pointant vers l'interface [96]. En 2011, en couplant des expériences de SFS (*sum frequency scattering*) et des simulations de dynamique moléculaire, Vácha *et al.* ont démontré que l'orientation des molécules d'eau à proximité d'une phase hydrophobe, la même qu'à proximité d'une surface chargée négativement, implique un transfert de charge au niveau de l'interface [97]. De plus, en 2015, Strazdaite *et al.* ont montré par spectroscopie HD-VSFG qu'au niveau d'une interface avec une phase hydrophobe, les molécules d'eau sont orientées avec leur groupement O-H vers la phase hydrophobe [98]. En 2018, Chen *et al.* ont mis en évidence, par spectroscopie infrarouge, la présence d'un réseau ordonné de molécules d'eau liées par des liaisons hydrogène à proximité de la surface hydrophile Si-OH, contrairement à la surface hydrophobe Si-H [99].

L'organisation et l'orientation des molécules d'eau ont également été étudiées à la surface de monocouches de silanes. En 2000, Nihonyanagi *et al.* ont étudié par spectroscopie SFG la structure de monocouches de silanes avec un groupement terminal amine à différents pH et ont

montré qu'à faible pH et à pH élevé, le signal SFG est plus important, donc l'épaisseur de la double couche où les molécules d'eau sont orientées est plus importante [100, 101]. En 2001, Ye *et al.* ont étudié par spectroscopie SFG la structure de l'eau à proximité d'une monocouche d'octadecyltrichlorosilane (OTS). Il a été montré que lorsque le pH est modifié, l'orientation des molécules d'eau à proximité de la surface de quartz, qui présente des groupements silanols, est modifiée, tandis que l'orientation n'est pas modifiée au niveau de la surface d'OTS [102].

Enfin, il a été démontré que l'organisation des molécules d'eau et des ions de la couche d'hydratation peut influencer l'adsorption de biomolécules, de peptides ou de protéines sur des surfaces. Par exemple, en 2017, Hegemann *et al.* ont montré que les molécules d'eau confinées sur une surface de polymère présentent une orientation préférentielle à l'origine d'interactions dipolaires à longue distance, qui modifient la façon dont les protéines interagissent avec la surface [103].

2.4.2 Étude des propriétés de l'eau *bulk* et des ions en simulations de dynamique moléculaire

Nous nous intéressons tout d'abord à des travaux de dynamique moléculaire présentant différents paramètres permettant de caractériser la structure locale des molécules d'eau ainsi que la couche d'hydratation des ions dans l'eau *bulk*.

En 2015, Duboué-Dijon et Laage [104] ont étudié la structure locale de l'eau liquide (sans ion) et en particulier son organisation tétraédrique dans le *bulk* et autour d'une molécule de propanol. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel NAMD, le modèle d'eau TIP4P/2005 et le champ de force CGenFF (*CHARMM general force field*) pour la molécule de propanol. Les simulations ont été réalisées à deux températures, 298 K et 260 K. La structure locale de l'eau a été caractérisée à l'aide de cinq paramètres d'ordre différents (paramètre d'ordre tétraédrique d'orientation, paramètre d'ordre tétraédrique de translation, indice de structure locale, densité locale, asphéricité du diagramme de Vonoroï). Cette étude a montré que les paramètres choisis sont faiblement corrélés entre eux et traduisent des distorsions différentes de la structure de l'eau (distorsions angulaires ou distorsions radiales de l'arrangement tétraédrique). De plus, la couche de solvatation autour du propanol est très similaire à la structure locale de l'eau, avec une légère diminution de l'organisation.

En 2002, Zhou *et al.* [105] se sont intéressés à la configuration des ions Li^+, Na^+, K^+, F^- et Cl^- en solution aqueuse, grâce à des simulations de dynamique moléculaire. Les interactions entre l'eau et les ions ont été décrites à l'aide d'un potentiel tenant compte des interactions coulombiennes et de Lennard-Jones, des paramètres spécifiques étant donnés pour chaque ion. Les molécules d'eau ont été décrites à l'aide du modèle SPC/E. La structure des ions en solution a été caractérisée à l'aide de paramètres courants tels que la fonction de distribution radiale, le nombre de coordination et le coefficient de diffusion, mais un nouveau paramètre a également été proposé, le facteur d'hydratation, qui rend compte de l'orientation des molécules d'eau autour du cation ou de l'anion considéré. Cette étude a montré que les cations sont entourés de molécules d'eau orientées avec leur atome d'oxygène vers l'ion, tandis que les anions sont entourés de molécules d'eau dont les atomes d'hydrogène sont orientés vers l'ion. De plus, d'après les résultats donnés par le facteur d'hydratation, la force d'hydratation est plus importante pour Li^+ que pour Na^+ et K^+ ($Li^+ > Na^+ > K^+$) et plus importante pour F^- que pour Cl^- ($F^- > Cl^-$).

En 2013, Bankura *et al.* [106] ont étudié la solvatation des ions Na^+, K^+ et Cl^- et ont comparé les résultats obtenus avec des simulations de dynamique moléculaire *ab initio* et conventionnelles.

Les simulations de dynamique moléculaire *ab initio* ont été réalisées avec le formalisme CPMD (*density functional theory (DFT) based Car-Parrinello (CP) molecular dynamics (MD) simulations*), et trois fonctions de densité ont été étudiées. Les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles ont été réalisées avec le logiciel Gromacs et le champ de force CHARMM. Deux modèles d'eau ont été étudiés : le modèle non polarisable TIP4P et le modèle polarisable SWM4-NDP. L'étude des fonctions de distribution radiales (RDF) ion-O et ion-H, du nombre de solvatation (ou de coordination) et de la distribution angulaire (O-ion-O) ont apporté des informations sur la structure de la première couche de solvatation. Cette étude a montré des différences sur la solvatation des ions entre les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles et *ab initio*. Néanmoins, les nombres de coordination obtenus se situent dans tous les cas entre 5,0 et 5,5 pour Na^+, entre 6,0 et 6,4 pour K^+ et entre 6,0 et 6,5 pour Cl^-, conformément aux valeurs expérimentales.

2.4.3 Structure de l'eau et organisation des ions à proximité d'une interface

On s'intéresse à présent à l'organisation et aux propriétés dynamiques des ions et des molécules d'eau à proximité de différents types de surfaces. Les premières surfaces à avoir été étudiées sont les surfaces parfaites et cristallines, et de nombreux types de surfaces, de plus en plus complexes, ont été modélisés. Quelques études, plus rares, se sont intéressées à des surfaces amorphes, notamment de polymère ou de SiO_2. Enfin, quelques travaux ont étudié des surfaces fonctionnalisées et ont montré les effets de la nature du groupement terminal et de la disposition des molécules sur la surface, sur l'organisation et les propriétés dynamiques des molécules d'eau situées à proximité de l'interface.

2.4.3.a Surface cristalline ou parfaite

En 1994, Lee et Rossky [107] se sont intéressés à la structure et à la diffusion de l'eau à proximité d'une surface hydrophobe lisse (surface parfaite plane), d'une surface hydrophobe rugueuse (atomes de Lennard-Jones) et d'une surface hydrophile (surface de silice hydroxylée). Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées à l'aide du modèle d'eau TIP4P et de paramètres spécifiques pour décrire les surfaces. Différents paramètres ont été étudiés, tels que le profil de densité des atomes d'oxygène, le profil du nombre de plus proches voisins, l'orientation des molécules d'eau, des paramètres d'ordre, la distribution radiale des atomes d'oxygène et d'hydrogène par rapport à la surface ou encore le coefficient de diffusion. Cette étude a montré une diminution des liaisons hydrogène à proximité des surfaces hydrophobes, tandis que les molécules d'eau sont fortement orientées à proximité de la surface hydrophile, avec l'apparition de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et la surface. De plus, le coefficient de diffusion dans la première couche d'eau à proximité d'une surface hydrophile est plus faible que dans l'eau *bulk* et plus faible qu'à proximité d'une surface hydrophobe [107]. Enfin, il a été montré que la perturbation de la structure du solvant diminue rapidement en s'éloignant de la surface, et disparaît après 10 Å.

En 2008, Marry *et al.* [108] ont étudié la structure et les propriétés dynamiques des molécules d'eau à proximité d'une surface d'argile montmorillonite, de formule $C_{0,75}Si_8(Al_{3,25}Mg_{0,75})O_{20}(OH)_4$ et chargée négativement. La structure initiale du système a été déterminée grâce à des simulations de Monte Carlo, puis des simulations de dynamique moléculaire ont été effectuées avec le logiciel DL_POLY, le modèle d'eau SPC/E et des paramètres spécifiques pour la surface. Cette étude a montré qu'approximativement la moitié des molécules d'eau situées dans la première couche d'eau forment des liaisons hydrogène avec la surface. De plus, la diffusion des molécules d'eau est ralentie à proximité de la surface, par rapport au *bulk*. Néanmoins, les propriétés d'organisation et de diffusion des molécules d'eau ne sont pas modifiées au-delà des deux ou trois premières couches de molécules.

En 2016, Kobayashi *et al.* [109] ont étudié la couche de solvatation d'une surface de muscovite (001) en modélisant une expérience d'AFM à l'aide d'une pointe faite d'un nanotube de carbone fermé. Les simulations de dynamique moléculaire et les simulations SMD ont été réalisées avec le logiciel Gromacs, le modèle d'eau SPC/E, le champ de force CLAYFF pour la muscovite et des paramètres spécifiques pour les ions K^+ et le nanotube de carbone. Les contributions des différentes couches d'eau à l'interface ont été déterminées sur les courbes de force obtenues. De plus, cette étude a montré que parmi les trois couches d'eau à l'interface, la première est celle qui présente la contribution la plus élevée à la force totale mesurée. Des informations ont également été obtenues concernant la structure de la première (en nids d'abeille) et de la deuxième couche d'eau à proximité de la surface.

En 2018, Yang *et al.* [110] ont étudié la structure, les propriétés dynamiques et l'adsorption d'une solution aqueuse contenant des ions Na^+ et Cl^- à proximité de nanopores de silicate de calcium hydraté (CSH), par simulations de dynamique moléculaire. Le logiciel LAMMPS et le champ de force ClayFF ont été utilisés. Les simulations ont montré que la diffusion des ions et de l'eau est particulièrement réduite à proximité de la surface hydrophile, par rapport aux valeurs obtenues dans le *bulk*. Par ailleurs, les molécules d'eau sont ordonnées sous forme de couches, avec un angle dipolaire préférentiel, à proximité de la surface. La couche de solvatation des ions situés à proximité de la surface est modifiée (des atomes d'oxygène de la surface sont notamment ajoutés), ce qui limite la mobilité de ces ions.

2.4.3.b Surface amorphe

En 2014, Dewan *et al.* [95] ont étudié la structure de la couche d'eau et des ions Na^+, Cs^+ et Cl^- à l'interface avec des surfaces chargées en simulations de dynamique moléculaire. Trois types de surfaces chargées négativement ont été étudiées, dont deux surfaces idéales, l'une avec charges localisées et l'autre avec une densité de charges distribuée de façon homogène, et une surface de silice amorphe. Les simulations ont été réalisées avec le champ de force CHARMM27, le modèle d'eau TIP3P et des paramètres spécifiques pour les surfaces. Cette étude a montré qu'à proximité des surfaces idéales, l'interface comprend deux régions distinctes, une couche compacte et une couche diffuse, en accord avec le modèle GCS. De plus, l'épaisseur de la couche diffuse dépend de la distribution de charges sur la surface. Enfin, la distribution des ions et l'orientation des molécules d'eau à proximité de la couche de silice amorphe dépendent fortement de la nature des cations (Na^+ ou Cs^+).

En 2018, Kitabata *et al.* [111] ont comparé la mouillabilité de deux surfaces de polyfluorure de vinylidène (PVDF), l'une cristalline et l'autre amorphe, par simulations de dynamique moléculaire. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel Gromacs, le modèle d'eau TIP4P/2005, et des paramètres spécifiques issus de OPLS pour les surfaces. La mouillabilité des surfaces a été évaluée en modélisant des gouttes d'eau de différentes tailles et en calculant l'angle de contact macroscopique correspondant. Les résultats obtenus ont montré que l'angle de contact est plus faible avec la surface amorphe (86° au lieu de 96° pour la surface cristalline). La surface amorphe est donc moins hydrophobe que la surface cristalline. Cette différence est expliquée par l'organisation des molécules d'eau à l'interface avec la surface amorphe : une interface épaisse se forme, où les molécules sont orientées et interagissent fortement avec la surface, et la tension superficielle est réduite.

2.4.3.c Surface fonctionnalisée

En 2014, Lee *et al.* [112] ont étudié par simulations de dynamique moléculaire de Car-Parinello la structure et les propriétés dynamiques de molécules d'eau à l'interface avec des

surfaces de silicium fonctionnalisées avec un groupement non polaire -H, -CF_3 ou -CH_3 ou un groupement polaire -COOH. Les interactions entre atomes ont été définies en utilisant la DFT (*density functional thoery*). Différents paramètres ont été étudiés, tels que la densité des molécules d'eau en fonction de la distance à la surface, la diffusion des molécules d'eau, leur distribution spatiale à proximité des surfaces ou encore le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène en fonction de la distance à la surface. Cette étude a montré que la nature des groupements adsorbés influence fortement les propriétés de l'eau à proximité des surfaces hydrophobes. En effet, la diffusion des molécules d'eau est plus rapide à proximité de la surface H-Si qu'à proximité des surfaces -CH_3 et -CF_3. De plus, l'arrangement des molécules dans la première couche d'eau est fortement impacté par la nature de la surface.

En 2018, Anvari *et al.* [113] ont étudié l'impact de l'adsorption de thiols sur le mouillage d'une surface hydrophile de sulfure de zinc (ZnS) cristallisée sous forme de sphalérite (110). Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel LAMMPS, et un champ de force atomes unifiés, adapté du champ de force CVFF, avec un modèle d'eau également adapté du champ de force CVFF. Les effets du taux de couverture de la surface, de la disposition aléatoire ou organisée des molécules sur la surface et de la structure de la chaîne alkyle (molécules de *n*-butylthiol ou d'*i*-butylthiol) ont été analysés grâce à la détermination de l'angle de contact avec une goutte constituée de 800 molécules d'eau, et au calcul de la tension superficielle des interfaces solide – vapeur et solide - liquide. Cette étude a montré qu'un arrangement aléatoire des molécules de thiol sur la surface implique un plus grand angle de contact qu'une organisation ordonnée, car la distance intermoléculaire entre les thiols est plus petite. De plus, il a été montré que la tension de surface varie avec le taux de couverture, et une transition vers un caractère hydrophobe a été constatée à partir d'un taux de couverture de 0,25. Enfin, pour un taux de couverture supérieur à 0,85, l'angle de contact est plus faible avec l'*i*-butylthiol, car il y a une interaction de Van der Waals plus forte avec les molécules d'eau.

Les travaux présentés montrent que l'organisation, la structure locale et les propriétés dynamiques des molécules d'eau et des ions sont fortement perturbées à proximité d'une interface. Néanmoins, ces perturbations ne concernent que les premières couches de molécules et disparaissent rapidement en s'éloignant de la surface, que celle-ci soit amorphe ou cristalline. Les études réalisées sur des surfaces fonctionnalisées ont montré les effets à la fois de la nature du groupement terminal et de la disposition des molécules sur la surface, sur les propriétés des molécules d'eau à l'interface. En revanche, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude de dynamique moléculaire caractérisant l'organisation et les propriétés dynamiques des molécules d'eau et des ions à proximité de monocouches de silanes.

2.4.4 Impact de la structure de l'eau et des ions sur l'adsorption de biomolécules sur une surface

Nous nous intéressons à présent à l'impact des molécules d'eau situées dans la couche d'hydratation sur l'adsorption de biomolécules sur différents types de surfaces. Les deux premières études présentées mettent en évidence les interactions avec les molécules d'eau dans le mécanisme d'adsorption des biomolécules. La dernière étude s'intéresse à l'adsorption d'un peptide sur des monocouches de thiols et montre les effets sur l'adsorption des interactions entre les différents groupements terminaux et les molécules d'eau.

En 2009, Skelton *et al.* [114] se sont intéressés à l'adsorption du peptide RKLPDA sur une surface de dioxyde de titane (110) et en particulier au rôle des molécules d'eau bien structurées à l'interface avec la surface hydrophile. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel DL_POLY, le modèle d'eau TIP3P, le champ de force CHARMM27 pour le peptide, et des paramètres spécifiques pour le titane. De plus, l'effet de mutations de certains résidus par un résidu alanine sur

le mécanisme d'adsorption a été étudié. Il en résulte que les résidus Asp et Pro jouent un rôle très important dans le maintien des interactions avec la surface de TiO_2, tandis que la mutation du résidu Lys pourrait permettre de renforcer la stabilité de l'interaction entre le peptide et la surface. De plus, les simulations ont montré la présence de quatre couches d'eau bien structurées à proximité de la surface de TiO_2. Le peptide n'interagit pas directement avec la surface, mais avec les molécules contenues dans les deux premières couches d'eau.

En 2018, Rosa *et al.* [115] ont étudié le mécanisme d'adsorption de bases azotées issues de l'ADN, la guanine (G), la cytosine (C), l'adénine (A), et la thymine (T), sur une surface d'or Au(111) en présence d'une couche de solvatation. Des simulations de métadynamique ont été réalisées à l'aide du logiciel Gromacs et du module Plumed. Le modèle d'eau TIP3P a été utilisé, ainsi que les champs de force AMBER99SB et GolDNA-AMBER. Des cartes de l'énergie libre en fonction de l'orientation de la base azotée et de la distance à la surface ont été déterminées. Cette étude a mis en évidence que lorsque la couche d'hydratation est prise en compte (contrairement à l'adsorption en phase gazeuse), le processus d'adsorption diffère significativement en fonction de la base azotée considérée, en termes de chemin d'adsorption, d'états de transition et de barrières d'énergie libre.

En 2012, Xie *et al.* [116] ont étudié l'adsorption du peptide neuromédine-B sur des monocouches auto-assemblées de thiols avec des groupements terminaux neutres sulfobétaïne, -OH et $-CH_3$. L'orientation initiale préférentielle du peptide sur les surfaces a été déterminée par des simulations de Monte Carlo, puis des simulations de dynamique moléculaire ont permis d'observer le comportement du peptide sur les surfaces. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel CHARMM33b1, le modèle d'eau TIP3P et le champ de force CHARMM. Cette étude a montré que la monocouche avec les groupements terminaux sulfobétaïne présente une forte résistance à l'adsorption du peptide, tandis que la monocouche -OH présente un comportement intermédiaire et que la monocouche $-CH_3$ présente une plus faible résistance à l'adsorption du peptide. La forte résistance de la monocouche sulfobétaïne à l'adsorption du peptide est expliquée par le grand nombre de liaisons hydrogène qui s'établissent entre les molécules d'eau et la surface, et par la faible mobilité des molécules d'eau à l'interface. Cette couche d'eau fortement liée réduit les contacts entre le peptide et la surface.

2.4.5 Conclusion

L'organisation et les propriétés dynamiques des ions et des molécules d'eau situés à proximité d'une surface solide diffèrent donc de celles observées dans l'eau *bulk*. Ces perturbations ne sont présentes qu'au niveau des premières couches d'eau et disparaissent rapidement en s'éloignant de la surface. Elles peuvent néanmoins influencer le mécanisme d'adsorption des biomolécules. Nous chercherons donc à caractériser les propriétés des ions et des molécules d'eau dans les couches d'hydratation des différentes monocouches de silanes que nous souhaitons modéliser.

2.5 Le complexe streptavidine - biotine

Le complexe streptavidine - biotine a fait l'objet de nombreuses investigations à la fois expérimentalement et en simulations. Il constitue donc pour nous un système modèle, puisque nous cherchons à identifier les effets de l'adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes, sur les interactions déjà bien connues qui s'établissent entre la streptavidine et la biotine.

Cette partie présente tout d'abord le complexe streptavidine - biotine, puis des études expérimentales et de simulations de dynamique moléculaire ayant caractérisé les interactions qui

s'établissent entre la streptavidine et la biotine. Nous présentons enfin différents travaux s'intéressant aux effets de l'immobilisation de la streptavidine sur ses interactions avec la biotine.

2.5.1 Présentation du complexe

Issue de la bactérie *Streptomyces avidinii*, la streptavidine est une protéine tétramérique de 52,8 kDa présentant un site de liaison à la biotine pour chacune de ses quatre chaînes. L'affinité entre la streptavidine et la biotine est très importante, il s'agit de l'une des interactions non covalentes les plus fortes de la nature, avec une constante de dissociation K_d valant environ 10^{-14} mol·L^{-1}. Cette forte affinité entre la streptavidine et la biotine s'explique par l'établissement de huit liaisons hydrogène et de nombreuses interactions électrostatiques et de Van der Waals entre la protéine et le ligand (voir figure 2.4).

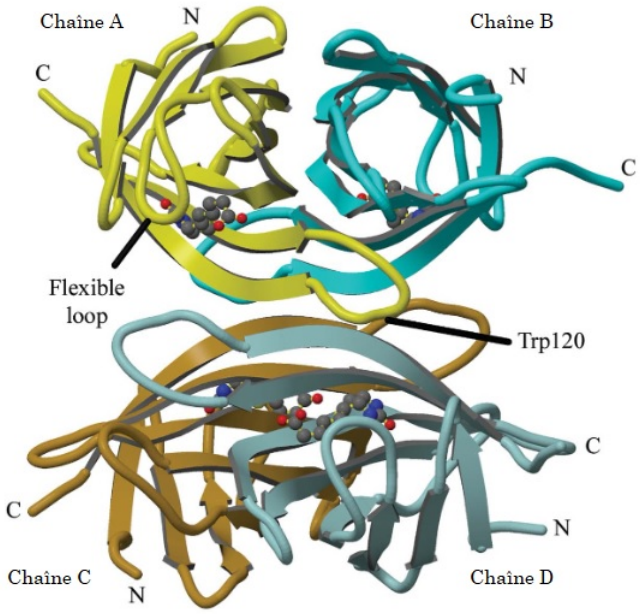


FIGURE 2.4 – *Le complexe streptavidine - biotine, déterminé par cristallographie aux rayons X (structure PDB 3RY2). Les chaînes A (jaune) et B (bleue) sont cristallographiquement uniques, tandis que les chaînes C (marron) et D (cyan) sont déduites par symétrie. La biotine est représentée dans chaque poche de la streptavidine par des points gris (carbone), rouge (oxygène) et bleu (azote). Image de Le Trong et al. (2011) [117].*

La structure secondaire de chaque chaîne de la streptavidine est constituée de huit feuillets β antiparallèles qui forment une structure tertiaire en tonneau β. Le site de liaison à la biotine fait intervenir deux chaînes distinctes : l'une des chaînes forme une poche de liaison et le résidu Trp120 de la chaîne voisine (appartenant à la boucle 7-8) se lie également à la biotine. Par exemple, la boucle 7-8 de la chaîne A interagit avec le site de liaison de la chaîne D et inversement [117].

2.5.2 Étude des interactions streptavidine - biotine

Dans cette partie, nous présentons des travaux expérimentaux et de simulations de dynamique moléculaire permettant de mieux comprendre la stabilisation des interactions streptavidine - biotine, le chemin de détachement entre la protéine et le ligand ou encore l'impact de mutations de la streptavidine sur ses interactions avec la biotine.

2.5.2.a Conformation du complexe et stabilisation des interactions streptavidine - biotine

La structure du complexe streptavidine - biotine a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Par exemple, en 2011, les travaux de Le Trong *et al.* [117] ont permis de déterminer la structure du complexe à l'échelle atomique (structure de la Protein Data Bank (PDB) 3RY2), donnant accès à la nature et à la position des résidus de la streptavidine situés à proximité de la biotine. De plus, une comparaison a été effectuée entre la structure de la streptavidine seule et celle lorsque la streptavidine est liée à la biotine, montrant que la boucle 3-4 présente une conformation fermée lorsque la biotine est située dans la poche de liaison, et une conformation variable (ouverte avec différentes conformations possibles ou fermée) en l'absence de biotine.

En 2015, Song *et al.* [118] ont étudié par simulations de dynamique moléculaire le rôle essentiel de la conformation de la boucle 3-4 dans la capacité de la streptavidine à interagir avec la biotine et à la retenir dans la poche de liaison. En plus des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, des simulations de dynamique moléculaire accélérées ont été réalisées (il s'agit de simulations avec un échantillonnage optimisé, pour échantillonner plus efficacement l'espace des configurations). Toutes les simulations ont été réalisées à partir de la structure PDB 1MK5, avec le logiciel AMBER12, le champ de force GAFF (*general AMBER force field*) pour la biotine et le champ de force Amber12 pour la streptavidine. Cinq simulations ont été réalisées, avec des conformations initiales différentes pour la streptavidine et des durées jusqu'à 800 ns. L'évolution de la conformation de la streptavidine a été étudiée grâce au RMSD, à la distance entre la boucle 3-4 et la biotine et par analyse en composantes principales. Cette étude a montré qu'en l'absence de biotine dans la poche de liaison, la conformation avec la boucle 3-4 ouverte est la plus stable, avec une différence d'énergie libre de $5\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$ environ. Lorsque la biotine est liée à la streptavidine, la conformation avec la boucle 3-4 fermée est plus stable, grâce aux interactions électrostatiques et hydrophobes qui s'établissent entre la boucle 3-4 et la biotine. De plus, l'interaction entre la boucle 3-4 et la biotine est essentielle pour conserver la présence de celle-ci dans la poche de liaison. Enfin, les changements de conformation de la boucle 3-4 dans les différentes chaînes de la streptavidine sont indépendants.

2.5.2.b Impact de mutations de la streptavidine sur ses interactions avec la biotine

L'étude des mutations de la streptavidine permet à la fois de déterminer des mutants permettant de modifier, voire de renforcer, les interactions streptavidine - biotine, mais également de mieux comprendre la nature de ces interactions, et la coopérativité qui peut éventuellement s'établir entre différents résidus.

En 2010, Chivers *et al.* ont identifié expérimentalement le mutant S52G/R53D de la streptavidine, appelé traptavidine, qui présente un taux de dissociation de la biotine dix fois plus faible que la streptavidine [119]. De plus, les structures du complexe traptavidine - biotine et de la traptavidine seule ont été identifiées par cristallographie en 2011 [120]. Cette étude a montré que les mutations engendrent une réduction de la flexibilité de la boucle 3-4 et un renforcement de la liaison hydrogène qui s'établit entre le résidu Ser45 et la biotine, qui peuvent expliquer le renforcement des interactions traptavidine - biotine par rapport aux interactions streptavidine - biotine.

En 2016, Liu *et al.* [121] se sont intéressés aux interactions entre la biotine et différents mutants de la streptavidine (S45A, D128A et le double mutant S45A/D128A) par simulations de dynamique moléculaire. Les protéines ont été décrites avec le champ de force AMBER03 et la biotine avec le champ de force GAFF. De plus, un calcul spécifique concernant la distribution de charge de la protéine a été réalisé (PPC). L'énergie libre de liaison entre la biotine et les

différents mutants de la streptavidine a été calculée par MM-PBSA. Les simulations de dynamique moléculaire et les calculs de MM-PBSA ont été réalisés avec Amber12 et AmberTools. Cette étude a montré que les mutations engendrent des changements de structure assez faibles et que la coopérativité entre les résidus provient principalement de l'énergie libre de solvatation et de la contribution entropique à l'énergie libre. De plus, les mutations de certains résidus de la streptavidine ne modifient pas seulement les interactions entre ces résidus et la biotine, mais aussi celles entre des résidus conservés (N49, S88) et la biotine.

En 2017, Tiwary [122] a étudié l'influence de la mutation N23A de la streptavidine dimérique sur la vitesse de détachement de la biotine en simulations de dynamique moléculaire, à l'aide d'une nouvelle méthode d'échantillonnage appelée *Infrequent Metadynamics*. Les simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel Gromacs et du module PLUMED, et le champ de force Amber ff99SB*ILDN tout-atome a été utilisé. Cette étude a montré que parmi les trois étapes de détachement identifiées, la première est l'étape critique à la fois pour la streptavidine et pour le mutant N23A, cependant, cette étape est franchie 100 fois plus rapidement pour le mutant, en raison de l'absence d'interaction entre le résidu N23 et la biotine. De plus, la fin du processus de dissociation est similaire pour la streptavidine et pour le mutant.

2.5.2.c Étude de la force de rupture, de l'énergie de liaison et du chemin de détachement entre la streptavidine et la biotine

Le complexe streptavidine - biotine a été très étudié expérimentalement, notamment en AFM en mode SMFS. Dans ce type d'expérience, la streptavidine et la biotine sont généralement fixées sur un substrat solide et sur la pointe d'AFM. Cette technique permet de déterminer la force de rupture et l'énergie de liaison du complexe, mais donne également accès à des informations concernant le chemin de détachement.

La première étude a été réalisée par Moy *et al.* en 1994 et a permis de déterminer une force de rupture de 257 pN [123] entre la streptavidine et la biotine. En 1999, Merkel *et al.* [21] ont mesuré par AFM la force de rupture entre la streptavidine et la biotine à différents *loading rates* de $0.05\,\mathrm{pN{\cdot}s^{-1}}$ à $6.0 \times 1\,0^4\,\mathrm{pN{\cdot}s^{-1}}$ et ont montré que la force de rupture mesurée augmente avec le *loading rate* (de 10 à 170 pN environ). De plus, le spectre de force dynamique obtenu montre l'existence de deux barrières d'énergie le long du chemin de détachement.

De nouvelles expériences ont été réalisées depuis, et ont abouti à des valeurs de forces de rupture différentes. En effet, la force de rupture déterminée par Köhler *et al.* (2014) vaut 31,3 pN [124] et les forces de rupture déterminées par Sedlak *et al.* varient entre 200 et 230 pN [125]. Ces différences s'expliquent par l'utilisation de protocoles expérimentaux optimisés pour fixer les molécules à la pointe et à la surface et par les différents paramètres expérimentaux choisis, par exemple le pH ou le *loading rate* (voir paragraphe 1.2.3, page 12).

Les simulations SMD complètent les expériences d'AFM en mode SMFS dans la compréhension du processus de détachement entre la streptavidine et la biotine, avec la détermination des forces de rupture, du chemin de détachement et des barrières d'énergie. En général, le centre de masse de la streptavidine est fixé tandis qu'une force extérieure est appliquée à la biotine.

En 1996, Grubmüller *et al.* [126] ont étudié le détachement entre la streptavidine et la biotine grâce à des simulations de dynamique moléculaire et des simulations SMD. Les simulations ont été réalisées avec le champ de force CHARMM, en appliquant une constante de force de 2,8 $\mathrm{N{\cdot}m^{-1}}$ et une vitesse de tirage comprise entre 0,4 $\mathrm{Å{\cdot}ps^{-1}}$ et 0,015 $\mathrm{Å{\cdot}ps^{-1}}$ sur la biotine, tandis que la position du centre de masse de la streptavidine est restreint. Les forces de rupture obtenues varient entre 250 et 700 pN environ, en fonction du *loading rate*. De plus, ces simula-

tions ont permis d'étudier le processus de détachement entre la streptavidine et la biotine, et notamment les ruptures successives des liaisons hydrogène établies entre la streptavidine et la biotine.

Par ailleurs, en 1997, Izrailev *et al.* [127] ont modélisé le détachement entre la biotine et l'avidine, une autre protéine tétramérique, par simulations SMD. Les simulations ont notamment été réalisées avec le logiciel X-PLOR et le champ de force CHARMM. Une constante de force $k(t) = \alpha t$, avec α compris entre 100 et 2×10^{-3} $k_B T \cdot \mathrm{ps}^{-1} \cdot \mathrm{Å}^{-2}$ a été apliquée sur la biotine, tandis qu'une restriction de position a été appliquée aux centres de trois des quatre monomères de l'avidine. Les forces de ruptures obtenues varient entre 450 et 800 pN. De plus, cette étude a permis d'identifier les différentes étapes du processus de détachement de la biotine et les résidus impliqués.

En 2019, Rico *et al.* [40] ont analysé le processus de détachement entre la streptavidine et la biotine en couplant des simulations de dynamique moléculaire et des expériences d'AFM en mode SMFS. Expérimentalement, la streptavidine a été immobilisée sur une surface par l'intermédiaire de billes d'agarose, tandis que la biotine a été liée de façon covalente à la pointe par l'intermédiaire d'un PEG (polyéthylène glycol). De plus, l'étude a été réalisée avec un microscope à force atomique à vitesse élevée, ou *High-Speed Force Spectroscopy* AFM (HSFS - AFM). Ainsi, la vitesse de tirage a été variée entre $0.05\,\mu\mathrm{m}\cdot\mathrm{s}^{-1}$ et $30\,000\,\mu\mathrm{m}\cdot\mathrm{s}^{-1}$. Les simulations SMD ont été réalisées à l'aide du logiciel Gromacs et du champ de force Amber99sb. La constante de force a été fixée à $100\,\mathrm{pN}\cdot\mathrm{nm}^{-1}$ et la vitesse de tirage a été variée entre $1000\,\mu\mathrm{m}\cdot\mathrm{s}^{-1}$ et 5×10^{10} $\mu\mathrm{m}\cdot\mathrm{s}^{-1}$. Ainsi, en combinant expériences et simulations, l'étude du détachement a été réalisée avec des *loading rates* variant entre $10^2\,\mathrm{pN}\cdot\mathrm{s}^{-1}$ et $10^{13}\,\mathrm{pN}\cdot\mathrm{s}^{-1}$. De plus, un recouvrement entre simulations et expériences a été observé sur la décade 10^8-$10^9\,\mathrm{pN}\cdot\mathrm{s}^{-1}$. Cette étude a permis d'analyser l'influence du *loading rate* sur la force de rupture et sur le processus de détachement de la biotine. En effet, différents états intermédiaires ont été identifiés, qui varient en fonction du *loading rate*. Le spectre de force dynamique du détachement entre la streptavidine et la biotine, qui présente la force de rupture en fonction du *loading rate*, a été obtenu. Celui-ci permet d'en déduire la variation d'énergie libre en fonction de la coordonnée de réaction. Enfin, il a été montré que le processus de détachement de la biotine présente deux barrières d'énergie, la première correspondant à la rupture des liaisons hydrogène parallèles à la direction de tirage, entre la biotine et les résidus Ser27, Tyr43, Asn49, Asp128 de la streptavidine, tandis que la deuxième barrière d'énergie correspond à la rupture des liaisons pratiquement perpendiculaires à la direction de tirage, entre la biotine et les résidus Asn49, Tyr54, Arg84 de la streptavidine.

2.5.3 Immobilisation de la streptavidine et impact sur ses interactions avec la biotine

Nous nous intéressons enfin à différents travaux ayant caractérisé les effets de l'immobilisation de la streptavidine, par adsorption ou par liaison covalente, sur sa capacité à se lier à la biotine et la force de rupture entre la streptavidine et la biotine.

En 2011, Mücksch et Urbassek [128] ont étudié, par simulations de dynamique moléculaire, l'adsorption de la streptavidine monomérique sur deux surfaces cristallines parfaites, le graphite et le dioxyde de titane (TiO_2) afin de caractériser les effets de la nature de la surface et de l'orientation intiale de la protéine sur les changements de conformation associés à son adsorption. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel NAMD, le champ de force CHARMM et des paramètres spécifiques pour décrire les deux surfaces. Elles comprennent 2×10^7 étapes. Les changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur les deux surfaces ont été caractérisés grâce au RMSD, à la structure secondaire et au rayon de giration de la protéine ainsi qu'avec les contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interac-

tion entre la protéine et les surfaces, et entre la surface de TiO_2 et les premières couches d'eau. Cette étude a montré que l'adsorption de la streptavidine sur le graphite conduit à d'importants changements de conformation, car la protéine s'étale sur la surface. Le même étalement de la protéine est observé sur la couche de TiO_2 très hydrophile, bien que le comportement de la streptavidine soit impacté par son orientation initiale, qui lui permet ou non de pénétrer les premières couches d'eau bien ordonnées à proximité de la surface. Enfin, pour les deux surfaces cristallines étudiées, les changements de conformation de la streptavidine sont très importants et celle-ci perd sa capacité à se lier à la biotine.

En 2019, Sedlak *et al.* [129] se sont intéressés à l'effet de l'immobilisation de la streptavidine monomérique par une liaison covalente située à l'extrémité N-terminale ou à l'extrémité C-terminale sur le détachement de la biotine en couplant simulations SMD et expériences d'AFM en mode SMFS. Expérimentalement, un résidu cystéine a été ajouté soit à l'extrémité N-terminale, soit à l'extrémité C-terminale de la streptavidine pour définir une liaison covalente avec la surface (immobilisation covalente par l'intermédiaire d'un PEG sur une surface de verre fonctionnalisée par des molécules de silane avec un groupement terminal amine), tandis que la biotine a été immobilisée sur la pointe de l'AFM, toujours par l'intermédiaire d'un PEG. La force de détachement a été caractérisée pour différentes vitesses de tirage comprises entre $200\,\mathrm{nm{\cdot}s^{-1}}$ et $6400\,\mathrm{nm{\cdot}s^{-1}}$. Les simulations SMD ont été réalisées avec les logiciels NAMD et QwikMD et le champ de force CHARMM36, la position d'un atome de carbone de la biotine étant restreinte, tandis que l'atome de carbone C_α de l'extrémité N-terminale ou de l'extrémité C-terminale de la streptavidine est entraîné avec une vitesse de tirage comprise entre 5,0 et 0,05 $\mathrm{Å{\cdot}ns^{-1}}$. Notons que la surface n'est pas modélisée en simulations de dynamique moléculaire. Expérimentalement, il a été montré qu'avec un *loading rate* de $10\,\mathrm{nN{\cdot}s^{-1}}$, la force de détachement de la biotine vaut 400 pN si la streptavidine est immobilisée par son extrémité C-terminale, et 200 pN si elle est immobilisée par son extrémité N-terminale. De plus, l'analyse de la propagation des forces dans la streptavidine réalisée à partir des simulations SMD a montré que dans le cas où la streptavidine est immobilisée par son extrémité N-terminale, des changements de structure sont observés, avec un dépliement local de la poche de liaison.

En 2020, Sedlak *et al.* [130] ont poursuivi ces travaux avec l'étude des changements de conformation induits par l'immobilisation de la chaîne D de la streptavidine tétramérique sur le détachement de la biotine située dans la poche de liaison de l'une des quatre chaînes, toujours en couplant simulations SMD et expériences d'AFM en mode SMFS. Expérimentalement, quatre types de protéines ont été étudiés (streptavidine non fonctionnelle, monovalente, trivalente et tétravalente) afin de déterminer l'effet de la chaîne de la streptavidine avec laquelle la biotine interagit sur la force de rupture. La streptavidine a été immobilisée à la surface par l'intermédiaire d'un résidu cystéine, tandis que la biotine a été fixée sur la pointe. Le détachement a été étudié avec une vitesse de tirage de $800\,\mathrm{nm{\cdot}s^{-1}}$. Les simulations ont été réalisées avec les logiciels QwikMD et NAMD, et le champ de force CHARMM36. Une restriction de position a été appliquée à l'atome d'azote terminal de la biotine, tandis que l'atome de carbone C_α de l'extrémité C-terminale de chaque chaîne a été entraîné, avec une vitesse de tirage de 0,5 $\mathrm{Å{\cdot}ns^{-1}}$ et une constante de force de $0.69\,\mathrm{N{\cdot}m^{-1}}$. Cette étude a montré qu'expérimentalement, les forces de rupture varient entre 100 pN et 440 pN, tandis qu'en simulations SMD, la force la plus élevée est obtenue pour le détachement de la biotine de la chaîne D. La force de rupture vaut 510 pN si la biotine est localisée dans la chaîne D, 450 pN dans la chaîne B, 340 pN dans la chaîne A et 360 pour la chaîne C. Cette étude a donc illustré le fait que la répartition des forces lors du tirage de la biotine entraîne des changements de conformation dans la poche de liaison de la streptavidine, qui induisent une diminution de la barrière d'énergie que la biotine doit franchir pour se détacher.

2.5.4 Conclusion

Le complexe streptavidine - biotine forme donc l'une des interactions non covalentes les plus fortes de la nature. De nombreux travaux ont été réalisés, à la fois expérimentalement et en simulations de dynamique moléculaire, afin de mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre la protéine et le ligand. En particulier, les travaux de Rico *et al.* [40], qui couplent expériences d'AFM en mode SMFS et simulations de dynamique moléculaire, apportent une description à l'échelle atomique du processus de détachement de la biotine en solution.

De plus, différents travaux ont montré que l'immobilisation de la streptavidine peut entraîner une modification de sa capacité à interagir avec la biotine. Les travaux de Sedlak *et al.* [129, 130] ont montré que lorsque la streptavidine est immobilisée par une liaison covalente, celle-ci conserve sa capacité à se lier à la biotine, bien que la force de rupture soit modifiée. En revanche, l'étude réalisée par Mücksch et Urbassek [128] a mis en évidence que l'adsorption de la streptavidine sur différentes surfaces cristallines entraîne des changements de conformation importants, qui lui font perdre sa capacité à se lier à la biotine.

Dans le cadre de notre étude, nous cherchons à identifier si les changements de conformation engendrés par l'adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes sont sufisamment faibles pour lui permettre de conserver sa capacité à se lier à la biotine, et dans ce cas, si les interactions streptavidine - biotine décrites par Rico *et al.* sont bien conservées.

2.6 Étude des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur de la protéine spike

Après avoir étudié le système modèle streptavidine - biotine, nous nous intéressons à un système particulier en lien avec la pandémie actuelle de Covid-19 (*Coronavirus disease 2019*). Nous étudions en effet le complexe formé du récepteur cellulaire ACE2 et du domaine de liaison au récepteur de la protéine spike située sur la surface du SARS-CoV-2, virus responsable de la Covid-19. Ce complexe a été largement étudié depuis le début de la pandémie, puisqu'il joue un rôle central dans le processus d'infection virale et pourrait être à l'origine de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans le cadre de notre étude, nous cherchons à déterminer si les changements de conformation engendrés par l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes lui permettent de conserver sa capacité à se lier au domaine de liaison au récepteur de la protéine spike, voire de la renforcer. Nous présentons donc, dans cette partie, différents travaux ayant étudié la structure du complexe et la nature des interactions qui s'établissent entre les deux protéines.

2.6.1 Le rôle de la protéine spike et du récepteur cellulaire dans le processus d'infection par le SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2, ou *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* a été identifié en 2019. Ce virus appartient au genre des *Betacoronavirus*, comme le SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) et le MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*). Comme tous les coronavirus, le SARS-CoV-2 pénètre dans les cellules hôtes grâce à la protéine spike. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire en forme de pointe, située sur la membrane du virus et qui lui donne une apparence ressemblant à une couronne [131, 132]. La protéine spike possède un rôle central dans le processus d'infection virale, puisqu'elle contrôle la reconnaissance et l'attachement à la cellule hôte et la fusion des membranes virale et cellulaire [131, 132, 133, 134]. L'ARN viral est ensuite libéré dans la cellule hôte qui va alors répliquer le

génome viral et produire d'autres virus [134]. Comme illustré sur la figure 2.5, la protéine spike du SARS-CoV-2 se lie aux cellules humaines par le récepteur cellulaire ACE2.

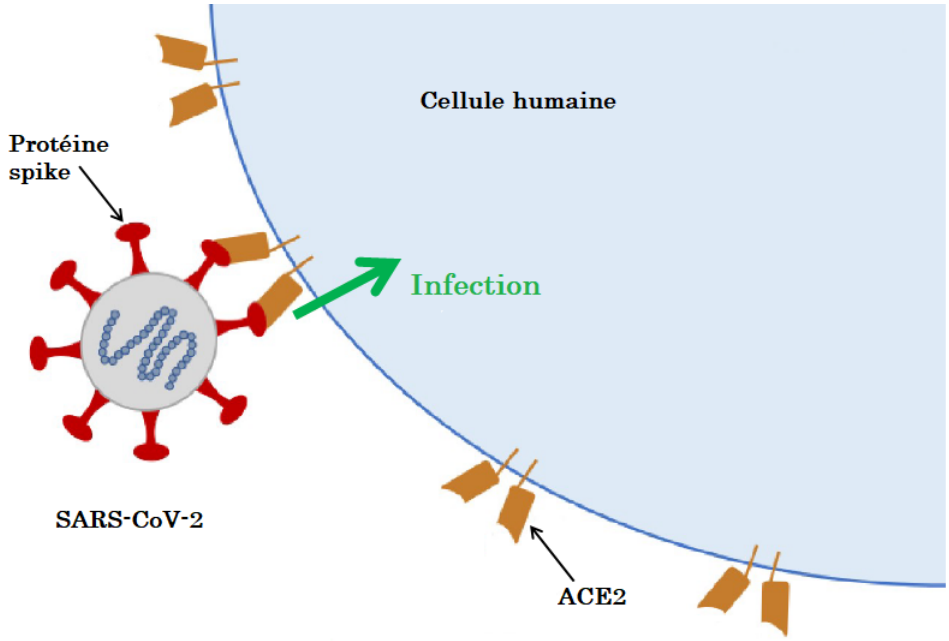


FIGURE 2.5 – *Schéma présentant le processus d'infection des cellules humaines par le SARS-CoV-2, à travers l'interaction entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2. Image adaptée de Bernardi et al. (2020) [133].*

2.6.1.a Structure de la protéine spike

La protéine spike est un homotrimère, dont chaque monomère contient 1281 acides aminés [133] et se divise en une sous-unité S1, qui comprend un domaine C-terminal et un domaine N-terminal, une sous-unité S2 correspondant à la région transmembranaire et un petit domaine cytoplasmique [132]. La sous-unité S1 se lie au récepteur cellulaire ACE2 par le domaine C-terminal, appelé domaine de liaison au récepteur ou *Receptor Binding Domain* (RBD), tandis que la sous-unité S2 est responsable de la fusion des membranes de la cellule hôte et du virus [132].

Nous nous intéressons uniquement au RBD de la protéine spike, qui, comme illustré sur la figure 2.6, comprend un sous-domaine principal (*core subdomain*), constitué d'un feuillet β antiparallèle à 5 brins (β1, β2, β3, β4 et β7), connectés par de courtes boucles et hélices, et un sous-domaine externe, situé entre les brins β4 et β7 et constitué d'hélices α (α4 et α5) et de deux petits brins β5 et β6 notamment [132, 135, 136]. La structure du RBD de la protéine spike est stabilisée par des ponts disulfure [135]. La protéine spike est une glycoprotéine, c'est-à-dire que des oligosaccharides ou des glycanes peuvent s'y lier de façon covalente. Par exemple, on parle de N-glycosylation si la liaison est effectuée au niveau d'un résidu asparagine (Asp).

2.6.1.b Structure du récepteur cellulaire ACE2

Le récepteur cellulaire ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2 ou *Angiotensin Converting Enzyme 2*) est une protéine de membrane contenant 788 acides aminés [133]. Son rôle physiologique primaire est la maturation d'une hormone qui contrôle la vasoconstriction et la pression du sang, l'angiotensine [137]. On retrouve cette protéine globulaire dans de nombreux

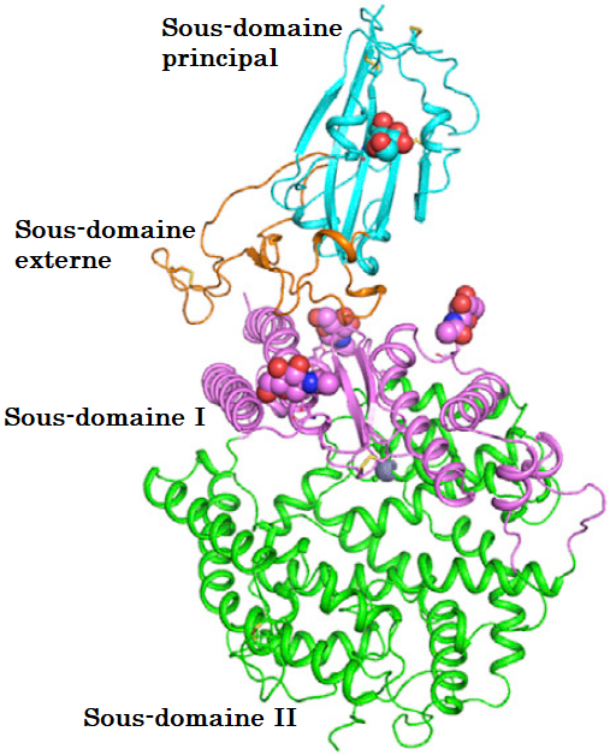


FIGURE 2.6 – *Structure du complexe formé du RBD de la protéine spike et du récepteur cellulaire ACE2. Le sous-domaine principal et le sous-domaine externe du RBD de la protéine spike sont représentés en bleu clair et en orange respectivement, tandis que les sous-domaines I et II du récepteur cellulaire ACE2 sont représentés en violet et en vert respectivement. Image adaptée de Wang et al. (2020) [132].*

tissus, notamment les poumons, le cœur, les reins et les intestins [134, 137].

Le RBD de la protéine spike se lie au domaine peptidase d'ACE2, qui contient les résidus 19 à 615 [137]. Celui-ci est divisé en deux sous-domaines I et II (voir figure 2.6) [132]. Notons que le récepteur cellulaire ACE2 est également présent chez de nombreux animaux (poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux, mammifères), avec une structure proche de celle observée chez l'humain, ce qui explique que ces animaux puissent être contaminés par le SARS-CoV-2 [131].

2.6.1.c Interactions entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2

La structure du complexe formé par le RBD de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 a été déterminée par cristallographie aux rayons X et déposée sur la Protein Data Bank [138] par différentes études, par exemple celles de Wang *et al.* [132] (structure 6LZG) ou de Lan *et al.* [135] (structure 6M0J). Comme illustré sur la figure 2.6, le RBD de la protéine spike est lié au sous-domaine I, sur la surface externe du récepteur cellulaire ACE2 [132, 139]. Les résidus du RDB de la protéine spike en contact avec ACE2 sont majoritairement situés au niveau du sous-domaine externe. Les interactions qui s'établissent entre les résidus sont principalement gouvernées par des interactions polaires [137]. Elles sont présentées sur la figure 2.7 et dans le tableau 2.1.

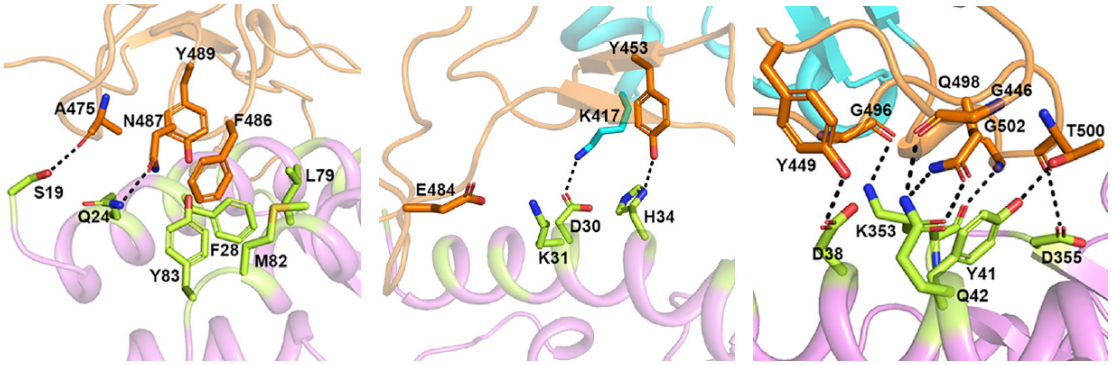


FIGURE 2.7 – *Images de la surface de contact entre le récepteur cellulaire ACE2 et le RBD de la protéine spike. Images de Wang et al. (2020) [132].*

Remarque : Il a été montré que le SARS-CoV-2 se lie aux cellules hôtes par le récepteur cellulaire ACE2 de la même manière que le SARS-CoV. Bien que les RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV présentent une séquence identique à plus de 70 % [131, 132], le RDB de la protéine spike du SARS-CoV-2 présente une plus grande affinité avec le récepteur ACE2, et donc une constante de dissociation K_D plus petite [132, 135]. Cela s'explique par le nombre et la nature des résidus situés à l'interface et qui établissent des liaisons avec le récepteur cellulaire ACE2 [132].

Résidu du récepteur cellulaire ACE2	Résidus du RBD de la protéine spike en contact avec le résidu d'ACE2	
	Résultats de Wang *et al.* [132] [a]	Résultats de Lan *et al.* [135] [b]
S19	A475*, G476	
Q24	A475, G476, N487*	F486, N487*
T27	F456, Y473, A475, Y489	
F28	Y489	
D30	K417*, L455, F456	K417*$$, L455
K31	L455, F456, E484, Y489, F490, Q493	L455, Q493
H34	Y453*, L455, Q493	L455, Q493
E35	Q493	Q493*
E37	Y505	Y505*
D38	Y449*, G496, Q498	Y449*, Q498
Y41	Q498, T500*, N501*	Q498, T500*, N501*
Q42	G446*, Y449*, Q498***	G446*, Y449*, Q498
L45	Q498, T500	Q498
L79	F486	F486
M82	F486	F486
Y83	F486, N487*, Y489	F486, N487*, Y489*
N330	T500	
K353	G496*, N501, G502*, Y505	Q498, N501, G502*
G354	G502, Y505	N501
D355	T500*, G502	N501
R357	T500	
R393	Y505	Y505*

TABLE 2.1 – *Résidus du RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2 en contact avec le récepteur cellulaire ACE2.* [a] *Les résultats de Wang et al. présentent les contacts de Van der Waals (cut-off de 4,5 Å) et les liaisons hydrogène (cut-off de 3,5 Å, notées avec le symbole *) qui peuvent s'établir entre les résidus du RBD de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2.* [b] *Les résultats de Lan et al. présentent les résidus en contact (cut-off de 4,0 Å), ainsi que les liaisons hydrogène (notées avec le symbole *) et les ponts salins (notés avec le symbole* $ *) pouvant s'établir entre les résidus du RBD de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2. Le nombre de symboles correspond aux nombre d'interactions possibles (liaisons hydrogène ou ponts salins) entre deux résidus. Au total, 16 liaisons hydrogène potentielles ont été identifiées par l'étude de Wang et al. [132], tandis que 13 liaisons hydrogène et 2 ponts salins ont été proposés dans les travaux de Lan et al. [135].*

2.6.2 Analyse des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike

Cette partie présente différents travaux expérimentaux et de simulation s'intéressant aux interactions entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2, à la modification de ces interactions grâce à des mutations et à l'exploitation de ces interactions pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

2.6.2.a Étude des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike par AFM

En 2020, Yang *et al.* [140] ont souhaité mettre en évidence le rôle du RBD dans les interactions qui s'établissent entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2. Pour cela, ils ont étudié par microscopie à force atomique (AFM) en mode SMFS les interactions qui s'établissent entre ACE2 et la sous-unité S1 de la protéine spike d'une part, et entre ACE2 et uniquement le RBD d'autre part. Le récepteur cellulaire ACE2 a été immobilisé sur des surfaces modèles et sur des cellules vivantes, tandis que le RBD et la sous-unité S1 de la protéine spike ont été fixés sur la pointe de l'AFM. Les analyses ont été réalisées grâce à des courbes force - distance. Les surfaces modèles sont des surfaces d'or fonctionnalisées par des molécules de thiol présentant un groupement terminal -COOH ou -OH, sur lesquelles le récepteur cellulaire ACE2 est immobilisé par une liaison covalente. La sous-unité S1 ou le RBD de la protéine spike sont fixés par l'intermédiaire d'une liaison covalente avec l'extrémité du PEG (polyéthylène glycol) attaché sur la pointe. Les résultats ont montré que la protéine spike interagit de façon spécifique avec le récepteur cellulaire ACE2 fixé sur la surface modèle, par l'intermédiaire de son RBD uniquement. En effet, les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la liaison ont été étudiées, en déterminant les valeurs de k_{on}, k_{off} et K_D selon que le récepteur cellulaire ACE2 interagisse avec la sous-unité S1 ou le RBD de la protéine spike. Dans les deux cas, les forces de rupture obtenues pour les différents *loading rates* étudiés correspondent, la longueur de la barrière de potentiel vaut environ 0,8 nm et la constante de dissociation vaut environ 120 nM, ce qui confirme le rôle du RBD dans la liaison au récepteur cellulaire ACE2. Il a cependant été montré, par ajout de glycanes, que lorsqu'ACE2 est immobilisé sur une cellule et non sur une surface modèle, la sous-unité S1 peut également interagir avec d'autres récepteurs situés sur la cellule.

2.6.2.b Détermination de l'interface ACE2 - protéine spike par simulations de *docking* moléculaire et de dynamique moléculaire et comparaison avec des complexes analogues

En 2020, avant la détermination de la structure du complexe ACE2 - RBD de la protéine spike par cristallographie aux rayons X [132, 135], Chen *et al.* [131] ont étudié la structure de la protéine spike du SARS-CoV-2 à partir de sa séquence génomique : la structure en trois dimensions de la protéine a été déterminée avec le programme Cn3D et le serveur Swiss-model, par comparaison avec la protéine spike du SARS-CoV. Ensuite, les interactions avec ACE2 ont été étudiées par *docking* moléculaire à l'aide des logiciels PatchDock et FireDock. Les résultats obtenus suggèrent que l'affinité de liaison entre ACE2 et la protéine spike est plus importante pour le SARS-CoV-2 (-21,82 kcal·mol^{-1}) que pour le SARS-CoV (-13,38 kcal·mol^{-1}). Cela est notamment expliqué par la présence du résidu F486 pour la protéine spike du SARS-CoV-2, qui pénètre dans une poche hydrophobe d'ACE2 formée notamment des résidus F28, L79, Y83 et Y97.

He *et al.* [141] se sont également interessés à l'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike, et ont comparé les interactions obtenues pour le SARS-CoV-2 et pour le SARS-CoV. La structure tridimensionnelle de la protéine spike du SARS-CoV-2 a été déterminée à l'aide du programme Modeller à partir de sa séquence génomique (tandis que les autres

structures ont été récupérées sur la Protein Data Bank [138]). La structure du complexe composé de la protéine spike du SARS-CoV-2 et d'ACE2 a été déterminée par *docking* moléculaire à l'aide de l'algorithme HDOCK, et des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées à l'aide du logiciel AMBER et du champ de force ff14SB. Les énergies libres de la protéine spike et de son RDB, et l'énergie de liaison entre ACE2 et la protéine spike ont été déterminées par MM-GBSA grâce au logiciel MMPBSA.py. Les résultats montrent que la structure du complexe ACE2 - protéine spike prédite par *docking* moléculaire pour le SARS-CoV-2 est très proche de celle déterminée expérimentalement pour le SARS-CoV, ce qui suggère que les RDB des deux protéines spike se lient de la même manière au récepteur cellulaire ACE2. Cependant, l'énergie de liaison est plus faible pour le SARS-CoV-2 (-50,4345 kcal·mol^{-1}), ce qui montre que l'affinité pour le récepteur ACE2 est accrue par rapport au SARS-CoV (-36,7541 kcal·mol^{-1}). De plus, la protéine spike du SARS CoV-2 présente une énergie libre plus basse que celle du SARS-CoV (-67 303,2794 kcal·mol^{-1} *vs.* -63 139,9637 kcal·mol^{-1}), ce qui suggère qu'elle serait plus stable et pourrait survivre à des températures plus élevées. Enfin, les simulations montrent que le RBD de la protéine spike du SARS-CoV-2 présente une flexibilité accrue par rapport à celle du SARS-CoV.

En 2020, Piplani *et al.* [142] ont étudié les interactions entre la protéine spike du SARS-CoV-2 et les récepteurs cellulaires humain et de différentes espèces animales (pangolin, chien, singe, hamster, chat, ...). Les structures tridimensionnelles des récepteurs cellulaires et de la protéine spike ont été déterminées à partir des séquences génomiques à l'aide du logiciel Modeller, et le *docking* moléculaire a été réalisé à l'aide de l'algorithme HDOCK. De plus, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel Gromacs et le champ de force AMBER99SB-ILDN et l'énergie libre de liaison a été calculée par MM-PBSA à l'aide de l'outil g_mmpbsa. Cette étude montre que l'énergie libre de liaison entre la protéine spike et ACE2 la plus basse est obtenue pour le récepteur cellulaire ACE2 humain (-57,6 kcal·mol^{-1}). Une valeur légèrement plus élevée est obtenue pour le pangolin (-56,5 kcal·mol^{-1}), le chien (-49,5 kcal·mol^{-1}) et le singe (-50,8 kcal·mol^{-1}), tandis que l'énergie d'interaction est plus élevée avec les récepteurs ACE2 issus de la souris (-39,4 kcal·mol^{-1}). Cette étude apporte donc des informations sur les origines du SARS-CoV-2, mais également sur sa capacité à infecter davantage l'homme et certaines espèces animales.

Toujours en 2020, Ali et Vijayan [143] ont étudié, par simulations de dynamique moléculaire, la stabilité des interactions entre ACE2 et le RBD de la protéine spike et la contribution des contacts polaires et hydrophobes à ces interactions. De plus, ils les ont comparées à celles obtenues à l'interface ACE2 - RBD de la protéine spike du SARS-CoV. Pour cela, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel Desmond et le champ de force OPLS, avec une durée comprise entre 500 ns et 1 μs. Deux structures cristallographiques ont été étudiées pour chaque complexe ACE2 - RBD de la protéine spike (celui correspondant au SARS-CoV et celui correspondant au SARS-CoV-2). Différents paramètres ont été analysés, notamment le RMSD, le RMSF, la durée du contact entre résidus ou la distance entre deux résidus au cours de la simulation, et des calculs de l'énergie libre de liaison entre ACE2 et le RDB de la protéine spike ont été réalisés par MM-GBSA.
L'analyse des interactions entre ACE2 et le RDB de la protéine spike du SARS-CoV-2 montre que les contacts se forment, se rompent et se reforment au cours de la simulation. Certaines interactions sont durables, notamment les liaisons hydrogène entre les résidus Tyr449, Gln493 et Gln498 de la protéine spike et les résidus Asp38, Glu35 et Lys 353 d'ACE2, les interactions hydrophobes entre les résidus Tyr473, Ala475 et Phe486 de la protéine spike et les résidus Leu79, Met82, Tyr83 d'ACE2, le pont salin entre le résidu Lys417 de la protéine spike et le résidu Asp30 d'ACE2, et les interactions hydrophobes entre les résidus Phe456 et Tyr489 de la protéine spike et le résidu Thr27 d'ACE2. En revanche, d'autres interactions, pourtant attendues d'après les résultats de cristallographie aux rayons X, ne sont pas observées. Par exemple, le résidu Lys31

n'interagit pas avec les résidus Leu455 et Tyr489. En effet, les simulations de dynamique moléculaires permettent d'observer la dynamique et la stabilité des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène, qui gouvernent principalement les interactions entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2, mais également de prendre en compte les effets hydrophobes. Cela explique que la surface de contact observée au cours de ces simulations soit différente de celle déterminée en analysant les structures obtenues par cristallographie aux rayons X.
Par ailleurs, en accord avec les affinités déterminées expérimentalement, l'énergie d'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike est plus faible pour le SARS-CoV-2 (valeurs entre $-106,5 \pm 24,8$ kcal·mol^{-1} et $-140,0 \pm 10,6$ kcal·mol^{-1} pour les différentes répliques de simulations) que pour le SARS-CoV (valeurs entre $-71,2 \pm 15,4$ kcal·mol^{-1} et $-44,5 \pm 17,6$ kcal·mol^{-1} pour les différentes répliques de simulations). Cette différence s'explique par la présence d'interactions entre ACE2 et la protéine spike du SARS-CoV-2 qui ne sont pas observées pour le SARS-CoV, notamment le pont salin entre le résidu Lys417 de la protéine spike et le résidu Asp30 d'ACE2, et les trois liaisons hydrogène stables entre les résidus Tyr449, Gln493 et Gln498 de la protéine spike et les résidus Asp38, Glu35 et Lys 353 d'ACE2.

2.6.2.c Effet de mutations sur les interactions entre ACE2 et le RBD de la protéine spike

En 2020, Laurini *et al.* [136] ont étudié, par des simulations de dynamique moléculaire, la structure de l'interface entre le RBD de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 et les énergies associées aux différentes interactions, afin de déterminer les interactions déterminantes du processus de reconnaissance moléculaire. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel AMBER19 et les champs de force ff14SB7 et GLYCAM06j-18 à partir de la structure cristallographique 6M0J et pour une durée de 1 μs. L'analyse de la structure du complexe a permis de déterminer les différentes liaisons intermoléculaires et intramoléculaires qui s'établissent entre les résidus, c'est-à-dire les liaisons hydrogène, les ponts salins et les interactions de contact (hydrophobes, de Van der Waals et polaires notamment). De plus, la contribution énergétique de chaque résidu à l'interaction entre le RBD de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 a été déterminée par MM-PBSA et grâce à la méthode de balayage à l'alanine (*alanine scanning mutagenesis*), qui consiste à modéliser la substitution de chacun des résidus étudiés par un résidu alanine et à estimer la variation correspondante de l'énergie libre de liaison. Cette variation est due à la disparition des interactions qui s'établissaient entre le résidu substitué et les autres résidus de l'interface. Les résultats ont montré que les résidus D38, K31, E37, K353 et Y41 du récepteur cellulaire ACE2 et les résidus Q498, T500 et R403 du RBD de la protéine spike sont les points sensibles (*hot-spots*) qui façonnent et déterminent la stabilité de l'interface protéine - protéine du complexe étudié.

Laurini *et al.* ont poursuivi ces travaux en 2021 [144] avec l'étude des effets de différentes mutations sur les interactions qui s'établissent entre les résidus d'ACE2 et de la protéine spike au niveau de l'interface. Chacun des 18 résidus d'ACE2 et des 14 résidus du RBD de la protéine spike situés à l'interface ont été successivement remplacés des résidus hydrophobes (isoleucine), polaires (sérine et thréonine), chargés négativement (acide aspartique ou acide glutamique), chargés positivement (lysine ou arginine) et volumineux (tryptophane) afin d'étudier les effets de la nature, de la forme et de la dimension des résidus mutants sur la structure et la force des interactions à l'interface. Cette étude doit permettre de mieux comprendre la spécificité des interactions qui s'établissent entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2, mais pourrait être également utile pour le développement de vaccins ou d'anticorps neutralisants ou pour évaluer le rôle de la diversité génétique des individus dans les interactions ACE2 - protéine spike. Comme pour l'étude précédente, les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel AMBER19 et les champs de force ff14SB7 et GLYCAM06j-18, à partir de la structure cristallographique 6M0J et pour une durée de 1 μs, et les différentes contribu-

tions énergétiques ont été déterminées par MM-PBSA. Cette étude a montré que la plupart des mutations engendrent une destabilisation de l'interface protéine - protéine (valeur de $\Delta\Delta G$ négative). Cependant, certaines mutations améliorent l'affinité entre ACE2 et le RBD de la protéine spike (valeur de $\Delta\Delta G$ positive), notamment les variants Q24T, T27D/K/W, D30E, H34S/T/K, E35D, Q42K, L79I/W, R357K et R393K pour ACE2 et les variants L455D/W, F456 K/W, Q493K, N501T et Y505W pour le RBD de la protéine spike. Ces résultats ont été validés par comparaison avec les résultats expérimentaux obtenus par Chan *et al.* [139].

En effet, en 2020, Chan *et al.* [139] ont étudié expérimentalement l'effet de mutations du récepteur cellulaire ACE2 sur son affinité avec la protéine spike. L'objectif de cette étude est de développer une protéine appelée ACE2 soluble (sACE2) qui présenterait un effet thérapeutique de neutralisation de l'infection, en agissant comme un leurre pour la protéine spike. L'étude de différentes mutations doit permettre d'identifier un variant d'ACE2 présentant une affinité accrue pour la protéine spike, afin de rivaliser avec celle des anticorps monoclonaux. Le principal intérêt du candidat thérapeutique sACE2 est que, du fait de sa similarité avec récepteur natif ACE2, le virus ne devrait pas pouvoir échapper à la neutralisation par sACE2 grâce à des mutations de la protéine spike sans décroître son affinité pour le récepteur natif ACE2, contrairement aux anticorps. Les mutations de la protéine sACE2 ont été réalisées par *deep-mutagenesis* et la caractérisation des interactions avec la protéine spike a été effectuée par cytométrie en flux, en utilisant la technique FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Cette étude a montré que de nombreux variants ne peuvent pas se lier au RBD de la protéine spike, tandis que certains présente une affinité plus élevée. L'affinité entre ACE2 et la protéine spike est accrue en substituant certains résidus situés à l'interface : par exemple, la substitution du résidu T27 par un résidu hydrophobe permet d'augmenter les liaisons hydrophobes avec les résidus aromatiques de la protéine spike, la mutation D30E permet à ce résidu d'accroître ses interactions avec le résidu K417, et la substitution de K31 par un résidu aromatique participe à la formation d'un groupement interfacial de résidus aromatiques. Les mutations de certains résidus situés plus loin de l'interface peuvent également stabiliser la liaison à la protéine spike, en modifiant la structure d'ACE2. Par exemple, certains résidus (S19, L91, T92, T324 et Q325) peuvent être remplacés par la proline. Enfin, les résidus N90 et T92, qui ne sont pas situés directement au niveau de l'interface mais forment un site de N-glycosylation, sont très propices aux mutations, et presque toutes les mutations proposées pour ces deux résidus aboutissent à un renforcement des liaisons avec le RBD de la protéine spike.

2.6.2.d L'interaction ACE2 - protéine spike : une cible thérapeutique

Si l'étude des interactions entre le RDB de la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 permet de mieux comprendre le mécanisme de l'infection virale par le SARS-CoV-2, d'autres études se basent sur ces interactions pour développer des approches thérapeutiques à la Covid-19. Par exemple, Bernardi *et al.* [133] ont étudié, par simulations de dynamique moléculaire atomistiques, des protéines de fusion ACE2-Fc. Il s'agit de protéines obtenues artificiellement en combinant le domaine extracellulaire du récepteur ACE2 et la région Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1, c'est-à-dire le domaine constant d'un anticorps. La protéine obtenue est appelée immunoadhésine. La partie ACE2 agit comme un leurre, qui se lie à la protéine spike, et l'empêche ainsi d'infecter les cellules humaines, tandis que la région Fc apporte les fonctions effectrices du système immunitaire, qui élimine le virus. Les simulations de dynamique moléculaire ont été effectuées avec le logiciel Gromacs et le champ de force AmberFF14Sb principalement. Cette étude a montré l'importance de prendre en compte le phénomène de glycosylation (liaison covalente d'oligosaccharides ou de glycanes sur certains acides aminés) pour l'étude des immunoadhésines ACE2-Fc, puisque cela peut affecter leur structure.

De plus, en 2020, Basu *et al.* [134] se sont intéressés au potentiel thérapeutique de cinq

composés phytochimiques issus de plantes médicinales indiennes en réalisant des simulations de *docking* moléculaire avec les outils ClusPro et SWISSDOCK notamment. Cette étude est fondée sur le principe de modulation allostérique : une protéine peut présenter deux sites de liaison pour se lier à deux ligands différents, le premier site de liaison étant appelé site fonctionnel, et le deuxième site régulateur. Lorsque le ligand modulateur se lie à la protéine au niveau du site régulateur, cela peut engendrer des changements de conformation dans la protéine, et réguler l'activité du site fonctionnel. Ainsi, la fonction de la protéine ACE2 de se lier à la protéine spike, participant au processus d'entrée du virus dans la cellule hôte, pourrait être régulée grâce à la présence d'une molécule modulatrice au niveau d'un site régulateur du récepteur cellulaire ACE2. Cinq molécules ont été étudiées : l'hespéridine, l'émodine, l'antraquinone, la rhéine et la chrysine. L'étude montre que l'hespéridine peut se lier au récepteur cellulaire ACE2, et que les changements de conformation causés par sa présence aboutissent à une diminution de l'énergie d'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike. Elle pourrait donc présenter une activité antivirale.

Enfin, dans leur étude présentée précédemment (voir paragraphe 2.6.2.a, page 58), Yang *et al.* [140] ont également étudié la possibilité de bloquer la liaison entre ACE2 et la protéine spike grâce à l'ajout de différents peptides, en couplant des expériences d'AFM et des simulations de dynamique moléculaire. Les peptides étudiés sont constitués d'un enchaînement de certains résidus du récepteur cellulaire ACE2, situés au niveau de l'interface avec la protéine spike. Expérimentalement, les peptides synthétisés ont été ajoutés avec différentes concentrations au système étudié, et une diminution de la probabilité de liaison ente ACE2 et la protéine spike a été observée. En particulier, les peptides constitués des résidus E22 à S44 et E22 à E57 du récepteur cellulaire ACE2 induisent une diminution de la probabilité de liaison de plus de 70 %, que ACE2 soit immobilisé sur une surface modèle ou sur une cellule vivante. Ces résultats ont été confirmés par simulations de dynamique moléculaire.

2.6.3 Conclusion

Le complexe formé par le récepteur cellulaire ACE2 et la protéine spike est donc au centre du processus d'infection virale par le SARS-CoV-2 et l'objet de recherches pour identifier des vaccins ou des traitements potentiels contre la Covid-19. Plusieurs études expérimentales et en simulations ont permis d'identifier la structure précise du complexe et les interactions qui s'établissent entre ACE2 et le RBD de la protéine spike. De plus, l'étude des effets de différentes mutations sur les interactions ACE2 - protéine spike ont permis d'isoler des variants permettant d'accroître l'affinité entre les deux protéines et des protéines candidates pour développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Le tableau 2.2 présente un récapitulatif des interactions observées entre le récepteur cellulaire ACE2 et le RBD de la protéine spike en solution, d'après les études que nous avons présentées. Nous souhaitons les comparer aux interactions obtenues lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est immobilisé sur différentes monocouches de silanes.

Article	Méthode	K_d (nM)	$\Delta G_{ACE2-RBD}$ (kcal·mol^{-1})	Interactions ACE2 - RBD
Wang *et al.* [132]	Cristallographie aux rayons X, SPR	$133,3 \pm 5,6$	-9,4[a]	Surface de contact : 21 résidus du RBD (K417, G446, Y449, Y453, L455, F456, Y473, A475, G476, E484, F486, N487, Y489, F490, Q493, G496, Q498,T500, N501, G502, Y505) et 22 résidus d'ACE2 (S19, Q24, T27, F28, D30, K31, H34, E35, E37, D38, Y41, Q42, L45, L79, M82, Y83, N330, K353, G354, D355, R357, R393). 16 liaisons hydrogène.
Lan *et al.* [135]	Cristallographie aux rayons X, SPR	4,7	-11,4[a]	Surface de contact : 17 résidus du RBD (K417, G446, Y449, Y453, L455, F456, A475, F486, N487, Y489, Q493, G496, Q498, T500, N501, G502, Y505) et 20 résidus d'ACE2 (Q24, T27, F28, D30, K31, H34, E35, E37, D38, Y41, Q42, L79, M82, Y83, N330, K353, G354, D355, R357 et R393). 2 ponts salins et 13 liaisons hydrogène.
Chen *et al.* [131]	*Docking* moléculaire	-	-21,82	Forte interaction entre le résidu F486 (RBD) et la poche hydrophobe d'ACE2 formée des résidus F28, L79, Y83 et L97.
He *et al.* [141]	MD, MM-PBSA	-	-50,4345	-
Piplani *et al.* [142]	MD, MM-PBSA	-	-57,6	-
Ali et Vijayan [143]	MD, MM-GBSA	-	$-106,5 \pm 24,8$ à $-140,0 \pm 10,6$	Les liaisons hydrogène entre Y449, Q493, Q498 (RBD) et E35, D38, K353, les interactions hydrophobes entre Y473, A475, F486 (RBD) et L79, M82, Y83, le pont salin entre K417 (RBD) et D30 (ACE2) et les interactions hydropbobes entre F456, Y489 et T27 sont durables. K31 n'interagit pas avec les résidus L455 et Y489.
Laurini *et al.* [136, 144]	MD, MM-PBSA	-	-	Surface de contact : 14 résidus du RBD et 18 résidus d'ACE2. Résidus *hot-spots* : R403, Q498 et T500 (RBD), K31, E37, D38, Y41 et K353 (ACE2)
Chan *et al.* [139]	*deep mutagenesis*, cytométrie en flux	22	10,5[a]	Possibilité d'accroître l'affinité avec le RBD grâce à des mutations d'ACE2 : au niveau de l'interface (substitution de T27 par un résidu hydrophobe, mutation D30E, substitution de K31 par un résidu aromatique) ou plus loin de l'interface (mutation de S19, L91, T92, T324 ou Q325 par la proline, mutation au niveau des résidus N90 et T92)

TABLE 2.2 – *Tableau récapitulatif des principaux résultats développés dans les études présentées, concernant la caractérisation des interactions entre le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine spike du SARS-CoV-2.* [a] *Calcul effectué à partir de la valeur de K_d, grâce à l'équation 1.4, page 10.*

2.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un état de l'art de travaux expérimentaux et de simulations de dynamique moléculaire en lien avec les systèmes que nous souhaitons modéliser.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la modélisation des monocouches de silanes en simulations de dynamique moléculaire. Après avoir rappelé le principe de techniques expérimentales utilisées dans notre équipe pour caractériser la structure des monocouches de silanes, nous avons présenté différents travaux ayant développé des méthodes de modélisation de ces monocouches. Nous avons vu que les méthodes utilisant un champ de force réactif requièrent des temps de calcul très importants. Différentes méthodes utilisant un champ de force classique ont également été développées. Néanmoins, la structure des monocouches obtenues avec ces méthodes dépend de nombreux paramètres tels que le champ de force, la structure de la couche de SiO_2 ou la prise en compte des réactions de réticulation entre les molécules de silane trifonctionnelles. Nous avons notamment remarqué que la méthode développée par Roscini *et al.* [69] se distingue des autres méthodes présentées car aucune liaison covalente n'est définie entre les molécules de silane et le SiO_2, ce qui permet aux molécules de s'organiser spontanément sur la surface. Cependant, seules des molécules de silane avec des groupements terminaux non chargés ($-CH_3$) ont été considérées. Nous cherchons donc à adapter cette méthode pour les différentes monocouches de silanes que nous souhaitons modéliser.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la modélisation en simulations de dynamique moléculaire de l'adsorption de protéines sur des surfaces, et l'impact de cette immobilisation sur le phénomène de reconnaissance moléculaire. Les études présentées mettent en évidence les effets du type de surface, de sa charge et de son hydrophobicité sur l'orientation finale de la protéine et les changements de conformation induits par son adsorption. En particulier, la nature du groupement terminal influence le mécanisme d'adsorption des biomolécules sur des monocouches auto-assemblées de thiols ou de silanes. De plus, quelques études de simulations de dynamique moléculaire ont montré les effets de l'orientation sur la surface et des changements de conformation induits par l'immobilisation d'une biomolécule, sur les interactions qui s'établissent au sein du complexe. Notre étude s'inscrit dans la suite de celles-ci, puisque nous souhaitons caractériser l'influence de la nature du groupement terminal et de la longueur de la chaîne alkyle sur les changements de conformation induits par l'adsorption de protéines et sur les interactions protéine - ligand.

Dans la troisième partie, nous avons étudié l'organisation et les propriétés dynamiques des ions et des molécules d'eau situées à proximité des interfaces. Nous avons présenté des études expérimentales et de dynamique moléculaire qui montrent comment les propriétés des ions et des molécules d'eau situées à l'interface diffèrent des propriétés de l'eau *bulk* et sont impactées par le type de surface. Ces études ont montré que les perturbations induites par la surface ne sont observées que dans les premières couches d'eau et disparaissent rapidement en s'éloignant de la surface. Dans le cas des surfaces avec des monocouches fonctionnalisées, les propriétés des molécules d'eau et des ions à l'interface sont influencées à la fois par la nature du groupement terminal et par la disposition des molécules sur la surface. Enfin, plusieurs études expérimentales et de dynamique moléculaire ont montré que l'organisation des ions et des molécules d'eau à l'interface influence le mécanisme d'adsorption des biomolécules. C'est pourquoi dans notre étude nous cherchons à caractériser les propriétés des ions et des molécules d'eau à l'interface avec les différentes monocouches de silanes que nous modélisons.

Dans la quatrième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés au complexe streptavidine - biotine. Ce complexe a été largement étudié, à la fois expérimentalement et en simulations de dynamique moléculaire. En particulier, des études de dynamique moléculaire ont permis de

caractériser les interactions streptavidine - biotine et le processus de détachement entre la protéine et le ligand à l'échelle atomique, pour le complexe en solution. Le complexe streptavidine - biotine constitue donc pour nous un système modèle, et dans notre étude, nous souhaitons caractériser les modifications des interactions streptavidine - biotine induites par l'adsorption de la streptavidine sur nos différentes monocouches de silanes.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée au complexe formé par le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine spike, située à la surface du SARS-CoV-2. Ce complexe a été largement étudié depuis le début de la pandémie de Covid-19, puisqu'il est au centre du processus d'infection virale. Nous avons présenté différentes études expérimentales et de simulations de dynamique moléculaire caractérisant les interactions entre ACE2 et le RBD de la protéine spike en solution. Dans le cadre de notre étude, nous souhaitons étudier l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différents types de monocouches de silanes, et l'impact de son adsorption sur les interactions qui s'établissent avec le RBD de la protéine spike.

Deuxième partie

Méthodes

CHAPITRE 3

Modélisation des monocouches de silanes, protocoles de simulation et paramètres d'analyse

3.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que les simulations de dynamique moléculaire sont bien adaptées à l'étude des interactions protéine - ligand et à la description des changements de conformation associés à l'adsorption de protéines sur des surfaces. Nous nous sommes également intéressés à la modélisation des monocouches de silanes. Nous avons montré que différentes méthodes ont été développées en dynamique moléculaire, dont certaines ne rendent pas parfaitement compte de la structure des monocouches de silanes observée expérimentalement. De plus, les travaux publiés s'intéressent principalement à des monocouches constituées de molécules de silane trifonctionnelles et avec des groupements terminaux non chargés.

Ce chapitre présente, dans une première partie, la méthode que nous avons employée pour modéliser les monocouches de silanes et que nous avons adaptée de celle proposée par Roscioni *et al.* [69]. Nous présentons les différentes molécules de silane modélisées, les champs de force associés et les monocouches de silanes obtenues.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous présentons de façon plus détaillée les protocoles que nous avons utilisés pour modéliser nos différents systèmes. Nous détaillons en particulier le protocole employé pour modéliser l'adsorption des protéines étudiées sur les différentes monocouches de silanes, ainsi que celui utilisé pour la réalisation des simulations SMD, permettant de caractériser le phénomène de reconnaissance moléculaire grâce à l'étude du détachement protéine - ligand.

Enfin, dans la troisième partie de ce chapitre, nous présentons les différents paramètres d'analyse que nous avons utilisés pour caractériser la structure et l'organisation des différents atomes, ions et molécules dans nos simulations, et pour lesquels des outils spécifiques sont disponibles avec les logiciels Gromacs et VMD. Nous présentons également les codes Python que nous avons développés dans le cadre de notre étude pour compléter les outils préexistants, notamment pour caractériser la structure des monocouches de silanes et l'organisation des ions et des molécules d'eau à l'interface.

3.2 Modélisation de la fonctionnalisation d'une surface de SiO_2 avec différentes monocouches de silanes

Comme expliqué au paragraphe 2.2.2, page 35, plusieurs méthodes ont été développées pour modéliser la fonctionnalisation d'une surface de SiO_2 par une monocouche de silanes. Cependant, ce domaine fait encore l'objet de peu de publications, et il n'existe pas de méthode ni de champ de force communément admis pour modéliser simplement et de façon réaliste tout type de monocouche de silanes. En particulier, la plupart des études considèrent des molécules de *n*-alkylsilanes avec des chaînes alkyles de différentes longueurs et des groupement terminaux CH_3, mais très peu d'études s'intéressent à d'autres types de groupements terminaux (-OH, -NH_3^+ ou -COO^- par exemple).

Les méthodes utilisant un champ de force réactif, comme celles développées par Deetz *et al.* et Black *et al.* ont pour objectif de reproduire le plus fidèlement possible le processus de silanisation expérimental, avec la modélisation de la formation de la couche de SiO_2 amorphe, de l'apparition de groupes hydroxyles sur la surface par réaction avec des molécules d'eau ou de H_2O_2 et de la formation de la monocouche de silanes par mise en contact de la surface avec un mélange contenant des molécules d'hexane et de silane [59, 71]. Cependant, les angles d'inclinaison obtenus par Black *et al.* sont plus élevés que les valeurs attendues d'après les résultats expérimentaux [69]. De plus, ces méthodes requièrent des calculs 50 fois plus importants que celles utilisant un champ de force classique [71].

