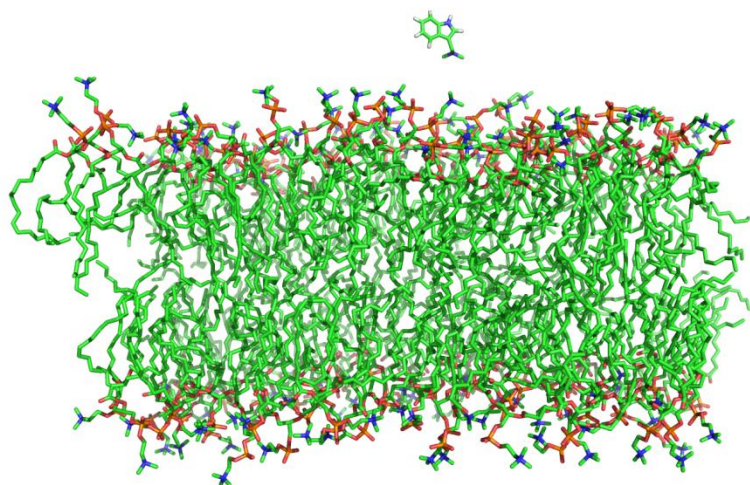


Etude des interactions de molécules phytotoxiques avec des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique végétale

Simon Lebecque



Promotrices :
Dr. Magali Deleu
Pr. Marie-Laure Fauconnier

2019

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE - GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**Etude des interactions de molécules phytotoxiques
avec des modèles membranaires inspirés de la
membrane plasmique végétale**

Simon Lebecque

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
Sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promotrices : Dr. Magali Deleu – Pr. Marie-Laure Fauconnier

Année civile : 2019

« Seigneur, prenez pitié du chrétien qui doute, de l'incrédule qui voudrait croire, du forçat de la vie qui s'embarque seul, dans la nuit, sous un firmament que n'éclairent plus les consolants fanaux du vieil espoir ! »

(À rebours, Joris-Karl Huysmans)

Résumé

L'agriculture se trouve actuellement face à un double défi : produire suffisamment et produire durablement. Ces dernières décennies, l'accent a essentiellement été mis sur les rendements, tirés vers le haut notamment via l'usage massif d'herbicides synthétiques permettant de gérer les adventices. Leur efficacité est cependant menacée par le développement de résistances parmi les adventices, lié au faible renouvellement de leurs modes d'action. De nombreuses études pointent en outre les risques associés à l'usage de ce type de produits tant pour l'environnement que pour la santé humaine. De nouveaux outils de lutte contre les adventices sont donc activement recherchés afin de rencontrer ces deux enjeux.

L'allélopathie, qui désigne le phénomène par lequel certaines plantes affectent le développement des plantes voisines en émettant des composés (allélo)chimiques dans l'environnement, représente une piste prometteuse à cet égard. Il paraît toutefois nécessaire d'identifier au préalable les composés allélochimiques impliqués dans de telles interactions et d'élucider leur mode d'action afin d'en faire une exploitation sécurisée, maîtrisée et optimisée. Plus largement, de nombreuses molécules d'origine végétale s'avèrent phytotoxiques, et pourraient donc servir d'herbicides naturels présentant potentiellement des modes d'action nouveaux et une biodégradabilité plus élevée que les herbicides synthétiques traditionnels.

L'objet de cette thèse consiste à étudier certaines molécules phytotoxiques d'origine végétale sous un angle original : leurs interactions avec des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique de plante. Cette perspective est intéressante car la membrane plasmique est à la fois le site d'interaction initial d'un composé toxique avec une cellule et le siège de nombreux processus cruciaux pour le bon fonctionnement cellulaire, et apparaît donc comme une cible potentielle. Des bicouches lipidiques artificielles composées de lipides retrouvés dans la membrane plasmique de plante ont été utilisées pour étudier le comportement de molécules phytotoxiques d'origine végétale en présence d'un tel environnement. Deux types de structures moléculaires ont été étudiés dans ce contexte : des petits composés aromatiques amphiphiles et des composés possédant une chaîne hydrocarbonée.

Dans un premier temps, deux alcaloïdes de l'orge, la gramine et l'hordénine, ont été considérés. Il s'agit de composés caractérisés par une petite structure aromatique et amphiphile. Leur phytotoxicité a été évaluée via des essais biologiques réalisés sur *Matricaria recutita* L., la camomille, une adventice commune d'Europe. Les deux composés ont induit une réduction de la longueur racinaire chez cette espèce, mais la gramine s'est révélée nettement plus toxique que l'hordénine. Les interactions de ces molécules avec des bicouches lipidiques ont ensuite été investiguées grâce à des techniques de biophysique. Des titrages calorimétriques isothermes ont permis de montrer que l'affinité de la gramine pour des bicouches lipidiques est supérieure à celle de l'hordénine. Des expériences en spectroscopie infrarouge ont mis en évidence l'impact de ces alcaloïdes sur une propriété importante des bicouches lipidiques : leur température de transition de phase. A

nouveau, l'effet de la gramine sur ce paramètre s'est avéré plus important que celui de l'hordénine. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ont été explorés par le biais de simulations de dynamique moléculaire. Les résultats des expériences de biophysique sont discutés, de même que leur possible corrélation avec les résultats des tests biologiques.

Dans un deuxième temps, des molécules avec un autre type de structures, incluant une chaîne hydrocarbonée, ont été étudiées. L'acide nonanoïque, la sarmentine et la sorgoléone ont été choisis. Leur impact sur l'ordre et la fluidité de bicouches lipidiques a été étudié par fluorimétrie. L'utilisation du 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène (DPH) et du laurdan, deux sondes fluorescentes, a ainsi permis de mettre en évidence l'augmentation d'ordre et l'augmentation de la température de transition de phase d'une bicouche lipidique induite par la présence de sorgoléone. L'acide nonanoïque et la sarmentine ont en revanche semblé n'avoir qu'un impact minime ou inexistant sur ces mêmes paramètres. Grâce à des titrages calorimétriques isothermes, l'affinité des trois molécules pour les bicouches lipidiques a pu être mesurée, et classée comme suit : sorgoléone >> sarmentine > acide nonanoïque. Des simulations en dynamique moléculaire ont enfin été réalisées afin d'obtenir des détails concernant la localisation préférentielle des composés au sein d'une bicouche lipidique. Une analyse du paramètre d'ordre des chaînes hydrophobes des lipides basée sur ces simulations a confirmé l'effet rigidifiant de la sorgoléone et suggéré la présence d'une possible influence subtile de l'acide nonanoïque et de la sarmentine sur la stabilité des bicouches lipidiques. Les résultats sont discutés par rapport à leur implication potentielle quant à la phytotoxicité des composés.

Une discussion générale revient sur les principaux résultats obtenus dans le cadre de la thèse, leur apport à l'état des connaissances et les limites de leur signification. L'impact de certains traits structuraux présentés par des molécules phytotoxiques susceptibles d'interagir avec des bicouches lipidiques est discuté. Finalement, des perspectives à partir de cette thèse sont évoquées, en soulignant notamment l'importance des recherches à mener pour mieux comprendre le fonctionnement de la membrane plasmique et le rôle de sa composante lipidique.

Abstract

Agriculture is facing a double challenge: the need to produce enough food and the need to do it in a sustainable way. For last decades, the priority was mainly to reach high yields which were obtained by using massive amounts of synthetic herbicides for weeds management. Their efficacy is however threatened since weeds are developing resistances because of the low renewal of their modes of action. Moreover, numerous studies emphasize their toxicity for environment and public health. New tools are thus highly wanted in order to manage the weeds.

Allelopathy, defined as the phenomenon by which some plants affect the development of neighboring plants by releasing (allelo)chemicals into their environment, is a promising track. It seems however necessary to identify allelochemicals involved in such interactions and to understand their mode of action in order to use allelopathy in a safe, optimized way. More generally, numerous compounds of plant origin are phytotoxic and could therefore be used as natural herbicides that might feature new modes of action and a higher biodegradability than traditional synthetic herbicides.

The aim of this thesis is to study a few phytotoxic molecules of plant origin with an original approach by investigating their interactions with model membranes mimicking the plant plasma membrane. This approach is interesting since the plasma membrane is the first site of contact of a toxic compound with a cell and because the plasma membrane is a place where a lot of essential cellular processes occur, making of it a potential target for toxic compounds. Artificial lipid bilayers made of lipids found in plant plasma membrane were used to study the behavior of phytotoxic compounds of plant origin in the presence of such an environment. In this context, we were interested in two types of chemical structures: small aromatic amphiphilic compounds and compounds that possess a hydrocarbon tail.

First, two alkaloids from barley were investigated: gramine and hordenine. Both compounds are small aromatic amphiphilic molecules. Their phytotoxicity has been assessed by carrying out biological assays with *Matricaria recutita* L. (chamomile), a common weed in Europe. Both hordenine and gramine induced a decrease in the root length of chamomile, but gramine was far more toxic than hordenine. Biophysical techniques were then used in order to investigate their interactions with lipid bilayers. By means of isothermal titration calorimetric experiments, it has been shown that gramine has a higher affinity for lipid bilayers than hordenine. Experiments carried out with infrared spectroscopy have highlighted the impact of these alkaloids on an important property of lipid bilayers: their phase transition temperature. Again, gramine was more effective than hordenine in influencing this parameter. The underlying molecular mechanisms were explored with molecular dynamics simulations. Biophysical results are discussed, as well as their possible correlation with biological tests results.

