

## ÉTUDE NUMÉRIQUE DE SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE DU 2-(2-FURYL)-3-HYDROXYCHROMONE EN MILIEU BIOLOGIQUE : CAS DE BICOUCHE PHOSPHOLIPIDIQUE

**Brahim Elhadj Ali ABDALLAH<sup>1\*</sup>, Mahamat Hassan BABIKIR<sup>1</sup>  
et Mahamoud Youssouf KHAYAL<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centre National de Recherche pour le Développement (CNRD), BP 1228,  
N'Djaména, Tchad

<sup>2</sup>Université de N'Djaména, Faculté de Sciences Exactes et Appliquées,  
BP 1117, N'Djaména, Tchad

(reçu le 14 Novembre 2022; accepté le 25 Décembre 2022)

\* Correspondance, e-mail : [abdallahbrahim88@gmail.com](mailto:abdallahbrahim88@gmail.com)

### RÉSUMÉ

Étudier la réaction ESIPT dans les modèles de membranes biologiques (DOPC et POPE) pour expliquer le mécanisme qui gouverne cette dernière et prédire les spectres de fluorescence par la dynamique par la simulation de la dynamique moléculaire classique couplée au modèle empirique de la liaison de valence (EVB) qui permet de décrire le processus de rupture / formation des liaisons. On constate que les deux phospholipides étudiés adoptent un comportement similaire aux études de FHC effectuées dans les alcools. Les réponses du FHC dans le DOPC sont semblables à ceux effectués dans le méthanol tandis que le FHC dans le POPE ressemble aux études dans l'éthanol. Le proton met 126 ps et 65 ps avant de traverser dans DOPC et POPE respectivement. La réaction ESIPT est lente dans DOPC et rapide dans POPE. Cette différence de temps de réaction est confirmée par les rapports de bandes observés. Ce rapport est élevé dans le premier cas.

**Mots-clés :** *FHC, dynamique moléculaire, EVB, ESIPT, spectroscopie de fluorescence, liaison-hydrogène, Membrane phospholipidique.*

## ABSTRACT

### **Numerical study of fluorescence spectroscopy of 2-(2-furyl)-3-hydroxychromone in biological medium : case of phospholipid bilayer**

Study the ESIPT reaction in models of biological membranes (DOPC and POPE) to explain the mechanism that governs the latter and predict the fluorescence spectra by dynamics through the simulation of classical molecular dynamics Coupled with the empirical model of the valence bond (EVB) which makes it possible to describe the process of rupture / formation of bonds. It is found that the two phospholipids considered adopt a behavior similar to the studies of FHC carried out in alcohols. The responses of the FHC in DOPC are similar to those made in methanol while the FHC in POPE resembles the studies in ethanol. The proton takes 126 ps and 65 ps before crossing into DOPC and POPE respectively. The ESIPT reaction is slow in DOPC and fast in POPE. This difference in reaction time is confirmed by the observed band ratios. This ratio is high in the first case.

**Keywords :** *FHC, molecular dynamics, EVB, ESIPT, Dual fluorescence, H-bond, bilayer phospholipide.*

## I - INTRODUCTION

Pour explorer la possibilité de simuler la réaction ESIPT dans les milieux biologiques, nous avons entrepris des calculs au sein de deux types de membrane que sont Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et Palmeoylphosphatidylethanolamine (POPE). La PC et la PE sont les lipides majoritaires des membranes du vivant. Dans les cellules de mammifères, la PC seule peut être retrouvée à hauteur de 50 % des phospholipides totaux [1]. Elle est en revanche absente des membranes bactériennes, ces dernières ne pouvant synthétiser la tête polaire associée [2]. Sa charge nette est neutre, ce qui en fait un lipide zwiterionique. La PE est aussi un lipide zwiterionique et est le 2<sup>ème</sup> lipide le plus présent dans les membranes de mammifères. Dans ce type de cellules, elle peut être obtenue par décarboxylation de la PS. Ce phospholipide est par ailleurs très présent dans les membranes cellulaires de la substance blanche du cerveau. Dans les membranes des cellules fongiques, elle représente même, dans de nombreux cas, le lipide majoritaire. De plus, la PE forme, avec le PhosphatidylGlycérol, la base des membranes bactériennes.

