



uOttawa

L'Université canadienne
Canada's university

FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
ET POSTDOCTORALES



FACULTY OF GRADUATE AND
POSTDOCTORAL STUDIES

Pierre-Alexandre Boucher

AUTEUR DE LA THÈSE / AUTHOR OF THESIS

M.Sc. (Physique)

GRADE / DEGRÉ

Département de physique

FACULTÉ, ÉCOLE, DÉPARTEMENT / FACULTY, SCHOOL, DEPARTMENT

D'un modèle pour la formation de pores alignés de peptides dans une bi-couche lipidique sous une
rampe de tension

TITRE DE LA THÈSE / TITLE OF THESIS

B. Joós

DIRECTEUR (DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS SUPERVISOR

CO-DIRECTEUR (CO-DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS CO-SUPERVISOR

EXAMINATEURS (EXAMINATRICES) DE LA THÈSE / THESIS EXAMINERS

B. Campbell

I. L'Heureux

A. Longtin

Gary W. Slater

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES ET POSTDOCTORALES /
DEAN OF THE FACULTY OF GRADUATE AND POSTDOCTORAL STUDIES

**D'un modèle pour la formation de pores alignés de peptides
dans une bi-couche lipidique sous une rampe de tension**

par

Pierre-Alexandre Boucher

Thèse soumise à la
Faculté des Études supérieures et postdoctorales
dans le cadre des exigences
du programme de maîtrise en Sciences

*Département de Physique
Faculté des Sciences
Université d'Ottawa*



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-14885-3

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-14885-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des Matières

Table des Matières	
Remerciements	
Résumé	
I	Introduction.....5
II	Sur ce qui a été fait avant.....9
	1- Des Lipides
	2- Des Membranes
	3- Des Peptides
	4- De l'Expérience d'Evans et son Groupe
	5- Des Expériences avec Peptides
III	Du modèle et des calculs faits sans peptides.....34
	1- Des Fondements du Modèle
	2- De l'Application du Modèle
IV	Du modèle et des calculs avec peptides.....48
	1- Des Modifications au Modèle
	2- De l'Application du Modèle
V	Des Résultats.....62
	1- Des Résultats sans Peptides
	2- Des Résultats avec Peptides
	3- De l'Étude des Fuites de Contenu Vésiculaire
	4- De la Dépendance sur la taille du système
VI	Conclusion.....86
VII	Références.....88
VIII	Annexes
	A- Code utilisé

Remerciements:

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Béla Joós pour sa patience envers ma méthode de travail, sa disponibilité, ses conseils judicieux et évidemment son apport scientifique au projet. Son jugement pratiquement infaillible et sa grande expérience du domaine scientifique me sont souvent venus en aide.

Je veux aussi remercier le Dr. Martin Zuckermann qui a su susciter mon intérêt pour la biophysique. Je souhaite que nous puissions collaborer à nouveau dans le futur car sa connaissance du domaine est vaste.

Le groupe de recherche du Dr. Joós mérite aussi d'être mentionné, il s'agit de Matthew Wallace, Alain Gauthier et Jean-François Joly. Ils m'ont bien aidé, que ce soit pour des questions scientifiques, de programmation ou plus simplement pour du support moral.

Résumé:

Un modèle en réseau pour la formation de pores alignés de peptides dans une bi-couche lipidique est construit à partir du modèle établi par Fournier et Joós. Ce modèle est tout d'abord étendu pour supporter des rampes de tension. Nous reproduisons les résultats obtenus par Evans et al. Lorsque le taux d'application de la tension sur une membrane est augmenté, la tension à laquelle elle se brise augmente et la densité de probabilité de rupture s'élargit. Notre modèle prédit aussi qu'avec une augmentation de la concentration de peptides, la tension à la rupture diminue et la largeur de la distribution de tension à la rupture augmente. Il prédit aussi qu'à tension zéro, une certaine concentration de peptides causera la formation de pores-peptides et ainsi la perte de contenu vésiculaire. La demi-vie du processus de perte de contenu dépend linéairement du module de compressibilité et de la longueur des chaînes hydrophobes. Nous montrons que la tension de rupture d'une membrane contient une composante qui varie avec l'inverse du nombre de lipides composant la membrane.

I - Introduction:

Les bi-couches lipidiques sont d'une importance vitale pour les organismes vivants. Elles forment les membranes cellulaires qui séparent le contenu cellulaire de l'environnement externe et sont capables de maintenir des gradients de concentration d'ions, essentiels pour la communication inter-cellulaire. Les lipides étant composés d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe, la bi-couche est maintenue par des interactions hydrophobes[1]. Ils s'auto-arrangent de telle sorte que l'exposition à l'eau des queues hydrophobes soit minimisée.

La stabilité des bi-couches lipidiques est d'une grande importance car si la membrane est rompue, les fonctions de la cellule pourraient s'en ressentir à un point où la cellule pourrait mourir. Cependant, la rupture des membranes est un phénomène fréquent dans les systèmes vivants. Par exemple, les globules rouges du sang relâchent de l'hémoglobine par gonflement thermique de la cellule[2]. Expérimentalement, la rupture d'une cellule peut être obtenue de plusieurs manières différentes: par l'application d'un champ électrique causant la rupture via l'effet capacitif[3], par aspiration avec une micro-pipette[4], par l'extrusion à travers un pore[5], par l'exposition à une source lumineuse intense[6] ou par gonflement osmotique[7]. Ces différentes méthodes expérimentales seront présentées dans un chapitre subséquent.

Il est généralement accepté que la membrane se brise à un étirement, un changement relatif d'aire de surface, de l'ordre de 2-4 %, ce qui correspond à une tension de surface appliquée

d'environ 1-25 mN/m. La membrane étant essentiellement un liquide en deux-dimensions, on s'attend à ce que la rupture se produise via la formation de pores dans la membrane. On définit comme un pore un trou dans la membrane qui laisse passer l'eau. Un pore peut être de la largeur d'un seul lipide[8]. Lorsque la tension augmente, des pores meta-stables (des pores avec une durée de vie très courte) vont apparaître et disparaître. À chaque tension appliquée correspond un rayon de pore idéal qui minimise l'énergie de la membrane. Lorsque le pore atteint un certain rayon, il va croître irréversiblement causant ainsi la rupture de la membrane.

Evans et al.[9],[10], dans une expérience d'aspiration avec une micro-pipette où ils appliquent une tension sur une membrane à différents taux, ont montré que la tension à laquelle la bi-couche se rompt, la tension critique, est une fonction du taux auquel la tension est appliquée. Tout comme une bande élastique, le plus vite on tire sur la membrane, le plus on peut l'étirer avant qu'elle ne se brise. L'analogie est très intéressante car, encore une fois comme une bande élastique, la tension à laquelle une membrane se brise est aussi fonction de la température.

Evans et al. ont aussi observé une distribution de tension critique. Ils ont de plus observé que la distribution de cette tension critique s'élargit lorsqu'on augmente le taux auquel la tension est appliquée.

Différentes méthodes de simulation de pores dans une bi-couche lipidique ont été tentées[11],[12],[13],[14],[15] cependant, à notre connaissance, la simulation numérique de l'application d'une rampe de tension sur une membrane n'a jamais été étudiée spécifiquement.

Il est connu depuis quelques temps que des peptides amphiphiles tels que la *Mélistine* agissent comme un mécanisme de défense offensive. Les peptides amphiphiles attaquent les intrus, tels que les bactéries, et les tuent en causant la rupture de leurs membranes cellulaires. Il a été observé que les bi-couches lipidiques, mises en présence de peptides amphiphiles, perdent leur contenu cellulaire. Le taux de perte et la quantité de matériel cellulaire perdu par une certaine population de vésicules dépend de la concentration de peptides en solution. Cependant, il a été montré[16] que la perte de matériel cellulaire est un mécanisme de type “tout ou rien”. C’est-à-dire que si la concentration de peptides est trop faible, il n’y aura aucun pore dans la vésicule et donc la perte de matériel sera nulle. Cependant, à une certaine concentration seuil, les peptides forcent la formation de pores dans la membrane qui perd alors son contenu à un certain taux qui dépend de la taille des pores. Il est important de bien comprendre qu’une fois des pores-peptides formés dans une vésicule, celle-ci perd tout son contenu et non seulement une partie.

Un phénomène intéressant se produit lorsqu’une membrane est en présence de peptides, mais d’une concentration de peptides insuffisante pour rompre la membrane. La bi-couche devient alors plus fragile, elle se rompt à une tension plus faible. Ce phénomène a cependant été très peu étudié.

Il a été suggéré que les peptides causant la rupture des membranes cellulaires pourraient servir à remplacer les antibiotiques car ils sont très efficaces pour repousser les attaques des bactéries et celles-ci ne peuvent que très difficilement évoluer un mécanisme de défense contre les peptides amphiphiles[17]. Ce remplacement des antibiotiques par les peptides serait d’une importance capitale en médecine car l’utilisation à outrance des antibiotiques n’a fait qu’affaiblir leurs capacités

défensives. Il devient toujours plus difficile et plus coûteux de développer de nouveaux antibiotiques.

Nous présentons d'abord des résumés explicatifs sur les lipides, sur les membranes et puis sur les peptides. Nous expliquerons ensuite la méthode expérimentale d'Evans et al. pour l'observation d'une vésicule soumise à une rampe de tension. Viendra ensuite la présentation de notre modèle, tout d'abord sans peptides puis avec peptides. Finalement nous présenterons les résultats obtenus à l'aide de ce modèle.

II - Sur ce qui a été fait avant

1- Des Lipides:

Les lipides sont des molécules organiques présentes dans tous les organismes vivants[18]. Plus particulièrement, nous étudions les phospholipides, des lipides qui comportent un segment phosphate. Dans ce texte, nous ferons référence aux phospholipides en utilisant le mot lipides, bien que ce terme désigne un ensemble plus large que les phospholipides. Les lipides (les phospholipides) donc sont composés d'une tête hydrophile où se situe le groupe phosphate et de deux chaînes (ou queues) hydrophobes composées d'acides gras. La tête hydrophile, étant polaire, est fortement soluble dans l'eau alors que les chaînes de gras ne le sont pas.

La structure plus détaillée (voir le schéma à la figure 1, page 10[19]) d'un lipide (plus particulièrement Phosphatidylcholine) est comme suit: le groupe de tête est formé d'un groupe choline relié à un groupe phosphate qui lui est relié à un groupe glycerol. Au groupe glycerol sont liées par des liens ester, des liens entre des atomes de carbone et d'oxygène, deux chaînes d'acides gras, chacune composée de 12 à 24 molécules d'acides gras.

Les liens formant les molécules de lipides sont des liens covalents. Cependant les lipides n'interagissent que très faiblement entre eux: ils ne forment pas de liens autrement que par les forces

de van der Waals. C'est cette particularité qui rend si formidable l'auto-assemblage et la cohésion de structures aussi complexes que les membranes bi-lipidiques.

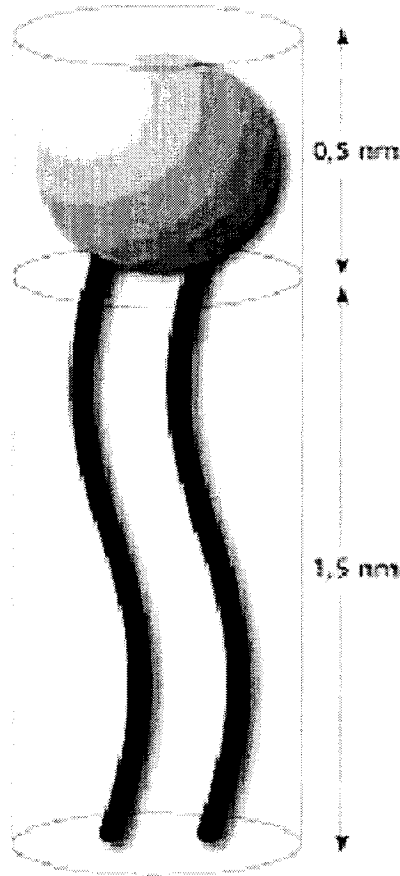


Figure 1: *Structure et représentation schématique d'un lipide typique, soit le DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine) dont la forme peut être assimilée à un cylindre. Voir la référence [19] pour la figure.*

Les molécules de lipides, étant donné leur géométrie, peuvent être assimilées à un cylindre ayant une surface d'environ 0.6 nm^2 au sommet. La hauteur du cylindre dépend cependant fortement du type de lipide utilisé, car la longueur des chaînes peut facilement changer. La hauteur du groupe

de tête est habituellement de l'ordre de 0.5 nm et la hauteur des chaînes est de l'ordre de 1.5 nm, ce qui correspond à une longueur de liens entre atomes de carbone de la chaîne d'environ 0.1 nm.

Une autre caractéristique importante des lipides est leur degré de saturation/insaturation. On dit d'un lipide qu'il est saturé lorsque tous les liens covalents entre les acides gras des chaînes hydrophobes sont des liens simples. Les liens simples permettent une rotation libre des acides gras les formant, ce qui résulte en de très flexibles chaînes.

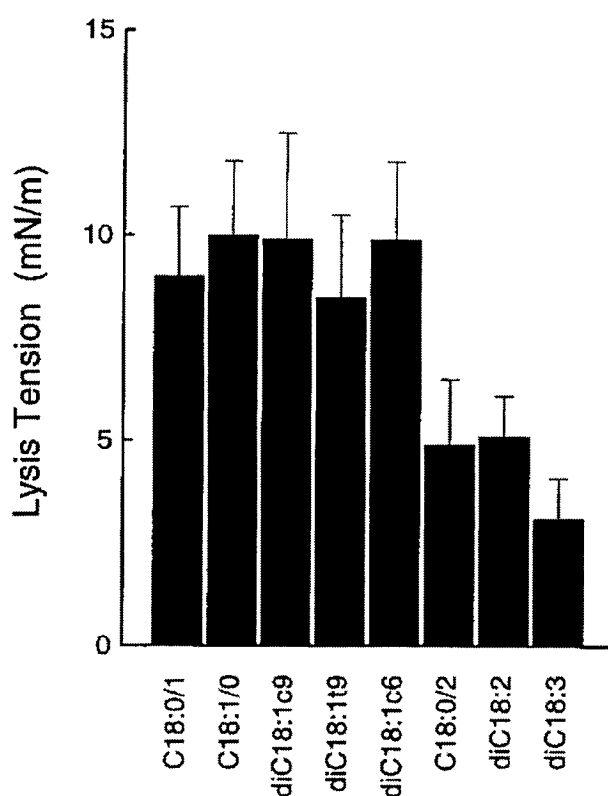


Figure 2: Tension à la rupture (à la lyse) pour différents lipides, placés ici en ordre croissant de nombre de liens insaturés. La tendance générale est une diminution de la tension à la rupture avec l'augmentation du nombre de liens insaturés. Voir la référence 30 pour l'image.

Les chaînes insaturées comportent un ou plusieurs liens doubles. Ces liens ne permettent pas la rotation des acides gras le formant et rendent donc les chaînes plus rigides. Les liens doubles sont comme des défauts dans la chaîne, défauts qui l'empêchent de bouger librement. Mais un grand degré d'insaturation peut rendre une membrane extrêmement flexible, comme dans le cas du DHA ("docosahexaenoic acid")[20]-[21], un lipide que l'on trouve dans les cellules du cerveau. Le DHA contient six liens insaturés, mais rend les membranes très flexibles au point où elles en sont instables. Il est donc juste, dans ce cas aussi, de dire qu'un grand nombre de liens insaturés dans les queues des lipides rend une membrane plus facile à briser.

Le degré d'insaturation d'une chaîne est important pour la rupture car des chaînes rigides rendent la membrane moins souple (plus difficile à courber). Les chaînes insaturées rendent aussi une membrane plus facile à rompre, car elles sont moins flexibles. Voir la figure 2 à la page 11. La notation utilisée est CA:B où A est la longueur des chaînes et B le nombre de liens insaturés par chaînes.

2- Des Membranes:

Les bi-couches sont d'une importance vitale pour tous les organismes vivants. En effet, elles forment les membranes plasmiques séparant le contenu cellulaire du milieu environnant de même qu'elles forment une barrière entre les organelles d'une cellule eucaryote et le reste du contenu cellulaire.

Les bi-couches sont le résultat d'une propriété spéciale des lipides de s'auto-assembler lorsque placés en solution. Ces auto-assemblages peuvent avoir plusieurs formes, la plus simple étant les micelles, agrégats de lipides sous forme de mono-couche où les lipides enfouissent leurs queues hydrophobes au centre des micelles pour les cacher de l'eau. Les lipides peuvent aussi s'assembler sous forme de cylindre, un peu comme une micelle, mais les têtes hydrophiles s'alignent sur la surface courbe du cylindre, et l'expansion se fait dans le sens de la longueur du cylindre. Voir la figure 3 à la page 14.

La structure qui nous intéresse le plus est cependant la bi-couche où les lipides, toujours pour protéger leurs queues hydrophobes de l'eau s'assemblent en une structure en sandwich où les têtes hydrophiles sont exposées à l'eau. Pour minimiser l'exposition des bords de la bi-couche, celle-ci a tendance à se replier sur elle-même pour ainsi former une vésicule: le contenu séparé de l'extérieur par la bi-couche. On désigne par vésicule une structure tri-dimensionnelle fermée dont l'intérieur est séparé physiquement de l'extérieur par une bi-couche lipidique. Les vésicules elles-mêmes peuvent avoir toutes sortes de formes tels la sphère, l'hyperbole, l'ellipse, les sphères multiples, etc

... (les hyperboles et les ellipses sont en fait la rotation de ces dernières formes pour former un objet tri-dimensionnel). Voir la figure 3.

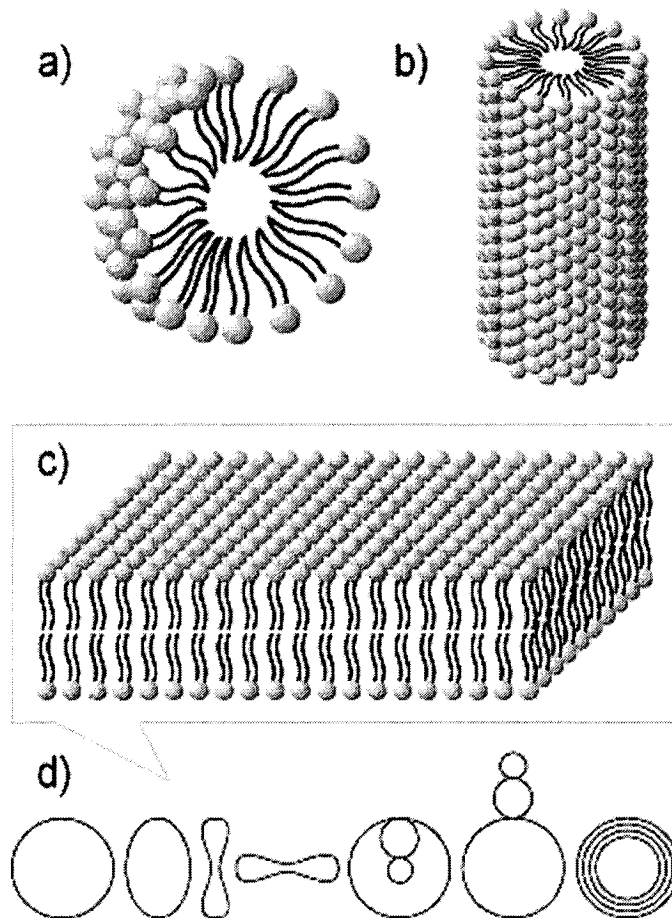


Figure 3: *Différentes formes possibles d'auto-arrangement de lipides. A) Micelle, les queues hydrophobes sont toutes tournées vers le centre du micelle et ainsi sont protégées de l'eau. B) Cylindre, les queues hydrophobes sont une fois de plus tournées vers le centre, mais la structure résultante est un cylindre et non une sphère. C) Bi-couche, chacune des épaisseurs de lipides protège l'autre de l'eau. D) Assemblages tri-dimensionnels possibles de bi-couches. Tiré de la référence 19.*

Comme les membranes s'auto-assemblent et que les lipides sont construits par des liens covalents, l'on pourrait s'attendre à ce que les membranes soient aussi construites de liens covalents. Cette idée est pourtant fausse, outre les interactions de van der Waals, il n'y a aucune interaction entre les lipides. Ce sont donc les interactions hydrophobes et hydrophiles des lipides qui maintiennent l'intégrité structurelle de la membrane.

Il est facile de dire que les lipides s'auto-assemblent, mais comment cela se fait-il au juste? C'est par la minimisation de l'énergie libre $F = E - TS$. Lorsque les lipides sont placés dans l'eau, l'eau peut soit interagir avec les queues hydrophobes lipides augmentant ainsi son énergie (E), ou elle peut soit former une cage de liens hydrogènes entre molécules d'eau adjacentes aux lipides, diminuant ainsi son entropie (S). D'une manière comme de l'autre, l'exposition des queues hydrophobes à l'eau augmente l'énergie libre de l'eau. Ainsi donc, pour minimiser cette énergie libre, les lipides forment des structures où les queues hydrophobes sont cachées de l'eau. Voir la référence [1] pour toute cette section.

3- Des Peptides:

Ce que nous nommerons ici des peptides, sont plus précisément des groupes d'acides aminés formant des hélices- α et dont une des faces est particulièrement hydrophile alors que l'autre est plutôt hydrophobe. Ces groupes d'acides aminés que nous étudions ont en particulier la propriété de causer des pertes de matériel cellulaire dans les vésicules de bi-couches lipidiques; ils ont la propriété de rendre les membranes plasmiques perméables.

Il nous est important de faire cette précision car le terme peptide ne désigne pas uniquement les peptides que nous voulons étudier, mais bien toute protéine assez petite. C'est donc un terme assez vaste que nous réduisons ici, pour alléger le texte. Ceux que nous étudions ici sont aussi parfois nommés peptides anti-microbiens.

Ces peptides anti-microbiens forment des hélices- α lorsqu'ils s'insèrent dans la membrane. D'autres peptides, tel que la *gramicidin* forment plutôt des feuillets- β . Ces peptides ont aussi été étudiés pour leur propriétés anti-microbiennes[22], mais nous nous concentrerons sur ceux formant des hélices- α .

Les peptides anti-microbiens sont, sur l'échelle de l'évolution, une arme très ancienne. Leur présence pratiquement universelle chez les plantes et les animaux suggère qu'ils ont joué un rôle clé dans l'évolution d'organismes multicellulaires complexes. Les peptides anti-microbiens s'attaquent

aux cellules procaryotes, les bactéries, protozoaires etc., en rendant leur membrane plasmique perméable par la formation de pores, ce qui tue effectivement les cellules procaryotes car elles perdent alors leur contenu biologique[17].

Dans un contexte où les bactéries deviennent rapidement résistantes aux antibiotiques et où il devient toujours plus difficile de trouver de nouveaux antibiotiques, il est essentiel pour la médecine de développer de nouvelles armes défensives contre les microbes. Les peptides anti-microbiens sont des candidats de choix: ils attaquent les microbes sans s'attaquer à l'organisme: ils s'attaquent beaucoup moins aux cellules eucaryotes qu'aux cellules procaryotes et les microbes ne développent pas de résistance aux peptides.

Contrairement à la croyance qui dit que peu importe ce qu'on fait aux bactéries, elles vont toujours réussir à développer un mécanisme de résistance, il est très improbable que des bactéries développent des moyens de défenses contre les peptides bien que ce ne soit pas impossible.

Le mécanisme d'action des peptides est toujours un sujet ouvert. Cependant, un consensus semble émerger des discussions[23]. Il faut tout d'abord savoir que les peptides anti-microbiens peuvent être divisés en deux catégories, les peptides faiblement chargés (charge nette d'environ 1) et les peptides fortement chargés (charge nette plus grande ou égale à 4). Le premier groupe contient, entre autres, *l'alaméthicine* et la *pardaxine*, alors que le second groupe contient, entre autres, la *mélettine* et la *magainine*.