Then, molecules with another kind of structures, having a hydrocarbon tail, were studied. Nonanoic acid, sarmentine and sorgoleone were chosen. Their impact on the lipid bilayer order and fluidity was studied by means of fluorimetry. By using two fluorescent probes, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and laurdan, we were able to highlight the ability of sorgoleone to increase the order and the phase transition temperature of a lipid bilayer. Nonanoic acid and sarmentine had no or little effect on these parameters. Affinity of each molecule for lipid bilayers was measured with isothermal titration calorimetry, and ranked as follows: sorgoleone >> sarmentine > nonanoic acid. Finally, molecular dynamics simulations were carried out in order to get details about the location of these compounds within a lipid bilayer. An analysis of the order parameter of the lipid hydrophobic chains confirmed the rigidifying effect of sorgoleone and suggested a possible subtle way by which nonanoic acid and sarmentine could influence the stability of lipid bilayers. Results are discussed regarding their potential implications for the phytotoxicity of these compounds.

In a general discussion, the main results of this thesis are discussed, as well as their contribution to actual knowledge and the limits of their significance. The impact of some structural traits possessed by phytotoxic molecules that are likely to interact with lipid bilayers is also discussed. Finally, perspectives of this work are mentioned, emphasizing the need for more research about the way plasma membrane functions and the role of its lipid part.

Remerciements

Il ne serait pas juste, au sens d' « exact », de présenter cette thèse comme un accomplissement strictement personnel. Il ne serait donc pas juste non plus, au sens de « loyal », de ne pas remercier les personnes impliquées directement ou indirectement dans la réalisation de ce travail.

Je voudrais citer en premier lieu les trois personnes sans lesquelles ce travail n'aurait tout simplement jamais été entamé : Magali et Marie-Laure, qui m'ont fait confiance pour mener ce projet à leurs côtés, mais aussi Laurence, qui m'a initialement ouvert les portes du LBMI.

Je remercie Magali pour sa présence permanente « sur le terrain », sa réactivité, son aide, mais aussi et peut-être surtout pour sa simplicité et son ouverture. Jamais nos échanges ne m'ont paru fermés et hiérarchisés.

Merci à Marie-Laure d'avoir été un soutien constant et d'avoir apporté souvent un éclairage différent sur les problèmes se présentant à nous. Être sous sa supervision était à la fois précieux et rassurant.

Je tiens également à remercier Laurence, pour sa confiance accordée et jamais démentie, en ligne avec son attitude fédératrice et bienveillante.

Je souhaite remercier aussi les membres du LBMI avec lesquels j'ai partagé un bout de chemin, en particulier Jean-Marc et Nail, qui m'ont accueilli à mon arrivée et qui m'ont initié à leur domaine de prédilection, respectivement la dynamique moléculaire et la spectroscopie infrarouge, avec une envie manifeste de partager.

J'adresse aussi un grand merci aux gens qui m'ont aidé, très concrètement, dans mes expériences au laboratoire. Hazar et Lucas, que j'ai eu le plaisir d'accompagner dans la réalisation de leur mémoire ; Catherine, Benjamin, Danny, Thomas, Estelle, Gaëtan et Isabelle, qui ont activement participé à des expériences que j'ai menées et ont toujours affiché une disponibilité et une volonté de m'aider très réconfortantes.

Plus largement, ce fut un plaisir d'être intégré à la plateforme AgricultureIsLife et de côtoyer ses doctorants de tous horizons – tant scientifiques que culturels. Je remercie donc chaleureusement chacun des membres de ce projet, et plus particulièrement Sarah et Joëlle, qui en furent l'âme.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, comme ceux de mon comité de thèse, pour le temps qu'ils auront dédié à mon travail.

Mes derniers mercis vont à ceux qui s'en sont tenus aux coulisses de cette thèse, et sans qui pourtant rien n'aurait été possible : mes amis et ma famille. D'une certaine façon, je pourrais repartir de la citation d'ouverture de cette thèse, et dire que mon firmament est éclairé par de consolants fanaux dont font assurément partie Charles-Emmanuel, Florian, Marie, Olivier, Thomas, mon papa et ma maman. Le soutien et l'amour inconditionnels de mes parents ont constitué la première impulsion d'un mouvement que je conserverai toute ma vie, en vertu du principe d'inertie. Je ne l'oublierai pas.

Enfin, je ne peux pas vraiment dire que je suis ou ai été « seul, dans la nuit », parce que j'ai la chance de marcher aux côtés d'Anaïs, et qu'elle porte en elle la douce lueur de l'aube. Merci à elle.

Table des matières

Résumé	viii
Abstract	x
Remerciements	xii
Table des matières	1
Liste des figures	4
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	8
Introduction générale.....	9
1. Introduction bibliographique	11
1.1. L'allélopathie.....	13
1.1.1. Contexte et définitions.....	15
1.1.2. Composés allélochimiques : mécanismes de libération, diversité des structures et des modes d'action.....	17
1.1.3. Facteurs influençant la production des composés allélochimiques ...	20
1.1.4. L'allélopathie dans les systèmes agricoles	22
1.1.4.1. La voie biologique	22
1.1.4.2. La voie chimique	23
1.1.5. L'allélopathie : « nouvelle arme » des plantes invasives ?.....	24
1.1.6. Conclusion.....	24
1.1.7. Références	24
1.2. La membrane plasmique.....	31
1.2.1. La membrane plasmique : description et fonctions principales.....	31
1.2.2. La membrane plasmique : l'environnement lipidique	32
1.2.2.1. Structure des principaux lipides membranaires	32
1.2.2.2. Principales caractéristiques des bicouches lipidiques.....	39
1.2.2.3. Rôles des lipides au sein de la membrane plasmique	43
1.2.2.4. Composition et organisation des membranes plasmiques de plante	45
1.2.2.5. Etude de l'environnement lipidique et de ses interactions avec des molécules bioactives.....	47

1.2.3.	Références	52
2.	Objectifs de la thèse.....	59
2.1.	Contexte et stratégie	61
2.2.	Organisation de la section scientifique de la thèse	63
3.	Interactions entre des composés allélochimiques possédant une structure aromatique amphiphile et des bicouches lipidiques artificielles inspirées de la membrane plasmique de plante	65
3.1.	Introduction	70
3.2.	Results	71
3.2.1.	Phytotoxicity assays.....	71
3.2.2.	Ability of alkaloids to insert into lipid bilayers	72
3.2.3.	Effect of gramine and hordenine on lipid phase transition temperature 73	
3.2.4.	Interactions with lipid bilayer: a molecular dynamics insight	76
3.3.	Discussion.....	83
3.4.	Methods	87
3.4.1.	Plant material and chemicals	87
3.4.2.	Phytotoxicity assays.....	87
3.4.3.	Lipid preparation and isothermal titration calorimetry.....	87
3.4.4.	Lipid preparation and Fourier transform infrared spectroscopy	88
3.4.5.	Molecular dynamics.....	88
3.5.	References	89
3.6.	Supplementary data	95
4.	Interactions entre des herbicides naturels possédant une chaîne hydrophobe et des bicouches lipidiques inspirées de la membrane plasmique de plante.....	97
4.1.	Introduction	102
4.2.	Material and methods	105
4.2.1.	Chemicals	105
4.2.2.	Liposome preparations.....	105
4.2.3.	Laurdan generalized polarization	106
4.2.4.	DPH anisotropy	106
4.2.5.	Isothermal titration calorimetry	107
4.2.6.	Molecular dynamics.....	108
4.3.	Results	108

4.3.1.	Effect on bilayer order and lipid phase transition temperature.....	108
4.3.2.	Study of the fluidity of the hydrophobic core of bilayer in the presence of the natural herbicides	111
4.3.3.	Partitioning into lipid vesicles	113
4.3.4.	Interaction of the natural herbicides with the lipid bilayer and their effect on the lipid order parameter studied by molecular dynamics.....	115
4.4.	Discussion	121
4.5.	Conclusion.....	123
4.6.	References	125
4.7.	Supplementary data	129
5.	Discussion générale, conclusions et perspectives	131
	Productions scientifiques.....	145
	Annexe	147

Liste des figures

Figure 1. Modes d'émission des composés allélochimiques dans l'environnement. 1 : exsudation racinaire, 2 : lixiviation des parties aériennes, 3 : volatilisation, 4 : décomposition d'une partie ou de l'intégralité de la plante. Emission pathways of allelochemical compounds into the environment. 1: root exudation, 2: aerial parts leaching, 3: volatilisation, 4: decomposition of plant or plant parts.....	17
Figure 2. Structures chimiques des composés évoqués dans cet article. Chemical structures of the compounds cited in this article.	18
Figure 3. Exemples de structures de glycérophospholipides possédant deux chaînes hydrocarbonées saturées à 16 atomes de carbone.....	34
Figure 4. Exemples de structures de sphingolipides.....	36
Figure 5. Exemples de structures de stérols libres.....	38
Figure 6. Illustration schématique d'une bicouche en phase gel (solide ordonnée) et en phase fluide (liquide désordonnée).	42
Figure 7. Exemple de système initial de dynamique moléculaire (bicouche lipidique avec molécules d'eau et alcaloïdes en solution). Vert : atome de carbone/groupement méthyl, blanc : atome d'hydrogène, rouge : atome d'oxygène, orange : atome de phosphore, bleu : atome d'azote.....	49
Figure 8. Fonction de l'énergie potentielle et ses différentes composantes issues des interactions liées et non liées.....	51
Figure 9. Molecular structures of the alkaloids under investigation. (A) Gramine and (B) hordenine (both in protonated state).....	70
Figure 10. Interactions between alkaloids and liposomes evidenced by ITC experiments. Upper panels: raw data from ITC experiments. Each peak corresponds to a single injection of 10 μ L of a 10mM PLPC-PLPG (molar ratio 4:1) LUV suspension into a solution containing (A) 10 μ M gramine and (B) 10 μ M hordenine at 26 °C. LUV suspension and alkaloids solutions were buffered at pH 6.15 with MES – NaOH. Lower panels: cumulative heats of binding ($\Sigma\delta h_i$) as a function of the lipid concentration in the cell (COL). Solid line corresponds to the best fit using the eq. 4. From this fit, the partition coefficient, K, is determined for each alkaloid (fitting uncertainty in brackets).	73
Figure 11. Effect of alkaloids on phase transition temperature of liposomes. Evolution of s_{VCH_2} as a function of temperature for (A) DMPC liposomes, (B) DMPG liposomes and (C) DMPC-DMPG (molar ratio 4:1) liposomes in the absence of alkaloids (solid line, $\square$), in the presence of gramine (dashed line, $\times$) or in the presence of hordenine (round dotted line, $\blacktriangle$).	75
Figure 12. Snapshots after 500 ns long simulations of a PLPC bilayer with alkaloids. (A) 128 PLPC bilayer with 32 gramine molecules and (B) 128 PLPC bilayer with 32 hordenine molecules. For sake of clarity, water molecules and ions are omitted. Gray: alkaloids molecules, green: carbon atoms, red: oxygen atoms, orange: phosphor atoms, blue: nitrogen atoms.	76
Figure 13. Location of gramine and hordenine within the lipid bilayers. Evolution of the distance from the (A) PLPC bilayer center of mass and (B) PLPG bilayer center of mass along the Z axis (nm). Gramine: red line, hordenine: green line, phosphorus atoms: blue line, glycerol backbone COM: violet line.....	78