## II - MÉTHODOLOGIE

Toutes les coordonnées internes des membranes, sont obtenues grâce à CHARMM (Chimistry at Harvard Macro Molecular). Dans ce travail, comme les études en solutions, nous avons procédé de la même manière, en insérant le FHC dans les membranes saturées et non-saturées (DOPC et POPE) de 128 phospholipides chacune de dimension 81\*80\*70 Angström au cube avec 4736 et 4096 molécules d'eau respectivement 11 (K + /Cl -) pour le DOPC et 10 (K + /Cl -) pour le POPE. Le choix du nombre de molécules d'eau est dicté par les études expérimentales [3].

**Tableau 1 :** *Données pour les simulations dans les membranes*

Membranes	Nombre de lipides	Molécule d'eau/lipide	Nombre de K + /Cl -
DOPC	128	37	11/11
POPE	128	32	10/10

Afin de simuler une bicouche lipidique, il est nécessaire d'obtenir la structure de départ en format PDB exécutable par le programme LEaP d'Amber. Il existe plusieurs options pour construire la structure lipidique : par le programme de visualisation de dynamiques moléculaires, VMD peut jusqu'à maintenant construire les bicouches POPC et POPE. Un autre programme accessible sur le programme CHARMM-GUI permet de construire des membranes beaucoup plus complexes en utilisant une interface graphique. Pour les dynamiques moléculaires des systèmes à bicouche lipidique, nous avons utilisé le protocole ci-dessous :

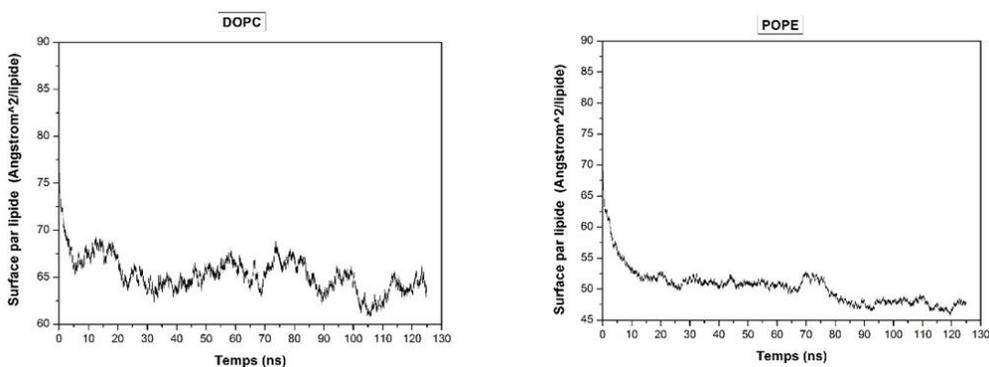
- Minimisation ;
- Chauffage, pour maintenir les lipides fixes ;
- Chauffage 2, pour maintenir les lipides fixes ;
- Équilibrage de la dimension périodique de la boîte ;
- Production de la dynamique moléculaire à pression constante.

## III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

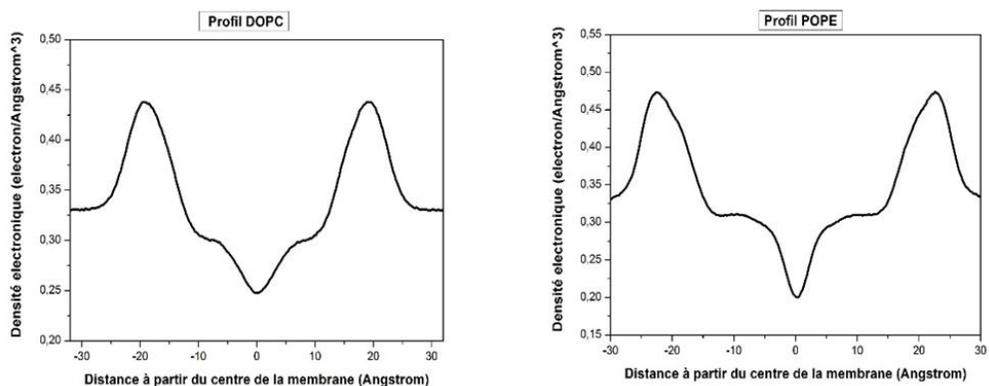
### III-1. Stabilité des membranes

Pour juger la stabilité des membranes étudiées, nous avons examiné l'évolution de la surface moyenne occupée par lipide au cours du temps (*Figure 1*). Il y apparaît qu'en début de simulation de dynamique moléculaire, la surface moyenne occupée par lipide est d'environ 75 Å<sup>2</sup>

pour DOPC et  $65 \text{ \AA}^2$  pour POPE. Cette surface diminue au cours des 120 ns de simulation de dynamique, pour se stabiliser autour de 65 et  $50 \text{ \AA}^2$  pour le DOPC et le POPE respectivement. Ce comportement montre bien que nos membranes sont en équilibre. Ceci est confirmé par la distribution de la densité électronique au sein de la bicouche qui est nulle dans la partie centrale et maximal au niveau des deux surfaces externes avec une valeur identique (*Figure 2*). Ce résultat indique que la densité de charge est localisée au niveau des surfaces externes en contact avec l'eau, ce qui est raisonnable du fait que ces surfaces externes comportent les têtes polaires des phospholipides.