Les méthodes utilisant un champ de force classique étudient des molécules de silane trifonctionnelles et proposent généralement de définir des liaisons entre les molécules de silane et avec la surface à l'état initial des simulations [70, 72, 73]. Une autre méthode est proposée dans l'étude de Roscioni *et al.* [69], où aucune liaison covalente n'est définie avec la surface de SiO_2 amorphe, les interactions étant assurée par d'importantes interactions électrostatiques et de Lennard-Jones. Cette méthode permet d'observer l'organisation spontanée des molécules sur la surface, avec une diffusion de quelques dizaines d'Å au cours de la simulation [69]. De plus, les monocouches de silanes obtenues présentent une structure en accord avec les résultats expérimentaux concernant les angles d'inclinaison, l'épaisseur de la monocouche et la distribution des molécules sur la surface [69]. Nous proposons donc une méthode de modélisation de la fonctionnalisation d'une couche de SiO_2 amorphe par une monocouche de silanes largement inspirée des travaux de Roscioni *et al.*, en adaptant les champs de force proposés pour des molécules de silane présentant une chaîne alkyle plus courte ou un groupement terminal chargé.

3.2.1 Présentation des quatre molécules de silane étudiées

Nous portons notre étude sur quatre molécules de silane monofonctionnelles, correspondant à des molécules étudiées expérimentalement au sein de notre équipe. Ces molécules diffèrent par la longueur de leur chaîne alkyle (entre 3 et 18 atomes de carbone) et la nature de leur groupement terminal (voir tableau 3.1) :

- *n*-butyldiméthylméthoxysilane, appelée **CH_3 court**, cette molécule présente une courte chaîne alkyle ($n = 4$) et un groupement terminal non chargé (-CH_3) ;
- 3-aminopropyldiméthyléthoxysilane (APDMES), appelée **NH_3^+**, cette molécule possède également une courte chaîne alkyle ($n = 3$) et un groupement terminal chargé positivement (-NH_3^+) à pH = 7 ;
- octadecyldiméthylméthoxysilane, appelée **CH_3 long**, cette molécule présente une longue chaîne alkyle ($n = 18$) et un groupement terminal non chargé (-CH_3) ;
- diméthylamino(diméthyl)silylundecanoate, appelée **COO^-**, cette molécule présente une longue chaîne alkyle ($n = 11$) et un groupement terminal chargé négativement (-COO^-) à pH = 7.

Désignation	Formule brute	Formule topologique
CH_3 court	$C_7H_{18}OSi$	
NH_3^+	$C_7H_{20}NOSi$	
CH_3 long	$C_{21}H_{46}OSi$	
COO^-	$C_{15}H_{32}NO_2Si$	

TABLE 3.1 – *Représentation des quatre molécules de silane modélisées*

3.2.2 Description de la structure des molécules de silane et du champ de force

Comme, à notre connaissance, aucun champ de force n'a été publié pour des molécules de silane monofonctionnelles (c'est-à-dire avec une structure diméthylsilanol $OSi(CH_3)_2R$ par exemple), nous reprenons la structure de Roscioni *et al.* pour modéliser nos molécules de silane (voir paragraphe 2.2.2, page 35). En effet, du fait de la structure $OSi(OH)_2R$, il ne peut s'établir qu'une seule liaison avec la surface de SiO_2. De plus, comme nous n'utilisons pas un champ de force réactif, les groupements trisilanols ne peuvent pas former de liaisons Si-O-Si entre les molécules de silane. On considère donc que, malgré leur structure trisilanol, les molécules se comportent comme des silanes monofonctionnels dans nos simulations. Notons cependant que cette méthode ne nous permet pas de prendre en compte la gêne stérique engendrée par les groupements méthyles (-CH_3), qui pourrait engendrer une baisse de la densité atteignable par rapport à la structure utilisée [145]. Néanmoins, nous modélisons des monocouches de silanes avec une densité proche de celle obtenue expérimentalement dans notre équipe, et qui vaut environ 3 molécules/nm^2.

Pour pouvoir observer la diffusion des molécules de silane sur la surface de SiO_2 à partir d'une organisation aléatoire, nous adaptons la méthode de Roscioni *et al.* en positionnant initialement les résidus $OSi(OH)_2R$ dans un plan xy situé à environ 0,2 - 0,3 nm de la surface. Les molécules sont placées dans le plan de façon aléatoire, avec une distance minimale de 0,3 à 0,4 nm entre elles, à l'aide d'un code Python. Pour favoriser le rapprochement entre les molécules de silane et la surface de SiO_2 amorphe au cours de la simulation, des paramètres de Lennard-Jones élevés sont utilisés pour les atomes des molécules de silane qui se lient à la surface. De plus, les molécules d'eau situées entre la surface de SiO_2 et les silanes sont retirées au début de la simulation (jusqu'au milieu des molécules de silane). Après la minimisation de l'énergie, les molécules de silane sont suffisamment proches de la surface, et une restriction de position est appliquée sur l'atome d'oxygène lié au SiO_2, dans la direction normale à la surface. Aucune restriction de position n'est appliquée dans les autres directions, pour permettre aux molécules de silane de diffuser et de se réorganiser à la surface au cours de la simulation.

Les champs de force des différentes molécules de silane sont adaptés des études de Roscioni *et al.* [69] et Castillo *et al.* [72] et du champ de force OPLS tout-atome [31], et détaillés en annexe A, page 221. Pour tous les atomes exceptés les groupements terminaux COO^- et NH_3^+

et l'atome de carbone voisin, les paramètres de Lennard-Jones et les paramètres associés aux interactions liantes (élongation, flexion et torsion) sont issus de l'étude de Castillo *et al.* [72], tandis que les valeurs des charges sont adaptées des travaux de Roscioni *et al.* [69]. Notons que nous utilisons des valeurs issues de deux études différentes car l'une était incomplète pour les charges et l'autre pour les paramètres associés aux différentes interactions. La charge des atomes des groupements hydroxyles liés à l'atome de silicium est légèrement adaptée pour garantir une charge totale neutre aux molécules de silane sans groupement terminal chargé (et une charge globale de +1 ou -1 lorsque le groupement terminal est NH_3^+ ou COO^- respectivement). De plus, la charge des atomes de carbone et d'hydrogène dépend de leur position dans la chaîne alkyle, or l'étude de Roscioni *et al.* ne contient que des molécules de silane comportant 18 atomes de carbone. Pour les molécules avec une chaîne alkyle plus courte (CH_3 court, NH_3^+ et COO^-), nous reprenons les charges des atomes de carbone situés à la même position dans la chaîne alkyle, légèrement adaptées pour respecter la charge globale de la molécule. Pour les atomes des groupements terminaux COO^- et NH_3^+ et l'atome de carbone voisin, toutes les valeurs sont issues du champ de force OPLS [31].

Les molécules de silane sont immobilisées sur une couche de SiO_2 amorphe. Nous reprenons la structure publiée par Roscioni *et al.* [69], sans les groupements hydroxyles et en adaptant ses dimensions grâce à un code Python (les dimensions initiales valent 9,1 nm × 7,8 nm × 6,7 nm environ). Comme pour les molécules de silane, les charges sont issues des valeurs publiées par Roscioni *et al.* [69] et les paramètres de Lennard-Jones de Castillo *et al.* [72]. Les paramètres du champ de force pour la couche de SiO_2 sont également détaillés en annexe A, page 228.

3.2.3 Présentation des monocouches de silanes obtenues

Les molécules de silane étudiées nous permettent de modéliser quatre types de monocouches, désignées par le nom de la molécule qui les compose (CH_3 court, NH_3^+, CH_3 long et COO^-). Trois densités différentes, ou taux de couverture, sont considérés : $d = 1{,}5$ nm^{-2} ; $d = 3{,}0$ nm^{-2} (densité expérimentale) et $d = 4{,}2$ nm^{-2}. Deux monocouches mixtes sont également modélisées :

— la monocouche **mix court**, qui correspond à un mélange (1:1) de molécules NH_3^+ et CH_3 court

— la monocouche **mix long**, constituée d'un mélange (1:1) de molécules NH_3^+ et CH_3 long.

Quelques exemples de monocouches de silanes obtenues avec notre méthode sont présentés sur la figure 3.1. Ces images illustrent la diffusion des molécules dans le plan xy ainsi qu'une variation de leur angle d'inclinaison au cours de la simulation. La structure de l'ensemble des monocouches de silanes modélisées est étudiée et comparée à celle de monocouches obtenues expérimentalement au sein de notre équipe au chapitre 4, page 89.

3.2.4 Les avantages et limites de la méthode

Notre méthode présente quelques limites et notamment, comme expliqué précédemment, le fait que nous modélisons des molécules de silane monofonctionnelles par des molécules trifonctionnelles (sans possibilité toutefois d'établir des réactions de réticulation). De plus, nous observons que les atomes de la couche de SiO_2 se déplacent légèrement au cours de la simulation, conduisant à une dilatation de celle-ci. Néanmoins, la densité des monocouches de silanes obtenues correspond à celle observée expérimentalement. De plus, comme nous le verrons au chapitre 4, page 89, la structure des monocouches est en accord avec les caractérisations expérimentales effectuées dans notre équipe, et les résultats obtenus dans de précédentes études de dynamique moléculaire. De plus, notre méthode nous permet d'observer l'organisation spontanée des molécules sur la surface, contrairement aux méthodes qui définissent des liaisons covalentes entre les

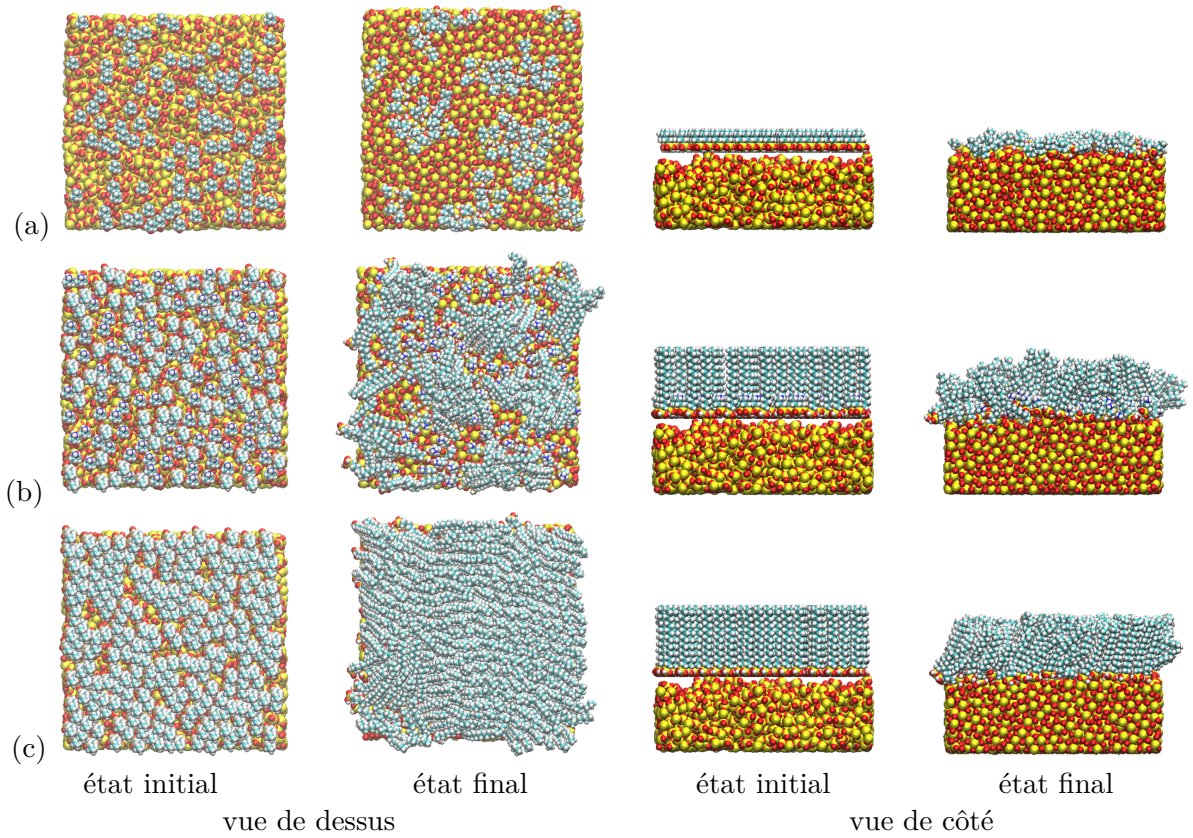


FIGURE 3.1 – *Images de différentes monocouches de silanes à l'état initial et à l'état final (simulations de 100 ns) : (a) CH_3 court d = 1,5 nm^{-2}, (b) mix long d = 3,0 nm^{-2} et (c) CH_3 long d = 4,2 nm^{-2}. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène) et bleu foncé (azote).*

molécules de silane et la surface à l'état initial des simulations. Les distances intermoléculaires obtenues sont en accord avec les résultats de l'étude de Roscioni *et al.* [69].

3.3 Préparation des systèmes initiaux et protocole de simulation

Dans cette partie, nous présentons les méthodes que nous avons employées pour la définition des états initiaux des boîtes de simulation. Nous présentons en particulier les différents codes Python que nous avons développés afin de définir facilement et de façon reproductible nos systèmes. Nous présentons également nos protocoles de simulation, en distinguant d'une part les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, qui permettent de modéliser l'arrangement des molécules de silane sur la surface de SiO_2 amorphe ainsi que l'adsorption des protéines (la streptavidine et le récepteur cellulaire ACE2), et d'autre part les simulations SMD.

3.3.1 Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles : modélisation de l'arrangement des monocouches de silanes et de l'adsorption des protéines

3.3.1.a Définition du système initial

Le système initial est défini en disposant les différents éléments de façon arbitraire dans la boîte de simulation : la couche de SiO_2 amorphe, les molécules de silane, les molécules d'eau, les ions Na^+ et Cl^-, le mur de Lennard-Jones, et éventuellement une protéine ou un complexe. La figure 3.2 présente un exemple de système que nous avons étudié, à l'état initial.

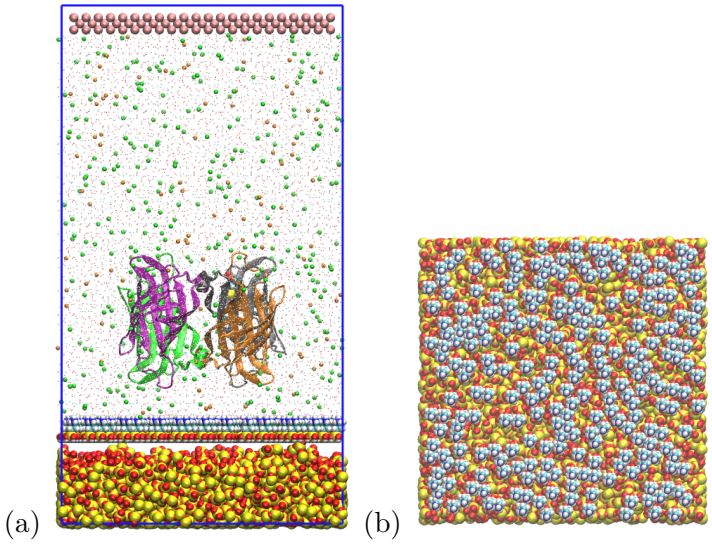


FIGURE 3.2 – *Image à l'état intial du système comportant la streptavidine tétramérique, la biotine, la couche de SiO_2 amorphe, les molécules de silane formant la monocouche NH_3^+, des molécules d'eau, des ions Na^+ et Cl^- et le mur de Lennard-Jones : (a) le système complet vu de côté et (b) la surface vue de dessus. La streptavidine est placée au-dessus de la surface avec l'orientation initiale 2. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote), et les ions par des points orange (Na^+) et verts (Cl^-). Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau par des points.*

Couche de SiO_2 amorphe Nous redimensionnons la couche de SiO_2 amorphe publiée par Roscioni et *al.* [69] (fichier : OTS_3.02_300K.pdb, dimensions : 9,1 nm × 7,8 nm × 6,7 nm environ) aux dimensions de notre boîte de simulation et avec une épaisseur de 2 à 2,5 nm, grâce au code Python *dimensions_SiO2_v5.py*.

Mur de Lennard-Jones Afin de bloquer les interactions qui pourraient s'établir entre les molécules d'eau et la face inférieure du SiO_2 si l'on considérait des conditions périodiques dans les trois directions de l'espace, on place un mur de Lennard-Jones en haut de la boîte de simulation et on ne considère des conditions périodiques que selon les directions x et y. Le mur de Lennard-Jones est constitué d'atomes disposés régulièrement selon un arrangement cubique centré avec un paramètre de maille de 0,4 nm. Les paramètres du champ de force utilisés sont ceux publiés par Kitabata *et al.* [111] (voir annexe A, page 228). Les atomes du mur de Lennard-Jones sont placés dans la boîte de simulation grâce au code Python *LJ_layer.py*.

Molécules de silane On place ensuite dans la boîte de simulation le nombre de molécules de silane correspondant à la densité souhaitée. Les molécules sont disposées de façon aléatoire dans un plan situé environ 0,3 nm au-dessus de la couche de SiO_2 à l'aide des codes Python *couche_silanes_aleatoire.py*, *add_silanes.py* et *fusionner_fichiers_gro.py*, faisant appel à la fonction Gromacs *editconf*. Dans le cas d'une monocouche mixant deux types de molécules de silane, on place d'abord les molécules correspondant au premier type, puis celles correspondant au deuxième type, grâce aux codes Python *couche_silanes_aleatoire_mix2_silanes_v4.py*, *add_silanes_v2.py* et *fusionner_fichiers_gro.py*.

Protéine ou complexe Si nécessaire, on ajoute ensuite une protéine ou un complexe dans la boîte de simulation. Après avoir défini son orientation, la protéine est ajoutée à l'aide de la fonction Gromacs *editconf* et du code Python *fusionner_fichiers_gro.py*. Afin de s'assurer que la distance entre la protéine et la surface correspond bien à celle voulue, on calcule rapidement la coordonnée minimale de la protéine en z à l'aide du code Python *hauteur_min_max.py*.

Molécules d'eau Les molécules d'eau sont ajoutées dans la boîte de simulation à l'aide de la fonction Gromacs *solvate*. On utilise le modèle d'eau TIP4P : il s'agit d'un modèle d'eau à quatre atomes, c'est-à-dire qu'il comporte un atome virtuel portant la charge partielle associée à l'atome d'oxygène (voir figure 3.3) [146]. Ce modèle permet de mieux reproduire les propriétés de l'eau qu'un modèle classique à trois atomes, en particulier aux interfaces.

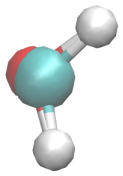


FIGURE 3.3 – *Molécule d'eau issue du modèle TIP4P comportant deux atomes d'hydrogène (en blanc), un atome d'oxygène (en rouge) et un atome virtuel portant la charge partielle de l'oxygène (en bleu).*

De plus, on retire les molécules d'eau qui pourraient se trouver entre la surface de SiO_2 et les molécules de silane ainsi qu'entre les atomes du mur de Lennard-Jones, à l'aide du code Python *remove_water_tip4p.py*.

Ions Na^+ et Cl^- Des ions Na^+ et Cl^- sont ajoutés afin d'équiliber les charges du système, car certaines molécules ont une charge non nulle (par exemple les molécules de silane NH_3^+ et COO^- ou certaines protéines). De plus, on ajoute des ions Na^+ et Cl^- à une concentration de 0,150 mol·L^{-1}, afin de reproduire les conditions physiologiques. Les ions sont ajoutés à l'aide de la fonction Gromacs *genion*.

3.3.1.b Protocole de simulation

Le protocole de simulation comprend les étapes suivantes : minimisation de l'énergie, équilibre NVT, équilibre NPT et production.

Minimisation de l'énergie La minimisation de l'énergie modifie les positions des atomes dans le système de façon à obtenir une structure de départ réaliste pour la simulation, en termes de géométrie ou d'orientation du solvant par exemple. Cette étape permet donc de relaxer les contraintes et de minimiser les forces qui s'appliquent sur chaque atome [41]. Nous réalisons la minimisation de l'énergie à 300 K et 1 bar, et nous utilisons l'intégrateur *steep*, qui fonctionne sur la base de la méthode du gradient *(steepest descent)*. La minimisation s'arrête lorsque la force maximale exercée sur chaque atome vaut moins de 1000 kJ·mol^{-1}·nm^{-1}.

Équilibre NVT Alors que la minimisation de l'énergie permet notamment aux molécules de solvant de s'orienter correctement entre elles, les étapes d'équilibre permettent quant à elles d'équilibrer le solvant avec les protéines, à la bonne température et à la bonne pression [41]. La première étape de l'équilibre est réalisée dans l'ensemble NVT, c'est-à-dire à nombre de particules, volume et température constants. Nous réalisons l'équilibre NVT avec un intégrateur MD, qui résout les équations du mouvement avec l'algorithme *leap-frog*. Nous réalisons un équilibre NVT de 100 ps, avec un pas de temps de 2 fs et nous utilisons un thermostat de Nosé-Hoover pour maintenir la température à 300 K. Les vitesses initiales des atomes sont déterminées à l'aide d'une distribution de Maxwell-Boltzmann. Des contraintes sont appliquées sur les liaisons hydrogène (algorithme LINCS), et des restrictions de position sur la protéine ou le complexe.

Équilibre NPT La seconde étape de l'équilibre est réalisée dans l'ensemble NPT, ou isotherme-isobare, donc à nombre de particules, pression et température constants. Cette étape permet de stabiliser la pression et la densité du système [41]. Nous utilisons le même intégrateur MD, et nous appliquons les mêmes contraintes sur les liaisons hydrogène. Nous réalisons l'équilibre NPT avec une durée de 100 ps et un pas de temps de 2 fs. Nous utilisons un thermostat de Nosé-Hoover et un barostat de Parrinello-Rahman permettent de maintenir la température et la pression à 300 K et 1 bar respectivement. Les vitesses initiales des atomes correspondent aux vitesses finales de l'équilibre NVT.

Production Enfin, l'étape de production est réalisée en retirant les restrictions de position sur les protéines. Les seules restrictions de position toujours présentes concernent le SiO_2 et le mur de Lennard-Jones, ainsi que l'atome d'oxygène des silanes qui se lie au SiO_2 (pour ce dernier, la restriction est appliquée uniquement selon l'axe z). Nous réalisons des productions avec une durée comprise entre 100 ns et 300 ns et un pas de temps de 2 fs. Des contraintes sont toujours appliquées sur les liaions hydrogène. La température et la pression sont toujours maintenues grâce à un thermostat de Nosé-Hoover et un barostat de Parrinello-Rahman. Les vitesses initiales correspondent aux vitesses finales de l'équilibre NPT pour la première réplique, et à des vitesses aléatoires issues d'une distribution de Maxwell-Boltzmann pour les autres répliques.

Remarque : Le même protocole est utilisé pour modéliser les complexes en solution, qui constituent pour nous une référence concernant la structure du complexe et les interactions

protéine - ligand ou protéine - protéine. Cela nous permet ensuite de déterminer les modifications induites par les changements de conformation associés à l'adsorption de la protéine sur les différentes monocouches de silanes.

3.3.2 Simulations SMD : modélisation du détachement dans les complexes protéine - ligand ou protéine - protéine

3.3.2.a Définition du système initial

Les simulations SMD sont réalisées à partir des états finaux des simulations modélisant l'adsorption du complexe sur une surface et permettent d'identifier les effets de l'adsorption de la streptavidine ou du récepteur cellulaire ACE2 sur les interactions qui s'établissent avec la biotine ou le RBD de la protéine spike respectivement. Afin de modéliser une expérience d'AFM en mode SMFS, le tirage est réalisé dans la direction normale à la surface. Cependant, il est nécessaire que la distance de tirage soit plus petite que la taille de la boîte de simulation : celle-ci donc être agrandie dans la direction normale à la surface. Notons que nous n'utilisons pas la boîte agrandie pour modéliser l'adsorption des protéines afin de diminuer les temps de calcul.

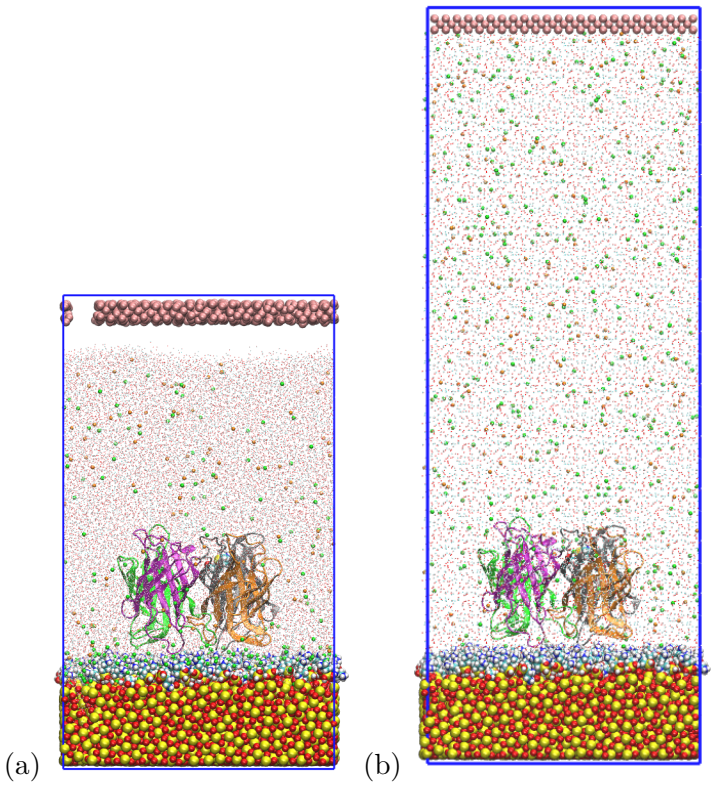


FIGURE 3.4 – *Images du système comportant la streptavidine tétramérique, la biotine, la couche de SiO_2 amorphe, les molécules de silane formant la monocouche NH_3^+, des molécules d'eau, des ions Na^+ et Cl^- et le mur de Lennard-Jones (a) à l'état final d'une simulation de dynamique moléculaire conventionnelle et (b) à l'état intial des simulations SMD . La streptavidine est adsorbée sur la surface avec l'orientation initiale 2. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote), et les ions par des points orange (Na^+) et verts (Cl^-). Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau par des points.*

Retirer le mur, les ions et les molécules d'eau La première étape consiste à retirer l'ensemble des atomes du mur de Lennard-Jones, les ions et les molécules d'eau du système à l'état final des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, c'est-à-dire que l'on conserve uniquement la surface (SiO_2 et monocouche de silanes), ainsi que le complexe adsorbé. Cette étape est réalisée à l'aide du code Python *remove_water_ions.py*.

Redimensionnement de la boîte La boîte de simulation est redimensionnée à la taille souhaitée à l'aide de la fonction Gromacs *editconf*.

Ajout du mur de LJ, des molécules d'eau et des ions Enfin, comme précédemment, les atomes du mur de Lennard-Jones sont ajoutés avec le code Python *LJ_layer.py*, les molécules d'eau avec la fonction Gromacs *solvate* (les molécules situées dans le mur de Lennard-Jones sont retirées avec code Python *remove_water_tip4p.py*). Enfin, les ions sont ajoutés avec la fonction Gromacs *genion*.

3.3.2.b Protocole de simulation

Le protocole de simulation est très proche de celui présenté précédemment, puisqu'il comprend les étapes de minimisation de l'énergie, d'équilibre NPT et de production (on ne réalise pas d'équilibre NVT, l'équilibre NPT seul étant suffisant pour équilibrer le système). La force entraînant le détachement est appliquée sur la biotine ou sur le RBD de la protéine spike pendant l'étape de production uniquement. La durée de la production varie en fonction de la constante de force et de la vitesse de tirage choisies, qui rendent le processus de détachement plus ou moins long. Comme pour les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, plusieurs répliques de simulations sont réalisées.

3.3.3 Les limites de notre méthode

La méthode de simulation proposée nous permet, comme nous le verrons dans la suite, de modéliser la formation des monocouches de silanes sur la surface de SiO_2 amorphe et l'adsorption des protéines. De plus, les effets des changements de conformation induits par l'adsorption sur les interactions protéine - ligand ou protéine - protéine peuvent être évalués à l'aide de simulations SMD. Cependant, en plus des limitations associées à la technique de la dynamique moléculaire (évoquées au paragraphe 1.3.8, page 24), notre méthode présente les limites qui lui sont propres.

Concernant la construction du système, nous avons déjà évoqué des limites concernant la modélisation de la surface (voir paragraphe 3.2.4, page 72). Nous pouvons également noter qu'une zone de vide apparaît entre les atomes du mur de Lennard-Jones et le haut de la couche d'eau, comme illustré sur la figure 3.4 (a). Nous observons aussi une mauvaise estimation de la pression globale dans le système. Néanmoins, comme nous le verrons au chapitre 4, page 89, la masse volumique de l'eau correspond bien à la valeur attendue à pression atmosphérique.

Concernant l'étude de l'adsorption des protéines, nous avons choisi d'étudier ce phénomène avec des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles, d'une durée de 100 ns à 200 ns, en positionnant les protéines à proximité de la surface à l'état initial, et avec plusieurs orientations. Nous estimons l'orientation la plus favorable en déterminant la somme des contributions électrostatique et de Lennard-Jones à l'énergie d'interaction entre la protéine et les molécules de silane, à l'état final des simulations. Cependant, cette méthode peut ne pas systématiquement conduire à la détermination de la configuration la plus stable, le processus d'adsorption d'une protéine sur une surface pouvant être très long (de plusieurs secondes jusqu'à des heures [147]). C'est pourquoi de nouvelles techniques ont été introduites, qui proposent un échantillonnage

plus adapté afin de déterminer la configuration la plus stable de la protéine adsorbée sur la surface [147]. On pourra notamment citer les méthodes REMD (*Replica Exchange Molecular Dynamics*) ou aMD (*accelerated Molecular Dynamics*).

Une autre limite concerne l'étude du phénomène de reconnaissance moléculaire, puisque nous modélisons l'adsorption du complexe sur les différentes surfaces, et non l'adsorption de la protéine seule, suivie de la capture d'un ligand ou d'une autre protéine qui serait ajouté dans la boîte de simulation. Cela peut introduire des artéfacts concernant la structure de la protéine adsorbée et la conservation de sa capacité à se lier à une autre protéine ou à un ligand.

Enfin concernant les simulations SMD, nous étudions le détachement des différents complexes en appliquant une force uniquement dans la direction normale à la surface, bien qu'il ait été montré que le choix de la direction de tirage peut influencer le mécanisme du détachement et la valeur de la force de rupture. Nous avons essayé de prendre en compte cela en réalisant des simulations SMD avec différentes configurations initiales, pour lesquelles la protéine va présenter une orientation légèrement différente sur la surface. De plus, nous ne modélisons pas la molécule permettant de relier le ligand à la pointe de l'AFM.

3.4 Présentation des paramètres d'analyse des simulations

Cette partie présente les paramètres que nous avons utilisés pour caractériser les différents éléments des systèmes de simulation, notamment la structure et l'organisation des monocouches de silanes, l'organisation des molécules d'eau, les changements de conformation des protéines, ainsi que les interactions protéine - surface et protéine - ligand. Nous présentons les fonctionnalités des logiciels Gromacs [148] et VMD [149] que nous avons utilisées, ainsi que les codes Python que nous avons développés dans le cadre de notre étude. Ces derniers font notamment appel aux modules Math, Matplotlib et NumPy. Notons enfin que la plupart des courbes obtenues ont été tracées avec le logiciel Gnuplot.

3.4.1 Structure et organisation des monocouches de silanes

Épaisseur. L'étude de l'épaisseur des monocouches de silanes est intéressante car ces valeurs peuvent être comparées à des données expérimentales, obtenues par ellipsométrie par exemple. En simulations de dynamique moléculaire, l'épaisseur peut être définie de différentes façons. Par exemple, on peut considérer la distance entre l'atome de silicium et l'atome terminal de la molécule de silane, projetée dans la direction normale à la surface [69], ou encore la distance, normale à la surface, entre l'atome d'oxygène du substrat lié à la molécule de silane et l'atome de celle-ci le plus éloigné de la surface [72]. Notre code Python *thickness_histogram_v3.py* permet de calculer l'épaisseur moyenne de la monocouche de silanes et un histogramme des valeurs obtenues pour les différentes molécules de la monocouche. L'épaisseur est calculée comme la distance projetée selon l'axe z entre un atome choisi par l'utilisateur (dans notre cas l'atome de silicium de la molécule) et l'atome le plus éloigné de la surface suivant l'axe z.

Angle d'inclinaison. En simulations de dynamique moléculaire, l'angle d'inclinaison est défini par Roscioni *et al.* comme l'angle entre la normale à la surface et le vecteur reliant l'atome de silicium et l'atome terminal de la molécule de silane [69]. Nous déterminons celui-ci à l'aide des fonctions Gromacs *make_ndx* et *gangle*. Nous obtenons ensuite les valeurs moyennes et les histogrammes à l'aide de codes Python.

Paramètre d'ordre Le paramètre d'ordre des liaisons chimiques, noté S_{CC}, décrit l'orientation des liaisons chimiques par rapport à la normale à la surface [67]. Il est défini ainsi :

$$S_{CC} = \frac{3\cos^2\varphi - 1}{2} \tag{3.1}$$

avec φ l'angle entre la liaison C-C et la normale à la surface (voir figure 3.5). Ainsi, S_{CC} prend des valeurs entre -0,5 et 1. $S_{CC} = -0,5$ correspond à une liaison parallèle à la surface ($\varphi = 90°$) et $S_{CC} = 1$ correspond à une liaison perpendiculaire à la surface ($\varphi = 0°$). Notons que dans un groupe de liaisons chimiques orientées aléatoirement, $< S_{CC} >= 0$.

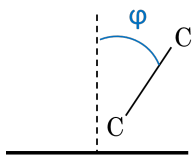


FIGURE 3.5 – *Illustration de l'angle φ entre la liaison C-C et la normale à la surface.*

Notre code Python *order_parameter_v2.py* permet de déterminer à la fois la valeur moyenne pour chaque type de liaison séparément, et la distribution des valeurs de S_{CC} dans toute la monocouche de silanes.

Conformation *gauche* ou *trans*. La proportion de molécules de silane en conformation *trans* peut être évaluée grâce au paramètre r_{trans} [67]. Pour chaque molécule de silane, ses angles de torsion C-C-C-C, notés ϕ, sont calculés (voir figure 3.6). Si $150 \leq \phi \leq 180$, l'angle de torsion est en conformation *trans*, et si $50 \leq \phi \leq 150$, l'angle de torsion est en conformation *gauche*.

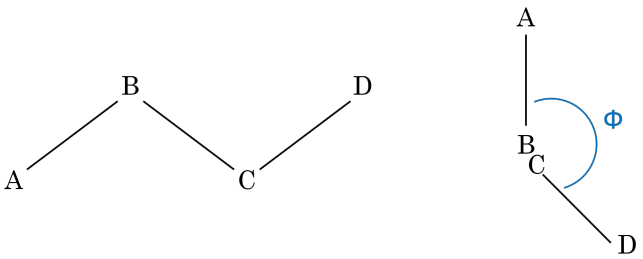


FIGURE 3.6 – *Illustration de l'angle de torsion ϕ.*

r_{trans} est défini comme le nombre d'angles de torsion en conformation *trans*, divisé par la somme des nombres d'angles de torsion en conformation *trans* et *gauche* :

$$r_{trans} = \frac{nb_{trans}}{nb_{trans} + nb_{gauche}} \tag{3.2}$$

Nous calculons également le paramètre r_{trans} à l'aide du code Python *order_parameter_v2.py*.

Longueur La longueur des molécules de silane est définie par Roscioni *et al.* comme la distance entre leur atome de silicium et leur atome terminal [69]. Notre code Python *histogramme_longueur_silanes_v3.py* nous permet de calculer la longueur moyenne des molécules de silane et l'histogramme des longueurs dans la monocouche.

Distribution radiale en 2D La distribution radiale des molécules de silane dans le plan xy est proportionnelle à la probabilité de trouver des molécules voisines en fonction de la distance à une molécule donnée [69, 113]. Nous l'évaluons en tenant compte des conditions périodiques aux frontières à l'aide du code Python *position_silanes_histogramme_v5.py*.

Rugosité Nous évaluons la rugosité des monocouches de silanes avec une méthode définie par analogie avec l'AFM, et adaptée des travaux de Kong *et al.* [70] et Roscioni *et al.* [69]. Pour cela, nous avons développé le code Python *delta_z_v4.py*, qui détermine l'écart quadratique moyen (*root-mean-square deviation*) des valeurs de z accessibles à l'état final par une pointe d'AFM carrée de dimensions 0,4 nm × 0,4 nm (valeur choisie par l'utilisateur), scannant la surface dans les directions x et y avec un déplacement minimal de 0,15 nm (valeur choisie par l'utilisateur) :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(z_i - \bar{z})^2} \tag{3.3}$$

avec n le nombre de valeurs de z accessibles et $\bar{z}$ la valeur moyenne. On définit également une marge de 0,25 nm (valeur choisie par l'utilisateur) afin de ne pas considérer d'effets de bord.

Les faibles valeurs choisies pour la taille de la pointe et son déplacement minimal font que les valeurs de rugosité déterminées ne peuvent pas être directement comparées à des valeurs obtenues expérimentalement en AFM, où la taille de la pointe et son déplacement minimal valent environ 10 nm (pour rappel, les dimensions de la surface que nous considérons dans nos boîtes de simulation valent environ 10 nm × 10 nm). En revanche, cela permet de comparer l'inhomogénéité des différentes monocouches de silanes, qui peut impacter l'organisation des molécules d'eau à l'interface (figure 3.7).

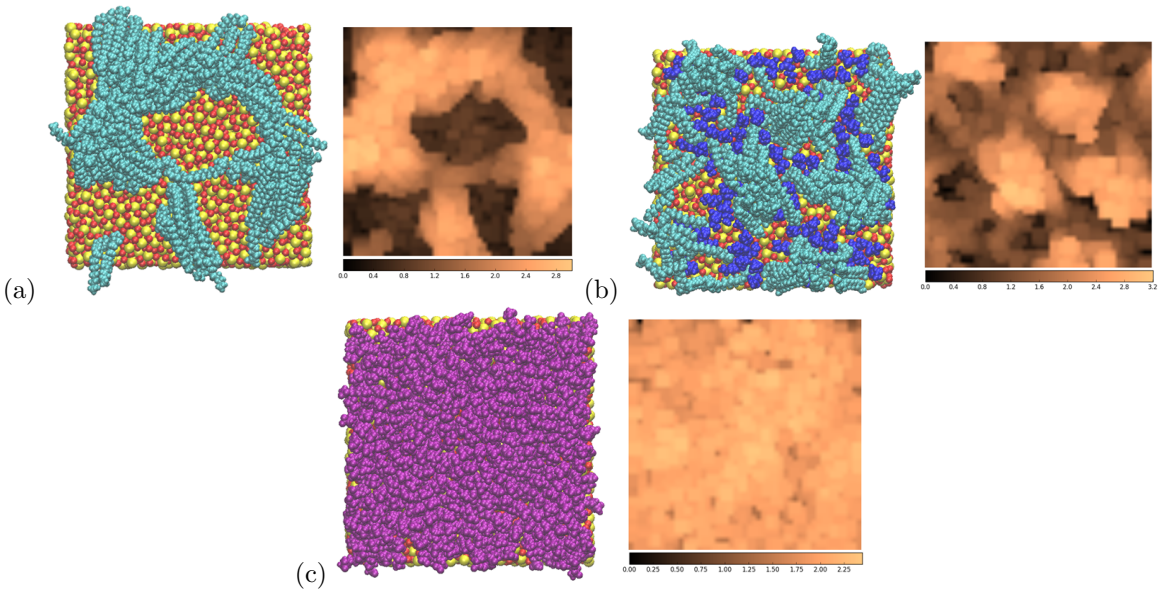


FIGURE 3.7 – *Illustration du fonctionnement du code Python delta_z_v4.py évaluant la rugosité des monocouches de silanes : (a) monocouche de silanes CH_3 long d = 1,5 nm^{-2}, (b) monocouche de silanes mix long d = 3,0 nm^{-2} et (c) monocouche de silanes COO^- d = 4,2 nm^{-2}. Les atomes sont représentés en jaune (silicium) et rouge (oxygène). Les molécules de silane sont représentées en bleu clair (CH_3 long), en bleu foncé (NH_3^+) et en violet (COO^-).*

Distance de diffusion en 2D La distance de diffusion des molécules de silane, ou distance moyenne de déplacement dans le plan xy est évaluée en fonction du temps de simulation :

$$d(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{n} \sqrt{(x_i(t) - x_i(0))^2 + (y_i(t) - y_i(0))^2} \tag{3.4}$$

avec N le nombre de molécules de silane sur la surface et $x_i(t)$, $y_i(t)$ la position de la molécule i dans le plan xy de la surface. En particulier, on s'intéresse à la distance moyenne de déplacement des molécules par rapport à l'organisation initiale aléatoire. Le code Python *diffusion_xy.py* nous permet d'évaluer la distance de diffusion des molécules de silane dans le plan pour les différents instants de la simulation considérés.

3.4.2 Caractérisation des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^-

Densité La densité des molécules d'eau ou des ions le long de la normale à la surface est évaluée à l'aide de la fonction Gromacs *density*.

Fonction de distribution radiale et nombre de coordination La fonction de distribution radiale, ou *radial distribution function* (RDF) notée $g_{A-B}(r)$ est la probabilité de trouver un atome de type B à la distance r d'un atome de type A. Le nombre de coordination courant, ou *running coordination number* noté $n_{A-B}(r)$ est le nombre d'atomes B entourant l'atome A à une distance comprise entre 0 et r [106] :

$$n_{A-B}(r) \;=\; \frac{4\pi N}{V} \int_0^r g_{A-B}(r)\; r^2\; dr \tag{3.5}$$

avec N le nombre d'atomes de type B et V le volume de la boîte de simulation. Par exemple, les fonctions de distribution radiale $g_{Na^+-O}(r)$, $g_{Na^+-H}(r)$, $g_{Cl^--O}(r)$, et $g_{Cl^--H}(r)$, et les nombres de coordination courants $n_{Na^+-O}(r)$, $n_{Na^+-H}(r)$, $n_{Cl^--O}(r)$ et $n_{Cl^--H}(r)$ permettent de caractériser la position et l'orientation des molécules d'eau entourant les ions Na^+ et Cl^-. Enfin, n_{A-B} est le nombre de coordination de la première couche de solvatation, c'est-à-dire calculé pour r entre 0 et le premier minimum de la fonction de distribution radiale [105]. Les fonctions de distribution radiales sont déterminées à l'aide des fonctions Gromacs *make_ndx* et *rdf*.

En complément, pour identifier spécifiquement les RDF et les nombres de coordination des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- en fonction de leur position par rapport à la surface, les codes Python *water_3_layers_ions.py* et *water_4_layers_ions.py* ont été développés. Ils permettent d'attribuer chaque ion ou molécule à la couche correspondante parmi les trois couches (entre les molécules de silane / couche interfaciale / *bulk*) ou les quatre couches considérées (entre les molécules de silane / couche compacte / couche diffuse / *bulk*) en fonction de leur valeur de z. L'attribution de chaque molécule à l'une des couches est réalisée à l'état final si le calcul est réalisé sur la dernière ns de la simulation.

Enfin, le profil d'un nombre de coordination, par exemple n_{O-O} en fonction de z est évalué en suivant les trois premiers points de la procédure décrite au paragraphe « Liaisons hydrogène, nombre de donneurs et d'accepteurs » ci-dessous.

Orientation des molécules d'eau L'orientation des molécules d'eau au niveau d'une interface dépend de sa charge et de son hydrophobicité, mais également de sa structure (répartition des charges, taille de l'interface) [95]. Elle est étudiée en traçant le cosinus moyen de l'angle θ défini entre le moment dipolaire permanent des molécules d'eau et la normale à la surface, en fonction de z. Dans un environnement parfaitement isotropique comme l'eau *bulk*, on a $< \cos\theta > = 0$. Une valeur positive de $< \cos\theta >$ signifie que les atomes d'hygrogène sont orientés

vers l'extérieur, tandis qu'une valeur négative de $< \cos\theta >$ montre que les atomes d'hydrogène pointent vers la surface. Nous calculons le cosinus moyen de l'angle θ entre le moment dipolaire permanent des molécules d'eau et la normale à la surface, en fonction de z, grâce au code Python *water_order_v3.py*.

Liaisons hydrogène, nombre de donneurs et d'accepteurs Des liaions hydrogène peuvent s'établir entre les molécules d'eau, induisant un transfert de charge, ou une modification de la densité électronique, entre le doublet non liant d'un atome d'oxygène (accepteur de liaison hydrogène) et une autre molécule d'eau (donneur de liaison hydrogène), comme illustré par la figure 3.8. En simulation de dynamique moléculaire, les liaisons hydrogène sont déterminées à l'aide de deux critères géométriques : une distance O-O inférieure à 0,35 nm et un angle $\widehat{\text{H-O-O}}$ inférieur à 30 °. Le nombre de liaisons hydrogène s'établissant entre deux éléments du système peut être déterminé à l'aide du logiciel VMD, ou de la fonction Gromacs *hbond*.

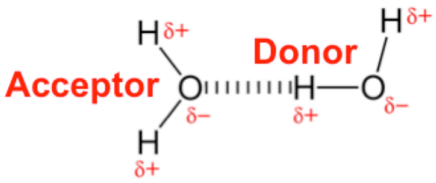


FIGURE 3.8 – *Illustration des atomes donneur et accepteur pour une liaison hydrogène formée entre deux molécules d'eau. Adapté de Lee et al. (2014) [112].*

Nous déterminons l'équilibre entre donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène au niveau d'une interface en traçant le profil de $nb_{Accepteurs} - nb_{Donneurs}$ à partir des RDF $g_{O-H}(r)$ et $g_{H-O}(r)$ (voir paragraphe 4.4.2.b, page 123) :

$$nb_{Accepteurs} - nb_{Donneurs} = 2\ n_{H-O}(r_{min}^{2e\ pic}) - n_{O-H}(r_{min}^{2e\ pic}) \tag{3.6}$$

Pour évaluer ce profil, après avoir utilisé la fonction Gromacs *trjconv* pour générer tous les fichiers GRO de la trajectoire étudiée (c'est-à-dire les différents instants considérés), nous réalisons la procédure suivante à l'aide d'un code Python :

— Pour chaque fichier GRO, attribution de chaque atome d'oxygène d'une molécule d'eau à une couche de 0,25 nm d'épaisseur en fonction de sa coordonnée z à l'aide du code Python *coordination_number_profile_part1.py* ;
— Utilisation des fonctions Gromacs *make_ndx* et *rdf* pour calculer g_{O-H} pour chaque couche et chaque fichier GRO ;
— Pour chaque couche, calcul du $n_{O-H}(r_{min}^{2e\ pic})$ moyen sur les différents fichiers GRO avec le code Python *coordination_number_profile_part2.py* ;
— Répétition des trois premiers points pour calculer $n_{H-O}(r_{min}^{2e\ pic})$ dans les différentes couches d'eau ;
— Calcul de $2\ n_{H-O}(r_{min}^{2e\ pic}) - n_{O-H}(r_{min}^{2e\ pic})$ pour chaque couche d'eau.

Organisation tétraédrique L'orientation relative des groupements O-H ou des doublets non liants à proximité d'une interface modifie la structure de l'eau liquide. En effet, dans l'eau *bulk*, les quatre plus proches voisins d'une molécule d'eau forment approximativement un tétraèdre régulier. La structure tétraédrique des molécules d'eau peut être caractérisée par différents paramètres d'ordre [104]. Par exemple, le paramètre d'ordre S introduit par Chau et Hardwick [150] est divisé en deux parties analysées séparément, l'une caractérisant la distance et l'autre l'angle entre les molécules d'eau.

La partie angulaire S_g est définie ainsi [150] :

$$S_g = \frac{3}{32} \sum_{j=1}^{3} \sum_{k=j+1}^{4} (\cos \psi_{j,k} + \frac{1}{3})^2 \tag{3.7}$$

avec $\psi_{j,k}$ l'angle au niveau de l'atome central entre les liaisons i et j. Le facteur de normalisation $\frac{3}{32}$ assure que $0 \leq S_g \leq 1$. On a $S_g = 0$ si tous les cosinus valent $-\frac{1}{3}$, c'est-à-dire lorsque l'arrangement forme un tétraèdre régulier.

La partie caractérisant la distance est notée S_g et vaut [104, 150] :

$$S_k = \frac{1}{3} \sum_{k=1}^{4} \frac{(r_k - \bar{r})^2}{4\bar{r}^2} \tag{3.8}$$

avec r_k, la distance radiale entre l'atome d'oxygène central et le $k^{\text{ième}}$ atome d'oxygène périphérique, et $\bar{r}$, la moyenne arithmétique des quatre distances radiales. Le paramètre S_k permet donc de mesurer la variance des distances radiales entre l'atome central et les atomes périphériques. On a $S_k = 0$ pour un tétraèdre régulier.

Nous calculons les paramètres S_g et S_k à l'aide de la fonction Gromacs *hydorder*, complétée par les codes Python *tetra_Sg.py* et *tetra_Sk.py* qui permettent d'évaluer leur évolution le long de la normale à la surface.

Cœfficient de diffusion Le cœfficient de diffusion D_A (en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) d'une particule de type A est déterminé à partir de son déplacement quadratique moyen, ou *mean square displacement* (MSD) grâce à la relation d'Einstein [33] :

$$\text{MSD}_A = \lim_{x \to +\infty} \left\langle \|\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)\|^2 \right\rangle_{i \in A} = 6 D_A t \tag{3.9}$$

Le coefficient de diffusion des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- est calculé à l'aide de la fonction Gromacs *msd*. Comme pour les RDF et nombres de coordination, les codes Python *water_3_layers_ions.py* et *water_4_layers_ions.py* permettent d'attribuer chaque ion ou molécule à la couche correspondante à l'état final.

3.4.3 Caractérisation des changements de conformation des protéines

RMSD La déviation par la méthode des moindres carrés, ou *root-mean-square deviation* (RMSD) renseigne sur les changements globaux de structure de la molécule analysée au cours de la simulation :

$$\text{RMSD}(t, \text{ref}) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^{N} m_i \left\|\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}}\right\|^2} \tag{3.10}$$

avec $M = \sum_{i=1}^{N} m_i$. Le RMSD est calculé par rapport à une structure de référence (structure à l'état initial ou structure cristalline par exemple) [33, 151], à l'aide de la fonction Gromacs *rms*. Les valeurs moyennes sur un intervalle de temps ou sur différentes répliques de simulations sont calculées à l'aide de codes Python. Dans cette étude, nous calculons en général le RMSD entre l'instant initial et l'état moyen correspondant aux dernières ns des simulations (l'état moyen est par exemple calculé sur 10 dernières ns d'une simulation de 100 ns).

RMSF La fluctuation par la méthode des moindres carrés, ou *root-mean-square fluctuation* (RMSF) mesure la déviation moyenne d'une particule i sur une période de temps. Le RMSF de la particule i par rapport à sa position de référence vaut :

$$\mathrm{RMSF}(i, \mathrm{ref}) = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^{T} \left\| \mathbf{r}_i(t_j) - \mathbf{r}_i^{\mathrm{ref}} \right\|^2} \tag{3.11}$$

avec T l'intervalle de temps sur lequel le calcul est réalisé et $\mathbf{r}_i^{\mathrm{ref}}$ la position de référence de la particule i [151]. Le RMSF permet donc de caractériser la mobilité moyenne des différentes particules, et par exemple pour une protéine, de localiser les résidus autour desquels les changements de conformation sont les plus importants. Il est évalué à l'aide de la fonction Gromacs *rmsf*. De même que pour le RMSD, nous calculons en général le RMSF entre l'instant initial et l'état moyen correspondant aux dernières ns des simulations.

Structure secondaire La structure secondaire associée à chaque résidu de la protéine peut être déterminée au cours du temps, par exemple avec la méthode du dictionnaire de structure secondaire des protéines (DSSP) [33]. Les différentes structures secondaires qui peuvent être identifiées sont le coude (T), le brin β (E), le résidu isolé dans un pont β (B), l'hélice α (H), l'hélice 3_{10} (G), l'hélice π (I) et la pelote (C) [152]. Nous déterminons l'évolution de la structure secondaire au cours de la simulation avec le logiciel VMD, et nous nous intéressons plus particulièrement à la proportion de résidus présentant une structure secondaire en hélice α, en hélice 3_{10} ou en brin β.

3.4.4 Caractériation des interactions protéine-surface et protéine-ligand

Énergie d'interaction Nous appelons « énergie d'interaction », l'énergie associée aux interactions non liantes, ou *non-bonded interaction energy*, ou *total Van der Waals and electrostatic interaction energy*, qui ne correspond ni à l'énergie libre, ni à l'énergie de liaison, mais peut néanmoins permettre d'évaluer la force des interactions qui s'établissent entre deux molécules. Elle est définie comme la somme des termes d'énergie correspondant aux interactions coulombiennes et de Lennard-Jones à courte portée (Coul-SR et LJ-SR) [41]. Les différentes contributions sont calculées grâce à la fonction Gromacs *energy*.

Surface de contact La surface de contact entre deux molécules est évaluée grâce à un critère géométrique : on considère que deux molécules (ou une molécule et un résidu, ou deux résidus) sont en contact sur un intervalle de temps donné si la distance minimale entre ces molécules (c'est-à-dire la distance minimale entre un atome de l'une et un atome de l'autre) est en moyenne inférieure à une certaine distance appelée *cut-off*. Le *cut-off* vaut typiquement 0,3 à 0,5 nm. Nous évaluons la surface de contact à un instant donné à l'aide du code Python *liaisons_SA_silanes_v3.py*. De plus, nous déterminons la surface de contact sur un intervalle de temps donné à l'aide de la fonction Gromacs *mindist* et des codes Python *residus_contact_silanes.py* ou *distance_residus_silanes.py*.

Force de détachement La force de détachement ou force de rupture entre une protéine et un ligand (ou entre deux protéines) est déterminée à l'aide des simulations SMD (voir paragraphe 1.4.1, page 24). Elle est définie comme la force maximale appliquée au cours de la simulation sur le ligand (ou la protéine sur laquelle la force est appliquée). Le temps de détachement correspond à la durée nécessaire pour atteindre la force de rupture. Nous réalisons le tracé des courbes de force en fonction du temps pour chaque réplique de simulation et le calcul de la force de rupture et du temps de détachement moyens à l'aide du code Python *pulling_analysis_v2.py*.

Processus de détachement Nous évaluons le processus de détachement en déterminant, à tout instant, la distance entre certains résidus sélectionnés et le ligand, à l'aide de la fonction Gromacs *mindist* et du code Python *moyenne_choix_residus.py*.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différentes méthodes que nous avons développées pour réaliser nos simulations de dynamique moléculaire et analyser les résultats obtenus. Nous avons en particulier développé des outils pour modéliser et analyser la structure des monocouches de silanes, afin de compléter les fonctionnalités disponibles avec les logiciels Gromacs et VMD.

Dans la première partie, nous avons présenté la méthode développée pour modéliser la fonctionnalisation d'une surface de SiO_2 amorphe avec différentes monocouches de silanes. Cette méthode est adaptée de celle proposée par Roscioni *et al.* [69]. Nous avons considéré quatre molécules de silane, appelées CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+ et COO^-. Grâce à celles-ci, nous modélisons six types de monocouches de silanes : CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+, COO^-, mix court (mélange 1:1 des molécules CH_3 court et NH_3^+) et mix long (mélange 1:1 des molécules CH_3 long et NH_3^+). De plus, notre méthode nous permet de modéliser des monocouches de silanes à différentes densités : $d = 1{,}5$ nm^{-2} ; $d = 3{,}0$ nm^{-2} (densité expérimentale) et $d = 4{,}2$ nm^{-2}. Nous avons enfin présenté les limites de notre méthode.

Dans la seconde partie, nous avons détaillé notre méthode de préparation des boîtes de simulation, avec les différents codes Python développés. Ceux-ci permettent d'assembler facilement et de façon reproductible les différents éléments des systèmes étudiés, en particulier de redimensionner la couche de SiO_2 développée par Roscioni *et al.* [69] et de disposer les molécules de silane et le mur de Lennard-Jones dans la boîte de simulation. Nous avons également expliqué les différentes étapes de notre protocole de simulation, qui comprend une minimisation de l'énergie, des équilibres NVT et NPT, et une étape de production qui permet de réaliser différentes répliques indépendantes des simulations étudiées. Nous avons enfin évoqué les limites de ce protocole.

La troisième partie de ce chapitre est dédiée à la description des différents paramètres d'analyse que nous avons utilisés afin de caractériser la structure des monocouches de silanes modélisées, l'organisation des molécules d'eau et des ions Na^+et Cl^-, la conformation des protéines ainsi que les interactions protéine - protéine et protéine - ligand. Nous présentons les fonctionnalités des logiciels Gromacs et VMD utilisées, ainsi que les codes Python développés dans le cadre de notre étude, afin de caractériser par exemple la conformation des molécules de silane, leur distribution sur la surface et la rugosité de la monocouche, l'orientation des molécules d'eau ou encore la surface de contact entre la protéine et les molécules de silane par exemple. Ces paramètres ont été utilisés pour caractériser les différents systèmes étudiés. Les résultats de ces simulations sont présentés dans les chapitres suivants.

Troisième partie

Résultats

CHAPITRE 4

Propriétés des monocouches de silanes et organisation de la couche d'eau à l'interface

4.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est dans un premier temps de vérifier si notre méthode de simulation des monocouches de silanes monofonctionnels et les champs de force employés (présentés au paragraphe 3.2, page 70) permettent de modéliser des monocouches de silanes de façon réaliste. Pour cela, nous nous intéressons aux monocouches de silanes CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+ et COO^- à différentes densités ($d = 1{,}5$ nm^{-2} ; $d = 3{,}0$ nm^{-2} et $d = 4{,}2$ nm^{-2}). Nous caractérisons la morphologie des différentes monocouches modélisées et nous la comparons à de précédents travaux de simulation et à des résultats expérimentaux de FTIR-ATR et d'XPS. Comme nos monocouches de silanes sont modélisées en solution aqueuse saline à base d'ions Na^+ et Cl^-, nous proposons ensuite d'étudier l'organisation des molécules d'eau de la couche d'hydratation ainsi que la répartition des ions à l'interface avec les molécules de silane.

Nous commençons par caractériser la structure des différentes monocouches de silanes à l'aide de différents paramètres, notamment grâce aux codes Python développés, présentés au paragraphe 3.4, page 79. Nous déterminons la distribution de l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles, et comparons les valeurs de l'angle d'inclinaison le plus probable et de la largeur à mi-hauteur, qui peuvent apporter des informations concernant l'organisation des différentes monocouches de silanes. Nous caractérisons également la conformation des molécules de silane, grâce au paramètre d'ordre nématique S_2, qui reflète l'orientation d'une liaison C-C par rapport à la normale à la surface. Afin d'obtenir des informations plus détaillées concernant l'organisation des molécules au sein des monocouches de silanes, nous déterminons le paramètre d'ordre nématique moyen pour chaque liaison de la molécule de silane considérée, les valeurs moyennes pour les liaisons paires et impaires et la distribution de probabilité des valeurs de S_2. Nous évaluons également la présence de défauts gauches dans les molécules de silane grâce au paramètre r_{trans}, qui reflète la proportion d'angles de torsion en conformation *trans*, par rapport à ceux en conformation *gauche*.

Nous étudions ensuite l'organisation des molécules de silane sur la surface. Pour cela, nous déterminons la distance de diffusion des molécules au cours de la simulation. Nous calculons également la fonction de distribution radiale des atomes de silicium des molécules de silane, qui reflète, pour une molécule de silane donnée, la probabilité de trouver une molécule voisine en fonction de la distance. Nous caractérisons aussi l'organisation des molécules en déterminant la

fonction de distribution radiale en deux dimensions.

Enfin, nous validons la morphologie des différentes monocouches de silanes modélisées par comparaison avec des résultats expérimentaux et avec de précédentes études de dynamique moléculaire. Expérimentalement, des monocouches de silanes correspondant à celles modélisées (NH_3^+, COO^-, CH_3 court et CH_3 long) ont été fabriquées à l'INL et leur densité a été déterminée par XPS. De plus, une analyse de FTIR-ATR a été réalisée par notre équipe, apportant des informations qualitatives concernant l'orientation des chaînes alkyles et la présence de défauts dans les monocouches. Nos résultats sont également validés par comparaison avec les résultats de simulations de dynamique moléculaire obtenus par Roscioni *et al.* [69] (organisation des molécules dans le plan, angle d'inclinaison des chaînes alkyles), Castillo *et al.* [72] (angle d'inclinaison des chaînes alkyles, présence de défauts gauche) ainsi que Schulze et Stein [67] (paramètre d'ordre).

Les simulations ont été réalisées sur le calculateur Newton de l'Ecole Centrale de Lyon et les résultats obtenus ont été publiés dans l'article suivant : S. Lecot, A. Lavigne, Z. Yang, T. Géhin, C. Botella, V. Jousseaume, Y. Chevolot, M. Phaner-Goutorbe and C. Yeromonahos. Arrangement of Monofunctional Silane Molecules on Silica Surfaces : Influence of Alkyl Chain Length, Head-Group Charge, and Surface Coverage, from Molecular Dynamics Simulations, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 20125–20134. Une traduction de l'article est présentée dans la première partie de ce chapitre, avec en complément les résultats pour la monocouche NH_3^+ - $d = 4,2$ nm^{-2}, qui n'avaient pas été détaillés dans l'article (étudiée ensuite pour compléter l'étude).

Nous continuons ensuite à analyser les résultats des simulations effectuées, en nous intéressant à l'organisation des molécules d'eau et des ions dans la couche d'hydratation des différentes monocouches de silanes. En effet, comme présenté au pagraphe 2.4, page 42, l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface solide - liquide a été étudiée en simulations de dynamique moléculaire pour des surfaces parfaites, cristallines et amorphes mais, à notre connaissance, il existe peu d'études s'intéressant à des surfaces fonctionnalisées, et les effets combinés de la longueur de la chaîne alkyle et de la charge du groupement terminal n'ont pas encore été étudiés. De plus, nous avons vérifié que les effets observés sont bien dus à la présence des molécules de silane en modélisant également un système avec une couche de SiO_2 non fonctionnalisée.

Nous nous concentrons, dans un premier temps, sur l'organisation et les propriétés dynamiques des ions Na^+ et Cl^-. Nous étudions le positionnement des ions par rapport à la surface en traçant les profils de densité des ions Na^+ et Cl^- et des molécules d'eau. Nous déterminons ensuite la structure ionique d'hydratation des ions Na^+ et Cl^- dans l'eau *bulk*, puis les différences observées à l'interface avec les surfaces étudiées. Nous déterminons en particulier les nombres de coordination n_{Na^+-O}, n_{Na^+-H}, n_{Cl^--O} et n_{Cl^--H} à proximité des monocouches de silanes NH_3^+ et COO^-. Nous caractérisons enfin les propriétés dynamiques des ions Na^+ et Cl^- en calculant leurs coefficients de diffusion à proximité des monocouches de silanes et dans l'eau *bulk*.

Nous nous intéressons ensuite à l'organisation et aux propriétés dynamiques des molécules d'eau à proximité des différentes surfaces étudiées. Nous caractérisons l'orientation des molécules d'eau à l'interface en calculant l'angle moyen entre leur moment dipolaire et la normale à la surface, en fonction de la distance à la surface. Nous analysons également l'organisation des molécules d'eau en calculant le nombre de coordination n_{O-O} et en évaluant l'équilibre entre le nombre de donneurs et le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène, en fonction de la distance à la surface. Enfin, nous caractérisons la diffusion des molécules d'eau à proximité de la couche de SiO_2 et des différentes monocouches de silanes.

Les résultats obtenus concernant l'organisation des molécules d'eau et des ions dans la couche d'hydratation des différentes monocouches de silanes ont été publiés dans l'article suivant : S. Lecot, A. Lavigne, Z. Yang, Y. Chevolot, M. Phaner-Goutorbe and C. Yeromonahos. Effects of the Chemical and Structural Properties of Silane Monolayers on the Organization of Water Molecules and Ions at Interfaces, from Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* 2021, 37, 18, 5563-5572. Une traduction de cet article est présentée dans la seconde partie de ce chapitre.

4.2 Méthode

4.2.1 Simulations de dynamique moléculaire

4.2.1.a Présentation du modèle

Onze systèmes différents ont été étudiés en simulations de dynamique moléculaire. Le premier système comporte une couche de SiO_2 amorphe non fonctionnalisée. La structure de la couche de SiO_2 est reprise de l'étude de Roscioni *et al.* [69] et redimensionnée aux dimensions 7,8 nm × 7,8 nm × 2,5 nm. Pour les autres systèmes, la surface de SiO_2 est fonctionnalisée par différentes monocouches de silanes, en faisant varier leur densité d. Les monocouches modélisées sont : CH_3 court ($d = 1{,}5$ nm^{-2}, $d = 3{,}0$ nm^{-2} et $d = 4{,}2$ nm^{-2}), CH_3 long ($d = 1{,}5$ nm^{-2}, $d = 3{,}0$ nm^{-2} et $d = 4{,}2$ nm^{-2}), NH_3^+ ($d = 3{,}0$ nm^{-2} et $d = 4{,}2$ nm^{-2}) et COO^- ($d = 3{,}0$ nm^{-2} et $d = 4{,}2$ nm^{-2}). Les molécules de silane sont initialement placées sur la surface en suivant la méthode présentée au paragraphe 3.2, page 70. Ensuite, environ 20 000 molécules d'eau sont placées de façon aléatoire au-dessus des surfaces, ainsi que des ions Na^+ et Cl^- avec une concentration de 0,2 mol·L^{-1} (soit 82 ions Na^+ et 82 Cl^-). De plus, des ions Na^+ ou Cl^- sont ajoutés pour compenser les charges des groupements terminaux des molécules de silane. Enfin, un mur de Lennard-Jones est placé en haut de la boîte, pour bloquer les interactions entre l'eau et la face inférieure du SiO_2. Le système ne présente donc des conditions périodiques que selon les directions x et y. Les boîtes de simulation obtenues, de dimensions 7,8 nm × 7,8 nm × 15 nm incluent près de 100 000 atomes.

Les paramètres de champ de force pour la surface de SiO_2 amorphe et les molécules de silane sont ceux décrits au paragraphe 3.2, page 70 et en annexe A, page 221. Le modèle d'eau TIP4P [153] et les ions Na^+ [154] et Cl^- [155] sont décrits avec le champ de force OPLS tout-atome. Les paramètres utilisés pour le champ de force du mur de Lennard-Jones sont issus des travaux de Kitabata *et al.* [111].

4.2.1.b Protocole de simulation

Les simulations sont réalisées avec le logiciel Gromacs, version 5.1.3 [148] et la visualisation avec VMD, version 1.9 [149]. Tout d'abord, une étape de minimisation de l'énergie est effectuée, avec la méthode de la plus grande pente (*steepest descent method*). Les équilibres NVT et NPT sont ensuite réalisés, chacun avec une durée de 100 ps et une température de 300 K, puis les productions, d'une durée de 100 ns. Les équations du mouvement sont intégrées avec l'algorithme *leap-frog* et un pas de temps de 2 fs. L'algorithme LINCS est utilisé pour appliquer des contraintes aux paramètres de liaison. La température est conservée à 300 K avec un thermostat de Nosé-Hoover et une constante de temps de 0,4 ps. La pression est maintenue à 1 bar avec un barostat de Parrinello-Rahman utilisant une constante de temps de 12 ps. Les interactions électrostatiques à longue distance sont calculées avec la méthode *particle-mesh Ewald* [34] et un *cut-off* de 1 nm. Le même *cut-off* est utilisé pour les potentiels de Lennard-Jones.

4.2.1.c Paramètres d'analyse

Structure et organisation des monocouches de silanes Les paramètres étudiés, notamment l'angle d'inclinaison de la chaîne alkyle, le paramètre des défauts gauches, le paramètre

d'ordre nématique, la rugosité, la distribution radiale en deux dimensions et la distance de diffusion en deux dimensions sont présentés en détails au paragraphe 3.4, page 79. Les valeurs données correspondent aux valeurs calculées à l'état final, et les barres d'erreur à l'écart-type des valeurs obtenues. Les courbes et les histogrammes sont lissés en utilisant des fonctions de Bézier.

Organisation et diffusion des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- à l'interface avec les monocouches de silanes Les paramètres étudiés sont la fonction de distribution radiale $g_{A-B}(r)$ et le nombre de coordination $n_{A-B}(r)$ entre deux types d'atomes A et B, l'orientation du moment dipolaire des molécules d'eau par rapport à la normale à la surface, l'équilibre entre le nombre de donneurs et le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène, le déplacement quadratique moyen et le coefficient de diffusion. Ces différents paramètres sont définis au paragraphe 3.4, page 79. Sauf précision contraire, les valeurs données sont des valeurs moyennes calculées sur la dernière ns de la simulation, et les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des valeurs obtenues. Le déplacement quadratique moyen des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- est évalué pour les différentes zones au-dessus des monocouches de silanes (couche interfaciale, couche compacte, couche diffuse ou *bulk*). Pour cela, chaque ion ou molécule est attribué à une zone à l'état final, et le calcul est effectué sur la dernière ns de la simulation.

4.2.2 Matériels et méthodes pour l'étude expérimentale

4.2.2.a Matériels

Les substrats silicium / aluminium (200 nm) / SiO_2 (20 nm) ont été préparés par Vincent Jousseaume au CEA-Leti, par dépôt physique en phase vapeur (PVD) à l'aide d'une plate-forme Applied Materials Endura 5500 de 200 mm. Les dépôts ont été réalisés sur des *wafers* Si(100), en s'assurant de ne pas avoir de bulle d'air entre l'aluminium et le SiO_2. Les molécules de silane suivantes ont été achetées chez ABCR : 3-aminopropyldiméthyléthoxysilane 95 % (NH_3^+ à pH = 7), *n*-propyldiméthylméthoxysilane 95 % (CH_3 court) et octadécyldiméthylméthoxysilane 95 % (CH_3 long). Le tert-butyl-11-(diméthylamino-(diméthyl)silyl)undecanoate, qui conduit à la molécule de silane COO^- (à pH = 7) après déprotection, a été synthétisé à l'INL selon le protocole publié dans les travaux de Dugas *et al.* [2].

4.2.2.b Fonctionnalisation chimique de la surface

La fonctionnalisation chimique de la surface a été réalisée à l'INL. Les substrats ont été nettoyés par traitement UV/ozone sous flux d'oxygène pendant 30 minutes afin de retirer les contaminations organiques et d'obtenir une surface présentant des groupements hydroxyles. Ensuite, les substrats ont été chauffés pendant 4 heures sous flux d'azote, puis refroidis jusqu'à la température ambiante, toujours sous flux d'azote. Les substrats ont ensuite été immergés dans une solution contenant 10 mL de pentane anhydre et 90 μL de molécules de silane. Après 1 heure d'incubation, le pentane était évaporé et les échantillons ont été chauffés à 150 °C pendant 15 heures, pour permettre la réaction de silanisation. Finalement, les échantillons ont été rincés pendant 10 minutes dans le tétrahydrofurane (THF) sous ultrasons et pendant 10 minutes dans l'eau ultrapure, toujours sous ultrasons.

4.2.2.c Analyse XPS

Les mesures d'XPS ont été réalisées à l'INL, à l'aide d'un spectromètre VSW équipé d'une source de rayon X monochromatique (Al Kα 1486,6 eV). L'angle entre le faisceau incident et le détecteur était l'angle magique et l'angle de détection (*take-off angle*) valait 90° par rapport à la surface du substrat. La résolution angulaire valait 3° et la résolution énergétique valait 0,2 eV. L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel CasaXPS. L'énergie de liaison de

la composante Si(-O)$_4$ valait 104 eV. Un fond de Shirley (*Shirley background*) a été soustrait des spectres Si2p et O1s, éléments du *bulk*, et un fond linéaire a été soustrait des spectres C1s, élément de surface. Les pics ont modélisés par des courbes de Gauss-Lorentz.

4.2.2.d Analyse FTIR-ATR

L'analyse de FTIR-ATR a été réalisée à l'INL en utilisant un spectromètre Thermo Nicolet 6700 avec un détecteur mercure - cadmium - tellure (MCT) et un cristal diamant, entre 800 cm^{-1} et 3000 cm^{-1}. Les résultats ont été obtenus en moyennant 256 scans avec une résolution de 4 cm^{-1}.

4.3 Résultats et discussion : structure et organisation des monocouches de silanes

Les monocouches modélisées par simulations de dynamique moléculaire sont caractérisées par l'angle d'inclinaison de la chaîne alkyle des molécules de silane, le nombre moyen de défauts gauches dans les chaînes alkyles, le paramètre d'ordre nématique pour chaque liaison C-C et sa distribution globale ainsi que l'arrangement hexagonal des molécules de silane sur la surface de SiO_2 et sa longueur de persistance. De plus, les résultats obtenus sont comparés aux données expérimentales, la densité des monocouches étant déterminée par XPS, et les angles d'inclinaison des molécules de silane étant qualivativement validés par FTIR-ATR.

La figure 4.1 présente une illustration des différents systèmes modélisés, à l'état final. De plus, le tableau 4.1 récapitule les différentes monocouches étudiées en simulations de dynamique moléculaire et leurs rugosités relatives, ainsi que les densités des couches expérimentales déterminées par XPS.

Monocouche de silanes	Densités des monocouches de silanes étudiées en simulations (nm^{-2}) [a]	Rugosité relative de la surface en simulations	Densité des monocouches de silanes déterminées par XPS (nm^{-2}) [b]
CH_3 court	1,5 - 3,0 - 4,2	0,49 - 0,41 - 0,27	3
CH_3 long	1,5 - 3,0 - 4,2	1,0 - 0,92 - 0,42	3
NH_3^+	3,0 - 4,2	0,38 - 0,27	8
COO^-	3,0 - 4,2	0,55 - 0,26	3

Table 4.1 – *Densité des monocouches de silanes et rugosité de la surface.* [a] *La rugosité des monocouches de silanes est déterminée selon la méthode présentée au paragraphe 3.4, page 79. La rugosité relative de la surface est normalisée par rapport à la valeur obtenue pour la surface CH_3 long d = 1,5 nm^{-2}. La rugosité relative pour la surface de SiO_2 amorphe vaut 0,22.* [b] *Le détail du calcul de la densité par XPS est présenté au paragraphe 4.3.2.a, page 104.*

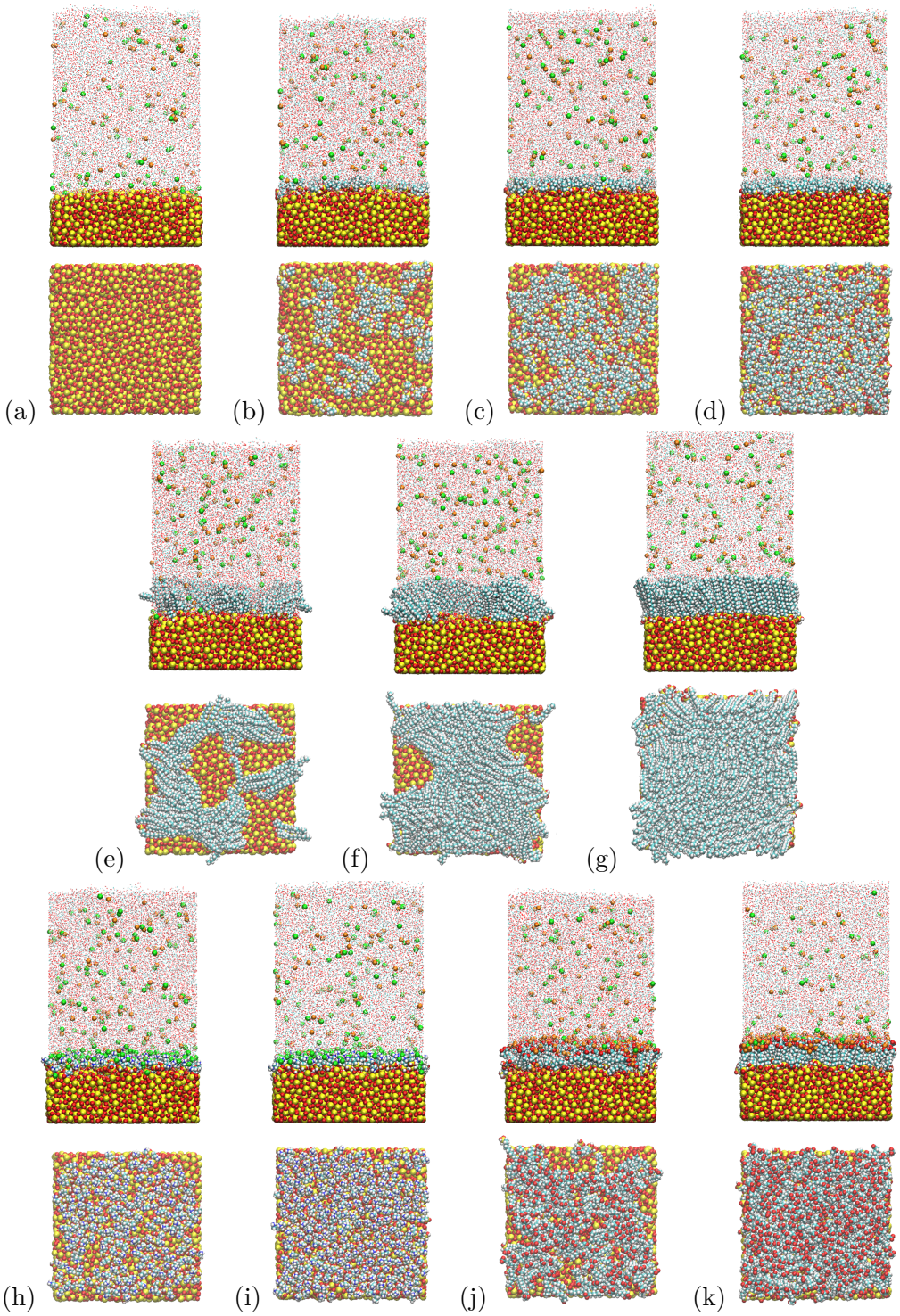


FIGURE 4.1 – *Images des molécules de silane fonctionnalisant une couche de SiO_2 amorphe, des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- (au-dessus) et vue de dessus de la surface (en dessous) pour les différents systèmes, à l'état final (simulations de 100 ns) : (a) couche de SiO_2 non fonctionnalisée, (b) CH_3 court $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (c) CH_3 court $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (d) CH_3 court $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (e) CH_3 long $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (f) CH_3 long $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (g) CH_3 long $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (h) NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (i) NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (j) COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et (k) COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène), bleu foncé (azote), orange (Na^+) et vert (Cl^-). Les molécules d'eau sont représentées par des points.*

4.3.1 Résultats des simulations de dynamique moléculaire

De précédents travaux ont étudié les effets de la longueur de la chaîne alkyle sur les propriétés de structure des monocouches de silanes, avec des molécules présentant plus de six atomes de carbone ($n > 6$) et différentes densités [69, 72]. Dans cette étude, nous analysons l'impact d'un groupement terminal chargé et de la longueur de la chaîne alkyle (avec plus de trois atomes de carbone, $n > 3$) sur les propriétés de structure des monocouches de silanes avec différentes densités. Les simulations de dynamique moléculaire sont réalisées avec une durée de 100 ns, en suivant la méthode présentée précédemment. Rappelons qu'à l'état initial, les molécules de silane sont placées dans un plan de façon aléatoire. La figure 4.2 présente la distance de diffusion des molécules de silane dans le plan en fonction de l'avancée de la simulation. On observe que, pour tous les systèmes, la distance de diffusion des molécules de silane est stabilisée rapidement, après 30 ns environ. Après cette phase de diffusion, on considère que l'atome de silicium des molécules de silane est fixé de façon définitive à un atome d'oxygène du SiO_2.

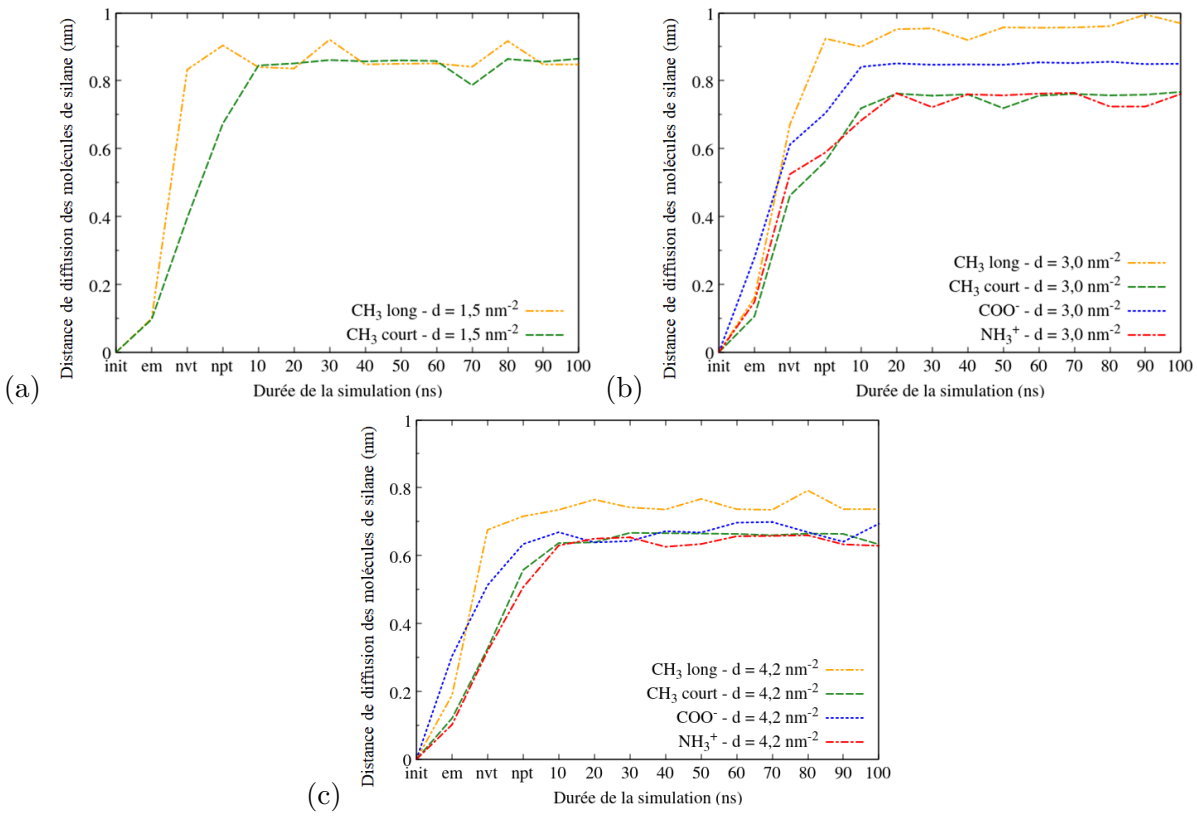


FIGURE 4.2 – *Distance de diffusion des molécules de silane en fonction de l'instant de la simulation, ou distance moyenne de déplacement des molécules de silane dans le plan (x, y) par rapport à l'organisation initiale aléatoire pour les monocouches de silanes étudiées, à différentes densités : (a) $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (b) $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et (c) $d = 4{,}2\ nm^{-2}$. La distance de diffusion dépend du type de molécules de silane et de la densité, et est stabilisée rapidement (en moins de 30 ns) pour tous les systèmes.*

L'angle d'inclinaison de la chaîne alkyle α, le paramètre d'ordre nématique $< S_2 >$ et le paramètre des défauts gauches r_{trans} sont déterminés et comparés à l'arrangement cristallin des molécules de silane. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.2.

Monocouche de silanes		Angle d'inclinaison de la chaîne alkyle [a]		Paramètre d'ordre nématique $< S_2 >$		Paramètres des défauts gauches r_{trans} [c]
		α (°)	FWHM [b] (°)	liaison paire	liaison impaire	
CH_3 court	$d = 1{,}5$ nm^{-2}	22	53	-0,04	0,32	[c]
	$d = 3{,}0$ nm^{-2}	22	35	-0,04	0,42	[c]
	$d = 4{,}2$ nm^{-2}	22	32	-0,03	0,53	[c]
CH_3 long	$d = 1{,}5$ nm^{-2}	40	38	0,05	0,03	0,81
	$d = 3{,}0$ nm^{-2}	34	26	0,06	0,22	0,85
	$d = 4{,}2$ nm^{-2}	32	24	0,04	0,40	0,89
NH_3^+	$d = 3{,}0$ nm^{-2}	23	57	0,17	0,05	[c]
	$d = 4{,}2$ nm^{-2}	12	24	0,28	0,11	[c]
COO^-	$d = 3{,}0$ nm^{-2}	19	27	0,20	0,16	0,69
	$d = 4{,}2$ nm^{-2}	20	30	0,26	0,23	0,70

TABLE 4.2 – *Angle d'inclinaison des chaînes alkyles, paramètre d'ordre nématique et paramètre des défauts gauches des monocouches de silanes étudiées.* [a] *Les distributions de l'angle d'inclinaison sont présentés sur la figure 4.3.* [b] *Full Width at Half-Maximum, c'est-à-dire la largeur à mi-hauteur.* [c] *Le calcul de r_{trans} n'est pas pertinent pour les petites molécules, qui ne présentent qu'un seul angle de torsion.*

4.3.1.a Angle d'inclinaison

Comme présenté dans le tableau 4.2 et sur la figure 4.3, l'angle d'inclinaison le plus probable des molécules de silane CH_3 long diminue (passant de 40° à 32°), de même que la largeur à mi-hauteur (qui passe de 38° à 24°) lorsque la densité augmente de 1,5 nm^{-2} à 4,2 nm^{-2}. Cela montre que les molécules CH_3 long se redressent et adoptent une structure plus organisée lorsque la densité croît. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études de dynamique moléculaire, pour des molécules de silane présentant de longues chaînes alkyles ($n > 6$) [69, 71, 72], et peuvent être expliqués par un renforcement des forces de Van der Waals entre les chaînes alkyles lorsque leur densité augmente.