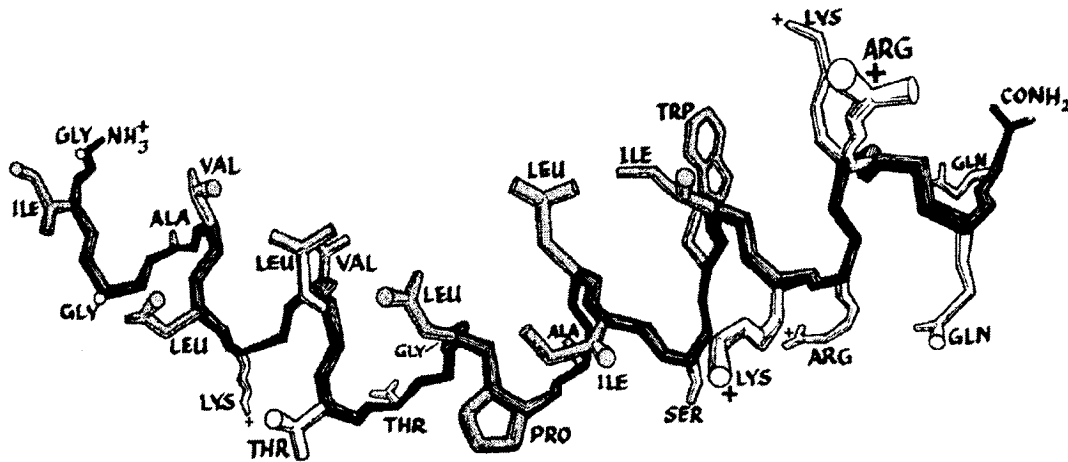


Figure 4: Dessin schématique de la structure de la mélittine. Les acides aminés sont indiqués avec leur abréviation à trois lettres. Tiré de la référence 24.

À la figure 4 [24], nous pouvons voir la structure de la *mélittine*, structure qui peut être assimilée à un cylindre. Nous avons choisi la *mélittine* car c'est le peptide anti-microbien le plus largement étudié. Ce peptide se trouve, entre autres, dans le venin d'abeille, *Apis mellifera*, et en est la principale composante toxique[25]-[26].

Il est avancé que les peptides faiblement chargés s'associent entre eux et qu'ils font fuir la membrane à de très faibles concentrations (de l'ordre de 1/1000). Les peptides ne s'alignent pas tous immédiatement dans la direction trans-membranaire. Cette orientation est atteinte vers une concentration de 1 peptide pour 100 lipides. Les peptides faiblement chargés forment des pores où ils sont serrés les uns contre les autres que l'on surnomme "barrel-staves". Ce nom vient de la ressemblance d'un pore "barrel-stave" avec un baril, les peptides formant les montants ("staves") du baril.

Les peptides fortement chargés forment, à de faibles concentrations, un tapis sur la membrane. Lorsque la concentration de peptides atteint un certain niveau (de l'ordre de 1/100) alors les peptides s'associent entre eux et s'insèrent dans la membrane pour former des pores-peptides. Ces peptides fortement chargés forment des pores du type toroïdal où il est permis aux lipides d'insérer leurs têtes hydrophiles entre les peptides pour compléter la protection des queues hydrophobes des lipides.

Ici le lecteur se demande probablement ce qu'est un pore-peptide, ce que nous allons le lui expliquer dans les lignes qui suivent. Un pore-peptide est un pore, un trou dans une membrane bi-lipidique dont le pourtour est fait de peptides. L'existence de ce pore ne résulte pas nécessairement de la tension appliquée sur la membrane, mais d'une combinaison de la présence des peptides selon une certaine concentration en plus de la tension appliquée.

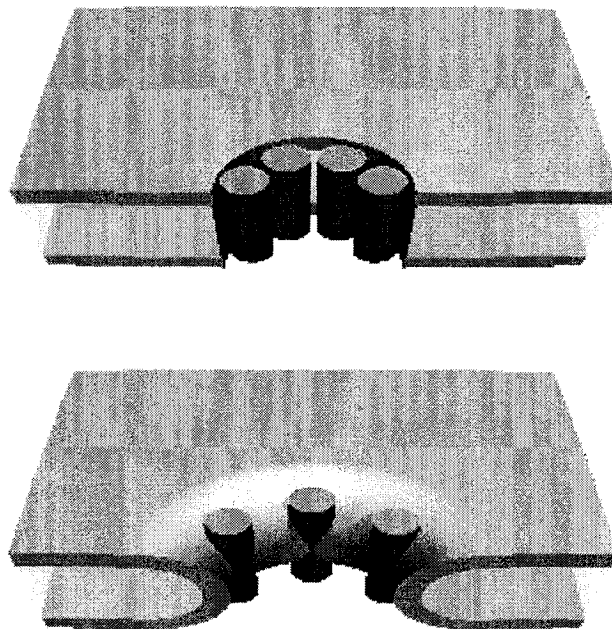


Figure 5: Représentation schématique d'un pore "barrel-stave" (haut) et d'un pore toroïdal. Les peptides sont représentés par des cylindres. Image tirée de la référence 28.

Une propriété très importante des peptides anti-microbiens est que leurs acides aminés chargés se trouvent en majorité d'un côté de l'hélice qu'ils forment, tandis que les acides aminés neutres se trouvent quant à eux de l'autre côté. C'est ce phénomène qui fait que les peptides sont des molécules amphiphiles: ils ont un côté hydrophile et un côté hydrophobe.

Les peptides en conformation d'hélice- α peuvent être visualisés comme des cylindres d'une hauteur de 3,5 nm[27] et ayant une aire de surface d'environ 4,5 nm²[24]. Si l'on tranche le cylindre dans le sens de sa longueur, une moitié du cylindre est hydrophobe, et l'autre est hydrophile.

Ayant cette caractéristique d'amphiphilicité, le peptide peut s'insérer dans la membrane, sur le bord d'un trou, exposant ainsi son côté hydrophile à l'eau du pore. Il protège ainsi à la fois son côté hydrophobe ainsi que les queues hydrophobes des lipides de l'eau contenue dans le pore.

Les peptides amphiphiles ont donc la capacité de venir stabiliser un pore ouvert dans une membrane. Leur insertion vient diminuer l'énergie de ligne totale de la membrane (l'énergie d'interaction entre le bord d'un pore et l'eau), ce qui rend le pore plus stable. De plus, même si les peptides ne sont pas présents en concentration suffisante pour faire ouvrir spontanément des pores-peptides, leur insertion se fait très facilement au bord des pores. Ils fragilisent ainsi la membrane qui se brisera à une tension beaucoup plus petite (cette tension varie avec la concentration de peptides).

Un pore "barrel-stave" est, comme mentionné plus haut, un pore dans une membrane dont le pourtour est fait de peptides qui stabilisent ce pore. Les peptides y sont très rapprochés, ce qui

constitue la différence majeure entre les pores “barrel-stave” et les pores toroïdaux où les peptides sont moins rapprochés les uns des autres, car ce sont des peptides fortement chargés et donc qui se repoussent les uns les autres. Dans les pores toroïdaux, les lipides doivent insérer leurs têtes hydrophiles entre les peptides pour bien protéger leurs queues hydrophobes. Notons que la *mélatine*, le peptide le plus étudié, forme des pores toroïdaux[28].

4- De l'Expérience d'E.Evans et son Groupe:

Evan Evans et son groupe ont établi une nouvelle méthode expérimentale de travail sur les vésicules lipidiques. Leur méthode consiste à attraper une vésicule à l'aide d'une micro-pipette pour ensuite diminuer la pression à l'intérieur de la pipette de telle sorte que la vésicule y soit aspirée. En utilisant cette méthode, il est possible d'appliquer une tension fixée pour étudier la membrane.

La méthode d'aspiration par micro-pipette (voir la figure 6) a été utilisée pour étudier l'effet de la longueur des chaînes et de leur degré d'insaturation sur l'élasticité[29], de même que la perméabilité et la résistance mécanique des membranes[30]. Cette technique a permis de déterminer correctement le module d'expansion des membranes en mettant à jour le fait que lorsqu'on tire sur une membrane, il faut tout d'abord aplanir les ondulations thermiques qu'elle contient de sorte qu'on ne commence à étirer une membrane réellement qu'après avoir déjà appliqué une certaine tension. Ce fait menait à une sous-estimation du module de compressibilité (pour expansion) des bi-couches lipidiques.

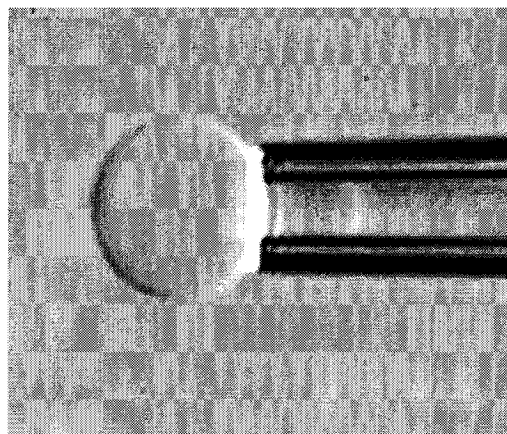


Figure 6: Photographie de l'Expérience d'Evans, la vésicule est aspirée par la micro-pipette, ce qui crée une tension dans la vésicule. Pour l'image, voir la référence 9.

Si l'on connaît la différence de pression entre les milieux, ainsi que le rayon de la vésicule et le rayon à l'intérieur de la pipette, il est alors possible de connaître la tension superficielle qui est appliquée sur la membrane:

$$\tau = \frac{PR_p}{2} \left(1 - \frac{R_p}{R_s} \right) \quad (1)$$

où R_p est le rayon interne de la micro-pipette, R_s le rayon de la vésicule et P est la différence de pression entre l'intérieur de la micro-pipette et l'environnement[31]. L'équation (1) est basée sur la formule de Laplace qui donne la tension dans une surface en fonction de la différence de pression entre les côtés de la surface.

Ce qui nous intéresse particulièrement, c'est l'expérience faite par E. Evans et son groupe[9] où ils branchent à la micro-pipette une seringue motorisée qui permet de faire varier de façon continue la pression dans la micro-pipette. Cela leur a permis de tester la résistance mécanique d'une vésicule soumise à une tension croissante.

Leurs résultats (voir les figures 7 et 8 aux pages 24 et 25) montrent que la tension à laquelle une vésicule se brise dépend fortement du taux auquel la tension est appliquée. Plus la tension est appliquée rapidement, plus la vésicule se brise à une tension élevée. De plus, ils ont montré qu'avec l'augmentation du taux d'application de la tension, la distribution de tension à la rupture s'élargit.

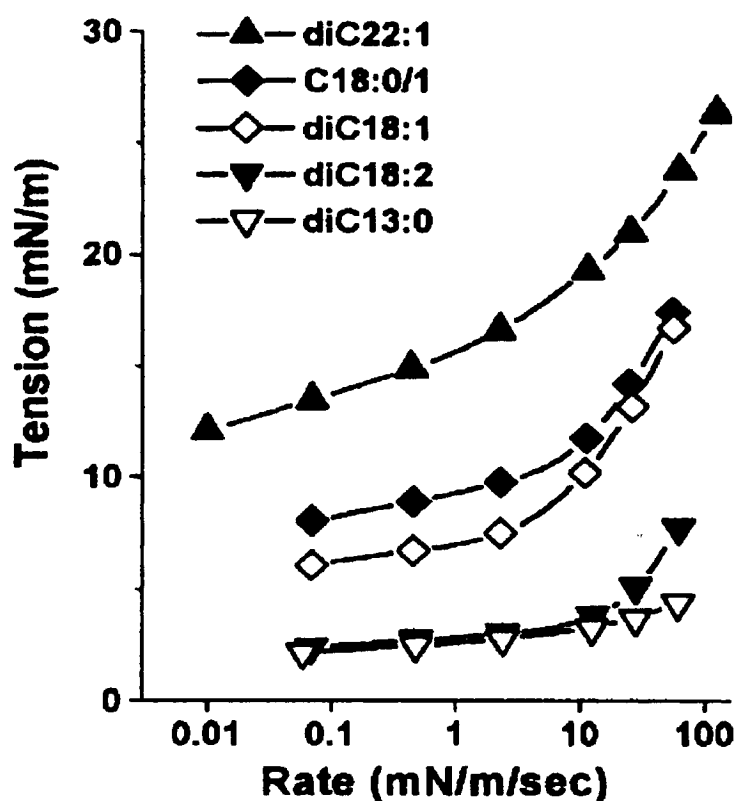


Figure 7: Tension à la rupture en fonction du taux d'application de la tension pour différents lipides. On peut voir une dépendance claire de la tension critique sur le taux d'application de la tension. De plus, la tension critique augmente avec l'augmentation de la longueur des chaînes et la diminution du nombre de liens insaturés. Tiré de la référence [9].

Ces résultats démontrent l'existence de deux régimes distincts pour la rupture de la membrane. Premièrement, aux petits taux d'application de la tension la rupture est limitée par la l'apparition d'un défaut dans la membrane, aussitôt que la tension fournit assez d'énergie pour passer la barrière d'énergie, la membrane se brise. Pour le deuxième régime, où les taux d'application de la tension sont grands, la rupture est limitée par la croissance des pores car la tension augmente si vite qu'un trou n'a simplement pas le temps de se former avant que la tension n'augmente.

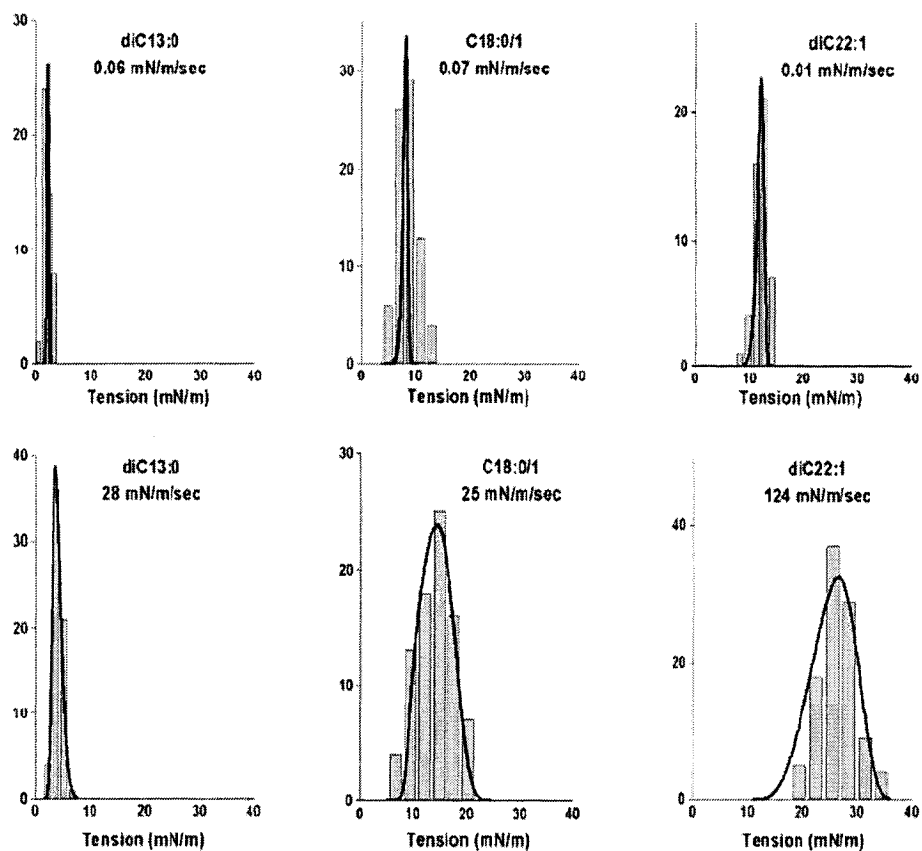


Figure 8: Histogramme du nombre de vésicules brisant à une certaine tension pour différents taux d'application de la tension et différents lipides. Les lignes pleines sont les résultats du modèle phénoménologique d'Evans et al. On peut voir que la largeur de la distribution augmente avec le taux d'application de la tension. Tiré de la réf [9].

De plus, ils calculent des valeurs pour l'hydrophobicité qui sont significativement plus petites que celles habituellement citées, ce qui est très intéressant car elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le concept d'hydrophobicité apparente de Fournier et Joós [33], sur qui nous avons basé notre modèle présent.

Evans et son groupe ont développé un modèle phénoménologique pour expliquer le phénomène. Ils ont recours à une barrière énergétique additionnelle pour la formation d'un défaut dans la membrane, en plus de la barrière normale pour la formation d'un trou qui peut croître indéfiniment.

Dans leur vision de la chose, un défaut se forme tout d'abord dans la bi-couche, mais pour se former, le défaut doit passer une barrière d'énergie E_s . Cette barrière d'énergie passée, le défaut peut soit disparaître et la membrane est de retour à l'état intact, ou alors le défaut peut croître en un trou qui relaxera entièrement la membrane. Voir la figure 9 pour un schéma de l'allure du paysage énergétique.

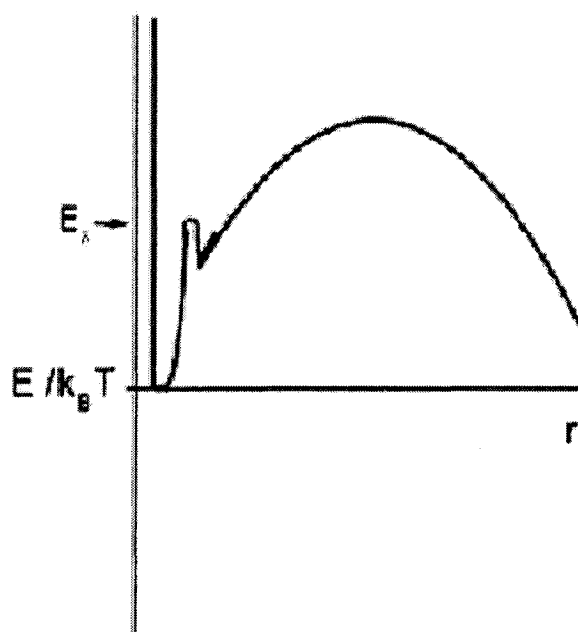


Figure 9: Énergie en fonction du rayon d'un défaut dans la membrane selon Evans et al. (par Evans, communications privées, 2004) On note la présence d'une première barrière énergétique à la formation d'un défaut dans la membrane.

Donc selon leur modèle, à de petits taux d'application de tension, c'est la barrière de formation de défaut qui limite l'apparition d'un pore, et à de grands taux, c'est la barrière de cavitation. Pour expliquer leurs observations, ils ont établi un modèle cinétique pour la rupture d'une membrane. Ce modèle se résume à trois équations maîtresses, définissant respectivement les probabilités que la membrane soit intacte, comporte un défaut ou soit brisée. Les probabilités d'être dans chaque état dépendent des taux de transition entre chacun des états qui eux dépendent en partie de la tension appliquée à la membrane.

Ce modèle ne sera pas détaillé plus profondément ici car ce serait en dehors de notre objectif, mais nous référons le lecteur à l'article par Evans et son groupe[9].

Une fois les paramètres des taux de transitions ajustés, le modèle explique correctement la situation, c'est-à-dire qu'il parvient à reproduire l'augmentation de la tension de rupture avec l'augmentation du taux d'application de la tension. De même, il reproduit l'élargissement de la probabilité de rupture avec l'augmentation du taux d'application de la tension.

Une question demeure cependant, la barrière pour la formation d'un défaut est-elle superflue? Peut-on expliquer le phénomène sans l'ajout d'un autre paramètre au problème? L'approche que nous utilisons est différente de celle d'Evans, nous utilisons un modèle microscopique de nucléation, ce qui fait qu'il est possible que nous ne puissions observer la barrière de formation d'un défaut du modèle phénoménologique d'Evans.

5- Des Expériences avec Peptides:

Plusieurs expériences différentes ont été faites avec les peptides, notamment la *méltine*, qui est le plus utilisé des peptides car il est généralement considéré comme un peptide typique de sa classe (la classe des peptides fortement chargés); l'on suppose son comportement comme représentant le comportement général des peptides anti-microbiens.

Evans et son groupe ont élargi leur méthode d'application de tension sur une vésicule par succion avec une micro-pipette pour étudier le cas où des peptides sont présents en solution (et donc aussi dans la bi-couche de la vésicule). Ils ont en particulier étudié l'effet des peptides dans la bi-couche lorsque la concentration de peptides est trop faible pour causer la rupture de la vésicule. Ce sont, entre autres, ces résultats que nous avons reproduits avec notre modèle.

La méthodologie de l'expérience reste la même: on saisit une vésicule avec une micro-pipette, puis on applique la tension à un taux constant. La seule différence est que dans la solution où se trouve la vésicule il y a une certaine concentration de *méltine*.

Deux choses ressortent du graphique de la tension de rupture en fonction du taux d'application de la tension (voir la figure 10 à la page 29). Premièrement, il est clair que la *méltine* affaiblit énormément la membrane. Deuxièmement, l'effet des peptides semble s'amoinrir avec l'augmentation du taux d'application de la tension. En effet, aux très grands taux d'application de

la tension, les tension critiques pour différentes concentrations de *mélittine* se rapprochent les unes des autres, montrant que l'effet de l'augmentation de la concentration du peptide diminue.

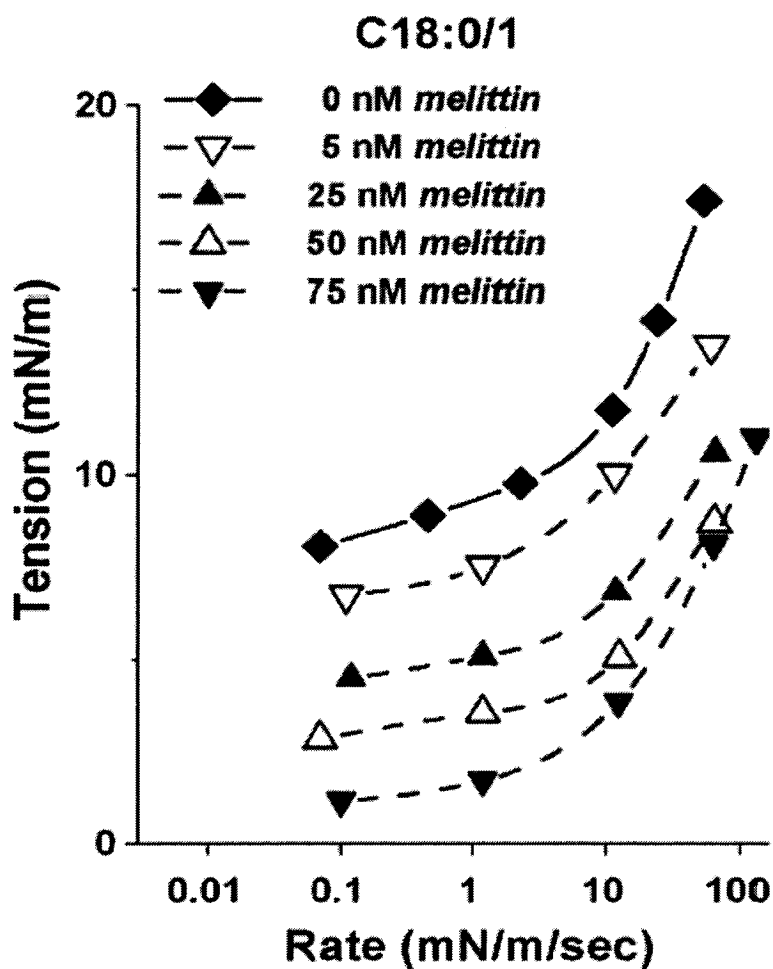


Figure 10: Tension à la rupture en fonction du taux d'application de la tension pour différentes concentration de *mélittine*. Graphique par E.Evans (communications privées, 2004)

À la figure 11, à la page 30, on peut voir le changement de tension à la rupture avec l'augmentation de la concentration de *mélittine* en solution. La tension à la rupture diminue

linéairement avec l'augmentation de la concentration de mélittine. La rupture de la membrane à tension nulle se fait au-delà d'une concentration de 75 nM de *mélittine* en solution.