**Figure 1 :** Surface par lipide DOPC / POPE



**Figure 2 :** Profil DOPC / POPE

- **Courbes de Potentielle du FHC dans les membranes**

Grâce au modèle EVB nous avons calculé les courbes d'énergies potentielles du FHC dans les membranes biologiques dans les états excité et fondamental en fonction de la coordonnée de la réaction (CR) du proton (figure 3). À l'état excité,  $T^*$  est énergétiquement plus stable que  $N^*$  dans les deux membranes,

ce qui laisse envisager que la réaction ESIPT est susceptible de survenir. Cependant cette réaction devrait être ralentie par la présence d'une barrière de potentielle qui est de 0.473 eV dans le DOPC et 0.27 eV dans le POPE.

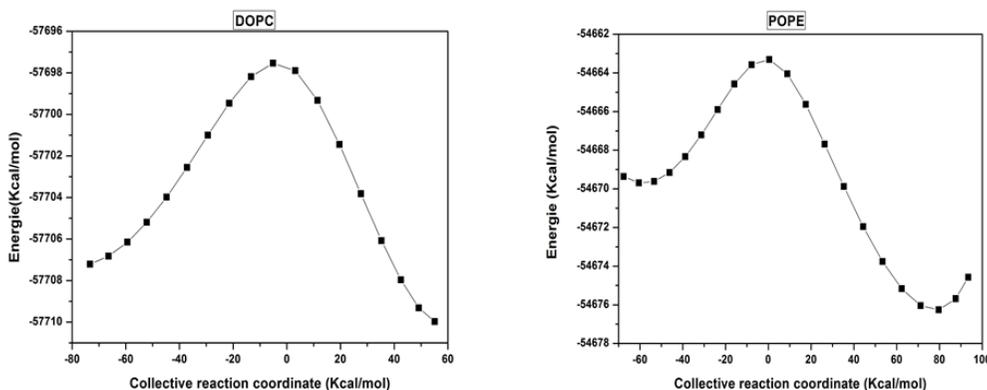


Figure 3 : Les Courbes d'énergie potentielle dans les membranes

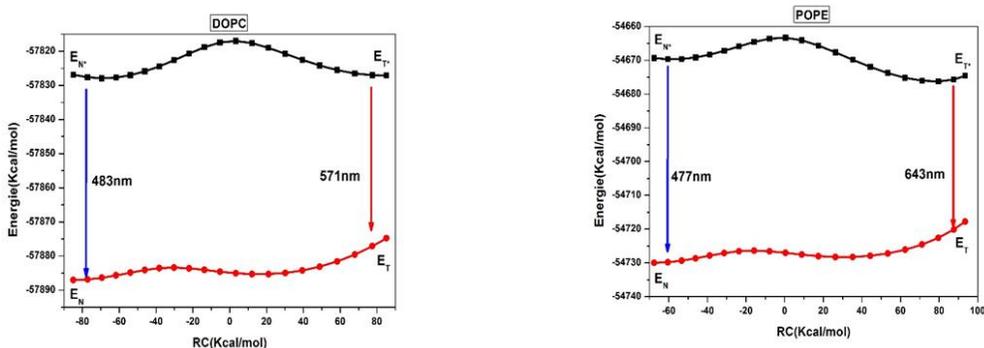
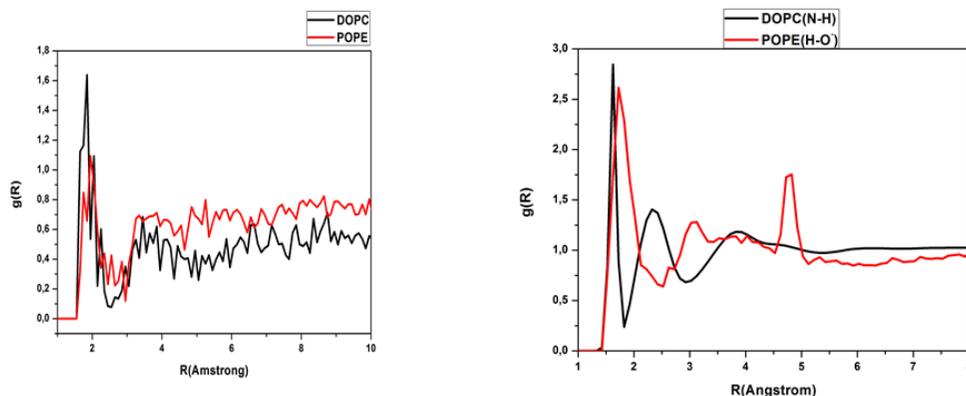