La présence d'un groupement terminal chargé semble influencer la relation entre l'angle d'inclinaison et la densité pour des molécules de silane présentant de longues chaînes alkyles ($n > 8$). En effet, pour les monocouches COO^- dont les molécules de silane présentent des chaînes alkyles avec 11 atomes de carbone ($n = 11$), on n'observe pas d'effet de la densité sur l'angle d'inclinaison des chaînes, contrairement aux monocouches CH_3 long. De plus, la longueur de la chaîne alkyle semble également influencer la relation entre la densité de la monocouche et l'angle d'inclinaison. Contrairement aux monocouches CH_3 long, les angles d'inclinaison moyens des monocouches CH_3 court semblent indépendants de la densité de surface et similaires, autour de 20°.

Concernant la distribution des angles d'inclinaison, l'élargissement observé pour les monocouches NH_3^+ et COO^- par rapport aux monocouches non chargées pourrait être dû à la répulsion entre leurs groupements terminaux chargés. De plus, pour une densité donnée, la distribution de l'angle d'inclinaison est plus large pour la monocouche CH_3 court que pour la monocouche CH_3 long et plus large pour NH_3^+ que pour COO^-. Cela pourrait être expliqué pour les forces de Van der Waals qui peuvent s'établir entre les longues chaînes alkyles. Ces résultats suggèrent que la largeur à mi-hauteur de la distribution de l'angle d'inclinaison augmente avec la présence de groupements terminaux chargés et diminue lorsque la longueur de la chaîne augmente.

La largeur à mi-hauteur de la distribution de l'angle d'inclinaison peut être reliée au degré

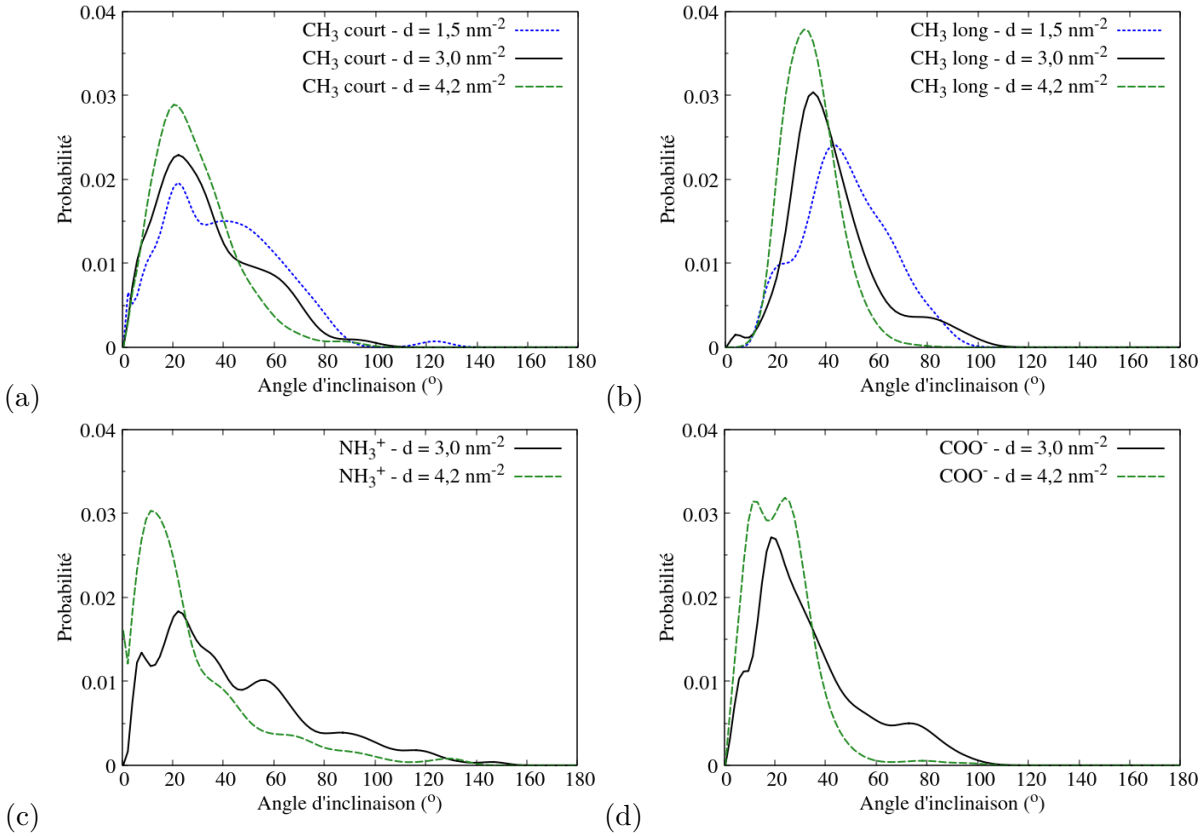


FIGURE 4.3 – *Distribution des angles d'inclinaison des molécules de silane dans les monocouches à différentes densités : (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) NH_3^+ et (d) COO^-.*

d'agrégation des molécules de silane observé sur la figure 4.1. En effet, pour une même densité, par exemple $d = 3,0$ nm^{-2}, les molécules CH_3 long sont positionnées en un agrégat unique et dense, tandis que les molécules CH_3 court forment plusieurs agrégats plus petits, séparés par de petites zones de SiO_2 non fonctionnalisé, et que les molécules de silane présentant des groupements terminaux chargés semblent plus uniformément réparties sur la surface. Les groupements chargés et les courtes chaînes alkyles semblent donc participer à la diminution du degré d'agrégation des molécules de silane sur la surface de SiO_2 et à l'augmentation de la largeur à mi-hauteur des distributions d'angles d'inclinaison. En effet, la largeur à mi-hauteur est plus faible pour la monocouche CH_3 long (26°) que pour les monocouches CH_3 court (35°) et NH_3^+ (57°) (tableau 4.2). Les molécules de silane à l'intérieur d'un agrégat unique et dense pourraient tendre à se comporter de façon similaire, afin augmenter les interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyles, ce qui conduirait à une faible largeur à mi-hauteur. À l'inverse, les molécules de silane dispersées plus uniformément seraient moins impactées par les molécules de silane voisines, ce qui conduirait à une plus grande largeur à mi-hauteur. On notera toutefois que les monocouches COO^- et CH_3 long présentent des largeurs à mi-hauteur similaires (respectivement 27°et 26°), malgré des distributions sur la surface très différentes. Ce résultat pourrait être expliqué par la balance entre les effets opposés des groupements terminaux chargés et des longues chaînes alkyles des molécules COO^-.

Ainsi, la largeur à mi-hauteur de la distribution de l'angle d'inclinaison de la chaîne alkyle semble dépendre, de la même façon que le degré de dispersion des molécules de silane sur la surface de SiO_2, de la présence de groupements terminaux chargés et de la longueur de la chaîne alkyle.

4.3.1.b Défauts gauche

Le paramètre des défauts gauches r_{trans} est calculé pour les molécules de silane CH_3 long et COO^- et les différentes valeurs sont présentées dans le tableau 4.2. Le calcul du paramètre des défauts gauches n'est pas pertinent pour les monocouches CH_3 court et NH_3^+ car, du fait de leur courte chaîne alkyle, les molécules ne contiennent d'un seul angle de torsion. Concernant les monocouches CH_3 long, on observe que r_{trans} présente une valeur plus faible à basse densité (0,81 à $d = 1,5$ nm^{-2}) qu'à haute densité (0,85 et 0,89 à $d = 3,0$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2} respectivement). Cela signifie que les molécules présentent plus de défauts gauches lorsque la densité diminue. Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales issues de différents travaux [156, 157, 158]. Les molécules COO^- présentent des valeurs de r_{trans} inférieures à celles obtenues pour les molécules CH_3 long pour une même densité (0,69 et 0,7 à $d = 3,0$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2} respectivement), et donc plus de défauts gauches. Il semble donc que la présence d'un groupement terminal chargé résulte en une augmentation du nombre de défauts gauches.

4.3.1.c Paramètre d'ordre nématique

La figure 4.4 présente le paramètre d'ordre nématique moyen pour chaque liaison C-C ou C-N des monocouches étudiées, tandis que la figure 4.5 présente la distribution du paramètre d'ordre nématique pour les monocouches CH_3 long avec les densités $d = 1,5$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2}. Nous avons précédemment montré que, pour les monocouches CH_3 long, l'angle d'inclinaison des molécules de silane est compris entre 32°et 40°. En conséquence, pour des molécules parfaitement parallèles, on devrait obtenir des valeurs de S_2 comprises entre 0,98 et 1 pour les liaisons impaires et entre -0,24 et -0,4 pour les liaisons paires. D'après la figure 4.4, lorsque la densité des molécules de silane CH_3 long augmente, la valeur du paramètre d'ordre nématique pour les liaisons impaires $< S_2^{2n+1} >$ croît de 0,03 à 0,40. De plus, la distribution de probabilité de S_2 (figure 4.5) montre que les deux valeurs correspondant aux liaisons paires et impaires (autour de 1 et -0,25) sont plus représentées lorsque la densité augmente. Ces résultats montrent

que les molécules CH_3 long s'organisent avec une structure en chevrons lorsque la densité augmente, en accord avec de précédentes études [69, 156, 67]. On en déduit donc que les molécules de silane présentant de longues chaînes alkyles, sans groupement terminal chargé et avec une densité élevée adoptent une organisation bien ordonnée, avec une orientation préférentielle de la chaîne alkyle et peu de défauts gauches.

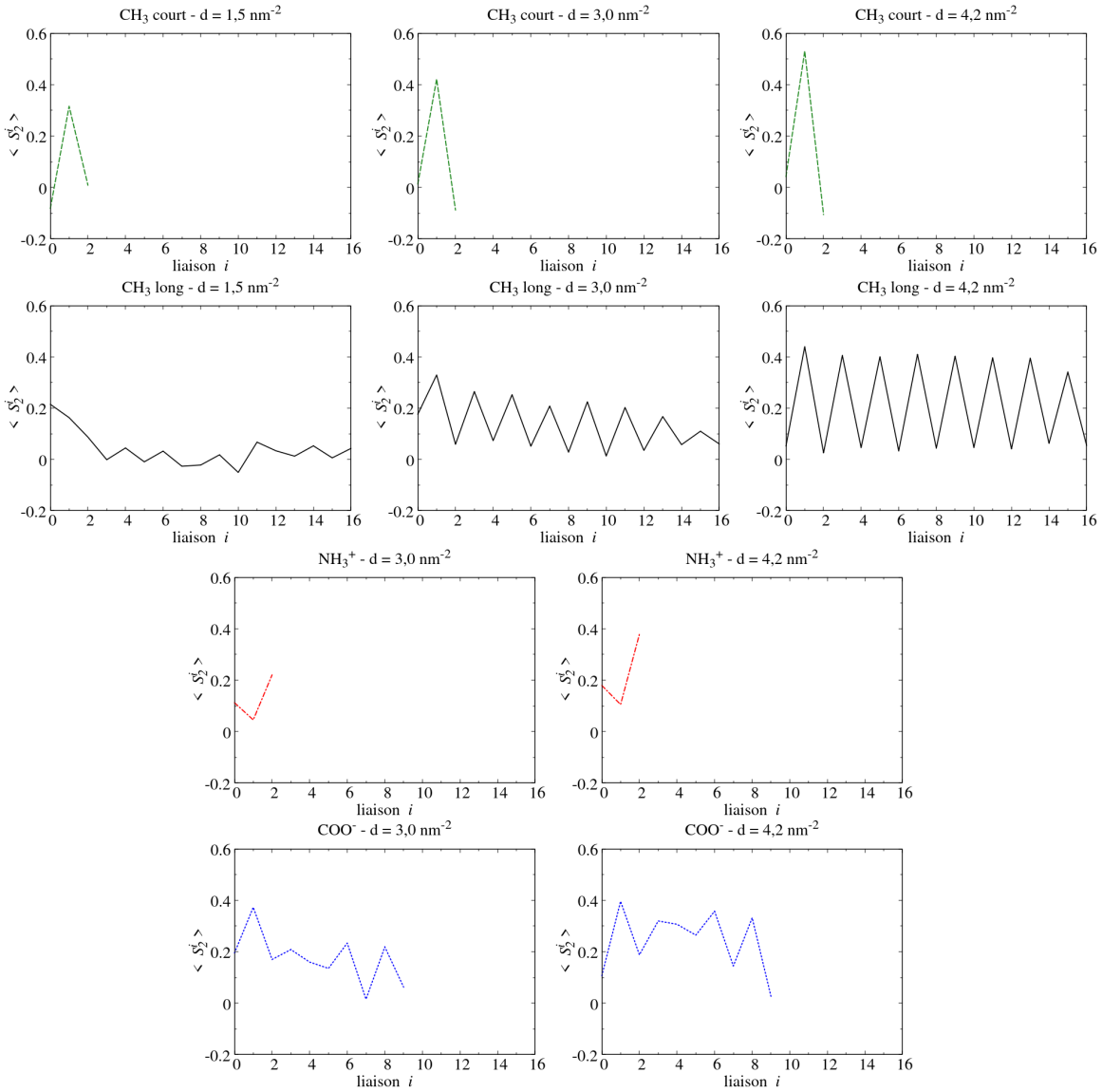


FIGURE 4.4 – *Paramètre d'ordre nématique moyen* $< S_2^i >$ *pour chaque liaison C-C ou C-N des différentes monocouches de silanes. Les molécules de silane présentent une structure en chevrons lorsque* $< S_2^i >$ *varie périodiquement entre les liaisons paires et impaires.*

Les monocouches CH_3 court présentent un angle d'inclinaison des chaînes alkyles autour de 22°, donc, pour des molécules parfaitement parallèles, on devrait obtenir une valeur de S_2 de 0,94 pour la liaison impaire. Nos résultats montrent que $< S_2^1 >$ vaut 0,42 pour la monocouche CH_3 court à $d = 3{,}0$ nm^{-2} et 0,53 pour la monocouche à $d = 4{,}2$ nm^{-2}. Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que celles obtenues pour les liaisons impaires des molécules CH_3 long (0,22 et 0,40 respectivement). On en déduit que, même si les molécules CH_3 court présentent une distribution de l'angle d'inclinaison plus large, le paramètre d'ordre nématique relatif à leur deuxième liaison

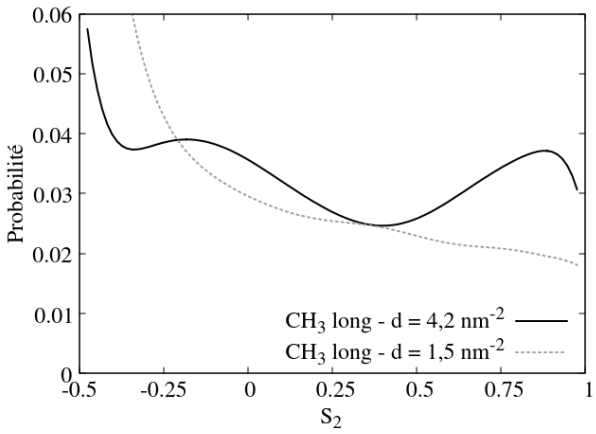


FIGURE 4.5 – *Distribution du paramètre d'ordre nématique S_2 pour la monocouche de silanes CH3 long avec les densités d = 1,5 nm^{-2} et d = 4,2 nm^{-2}. S_2 = 0 correspond à une liaison parallèle à la surface. Pour CH_3 long à d = 4,2 nm^{-2}, les valeurs autour de -0,25 et 1 sont les plus probables, et correspondent aux valeurs de S_2 pour un angle d'inclinaison de 32 °.*

C-C est élevé, ce qui signifie que cette liaison est bien ordonnée dans la monocouche.

Concernant les monocouches de silanes NH_3^+ et COO^-, les valeurs de $< S_2^i >$ sont proches de 0, aussi bien pour les liaisons paires que pour les liaisons impaires, et on n'observe pas de structure en chevrons pour les molécules COO^-. On en déduit que la présence de groupements terminaux chargés résulte en un désordre plus important dans les monocouches.

4.3.1.d Fonction de distribution radiale en deux dimensions

Le paramètre d'ordre nématique élevé obtenu avec les monocouches CH_3 long à densités élevées suggère la présence d'un positionnement organisé des molécules dans ces monocouches. Pour vérifier cette hypothèse, nous examinons la fonction de distribution radiale (RDF) en deux dimensions des atomes de silicium dans le plan (x,y) [69, 59]. La figure 4.6 présente la RDF des atomes de silicium des molécules de silane pour les monocouches CH_3 long à l'état initial et à l'état final. À l'état initial, les molécules de silane sont positionnées de façon aléatoire dans le plan (x,y), et la RDF est approximativement une droite dont la pente est directement proportionnelle à la densité des molécules de silane sur la surface. À l'état final, on observe l'apparition de pics dans la RDF, qui témoignent de l'apparition de distances privilégiées entre les molécules de silane, et donc d'un positionnement organisé des molécules sur la surface. La figure 4.7 présente les RDF à l'état final pour toutes les monocouches étudiées. On observe la présence de plusieurs pics dans la RDF pour tous les systèmes, qui traduisent l'apparition d'un positionnement organisé et périodique.

La figure 4.8 présente les représentations en deux dimensions de la RDF pour les monocouches de silanes CH_3 long. On observe que pour les monocouches à densités $d = 3,0$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2}, ces représentations montrent un arrangement hexagonal des molécules de silane sur la surface. Cela signifie que chaque molécule de silane possède six plus proches voisins, espacés de 0,5 nm environ. Pour la monocouche à $d = 1,5$ nm^{-2}, l'arrangement hexagonal est moins évident et l'intensité du premier pic diminue. Cela pourrait être dû à la présence de défauts (absence de molécules à certains endroits) dans la monocouche du fait de la faible densité, comme montré sur la figure 4.1. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux de simulations de dynamique moléculaire [69, 59].

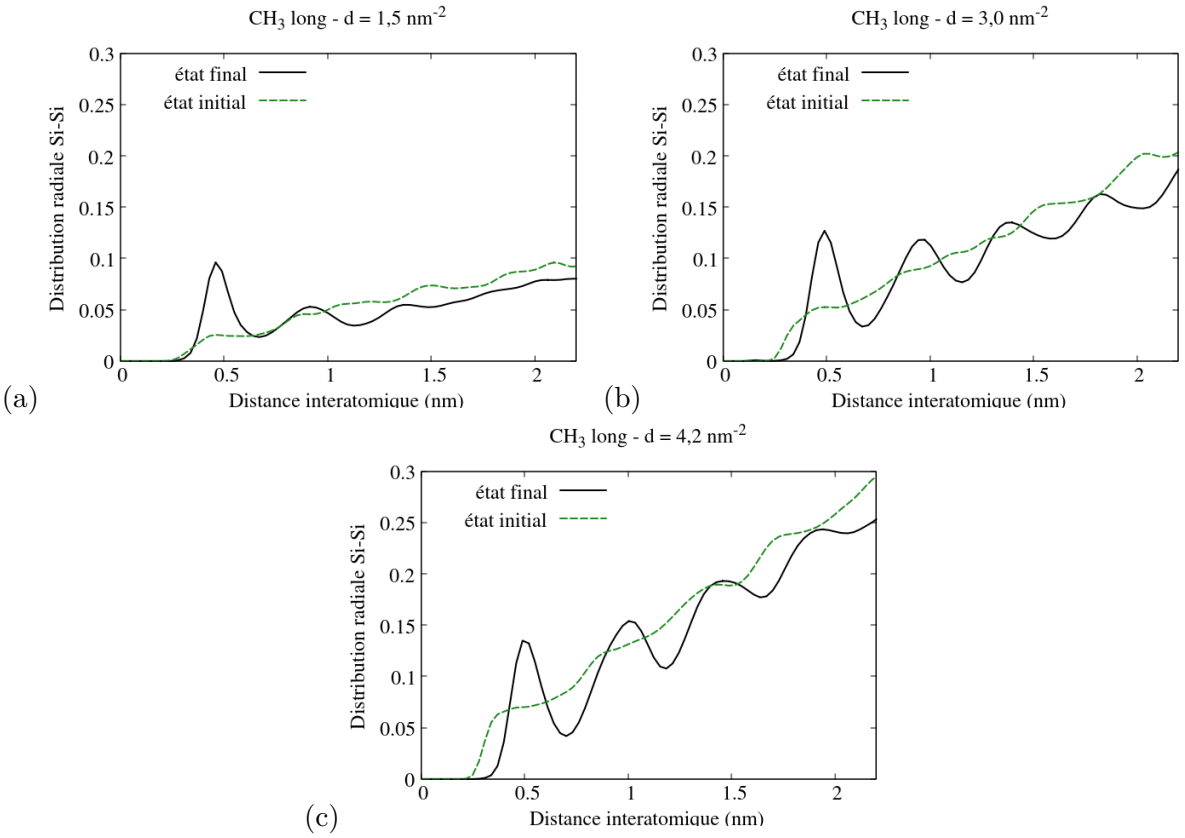


FIGURE 4.6 – *Apparition d'un positionnement organisé pendant les simulations : fonctions de distribution radiale (RDF) en 2D des molécules de silane CH_3 long à l'état initial et à l'état final pour les différentes densités étudiées : (a) d = 1,5 nm^{-2}, (b) d = 3,0 nm^{-2} et (c) d = 4,2 nm^{-2}. À l'état initial, la RDF est approximativement une droite dont la pente est proportionnelle à la densité de silanes. À l'état final, on observe la présence de pics qui montrent l'apparition d'une organisation des positions avec un paramètre de maille d'environ 4,5 à 5,0 nm.*

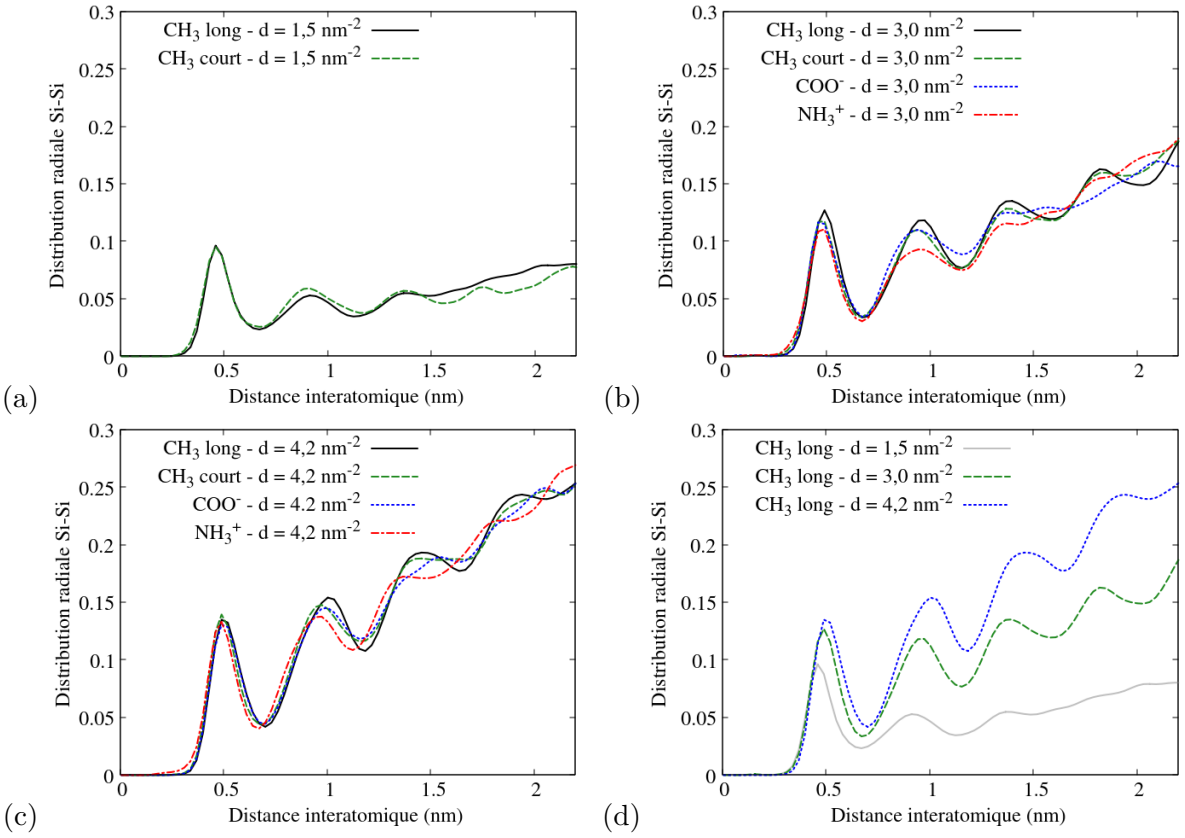


FIGURE 4.7 – *Fonctions de distribution radiale des monocouches de silanes étudiées à différentes densités (a) d = 1,5 nm^{-2}, (b) d = 3,0 nm^{-2} et (c) d = 4,2 nm^{-2}, et (d) comparaison des fonctions de distributions radiales aux différentes densités pour la monocouche CH_3 long à l'état final (simulations de 100 ns). Les pics observés à des distances interatomiques périodiques montrent qu'une organisation du positionnement apparaît dans les monocouches de silanes.*

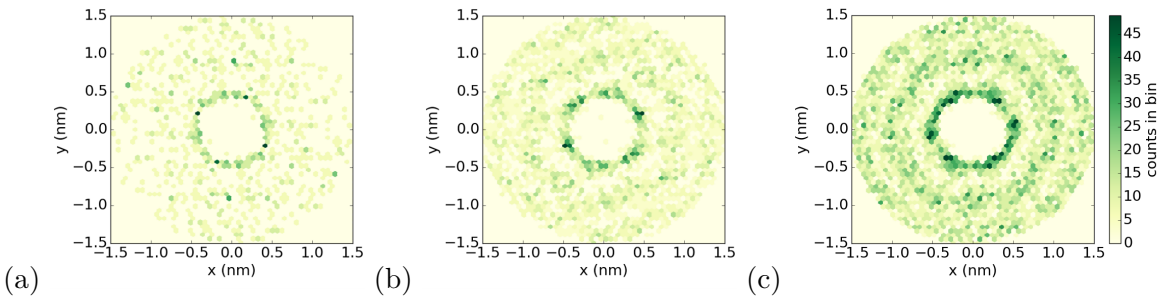


FIGURE 4.8 – *Fonctions de distribution radiale Si-Si en deux dimensions pour la monocouche de silanes CH_3 long à différentes densités (unités arbitraires) : (a) d = 1,5 nm^{-2}, (b) d = 3,0 nm^{-2} et (c) d = 4,2 nm^{-2}.*

De plus, d'après la figure 4.7, quelle que soit la monocouche de silanes considérée, et indépendamment de la longueur de la chaîne alkyle et de la charge du groupement terminal, le premier pic (qui correspond au paramètre de maille, c'est-à-dire à la distance minimale entre deux molécules voisines) est décalé vers des valeurs plus importantes lorsque la densité augmente : il est positionné à 0,45 nm à d = 1,5 nm^{-2}, 0,49 nm à d = 3,0 nm^{-2} et 0,5 nm à d = 4,2 nm^{-2}. Ce résultat pourrait être expliqué par la flexibilité des chaînes alkyles. En effet, à faible densité, la flexibilité des chaînes alkyles permet aux atomes de silicum des molécules de silane de se positionner plus près les unes des autres pendant la phase de diffusion de la simulation, tout en respectant le rayon de Van der Waals de l'atome de silicium (qui vaut 0,21 nm).

Pour une densité donnée, l'intensité du premier pic est la même pour tous les systèmes. Cela signifie que le nombre de plus proches voisins des molécules de silane ne dépend pas de la longueur de leur chaîne alkyle et de la charge de leur groupement terminal. Pour les monocouches de silanes CH_3 court et CH_3 long avec les densités $d = 3,0$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2}, la fonction de distribution radiale montre que l'arrangement hexagonal persiste dans le plan (x,y) jusqu'à 2 nm de l'origine, puisque 4 pics sont biens définis sur la figure 4.7. Ce n'est pas le cas avec les groupements terminaux chargés : seuls les deux premiers pics sont visibles, ce qui montre que la propagation de l'arrangement hexagonal est limité à 1,5 nm environ. En conséquence, les monocouches NH_3^+ et COO^- sont plus désordonnées que les monocouches CH_3 court et CH_3 long.

En conclusion, la longueur de persistance de l'arrangement hexagonal peut être corrélée au paramètre d'ordre nématique, puisqu'elle croît avec la densité et est indépendante de la longueur de la chaîne et de la distribution des angles d'inclinaisons. Elle est aussi diminuée par la présence groupements terminaux chargés. On en déduit que parmi les quatre monocouches de silanes étudiées, les monocouches CH_3 long et CH_3 court aux densités $d = 3,0$ nm^{-2} et $d = 4,2$ nm^{-2} sont celles qui conduisent à l'ordre de positionnement le plus élevé. Cependant, les molécules de silane CH_3 court présentent une distribution des angles d'inclinaison plus large que les molécules CH_3 long. Enfin, la longueur de persistance de l'arrangement hexagonal semble reliée au degré d'agrégation sur la surface que l'on observe sur la figure 4.1. En effet, pour une densité $d = 3,0$ nm^{-2}, quatre pics sont bien définis sur les RDF pour CH_3 long et CH_3 court, mais seulement 2 pics pour les monocouches COO^- et NH_3^+, ce qui suggère que la longueur de persistance de l'arrangement hexagonal augmente avec le degré d'agrégation des molécules de silane.

4.3.2 Validation expérimentale de la morphologie des monocouches de silanes modélisées

De précédentes études expérimentales ont montré que les molécules avec de longues chaînes alkyles forment des monocouches plus ordonnées, avec un angle d'inclinaison plus petit et organisées de façon plus dense sur la surface que les molécules avec de courtes chaînes alkyles [65, 66, 159, 160, 161]. Cependant, la plupart des études expérimentales s'intéressent à des molécules de silane multifonctionnelles, qui permettent des réactions de réticulation, tandis que les simulations de dynamique moléculaire réalisées utilisent des molécules de silane monofonctionnelles. Or la morphologie de la monocouche dépend de la nature des molécules de silane [160]. C'est pourquoi, pour vérifier que les résultats issus des simulations de dynamique moléculaire sont cohérents, des monocouches de silanes monofonctionnels NH_3^+, COO^-, CH_3 court et CH_3 long ont été réalisées expérimentalement. Les angles d'inclinaison des chaînes alkyles ont été caractérisés qualitativement par FTIR-ATR et la densité des monocouches de silanes a été estimée par XPS.

4.3.2.a Analyse XPS

Les spectres du substrat de SiO_2 non fonctionnalisé et des quatre substrats de SiO_2 fonctionnalisés par des monocouches de silanes sont présentés aux figures 4.9 à 4.13. Les éléments O1s et Si2p sont détectés sur le substrat comportant la couche de SiO_2 non fonctionnalisée, tandis que l'élément C1s n'est pas détecté. Les substrats fonctionnalisés présentent des pics C1s, O1s et Si2p distincts, dont les énergies de liaison sont présentées dans le tableau 4.3. Les niveaux de cœur C1s, O1s et Si2p sont également présentés dans les figures 4.9 à 4.13.

	Couche de SiO_2		CH_3 court		CH_3 long		NH_3^+		COO^-	
	at. %	eV	at. %	eV	at. %	eV	at. %	eV	at. %	eV
$Si(-O)_4$	38,6	104	34,9	104	36,2	104	36,2	104	36,0	104
$Si(-O)_1$			0,8	102,0	0,6	101,7	1,3	101,7	0,6	101,4
O1s	61,4	533,4	53,6	533,3	53,7	533,3	55,7	533,3	55,1	533,3
C1s			10,7	285,2	9,6	285,4	6,8	285,6	8,1	285,4

TABLE 4.3 – *Pourcentages interatomiques et énergies de liaison pour la couche de SiO_2 et les quatre monocouches de silanes*

Dans les spectres à haute résolution Si2p des substrats silanisés, on observe deux contributions, qui sont associées à $Si(-O)_4$ et à $Si(-O)_1$ (tableau 4.3). La contribution $Si(-O)_4$ correspond aux atomes de silicium liés aux atomes d'oxygène dans le substrat de SiO_2. La présence de la contribution $Si(-O)_1$ témoigne du succès du processus de silanisation, puisque les quatre molécules de silane employées sont monovalentes. Les pourcentages atomiques des éléments sur le substrat non fonctionnalisé et les quatre substrats fonctionnalisés sont présentés dans le tableau 4.3. Le ratio Si/O vaut environ 1,6 pour chaque substrat, et le ratio $Si(-O)_4$ / C1s est cohérent avec la composition moléculaire des silanes, sauf pour la monocouche CH_3 court. En effet, une contamination par des atomes de carbone apparaît systématiquement sur la monocouche de silanes CH_3 court, bien que la solution de silane ne soit pas contaminée. La densité des molécules de silane sur la surface, notée $\Gamma_{silanes}$, est estimée par la formule [63] :

$$\Gamma_{silanes} = \frac{A_{Si(-O)_1}}{A_{Si2p}} n_{SiO_2} z \tag{4.1}$$

avec $A_{Si(-O)_1}$ et A_{Si2p}, les aires normalisées du pic $Si(-O)_1$ et des composantes ($Si(-O)_1$ + $Si(-O)_4$) respectivement, n_{SiO_2}, la concentration moléculaire de la silice (22 nm^{-3}) et z, la profondeur d'analyse. z vaut approximativement 3λ avec λ le libre parcours moyen dans la silice, estimé à 3,7 nm [162, 163].

La densité de surface vaut environ 3 nm^{-2} pour les monocouches CH_3 court, CH_3 long et COO^- et environ 8 nm^{-2} pour la monocouche NH_3^+. Ces résultats suggèrent que la densité ne dépend pas de la longueur de la chaîne alkyle, contrairement à de précédents résultats obtenus pour des silanes multifonctionnels [66]. La densité de la monocouche NH_3^+ est plus de deux fois plus élevée que celle obtenue avec les autres molécules de silane. Cela pourraît être expliqué par un effet catalytique des groupements amines pendant le processus de silanisation [164, 165]. De plus, notons que, du fait de la profondeur d'analyse et des variations de longueur de la chaîne alkyle, les calculs sous-estiment le ratio entre la densité de surface des courtes chaînes alkyles (CH_3 court, NH_3^+) et des longues chaînes alkyles (CH_3 long, COO^-).

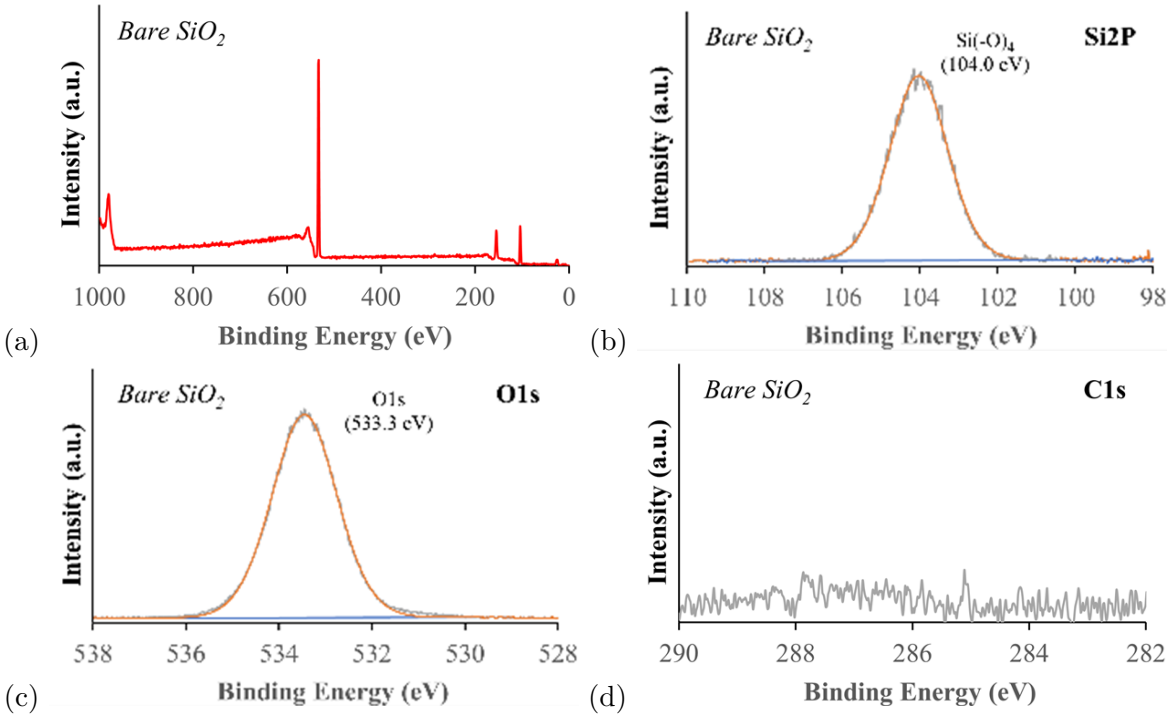


FIGURE 4.9 – *Spectres d'XPS de la couche de SiO_2 non fonctionnalisée : (a) spectre complet et spectres fins des niveaux de cœur (b) Si2p, (c) O1s et (d) C1s.*

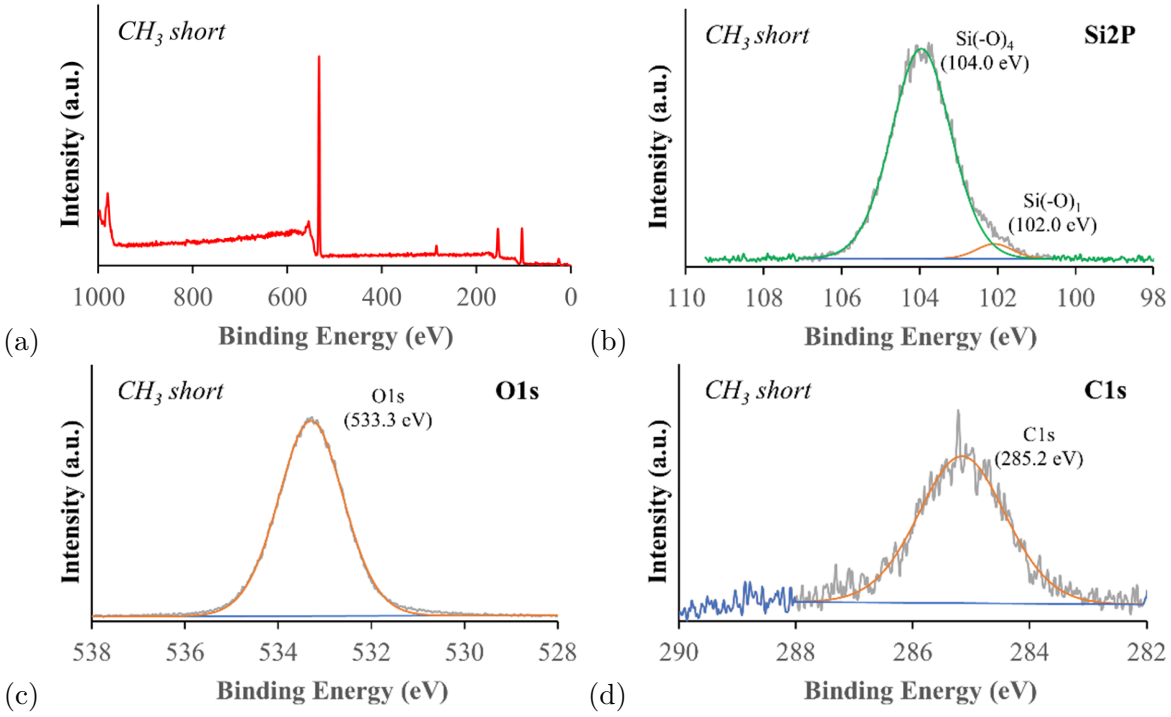


FIGURE 4.10 – *Spectres d'XPS de la monocouche de silanes CH_3 court : (a) spectre complet et spectres fins des niveaux de cœur (b) Si2p, (c) O1s et (d) C1s.*

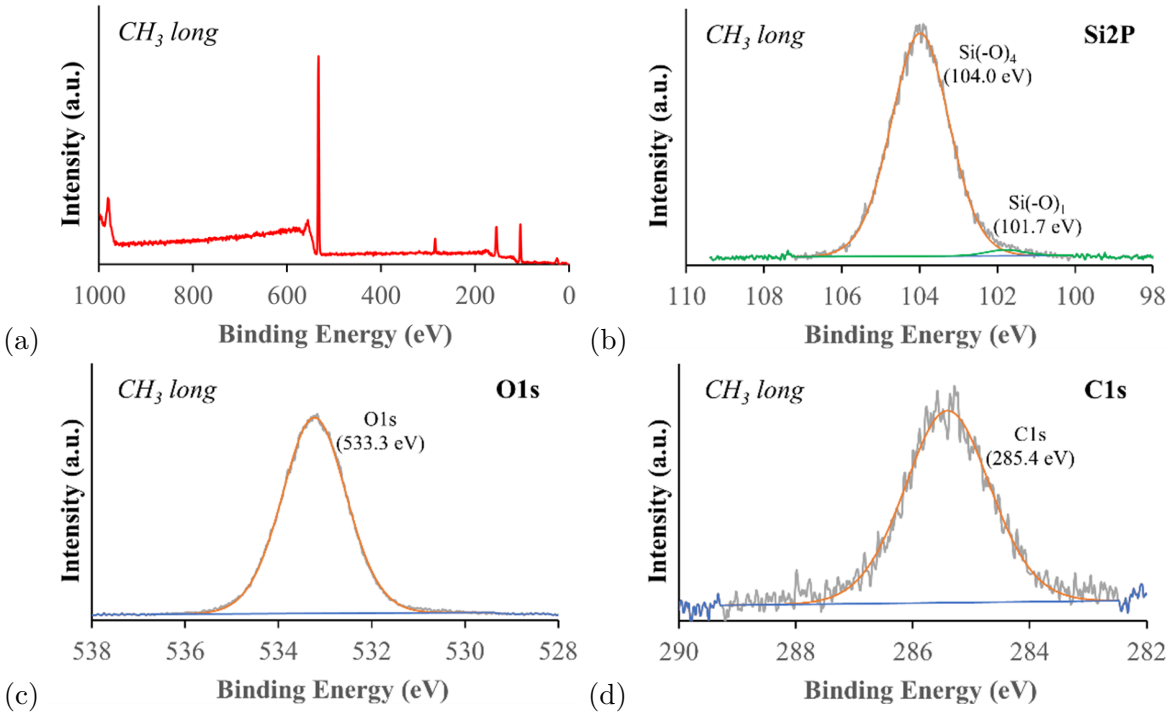


FIGURE 4.11 – *Spectres d'XPS de la monocouche de silanes CH_3 long : (a) spectre complet et spectres fins des niveaux de cœur (b) Si2p, (c) O1s et (d) C1s.*

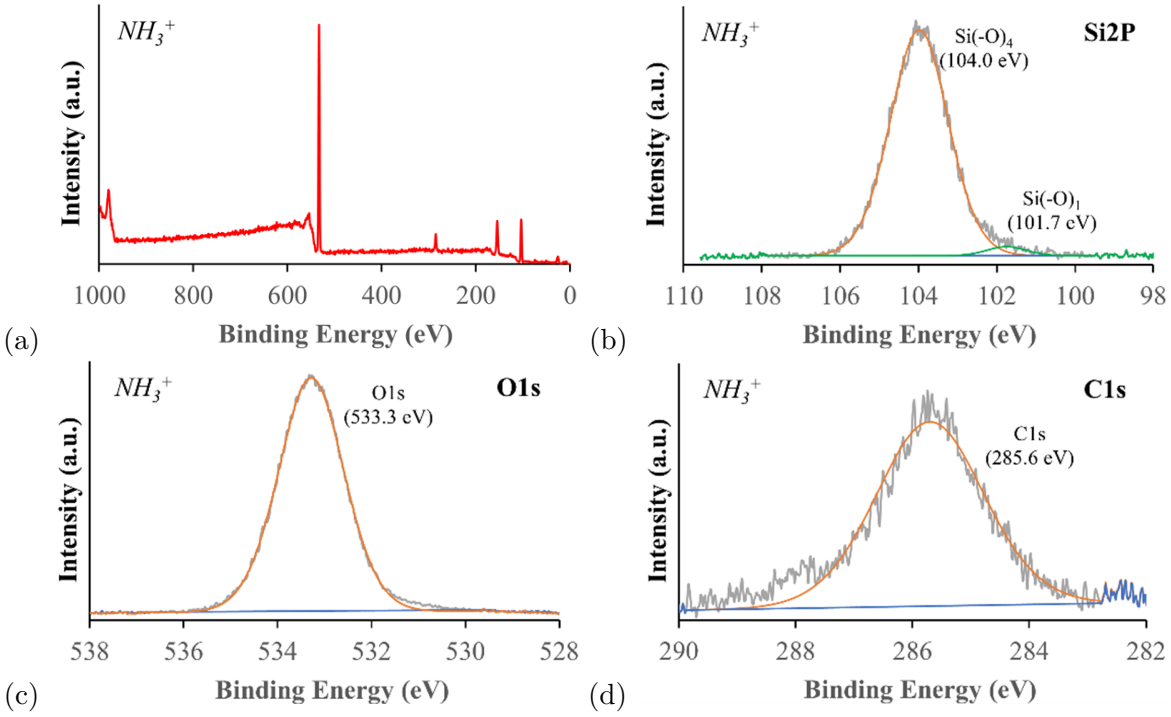


FIGURE 4.12 – *Spectres d'XPS de la monocouche de silanes NH_3^+ : (a) spectre complet et spectres fins des niveaux de cœur (b) Si2p, (c) O1s et (d) C1s.*

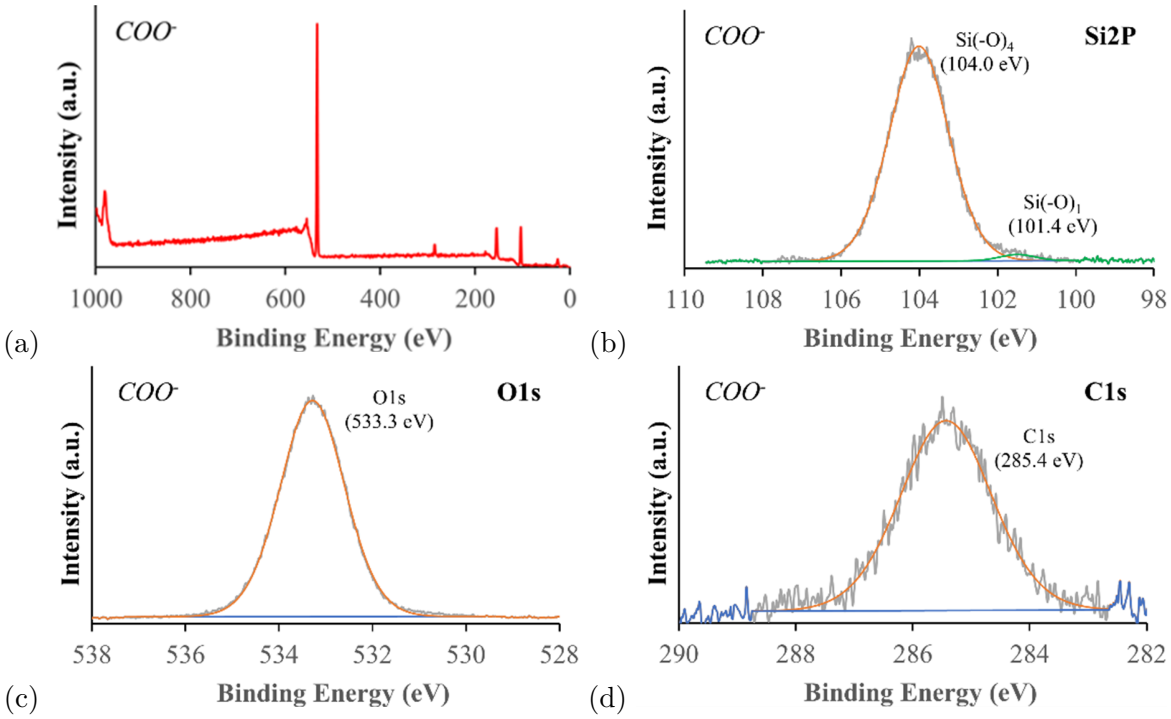


FIGURE 4.13 – *Spectres d'XPS de la monocouche de silanes COO^- : (a) spectre complet et spectres fins des niveaux de cœur (b) Si2p, (c) O1s et (d) C1s.*

4.3.2.b Analyse FTIR-ATR

Les analyses de FTIR-ATR peuvent apporter des informations concernant l'organisation des molécules de silane dans la monocouche. En effet, le mode d'élongation asymétrique du groupement méthylène est décalé vers les basses fréquences lorsque les chaînes alkyles sont plus ordonnées [159, 166, 167, 168]. De plus, plusieurs études combinant spectroscopie infrarouge, ellipsométrie et AFM ont montré qu'une augmentation de l'organisation des chaînes alkyles, ou un décalage vers les basses fréquences, est associé à une diminution de l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles [66, 168].

Les spectres de FTIR-ATR des monocouches de silanes COO^-, CH_3 long, CH_3 court et NH_3^+ sont présentés sur la figure 4.14. Les spectres des monocouches COO^-, CH_3 long et NH_3^+ sont dominés par le mode d'élongation méthylène symétrique (d^+, dans l'intervalle 2854 - 2854 cm^{-1}) et le mode d'élongation méthylène asymétrique (d^-, dans l'intervalle 2924-2928 cm^{-1}). Ces modes ne sont pas observés pour la monocouche CH_3 court, probablement car la molécule de silane CH_3 court présente moins de groupements méthylènes que les molécules CH_3 long et COO^-. Cependant, les modes d^+ et d^- sont observés pour la monocouche NH_3^+, bien que les molécules NH_3^+ et CH_3 court présentent des nombres de groupements méthylènes similaires. Cela peut être expliqué par la densité plus importante mesurée pour la monocouche NH_3^+ ($d = 8$ nm^{-2}), par rapport à la monocouche CH_3 court ($d = 3$ nm^{-2}).

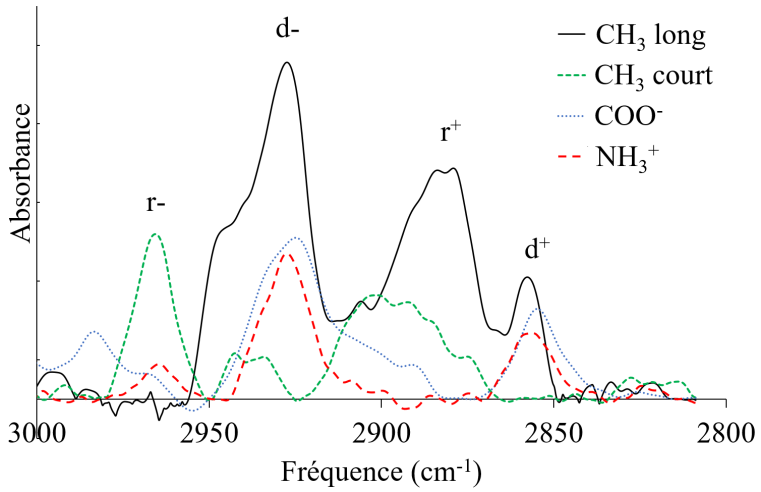


FIGURE 4.14 – *Spectre de FTIR - ATR des quatre surfaces silanisées.*

Les résultats montrent un décalage du mode d^- entre les différentes monocouches de silanes, jusqu'à 4 cm^{-1}. En effet, le pic est mesuré à 2929 cm^{-1} pour la monocouche CH_3 long, 2927 cm^{-1} pour la monocouche NH_3^+ et 2925 cm^{-1} pour la monocouche COO^-. Ce décalage vers les basses fréquences suggèrent que l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles est plus élevé pour la monocouche CH_3 long que pour les monocouches NH_3^+ et COO^- [168]. Ces résultats sont en accord avec les angles d'inclinaison déterminés par simulations de dynamique moléculaire. En effet, l'angle d'inclinaison des molécules de silane CH_3 long pour une monocouche de densité $d = 3,0$ nm^{-2} vaut 34 °, tandis que l'angle d'inclinaison de la monocouche NH_3^+ à une densité $d = 4,2$ nm^{-2} et celui de la monocouche COO^- à une densité $d = 3,0$ nm^{-2} sont proches, 12 °et 19 °respectivement.

Le mode d'élongation méthyle asymétrique (r^- dans le plan, 2966 cm^{-1}) est clairement résolu pour la monocouche de silanes CH_3 court uniquement, tandis que le mode d'élongation méthyle

symétrique (r^+, 2878 cm^{-1} ; r^+ FR, 2940 cm^{-1}) est clairement résolu pour la monocouche CH_3 long, mais pas pour la monocouche CH_3 court. De tels résultats ont déjà été observés en expériences de FTIR-ATR polarisé [66]. En effet, dans les expériences de FTIR-ATR polarisé, le mode r^- est observé seulement si les chaînes alkyles sont pratiquement perpendiculaires à la surface, tandis que le mode r^+ est observé pour les chaînes alkyles avec un angle d'inclinaison plus élevé uniquement. Dans cette étude, nous ne pouvons pas calculer les différents angles d'inclinaison car la mesure de FTIR-ATR est réalisée avec un faisceau non polarisé. Cependant, les résultats suggèrent qu'il y a un changement d'orientation entre les molécules de silane CH_3 long et CH_3 court. En effet, les monocouches CH_3 long et CH_3 court ayant la même densité, si l'angle d'inclinaison moyen des chaînes alkyles était le même, alors les aires des pics r^+ et r^- des deux monocouches seraient les mêmes (avec des largeurs différentes en fonction de la distribution des angles d'inclinaison). En supposant que la présence du mode r^- dans le système CH_3 court n'est pas uniquement liée à la contamination des atomes de carbone, ces résultats expérimentaux sont qualitativement en accord avec les angles d'inclinaison déterminés avec les simulations de dynamique moléculaire, qui valent 34° pour la monocouche CH_3 long à une densité $d = 3,0$ nm^{-2} et 22° pour la monocouche CH_3 court à une densité $d = 3,0$ nm^{-2}.

De précédentes études expérimentales ont montré que, dans le cas des molécules de silane multifonctionnelles, lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente, la densité croît et l'angle d'inclinaision décroit [66]. Nos résultats, à la fois expérimentaux et issus des simulations de dynamique moléculaire, suggèrent que dans le cas des molécules de silane monofonctionnelles, la longueur de la chaîne alkyle n'a pas d'effet significatif sur la densité, probablement à cause de plus faibles liaisons intermoléculaires. Cependant, l'angle d'inclinaison moyen de la chaîne alkyle croît lorsque la longueur de la chaîne augmente.

4.3.3 Conclusion

En conclusion, cette étude montre que l'état ordonné des différentes monocouches de silanes dépend à la fois de la longueur de leur chaîne alkyle (n est compris entre 3 et 18), de la charge de leur groupement terminal et de leur densité. En effet, de longues chaînes alkyles et une densité élevée conduisent à des monocouches auto-assemblées plus organisées, avec une distribution de l'angle d'inclinaison étroite et centrée sur une orientation préférentielle et peu de défauts gauches. De plus, pour une longueur de chaîne alkyle et une densité données, des molécules de silane chargées conduisent à un état plus désordonné que des molécules non chargées, avec une distribution de l'angle d'inclinaison plus large. Pour les longues chaînes alkyles ($n > 8$) l'angle d'inclinaison est affecté par la densité de la surface, tandis qu'avec les courtes chaînes alkyles ($n = 3$), à l'inverse, l'angle d'inclinaison semble indépendant de la densité. La présence d'un groupement terminal chargé influence également la relation entre l'angle d'inclinaison et la densité pour les molécules présentant de longues chaînes alkyles. En effet, pour la monocouche COO^- ($n = 11$), on n'observe pas d'effet de la densité sur l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles. Enfin, les différences entre les angles d'inclinaison pour les différentes monocouches de silanes issus des simulations de dynamique moléculaire sont qualitativement validés par l'analyse de FTIR-ATR.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les molécules de silane s'organisent selon un arrangement hexagonal dans tous les systèmes étudiés et que, quelle que soit la longueur de la chaîne alkyle, une augmentation de la densité conduit à une apparition plus marquée de l'organisation hexagonale. Les valeurs du paramètre d'ordre nématique montrent que cet arrangement est principalement gouverné par l'orientation parallèle des premières liaisons C-C des molécules de silane, à proximité de la surface de SiO_2. Ainsi, même les molécules de silane avec une courte chaîne alkyle (CH_3 court) présentent, malgré une large distribution des angles d'inclinaison, un arrangement hexagonal bien défini à densité élevée.

4.4 Résultats et discussion : organisation et diffusion des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- à l'interface avec les monocouches de silanes

Nous nous intéressons à présent aux effets des monocouches de silanes sur l'organisation et la diffusion des ions Na^+ et Cl^- et des molécules d'eau à l'interface. Plus précisément, nous étudions l'impact des monocouches de silanes NH_3^+, COO^-, CH_3 court et CH_3 long sur la distribution des ions Na^+ et Cl^- et leur structure d'hydratation, mais aussi sur l'organisation, l'orientation et la diffusion des molécules d'eau interfaciales.

4.4.1 Distribution, structure d'hydratation et diffusion des ions Na^+ et Cl^-

4.4.1.a Distribution des ions

Selon le modèle de Gouy - Chapman - Stern (GCS), en présence d'un électrolyte (NaCl dans cette étude), la charge de surface est contrebalancée par la distribution des ions, qui forment trois couches différentes au-dessus de la surface (voir figure 4.15). La première couche, le plan d'Helmholtz, est caractérisée par l'adsorption spécifique d'ions et de molécules d'eau présentant une orientation particulière. À l'extérieur de ce plan, la deuxième couche est caractérisée par l'adsorption non spécifique d'ions hydratés. Ces deux couches forment la couche compacte de Stern. À l'extérieur de la couche de Stern, la troisième couche, ou couche diffuse, est caractérisée par l'adsorption non spécifique d'ions hydratés à une concentration qui décroît progressivement vers l'eau *bulk* [95]. De plus, l'épaisseur de la couche diffuse, donnée par la longueur de Debye, croît lorsque la concentration en ions décroît. La longueur de Debye dans un électrolyte est donnée par la formule :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_d k_B T}{\sum_i q_i^2 c_i^0}} \tag{4.2}$$

avec $\epsilon_d = \epsilon_0 \epsilon_r$ la permittivité diélectrique du solvant (ϵ_0 étant la permittivité diélectrique du vide et ϵ_r la permittivité relative du solvant), T la température (K), k_B la constante de Boltzmann, c_i^0 concentration en ions i, et q_i la charge de l'ion i. Pour une concentration en NaCl de 0,2 mol·L^{-1}, l'épaisseur de la couche diffuse vaut 0,7 nm à 300 K, tandis que l'épaisseur de la couche compacte correspond à quelques monocouches d'eau.

Plusieurs études expérimentales et de simulations de dynamique moléculaire ont cependant établi des limites à ce modèle, qui néglige les interactions entre les ions [95, 108, 169, 170]. En particulier, il a été montré que la composition de la couche compacte et l'épaisseur de la couche diffuse dépendent de la distribution des charges sur la surface [95]. Dans le cas d'une distribution de charge uniforme négative, une adsorption spécifique d'ions Na^+ est observée dans la couche compacte, tandis qu'une diminution progressive de la concentration en ions est observée dans la couche diffuse, comme prédit par la théorie GCS. En revanche, dans le cas où les charges négatives sont localisées sur la surface, la distribution des ions varie en fonction de leur concentration. Avec une concentration en NaCl de 0,1 mol·L^{-1}, les ions Na^+ sont adsorbés spécifiquement dans la couche compacte, et on n'observe pas de couche diffuse, alors qu'avec les mêmes charges négatives localisées sur la surface et une concentration en NaCl de 0,5 mol·L^{-1}, une adsorption spécifique des ions Na^+ est toujours observée dans le plan de Helmholtz, mais suivie d'une diminution progressive de Na^+ et d'une adsorption spécifique d'ions Cl^-, en dehors du plan de Helmholtz mais toujours dans la couche compacte. De plus, une augmentation progressive de la concentration en ions Na^+ et une diminution progressive de la concentration en ions Cl^- est observée dans la couche diffuse, dont l'épaisseur est plus faible que celle prévue par

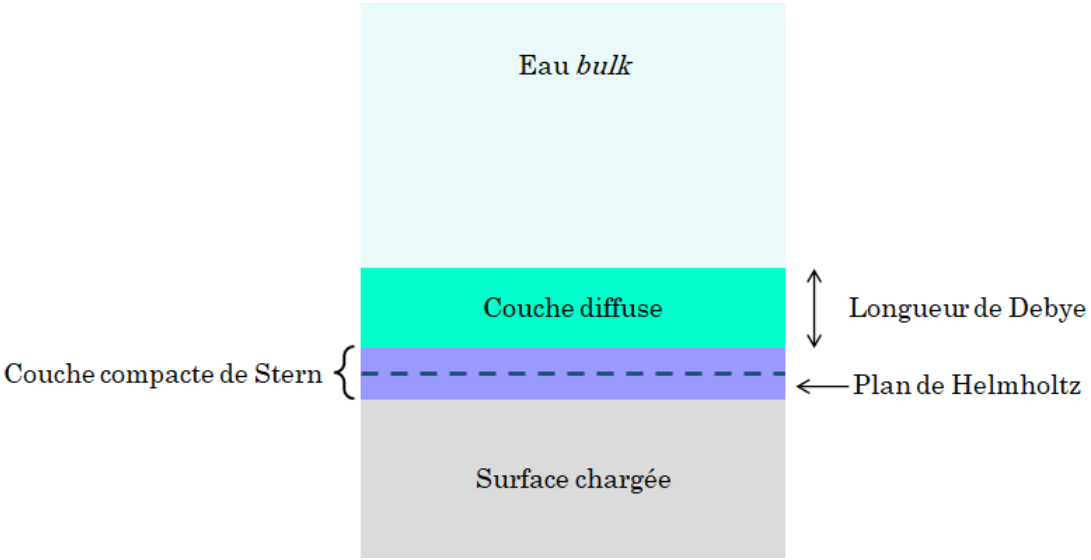


FIGURE 4.15 – *Schéma des différentes couches d'eau à l'interface avec une surface chargée selon le modèle de Gouy - Chapman - Stern.*

le modèle GCS [95].

La figure 4.1, page 94, présente l'arrangement de toutes les monocouches de silanes étudiées, qui fonctionnalisent une surface de SiO_2 amorphe, et la distribution des molécules d'eau et des ions à l'état final (simulations de 100 ns). La distribution des ions le long de la normale à la surface est présentée sur la figure 4.16 pour tous les systèmes étudiés. Dans le cas de la monocouche NH_3^+, comme prédit par la théorie GCS, on observe une adsorption spécifique des ions Cl^- sur la surface, suivie d'une couche diffuse qui s'étale sur environ 0,7 nm, dans laquelle la concentration en ions Cl^- décroît progressivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dewan *et al.* pour une charge de surface répartie uniformément [95]. Dans le cas de la monocouche COO^-, en revanche, les distributions des ions sont différentes de celles prédites par la théorie GCS. En effet, dans la couche compacte, des ions Na^+ sont spécifiquement adsorbés sur la surface, mais une augmentation de la concentration en ions Cl^- est également observée. Au-dessus de la couche compacte, une couche diffuse d'environ 0,7 nm d'épaisseur est observée, où la concentration des ions Na^+ et Cl^- décroît. Une telle adsorption des ions Na^+ et Cl^- est observée par Dewan *et al.* pour une distribution de charges localisées sur une surface de SiO_2 [95]. Ainsi, les différences observées dans les distributions des ions sur les monocouches de silanes NH_3^+ et COO^- pourraient être expliquées par une organisation différente des groupements terminaux chargés sur la surface.

Pour vérifier cette hypothèse, nous analysons la distribution en deux dimensions des groupements terminaux chargés des molécules de silane NH_3^+ et COO^- (voir figure 4.17). Notons que dans la première partie de ce chapitre, en traçant les fonctions de distribution radiales Si-Si des molécules de silane, nous avons montré qu'une organisation de positionnement apparaît dans les monocouches de silanes au cours de la simulation, et que la distance interatomique ne dépend que de la densité de la surface et non du type de molécules de silane. La distance interatomique vaut 4,9 Å à $d = 3,0$ nm $^{-2}$ et 5,0 Å à $d = 4,2$ nm $^{-2}$. D'après la figure 4.17, pour les monocouches de silane COO^-, la RDF des atomes d'oxygène des groupements terminaux présente un premier pic à 2,1 Å, qui correspond à la distance intramoléculaire entre les deux atomes d'oxygène du groupement terminal. Le second pic est observé à partir de 2,8 Å, ce qui correspond à la distance minimale intermoléculaire entre deux atomes d'oxygène des groupements terminaux. Concernant la monocouche de silanes NH_3^+, le pic correspondant à la distance

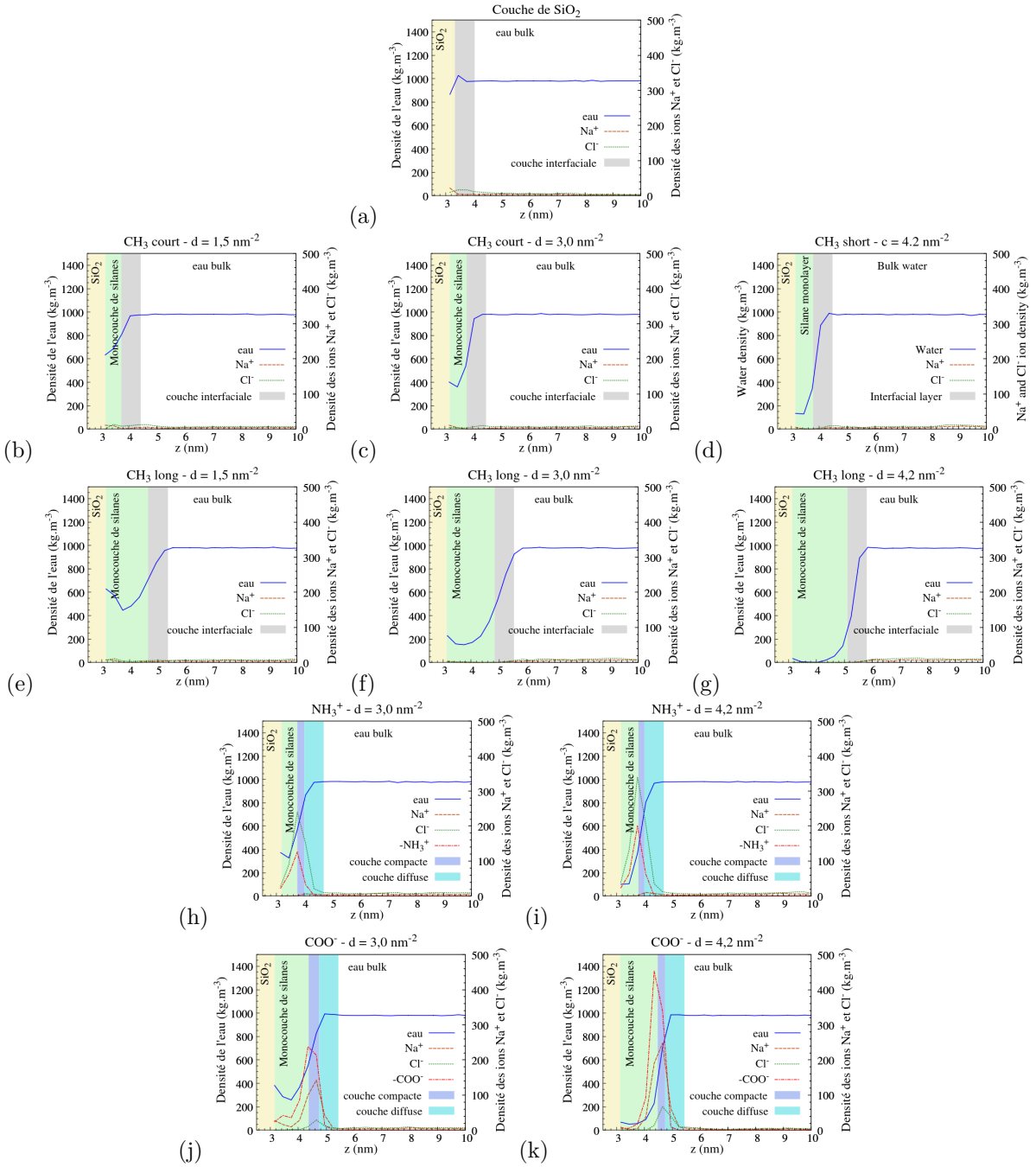
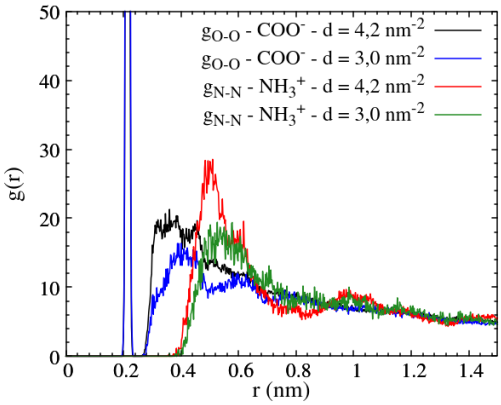


FIGURE 4.16 – *Distribution des molécules d'eau, des groupements terminaux chargés, des ions Na^+ et des ions Cl^- pour les systèmes (a) couche de SiO_2 non fonctionnalisée, (b) CH_3 court $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (c) CH_3 court $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (d) CH_3 court $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (e) CH_3 long $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (f) CH_3 long $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (g) CH_3 long $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (h) NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (i) NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (j) COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, et (k) COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$. Les couches compactes et diffuses sont représentées pour les systèmes NH_3^+ et COO^- et la couche interfaciale de 0,7 nm d'épaisseur est indiquée pour les systèmes CH_3 long, CH_3 court et SiO_2.*

intermoléculaire entre les atomes d'azote des groupements terminaux commence à croître à 3,7 Å, avec une valeur maximale obtenue entre 4,8 et 5,1 Å environ. Nos résultats suggèrent donc que les interactions entre les longues chaînes alkyles des molécules de silane COO^- induisent la formation d'agrégats de groupements terminaux chargés négativement, tandis que les groupements terminaux chargés positivement des monocouches de silanes NH_3^+ sont dispersés de façon plus uniforme sur la surface. De plus, les résultats montrent, en accord avec l'étude de Dewan *et al.* [95] qu'une augmentation de la densité de surface en molécules NH_3^+ ou COO^- ne conduit pas à une augmentation significative de l'épaisseur de la couche diffuse.



(a)

FIGURE 4.17 – *Fonctions de distribution radiales des charges des groupements terminaux : g_{O-O} dans la monocouche de silanes COO^- et g_{N-N} dans la monocouche de silanes NH_3^+.*

Pour les monocouches de silanes CH_3 long et CH_3 court, nos résultats montrent, comme prévu, que les ions Na^+ et Cl^- sont uniformément répartis dans l'eau. On n'observe donc ni couche compacte, ni couche diffuse pour ces systèmes. Cependant, une couche interfaciale est définie, dans laquelle la densité des molécules d'eau croît pour atteindre la valeur du *bulk*. La couche interfaciale fait approximativement 0,7 nm d'épaisseur (et est définie à partir de l'atome le plus élevé de la surface). Enfin, concernant la couche de SiO_2 non fonctionnalisée, on observe une légère augmentation de la concentration en ions Na^+ suivie d'une légère augmentation de la concentration en ions Cl^- à l'interface. Cette distribution des ions pourrait être expliquée par les charges partielles des atomes d'oxygène, malgré la charge globale neutre de surface de SiO_2.

4.4.1.b Structure ionique d'hydratation et diffusion des ions

Structure ionique d'hydratation dans l'eau *bulk* La figure 4.18 présente les RDF g_{Na^+-O}, g_{Na^+-H}, g_{Cl^--O}, g_{Cl^--H} et les nombres de coordination correspondants dans la région *bulk*. Les valeurs obtenues sont similaires pour tous les systèmes étudiés. Les structures d'hydratation des ions Na^+ et Cl^- dans l'eau *bulk* ne sont donc pas impactées par la présence et la nature des monocouches de silanes étudiées.

La figure 4.19 présente la superposition des différentes courbes pour l'un des systèmes étudiés ($NH_3^+ d = 4{,}2$ nm^{-2}). Concernant les ions Na^+, le premier pic de $g_{Na^+-O}(r)$ est obtenu à 2,4 Å, tandis que le premier pic de $g_{Na^+-H}(r)$ est situé à 3,0 Å. Les molécules d'eau dans la première couche de solvatation sont donc orientées avec leur atome d'oxygène pointant vers les ions Na^+. Le nombre de coordination, c'est-à-dire le nombre de molécules d'eau dans la première couche de solvatation, est calculé en intégrant la RDF jusqu'au premier minimum, qui est situé à 3,2 Å pour $g_{Na^+-O}(r)$ et à 3,7 Å pour $g_{Na^+-H}(r)$. Les nombres de coordination valent respectivement 5,5 et 13,3. Concernant les ions Cl^-, le premier pic de $g_{Cl^--H}(r)$ est obtenu à 2,3 Å et le

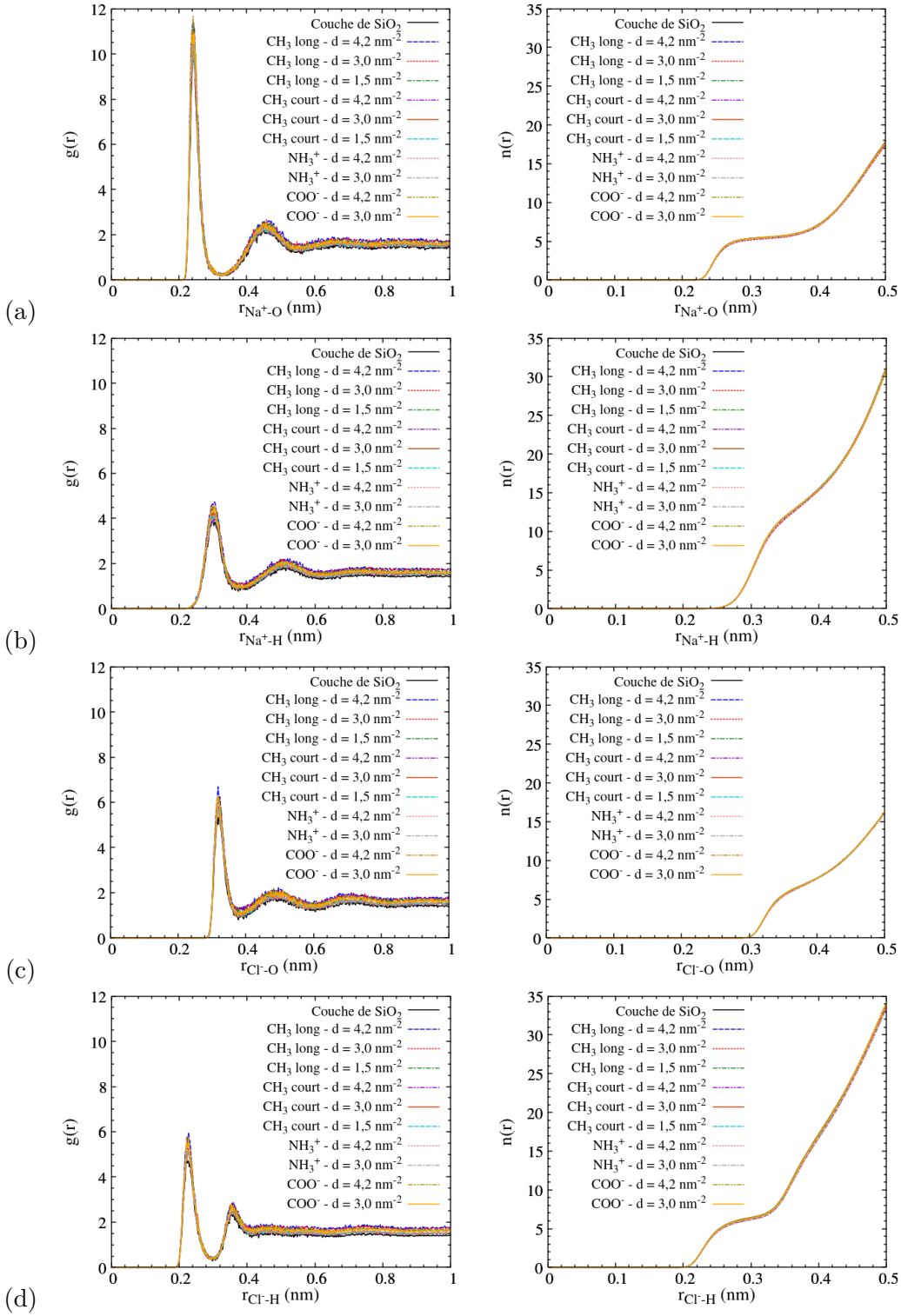


FIGURE 4.18 – *Fonctions de distribution radiales (à gauche) et nombres de cooordination correspondants (à droite) dans l'eau bulk pour tous les systèmes : (a) Na^+-O, (b) Na^+-H, (c) Cl^--O et (d) Cl^--H.*

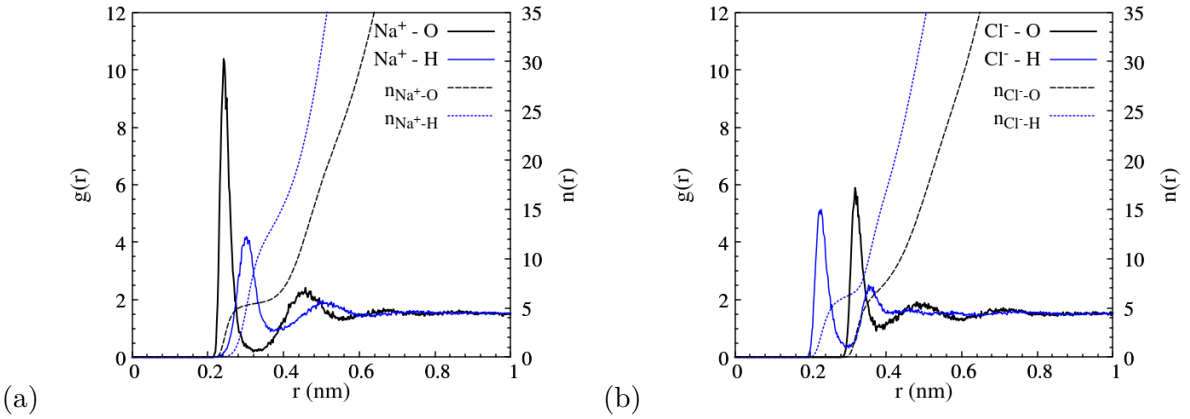


FIGURE 4.19 – *Fonctions de distribution typiques (lignes continues) et nombres de coordination correspondants (lignes pointillées) dans l'eau bulk pour le système NH_3^+ $d = 4{,}2$ nm^{-2} : (a) Na^+-O et Na^+-H et (b) Cl^--O et Cl^--H.*

premier pic de $g_{Cl^--O}(r)$ à 3,2 Å. De plus, pour $g_{Cl^--H}(r)$, un second pic est situé à 3,6 Å, ce qui montre qu'un seul des atomes d'hydrogène des molécules d'eau de la première couche de solvatation pointe vers l'ion Cl^- [106]. Les nombres de coordination sont $n_{Cl^--O} = 6,7$ et $n_{Cl^--H} = 6,0$. Tous ces résultats sont en accord avec de précédentes études de simulations de l'eau *bulk* [105, 106]. Comme suggéré par Chen *et al.* [171], le fait que les RDF ne convergent pas vers 1 est dû à l'interface solide - liquide et aux distributions d'ions inhomogènes dans les différents systèmes de simulation.

Structure ionique d'hydratation à l'interface avec les monocouches de silanes chargées Les nombres de coordination n_{Na^+-O} et n_{Na^+-H} au-dessus des monocouches de silanes COO^- sont présentés dans le tableau 4.4 et sur la figure 4.20 et les nombres de coordination n_{Cl^--O} et n_{Cl^--H} au-dessus des monocouches de silanes NH_3^+ et COO^- sont présentés dans le tableau 4.4 ainsi que sur les figures 4.21 et 4.22.