Figure 14. Analysis of hydrogen bonds formation between lipids and alkaloids. Time evolution of the number of hydrogen bonds (A) between alkaloids and lipids phosphate groups and (B) between alkaloids and lipid ester groups (average number per alkaloid in both cases). PLPC – gramine: blue line; PLPC – hordenine: red line; PLPG – gramine: green line; PLPG – hordenine: violet line. For each alkaloid – lipid pair, the average number of hydrogen bonds per alkaloid during the last 100 ns is displayed.....80

Figure 15. Orientation of gramine and hordenine within the PLPC bilayer. Distribution of angles (A) between the PLPC bilayer normal and vectors defined on each alkaloid as shown in the insets and (B) between the PLPC bilayer normal and vectors orthogonal to the surface defined on each alkaloid by 3 points of the cyclic part (insets of B: schematic representation of hordenine (left) and gramine (right) orientation within lipid bilayer). Blue line: gramine, red line: hordenine.82

Figure 16. Time evolution of the number of hydrogen bonds between alkaloids and lipids (average number per alkaloid). PLPC – gramine: blue line; PLPC – hordenine: red line; PLPG – gramine: green line; PLPG – hordenine: violet line. For each alkaloid – lipid pair, the average number of hydrogen bonds per alkaloid during the last 100 ns is displayed.95

Figure 17. Distribution of angles (A) between the PLPG bilayer normal and vectors defined on each alkaloid as shown in the insets and (B) between the PLPG bilayer normal and vectors orthogonal to the surface defined on each alkaloid by 3 points of the cyclic part. Blue line: gramine, red line: hordenine.....96

Figure 18. Molecular structures of (A) nonanoic acid, (B) sarmentine and (C) sorgoleone.103

Figure 19. Evolution of laurdan generalized polarization as a function of temperature for DPPC MLVs (50 μ M) in the absence or presence (lipid:herbicide molar ratio 5:1) of natural herbicides ($\square$: pure DPPC, $\blacklozenge$: DPPC + nonanoic acid, $\times$: DPPC + sarmentine, $\blacktriangle$: DPPC + sorgoleone).110

Figure 20. Evolution of DPH anisotropy for DPPC LUVs (50 μ M) mixed with increasing concentrations of natural herbicides at 50°C ($\blacklozenge$: DPPC + nonanoic acid, $\times$: DPPC + sarmentine, $\blacktriangle$: DPPC + sorgoleone).112

Figure 21. Upper panels: raw data from ITC experiments. Each peak corresponds to a single injection of 10 μ L of a PLPC LUV suspension (5 mM for (A) and (B), 1 mM for (C)) into a solution containing (A) 500 μ M nonanoic acid, (B) 75 μ M sarmentine and (C) 75 μ M sorgoleone at 26 °C. LUV suspension and herbicides solutions were buffered at pH 7 with TRIS – HCl. Lower panels: cumulative heats of binding ($\Sigma\delta h_i$) as a function of the lipid concentration in the cell (C_L^0). Solid line corresponds to the best fit using the eq. 8.114

Figure 22. Snapshots after 250 ns simulations of a 140 molecules PLPC bilayer with (A) 28 nonanoic acid molecules, (B) 28 sarmentine molecules or (C) 28 sorgoleone molecules. For sake of clarity, water molecules and ions are omitted. Dark red: herbicidal molecules, green: carbon atoms, red: oxygen atoms, orange: phosphor atoms, blue: nitrogen atoms.116

Figure 23. Evolution of the average distance between various atomic groups and the PLPC bilayer center of mass along the Z axis (nm). Blue line: herbicide (A: nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) COM, red line: herbicide (A:

nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) polar part (defined as shown on the inset), green line: last methyl group of herbicide (A: nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) alkyl chain, violet line: PLPC phosphorus atoms, cyan line: PLPC glycerol groups..... 118

Figure 24. Order parameter for each carbon atom in the palmitoyl chain of PLPC in the presence or absence of herbicidal molecules. Blue line: pure PLPC, red line: PLPC + nonanoic acid (5:1 molar ratio), green line: PLPC + sarmentine (5:1 molar ratio), violet line: PLPC + sorgoleone (5:1 molar ratio)..... 120

Figure 25. Evolution of DPH anisotropy for DPPC LUV (50 μ M) mixed with increasing concentrations of natural herbicides at 35°C (◆: DPPC + nonanoic acid, ×: DPPC + sarmentine, ▲: DPPC + sorgoleone). 129

Figure 26. Illustration schématique des mécanismes moléculaires proposés pour expliquer l'effet des différents composés phytotoxiques considérés dans ce travail sur des modèles membranaires. A : monocouche lipidique seule ; B : monocouche lipidique en présence d'hordénine ; C : monocouche lipidique en présence de gramine ; D : monocouche lipidique en présence de sorgoléone ; E : monocouche lipidique en présence de sarmentine (mécanisme similaire proposé pour l'acide nonanoïque). 136

Liste des tableaux

Table 1. Température de transition de phase de phosphatidylcholines en fonction de la longueur de leurs chaînes (deux chaînes identiques saturées). Tableau repris de (Lewis and McElhaney, 1992).	40
Table 2. Température de transition de phase de glycérophospholipides possédant les mêmes chaînes d'acides gras (2 chaînes palmitoyl (16 :0)) mais des têtes polaires différentes (voir figure 3 pour les structures). Tableau repris de (Lewis and McElhaney, 1992).	41
Table 3. Comparaison de différentes propriétés des bicouches lipidiques en fonction de leur état (phase gel – phase fluide).	42
Table 4. Phytotoxicity of gramine and hordenine. Effect of various gramine and hordenine treatments on the mean root length of <i>M. recutita</i> seedlings (treatments that do not share a common letter are significantly different, Tukey test with $\alpha = 0.05$).	72
Table 5. Phase transition temperature of the different systems as determined from FTIR measurements (fitting uncertainty in brackets). ΔT_m is computed for each system in the presence of an alkaloid with respect to the same system in the absence of alkaloid.	76
Table 6. Thermodynamic parameters characterizing the interactions of herbicidal molecules with PLPC LUVs.	115

Liste des abréviations

ASG : acyl steryl glycoside

BOA : benzoxazolin-2(3H)-one

DGDG : digalactosyldiacylglycérol

DMPC : 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholine (14:0, 14:0 PC)

DMPG : 1,2-Dimyristoyl-phosphatidylglycerol (14:0, 14:0 PG)

DPH : 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriène

DPPA : 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidic acid (16 :0, 16 :0 PA)

DPPC : 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholine (16 :0, 16 :0 PC)

DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine (16 :0, 16 :0 PE)

DPPG : 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (16 :0, 16 :0 PG)

DPPS : 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylserine (16 :0, 16 :0 PS)

FTIR : Fourier-transform infrared spectroscopy

GIPC : glycosyl inositol phosphorylceramides

ITC : isothermal titration calorimetry (titrage calorimétrique isotherme)

LUV : large unilamellar vesicle

MD : molecular dynamics (dynamique moléculaire)

MGDG : monogalactosyldiacylglycérol

MLV : multilamellar vesicle

NMR (RMN) : nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)

PC : phosphatidylcholine

PG : phosphatidylglycerol

PLPC : 1-palmitoyl-2-lioneloyl-phosphatidylcholine (16 :0, 18:2 PC)

PLPG : 1-palmitoyl-2-lioneloyl-phosphatidylglycerol (16 :0, 18:2 PG)

SE : steryl ester

SG : steryl glycoside

T_m : temperature de transition de phase

Introduction générale

La présente thèse s'intéresse aux interactions entre des molécules phytotoxiques d'origine végétale et des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique de plante.

Compte tenu du développement de résistances aux herbicides traditionnels parmi les adventices et des risques associés à l'utilisation intensive de tels produits, l'émergence de solutions alternatives pour lutter contre les plantes indésirables est vivement souhaitée. L'exploitation de l'allélopathie, terme qui désigne le phénomène par lequel certaines plantes affectent le développement des plantes voisines en émettant des composés (allélo)chimiques dans l'environnement, pourrait être une de ces solutions alternatives. La première partie de l'introduction bibliographique de cette thèse (**Chapitre 1.1**) est dédiée à une revue des principaux concepts liés à l'allélopathie.

Beaucoup de composés allélochimiques sont phytotoxiques, et tous possèdent par définition une origine végétale ; des composés allélochimiques font ainsi partie des molécules phytotoxiques d'origine végétale sélectionnées pour nos études. Cette thèse s'intéresse aux interactions de telles molécules avec des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique de plante, car la membrane plasmique est le site d'interaction initial entre une molécule toxique et la cellule cible, mais aussi une composante cellulaire remplissant de nombreux rôles cruciaux pour le bon fonctionnement de la cellule. La deuxième partie de l'introduction bibliographique (**Chapitre 1.2**) est donc consacrée à la membrane plasmique, l'accent étant placé sur l'environnement lipidique qui a inspiré nos modèles membranaires.