Figure 4 : Courbes d'énergie potentielle de FHC dans les membranes DOPC et POPE

Pour connaître l'origine de cette barrière, nous avons étudié la distribution des molécules susceptibles de former des liaisons hydrogènes avec FHC : les molécules d'eau, atomes N, et O des phospholipides environnants. Pour ce faire, nous avons calculé la fonction de distribution radiale  $g(R)$  de ces entités (Figure 5).



**Figure 5 :** Fonctions de distribution radiale

Pour la molécule d'eau, la fonction de giration a la valeur 1.6 Å dans DOPC et 1.2 Å dans POPE. Le nombre  $n$  de molécules d'eau liés au H du groupement hydroxyle de FHC calculé de la même manière qu'en solution donne 0.0 dans les deux membranes, ce qui traduit une très faible probabilité de trouver l'atome d'oxygène de l'eau autour du proton transféré de FHC, indiquant ainsi l'absence des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre FHC et les molécules d'eau. Ces résultats montrent qu'à température ambiante et sans cholestérol, l'intérieur des bicouches étudiées reste hydrophobe. Ceci confirme l'influence du cholestérol sur l'hydratation des bicouches [59]. Ce résultat indique aussi que la sonde est à l'intérieur de la bicouche et loin de l'interface entre l'eau et les têtes polaires. Par contre, les fonctions de distribution radiale  $g(R)$  pour le N de DOPC et le O- de POPE à une distance  $R$  de l'atome H du groupement hydroxyle de FHC (**Figure 5**) présentent des pics à 1.75 Å pour N de DOPC et à 2 Å pour O- de POPE pour lesquelles la valeur de  $g(R)$  est environ 2 fois sa valeur obtenue avec les molécules d'eau. Le nombre  $n$  d'atomes N et O- en contact avec H du groupement hydroxyle est environ 1, montrant ainsi que FHC interagit fortement avec un phospholipide environnant. Dans DOPC cette interaction est assurée par une liaison hydrogène H---N alors que dans POPE elle est due à une interaction électrostatique du type H+---O-. Ce comportement est très probablement à l'origine de la barrière d'énergie observée sur la courbe de potentiel. Les énergies des différents états extraites des courbes d'énergie potentielle à l'état fondamental et l'état excité permettent de prédire les positions de la longueur d'onde d'émission des deux formes N\* et T\* comme étant la différence  $EN^*-EN$  et  $ET^*-ET$  des énergies des états S1(R) et S0(FC), respectivement. Les émissions de N\* sont prédites à 483 et 477 nm et celles de T\* à 571 et 643 nm respectivement pour le DOPC et POPE. Les valeurs expérimentales pouvant servir de comparaison ne sont pas

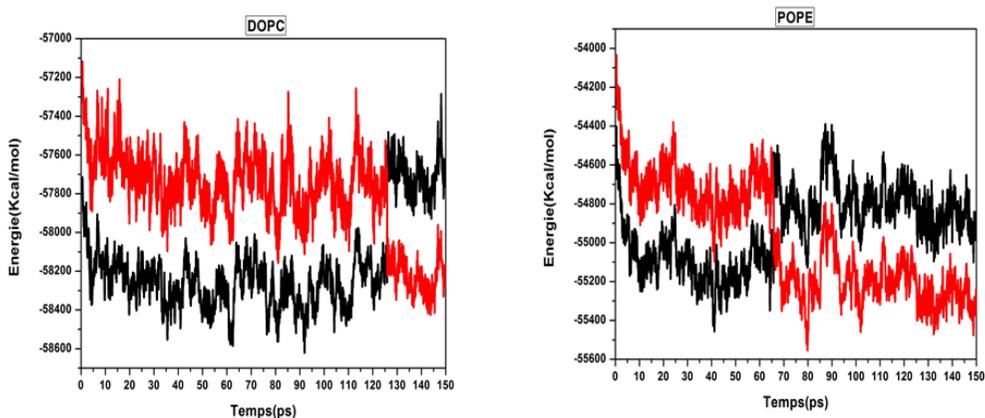
disponibles, cependant un déplacement hypsochrome de l'émission de N\* et un déplacement bathochrome de l'émission de T\* quand on passe de DOPC protique vers POPE non protique. Ce comportement est similaire à celui observé en solution [4], ce qui valide nos résultats.