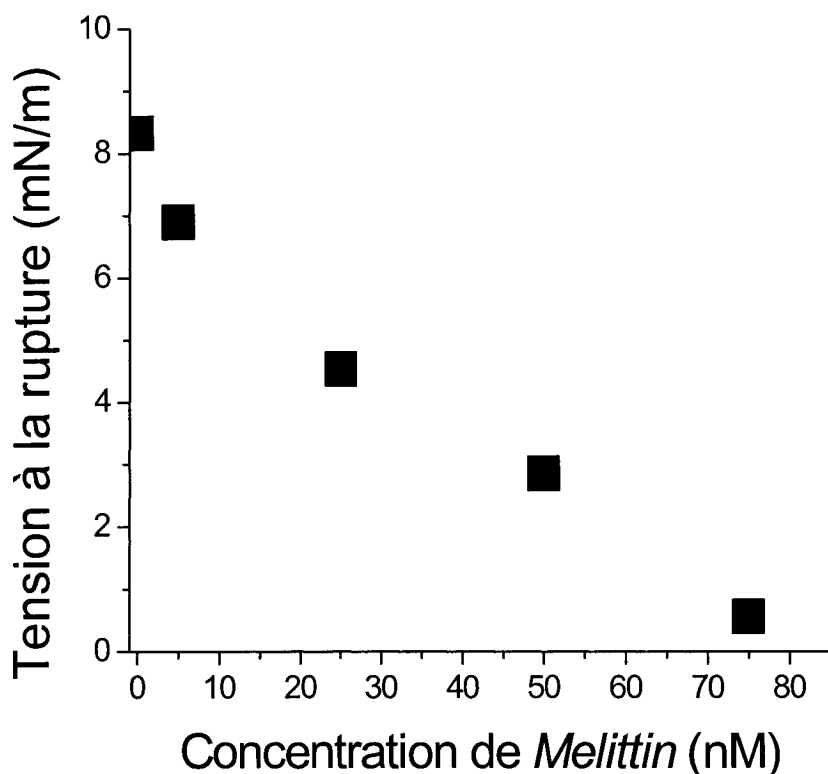


Figure 11: *Tension à la rupture en fonction de la concentration de mélittine pour un taux d'application de la tension de 0.1 mN/m/s construit à partir des données d'Evans (communications privées, 2004). Ces résultats semblent indiquer une baisse initiale abrupte de tension à la rupture, puis une diminution monotone avec l'augmentation de la concentration de mélittine.*

Benachir et Lafleur[16] ont pour leur part étudié l'interaction de la *mélittine* avec une membrane qui n'est soumise à aucun stress. Pour ce faire, ils préparent tout d'abord un bain de vésicules. À ce bain, ils ajoutent la *mélittine* qui vient s'insérer dans les vésicules. Ils ajoutent ensuite

une certaine quantité de peptides qu'ils ne maintiennent pas fixée ainsi lorsque la *mélittine* s'insère dans les bi-couches, la concentration de *mélittine* en solution diminue.

Utilisant une méthode de fluorescence, ils calculent la quantité relative de contenu perdu. Pour calculer cette quantité perdue, ils font l'expérience et ensuite ils détruisent toutes les vésicules pour déterminer la quantité totale de contenu vésiculaire présent dans le système et ainsi déterminer la quantité relative de contenu vésiculaire perdue.

Leur première observation est que la courbe du pourcentage de contenu vésiculaire perdu atteint un plateau quelques minutes après le début de l'expérience. Même si on laisse le mélange de vésicules et de *mélittine* incubé pour des périodes au-delà de trente minutes, il n'y a plus de perte de contenu vésiculaire. Ceci implique donc que la *mélittine* se lie rapidement aux vésicules et qu'une fois liée, il n'y a pas d'échange d'une vésicule à l'autre.

La seconde observation importante qu'ils font est que le mécanisme par lequel la *mélittine* fait perdre son contenu à une vésicule en est un de type "tout-ou-rien". C'est-à-dire qu'une vésicule ne peut pas perdre une fraction de son contenu, elle ne perd rien ou elle perd tout. Cette observation est basée sur des mesures de fluorescence et nous référons le lecteur à l'article pour plus de détails [16]. Cependant, nous tenterons de l'expliquer brièvement. Pour un processus de perte graduelle, toutes les vésicules perdent une portion de leur contenu, alors que pour un processus de perte "tout-ou-rien" seulement une portion des vésicules perdent tout leur contenu. Cela a un effet sur les propriétés d'auto-étanchement du marqueur fluorescent dans les vésicules. En effet, plus celui-ci se

trouve en haute concentration, mieux il s'auto-étanche ("self-quench"). Donc si toutes les vésicules perdent un peu du marqueur fluorescent, l'auto-étanchement sera moins bon, alors que si seulement une portion des vésicules perdent tout leur contenu, l'auto-étanchement restera le même car les vésicules intactes gardent la même concentration de marqueur.

La troisième observation qu'ils ont faite, est l'insertion préférentielle de la *mélistine* dans les vésicules qui ont perdu leur contenu. Pour parvenir à ce résultat, ils ont divisé en plusieurs portions la quantité de *mélistine* nécessaire pour briser toutes les membranes lorsque cette quantité est ajoutée d'un coup aux vésicules. Après l'ajout de la première portion, une certaine quantité de vésicules perdent tout leur contenu, comme attendu. Ce qui est surprenant c'est qu'après l'ajout de chacune des portions suivantes, il n'y a plus de perte de contenu vésiculaire supplémentaire. Cela veut donc dire que les peptides rajoutés subséquemment s'insèrent dans les vésicules ayant déjà perdu leur contenu et non dans les vésicules intactes.

Nous croyons cependant, que ce n'est pas exactement dans les vésicules ayant perdu leur contenu que les peptides s'insèrent préférentiellement, mais bien dans les vésicules déjà brisées. Cette nouvelle affirmation est équivalent à la première mais plus précise, car les peptides n'ont pas d'interaction (dans les modèles établis à date) avec le contenu des vésicules ou des cellules. Notre modèle présent n'est cependant pas en mesure de tester ces résultats et nous ne pouvons donc pas supporter cette affirmation, à savoir que les peptides s'insèrent de préférence dans les vésicules brisées.

Par ailleurs, Allende et al.[32] ont effectué des expériences de fuites, mais en mesurant en plus du pourcentage total de matériel perdu, le taux auquel le matériel cellulaire est perdu. Ceci est très intéressant car nous savons d'après Benachir et Lafleur que la perte de matériel cellulaire est un mécanisme du type tout-ou-rien, donc que seules les vésicules brisées perdent leur contenu. Si l'on connaît le taux auquel ces vésicules perdent leur contenu, il est possible de calculer la grosseur des pores. Inversement, si l'on connaît la taille des pores dans une membrane, il est possible de calculer le taux de perte de matériel cellulaire. Il est donc possible de relier les résultats expérimentaux avec notre modèle car nous pouvons (comme il sera expliqué plus loin), calculer la taille des pores dans une membrane.

Il est donc possible de connaître l'effet des propriétés de la membrane sur le taux auquel le contenu est perdu. Par exemple, Allende et al. ont calculé l'effet sur le taux de perte de contenu cellulaire du changement de module de compressibilité. Ils ont aussi tenté de calculer l'effet du changement de la longueur des chaînes sur le taux de perte de contenu. Ils obtiennent une dépendance linéaire du taux de perte sur le module de compressibilité, mais ne parviennent pas à obtenir une dépendance claire sur la longueur des chaînes. Cette impossibilité surgit du fait qu'il est difficile de manipuler uniquement la longueur des chaînes; il faut changer de lipides, et donc il faut changer plus d'une caractéristique.

III - Du Modèle et des Calculs sans Peptides:

1- Des Fondements du Modèle:

Nous débutons avec le modèle développé par Luc Fournier et Béla Joós[33] pour la cinétique de rupture d'une membrane soumise à un étirement de surface. Ce modèle considère le coût énergétique pour exposer les queues hydrophobes des lipides à l'eau environnante ainsi que l'énergie nécessaire pour étirer la membrane sur une certaine surface. Il est basé sur le modèle de Litster[34] établi il y a trente ans, qui se divise en deux parties: l'énergie de surface (pour étirer la membrane) et l'énergie de ligne totale, proportionnelle à la surface de queues hydrophobes exposées à l'eau. L'énergie nécessaire pour étirer une membrane de surface au repos a_m et de surface moléculaire (la surface d'un lipide) a_0 est donnée, dans l'approximation élastique, par:

$$E_m = \frac{1}{2} K a_m \left(\frac{\Delta a}{a_0} \right)^2 \quad (1)$$

où K est le module de compressibilité pour expansion des lipides et $\Delta a = a - a_0$ est le changement de surface moléculaire. Pour de petites expansions, le module de compressibilité pour expansion peut être trouvé expérimentalement. Cependant, Rawicz et al.[29] ont montré que la valeur trouvée et la valeur réelle du module de compressibilité diffèrent car la membrane au repos a des plis, des ondulations dans la troisième dimension (perpendiculairement au plan de la membrane). Ces ondulations font qu'on peut tirer sur la membrane sans l'étirer comme tel, mais seulement en

aplanissant les ondulations.

Le module de compressibilité apparent est calculé à partir de la pente de la courbe:

$$\tau = K \left(\frac{\Delta a}{a_0} \right) \quad (2)$$

où τ est la tension de surface. Cette relation nous permet donc de relier l'étirement d'une membrane avec la tension appliquée.

Lorsqu'un pore est créé, une portion de la contrainte dans la membrane est relâchée de telle sorte que l'énergie de surface, l'énergie associée à l'étirement de la membrane, diminue. Si l'on suppose que cette relaxation est uniforme, c'est-à-dire que l'étirement de la membrane est toujours uniforme, le changement de surface moléculaire devient:

$$\frac{\Delta a}{a_0} = \frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{a_p}{a_m} \quad (3)$$

où a_p est la surface totale des pores dans la membrane et Δa_m est le changement de la surface totale de la membrane. Cependant, lorsqu'un pore est créé, les queues hydrophobes des lipides se voient exposées à l'eau, ce qui augmente l'énergie du système. Si l'on suppose un petit trou de forme circulaire dans la membrane, l'énergie pour exposer les queues hydrophobes des lipides à l'eau est proportionnelle à la circonférence du trou:

$$E_e = 2\lambda \sqrt{\pi a_m} \left(\frac{a_p}{a_m} \right)^{1/2} \quad (4)$$

On écrit l'équation sous cette forme pour exprimer l'idée que seul le rapport de la surface des pores sur la surface totale relâchée de la membrane est d'importance pour le calcul de l'énergie de ligne totale. Le paramètre λ est la tension de ligne (ou tension de bord), le coût énergétique par unité de longueur pour exposer les queues des lipides à l'eau. Ce paramètre peut être ré-écrit en utilisant la longueur des lipides:

$$\lambda = 2h_t\sigma \quad (5)$$

où, donc, h_t est la longueur des queues hydrophobes des lipides. σ est ici l'hydrophobicité, l'énergie hydrophobe par unité de surface. Le facteur de 2 tient en compte le fait qu'on travaille avec des bi-couches de lipides.

Fournier et Joós[33] ont introduit le concept d'hydrophobicité *apparente* qui est en fait considérablement plus petite que l'hydrophobicité *pure*, qui est habituellement citée comme étant 40 mN/m. Cette hydrophobicité apparente considère le fait que même lorsque la membrane est au repos, alors même qu'elle doit former une barrière entre la cellule et son milieu, il y a une certaine quantité d'eau dans la membrane, ce qui diminue l'énergie effective pour exposer les queues des lipides à l'eau. L'étirement à la rupture prédit par la théorie pour une hydrophobicité de 40 mN/m est de l'ordre de $\Delta a_m/a_m = 50\%$. Les valeurs expérimentales sont plutôt de l'ordre de 4%.

Fournier et Joós ont aussi introduit un facteur géométrique pour la rigidité des queues des lipides. Lorsqu'une membrane est étirée, les lipides s'arrangent de telle sorte que l'eau ne peut pas pénétrer jusqu'au centre de la membrane. Ce faisant, leurs queues hydrophobes, bloquant le passage de l'eau entre les têtes hydrophiles des lipides, sont exposées à l'eau. L'on pourrait s'attendre naïvement à ce que la surface des queues exposées à l'eau soit égale à l'étirement de la membrane. Ce serait le cas si les queues des lipides étaient parfaitement flexibles, ce qui n'est pas le cas. Le facteur géométrique de rigidité $\gamma \geq 1$ est défini comme étant le rapport de la surface des queues exposée à l'eau sur le changement de surface moléculaire.

Pour mieux comprendre, imaginons que l'augmentation de surface moléculaire Δa est un cercle entouré de lipides (voir la figure 12 à la page 38). Les queues forment alors un cône sous le cercle de manière à fermer le trou, l'apothème se trouvant à être la longueur des lipides exposés à l'eau. Le cône ayant une surface S , le facteur de rigidité est donc $S/\Delta a$. Avec un peu de géométrie analytique, on trouve que la hauteur des lipides qui est exposée à l'eau est:

$$h_e = \gamma \sqrt{\frac{a_0}{\pi}} \left(\frac{\Delta a}{a_0} \right)^{1/2} \quad (6)$$

De plus, les lipides se repoussent l'un l'autre. Cette répulsion est essentiellement stérique au sens où plus on rapproche deux lipides, plus il faut restreindre le mouvement des queues, ce qui résulte en une répulsion effective de courte portée. C'est donc essentiellement une augmentation

d'énergie qui est due à la diminution de conformations spatiales possibles pour un lipide, et donc une augmentation d'énergie libre due à la diminution de l'entropie d'un lipide. Si on suppose une interaction de la forme D/a [1] où D est une constante positive, l'énergie par molécule de la membrane peut s'écrire:

$$U(a) = 2\sigma\gamma(a - a_0) + Da^{-1} + U_0 \quad (7)$$

où la première partie est due à l'exposition des queues des lipides à l'eau et la seconde partie est due à l'interaction stérique des queues des lipides entre elles.

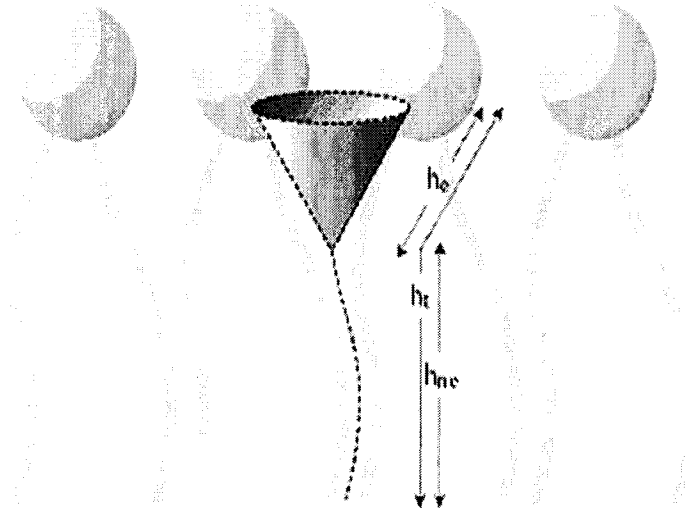


Figure 12: Représentation schématique des hauteurs exposées et non-exposées des lipides. La hauteur exposée contribue au module de compressibilité (pour expansion) de la membrane. Le facteur de rigidité γ est le rapport de la surface des côtés du cône sur la surface de la base de ce même cône. La surface des lipides exposée est donc plus grande que l'augmentation de surface. Voir la référence [19] pour la figure.

Avec la condition que cette énergie doit être un minimum pour $a = a_0$ on trouve la valeur de $D = 2\sigma\gamma a_0^2$. Qui plus est, si l'on compare la courbure de ce potentiel $U(a)$ avec la courbure du potentiel donné par l'équation (1), on obtient la relation:

$$K = 4\sigma\gamma \quad (8)$$

qui relie le module de compressibilité pour expansion à l'hydrophobicité apparente et à la rigidité des queues hydrophobes des lipides. Dans nos simulations, nous utilisons la valeur trouvée expérimentalement pour le module de compressibilité (K) et nous ajustons la rigidité (γ) pour obtenir la bonne valeur de l'étirement à la rupture pour le cas quasi-statique. Fixer le module de compressibilité et la rigidité fixe automatiquement l'hydrophobicité par la relation (8).

2- De l'Application du Modèle:

Considérons tout d'abord un réseau hexagonal de N sites. Chaque site doit être dans l'un de deux états: l'état lipide ou l'état trou (voir la figure 13 à la page 41). Ce réseau représente une membrane, une bi-couche lipidique dans laquelle peuvent se former des trous, des pores, et sur laquelle nous allons tirer pour déterminer la tension à laquelle elle se brise. Si on définit l'aire de surface d'un lipide, nous définissons du même coup la surface totale du réseau représentant une membrane.

Il faut faire attention ici, car nous ne simulons pas le système dans l'ensemble canonique ni dans l'ensemble grand canonique. Nous gardons la surface et le nombre total de lipides fixes, mais le nombre de trous n'est pas fixé. Dans l'ensemble canonique, le nombre des sites trous et lipides seraient fixés et nous ne pourrions que les inter-changer pour déterminer leur distribution. Dans l'ensemble grand canonique, nous devrions travailler avec une membrane qui a un nombre variable de lipides, ce qui n'est pas acceptable. Nous travaillons donc dans un ensemble canonique modifié où nous fixons le nombre de lipides sans fixer le nombre de trous et en gardant la surface fixée. Pour permettre cela nous ne gardons pas le nombre de sites lipides fixé, mais le nombre de lipides ainsi que le nombre total de sites fixés, ce qui veut dire que nous permettons une occupation plus grande que l'unité; nous permettons à plus d'un lipide à la fois d'occuper un même site. Le nombre total de site (et donc la surface de la membrane) est donc conservé de même que le nombre de lipides dans la membrane.

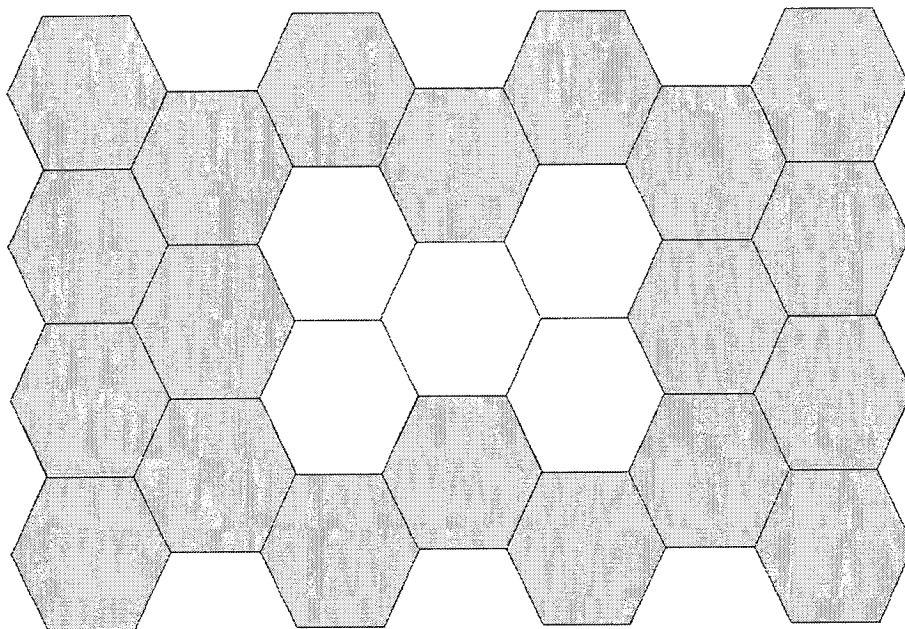


Figure 13: Exemple du réseau hexagonal de notre modèle, les sites blancs représente les sites trous et les gris les sites lipides. L'occupation des sites lipides est uniforme et plus grande ou égale à 1. Ici, le nombre d'interactions lipides-trou N^h est 18.

Comme nous supposons que la relaxation de la membrane est uniforme, l'occupation des sites lipides doit elle aussi être uniforme. Celle-ci peut donc facilement être calculée, car nous distribuons les lipides sur tous les sites lipides, mais nous savons qu'il y a un nombre de lipides égal au nombre total de sites. Si l'on connaît le nombre de trous, l'occupation des sites lipides sera: $N / (N - n_h)$ où n_h est le nombre de sites trous (h pour hole).

Bien qu'une vraie vésicule soit un objet tri-dimensionnel, nous utilisons un réseau bi-dimensionnel. Nous supposons donc que les fluctuations dans la troisième dimension (perpendiculaire au plan de la bi-couche) sont négligeables, la courbure étant très petite à l'échelle des lipides.

Farago et Santangelo ont montré [35] que l'effet principal des fluctuations dans la troisième dimension est une diminution effective des tensions de ligne et de surface. On peut considérer que ces fluctuations, étant petites, sont incluses dans les valeurs de nos paramètres. Considérant leurs résultats, notre modèle ne serait pas valide à de hautes-températures où les valeurs des paramètres régissant les tensions de lignes et de surface (l'hydrophobicité et le module de compressibilité) peuvent devenir négatives. Par ailleurs, nous pouvons supposer que les fluctuations dans la troisième dimension sont incluses dans les fluctuations thermiques permises par le facteur de Boltzmann de notre simulation de Monte Carlo (Voir plus loin pour plus de détails sur le facteur de Boltzmann et les simulations de Monte Carlo).

Comme il a été mentionné plus haut, l'énergie d'une membrane peut être divisée en deux parties: l'énergie de surface et l'énergie de ligne (ou de bord) totale. Pour calculer l'énergie de surface, nous pourrions utiliser un potentiel d'interaction entre les sites lipides où la constante d'interaction serait une fonction de la distance entre deux sites lipides. Cependant, il existe une méthode beaucoup plus simple pour calculer l'énergie de surface: l'équation (1) nous la donne directement. Il suffit de calculer le changement relatif de surface moléculaire pour les lipides, défini dans l'équation (3) et qui peut être ré-écrite comme:

$$\frac{\Delta a}{a_0} = \frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{a_p}{a_m} = \frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{n_h}{N} \quad (9)$$

Le changement relatif de surface moléculaire est donc égal au changement relatif de la surface totale de la membrane moins la surface relative des trous (ou pores). L'énergie de surface

est alors donnée par:

$$E_s = \frac{1}{2} K a_m \left(\frac{\Delta a}{a_0} \right)^2 = \frac{1}{2} K a_m \left(\frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{n_h}{N} \right)^2 \quad (10)$$

Écrite dans cette dernière forme, il est clair que la création de sites trous relaxe la membrane. Lorsque la surface relative des trous est égale à l'étirement imposé sur la membrane, l'énergie de surface de la membrane est nulle, comme l'on s'y attendrait.

L'énergie de ligne totale est l'énergie associée à l'exposition des queues des lipides à l'eau. Dans le modèle, l'énergie de ligne (ou énergie de bord) totale est l'énergie d'interaction entre un site lipide et un site trou. L'énergie de ligne totale dépend donc de la position des sites trous dans la membrane. Comme le réseau est hexagonal, chaque site a six plus proches voisins (first neighbors) de telle sorte que l'énergie d'interaction entre un site lipide voisin d'un site trou est le coût énergétique pour exposer un sixième de la surface hydrophobe d'un lipide à l'eau, multiplié par deux car il s'agit d'une bi-couche. Il s'agit donc d'une interaction entre plus proches voisins seulement, et on peut l'écrire comme:

$$J^{lh} = \frac{2}{3} h_{ne} \sigma \sqrt{\pi a_0} \quad (11)$$

où $h_{ne} = h_t - h_e$ est la hauteur hydrophobe des queues des lipides qui n'est pas exposée à l'eau (avant que le trou voisin n'apparaisse). En d'autres termes il s'agit de la hauteur hydrophobe qui devient exposée à l'eau lorsqu'un site trou voisin est créé. La hauteur hydrophobe exposée à l'eau est

responsable en partie de l'énergie de surface et est calculée à partir de l'équation (6).

L'énergie de ligne totale peut donc être simplement calculée comme étant le nombre d'interactions entre des sites lipides et des sites trous (le nombre de voisins) multiplié par l'interaction lipide-trou. Celle-ci est la même partout dans la membrane car nous supposons une relaxation uniforme. L'énergie de ligne totale est donc:

$$E_{edge} = J^{lh} N^{lh} \quad (12)$$

où N^{lh} est le nombre d'interactions lipide-trou (on utilise edge pour bord).