Le **Chapitre 2** revient sur les objectifs de la thèse, le contexte dans lequel elle s'inscrit, la stratégie suivie (en particulier par rapport au choix des molécules, des techniques et des modèles membranaires utilisés) et l'organisation de la suite du document.

Les **Chapitres 3 & 4** sont dédiés à l'étude des interactions entre des molécules phytotoxiques d'origine végétale (possédant une petite structure aromatique amphiphile et possédant une chaîne hydrocarbonée, respectivement) et des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique de plante.

Le **Chapitre 5** comprend une discussion générale, une conclusion et des perspectives pour le travail accompli.

A la fin du document se trouve une liste des productions scientifiques réalisées dans le cadre de cette thèse.

En annexe, un article dédié au développement d'une méthode d'étude des micelles par dynamique moléculaire qui, appliqué à certains composés amphiphiles phytotoxiques, pourrait permettre la caractérisation de leur comportement d'agrégation et, éventuellement, de mieux comprendre leur mode d'action.

Introduction bibliographique

1.1. L'allélopathie

Allélopathie et composés allélochimiques : concepts généraux et rôles potentiels dans les systèmes agricoles

Simon Lebecque^{1,2}, Marie-Laure Fauconnier³, Magali Deleu²

¹TERRA—AgricultureIsLife, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Gembloux, Belgique

²Laboratoire de Biophysique Moléculaire aux Interfaces, Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Gembloux, Belgique

³Laboratoire de Chimie Générale et Organique, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Gembloux, Belgique

Etat de l'article : En préparation pour soumission aux Cahiers de l'agriculture ou BASE (2019).

Résumé – L'allélopathie désigne le phénomène par lequel certaines plantes influencent la germination et la croissance de plantes voisines en émettant des composés (allélo)chimiques dans l'environnement. Cette revue propose d'abord une introduction contextualisée du sujet et une délimitation aussi claire que possible de concepts jugés importants dans le cadre de l'étude de l'allélopathie. Les composés allélochimiques sont considérés du point de vue des modes d'émission possibles, de la variété de leurs structures et de leurs modes d'action, ainsi que des facteurs influençant leur production, avec la volonté d'esquisser pour le lecteur une image générale de ces sujets, nourrie par de multiples exemples. Enfin, la place de l'allélopathie dans le contexte écologique des espèces invasives et dans les systèmes agricoles est abordée, avec un fort accent placé sur des pistes d'exploitation potentielle par les agriculteurs.

Mots clés : allélopathie, gestion des adventices, composés allélochimiques, herbicides, développement durable

Abstract – Allelopathy refers to the phenomenon by which some plants interfere with the germination and growth of neighboring plants by releasing (allelo)chemical compounds into the environment. First, this review gives a contextualized introduction of the topic, with a clear definition of important concepts in the framework of allelopathy. Then, the known mechanisms of emission of allelochemical compounds into the environment are described. The diversity of structures and modes of action of allelochemical compounds as well as the factors that can influence their production levels are also considered. The overall purpose is to provide the reader with a big picture of those topics, with a variety of examples. Finally, the role of allelopathy in the ecological context of invasive species and its role in the agricultural systems are developed, with a strong accent on its potential benefits for farmers.

Keywords: allelopathy, weeds management, allelochemical compounds, herbicides, sustainable development

1.1.1. Contexte et définitions

L'agriculture se trouve tiraillée entre deux impératifs que lui impose son temps et qui peuvent paraître, au vu des outils dont elle dispose actuellement, irréconciliables. D'une part, la pression démographique appelle une production agricole toujours plus importante et efficace pour satisfaire aux besoins d'une population mondiale florissante. En effet, avec près de 9,8 milliards d'êtres humains sur Terre d'ici 2050 (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2017), la FAO prévoit une augmentation de 50% de la demande globale en produits agricoles par rapport à 2012 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). D'autre part, l'enjeu écologique occupe une place croissante sur la scène sociétale, remettant en question l'ensemble des moyens de production humains, au premier rang desquels se trouve l'agriculture moderne.

Le cas de la gestion des adventices illustre bien l'actuelle incompatibilité entre ces deux objectifs – produire efficacement et produire en respectant l'intégrité de l'environnement. Il s'agit d'un point crucial pour l'agriculteur, puisque les « mauvaises herbes » entrent en compétition avec les plantes cultivées pour les ressources disponibles. Leur suppression (partielle) permet donc d'améliorer les rendements agricole et économique. Pour ce faire, la solution qui s'est globalement imposée ces dernières décennies est l'usage intensif d'herbicides synthétiques. Ainsi, en 1974, année de mise sur le marché du glyphosate, la quantité d'ingrédient actif de cet herbicide pulvérisée par les agriculteurs aux Etats Unis était de 360 tonnes. Depuis, elle n'a cessé de croître pour dépasser, en 2014, les 113 000 tonnes (Benbrook, 2016). Il a néanmoins été prouvé que ces herbicides synthétiques peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine (Alavanja et al., 2004; Annett et al., 2014; Kim et al., 2017). Leur utilisation répandue dans le temps et dans l'espace a par ailleurs favorisé l'apparition de résistances au sein de certaines espèces végétales, engendrant le cas échéant une diminution substantielle de leur efficacité (Heap, 2014). Ce dernier problème prend d'autant plus d'ampleur que la multitude d'herbicides couramment utilisés agit selon un nombre limité de modes d'action différents, une vingtaine seulement (Duke, 2012).

Par conséquent, des moyens de lutte alternatifs sont activement recherchés. Le phénomène de l'allélopathie, notamment, constitue une piste prometteuse à cet égard. Le terme « allélopathie » fut employé pour la première fois par Hans Mölich pour désigner l'effet d'une plante sur une autre via la libération de composés chimiques (appelés composés « allélochimiques ») (Willis, 2007). Les racines étymologiques de ce mot peuvent induire en erreur quant à sa signification précise : le mot grec « allelon » signifie « l'un l'autre », « mutuellement », tandis que le nom grec « pathos » peut être traduit par « ressenti ». Toutefois, la réciprocité n'est pas un critère nécessaire pour qualifier d'allélopathique une relation entre deux plantes qui sera souvent caractérisée par une plante donneuse et une plante receveuse bien définies (Willis, 2007).

La définition exacte de l'allélopathie a régulièrement été source de débats. En particulier, fallait-il exclure ou non les effets bénéfiques qu'une plante peut avoir sur une autre via l'émission de composés chimiques ? Cette distinction est considérée par certains auteurs comme artificielle, car beaucoup de composés présentent un

effet hormétique : toxiques à une certaine concentration, ils deviennent stimulants à plus faible dose (Rice, 1984; Belz et al., 2005). Une définition communément reprise est celle fournie par Rice selon laquelle l'allélopathie désigne tout effet direct ou indirect, nocif ou stimulant, d'une plante (microorganismes photosynthétiques inclus) sur une autre par le biais de la production de composés chimiques émis dans l'environnement (Rice, 1984). D'autres définitions cohabitent avec celle-ci, comme celle, plus large, issue du premier congrès mondial sur l'allélopathie en 1996 - où l'allélopathie est vue comme tout processus impliquant des métabolites secondaires produits par des plantes, microorganismes, virus ou champignons qui influence la croissance et le développement de systèmes agricoles ou biologiques (à l'exception des animaux), incluant à la fois les effets positifs et négatifs (Koocheki et al., 2013) – ou celle, plus restreinte, retenue par Lambers – qui ne considère que les effets négatifs de plantes à plantes (Lambers et al., 2008)– mais la définition de Rice semble la plus fréquemment reprise, quoique les effets négatifs soient largement plus étudiés que les effets positifs.

Il convient de bien distinguer l'allélopathie de deux notions apparentées : la compétition et l'autotoxicité. *Sensu stricto*, la compétition se rapporte à l'exploitation de ressources limitées présentes dans l'environnement (ensoleillement, eau, nutriments...), et dépend donc de la capacité d'une espèce à accaparer ces ressources efficacement, au détriment des autres (Muller, 1969). L'allélopathie est caractérisée par la libération de composés chimiques dans l'environnement (ajout d'un élément à l'environnement), que la compétition (soustraction d'une ressource de l'environnement) ne présente pas. Les deux concepts, distincts, contribuent à la capacité globale d'une espèce à prendre le dessus sur les autres dans un habitat donné. Il est intéressant de noter que la difficulté à séparer les deux phénomènes lors d'expériences *in situ* constitue un défi majeur pour qui souhaite évaluer l'importance biologique de l'allélopathie (Fuerst and Putnam, 1983; Inderjit and del Moral, 1997).

L'autotoxicité, quant à elle, est un sous-ensemble de l'allélopathie circonscrit aux cas où la plante donneuse et la plante receveuse appartiennent à une même espèce et où l'impact de la première sur la seconde est strictement négatif (Singh et al., 1999). Cet effet intraspécifique peut être évité si la plante donneuse possède des mécanismes spécifiques de résistance (Sirikantaramas et al., 2008b; Dayan and Duke, 2009). Dans la plupart des exemples connus, ces mécanismes consistent en la détoxification et/ou la séquestration du composé toxique. Ainsi, la glycosylation est un processus couramment mis en œuvre pour atténuer la toxicité d'un composé (Sirikantaramas et al., 2008b). Par exemple, la benzoxazolin-2(3H)-one (BOA), une benzoxazinone phytotoxique produite notamment par des poacées, dont le maïs, est stockée sous forme glycosylée dans la vacuole des cellules productrices (Sicker et al., 2000). Lorsqu'une source exogène de BOA est administrée à des plants de maïs, la BOA est transformée par glycosylation en un produit non toxique (Sicker et al., 2000, 2001).