Monocouche de silanes	Couche compacte		Couche diffuse		Eau *bulk*	
Nombre de coordination	n_{Na^+-O} [a]	n_{Na^+-H} [a]	n_{Na^+-O}	n_{Na^+-H}	n_{Na^+-O}	n_{Na^+-H}
COO^- $d = 3,0$ nm^{-2}	3,5	10,2	4,4	11,9	5,5	13,3
COO^- $d = 4,2$ nm^{-2}	2,8	8,2	3,9	10,7	5,5	13,3
Nombre de coordination	n_{Cl^--O} [a]	n_{Cl^--H} [a]	n_{Cl^--O}	n_{Cl^--H}	n_{Cl^--O}	n_{Cl^--H}
NH_3^+ $d = 3,0$ nm^{-2}	4,9	4,3	5,7	5,2	6,7	6,0
NH_3^+ $d = 4,2$ nm^{-2}	3,5	2,8	5,6	5,0	6,8	6,1
COO^- $d = 3,0$ nm^{-2}	5,0	2,6	6,0	4,6	6,8	6,2
COO^- $d = 4,2$ nm^{-2}	4,0	1,6	5,1	3,0	6,9	6,3

TABLE 4.4 – *Nombres de coordination n_{Na^+-O}, n_{Na^+-H}, n_{Cl^--O} et n_{Cl^--H} dans les différentes couches d'eau pour les systèmes avec les monocouches de silanes COO^- et NH_3^+.* [a] *Les distances de cut-off pour les calculs de nombres de coordination valent 3,2 Å pour Na^+-O, 3,7 Å pour Na^+-H, 3,8 Å pour Cl^--O et 2,9 Å pour Cl^--H [106].*

Concernant les ions Cl^- à proximité des monocouches de silane NH_3^+, on observe que leurs nombres de coordination sont significativement plus faibles dans la couche compacte que dans la

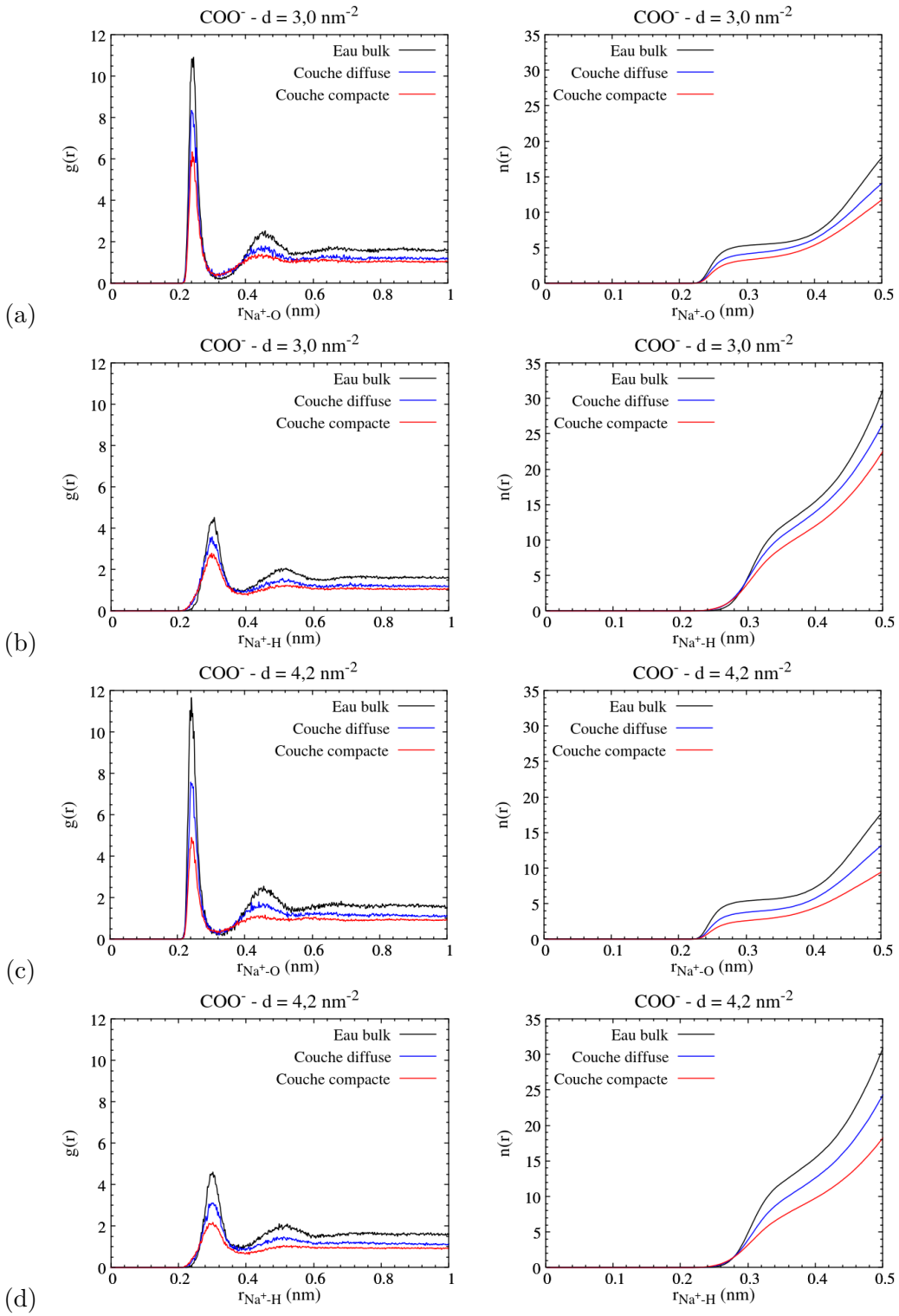


FIGURE 4.20 – *Fonctions de distribution radiale Na^+-O et Na^+-H (à gauche) et nombres de cooordination correspondants (à droite) dans l'eau bulk pour les systèmes COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$: (a) Na^+-O et (b) Na^+-H pour le système COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (c) Na^+-O et (d) Na^+-H pour le système COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$.*

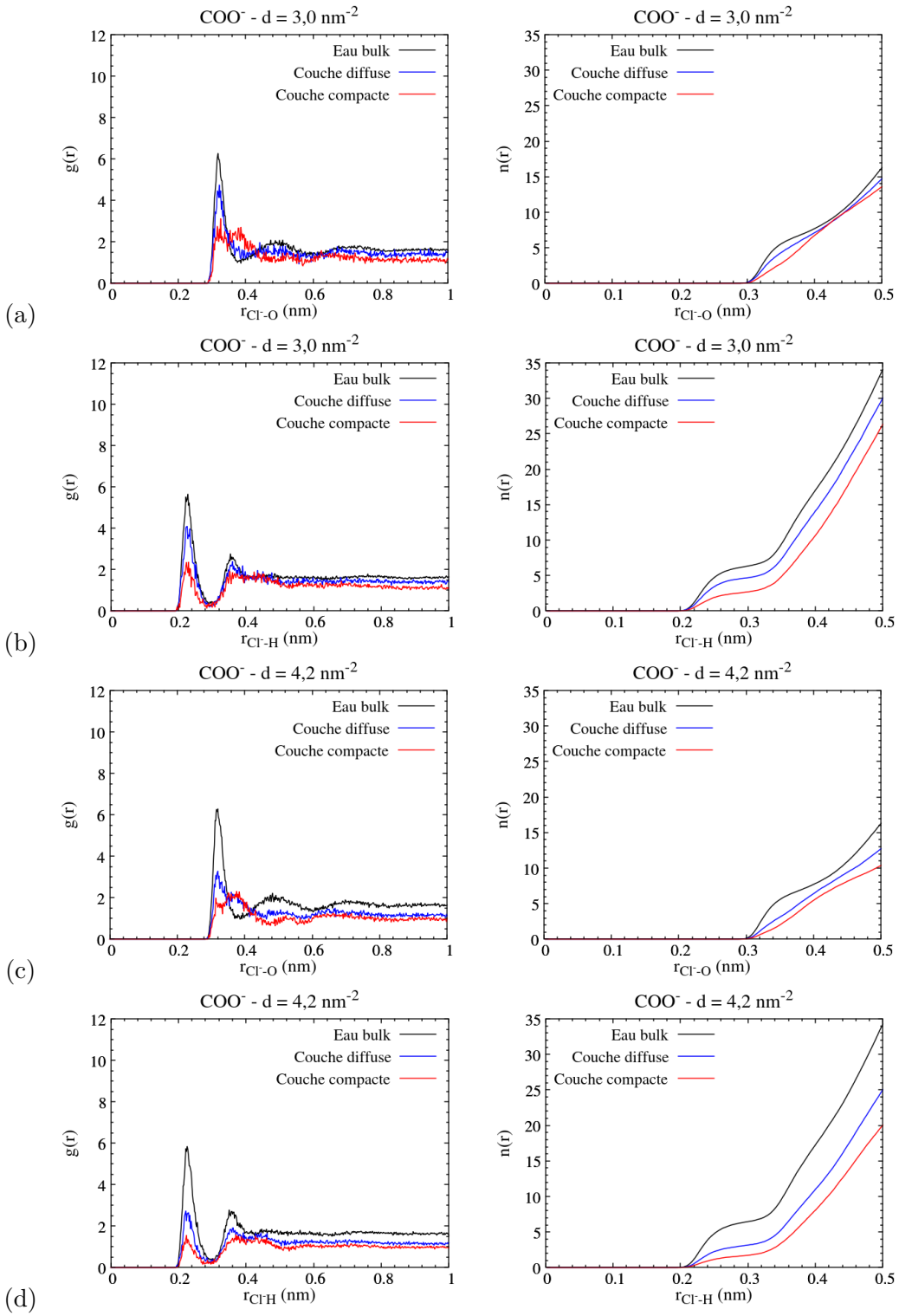


FIGURE 4.21 – *Fonctions de distribution radiale $Cl^- - O$ et $Cl^- - H$ (à gauche) et nombres de cooordination correspondants (à droite) dans l'eau bulk pour les systèmes COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$: (a) $Cl^- - O$ et (b) $Cl^- - H$ pour le système COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (c) $Cl^- - O$ et (d) $Cl^- - H$ pour le système COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$.*

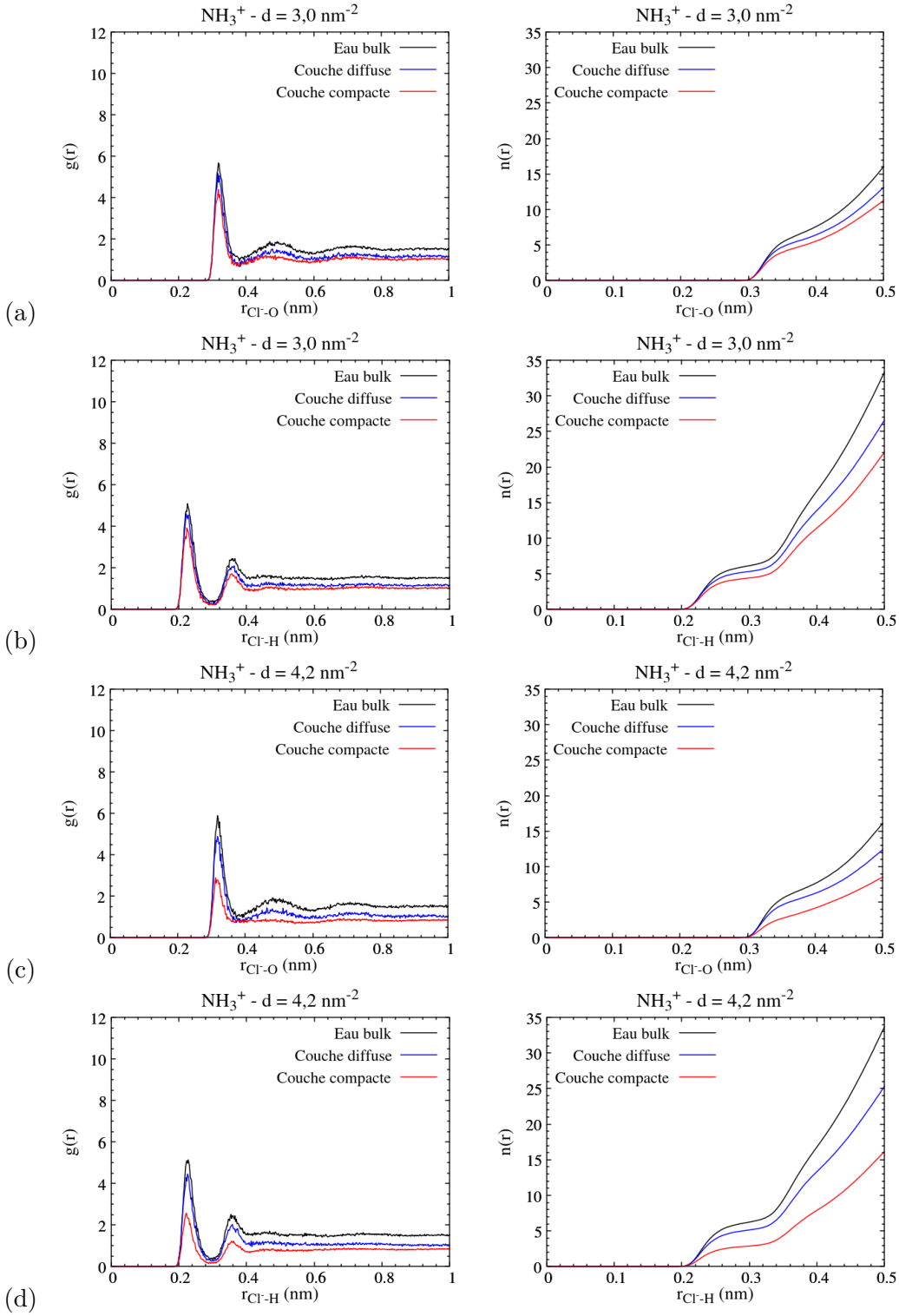


FIGURE 4.22 – *Fonctions de distribution radiale $Cl^- - O$ et $Cl^- - H$ (à gauche) et nombres de cooordination correspondants (à droite) dans l'eau bulk pour les systèmes NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$: (a) $Cl^- - O$ et (b) $Cl^- - H$ pour le système NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (c) $Cl^- - O$ et (d) $Cl^- - H$ pour le système NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$.*

couche diffuse, et dans la couche diffuse que dans l'eau *bulk*. La structure d'hydratation des ions Cl^- est donc perturbée à proximité de l'interface. Pour les monocouches de silanes COO^-, on observe que la structure d'hydratation des ions Na^+ est perturbée dans les couches compacte et diffuse mais également celle des ions Cl^-. Cela est en accord avec les résultats de Dewan *et al.* sur une surface avec des charges négatives localisées [95] et montre le rôle à la fois des cations et des anions dans la couche d'eau à l'interface avec les monocouches COO^-, ce qui n'est pas prévu avec la théorie GCS.

Ces résultats montrent donc que les monocouches chargées induisent une diminution progressive de la première couche de solvatation des ions situés à proximité de l'interface. De plus, nos résultats suggèrent que la perturbation de la première couche de solvatation des ions dans les couches compactes et diffuses croît avec la densité des silanes et la concentration en ions. Par exemple, avec les monocouches NH_3^+, $n_{Cl^- - H}$ vaut 6,0 dans l'eau *bulk*, 4,3 dans la couche compacte à $d = 3,0$ nm $^{-2}$ (la densité en ions Cl^- vaut environ 240 kg·m^{-3}) et 2,8 à $d = 4,2$ nm $^{-2}$ (la densité en ions Cl^- vaut environ 340 kg·m^{-3}).

Notons que dans le cas des monocouches CH_3 long et CH_3 court, la concentration en ions dans la couche interfaciale est trop faible (à cause de la distribution uniforme des ions dans l'eau) pour permettre le calcul de leur structure d'hydratation.

Diffusion des ions Na^+ et Cl^- La perturbation de la structure d'hydratation des ions Na^+ et Cl^- est en accord avec leurs coefficients de diffusion (voir tableau 4.5 et figure 4.23). En effet, les coefficients de diffusion des ions dans l'eau *bulk* sont en accord avec de précédents travaux [105], tandis que nos résultats suggèrent que la diffusion des ions est significativement plus faible dans les couches diffuses que dans l'eau *bulk*, et dans les couches compactes que dans les couches diffuses.

Région	Coefficient de diffusion des ions Cl^- au dessus de la monocouche NH_3^+ ($\times 10^{-5}$ cm^2·s^{-1})		Coefficient de diffusion des ions Na^+ au dessus de la monocouche COO^- ($\times 10^{-5}$ cm^2·s^{-1})	
Couche compacte	$0,10 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$
Couche diffuse	$0,34 \pm 0,21$	$0,41 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,06$
Eau *bulk*	$1,50 \pm 0,28$	$1,71 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,04$	$1,49 \pm 0,21$

TABLE 4.5 – *Coefficients de diffusion des ions Cl^- au dessus de la monocouche de silanes NH_3^+ et des ions Na^+ au dessus de la monocouche COO^-.*

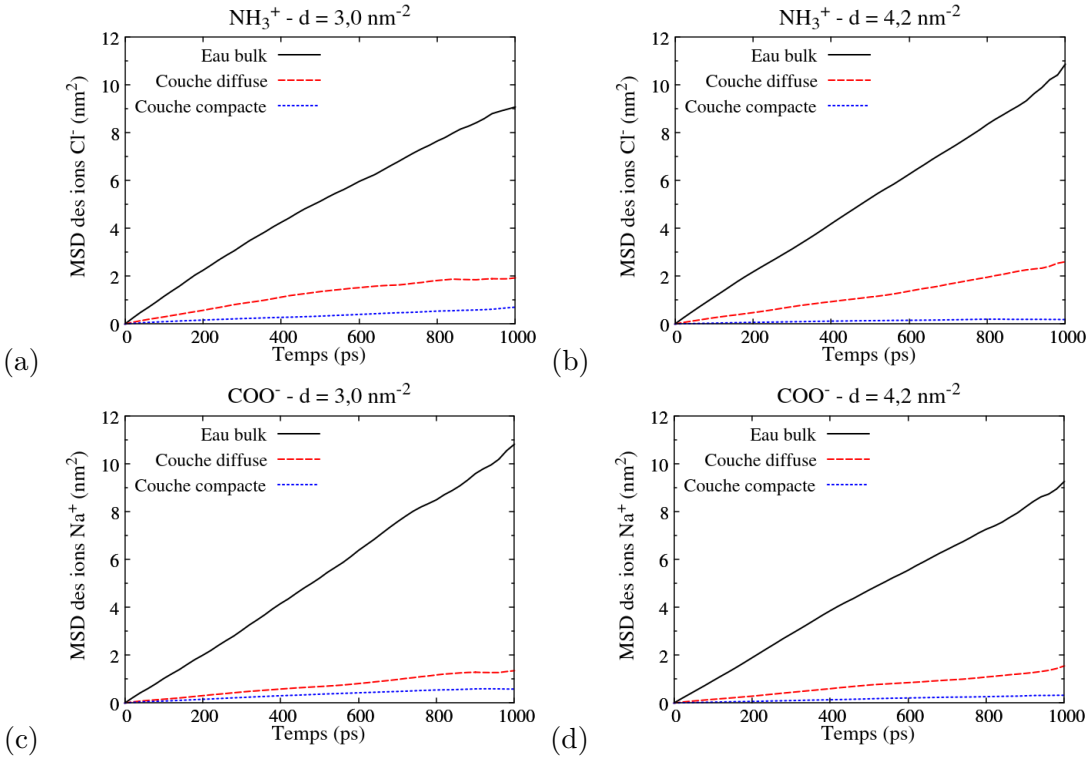


FIGURE 4.23 – *MSD dans la couche compacte, la couche diffuse et l'eau bulk pour (a) les ions Cl^- à proximité de la monocouche de silanes NH_3^+ d = 3,0 nm^{-2}, (b) les ions Cl^- à proximité de la monocouche de silanes NH_3^+ d = 4,2 nm^{-2}, (c) les ions Na^+ à proximité de la monocouche de silanes COO^- d = 3,0 nm^{-2} et (d) les ions Na^+ à proximité de la monocouche de silanes COO^- d = 4,2 nm^{-2}.*

4.4.2 Organisation et propriétés dynamiques des molécules d'eau

4.4.2.a Orientation des molécules d'eau à l'interface

L'organisation des molécules d'eau à l'interface avec les monocouches de silanes est caractérisée grâce à l'orientation de leur moment dipolaire par rapport à la normale à la surface (figure 4.24). Dans l'eau *bulk*, on observe que $< \cos\theta >= 0$ pour tous les systèmes de simulation. En effet, les molécules d'eau sont orientées aléatoirement et il n'y a pas de moment dipolaire global. De précédents travaux expérimentaux [96, 102, 172] et en simulations de dynamique moléculaire [95] ont montré que les molécules d'eau sont orientées jusqu'à 1 nm au dessus de la surface, avec leurs atomes d'hydrogène pointant vers l'extérieur au-dessus de surfaces planes chargées positivement, tandis qu'elles sont orientées avec les atomes d'hydrogène pointant vers la surface au-dessus de surfaces planes chargées négativement. De plus, il a été montré que les molécules d'eau sont orientées jusqu'à 1 nm au-dessus de surfaces étendues, hydrophobes et non polaires, avec les atomes d'hydrogène pointant vers la surface [173, 174, 175, 176] mais qu'à proximité de petits solutés hydrophobes, les molécules d'eau s'orientent avec les atomes d'hydrogène pointant à l'extérieur de la surface [177]. Cette organisation résulte de l'optimisation à la fois du nombre de liaisons hydrogène et de la densité des molécules d'eau [176].

Les résultats présentés sur la figure 4.24 montrent que les molécules d'eau à l'interface avec les monocouches de silanes NH_3^+ présentent une valeur positive de $< \cos\theta >$, ce qui indique que les atomes d'hydrogène pointent à l'extérieur de la surface. À l'inverse, on obtient une valeur négative de $< \cos\theta >$ à l'interface avec les monocouches de silanes COO^- et les molécules d'eau sont orientées avec les atomes d'hydrogène pointant vers la surface. Ces résultats sont en accord avec l'orientation des molécules d'eau à proximité d'ions chargés respectivement positivement et négativement [105, 106] (voir figure 4.19) et sont dus aux interactions électrostatiques qui s'établissent entre les molécules d'eau et les groupements terminaux chargés des molécules de silane. De plus, la forte orientation globale des molécules d'eau observée dans la couche compacte diminue ensuite progressivement dans la couche diffuse. Contrairement aux résultats de précédents travaux menés avec des surfaces planes chargées négativement [95], on n'observe pas d'oscillation de l'orientation des molécules d'eau. Cela pourrait être expliqué par la rugosité des monocouches de silanes (tableau 4.1, page 93).

Concernant la couche de SiO_2 non fonctionnalisée, nos résultats montrent que les molécules d'eau adsorbées sont légèrement orientées avec les atomes d'hydrogène pointant vers la surface (valeur de $< \cos\theta >$ négative), tandis que les molécules d'eau interfaciales s'orientent préférentiellement avec leurs atomes d'hydrogène pointant à l'extérieur de la surface (valeur de $< \cos\theta >$ positive). Ce résultat est en accord avec une précédente étude [95] et pourrait être expliqué par les charges partielles des atomes d'oxygène et de silicium du SiO_2 pour les molécules d'eau adsorbées, et par les ions Na^+ adsorbés pour les molécules d'eau interfaciales.

Une valeur de $< \cos\theta >$ positive est obtenue à l'interface avec les monocouches de silanes CH_3 court, ce qui montre que les molécules d'eau s'orientent préférentiellement avec les atomes d'hydrogène pointant à l'extérieur de la surface. De plus, l'orientation globale des molécules d'eau est plus prononcée lorsque la densité de la monocouche de silanes croît. Cela montre qu'à l'interface avec les monocouches de silanes CH_3 court, les molécules d'eau s'orientent comme à proximité de petits solutés hydrophobes [177] et non comme à l'interface avec une surface hydrophobe plane et étendue [173, 174, 175, 176]. Les molécules d'eau s'orientent à proximité d'un groupement méthyle indépendamment des autres molécules de silane, qui sont bien séparées sur la surface du fait de leurs courtes chaînes alkyles. Concernant la monocouche CH_3 long, on n'observe pas d'orientation globale des molécules d'eau à l'interface ($< \cos\theta > = 0$). Cela pourrait être dû à la rugosité de surface plus élevée avec les monocouches CH_3 long par rapport

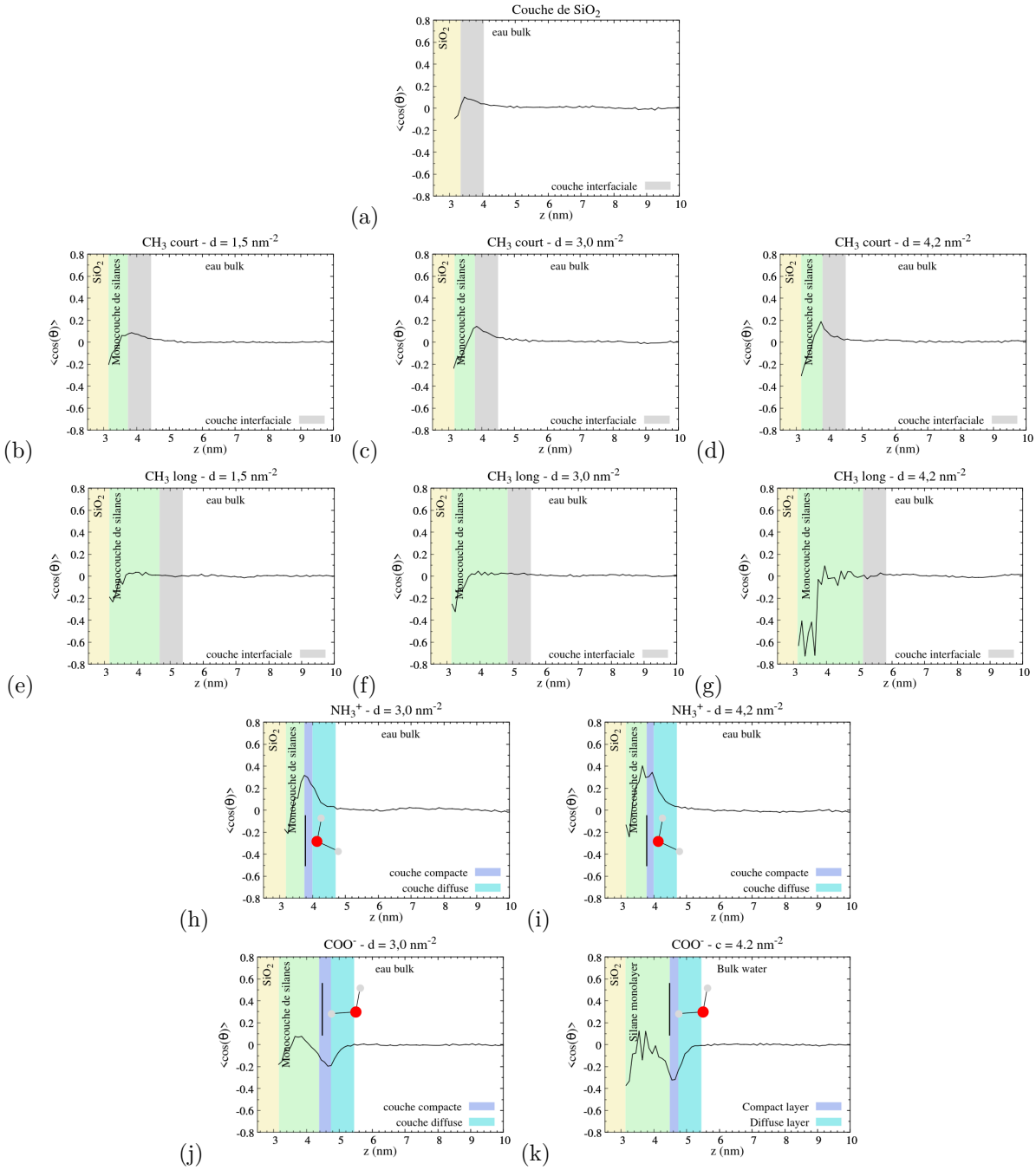


FIGURE 4.24 – *Effet des monocouches de silanes sur l'orientation des molécules d'eau : distribution de l'angle* $< \cos\theta >$ *le long de la normale à la surface de* SiO_2 *pour les systèmes (a) couche de* SiO_2 *non fonctionnalisée, (b)* CH_3 *court* $d = 1{,}5\ nm^{-2}$*, (c)* CH_3 *court* $d = 3{,}0\ nm^{-2}$*, (d)* CH_3 *court* $d = 4{,}2\ nm^{-2}$*, (e)* CH_3 *long* $d = 1{,}5\ nm^{-2}$*, (f)* CH_3 *long* $d = 3{,}0\ nm^{-2}$*, (g)* CH_3 *long* $d = 4{,}2\ nm^{-2}$*, (h)* NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$*, (i)* NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$*, (j)* COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ *et (k)* COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$*. Une molécule d'eau est représentée au niveau de la couche compacte pour les systèmes* NH_3^+ *et* COO^-*. Les couches compactes et diffuses sont représentées pour les systèmes* NH_3^+ *et* COO^- *et la couche interfaciale de 0,7 nm d'épaisseur est indiquée pour les systèmes* CH_3 *long,* CH_3 *court et* SiO_2*.*

aux monocouches CH_3 court (tableau 4.1, page 93), qui empêcherait la formation d'un moment dipolaire global [176]. Notons que les oscillations observées à l'intérieur de la monocouche de silanes CH_3 long $d = 4,2$ nm^{-2} sont dues à la faible densité des molécules d'eau (inférieure à 100 kg·m^{-3}) dans cette monocouche de silanes hydrophobe et dense.

De plus, lorsque la couche de SiO_2 amorphe est fonctionnalisée avec une monocouche de silanes, on observe systématiquement une valeur négative de $< \cos\theta >$ à proximité de la couche de SiO_2, qui persiste le long de la chaîne alkyle, à l'intérieur de la monocouche de silanes. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Nakamura et Ohno, caractérisant l'orientation possible de molécules d'eau à l'intérieur de nanotubes de carbone [178]. Cependant, cette étude a montré que la direction du moment dipolaire global des molécules d'eau confinées dépend du diamètre des nanotubes de carbone [178]. Ainsi, la direction du moment dipolaire global dans les monocouches de silanes pourrait dépendre du type de monocouche de silanes, mais aussi de la densité (c'est-à-dire de la distance entre les molécules de silane). Néanmoins, on observe la même tendance (valeur de $< \cos\theta >$ négative), quelle que soit la densité. Nos résultats suggèrent donc que l'orientation globale du moment dipolaire des molécules d'eau est plus déterminée par la surface de SiO_2, qui induit une orientation négative, que par la distance entre les molécules de silane.

4.4.2.b Organisation des molécules d'eau

En l'absence de champ électrostatique et si la distance intermoléculaire est inférieure à 5 Å, les molécules d'eau peuvent s'organiser en un réseau tétraédrique grâce à l'établissement de liaisons hydrogène [103]. Dans la glace cristalline, un réseau tétraédrique bien défini apparaît, tandis que dans l'eau *bulk*, seul un ordre à courte distance est observé [104]. De plus, dans une précédente étude, l'analyse de la distribution de l'angle entre molécules d'eau a montré que celles-ci présentent une organisation plus prononcée à proximité de surfaces hydrophobes que dans l'eau *bulk* [104].

Le réseau de liaisons hydrogène peut être caractérisé par la mesure de l'équilibre entre les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogène. En effet, alors qu'un équilibre entre donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène est attendu dans l'eau *bulk* liquide, celui-ci peut-être rompu à proximité d'une interface [97]. La structure à courte distance des molécules d'eau peut être évaluée grâce à la fonction de distribution radiale $g_{O-O}(r)$, qui présente un premier pic localisé à 2,8 Å, et grâce au nombre de coordination correspondant n_{O-O}. De plus, des informations complémentaires concernant le réseau de liaisons hydrogène sont données par $g_{O-H}(r)$ et $g_{H-O}(r)$. En effet, leur premier pic est localisé à 1,0 Å et correspond à la liaison covalente intramoléculaire O-H, tandis que le second pic, qui apparaît à 1,7 - 1,8 Å, est relié aux liaisons hydrogène [106]. Plus précisément, le second pic de $g_{O-H}(r)$ est relié aux donneurs de liaisons hydrogène, tandis que le second pic de $g_{H-O}(r)$ décrit les accepteurs de liaison hydrogène. Ainsi, la mesure de l'équilibre entre les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogène est donnée par :

$$nb_{Accepteurs} - nb_{Donneurs} = 2\ n_{H-O}(r_{min}^{2e\ pic}) - n_{O-H}(r_{min}^{2e\ pic}) \tag{4.3}$$

avec $n_{A-B}(r_{min}^{2e\ pic})$ le nombre de coordination obtenu au deuxième minimum de la fonction de distribution radiale $g_{A-B}(r)$. Des fonctions de distributions radiales $g_{O-O}(r)$, $g_{O-H}(r)$ et $g_{H-O}(r)$ représentatives de l'eau *bulk* et les nombres de coordination correspondants sont présentés sur la figure 4.25. L'évolution de n_{O-O} et $nb_{Accepteurs} - nb_{Donneurs}$ le long de la normale à la surface pour les différents systèmes étudiés est présentée sur la figure 4.26.

Nos résultats montrent que dans l'eau *bulk*, pour tous les systèmes de simulation, le nombre de coordination n_{O-O} vaut environ 4,3, conformément à l'organisation des molécules d'eau en un réseau tétraédrique. De plus, les nombres de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène sont

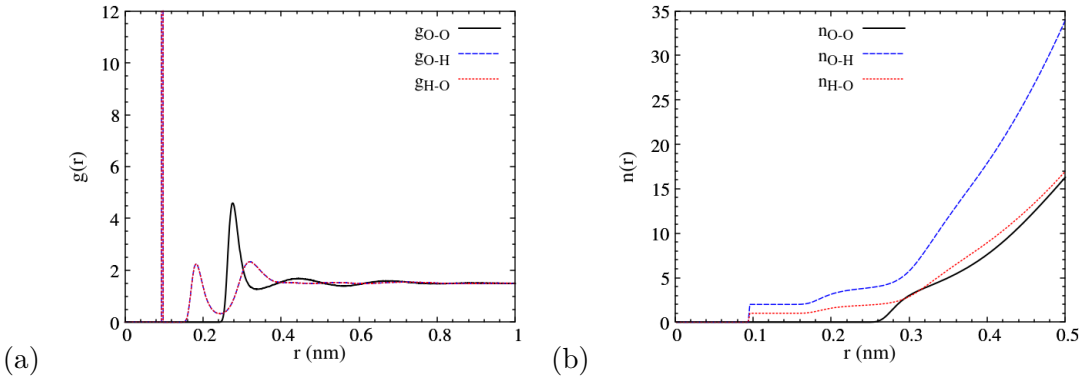


FIGURE 4.25 – *Organisation des molécules d'eau dans le bulk : (a) fonctions de distribution radiale $O-O$, $O-H$ et $H-O$ typiques et (b) nombres de coordination correspondants. Les valeurs sont données pour le système NH_3^+ $d = 4{,}2$ nm^{-2}.*

égaux, ce qui montre que les molécules d'eau sont orientées de façon aléatoire, et qu'il n'y a pas de rupture du réseau de liaisons hydrogène. En accord avec ces résultats, la figure 4.27 montre que la diffusion des molécules d'eau dans la région *bulk* est la même pour tous les systèmes de simulation. Le coefficient de diffusion vaut entre 3,3 et 3,4 $\times 10^{-5}$ $cm^2 \cdot s^{-1}$, ce qui est proche de la valeur de 3,55 $\times 10^{-5}$ $cm^2 \cdot s^{-1}$ déterminée par Yang *et al.* [110].

Cependant, le nombre de coordination n_{O-O} décroît à proximité des monocouches de silanes, toujours en accord avec les travaux de Yang *et al.* [110], ce qui montre que la première couche de solvatation des molécules d'eau est perturbée par les molécules de silane et que le réseau tétraédrique est également perturbé. Dans le cas des monocouches de silanes NH_3^+ et COO^-, n_{O-O} vaut environ 2,5 dans la couche compacte et croît dans la couche diffuse pour atteindre une valeur de 4,3 dans le bulk. Ces résultats sont expliqués par la forte orientation des molécules d'eau dans les couches compactes et diffuses et sont en accord avec le déséquilibre observé entre le nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène à l'interface. Dans le cas des monocouches de silane CH_3 court et CH_3 long, la première couche de solvatation est seulement légèrement perturbée, puisque n_{O-O} vaut environ 3,5 dans la couche interfaciale. Ce résultat peut être expliqué par la faible orientation globale des molécules d'eau et par l'équilibre obtenu entre le nombre de donneurs et le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène.

Ces résultats sont en accord avec les coefficients de diffusion des molécules d'eau qui sont, comme attendu [107, 112], plus élevés dans les couches interfaciales au-dessus des monocouches de silanes CH_3 court et CH_3 long qu'à l'interface avec les monocouches de silanes chargées NH_3^+ et COO^- (figure 4.28). De plus, pour les monocouches CH_3 court et CH_3 long, la diffusion des molécules d'eau augmente avec la densité (figure 4.29), car l'hydrophobicité augmente également.

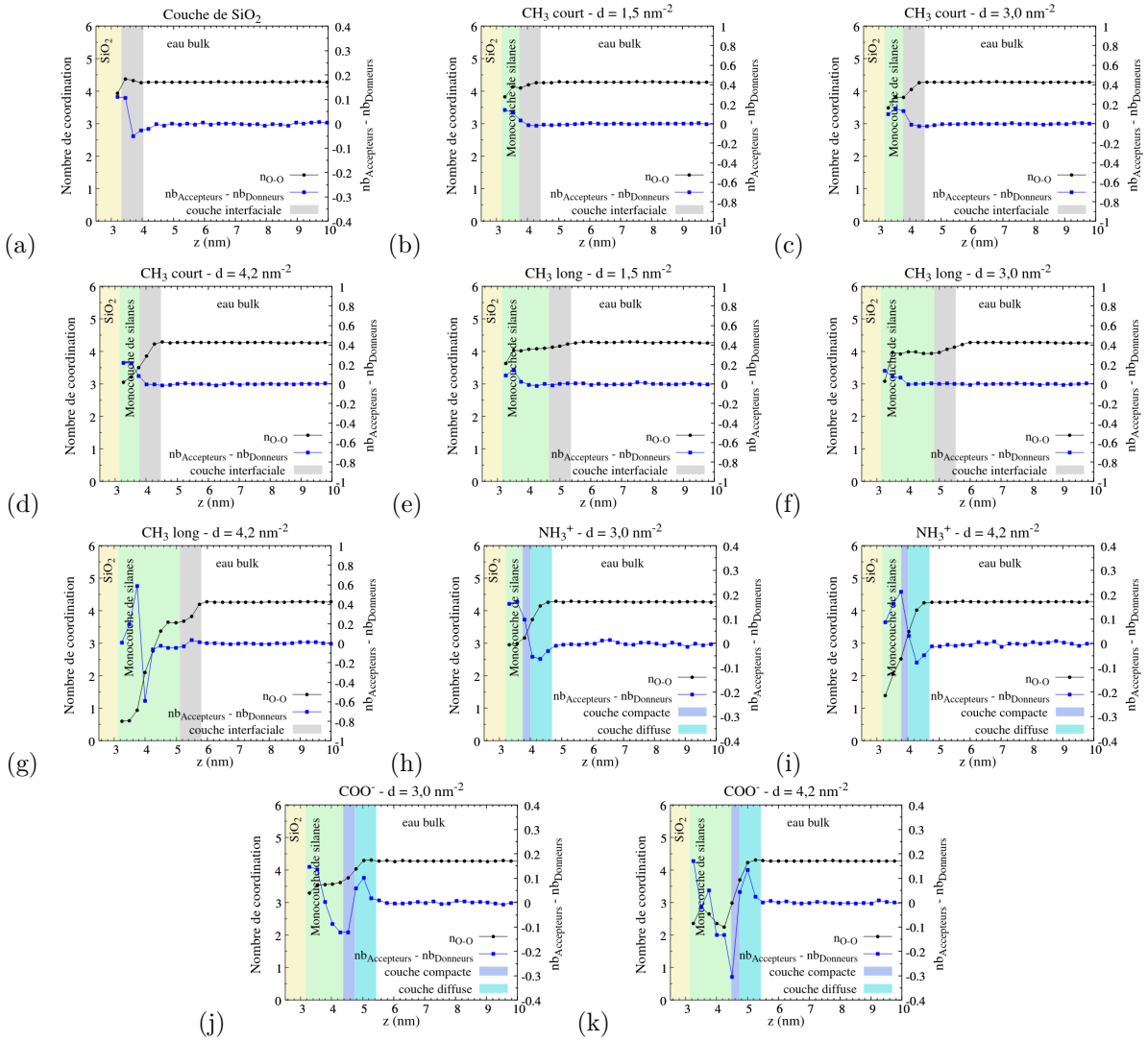


FIGURE 4.26 – *Évolution du nombre de coordination des molécules d'eau et balance entre les accepteurs et les donneurs de liaison hydrogène le long de la normale à la surface pour les systèmes : (a) couche de SiO_2 non fonctionnalisée, (b) CH_3 court $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (c) CH_3 court $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (d) CH_3 court $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (e) CH_3 long $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (f) CH_3 long $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (g) CH_3 long $d = 4{,}2\ nm^{-2}$, (h) NH_3^+ $d = 3{,}0\ nm^{-2}$, (i) NH_3^+ $d = 4{,}2\ nm^{-2}$ (j) COO^- $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et (k) COO^- $d = 4{,}2\ nm^{-2}$. Les couches compactes et diffuses sont représentées pour les systèmes NH_3^+ et COO^- et la couche interfaciale de 0,7 nm d'épaisseur est indiquée pour les systèmes CH_3 long, CH_3 court et SiO_2. La distance de cut-off vaut 3,3 Å pour le calcul du nombre de coordination $O-O$ [106], 2,5 Å pour les nombres de coordination $O-H$ et $H-O$.*

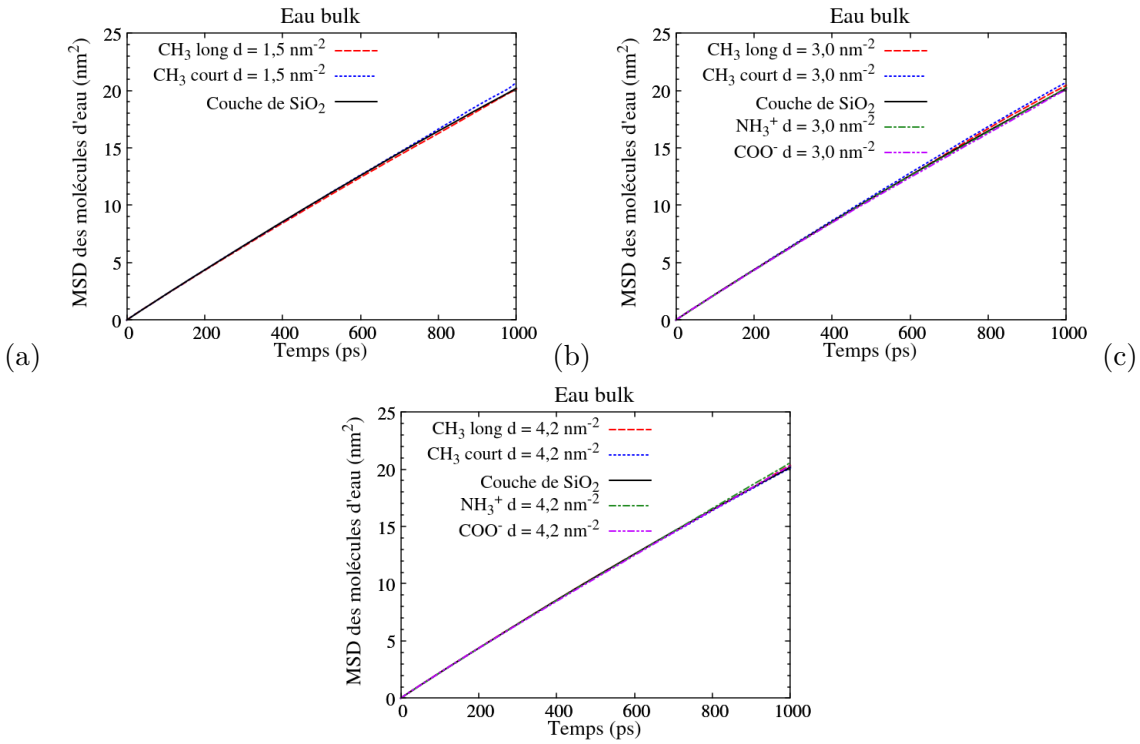


FIGURE 4.27 – *MSD des molécules d'eau du bulk au dessus de la couche de SiO_2 et des monocouches de silanes avec les densités (a) $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (b) $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et (c) $d = 4{,}2\ nm^{-2}$.*

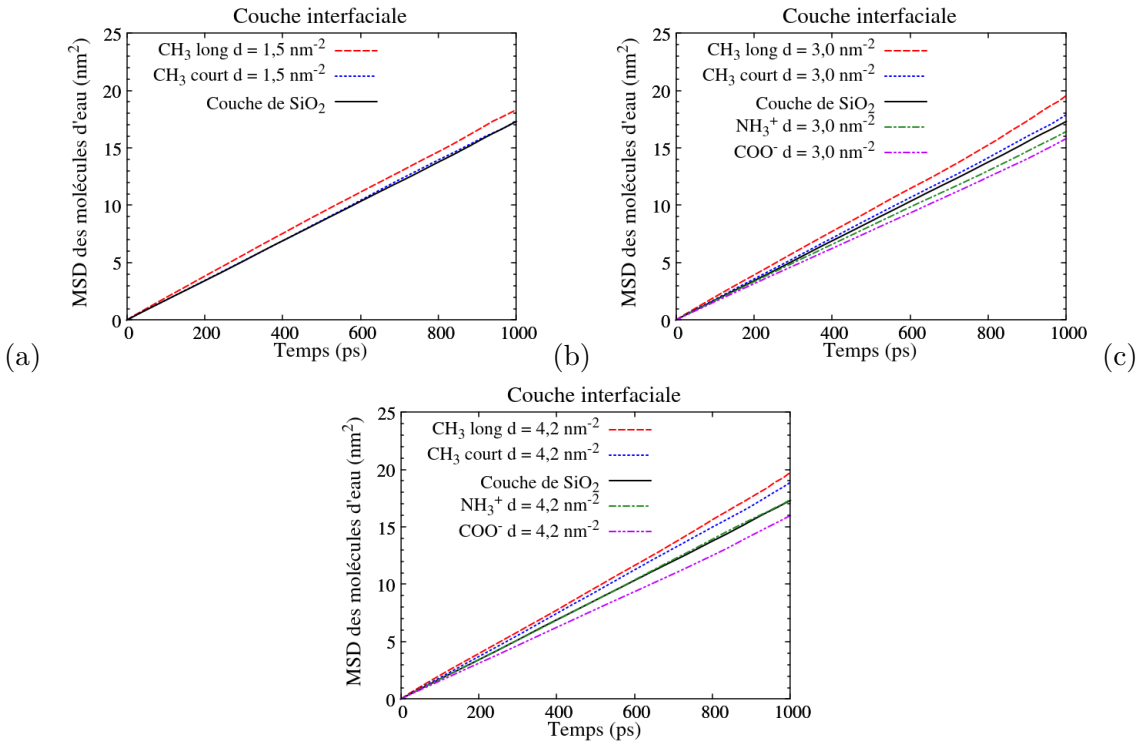


FIGURE 4.28 – *MSD des molécules d'eau de la couche interfaciale au dessus de la couche de SiO_2 et des monocouches de silanes avec les densités (a) $d = 1{,}5\ nm^{-2}$, (b) $d = 3{,}0\ nm^{-2}$ et (c) $d = 4{,}2\ nm^{-2}$.*

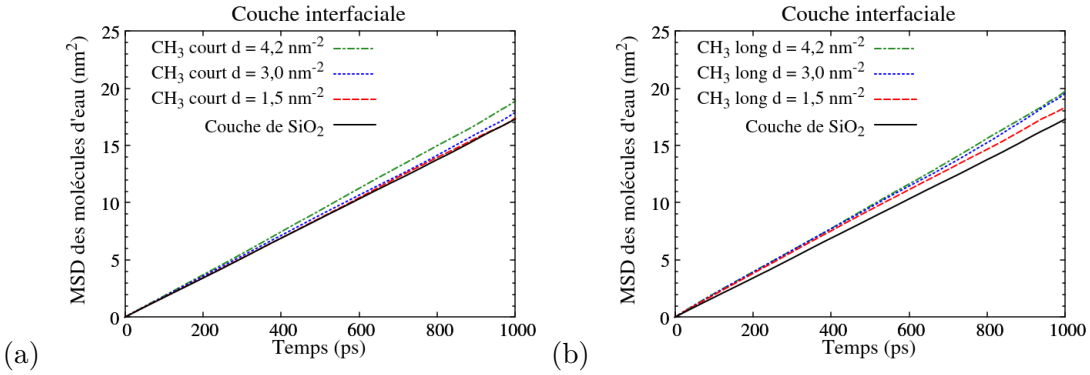


FIGURE 4.29 – *MSD des molécules d'eau de la couche interfaciale au dessus de la couche de SiO_2 et des monocouches de silanes (a) CH_3 court et (b) CH_3 long à différents taux de couverture.*

4.4.3 Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que l'organisation et les propriétés dynamiques des ions Na^+ et Cl^- et des molécules d'eau à l'interface dépendent de la structure de la monocouche et de la charge du groupement terminal des molécules de silane.

En effet, nos résultats suggèrent que la distribution des ions à l'interface avec les monocouches de silanes est influencée par la distribution spatiale des groupements terminaux chargés. La monocouche de silanes NH_3^+, pour laquelle les groupements terminaux chargés des molécules de silane sont répartis de façon plus uniforme, conduit à une distribution des ions Cl^- qui suit le modèle GCS, tandis que dans le cas des monocouches avec un degré d'agrégation plus élevé (molécules de silane COO^-), on observe deux couches spécifiques d'ions à l'interface (Na^+ puis Cl^-). Par ailleurs, on observe une forte orientation globale des molécules d'eau à l'interface avec les monocouches de silanes chargées, ce qui conduit à une perturbation de la première couche de solvatation des ions, à une perturbation de l'organisation tétraédrique des molécules d'eau et à une rupture de l'équilibre entre accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène. En accord avec ces résultats, la diffusion des ions et des molécules d'eau est réduite à proximité des monocouches de silane chargées, par rapport à une couche de SiO_2 non fonctionnalisée.

Concernant les monocouches de silanes non chargées CH_3 long et CH_3 court, nos résultats suggèrent que l'organisation des molécules d'eau interfaciales est liée à la rugosité des surfaces. En effet, on n'observe pas d'orientation globale des molécules d'eau à l'interface avec la monocouche de silanes CH_3 long, tandis qu'une légère orientation globale est obtenue avec les monocouches CH_3 court. Ces résultats pourraient être expliqués par la rugosité plus importante des monocouches CH_3 long, et par la dispersion dans le plan des groupements méthyles des molécules de silane CH_3 court du fait de leurs courtes chaînes alkyles. À proximité des groupements méthyles des monocouches CH_3 court, les molécules d'eau s'orientent avec les atomes d'hydrogène pointant à l'extérieur de la surface, conformément à de précédents travaux sur l'orientation des molécules d'eau autour de petits solutés hydrophobes. En accord avec ces résultats, l'organisation tétraédrique des molécules d'eau et l'équilibre entre les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogène sont plus importants à l'interface avec les monocouches CH_3 long et CH_3 court qu'à l'interface avec les monocouches chargées. De plus, la diffusion des ions et des molécules d'eau est plus importante à l'interface avec la monocouche CH_3 long qu'à l'interface avec la monocouche CH_3 court, celle-ci étant plus importante que la diffusion à l'interface avec les monocouches chargées. Enfin, quel que soit le système étudié, les propriétés du *bulk* sont recouvrées environ 0,7 nm au-dessus de la monocouche de silanes.

Au-delà des interactions électrostatiques et de Van der Waals, l'adsorption des protéines est impactée par la structure de la couche d'hydratation à l'interface [179]. En effet, l'adsorption de protéines est favorisée par une faible diffusion des molécules d'eau et la déshydration de la surface. De plus, l'organisation des molécules d'eau doit favoriser l'adsorption de protéine guidée par l'entropie, du fait de la perturbation de la couche d'eau bien organisée. Nos résultats suggèrent que les monocouches de silanes étudiées modifient les nombres de coordination, les coefficients de diffusion et l'orientation des molécules d'eau à l'interface, ce qui favorise l'adsorption de protéines, de façon plus prononcée avec les monocouches de silanes chargées qu'avec les monocouches comportant des molécules de silane sans groupement terminal chargé, et plus avec les monocouches CH_3 court qu'avec les monocouches CH_3 long. Ces résultats pourraient aider à optimiser les couches de fonctionnalisation de surface pour capturer des analytes [180] ou pour éviter l'adhésion non spécique.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé la structure des monocouches de silanes CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+ et COO^- obtenues en simulations de dynamique moléculaire avec la méthode décrite au chapitre 3, page 69. Nous avons également analysé l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface avec les différentes monocouches de silanes, et avec une couche de SiO_2 non fonctionnalisée. Nous avons ainsi pu vérifier que les monocouches de silanes sont modélisées de façon réaliste, en comparant les résultats obtenus à des données expérimentales et à de précédents travaux de dynamique moléculaire. Nous avons également pu observer les effets de la longueur de la chaîne alkyle, de la charge du groupement terminal et de la densité de la monocouche de silanes sur sa structure et celle de sa couche d'hydratation.

Dans la première partie, nous avons caractérisé la structure des monocouches de silanes à l'aide de différents paramètres tels que l'angle d'inclinaison des chaînes alkyles, le paramètre d'ordre nématique, le paramètre des défauts gauches ou la distribution spatiale des molécules dans le plan. Les résultats obtenus suggèrent, en accord avec de précédentes études [69, 72], que les monocouches de silanes avec de longues chaînes alkyles (CH_3 long) et une densité élevée sont bien organisées, avec une distribution de l'angle d'inclinaison étroite et centrée sur une valeur préférentielle et peu de défauts gauches. De plus, on observe des effets de la longueur de la chaîne alkyle et de la charge du groupement terminal sur l'organisation des monocouches de silanes. En effet, les monocouches avec de courtes chaînes alkyles (CH_3 court), contrairement aux longues chaînes alkyles, présentent un angle d'inclinaison indépendant de la densité. De plus, pour une longueur de chaîne alkyle et une densité données, la monocouche de silanes présente un état plus désordonné avec groupement terminal chargé. Ces différences d'angle d'inclinaison observées en simulations ont été validées qualitativement par des expériences de FTIR-ATR réalisées à l'INL. Par ailleurs, on observe que les molécules de silane s'organisent sur la surface un arrangement hexagonal, qui est plus prononcé lorsque la densité augmente, pour tous les types de monocouches.

Dans la seconde partie, nous avons étudié l'organisation et les propriétés dynamiques des molécules d'eau et des ions Na^+ et Cl^- dans la couche d'hydratation des différentes surfaces étudiées. Nous avons en particulier évalué la structure ionique d'hydratation et le coefficient de diffusion des ions Na^+ et Cl^- à l'interface, ainsi que l'orientation des molécules d'eau, leur organisation tétraédrique et la rupture du réseau de liaisons hydrogène qui s'établit entre les différentes molécules d'eau, au niveau de l'interface avec les monocouches de silanes.

Concernant l'organisation des molécules d'eau, les monocouches de silanes présentant un

groupement terminal chargé NH_3^+ et COO^- induisent une forte orientation des molécules d'eau à l'interface, conduisant à une rupture du réseau de liaisons hydrogène et à une perturbation de leur organisation tétraédrique. En revanche, pour les monocouches de silanes non chargées, l'organisation des molécules d'eau à l'interface semble influencée par la rugosité de la surface et par la longueur des chaînes alkyles. De plus, on observe que la diffusion des ions et des molécules d'eau est plus importante à l'interface avec la monocouche CH_3 long qu'à proximité de la monocouche CH_3 court et qu'à l'interface avec les monocouches chargées NH_3^+ et COO^-.

En ce qui concerne la distribution des ions à l'interface avec les monocouches de silanes chargées, on observe un comportement différent pour les monocouches NH_3^+ et COO^-, qui semble relié à la distribution des charges sur la surface. En effet, avec la monocouche de silanes NH_3^+, les groupements terminaux chargés sont répartis de façon plus uniforme sur la surface, et la distribution des ions Cl^- suit le modèle de Gouy-Chapman-Stern. A l'inverse, pour la monocouche COO^-, on observe un degré d'agrégation des groupements terminaux plus élevé, et on obtient deux couches spécifiques d'ions à l'interface (Na^+ puis Cl^-).

Enfin, on remarque que, quelle que soit la monocouche de silanes étudiée, les propriétés de l'eau *bulk* sont recouvrées environ 0,7 nm au-dessus de l'interface.

Cette étude nous a non seulement permis de valider la structure des monocouches de silanes modélisées mais aussi de mettre en évidence les effets de la charge du groupement terminal, de la longueur de la chaîne alkyle et de la densité sur la structure des monocouches de silanes et sur l'organisation de la couche d'eau interfaciale. Cette étape était cruciale pour modéliser en simulations de dynamique moléculaire les changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine sur ces monocouches de silanes et déterminer leur éventuel impact sur les interactions protéine – ligand.

CHAPITRE 5

Adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes et impact sur ses interactions avec la biotine

5.1 Introduction

Comme expliqué précédemment, les simulations de dynamique moléculaire permettent de modéliser les changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine sur une monocouche de silanes et leur impact sur les interactions protéine – ligand. Nous nous intéressons au complexe streptavidine – biotine, qui constitue pour nous un système modèle, puisque de nombreuses données expérimentales et de simulations sont accessibles concernant les interactions entre la streptavidine et la biotine, notamment en solution (voir paragraphe 2.5, page 47). Notre objectif est d'observer les effets sur les interactions streptavidine – biotine de l'adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes, tout en vérifiant leur cohérence avec des résultats déjà connus, et ainsi valider la méthodologie présentée au paragraphe 3.3, page 74.

Nous commençons par nous intéresser à l'adsorption de la streptavidine dimérique sur différentes monocouches de silanes, c'est-à-dire que ne considérons que deux des quatre chaînes de la protéine (chaînes A et B), l'intérêt étant un gain en temps de calcul. Nous modélisons l'adsorption de la streptavidine sur les cinq monocouches NH_3^+, CH_3 court, CH_3 long, mix court et mix long. Nous modélisons également un système avec le complexe streptavidine – biotine en solution, qui représente notre référence et nous permet de valider que les effets observés dans les autres systèmes sont bien expliqués par l'adsorption sur les différentes monocouches de silanes.

Nous caractérisons la façon dont la streptavidine s'adsorbe sur les différentes monocouches de silanes en déterminant la somme des deux contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction entre la streptavidine et la surface (que nous désignons dans la suite par le terme « énergie d'interaction »). Celle-ci permet d'obtenir des informations sur l'intensité des interactions qui s'établissent entre la protéine et les différentes molécules de silane. Nous caractérisons également la surface de contact, c'est-à-dire le nombre d'atomes et la nature des résidus de la streptavidine en contact avec les molécules de silane.

Nous nous intéressons ensuite aux changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine de façon globale, à l'aide du RMSD (*root-mean-square deviation*). Cependant, cette seule analyse est insuffisante pour caractériser complètement l'impact des changements de conformation induits par l'adsorption sur les interactions streptavidine – biotine, puisqu'elle n'apporte pas d'information sur la localisation précise des changements de conformation. Dans

notre cas, nous supposons que des changements de conformation situés au niveau de la poche de liaison à la biotine perturberaient plus fortement les interactions streptavidine – biotine que des changements de conformation situés au niveau des résidus en contact avec la surface, et éloignés de la poche de liaison à la biotine. Nous déterminons la localisation des résidus présentant la plus grande mobilité avec le RMSF (*root-mean-square fluctuation*).

Nous réalisons ensuite des simulations SMD, permettant de modéliser une expérience d'AFM en mode SMFS où la biotine serait immobilisée sur la pointe de l'AFM, afin d'évaluer les effets des changements de conformation identifiés sur les interactions streptavidine – biotine. Les simulations sont réalisées avec une vitesse de tirage de 2×10^6 μm·s^{-1}. Nous déterminons la force de rupture et le temps de détachement de la biotine pour les différents systèmes. Les valeurs des forces de rupture sont comparées à celles obtenues expérimentalement et en simulations de dynamique moléculaire par Rico *et al.* [40] et Sedlak *et al.* [130], afin d'identifier l'impact des changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur la force de rupture de la biotine.

Les simulations ont été réalisées sur le calculateur Newton de l'Ecole Centrale de Lyon, et les résultats obtenus ont été publiés dans l'article suivant : S. Lecot, Y. Chevolot, M. Phaner-Goutorbe, C. Yeromonahos. Impact of Silane Monolayers on the Adsorption of Streptavidin on Silica and Its Subsequent Interactions with Biotin : Molecular Dynamics and Steered Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* 2020, 124, 6786-6796. Une traduction de l'article est présentée dans la première partie de ce chapitre, avec quelques compléments et corrections. En effet, pour les simulations SMD présentées dans l'article, les forces de rupture de la biotine pour le complexe en solution ont été déterminées en appliquant une restriction de position à tous les atomes de la streptavidine, hors atomes d'hydrogène, pour empêcher son mouvement sous l'effet de la force appliquée à la biotine. Cependant, cela induit une augmentation de la rigidité de la protéine et conduit à une surévaluation de la force de rupture, par rapport aux systèmes où la streptavidine est immobilisée sur les monocouches de silanes, et où aucune restriction de position supplémentaire n'est appliquée. Les simulations ont donc été à nouveau réalisées pour le complexe en solution, en appliquant cette fois-ci une restriction de position sur l'atome le plus proche du centre de masse (hors atomes d'hydrogène) uniquement. Les résultats corrigés sont présentés dans ce chapitre.

Suite à ces premiers résultats, nous avons effectué une demande d'allocation d'heures de calcul sur le supercalculateur Occigen du CINES. Grâce aux 5 500 000 heures accordées, nous poursuivons notre étude en modélisant l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur deux monocouches de silanes (NH_3^+ et CH_3 court) et son impact sur les interactions avec la biotine. Le fait de considérer la streptavidine tétramérique présente deux intérêts. Le premier intérêt est que le complexe modélisé est plus réaliste, puisqu'il permet de prendre en compte le rôle des autres chaînes dans la stabilisation de la structure de la streptavidine et dans les interactions avec la biotine. Le second intérêt est que le système modélisé est plus proche de la majeure partie des données expérimentales ou de simulations disponibles.

Nous caractérisons à nouveau l'adsorption de la streptavidine en déterminant l'énergie d'interaction et la surface de contact entre la streptavidine et les molécules de silane. Nous étudions les changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine à l'aide du RMSD et de la structure secondaire de la protéine (changements de conformation globaux) et de son RMSF (localisation des changements de conformation).

De plus, grâce à nos moyens de calcul importants, nous réalisons des simulations SMD pour modéliser le détachement de la biotine sur une large gamme de vitesses de tirage (20×10^6 –

$0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1}), et notamment à des vitesses suffisamment basses pour s'approcher des vitesses de tirage pouvant être atteintes expérimentalement. En effet, pour les expériences de spectroscopie de force à molécule unique avec un AFM conventionnel, les vitesses de tirage sont généralement comprises entre quelques nm·s^{-1} et quelques μm·s^{-1}. Notons qu'avec un AFM en mode *High Speed Force Spectroscopy* (HSFS), il est possible d'atteindre des vitesses de tirage de l'ordre de 10^4 μm·s^{-1}.

Nous caractérisons les effets des changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur ses interactions avec la biotine en déterminant la force de rupture et le chemin de détachement de la biotine pour les différentes vitesses de tirage. En raison du surcoût important en temps de calcul, nous ne modélisons pas le complexe streptavidine – biotine en solution. Cependant, nous validons nos résultats en comparant les forces de rupture obtenues lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes à celles présentées dans les travaux de Rico *et al.* [40], pour le complexe streptavidine tétramérique – biotine en solution (avec une gamme de vitesses de tirage proche de la nôtre). Le spectre de force dynamique obtenu pourrait également permettre d'accéder à des informations complémentaires concernant le *free-energy landscape* du complexe streptavidine – biotine [181].

Les simulations SMD nous permettent d'évaluer les effets des changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur la force des interactions streptavidine – biotine en déterminant la force de rupture de la biotine. Cependant, ces simulations sont dites hors-équilibre, puisque le processus de détachement n'est pas réalisé de façon quasi-statique. Nous cherchons donc également à caractériser le processus de détachement à l'équilibre en déterminant le PMF (*potential of mean forc*e, c'est-à-dire la variation d'énergie libre le long d'un chemin de détachement donné) par *umbrella sampling* (voir paragraphe 1.4.2.b, page 27). Les résultats de notre étude sur l'adsorption de la streptavidine tétramérique sont présentés dans la seconde partie de ce chapitre.

5.2 Étude de l'adsorption de la streptavidine dimérique sur cinq monocouches de silanes

Cette partie s'intéresse à l'étude, par simulations de dynamique moléculaire, de l'adsorption de la streptavidine dimérique sur cinq monocouches de silanes présentant des propriétés physico-chimiques différentes (variations de la charge du groupement terminal et de la longueur de la chaîne alkyle). Les changements de conformation associés à l'immobilisation de la streptavidine sur ces surfaces sont étudiés, ainsi que leur impact les interactions qui s'établissent entre la streptavidine et la biotine. Les simulations réalisées se divisent en deux étapes, comme expliqué au paragraphe 3.3, page 74. Dans un premier temps, les processus de formation de la monocouche de silanes et d'adsorption de la streptavidine sont modélisés par des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles de 100 ns. Ensuite, des simulations SMD sont réalisées à partir de l'état final des premières simulations, pour étudier le détachement entre la streptavidine et la biotine.

5.2.1 Méthode

5.2.1.a Présentation du modèle

Nous étudions six systèmes différents. Le premier système modélise le complexe streptavidine - biotine en solution ; il reproduit les systèmes analysés dans de précédents travaux (paragraphe 2.5.2, page 48) et sert ici de référence. Les cinq autres systèmes comportent des surfaces de SiO_2 amorphe fonctionnalisées par différentes monocouches de silanes, toutes avec une densité de 3,0 nm^{-2} : NH_3^+, CH_3 court, CH_3 long, mix court et mix long. La structure de la couche de

SiO_2 amorphe est celle publiée par Roscioni *et al.* [69], redimensionnée à la taille de la boîte de simulation, avec une épaisseur 2,5 nm. Les molécules de silane sont initialement placées sur la surface en suivant la méthode présentée au paragraphe 3.2, page 70. Le complexe streptavidine - biotine est issu de la structure 3RY2 [117], publiée sur la Protein Data Bank [138]. Seules les chaînes A et B de la streptavidine sont considérées, et une seule biotine est conservée, située dans la poche de liaison de la chaîne A. Le complexe est initialement placé à environ 1,1 nm au-dessus des molécules de silane. De plus, des molécules d'eau sont ajoutées ainsi que ions Na^+ et Cl^-, pour compenser les charges, et avec une concentration de 0,150 mol·L^{-1} pour reproduire les conditions physiologiques. Enfin, un mur de Lennard-Jones est placé en haut de la boîte, pour bloquer les interactions entre l'eau et la face inférieure du SiO_2. Le système ne présente donc des conditions périodiques que selon les directions x et y. Les dimensions de la boîte de simulation, qui comprend environ 100 000 atomes, valent 7,8 nm × 7,8 nm × 15 nm (voir figure 5.1).

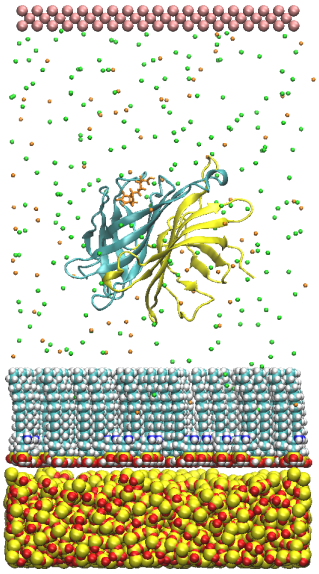


FIGURE 5.1 – *Image à l'état initial du système comportant la streptavidine dimérique, la biotine, la couche de SiO_2 amorphe, les molécules de silane formant la monocouche mix long, des molécules d'eau, des ions Na^+ et Cl^- et le mur de Lennard-Jones. La chaîne A de la streptavidine est représentée en cyan, la chaîne B en jaune et la biotine en orange. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote), et les ions par des points orange (Na^+) et verts (Cl^-). Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose tandis que les molécules d'eau ne sont pas représentées.*

Les paramètres du champ de force pour la surface de SiO_2 amorphe et les molécules de silane sont proches de ceux décrits au paragraphe 3.2, page 70 et en annexe A, page 221. Les interactions entre les atomes de la streptavidine sont décrites avec le champ de force OPLS tout-atome [31]. Le champ de force de la biotine est déterminé à partir de l'outil ATB *(Automated Topology Builder)* [182, 183]. Le modèle d'eau TIP4P [153] et les ions Na^+ [154] et Cl^- [155] sont décrits avec le champ de force OPLS tout-atome. Les paramètres utilisés pour le champ de force du mur de Lennard-Jones sont issus des travaux de Kitabata *et al.* [111].

5.2.1.b Protocole de simulation

Adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes Les simulations sont réalisées avec le logiciel Gromacs, version 5.1.3 [148] et la visualisation avec VMD, version 1.9 [149]. Tout d'abord, une étape de minimisation de l'énergie est effectuée, avec la méthode de la plus grande pente (*steepest descent method*). Les équilibres NVT et NPT sont ensuite réalisés, chacun avec une durée de 100 ps et une température de 300 K. Enfin, cinq productions indépendantes sont réalisées pour le système en solution et dix productions pour les autres systèmes, toutes avec une durée de 100 ns. Les équations du mouvement sont intégrées avec l'algorithme *leap-frog* et un pas de temps de 2 fs. L'algorithme LINCS est utilisé pour appliquer des contraintes aux paramètres de liaison. La température est conservée à 300 K avec un thermostat de Nosé-Hoover et une constante de temps de 0,4 ps. La pression est maintenue à 1 bar avec un barostat de Parrinello-Rahman utilisant une constante de temps de 12 ps. Les interactions électrostatiques à longue distance sont calculées avec la méthode *particle-mesh Ewald* [34] et un *cut-off* de 1 nm. Le même *cut-off* est utilisé pour les potentiels de Lennard-Jones.

Simulations SMD Les configurations initiales utilisées pour les simulations SMD sont sélectionnées parmi les états finaux des simulations de dynamique moléculaire présentées précédemment. Les simulations SMD sont des simulations hors-équilibre, où une force externe est appliquée à la biotine pour la détacher de la streptavidine. Pour le système en solution, une restriction de position est appliquée au centre de masse de la streptavidine pour empêcher son mouvement, et ainsi observer le détachement de la biotine. En pratique, la restriction de position est appliquée à l'atome de la streptavidine le plus proche du centre de masse, hors atomes d'hydrogène. En revanche, aucune restriction de position n'est appliquée à la streptavidine lorsque celle-ci est adsorbée sur une monocouche de silanes, et aucune liaison covalente n'est définie entre la streptavidine et la surface : les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques qui s'établissent entre la streptavidine et la surface sont suffisantes pour empêcher sa désorption pendant que la biotine est entraînée par la force appliquée. Cette force appliquée sur la biotine est un potentiel harmonique, avec une constante de force $k = 100\,\mathrm{pN{\cdot}nm^{-1}}$ [40] et une vitesse $v = 2 \times 10^6\ \mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. Pour reproduire les expériences d'AFM en mode SMFS, la force est appliquée sur la biotine dans la direction normale à la surface. Cependant, l'impact de la direction de tirage sur la force de rupture est étudié (voir paragraphe 5.2.2.d, page 144). En effet, les travaux de Ferreira *et al.* [91] ont montré que le choix de la direction de tirage du ligand peut affecter la valeur de la force de rupture et le processus de détachement déterminés par simulations SMD. Les boîtes de simulation sont agrandies à une hauteur de 25 nm, afin de satisfaire la convention de l'image minimale. Les équations du mouvement sont résolues avec un pas de temps de 1 fs. Les simulations SMD présentent une durée de 4 ns et 20 répliques sont réalisées pour chaque configuration initiale, soit environ 300 simulations au total.

5.2.1.c Analyse des résultats

Adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes Les paramètres étudiés, notamment le RMSD et le RMSF de la steptavidine et l'énergie d'interaction (somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie de liaison entre la streptavidine et les molécules de silane) sont présentés en détails au paragraphe 3.4, page 79. Les valeurs données correspondent aux valeurs moyennes calculées sur les dernières 10 ns des simulations, et les barres d'erreur à l'écart-type des valeurs obtenues pour les différentes répliques des simulations. La surface de contact est déterminée à l'état final. Les atomes de la streptavidine sont considérés comme en contact avec la monocouche de silanes (ou avec la couche de SiO_2 amorphe) s'ils sont situés à moins de 0,3 nm d'un atome d'une molécule de silane (ou d'un atome de la couche de SiO_2). De plus, les résidus de la streptavidine en contact avec la surface sont identifiés à l'état final. Les résidus de la streptavidine sont considérés comme en contact avec la surface s'ils sont

présents dans la moitié au moins des dix répliques de simulations.

Simulations SMD La force de rupture est déterminée grâce à la courbe présentant la force appliquée sur la biotine en fonction du temps, et définie comme la force la plus élevée appliquée sur la biotine avant son détachement. La force de rupture et la durée du détachement sont déterminées pour chaque réplique de simulation, et on en déduit les valeurs moyennes, les écarts-type et les histogrammes des forces de rupture.

5.2.2 Résultats et discussion

5.2.2.a Orientation initiale de la streptavidine

De précédents travaux ont montré que l'orientation initiale de la protéine peut affecter son adsorption sur la surface, et notamment l'énergie d'interaction et la nature des résidus interagissant avec la surface [78, 128, 184, 185]. Nous étudions dans un premier temps l'adsorption de la streptavidine sur une surface de SiO_2 fonctionnalisée avec des molécules de silane NH_3^+, avec trois orientations initiales différentes, comme illustré sur la figure 5.2. L'orientation 2 est définie par une rotation de 180 ° le long de l'axe x par rapport à l'orientation 1, et l'orientation 3 par une rotation de 270 ° le long de l'axe y. Trois simulations sont réalisées pour chaque orientation initiale, avec une durée de 100 ns pour permettre la stabilisation du système. L'énergie d'interaction entre la streptavidine et les molécules de silane NH_3^+ vaut, pour les orientations initiales 1, 2 et 3, respectivement -158 ± 16 kcal·mol^{-1}, -196 ± 65 kcal·mol^{-1} et -227 ± 83 kcal·mol^{-1}. Bien que l'effet de l'orientation initiale sur l'énergie d'interaction soit faible, l'orientation initiale 3 conduit à l'adsorption la plus stable de la streptavidine. Comme toutes les surfaces étudiées sont, dans une certaine mesure, hydrophobes (avec différents niveaux d'hydrophobicité), nous supposons que l'orientation 3 est favorable pour toutes les monocouches de silanes. L'orientation 3 est donc choisie pour toutes les simulations suivantes, quelle que soit la monocouche de silanes.

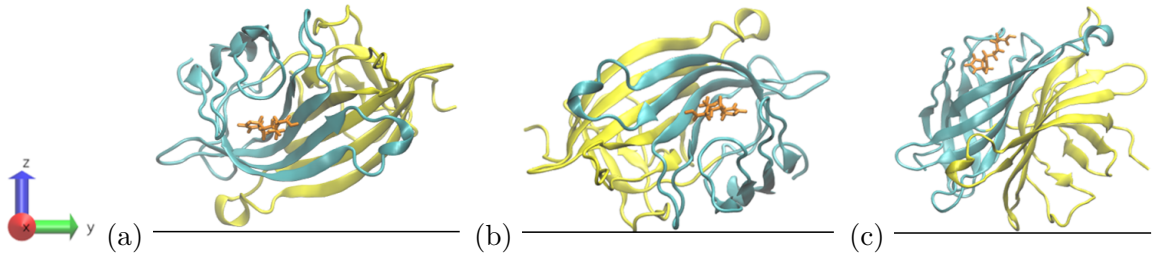


FIGURE 5.2 – *Les différentes orientations initiales de la streptavidine dimérique : (a) orientation 1 (référence), (b) orientation 2 (rotation de 180 ° le long de l'axe x) et (c) orientation 3 (rotation de -90 ° le long de l'axe y). La chaîne A de la streptavidine est représentée en cyan, la chaîne B en jaune et la biotine en orange.*

De plus, cette supposition est renforcée par la distribution de potentiel électrostatique sur la surface de la streptavidine, les calculs électrostatiques étant réalisés en utilisant la méthode de Poisson-Boltzmann [186, 187]. En effet, avec l'orientation initiale 3, des résidus avec différents potentiels électrostatiques (positif, négatif, proche de zéro) pointent vers la monocouche de silanes (figure 5.3). Après l'adsorption sur la surface, des changements de conformation et une légère réorientation de la streptavidine sont observés. Ainsi, la surface de contact de la streptavidine avec les molécules de silane NH_3^+ est essentiellement constituée de résidus avec un potentiel électrostatique négatif, tandis que la surface de contact avec les molécules de silane non chargées comporte majoritairement des résidus avec un potentiel électrostatique proche de zéro (figure 5.4). Dans le cas de l'orientation initiale 2, ce sont majoritairement des résidus avec

un potentiel électrostatique positif qui pointent vers la monocouche de silanes. Ces résultats suggèrent donc que l'orientation initiale 2 est moins favorable que l'orientation initiale 3. Cependant, la distribution de potentiel électrostatique ne nous permet pas de confirmer clairement notre supposition selon laquelle l'orientation 3 est plus favorable que l'orientation 1 pour tous les systèmes étudiés.

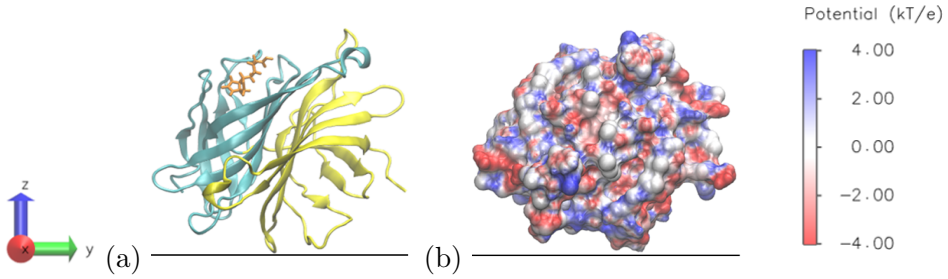


FIGURE 5.3 – *(a) Orientation initiale 3 de la streptavidine et (b) potentiel électrostatique correspondant à la surface de la protéine. Pour l'image (a), la chaîne A de la streptavidine est représentée en cyan, la chaîne B en jaune et la biotine en orange.*

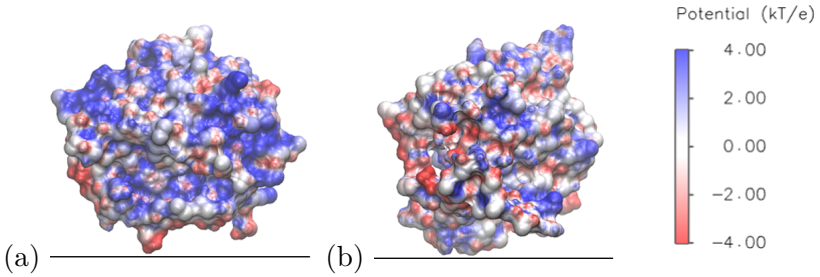


FIGURE 5.4 – *Potentiel électrostatique à la surface de la streptavidine à l'état final (simulations de 100 ns), c'est-à-dire après l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes (a) NH_3^+ et (b) CH_3 long (une image représentative pour chaque système).*

5.2.2.b Interactions entre la streptavidine et la surface

Adsorption de la streptavidine sur les différentes monocouches de silanes Les simulations de dynamique moléculaire modélisant l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes sont réalisées pour une durée de 100 ns. Des images représentatives des différents systèmes à l'état final sont présentés sur la figure 5.5.

Dans la plupart des cas, on observe que la streptavidine s'immobilise très rapidement sur la surface et que la biotine reste dans la poche de liaison de la protéine. Cependant, dans de rares cas, la streptavidine ne s'immobilise pas sur la surface (voir tableau 5.1). Ce phénomène peut être expliqué par la distance initiale entre la protéine et les molécules de silane, qui est quelque peu élevée : elle vaut en effet 1,1 nm, soit une distance plus grande que le *cut-off* et supérieure à celle employée dans d'autres études (par exemple, dans les travaux de Utesch *et al.*, la protéine étudiée est initialement placée à 0,5 nm au-dessus de la monocouche considérée [75]). Une autre explication pourrait être l'orientation initiale de la streptavidine, qui n'est peut-être pas la plus favorable pour l'ensemble des monocouches étudiées. Expérimentalement, cela correspondrait aux protéines qui ne s'adsorbent pas lorsque la solution les contenant est déposée sur la surface, et qui sont éliminées au rinçage. Ces productions ne sont pas prises en compte dans la suite

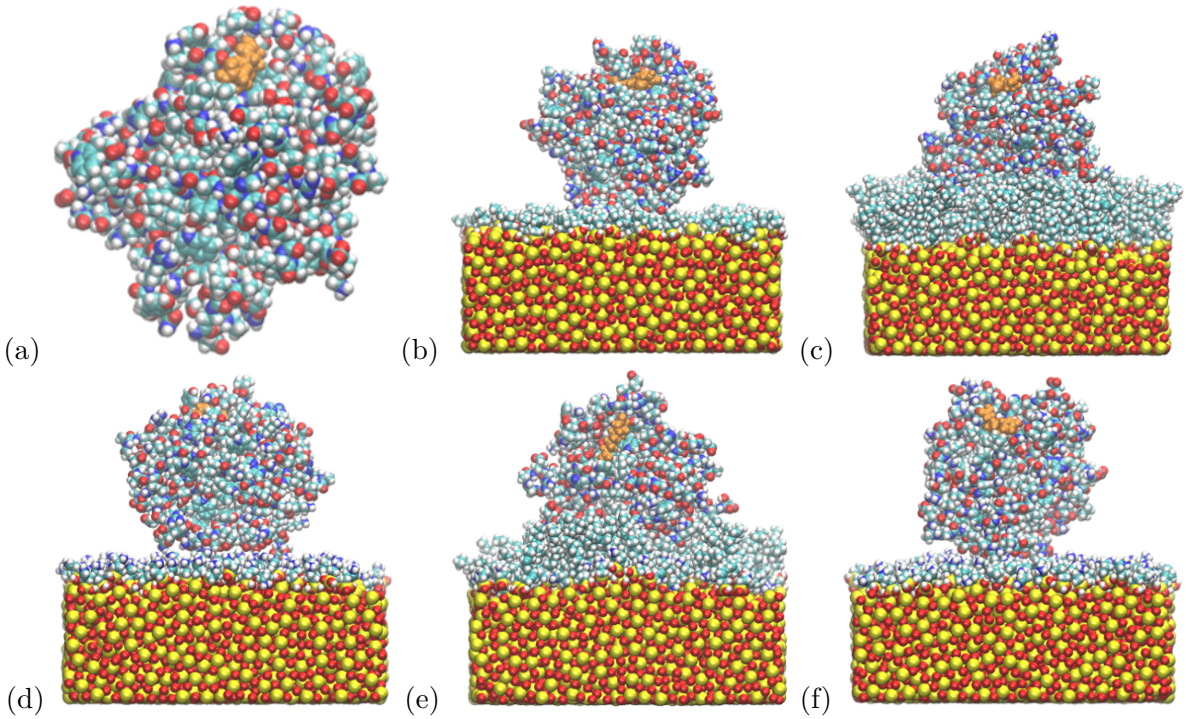


FIGURE 5.5 – *Images des six systèmes à l'état final (simulations de 100 ns) : complexe streptavidine - biotine (a) en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes (b) CH_3 court, (c) CH_3 long, (d) NH_3^+, (e) mix long et (f) mix court. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote), et la biotine en orange.*

des analyses. Notons que, dans les autres cas, l'énergie d'interaction entre la streptavidine et les monocouches de silanes est stabilisée en moins de 80 ns pour tous les systèmes (voir figure 5.6). La durée de 100 ns est donc appropriée pour étudier l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes.

Système	Nombre total de productions réalisées	Nombre de productions où la streptavidine n'est pas immobilisée	Nombre de productions où la streptavidine est immobilisée et la biotine se détache
En solution	5	0	0
CH_3 court	10	1	3
CH_3 long	10	0	5
NH_3^+	10	1	1
Mix court	10	0	2
Mix long	10	0	1

TABLE 5.1 – *Fréquence d'immobilisation de la streptavidine sur les monocouches de silanes et de détachement de la biotine.*

Un autre phénomène est également observé : principalement avec les monocouches non chargées CH_3 court et CH_3 long, pour certaines productions, la biotine sort de la poche de la streptavidine après l'adsorption de celle-ci sur les molécules de silane. On n'observe pas de variation exceptionnelle des différents paramètres étudiés (RMSF, RMSD, énergie d'interaction) associée à ces évènements. Ces productions sont donc prises en compte pour l'étude de l'adsorption de

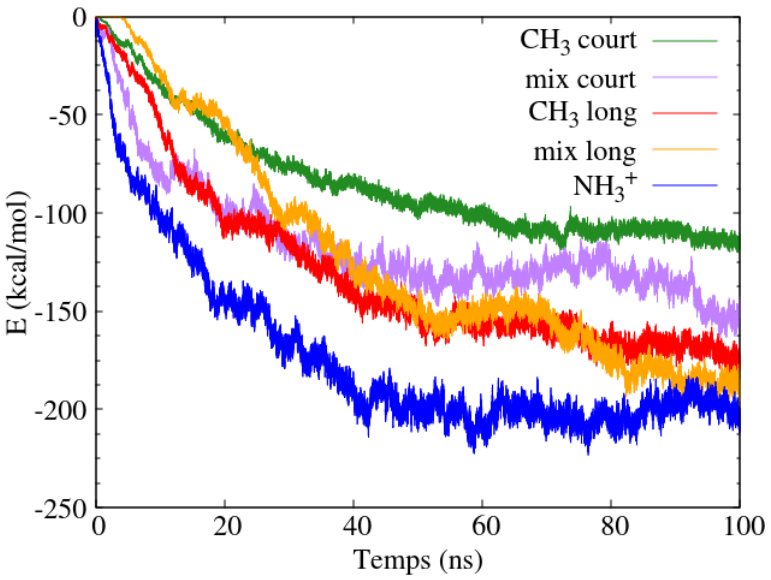


FIGURE 5.6 – *Évolution de l'énergie d'interaction entre la streptavidine et les différentes monocouches de silanes au cours de la simulation.*

la streptavidine sur les différentes monocouches de silanes et des changements de conformation associés, mais elles ne sont pas considérées pour les simulations SMD. Notons que ce phénomène n'est pas observé pour la streptavidine tétramérique (voir partie 5.3, page 152). Cela pourrait être expliqué par la stabilisation apportée par la présence des autres chaînes et notamment celle du résidu Trp120 de la chaîne D, qui interagit avec la biotine et n'est pas pris en compte ici.

Interactions entre la streptavidine et les molécules de silane Les interactions entre la streptavidine et les différentes monocouches de silanes sont caractérisées par l'énergie d'interaction et par la surface de contact entre la protéine et les molécules de silane (voir tableau 5.2). La surface de contact est caractérisée par le nombre d'atomes de la streptavidine en contact avec les molécules de silane et par la nature des résidus impliqués. Les cinq monocouches étudiées sont constituées de trois types de molécules de silane, qui présentent des longueurs de chaîne alkyle et des groupements terminaux différents. Les surfaces possèdent donc une charge et une hydrophobicité différentes, ce qui implique une disparité des interactions qui s'établissent avec la streptavidine.

Les interactions entre la streptavidine et la monocouche NH_3^+ sont celles qui impliquent le moins d'atomes de la protéine (24 ± 7 atomes), mais correspondent à l'énergie la plus basse (-197 ± 51 kcal·mol^{-1}). La contribution énergétique associée à chaque interaction est donc importante. Il s'établit en effet $6,7 \pm 2,7$ liaisons hydrogène ainsi que des interactions électrostatiques avec les résidus Asp67 et Glu51, qui sont tous les deux hydrophiles et chargés négativement.

Concernant les interactions entre la streptavidine et la monocouche CH_3 court, on constate que la surface de contact est plus grande qu'avec NH_3^+, mais que l'énergie d'interaction est plus faible en valeur absolue. L'énergie associée à chaque interaction est donc plus faible, conformément aux interactions de Van der Waals. Les résidus de la streptavidine qui interagissent avec les molécules de silane CH_3 court présentent une charge et une hydrophobicité variées. Par exemple, les résidus Glu51, chargé négativement, Arg84, chargé positivement, et Ala65, non polaire, sont tous impliqués dans les interactions avec la monocouche de silanes CH_3 court.