Cependant, lorsque des sites trous sont créés, le nombre de lipides par site augmente. Il y a donc plus de lipides sur le bord d'un trou que le nombre de sites lipides adjacent à des sites trous. Ce nombre de lipides est en fait:

$$N^{lh*} = \frac{N}{N - n_h} N^{lh} \quad (13)$$

Par ailleurs, l'expression citée plus haut pour J^{lh} est en fait l'énergie par interaction lorsque l'occupation des sites lipides est l'unité. L'énergie de ligne (par unité de longueur) est donnée par J^{lh} / r où r est la distance inter-particules. La distance inter-particules s'écrit:

$$r = \left(\frac{N - n_h}{N} \right)^{1/2} r^* \quad (14)$$

où r^* est la distance inter-particules à l'équilibre. L'énergie par interaction doit donc être ré-écrite comme étant l'énergie d'interaction lorsque l'occupation des sites lipides est de un divisé par la distance inter-particules et multipliée par la distance inter-sites (qui est la même que la distance inter-particules initiale. L'expression correcte pour l'énergie de ligne totale est donc:

$$E_{edge} = \left(\frac{N}{N - n_h} \right)^{1/2} J^{lh} N^{lh} \quad (15)$$

Pour faire notre simulation, nous utilisons l'algorithme de Metropolis pour les simulations de type Monte Carlo. Une simulation de Monte Carlo est la méthode la plus simple pour simuler un processus activé thermiquement, comme la formation de pores dans une membrane.

On choisit un site de la membrane aléatoirement et on génère une configuration d'essai en changeant son état (si c'était un site lipide, on en fait un site trou, et inversement). On calcule l'énergie finale, et on accepte le changement selon la règle d'acceptation:

$$acc(i \rightarrow f) = \min \left\{ 1, \exp \left[- (E_f - E_i) / k_B T \right] \right\} \quad (16)$$

où k_B est la constante de Boltzmann et E_f et E_i sont les énergies totales finales et initiales (après et avant le changement) du système. Par énergie totale nous entendons la somme de l'énergie de surface et de l'énergie de ligne totale.

La masse du système est conservée par l'occupation multiple des sites lipides. L'équilibre détaillé (detailed balance) est préservé car à chaque configuration possible du système correspond une énergie définie qui ne dépend pas du chemin (dans l'espace des configurations) emprunté pour s'y rendre.

Nous avons utilisé un système de 200 par 200 sites pour un total de 40 000 sites (ou 80 000 lipides), ce qui donne une aire totale d'environ $0.024 \mu\text{m}^2$, soit approximativement l'aire d'une petite vésicule. De plus gros systèmes peuvent être simulés, mais au coût de plus de temps d'ordinateur. Nous avons utilisé des conditions aux frontières périodiques, c'est-à-dire que le voisin d'un site à la droite du réseau sera le site à la même hauteur à la gauche du réseau.

Ce qui a été fait par Fournier et Joós[33] est d'augmenter l'étirement ($\Delta a_m/a_m$) très lentement (quasi-statiquement) pour toujours garder le système en équilibre. Pour ce faire, ils choisissent l'étirement et laissent le système s'équilibrer pendant 1000 essais par sites (1000 pas de Monte Carlo), ils augmentent alors à nouveau l'étirement et ainsi de suite jusqu'à ce que le point de rupture soit atteint. Cependant, ce que nous voulons montrer ici c'est que le modèle décrit plus haut est aussi valable pour une application de l'étirement qui n'est pas quasi-statique. Pour ce faire, nous fixons l'augmentation de l'étirement à une certaine valeur (nous avons utilisé 0,01%) puis nous varions le nombre de pas de MC entre deux augmentations pour simuler différents taux d'application de la tension.

Il n'est pas évident de trouver une relation entre le temps et un pas de Monte Carlo. Un pas de MC correspond à une moyenne d'un essai par site, sur un réseau de 200 par 200 sites cela correspond à 40 000 essais (qu'ils soient acceptés ou refusés). Analytiquement, on ne peut pas trouver de lien direct entre un pas de MC et le temps. Cependant, si l'on connaît la tension de rupture d'un certain lipide pour un étirement quasi-statique ainsi que pour un autre taux d'étirement, il est possible d'induire une relation entre un pas de MC et le temps. Cette relation n'est cependant pas une définition précise, mais bien une approximation et doit être considérée comme un calcul d'ordre de grandeur.

Par exemple, la valeur quasi-statique de tension à la rupture pour le lipide C18:0/1 est de 6,8 mN/m. Il est possible de calibrer le modèle pour cette valeur si nous connaissons déjà le module de compressibilité pour expansion et la longueur des chaînes hydrophobes de ce lipide. Il faut donc calibrer le modèle pour trouver une valeur de la rigidité des chaînes. Nous savons aussi qu'à un taux d'étirement de 0.1 mN/m/s, une bi-couche de C18:0/1 se rompt à 8.3 mN/m[9]. Le nombre de pas de MC entre chaque étirement correspondant à une tension de rupture de 8.3 mN/m doit donc correspondre à un taux d'étirement réel de 0.1 mN/m/s.

Ayant fait les simulations, nous trouvons qu'un taux d'application de la tension de 0.1 pas de MC entre chaque augmentation de 0.01% de l'étirement (ou une augmentation de la tension de 0.0235 mN/m) correspond à une tension de rupture de 8.3 mN/m. Ce qui veut donc dire qu'un pas de MC correspond approximativement à 2.35 secondes. Cependant cette valeur n'est pas un calcul direct mais simplement une estimation à partir d'autres résultats.

IV - Du modèle et des Calculs avec Peptides

1- Des Modifications au Modèle:

Les peptides sont des molécules amphipatiques composées d'une séquence quelconque d'acides aminés. Ils peuvent prendre plusieurs formes pour s'insérer dans la membrane, notamment le feuillet- β et l'hélice- α . C'est cette dernière qui nous intéresse.

Les peptides que nous étudions ont cette particularité que dans l'hélice- α qu'ils forment les acides aminés chargés se trouvent d'un côté de l'hélice (qui ressemble à un cylindre) et les acides aminés neutres de l'autre côté de telle sorte que la face (ou plutôt demi-face du cylindre) composée d'acides aminés chargée est hydrophile, et l'autre face hydrophobe.

Certains peptides sont reconnus pour s'insérer dans la membrane et former des pores dont ils forment la bordure. Imaginons un pore dans une bi-couche lipidique. L'insertion de peptides amphiphiles sur la bordure viendra diminuer l'énergie de ligne totale par leur hydrophilicité partielle. Les peptides ont donc la capacité de stabiliser des pores dans la membrane.

Bien que plusieurs études expérimentales et théoriques sur les peptides causant la rupture des membranes aient été faites [36]-[37]-[38]-[39]-[40]-[41], le mécanisme par lequel ils rendent la membrane perméable n'est toujours pas très clair. Ce que nous voulons montrer ici est que notre

modèle peut supporter des inclusions tels que les peptides induisant la perméabilisation de la membrane si nous supposons un mécanisme d'action du type "barrel-stave/toroidal".

Dans ces modèles, les peptides s'insèrent avec leur axe principal perpendiculaire au plan de la bi-couche. Cependant les peptides ne s'insèrent pas simplement dans la bi-couche, ils s'insèrent spécifiquement en bordure des pores pour ainsi exposer leur côté hydrophile à l'eau dans le pore, protégeant ainsi les queues hydrophobes de l'eau.

Il existe plusieurs autres modèles pour la perméabilisation de la membrane par les peptides amphiphiles mais des études ont montré qu'à partir d'une certaine concentration seuil, la *mélicitine* agit selon le modèle toroïdal. La différence entre le modèle toroïdal et le modèle "barrel-stave" est que dans le "barrel-stave" les lipides adjacents aux peptides sont complètement protégés de l'eau alors que dans le modèle toroïdal ils ne le sont pas. Les têtes hydrophobes doivent donc se glisser entre les peptides pour bien protéger les queues hydrophobes.

Considérons une vésicule immergée dans l'eau où se trouvent des peptides en solution (comme la *mélicitine* par exemple). Pour s'insérer dans la membrane, les peptides doivent traverser une série d'étapes de réarrangement, de changements de conformation en plus de devoir déplacer les lipides pour se faire une place dans la bi-couche. Il y a donc une barrière d'énergie que le peptide doit surmonter pour parvenir à s'insérer dans la membrane. En thermodynamique, le coût énergétique d'insertion d'une particule dans un système à partir d'un bain de réserve se nomme le potentiel chimique. Dans le cas de notre modèle, le potentiel chimique représente donc ces

changements de conformation que le peptide doit faire de même que l'énergie associée au déplacement des lipides. Le potentiel chimique n'inclut cependant pas l'énergie liée à la compression des lipides par le peptides, cette énergie faisant toujours parti de l'énergie de surface.

Il y a aussi un lien entre le potentiel chimique et la concentration de peptides en solution. Ceci est important car expérimentalement, il est de loin plus facile de mesurer la concentration que de calculer le potentiel chimique. Clairement, plus nous avons de peptides en solution, plus à l'équilibre il doit y avoir un grand nombre de peptides dans la membrane, ce qui équivaut à dire que la barrière d'énergie contrôlant l'insertion des peptides dans la membrane doit être plus petite. La relation prend la forme [32]:

$$C \propto \exp\left(\frac{-\mu}{k_B T}\right) \quad (16)$$

où μ est le potentiel chimique et C la concentration de peptides en solution. Nous n'avons pas l'égalité parce que nous ne pouvons établir de relation exacte au sens des unités conventionnelles. Nous ne pouvons établir de liens entre le nombre de peptides dans la membrane et la concentration molaire de peptides en solution. Cependant, notre concentration C représente un rapport du nombre de peptides dans la membrane par rapport au nombre de lipides.

Par contre, ce rapport n'est pas exact car le nombre précis de peptides dans la membrane à l'équilibre dépendra de l'état complet de la membrane. Plus précisément, si la membrane est sous tension, les peptides s'inséreront plus facilement; si la membrane est brisée ou s'il y a un pore, les

peptides s'inséreront d'autant plus facilement. Tous ces facteurs influencent le nombre de peptides dans la membrane sans changer la valeur de la concentration C . Ce nombre n'est donc pas exact, mais une indication de la grandeur de la concentration de peptides en solution.

Il est intéressant de noter que certains peptides forment des pores en "barrel-stave" (comme l'*alamethicin*) et que d'autres (comme la *mélettine*) forment des pores toroïdaux [28]. Comme nous l'avons dit plus haut, la différence effective est au niveau du changement d'énergie de ligne. L'énergie de ligne d'un pore en "barrel-stave" sera plus petite car les lipides n'ont pas à courber pour s'insérer entre les peptides. Dans le modèle donc, la différence physique peut être incluse en changeant le paramètre d'interaction entre les peptides et les pores ainsi que l'interaction peptide-peptide. Cette dernière est importante pour les peptides du second groupe qui sont fortement chargés: il doit y avoir une répulsion entre eux.

En incluant les peptides dans le modèle, nous travaillons maintenant dans l'ensemble grand canonique car le nombre de peptides n'est pas fixé et donc la masse du système change. La concentration de peptides en solution est cependant maintenue fixe. Le nombre de lipides est toujours conservé, de même que la température qui reste constante.

Lors de l'insertion, les peptides doivent pousser les lipides les uns contre les autres pour se faire de la place dans la membrane, occupant ainsi une certaine surface dans la membrane. Cet espace de la membrane occupé par des peptides réduit donc la contrainte imposée sur les lipides. Le changement de surface moléculaire relatif lors de l'étirement devient donc:

$$\frac{\Delta a}{a_0} = \frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{a_{pores}}{a_m} - \frac{a_{pep}}{a_m} \quad (17)$$

où a_{pores} et a_{pep} sont les surfaces totales occupées par les pores et les peptides respectivement. Si l'on prend pour acquis que les peptides occupent un seul site du réseau de notre modèle et qu'ils continuent d'occuper un seul site même avec le changement de surface du réseau, nous pouvons réécrire l'énergie de surface comme:

$$E_s = \frac{1}{2} K a_m \left(\frac{\Delta a}{a_0} \right)^2 = \frac{1}{2} K a_m \left(\frac{\Delta a_m}{a_m} - \frac{n_h + n_{pep}}{N} \right)^2 \quad (18)$$

où n_{pep} est le nombre de peptides dans la membrane (le nombre de sites peptides).

Un peptide a cependant une aire de surface équivalente à environ sept ou huit lipides (comme mentionné plus haut, un peptide a une aire de surface de 4,5 nm², et un site de notre réseau a une surface de l'ordre de 0,6 nm²) et dans notre modèle nous fixons l'aire de surface à la même valeur que les lipides. Les résultats nous montrent que cette petite entorse à la réalité n'a pas une grande influence sur la physique du problème, car c'est la topologie, la répartition des peptides dans la membrane, qui est importante. Il pourrait être intéressant de modifier le modèle pour que les peptides occupent une aire de surface plus réaliste, question de vérifier nos résultats et la validité de l'hypothèse faite ici.

Comme pour les trous dans la membrane, l'énergie d'interaction d'un peptide dépend de sa position dans la membrane, mais de plus, l'énergie d'interaction pour les peptides dépend de l'orientation du peptide. Les acides aminés étant répartis dans le peptide de telle sorte qu'en conformation d'hélice- α les acides aminés chargés et les neutres se retrouvent de côtés opposés de l'hélice, il en résulte que le peptide a une face hydrophile et une face hydrophobe. Donc un côté du peptide doit avoir un potentiel attractif avec les trous et l'autre côté un potentiel répulsif avec les trous.

Cependant, dans notre modèle, les peptides ont six faces car nous travaillons avec un réseau hexagonal, alors pour garder la continuité nous choisissons les interactions comme dans la figure 14.

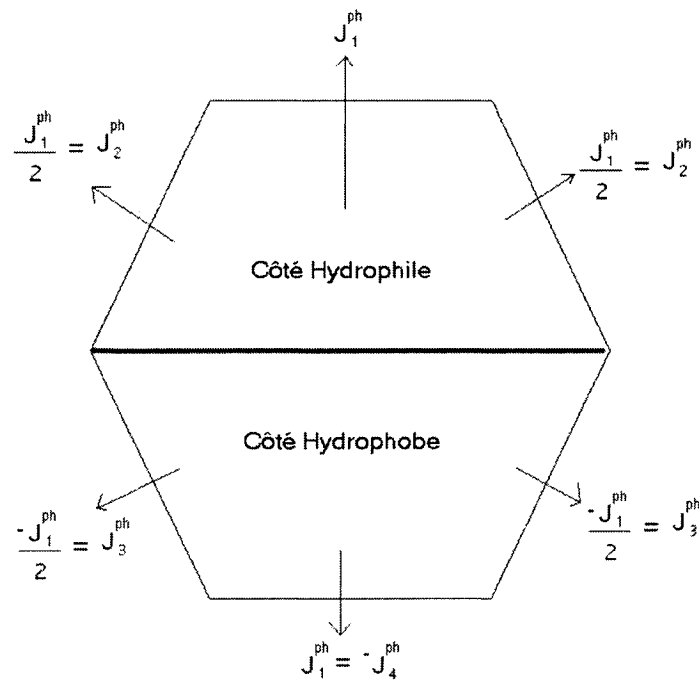


Figure 14: Représentation schématique de l'interaction des sites peptides avec les sites trous. La séparation entre le côté hydrophile et le côté hydrophobe du peptide est indiquée par une ligne horizontale. Tous les potentiels d'interactions sont définis à partir de l'interaction hydrophile entre le peptide et un site trou (soit J^ph_1)

Nous avons choisi les parties attractives et répulsives des potentiels de la même grandeur (mais de signes opposés) de telle sorte que l'énergie des peptides dans l'eau soit 0.

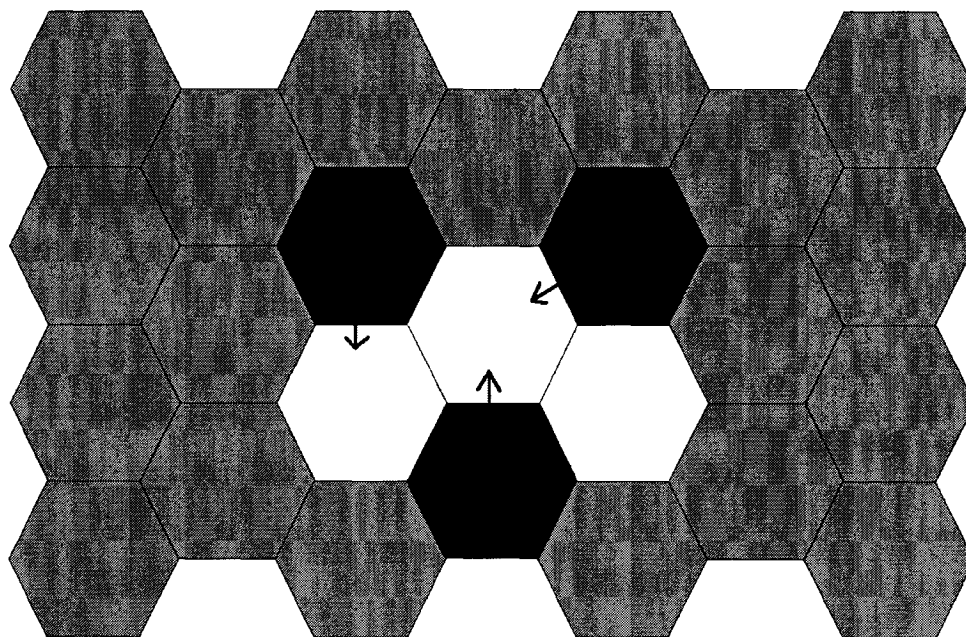


Figure 15: Exemple du réseau hexagonal avec peptides. Les sites blancs représentent les sites trous, les gris les sites lipides et les noirs les sites peptides. Les flèches indiquent la direction du côté hydrophile des peptides. Nous avons ici le nombre d'interactions suivantes: $N^{lh} = 7$, $N^{ph}_1 = 3$, $N^{ph}_2 = 4$, $N^{ph}_3 = N^{ph}_4 = 0$.

Il n'y a pas d'interaction additionnelle avec les lipides. Le raisonnement pour justifier cela va comme suit. Dans une membrane non-étirée, l'interaction lipide-lipide du modèle est définie comme étant zéro par la définition de l'énergie de surface qui donne une énergie nulle lorsque la membrane n'est pas étirée. De même, dans une membrane non-étirée, remplacer un lipide par un peptide ne devrait pas changer l'énergie de la membrane car le peptide occupe sensiblement la même surface qu'un lipide.

De plus, il n'y a pas d'interaction peptide-peptide car celles-ci, dans le cas des peptides faiblement chargés, sont l'équivalent des interactions lipides-lipides qui sont nulles pour une membrane qui n'est pas étirée. Les peptides devraient se repousser entre eux car ce sont des molécules chargées positivement. Nous avons décidé, pour l'instant, d'ignorer cette interaction bien que pour le second groupe de peptides elle pourrait être importante.

On pourrait argumenter que la *méltine* (ou n'importe quel peptide) n'a pas exactement la même hauteur qu'une membrane, ce qui crée un mal-agencement hydrophobe (hydrophobic mismatch). Cependant cette énergie est incluse dans le potentiel chimique d'insertion des peptides dans la membrane. Cette question n'est pas essentielle à l'établissement du modèle, car nous cherchons à reproduire un comportement général et non un peptide en particulier. Il est donc possible de supposer que le peptide est de la même hauteur que la membrane.

Dans le modèle, le peptide a six faces, mais seulement quatre valeurs d'interactions doivent être choisies car il existe 2 paires de côtés où les valeurs d'interactions entre le peptide et l'eau est la même (Voir la figure 14 à la page 53). L'énergie de ligne totale, l'équation 15, lorsqu'on ajoute les peptides au modèle s'écrit comme suit:

$$E_{edge} = \left(\frac{N}{N - n_h} \right)^{1/2} J^{lh} N^{lh} + J_1^{ph} N_1^{ph} + J_2^{ph} N_2^{ph} + J_3^{ph} N_3^{ph} + J_4^{ph} N_4^{ph} \quad (19)$$

où les J_i^{ph} sont les interactions du peptide avec les trous pour chacun des quatre potentiels et les N_i^{ph}

sont le nombre d'interactions de chacun des côtés du peptide avec l'eau (Rappelons-nous que deux paires des six côtés ont la même valeur d'interaction de sorte qu'il y a quatre différents potentiels d'interaction peptide-trou). Le premier terme de cette équation est l'énergie de ligne totale pour les trous dans le système déjà mentionné plus haut; nous avons simplement ajouté la contribution énergétique des peptides dans la membrane.

Encore une fois nous avons utilisé un algorithme de Metropolis dans une simulation de Monte Carlo pour calculer les solutions du système. Sélectionnant un site aléatoirement, nous essayons de le convertir en un site d'un des deux autres états possible. Par exemple, si nous choisissons un site trou, alors il y a une chance sur deux que le programme essaye de le convertir en site peptide et une chance sur deux qu'il essaye de le convertir en site lipide.

2- De l'Application du Modèle

Cependant un problème se pose pour le choix de l'orientation du peptide lors du changement d'essai. Nous utilisons un schéma biaisé très similaire au schéma d'échantillonnage de Rosenbluth, tiré du livre de Frenkel et Smit[42]. Chaque fois qu'on essaie d'insérer un peptide, nous calculons l'énergie associée à chacune des six orientations possibles (nous calculons l'énergie de ligne totale de chacune des orientations car l'énergie de surface ne dépend pas de l'orientation du peptide). Nous définissons le facteur de Rosenbluth comme suit:

$$W(6) = \sum_{j=1}^6 \exp \left[\frac{U^{or}(o_j)}{k_B T} \right] \quad (20)$$

où $U^{or}(o_j)$ se réfère à l'énergie de ligne totale associée avec la j-ème orientation possible du peptide. Une des six orientations possibles du peptide est alors sélectionnée comme étant l'orientation de la configuration d'essai de l'algorithme de Metropolis avec la probabilité:

$$P(o_n) = \frac{\exp[-U^{or}(o_n)]}{W(6)} \quad (21)$$

$P(o_n)$ étant la probabilité d'utiliser la n-ième orientation comme configuration d'essai. Nous pouvons ensuite définir:

$$W(o) = \sum_{k=2}^6 \exp\left[\frac{U^{or}(o_k)}{k_B T}\right] + \exp\left[\frac{U^{or}(o_o)}{k_B T}\right] \quad (22)$$

où la somme sur les k couvre les 5 orientations qui n'ont pas été choisies comme configuration d'essai et $U^{or}(o_o)$ est l'énergie de ligne totale du peptide immergé dans l'eau (l'énergie du peptide en dehors de la membrane). Cette énergie est zéro car nous avons défini les grandeurs des potentiels attractifs et répulsifs comme étant égales. L'équation (21) se réduit donc à:

$$W(o) = \sum_{k=2}^6 \exp\left[\frac{U^{or}(o_k)}{k_B T}\right] + 1 \quad (23)$$

La règle d'acceptation pour la configuration du réseau générée par l'algorithme de Metropolis pour l'insertion d'un peptide devient donc:

$$acc(i \rightarrow f) = \min\left(1, \frac{W(f)}{W(o)} \exp\left[-\frac{U^{pos}(f) - U^{pos}(i) + \mu}{k_B T}\right]\right) \quad (24)$$

où $U^{pos}(f)$ et $U^{pos}(i)$ se réfèrent aux portions des énergies initiales et finales du peptides qui ne dépendent pas de l'orientation, et donc qui dépendent uniquement de la position du peptide dans la membrane. En l'occurrence, cette énergie de position est l'énergie de surface, l'énergie associée à

la relaxation de la membrane par l'insertion du peptide. Cette énergie de position considère cependant aussi le changement d'énergie de ligne totale au sens où si un peptide s'insère au bord d'un trou, il protège un lipide de l'eau et cette protection ne dépend pas de l'orientation du peptide, mais uniquement de sa position.