Un autre mécanisme de résistance peut être illustré à travers le cas particulier de la camptothécine, un alcaloïde produit notamment par *Camptotheca acuminata* Decne, connu pour son activité antitumorale. Son efficacité en tant que traitement contre le cancer tient à sa faculté à inhiber l'action de la topoisomérase I, enzyme régulant la structure de l'ADN. Du fait du caractère ubiquitaire de cette cible dans le monde du

vivant, la camptothécine s'avère toxique pour une large gamme d'organismes, notamment les plantes. Les espèces végétales sécrétant la molécule ont toutefois développé un mode de résistance particulier : des mutations ponctuelles de la protéine topoisomérase I leur confèrent une résistance spécifique (Sirikantaramas et al., 2008a). Bien que suspectée (Dayan and Duke, 2009), l'existence d'un type de résistance à un composé allélochimique basé sur une modification de la cible de ce composé chez l'espèce donneuse n'est, à notre connaissance, pas étayée à l'heure actuelle par des cas concrets rapportés dans la littérature. L'exemple de la camptothécine donne toutefois des raisons de penser qu'un tel type de résistance pourrait avoir une réelle importance biologique dans le contexte de l'allélopathie.

1.1.2. Composés allélochimiques : mécanismes de libération, diversité des structures et des modes d'action

Les composés allélochimiques peuvent être émis dans l'environnement selon différents mécanismes illustrés par la figure 1. L'exsudation racinaire, la lixiviation des parties aériennes, la volatilisation et la décomposition d'une partie ou de la

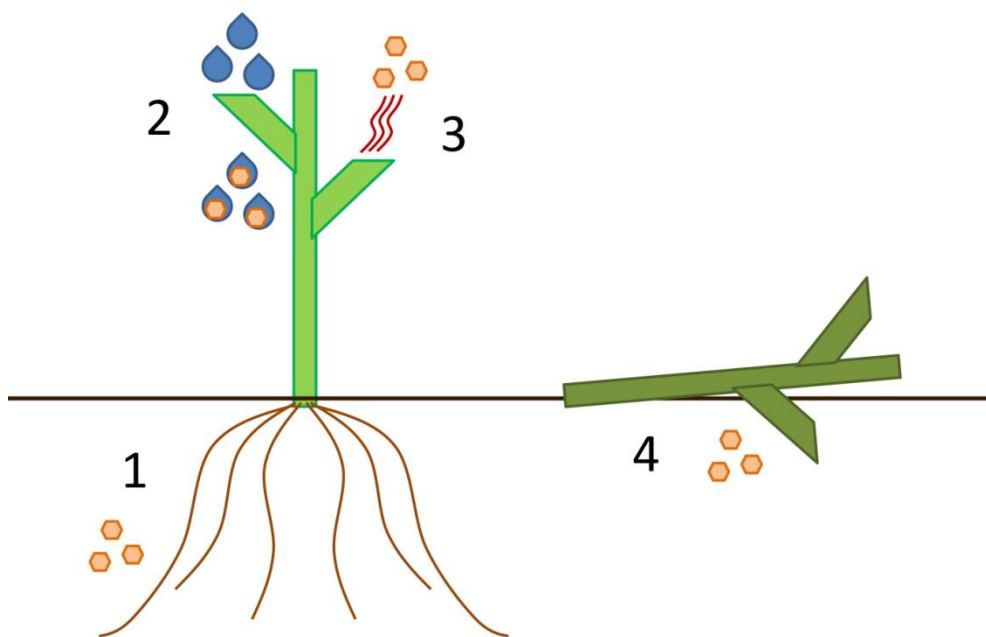


Figure 1. Modes d'émission des composés allélochimiques dans l'environnement. 1 : exsudation racinaire, 2 : lixiviation des parties aériennes, 3 : volatilisation, 4 : décomposition d'une partie ou de l'intégralité de la plante. Emission pathways of allelochemical compounds into the environment. 1: root exudation, 2: aerial parts leaching, 3: volatilisation, 4: decomposition of plant or plant parts.

totalité d'une plante sont autant de voies de libération possibles.

L'exsudation racinaire est par exemple observée chez le sorgho (*Sorghum bicolor* L.) qui excrète dans la rhizosphère la sorgoléone, une benzoquinone possédant une queue hydrophobe (voir figure 2 pour les structures des molécules évoquées dans le texte) (Dayan et al., 2009b). Il en est de même pour l'hordénine, un alcaloïde produit par l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (Lovett et al., 1994).

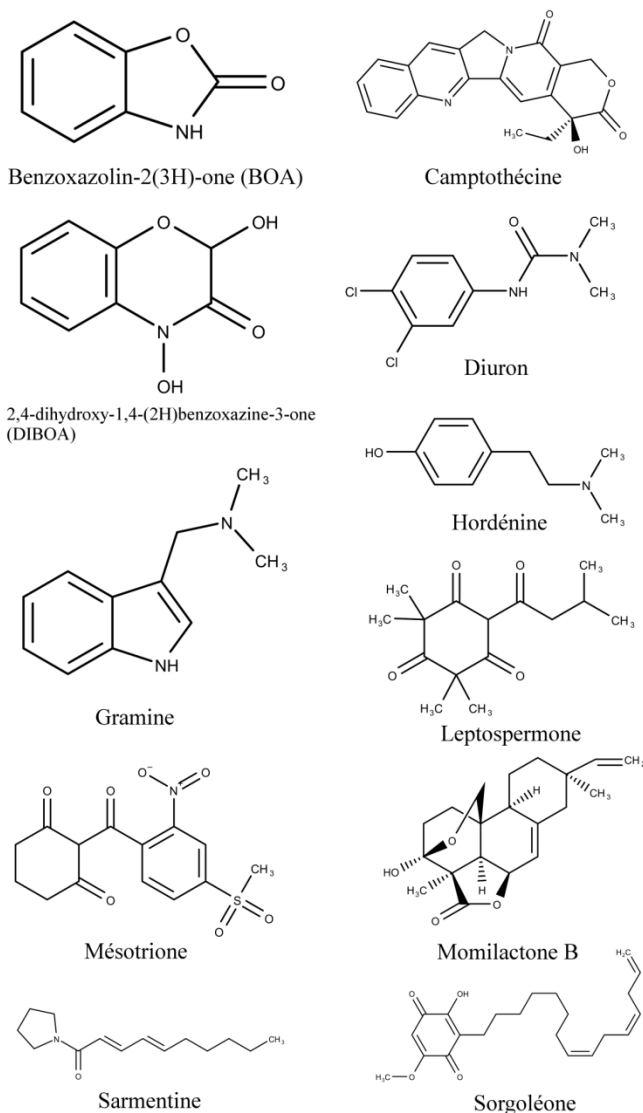


Figure 2. Structures chimiques des composés évoqués dans cet article. Chemical structures of the compounds cited in this article.

Pour illustrer la lixiviation des parties aériennes d'une plante, nous pouvons citer le cas d'une espèce de fougère, *Pteridium aquilinum* L., dont les frondes émettent des composés phytotoxiques dans l'environnement lorsqu'elles subissent une averse (Stephen R. Gliessman and Cornelius H. Muller, 1972). Chez diverses espèces d'eucalyptus, de l'eau ayant ruisselé sur les troncs s'est avérée particulièrement phytotoxique (May and Ash, 1990).

La volatilisation apparaît, quant à elle, comme la voie de dissémination dans l'environnement de monoterpènes produits par *Salvia leucophylla* Greene (Muller and Muller, 1964). Ces composés sont retrouvés dans les feuilles de *S. leucophylla*, d'où ils s'échappent par volatilisation, laquelle est favorisée par le climat méditerranéen de la région d'origine de cette plante (Reigosa Roger et al., 2006). La matière colloïdale présente dans la terre engendre leur fixation par adsorption sur le sol d'où ils peuvent exercer leur effet toxique sur les plantes environnantes (Muller and del Moral, 1966).

Enfin, il a été montré que des résidus de seigle (*Secale cereale* L.) inhibent la germination et la croissance de diverses plantes (Jane P. Barnes and Alan R. Putnam, 1986). Des résultats similaires ont également été obtenus, entre autres, avec des résidus de riz (Chou and Lin, 1976). Ces éléments donnent notamment matière à réflexion quant aux impacts positifs et négatifs que l'allélopathie peut avoir sur les systèmes agricoles (voir section 4.1).

La plupart des composés allélochimiques sont des métabolites secondaires. Ne participant pas directement au développement des plantes, les métabolites secondaires ont longtemps été considérés comme des sous-produits du métabolisme primaire. Requérant toutefois une dépense d'énergie et de ressources pour leur production, ils sont désormais considérés comme des acteurs à part entière dans l'adaptation d'une plante à son environnement (Bourgaud et al., 2001), jouant un rôle de messenger ou de composé de défense (Wink, 2003).

Les métabolites secondaires utiles à la défense des plantes peuvent avoir un large spectre d'activité. Il en est ainsi pour la gramine, par exemple, alcaloïde produit par l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et dont la toxicité a été démontrée sur des champignons (Wippich and Wink, 1985; Matsuo et al., 2001), bactéries (Sepulveda and Corcuera, 1990), mammifères (Gallagher et al., 1964; Goelz et al., 1980), insectes (Corcuera, 1984, 1993) et plantes (Liu and Lovett, 1993; Kremer and Ben-Hammouda, 2009). D'un point de vue évolutif, cette multifonctionnalité se comprend en tant qu'optimisation des ressources de la plante pour lutter contre un large éventail d'ennemis potentiels (Wink, 2003). Les composés allélochimiques, entendus comme affectant le développement des plantes, peuvent donc avoir un rôle plus large.