**Tableau 2 :** Propriétés photophysiques de FHC dans les membranes

Membranes	Barrière d'énergie (eV)	Temps (ps)	IN*/IT*	$\lambda_{N^*}$ (nm)	$\lambda_{T^*}$ (nm)
DOPC	0.473	126	1.22	403	530
POPE	0.27	65	0.78	406	530

• *Temps d'occurrence d'ESIPT*

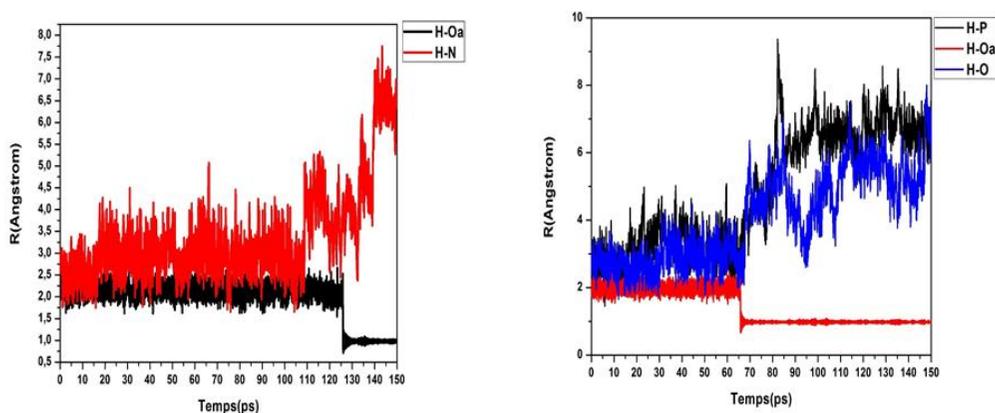
Pour estimer le temps de transfert de proton ESIPT, nous avons laissé le proton évoluer le long de la trajectoire de la dynamique moléculaire pendant un temps égal à 150 ps. Les temps sont de 126 ps et 65 ps pour le DOPC et POPE respectivement. Le temps de la réaction ESIPT est donné par le point de croisement des courbes d'énergie potentielle de la forme N\* et T\* en fonction de temps. Ces temps de réaction varient en fonction de type membranes, ce qui montre que FHC est sensible à la différence de composition des membranes. Le temps calculé pour DOPC est similaire à celui obtenu dans le méthanol en solution, ce comportement a été observé pour d'autres type de sonde ESIPT [5] et montre que les temps d'occurrence de ESIPT obtenu de nos simulations sont réalistes. D'un point de vue la physique fondamentale, il se dégage de nos résultats que la liaison hydrogène est plus forte que la liaison électrostatique.