L'énergie d'interaction entre la streptavidine et la monocouche mix court est approximativement la moyenne des valeurs obtenues pour les monocouches uniformes NH_3^+ et CH_3 court. La surface de contact est plus faible que pour la monocouche CH_3 court, car les molécules de silane NH_3^+ induisent la répulsion de certains résidus de la streptavidine. Par exemple, le résidu chargé positivement Arg84 n'interagit pas avec la monocouche mix court (à cause de la répulsion induite par les groupements terminaux NH_3^+ des molécules de silane), alors qu'il est impliqué dans les interactions avec la monocouche CH_3 court, à travers des interactions entre ses ponts méthylènes et les chaînes alkyles des molécules de silane. Enfin, les résidus Asp67, Glu51 et Glu116, hydrophiles et chargés négativement, interagissent spécifiquement avec les molécules de silane NH_3^+ de la monocouche mix court.

Monocouche de silanes	Énergie d'interaction entre la streptavidine et les molécules de silane (kcal·mol^{-1}) [a]	Nombre d'atomes de la streptavidine en contact avec les molécules de silane	Résidus de la streptavidine liés à des molécules de silane
CH_3 court	-113 ± 22	64 ± 18	*A* : Ala65, Thr66, Asp67, Gly68 - *B* : Glu51, Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85, His87
CH_3 long	-170 ± 42	154 ± 37	*A* : Ala35, Asp36, Ser62, Ala63, Pro64, Ala65, Thr66, Asp67, Ser69, Gly99, Ala100 *B* : Gln24, Leu25, Val47, Asn49, Glu51, Arg53, Asn81, Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85, Ala86, His87, Ser112, Thr114, Thr115, Ala117, Asn118
NH_3^+	-197 ± 51	24 ± 7	*A* : Asp67 - *B* : Glu51
Mix court	-147 ± 38	30 ± 14	*A* : Asp67, Gly68 *B* : Glu51, Glu116
Mix long	-186 ± 61	128 ± 42	*B* : Tyr22, Gln24, Leu25, Gly26, Ser27, Ile30, Tyr43, Glu44, Ala46, Val47, Asn49, Glu51, Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85, Val133, Pro135

TABLE 5.2 – *Énergie d'interaction et surface de contact entre la streptavidine et les cinq monocouches de silanes.* [a] *Somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction.*

Dans le cas de la monocouche CH_3 long, la surface de contact est très grande car la streptavidine pénètre entre les molécules de silane (figure 5.5). Des interactions de Van der Waals s'établissent entre les molécules de silane CH_3 long et la streptavidine, sans sélection du type de résidu : les molécules de silane CH_3 long interagissent avec des résidus hydrophobes et apolaires (Ala, Val, Leu), mais également avec des résidus hydrophiles ou chargés (Arg, Asn, Asp, His).

Concernant la monocouche mix long, les molécules de silane CH_3 long créent une gêne stérique, qui réduit les contacts entre la streptavidine et les molécules de silane NH_3^+, sans les empêcher complètement. La surface de contact et l'énergie d'interaction sont proches de celles obtenues pour la couche uniforme CH_3 long. On observe également que la nature des résidus en contact avec la surface est moins reproductible avec la monocouche mix long qu'avec les autres

surfaces, particulièrement pour la chaîne A. En effet, aucun résidu n'est impliqué dans au moins la moitié des répliques de simulations.

En conclusion, ces résultats suggèrent que les longues chaînes alkyles conduisent à une plus grande surface de contact avec la streptavidine, tandis que les charges de surface tendent à réduire la surface de contact. De plus, l'énergie d'interaction est plus impactée par la présence de charges de surface que par la taille de la surface de contact.

Interactions entre la streptavidine et le SiO_2 Le tableau 5.3 montre qu'il existe très peu d'interactions entre la streptavidine et le SiO_2. Pour les monocouches CH_3 long et mix long, les molécules de silane qui possèdent de longues chaînes alkyles induisent une gêne stérique et empêchent les interactions entre la streptavidine et le SiO_2. Les molécules de silane constituant la monocouche NH_3^+ sont chargées positivement et seuls quelques résidus de la streptavidine, chargés négativement, interagissent avec elles, tandis que les autres résidus sont repoussés loin de la surface. La zone de contact entre la streptavidine et la surface est donc très petite et il y a peu d'interactions avec le SiO_2. Les interactions entre la streptavidine et le SiO_2 sont un peu plus importantes dans le cas des monocouches mix court et CH_3 court. En effet, la zone de contact entre les molécules de silane CH_3 court et la streptavidine est plus importante, pour maximiser les interactions de Van der Waals. Ces molécules ayant une chaîne alkyle courte, des interactions peuvent également s'établir entre la streptavidine et le SiO_2.

Monocouche de silanes	Énegie d'interaction entre la streptavidine et le SiO_2 (kcal·mol^{-1})	Nombre d'atomes de la streptavidine en contact avec le SiO_2
CH_3 court	-31 ± 21	0.6 ± 0.5
CH_3 long	-4.4 ± 12.4	0.1 ± 0.3
NH_3^+	-1.2 ± 1.2	0.0 ± 0.0
Mix court	-15 ± 21	0.2 ± 0.4
Mix long	-4 ± 12	0.0 ± 0.0

Table 5.3 – *Énergie d'interaction et surface de contact entre la streptavidine et le SiO_2 pour les différentes surfaces.* [a] *Somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction.*

5.2.2.c Changements de conformation de la streptavidine après son adsorption sur les monocouches de silanes

RMSD L'évolution du RMSD de la streptavidine pour les différents systèmes est présentée sur la figure 5.7. Comme prévu, la plus petite valeur de RMSD à l'état final est obtenue pour le système en solution, puisqu'il n'y a pas de changement de conformation induit par une surface. La valeur finale pour ce système vaut $4,1 \pm 0,3$ Å, en accord avec une précédente étude [128]. Lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes, les valeurs de RMSD varient entre $4,2 \pm 0,5$ Å pour CH_3 court et $5,0 \pm 0,9$ Å pour NH_3^+. De plus, on constate que plus l'énergie d'interaction entre la streptavidine et les molécules silanes est élevée, plus le RMSD, c'est-à-dire le changement global de conformation de la streptavidine, est élevé.

Une étude récente a montré que l'adsorption de la streptavidine sur des surfaces cristallines de graphite et de TiO_2 conduit à d'importants changements de conformation, avec des valeurs de RMSD sont comprises entre 15 et 40 Å, à cause de l'étalement de la streptavidine sur les surfaces. Nos résultats montrent que les monocouches de silanes conduisent à des valeurs de

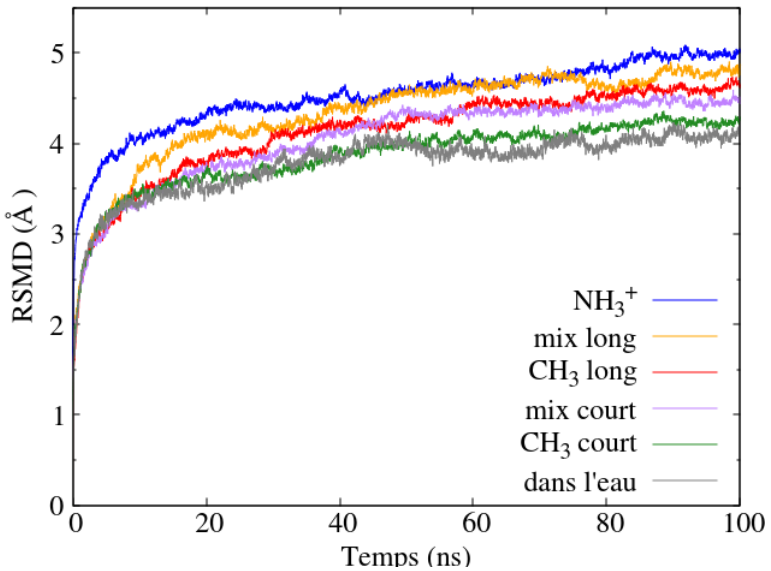


FIGURE 5.7 – *Évolution du RMSD de la streptavidine en solution et pendant son adsorption sur les différentes monocouches de silanes.*

RMSD plus proches de celles obtenues en solution que les surfaces de graphite et de TiO_2. Cela pourrait être expliqué par la plus petite surface de contact entre la streptavidine et les molécules de silane, qu'entre la streptavidine et les surfaces de graphite et de TiO_2.

L'adsorption de la streptavidine sur des monocouches de silanes conduit donc à des changements de conformation globaux, puisque le RMSD est plus élevé lorsque la streptavidine est adsorbée sur une surface qu'en solution. Les changements de conformation sont cependant plus faibles que ceux observés lors de l'adsorption de la streptavidine sur des surfaces cristallines non fonctionnalisées.

RMSF Les changements de conformation de la streptavidine dus à son adsorption sur les différentes monocouches de silanes sont à présent caractérisés grâce aux valeurs de RMSF, qui renseignent sur la mobilité de chaque résidu de la streptavidine individuellement. Une valeur de RMSF élevée indique une mobilité importante pour le résidu considéré [188, 189]. Les profils de RMSF moyens (sur 5 à 10 productions) de la streptavidine pour les différents systèmes sont présentés sur la figure 5.8. Quel que soit le système considéré, les valeurs de RMSF sont comprises entre $0,5$ et $4,5$ Å pour tous les résidus. On considère qu'un résidu présente une mobilité élevée si son RMSF est supérieur ou égal à 3 Å [190]. Les zones de la streptavidine présentant les variations de flexibilité les plus importantes après l'adsorption sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+, par rapport au cas en solution, sont présentées à la figure 5.9. La localisation des résidus présentant une mobilité élevée est présentée sur la figure 5.10.

Concernant le système où le complexe streptavidine - biotine est en solution, trois résidus seulement présentent un RMSF supérieur à 3 Å, dont deux résidus appartenant à la chaîne B (Asn49 et Ser136) et un résidu au niveau de l'extrémité N-terminale de la chaîne A (Glu14). Tous sont situés loin de la poche de liaison à la biotine.

Tous les systèmes avec une surface possèdent plus de trois résidus avec une mobilité élevée, ce qui est cohérent avec les valeurs de RMSD plus élevées que pour le système en solution. L'adsorption de la streptavidine sur la monocouche CH_3 court conduit à une forte mobilité de

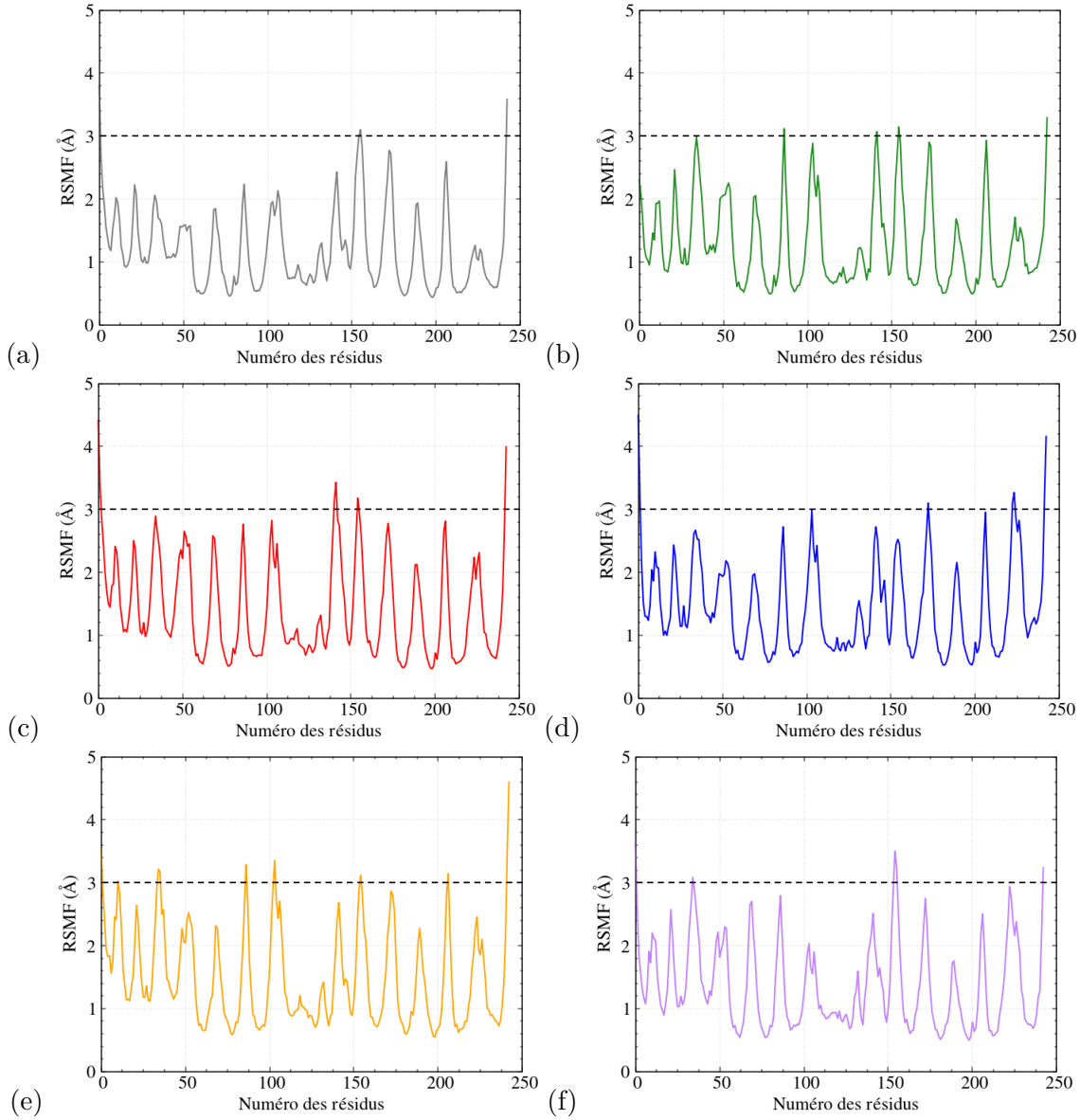


FIGURE 5.8 – *RMSF des atomes C_α de la streptavidine pour les différents systèmes : (a) en solution, (b) CH_3 court, (c) CH_3 long, (d) NH_3^+, (e) mix long et (f) mix court.*

quatre résidus, dont trois de la chaîne B et seulement un de la chaîne A. Il s'agit du résidu hydrophobe Ala100, situé loin de la poche de liaison à la biotine. Concernant le système CH_3 long, six résidus présentent une mobilité élevée, dont deux résidus de la chaîne A, situés loin de la poche de liaison à la biotine : le résidu Glu14, au niveau de l'extrémité N-terminale et le résidu voisin Ala15, qui est hydrophobe. L'adsorption de la streptavidine sur la monocouche NH_3^+ induit une forte mobilité de sept résidus, dont deux sont situés sur la chaîne A loin de la poche de liaison, les résidus Glu14 et Ala15. Concernant le système mix long, dix résidus ont une mobilité supérieure à 3 Å, dont 6 dans la chaîne A. Parmi eux, trois résidus sont situés dans ou à proximité de la poche de liaison à la biotine : Gln24, Gly48 et Asn49. Enfin, lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes mix court, 5 résidus présentent une mobilité élevée, dont deux situés sur la chaîne A. En particulier, le résidu Gly48 est situé dans la poche de liaison et en contact direct avec la biotine.

En conclusion, le nombre et la nature des résidus présentant une mobilité élevée sont forte-

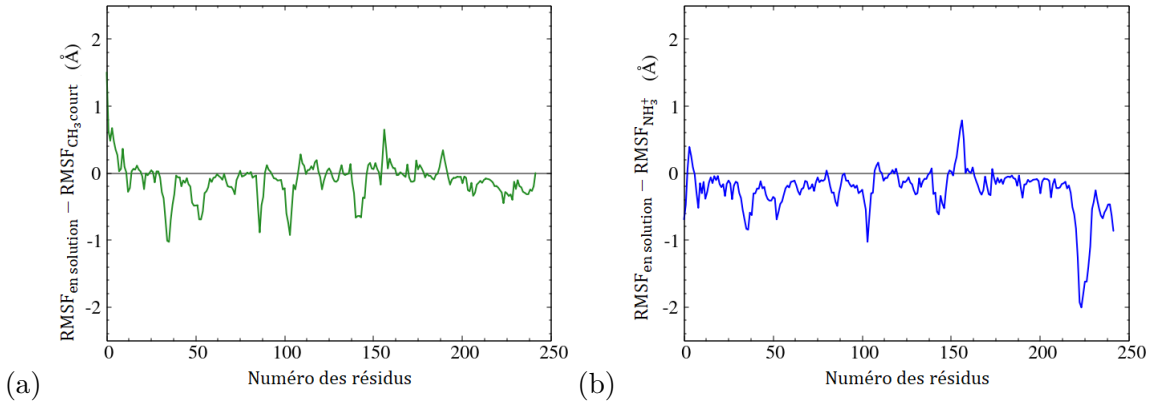


FIGURE 5.9 – *Variation de RMSF des atomes C_α de la streptavidine lorsque celle-ci est adsorbée sur les monocouches de silanes (a) CH_3 court et (b) NH_3^+ par rapport à l'état de référence correspondant à la streptavidine en solution.*

ment impactés par l'adsorption de la streptavidine sur une surface. De plus, la nature des résidus avec la plus grande mobilité dépend du type de monocouche de silanes. Ainsi l'adsorption sur les monocouches de silanes CH_3 court, CH_3 long et mix long induit-elle une forte mobilité des résidus Ala, hydrophobes et non polaires, tandis que le résidu chargé négativement Glu117 et le résidu polaire Thr66 présentent une forte mobilité avec la monocouche de silanes NH_3^+. On n'observe pas de corrélation directe entre la valeur du RMSD et le nombre de résidus avec une mobilité élevée. En effet, la plus grande valeur de RMSD est obtenue pour le système NH_3^+, mais le système mix long présente plus de résidus avec une forte mobilité. On en déduit que l'adsorption sur la monocouche de silanes NH_3^+ induit des changements de conformation diffus dans toute la protéine tandis que les changements de conformation sont concentrés sur certains résidus spécifiques lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes mix long. Concernant la localisation des résidus de la streptavidine avec une mobilité élevée dans la chaîne *A*, pour les systèmes CH_3 long, CH_3 court et NH_3^+, seule l'extrémité N-terminale présente une forte mobilité. En revanche, pour les systèmes mix court et mix long, certains résidus avec une mobilité élevée sont situés dans la poche de liaison à la biotine, notamment les résidus Gly48 et Asn49 appartenant à la boucle 3-4. Dans la suite, les effets de ces changements de conformation sur les interactions streptavidine - biotine sont étudiés.

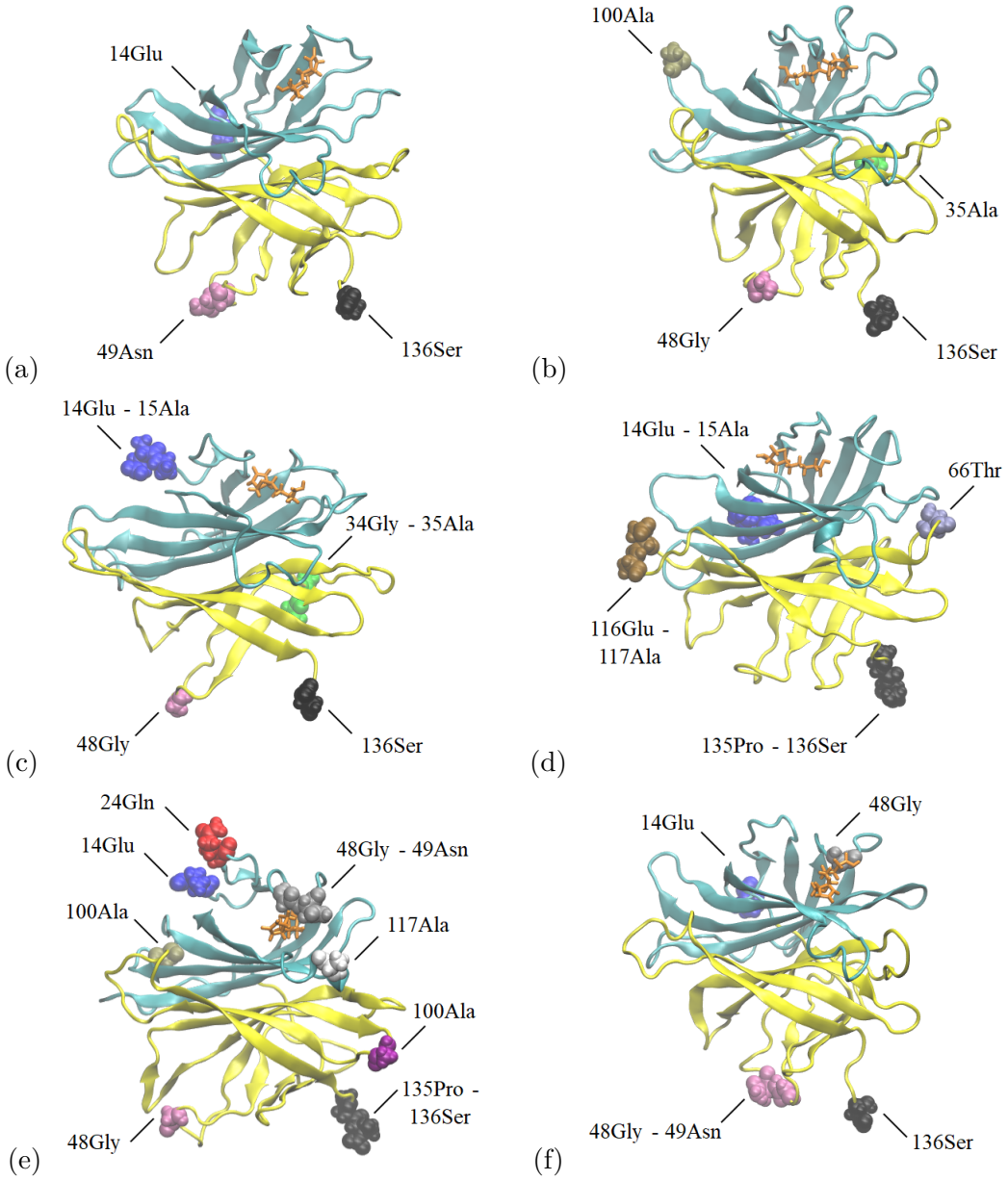


FIGURE 5.10 – *Localisation des résidus de la streptavidine présentant une mobilité élevée pour les différents systèmes : (a) en solution, (b) CH_3 court, (c) CH_3 long, (d) NH_3^+, (e) mix long et (f) mix court. La chaîne A de la streptavidine est représentée en cyan, la chaîne B en jaune et la biotine en orange. Les autres couleurs montrent les résidus de la streptavidine avec un RMSF $\geq$ 3 Å.*

5.2.2.d Étude du détachement entre la streptavidine et la biotine par simulations SMD

La première partie de cette étude a montré que l'adsorption de la streptavidine sur des surfaces de SiO_2 amorphe fonctionnalisées par des monocouches de silanes conduit à des changements de conformation qui diffèrent en fonction du type de monocouche de silanes. Pour comprendre l'impact de ces changements de conformation sur les interactions streptavidine - biotine, des simulations SMD sont réalisées pour chaque système.

Effet de la direction de tirage sur le détachement de la biotine L'état final (100 ns) des simulations d'adsorption de la streptavidine est utilisé comme configuration initiale pour les simulations SMD. Ces configurations sont caractérisées par l'angle d'adsorption de la streptavidine, c'est-à-dire l'angle entre la normale à la suface et le vecteur reliant le centre de masse de la streptavidine au centre de masse de la biotine (dans le cas où le complexe est en solution, il s'agit de l'angle entre l'axe z et le vecteur reliant le centre de masse de la streptavidine au centre de masse de la biotine). Afin de reproduire une expérience d'AFM en mode SMFS, la biotine est tirée dans la direction normale à la surface (par analogie, pour le système où le complexe est en solution, la biotine est tirée dans la direction de l'axe z). L'effet de la direction de tirage sur le détachement de la biotine peut donc être observé en réalisant des simulations SMD avec plusieurs configurations initiales, présentant des angles d'adsorption de la streptavidine différents.

Pour chaque système, deux ou trois configurations sont sélectionnées parmi les différentes répliques de simulations, et l'angle d'adsorption de la streptavidine est évalué pour chacune. Pour chaque configuration initiale, 20 répliques indépendantes de simulations SMD sont réalisées avec la même vitesse de tirage ($v = 2 \times 10^6$ μm·s^{-1}), la même constante de force ($k = 100$ pN·nm^{-1}), et une durée de 4 ns. Les valeurs de l'angle d'adsorption de la streptavidine et de la force de rupture moyenne entre la streptavidine et la biotine sont présentées dans le tableau 5.4 et les histogrammes de la distribution des forces de rupture sont présentés sur la figure 5.11.

Système	Angle d'adsorption de la streptavidine (°)	Temps de détachement (ns)	Force de rupture (pN)
En solution	$10,0$	$1,5 \pm 0,3$	283 ± 59
	$22,1$	$1,5 \pm 0,4$	270 ± 76
CH_3 court	$23,9$	$1,8 \pm 0,2$	345 ± 55
	$46,9$	$1,3 \pm 0,2$	211 ± 63
CH_3 long	$32,4$	$1,2 \pm 0,2$	224 ± 45
	$11,2$	$1,2 \pm 0,2$	230 ± 60
NH_3^+	40.0	$1,0 \pm 0,4$	180 ± 74
	$15,9$	$1,1 \pm 0,2$	180 ± 45
	$41,4$	$1,0 \pm 0,3$	142 ± 48
Mix long	$25,2$	$1,0 \pm 0,2$	154 ± 44
	$35,2$	$1,1 \pm 0,3$	176 ± 48
	$41,8$	$1,1 \pm 0,2$	172 ± 43
Mix court	$38,8$	$1,0 \pm 0,9$	127 ± 32
	$26,0$	$1,2 \pm 0,6$	132 ± 42

TABLE 5.4 – *Effet de l'angle d'adsorption de la streptavidine : temps de détachement et force de rupture pour les différentes configurations initiales des systèmes étudiés.*

Nos résultats ne montrent pas de corrélation entre l'angle d'adsorption de la streptavidine et la force de rupture moyenne de la biotine. De plus, pour un système donné, les histogrammes des

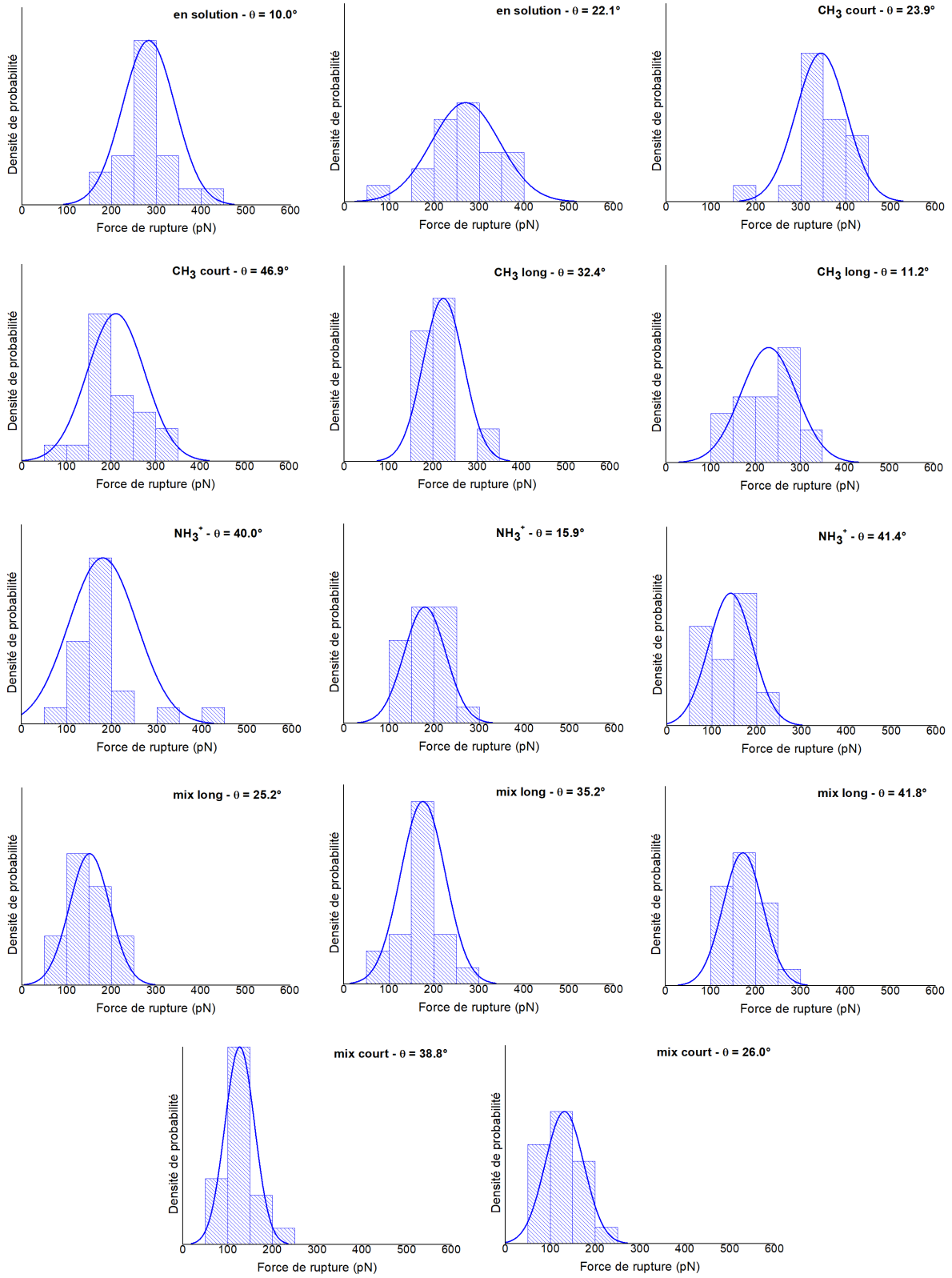


FIGURE 5.11 – *Histogrammes de la force de rupture de la biotine déterminée par simulations SMD (vitesse de tirage de 2 m·s^{-1}, 20 tirages par histogramme) pour les différents systèmes et les différentes configurations initiales étudiés.*

forces de rupture pour les différentes orientations initiales se superposent. C'est pourquoi, dans la suite, l'impact des différentes monocouches de silanes sur la force moyenne de détachement est comparé avec la force de rupture moyenne pour les différents angles d'adsorption de la streptavidine. Cela permet de reproduire le fait qu'expérimentalement, les courbes de forces sont déterminées en plusieurs points sur la surface d'un échantillon.

Durée du détachement et force de rupture Des courbes de détachement typiques pour chaque système sont présentés sur la figure 5.12 et les valeurs moyennes des temps de détachement et des forces de rupture sont données dans le tableau 5.5. Dans le cas où le complexe streptavidine - biotine est en solution, la force de rupture vaut 276 ± 67 pN, pour un *loading rate* de 2×10^{11} pN·s^{-1}, ce qui est légèrement plus faible que les résultats de Rico *et al.* pour la streptavidine monomérique [40].

Système	En solution	CH_3 court	CH_3 long	NH_3^+	Mix court	Mix long
Temps de détachement (ns)	$1,5 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,2$
Force de rupture (pN)	276 ± 67	278 ± 91	227 ± 54	167 ± 60	129 ± 38	166 ± 47

Table 5.5 – *Forces de rupture et temps de détachement moyens déterminés par simulations SMD, pour les six systèmes étudiés.*

On observe que la valeur de la force de rupture déterminée lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche CH_3 court (278 ± 91 pN) est similaire à celle obtenue lorsque le complexe est en solution, tandis que toutes les autres valeurs sont inférieures. La troisième force de rupture vaut 227 ± 54 pN, et est obtenue lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes CH_3 long. Les valeurs des forces de rupture sont presque les mêmes lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches NH_3^+ et mix long : elles valent respectivement 167 ± 60 pN et 166 ± 47 pN. La plus petite force de rupture vaut 129 ± 38 pN et est obtenue pour le système mix court. On en déduit que la monocouche de silanes CH_3 court permet de conserver la force de rupture, tandis que l'adsorption de la streptavidine sur les autres monocouches engendre une diminution de celle-ci, c'est-à-dire un affaiblissement de la liaison streptavidine - biotine. Cette diminution peut s'expliquer par des changements de conformation dans la streptavidine, comme le montrent les valeurs de RMSD, qui sont systématiquement plus élevées lorsque la streptavidine est adsorbée sur une surface ainsi que par le nombre plus élevé de résidus avec une mobilité élevée. Ces résultats sont en accord avec une étude récente menée par Sedlak *et al.*, qui montre que les changements de conformation de la streptavidine induits par un attachement covalent résultent en une diminution de la barrière d'énergie à franchir pour faire sortir la biotine de la poche de liaison, et donc en une diminution de la force de rupture [130].

Cependant, ces résultats suggèrent que les changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur des monocouches de silanes sont beaucoup plus faibles que ceux induits par son adsorption sur les surfaces cristallines de graphite ou de TiO_2 étudiées par Mücksch *et al.* [128]. En effet, nos résultats montrent que le RMSD de la streptavidine adsorbée sur les monocouches de silanes est inférieur à 5 Å, quelle que soit la monocouche considérée, alors qu'il a été démontré que la streptavidine s'étale sur les surfaces cristallines, et que ses structures secondaire et tertiaire sont largement altérées (avec, comme expliqué précédemment, des valeurs de RMSD comprises entre 15 et 40 Å [128]). De plus, l'étude de Mücksch *et al.* a montré que la streptavidine perd sa capacité à se lier à la biotine lorsqu'elle est adsorbée sur des surfaces cristallines de graphite et de TiO_2. En effet, le site de liaison à la biotine est détruit et

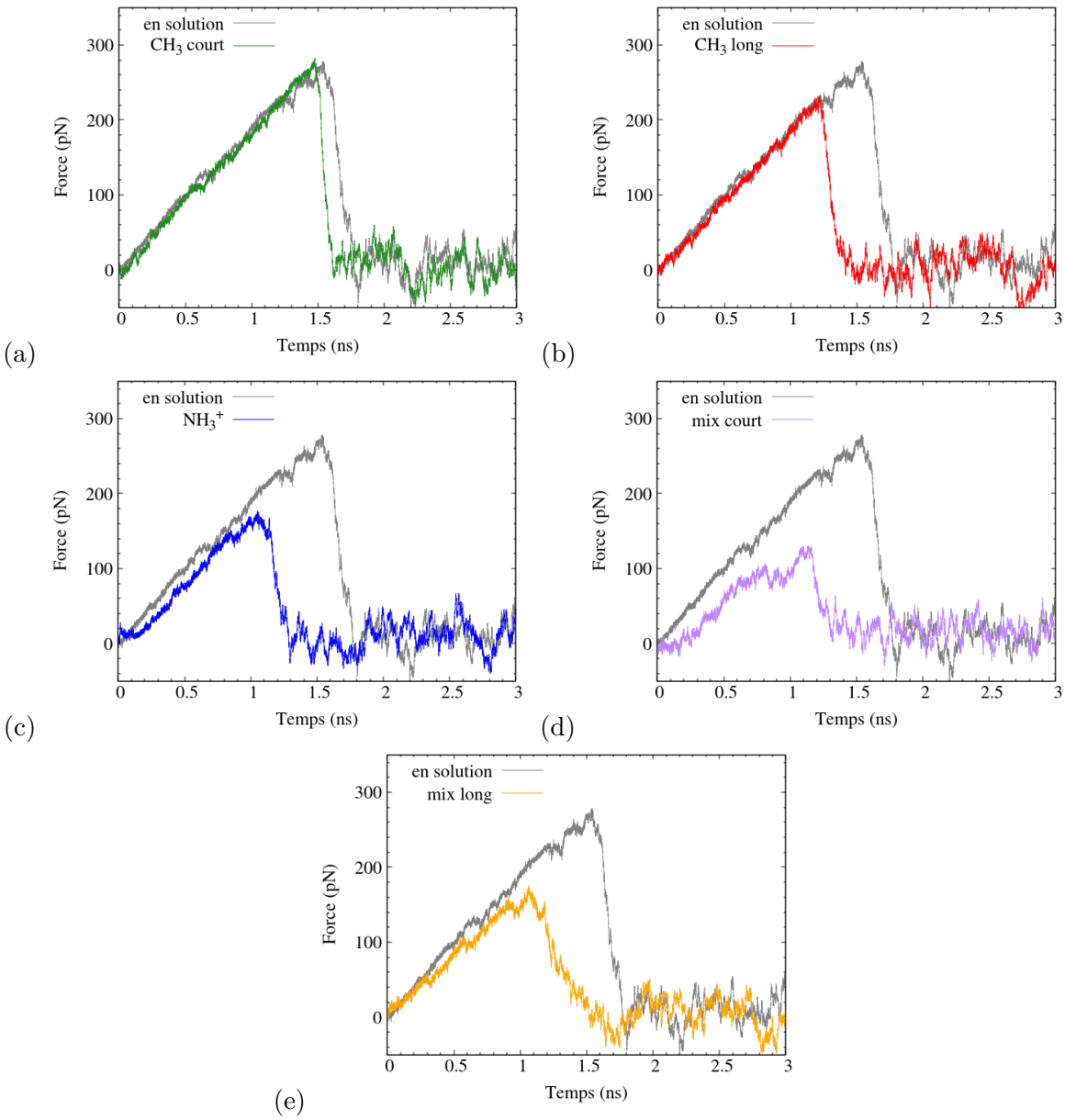


FIGURE 5.12 – *Courbes de force représentatives des différents systèmes étudiés par simulations SMD : complexe streptavidine - biotine en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) NH_3^+, (d) mix court et (e) mix long.*

ses constituants sont déplacés de l'intérieur de la protéine vers l'extérieur [128]. Au contraire, la capacité de la streptavidine à se lier à la biotine est préservée lorsqu'elle est immobilisée sur les monocouches de silane considérées dans notre étude.

Les plus grandes valeurs de forces de rupture sont obtenues lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes non chargées CH_3 court et CH_3 long, et la valeur la plus proche de celle du complexe en solution est obtenue lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche CH_3 court. Il s'agit également du système avec la plus petite valeur de RMSD et seulement quatre résidus présentant une mobilité élevée, aucun n'étant localisé dans la poche de liaison à la biotine. On en déduit donc que l'adsorption de la streptavidine sur la monocouche de silanes CH_3 court est celle qui induit les plus faibles changements de conformation, et permet de préserver au mieux les interactions streptavidine - biotine. La force de rupture plus faible obtenue avec la monocouche CH_3 long peut être expliquée par la valeur plus élevée du RMSD, qui est reliée à une énergie d'interaction plus élevée. En effet, de nombreuses interactions de Van der Waals s'établissent entre la streptavidine et les longues chaînes alkyles de ces molécules de silane.

Les forces de rupture et les temps de détachement les plus faibles sont obtenus avec les monocouches chargées positivement mix court, mix long et NH_3^+. Pour ces trois cas, l'affaiblissement des interactions streptavidine - biotine peut être expliqué par les changements de conformation importants de la streptavidine. L'adsorption de la streptavidine sur la monocouche NH_3^+ induit la plus grande valeur de RMSD, c'est-à-dire le changement global de conformation le plus important. Celui-ci est dû aux fortes interactions électrostatiques qui s'établissent entre les molécules de silane et la streptavidine. Les résidus chargés négativement de la streptavidine interagissent préférentiellement avec les molécules de silane chargées positivement, tandis que les résidus non polaires et chargés positivement sont repoussés loin de la surface.

Concernant les monocouches mix long et mix court, nos résultats suggèrent que la valeur de la force de rupture n'est pas directement corrélée à la valeur du RMSD et au nombre de résidus présentant une mobilité élevée. Cependant, pour ces deux monocouches, une mobilité élevée est observée au niveau des résidus Gly48 et Asn49 de la chaîne A, qui appartiennent à la boucle 3-4 de la poche de liaison et sont en contact direct avec la biotine. Ces changements de conformation locaux semblent induire un affaiblissement des interactions streptavidine - biotine, et il en résulte une diminution de la force de rupture pour ces deux systèmes. En effet, le rôle essentiel des résidus Gly48 et Asn49 dans les interactions avec la biotine a déjà été démontré. En particulier, le résidu Asn49 est celui qui présente la coopération individuelle la plus élevée avec les autres résidus de la poche de liaison, pour interagir avec la biotine [191].

En résumé, nous obtenons les forces de rupture les plus élevées lorsque le complexe est en solution et adsorbé sur la monocouche CH_3 court, ce qui signifie que l'adsorption de la streptavidine sur les autres monocouches de silanes provoque systématiquement un affaiblissement des interactions streptavidine - biotine. Les valeurs de forces de rupture les plus faibles sont observées avec les surfaces chargées NH_3^+, mix court et mix long. Concernant la monocouche NH_3^+ l'affaiblissement des interactions avec la biotine est expliquée par l'important changement global de conformation de la streptavidine. Pour les monocouches mix court et mix long, les interactions avec la surface induisent un changement de conformation localisé de la streptavidine, au niveau de la poche de liaison, qui impacte les interactions avec la biotine. Des valeurs de forces de rupture plus élevées sont obtenues avec les monocouches de silanes CH_3 court et CH_3 long. Ainsi, les changements de conformation induits par l'établissement d'interactions de Van der Waals avec des molécules de silane non chargées semblent-ils mieux préserver les interactions streptavidine - biotine. Cependant, la force de rupture est plus faible avec la monocouche CH_3 long qu'avec la monocouche CH_3 court. Cela pourrait être expliqué par la plus grande surface de

contact avec la streptavidine, qui induit une énergie d'interaction plus élevée et des changements de conformation plus importants.

Remarque : Les résultats présentés dans cette partie concernant les simulations SMD pour le complexe streptavidine - biotine en solution ont été corrigés par rapport à ceux que nous avons publiés précédemment [192]. En effet, dans notre article, les forces de rupture de la biotine pour le complexe en solution sont déterminées en appliquant une restriction de position à tous les atomes de la streptavidine, hors atomes d'hydrogène, et non au centre de masse. Cela engendre une augmentation de la rigidité de la protéine et conduit à une forte surévaluation de la force de rupture de la biotine (+ 110 %) par rapport aux systèmes où la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes et où aucune restriction de position supplémentaire n'est définie. Ici, nous appliquons une restriction de position à un seul atome de la streptavidine, l'atome le plus proche de son centre de masse (hors atomes d'hydrogène), afin de comparer le plus fidèlement possible les forces de rupture dans le cas où le complexe est en solution et dans le cas où la streptavidine est adsorbée sur les différentes monocouches de silanes. Les interprétations des résultats ont également été corrigées. Contrairement aux conclusions données dans l'article, nous en déduisons que la monocouche CH_3 court permet de bien préserver les interactions streptavidine - biotine, puisque les forces de rupture obtenues pour le complexe en solution et lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes CH_3 court sont très proches.

Cette étude présente cependant plusieurs limites, et notamment le fait que nous considérons la structure dimérique et non pas la structure tétramérique de la streptavidine. Comme expliqué précédement, le fait de considérer la structure tétramérique permet de tenir compte de la contribution des quatre chaînes dans la stabilisation des interactions entre la biotine et la streptavidine. De plus, le système modélisé est plus proche de la majeure partie des données expérimentales ou de simulations disponibles. Une autre limite de notre étude est le fait que nous avons réalisé les simulations SMD avec des vitesses de tirage élevées. Les valeurs des forces de rupture obtenues sont donc très éloignées de celles qui seraient déterminées expérimentalement, et le processus de détachement peut également être impacté par cette vitesse de tirage élevée.

5.3 Étude de l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur deux monocouches de silanes

Cette seconde partie est consacrée à l'étude de l'adsorption de la streptavidine tétramérique, en se limitant à son adsorption sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, sur lesquelles la streptavidine dimérique a présenté un comportement très différent. Après avoir analysé les changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, nous étudions leur impact sur les interactions streptavidine - biotine en caractérisant les forces de rupture et le processus de détachement à différentes vitesses de détachement, ainsi que les énergies de liaison.

5.3.1 Méthode

L'étude réalisée se divise en trois étapes. Dans une première partie, des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles d'une durée de 300 ns sont réalisées afin d'étudier l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes avec trois orientations initiales différentes et de caractériser les changements de conformation associés. Dans une seconde partie, l'impact de l'adsorption de la streptavidine sur des monocouches de silanes, sur le détachement de la biotine, est caractérisé par simulations SMD. Nous faisons cette fois varier la vitesse de tirage entre 20×10^6 μm·s^{-1} et $0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1} (la gamme de vitesses expérimentales se situe entre quelques nm·s^{-1} et quelques μm·s^{-1} avec un AFM conventionnel, voir paragraphe 1.2.3.b, page 13). Enfin, les énergies de liaison entre la streptavidine et la biotine sont caractérisées par *umbrella sampling*.

5.3.1.a Présentation du modèle

Les systèmes étudiés comportent tous une surface de SiO_2 amorphe fonctionnalisée par une monocouche de silanes NH_3^+ ou CH_3 court, avec une densité de 3,0 nm^{-2}. La structure de la couche de SiO_2 amorphe est celle publiée par Roscioni *et al.* [69], redimensionnée par un code Python à la taille 9,2 nm × 9,2 nm × 2,5 nm. Les molécules de silane sont initialement placées sur la surface en suivant la méthode présentée au paragraphe 3.2, page 70. Le complexe streptavidine - biotine est issu de la structure 3RY2 [117], publiée sur la Protein Data Bank [138]. Les quatre chaînes A, B, C et D de la streptavidine sont considérées. Les molécules d'eau sont conservées, ainsi qu'une seule biotine, située dans la poche de liaison de la chaîne A, mais les autres molécule de biotine et de glycérol identifiées dans la structure cristallographique ne sont pas considérées pour cette étude. De plus, des molécules d'eau sont ajoutées ainsi que ions Na^+ et Cl^-, afin de compenser les charges, et avec une concentration de 0,150 mol·L^{-1} pour reproduire les conditions physiologiques. Finalement, un mur de Lennard-Jones est placé en haut de la boîte, pour bloquer les interactions entre l'eau et la face inférieure du SiO_2. Le système ne présente donc des conditions périodiques que selon les directions x et y.

Les paramètres du champ de force pour la surface de SiO_2 amorphe et les molécules de silane sont ceux décrits au paragraphe 3.2, page 70 et en annexe A, page 221. Les interactions entre atomes de la streptavidine sont décrites avec le champ de force OPLS tout-atome [31]. Le champ de force de la biotine est déterminé à partir de l'outil ATB *(Automated Topology Builder)* [182, 183]. Le modèle d'eau TIP4P [153] et les ions Na^+ [154] et Cl^- [155] sont décrits avec le champ de force OPLS tout-atome. Les paramètres utilisés pour le champ de force du mur de Lennard-Jones issus des travaux de Kitabata *et al.* [111].

5.3.1.b Protocole de simulation

Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles : adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court Les simulations sont réalisées avec le logiciel Gromacs, version 5.1.3 [148] et la visualisation avec VMD, version 1.9 [149]. Tout d'abord, une étape de minimisation de l'énergie est effectuée, avec la méthode de la plus grande pente (*steepest descent method*). Les équilibres NVT et NPT sont ensuite réalisés, chacun avec une durée de 100 ps et une température de 300 K. Enfin, plusieurs productions indépendantes sont effectuées. Les équations du mouvement sont intégrées avec l'algorithme *leap-frog* et un pas de temps de 2 fs. L'algorithme LINCS est utilisé pour appliquer des contraintes aux paramètres de liaison. La température est conservée à 300 K avec un thermostat de Nosé-Hoover et une constante de temps de 0,4 ps. La pression est maintenue à 1 bar avec un barostat de Parrinello-Rahman utilisant une constante de temps de 12 ps. Les interactions électrostatiques à longue distance sont calculées avec la méthode *particle-mesh Ewald* [34] et un *cut-off* de 1 nm. Le même *cut-off* est utilisé pour les potentiels de Lennard-Jones.

Le processus d'adsorption de la streptavidine tétramérique sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ est modélisé en considérant six systèmes différents. En effet, le complexe streptavidine - biotine est initialement placé à 0,8 nm au-dessus chaque monocouche de silanes avec l'une des trois orientations initiales définies sur la figure 5.13. Les boîtes de simulation comportent environ 150 000 atomes, leurs dimensions valent 9,2 nm × 9,2 nm × 17 nm. Une illustration de l'un des systèmes à l'état initial est présentée sur la figure 5.14. Cinq productions indépendantes de 300 ns sont réalisées pour chaque système (soit un total de 30 simulations de 300 ns), afin d'observer le processus d'adsorption de la streptavidine sur les différentes monocouches de silanes et la stabilisation du système.

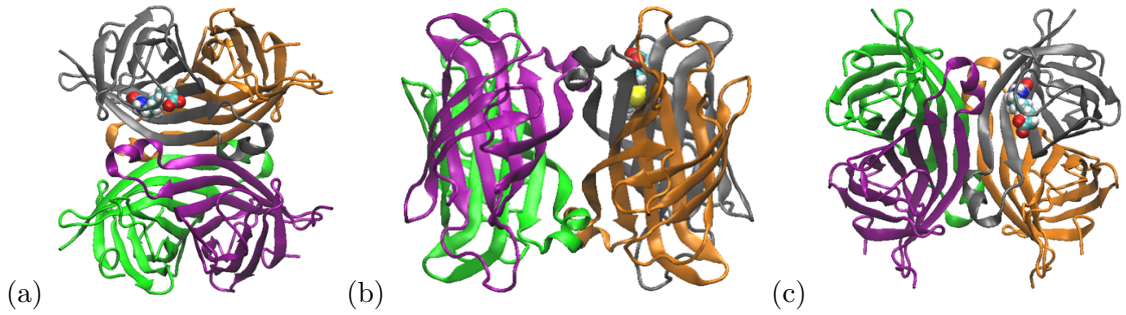


FIGURE 5.13 – *Les différentes orientations initiales de la streptavidine tétramérique : (a) orientation 1 (référence), (b) orientation 2 (rotation de -90 ° le long de l'axe y) et (c) orientation 3 (rotation de -90 ° le long de l'axe x). La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes de la biotine sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote).*

Simulations SMD : étude du détachement de la biotine à différentes vitesses de tirage Les simulations de dynamique moléculaire conventionnelles présentées précédemment permettent de modéliser des systèmes stabilisés où la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes, mais également de déterminer quelle est l'orientation initiale la plus favorable pour l'immobilisation de la protéine. Les configurations initiales pour les simulations SMD sont sélectionnées parmi les états finaux de ces simulations, une production représentative étant choisie parmi les cinq réalisées avec l'orientation initiale identifiée (orientation 2). Lors des simulations SMD, une force externe est appliquée sur le centre de masse de la biotine. Aucune

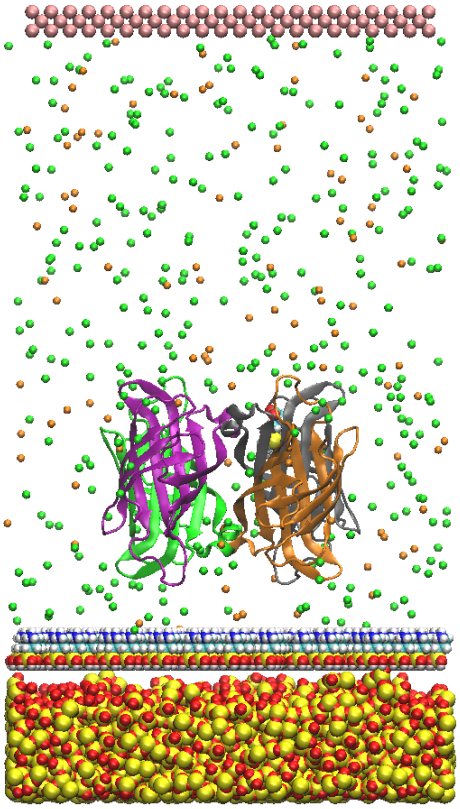


FIGURE 5.14 – *Image à l'état intial du système comportant la streptavidine tétramérique, la biotine, la couche de SiO_2 amorphe, les molécules de silane formant la monocouche NH_3^+, des molécules d'eau, des ions Na^+ et Cl^- et le mur de Lennard-Jones. La streptavidine est placée au-dessus de la surface avec l'orientation initiale 2. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote), et les ions par des points orange (Na^+) et verts (Cl^-). Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau ne sont pas représentées.*

restriction de position n'est appliquée à la streptavidine, et aucune liaison covalente n'est définie avec la surface : les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques qui s'établissent entre la streptavidine et la couche de SiO_2 fonctionnalisée avec les monocouches CH_3 court et NH_3^+ sont suffisantes pour empêcher sa désorption pendant que la biotine est entraînée par la force appliquée. Cette force est un potentiel harmonique, avec une constante de force $k = 100\,\mathrm{pN{\cdot}nm^{-1}}$. Pour reproduire les expériences d'AFM, la force est appliquée sur la biotine dans la direction normale à la surface. Les boîtes de simulation sont agrandies à une hauteur de 27 nm, afin de satisfaire la convention de l'image minimale. Ces nouvelles boîtes de simulation contiennent environ 290 000 atomes. Une étape de minimisation de l'énergie, un équilibre NPT puis des productions indépendantes sont réalisés. Les équations du mouvement sont résolues avec un pas de temps de 2 fs. 5 vitesses de tirage différentes ont été considérées, une par décade entre 20×10^6 $\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$ et $0,002 \times 10^6$ $\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. La durée des simulations et le nombre de répliques réalisées pour chaque configuration initiale dépendent de la vitesse de tirage : plus la vitesse de tirage est élevée, plus le calcul est rapide mais plus le processus de détachement est éloigné de l'équilibre, et donc plus le nombre de répliques nécessaires est important. En accord avec Ferreira *et al.* [91], nous effectuons 80 répliques de simulations pour la vitesse de tirage de 2×10^6 $\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. Le nombre de répliques pour les autres vitesses de tirage est adapté en fonction du temps de calcul nécessaire pour chacune. Un bilan des simulations SMD effectuées est présenté dans le tableau 5.6.

Vitesse de tirage ($\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$)	Durée de la simulation SMD (ns)	Nombre de répliques réalisées pour chaque monocouche de silanes
20×10^6	1	100
2×10^6	5	80
$0,2 \times 10^6$	30	40
$0,02 \times 10^6$	200	10
$0,002 \times 10^6$	1100	3

TABLE 5.6 – *Étude du détachement de la biotine lorsque la streptavidine tétramérique est adsorbée sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court : bilan des simulations SMD effectuées à différentes vitesses de tirage.*

Umbrella sampling L'énergie libre de liaison entre la streptavidine et la biotine est déterminée par *umbrella sampling*. Pour cela, une réplique de simulation SMD représentative est choisie parmi les 40 réalisées avec la vitesse de tirage $0,2 \times 10^6$ $\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. Des fenêtres sont définies sur la trajectoire, c'est-à-dire le long du chemin de détachement. Celles-ci constituent les configurations initiales pour l'*umbrella sampling* [38]. Pour chaque fenêtre, un équilibre NPT de 100 ps est effectué, suivi d'une production de 10 ns. Une constante de force de $100\,\mathrm{pN{\cdot}nm^{-1}}$ est appliquée pour restreindre le système autour de la configuration choisie. Au total, 14 fenêtres d'échantillonnage ont été sélectionnées afin de déterminer le PMF, réparties le long de la coordonnée de réaction (les espacements entre les différentes fenêtres varient en fonction de la coordonnée de réaction).

5.3.1.c Analyse des résultats

Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles Sauf précision contraire, les valeurs données pour les différents paramètres sont des valeurs moyennes déterminées sur les dernières 30 ns des simulations de 300 ns, et l'erreur donnée correspond à l'écart-type calculé par rapport aux résultats des différentes répliques de simulations. On appelle énergie d'interaction la somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction entre la

streptavidine et la surface. Les paramètres étudiés, notamment le RMSD, le RMSF, les liaisons hydrogène, la structure secondaire de la streptavidine, ainsi que la surface de contact entre la protéine et les molécules de silane sont présentés en détails au paragraphe 3.4, page 79. Les atomes de la streptavidine sont considérés comme en contact avec la monocouche de silanes ou avec la couche de SiO_2 amorphe s'ils sont situés à moins de 0,5 nm d'un atome d'une molécule de silane ou de la couche de SiO_2 respectivement.

Simulations SMD La force de rupture est déterminée grâce à la courbe présentant la force appliquée sur la biotine en fonction du temps, et définie comme la force la plus élevée avant son détachement. La force de rupture et la durée du détachement sont déterminées pour chaque réplique de simulation, et on en déduit les valeurs moyennes, les écarts-type et l'histogramme des forces de rupture. Le *loading rate* est déterminé par la mesure de la pente de la courbe de force avant la rupture [40].

Déterminaison de l'énergie de liaison par *umbrella sampling* Les résultats obtenus grâce à la procédure d'*umbrella sampling* sont analysés par la méthode d'analyse de l'histogramme pondéré (WHAM), à l'aide de la fonction Gromacs *wham*.

5.3.2 Résultats et discussion

5.3.2.a Adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, avec trois orientations initiales

L'objectif de cette première partie est de déterminer quelle orientation initiale conduit à l'adsorption la plus favorable de la streptavidine sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court. Les courbes présentant l'évolution de l'énergie d'interaction entre la streptavidine et les molécules de silane sont montrées sur la figure 5.15, et des images représentatives des différents systèmes à l'état final sont présentées sur la figure 5.16. Les simulations, d'une durée de 300 ns, permettent la stabilisation de l'énergie. Notons que la biotine conserve sa position dans la poche de liaison de la chaîne A sur toute la durée des simulations effectuées.

Avec la monocouche de silanes NH_3^+, on observe que la streptavidine s'adsorbe systématiquement sur surface, quelle que soit son orientation initiale. De plus, l'énergie d'interaction est rapidement stabilisée avec les orientations 2 et 3, mais un peu plus lente avec l'orientation 1. Une fois le système stabilisé, l'énergie d'interaction entre les molécules de silane NH_3^+ et la streptavidine vaut -206 ± 66 kcal·mol^{-1} avec l'orientation initiale 1, -300 ± 49 kcal·mol^{-1} avec l'orientation initiale 2 et -217 ± 64 avec l'orientation initiale 3 (valeurs moyennes calculées sur les dernières 30 ns des simulations). Ces résultats indiquent que l'orientation initiale 2 est la plus favorable pour l'immobilisation de la streptavidine sur la monocouche NH_3^+ parmi les trois orientations considérées.

Concernant la monocouche de silanes CH_3 court, on observe qu'avec l'orientation initiale 3, la streptavidine ne s'immobilise pas sur la surface pour l'une des cinq répliques de simulations réalisées, et qu'elle s'immobilise après 250 ns pour une autre réplique. Cette orientation initiale semble donc peu favorable. En revanche, avec les orientations initiales 1 et 2, la streptavidine s'immobilise systématiquement et rapidement sur la surface. L'énergie d'interaction entre les molécules de silane CH_3 court et la streptavidine vaut -137 ± 52 kcal·mol^{-1} avec l'orientation initiale 1 et -198 ± 44 kcal·mol^{-1} avec l'orientation initiale 2. Ces résultats semblent donc montrer que l'orientation initiale 2 est également la plus favorable pour l'adsorption de la streptavidine sur la monocouche CH_3 court. Dans la suite, on s'intéresse à l'étude des changements de conformation de la streptavidine et des interactions entre la streptavidine et les monocouches de silanes pour les systèmes avec l'orientation initiale 2 uniquement.

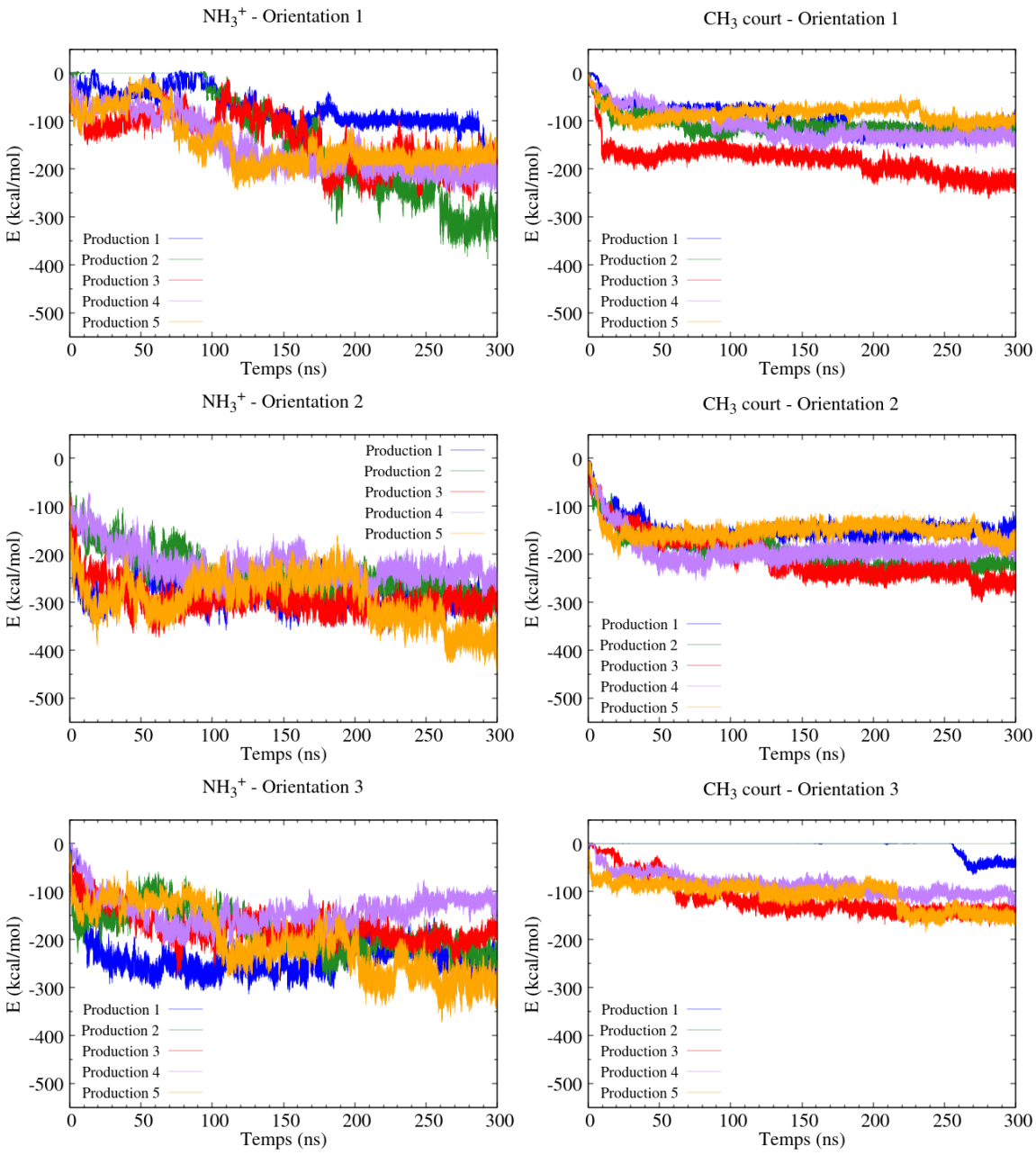


FIGURE 5.15 – *Évolution de l'énergie d'interaction entre les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court et la streptavidine avec trois orientations initiales différentes.*

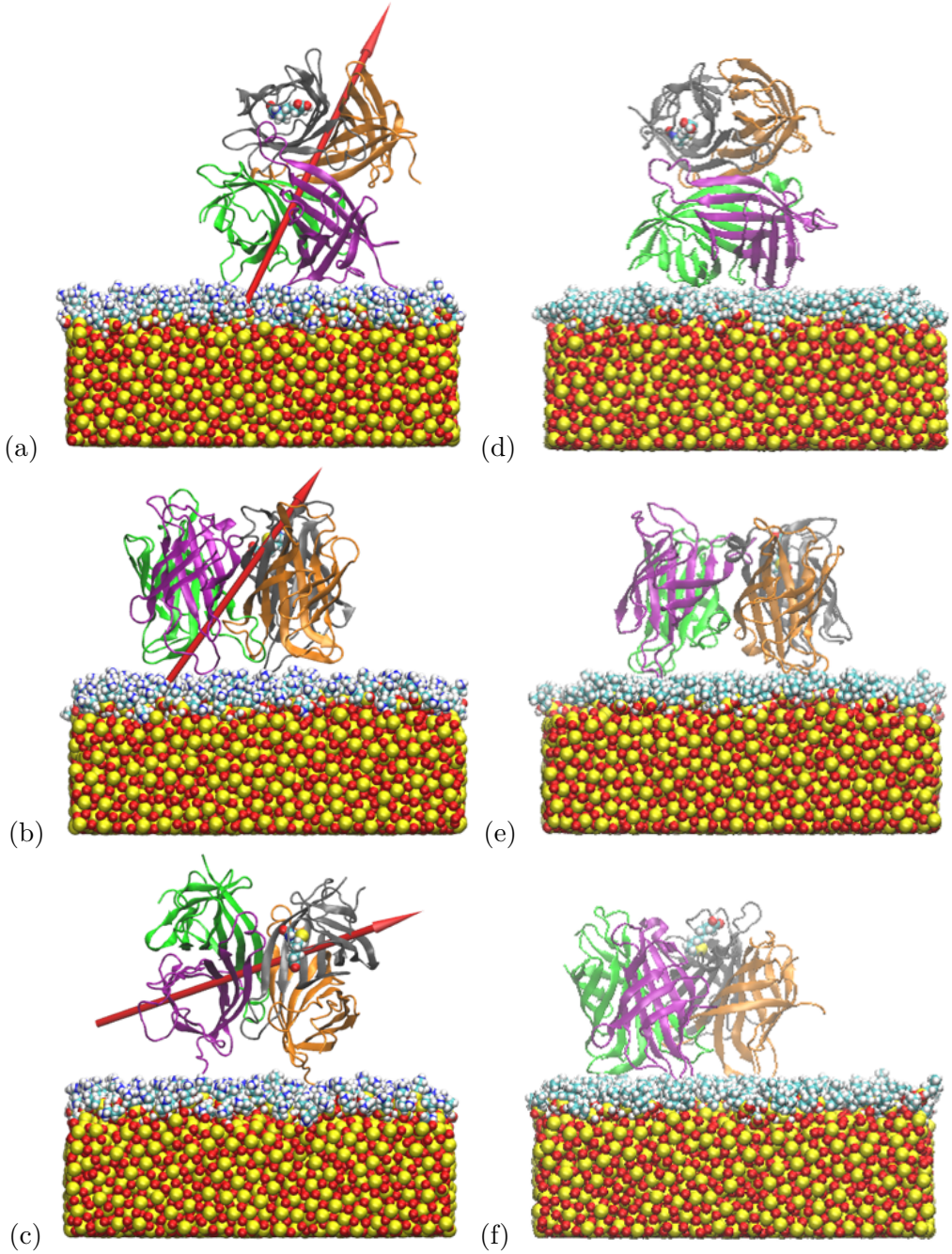


FIGURE 5.16 – *Images représentatives des différents systèmes à l'état final (300 ns) : la streptavidine tétramérique est adsorbée sur la monocouche de silanes NH_3^+ avec (a) l'orientation initiale 1, (b) l'orientation initiale 2 et (c) l'orientation initiale 3 et sur la monocouche de silanes CH_3 court avec (d) l'orientation initiale 1, (e) l'orientation initiale 2 et (f) l'orientation initiale 3. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote). Les ions Na^+ et Cl^-, les atomes du mur de Lennard-Jones et les molécules d'eau ne sont pas représentés. Le moment dipolaire de la streptavidine est indiqué par une flèche rouge lorsque celle-ci est adsorbée sur la monocouche de silanes NH_3^+.*

5.3.2.b Interactions entre la streptavidine et les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court

Les interactions entre la streptavidine et les monocouches de silanes sont étudiées pour les systèmes avec l'orientation initiale 2. La surface de contact et les résidus de la streptavidine interagissant avec les molécules de silane sont présentés dans le tableau 5.7.

Monocouche de silanes		NH_3^+	CH_3 court
$E^{int}_{streptavidine-silanes}$ (kcal·mol^{-1})		-300 ± 49	-198 ± 44
Contact streptavidine - surface [a,b]		$21,2 \pm 5,6$	$36,4 \pm 6,5$
Résidus de la streptavidine en contact avec les molécules de silane [b,c]	Chaîne A	Thr66, Asp67, Gly68 (L4-5)	Ala63, Pro64, Ala65, Thr66, Asp67, Gly68, Ser69 (L4-5)
	Chaîne B	Glu51 (L3-4)	Val47, Gly48, Asn49, Ala50 Glu51 (L3-4)
		Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85 (L5-6)	Asn81, Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85, Ala86, His87 (L5-6)
		Thr114, Glu116 (L7-8)	–
	Chaîne C	Asn49, Glu51 (L3-4)	Val47, Gly48, Asn49, Ala50, Glu51 (L3-4)
		Tyr83, Arg84 (L5-6)	Asn82, Tyr83, Arg84, Asn85 (L5-6)
		–	Thr115 (L7-8)
	Chaîne D	Thr66, Asp67, Gly68 (L4-5)	Pro64, Ala65, Thr66, Asp67, Gly68 (L4-5)

TABLE 5.7 – *Énergie d'interaction et surface de contact entre la streptavidine tétramérique et les monocouches de silanes.* [a] *Nombre de résidus de la streptavidine en contact avec les molécules de silane.* [b] *Un résidu est considéré comme en contact avec une monocouche de silanes s'il est situé à moins de 0,5 nm d'un atome d'une molécule de silane.* [c] *La boucle à laquelle appartiennent les résidus est indiquée entre parenthèses.*

On remarque que les quatre chaînes de la streptavidine sont en contact avec les monocouches de silanes. De la même manière que pour la streptavidine dimérique, l'énergie d'interaction est plus basse avec la monocouche NH_3^+ qu'avec la monocouche CH_3 court, tandis que la surface de contact est plus grande avec la monocouche CH_3 court. Concernant les résidus de la streptavidine en contact avec la monocouche NH_3^+, on retrouve de nombreux résidus polaires (Thr, Asn, Tyr) ou chargés négativement (Asp, Glu). Il peut donc s'établir des interactions de type électrostatique entre la streptavidine et les molécules de silane NH_3^+. De plus, on remarque que tous les résidus de la streptavidine en contact avec la monocouche NH_3^+ sont également en contact avec la monocouche CH_3 court, à l'exception des résidus Thr114 et Glu116 de la chaîne *B*. À ces résidus s'ajoutent des résidus voisins, polaires (Ser, Asn, Thr) et apolaires (Ala, Pro, Gly, Val). Ainsi, de nombreuses interactions de Van der Waals peuvent s'établir entre la streptavidine et la monocouche de silanes CH_3 court.

5.3.2.c Changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court

Changements globaux de conformation : RMSD et structure secondaire Les changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur les mo-

nocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ sont caractérisés à l'aide de la structure secondaire (tableau 5.8) et du RMSD (tableau 5.9).

Système	Hélice α (%) [a]	Hélice 3_{10} (%) [a]	Feuillets β (%) [a]
Structure initiale	0	4,9	57,6
NH_3^+	0	1,1	54,1
CH_3 court	0,4	1,6	51,4

TABLE 5.8 – *Structure secondaire de la streptavidine tétramérique à l'état final et comparaison à la structure initiale.* [a] *Pourcentage de résidus du complexe présentant la structure secondaire mentionnée.*

Nos résultats concernant la structure secondaire de la streptavidine ne montrent pas de changement significatif lors de l'adsorption sur les monocouches de silanes, contrairement à ceux de Mücksch *et al.* [128]. En effet, ces travaux étudient l'adsorption de la streptavidine monomérique sur des surfaces cristallines de graphite et de TiO_2 et montrent une forte diminution de la proportion de résidus présentant une structure secondaire en hélice 3_{10} et en feuillets β, et l'apparition d'une structure secondaire en hélice α lors de l'adsorption sur les surfaces étudiées. Par exemple, la proportion de résidus présentant une structure en feuillets β passe de plus de 50 % à 1% environ lors de l'adsorption de la streptavidine sur une surface de TiO_2 et à 13 % environ lors de l'adsorption sur une surface de graphite [128]. À l'inverse, la proportion de résidus présentant une structure en feuillets β reste très élevée lors de l'adsorption sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court (respectivement 54,1 % et 51,4 %). Ainsi, contrairement au cas où la streptavidine est adsorbée sur des surfaces cristallines de graphite et de TiO_2 [128], sa structure est bien conservée lors de son adsorption sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, ce qui lui permet de conserver sa capacité à interagir avec la biotine.

Système	$RMSD_{streptavidine}$ (Å)	$RMSD_A$ (Å)	$RMSD_B$ (Å)	$RMSD_C$ (Å)	$RMSD_D$ (Å)
NH_3^+	$3,4 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,6$
CH_3 court	$3,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$

TABLE 5.9 – *RMSD de la protéine tétramérique et de ses quatre chaînes lorsqu'elle est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+.*

De plus, le RMSD de la streptavidine présente des valeurs très proches avec les deux monocouches de silanes ($3,4 \pm 0,2$ Å pour CH_3 court et $3,5 \pm 0,1$ Å pour NH_3^+). On remarque que ces valeurs sont inférieures aux valeurs de RMSD mesurées lors de l'adsorption de la streptavidine dimérique sur ces mêmes monocouches de silanes ($4,2 \pm 0,5$ Å pour CH_3 court et $5,0 \pm 0,9$ Å pour NH_3^+). Cela montre que l'adsorption sur les monocouches de silanes engendre des changements de conformation moins importants avec la streptavidine tétramérique qu'avec la streptavidine dimérique. Ce phénomène pourrait être expliqué par un effet stabilisateur entre les différentes chaînes lorsque la structure tétramérique est considérée.

Localisation des changements de conformation : RMSD des quatre chaînes de la streptavidine et RMSF On s'intéresse à présent à la localisation des changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+. D'après les valeurs de RMSD présentées dans le tableau 5.9, les changements de conformation sont moins importants au niveau de la chaîne A de la streptavidine qu'au niveau des trois autres chaînes. Notons que la chaîne A est la seule comportant une biotine dans

sa poche de liaison, ce qui suggère que la présence de la biotine stabilise la structure de cette chaîne. En accord avec les valeurs de RMSD, le RMSF présente globalement des valeurs moins élevées pour les résidus de la chaîne A que pour les résidus des autres chaînes (figure 5.17). On observe toutefois que le groupement N-terminal de la chaîne A présente une valeur de RMSF élevée lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche NH_3^+ (celui-ci n'appartient pas à la surface de contact, mais se trouve à proximité des molécules de silane NH_3^+). Finalement, le RMSF des résidus de la boucle 3-4 présente des valeurs plus faibles pour la chaîne A que pour les autres chaînes.

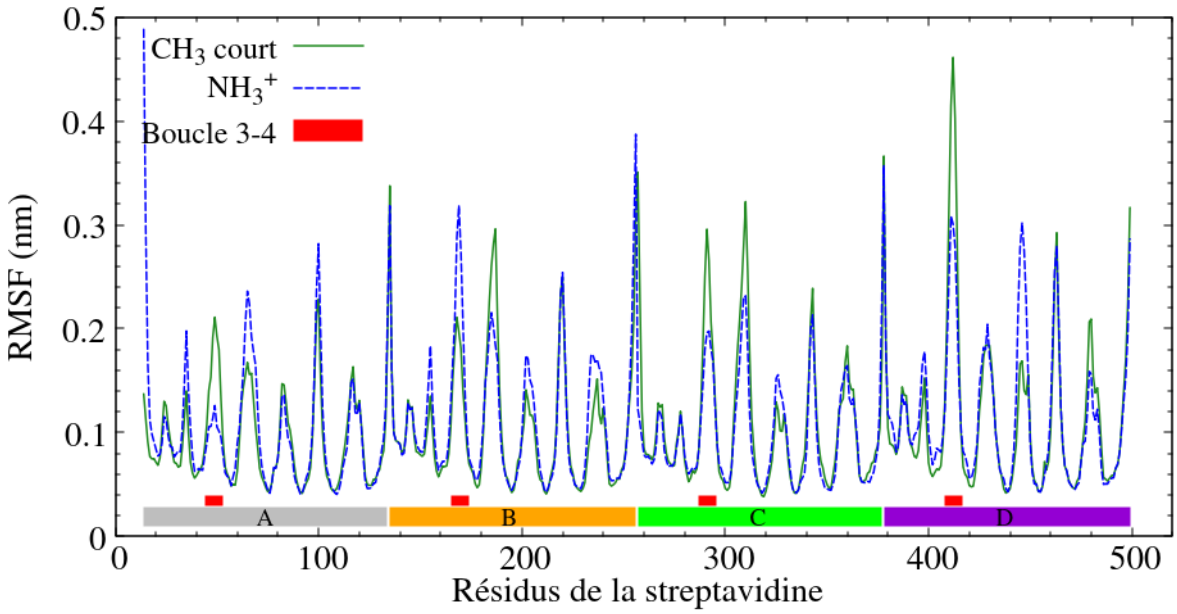


FIGURE 5.17 – *RMSF des atomes du squelette de la streptavidine lorsqu'elle est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+.*

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.5.2, page 48, la boucle 3-4 possède un rôle prépondérant dans les interactions stretavidine - biotine. En effet, plusieurs de ses résidus (Tyr43, Ser45, Val47, Gly48 et Ala50) appartiennent à la poche de liaison [40, 117] et sont en contact direct avec la biotine. Les travaux de Song *et al.* [118] ont montré par simulations de dynamique moléculaire que lorsque la streptavidine est en solution, la boucle 3-4 peut présenter un état ouvert ou fermé. De plus, les changements de conformation des boucles 3-4 des différentes chaînes de la streptavidine tétramérique sont indépendants (c'est-à-dire que la boucle 3-4 de l'une des chaînes de la streptavidine peut s'ouvrir ou se fermer indépendamment de la configuration des autres chaînes). En l'absence de biotine dans la poche de liaison, la streptavidine présente une configuration plus stable avec la boucle 3-4 ouverte, tandis qu'en présence d'une biotine, la configuration fermée est la plus stable puisqu'elle permet l'établissement d'interactions électrostatiques et hydrophobes entre la boucle 3-4 et la biotine [118]. En accord avec ces résultats, nous observons que la boucle 3-4 de la chaîne A reste fermée à l'état final, tandis que les boucles 3-4 des autres chaînes deviennent partiellement ou complètement ouvertes, à la fois pour la monocouche NH_3^+ et la monocouche CH_3 court (figure 5.18). Notons que, d'après les résultats du tableau 5.7, les résidus de la boucle 3-4 ne sont pas en contact avec les molécules de silane pour les chaînes A et D, mais certains de ces résidus sont en contact avec la surface pour les chaînes B et C.

On s'intéresse à présent à la nature des résidus présentant une mobilité élevée en fonction de

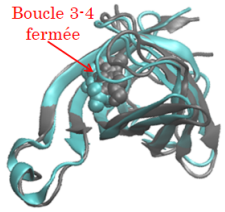
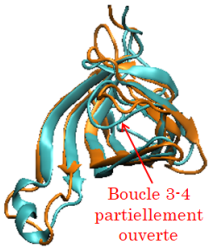
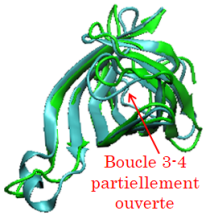
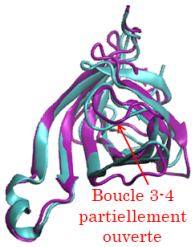
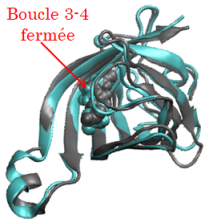
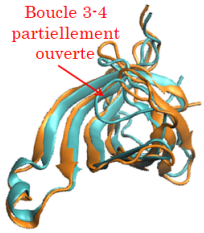
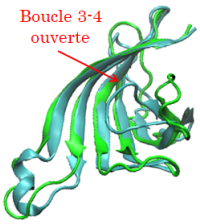
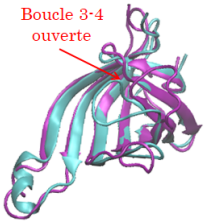
Monocouche de silanes	Chaîne A	Chaîne B	Chaîne C	Chaîne D
NH_3^+				
CH_3 court				

FIGURE 5.18 – *Images représentatives des différentes chaînes de la streptavidine à l'état final et comparaison avec leur structure à l'état initial. Les chaînes sont représentées en cyan à l'état initial. À l'état final, la chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. On observe que la boucle 3-4, qui est systématiquement fermée à l'état initial, reste fermée à l'état final pour la chaîne A (la biotine étant située dans la poche de liaison), mais est partiellement ou complètement ouverte à l'état final avec les chaînes B, C et D, à la fois pour la monocouche NH_3^+ et la monocouche CH_3 court.*

la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée. Comme pour la streptavidine dimérique, on considère qu'un résidu présente une mobilité élevée si son RMSF présente une valeur supérieure à 3 Å [190]. Ces résidus sont présentés sur la figure 5.19. Lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes NH_3^+, les résidus Glu14 de la chaîne A, Ala15 de la chaîne B et Ala15 de la chaîne D, qui appartiennent à l'extrémité N-terminale de leur chaîne, présentent tous une mobilité élevée, de même que le résidu Ser136 de l'extrémité C-terminale de la chaîne B. De plus, les résidus Asn49 de la chaîne B et Gly48 et Asn49 de la chaîne D, qui appartiennent à la boucle 3-4, montrent une mobilité élevée, en accord avec l'ouverture de la boucle observée sur la figure 5.18. Enfin, la mobilité du résidu polaire Tyr83 de la chaîne D est également importante. Concernant les résidus présentant une mobilité élevée lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes CH_3 court, on retrouve les résidus des extrémités N-terminales et C-terminales (Ala15 et Ser136 de la chaîne B, Glu14 de la chaîne C, Ala15 et Ser136 de la chaîne D). Le résidu Asp67 de la chaîne C (boucle 4-5) montre également une mobilité élevée, ainsi que les résidus Val47 à Ala50 de la chaîne D (boucle 3-4), en accord avec les observations faites précédemment sur l'ouverture de cette boucle.

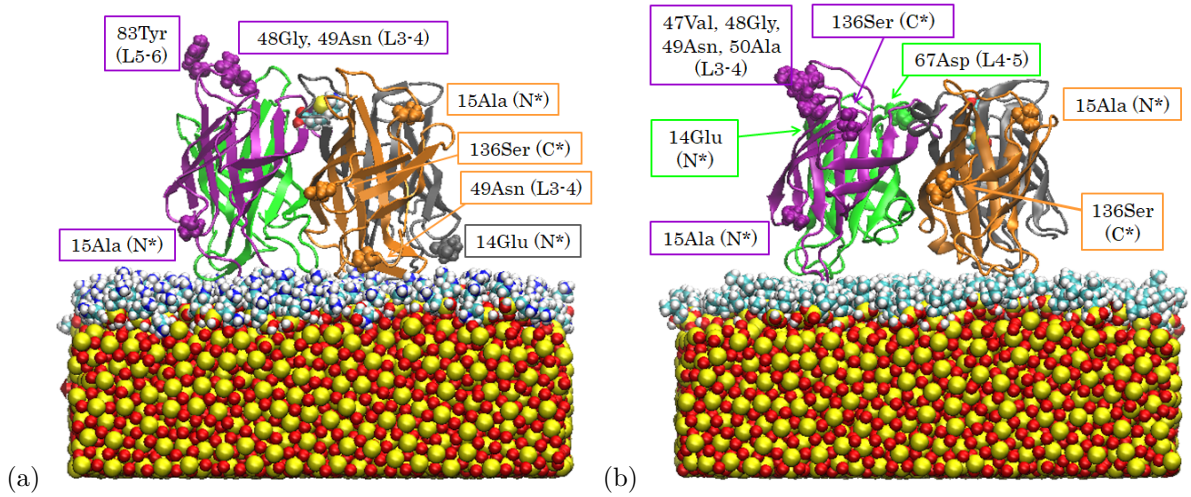


FIGURE 5.19 – *Localisation des résidus de la streptavidine tétramérique présentant une mobilité élevée (RMSF > 3 Å) lorsqu'elle est adsorbée sur les monocouches de silanes (a) NH_3^+ et (b) CH_3 court. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote). Les ions Na^+ et Cl^-, les atomes du mur de Lennard-Jones et les molécules d'eau ne sont pas représentés. Les notations N* et C* indiquent que le résidu appartient respectivement à l'extrémité N-terminale de la chaîne ou à l'extrémité C-terminale de la chaîne, tandis que la notation L indique la boucle (loop) à laquelle le résidu appartient.*

Les précédentes analyses ont montré que lors de son adsorption sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, la streptavidine présente des changements de conformation assez faibles, qui lui permettent de conserver sa capacité à se lier avec la biotine. Ces changements de conformation sont principalement localisés au niveau des extrémités N-terminales et C-terminales des différentes chaînes et des boucles 3-4 des chaînes B, C et D qui, en l'absence de biotine, adoptent une configuration ouverte. Cependant, on observe que le RMSF au niveau des résidus de la boucle 3-4 de la chaîne A présente des valeurs assez différentes selon que la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes NH_3^+ ou CH_3 court (figure 5.17). Dans la suite, on cherche donc à identifier si ces changements de conformation induisent une modification des interactions qui

s'établissent entre la streptavidine et la biotine en réalisant des simulations SMD pour étudier le détachement de la biotine.