Structurellement, les composés identifiés à ce jour comme allélochimiques présentent une grande diversité dont un petit aperçu est donné par la figure 2, qui illustre les structures des molécules évoquées dans cet article. Alcaloïdes (Liu and Lovett, 1993), terpénoïdes (Kato-Noguchi and Peters, 2013), composés phénoliques (Li et al., 2010), quinones (Dayan et al., 2010) et flavonoïdes (Weston and Mathesius, 2013; Huang et al., 2015) sont autant d'exemples de classes chimiques auxquelles les composés allélochimiques peuvent appartenir. Un large panel de modes d'action semble répondre à cette importante variété des structures. Etablir une liste exhaustive des mécanismes d'action attribués aux composés

allélochimiques identifiés à ce jour serait une gageure et ne constitue pas l'objectif de cette revue. Nous renverrons à d'autres références pour un aperçu général des cibles supposées de différents composés allélochimiques (voir par exemple (Macías, 2004; Reigosa Roger et al., 2006; Dayan and Duke, 2014)).

Nous insisterons ici sur la difficulté d'identifier un mécanisme d'action unique ou principal, au travers notamment de l'exemple de la sarmentine, un composé phytotoxique isolé à partir des fruits du poivrier long (*Piper longum* L.) (Huang et al., 2010). Il a, en effet, été montré que la sarmentine est capable de déstabiliser la membrane plasmique, d'inhiber le photosystème II et d'inhiber l'énoyl-ACP réductase (intervenant dans la synthèse d'acides gras) sans que l'on puisse affirmer pour chacune de ces actions si elle est plus ou moins responsable de la phytotoxicité du composé (Dayan et al., 2015).

L'écart qui existe souvent entre expériences *in vitro* et expériences *in vivo* ne doit pas non plus être négligé lorsque le mode d'action d'une molécule est investigué. Ainsi, lors d'expériences sur des chloroplastes isolés, la capacité de la sorgoléone à inhiber le photosystème II s'est avérée aussi importante que celle du diuron, un puissant herbicide, suggérant que ce pourrait être son principal mode d'action (Gonzalez et al., 1997). Des études ultérieures réalisées sur *Abutilon theophrasti* Medik. ont néanmoins montré que la sorgoléone n'est pas transloquée des racines vers le feuillage chez les plantes matures et que l'application de la molécule sur des feuilles ne perturbe le processus de photosynthèse que chez les plants âgés de 4 jours ou moins (Dayan et al., 2009b). D'autres mécanismes, comme l'inhibition de l'H⁺-ATPase racinaire (Hejl and Koster, 2004), doivent donc être responsables de la toxicité de la sorgoléone sur des plantes plus âgées (Dayan et al., 2010).

L'identification de la principale cible moléculaire d'un composé allélochimique est un processus souvent complexe, en particulier lorsque la phytotoxine possède un mode d'action inédit. Le développement de protocoles définis permettant d'obtenir rapidement des indices sur les mécanismes intervenant dans la toxicité d'une molécule est donc particulièrement souhaitable (Dayan et al., 2000; Dayan and Watson, 2011).

1.1.3. Facteurs influençant la production des composés allélochimiques

La production par une plante de molécules allélochimiques est influencée par différents facteurs intrinsèques et extrinsèques. Le premier facteur que l'on peut citer tient au génotype de la plante considérée. Il a, par exemple, été montré que la quantité de gramine produite par des plants d'orge peut varier fortement en fonction du cultivar considéré (Hanson et al., 1983; Hoult and Lovett, 1993). En particulier, les cultivars les plus récents semblent posséder une faculté à produire la gramine inférieure à celle des variétés ancestrales. De cette observation est née l'idée que la pression de sélection humaine essentiellement dirigée vers des rendements plus élevés a pu engendrer une perte de certains traits génétiques liés au potentiel allélopathique de l'orge, intuition renforcée par une étude menée sur 127 variétés d'orge (Bertholdsson, 2004). Dans le cas de la gramine spécifiquement, une voie de biosynthèse a été proposée, au départ de laquelle se trouve le tryptophane (Bowden and Marion, 1951) et dont deux intermédiaires ont été identifiés (Gower and Leete, 1963). Il a par ailleurs été rapporté qu'il manque au cultivar Proctor de l'orge la

capacité à synthétiser le premier intermédiaire stable connu de cette biosynthèse à partir du tryptophane, expliquant sa déficience en gramine (Hanson et al., 1983). En postulant que le chaînon manquant chez le cultivar proctor est une enzyme, donc une molécule issue d'un gène, cet exemple semble précisément mettre en lumière l'influence du patrimoine génétique et de son expression sur la production de composés de défense.

Le contrôle génétique associé au pouvoir allélopathique d'une plante peut également être illustré en prenant l'exemple du riz (*Oryza sativa* L.). Aux tentatives d'identifier des gènes liés à l'activité allélopathique globale de certains cultivars (Jensen et al., 2001) ont succédé des études permettant une compréhension plus détaillée des mécanismes mis en œuvre. D'abord, les momilactones, en particulier la momilactone B, ont été reconnues comme composés allélochimiques majeurs du riz (Kato-Noguchi and Ino, 2003; Kato-Noguchi and Peters, 2013). Dans un deuxième temps, le processus de biosynthèse de ces molécules a été élucidé, et certains gènes essentiels à son déroulement identifiés (Peters, 2006; Shimura et al., 2007). Enfin, l'inactivation de deux de ces gènes a résulté en une diminution significative du potentiel allélopathique de ces mutants par rapport au type sauvage (Xu et al., 2011), accréditant les précédents postulats et l'importance de la relation entre le génotype et le pouvoir allélopathique du riz.

L'âge et le stade de développement de la plante donneuse peuvent également influencer la production de composés allélochimiques. Ainsi, l'évolution de la quantité d'hordénine produite au cours du temps par des pousses d'orge initialement âgées de 5 jours transplantées dans un système hydroponique a été suivie par Liu et Lovett (Liu and Lovett, 1993). Il en est ressorti que les plants ont produit de l'hordénine durant l'entièreté des 60 jours de la période considérée, mais que le niveau de production maximal fut atteint au 36^{ème} jour. Des fluctuations de la quantité de 2,4-dihydroxy-1,4-(2H)benzoxazine-3-one (DIBOA), une benzoxazinone phytotoxique, retrouvée dans les tissus de différents cultivars de seigle (*Secale cereale* L.) ont également été observées en fonction de l'âge et du stade de développement des plantes considérées (Nilda R. Burgos et al., 1999; Reberg-Horton et al., 2005).

Enfin, l'environnement de la plante peut lui aussi jouer un rôle modulateur dans le niveau d'expression de certains traits liés à l'allélopathie. Ces facteurs environnementaux peuvent être biotiques ou abiotiques. Pour reprendre le cas de la gramine chez l'orge, Hanson et al. ont rapporté une augmentation de la présence de gramine dans les plants d'orge lorsque ceux-ci sont cultivés à des températures supérieures à la température optimale de culture (Hanson et al., 1983). Matsuo et al. ont, quant à eux, observé une stimulation de la production de gramine par des pousses d'orge après inoculation de l'oïdium de l'orge ou du blé, ainsi qu'après un stress mécanique (Matsuo et al., 2001). Le niveau de production d'hordénine par l'orge est aussi sujet à de fortes variations dépendant de l'environnement, une exposition lumineuse de faible intensité pouvant par exemple engendrer une augmentation drastique (Lovett et al., 1994). L'impact de divers facteurs environnementaux sur la quantité de sorgoléone produite par les racines de sorgho a également été analysé (Dayan, 2006). Par exemple, une forte réduction est constatée lorsque la température s'écarte de la gamme 25°C - 35°C, tandis que des

changements de la longueur d'onde de la lumière à laquelle sont exposées les pousses de sorgho provoquent aussi des variations dans le niveau de sorgoléone synthétisée.

1.1.4. L'allélopathie dans les systèmes agricoles

Au vu de ce que représente l'allélopathie, ce phénomène apparaît comme un potentiel outil pour les agriculteurs. Différentes modalités peuvent être envisagées pour exploiter avantageusement cet ensemble d'effets dans le cadre de la lutte contre les adventices, que nous proposons de séparer en deux groupes principaux : la voie biologique et la voie chimique.

1.1.4.1. La voie biologique

La voie biologique de l'exploitation de l'allélopathie repose sur l'utilisation de plantes capables d'émettre des composés allélochimiques. Dans sa version la plus directe, cela consiste à cultiver des plantes d'intérêt économique possédant un potentiel allélopathique élevé (Wu et al., 1999). Comme discuté précédemment, la capacité d'une plante à produire et émettre des composés allélochimiques dépend notamment de son génotype. Par conséquent, certains cultivars peuvent s'avérer plus efficaces que d'autres pour inhiber le développement d'adventices, et pourraient donc être privilégiés afin de réduire l'usage d'herbicides. Le cas du riz semble être un exemple prometteur en la matière, puisque différents cultivars associés à un pouvoir allélopathique supérieur ont pu être identifiés (Olofsdotter et al.,; Dilday et al., 1994).

Ceci pourrait toutefois n'être considéré que comme un point de départ, car la capacité d'une espèce à produire et émettre des composés allélochimiques pourrait être intégrée à des programmes de sélection végétale (Bertholdsson, 2010; Worthington and Reberg-Horton, 2013). Alternativement, le génie génétique pourrait augmenter l'expression de certains gènes liés au pouvoir allélopathique d'une espèce ou assurer leur transfert vers une espèce ne les présentant pas naturellement (Duke et al., 2001; Worthington and Reberg-Horton, 2013). Au-delà des considérations techniques et éthiques liées à la création d'organismes transgéniques, l'autotoxicité pourrait être un frein dans un tel cas de figure, si l'espèce ne possède, naturellement ou artificiellement, pas de mécanismes de résistance vis-à-vis du ou des composé(s) allélochimique(s) nouvellement produit(s).