**Figure 6 :** Évolution temporelle d'énergie potentielle totale du FHC dans les membranes DOPC et POPE

- **Mécanisme de la réaction**

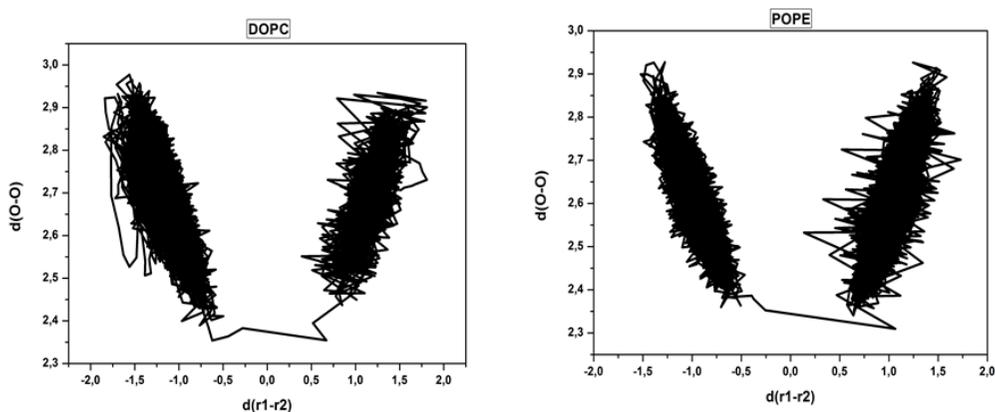
Pour comprendre les mécanismes ayant cours lors de la réaction ESIPT, nous commençons par clarifier le rôle dans l'occurrence de ESIPT des interactions entre le proton transféré et Oa, ainsi que celles du proton transféré avec les phospholipides environnant. Nous avons ainsi représenté l'évolution en fonction du temps de la distance intramoléculaire entre l'atome Oa et le proton transféré (**Figure 7**). Il y est remarqué qu'au début de la simulation, cette distance est d'environ 2 Å pour les deux membranes, indiquant une liaison H intramoléculaire stable. Cette distance diminue subitement pour atteindre 1 Å au moment d'occurrence de la réaction ESIPT. Ceci démontre clairement que la liaison H intramoléculaire se rompt plus vite dans le POPE que dans le DOPC lors de la réaction ESIPT. Nous avons précédemment montré que FHC est lié à un phospholipide par liaison hydrogène dans DOPC, alors que dans POPE il est lié à un phospholipide par liaison électrostatique plus faible. L'évolution de la longueur de cette liaison au cours du temps est présente également dans la **Figure 7**. Il ressort qu'au début de la réaction cette distance est d'environ 3 Å caractéristique des interactions non liantes pour les deux membranes, elle reste stable jusqu'au moment de la réaction ou elle augmente et passe à environ 5 Å, signifiant une rupture des interactions préexistantes. Comme dans le cas de FHC en solution, ce résultat prouve que le systèmes présente deux forces antagonistes : la liaison hydrogène intramoléculaire et la liaison hydrogène intermoléculaire (dans DOPC) et la liaison électrostatique (dans POPE). Il paraît vraisemblablement qu'après l'excitation de la molécule, la force intermoléculaire l'emporte et inhibe la réaction, mais que progressivement la force intramoléculaire augmente et fini par devenir prépondérante, aidées probablement comme nous l'avons vu en solution, par les modes de vibration promoteurs qui parviennent à supprimer la barrière de la réaction, rendant possible l'ESIPT.