5.3.2.d Effets de l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ sur le processus de détachement de la biotine

Les simulations SMD sont réalisées à partir des états finaux des simulations de dynamique moléculaire modélisant l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court avec l'orientation initiale 2, d'une durée de 300 ns. Une réplique représentative est sélectionnée parmi les cinq réalisées pour chaque système, c'est-à-dire une réplique telle que le RMSD, la surface de contact et l'énergie d'interaction entre la streptavidine et les molécules de silane soient proches des valeurs moyennes obtenues. Les configurations initiales des simulations SMD sont présentées sur la figure 5.20 et le processus de détachement modélisé par les simulations SMD est illustré sur la figure 5.21.

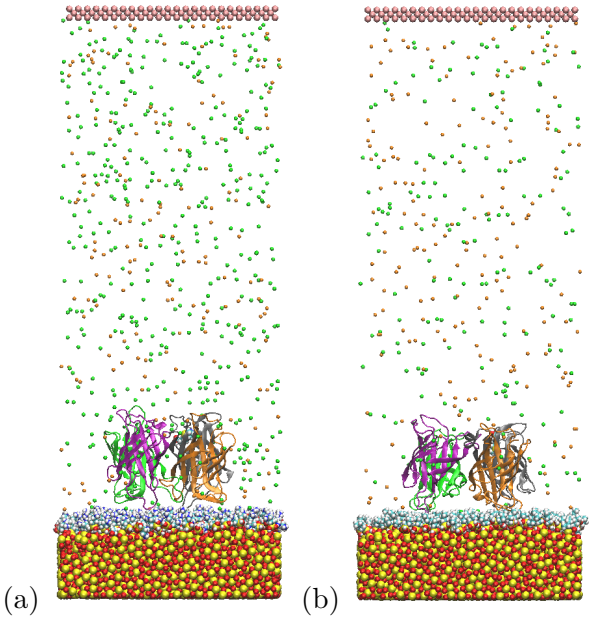


FIGURE 5.20 – *Images des configurations initiales des simulations SMD pour le complexe streptavidine - biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes (a) NH_3^+ et (b) CH_3 court. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène), bleu (azote) et rose (mur de Lennard-Jones). Les ions Na^+ sont indiqués par des points orange et ions Cl^- par des points verts. Les molécules d'eau ne sont pas représentées.*

Comme dans la partie précédente, la force est appliquée sur la biotine dans la direction normale à la surface, afin de modéliser une expérience d'AFM en mode SMFS. De plus, les simulations SMD sont réalisées avec différentes vitesses de tirage, comprises entre 20×10^6 μm·s^{-1} et $0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1}, afin d'observer leurs effets sur la force de rupture et le processus de détachement. On rappelle que le détail du nombre de répliques de simulations SMD effectuées est présenté dans le tableau 5.6, page 155. Les résultats obtenus sont notamment comparés à ceux issus des travaux de Rico *et al.* [40], qui étudient le complexe en solution, c'est-à-dire sans changement de conformation induit par l'immobilisation de la protéine.

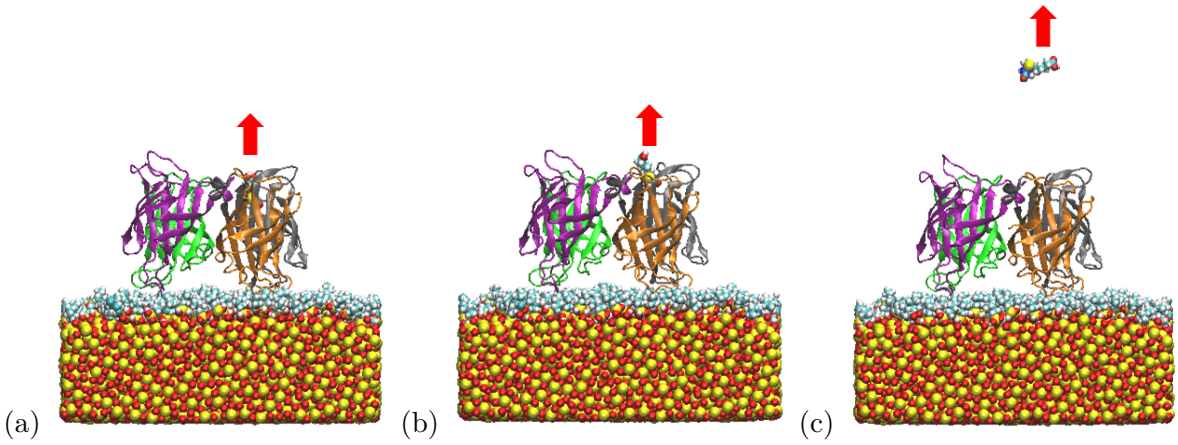


FIGURE 5.21 – *Illustation du processus de détachement modélisé avec les simulations SMD lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche CH_3 court (vitesse de tirage $v = 20 \times 10^6$ μm·s^{-1}) : (a) $t = 0,30$ ns, une force est appliquée sur la biotine dans la direction normale à la surface, celle-ci reste liée à la streptavidine ; (b) $t = 0,37$ ns, la force appliquée sur la biotine est suffisante pour la faire sortir de la poche de liaison de la streptavidine ; (c) $t = 0,40$ ns, la biotine est entraînée loin de la surface par la force appliquée. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet. Les atomes sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène) et bleu (azote). Les ions Na^+ et Cl^-, les atomes du mur de Lennard-Jones et les molécules d'eau ne sont pas représentés.*

Effets de l'adsorption de la streptavidine sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ et de la vitesse de tirage sur la force de rupture de la biotine Les valeurs moyennes des forces de rupture de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches NH_3^+ et CH_3 court sont récapitulées dans le tableau 5.10. La figure 5.22 présente les forces de rupture lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court en fonction du *loading rate* et une comparaison avec les résultats des travaux de Rico *et al.* pour le complexe streptavidine - biotine en solution [40] et ceux de Sedlak *et al.* qui étudient le cas où la streptavidine est immobilisée par une liaison covalente [130]. Enfin, des courbes de force représentatives sont présentées sur la figure 5.23 et les histogrammes des forces de rupture sont donnés sur la figure 5.25.

Vitesse de tirage (μm·s^{-1})	Monocouche de silanes CH_3 court		Monocouche de silanes NH_3^+	
	Force de rupture (pN)	Temps de détachement (ns)	Force de rupture (pN)	Temps de détachement (ns)
20×10^6	672 ± 73	0,36 ± 0,04	531 ± 99	0,31 ± 0,05
2×10^6	456 ± 70	2,5 ± 0,3	314 ± 84	1,9 ± 0,4
$0,2 \times 10^6$	332 ± 66	17,5 ± 3,2	231 ± 72	13,6 ± 3,8
$0,02 \times 10^6$	234 ± 43	122,7 ± 20,5	206 ± 55	115,2 ± 28,6
$0,002 \times 10^6$	151 ± 43	754,2 ± 229,0	118 ± 20 [a]	959,9 ± 92,0 [a]

TABLE 5.10 – *Forces de rupture et temps de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ et déterminées par simulations SMD avec différentes vitesses de tirage.* [a] *La force de rupture indiquée correspond à la force maximale appliquée sur la biotine au cours son détachement. Cependant, pour la vitesse de tirage $v = 0,002 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ et la monocouche de silanes NH_3^+, un bruit important est observé pour certaines répliques de simulations (voir figure 5.24), qui rend difficile l'identification de la force correspondant effectivement à la rupture. De plus, l'instant exact du détachement est difficilement identifiable en visualisant les trajectoires correspondantes car on observe un détachement en plusieurs étapes (la biotine sort et rentre à nouveau dans la poche de liaison) ainsi que des interactions entre la biotine et des résidus de la streptavidine qui ne se situent pas dans la poche de liaison de la chaîne A mais par exemple en surface.*

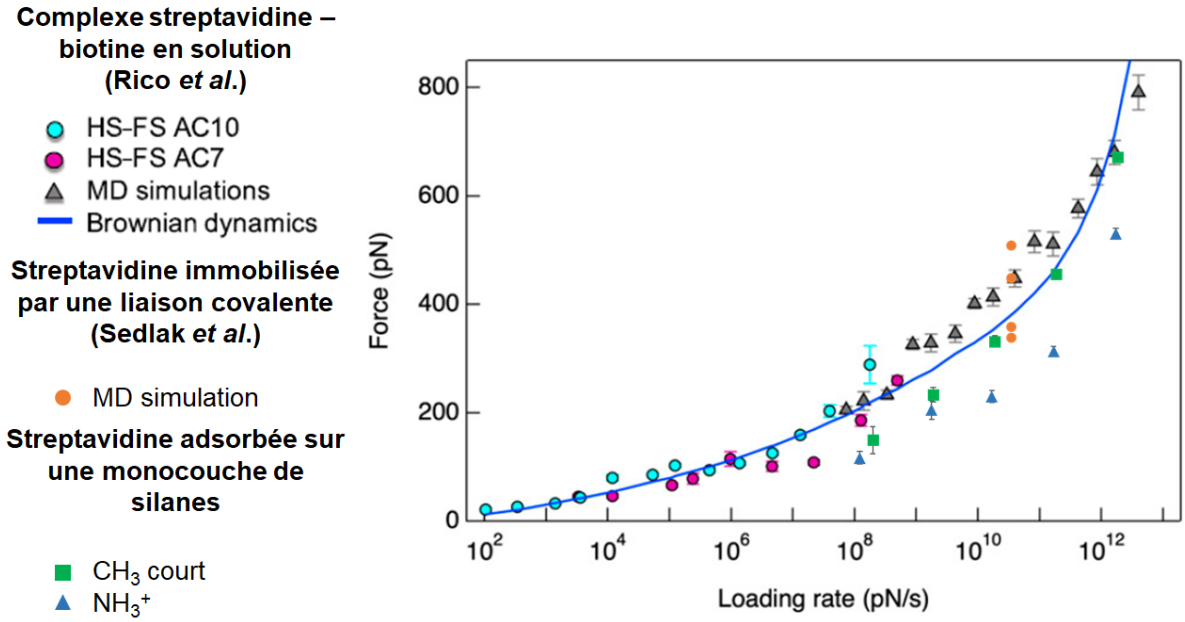


FIGURE 5.22 – *Forces de rupture moyennes pour les différents loading rates lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court et comparaison aux valeurs déterminées par Rico et al. en solution [40] et Sedlak et al. lorsque la streptavidine est immobilisée par une liaison covalente [130]. Le loading rate est déterminé par la mesure de la pente de la courbe de force avant la rupture [40]. Les barres d'erreur indiquées pour nos résultats correspondent à l'erreur standard des valeurs calculées. Image adaptée de Rico et al. (2019) [40].*

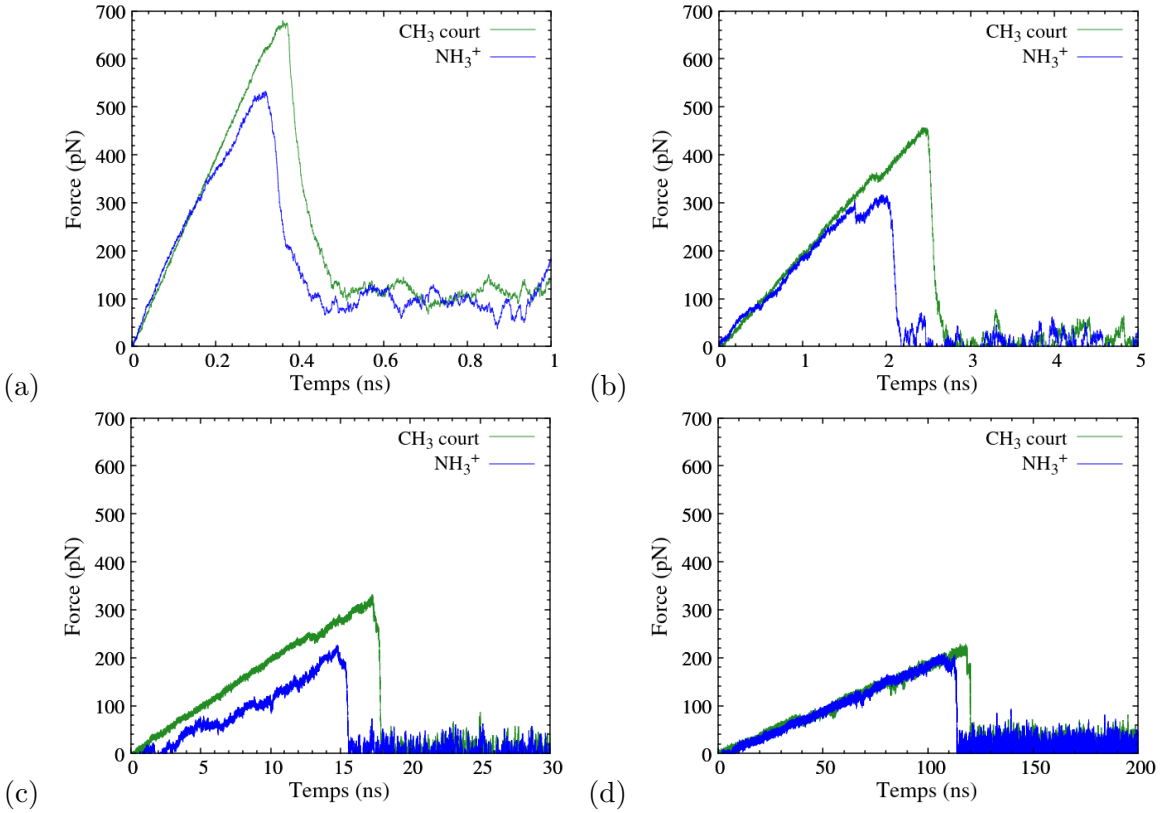


FIGURE 5.23 – *Courbes de force représentatives du détachement de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ et déterminées par simulations SMD avec différentes vitesses de tirage : (a) 20×10^6 $\mu m{\cdot}s^{-1}$, (b) 2×10^6 $\mu m{\cdot}s^{-1}$, (c) $0,2 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ et (d) $0,02 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$.*

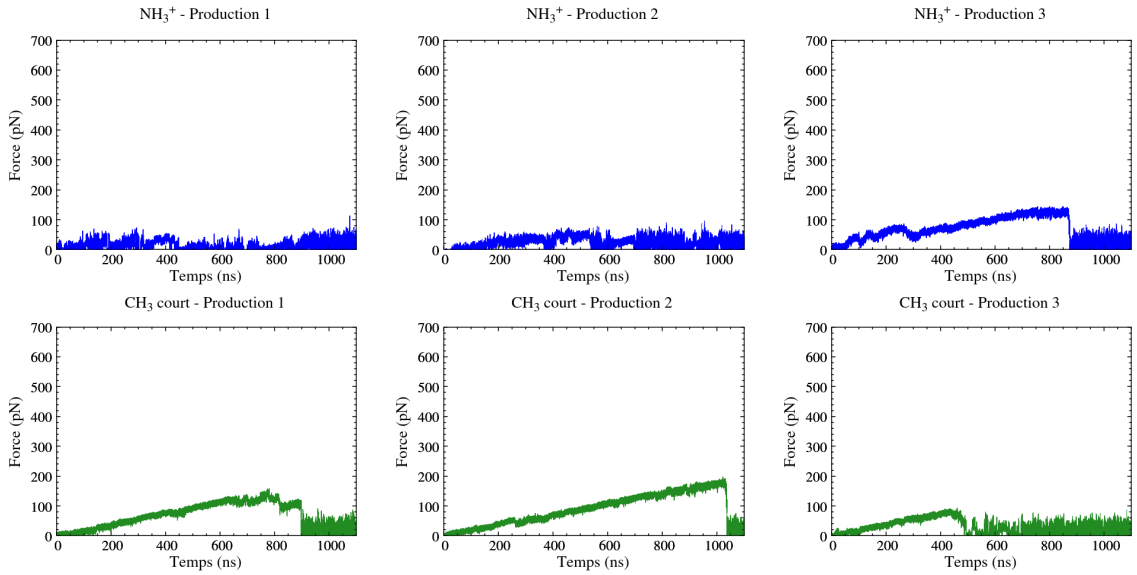


FIGURE 5.24 – *Courbes de force obtenues pour les trois répliques de simulations de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ avec la vitesse de tirage $v = 0,002 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$.*

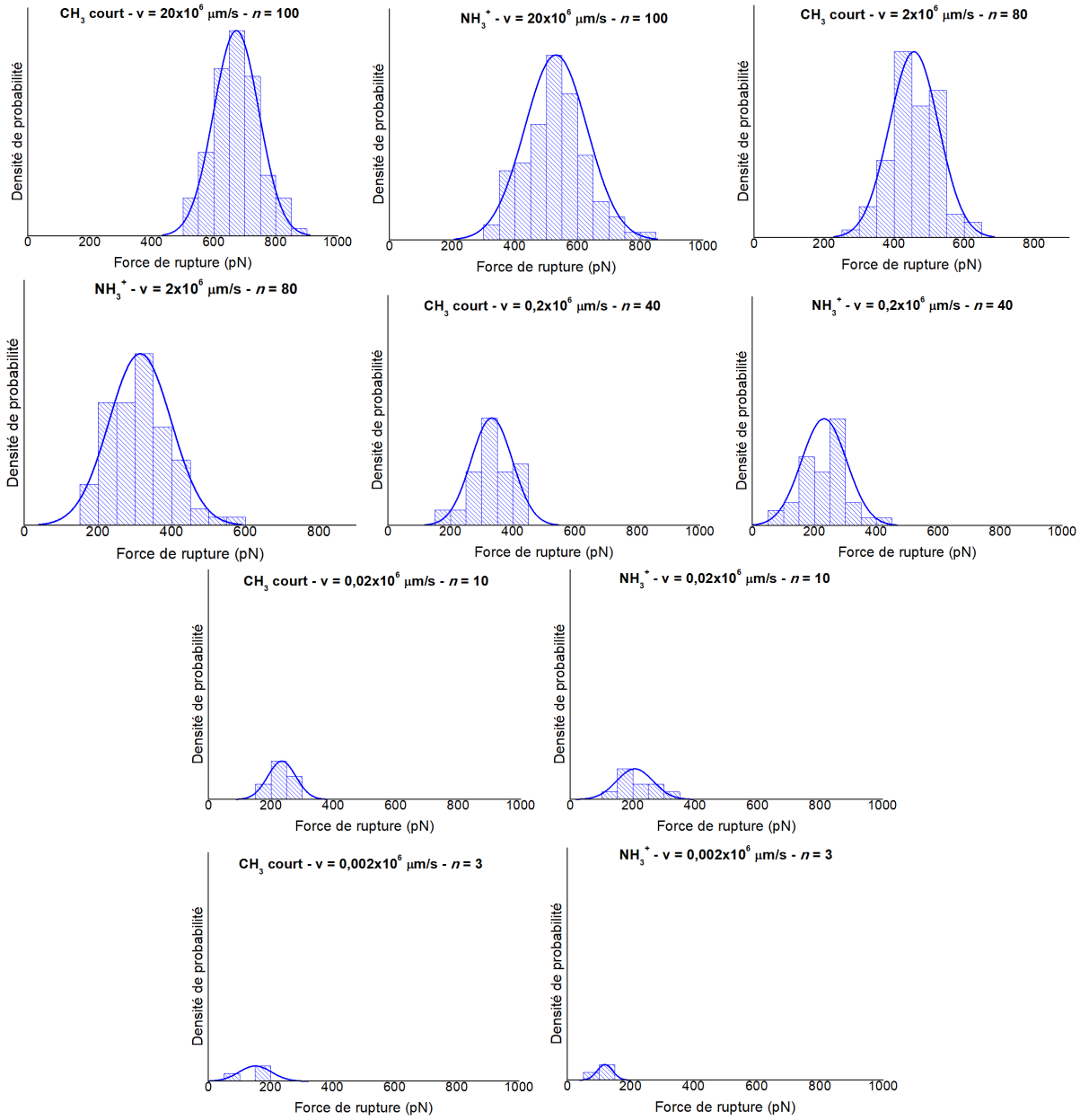


FIGURE 5.25 – *Histogrammes des forces de rupture de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ et déterminées par simulations SMD avec différentes vitesses de tirage.*

On observe que les forces de rupture et les temps de détachement sont fortement impactés par le choix de la vitesse de tirage : quelle que soit la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée, la force de rupture de la biotine diminue et le temps de détachement augmente lorsque la vitesse de tirage diminue. L'évolution de la force de rupture en fonction du *loading rate* suit globalement la même évolution que pour le complexe en solution (figure 5.22). De plus, les forces de rupture déterminées lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ sont du même ordre de grandeur que celles calculées par Rico *et al.* pour le complexe en solution [40]. Cela confirme le fait que la streptavidine conserve sa capacité à se lier à son ligand, la biotine, malgré les changements de conformation induits par son adsorption sur les monocouches de silanes.

Les forces de rupture déterminées lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes CH_3 court sont très proches de celles données par Rico *et al.* [40] pour le complexe en solution, en particulier pour les vitesses de tirage les plus élevées. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus dans la première partie concernant la streptavidine dimérique, et montre que les changements de conformation engendrés par l'adsorption de la streptavidine sur la monocouche de silanes CH_3 court sont suffisamment faibles pour permettre une bonne conservation des interactions streptavidine - biotine. De plus, on remarque qu'avec la vitesse de tirage $v = 0,2 \times 10^6$ μm·s^{-1} (c'est-à-dire pour un *loading rate* proche de celui considéré par Sedlak *et al.*), les valeurs des forces de rupture obtenues sont proches de celles déterminées lorsque la streptavidine est immobilisée par une liaison covalente [130].

Pour toutes les vitesses de tirage, les forces de rupture sont plus importantes lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche CH_3 court que sur la monocouche NH_3^+, en accord avec les résultats de la partie précédente, à propos de la streptavidine dimérique. Cependant, cette différence n'est pas directement expliquée par les changements globaux de conformation de la streptavidine tétramérique, puisque celle-ci présente des valeurs de RMSD équivalentes lorsqu'elle est adsorbée sur les deux monocouches de silanes ($3,4 \pm 0,2$ Å pour NH_3^+ et $3,5 \pm 0,1$ Å pour CH_3 court). En revanche, les différences observées dans les valeurs des forces de rupture pourraient être expliquées par des changements locaux de conformation : le RMSF de la chaîne A de la streptavidine présente en effet des valeurs différentes selon que celle-ci est adsorbée sur la monocouche NH_3^+ ou sur la monocouche CH_3 court, en particulier au niveau des boucles 3-4 et 4-5 (voir figure 5.17).

Avec la vitesse de tirage $v = 2 \times 10^6$ μm·s^{-1}, la force de rupture vaut 456 ± 70 pN lorsque la streptavidine tétramérique est adsorbée sur la monocouche CH_3 court et 314 ± 84 pN sur la monocouche NH_3^+. Nous remarquons que les forces de rupture étaient plus faibles avec la streptavidine dimérique : elles valaient 278 ± 91 pN avec la monocouche CH_3 court et 167 ± 60 pN avec la monocouche NH_3^+. Ce phénomène a également été observé par Rico *et al.* [40] entre la streptavidine tétramérique et la streptavidine monomérique, et peut être expliqué par l'effet stabilisateur associé aux interactions qui s'établissent entre les autres chaînes de la streptavidine tétramérique et la biotine, notamment avec le résidu 120Trp de la chaîne D (boucle 7-8), qui participe aux interactions avec la biotine localisée dans la poche de liaison de la chaîne A (voir figure 5.26). Dans notre cas, la différence entre les valeurs des forces de rupture obtenues pour la streptavidine dimérique et pour la streptavidine tétramérique pourrait également être expliquée par une stabilisation globale de la structure en présence des quatre chaînes de la streptavidine, qui diminuerait les changements de conformation et permettrait de mieux conserver la structure de la protéine observée en solution (rappelons que cette configuration tétramérique correspond à la structure observée dans la nature). Les valeurs de RMSD sont en effet plus petites pour la streptavidine tétramérique que pour la streptavidine dimérique : le RMSD de la streptavidine dimérique vaut $4,2 \pm 0,5$ Å lorsque celle-ci est adsorbée sur la monocouche CH_3 court et $5,0 \pm 0,9$

Å sur la monocouche NH_3^+.

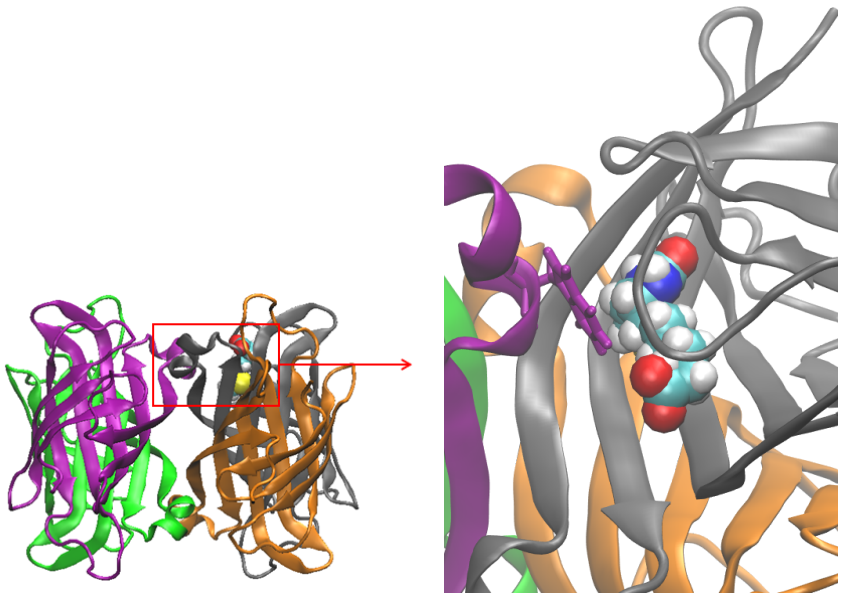


FIGURE 5.26 – *Illustration de la localisation du résidu 120Trp de la chaîne D par rapport à la biotine située dans la poche de liaison de la chaîne A sur la structure initiale du complexe streptavidine - biotine. La chaîne A de la streptavidine est représentée en gris, la chaîne B en orange, la chaîne C en vert et la chaîne D en violet, le résidu Trp120 de la chaîne D est représenté par des bâtonnets. Les atomes de la biotine sont représentés en jaune (silicium), rouge (oxygène), cyan (carbone), blanc (hydrogène), bleu (azote).*

En conclusion, lorsque la streptavidine est immobilisée sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, les forces de rupture de la biotine dépendent fortement de la vitesse de tirage et suivent globalement l'évolution en fonction de la vitesse proposée par Rico *et al.* [40]. Les forces de rupture sont systématiquement plus importantes lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court que sur la monocouche NH_3^+, ce qui illustre l'impact des propriétés physico-chimiques de la surface, ici la charge du groupement terminal des molécules de silane, dans les changements de conformation de la streptavidine et dans la force des interactions qui s'établissent avec la biotine. Les forces de rupture obtenues lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche CH_3 court sont proches de celles déterminées par Rico *et al.* pour le complexe en solution [40]. Les interactions streptavidine - biotine sont donc bien conservées dans ce cas et affaiblies lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche NH_3^+. Enfin, à vitesse de tirage égale, les forces de rupture sont plus importantes avec la streptavidine tétramérique qu'avec la streptavidine dimérique. La structure de la protéine et ses interactions avec la biotine sont donc stabilisées par la présence des quatre chaînes.

Effets de la monocouche de silanes et de la vitesse de tirage sur le chemin de détachement de la biotine Nous nous intéressons à présent au mécanisme de détachement de la biotine au cours des simulations SMD, et nous étudions les effets de la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée et de la vitesse de tirage sur ce mécanisme.

Pour le complexe en solution, l'étude de Rico *et al.* [40] a montré que le détachement entre la streptavidine et la biotine est un processus dynamique, qui présente différents chemins de détachement et différents états intermédiaires en fonction de la vitesse de tirage. De plus, l'existence d'états intermédiaires a été observée sur les courbes de force issues des simulations SMD et des

expériences d'AFM en mode HSFS. De façon générale, deux étapes ont été identifiées dans le processus de détachement. La première étape correspond à la rupture des liaisons hydrogène parallèles à la direction de tirage, entre la biotine et les résidus Ser27, Tyr43, Asn49 et Asp128 de la streptavidine, tandis que la deuxième étape correspond à la rupture des liaisons hydrogène pratiquement perpendiculaires à la direction de tirage, entre la biotine et les résidus Asn49, Tyr54 et Arg84.

Nous présentons le mécanisme de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur les deux monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court et toutes les vitesses de tirage étudiées dans les figures 5.27 à 5.36. Celles-ci présentent en (a) la distance moyenne au cours de la simulation SMD entre les différents résidus de la streptavidine consituant la poche de liaison et la biotine (moyenne calculée pour les n répliques de simulations réalisées, détaillées dans le tableau 5.6, page 155). Les résidus considérés sont les résidus de la poche de liaison à la biotine déterminés par Rico *et al.* [40] (résidus Leu25, Ser27, Tyr43, Ser45, Val47, Gly48, Ala50, Trp79, Ala86, Ser88, Thr90, Trp92, Trp108, Leu110 et Asp128), complétés par les résidus en contact avec la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court (résidus Asn23, Ala46, Asn49 et Phe130 de la chaîne A et Trp120 de la chaîne D), c'est-à-dire les résidus dont l'un des atomes est situé à moins de 0,5 nm de l'un des atomes de la biotine. De plus, les figures présentent en (b) une courbe de force typique pour le système et la force de tirage considérés. Enfin, nous indiquons en (c) la distance moyenne à la biotine au cours de la simulation SMD pour les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84 et Asn85 de la chaîne A et le résidu Lys121 de la chaîne D. Ces résidus ont en effet été identifiés dans les travaux de Rico *et al.* comme interagissant avec la biotine lors d'états intermédiaires du processus de détachement [40].

De façon générale, les courbes montrées en (a) et (c), qui présentent la distance moyenne à la biotine en fonction de l'avancement des simulations SMD, nous renseignent sur le processus de détachement. Au début de la simulation, quels que soient le système et la vitesse de tirage considérés, la distance à la biotine est constante. En effet, la force appliquée sur la biotine est trop faible pour la détacher de la streptavidine, et celle-ci conserve sa position dans la poche de liaison. Au bout d'un certain temps, la distance à la biotine commence à augmenter pour une partie des résidus considérés, montrant un éloignement de ces résidus, c'est-à-dire l'affaiblissement ou la rupture d'interactions avec la biotine. La distance à la biotine augmente ensuite pour les autres résidus de la streptavidine, ce qui illustre un détachement progressif entre la biotine et les différents résidus de la streptavidine. Enfin, la distance à la biotine augmente fortement pour tous les résidus, montrant que la biotine est sortie de la poche de liaison de la streptavidine et s'en éloigne, emportée par la force appliquée sur son centre de masse (selon la direction normale à la surface sur laquelle la streptavidine est adsorbée). Cependant, pour certaines vitesses de tirage (voir figures 5.31 et 5.32), on observe que la distance à la biotine diminue avant d'augmenter pour une partie des résidus présentés en (c), c'est-à-dire pour certains résidus parmi Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 (chaîne A) et 121Lys (chaîne D). Cela illustre l'établissement d'un état intermédiaire dans le processus de détachement, au cours duquel la biotine interagit plus fortement avec un ou plusieurs de ces résidus dont elle était auparavant plus éloignée.

Les différentes étapes du détachement et l'établissement d'états intermédiaires peuvent être reliés aux différents évènements observés sur les courbes de force montrées en (b). Ceux-ci sont numérotés de 1 à 3 sur les différentes figures. Le tableau 5.11 présente un bilan des différentes étapes du détachement pour les systèmes et les vitesses de tirage étudiés.

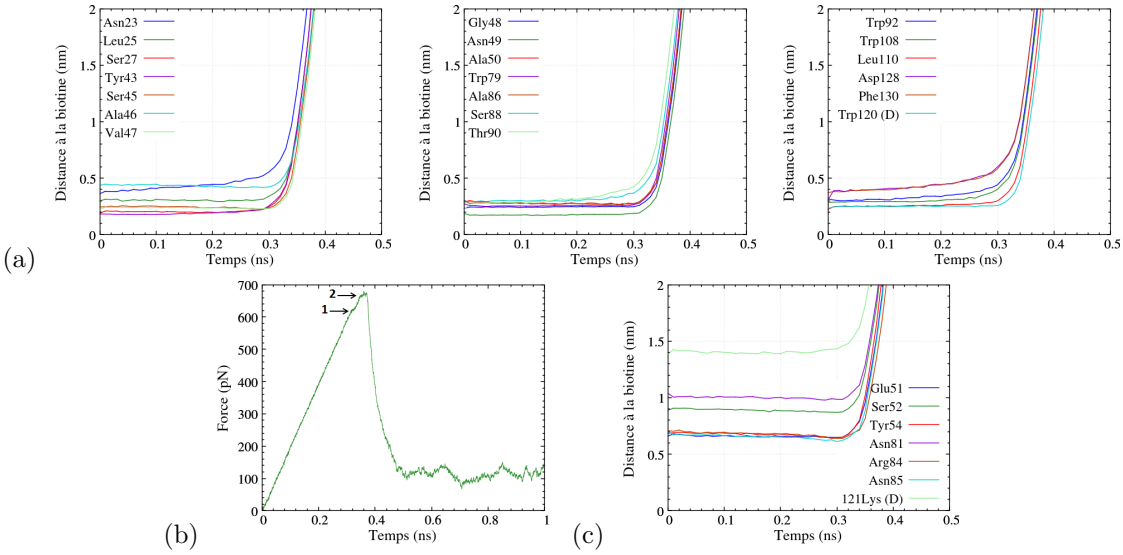


FIGURE 5.27 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 20 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 100)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

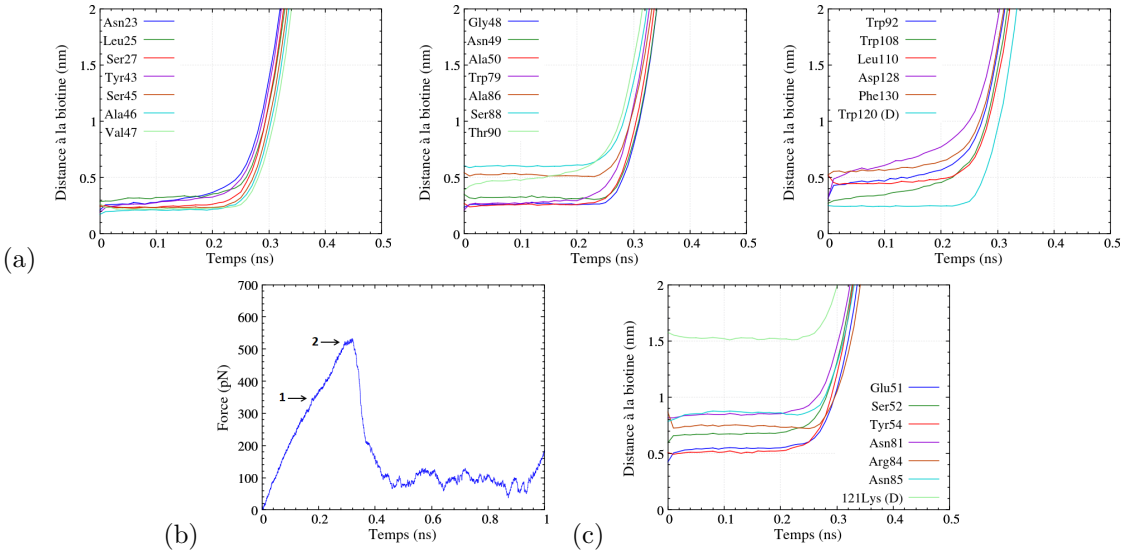


FIGURE 5.28 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes NH_3^+, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 20 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 100)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

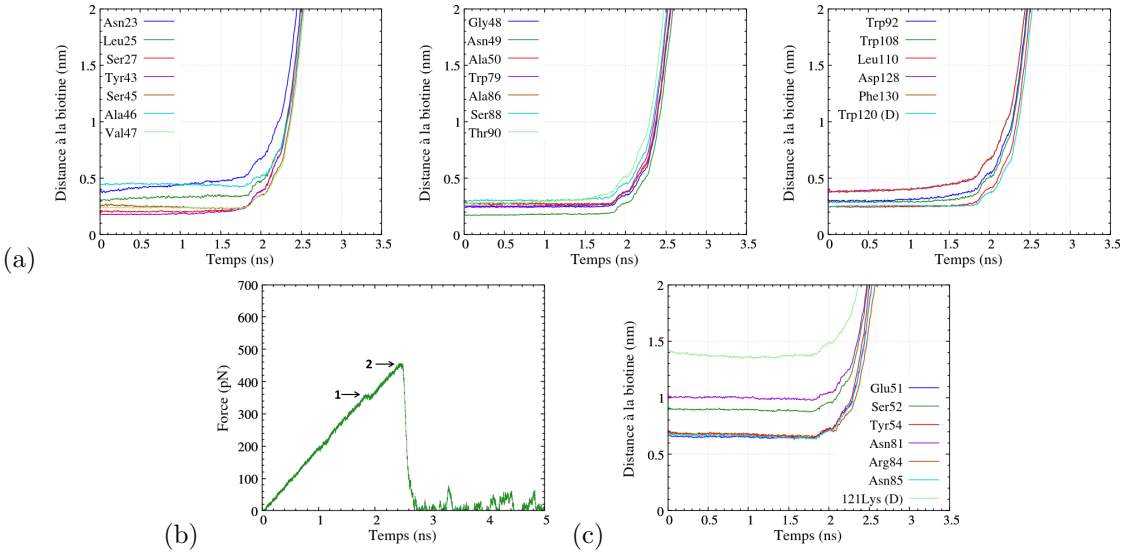


FIGURE 5.29 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 2 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 80)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

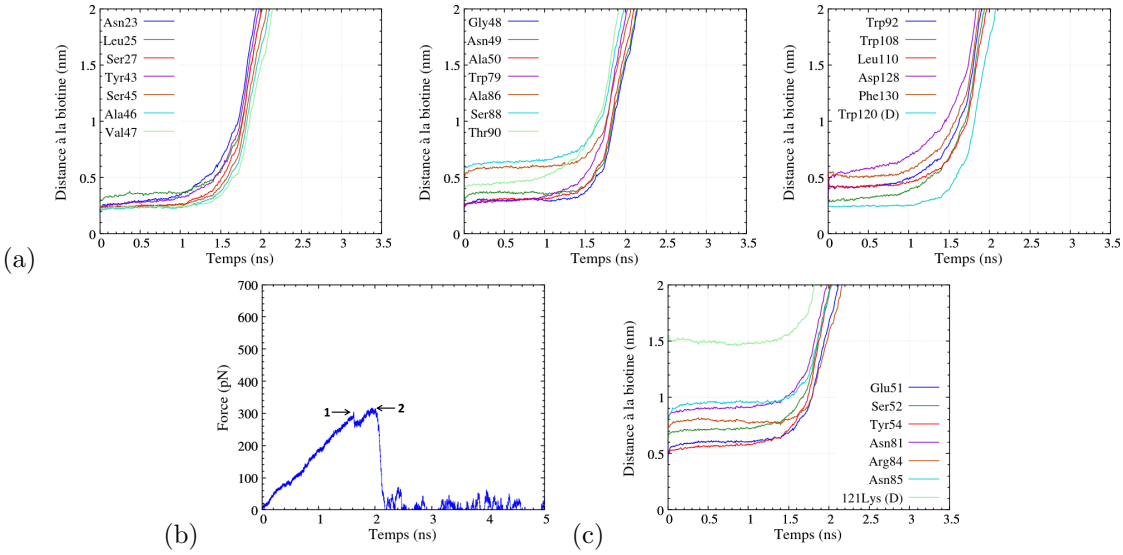


FIGURE 5.30 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes NH_3^+, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 2 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 80)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

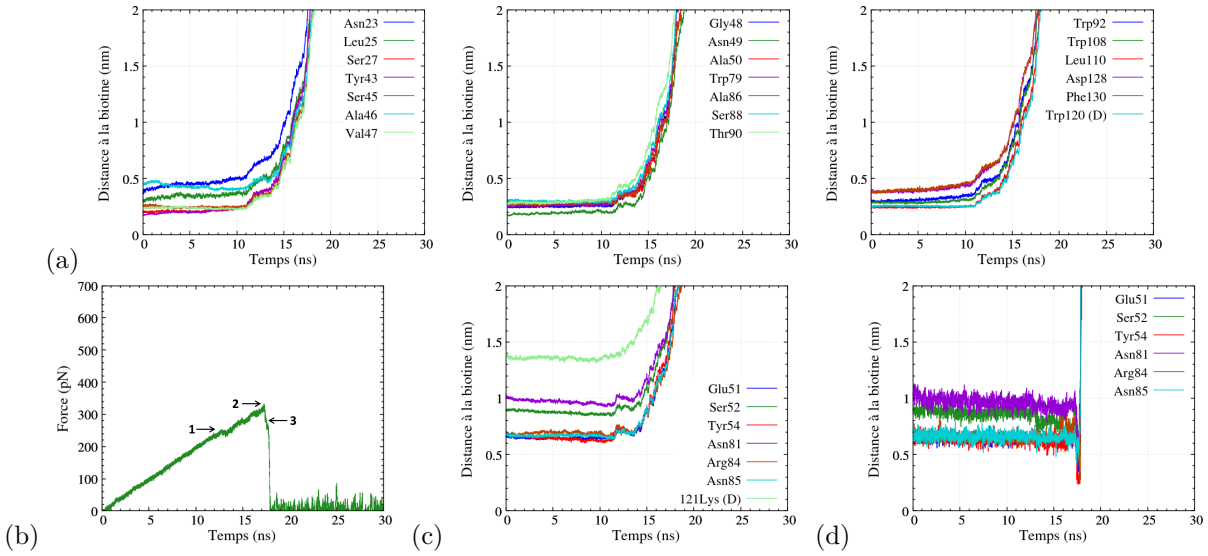


FIGURE 5.31 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 0,2 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 40)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié, (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et 121Lys de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations, et (d) évolution des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et la biotine pour l'une des répliques de simulations (le résidu 121Lys de la chaîne D n'est pas indiqué pour faciliter la lecture).*

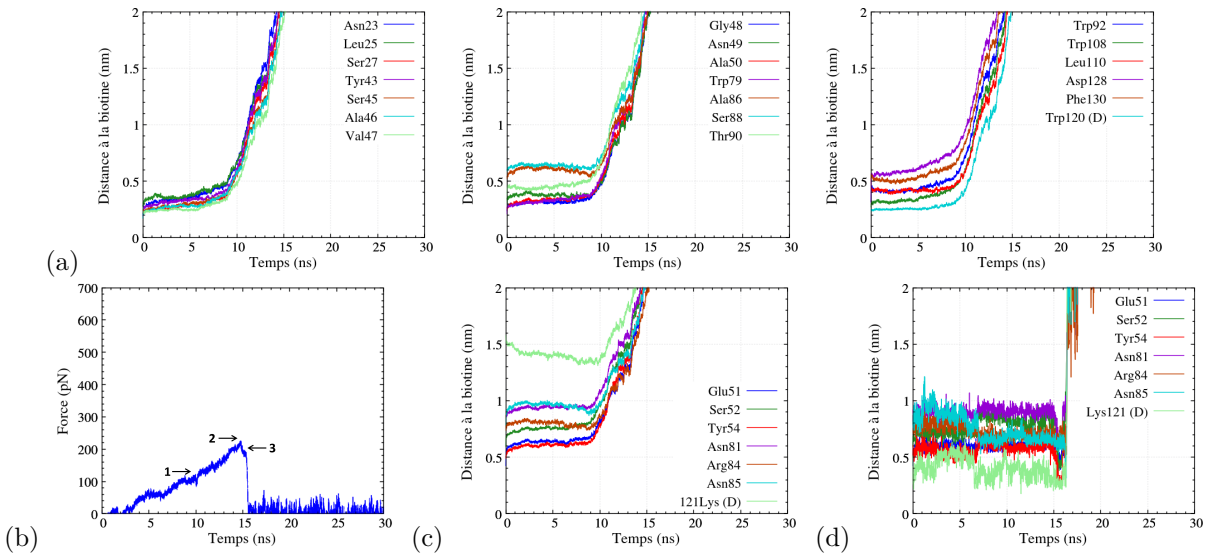


FIGURE 5.32 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes NH_3^+, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 0,2 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 40)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié, (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et 121Lys de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations, et (d) évolution des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour l'une des répliques de simulations.*

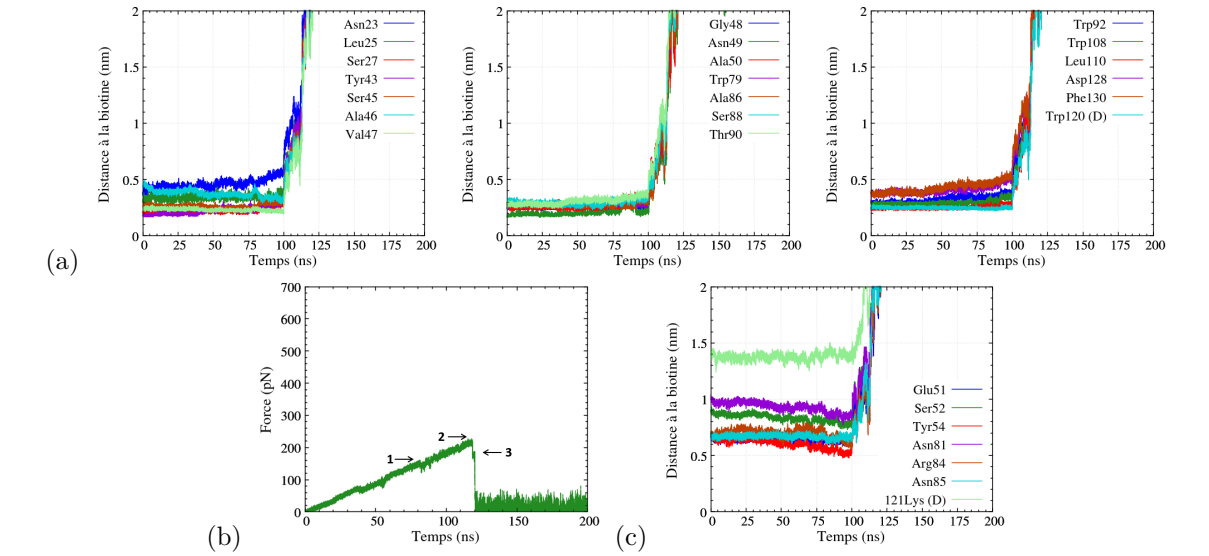


FIGURE 5.33 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 0,02 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 10)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

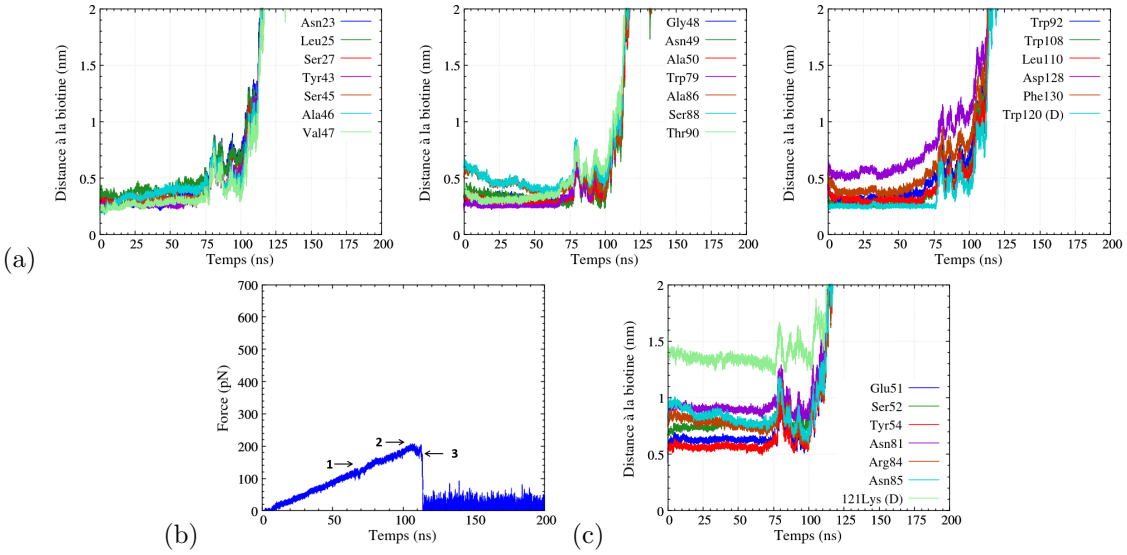


FIGURE 5.34 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes NH_3^+, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 0,02 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 10)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

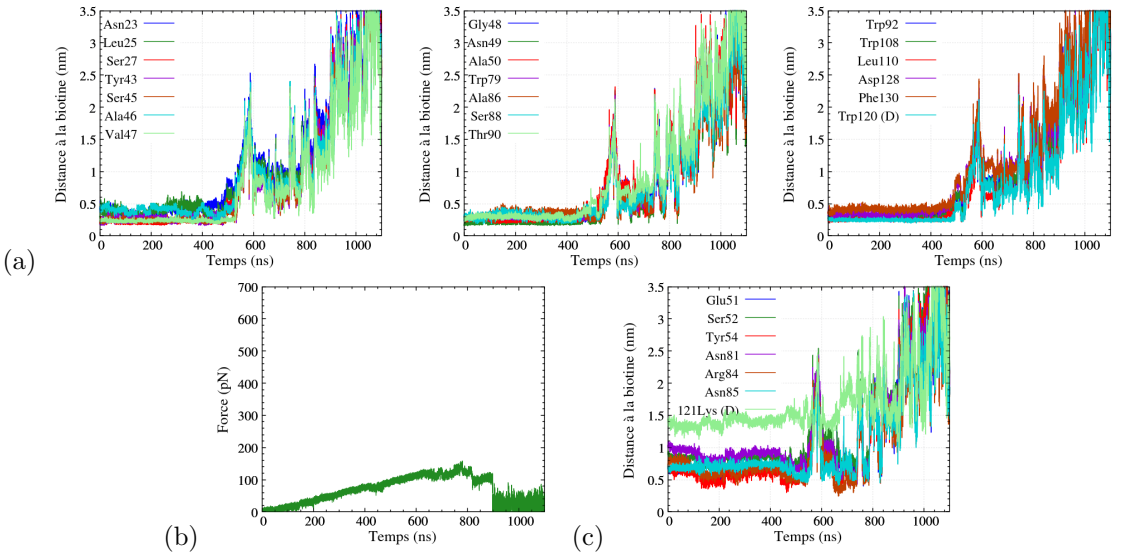


FIGURE 5.35 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage $v = 0,002 \times 10^6$ $\mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 3)$: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

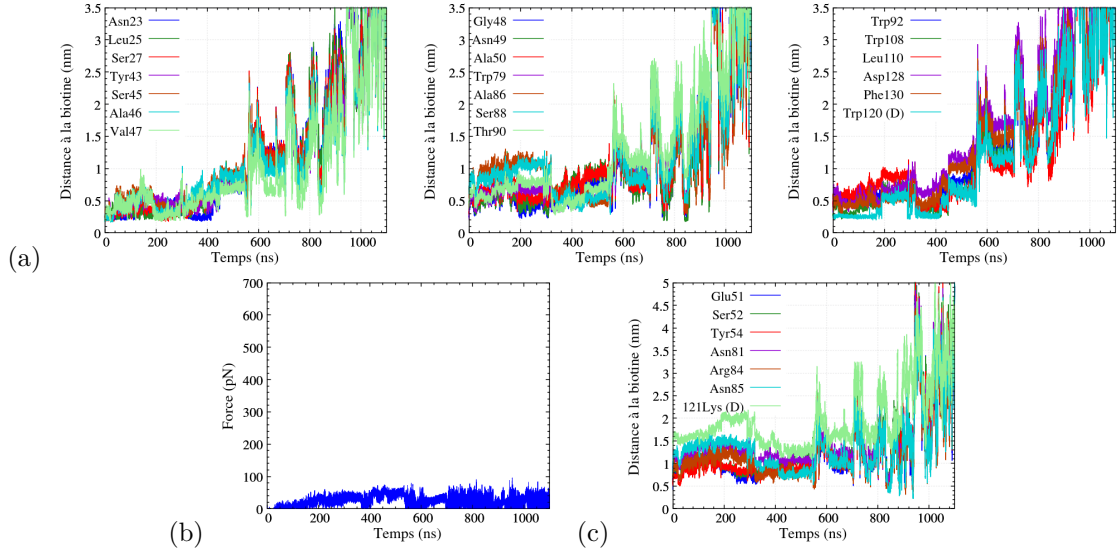


FIGURE 5.36 – *Processus de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes* NH_3^+*, déterminé par simulations SMD avec une vitesse de tirage* $v = 0,002 \times 10^6\ \mu m{\cdot}s^{-1}$ $(n = 3)$ *: (a) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus de la poche de liaison de la streptavidine et la biotine pour les différentes répliques de simulations, (b) courbe de force représentative pour le système étudié et (c) évolution de la moyenne des distances minimales entre les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84, Asn85 de la chaîne A et Lys121 de la chaîne D et la biotine pour les différentes répliques de simulations.*

Figure	Monocouche de silanes	v ($\times 10^6$ μm·s^{-1})	Nombre d'étapes	Interprétation
5.27	CH_3 court	20	2	1. Éloignement des résidus Asn23, Ser88, Trp90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus de la poche de liaison
5.28	NH_3^+	20	2	1. Éloignement des résidus Asn23, Thr90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus
5.29	CH_3 court	2	2	1. Éloignement des résidus Asn23, Ser88, Thr90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus
5.30	NH_3^+	2	2	1. Éloignement des résidus Asn23, Tyr43, Trp79, Thr90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus
5.31	CH_3 court	0,2	3	1. Éloignement des résidus Asn23, Thr90, Trp92, Tpr108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus de la poche de liaison 3. État intermédiaire impliquant les résidus Tyr54, Asn81, Arg84 et Asn85
5.32	NH_3^+	0,2	3	1. Éloignement des résidus Asn23, Trp92, Tpr108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement progressif des autres résidus de la poche de liaison 3. État intermédiaire impliquant les résidus Glu51, Ser52, Tyr54 et Arg84
5.33	CH_3 court	0,02	3	1. Éloignement des résidus Asn23, Thr90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130 2. Éloignement des autres résidus 3. État intermédiaire impliquant les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81 et Arg84
5.34	NH_3^+	0,02	3	1. Éloignement des résidus Asn23, Thr90, Trp92, Asp128 et Phe130 2. Éloignement des autres résidus 3. État intermédiaire impliquant les résidus Glu51, Arg84 et Asn85
5.35	CH_3 court	0,002		Détachement très lent, certaines liaisons pouvant se rompre puis se reformer
5.36	NH_3^+	0,002		Détachement très lent, certaines liaisons pouvant se rompre puis se reformer

Table 5.11 – *Tableau récapitulatif des différentes étapes du mécanisme de détachement de la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court ou NH_3^+, pour les différentes vitesses de tirage considérées.*

Pour toutes les figures 5.27 à 5.36 (a), on remarque qu'au début des simulations SMD, la distance moyenne à la biotine de certains résidus de la poche de liaison est très différente selon que la streptavidine est immobilisée sur la monocouche de silanes NH_3^+ ou sur la monocouche CH_3 court. En particulier, la distance à la biotine est plus importante pour les résidus Ala86 à Phe130

lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche NH_3^+. Ces modifications illustrent les changements de conformation de la streptavidine en fonction de la monocouche de silanes sur laquelle la protéine est immobilisée, et pourraient expliquer la diminution de la force de rupture (c'est-à-dire l'affaiblissement des interactions streptavidine - biotine) observée lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes NH_3^+.

Contrairement à la valeur de la force de rupture, on remarque que même si processus de détachement de la biotine dépend fortement de la vitesse de tirage, il dépend faiblement du type de monocouche de silanes. Pour les vitesses de tirage les plus élevées ($v = 20 \times 10^6$ μm·s^{-1} et $v = 2 \times 10^6$ μm·s^{-1}), le processus de détachement se divise en deux étapes, visibles sur les courbes de force, la première correspondant plutôt à la rupture des liaisons entre la biotine et les résidus Asn23, Ser88, Trp90, Trp92, Trp108, Asp128 et Phe130, et la seconde étant associée au détachement des autres résidus de la poche de liaison. Pour les vitesses de tirage plus faibles, une troisième étape apparaît dans le processus de détachement, qui correspond à la formation d'un état intermédiaire. La streptavidine peut par exemple établir des interactions avec les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84 ou Asn85.

Plus précisément, lorsque la vitesse de tirage vaut 20×10^6 μm·s^{-1} (figures 5.27 et 5.28), une fois que tous les résidus de la poche de liaison sont détachés, la distance moyenne à la biotine augmente rapidement : on n'observe pas de formation d'un état intermédiaire impliquant d'autres résidus pendant le processus de détachement. De plus on notera que, pour les deux monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court, les résidus pour lesquels la distance initiale à la biotine est conservée le plus longtemps, c'est-à-dire les résidus pour lesquels les interactions avec la biotine se rompent en dernier, sont les résidus de la boucle 3-4 (Ser45 à Ala50) et le résidu 120Trp de la chaîne D.

Lorsque la vitesse de tirage vaut 2×10^6 μm·s^{-1} (figures 5.29 et 5.30), quelques oscillations sont observées sur les courbes présentant la distance moyenne des différents résidus de la poche de liaison à la biotine (partie (a) des figures), qui pourraient traduire un ralentissement de la biotine lors de son détachement. Celui-ci s'expliquerait par la plus grande difficulté à rompre les liaisons entre la streptavidine et la biotine lorsque la vitesse de tirage diminue. Cependant, on n'observe pas de formation d'un état intermédiaire impliquant les autres résidus étudiés au cours du processus de détachement.

Pour la vitesse de tirage $v = 0,2 \times 10^6$ μm·s^{-1}, trois étapes peuvent être distinguées sur la courbe de force (figures 5.31 et 5.32). D'après la partie (a) des figures, les deux premières étapes correspondent toujours à l'éloignement progressif entre la biotine et les différents résidus de la poche de liaison de la streptavidine. Cependant, après une légère augmentation de la distance moyenne à la biotine, une petite stagnation et puis des oscillations sont observées pour les résidus de la poche de liaison, et une légère diminution également suivie d'oscillations est visible pour les résidus Glu51, Ser52, Tyr54, Asn81, Arg84 et Asn85. L'interprétation de ces variations observées sur les courbes de distances moyennes à la biotine étant difficile, on considère également les courbes déterminées pour chacune des répliques de simulations SMD, dont un exemple est présenté dans la partie (d) des figures. On observe sur certaines répliques une diminution plus prononcée, mais sur un plus court instant, de la distance à la biotine pour certains résidus de la streptavidine. On en déduit qu'il s'établit, au cours du processus de détachement de la biotine, un état intermédiaire où des interactions se créent avec ces résidus, qui n'appartiennent pas à la poche de liaison de la streptavidine. Cet état intermédiaire est visible au niveau du point 3 sur les courbes de force.

Lorsque la vitesse de tirage vaut $0,02 \times 10^6$ μm·s^{-1}, on observe toujours un processus de

détachement en trois étapes (figures 5.33 et 5.34). En effet, pour les résidus présentés dans les parties (a) et (c), on observe que la distance moyenne à la biotine augmente puis diminue à nouveau. Certaines interactions ont donc tendance à se rompre puis à se reformer au cours du processus de détachement, du fait de la faible vitesse de tirage qui est appliquée sur la biotine.

Enfin, on s'intéresse au détachement de la biotine pour la plus basse vitesse de tirage, $v = 0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1} (figures 5.35 et 5.36). On remarque que le processus de détachement de la biotine est très lent, certaines liaisons pouvant se rompre puis se reformer, comme le montrent les fortes oscillations observées sur les distances moyennes à la biotine pour les différents résidus étudiés et les nombreux évènements visibles sur les courbes de force. De plus, l'analyse des trajectoires obtenues montre qu'après sa sortie de la poche de liaison, la biotine continue à interagir avec la streptavidine au niveau d'autres résidus, malgré la force appliquée. Enfin, on observe que le bruit est très important, en particulier avec la monocouche NH_3^+, et il est difficile pour certaines trajectoires de distinguer la force à appliquer sur la biotine pour la faire sortir de la poche de liaison, de la force nécessaire pour rompre des liaisons qui s'établissent ensuite entre la biotine et d'autres résidus situés en surface de la streptavidine.

Ainsi, pour les vitesses de tirage élevées, nous observons un mécanisme de détachement des résidus de la poche de liaison en deux étapes, en accord avec les résultats présentés dans l'étude de Rico *et al.* pour le complexe streptavidine - biotine en solution [40] (les résidus correspondant aux différentes étapes ne sont pas exactement les mêmes, car nous n'avons pas considéré la même direction de tirage). Nous observons cependant que les résidus présents dans la première étape varient légèrement en fonction de la vitesse de tirage et de la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée. Pour les vitesses de tirage plus faibles, nous observons l'apparition d'états intermédiaires, indiquant que de nouvelles interactions s'établissent entre la biotine et certains résidus de la streptavidine n'appartenant pas à la poche de liaison et n'étant pas initialement directement en contact avec la biotine.

5.3.2.e Énergie de liaison entre la streptavidine et la biotine

Nous nous intéressons à présent à la détermination de l'énergie libre de liaison ($\Delta G_{liaison}$) entre la streptavidine et la biotine par *umbrella sampling*. La figure 5.37 présente le PMF (potentiel de force moyenne) obtenu lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches CH_3 court et NH_3^+ ainsi que les histogrammes des différentes configurations. Le PMF est déterminé grâce à la méthode WHAM, à partir des différentes fenêtres d'échantillonnage réparties le long du chemin de détachement.

Ces premiers résultats nécessiteront une analyse plus approfondie. Ils semblent néanmoins montrer qu'à la fois l'allure du PMF et la valeur de l'énergie de liaison sont impactées par la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée. En effet, la valeur de l'énergie de liaison correspond à la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale du PMF [41] : elle vaudrait donc approximativement 5 kcal·mol^{-1} lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche NH_3^+ et 4 kcal·mol^{-1} avec la monocouche CH_3 court. Ces résultats semblent montrer que l'énergie de liaison est plus importante avec la monocouche NH_3^+ qu'avec la monocouche CH_3 court, contrairement à ce que nous attendions d'après les forces de rupture déterminées avec les simulations SMD, qui sont plus élevées avec la monocouche CH_3 court. Notons cependant que pour les simulations SMD avec les plus basses vitesses de tirage, donc pour les trajectoires les plus proches de l'équilibre, la différence de force de rupture entre les deux monocouches de silanes est plus faible que pour les vitesses de tirage plus élevées. Concernant l'allure des PMF, nous observons que celui obtenu lorsque la streptavidine est immobilisée sur la monocouche NH_3^+ présente deux barrières d'énergie, tandis qu'avec la monocouche CH_3 court, nous n'observons qu'une seule barrière d'énergie.

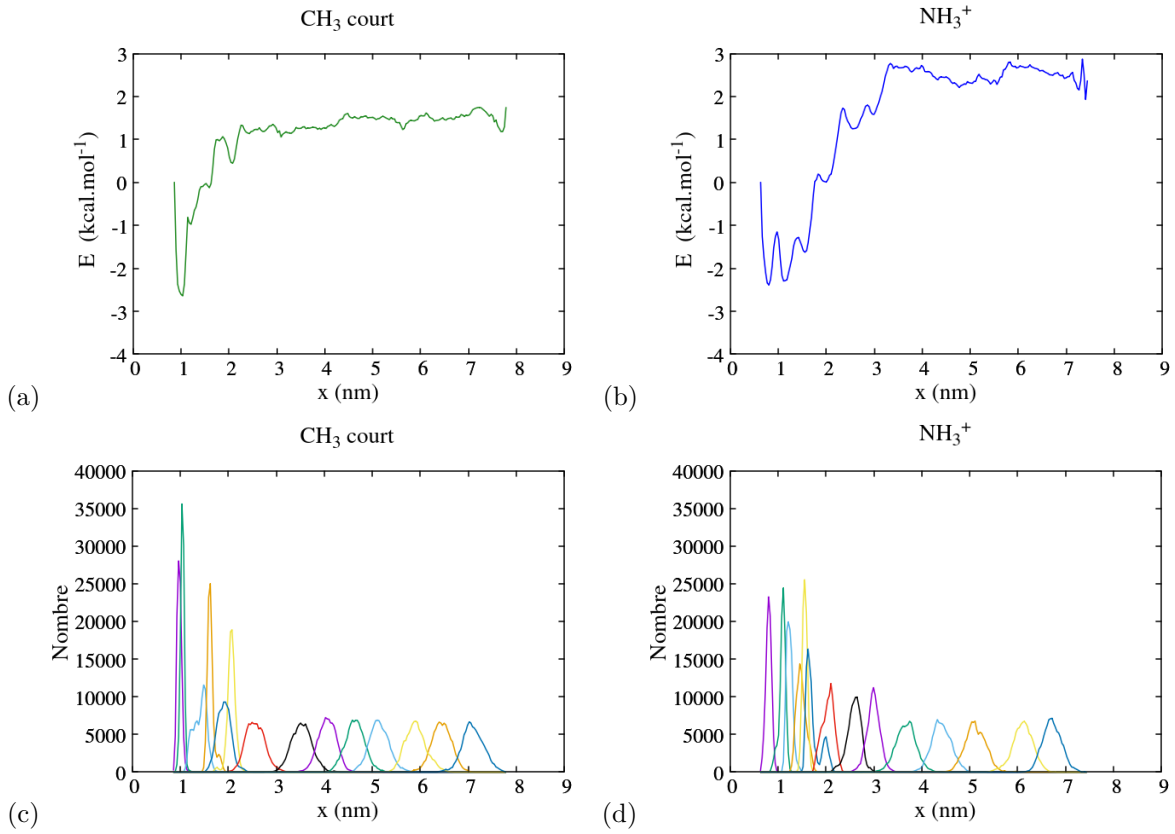


FIGURE 5.37 – *Détermination de l'énergie libre de liaison entre la streptavidine et la biotine lorsque la streptavidine est adsorbée sur les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ : (a) PMF et (c) histogramme des configurations lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche CH_3 court, (b) et (d) histogramme des configurations lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche NH_3^+.*

Une fois encore, ces résultats préliminaires nécessiteront une confirmation ainsi qu'une analyse plus approfondie. Nous devrons en particulier vérifier que la valeur choisie pour la constante de force convient et déterminer l'impact de la direction de tirage choisie (c'est-à-dire de la coordonnée de réaction), sur le chemin de détachement obtenu. Notons que le paysage d'énergie libre pour le complexe en solution, déterminé dans l'étude de Rico *et al.* [40] par dynamique brownienne, présente deux barrières d'énergie, valant respectivement 17 k_BT (soit environ $10\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$) et 21 k_BT (soit environ $12\,\mathrm{kcal{\cdot}mol^{-1}}$).

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au système modèle streptavidine - biotine. En couplant simulations de dynamique moléculaire et simulations SMD, nous avons étudié l'adsorption de la streptavidine sur différentes monocouches de silanes, les changements de conformation induits par cette adsorption et leur impact sur les interactions streptavidine - biotine. Nous avons comparé les résultats obtenus à différents travaux s'intéressant au complexe streptavidine - biotine en solution, à l'adsorption de la streptavidine sur des surfaces cristallines ou encore à l'immobilisation de la streptavidine par une liaison covalente.

Dans la première partie, nous avons étudié l'adsorption de la streptavidine dimérique sur les monocouches de silanes NH_3^+, CH_3 court, CH_3 long, mix court et mix long. Nous avons montré que les changements de conformation de la streptavidine dépendent du type de monocouche de silanes et sont plus importants avec les monocouches chargées ou présentant de longues chaînes alkyles. De plus, nous avons mis en évidence que lorsque la streptavidine est immobilisée sur les monocouches de silanes mix court et mix long, on observe des changements de conformation importants au niveau de la poche de liaison à la biotine. En revanche, la monocouche CH_3 court engendre les plus faibles changements de conformation et semble donc la plus appropriée pour ne pas perturber le processus de reconnaissance de la biotine.

Nous avons ensuite étudié l'impact de ces déformations sur les interactions streptavidine – biotine en modélisant le détachement de la biotine, pendant que la streptavidine reste immobilisée grâce aux interactions de Van der Waals et électrostatiques qui s'établissent avec les monocouches de silanes. Les simulations SMD ont été réalisées avec une vitesse de tirage de 2×10^6 $\mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. Nous avons choisi d'appliquer la force de tirage dans la direction normale à la surface pour imiter les expériences d'AFM en mode SMFS. Nous avons réalisé des simulations SMD sur différentes configurations initiales afin de prendre en compte les impacts de la variabilité des changements de conformation et de l'orientation finale du complexe sur la surface dans les forces de ruptures calculées. Nous avons montré que pour une même monocouche de silanes, les histogrammes des forces de rupture pour les différentes configurations initiales se superposent. Nous avons ensuite mis en évidence que la force de rupture moyenne diffère en fonction de la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée. La force de rupture obtenue lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche CH_3 court est très proche de celle déterminée pour le complexe en solution, tandis que les forces de rupture sont fortement diminuées lorsque la streptavidine est adsorbée sur les autres monocouches de silanes, jusqu'à plus de 50% avec la monocouche mix court. Ce résultat confirme que dans le cas du système streptavidine dimérique - biotine, la monocouche de silanes CH_3 court est la plus adaptée pour immobiliser la streptavidine.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'adsorption de la streptavidine tétramérique, plus étudiée expérimentalement, en se focalisant sur les monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court. Ces monocouches ont été choisies car la monocouche CH_3 court est

celle qui permet de préserver au mieux les interactions streptavidine dimérique – biotine, tandis que la monocouche NH_3^+ permet l'établissement d'interactions électrostatiques fortes et localisées avec la streptavidine. Comme avec la streptavidine dimérique, nous avons montré que le mécanisme d'adsorption de la protéine est modifié en fonction de la charge du groupement terminal des molécules de silane. Avec la monocouche de silanes NH_3^+, la surface de contact est plus faible, et les résidus de la streptavidine en contact avec la surface sont principalement polaires ou chargés négativement. On retrouve la plupart de ces résidus dans la surface de contact avec la monocouche de silanes CH_3 court, complétés par des résidus hydrophobes et non polaires. Nous avons montré que la structure de la protéine adsorbée est stabilisée par la présence des quatre chaînes et que la structure secondaire est bien préservée lorsque la streptavidine est immobilisée sur les deux monocouches NH_3^+ et CH_3 court. Cependant, les changements de conformation sont plus importants pour les chaînes B, C et D que pour la chaîne A de la streptavidine, et on explique cette différence par le fait que la boucle 3-4 reste fermée pour la chaîne A où se trouve la biotine, mais a tendance à s'ouvrir pour les autres chaînes au cours de la simulation.

Les interactions streptavidine - biotine ont ensuite été caractérisées par des simulations SMD réalisées sur une large gamme de vitesses, entre 20×10^6 μm·s^{-1} et $0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1}. Les simulations ont été réalisées sur une seule configuration initiale, représentative des différentes configurations obtenues, pour chacun des deux systèmes. Comme pour la streptavidine dimérique, nous avons constaté que les forces de rupture sont plus élevées lorsque la streptavidine tétramérique est adsorbée sur la monocouche CH_3 court que sur la monocouche NH_3^+.

Toutefois, nous avons remarqué que, pour une même vitesse de tirage, les forces de rupture obtenues sont plus élevées qu'avec la streptavidine dimérique. Nous expliquons cette différence à la fois par une plus grande stabilisation de la structure de la protéine tétramérique mais aussi par la prise en compte du rôle du résidu 120Trp de la chaîne D notamment (présent uniquement dans la protéine tétramérique). Il s'ajoute aux résidus constituant la poche de liaison à la biotine situés dans la chaîne A. De plus, on observe que les forces de rupture obtenues lorsque la streptavidine tétramérique est immobilisée sur la monocouche de silanes CH_3 court sont assez proches de l'évolution de la force de rupture en fonction de la vitesse de tirage donnée par Rico *et al.* [40] pour le complexe en solution. Les spectres de force dynamique obtenus pourraient être exploités pour déterminer des informations complémentaires concernant l'influence des changements de conformation induits par l'adsorption de la streptavidine sur le paysage d'énergie libre du complexe streptavidine – biotine [181]. Nous avons également montré que le chemin de détachement de la biotine est peu modifié par la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée, mais fortement impacté par la vitesse de tirage, avec l'apparition d'états intermédiaires dans les processus de détachement avec les plus faibles vitesses de tirage.

Enfin, les PMF déterminés par *umbrella sampling* semblent montrer que la nature de la monocouche de silanes sur laquelle la streptavidine est adsorbée impacte plus l'allure du PMF que la valeur de l'énergie libre de liaison obtenue. Cependant, ces calculs devraient être poursuivis, notamment pour déterminer l'impact de la direction de tirage choisie (c'est-à-dire de la coordonnée de réaction) sur le chemin de détachement obtenu.

Finalement, cette étude montre que les monocouches de silanes permettent d'immobiliser la streptavidine, tout en conservant sa capacité à se lier à la biotine, contrairement aux simulations de Müschck *et al.* [128] qui modélisent l'immobilisation de la streptavidine sur des surfaces cristallines de graphite et de TiO_2, et indiquent que celle-ci subit des changements de structure importants et perd sa capacité à se lier à la biotine. Nous observons cependant que l'adsorption de la streptavidine sur les différentes monocouches de silanes engendre des changements de conformation qui modifient ses interactions avec la biotine, de façon différente en fonction de la

nature de la monocouche. La monocouche de silanes qui permet de préserver au mieux les interactions streptavidine – biotine parmi celles étudiées est CH_3 court, tandis que les changements de conformation liés à l'adsorption de la streptavidine sur des molécules de silane présentant une longue chaîne alkyle ou un groupement terminal chargé engendrent un affaiblissement des interactions streptavidine - biotine.

Cette étude a été réalisée sur le système modèle streptavidine – biotine. L'objectif est à présent de déterminer si ces résultats peuvent être transposés pour d'autres types de protéines, par exemple des anticorps, qui pourraient être utiles pour la conception d'un outil de diagnostic.

CHAPITRE 6

Adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur des monocouches de silanes et effet sur ses interactions avec la protéine spike

6.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la possibilité de modéliser en simulations de dynamique moléculaire les changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine et leurs effets sur les interactions protéine – ligand, à l'aide du système modèle streptavidine - biotine. Nous avons montré que les propriétés physico-chimiques de la monocouche de silanes, en particulier la charge du groupement terminal et la longueur de la chaîne alkyle des molécules considérées, impactent le mécanisme d'adsorption de la protéine sur la surface.

Nous transposons à présent notre étude à un système réel, qui pourrait avoir une application dans le domaine des biocapteurs. Nous nous intéressons à un cas d'actualité, en étudiant l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes et son impact sur les interactions avec la protéine spike. En effet, le SARS-CoV-2 est le virus à l'origine de la pandémie de Covid-19 qui s'est répandue depuis décembre 2019, et la protéine spike est une protéine située à sa surface, qui joue un rôle central dans le processus d'infection virale. Cette protéine permet l'attachement du virus à la cellule-hôte, grâce à ses interactions avec le récepteur cellulaire ACE2, et la fusion des membranes. Depuis la pandémie, les interactions entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 ont été particulièrement étudiées, afin de mieux comprendre le processus d'infection virale, mais également de développer de nouvelles approches thérapeutiques (voir paragraphe 2.6, page 53).

Les tests antigéniques actuellement utilisés reposent sur la détection du SARS-CoV-2 par reconnaissance moléculaire de la protéine spike grâce à des anticorps spécifiques, qui se lient fortement à la protéine. L'intérêt de développer un biocapteur reposant sur les interactions entre la protéine spike et le récepteur cellulaire ACE2 est que les variants ne peuvent pas perdre leur capacité à se lier à ACE2, contrairement aux anticorps, puisque celui-ci constitue la porte d'entrée du virus dans les cellules-hôtes. L'objectif de ce chapitre est donc d'identifier quel type de monocouche de silanes serait le plus adapté pour immobiliser le récepteur cellulaire ACE2 tout en conservant sa capacité à interagir avec le domaine de liaison au récepteur, ou *Receptor-Binding Domain* (RBD) de la protéine spike du SARS-CoV-2, noté dans la suite « S-RBD ».

La première étape de notre étude consiste à sélectionner les monocouches de silanes les plus adaptées pour adsorber le récepteur cellulaire ACE2. Celles-ci doivent en effet permettre une

immobilisation forte du récepteur tout en conservant sa bioactivité, c'est-à-dire avec une orientation sur la surface lui permettant d'interagir avec la protéine spike et des changements de conformation au niveau du site de liaison suffisamment faibles pour conserver sa capacité à reconnaître la protéine spike. Nous étudions l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les six monocouches de silanes CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+, COO^-, mix court et mix long avec une densité de 3,0 nm^{-2}. De plus, nous modélisons l'adsorption d'ACE2 avec quatre orientations initiales différentes sur chaque monocouche de silanes. Nous déterminons l'énergie d'interaction entre ACE2 et les différentes surfaces (c'est-à-dire la somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie de liaison), afin d'identifier quelles orientations d'ACE2 seraient les plus favorables. Nous caractérisons ensuite les changements de conformation associés à l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les monocouches sélectionnées en calculant le RMSD (*root-mean-square deviation*), qui renseigne sur la déformation globale de la protéine, puis le RMSF (*root-mean-square fluctuation*), qui permet de localiser les changements de conformation. Nous modélisons également le récepteur cellulaire ACE2 en solution afin de vérifier que les changements de structure observés sont effectivement induits par l'adsorption sur les différentes monocouches de silanes.

La deuxième étape de notre étude est consacrée aux effets des changements de conformation induits par l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur ses interactions avec le S-RBD. Pour cela, nous modélisons l'adsorption du complexe ACE2 – S-RBD sur les monocouches de silanes et avec les orientations initiales sélectionnées dans la première partie. Nous réalisons aussi une simulation du complexe en solution, qui représente notre référence pour les interactions entre ACE2 et le S-RBD.Nous étudions les interactions entre le complexe immobilisé et les monocouches de silanes sélectionnées en déterminant l'énergie d'interaction et la surface de contact, c'est-à-dire le nombre et la nature des résidus du complexe en contact avec les molécules de silane. Nous caractérisons également les changements de conformation globaux du complexe lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes à l'aide du RMSD et de la structure secondaire. Les changements de conformation sont ensuite localisés à l'aide du RMSF. Nous nous intéressons plus particulièrement aux effets de l'adsorption d'ACE2 sur les interactions ACE2 – S-RBD en déterminant la surface de contact entre les deux protéines et le nombre de liaisons hydrogène établies, pour les différents systèmes, c'est-à-dire pour le complexe en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes identifiées.

La troisième étape de notre étude est consacrée à la réalisation de simulations SMD modélisant une expérience d'AFM en mode SMFS où le S-RBD serait immobilisé sur la pointe de l'AFM, afin d'estimer les effets des changements de conformation identifiés sur la force des interactions qui s'établissent entre ACE2 et le S-RBD. Les simulations sont réalisées avec une vitesse de tirage de 2×10^6 $\mu m \cdot s^{-1}$ pour les différents systèmes et nous déterminons la force de rupture et le temps de détachement du S-RBD.

Dans la quatrième partie de notre étude, l'énergie libre de liaison entre ACE2 et le S-RBD est calculée pour les différents systèmes par MM-PBSA en utilisant le logiciel g_mmpbsa [54]. Nous souhaitons également déterminer, en fonction de la monocouche de silanes sur laquelle ACE2 est immobilisé, quels résidus présentent un effet stabilisateur ou déstabilisateur des interactions ACE2 – S-RBD par rapport au complexe en solution. Pour cela, nous identifions les contributions de chacun des résidus à l'énergie libre de liaison et nous calculons la variation d'énergie libre de liaison pour chaque résidu par rapport au complexe en solution.

Enfin, nous vérifions la cohérence des résultats obtenus en comparant la structure du complexe en solution à celle modélisée par Ali *et al.* [143]. De plus, nous confrontons nos résultats aux travaux de Laurini et al. [136, 144], qui ont déterminé l'importance relative des différents

résidus de l'interface dans l'établissement des interactions entre ACE2 et le S-RBD .

Les simulations décrites ci-dessus ont été réalisées grâce aux 5 500 000 heures de calcul qui nous ont été allouées sur le supercalculateur Occigen du CINES. Ce chapitre présente les résultats obtenus et développés dans l'article suivant, récemment accepté dans le journal *J. Phys. Chem. B* : S. Lecot, Y. Chevolot, M. Phaner-Goutorbe, C. Yeromonahos. The Curious Binding Energy Increase between the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Adsorbed on a Silane Monolayer, from Molecular Dynamics Simulations.

6.2 Méthode

6.2.1 Présentation du modèle

Les simulations sont réalisées à partir de la structure 6M0J [135] du complexe ACE2 - S-RBD publiée sur la Protein Data Bank [138]. Cette structure comporte les résidus Thr333 à Gly526 du S-RBD et les résidus Ser19 à Asp615 du récepteur cellulaire ACE2 (voir figure 6.1).

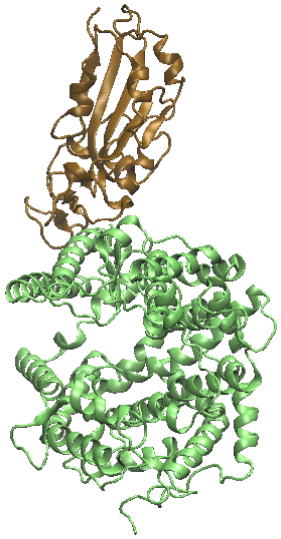


FIGURE 6.1 – *Image du complexe ACE2 - S-RBD. Le récepteur cellulaire ACE2 est représenté en vert clair et le S-RBD en marron.*

Les molécules d'eau sont conservées, mais l'ion zinc et les quatre molécules de glycane contenues dans la structure initiale ne sont pas considérés pour cette étude. Pour les systèmes comportant une surface de SiO_2 amorphe fonctionnalisée par une monocouche de silanes, la structure de la couche de SiO_2 est reprise de l'étude de Roscioni *et al.* [69] et redimensionnée à la taille de la boîte de simulation, avec une épaisseur de 2 nm. Six monocouches de silanes sont considérées, toutes avec une densité de 3,0 nm^{-2} : il s'agit des monocouches CH_3 court, NH_3^+, CH_3 long, COO^-, mix court et mix long. Les molécules de silane sont initialement placées sur la surface en suivant la méthode présentée au paragraphe 3.2, page 70. Des molécules d'eau sont ajoutées ainsi que des ions Na^+ et Cl^-, pour compenser les charges, et avec une concentration de 0,150 $mol{\cdot}L^{-1}$ pour reproduire les conditions physiologiques. Enfin, un mur de Lennard-Jones est placé en haut de la boîte, pour bloquer les interactions entre l'eau et la face inférieure du SiO_2. Le système ne présente donc des conditions périodiques que selon les directions x et y.

Les paramètres de champ de force pour la surface de SiO_2 amorphe et les molécules de silane sont ceux décrits au paragraphe 3.2, page 70 et en annexe A, page 221. Le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD sont modélisés avec le champ de force OPLS tout-atome [31], de même que le modèle d'eau TIP4P [153] et les ions Na^+ [154] et Cl^- [155]. Les paramètres utilisés pour le champ de force du mur de Lennard-Jones sont issus des travaux de Kitabata *et al.* [111].

6.2.2 Protocole de simulation

6.2.2.a Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles

Les simulations sont réalisées avec le logiciel Gromacs, version 5.1.3 [148] et la visualisation avec VMD, version 1.9 [149]. Tout d'abord, une étape de minimisation de l'énergie est effectuée, avec la méthode de la plus grande pente (*steepest descent method*). Les équilibres NVT et NPT sont ensuite réalisés, chacun avec une durée de 100 ps et une température de 300 K. Enfin, plusieurs productions indépendantes sont réalisées. Les équations du mouvement sont intégrées avec l'algorithme *leap-frog* et un pas de temps de 2 fs. L'algorithme LINCS est utilisé pour appliquer des contraintes aux paramètres de liaison. La température est conservée à 300 K avec un thermostat de Nosé-Hoover et une constante de temps de 0,4 ps. La pression est maintenue à 1 bar avec un barostat de Parrinello-Rahman utilisant une constante de temps de 12 ps. Les interactions électrostatiques à longue distance sont calculées avec la méthode *particle-mesh Ewald* [34] et un *cut-off* de 1 nm. Le même *cut-off* est utilisé pour les potentiels de Lennard-Jones.

Adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silane Le processus d'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 seul sur les différentes monocouches de silanes est étudié en considérant 25 systèmes différents. Le premier système présente le récepteur cellulaire ACE2 en solution et sert ici de référence. Les 24 autres systèmes comportent une monocouche de silanes (CH_3 court, NH_3^+, CH_3 long, COO^-, mix court ou mix long) et le récepteur cellulaire ACE2 est initialement placé 0,8 nm au-dessus des molécules de silane, avec l'une des quatre orientations initiales définies dans le tableau 6.1. En considérant l'orientation 1 comme référence, les orientations 2, 3 et 4 sont obtenues par rotation, respectivement, de $180\,°$, $90\,°$ et $-90\,°$ le long de l'axe y. Un exemple de système à l'état initial est présenté sur la figure 6.2. Les boîtes de simulation présentent des dimensions de 10,6 nm $\times$ 10,6 nm $\times$ 19 nm et plus de 230 000 atomes. Trois répliques de simulations indépendantes de 100 ns sont réalisées pour chaque système (soit un total de 75 simulations de 100 ns), afin d'observer le processus d'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les différentes monocouches de silanes et la stabilisation du système.

Adsorption du complexe sur les monocouches de silane sélectionnées Le processus d'adsorption du complexe, sur les monocouches de silanes et avec les orientations initiales sélectionnées grâce à la première étape, est étudié grâce à quatre systèmes différents. Le premier système comporte le complexe ACE2 - S-RBD en solution, et sert, comme précédemment, de référence. Les autres systèmes incluent les monocouches de silanes retenues (CH_3 court, mix court et mix long). De plus, le complexe est placé 0,8 nm au dessus des molécules de silane, avec l'orientation initiale la plus favorable (orientation 4 pour CH_3 court, orientation 1 pour mix court et mix long). Un exemple de système à l'état initial est présenté sur la figure 6.3. Les boîtes de simulation présentent des dimensions de 13,8 nm $\times$ 13,8 nm $\times$ 24 nm et plus de 510 000 atomes. Six répliques de simulations indépendantes de 200 ns ont été réalisées pour chaque système (soit un total de 24 simulations de 200 ns), afin d'observer le processus d'adsorption du complexe sur les monocouches de silanes et la stabilisation du système.

Orientation initiale 1	Orientation initiale 2	Orientation initiale 3	Orientation initiale 4

TABLE 6.1 – *Présentation des quatre orientations initiales étudiées pour le complexe ACE2 - S-RBD. Le récepteur cellulaire ACE2 est représenté en vert clair et le S-RBD en marron.*

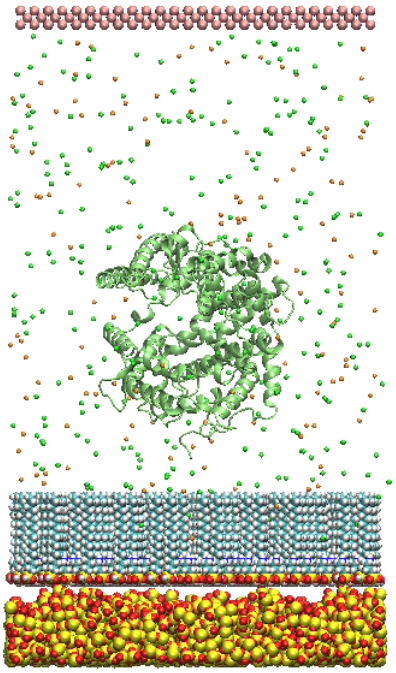


FIGURE 6.2 – *Image du système avec la monocouche de silanes mix long et le récepteur cellulaire ACE2 dans l'orientation 1 à l'état initial. Le récepteur cellulaire ACE2 est réprésenté en vert pâle, les atomes et les ions sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène), bleu foncé (azote), orange (Na^+), vert (Cl^-) et rose (mur de Lennard-Jones). Les molécules d'eau ne sont pas représentées. Le récepteur cellulaire ACE2 est initialement placé 0,8 nm au-dessus des molécules de silane.*

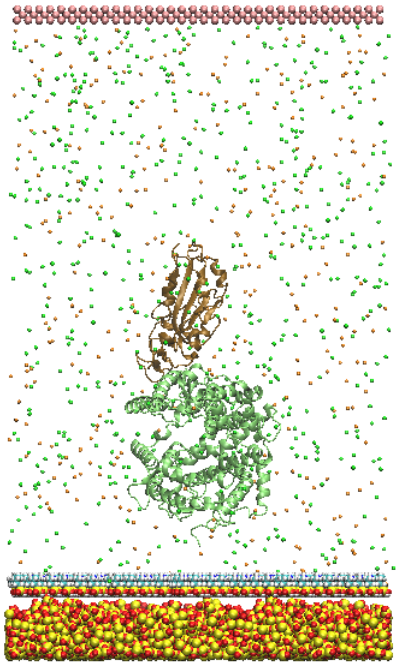


FIGURE 6.3 – *Image du système avec la monocouche de silanes mix court et complexe ACE2 - S-RBD dans l'orientation 1 à l'état initial. Le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD sont représentés respectivement en vert pâle et en marron. Les atomes et les ions sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène), bleu foncé (azote), orange (Na^+), vert (Cl^-) et rose (mur de Lennard-Jones). Les molécules d'eau ne sont pas représentées. Le complexe est placé 0,8 nm au dessus des molécules de silane.*

6.2.2.b Simulations SMD : étude du détachement du S-RBD

Les configurations initiales des simulations SMD sont sélectionnées parmi les états finaux des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles. Lors des simulations SMD, une force externe est appliquée sur le centre de masse du S-RBD pour le détacher du récepteur cellulaire ACE2. Pour le système en solution, une restriction de position est appliquée sur le centre de masse d'ACE2, afin d'empêcher son mouvement et de permettre le détachement du S-RBD. En pratique, la restriction de position est appliquée sur l'atome du récepteur cellulaire ACE2 le plus proche de son centre de masse (hors atomes d'hydrogène). En revanche, aucune restriction de position n'est appliquée au récepteur cellulaire ACE2 lorsque celui-ci est adsorbé sur une monocouche de silanes, et aucune liaison covalente n'est définie avec la surface : les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques qui s'établissent entre ACE2 et la couche de SiO_2 fonctionnalisée sont suffisantes pour empêcher sa désorption pendant que le S-RBD est entraîné par la force appliquée. Cette force est un potentiel harmonique, avec une constante de force $k = 100\,\mathrm{pN/nm}$ et une vitesse $v = 2 \times 10^6\ \mu\mathrm{m{\cdot}s^{-1}}$. Pour reproduire les expériences d'AFM, la force est appliquée sur le S-RBD dans la direction normale à la surface. Au moins deux configurations initiales sont considérées pour chaque système, afin de tenir compte des effets de la direction de tirage et de la variabilité des changements de conformation d'ACE2, induits par son adsorption sur la surface. Les boîtes de simulation sont agrandies à une hauteur de 32 nm, afin de satisfaire la convention de l'image minimale. Cette nouvelle boîte de simulation contient plus de 760 000 atomes. Une étape de minimisation de l'énergie et un équilibre NPT sont réalisés, puis les répliques de simulations avec une durée de 6 ns. Les équations du mouvement sont résolues avec un pas de temps de 2 fs. 20 répliques de simulations indépendantes sont effectuées pour chaque configuration initiale (au total, 160 simulations SMD ont été réalisées).

6.2.3 Paramètres d'analyse

Simulations de dynamique moléculaire conventionnelles Sauf précision contraire, les valeurs données pour les différents paramètres sont des valeurs moyennes déterminées sur les dernières 10 ns des simulations de 100 ns ou 200 ns, et l'erreur donnée correspond à l'écart-type calculé par rapport aux résultats des différentes productions. On appelle énergie d'interaction la somme des contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction. Les paramètres étudiés, notamment le RMSD, le RMSF, les liaisons hydrogène et la structure secondaire des protéines, ainsi que la surface de contact entre le récepteur cellulaire ACE2 et les molécules de silane et celle entre ACE2 et le S-RBD sont présentés en détails au paragraphe 3.4, page 79. Les atomes du récepteur cellulaire ACE2 sont considérés comme en contact avec la monocouche de silanes, avec la couche de SiO_2 amorphe ou avec le S-RBD s'ils sont situés à moins de 0,4 nm d'un atome d'une molécule de silane, de la couche de SiO_2 ou du S-RBD respectivement.

Détermination de l'énergie d'interaction par MM-PBSA L'énergie libre de liaison entre le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD (ΔG) est déterminée par MM-PBSA (voir paragraphe 1.4.2.c, page 29), à l'aide de l'outil g_mmpbsa [54]. Les approximations et les hypothèses réalisées dans les calculs de MM-PBSA ne permettent pas d'interpréter les valeurs d'énergie libre de liaison de façon quantitative, mais celles-ci peuvent être comparées, de façon qualitative, entre les différents systèmes. Les valeurs données sont des moyennes calculées sur la dernière ns de la simulation (un point toutes les 100 ps). Les paramètres sélectionnés sont les suivants : constante diélectrique du soluté (pdie = 16), résolution des équations de Poisson-Boltzmann non-linéaire (npbe), calcul de l'énergie de solvatation non polaire avec le modèle SASA.

Simulations SMD La force de rupture est déterminée grâce à la courbe présentant la force appliquée sur le S-RBD en fonction du temps, et définie comme la force la plus élevée avant son détachement. La force de rupture et la durée du détachement sont déterminées pour chaque

réplique de simulation, et on en déduit les valeurs moyennes, les écarts-type et l'histogramme des forces de rupture.

6.3 Résultats et discussion

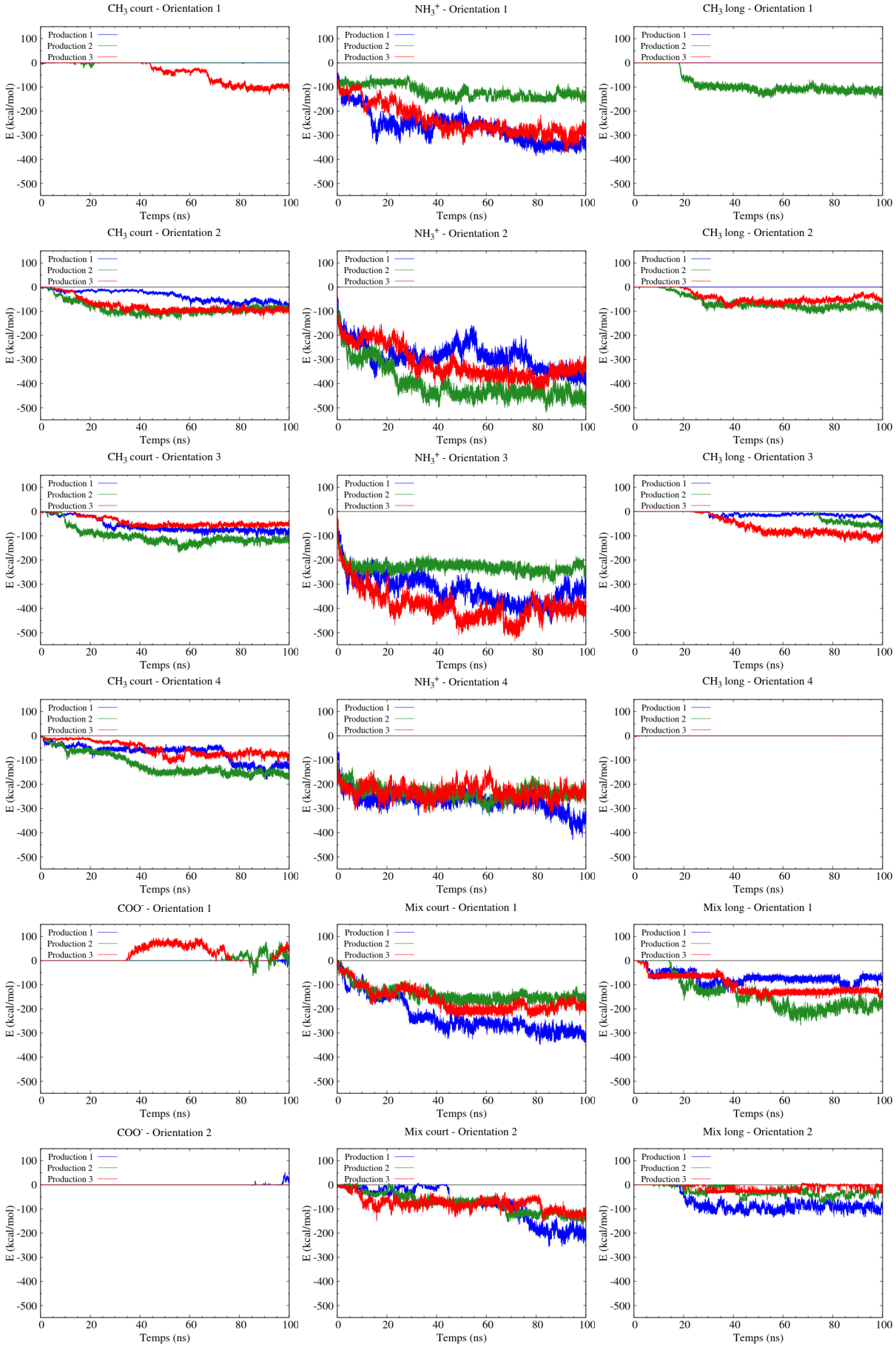
6.3.1 Adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes, avec quatre orientations initiales

Dans cette première partie, on s'intéresse aux simulations de dynamique moléculaire conventionnelles modélisant l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 seul, sur les six monocouches de silanes.

6.3.1.a Évolution de l'énergie d'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et les molécules de silane

Nous souhaitons tout d'abord déterminer quelles monocouches de silanes sont les plus adaptées pour l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2. En effet, les monocouches sélectionnées doivent favoriser une immobilisation systématique d'ACE2 et son orientation sur la surface doit lui permettre de conserver sa capacité à capturer le S-RBD. D'après les images présentées sur la figure 6.1, si le récepteur cellulaire est adsorbé sur une surface avec l'orientation initiale 1, les résidus de l'interface, c'est-à-dire ceux interagissant avec le S-RBD, se trouvent sur le dessus de la protéine, qui peut donc conserver la capacité à capturer le S-RBD. Au contraire, avec l'orientation 2, les résidus de l'interface se retrouvent en dessous de la protéine et au contact des molécules de silane. Le récepteur cellulaire ACE2 ainsi immobilisé perd donc sa capacité à interagir avec le S-RBD. Finalement, avec les orientations 3 et 4, la zone d'interface se trouve sur le côté du récepteur cellulaire ACE2, et devrait donc être accessible pour interagir avec le S-RBD. Cependant, cette zone est très proche de la surface, et des interactions entre le S-RBD et les molécules de silane pourraient perturber les interactions avec ACE2.

Nous cherchons donc à identifier les monocouches de silanes pour lesquelles l'immobilisation d'ACE2 est systématique (sur les 3 répliques de simulations réalisées) et l'orientation 1 est la plus favorable, ou éventuellement les orientations 3 et 4. L'orientation la plus favorable est la plus stable, c'est-à-dire celle dont l'énergie d'interaction entre ACE2 et les molécules de silane est la plus basse. Les courbes présentant l'évolution de l'énergie d'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et des différentes monocouches de silanes sont détaillées sur la figure 6.4 et un récapitulatif des fréquences d'immobilisation d'ACE2 sur les monocouches de silanes et des énergies d'interaction est présenté dans le tableau 6.2.


CH3 court - Orientation 1
NH3+ - Orientation 1
CH3 long - Orientation 1
CH3 court - Orientation 2
NH3+ - Orientation 2
CH3 long - Orientation 2
CH3 court - Orientation 3
NH3+ - Orientation 3
CH3 long - Orientation 3
CH3 court - Orientation 4
NH3+ - Orientation 4
CH3 long - Orientation 4
COO- - Orientation 1
Mix court - Orientation 1
Mix long - Orientation 1
COO- - Orientation 2
Mix court - Orientation 2
Mix long - Orientation 2
Production 1
Production 2
Production 3
E (kcal/mol)
Temps (ns)

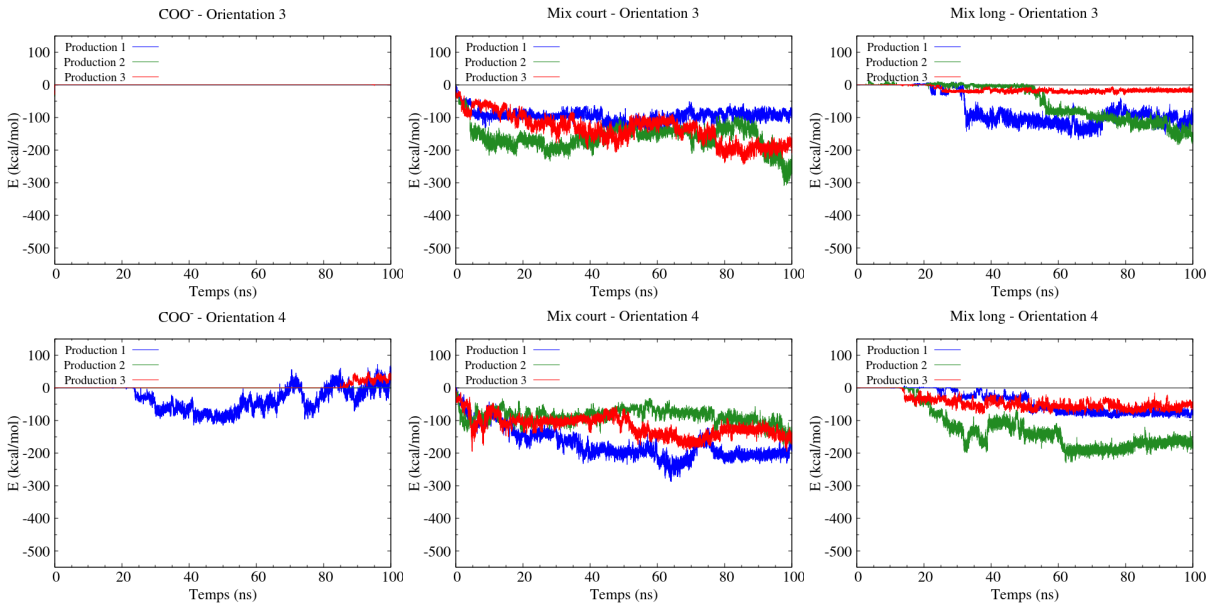


FIGURE 6.4 – *Évolution de l'énergie d'interaction entre le récepteur cellulaire ACE2 et les différentes monocouches de silanes au cours de la simulation.*

Avec la monocouche CH_3 court et l'orientation initiale 1 pour ACE2, on observe que la protéine ne s'immobilise sur la surface que pour une seule des trois répliques de simulations, après 45 ns environ. Avec les orientations initiales 2, 3 et 4, l'immobilisation d'ACE2 sur la surface est rapide et systématique pour les 3 répliques de simulations. De plus, les interactions entre ACE2 et les molécules de silane se stabilisent progressivement, comme le montre la diminution de l'énergie d'interaction au cours de la simulation. L'orientation initiale 4 est la plus favorable puisqu'elle conduit à l'énergie d'interaction entre ACE2 et les molécules de silane la plus faible.

Concernant la monocouche NH_3^+, on observe une accroche systématique, rapide et forte du récepteur cellulaire ACE2 sur la surface, quelle que soit son orientation initiale. En revanche, l'orientation initiale conduisant à l'immobilisation la plus favorable d'ACE2 est l'orientation 2, qui n'est pas adaptée pour notre application.

Pour la monocouche CH_3 long, seule l'orientation initiale 3 conduit à une adsorption systématique du récepteur cellulaire ACE2 sur la surface. Cependant, l'immobilisation est assez lente (les interactions avec la surface apparaissent après plus de 30 ns, 70 ns et 20 ns respectivement pour les répliques 1, 2 et 3) et l'énergie d'interaction entre ACE2 et les molécules de silane CH_3 long est assez faible. L'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2 sur cette monocouche de silanes ne semble donc pas très favorable.

Avec la monocouche COO^-, on n'observe aucune interaction entre ACE2 et les molécules de silane pour les orientations 2 et 3, et l'établissement d'interactions pour certaines répliques de simulations, après plusieurs dizaines de ns, pour les orientations 1 et 4. De plus, l'énergie d'interaction obtenue pour l'orientation initiale 1 est positive : ces interactions sont donc défavorables. Ce résultat peut s'expliquer par les interactions électrostatiques qui s'établissent entre la monocouche de silanes COO^- et le récepteur cellulaire ACE2, qui présente également une charge totale négative (-27 e). Cette monocouche est donc inadaptée pour immobiliser le récepteur cellulaire ACE2.

Concernant la monocouche mix court, on observe une immobilisation systématique et rapide du récepteur cellulaire ACE2, pour toutes les orientations initiales. De plus, l'orientation 1 est la

Monocouche de silanes	Orientation initiale d'ACE2	Fréquence d'immobilisation d'ACE2 sur la surface à l'état final (100 ns)	$E^{int}_{ACE2-silanes}$ (kcal·mol^{-1}) [a]	$E^{int}_{ACE2-SiO_2}$ (kcal·mol^{-1}) [a]
CH_3 court	1	1/3	–	–
	2	3/3	$-82,4 \pm 14,6$	$-0,8 \pm 0,9$
	3	3/3	$-85,0 \pm 32,6$	$-0,3 \pm 0,4$
	4	3/3	$-122,3 \pm 39,5$	$-0,5 \pm 0,3$
NH_3^+	1	3/3	$-257,7 \pm 110,0$	$-0,3 \pm 0,2$
	2	3/3	$-386,2 \pm 57,7$	$-0,2 \pm 0,3$
	3	3/3	$-320,2 \pm 84,6$	$0,0 \pm 0,0$
	4	3/3	$-273,7 \pm 62,9$	$-0,1 \pm 0,0$
CH_3 long	1	1/3	–	–
	2	2/3	–	–
	3	3/3	$-60,8 \pm 41,1$	$0,0 \pm 0,0$
	4	0/3	–	–
COO^-	1	3/3	$15,7 \pm 13,0$	$0,0 \pm 0,0$
	2	0/3	–	–
	3	0/3	–	–
	4	2/3	–	–
mix court	1	3/3	$-244,5 \pm 75,9$	$-0,1 \pm 0,1$
	2	3/3	$-171,6 \pm 39,3$	$0,0 \pm 0,0$
	3	3/3	$-195,1 \pm 71,8$	$0,1 \pm 0,2$
	4	3/3	$-198,6 \pm 45,0$	$0,6 \pm 2,0$
mix long	1	3/3	$-255,8 \pm 104,3$	$0,0 \pm 0,0$
	2	3/3	$-201,1 \pm 53,3$	$0,0 \pm 0,0$
	3	3/3	$-209,7 \pm 81,1$	$0,0 \pm 0,0$
	4	3/3	$-222,2 \pm 100,8$	$0,0 \pm 0,0$

TABLE 6.2 – *Fréquence d'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2 sur la surface et énergie d'interaction.* [a] *Les valeurs des énergies d'interaction entre ACE2 et les molécules de silane et entre ACE2 et la couche de SiO_2 ne sont données que lorsque l'immobilisation d'ACE2 sur la surface est systématique (3/3).*

plus favorable énergétiquement et l'orientation 2, que l'on souhaite éviter, est la moins favorable. Cette monocouche semble donc bien adaptée pour notre application.

Enfin, pour la monocouche mix long, on observe que l'adsorption d'ACE2 sur les monocouches de silanes est systématique, bien qu'elle soit un peu plus lente qu'avec la monocouche mix court. De plus, l'orientation initiale 1 est la plus favorable énergétiquement et celle pour laquelle l'immobilisation est la plus rapide, tandis que l'orientation 2 est la moins favorable. Cette monocouche semble donc également bien adaptée pour l'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2.

En conclusion, trois monocouches de silanes permettent une immobilisation rapide et forte du récepteur cellulaire ACE2 avec une orientation qui soit adaptée pour conserver sa capacité à capturer le S-RBD : il s'agit des monocouches CH_3 court (orientation 4), mix court (orientation 1) et mix long (orientation 1). Des images représentatives de ces différents systèmes à l'état final sont présentées sur la figure 6.5. Nous nous limiterons à leur étude dans la suite de ce chapitre.

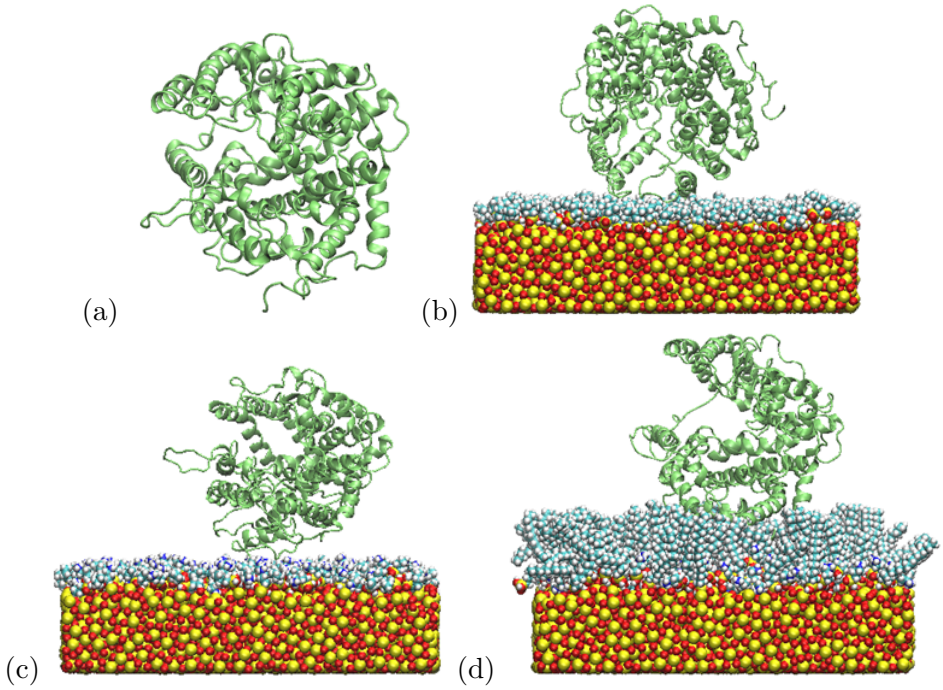


FIGURE 6.5 – *Images représentatives des différents systèmes à l'état final (100 ns) : le récepteur cellulaire ACE2 (a) en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes (b) CH_3 court (orientation initiale 4), (c) mix court (orientation initiale 1) et (d) mix long (orientation initiale 1). Le récepteur cellulaire ACE2 est représenté en vert pâle, tandis que les atomes sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène) et bleu foncé (azote). Les molécules d'eau, les ions Na^+ et Cl^- et les atomes du mur de Lennard-Jones ne sont pas représentés.*

6.3.1.b RMSD

Les changements globaux de conformation d'ACE2 résultant de son adsorption sur les monocouches de silanes sont caractérisés par l'évolution du RMSD au cours de la simulation (figure 6.6). Une fois le système stabilisé, le RMSD vaut $3,2 \pm 0,5$ Å si ACE2 est en solution, $3,0 \pm 0,2$ Å s'il est adsorbé sur la monocouche CH_3 court, $3,4 \pm 0,1$ Å s'il est immobilisé sur la monocouche mix court et $3,1 \pm 0,4$ Å si ACE2 est fixé sur la monocouche mix long. Les valeurs de RMSD

pour les différentes monocouches de silane étant proches de celles obtenues en solution, on en déduit que, comme pour la streptavidine, l'adsorption d'ACE2 sur une monocouche de silanes engendre des changements de conformation assez faibles et permet de conserver la structure globale de la protéine.

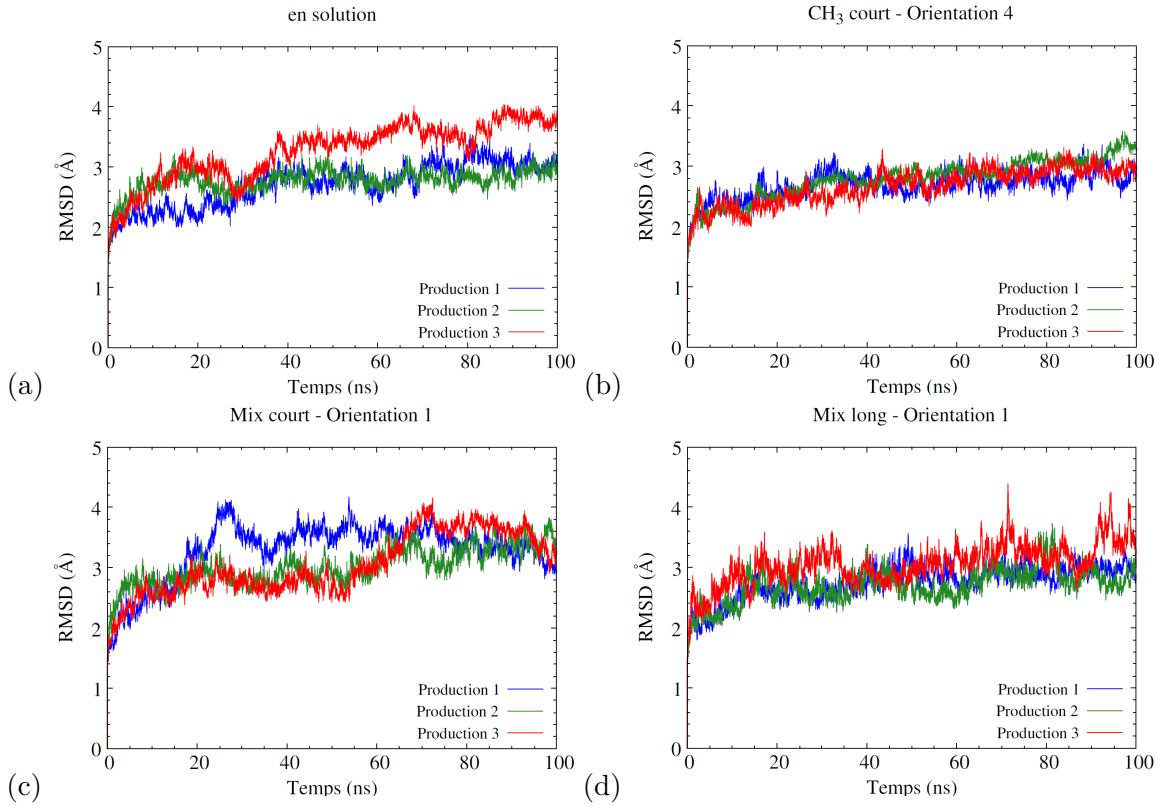


FIGURE 6.6 – *Évolution du RMSD du récepteur cellulaire ACE2 (a) en solution et pendant son adsorption sur les monocouches de silanes (b) CH_3 court, (c) mix court et (d) mix long.*

6.3.1.c RMSF

Les changements de conformation d'ACE2 lors de son adsorption sur une monocouche de silanes sont également caractérisés à l'aide du RMSF, qui renseigne sur la mobilité individuelle de chaque résidu, et permet donc de localiser les changements de conformation. La figure 6.7 présente le RMSF moyen d'ACE2 (valeur moyenne pour les trois répliques de simulations, calculée sur toute la durée des simulations), selon que celui-ci est en solution ou adsorbé sur une monocouche de silanes. De plus, les résidus d'ACE2 situés à l'interface avec le S-RBD, lorsque le complexe est en solution (voir paragraphe 6.3.2.d, page 203), sont également affichés.

Globalement, le RMSF d'ACE2 lorsque celui-ci est adsorbé sur une monocouche de silanes est relativement proche du RMSF obtenu en solution. Cela confirme nos conclusions concernant le RMSD, c'est-à-dire que l'adsorption sur une monocouche de silanes n'entraîne pas de changement majeur de conformation pour ACE2. Quelques différences sont cependant observées, par exemple une mobilité accrue autour du résidu 290 lorsqu'ACE2 est adsorbé sur les monocouches CH_3 court et mix long. Afin d'identifier plus précisément les effets de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur ses interactions avec le S-RBD, nous nous intéressons au RMSF pour les résidus de l'interface. En effet, une forte mobilité de ces résidus pourrait perturber l'établissement d'interactions avec le S-RBD, et donc le phénomène de reconnaissance moléculaire. On distingue trois zones de contact : entre les résidus 24 et 45, entre les résidus 79 et 83 et entre les résidus

353 et 357. Pour les trois monocouches de silanes, le RMSF au niveau de ces résidus est assez faible et proche de celui obtenu en solution. Bien qu'une mobilité plus importante soit observée pour certains résidus voisins des résidus d'interface, il semble qu'ACE2 conserve sa capacité à interagir avec le S-RBD lorsque celui-ci est adsorbé sur les monocouches de silanes étudiées.

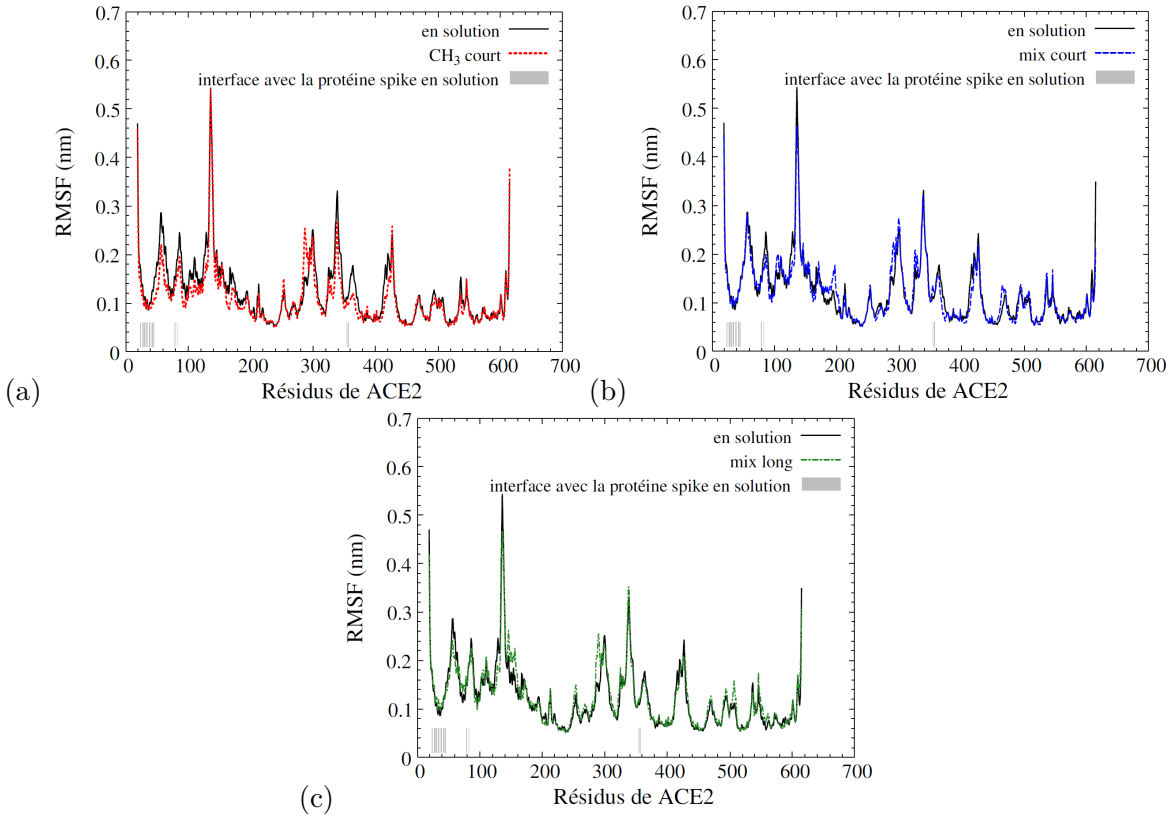


FIGURE 6.7 – *RMSF des atomes C_α d'ACE2 lorsque celui-ci est adsorbé sur une monocouche de silanes (a) CH_3 court, (b) mix court ou (c) mix long et comparaison avec le cas où ACE2 est en solution. Les résidus d'ACE2 situés à l'interface avec le S-RBD, lorsque le complexe est en solution, sont également affichés.*

6.3.2 Effet de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur la structure du complexe formé avec le S-RBD

Comme l'adsorption d'ACE2 sur les monocouches de silanes et avec les orientations initiales identifiées dans la première partie n'engendre pas de changements de conformation importants pour les résidus de l'interface avec le S-RBD, ce qui suggère qu'ACE2 conserve sa capacité à capturer la protéine, nous allons étudier dans cette deuxième partie l'adsorption du complexe ACE2 - S-RBD. Des images représentatives des quatre systèmes étudiés à l'état final sont présentées sur la figure 6.8.

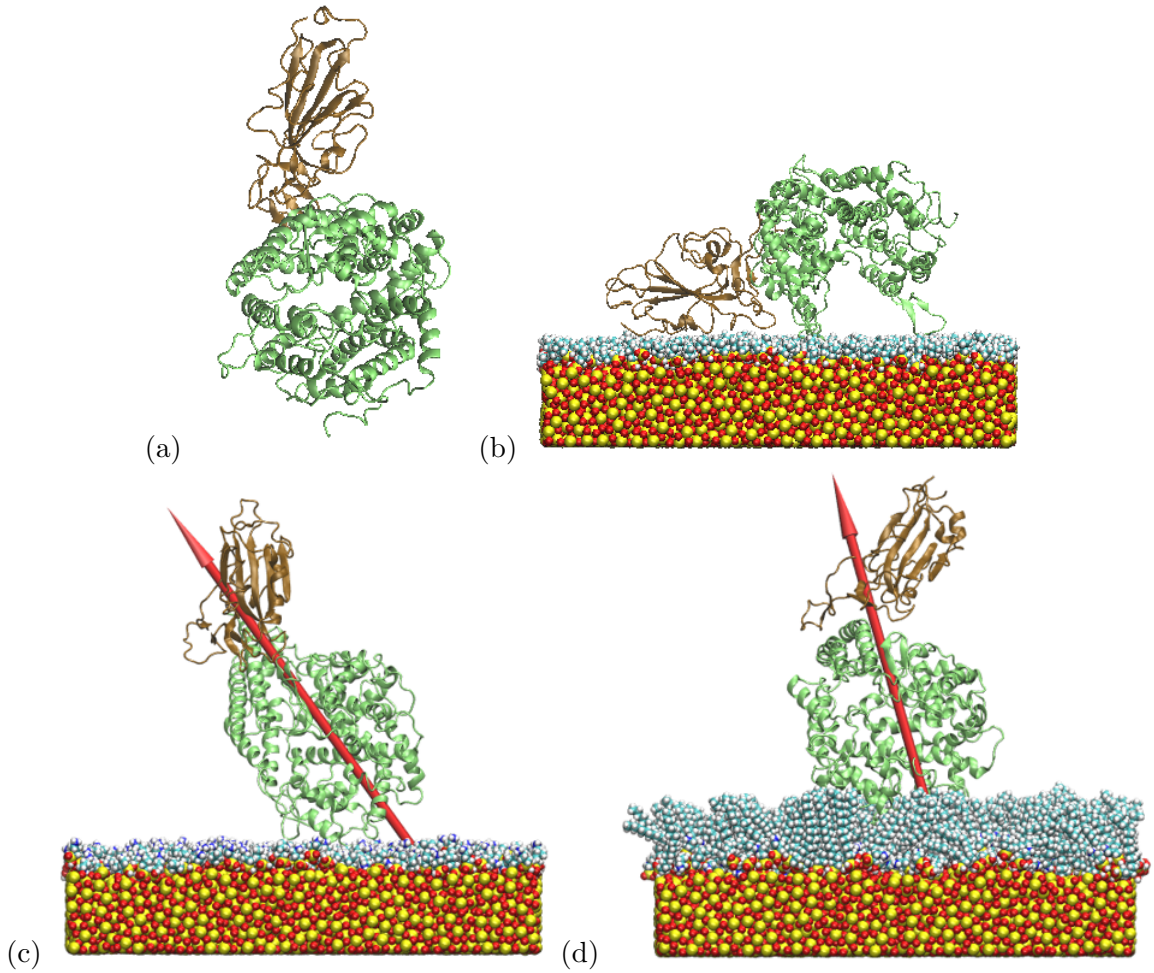


FIGURE 6.8 – *Images représentatives des différents systèmes à l'état final (200 ns) : le complexe ACE2 - S-RBD (a) en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes (b) CH_3 court, (c) mix court et (d) mix long. Le récepteur cellulaire ACE2 et le domaine de liaison au récepteur du S-RBD sont représentés respectivement en vert pâle et en marron. Les atomes sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène) et bleu foncé (azote). Les molécules d'eau, les ions Na^+ et Cl^- et les atomes du mur de Lennard-Jones ne sont pas représentés. Le moment dipolaire du complexe est indiqué par une flèche rouge lorsque celui-ci est adsorbé sur les monocouches de silanes mix court et mix long.*

6.3.2.a Changements globaux de conformation : RMSD et structure secondaire

Les changements de conformation induits par l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les monocouches de silanes sont caractérisés à l'aide du RMSD (tableau 6.3) et de la structure

secondaire du complexe (tableau 6.4). Le RMSD du complexe ACE2 - S-RDB en solution est inférieur à 4,5 Å. Cette valeur est en accord avec les résultats d'Ali *et al.*, et montre que l'intégrité de la structure du complexe est conservée au cours de la simulation [143].

Le RMSD du complexe est également inférieur à 4,5 Å lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est adsorbé sur les monocouches de silanes, ce semble montrer une bonne conservation de la structure. On observe que le RMSD du S-RBD est légèrement plus important et présente une plus grande variabilité lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est immobilisé sur la monocouche CH_3 court. Ces changements de conformation plus importants peuvent s'expliquer par le fait que, pour certaines répliques de simulations, le S-RBD n'interagit pas uniquement avec ACE2, mais également avec les molécules de silane, du fait de l'orientation du récepteur cellulaire sur la surface, comme illustré sur la figure 6.8 (b).

Système	$\text{RMSD}_{complexe}$ (Å)	RMSD_{ACE2} (Å)	RMSD_{S-RBD} (Å)
en solution	$4,1 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,9$
CH_3 court	$4,2 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,5$	$5,3 \pm 1,7$
mix court	$3,7 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,5$
mix long	$4,2 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,4$

Table 6.3 – *RMSD du complexe ACE2 - S-RBD en solution et lorsqu'ACE2 est adsorbé sur différentes monocouches de silanes.*

De plus, les résultats ne montrent pas de changement significatif de la structure secondaire du complexe, selon que celui-ci est en solution ou adsorbé sur une monocouche de silanes. Cela montre que l'adsorption sur les silanes n'engendre pas de changement global important pour la structure du complexe, et donc que le récepteur cellulaire ACE2 pourrait conserver sa capacité à interagir avec le S-RBD lorsqu'il est immobilisé sur une monocouche de silanes.

Système	Hélice α (%) [a]	Hélice 3_{10} (%) [a]	Feuillets β (%) [a]
structure initiale	48,8	5,2	8,3
en solution	40,6	3,3	8,5
CH_3 court	40,1	3,2	8,5
mix court	40,2	3,0	8,4
mix long	39,9	3,5	8,6

Table 6.4 – *Structure secondaire du complexe ACE2 - S-RBD en solution et lorsqu'ACE2 est adsorbé sur différentes monocouches de silanes et comparaison à la structure initiale.* [a] *Pourcentage de résidus du complexe présentant la structure secondaire mentionnée.*

6.3.2.b Interactions entre le complexe ACE2 - S-RBD et les monocouches de silanes

Les interactions entre ACE2 et les différentes monocouches de silanes sont caractérisées par l'énergie d'interaction et par le nombre de résidus en contact entre le complexe et les molécules de silane (voir tableau 6.5). De plus, on identifie les résidus d'ACE2 les plus susceptibles d'interagir avec les molécules de silane. Comme pour le complexe streptavidine - biotine (voir paragraphe 5.2.2.b, page 137), l'énergie d'interaction et la surface de contact sont plus grandes avec la monocouche mix long qu'avec les monocouches mix court et CH_3 court. Il peut en effet s'établir de nombreuses interactions de Van der Waals entre les longues chaînes alkyles des molécules de silane CH_3 long et les résidus hydrophobes (A, L, P, V, I, M, F, W) du récepteur cellulaire,

mais également des interactions électrostatiques entre les molécules NH_3^+ et les résidus polaires ou chargés négativement (D, E) d'ACE2.

La monocouche mix court présente une énergie d'interaction plus grande, mais une surface de contact plus petite que la monocouche CH_3 court. En effet, il peut s'établir des interactions électrostatiques entre les résidus chargés négativement (D609, D615) d'ACE2 et les molécules de silane chargées positivement NH_3^+, mais celles-ci peuvent également exercer un effet répulsif envers d'autres résidus, ceux chargés positivement par exemple. Concernant la monocouche CH_3 court, des liaisons de Van der Waals, plus nombreuses mais de plus basse énergie, peuvent s'établir entre le récepteur cellulaire ACE2 et les molécules de silane. Notons que, du fait de l'orientation du récepteur cellulaire ACE2 sur la monocouche CH_3 court, des interactions s'établissent également entre le S-RBD et les molécules de silane (figure 6.8).

Système	CH_3 court	mix court	mix long
$E^{int}_{complexe-SiO_2}$ (kcal·mol^{-1})	$-1,3 \pm 2,7$	$-0,6 \pm 0,5$	$-0,0 \pm 0,0$
$E^{int}_{complexe-silanes}$ (kcal·mol^{-1})	$-197,8 \pm 76,0$	$-290,7 \pm 60,6$	$-309,7 \pm 59,6$
Contact complexe - silanes [a,b]	$28,2 \pm 11,9$	$15,5 \pm 6,3$	$60,8 \pm 13,4$
Contact ACE2 - silanes [a,b]	$14,8 \pm 5,6$		
Contact S-RBD - silanes [a,b]	$13,3 \pm 10,1$	0	0
Résidus d'ACE2 en contact avec la surface [b]	E56, E57, Q60, P135 D136, N137, P138, Q139, E140	D609, Y613, A614, D615	D136 à L142, L148, I151, N154, L156, D157, N159 à A164, E166, S167, S170, Y243, A246, K247, M249 à Y255, P258, I259, L281, V283, G286, Q287, V491 à D494, Q598 à F603, Y613 à D615

Table 6.5 – *Énergie d'interaction non liantes et surface de contact entre le complexe ACE2 - S-RBD et les monocouches de silane.* [a] *Nombre de résidus du complexe, d'ACE2 ou du S-RBD respectivement en contact avec les molécules de silane.* [b] *Un résidu est considéré comme en contact avec la surface si l'un de ses atomes est situé à moins de 0,4 nm d'un atome de la surface.*

L'étude du RMSD et de la structure secondaire du complexe a montré que l'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2 sur les monocouches de silanes mix long, mix court et CH_3 court n'entraîne pas de changement majeur dans la structure de la protéine, c'est-à-dire de fortes déformations pouvant aboutir à l'impossibilité de capturer le S-RBD. Cependant, les valeurs de l'énergie d'interaction entre ACE2 et les monocouches de silanes et le nombre de résidus d'ACE2 en contact avec la surface ont illustré le fait que le processus d'adsorption et les interactions qui s'établissent avec la surface dépendent des propriétés physico-chimiques des monocouches de silanes, en particulier de la longueur des chaînes alkyles et de la charge des groupements terminaux des molécules de silane. De même que pour le complexe streptavidine - biotine (voir paragraphe 5.2.2.c, page 141), cela pourrait engendrer des changements de conformation localisés, qui impacteraient les interactions entre ACE2 et le S-RBD. C'est ce que l'on cherche à caractériser dans la suite, avec l'étude des résidus à l'interface entre ACE2 et le S-RBD et de

leur RMSF.

6.3.2.c RMSF

La figure 6.9 présente le RMSF des atomes C_α d'ACE2 et du S-RBD, selon que le complexe est en solution ou adsorbé sur les monocouches de silanes. Les résidus d'ACE2 en contact avec les molécules de silane et les résidus de l'interface ACE2 - S-RBD pour le complexe en solution sont également affichés. Les RMSF d'ACE2 et du S-RBD pour le complexe en solution sont en accord avec les résultats d'Ali *et al.* [143], concernant la nature des résidus présentant une mobilité faible ou élevée. L'allure des courbes de RMSF est globalement conservée lorsque le complexe est adsorbé sur les monocouches de silanes, en accord avec les résultats précédents. On peut cependant observer quelques différences.

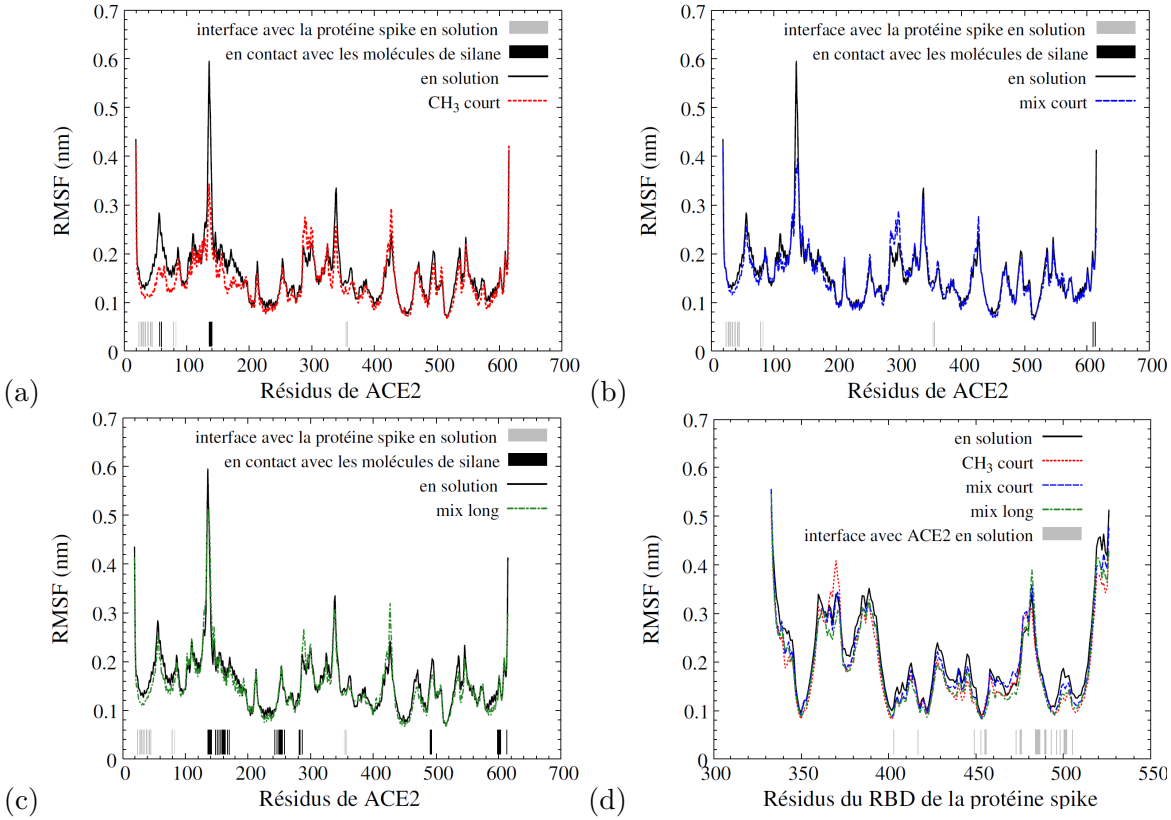


FIGURE 6.9 – *RMSF des atomes C_α d'ACE2 lorsque celui-ci est adsorbé sur une monocouche de silanes (a) CH_3 court, (b) mix court ou (c) mix long et (d) RMSF des atomes C_α du S-RBD, et comparaison avec le cas où le complexe est en solution. Les résidus d'ACE2 en contact avec les molécules de silane et l'interface entre ACE2 et le S-RBD, lorsque le complexe est en solution, sont également affichés.*

Quelle que soit la monocouche de silanes, le RMSF du récepteur cellulaire ACE2 présente des valeurs un peu plus élevées au niveau des résidus 280 à 300 et autour du résidu 427 lorsque le complexe est immobilisé sur une surface que lorsqu'il est en solution. Lorsqu'ACE2 est immobilisé sur la monocouche CH_3 court, on observe un RMSF un peu plus faible autour des résidus 60 et 135 à 140, qui correspondent à la surface de contact avec les molécules de silane. Pour la monocouche mix court, le RMSF est également plus faible vers les résidus 135 à 140, mais aussi autour du résidu 615, qui est en contact avec les molécules de silane. Enfin, concernant la monocouche mix long, le RMSF est plus faible autour du résidu 615, qui est en contact avec

les molécules de silane. En revanche, pour les autres résidus d'ACE2 en contact avec la surface, le RMSF est très peu impacté par les interactions de Van der Waals qui s'établissent avec les molécules de silane. On s'intéresse à présent aux résidus d'ACE2 appartenant à l'interface avec le S-RBD lorsque le système est en solution. On constate une diminution du RMSF autour des résidus 24 à 45 et 79 à 83 lorsque le complexe est immobilisé sur les trois monocouches de silanes. Autour des résidus 353 à 357, on observe une modification du RMSF pour les monocouches CH_3 court et mix long, mais celle-ci est moins prononcée pour la monocouche mix court.

Concernant le S-RBD, on observe que le RMSD est légèrement modifié, selon que le complexe se trouve en solution ou adsorbé sur une surface. Les variations les plus importantes sont observées pour la monocouche CH_3 court, avec une flexibilité accrue autour des résidus 367 à 372. En effet, du fait de l'orientation du récepteur cellulaire sur la surface, ces résidus sont en contact avec les molécules de silane dans plusieurs répliques de simulations. De plus, on observe des variations de RMSF autour des résidus appartenant à l'interface avec ACE2, en particulier autour des résidus 484 à 505.

Les variations de RMSF observées selon que le complexe ACE2 - S-RBD est en solution ou immobilisé sur les monocouches de silanes témoignent de changements de conformation localisés, en particulier autour des résidus de l'interface, qui pourraient entraîner une modification des interactions entre les deux protéines. C'est ce que nous étudions dans la suite, en nous intéressant plus particulièrement à l'interface entre le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD.

6.3.2.d Interface entre ACE2 et le S-RBD

L'interface entre le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD est définie à l'aide des figures 6.10 et 6.11, qui présentent respectivement les résidus d'ACE2 en contact avec le S-RBD et les résidus du S-RBD en contact avec ACE2, c'est-à-dire les résidus dont au moins l'un des atomes est situé à moins de 0,4 nm d'un atome de l'autre protéine.

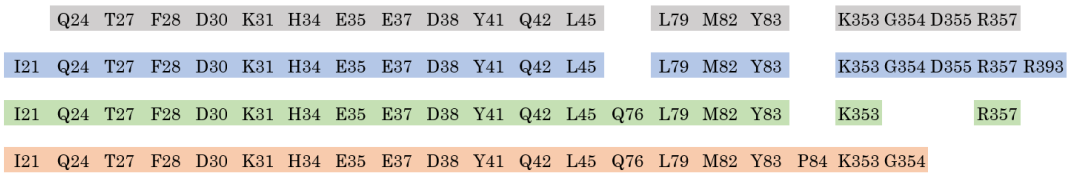


FIGURE 6.10 – *Résidus du récepteur cellulaire ACE2 en contact avec le S-RBD lorsque le complexe est en solution (gris) et lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est adsorbé sur une monocouche de silanes mix court (bleu), mix long (vert) ou CH_3 court (rouge).*

On dénombre 19 résidus d'ACE2 appartenant à l'interface, lorsque le complexe est en solution et lorsqu'il est adsorbé sur la monocouche mix long, 20 avec la monocouche CH_3 court et 21 avec mix court. Notons que les résidus identifiés par Laurini *et al.* [136] comme des *hot-spots*, c'est-à-dire les principaux sites d'interaction avec le S-RBD lorsque le complexe est en solution, font systématiquement partie de l'interface lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes étudiées. Il s'agit des résidus D38, K31, E37, K353 et Y41. De plus, les résidus Q24, T27, F28, D30, H34, E35, Q42, L45, L79, M82 et Y83 font également partie de l'interface dans tous les cas. Le résidu I21, qui n'appartient pas à l'interface lorsque le système est en solution, est présent avec les trois monocouches de silanes. Enfin, la présence de certains résidus dans l'interface est spécifique au type de monocouche de silanes. Pour la monocouche mix court, seul le résidu R393 s'ajoute à l'interface, tandis qu'avec les monocouches mix long et CH_3 court, on observe que le résidu Q76 s'ajoute à l'interface, et que celle-ci est perturbée au niveau des

résidus G354 à R357, en accord avec les observations faites pour le RMSF.

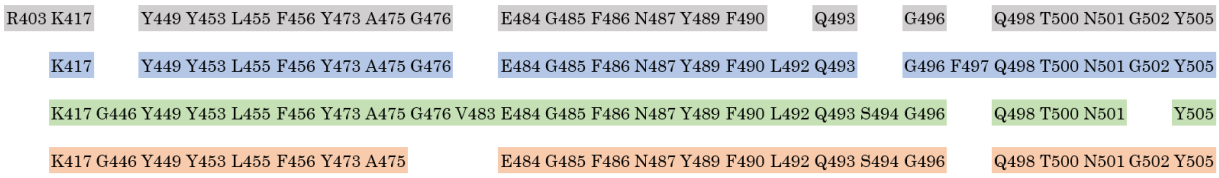


FIGURE 6.11 – *Résidus du S-RBD en contact avec le récepteur cellulaire ACE2 lorsque le complexe est en solution (gris) et lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est adsorbé sur une monocouche de silanes mix court (bleu), mix long (vert) ou CH_3 court (rouge).*

De plus, 22 résidus du S-RBD appartiennent à l'interface avec ACE2 lorsque le système est en solution, contre 23 résidus avec les monocouches de silanes CH_3 court et mix court, et 24 avec la monocouche mix long. Concernant les résidus *hot-spots* identifiés par Laurini *et al.* [136], les résidus Q498 et T500 sont conservés lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes, mais pas R403. Les autres résidus de l'interface sont conservés après l'adsorption d'ACE2 sur une surface, sauf G476 avec la monocouche CH_3 court et G502 avec mix long. De plus, le résidu L492 complète l'interface pour les trois monocouches de silanes. Enfin, l'apparition de certains résidus est spécifique à une ou plusieurs monocouches de silanes : les résidus G446 et S494 avec les monocouches mix long et CH_3 court, le résidu V483 avec mix long et le résidu F497 avec mix court.

Ces résultats montrent donc que l'interface entre ACE2 et le S-RBD est modifiée par l'adsorption d'ACE2 sur les monocouches de silanes, mais également qu'elle est impactée par les propriétés physico-chimiques des différentes monocouches. De plus, on dénombre plus de résidus appartenant à l'interface lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes : il peut donc se former plus d'interactions de Van der Waals et électrostatiques mais également de liaisons hydrogène (voir tableau 6.6) entre le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD par rapport au cas où le complexe est en solution, ce qui pourrait se traduire par un renforcement des interactions entre les deux protéines.

Système	en solution	CH_3 court	mix court	mix long
Nombre de liaisons hydrogène	$9,1 \pm 1,5$	$10,3 \pm 1,8$	$11,9 \pm 1,7$	$10,5 \pm 1,4$

TABLE 6.6 – *Nombre de liaisons hydrogène s'établissant entre le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD, selon que le complexe est en solution ou adsorbé sur les monocouches de silanes.*

6.3.3 Effet de l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les interactions qui s'établissent avec le S-RBD

Dans cette partie, nous caractérisons la force des interactions qui s'établissent entre ACE2 et le S-RBD avec la détermination de l'énergie libre de liaison par MM-PBSA et l'étude des forces de rupture entre ACE2 et le S-RBD par simulations SMD.

6.3.3.a Étude des forces de rupture par simulations SMD

Par analogie avec les expériences d'AFM en mode SMFS (voir paragraphe 1.2.3, page 12), les simulations SMD sont réalisées en appliquant un potentiel harmonique au centre de masse du

S-RBD dans la direction normale à la surface (c'est-à-dire selon l'axe z). En raison de l'orientation du récepteur cellulaire ACE2 lorsqu'il est adsorbé sur la monocouche de silanes CH_3 court, avec le S-RBD qui se fixe sur le côté du récepteur et peut interagir avec les silanes, ce système paraît peu adapté pour effectuer les simulations SMD. Les simulations sont donc réalisées uniquement pour le complexe ACE2 - S-RBD en solution, et lorsque le complexe est adsorbé sur les monocouches mix court et mix long.

L'état initial des simulations SMD est choisi parmi les états finaux des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles modélisant le complexe ACE2 - S-RBD en solution ou adsorbé sur une monocouche de silanes. En effet, les six répliques de simulations réalisées pour chaque système étant indépendantes, il existe une variabilité entre celles-ci, à la fois sur la façon dont le récepteur cellulaire ACE2 est adsorbé sur la surface, et sur les changements de conformations du complexe. Chaque configuration est caractérisée par un angle θ, appelé angle d'adsorption d'ACE2, qui est défini comme l'angle formé par la normale à la surface et le vecteur reliant le centre de masse d'ACE2 au centre de masse du S-RBD. Par analogie, lorsque le système est en solution, on appelle angle d'adsorption d'ACE2 l'angle entre la direction de tirage (axe z) et le vecteur reliant le centre de masse d'ACE2 au centre de masse du S-RBD. De même que pour le complexe streptavidine dimérique - biotine, les simulations SMD sont réalisées à partir de plusieurs configurations initiales, afin de prendre en compte l'effet de l'angle d'adsorption et celui de la variabilité des changements de conformation sur les forces de rupture déterminées.

Pour chaque système (complexe en solution et complexe adsorbé sur les monocouches de silanes mix court et mix long), deux configurations initiales sont sélectionnées. De plus, pour le complexe en solution, deux configurations supplémentaires sont définies à partir de celles-ci, par rotation du complexe, afin de faire varier l'angle d'adsorption pour une configuration initiale donnée, et ainsi discriminer les effets de la direction de tirage des effets de changements de conformation sur les forces de rupture déterminées. Les différentes configurations initiales sont présentées sur la figure 6.12. Pour chaque configuration initiale, 20 répliques indépendantes de simulations SMD sont réalisées, avec une vitesse de tirage $v = 2 \times 10^6$ μm·s^{-1} et une constante de force $k = 100$ pN/nm. Une illustration du processus de détachement modélisé grâce aux simulations SMD est présentée sur la figure 6.13, les valeurs moyennes des forces de rupture et temps de détachement pour les différentes configurations initiales sont regroupés dans le tableau 6.7, les courbes typiques de détachement pour les différents systèmes sont présentées sur la figure 6.14, et les histogrammes de la distribution des forces de rupture sont donnés sur la figure 6.15.

La figure 6.13 présente le processus de détachement entre le S-RBD et le récepteur cellulaire ACE2 adsorbé sur la monocouche de silanes mix court, tel qu'il est modélisé dans les simulations SMD. Les interactions qui s'établissent entre ACE2 et les molécules de silane sont suffisamment importantes pour que le récepteur cellulaire reste immobilisé sur la surface alors qu'une force externe est appliquée sur le S-RBD. Celui-ci est finalement détaché et entraîné loin de la surface.

Dans le cas où le complexe ACE2 - S-RBD est en solution, on observe que les forces de rupture obtenues pour les deux configurations initiales étudiées sont proches. De plus, la force de rupture est légèrement modifiée lorsque l'angle d'adsorption d'ACE2 varie, mais cette modification semble peu significative au regard de la distribution des valeurs obtenues. Les histogrammes correspondant aux quatre configurations étudiées se superposent, c'est pourquoi on considère dans la suite que la force détachement pour le complexe en solution est la valeur moyenne des forces de rupture obtenues pour les quatre configurations. On a donc $F_{rupture}(\text{en solution}) = 609 \pm 73$ pN.

Concernant le cas où ACE2 est adsorbé sur la monocouche de silanes mix court, on observe que la force de rupture correspondant à la configuration intiale 1 est légèrement plus élevée

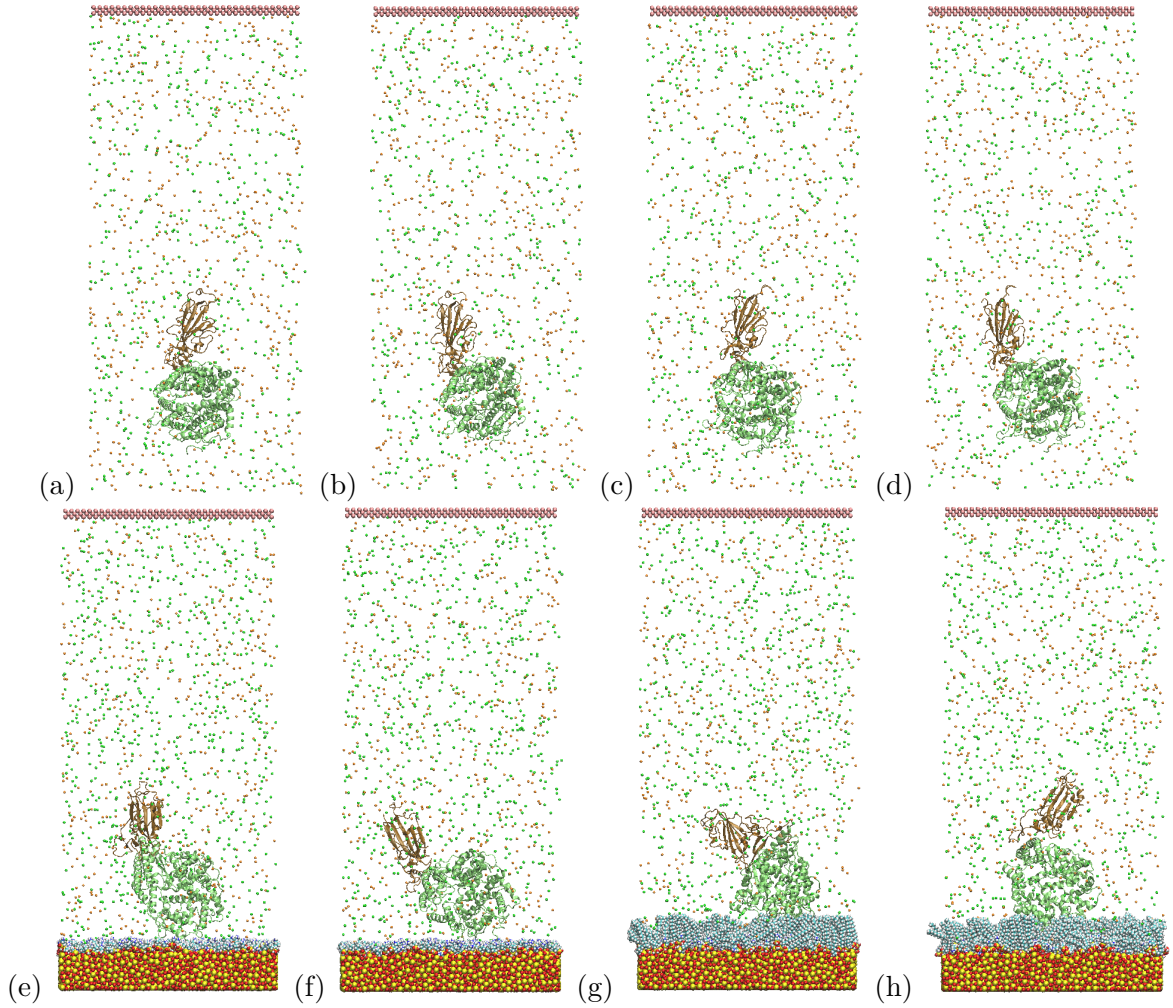


FIGURE 6.12 – *Images des configurations initiales des simulations SMD pour le complexe ACE2 - S-RBD en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes mix court et mix long : (a) en solution, configuration 3 -* $\theta = 22,0°$*, (b) en solution, configuration 3 -* $\theta = 33,1°$*, (c) en solution, configuration 4 -* $\theta = 18,9°$*, (d) en solution, configuration 3 -* $\theta = 33,5°$*, (e) mix court, configuration 1 -* $\theta = 30,4°$*, (f) mix court, configuration 4 -* $\theta = 51,5°$*, (g) mix long, configuration 2 -* $\theta = 45,4°$ *et (h) mix long, configuration 5 -* $\theta = 6,0°$*. Le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD sont représentés respectivement en vert pâle et en marron. Les atomes et les ions sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène), bleu foncé (azote), orange (*Na^+*), vert (*Cl^-*) et rose (mur de Lennard-Jones). Les molécules d'eau ne sont pas représentées.*

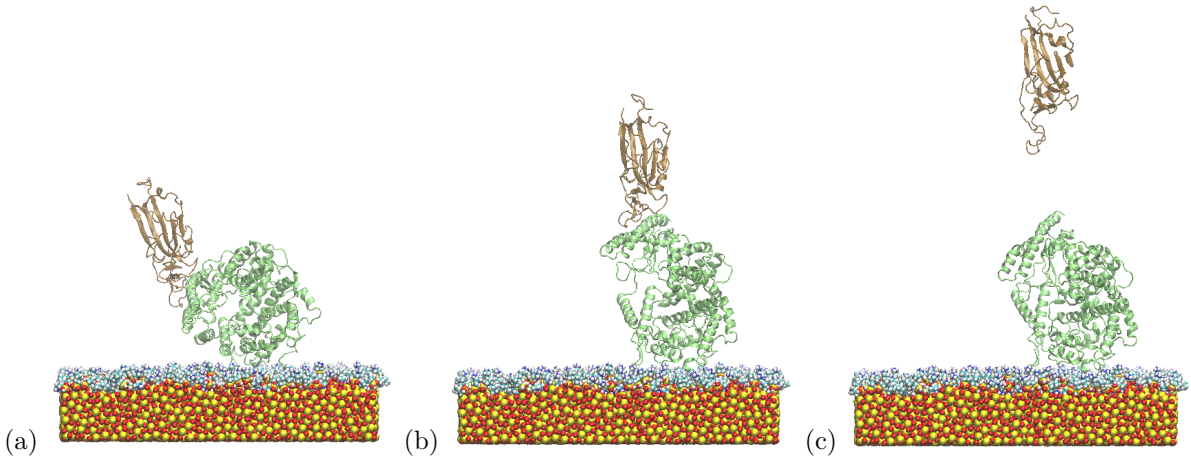


FIGURE 6.13 – *Illustation du processus de détachement modélisé avec les simulations SMD pour le système mix court, configuration 4 - $\theta = 51,5°$: (a) $t = 1,0$ ns, une force est appliquée dans la direction normale à la surface sur le S-RBD, celui-ci reste lié au récepteur cellulaire ACE2 ; (b) $t = 5,0$ ns, la force appliquée sur le S-RBD est suffisante pour le détacher du récepteur cellulaire ACE2 ; (c) $t = 5,5$ ns, le S-RBD est entraîné loin de la surface par la force appliquée. Le récepteur cellulaire ACE2 et le S-RBD sont représentés respectivement en vert pâle et en marron. Les atomes et les ions sont indiqués en jaune (silicium), rouge (oxygène), bleu clair (carbone), blanc (hydrogène) et bleu foncé (azote). Les ions Na^+ et Cl^-, le mur de Lennard-Jones et les molécules d'eau ne sont pas représentés.*

Système	Configuration initiale	Angle d'adsorption d'ACE2 (°)	Force de détachement (pN)	Temps de détachement (ns)
en solution	3	22,0	607 ± 74	$3,5 \pm 0,4$
		33,1	589 ± 85	$3,7 \pm 0,4$
	4	18,9	623 ± 59	$3,6 \pm 0,3$
		33,5	618 ± 71	$3,8 \pm 0,4$
mix court	1	30,4	758 ± 67	$4,5 \pm 0,3$
	4	51,5	715 ± 79	$4,8 \pm 0,4$
mix long	2	45,4	537 ± 70	$3,5 \pm 0,4$
	5	6,0	743 ± 71	$4,2 \pm 0,3$

TABLE 6.7 – *Forces de rupture et temps de détachement pour les différentes configurations initiales et les différents angles d'adsorption étudiés.*

que celle correspondant à la configuration 4. Ce résultat s'explique par la variabilité du processus d'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur les silanes, qui engendre des changements de conformation et un angle d'adsorption d'ACE2 qui diffèrent en fonction de la configuration considérée. Comme les histogrammes des deux configurations se superposent, on considère que la force de rupture lorsque le complexe est adsorbé sur la monocouche mix court est la moyenne des valeurs obtenues pour les deux configurations considérées. Elle vaut donc $F_{rupture}(\text{mix court}) = 737 \pm 73$ pN. De plus, on remarque que cette force de rupture est significativement plus élevée que celle obtenue pour le complexe en solution, avec une augmentation d'environ 20%. Ce résultat suggère que l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur la monocouche de silanes mix court engendre un renforcement des interactions entre ACE2 et le S-RBD.

Enfin, dans le cas où ACE2 est adsorbé sur la monocouche mix long, on observe que la force de rupture varie très fortement en fonction de la configuration initiale considérée. Comme pour la monocouche mix court, la variabilité du processus d'immobilisation d'ACE2 explique ce phénomène, puisque celui-ci influence à la fois les changements de structure et l'angle d'adsorption d'ACE2. De plus, on observe que la valeur de force de rupture obtenue pour la configuration 2 (537 ± 70 pN) est inférieure à celle déterminée en solution, tandis que la valeur correspondant à la configuration 5 (743 ± 71 pN) est supérieure à celle obtenue en solution. Il est donc difficile de conclure à un effet de l'adsorption sur la monocouche de silanes mix long sur la force des interactions entre ACE2 et le S-RBD. On obtiendra plus d'informations avec la détermination de l'énergie libre par MM-PBSA, puisque les six répliques des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles modélisant l'adsorption d'ACE2 sur les monocouches de silanes seront prises en compte.

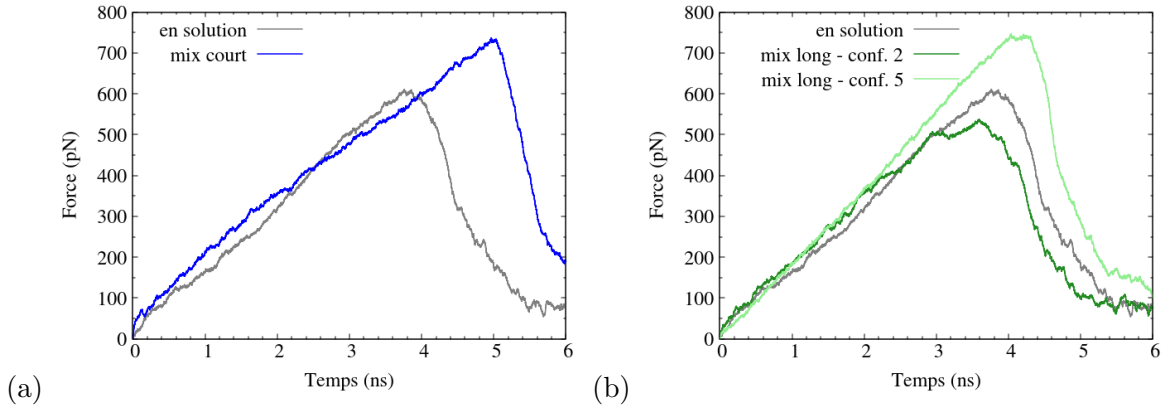


FIGURE 6.14 – *Courbes de forces représentatives des différents systèmes étudiés par simulations SMD : (a) complexe en solution et adsorbé sur la monocouche de silanes mix court et (b) complexe en solution et adsorbé sur la monocouche de silanes mix long.*

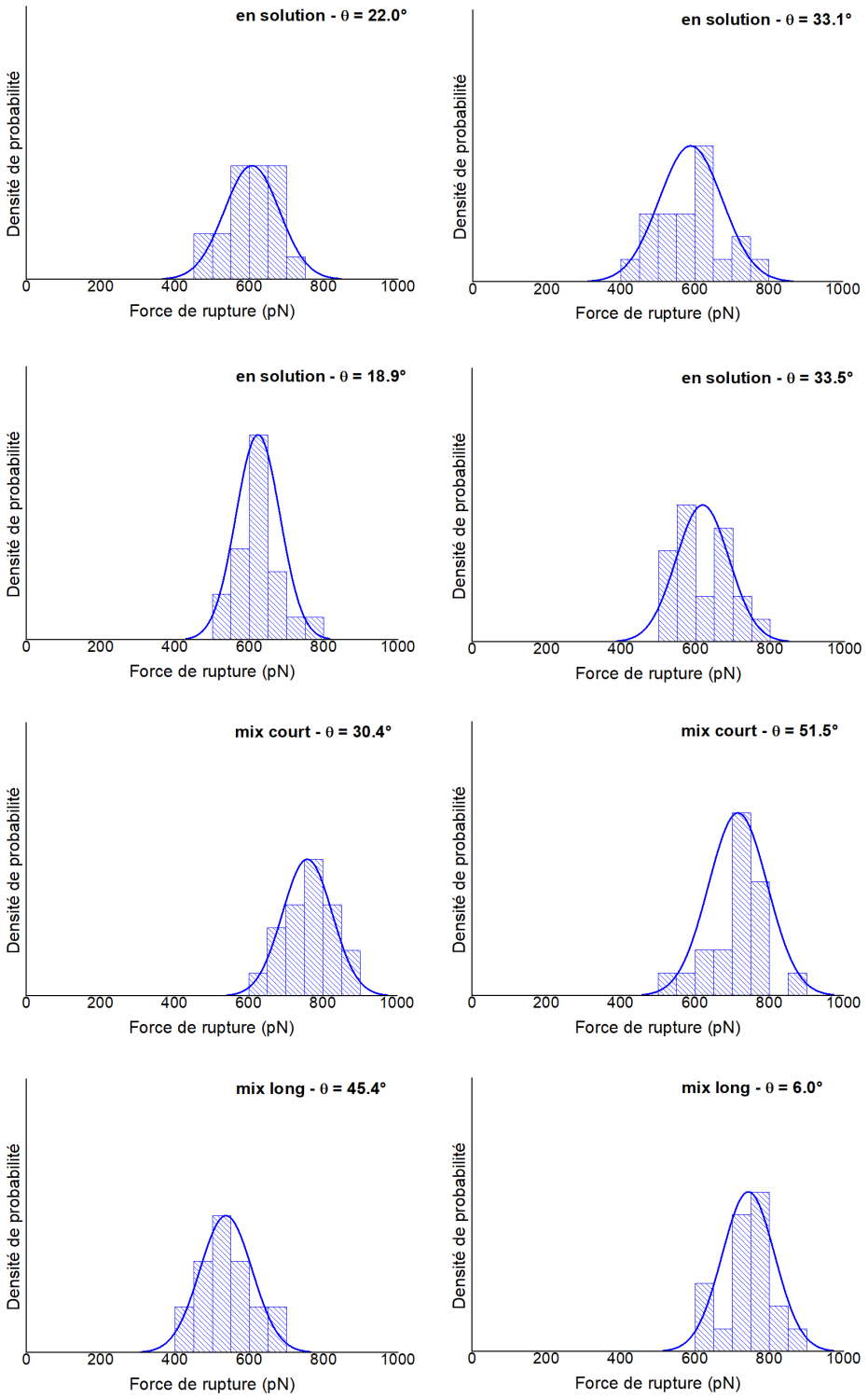


FIGURE 6.15 – *Histogrammes des forces de rupture du S-RBD déterminées par simulations SMD (vitesse de tirage $v = 2\ m{\cdot}s^{-1}$, constante de force $k =$ 01 00 pN/nm, 20 répliques de simulations par histogramme) pour les différents systèmes et configurations initiales étudiés.*

6.3.3.b Détermination de l'énergie d'interaction par MM-PBSA

Le calcul des énergies libres de liaison entre ACE2 et le S-RBD est réalisé avec l'outil g_mmpbsa [54] lorsque le complexe est en solution et lorsqu'il est adsorbé sur les monocouches de silane CH_3 court, mix court et mix long. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 6.8. Du fait des approximations réalisées dans les calculs de MM-PBSA, les résultats sont interprétés de façon qualitative uniquement. De plus, on observe une erreur assez importante, due au fait qu'ACE2 ne s'adsorbe pas exactement de la même façon en fonction de la réplique considérée et donc que les changements de conformation peuvent varier. Les résultats montrent une augmentation de l'énergie libre de liaison lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes, signe d'une stabilisation des interactions avec le S-RBD.

Système	en solution	CH_3 court	mix court	mix long
ΔG (kcal·mol^{-1})	$-63,0 \pm 6,3$	$-78,2 \pm 6,6$	$-74,7 \pm 9,1$	$-72,9 \pm 9,9$

TABLE 6.8 – *Énergies libres de liaison calculées par MM-PBSA entre ACE2 et le S-RBD pour les différents systèmes.*

Afin de mieux comprendre le processus à l'origine de la stabilisation des interactions entre ACE2 et le S-RBD lorsque le récepteur cellulaire est adsorbé sur les monocouches de silanes, nous étudions la contribution des différents résidus à l'énergie libre de liaison. Pour cela, nous définissons la variation d'énergie libre de liaison lorsque le complexe est adsorbé sur une monocouche de silanes par rapport au complexe en solution, par analogie avec les travaux de Laurini *et al.* [136, 144] :

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{en\ solution} - \Delta G_{silanes} \tag{6.1}$$

Ainsi, si $\Delta\Delta G \geq 0$, il y a une stabilisation des interactions pour le résidu considéré, tandis que si $\Delta\Delta G \leq 0$, il y a une déstabilisation des interactions. La figure 6.16 présente les principaux résidus contribuant à la stabilisation ou à la déstabilisation des interactions entre ACE2 et le S-RBD lorsqu'ACE2 est immobilisé sur une monocouche de silanes, par rapport au cas où le complexe est en solution. En pratique, pour chaque monocouche de silanes, tous les résidus tels que $|\Delta\Delta G| \geq 0,4$ kcal·mol^{-1} sont présentés.

De façon générale, on observe que les barres d'erreur obtenues sont beaucoup plus importantes que celles présentées dans les travaux de Laurini *et al.* [136, 144]. En effet, contrairement à ces travaux qui étudient les effets de mutations sur les contributions des différents résidus à l'énergie de liaison, nous nous intéressons à l'impact de changements de conformation, c'est-à-dire de modifications des positions relatives des différents résidus, sur les différentes contributions. Les modifications attendues sont donc plus faibles en intensité (car il n'y a pas de modification de la nature des groupements chimiques), mais également plus sensibles à la variabilité des changements de conformation observée dans les différentes répliques de simulations. En effet, ceux-ci dépendent directement du processus d'adsorption et de la façon dont le récepteur cellulaire ACE2 est immobilisé sur la surface. De plus, les positions des groupements varient au cours du temps, du fait de l'agitation thermique, ce qui peut entraîner l'apparition d'imprécisions supplémentaires.

On observe que la plupart des résidus contribuant le plus à la stabilisation ou à la destabilisation des interactions ACE2 - S-RBD lorsque le récepteur cellulaire est immobilisé sur les monocouches de silanes (voir figure 6.16) se situent au niveau de l'interface entre les deux protéines. Cependant, certains résidus (E23, K458) n'appartiennent ni aux surfaces de contact présentées aux figures 6.10 et 6.11, ni aux résidus identifiés dans différentes études [132, 135, 136, 144].

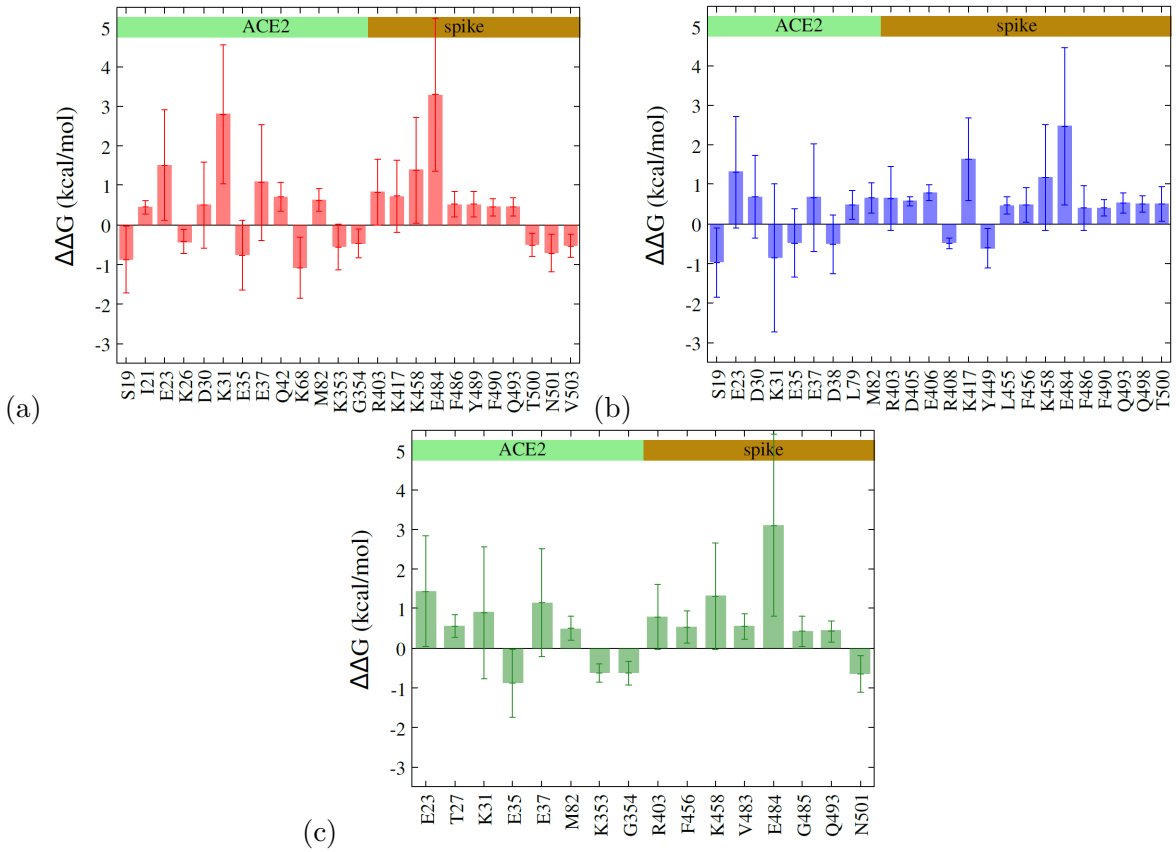


FIGURE 6.16 – *Variations de l'énergie libre de liaison ($\Delta\Delta G = \Delta G_{en\ solution} - \Delta G_{silanes}$) induites par l'imobilisation d'ACE2 sur les monocouches de silanes étudiées : (a) CH_3 court, (b) mix court et (c) mix long. Pour chaque monocouche de silanes, les résidus qui contribuent le plus à la stabilisation ou à la déstabilisation des interactions entre ACE2 et le S-RBD, c'est-à-dire tous les résidus tels que $|\Delta\Delta G| \geq 0,4$ kcal·mol^{-1}, sont présentés. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.*

Notons qu'il s'agit principalement de résidus chargés, donc qui peuvent établir des interactions électrostatiques. Cela démontre que certains résidus participent aux interactions entre ACE2 et le S-RBD bien qu'ils ne soient pas identifiés par des considérations géométriques (distance inférieure à 0,4 nm), et souligne donc l'apport de la technique de MM-PBSA pour l'étude de ces interactions.