Si l'utilisation de cultivars hautement allélopathiques d'espèces d'intérêt économique paraît intéressante dans le cadre de la lutte contre les adventices, elle soulève néanmoins la question de l'impact sur les rendements. En effet, la synthèse de composés allélochimiques requérant la mobilisation de ressources par la plante, elle pourrait influencer négativement la production de biomasse. Une corrélation négative entre pouvoir allélopathique et rendement en grains a ainsi été rapportée chez le blé (Bertholdsson, 2010), mais trop peu d'études se sont intéressées à la question jusqu'à présent.

D'autres stratégies, moins directes, existent pour tirer profit du phénomène de l'allélopathie. La mise en place d'une culture associée impliquant une espèce allélopathique est un exemple de pratique agricole intégrée qui pourrait permettre de tirer parti de l'allélopathie (Putnam and Duke, 1978; Singh et al., 2001). Cette disposition présuppose évidemment que les composés allélochimiques relargués par

l'espèce allélopathique sont mieux tolérés par l'autre espèce cultivée que par les adventices.

Les cultures de couverture ou l'utilisation de résidus végétaux sont d'autres exemples de pratiques agricoles pouvant grandement gagner en efficacité si les plantes impliquées possèdent un pouvoir allélopathique élevé (Bhowmik and Inderjit, 2003). Ainsi, Putnam et al. ont rapporté que le maintien sur champ des résidus de différentes cultures, notamment de seigle, engendre une diminution drastique de la présence d'adventices (Putnam et al., 1983). Aux facteurs physiques (tels que l'ombre et la diminution de température du sol) s'ajoute selon les auteurs une importante contribution allélopathique.

Concluons cette section par une mise en garde : dès lors qu'on admet la possibilité qu'une plante émette dans l'environnement des composés susceptibles d'influencer le développement d'autres plantes, on ne peut faire l'économie d'une réflexion sur la persistance de ces composés dans l'environnement, et leur potentiel impact sur les cultures présentes et à venir. Si la biodégradabilité des composés naturels est généralement supposée supérieure à celle des herbicides synthétiques (voir plus bas), cette hypothèse devrait néanmoins être testée spécifiquement pour chaque cas de figure. Ainsi, la gestion des résidus, par exemple, pourrait avoir un effet négatif non seulement immédiat sur le développement des adventices, mais aussi prolongé jusqu'à affecter la culture subséquente.

1.1.4.2. La voie chimique

L'exploration de ce que nous appelons ici « la voie chimique » repose sur l'intuition que l'allélopathie, et plus exactement les composés allélochimiques qu'elle met en œuvre, constitue avant tout un formidable réservoir de molécules nouvelles dont les modes d'action façonnés par l'histoire évolutive des espèces se distinguent des modes d'action souvent redondants des herbicides synthétiques traditionnels (Duke et al., 2000). Cette idée de réserve inexplorée est renforcée par une analyse des données d'enregistrements de produits phytosanitaires aux Etats Unis : environ 30% des insecticides et fongicides enregistrés sur la période 1997-2010 étaient des produits naturels ou dérivés de produits naturels ; sur la même période, la proportion n'est que de 8% en ce qui concerne les herbicides (Cantrell et al., 2012). La possibilité de découvrir par cette voie d'exploration de nouveaux modes d'action s'avère particulièrement intéressante compte tenu du développement de résistances aux herbicides traditionnels que nous avons déjà évoqué.

A cela s'ajoute le fait que les molécules d'origine naturelle sont généralement jugées plus biodégradables que la plupart des composés synthétiques, car leurs structures, plus compatibles avec le monde du vivant, sont globalement plus facilement métabolisées (Dayan et al., 2009a). Cette généralité devrait cependant, comme déjà énoncé, systématiquement être confrontée à la réalité de chaque cas spécifiquement considéré.

L'exploitation la plus évidente de ces phytotoxines d'origine végétale, une fois isolées, identifiées et caractérisées, consiste à les utiliser telles quelles comme bioherbicides. Une autre possibilité serait d'établir pour une molécule d'intérêt donnée une relation structure-fonction à partir de laquelle la conception de nouveaux herbicides plus efficaces, basés ou non sur la structure du composé allélochimique

initial, deviendrait possible (Dayan and Duke, 2014). Cette seconde possibilité s'avère particulièrement intéressante si la molécule de départ agit selon un mode d'action inédit, mais implique potentiellement la perte de la biodégradabilité supérieure attribuée aux composés naturels, selon les modifications chimiques effectuées.

Les tricétones (par exemple la mésotrione) constituent un très bon exemple d'herbicides développés à partir d'un composé allélochimique : la leptospermone (Lee et al., 1997). Cette molécule produite par différentes espèces du genre *Callistemon* possède des propriétés phytotoxiques se manifestant par un blanchissage des parties aériennes. Cette observation a conduit à étudier l'action herbicide de tricétones synthétiques, analogues structuraux de la leptospermone, qui se sont révélés particulièrement efficaces. Ces composés inhibent la p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), enzyme qui, chez les plantes, joue un rôle crucial dans la biosynthèse des caroténoïdes (Lee et al., 1998). Ces derniers, alors en quantités anormalement basses, n'assurent plus la photoprotection des molécules de chlorophylle qui sont détruites, engendrant un dysfonctionnement de la photosynthèse et la décoloration du feuillage. Ces tricétones constituent donc un bon exemple de molécules produites sur la base d'un composé allélochimique, ayant de plus permis d'introduire l'un des seuls modes d'action inédits apparus lors des 20 dernières années sur le marché des herbicides (Dayan and Duke, 2014).

1.1.5. L'allélopathie : « nouvelle arme » des plantes invasives ?

Nous terminerons cette revue en évoquant un rôle écologique important hypothétiquement attribué à l'allélopathie concernant les espèces végétales allochtones prenant l'avantage sur les plantes indigènes. Il a été proposé qu'une clé du succès de certaines de ces plantes serait la production de composés allélochimiques particulièrement efficaces car visant des espèces autochtones n'ayant pas co-évolué avec les espèces invasives (Callaway and Ridenour,). Cette hypothèse dite « des nouvelles armes » accorde donc à l'allélopathie une place potentiellement considérable dans ce type de contexte écologique, mais les exemples proposés sont à l'heure actuelle trop rares et insuffisamment investigués pour connaître l'importance réelle de ce facteur (van Kleunen et al., 2018).

1.1.6. Conclusion

A l'issue de cette revue, nous espérons avoir transmis au lecteur une vision générale et introductive de ce qu'est l'allélopathie, de quelques grands principes régissant son fonctionnement et de certains rôles qu'elle peut jouer dans la nature ou dans les systèmes agricoles. Ces rôles ne pourront être définis avec précision qu'en poursuivant les efforts d'identification de composés allélochimiques et d'élucidation de leurs mécanismes d'action et de leurs voies de synthèse. A ces défis de recherche fondamentale s'ajoutent des problèmes posés à la recherche plus appliquée, concernant notamment la génération de cultivars à haut potentiel allélopathique et le développement de pratiques agricoles permettant leur exploitation optimale.

1.1.7. Références

Alavanja, M.C.R., J.A. Hoppin, and F. Kamel. 2004. Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25(1): 155–197. doi: 10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020.

Annett, R., H.R. Habibi, and A. Hontela. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34(5): 458–479. doi: 10.1002/jat.2997.

Belz, R., K. Hurle, and S. Duke. 2005. Dose-response—A Challenge for Allelopathy? *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 3(2): 173–211. doi: 10.2201/nonlin.003.02.002.

Benbrook, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28(1). doi: 10.1186/s12302-016-0070-0.

Bertholdsson, N.-O. 2004. Variation in allelopathic activity over 100 years of barley selection and breeding. *Weed Res.* 44(2): 78–86. doi: 10.1111/j.1365-3180.2003.00375.x.

Bertholdsson, N.-O. 2010. Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. *Weed Res.* 50(1): 49–57. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00754.x.

Bhowmik, P.C., and Inderjit. 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Prot.* 22(4): 661–671. doi: 10.1016/S0261-2194(02)00242-9.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161(5): 839–851. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3.

Bowden, K., and L. Marion. 1951. THE BIOGENESIS OF ALKALOIDS: IV. THE FORMATION OF GRAMINE FROM TRYPTOPHAN IN BARLEY. *Can. J. Chem.* 29(12): 1037–1042. doi: 10.1139/v51-121.

Callaway, R.M., and W.M. Ridenour. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front. Ecol. Environ.* 2(8): 436–443. doi: 10.1890/1540-9295(2004)002[0436:NWISAT]2.0.CO;2.

Cantrell, C.L., F.E. Dayan, and S.O. Duke. 2012. Natural Products As Sources for New Pesticides. *J. Nat. Prod.* 75(6): 1231–1242. doi: 10.1021/np300024u.

Chou, C.-H., and H.-J. Lin. 1976. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. *J. Chem. Ecol.* 2(3): 353–367. doi: 10.1007/BF00988282.

Corcuera, L.J. 1984. Effects of indole alkaloids from Gramineae on aphids. *Phytochemistry* 23(3): 539–541.

Corcuera, L.J. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry* 33(4): 741–747.

Dayan, F.E. 2006. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. *Planta* 224(2): 339–346. doi: 10.1007/s00425-005-0217-5.

Dayan, F.E., C.L. Cantrell, and S.O. Duke. 2009a. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17(12): 4022–4034. doi: 10.1016/j.bmc.2009.01.046.

Dayan, F.E., and S.O. Duke. 2009. Biological Activity of Allelochemicals. p. 361–384. *In* Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (eds.), *Plant-derived Natural Products*. Springer US, New York, NY.

Dayan, F.E., and S.O. Duke. 2014. Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. *Plant Physiol.* 166(3): 1090–1105. doi: 10.1104/pp.114.239061.

Dayan, F.E., J. Howell, and J.D. Weidenhamer. 2009b. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *J. Exp. Bot.* 60(7): 2107–2117. doi: 10.1093/jxb/erp082.

Dayan, F.E., D.K. Owens, S.B. Watson, R.N. Asolkar, and L.G. Boddy. 2015. Sarmentine, a natural herbicide from *Piper* species with multiple herbicide mechanisms of action. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00222.