**Figure 7** : Évolution en fonction du temps des distances intermoléculaires

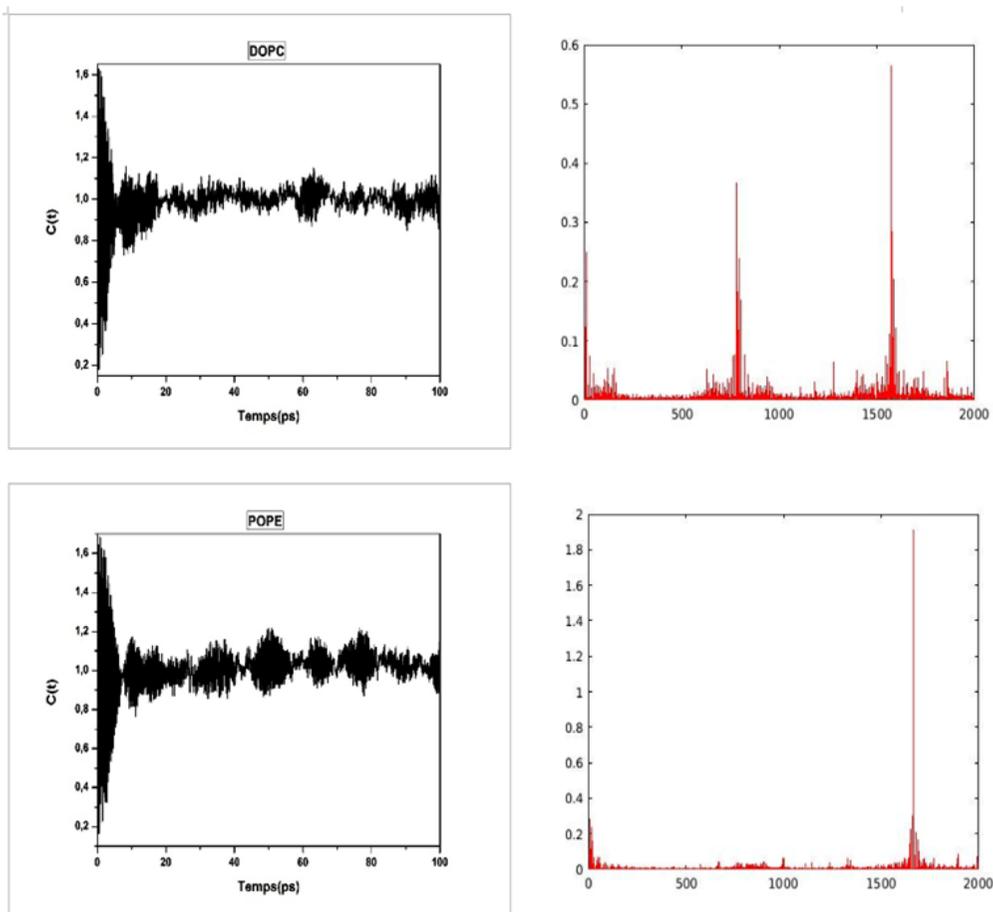
- **Trajectoires du proton**

Pour mettre en évidence le rôle des mouvements de vibration atomique dans les deux complexes, les trajectoires du proton entre les atomes Oa et Od sont représentées en fonction de  $r1-r2$  (**Figure 8**). Les distances  $r1$  et  $r2$  étant respectivement la distance Od-H et Oa-H et Oa-Od la distance donneur-accepteur. Les trajectoires individuelles dans les deux phospholipides différents présentent deux taches dans les régions caractérisées par  $(r1-r2 < 0)$  et  $(r1-r2 > 0)$  (**Figure 8**) correspondant au réactif  $N^*$  et au produit de la réaction  $T^*$  respectivement.



**Figure 8 :** Trajectoires du proton projetées sur les coordonnées donneur-accepteur  $d(O-O)$  en fonction de  $d(r1-r2)$  dans les membranes DOPC et POPE

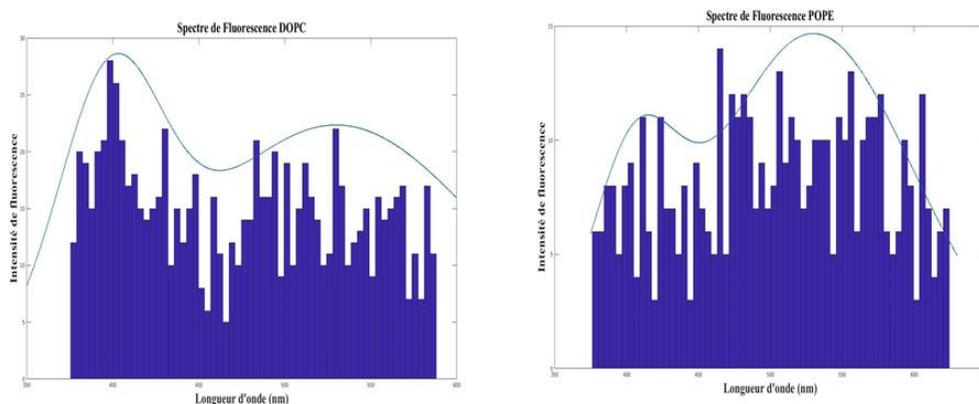
Il ressort de la **Figure 8** que le proton reste dans la forme  $N^*$  avant la réaction ES IPT, et que le passage vers la forme  $T^*$  s'effectue lorsque la distance Oa-Od devient minimale, environ 2.35 Å au moment de la réaction. Cette diminution ne peut être rendue possible que par l'existence des modes de vibrations faisant intervenir Oa et Od. Pour étudier l'existence des modes de vibration promoteurs faisant intervenir Oa et Od, nous avons calculé et représenté la fonction d'autocorrélation  $C(t)$ . La fonction d'autocorrélation dans le DOPC et le POPE montre que la distance Oa-Od fluctue autour d'une valeur moyenne (**Figure 9**). Pour calculer les fréquences vibratoires associées au mouvement Oa-Od, nous avons calculé le module de la transformée de Fourier dans les deux cas. C'est le module de la transformée de Fourier de fonction d'autocorrélation qui donne le spectre de vibration. Il a été constaté que la contribution dominante dans le mode promoteur correspond au pic centré autour de 1700  $cm^{-1}$ , plus élevé que celles obtenus en solution, indiquant ainsi que les vibrations se font à une fréquence relativement plus élevée.