Tout ceci n'est que pour l'insertion d'un peptide au lieu d'un trou ou d'un lipide. Si nous voulons remplacer un site peptide par un site trou ou un site lipide, la règle d'acceptation doit changer légèrement, le potentiel chimique doit être soustrait au changement d'énergie:

$$acc(i \rightarrow f) = \min \left\{ 1, \exp \left[-\frac{E_f - E_i - \mu}{k_B T} \right] \right\} \quad (25)$$

L'on serait tenté de croire que le fait de permettre aux peptides d'être retirés du réseau soit en contradiction avec le résultat expérimental de Benachir et Lafleur qui ont montré que la *mélittine* une fois insérée dans une vésicule ne change pas de vésicule [16], cela est dû à l'irréversibilité de l'insertion d'un peptide dans une membrane car cette insertion est favorisée entropiquement. Cependant notre modèle ne représente pas des états moléculaires précis d'une membrane, mais bien des états d'équilibre. Ainsi l'état de notre réseau pendant la phase d'équilibration n'a pas d'importance et seul le résultat à l'équilibre indique une configuration moyenne possible.

Par ailleurs, la règle d'acceptation d'une configuration d'essai pour changer un site trou en site lipide ou l'inverse reste la même que dans le modèle sans peptides, c'est-à-dire:

$$acc(i \rightarrow f) = \min\left\{1, \exp\left[-(E_f - E_i) / k_B T\right]\right\} \quad (26)$$

Le modèle est encore une fois simulé sur un réseau de 40 000 sites (ou 80 000 lipides, car c'est une bi-couche). Le schéma utilisé pour augmenter l'étirement Δa_m est le même à l'exception près que le nombre d'essais par sites doit être doublé pour produire les mêmes résultats que sans peptides. Ceci est dû au fait que pour tester le même nombre relatif de possibilités du modèle, il faut faire deux essais par site (car chaque site a trois configurations possibles, soit peptide, lipide ou trou). Pour comprendre, on peut imaginer que l'on fixe le potentiel chimique à une très grande valeur de sorte qu'aucun peptide ne s'insère dans la membrane. Le programme fera tout de même une fois sur deux un essai d'insertion de peptide. Dans ce cas, si on veut obtenir les mêmes résultats que dans le modèle sans peptides, il faut clairement faire deux fois plus d'essais.

Avant le début de la phase d'équilibration, nous ajustons le nombre de peptides dans la membrane pour respecter la concentration relative C . Nous enlevons donc des lipides pour ajouter des peptides. Nous procédons de la sorte pour éviter des problèmes dans le calcul de la relaxation de la membrane. Le problème dans le calcul de la relaxation survient du fait qu'à de très basses tensions, la membrane est sur-relaxée, il y a plus de peptides et de trous que nécessaire à la relaxation de la membrane. Mais à mesure que l'on tire, ce nombre reste pratiquement fixé alors que l'étirement augmente, ce qui fait que la relaxation diminue. Donc pour éviter une sur-relaxation de la membrane, nous procédons à une phase où nous remplaçons des lipides par des peptides.

Aussi, pour simuler l'insertion de peptides dans la membrane, nous laissons la membrane s'équilibrer avec des peptides en solutions pour 10 000 itérations par site. En laboratoire, les vésicules sont en présence de peptides avant même qu'une tension soit appliquée; il est donc logique de les laisser s'insérer avant de commencer à tirer sur la membrane. Pour tester l'effet des peptides sur la résistance des peptides à l'étirement, il est essentiel d'avoir des peptides dans la membrane et non seulement en solution!

Il est intéressant de noter que nous avons essayé d'inclure la diffusion des trous et des peptides dans le modèle. Cependant il s'avère que la diffusion n'apporte rien de plus au modèle. Il faut se souvenir que notre modèle ne génère pas des états moléculaires précis, mais plutôt des états moyens, ou des états d'équilibre. De plus, il faut faire très attention à la balance détaillée si l'on permet la diffusion. En effet, si lorsqu'on choisit un site trou, on lui permet soit de se déplacer, soit d'être remplacé par un site lipide ou un site peptide, alors il faut faire la même chose avec les sites lipides et les sites peptides car autrement, le nombre d'essai pour ôter des sites trous de la membrane sera relativement plus petit, ce qui engendre un biais dans la simulation et on se retrouve avec un surnombre de trous dans le réseau.

V - Des Résultats:

1- Des Résultats sans Peptides:

Pour utiliser différents lipides dans notre modèle, il faut ajuster deux paramètres du modèle pour correctement reproduire le comportement physique des lipides en question. Ces deux paramètres sont K le module de compressibilité pour expansion et h_t la rigidité des queues des lipides. Le module de compressibilité pour expansion des lipides que nous avons utilisé a été tiré des résultats d'Evans et al. [9]. Pour calibrer la rigidité des queues, nous extrapolons la tension de rupture pour un taux d'application très petit du graphique d'Evans (voir la figure 7 à la page 24). Nous utilisons alors ces valeurs pour ajuster la rigidité de telle sorte que la membrane se brise à la bonne tension pour un étirement très lent. Les valeurs utilisées sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Valeurs utilisées pour ajuster le modèle aux lipides.

	K (mN/m)	γ	σ (mN/m)	h_t (nm)	$\tau_{\max}$ (mN/m)
C18:0/1	235	9,2	6,39	3,07	6,8
diC22:1	263	8,2	8,02	3,37	11

Les lipides utilisés sont le *cis* insaturé 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3- phosphocholine (C18:0/1) SOPC et le 1,2-dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (diC22:1) DEPC. Ils ont été choisis car des valeurs expérimentales de module de compressibilité, de hauteur des chaînes et de

tension à la rupture existent dans la littérature pour ces lipides.

Notons que les valeurs d'hydrophobicité obtenues avec le présent modèle sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Evans et al. avec leur modèle phénoménologique. En effet, les valeurs obtenues par Evans et al sont de l'ordre de 4,23 mN/m et 5,04 mN/m pour le C18:0/1 et le diC22:1 respectivement. Ces valeurs sont nettement différentes à la valeur généralement supposée de 40 mN/m.

Nous avons réussi à reproduire les résultats expérimentaux obtenus par Evans et al. pour les lipides C18:0/1 et diC22:1 (voir les figures 7 et 16 aux pages 24 et 64). Bien que nous n'ayons pas d'échelle exacte de comparaison pour le taux d'application de la tension, notre modèle reproduit qualitativement les propriétés principales observées expérimentalement. Au bas taux d'application de la tension, la tension critique n'augmente que lentement avec l'augmentation du taux d'application, mais à mesure que ce taux augmente, la tension critique devient une fonction abrupte du taux d'application. Donc notre modèle inclut, sans aucune hypothèse supplémentaire, deux régimes différents de rupture de la membrane: un régime où la rupture est limitée par la nucléation d'un pore et un régime où la rupture est limitée par la croissance d'un pore.

Aux petits taux d'application de la tension, il y a bien assez de temps pour qu'un trou grandisse en un pore qui relaxe entièrement la membrane, mais la tension étant basse, la barrière d'énergie à passer pour créer un site trou dans le réseau est très grande et donc la rupture est limitée par la nucléation d'un trou. Cependant, aussitôt que la tension est assez grande pour permettre que

la barrière d'énergie soit passée, la membrane se brise. La rupture est donc bien définie et la répartition des tensions critiques est étroite.

Pour les taux d'application élevés, la situation est l'inverse: la tension élevée fournit bien assez d'énergie pour passer la barrière d'énergie pour la nucléation d'un trou, mais le temps

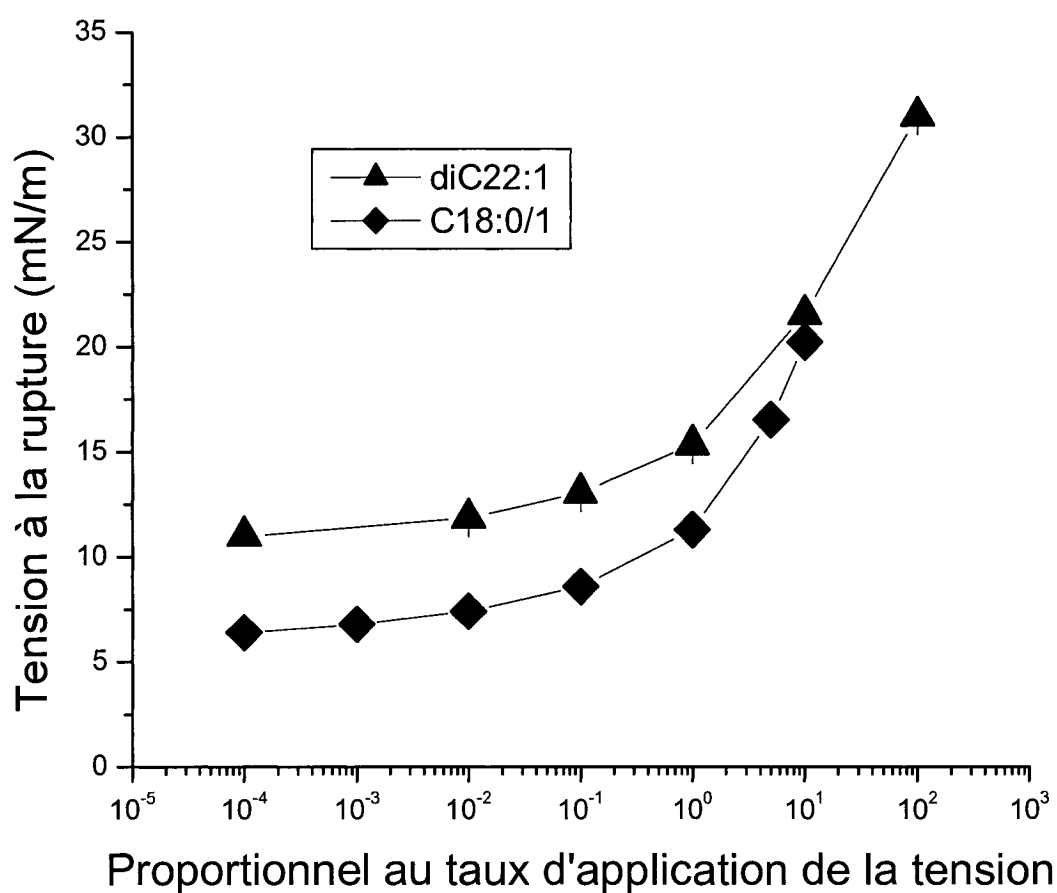


Figure 16: Tension à la rupture en fonction du taux d'application de la tension pour deux lipides différents. On peut facilement identifier les deux régimes de ruptures. Remarquer la ressemblance qualitative avec la figure 7 à la page 24.

nécessaire à la croissance de ce trou en un pore relaxant la membrane est trop long par rapport au taux auquel la tension augmente ainsi par le temps que le trou ait grandi en un pore relaxant la membrane, la tension a plus ou moins largement augmentée. Donc la croissance des pores retarde la rupture de la membrane et lui permet de ne briser qu'à des tensions très élevées pour un taux très grand d'application de la tension. Cependant, la croissance des pores n'est pas un processus uniforme et cela conduit à une grande variabilité de la tension critique; plus le taux d'application de la tension est grand, plus large sera la distribution des tensions critiques.

De plus, nous voyons clairement que la tension pour la rupture augmente avec la longueur des queues hydrophobes et diminue lorsque la rigidité augmente. Rappelons-nous (voir les figures 2 et 7 aux pages 11 et 24) qu'une grande rigidité des queues hydrophobes peut être associée à un certain nombre de liens insaturés (un petit nombre de liens insaturés, car un grand nombre de liens insaturés dans une chaîne très longue peut faire en sorte que la chaîne soit très flexible, par exemple le DHA, comme nous l'avons mentionné plus haut[20]-[21]). Donc de plus longs lipides rendent une membrane plus résistante aux déformations mécaniques et des lipides plus rigides rendent une membrane moins résistante au stress ou à la déformation.

Pour de petits taux d'application de la tension, la rupture est comparable à une transition de premier-ordre (bien que ce n'en soit pas une) dans le sens où la courbe de la relaxation en fonction de l'étirement est discontinue au point de rupture. Mais lorsque le taux d'application de la tension est augmenté, la relaxation ne montre plus cette discontinuité aussi clairement. La relaxation en fonction de l'étirement qui avait un saut clair devient, à mesure que l'on applique la tension plus

rapidement, une fonction de moins en moins abrupte de l'étirement.

On peut expliquer ce phénomène expérimentalement, lorsque le taux d'application est augmenté, la tension à laquelle la rupture se produit devient une valeur intrinsèquement incertaine, on observe une distribution de tension à la rupture. Ceci est dû au fait que la rupture aux grands taux d'application de la tension est limitée par la croissance des pores, qui n'est pas un phénomène uniforme au sens où la croissance d'un pore se produit par activation thermique, ce qui revient à dire de manière aléatoire. Le moment précis de la rupture de la membrane montre donc une certaine distribution qui elle, est reproductible.

De retour à notre modèle, si l'on prend la dérivée première de la relaxation en fonction de l'étirement nous obtenons le taux de relaxation en fonction de l'étirement. C'est ce taux de relaxation qui sera notre guide pour indiquer le moment de la rupture. En effet, aux petits taux d'application de la tension, le taux de relaxation est infini au moment de la rupture (la membrane se brise instantanément sur l'échelle de l'étirement). Un maximum de taux de relaxation correspond donc à un maximum de probabilité de rupture (voir les figures 17, 18 et 19 aux pages 67, 68 et 69 respectivement). Si l'on applique la même démarche pour un cas où la tension est appliquée plus rapidement, on obtient une courbe en forme de cloche que nous pouvons interpréter comme étant la probabilité que la rupture se produise à un certain étirement donné de la membrane. Le maximum de cette courbe correspond au point où la membrane relaxe le plus rapidement et correspond donc au point où la membrane a le plus de chances de se briser.

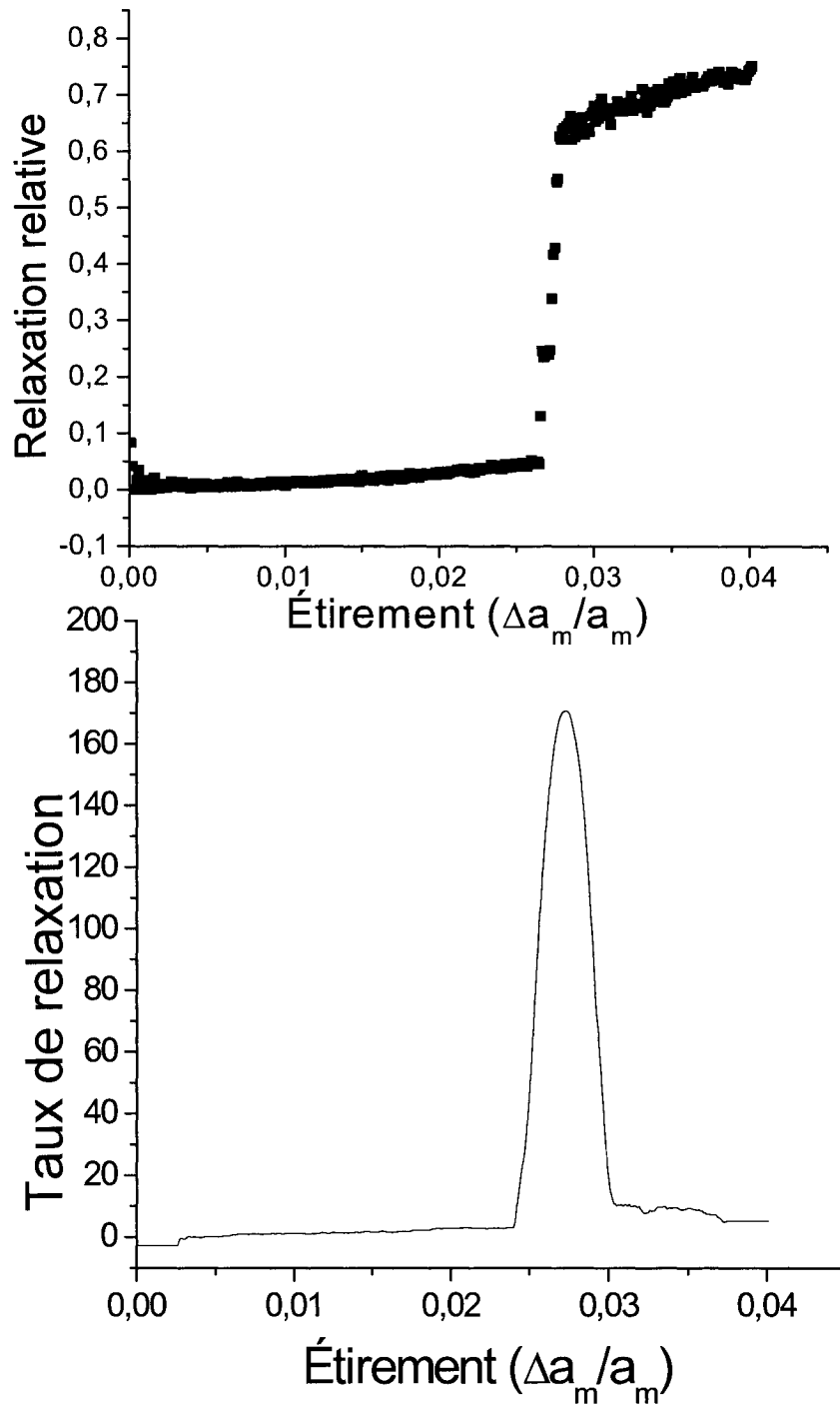


Figure 17: Relaxation relative (haut), rapport entre la surface relative des trous et de l'étirement relatif, et taux de relaxation (bas) en fonction de l'étirement à un taux d'application de l'étirement de 10 000 pas de MC entre les augmentations d'étirement. La membrane se relaxe subitement, ce qui s'assimile à une transition de premier-ordre. Le graphique du bas correspond à la dérivée par rapport à l'étirement du premier graphique.

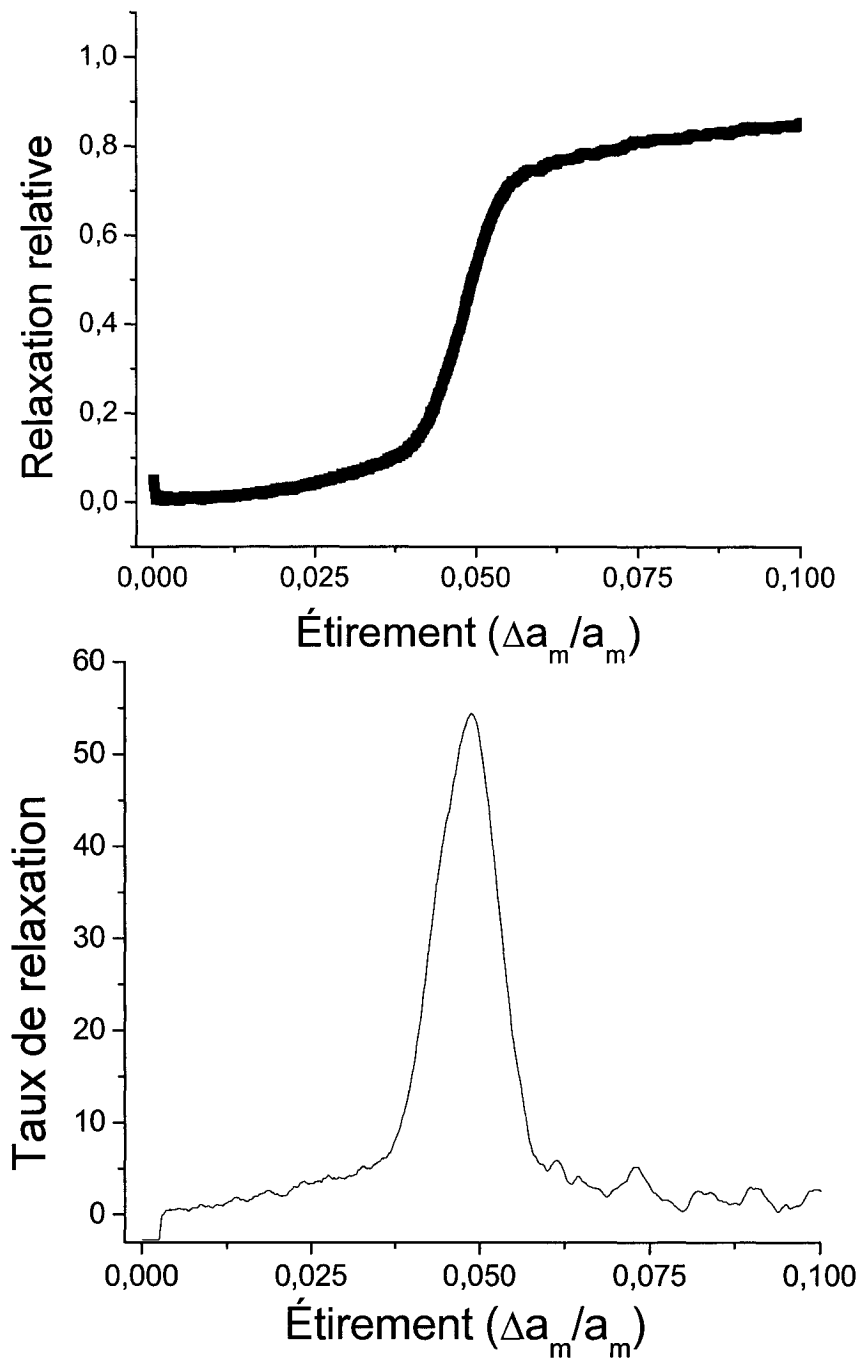


Figure 18: Relaxation relative (haut), rapport entre la surface relative des trous et de l'étirement relatif, et taux de relaxation (bas) en fonction de l'étirement à un taux d'application de l'étirement de 1 pas de MC entre les augmentations d'étirement. Le système ne se relaxe plus aussi rapidement qu'à un taux d'application plus lent (noter le changement d'échelles de l'abscisse). La rupture n'est plus assimilable à une transition de premier-ordre. Le graphique du bas correspond à la dérivée par rapport à l'étirement du premier graphique.

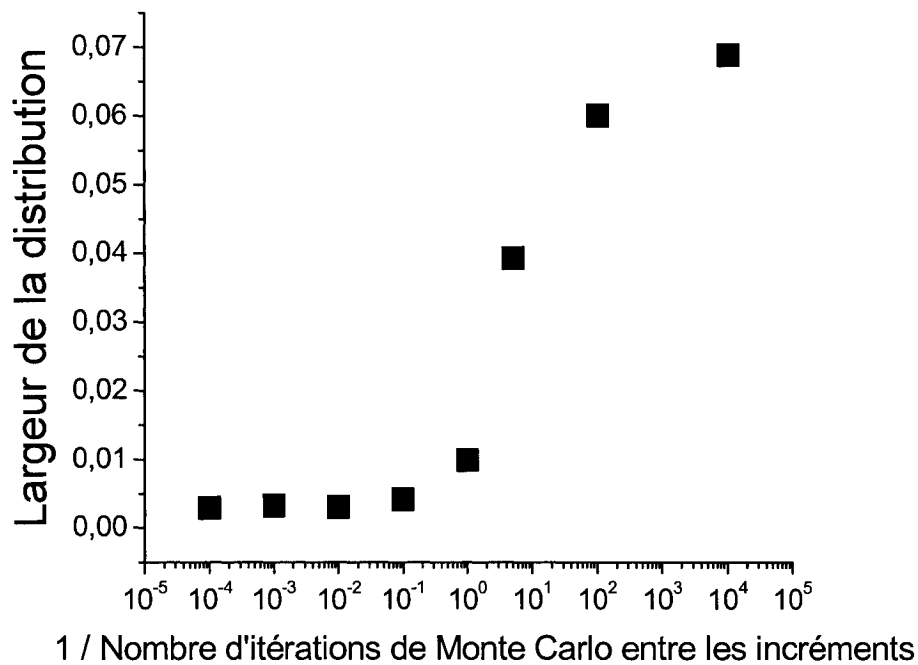


Figure 19: *Largueur à mi-hauteur de la distribution des étirements à la rupture en fonction du taux d'application de la tension (exprimé comme l'inverse du nombre d'itérations de MC entre les augmentations d'étirement). On peut clairement voir qu'en tirant plus vite sur une membrane, la distribution des étirements à la rupture s'élargit.*

Il est intéressant de noter que dans leur modèle cinétique pour la rupture des membranes en trois états, Evans et al.[9] définissent la probabilité que la membrane se rompe comme étant la dérivée temporelle de la probabilité instantanée qu'a la membrane de se trouver dans l'état rompu. Dans ce modèle, ils définissent les probabilités d'être dans l'état sans défaut, l'état pré-pore et l'état de la membrane rompue avec un ensemble de trois équations maîtresses. La probabilité d'être dans l'état rompu est proportionnelle à la relaxation de la membrane (définie comme la surface relative des pores divisée par l'étirement relatif) donc la dérivée temporelle de la probabilité d'être dans l'état

rompu est proportionnelle à la dérivée temporelle de la relaxation. Ceci est équivalent à notre définition de la probabilité de rupture car nous prenons la dérivée de la relaxation en fonction de l'étirement ce qui revient, à un facteur près, à la même chose qu'une dérivée temporelle car l'étirement est une fonction linéaire dans le temps. Nous utilisons donc la même définition pour la probabilité de rupture que Evans et al.