Enfin, on remarque que la somme des contributions stabilisatrices et déstabilisatrices des résidus sélectionnés permet d'expliquer la majeure partie de la stabilisation globale des interactions observée lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les monocouches de silanes. En effet, les 24 résidus identifiés pour la monocouche mix court engendrent une stabilisation globale de 10,5kcal·mol^{-1} sur 11,7 kcal·mol^{-1}, les 24 résidus identifiés pour la monocouche CH_3 court induisent une stabilisation de 9,9 kcal·mol^{-1} sur 15,2 kcal·mol^{-1}l et les 16 résidus de la monocouche mix long, une stabilisation de 8,9 kcal·mol^{-1} sur 9,9 kcal·mol^{-1}.

Concernant la monocouche de silanes mix court, les résidus K31, E37, D38, R403, Q498 et T500 font partie des *hot-spots* identifiés par Laurini *et al.* [136]. Ces résidus contribuent de façon importante aux interactions entre ACE2 et le S-RBD, cependant, les importantes barres d'erreur observées pour K31, E37, D38 et R403 montrent que ces résidus ne présentent pas systématiquement un effet stabilisateur ou déstabilisateur si ACE2 est adsorbé sur la monocouche mix court. En revanche, les résidus Q498 et T500 présentent un effet stabilisateur. Les résidus D30, E35, L79, M82, K417, Y449, L455, F456, E484, F486, F490 et Q493 font partie de l'interface mais pas des *hot-spots*. Pour les résidus D30, E35 et F486, les barres d'erreur sont trop grandes pour pouvoir conclure à un effet systématique stabilisateur ou déstabilisateur lorsqu'ACE2 est immobilisé sur la surface. Les résidus L79 et M82, qui appartiennent à une large poche hydrophobe [143], présentent un effet stabilisateur de même que K417, L455, F456, E484, F490 et Q493, tandis que Y449 présente un effet déstabilisateur. Enfin, les résidus S19, E23, D405, E406, R408 et K458 ne font pas partie de l'interface identifiée précédemment. Les résidus S19 et R408 présentent un effet déstabilisateur, tandis que les résidus D405 et E406 présentent un effet stabilisateur. Les résidus E23 et K458 présentent plutôt un effet stabilisateur, mais avec une barre d'erreur importante.

Pour la monocouche mix long, les résidus K31, E37, K353 et R403 font partie des *hot-spots* identifiés par Laurini *et al.* [136]. Le résidu K353 présente un effet déstabilisateur, tandis que R403 montre un effet stabilisateur. Les barres d'erreur obtenues pour les résidus K31 et E37 sont trop importantes pour pouvoir conclure à un effet systématique stabilisateur ou déstabilisateur. Les résidus T27, M82, F456, V483, E484, G485 et Q493 font partie de l'interface mais pas des résidus *hot-spots*, et présentent un effet stabilisateur, contrairement aux résidus E35, G354 et N501 qui présentent un effet déstabilisateur. Enfin, les résidus E23 et K458 ne font pas partie de l'interface mais présentent tous les deux un effet de stabilisation des interactions ACE2 - S-RBD lorsqu'ACE2 est adsorbé sur la monocouche mix long.

Enfin, avec la monocouche CH_3 court, les résidus K31, E37, K353, R403 et T500 font partie des résidus *hot-spots* selon les travaux de Laurini *et al.* [136]. Les résidus K31 et R403 présentent un effet stabilisateur, tandis que les résidus K353 et T500 montrent un effet déstabilisateur. Pour le résidu E37, de même que pour le résidu D30 qui ne fait pas partie des *hot-spots*, les barres d'erreur sont trop grandes pour pouvoir conclure. Les résidus I21, Q42, M82, K417, E484, F486, Y489, F490 et Q493 font également partie de l'interface mais pas des *hot-spots* et montrent un effet stabilisateur, contrairement aux résidus G354, E35 et N31 qui ont un effet déstabilisateur. Enfin, les résidus S19, E23, K26, K68, K458 et V503 ne font pas partie de l'interface. Tandis que les résidus S19, K26, K68 et V503 montrent un effet déstabilisateur, les résidus E23 et K458 stabilisent les interactions entre ACE2 et le S-RBD lorsqu'ACE2 est adsorbé sur la monocouche

CH_3 court.

S'il est difficile de conclure à un effet systématique des résidus *hot-spots* sur la stabilisation ou la déstabilisation des interactions, on notera en revanche que le résidu M82 d'ACE2 et les résidus E484 et Q493 du S-RBD par exemple sont systématiquement à l'origine d'une stabilisation des interactions. Enfin, certains résidus polaires ou chargés, n'appartenant pas à l'interface initialement définie, participent à la stabilisation des interactions entre ACE2 et le S-RBD, notamment les résidus E23 d'ACE2 et K458 du S-RBD.

6.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au complexe ACE2 - S-RBD, qui joue un rôle central dans le processus d'infection du SARS-CoV-2, le virus à l'origine de la pandémie de Covid-19 depuis décembre 2019. Nous avons étudié les changements de conformation associés à l'adsorption d'ACE2 sur différentes monocouches de silanes et leur impact sur la reconnaissance moléculaire du S-RBD. Nous avons pour cela transposé les méthodes développées avec le système modèle streptavidine – biotine et réalisé des simulations de dynamique moléculaire, des simulations SMD et des calculs de MM-PBSA.

Dans une première partie, nous avons modélisé l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 seul sur les monocouches de silanes NH_3^+, CH_3 court, CH_3 long, mix court et mix long. Nous avons montré que certaines monocouches de silanes ne sont pas bien adaptées à l'immobilisation du récepteur cellulaire ACE2, soit parce que l'adsorption de la protéine n'est pas très favorable (monocouches CH_3 long et COO^-), soit parce que l'orientation d'ACE2 la plus favorable n'est pas bien adaptée à notre application (monocouche NH_3^+). En revanche, trois monocouches de silanes sont favorables à l'immobilisation d'ACE2 avec une orientation adaptée pour conserver sa capacité à interagir avec le S-RDB. Il s'agit des monocouches CH_3 court (orientation 4), mix court (orientation 1) et mix long (orientation 1). De plus, l'adsorption d'ACE2 sur ces trois monocouches de silanes n'induit pas de changement de conformation majeur, notamment au niveau des résidus interagissant avec le S-RBD, ce qui suggère qu'ACE2 conserve sa capacité à capturer la protéine spike.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'adsorption du complexe ACE2 – S-RBD sur les trois monocouches de silanes et avec les orientations initiales sélectionnées, et nous avons également modélisé le complexe en solution. Nous avons montré que lorsqu'ACE2 est immobilisé sur la monocouche CH_3 court, le S-RBD est susceptible d'interagir avec les molécules de silane, contrairement aux monocouches mix court et mix long. De plus, nous avons mis en évidence que l'adsorption sur les trois monocouches étudiées n'engendre pas de changement de conformation majeur dans la structure du complexe, celle-ci étant bien conservée par rapport au complexe en solution. Nous observons cependant quelques changements de conformation localisés, en particulier au niveau des résidus en contact avec la surface et autour des résidus de l'interface ACE2 – S-RBD. Ces changements de conformation sont corrélés à une augmentation des résidus d'ACE2 en contact avec le S-RDB et réciproquement, et à une augmentation du nombre de liaisons hydrogène qui s'établissent entre ACE2 et le S-RBD. On observe donc, de façon inattendue, que les interactions ACE2 – S-RBD semblent renforcées par l'adsorption d'ACE2 sur les trois monocouches de silanes sélectionnées.

Finalement, dans la troisième partie, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet global de l'adsorption d'ACE2 sur la force des interactions qui s'établissent avec le S-RBD. Pour cela, nous avons déterminé l'énergie libre de liaison par MM-PBSA et les forces de rupture grâce à des simulations SMD. Le détachement entre ACE2 et le S-RBD a été modélisé pour

le complexe en solution et adsorbé sur les monocouches de silanes mix court et mix long. Les simulations SMD ont été réalisées avec une vitesse de tirage de 2×10^6 μm·s^{-1} et la force de tirage a été appliquée dans la direction normale à la surface pour les monocouches mix court et mix long, et dans deux directions pour le complexe en solution. De plus, deux configurations représentatives ont été considérées pour chaque système parmi les six réalisées, afin de prendre en compte les effets de la variabilité des changements de conformation et de l'orientation finale du complexe sur la surface dans les forces de rupture calculées. Nous avons montré que pour la monocouche mix court, la force de rupture est environ 20% plus élevée que pour le complexe en solution. En revanche, lorsque le complexe est adsorbé sur la monocouche mix long, on observe des forces de rupture plus faibles ou plus élevées que pour le complexe en solution, en fonction de la configuration initiale considérée.

Nous avons également réalisé des calculs de MM-PBSA pour déterminer l'énergie libre de liaison entre ACE2 et le S-RBD pour les différents systèmes (complexe en solution et adsorbé sur les monocouches mix court, mix long et CH3 court), en tenant cette fois-ci compte des six configurations modélisées. Nous avons montré que l'énergie libre de liaison entre ACE2 et le S-RBD est systématiquement plus importante lorsqu'ACE2 est immobilisé sur les trois monocouches de silanes que pour le complexe en solution, avec une énergie supérieure d'environ 20%.

Ces deux résultats sont complémentaires. En effet, pour les simulations SMD, seules deux configurations initiales sont étudiées, or les forces de rupture dépendent de l'angle d'adsorption d'ACE2 et des changements de conformation du complexe propres à chaque configuration. Les calculs de MM-PBSA permettent de tenir compte de la variabilité des changements de conformation issus de l'adsorption d'ACE2 sur les monocouches de silanes car ils sont réalisés pour les 6 répliques de simulations. En revanche, les systèmes ne peuvent être comparés que de façon qualitative : l'énergie de liaison étant plus basse lorsque le récepteur cellulaire ACE2 est adsorbé sur les monocouches de silanes, on en déduit que cette immobilisation conduit à une stabilisation des interactions ACE2 - S-RBD.

Nous avons de plus identifié, grâce aux calculs de MM-PBSA, les contributions des différents résidus à la stabilisation ou à la déstabilisation des interactions ACE2 – S-RBD lorsque le complexe est immobilisé sur les monocouches de silanes, par rapport au cas en solution. Nous avons montré qu'il est difficile de conclure à un effet systématiquement stabilisateur ou déstabilisateur pour les résidus *hot-spots* identifiés par Laurini *et al.* [136, 144], c'est-à-dire les principaux résidus contribuant aux interactions ACE2 – S-RBD. En revanche, nous avons mis en évidence que d'autres résidus de l'interface, par exemple les résidus M82 d'ACE2 et E484 et Q493 du S-RBD, sont à l'origine d'une stabilisation des interactions quelle que soit la nature de la monocouche de silanes sur laquelle ACE2 est adsorbé, par rapport au complexe en solution. Enfin, certains résidus polaires ou chargés mais qui n'appartiennent pas à l'interface ACE2 – S-RBD définie de façon géométrique (par analogie avec Lan *et al.* [135], les résidus d'ACE2 situés à moins de 0,4 nm du S-RBD et réciproquement) présentent tout de même un effet stabilisateur ou déstabilisateur. En particulier, les résidus E23 d'ACE2 et K458 du S-RBD présentent tous les deux un effet stabilisateur lorsqu'ACE2 est adsorbé sur les monocouches de silanes CH_3 court, mix court et mix long.

Finalement, cette étude présente une application des résultats observés pour le système modèle streptavidine - biotine en s'intéressant à l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes, et en analysant les effets des changements de conformation induits sur ses interactions avec le S-RBD. Nous observons que parmi les six monocouches de silanes étudiées, les monocouches CH_3 court, mix court et mix long permettent une immobilisation favorable du récepteur cellulaire ACE2. De plus, les résultats obtenus suggèrent que les

changements de conformation induits par l'adsorption d'ACE2 conduisent à un renforcement des interactions ACE2 – S-RBD par rapport au complexe en solution. On note une augmentation à la fois des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène qui s'établissent entre ACE2 et le S-RBD. En considérant l'orientation la plus favorable sur la surface ainsi que les résultats des calculs de MM-PBSA et des simulations SMD, la monocouche mix court semble être la plus adaptée pour l'adsorption d'ACE2, tout en induisant une augmentation de l'énergie libre de liaison du complexe ACE2 – S-RBD d'environ 20%.

Cette augmentation de l'énergie libre de liaison pourrait être utile pour augmenter l'efficacité de la capture de la protéine spike par le récepteur cellulaire ACE2 dans un dispositif de diagnostic. Pour aller plus loin, il faudrait confirmer expérimentalement les effets observés de l'adsorption d'ACE2 sur les différentes monocouches de silanes, sur ses interactions le S-RBD, par AFM en mode *Single Molecule Force Spectroscopy*.

Conclusion

Les biocapteurs permettent de détecter spécifiquement la présence d'un biomarqueur dans un échantillon, par l'intermédiaire d'un élément biologique adapté. Par exemple, l'analyte d'intérêt peut être capturé par reconnaissance moléculaire à l'aide d'une protéine immobilisée sur une surface. La protéine doit être fixée sur la surface tout en préservant son activité biologique, c'est-à-dire sa capacité à capturer l'analyte. Il faut donc que les changements de conformation induits par l'immobilisation de la protéine ne soient pas trop importants et que son orientation sur la surface soit adaptée, c'est-à-dire que le site d'interaction avec l'analyte reste accessible.

L'équipe Chimie et nanobiotechnologies de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) s'intéresse depuis plusieurs années à fonctionnalisation de surfaces de SiO_2 par des monocouches auto-assemblées de molécules de silane monofonctionnelles afin d'immobiliser des protéines ou des brins d'ADN par liaison covalente ou par adsorption. Les travaux d'Yang *et al.* ont en effet étudié la possibilité de détecter des marqueurs tumoraux grâce à l'immobilisation d'anticorps sur des monocouches de silanes et ont montré l'influence de la nature de la monocouche sur l'efficacité de l'immobilisation de la protéine et sur la conservation de sa bioactivité [5]. De plus, l'équipe a également acquis une expertise dans la mesure des interactions protéine - ligand par microscopie à force atomique (AFM) en mode spectroscopie de force à molécule unique (SMFS) [7].

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement à l'immobilisation des protéines par adsorption sur des monocouches de silanes. En effet, l'immobilisation par liaison covalente permet un bon contrôle de l'orientation sur la surface, mais présente un coût élevé. De plus, l'immobilisation par adsorption permet d'atteindre des densités plus élevées de protéines sur la surface, et met en jeu des interactions plus fortes et plus rapides que l'immobilisation par liaison covalente.

L'objectif de cette thèse était de réaliser une première étude de dynamique moléculaire au sein de notre équipe, afin de compléter les résultats expérimentaux avec une description à l'échelle atomique du phénomène de reconnaissance moléculaire et des interactions qui peuvent s'établir entre la protéine adsorbée et la surface. Plus précisément, nous avons étudié par simulations de dynamique moléculaire l'adsorption d'une protéine sur différents types de monocouches de silanes, les changements de conformation induits par cette immobilisation et leur impact sur la reconnaissance moléculaire, afin de déterminer quelle monocouche de silanes permettrait de préserver au mieux les interactions observées en solution.

Nous avons tout d'abord défini une méthode permettant de modéliser les monocouches de

silanes en adaptant la méthodologie proposée par Roscioni *et al.* [69] aux molécules de silane que nous étudions. Nous avons modélisé six types monocouches de silanes, appelées CH_3 court, CH_3 long, COO^-, NH_3^+, mix court et mix long, à différentes densités. Nous avons développé des codes Python afin de construire rapidement et de façon reproductible nos systèmes de simulation, mais aussi pour compléter les outils d'analyse disponibles avec les logiciels Gromacs et VMD, notamment concernant la caractérisation des monocouches de silanes.

Nous avons caractérisé la morphologie des monocouches de silanes que nous avons modélisées et nous l'avons comparée à de précédents résultats de simulations de dynamique moléculaire et à des résultats expérimentaux de FTIR et d'XPS obtenus à l'INL, afin de valider notre méthodologie et d'observer les effets de la longueur de la chaîne alkyle et de la charge du groupement terminal sur la structure des monocouches. Nous avons montré que les molécules de silane présentent un arrangement hexagonal sur la surface, qui est plus prononcé lorsque la densité augmente. De plus, nos résultats suggèrent que les molécules de silane avec de longues chaînes alkyles et une densité élevée forment des monocouches bien organisées, tandis que les molécules de silane avec un groupement terminal chargé forment des monocouches plus désordonnées.

Nous avons également étudié l'organisation et les propriétés dynamiques des ions et des molécules d'eau dans nos systèmes. Nous avons mis en évidence que celles-ci sont perturbées à proximité des monocouches de silanes, dans une couche d'hydratation d'environ 0,7 nm au-dessus de l'interface, tandis qu'on retrouve les propriétés de l'eau *bulk* au-delà. Nous avons vu que la distribution des ions à proximité des monocouches de silanes NH_3^+ et COO^- est impactée par la répartition des groupements terminaux chargés sur la surface. De plus, ces monocouches induisent une forte orientation des molécules d'eau près de la surface. Pour les monocouches comportant des groupements terminaux non chargés, nos résultats suggèrent que l'organisation des molécules d'eau est influencée par la rugosité de la surface et la longueur des chaînes alkyles.

Nous avons ensuite étudié les changements de conformation induits par l'adsorption d'une protéine sur différentes monocouches de silanes et leurs effets sur les interactions protéine - ligand à l'aide du complexe streptavidine - biotine. Celui-ci constitue pour nous un système modèle puisqu'il a été largement étudié à la fois en simulations et expérimentalement, notamment pour le complexe en solution. Nous avons dans un premier temps étudié l'adsorption de la streptavidine dimérique sur les monocouches de silanes CH_3 court, CH_3 long, NH_3^+, mix court et mix long. Nous avons montré que des changements de conformation plus importants sont observés avec les monocouches présentant des groupements terminaux chargés positivement. De plus, grâce à des simulations SMD, nous avons montré que ces changements de conformation engendrent une diminution de la force de rupture de la biotine par rapport au complexe en solution, c'est-à-dire un affaiblissement des interactions streptavidine - biotine. À l'inverse, nous obtenons une force de rupture très proche de celle obtenue en solution avec la monocouche CH_3 court.

Nous avons également modélisé l'adsorption de la streptavidine tétramérique sur les deux monocouches de silanes NH_3^+ et CH_3 court et réalisé des simulations SMD à différentes vitesses de tirage entre 20×10^6 μm·s^{-1} et $0,002 \times 10^6$ μm·s^{-1} afin d'identifier les effets de la vitesse de tirage et les changements de conformation induits par l'adsorption sur la force de rupture et le mécanisme de détachement de la biotine. Nous avons constaté que les forces de rupture obtenues lorsque la streptavidine est adsorbée sur la monocouche de silanes CH_3 court sont très proches de celles déterminées par Rico *et al.* pour le complexe en solution, tandis que des forces de rupture plus faibles sont obtenues avec la monocouche NH_3^+. La monocouche CH_3 court semble donc être une bonne candidate pour immobiliser la streptavidine tout en conservant sa capacité à se lier à la biotine.

Enfin, nous avons mis notre méthode en application en étudiant l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur différentes monocouches de silanes et son effet sur les interactions avec le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine spike du SARS-CoV-2 (noté S-RBD). Nous avons identifié trois monocouches de silanes qui semblent bien adaptées pour immobiliser ACE2 avec une orientation adaptée à la capture du S-RBD. Il s'agit des monocouches CH_3 court, mix court et mix long. Grâce à des simulations SMD et au calcul de l'énergie libre de liaison par MM-PBSA, nous avons observé que lorsqu'ACE2 est immobilisé sur ces trois monocouches de silanes, et en particulier sur la monocouche mix court, ses interactions avec le S-RBD sont renforcées. Ce renforcement de l'affinité entre les deux protéines pourraît être intéressant dans la perspective de réaliser un biocapteur.

Nous avons donc employé une méthode couplant simulations de dynamique moléculaire, simulations SMD et détermination de l'énergie libre de liaison, afin d'identifier quel type de monocouche de silanes serait le plus adapté pour immobiliser deux protéines, la streptavidine et le récepteur cellulaire ACE2, tout en conservant leur capacité à se lier à la biotine et au S-RBD respectivement. Nous observons que la nature de la monocouche la plus adaptée diffère en fonction de la protéine, ce qui montre l'intérêt d'une telle méthode de simulations pour identifier rapidement des monocouches potentiellement intéressantes pour l'immobilisation d'une protéine donnée.

En plus des limites propres à la dynamique moléculaire, la méthode que nous avons utilisée pour la réalisation de nos simulations présente des limites qui pourraient être améliorées dans de futures études. Nous pourrions tout d'abord optimiser la description de la couche de SiO_2 amorphe et des molécules de silane, avec la prise en compte explicite des deux groupements non hydrolysables méthyle ou éthyle présents dans les molécules de silane monofonctionnelles utilisées au laboratoire. Concernant l'adsorption des protéines sur les monocouches de silanes, nous avons identifié l'orientation la plus favorable en réalisant des simulations de dynamique moléculaire conventionnelles avec différentes orientations initiales et en déterminant les contributions électrostatique et de Van der Waals à l'énergie d'interaction entre la protéine et les molécules de silane. Cette méthode peut cependant aboutir à l'observation d'un état correspondant à un minimum local d'énergie et non au minimum global. D'autres méthodes telles que la REMD (*Replica-Exchange Molecular Dynamics*), l'aMD (*accelerated Molecular Dynamics*) ou des simulations de Monte-Carlo pourraient être utilisées pour déterminer l'orientation la plus favorable des protéines adsorbées sur les surfaces. Concernant les simulations SMD, notre méthode pourrait être améliorée afin de mieux prendre en compte l'impact de la direction de tirage sur les forces de rupture et les mécanismes de détachement déterminés. De plus, la hauteur des boîtes de simulation pourrait être optimisée afin de minimiser les temps de calcul.

Concernant les simulations présentées dans cette thèse, leurs interprétations pourraient être poursuivies avec la finalisation des calculs d'*umbrella sampling* et une analyse plus complète du spectre de force dynamique associé au complexe streptavidine tétramérique - biotine. De plus, nous pourrions déterminer l'énergie libre de liaison entre ACE2 et le S-RBD de façon plus précise, par exemple grâce à l'égalité de Jarzynski ou par *umbrella sampling*. On pourrait également étudier les effets du pH de la solution ou de la concentration en ions sur les phénomènes observés.

Par ailleurs, ces travaux pourront être poursuivis par une validation expérimentale des résultats obtenus, par AFM en mode SMFS. Cependant, les vitesses de tirage expérimentales seraient inférieures à celles utilisées en simulations et ne permettraient donc pas une comparaison directe des valeurs obtenues pour les forces de rupture. Les expériences d'AFM en mode SMFS donneraient également lieu à plusieurs types de difficultés, par exemple la prise en compte des interactions non spécifiques entre la biomolécule attachée sur la pointe et la surface, la difficulté

d'immobiliser une seule biomolécule sur la pointe ou encore l'inhomogénéité du dépôt des protéines sur les surfaces.

Enfin, notons qu'expérimentalement, la fonctionnalisation de surfaces de SiO_2 par des monocouches auto-assemblées mixant deux types de molécules de silane monofonctionnelles en proportions connues est un procédé en cours de développement à l'INL, par silanisation en phase gazeuse. Cette technique est également en cours d'application à la fonctionnalisation d'échantillons poreux, qui présentent de nombreux avantages pour la réalisation de biocapteurs.

ANNEXE A

Paramètres du champ de force

A.1 Champ de force des molécules de silane CH_3 long, CH_3 court, NH_3^+ et COO^-

A.1.1 Distribution des charges

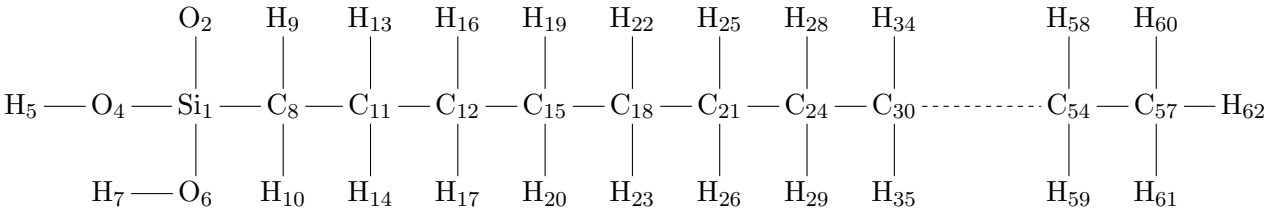


FIGURE A.1 – *Numérotation des atomes pour la molécule de silane CH_3 long.*

Atome i	q_i (e)	
Si_1	1,152	adapté de [69]
O_2, O_4, O_6	-0,676	adapté de [69]
H_5, H_7	0,496	adapté de [69]
C_8	-0,369	adapté de [69]
H_9, H_{10}	0,052	[69]
C_{11}	0,303	[69]
H_{13}, H_{14}	-0,038	[69]
C_{12}	-0,113	[69]
H_{16}, H_{17}	0,023	[69]
C_{15}	-0,068	[69]
H_{19}, H_{20}	0,004	[69]
C_{18}	0,149	[69]
H_{22}, H_{23}	-0,037	[69]
C_{21}	0,011	[69]
H_{25}, H_{26}	-0,011	[69]
C_{24}	-0,011	[69]
H_{28}, H_{29}	-0,010	[69]
C_{27}	0,080	[69]
H_{31}, H_{32}	-0,025	[69]
C_{30}	0,013	[69]
H_{34}, H_{35}	-0,012	[69]
C_{33}	0,021	[69]
H_{37}, H_{38}	-0,014	[69]
C_{36}	0,067	[69]
H_{40}, H_{41}	-0,023	[69]
C_{39}	-0,005	[69]
H_{43}, H_{44}	-0,010	[69]
C_{42}	0,034	[69]
H_{46}, H_{47}	-0,016	[69]
C_{45}	0,104	[69]
H_{49}, H_{50}	-0,030	[69]
C_{48}	-0,065	[69]
H_{52}, H_{53}	0,001	[69]
C_{51}	0,018	[69]
H_{55}, H_{56}	-0,008	[69]
C_{54}	0,197	[69]
H_{58}, H_{59}	-0,038	[69]
C_{57}	-0,260	[69]
H_{60}, H_{61}, H_{62}	0,054	[69]

TABLE A.1 – *Distribution des charges pour la molécule de silane CH_3 long, adaptée de Roscioni et al. [69].*

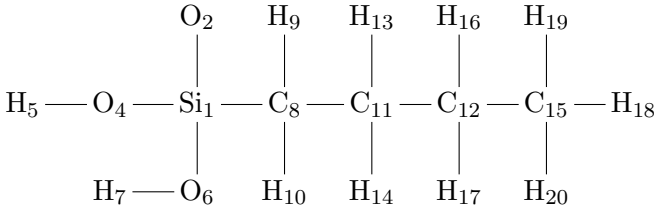


FIGURE A.2 – *Numérotation des atomes pour la molécule de silane CH_3 court.*

Atome i	q_i (e)	
Si_1	1,156579	adapté de [69]
O_2, O_4, O_6	-0,671421	adapté de [69]
H_5, H_7	0,500579	adapté de [69]
C_8	-0,364421	adapté de [69]
H_9, H_{10}	0,056579	adapté de [69]
C_{11}	0,307579	adapté de [69]
H_{13}, H_{14}	-0,033421	adapté de [69]
C_{12}	-0,108421	adapté de [69]
H_{16}, H_{17}	0,027579	adapté de [69]
C_{15}	-0,255421	adapté de [69]
H_{18}, H_{19}, H_{20}	0,058579	adapté de [69]

TABLE A.2 – *Distribution des charges pour la molécule de silane CH_3 court, adaptée de Roscioni et al. [69].*

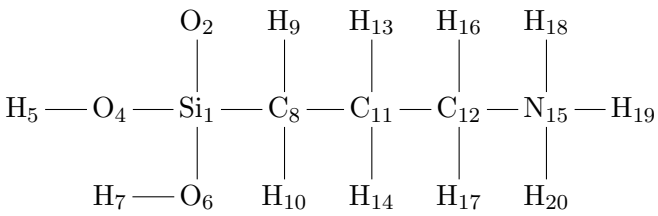


FIGURE A.3 – *Numérotation des atomes pour la molécule de silane NH_3^+.*

Atome i	q_i (e)	
Si_1	1,152	adapté de [69]
O_2, O_4, O_6	-0,676	adapté de [69]
H_5, H_7	0,496	adapté de [69]
C_8	-0,369	[69]
H_9, H_{10}	0,052	[69]
C_{11}	0,303	[69]
H_{13}, H_{14}	-0,038	[69]
C_{12}	0,190	[31]
H_{16}, H_{17}	0,021	adapté de [69]
N_{15}	-0,300	[31, 193]
H_{18}, H_{19}, H_{20}	0,330	[31, 193]

TABLE A.3 – *Distribution des charges pour la molécule de silane NH_3^+, adaptée de Roscioni et al. [69] et du champ de force OPLS tout-atome.*

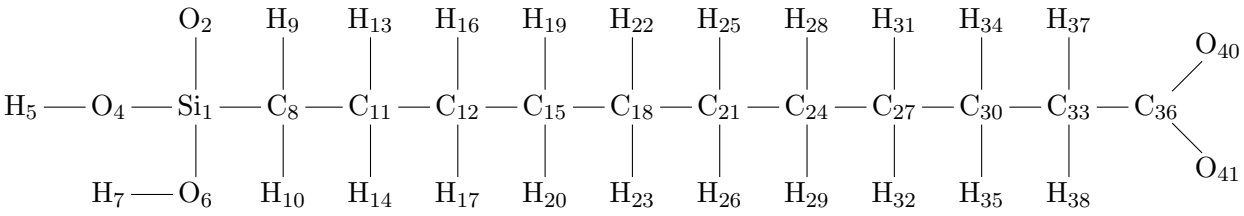


FIGURE A.4 – *Numérotation des atomes pour la molécule de silane COO^-.*

Atome i	q_i (e)	
Si_1	1,151923	adapté de [69]
O_2, O_4, O_6	-0,676077	adapté de [69]
H_5, H_7	0,495923	adapté de [69]
C_8	-0,369077	adapté de [69]
H_9, H_{10}	0,051923	adapté de [69]
C_{11}	0,302923	adapté de [69]
H_{13}, H_{14}	-0,038077	adapté de [69]
C_{12}	-0,113077	adapté de [69]
H_{16}, H_{17}	0,022923	adapté de [69]
C_{15}	-0,068077	adapté de [69]
H_{19}, H_{20}	0,003923	adapté de [69]
C_{18}	0,148923	adapté de [69]
H_{22}, H_{23}	-0,037077	adapté de [69]
C_{21}	0,010923	adapté de [69]
H_{25}, H_{26}	-0,011077	adapté de [69]
C_{24}	-0,011077	adapté de [69]
H_{28}, H_{29}	-0,010077	adapté de [69]
C_{27}	0,079923	adapté de [69]
H_{31}, H_{32}	-0,025077	adapté de [69]
C_{30}	0,012923	adapté de [69]
H_{34}, H_{35}	-0,012077	adapté de [69]
C_{33}	-0,220077	adapté de [31]
H_{37}, H_{38}	0,059923	adapté de [31]
C_{36}	0,699923	adapté de [31, 193]
O_{40}, O_{41}	-0,800077	adapté de [31, 193]

TABLE A.4 – *Distribution des charges pour la molécule de silane COO^-, adaptée de Roscioni et al. [69] et du champ de force OPLS tout-atome.*

A.1.2 Paramètres associés aux interactions non liantes

Type d'atome i	m_i (u.m.a.)		σ_{ii} (nm)		ϵ_{ii} (kJ·mol^{-1})	
Si	28,0855	[69]	0,3920	[72]	30,510400	adapté de [72]
O (O-H)	15,9994	[69]	0,3154	[72]	6,036800	adapté de [72]
H (H-O)	1,0079	[69]	0,2352	[72]	0,920000	[72]
C (C-H)	12,0110	[69]	0,3500	[72]	0,276144	[72]
H (H-C)	1,0079	[69]	0,2500	[72]	0,125520	[72]
C (CH_2-NH_3^+)	12.0110	[31]	0.3500	[31]	0.276144	[31]
H (CH_2-NH_3^+)	1.0079	[69]	0,2500	[72]	0,125520	[72]
N (NH_3^+)	14.0067	[31]	0,3250	[31]	0,711280	[31]
H (NH_3^+)	1.008	[31]	0.0000	[31]	0.0000	[31]
C (CH_2-COO^-)	12.0110	[31]	0.3500	[31]	0.276144	[31]
H (CH_2-COO^-)	1.0079	[31]	0.2500	[31]	0.125520	[31]
C (COO^-)	12.0110	[31]	0.3750	[31]	0.439320	[31]
O (COO^-)	15.9994	[31]	0.2960	[31]	0.878640	[31]

Table A.5 – *Masse et paramètres de Lennard-Jones des différents atomes des molécules de silane, adaptés de Roscioni et al. [69], Castillo et al. [72] et du champ de force OPLS tout-atome.*

A.1.3 Paramètres associés aux interactions liantes

Type de liaison	r_{eq} (nm)	k_{ij}^r (kJ·mol^{-1}·nm^{-2})	
Si - O	0,16300	323984,0	[72]
Si - C	0,18400	100000,0	[72]
O - H	0,09500	533549,0	[72]
C - H	0,10900	284512,0	[72]
C - C	0,15290	224262,4	[72]
C - N	0,14710	307105,6	[194]
N - H	0,10100	363171,2	[194]
C - O	0,12500	548940,8	[195]

Table A.6 – *Paramètres associés à l'élongation dans les molécules de silane, issus de Castillo et al. [72] et du champ de force OPLS tout-atome.*

Type d'angle	θ_{eq} (°)	k^{θ}_{ijk} (kJ·mol^{-1}·rad^{-2})	
O - Si - O	109,470	469,720	[72]
Si - O - H	119,520	228,840	[72]
H - C - H	107,800	276,144	[72]
O - Si - C	109,470	469,720	[72]
Si - C - C	109,450	482,300	[72]
C - C - C	112,700	488,273	[72]
C - C - H	110,700	313,800	[72]
Si - C - H	109,450	482,300	adapté de [72]
H - N - H	106,400	364,845	[194]
C - C - N	111,200	669,440	[194]
C - N - H	109,500	292,880	[194]
N - C - H	109,500	292,880	[194]
O - C - O	126,000	669,440	[195]
C - C - O	117,000	585,760	[195]

Table A.7 – *Paramètres associés à la flexion dans les molécules de silane, adaptés de Castillo et al. [72] et du champ de force OPLS tout-atome.*

Type d'angle dihédral	C_0 (kJ·mol^{-1})	C_1 (kJ·mol^{-1})	C_2 (kJ·mol^{-1})	C_3 (kJ·mol^{-1})	
O - Si - C - H	6,00000	18,00000	0,00000	-24,00000	[72]
O - Si - C - C	6,00000	18,00000	0,00000	-24,00000	[72]
Si - C - C - C	6,00000	18,00000	0,00000	-24,00000	[72]
C - C - C - C	2,92880	-1,46440	0,20920	-1,67360	[72]
C - C - C - H	0,62760	1,88280	0,00000	-2,51040	[72]
H - C - C - H	0,62760	1,88280	0,00000	-2,51040	[72]
C - C - C - N	5,77183	-2,67148	0,95814	-4,05848	[31]
C - C - N - H	0,72592	2,17777	0,00000	-2,90370	[31]
H - C - C - N	0,80333	2,40999	0,00000	-3,21331	[31]
H - N - C - H	0,54601	1,63803	0,00000	-2,18405	[31]
C - C - C - C(O)	-9,08346	9,75709	3,45180	-4,12542	[31]
H - C - C - C(O)	-0,47070	-1,41210	0,00000	1,88280	[31]
C - C - C - O	3,43088	0,00000	-3,43088	0,00000	[31]
H - C - C - O	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	[31]

Table A.8 – *Paramètres associés à la torsion dans les molécules de silane, issus de Castillo et al. [72] et du champ de force OPLS tout-atome.*

A.2 Champ de force de la couche de SiO_2 amorphe

Type d'atome i	m_i (u.m.a.)		q_i (e)		σ_{ii} (nm)		ϵ_{ii} (kJ·mol^{-1})	
Si	28,0855	[69]	2,1	[69]	0,3920	[72]	2,510400	[72]
O	15,9994	[69]	-1,05	[69]	0,3154	[72]	0,636800	[72]

Table A.9 – *Masse, charge et paramètres de Lennard-Jones des atomes de la couche de SiO_2 amorphe, issus de Roscioni et al. [69] et Castillo et al. [72].*

A.3 Champ de force du mur de Lennard-Jones

Type d'atome i	m_i (u.m.a.)		q_i (e)		σ_{ii} (nm)		ϵ_{ii} (kJ·mol^{-1})	
LJ	1,0079	[111]	0	[111]	0,35	[111]	0,0657	[111]

Table A.10 – *Masse, charge et paramètres de Lennard-Jones des atomes constituant le mur de Lennard-Jones, issus de Kitabata et al. [111].*

Bibliographie

[1] Judy Gibbs and Maine Kennebunk. Immobilization Principles–Selecting the Surface. *ELISA technical bulletin*, 1:1–8, 2001.

[2] Vincent Dugas, Géraldine Depret, Yves Chevalier, Xavier Nesme, and Éliane Souteyrand. Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization : covalent binding or adsorption ? *Sensors and Actuators B : Chemical*, 101(1):112–121, June 2004.

[3] Magali Phaner-Goutorbe, Vincent Dugas, Yann Chevolot, and Eliane Souteyrand. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols : A comparative study. *Materials Science and Engineering : C*, 31(2):384–390, March 2011.

[4] Zhugen Yang, Yann Chevolot, Thomas Géhin, Jérôme Solassol, Alain Mange, Eliane Souteyrand, and Emmanuelle Laurenceau. Improvement of protein immobilization for the elaboration of tumor-associated antigen microarrays : Application to the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1):385–392, February 2013.

[5] Zhugen Yang, Yann Chevolot, Thomas Géhin, Vincent Dugas, Nicolas Xanthopoulos, Vincent Laporte, Thierry Delair, Yasemin Ataman-Önal, Geneviève Choquet-Kastylevsky, Eliane Souteyrand, and Emmanuelle Laurenceau. Characterization of Three Amino-Functionalized Surfaces and Evaluation of Antibody Immobilization for the Multiplex Detection of Tumor Markers Involved in Colorectal Cancer. *Langmuir*, 29(5):1498–1509, February 2013.

[6] Francesca Zuttion, Delphine Sicard, Lucie Dupin, Gérard Vergoten, Camille Girard-Bock, Mimouna Madaoui, Yann Chevolot, Francois Morvan, Sébastien Vidal, Jean-Jacques Vasseur, Eliane Souteyrand, and Magali Phaner-Goutorbe. Deciphering multivalent glycocluster–lectin interactions through AFM characterization of the self-assembled nanostructures. *Soft Matter*, 15(36):7211–7218, September 2019.

[7] Francesca Zuttion. *Glycocluster inhibition effect on bacterial adhesion of Pseudomonas aeruginosa characterized by atomic force microscopy and spectroscopy : from molecule to cell.* phdthesis, Université de Lyon, October 2016.

[8] David G. Castner. Biomedical surface analysis : Evolution and future directions (Review). *Biointerphases*, 12(2):02C301, June 2017.

[9] Paul-François Gallet, Stéphanie Durand, Sébastien Legardinier, and Michel Guilloton. *Mini manuel biochimie : cours + exos + QCM-QROC.* Dunod, 2020.

[10] Reginald H. Garrett and Charles M. Grisham. *Biochemistry.* Thomson Brooks/Cole, 4th edition, 2010.

[11] Jack Kyte and Russell F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105–132, May 1982.

[12] Christophe Bucher and Jean-Pierre Dutasta. Introduction à la chimie supramoléculaire - Concepts - Chimie hôte-invité. *Techniques de l'Ingénieur - « Nanosciences et nanotechnologies »*, NM 220, June 2018.

[13] Lionel Aigouy, Yannick De Wilde, and Christian Frétigny. *Les nouvelles microscopies : A la découverte du nanomonde*. Belin, Paris, November 2006.

[14] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*, 49(1):57–61, July 1982.

[15] G. Binnig, Ch. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, and C. F. Quate. Atomic Resolution with Atomic Force Microscope. *Europhysics Letters (EPL)*, 3(12):1281–1286, June 1987.

[16] Jean-Claude Rivoal and Christian Frétigny. Microscopie à force atomique (AFM). *Techniques de l'ingénieur*, 1:394, 2005.

[17] R. R. L. De Oliveira, D. A. C. Albuquerque, T. G. S. Cruz, F. M. Yamaji, and F. L. Leite. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy : Basic Principles and Applications. In *Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*. IntechOpen, March 2012.

[18] Fidan Sumbul and Felix Rico. Single-molecule force spectroscopy : experiments, analysis, and simulations. In *Atomic Force Microscopy*, pages 163–189. Springer, 2019.

[19] Chih-Kung Lee, Yu-Ming Wang, Long-Sun Huang, and Shiming Lin. Atomic force microscopy : determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction. *Micron*, 38(5):446–461, 2007.

[20] G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627, May 1978.

[21] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714):50–53, January 1999.

[22] Musa Ozboyaci, Daria B. Kokh, Stefano Corni, and Rebecca C. Wade. Modeling and simulation of protein–surface interactions : achievements and challenges. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 49, 2016.

[23] Michel Cuendet. Molecular Dynamics Simulations - A short introduction. EMBL, 2008, Disponible sur : `https://embnet.vital-it.ch/CoursEMBnet/Pages3D08/slides/MD_cours_opt.pdf`. Consulté le 31/03/2021.

[24] Daniel L. Parton. *Pushing the boundaries : molecular dynamics simulations of complex biological membranes*. PhD Thesis, Oxford University, UK, 2011.

[25] Michael P. Allen. Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter : from synthetic polymers to proteins*, 23(1):1–28, 2004.

[26] R. Stote, A. Dejaegere, D. Kuznetsov, and L. Falquet. CHARMM Molecular Dynamics Simulations. Version 1.0, 1999 Disponible sur : `https://embnet.vital-it.ch/MD_tutorial/`. Consulté le 31/03/2021.

[27] M. A. González. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12:169–200, 2011.

[28] Bernard R. Brooks, Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, and Martin Karplus. CHARMM : A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2):187–217, 1983.

[29] Junmei Wang, Romain M. Wolf, James W. Caldwell, Peter A. Kollman, and David A. Case. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9):1157–1174, 2004.

[30] Walter RP Scott, Philippe H. Hünenberger, Ilario G. Tironi, Alan E. Mark, Salomon R. Billeter, Jens Fennen, Andrew E. Torda, Thomas Huber, Peter Krüger, and Wilfred F. van Gunsteren. The GROMOS biomolecular simulation program package. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(19):3596–3607, 1999.

[31] William L. Jorgensen, David S. Maxwell, and Julian Tirado-Rives. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45):11225–11236, November 1996.

[32] D. C. Rapaport. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, April 2004.

[33] Lindahl, Abraham, Hess, and van der Spoel. GROMACS 2021.1 Manual, March 2021. https://doi.org/10.5281/zenodo.4723561.

[34] Tom Darden, Darrin York, and Lee Pedersen. Particle mesh Ewald : An N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12):10089–10092, June 1993.

[35] Juan M. R. Albano, Eneida de Paula, and Monica Pickholz. Molecular Dynamics Simulations to Study Drug Delivery Systems. *Molecular Dynamics*, November 2018.

[36] M. T. Tran. Physique Générale - Introduction à la Théorie cinétique des gaz. Disponible sur : `http://lphe.epfl.ch/~mtran/phy_gen_B/Cours/Phys_214.pdf`. Consulté le 24/06/2019.

[37] Sergei Izrailev, Sergey Stepaniants, Barry Isralewitz, Dorina Kosztin, Hui Lu, Ferenc Molnar, Willy Wriggers, and Klaus Schulten. Steered molecular dynamics. In *Computational molecular dynamics : challenges, methods, ideas*, pages 39–65. Springer, 1999.

[38] Justin A. Lemkul and David R. Bevan. Assessing the Stability of Alzheimer's Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(4):1652–1660, February 2010.

[39] Barry Isralewitz, Jerome Baudry, Justin Gullingsrud, Dorina Kosztin, and Klaus Schulten. Steered molecular dynamics investigations of protein function. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 19(1):13–25, 2001.

[40] Felix Rico, Andreas Russek, Laura González, Helmut Grubmüller, and Simon Scheuring. Heterogeneous and rate-dependent streptavidin-biotin unbinding revealed by high-speed force spectroscopy and atomistic simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(14):6594–6601, April 2019.

[41] Justin Lemkul. From proteins to perturbed Hamiltonians : A suite of tutorials for the GROMACS-2018 molecular simulation package, v1. 0. *Living Journal of Computational Molecular Science*, 1(1):5068, 2019.

[42] Anita de Ruiter and Chris Oostenbrink. Free energy calculations of protein–ligand interactions. *Current opinion in chemical biology*, 15(4):547–552, 2011.

[43] Sanghyun Park and Klaus Schulten. Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations. *The Journal of chemical physics*, 120(13):5946–5961, 2004.

[44] C. Jarzynski. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Physical Review Letters*, 78(14):2690–2693, April 1997.

[45] Sanghyun Park, Fatemeh Khalili-Araghi, Emad Tajkhorshid, and Klaus Schulten. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *The Journal of Chemical Physics*, 119(6):3559–3566, August 2003.

[46] Glenn M. Torrie and John P. Valleau. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling : Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. *Chemical Physics Letters*, 28(4):578–581, October 1974.

[47] G. M. Torrie and J. P. Valleau. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation : Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, 23(2):187–199, February 1977.

[48] Johannes Kästner. Umbrella sampling. *WIREs Computational Molecular Science*, 1(6):932–942, 2011.

[49] Benoît Roux. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Computer Physics Communications*, 91(1):275–282, September 1995.

[50] Jochen S. Hub, Bert L. de Groot, and David van der Spoel. g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(12):3713–3720, December 2010.

[51] Shankar Kumar, John M. Rosenberg, Djamal Bouzida, Robert H. Swendsen, and Peter A. Kollman. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8):1011–1021, 1992.

[52] Samuel Genheden and Ulf Ryde. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5):449–461, May 2015.

[53] Bill R. Miller, T. Dwight McGee, Jason M. Swails, Nadine Homeyer, Holger Gohlke, and Adrian E. Roitberg. MMPBSA.py : An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9):3314–3321, September 2012.

[54] Rashmi Kumari, Rajendra Kumar, and Andrew Lynn. g_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7):1951–1962, July 2014.

[55] M.S. Valdes-Tresanco, M.E. Valdes-Tresanco, P.A. Valiente, and E. Moreno. gmx_mmpbsa : a new tool aid to perform end-state free energy calculations with GROMACS files, 2021.

[56] Tingjun Hou, Junmei Wang, Youyong Li, and Wei Wang. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1):69–82, January 2011.

[57] M. Lessel, O. Bäumchen, M. Klos, H. Hähl, R. Fetzer, M. Paulus, R. Seemann, and K. Jacobs. Self-assembled silane monolayers : an efficient step-by-step recipe for high-quality, low energy surfaces. *Surface and Interface Analysis*, 47(5):557–564, 2015.

[58] Sophie de Monredon Senani. *Interaction Organosilanes / Silice de précipitation Du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux*. PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, December 2004.

[59] Joshua D. Deetz, Quynh Ngo, and Roland Faller. Reactive Molecular Dynamics Simulations of the Silanization of Silica Substrates by Methoxysilanes and Hydroxysilanes. *Langmuir*, 32(28):7045–7055, July 2016.

[60] John A. Howarter and Jeffrey P. Youngblood. Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22(26):11142–11147, December 2006.

[61] Jill Chastain and Roger C King Jr. Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy. *Perkin-Elmer Corporation*, 40:221, 1992.

[62] Paul M. Dietrich, Stephan Glamsch, Christopher Ehlert, Andreas Lippitz, Nora Kulak, and Wolfgang ES Unger. Synchrotron-radiation XPS analysis of ultra-thin silane films : Specifying the organic silicon. *Applied Surface Science*, 363:406–411, 2016.

[63] Rebecca A. Shircliff, Ina T. Martin, Joel W. Pankow, John Fennell, Paul Stradins, Maria L. Ghirardi, Scott W. Cowley, and Howard M. Branz. High-Resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy of Mixed Silane Monolayers for DNA Attachment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(9):3285–3292, September 2011.

[64] Michaël A. Ramin, Gwénaëlle Le Bourdon, Nicolas Daugey, Bernard Bennetau, Luc Vellutini, and Thierry Buffeteau. PM-IRRAS Investigation of Self-Assembled Monolayers Grafted onto SiO2/Au Substrates. *Langmuir*, 27(10):6076–6084, May 2011.

[65] Marc D. Porter, Thomas B. Bright, David L. Allara, and Christopher E. D. Chidsey. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 109(12):3559–3568, June 1987.

[66] Aliyah Barrett and Poul B. Petersen. Order of Dry and Wet Mixed-Length Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(42):23943–23950, October 2015.

[67] Eric Schulze and Matthias Stein. Simulation of Mixed Self-Assembled Monolayers on Gold : Effect of Terminal Alkyl Anchor Chain and Monolayer Composition. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122:7699–7710, August 2018.

[68] Otello Maria Roscioni, Luca Muccioli, Raffaele Guido Della Valle, Antonio Pizzirusso, Matteo Ricci, and Claudio Zannoni. Predicting the anchoring of liquid crystals at a solid surface : 5-cyanobiphenyl on cristobalite and glassy silica surfaces of increasing roughness. *Langmuir*, 29(28):8950–8958, 2013.

[69] Otello Maria Roscioni, Luca Muccioli, Alexander Mityashin, Jérôme Cornil, and Claudio Zannoni. Structural Characterization of Alkylsilane and Fluoroalkylsilane Self-Assembled Monolayers on SiO2 by Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(27):14652–14662, July 2016.

[70] Zhe Kong, Qi Wang, Eryu Chen, and Tao Wu. Study on preparation method for short-chain alkylsiloxane self-assembled monolayers and the diffusion behavior of copper on silica surfaces. *Applied Surface Science*, 279:171–179, August 2013.

[71] Jana E. Black, Christopher R. Iacovella, Peter T. Cummings, and Clare McCabe. Molecular Dynamics Study of Alkylsilane Monolayers on Realistic Amorphous Silica Surfaces. *Langmuir*, 31(10):3086–3093, March 2015.

[72] Juan Manuel Castillo, Mischa Klos, Karin Jacobs, Martin Horsch, and Hans Hasse. Characterization of Alkylsilane Self-Assembled Monolayers by Molecular Simulation. *Langmuir*, 31:2630–2638, 2015.

[73] Jana E. Black, Andrew Z. Summers, Christopher R. Iacovella, Peter T. Cummings, and Clare McCabe. Investigation of the Impact of Cross-Polymerization on the Structural and Frictional Properties of Alkylsilane Monolayers Using Molecular Simulation. *Nanomaterials*, 9(4):639, April 2019.

[74] Giuseppina Raffaini and Fabio Ganazzoli. Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface : A Molecular Dynamics Study of Lysozyme on Graphite. *Langmuir*, 26(8):5679–5689, April 2010.

[75] Tillmann Utesch, Diego Millo, Maria Ana Castro, Peter Hildebrandt, Ingo Zebger, and Maria Andrea Mroginski. Effect of the Protonation Degree of a Self-Assembled Monolayer on the Immobilization Dynamics of a [NiFe] Hydrogenase. *Langmuir*, 29(2):673–682, January 2013.

[76] Yun Xie, Weiping Gong, Jiarui Jin, Zhenting Zhao, Zhanchao Li, and Jian Zhou. Molecular simulations of lysozyme adsorption on an electrically responsive mixed self-assembled monolayer. *Applied Surface Science*, 506:144962, March 2020.

[77] Tomoaki Hagiwara, Takaharu Sakiyama, and Hisahiko Watanabe. Molecular Simulation of Bovine β-Lactoglobulin Adsorbed onto a Positively Charged Solid Surface. *Langmuir*, 25(1):226–234, January 2009.

[78] Martin Hoefling, Susanna Monti, Stefano Corni, and Kay Eberhard Gottschalk. Interaction of β-Sheet Folds with a Gold Surface. *PLOS ONE*, 6(6):e20925, June 2011.

[79] Ryo Tosaka, Hideaki Yamamoto, Iwao Ohdomari, and Takanobu Watanabe. Adsorption Mechanism of Ribosomal Protein L2 onto a Silica Surface : A Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir*, 26(12):9950–9955, June 2010.

[80] C. E. Nordgren, D. J. Tobias, M. L. Klein, and J. K. Blasie. Molecular Dynamics Simulations of a Hydrated Protein Vectorially Oriented on Polar and Nonpolar Soft Surfaces. *Biophysical Journal*, 83(6):2906–2917, December 2002.

[81] Yu Sun, William J. Welsh, and Robert A. Latour. Prediction of the Orientations of Adsorbed Protein Using an Empirical Energy Function with Implicit Solvation. *Langmuir*, 21(12):5616–5626, June 2005.

[82] Hao-Jen Hsu, Sheh-Yi Sheu, and Ruey-Yug Tsay. Preferred orientation of albumin adsorption on a hydrophilic surface from molecular simulation. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 67(2):183–191, December 2008.

[83] Qiuming Wang, Jun Zhao, Xiang Yu, Chao Zhao, Lingyan Li, and Jie Zheng. Alzheimer Aβ1−42 Monomer Adsorbed on the Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, 26(15):12722–12732, August 2010.

[84] Qiuming Wang, Chao Zhao, Jun Zhao, Jingdai Wang, Jui-Chen Yang, Xiang Yu, and Jie Zheng. Comparative Molecular Dynamics Study of Aβ Adsorption on the Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, 26(5):3308–3316, March 2010.

[85] Guedmiller S. Oliveira, Fabio L. Leite, Adriano M. Amarante, Eduardo F. Franca, Richard A. Cunha, James M. Briggs, and Luiz C. G. Freitas. Molecular modeling of enzyme attachment on AFM probes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 45:128–136, September 2013.

[86] Thien Dien To, Anh Tuan Nguyen, Khoa Nhat Thanh Phan, An Thu Thi Truong, Tin Chanh Duc Doan, and Chien Mau Dang. Modification of silicon nitride surfaces with GOPES and APTES for antibody immobilization : Computational and experimental studies. *Advances in Natural Sciences : Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4):045006, 2015.

[87] Dorina Kosztin, Sergei Izrailev, and Klaus Schulten. Unbinding of Retinoic Acid from its Receptor Studied by Steered Molecular Dynamics. *Biophysical Journal*, 76(1):188–197, January 1999.

[88] Adriano M. Amarante, Guedmiller S. Oliveira, Carolina C. Bueno, Richard A. Cunha, Jéssica C. M. Ierich, Luiz C. G. Freitas, Eduardo F. Franca, Osvaldo N. Oliveira, and Fábio L. Leite. Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 53:100–104, September 2014.

[89] Lukas F. Milles, Klaus Schulten, Hermann E. Gaub, and Rafael C. Bernardi. Molecular mechanism of extreme mechanostability in a pathogen adhesin. *Science*, 359(6383):1527–1533, March 2018.

[90] Michel A. Cuendet and Olivier Michielin. Protein-Protein Interaction Investigated by Steered Molecular Dynamics : The TCR-pMHC Complex. *Biophysical Journal*, 95(8):3575–3590, October 2008.

[91] Moacir F. Ferreira, Eduardo F. Franca, and Fábio L. Leite. Unbinding pathway energy of glyphosate from the EPSPs enzyme binding site characterized by Steered Molecular Dynamics and Potential of Mean Force. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 72:43–49, March 2017.

[92] Rongjing Hu, Florent Barbault, François Maurel, Michel Delamar, and Ruisheng Zhang. Molecular Dynamics Simulations of 2-Amino-6-arylsulphonylbenzonitriles Analogues as HIV Inhibitors : Interaction Modes and Binding Free Energies. *Chemical Biology & Drug Design*, 76(6):518–526, 2010.

[93] Min Ruan, Mahamadou Seydou, Vincent Noel, Benoit Piro, François Maurel, and Florent Barbault. Molecular Dynamics Simulation of a RNA Aptasensor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(16):4071–4080, April 2017.

[94] Guedmiller S. Oliveira, Jéssica C. M. Ierich, Ariana S. Moraes, Gisela B. R. F. Silva, Yanyun Liu, Lourival R. de S. Neto, Roberto R. Faria, Eduardo F. Franca, Luiz C. G. Freitas, James M. Briggs, and Fabio L. Leite. Immobilization and unbinding investigation of the antigen-antibody complex using theoretical and experimental techniques. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 86:219–227, January 2019.

[95] Shalaka Dewan, Vincenzo Carnevale, Arindam Bankura, Ali Eftekhari-Bafrooei, Giacomo Fiorin, Michael L. Klein, and Eric Borguet. Structure of Water at Charged Interfaces : A Molecular Dynamics Study. *Langmuir*, 30(27):8056–8065, July 2014.

[96] Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, and Tahei Tahara. Direct evidence for orientational flip-flop of water molecules at charged interfaces : A heterodyne-detected vibrational sum frequency generation study. *The Journal of Chemical Physics*, 130(20):204704, May 2009.

[97] Robert Vácha, Steven W. Rick, Pavel Jungwirth, Alex G. F. de Beer, Hilton B. de Aguiar, Jean-Sebastien Samson, and Sylvie Roke. The Orientation and Charge of Water at the Hydrophobic Oil Droplet–Water Interface. *Journal of the American Chemical Society*, 133(26):10204–10210, July 2011.

[98] Simona Strazdaite, Jan Versluis, and Huib J. Bakker. Water orientation at hydrophobic interfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 143(8):084708, August 2015.

[99] Lei Chen, Xin He, Hongshen Liu, Linmao Qian, and Seong H. Kim. Water adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces of silicon. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(21):11385–11391, 2018.

[100] S. Nihonyanagi, S. Ye, and K. Uosaki. Sum frequency generation study on the molecular structures at the interfaces between quartz modified with amino-terminated self-assembled monolayer and electrolyte solutions of various pH and ionic strengths. *Electrochimica acta*, 46(20-21):3057–3061, 2001.

[101] Shen Ye, Satoshi Nihonyanagi, and Kohei Uosaki. pH-dependent water structure at a quartz surface modified with an amino-terminated monolayer studied by sum frequency generation (SFG). *Chemistry Letters*, 29(7):734–735, 2000.

[102] Shen Ye, Satoshi Nihonyanagi, and Kohei Uosaki. Sum frequency generation (SFG) study of the pH-dependent water structure on a fused quartz surface modified by an octadecyltrichlorosilane (OTS) monolayer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(16):3463–3469, January 2001.

[103] Dirk Hegemann, Nicolas Hocquard, and Manfred Heuberger. Nanoconfined water can orient and cause long-range dipolar interactions with biomolecules. *Scientific Reports*, 7(1):17852, December 2017.

[104] Elise Duboué-Dijon and Damien Laage. Characterization of the Local Structure in Liquid Water by Various Order Parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(26):8406–8418, July 2015.

[105] Jian Zhou, Xiaohua Lu, Yanru Wang, and Jun Shi. Molecular dynamics study on ionic hydration. *Fluid Phase Equilibria*, 194-197:257–270, March 2002.

[106] Arindam Bankura, Vincenzo Carnevale, and Michael L. Klein. Hydration structure of salt solutions from ab initio molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 138(1):014501, January 2013.

[107] Song Hi Lee and Peter J. Rossky. A comparison of the structure and dynamics of liquid water at hydrophobic and hydrophilic surfaces—a molecular dynamics simulation study. *The Journal of Chemical Physics*, 100(4):3334–3345, February 1994.

[108] Virginie Marry, Benjamin Rotenberg, and Pierre Turq. Structure and dynamics of water at a clay surface from molecular dynamics simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(32):4802–4813, August 2008.

[109] Kazuya Kobayashi, Yunfeng Liang, Ken-ichi Amano, Sumihiko Murata, Toshifumi Matsuoka, Satoru Takahashi, Naoya Nishi, and Tetsuo Sakka. Molecular Dynamics Simulation of Atomic Force Microscopy at the Water–Muscovite Interface : Hydration Layer Structure and Force Analysis. *Langmuir*, 32(15):3608–3616, April 2016.

[110] Jun Yang, Dongshuai Hou, and Qingjun Ding. Ionic hydration structure, dynamics and adsorption mechanism of sulfate and sodium ions in the surface of calcium silicate hydrate gel : A molecular dynamics study. *Applied Surface Science*, 448:559–570, August 2018.

[111] Masahiro Kitabata, Tseden Taddese, and Susumu Okazaki. Molecular Dynamics Study on Wettability of Poly(vinylidene fluoride) Crystalline and Amorphous Surfaces. *Langmuir*, 34(40):12214–12223, October 2018.

[112] Donghwa Lee, Eric Schwegler, and Yosuke Kanai. Dependence of Water Dynamics on Molecular Adsorbates near Hydrophobic Surfaces : First-Principles Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(16):8508–8513, April 2014.

[113] Monir Hosseini Anvari, Qingxia Liu, Zhenghe Xu, and Phillip Choi. Molecular Dynamics Study of Hydrophilic Sphalerite (110) Surface as Modified by Normal and Branched Butylthiols. *Langmuir*, 34(10):3363–3373, March 2018.

[114] Adam A. Skelton, Taining Liang, and Tiffany R. Walsh. Interplay of Sequence, Conformation, and Binding at the Peptide−Titania Interface as Mediated by Water. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1(7):1482–1491, July 2009.

[115] Marta Rosa, Rosa Di Felice, and Stefano Corni. Adsorption Mechanisms of Nucleobases on the Hydrated Au(111) Surface. *Langmuir*, 34(49):14749–14756, December 2018.

[116] Yun Xie, Meifeng Liu, and Jian Zhou. Molecular dynamics simulations of peptide adsorption on self-assembled monolayers. *Applied Surface Science*, 258(20):8153–8159, August 2012.

[117] Isolde Le Trong, Zhizhi Wang, David E. Hyre, Terry P. Lybrand, Patrick S. Stayton, and Ronald E. Stenkamp. Streptavidin and its biotin complex at atomic resolution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 67(9):813–821, September 2011.

[118] Jianing Song, Yongle Li, Changge Ji, and John Z. H. Zhang. Functional Loop Dynamics of the Streptavidin-Biotin Complex. *Scientific Reports*, 5(1):7906, January 2015.

[119] Claire E. Chivers, Estelle Crozat, Calvin Chu, Vincent T. Moy, David J. Sherratt, and Mark Howarth. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nature Methods*, 7(5):391–393, May 2010.

[120] Claire E. Chivers, Apurba L. Koner, Edward D. Lowe, and Mark Howarth. How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger : investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochemical Journal*, 435(1):55–63, March 2011.

[121] Fengjiao Liu, John Z. H. Zhang, and Ye Mei. The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system : A computational investigation through molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 6(1):27190, June 2016.

[122] Pratyush Tiwary. Molecular Determinants and Bottlenecks in the Dissociation Dynamics of Biotin–Streptavidin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(48):10841–10849, December 2017.

[123] V. T. Moy, E. L. Florin, and H. E. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266(5183):257–259, October 1994.

[124] Melanie Köhler, Andreas Karner, Michael Leitner, Vesa P. Hytönen, Markku Kulomaa, Peter Hinterdorfer, and Andreas Ebner. pH-Dependent Deformations of the Energy Landscape of Avidin-like Proteins Investigated by Single Molecule Force Spectroscopy. *Molecules*, 19(8):12531–12546, August 2014.

[125] Steffen M. Sedlak, Magnus S. Bauer, Carleen Kluger, Leonard C. Schendel, Lukas F. Milles, Diana A. Pippig, and Hermann E. Gaub. Monodisperse measurement of the biotin-streptavidin interaction strength in a well-defined pulling geometry. *PLOS ONE*, 12(12):e0188722, December 2017.

[126] Helmut Grubmüller, Berthold Heymann, and Paul Tavan. Ligand Binding : Molecular Mechanics Calculation of the Streptavidin-Biotin Rupture Force. *Science*, 271(5251):997–999, February 1996.

[127] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, and K. Schulten. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophysical Journal*, 72(4):1568–1581, April 1997.

[128] Christian Mücksch and Herbert M. Urbassek. Accelerated Molecular Dynamics Study of the Effects of Surface Hydrophilicity on Protein Adsorption. *Langmuir*, 32(36):9156–9162, September 2016.

[129] Steffen M. Sedlak, Leonard C. Schendel, Marcelo C. R. Melo, Diana A. Pippig, Zaida Luthey-Schulten, Hermann E. Gaub, and Rafael C. Bernardi. Direction Matters : Monovalent Streptavidin/Biotin Complex under Load. *Nano Letters*, 19(6):3415–3421, June 2019.

[130] Steffen M. Sedlak, Leonard C. Schendel, Hermann E. Gaub, and Rafael C. Bernardi. Streptavidin/biotin : Tethering geometry defines unbinding mechanics. *Science Advances*, 6(13):eaay5999, March 2020.

[131] Yun Chen, Yao Guo, Yihang Pan, and Zhizhuang Joe Zhao. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(1):135–140, April 2020.

[132] Qihui Wang, Yanfang Zhang, Lili Wu, Sheng Niu, Chunli Song, Zengyuan Zhang, Guangwen Lu, Chengpeng Qiao, Yu Hu, Kwok-Yung Yuen, Qisheng Wang, Huan Zhou, Jinghua Yan, and Jianxun Qi. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4):894–904.e9, May 2020.

[133] Austen Bernardi, Yihan Huang, Bradley Harris, Yongao Xiong, Somen Nandi, Karen A. McDonald, and Roland Faller. Development and simulation of fully glycosylated molecular models of ACE2-Fc fusion proteins and their interaction with the SARS-CoV-2 spike protein binding domain. *PLOS ONE*, 15(8):e0237295, August 2020.

[134] Anamika Basu, Anasua Sarkar, and Ujjwal Maulik. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. *Scientific Reports*, 10(1):17699, October 2020.

[135] Jun Lan, Jiwan Ge, Jinfang Yu, Sisi Shan, Huan Zhou, Shilong Fan, Qi Zhang, Xuanling Shi, Qisheng Wang, Linqi Zhang, and Xinquan Wang. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807):215–220, May 2020.

[136] Erik Laurini, Domenico Marson, Suzana Aulic, Maurizio Fermeglia, and Sabrina Pricl. Computational Alanine Scanning and Structural Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein/Angiotensin-Converting Enzyme 2 Complex. *ACS Nano*, 14(9):11821–11830, September 2020.

[137] Renhong Yan, Yuanyuan Zhang, Yaning Li, Lu Xia, Yingying Guo, and Qiang Zhou. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485):1444–1448, March 2020.

[138] RCSB Protein Data Bank. RCSB PDB : Homepage. Disponible sur : `https://www.rcsb.org/`. Consulté le 01/07/2021.

[139] Kui K. Chan, Danielle Dorosky, Preeti Sharma, Shawn A. Abbasi, John M. Dye, David M. Kranz, Andrew S. Herbert, and Erik Procko. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 369(6508):1261–1265, September 2020.

[140] Jinsung Yang, Simon J. L. Petitjean, Melanie Koehler, Qingrong Zhang, Andra C. Dumitru, Wenzhang Chen, Sylvie Derclaye, Stéphane P. Vincent, Patrice Soumillion, and David Alsteens. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. *Nature Communications*, 11(1):4541, September 2020.

[141] Jiahua He, Huanyu Tao, Yumeng Yan, Sheng-You Huang, and Yi Xiao. Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(4):428, April 2020.

[142] Sakshi Piplani, Puneet Kumar Singh, David A. Winkler, and Nikolai Petrovsky. In silico comparison of spike protein-ACE2 binding affinities across species ; significance for the possible origin of the SARS-CoV-2 virus. *arXiv:2005.06199 [q-bio]*, November 2020.

[143] Amanat Ali and Ranjit Vijayan. Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms. *Scientific Reports*, 10(1):14214, August 2020.

[144] Erik Laurini, Domenico Marson, Suzana Aulic, Alice Fermeglia, and Sabrina Pricl. Computational Mutagenesis at the SARS-CoV-2 Spike Protein/Angiotensin-Converting Enzyme 2 Binding Interface : Comparison with Experimental Evidence. *ACS Nano*, 15(4):6929–6948, April 2021.

[145] Mark J. Stevens. Thoughts on the Structure of Alkylsilane Monolayers. *Langmuir*, 15(8):2773–2778, April 1999.

[146] Martin Chaplin. Water Structure and Science, Water models. Disponible sur : `http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_models.html`. Consulté le 18/07/2019.

[147] Xuebo Quan, Jie Liu, and Jian Zhou. Multiscale modeling and simulations of protein adsorption : progresses and perspectives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41:74–85, 2019.

[148] David Van Der Spoel, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E. Mark, and Herman J. C. Berendsen. GROMACS : Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701–1718, 2005.

[149] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD : visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 27–28, February 1996.

[150] P.-L. Chau and A. J. Hardwick. A new order parameter for tetrahedral configurations. *Molecular Physics*, 93(3):511–518, February 1998.

[151] Gromacs Tutorial. Disponible sur : `http://www.strodel.info/index_files/lecture/html/tutorial.html`. Consulté le 01/07/2021.

[152] VMD - Secondary structure - sequence Form. Disponible sur : `https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.8.7/ug/node51.html`. Consulté le 01/07/2021.

[153] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D. Madura, Roger W. Impey, and Michael L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2):926–935, July 1983.

[154] Johan Aqvist. Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(21):8021–8024, October 1990.

[155] Jayaraman Chandrasekhar, David C. Spellmeyer, and William L. Jorgensen. Energy component analysis for dilute aqueous solutions of lithium(1+), sodium(1+), fluoride(1-), and chloride(1-) ions. *Journal of the American Chemical Society*, 106(4):903–910, February 1984.

[156] Bradley W. Ewers and James D. Batteas. Molecular Dynamics Simulations of Alkylsilane Monolayers on Silica Nanoasperities : Impact of Surface Curvature on Monolayer Structure and Pathways for Energy Dissipation in Tribological Contacts. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(48):25165–25177, December 2012.

[157] Atul N. Parikh, David L. Allara, Issam Ben Azouz, and Francis Rondelez. An intrinsic relationship between molecular structure in self-assembled n-alkylsiloxane monolayers and deposition temperature. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(31):7577–7590, 1994.

[158] David L. Allara and Ralgh G. Nuzzo. Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface. *Langmuir*, 1(1):52–66, 1985.

[159] Hongseung Yeon, Chenxuan Wang, Reid C. Van Lehn, and Nicholas L. Abbott. Influence of Order within Nonpolar Monolayers on Hydrophobic Interactions. *Langmuir*, 33(19):4628–4637, May 2017.

[160] Abraham Ulman. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, 96(4):1533–1554, January 1996.

[161] Sidharam P. Pujari, Luc Scheres, Antonius T. M. Marcelis, and Han Zuilhof. Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(25):6322–6356, 2014.

[162] John C. Vickerman and Ian S. Gilmore. *Surface Analysis : The Principal Techniques*. John Wiley & Sons, August 2011.

[163] S. Tanuma, C. J. Powell, and D. R. Penn. Calculations of electron inelastic mean free paths (IMFPS). IV. Evaluation of calculated IMFPs and of the predictive IMFP formula TPP-2 for electron energies between 50 and 2000 eV. *Surface and Interface Analysis*, 20(1):77–89, 1993.

[164] J. N. Kinkel and K. K. Unger. Role of solvent and base in the silanization reaction of silicas for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 316:193–200, January 1984.

[165] Alexander Y. Fadeev and Thomas J. McCarthy. Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon. *Langmuir*, 16(18):7268–7274, September 2000.

[166] Vikrant V. Naik, Roman Städler, and Nicholas D. Spencer. Effect of Leaving Group on the Structures of Alkylsilane SAMs. *Langmuir*, 30(49):14824–14831, December 2014.

[167] Nicolas Ardès-Guisot, Jean-Olivier Durand, Michel Granier, Aurore Perzyna, Yannick Coffinier, Bruno Grandidier, Xavier Wallart, and Didier Stievenard. Trichlorosilane Isocyanate as Coupling Agent for Mild Conditions Functionalization of Silica-Coated Surfaces. *Langmuir*, 21(21):9406–9408, October 2005.

[168] Haehyun Nam, Michel Granier, Bruno Boury, and Soo Young Park. Functional Organotrimethoxysilane Derivative with Strong Intermolecular π-πInteraction: One-Pot Grafting Reaction on Oxidized Silicon Substrates. *Langmuir*, 22(17):7132–7134, August 2006.

[169] Ali Eftekhari-Bafrooei and Eric Borguet. Effect of Electric Fields on the Ultrafast Vibrational Relaxation of Water at a Charged Solid–Liquid Interface as Probed by Vibrational Sum Frequency Generation. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(12):1353–1358, June 2011.

[170] Hui Zhang, Ali A. Hassanali, Yun Kyung Shin, Chris Knight, and Sherwin J. Singer. The water–amorphous silica interface : Analysis of the Stern layer and surface conduction. *The Journal of Chemical Physics*, 134(2):024705, January 2011.

[171] Zheng Chen, Mingrui Liao, Lizhi Zhang, and Jian Zhou. Molecular simulations on the hydration and underwater oleophobicity of zwitterionic self-assembled monolayers. *AIChE Journal*, 67(2):e17103, 2021.

[172] Emmanuel Anim-Danso, Yu Zhang, and Ali Dhinojwala. Surface Charge Affects the Structure of Interfacial Ice. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(7):3741–3748, February 2016.

[173] Kailash C. Jena and Dennis K. Hore. Water structure at solid surfaces and its implications for biomolecule adsorption. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(43):14383–14404, October 2010.

[174] Dimitrios Argyris, Naga Rajesh Tummala, Alberto Striolo, and David R. Cole. Molecular Structure and Dynamics in Thin Water Films at the Silica and Graphite Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(35):13587–13599, September 2008.

[175] Udo Schnupf and John W. Brady. Water structuring above solutes with planar hydrophobic surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(19):11851–11863, May 2017.

[176] Chyuan-Yih Lee, J. Andrew McCammon, and P. J. Rossky. The structure of liquid water at an extended hydrophobic surface. *The Journal of Chemical Physics*, 80(9):4448–4455, May 1984.

[177] Peter J. Rossky and Martin Karplus. Solvation. A molecular dynamics study of a dipeptide in water. *Journal of the American Chemical Society*, 101(8):1913–1937, 1979.

[178] Yoshimichi Nakamura and Takahisa Ohno. Ferroelectric mobile water. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(3):1064–1069, December 2010.

[179] Charles A. Haynes, Edward Sliwinsky, and Willem Norde. Structural and Electrostatic Properties of Globular Proteins at a Polystyrene-Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 164(2):394–409, May 1994.

[180] V. Jousseaume, J. El Sabahy, C. Yeromonahos, G. Castellan, A. Bouamrani, and F. Ricoul. SiOCH thin films deposited by chemical vapor deposition : From low- to chemical and biochemical sensors. *Microelectronic Engineering*, 167:69–79, January 2017.

[181] Berthold Heymann and Helmut Grubmüller. Dynamic Force Spectroscopy of Molecular Adhesion Bonds. *Physical Review Letters*, 84(26):6126–6129, June 2000.

[182] Alpeshkumar K. Malde, Le Zuo, Matthew Breeze, Martin Stroet, David Poger, Pramod C. Nair, Chris Oostenbrink, and Alan E. Mark. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository : Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(12):4026–4037, December 2011.

[183] Martin Stroet, Bertrand Caron, Koen M. Visscher, Daan P. Geerke, Alpeshkumar K. Malde, and Alan E. Mark. Automated Topology Builder Version 3.0 : Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(11):5834–5845, November 2018.

[184] S. O'Mahony, C. O'Dwyer, C. A. Nijhuis, J. C. Greer, A. J. Quinn, and D. Thompson. Nanoscale Dynamics and Protein Adhesivity of Alkylamine Self-Assembled Monolayers on Graphene. *Langmuir*, 29(24):7271–7282, June 2013.

[185] Vivek Pratap Hitaishi, Romain Clement, Nicolas Bourassin, Marc Baaden, Anne De Poulpiquet, Sophie Sacquin-Mora, Alexandre Ciaccafava, and Elisabeth Lojou. Controlling Redox Enzyme Orientation at Planar Electrodes. *Catalysts*, 8(5):192, May 2018.

[186] Nathan A. Baker, David Sept, Simpson Joseph, Michael J. Holst, and J. Andrew McCammon. Electrostatics of nanosystems : Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18):10037–10041, August 2001.

[187] Todd J. Dolinsky, Jens E. Nielsen, J. Andrew McCammon, and Nathan A. Baker. PDB2PQR : an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, 32:W665–W667, July 2004.

[188] Pei Tang and Yan Xu. Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane : The implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25):16035–16040, December 2002.

[189] Md Zahid Kamal, Tabrez Anwar Shamim Mohammad, G. Krishnamoorthy, and Nalam Madhusudhana Rao. Role of Active Site Rigidity in Activity : MD Simulation and Fluorescence Study on a Lipase Mutant. *PLOS ONE*, 7(4):e35188, April 2012.

[190] L. M. Espinoza-Fonseca and José G. Trujillo-Ferrara. Conformational changes of the p53-binding cleft of MDM2 revealed by molecular dynamics simulations. *Biopolymers*, 83(4):365–373, 2006.

[191] Yalong Cong, Kaifang Huang, Yuchen Li, Susu Zhong, John Z. H. Zhang, and Lili Duan. Entropic effect and residue specific entropic contribution to the cooperativity in streptavidin-biotin binding. *Nanoscale*, 12(13):7134–7145, April 2020.

[192] Solène Lecot, Yann Chevolot, Magali Phaner-Goutorbe, and Christelle Yeromonahos. Impact of Silane Monolayers on the Adsorption of Streptavidin on Silica and Its Subsequent Interactions with Biotin : Molecular Dynamics and Steered Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(31):6786–6796, August 2020.

[193] William L. Jorgensen and Jiali Gao. Monte Carlo simulations of the hydration of ammonium and carboxylate ions. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(10):2174–2182, May 1986.

[194] Lothar Schäfer, C. Van Alsenoy, and J. N. Scarsdale. Ab initio studies of structural features not easily amenable to experiment. 23. Molecular structures and conformational analysis of the dipeptide N-acetyl-N-methyl glycyl amide and the significance of local geometries for peptide structures. *The Journal of Chemical Physics*, 76(3):1439–1444, February 1982.

[195] Peter H. Berens, Donald HJ Mackay, Gary M. White, and Kent R. Wilson. Thermodynamics and quantum corrections from molecular dynamics for liquid water. *The Journal of chemical physics*, 79(5):2375–2389, 1983.

dernière page de la thèse

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 mai 2016,

Vu la demande du directeur de thèse

Madame M. PHANER-GOUTORBE

et les rapports de

Mme S. SACQUIN-MORA
Chargée de Recherche CNRS HDR - Laboratoire de Biochimie Théorique CNRS UPR 9080
Institut de Biologie Physico-Chimique - 13 rue Pierre et Marie Curie - 75005 Paris

et de

M. F. BARBAULT
Maître de Conférences HDR - Laboratoire ITODYS - Université de Paris - CNRS UMR 7086
15 rue Jean Antoine de Baïf - 75013 Paris

Madame LECOT Solène

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale MATERIAUX

Fait à Ecully, le 4 novembre 2021

P/Le directeur de l'E.C.L.
Le directeur des Formations

ECOLE CENTRALE DE LYON
Service Scolarité
ECULLY

Grégory VIAL

Résumé

Des dispositifs de diagnostic clinique prometteurs reposent sur la capture de l'analyte à détecter par reconnaissance moléculaire, grâce à des protéines adsorbées sur une surface. Cependant, l'adsorption sur une surface peut engendrer à des changements de conformation dans la structure de la protéine, conduisant à une perte de bioactivité. Les monocouches auto-assemblées de molécules de silane sont largement utilisées pour fonctionnaliser les surfaces de SiO_2. Notre objectif est de déterminer l'impact de la charge du groupement terminal et de la longueur de la chaîne alkyle, qui modifient la charge et l'hydrophobicité de la surface, sur la conformation de la protéine adsorbée et sur ses interactions avec un ligand ou une autre protéine. Les simulations de dynamique moléculaire sont bien adaptées pour étudier l'adsorption des protéines, car elles renseignent sur les interactions protéine - surface et sur les changements de conformation à l'échelle atomique. De plus, les simulations de dynamique moléculaire dirigées, ou *steered molecular dynamics* (SMD), qui modélisent la spectroscopie à force atomique (AFM), apportent des informations complémentaires concernant la force des interactions ligand - récepteur et leur dynamique.

Un système de dynamique moléculaire a été développé (Gromacs, champ de force adapté de OPLS tout-atome). La structure des différentes monocouches de silanes, variant par leur densité et la nature des molécules de silane (longueur de la chaîne alkyle, charge du groupement terminal) a été étudiée et validée qualitativement par des expériences de FTIR et d'XPS. Par ailleurs, l'organisation des molécules d'eau et des ions à l'interface a été analysée. Ensuite, l'adsorption de la streptavidine sur des monocouches de silanes et son impact sur les interactions avec la biotine ont été étudiés. Il a été démontré que l'adsorption de la streptavidine engendre des changements de conformation qui dépendent du type de monocouche de silanes. En couplant simulations de dynamique moléculaire et simulations SMD, le type de monocouche de silanes le plus adapté pour immobiliser la streptavidine tout en préservant ses interactions avec la biotine a été identifié. La même méthodologie a été appliquée pour étudier l'adsorption du récepteur cellulaire ACE2 sur des monocouches de silanes et son effet sur les interactions avec le domaine de liaison au récepteur de la protéine spike du SARS-CoV-2.

Mots-clés. Monocouches de silanes, adsorption de protéines, interactions streptavidine - biotine, complexe ACE2 - protéine spike, simulations de dynamique moléculaire

Abstract

Promising clinical diagnosis tools are based on the capture of the analyte to be detected by adsorbed proteins through molecular recognition. However, protein adsorption on surfaces can induce conformational changes in the protein structure, resulting in a loss of bioactivity. Among surfaces, self-assembled monolayers of silane molecules are widely used to functionalize SiO_2. Our objective is to decipher the impact of silane head-group charge and alkyl chain length, which vary the charge and hydropathy of the surface, on the conformation of the adsorbed protein and on its further interactions with a ligand or another protein. Molecular Dynamics (MD) simulations are well-suited to investigate protein adsorption, as they give insight into protein-surface interactions and conformational changes at atomic scale. Furthermore, Steered Molecular Dynamics (SMD) simulations, that mimic Atomic Force Microscopy (AFM) spectroscopy, provide additional information regarding forces and dynamics of ligand-receptor interactions.

Firstly, a MD simulation system was developed (Gromacs, force field based on OPLS-AA). The structure of the silane monolayers, including various alkyl chain lengths, head-group charges and surface coverages, were investigated and qualitatively validated by FTIR and XPS experiments. Furthermore, the structural properties of interfacial water and ions were deciphered. Then, the effect of streptavidin adsorption on silane monolayers on its subsequent interactions with biotin was deciphered. It was shown that streptavidin adsorption on silane monolayers induces conformational changes which depend on the type of silane molecules. By coupling MD and SMD simulations, it was possible to identify which type of silane monolayer is better suited to immobilize streptavidin while keeping its interactions with biotin. The same methodology was applied to decipher ACE2 cell receptor adsorption on silane monolayers and its effect on interactions with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein.

Keywords. Silane monolayers, protein adsorption, streptavidin - biotin interactions, ACE2 - spike protein complex, Molecular Dynamics simulations