**Figure 9 :** Évolution temporelle de la fonction d'autocorrelation et le module de la Transformée de Fourier dans le DOPC et POPE

- **Spectres de fluorescence du FHC dans les membranes**

Les spectres de fluorescence calculés à partir des énergies EVB pour les membranes DOPC et POPE sont présentés dans la **Figure 10**. Dans DOPC et POPE, la bande d'émission de N\* est obtenue à 403 et 406 nm respectivement et celle de T\* à 530 nm pour les deux membranes. Ces valeurs sont proches de celles obtenues en solution. Un déplacement bathochrome de 183  $\text{cm}^{-1}$  pour la bande N\* est obtenu alors que la bande T\* ne change pas au passage d'une membrane à l'autre. Le déplacement vers les grandes longueurs d'onde dans POPE pourrait s'expliquer par le fait que son composant monomérique porte une charge négative alors que le DOPC est neutre, l'interaction de cette charge avec FHC à l'état excité stabiliserait plus N\* qui a un moment dipolaire plus élevé comparé à T\* [6].



**Figure 10 :** *Profils d'émission de Fluorescence de FHC dans les membranes biologiques*

Ce comportement de la bande T\* est similaire à celui observé par [5]. Le spectre de fluorescence obtenu pour le DOPC est très proche de celui obtenu pour le FHC dans le méthanol. Ceci est probablement dû au fait que la cinétique de l'ESIPT dans les deux milieux est identique, caractérisé par des temps d'occurrence de réaction égaux. Cette similarité entre DOPC et le méthanol a également été observée par [7]. Les rapports de bande obtenus sont respectivement 1.22 et 0.78. Nos résultats montrent que la cinétique de la réaction ESIPT dépend de la structure chimique du monomère entrant dans la constitution de la membrane, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux. L'ensemble de nos résultats montre bien que les spectres obtenus par le modèle EVB sont réalistes. Ce modèle peut donc être utilisé pour concevoir et optimiser de nouvelles sondes à caractère ESIPT pour des applications en imagerie cellulaire, en sciences analytiques et en environnement.

#### IV - CONCLUSION

La réaction ESIPT en solution et dans les membranes biologiques trouve son origine dans la modification de la distribution de charges au sein de la molécule, consécutive à l'excitation de la molécule par une radiation de longueur d'onde convenable. Il s'en suit des mouvements de vibration impliquant Oa et Od. La distance entre les deux atomes diminue, ce qui a pour conséquence la suppression de la barrière de la réaction qui est due aux interactions intermoléculaires non liées entre la sonde et les molécules de solvant en solution ou les phospholipides environnants dans les membranes. La réaction ESIPT a lieu au bout d'un temps proportionnel à la force de liaison hydrogène entre FHC et les molécules environnantes dans les alcools et les membranes biologiques. Différemment, dans les amides la réaction ESIPT est très probablement gouvernée par l'effet tunnel dû au faible écart énergétique entre les états N\* et T\*.

**RÉFÉRENCES**

- [1] - G. VAN MEER, Cellular lipidomics. *The EMBO journal*, 24 (18) (2005) 3159 - 3165
- [2] - H. GOLDFINE and M. E. ELLIS, N-Methyl groups in bacterial lipids. *Journal of bacteriology*, 87 (1964) 8 - 15
- [3] - N. KUCERKA, S. TRISTRAM-NAGLE, J. NAGLE, *J. Membrane Biol.*, 208 (2005) 193 - 202
- [4] - BRAHIM ABDALLAH, DANIEL LISSOUCK, LUC CALVIN OWONO OWONO, CYRIL A. KENFACK, In silico simulation of the excited state proton transfer reaction of 2-(2-furyl)-3-hydroxychromone (FHC) in solution by empirical valence bond (EVB) method in conjunction with classical molecular dynamics, *Journal of Molecular Liquids*, 342 (2021) 2021 - 117355
- [5] - V. Y. POSTUPALENKO, V. V. SHVADCHAK, G. DUPORTAIL, V. G. PIVOVARENKO, A. S. KLYMCHENKO, Y. MÉLY, Monitoring membrane binding and insertion of peptides by two-color fluorescent label, 1808 (1) (Jan 2011) 424 - 32
- [6] - C. A. KENFACK, A.S. KLYMCHENKO, G. DUPORTAIL, A. BURGER, Y. MÉLY, *Phys Chem Chem Phys*, (2012) 14 - 8910
- [7] - RANJAN DAS, ANDREY S. KLYMCHENKO, GUY DUPORTAIL and YVES MÉLY, Excited State Proton Transfer and Solvent Relaxation of a 3-Hydroxyflavone Probe in Lipid Bilayers, 112 (38) (25 Sep 2008) 11929 - 35
- [8] - M. C. WIENER and S. H. WHITE, Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III Complete structure. *Biophys J.*, 61 (1992) 434 - 447