Cependant, dans leur modèle, Evans et son groupe supposent une barrière cinétique additionnelle pour la formation d'un défaut dans la membrane, ce qui change considérablement le paysage énergétique du problème (voir la figure 9 à la page 26). Bien que cette hypothèse semble raisonnable (entre autres elle permet d'expliquer correctement les résultats obtenus par Evans et son groupe) nos résultats ne peuvent confirmer ou infirmer cette hypothèse. En effet, notre modèle ne permet pas de détecter de barrière énergétique de nucléation, car cette barrière en est une d'énergie libre. Il faudrait donc aussi considérer la composante entropique du problème pour pouvoir observer la barrière de nucléation.

Ceci ne veut pourtant pas dire qu'aucune barrière cinétique pour la formation d'un défaut n'existe. Il se pourrait que cette barrière soit simplement incluse dans la barrière d'énergie pour la formation d'un site trou dans notre modèle. Les sites trous sont plus grands qu'un défaut qui n'est qu'une petite déformation locale de la membrane alors que les trous sont des colonnes dans la membrane où il n'y a pas de lipides et qui permet à l'eau de traverser la bi-couche. La barrière supposée par Evans et al. pourrait néanmoins être incluse explicitement dans le modèle présent.

2- Résultats avec peptides

Incluons maintenant les peptides dans notre modèle de réseau pour la cinétique de rupture d'une bi-couche lipidique sous tension. Nous avons pu reproduire, avec seulement quelques hypothèses au sujet des peptides mentionnés plus haut, les résultats obtenus par Evans et son groupe (communications privées, 2004). En augmentant le taux d'application de la tension, la tension critique augmente exactement comme dans le cas sans peptides, seulement cette fois les tensions critiques sont plus basses car la membrane est fragilisée par la présence des peptides qui viennent stabiliser les trous. De plus, la tension critique diminue avec une augmentation de la concentration relative des peptides pour un taux d'application de la tension fixé.

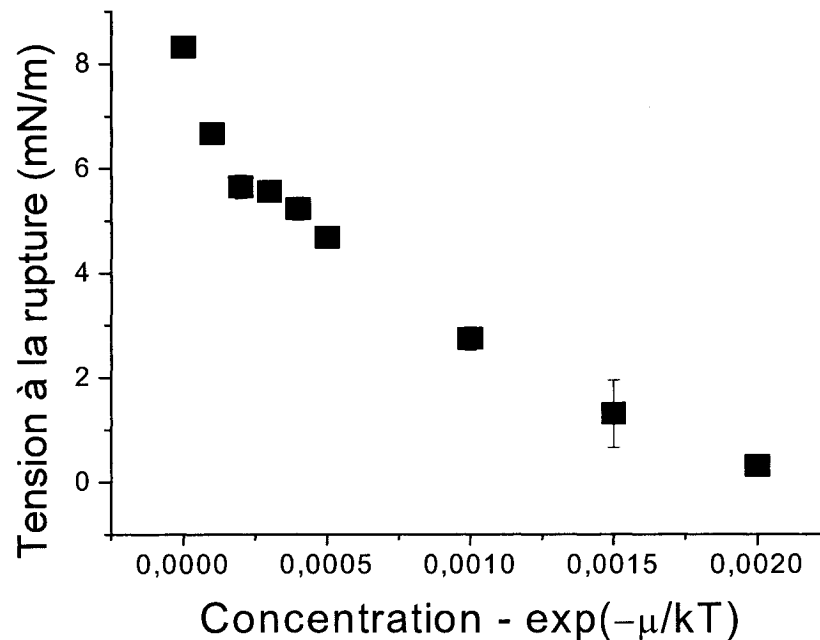


Figure 20: Tension à la rupture en fonction de la concentration de peptides pour un taux d'étirement de 20 pas de MC entre les augmentations de tension. L'interaction utilisée est $\mathcal{J}^{ph}_l = -6 kT$. On note qu'à une concentration proche de 0.002 la rupture de la membrane se fait à une tension presque nulle. Comparer avec la figure 11 à la page 30.

Nous avons utilisé une interaction $J^{ph}_1 = -6kT$, ce qui fait que le côté hydrophobe du peptide est plus hydrophobe encore que les queues des lipides. C'est-à-dire que J^{ph}_4 est plus petit que J^{ph}_1 . Cela est raisonnable car les peptides sont fait de plusieurs acides aminés qui peuvent être fortement hydrophobes.

Nous n'avons pas inclus de répulsion entre les peptides comme l'on s'y attendrait pour des peptides chargés (comme la *mélettine* utilisée par Evans (communications privées, 2004)), mais comme nos résultats montrent les même caractéristiques que ceux d'Evans, nous pouvons supposer que notre modèle de peptides est valide dans le cas de la *mélettine* qui est un peptide fortement chargé.

Par ailleurs, nous pouvons utiliser la figure 20 (page 71) pour déterminer la constante de proportionnalité entre le concentration réelle et la valeur de C que nous utilisons soit $C = \exp(-\mu/kT)$. Si l'on prend la valeur de l'étirement à la rupture pour $C = 0.001$ (soit 2.7542) comme étant égale à la valeur expérimentale d'étirement à la rupture pour une concentration de 50 nM (qui est en fait 2.857, donc pas exactement la même valeur, mais relativement près) on obtient une constante de proportionnalité de $5.05E-5$ M. Cette valeur ne doit pas être considérée comme une proportionnalité exacte, mais seulement utilisée comme référence d'ordre de grandeur pour comparer les potentiels chimiques aux concentrations.

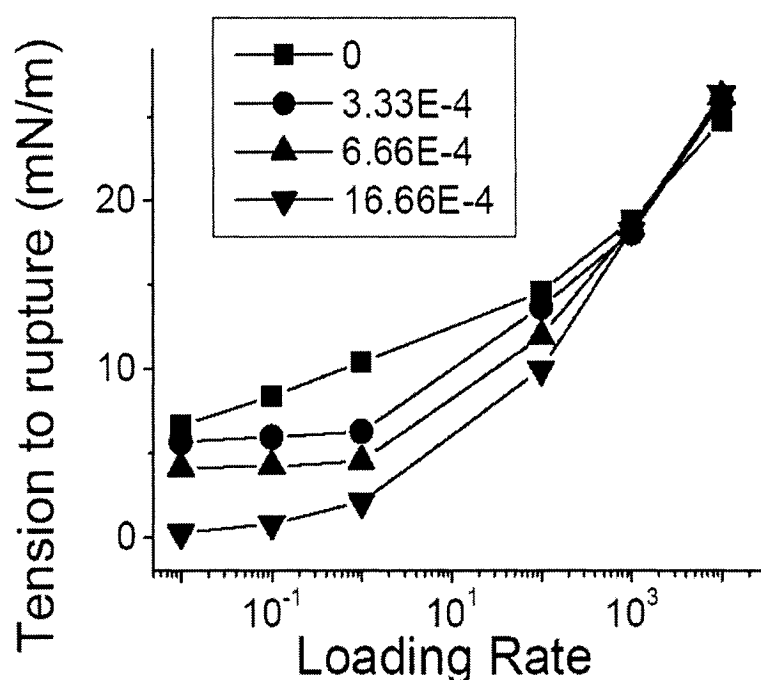


Figure 21: Tension à la rupture en fonction du taux d'application de la tension pour différentes concentrations de peptides pour une interaction $J^{ph}_1 = -6kT$. Chaque courbe représente une concentration fixée de peptides en solution. Pour de grandes concentrations, la membrane se brise à tension nulle. Aux très grands taux d'étirement, les peptides n'ont que très peu d'effet sur la membrane, ils n'ont pas le temps de s'insérer avant que celle-ci ne se brise.

La figure 21 nous donne la tension à la rupture en fonction du taux d'application de la tension pour différentes concentrations de peptides. Un fait à noter est qu'en augmentant le taux d'application de la tension, l'effet des peptides diminue jusqu'à devenir nul à un taux de 10^3 (ou 0.001 itérations par site entre les augmentations d'étirement). Ce phénomène est probablement dû au peu de temps entre le début de l'application de la tension et la rupture. Comme on peut le voir à la figure 22 à la page 74, la rupture se produit après moins d'un pas de MC. L'espace des configurations ne peut simplement pas être exploré assez pour que les peptides fassent effet.

On peut interpréter ce résultat comme suit: lorsque l'on tire très rapidement sur une membrane, les peptides n'ont pas le temps de se placer pour diminuer l'énergie de ligne totale. En effet, comme mentionné plus haut, la rupture se produit, dans ce cas, très rapidement. L'insertion des peptides étant contrôlée par le potentiel chimique qui est une barrière d'énergie, il faut un certain temps aux peptides pour passer cette barrière. Lorsqu'on tire rapidement, il n'ont pas le temps de passer la barrière et donc ils n'ont que très peu d'effet sur la rupture.

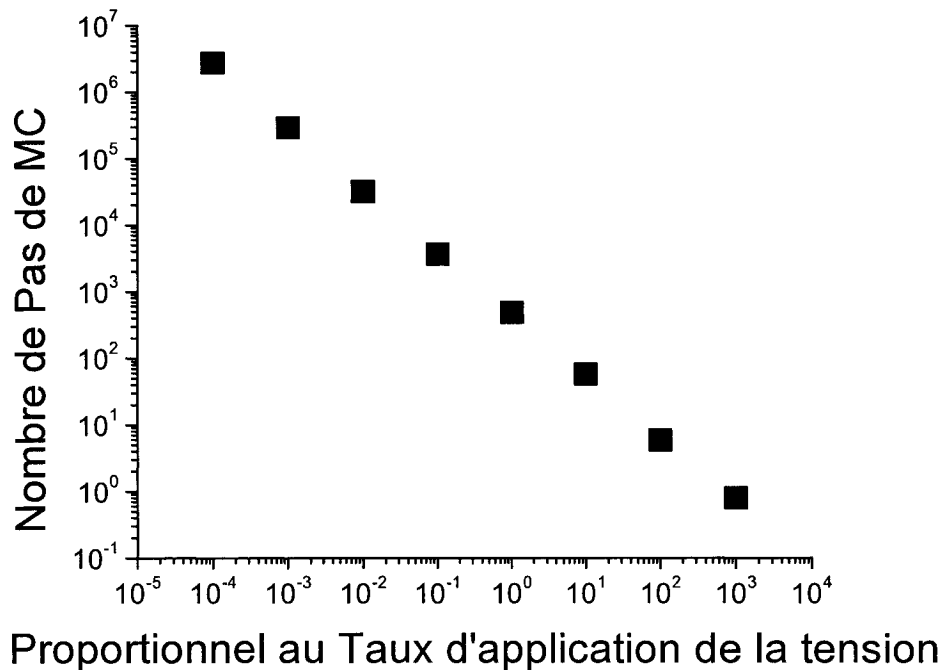


Figure 22: Nombre de pas de MC pour atteindre la rupture en fonction de l'inverse du nombre de pas de MC entre l'augmentation de l'étirement. Noter les échelles logarithmiques. Il est clair que la rupture prend moins de temps lorsqu'on tire rapidement bien que la membrane brise à une tension élevée. Ce petit intervalle de temps avant la rupture expliquerait l'action des peptides qui s'amointrit.

3- De l'Étude des Fuites de Contenu Vésiculaire

Une autre expérience intéressante que l'on peut faire avec des peptides et des membranes est de tester la perte de contenu d'une vésicule causée par la présence des peptides. Lorsque des peptides sont mis en présence de vésicules, ils s'insèrent dans ces dernières et forment, selon leur concentration, des pores-peptides non sélectifs qui permettent au contenu de la vésicule de fuir.

Allende et al.[32] ont montré que la demi-vie de la perte du contenu cellulaire augmente avec le module de compressibilité pour expansion de la membrane (voir la figure 24 à la page 76), mais ils n'ont pu identifier de relation claire avec la longueur des queues hydrophobes des lipides formant la membrane. Cela est probablement dû au fait qu'il est pratiquement impossible de modifier uniquement la longueur des chaînes hydrophobes sans changer d'autres paramètres du lipide; il en va de même pour le module de compressibilité. Cependant, avec notre modèle, il est possible de modifier un seul paramètre sans modifier les autres, ce qui nous permet de confirmer ou d'infirmer les résultats d'Allende et son groupe.

Le taux de perte de contenu cellulaire ne peut pas être calculé directement à partir de notre modèle, cependant le taux de perte doit être proportionnel au flux à travers la membrane. Ce flux se trouve à être le flux de Poiseuille.

$$J = \frac{\pi R^4}{8\eta} \frac{\Delta P}{l} \quad (26)$$

où R est le rayon d'un seul pore et η la viscosité du fluide, ΔP le gradient de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule et l est l'épaisseur de la membrane (ou la hauteur du pore). Le flux total à travers la membrane est donc proportionnel à la somme des rayons de chaque pore à la quatrième puissance. Supposant que les pores sont circulaires, le rayon d'un pore est proportionnel à la racine carrée de la surface d'un pore qui elle, est proportionnelle au nombre de sites trous formant un pore. On obtient donc:

$$J \propto \sum_{\text{pores}} n_i^2 \quad (27)$$

où n_i est le nombre de sites trous formant le i -ème pore et la sommation couvre chacun des pores du réseau.

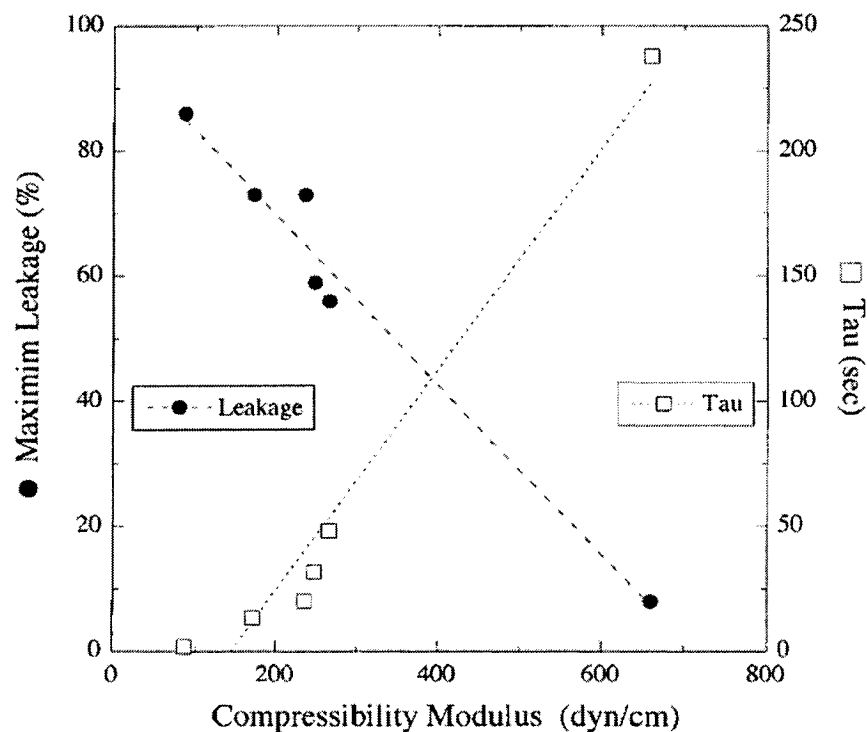


Figure 24: Pertes induites par la mélittine, pour différents lipides. Les lignes pointillées et de traits sont des régressions linéaires. Les points (  chelle de gauche) représentent la fraction totale de contenu v  sriculaire perdu alors que les carrés (  chelle de droite) représente la demi-vie du processus de perte du contenu. Voir la référence 32 pour le graphique.

Il est à noter que, comme nous l'avons dit plus haut, Allende et al. utilisent en fait la demi-vie du processus par lequel les vésicules perdent leur contenu, nous devons donc utiliser l'inverse du flux pour établir le même graphique. En effet, le flux à travers la membrane est inversement proportionnel à la demi-vie du processus. Si la demi-vie est courte, cela veut dire que les vésicules perdent rapidement leur contenu et donc que le flux à travers les membranes est grand. Inversement, si la demi-vie est grande, le processus est lent et donc le flux doit être petit.

Dans la figure 25, le nombre de sites trous est zéro jusqu'à ce qu'une concentration seuil où les peptides commencent à s'agréger et à former des pores-peptides. Ceci est en accord avec les résultats de Benachir et Lafleur car jusqu'à une concentration seuil, il n'y a pas de perte de contenu vésiculaire: il n'y a pas de pores dans la membrane qui peuvent laisser passer le contenu.

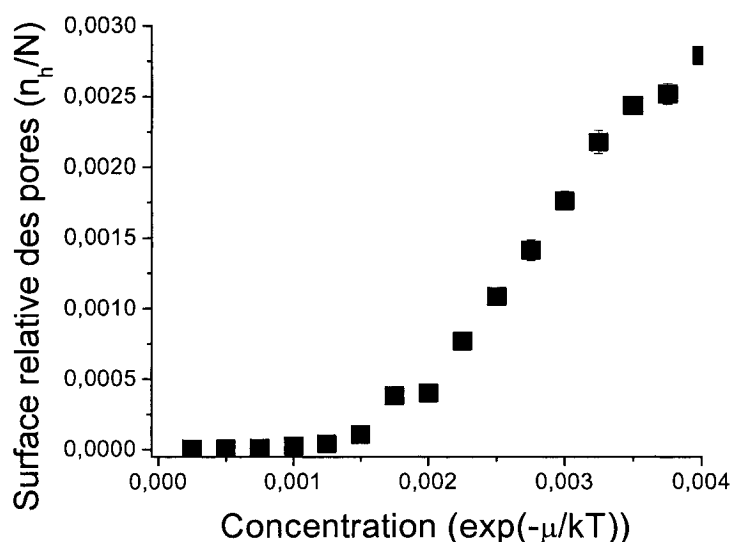


Figure 25: Surface relative occupée par les pores en fonction de la concentration de peptides pour un étirement nul pour une interaction des peptides de $J^h_i = -6kT$. On peut clairement voir que la membrane se perméabilise vers une concentration de l'ordre de 0,002. Jusqu'à cette concentration, il n'y a pas de perte de contenu vésiculaire car il n'y a pas de trous dans la membrane.

Ces résultats sont en accords avec les résultats expérimentaux généralement acceptés. La valeur seuil se trouvant aux environs de $1/1000$ qui est la valeur généralement acceptée dans la littérature pour le type I.

En fixant la concentration à une certaine valeur au-dessus du seuil de formation de pores-peptides et en fixant aussi l'étirement à zéro, on peut tester la dépendance du taux de perte sur le module de compressibilité (ou sur la hauteur hydrophobe des chaînes comme fait plus loin). Si l'on fait un graphique de l'inverse de la somme des carrés du nombre de sites trous par pore en fonction du module de compressibilité pour expansion, on trouve une région de dépendance linéaire sur le module de compressibilité. Ceci confirme les résultats obtenus par Allende et al. (voir les figures 24 et 26 aux pages 76 et 79), un régime linéaire peut clairement être identifié et bien que les points ne forment pas une ligne parfaite, la tendance est claire. Étant donné que les résultats d'Allende sur la question ne sont pas très précis, il est possible que la dépendance réelle ne soit pas linéaire (bien qu'il y ait un régime où elle l'est), il est aussi possible que notre modèle ne supporte pas bien les cas extrêmes, quand le module de compressibilité est très grand ou très petit. Notons que pour le cas où l'on étudie l'effet du changement de module de compressibilité nous avons, selon l'équation (8) de notre modèle, aussi modifié la tension de ligne en modifiant le module de compressibilité pour que le modèle reste consistant.

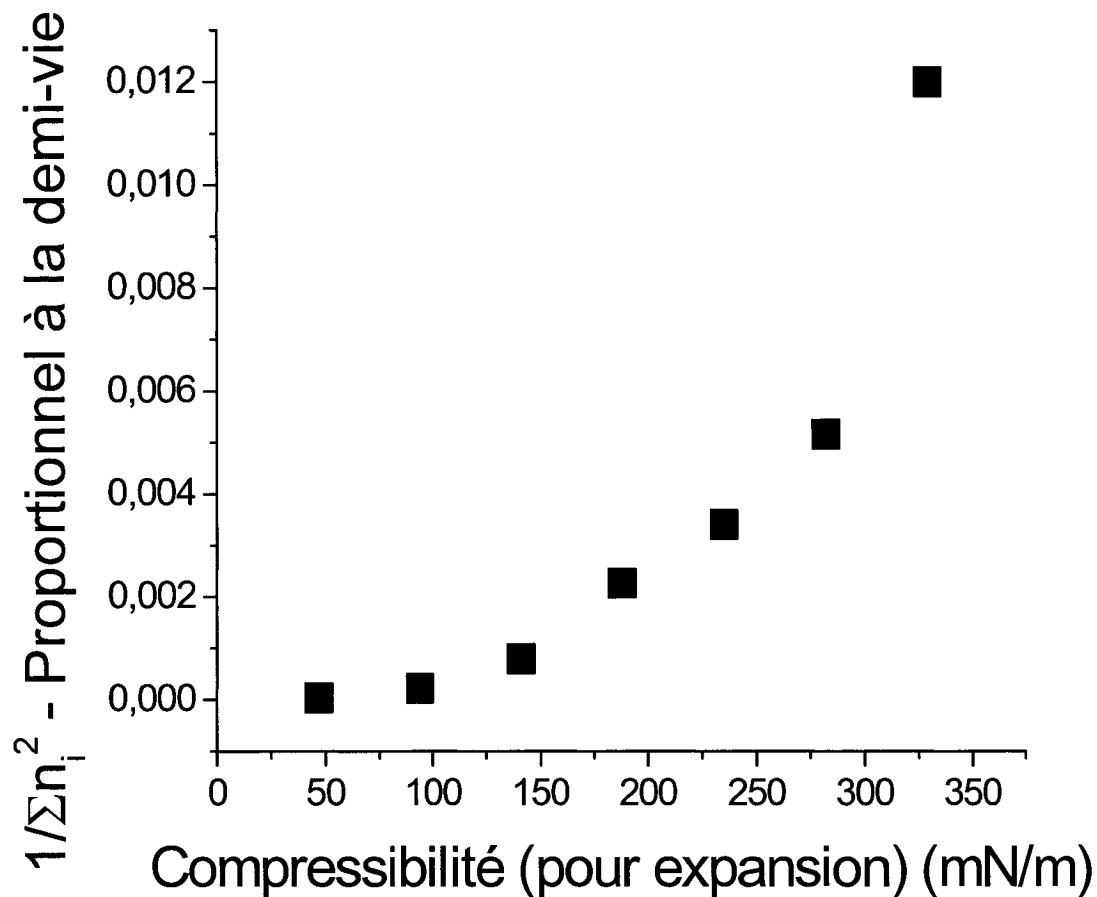


Figure 26: Demi-vie du processus de perte en fonction du module de compressibilité pour expansion de la membrane. Ici nous avons utilisé $\mathcal{P}_i^h = -6kT$ et $C = 0,00275$, soit une valeur de C au-dessus du seuil de formation de pores-peptides. Comparer avec la figure 24 (les carrés vides, échelles de droite) à la page 76.

La dépendance linéaire sur le module de compressibilité du taux de perte de contenu vésiculaire nous montre que plus la membrane est difficile à étirer, moins elle perdra son contenu. Cela peut s'expliquer en ce qu'un peptide doit pousser les lipides les uns contre les autres pour s'insérer, et si le module de compressibilité est grand, l'énergie requise est d'autant plus grande.

L'insertion d'un peptide dans une membrane avec un grand module de compressibilité est donc moins probable par rapport à l'insertion dans une membrane de petit module de compressibilité, et comme il faut un nombre seuil de peptides pour la formation de pores-peptides, le taux de perte du contenu vésiculaire s'en ressent.

Si maintenant on fait un graphique de l'inverse de la somme des carrés du nombre de sites trou par pore en fonction de l'épaisseur de la membrane (ou plutôt de la hauteur hydrophobe de la membrane), on obtient encore une fois une dépendance linéaire bien que ces résultats puissent être faussés car ils ne tiennent pas en compte la différence de hauteur de la membrane et des peptides. On supposait auparavant que l'énergie de ce mauvais agencement hydrophobe était incluse dans le potentiel chimique, toutefois pour cette expérience-ci, nous avons fixé le potentiel chimique à la même valeur pour toutes les hauteurs. On peut cependant faire l'approximation que ce mal-agencement hydrophobe n'aura un effet important que pour les cas extrêmes, c'est-à-dire les lipides très courts ou très longs.

Allende et al. ne sont pas parvenus à établir une relation claire entre le taux de perte de matériel vésiculaire et l'épaisseur hydrophobe de la vésicule, mais cela était probablement dû à l'impossibilité de changer uniquement la longueur des queues hydrophobes d'un lipide en laboratoire.

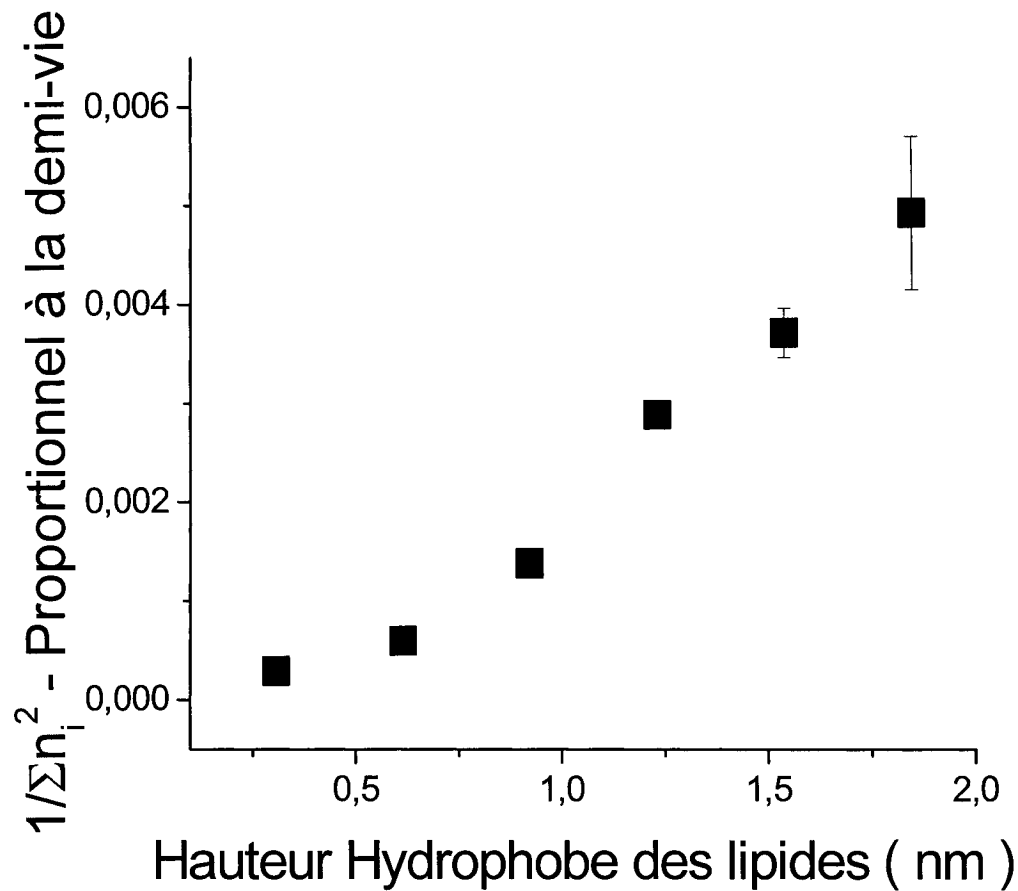


Figure 27: Demi-vie du processus de perte en fonction de la hauteur hydrophobe des lipides. Ici nous avons utilisé $J^h_l = -6kT$, $C = 0,00275$ et $K = 235 \text{ mN/m}$. La dépendance linéaire est évidente.

Pour notre part, nous obtenons une relation linéaire (voir la figure 27), c'est-à-dire que plus les chaînes sont longues, moins le matériel cellulaire est perdu rapidement. Cela est probablement dû au fait que le coût énergétique de l'exposition d'un lipide plus long à l'eau est plus grand simplement car sa surface hydrophobe est plus grande. La création d'un pore (et donc d'un pore-peptide) requiert donc plus d'énergie, et est donc moins probable.

Les barres d'erreur sur les points pour une membrane très épaisse sont très grandes car pour une membrane épaisse, il y a très peu de pore-peptide qui se forment. Il y en a tellement peu que même après une longue période qu'équilibration (10 000 itérations par site) la membrane continue à fluctuer. De plus, lorsqu'il y a très peu de pores (et donc beaucoup de fluctuations), la somme sur les carrés du nombre de sites trou par pore devient une quantité qui varie énormément expliquant ainsi les grandes barres d'erreur sur le flux pour des grandes valeurs de la hauteur hydrophobe.

Un autre lien intéressant entre notre modèle et la méthode d'Allende et al. est la valeur du potentiel chimique qu'ils ont trouvée. En effet, ils ont mesuré l'énergie libre du transfert de la *mélotine*, c'est à dire l'énergie requise pour transférer un peptide en solution dans l'eau vers une bi-couche lipidique. Leur énergie libre de transfert comprend plusieurs contributions, incluant les interactions électrostatiques, les changements de conformations du peptide à l'insertion, les effets hydrophobes, etc. Les valeurs qu'ils ont mesurées sont de l'ordre de 10 kT (entre 7 et 14 kT pour être plus précis). Les valeurs que nous obtenons sont du même ordre de grandeur, selon la concentration de peptides utilisée, nous avons des valeurs pour notre potentiel chimique entre 10 et 30 kT. La consistance de nos valeurs de potentiel chimiques dépend évidemment de la grandeur de l'interaction entre peptides et trous choisie, car si on change l'interaction, la valeur de potentiel chimique où se produit la rupture change aussi.

4- De la Dépendance sur la taille du système

Nous introduisons ici une section additionnelle concernant la dépendance de la tension à la rupture sur la taille du système. Tolpekina et al.[43] ont déterminé, d'après leurs simulations de dynamique moléculaire, que la tension critique d'une membrane, soit la tension à laquelle un pore stable apparaît, devait varier comme l'inverse de la racine cubique du nombre de lipides dans une membrane:

$$\tau^* \propto N^{-\frac{1}{3}} \quad (28)$$

où N est le nombre de lipides dans la membrane. Cependant, lorsque nous testons cette hypothèse avec notre modèle, il est clair que cette relation n'est pas valide et que la relation correcte serait plutôt:

$$\tau^* \propto \frac{1}{N} \quad (29)$$

Ce résultat est confirmé par le graphique que nous avons établie (voir la figure 28 à la page 84) de la tension à la rupture en fonction de la taille du système. Il faut noter cependant que la dépendance obtenue par Tolpekina et al. est juste pour leur système, bien que quand ils ajustent leurs résultats avec leur relation pour estimer la valeur de la tension à la rupture pour une membrane réelle (soit environ $100 \mu\text{m}^2$) ils obtiennent des valeurs qui sont d'un ordre de grandeur inférieures aux valeurs expérimentales obtenues en laboratoire.

L'étirement à la rupture d'une membrane infinie ne devrait pas être nul, de fait la droite que nous obtenons a un ordonnée à l'origine de 0.0279, ce qui veut dire que selon notre modèle, une membrane infinie se briserait à un étirement de 2,79%, ce qui est raisonnable. Notons les deux points pour les grandes valeurs de N qui sont à côté de la courbe, leur valeur n'est peut-être pas correcte car ils n'ont pas été moyennés sur plusieurs essais contrairement aux autres points du graphique. Ils n'ont donc pas été tenus en compte lors de la régression linéaire.

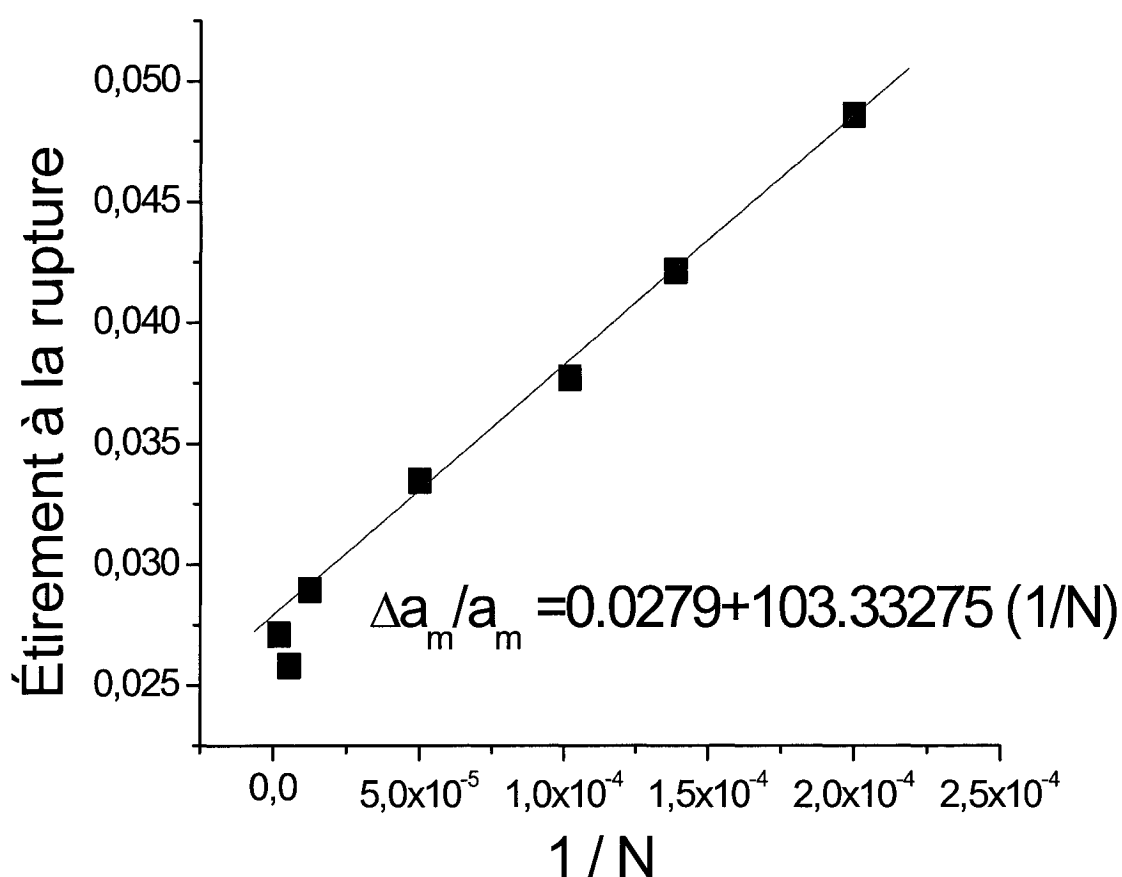


Figure 28: Étirement à la rupture en fonction de l'inverse du nombre de lipides dans la membrane. La relation linéaire est claire. On note que pour un système infini, l'étirement à la rupture estimé est de 2,79%.

Cette différence d'échelles entre notre modèle et celui de Tolpekina et al. vient peut-être de la taille extrêmement réduite de leur système qui est de 1 152 lipides, alors que nous travaillons avec un système de 80 000 lipides. Il se pourrait qu'à cette petite taille de système, la tension critique se comporte d'une manière différente avec le nombre de lipides.

VI - Conclusion:

Nous avons modifié avec succès le modèle cinétique pour la rupture d'une membrane construit par Fournier et Joós[33] pour qu'il supporte le changement de tension critique lorsque la tension est appliquée à différents taux.

Nous avons réussi à reproduire les résultats de Evans et al.[9] en utilisant un modèle cinétique simple qui s'ajuste à seulement deux valeurs expérimentales: le module de compressibilité pour expansion, K , et la hauteur des queues hydrophobes h_t . La rigidité des queues hydrophobes des lipides, γ doit être calibrée à partir de ces deux valeurs et de la valeur de la tension à la rupture pour un taux d'étirement très petit.

En incluant dans le modèle des peptides anti-microbiens tel que la *mélatine*, un agent lytique trouvé dans le venin d'abeille, notre modèle requiert deux paramètres supplémentaires, soit le potentiel chimique μ , et l'interaction peptide-trou hydrophile J^{ph}_1 . Le premier étant lié directement à la barrière d'énergie pour l'insertion du peptide dans la bi-couche lipidique et indirectement lié à la concentration de peptides en solution, et le second qui régit aussi les interactions des côtés hydrophobes et hydrophiles du peptide avec l'eau.

Ce nouvel ajout au modèle s'est fait avec succès, nous sommes parvenus à étudier la perte de matériel cellulaire tel que l'ont fait Benachir et Lafleur[16] ainsi que Allende et al.[32]

Nous avons de plus démontré que la relation entre la tension critique et la taille du système obtenue par Tolpekina et al. n'est pas correcte et que la tension critique est inversement proportionnelle au nombre de lipides dans la membrane.

Une prochaine étape possible pour le modèle serait d'inclure des protéines plus larges tels que les canaux trans-membranaires mécano-sensibles [44]-[45], de grosses protéines sensibles à la tension dans la membrane et qui changent de conformation, deviennent plus grosses, pour relaxer la membrane en un dernier effort pour sauver la cellule. Ce changement de conformation peut cependant être fatale pour la cellule s'il perdure car il implique l'ouverture d'un canal (la protéine est un canal) qui permet la fuite de matériel cellulaire.

Ce modèle pourrait de plus être utilisé pour étudier d'autres inclusions tel que le cholestérol ainsi que d'autres lipides, tels que les sphingolipides, pour ensuite étudier les "radeaux" ("rafts")[46], des structures dans la membrane qui ont soulevé beaucoup de discussion et dont l'existence n'est toujours pas certaine.

VII - Références:

- 1.M.Wortis and E.Evans, Phys. Canada **53**, 281 (1997).
2. D.S. Dimitrov and R.K. Jain, Biochim. Biophys. Acta **779**, 437 (1984).
3. M. Bier, T.R. Gowrishankar, W.Chen, and R.C. Lee, Bioelectromagnetics **25**, 634 (2004).
4. D. Berk and E.Evans, Biophys. J. **59**, 861 (1991).
- 5.D.G. Hunter and B.J. Frisken, Biophys. J. **74**, 2996 (1998).
6. E. Karatekin, O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.-H. Puech, and Françoise Brochart-Wyart, Biophys.J. **84**, 1734 (2003).
7. A. Ertel, A.G. Marangoni, J.Marsh, F.R. Hallett, and J.M. Wood, Biophys. J. **64**, 426 (1993).
- 8.D.Zahn, and J. Brickmann, Chem.Phys.Lett. **252**, 441 (2002).
- 9.E.Evans, V.Heinrich, F.Ludwig and W.Rawicz, Biophys. J. **85**, 2342 (2003).
- 10.E. Evans and F. Ludwig, J. Phys. Condes. Matter **12**, A315 (2000).
- 11.H. Leontiadou, A.E. Mark, and S.J. Marrink, Biophys. J. **86**, 2156 (2004).
- 12.R.Goetz and R. Lipowsky, J.Chem.Phys. **108**, 7397 (1998).
- 13.D.P. Tieleman, H. Leontiadou, A.E. Mark, and S.J. Marrink, J.Am.Chem.Soc. **125**, 6382 (2003).
- 14.H. Leontiadou, A.E. Siewert, and S.J. Marrink, Biophys.J. **86**, 2156 (2004).
15. S. Bernèche, M. Nina, and B. Roux, Biophys. J. **75**, 1603 (1998).
- 16.T.Benachir, M. Lafleur, Biochim. Et Biophys. Acta **1235**, 452 (1995).
- 17.M. Zasloff, Nature **415**, 389 (2002).
18. B.Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, New York, 1989.
19. L.Fournier, A lattice model for the rupture kinetics of lipid bilayer membranes, Thèse de M.Sc., Université d'Ottawa, Ottawa, 2002.

20. S.E. Feller, K. Gawrisch, and A.D. MacKerell, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 318 (2002).
21. H. Binder and K. Gawrisch, *J. Phys. Chem. B* **105**, 12378 (2001).
22. E.J. Prenner, R.N.A.H. Lewis, and R.N. McElhaney, *Phys. Can.* **60**, 121 (2004).
23. Z. Oren and Y. Shai, *Biopolymers* **47**, 451 (1998).
24. T.C. Terwilliger, and D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **257**, 6016 (1982).
25. E. Habermann, *Science* **177**, 314 (1972).
26. J. Gauldie, J.M. Hanson, F.D. Rumjanek, R.A. Shipolini, and C.A. Vernon, *Eur. J. Biochem.* **61**, 369 (1976).
27. T.C. Terwilliger, L. Weissman, and D. Eisenberg, *Biophys. J.* **37**, 353 (1982).
28. L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, D. Ding, and H.W. Huang, *Biophys. J.* **81**, 1475 (2001).
29. W. Rawicz, K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans, *Biophys. J.* **79**, 328 (2000).
30. K.C. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans, *Biophys. J.* **79**, 321 (2000).
31. R. Kwok and E. Evans, *Biophys. J.* **35**, 637 (1981).
32. D. Allende, S.A. Simon and T.J. McIntosh, *Biophysical J.* **88**, 1828 (2005).
33. L. Fournier and B. Joos, *Phys. Rev. E* **67**, 051908 (2003).
34. J.D. Litster, *Phys. Lett.* **53A**, 193 (1975).
35. O. Farago and C.D. Santangelo, *J. Chem. Phys.* **122**, 044901 (2005).
36. A. Zemel, A. Ben-Shaul and S. May, *Eur. Biophys. J.* **34**, 230 (2005).
37. B. Bechinger, *Biochim. et Biophys. Acta* **1462**, 157 (1999).
38. D. Sengupta, L. Meinhold, D. Langosch, G.M. Ullmann, and J.C. Smith, *PROTEINS: Struct., Func, and Bioinfo* **58**, 913 (2005).
39. J.-H. Lin and A. Baumgaertner, *Biophys. J.* **78**, 1714 (2000).
40. H.W. Huang, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 198304 (2004).
41. K. Hristova, D.E. Dempsey, and S.H. White, *Biophys. J.* **80**, 801 (2001).

- 42.D.Frenkel and B.Smit, Understanding Molecular Simulation, Academic Press, Cornwall, 2002.
43. T.V. Tolpekina, W.K. den Otter, and W.J. Briels, J. Chem. Phys. **121**, 8014 (2004).
- 44.P.Wiggins and R.Phillips, Biophys.J. **88**, 880 (2005).
45. C.E. Morris, Anatomical Record **268**, 239 (2002).
- 46.K.Jacobson and C.Dietrich, Cell Bio. **9**, 87 (1999).

Annexes

Annexe A

Exemple de code utilisé pour faire les simulations. Ce code calcule les valeurs d'énergie et de relaxation de même que le nombre de trous et le nombres de peptides dans une membrane à chaque intervalle d'étirement de 0.01% et ce, pour 7 taux d'application de la tension différents et pour 5 valeurs de concentrations de peptides différentes.

```
program pep2
implicit none
C Code permettant une phase d'initialisation de la membrane
C pendant laquelle les peptides s'insèrent

C Déclaration des variables
integer i,j,p,idum,max,hex(0:200,0:200),ntrou
integer orientation(0:200,0:200),npep,ori(6,6,0:2)
integer npp,nah,nph1,nph2,nph3,nph4,z
integer l,lupi,ite,npepi,pmax
real*8 am,kt,Ei,iteite
real*8 sigma,gamma,K,a0,ht,Mu,jpp
real*8 jph1,jph2,jph3,jph4
real*8 deltaam
common kt
common/GEN/ Mu
common/max/max
common/en/a0,ht,am,gamma,k,sigma
common/delt/deltaam
common/Jpp/Jpp
common/orient/ori
common/energ/Jph1,Jph2,Jph3,Jph4
common/N/npepi
C Ouverture des fichiers
open (11,file='pep data1.dat')
open (12,file='pep data2.dat')
open (13,file='pep data3.dat')
```

```

open (14,file='pep data4.dat')
open (15,file='pep data5.dat')
open (21,file='pep data11.dat')
open (22,file='pep data12.dat')
open (23,file='pep data13.dat')
open (24,file='pep data14.dat')
open (25,file='pep data15.dat')
open (31,file='pep data21.dat')
open (32,file='pep data22.dat')
open (33,file='pep data23.dat')
open (34,file='pep data24.dat')
open (35,file='pep data25.dat')
open (41,file='pep data31.dat')
open (42,file='pep data32.dat')
open (43,file='pep data33.dat')
open (44,file='pep data34.dat')
open (45,file='pep data35.dat')
open (51,file='pep data41.dat')
open (52,file='pep data42.dat')
open (53,file='pep data43.dat')
open (54,file='pep data44.dat')
open (55,file='pep data45.dat')
open (61,file='pep data51.dat')
open (62,file='pep data52.dat')
open (63,file='pep data53.dat')
open (64,file='pep data54.dat')
open (65,file='pep data55.dat')
open (71,file='pep data61.dat')
open (72,file='pep data62.dat')
open (73,file='pep data63.dat')
open (74,file='pep data64.dat')
open (75,file='pep data65.dat')

```

C Initialisation des valeurs constantes

```
kt=4.14d0
```

C idum sert de "seed" au générateur de nombres aléatoires

```
idum=-48961
```

```
max=200
```

```
a0=0.6d0
```

```
am=max**2*a0
```

```
ht=3.07d0/2
```

C max doit être pair pour respecter les conditions aux frontières

C périodiques

```
K=235.0d0  
gamma=9.1d0
```

```
C k=4*sigma*gamma  
sigma=K/4.0d0/gamma
```

```
C Définition des interactions des peptides
```

```
Jph1=-6.0d0*kt  
Jph2=Jph1/2  
Jph4=-jph1  
Jph3=Jph4/2  
Jpp=0.0d0*kt
```

```
call setorientation(ori)
```

```
C La boucle de l couvre 6 valeurs différentes pour
```

```
C le nombre d'itérations entre les augmentations
```

```
C d'étirement
```

```
do 737 l=0,6  
iteite=20.0d0*(10.0d0)**(2-l)  
if (l.le.2) then  
pmax=1000  
else  
pmax=3000  
endif
```

```
C La boucle de z couvre 5 concentrations
```

```
C différentes de peptides
```

```
do 357 z=1,5  
Mu=-dlog(3.33d-4*z)*kt
```

```
C lupi est une variable pour indiquer dans quel
```

```
C fichier écrire les valeurs
```

```
lupi=(z+((l+1)*10))  
write(*,*) iteite,mu,lupi  
ntrou=0  
npep=0  
Nah=0  
Npp=0  
Nph1=0  
Nph2=0  
Nph3=0  
Nph4=0  
npepi=0
```

```

C   initialise le reseau hexagonal
C   en position complète occupée (des 1)
do 1 i=0,(max-1)
  do 2 j=0,(max-1)
    hex(i,j)=1
    orientation(i,j)=0
2   continue
1   continue
deltaam=0.0d0
C   fin de l'initialisation

call insert(hex,orientation,npep,npp,idum)
C Sous-routine d'insertion initiale des peptides

write(lupi,*) 'Mu=',mu/kt,'kt',' ite', iteite
call energie(Ei,nah,npp,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,npep)

write(lupi,*) 'deltaam/am',
*' ntrou+npep/N',' deltaam/am-(ntrou+npep)/N',
*' Ei',' relax'

C pmax est la valeur jusqu'à laquelle on tire sur la membrane
C donc pmax * 0.01d-2 est l'étirement maximal qu'on atteint
do 111 p=0,pmax
  idum=idum-1
  write(*,*) z,p
  deltaam=0.01d-2*am*p
  call energie(Ei,nah,npp,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,npep)

C lorsque p est 0, donc lorsque la tension est nulle,
C on laisse la membrane s'équilibrer pendant 10 000 ité par site
if (p.eq.0) then
  ite=10000*max**2
else
  ite=iteite*max**2
endif

C On fait ite iterations avant de changer l'étirement
do 999 i=1,ite
  call metrop(hex,orientation,nah,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,
*npep,npp,Ei,idum)
999 continue

```

C écrit certaines valeurs dans un fichier

```
write(lupi,*) deltaam/am,  
*(ntrou+npep)*1.0d0/max**2,  
*deltaam/am-((ntrou+npep-npepi)*1.0d0/max**2),Ei,  
*((ntrou+npep-npepi)*1.0d0/max**2)/(deltaam/am)
```

C vide la mémoire tampon (buffer)

```
call flush  
111 continue  
357 continue  
737 continue  
stop  
end
```

C pour choisir sur quel site le trial sera effectué

```
subroutine choisir(x,y,idum)  
implicit none  
integer ranint,x,y,idum,max  
real*8 ran2  
common/max/max  
ranint=max**2*ran2(idum)  
y=ranint/max  
x=mod(ranint,max)  
return  
end
```

C Insère un certain nombre de peptides avant le début de la simulation

C et enlève un nombre de lipides égal

```
subroutine insert(hex,orientation,npep,npp,idum)  
implicit none  
integer hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200),npep,npp  
integer idum,max,npepi  
integer i,j,k,x0,y0,x,y  
real*8 kt,mu,C,ran2  
common kt  
common/GEN/Mu  
common/max/max  
common/N/npepi  
C=dexp(-Mu/kt)  
npepi=C*(max**2)
```

C npepi est le nombre initial de peptides dans la membrane

```
write(*,*) Mu,C,npepi
```

```

    if (npepi.eq.0) goto 999
    do 1 k=1,npepi
2   continue
    call choisir(x0,y0,idum)
    if(hex(x0,y0).eq.-1) goto 2
    hex(x0,y0)=-1
    orientation(x0,y0)=6*ran2(idum)+1
    npep=npep+1
    do 5 i=-1,1
        do 6 j=-1,1
            if (i.eq.j) goto 6
            x=x0+i
            y=y0+j
            if(x.ge.max) x=x-max
            if(x.lt.0) x=x+max
            if(y.ge.max) y=y-max
            if(y.lt.0) y=y+max
            if (hex(x,y).eq.-1) npp=npp+1
6       continue
5       continue
1       continue
999  continue
    return
    end

```

C metrop fait un pas de Monte Carlo sur le réseau

C génère une configuration d'essai et accepte ou refuse

C le changement

```

    subroutine metrop(hex,orientation,nah,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,
    *npep,npp,Ei,idum)
    implicit none
    integer idum,x0,y0,hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200)
    integer nph1,nph2,nph3,nph4,nah,ancien
    integer naht,nph1t,nph2t,nph3t,nph4t
    integer npp,nppt,ntrou,ntrout,oriold
    integer npep,npept
    real*8 boltz,deledge,delsurf,Ef,kT,Mu
    real*8 w,w0,Ei,ran2
    common kT
    common/GEN/ Mu

```

```

    call choisir(x0,y0,idum)
C créé de nouvelles variables aux valeurs temporaires (-t pour -trial)
    ancien=hex(x0,y0)
    oriold=orientation(x0,y0)
    naht=nah
    nph1t=nph1
    nph2t=nph2
    nph3t=nph3
    nph4t=nph4
    nppt=npp
    ntrout=ntrou
    npept=npep

C enlève ce qui se trouve au point x0,y0
    if(ancien.eq.1) call remlipid(hex,naht,x0,y0)
    if (ancien.eq.0) call remtrou(hex,orientation,naht,nph1t,nph2t
* ,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0)
    if(ancien.eq.-1) call rempep(hex,orientation,nph1t,nph2t,nph3t
* ,nph4t,nppt,npept,x0,y0)

C ajoute qqch au point x0,y0
    if (ran2(idum).gt.0.5d0) then
        if(ancien.eq.0) call addlipid(hex,naht,x0,y0)
        if(ancien.eq.-1) call addlipid(hex,naht,x0,y0)
        if (ancien.eq.1) call addtrou(hex,orientation,naht,nph1t,
*   nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0)

    else
        if(ancien.eq.0) call addpep(hex,orientation,nph1t,nph2t
*   ,nph3t,nph4t,nppt,npept,W,W0,x0,y0,idum)
        if(ancien.eq.-1) call addtrou(hex,orientation,naht,nph1t,
*   nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0)
        if(ancien.eq.1) call addpep(hex,orientation,nph1t,nph2t
*   ,nph3t,nph4t,nppt,npept,W,W0,x0,y0,idum)
    endif
    call energie(Ef,naht,nppt,nph1t,nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,npept)

C Définis le facteur de Boltzmann
    if(hex(x0,y0).eq.-1) then
        call siaddpep(delsurf,deledge,ntrou,ntrout,npep,npept
* ,nah,naht,npp,nppt)

```

```

        boltz=W/W0*dexp(-(delsurf+deledge+Mu)/kt)
    else
        if (ancien.eq.-1) then
            boltz=dexp((-Ef+Ei+Mu)/kt)
        else
            boltz=dexp((-Ef+Ei)/kt)
        endif
    endif
endif

```

C Accepte ou rejette le changement

```

    if(Boltz.lt.1) then
        if(ran2(idum).ge.boltz) then
            hex(x0,y0)=ancien
            orientation(x0,y0)=oriold
        else
            Ei=Ef
            ntrou=ntrout
            npep=npept
            nah=naht
            npp=nppt
            nph1=nph1t
            nph2=nph2t
            nph3=nph3t
            nph4=nph4t
        endif
    else
        Ei=Ef
        ntrou=ntrout
        npep=npept
        nah=naht
        npp=nppt
        nph1=nph1t
        nph2=nph2t
        nph3=nph3t
        nph4=nph4t
    endif
    return
end

```

C enlève un site lipide du réseau du point x0,y0

C en considérant les interactions

```
subroutine remlipid(hex,naht,x0,y0)
implicit none
integer hex(0:200,0:200),naht,x0,y0
integer i,j,max,x,y
common/max/max
do 3 i=-1,1
  do 4 j=-1,1
    if(i.eq.j) goto 4
    x=x0+i
    y=y0+j
    if(x.ge.max) x=x-max
    if(x.lt.0) x=x+max
    if(y.ge.max) y=y-max
    if(y.lt.0) y=y+max
    if (hex(x,y).eq.0) naht=naht-1
4  continue
3  continue
return
end
```

C enlève un site trou du réseau (et les interactions) au point x0,y0

```
subroutine remtrou(hex,orientation,naht,nph1t,nph2t
*,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0)
implicit none
integer hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200)
integer naht,nph1t,nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0
integer i,j,l,or,max,ori(6,6,0:2),x,y
common/max/max
common/orient/ori
ntrout=ntrout-1
do 5 i=-1,1
  do 6 j=-1,1
    if (i.eq.j) goto 6
    x=x0+i
    y=y0+j
    if(x.ge.max) x=x-max
    if(x.lt.0) x=x+max
    if(y.ge.max) y=y-max
    if(y.lt.0) y=y+max

    if (hex(x,y).eq.1) naht=naht-1
```

```

        if (hex(x,y).eq.-1) then
            or=orientation(x,y)
            do 16 l=1,6
                if((ori(or,l,0).eq.-i).and.(ori(or,l,1).eq.-j))then
                    if(l.eq.1) nph1t=nph1t-1
                    if((l.eq.2).or.(l.eq.3)) nph2t=nph2t-1
                    if((l.eq.4).or.(l.eq.5)) nph3t=nph3t-1
                    if(l.eq.6) nph4t=nph4t-1
                endif
            16        continue
        endif
6        continue
5        continue
    return
end

```

C enlève un peptide du point x0,y0 et ses interactions

```

    subroutine rempep(hex,orientation,nph1t,nph2t,nph3t
*,nph4t,nppt,npept,x0,y0)
    implicit none
    integer hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200)
    integer nph1t,nph2t,nph3t,nph4t,nppt,npept,x0,y0
    integer max,i,j,l,or,ori(6,6,0:2),x,y
    common/max/max
    common/orient/ori
    npept=npept-1
    do 7 i=-1,1
        do 8 j=-1,1
            if(i.eq.j) goto 8
            x=x0+i
            y=y0+j
            if(x.ge.max) x=x-max
            if(x.lt.0) x=x+max
            if(y.ge.max) y=y-max
            if(y.lt.0) y=y+max
            if(hex(x,y).eq.-1) nppt=nppt-1
            if(hex(x,y).eq.0) then
                or=orientation(x0,y0)
                do 17 l=1,6
                    if((ori(or,l,0).eq.i).and.(ori(or,l,1).eq.j))then
                        if(l.eq.1) nph1t=nph1t-1
                        if((l.eq.2).or.(l.eq.3)) nph2t=nph2t-1
                        if((l.eq.4).or.(l.eq.5)) nph3t=nph3t-1

```

```

                                if(l.eq.6) nph4t=nph4t-1
                                endif
17      continue
                                endif
8      continue
7      continue
      return
      end

```

C Sert à calculer le changement d'énergie qui n'est pas du à l'orientation
C du peptide, car la portion dépendant de l'orientation est prise en charge
C dans la pondération (W)

```

      subroutine siaddpep(delsurf,deledge,ntrou,ntrout,npep,npept
      *,nah,naht,npp,nppt)
      implicit none
      integer ntrou,ntrout,npep,npept,nah,naht,npp,nppt
      integer max
      real*8 delsurf,deledge,edgei,edgef,surfi,surff
      real*8 a0,ht,am,deltaam,a,Jah,he,hne,gamma,k,jpp,sigma
      common/en/a0,ht,am,gamma,k,sigma
      common/delt/deltaam
      common/jpp/jpp
      common/max/max
      a=a0*(deltaam/am-(ntrou+npep)*1.0d0/max**2)+a0
      if (((deltaam/am-((ntrou+npep)*1.0d0/max**2)).le.0) then
         he=0
      else
         he=gamma*dsqrt(a/dacos(-1.0d0)*(deltaam/am-((ntrou+npep)
         * *1.0d0/max**2)))
      endif
      hne=ht-he
      Jah=2.0d0/3.0d0*hne*sigma*dsqrt(dacos(-1.0d0)*a0)
      surfi=k*am*(deltaam/am-(ntrou+npep)*1.0d0/max**2)**2/2.0d0
      edgei=Jah*Nah+Jpp*Npp

      surff=k*am*(deltaam/am-(ntrout+npept)*1.0d0/max**2)**2/2
      a=a0*(deltaam/am-(ntrout+npept)*1.0d0/max**2)+a0
      if (((deltaam/am-((ntrout+npept)*1.0d0/max**2)).le.0) then
         he=0
      else
         he=gamma*dsqrt(a/dacos(-1.0d0)*(deltaam/am-((ntrout+npept)
         * *1.0d0/max**2)))
      endif
      endif

```

```

hne=ht-he
Jah=2.0d0/3.0d0*hne*sigma*dsqrt(dacos(-1.0d0)*a0)
edgef=Jah*Naht+Jpp*Nppt
delsurf=surff-surfi
deledge=edgef-edgei
return
end

```

C ajoute un lipide au point x0,y0

```

subroutine addlipid(hex,naht,x0,y0)
implicit none
integer hex(0:200,0:200)
integer naht,x0,y0,max,x,y
integer i,j
common/max/max
hex(x0,y0)=1
do 8 i=-1,1
  do 9 j=-1,1
    if (i.eq.j) goto 9
    x=x0+i
    y=y0+j
    if(x.ge.max) x=x-max
    if(x.lt.0) x=x+max
    if(y.ge.max) y=y-max
    if(y.lt.0) y=y+max
    if(hex(x,y).eq.0) naht=naht+1
9    continue
8    continue
return
end

```

C ajoute un trou au point x0,y0

```

subroutine addtrou(hex,orientation,naht,nph1t,
*   nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0)
implicit none
integer hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200)
integer naht,nph1t,nph2t,nph3t,nph4t,ntrout,x0,y0
integer i,j,max,x,y,l,or,ori(6,6,0:2)
common/max/max
common/orient/ori
ntrout=ntrout+1
hex(x0,y0)=0
orientation(x0,y0)=0

```

```

do 10 i=-1,1
  do 11 j=-1,1
    if (i.eq.j) goto 11
    x=x0+i
    y=y0+j
    if(x.ge.max) x=x-max
    if(x.lt.0) x=x+max
    if(y.ge.max) y=y-max
    if(y.lt.0) y=y+max
    if(hex(x,y).eq.1) naht=naht+1

    if (hex(x,y).eq.-1) then
      or=orientation(x,y)
      do 18 l=1,6
        if ((ori(or,l,0).eq.-i).and.(ori(or,l,1).eq.-j))then
          if(l.eq.1) nph1t=nph1t+1
          if((l.eq.2).or.(l.eq.3)) nph2t=nph2t+1
          if((l.eq.4).or.(l.eq.5)) nph3t=nph3t+1
          if(l.eq.6) nph4t=nph4t+1
        endif
      18      continue
    endif
  11  continue
10  continue
  return
end

```

C ajoute un peptide au point x0,y0

C et choisit son orientation

```

subroutine addpep(hex,orientation,nph1t,nph2t
* ,nph3t,nph4t,nppt,npept,W,W0,x0,y0,idum)
implicit none
integer hex(0:200,0:200),orientation(0:200,0:200)
integer nph1t,nph2t,nph3t,nph4t,nppt,npept,x0,y0
integer nph(6,4),npp
integer i,idum,ori(6,6,0:2),l,x,y,max
integer choix
real*8 W,ran2,E(6),E2,E3,E4,E5,kt,prob
real*8 Jph1,Jph2,Jph3,Jph4,Jpp
real*8 W0
common kt
common/orient/ori
common/energ/Jph1,Jph2,Jph3,Jph4

```

```

common/jpp/jpp
common/max/max
hex(x0,y0)=-1
npept=npept+1
npp=0
W=0
W0=0
do 777 i=1,6
do 344 l=1,4
    nph(i,l)=0
344 continue

do 343 l=1,6
x=x0+ori(i,l,0)
y=y0+ori(i,l,1)
if(x.ge.max) x=x-max
if(x.lt.0) x=x+max
if(y.ge.max) y=y-max
if(y.lt.0) y=y+max

if (hex(x,y).eq.0) then
    if (l.eq.1) nph(i,1)=nph(i,1)+1
    if((l.eq.2).or.(l.eq.3)) nph(i,2)=nph(i,2)+1
    if((l.eq.4).or.(l.eq.5)) nph(i,3)=nph(i,3)+1
    if (l.eq.6) nph(i,4)=nph(i,4)+1
endif
if((l.eq.1).and.(hex(x,y).eq.-1)) npp=npp+1
343 continue

777 continue
nppt=nppt+npp

do 345 i=1,6
E(i)=Jph1*nph(i,1)+Jph2*nph(i,2)+jph3*nph(i,3)+
    *Jph4*nph(i,4)+Jpp*npp
W=W+dexp(-E(i)/kt)
345 continue

E2=dexp(-E(1)/kt)+dexp(-E(2)/kt)
E3=E2+dexp(-E(3)/kt)
E4=E3+dexp(-E(4)/kt)
E5=E4+dexp(-E(5)/kt)

```

```

prob=ran2(idum)
if (prob.lt.(dexp(-E(1)/kt)/W)) then
  choix=1
  orientation(x0,y0)=1
  nph1t=nph1t+nph(1,1)
  nph2t=nph2t+nph(1,2)
  nph3t=nph3t+nph(1,3)
  nph4t=nph4t+nph(1,4)
else
  if (prob.lt.(E2/W)) then
    choix=2
    orientation(x0,y0)=2
    nph1t=nph1t+nph(2,1)
    nph2t=nph2t+nph(2,2)
    nph3t=nph3t+nph(2,3)
    nph4t=nph4t+nph(2,4)
  else
    if (prob.lt.(E3/W)) then
      choix=3
      orientation(x0,y0)=3
      nph1t=nph1t+nph(3,1)
      nph2t=nph2t+nph(3,2)
      nph3t=nph3t+nph(3,3)
      nph4t=nph4t+nph(3,4)
    else
      if (prob.lt.(E4/W)) then
        choix=4
        orientation(x0,y0)=4
        nph1t=nph1t+nph(4,1)
        nph2t=nph2t+nph(4,2)
        nph3t=nph3t+nph(4,3)
        nph4t=nph4t+nph(4,4)
      else
        if (prob.lt.(E5/W)) then
          choix=5
          orientation(x0,y0)=5
          nph1t=nph1t+nph(5,1)
          nph2t=nph2t+nph(5,2)
          nph3t=nph3t+nph(5,3)
          nph4t=nph4t+nph(5,4)
        else
          choix=6
          orientation(x0,y0)=6

```

```

nph1t=nph1t+nph(6,1)
nph2t=nph2t+nph(6,2)
nph3t=nph3t+nph(6,3)
nph4t=nph4t+nph(6,4)
endif
endif
endif
endif
endif
W0=W-dexp(-E(choix)/kt)+dexp((Jph1+Jph2+Jph3+Jph4)/kt)
return
end

```

C Calcule l'énergie du réseau dans un certain état pour un certain

C étirement

```

subroutine energie(E,nah,npp,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,npep)
implicit none
integer nah,npp,nph1,nph2,nph3,nph4,ntrou,npep,max,npepi
real*8 E,jpp,jph1,jph2,jph3,jph4
real*8 a0,ht,am,deltaam,gamma,k,sigma,a
real*8 he,hne,Jah
common/en/a0,ht,am,gamma,k,sigma
common/delt/deltaam
common/Jpp/Jpp
common/energ/Jph1,Jph2,Jph3,Jph4
common/max/max
common/N/npepi
a=a0*(deltaam/am-(ntrou+npep-npepi)*1.0d0/max**2)+a0
if (((deltaam/am-((ntrou+npep-npepi)*1.0d0/max**2)).le.0) then
  he=0
else
  he=gamma*dsqrt(a/dacos(-1.0d0)*(deltaam/am-((ntrou+npep-npepi)
* *1.0d0/max**2)))
endif
hne=ht-he
if (hne.lt.0.0d0) hne=0.0d0
if (hne.gt.ht) hne=ht
Jah=2.0d0/3.0d0*hne*sigma*dsqrt(dacos(-1.0d0)*a0)

E=Jah*Nah*dsqrt((1.0d0*max**2-npepi)/(max**2-(ntrou+npep-npepi)))
*+jph1*nph1+Jph2*nph2+Jph3*nph3+Jph4*nph4
*+Npp*Jpp
*+k*am*((a/a0)-1)**2/2.0d0

```

```

return
end

```

- C sous-routine pour écrire la matrice dans un fichier
- C Écrit en fait les coordonnées des sites occupés, converties
- C en coord cartésiennes orthogonales

```

subroutine ecrire(hex,lupi)
implicit none
integer hex(0:200,0:200),i,j,max,lupi,lupi2
common/max/max
open (20,file='lip.dat')
open (21,file='pep.dat')
open (22,file='lip2.dat')
open (23,file='pep2.dat')
lupi2=lupi+1
do 21 i=0,max-1
do 22 j=0,max-1
    if (hex(i,j).eq.1) write(lupi,*) i,j*1.0d0+(1.0d0*i)/2.0d0
    if (hex(i,j).eq.-1) write(lupi2,*) i,j*1.0d0+(1.0d0*i)/2.0d0
22 continue
21 continue
return
end

```

- C Fonction g,n,rant des nombres al,atoires

```

FUNCTION ran2(idum)
INTEGER idum,IM1,IM2,IMM1,IA1,IA2,IQ1,IQ2,IR1,IR2,NTAB,NDIV
REAL*8 ran2,AM,EPS,RNMX
PARAMETER (IM1=2147483563,IM2=2147483399,AM=1.0d0/IM1,IMM1=IM1-1,
*IA1=40014,IA2=40692,IQ1=53668,IQ2=52774,IR1=12211,IR2=3791,
*NTAB=32,NDIV=1+IMM1/NTAB,EPS=1.2d-7,RNMX=1.0d0-EPS)
INTEGER idum2,j,k,iv(NTAB),iy
SAVE iv,iy,idum2
DATA idum2/123456789/, iv/NTAB*0/, iy/0/
if (idum.le.0) then
    idum=max(-idum,1)
    idum2=idum
do 11 j=NTAB+8,1,-1
    k=idum/IQ1
    idum=IA1*(idum-k*IQ1)-k*IR1
    if (idum.lt.0) idum=idum+IM1
    if (j.le.NTAB) iv(j)=idum
11 continue

```

```

    iy=iv(1)
endif
k=idum/IQ1
idum=IA1*(idum-k*IQ1)-k*IR1
if (idum.lt.0) idum=idum+IM1
k=idum2/IQ2
idum2=IA2*(idum2-k*IQ2)-k*IR2
if (idum2.lt.0) idum2=idum2+IM2
j=1+iy/NDIV
iy=iv(j)-idum2
iv(j)=idum
if(iy.lt.1)iy=iy+IMM1
ran2=min(AM*iy,RNMX)
return
END

```

C donne les bonnes valeurs pour les valeurs

C de chaque plus proche voisin en fonction des vecteur directeurs

C sur un plan hexagonal

```

subroutine setorientation(ori)
implicit none
integer ori(6,6,0:2)
    ori(1,1,0)=0
    ori(1,1,1)=1
ori(1,2,0)=1
    ori(1,2,1)=0
    ori(1,3,0)=-1
    ori(1,3,1)=1
    ori(1,4,0)=-1
    ori(1,4,1)=0
    ori(1,5,0)=1
    ori(1,5,1)=-1
    ori(1,6,0)=0
    ori(1,6,1)=-1
    ori(2,1,0)=1
    ori(2,1,1)=0
    ori(2,2,0)=1
    ori(2,2,1)=-1
    ori(2,3,0)=0
    ori(2,3,1)=1
    ori(2,4,0)=-1
    ori(2,4,1)=1
    ori(2,5,0)=0

```

ori(2,5,1)=-1
 ori(2,6,0)=-1
 ori(2,6,1)=0
 ori(3,1,0)=1
 ori(3,1,1)=-1
 ori(3,2,0)=0
 ori(3,2,1)=-1
 ori(3,3,0)=1
 ori(3,3,1)=0
 ori(3,4,0)=0
 ori(3,4,1)=1
 ori(3,5,0)=-1
 ori(3,5,1)=0
 ori(3,6,0)=-1
 ori(3,6,1)=1
 ori(4,1,0)=0
 ori(4,1,1)=-1
 ori(4,2,0)=-1
 ori(4,2,1)=0
 ori(4,3,0)=1
 ori(4,3,1)=-1
 ori(4,4,0)=1
 ori(4,4,1)=0
 ori(4,5,0)=-1
 ori(4,5,1)=1
 ori(4,6,0)=0
 ori(4,6,1)=1
 ori(5,1,0)=-1
 ori(5,1,1)=0
 ori(5,2,0)=-1
 ori(5,2,1)=1
 ori(5,3,0)=0
 ori(5,3,1)=-1
 ori(5,4,0)=1
 ori(5,4,1)=-1
 ori(5,5,0)=0
 ori(5,5,1)=1
 ori(5,6,0)=1
 ori(5,6,1)=0
 ori(6,1,0)=-1
 ori(6,1,1)=1
 ori(6,2,0)=0
 ori(6,2,1)=1

```
    ori(6,3,0)=-1
    ori(6,3,1)=0
    ori(6,4,0)=0
    ori(6,4,1)=-1
    ori(6,5,0)=1
    ori(6,5,1)=0
    ori(6,6,0)=1
    ori(6,6,1)=-1
return
end
```