Dayan, F.E., A.M. Rimando, Z. Pan, S.R. Baerson, A.L. Gimsing, and S.O. Duke. 2010. Sorgoleone. *Phytochemistry* 71(10): 1032–1039. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.011.

Dayan, F.E., J.G. Romagni, and S.O. Duke. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem. Ecol.* 26(9): 2079–2094.

Dayan, F.E., and S.B. Watson. 2011. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101(3): 182–190. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.09.004.

Dilday, R., J. Lin, and W. Yan. 1994. Identification of allelopathy in the USDA-ARS rice germplasm collection. *Aust. J. Exp. Agric.* 34(7): 907. doi: 10.1071/EA9940907.

Duke, S.O. 2012. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Manag. Sci.* 68(4): 505–512. doi: 10.1002/ps.2333.

Duke, S. o., F. e. Dayan, J. g. Romagni, and A. m. Rimando. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Res.* 40(1): 99.

Duke, S.O., B.E. Scheffler, F.E. Dayan, L.A. Weston, and E. Ota. 2001. Strategies for Using Transgenes to Produce Allelopathic Crops. *Weed Technol.* 15(4): 826–834. doi: 10.1614/0890-037X(2001)015[0826:SFUTTP]2.0.CO;2.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed). 2017. The future of food and agriculture: trends and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fuerst, E.P., and A.R. Putnam. 1983. Separating the competitive and allelopathic components of interference: Theoretical principles. *J. Chem. Ecol.* 9(8): 937–944. doi: 10.1007/BF00982203.

Gallagher, C.H., J.H. Koch, R.M. Moore, and J.D. Steel. 1964. Toxicity of *Phalaris tuberosa* for sheep. *Nature* 204(4958): 542–545.

Goelz, M.F., H. Rothenbacher, J.P. Wiggins, W.A. Kendall, and T.V. Hershberger. 1980. Some hematological and histopathological effects of the alkaloids gramine and hordenine on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Toxicology* 18(2): 125–131.

Gonzalez, V.M., J. Kazimir, C. Nimbal, L.A. Weston, and G.M. Cheniae. 1997. Inhibition of a Photosystem II Electron Transfer Reaction by the Natural Product Sorgoleone. *J. Agric. Food Chem.* 45(4): 1415–1421. doi: 10.1021/jf960733w.

Gower, B.G., and E. Leete. 1963. Biosynthesis of Gramine: The Immediate Precursors of the Alkaloid. *J. Am. Chem. Soc.* 85(22): 3683–3685. doi: 10.1021/ja00905a034.

Hanson, A.D., K.M. Ditz, G.W. Singletary, and T.J. Leland. 1983. Gramine Accumulation in Leaves of Barley Grown under High-Temperature Stress. *Plant Physiol.* 71(4): 896–904. doi: 10.1104/pp.71.4.896.

Heap, I. 2014. Herbicide Resistant Weeds. p. 281–301. *In* Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht.

Hejl, A.M., and K.L. Koster. 2004. The Allelochemical Sorgoleone Inhibits Root H⁺-ATPase and Water Uptake. *J. Chem. Ecol.* 30(11): 2181–2191. doi: 10.1023/B:JOEC.0000048782.87862.7f.

Hoult, A.H.C., and J.V. Lovett. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. III. A method for identification and quantification of hordenine and gramine in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Chem. Ecol.* 19(10): 2245–2254.

Huang, H., C.M. Morgan, R.N. Asolkar, M.E. Koivunen, and P.G. Marrone. 2010. Phytotoxicity of Sarmentine Isolated from Long Pepper (*Piper longum*) Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 58(18): 9994–10000. doi: 10.1021/jf102087c.

Huang, H., X. Xiao, A. Ghadouani, J. Wu, Z. Nie, C. Peng, X. Xu, and J. Shi. 2015. Effects of Natural Flavonoids on Photosynthetic Activity and Cell Integrity in *Microcystis aeruginosa*. *Toxins* 7(1): 66–80. doi: 10.3390/toxins7010066.

Inderjit, and R. del Moral. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *Bot. Rev.* 63(3): 221–230. doi: 10.1007/BF02857949.

Jane P. Barnes, and Alan R. Putnam. 1986. Evidence for Allelopathy by Residues and Aqueous Extracts of Rye (*Secale cereale*). *Weed Sci.* 34(3): 384–390.

Jensen, L.B., B. Courtois, L. Shen, Z. Li, M. Olofsdotter, and R.P. Mauleon. 2001. Locating Genes Controlling Allelopathic Effects against Barnyardgrass in Upland Rice. *Agron. J.* 93(1): 21. doi: 10.2134/agronj2001.93121x.

Kato-Noguchi, H., and T. Ino. 2003. Rice seedlings release momilactone B into the environment. *Phytochemistry* 63(5): 551–554. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00194-8.

Kato-Noguchi, H., and R.J. Peters. 2013. The Role of Momilactones in Rice Allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 39(2): 175–185. doi: 10.1007/s10886-013-0236-9.

Kim, K.-H., E. Kabir, and S.A. Jahan. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575: 525–535. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.

van Kleunen, M., O. Bossdorf, and W. Dawson. 2018. The Ecology and Evolution of Alien Plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 49(1): null. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062654.

Koocheki, A., B. Lalegani, and S.A. Hosseini. 2013. Ecological Consequences of Allelopathy. p. 23–38. *In* Allelopathy. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kremer, R.J., and M. Ben-Hammouda. 2009. Allelopathic Plants. 19. Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Allelopathy J.* 24(2). <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth type=crawler&jrnl=09714693&AN=44329536&h=7BcTV7sEl2gKhMzfM5H5DOjjax1fsGUTbHRgvv17y2ISDZRvzhU6lKsuE4xbfWRk9M%2ByiHWZ2YjzCEgUmOqJOG%3D%3D&crl=c> (accessed 26 May 2014).

Lambers, H., F.S. Chapin, and T.L. Pons. 2008. *Plant physiological ecology*. 2nd ed. Springer, New York.

Lee, D.L., C.G. Knudsen, W.J. Michaely, H.-L. Chin, N.H. Nguyen, C.G. Carter, T.H. Cromartie, B.H. Lake, J.M. Shribbs, and T. Fraser. 1998. The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides†. *Pestic. Sci.* 54(4): 377–384. doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199812)54:4<377::AID-PS827>3.0.CO;2-0.

Lee, D.L., M.P. Prisbylla, T.H. Cromartie, D.P. Dagarin, S.W. Howard, W. McLean Provan, M.K. Ellis, T. Fraser, and L.C. Mutter. 1997. The Discovery and Structural Requirements of Inhibitors of p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Weed Sci.* 45(5): 601–609.

Li, Z.-H., Q. Wang, X. Ruan, C.-D. Pan, and D.-A. Jiang. 2010. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules* 15(12): 8933–8952. doi: 10.3390/molecules15128933.

Liu, D.L., and J.V. Lovett. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* 19(10): 2231–2244.

Lovett, J.V., A.H.C. Houlst, and O. Christen. 1994. Biologically active secondary metabolites of barley. IV. Hordenine production by different barley lines. *J. Chem. Ecol.* 20(8): 1945–1954. doi: 10.1007/BF02066235.

Macías, F.A. 2004. *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Matsuo, H., K. Taniguchi, T. Hiramoto, T. Yamada, Y. Ichinose, K. Toyoda, K. Takeda, and T. Shiraishi. 2001. Gramine Increase Associated with Rapid and Transient Systemic Resistance in Barley Seedlings Induced by Mechanical and Biological Stresses. *Plant Cell Physiol.* 42(10): 1103–1111. doi: 10.1093/pcp/pce139.

May, F.E., and J.E. Ash. 1990. An Assessment of the Allelopathic Potential of Eucalyptus. *Aust. J. Bot.* 38(3): 245–254.

Muller, C.H. 1969. Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio* 18(1–6): 348–357. doi: 10.1007/BF00332847.

Muller, C.H., and R. del Moral. 1966. Soil Toxicity Induced by Terpenes from *Salvia leucophylla*. *Bull. Torrey Bot. Club* 93(2): 130. doi: 10.2307/2483755.

Muller, W.H., and C.H. Muller. 1964. Volatile Growth Inhibitors Produced by *Salvia* Species. *Bull. Torrey Bot. Club* 91(4): 327. doi: 10.2307/2483297.

Nilda R. Burgos, Ronald E. Talbert, and John D. Mattice. 1999. Cultivar and Age Differences in the Production of Allelochemicals by *Secale cereale*. *Weed Sci.* 47(5): 481–485.

Olofsdotter, Navarez, Rebulanan, and Streibig. Weed-suppressing rice cultivars – does allelopathy play a role? *Weed Res.* 39(6): 441–454. doi: 10.1046/j.1365-3180.1999.00159.x.

Peters, R.J. 2006. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry* 67(21): 2307–2317. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.08.009.

Putnam, A.R., J. DeFrank, and J.P. Barnes. 1983. Exploitation of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. *J. Chem. Ecol.* 9(8): 1001–1010.

- Putnam, A.R., and W.B. Duke. 1978. Allelopathy in Agroecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 16(1): 431–451. doi: 10.1146/annurev.py.16.090178.002243.
- Reberg-Horton, S.C., J.D. Burton, D.A. Danehower, G. Ma, D.W. Monks, J.P. Murphy, N.N. Ranells, J.D. Williamson, and N.G. Creamer. 2005. Changes over time in the allelochemical content of ten cultivars of rye (*Secale cereale* L.). *J. Chem. Ecol.* 31(1): 179–193. doi: 10.1007/s10886-005-0983-3.
- Reigosa Roger, M.J., N. Pedrol, and L. González. 2006. Allelopathy a physiological process with ecological implications. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Rice, E.L. 1984. Allelopathy. 2nd ed. Academic Press.
- Sepulveda, B.A., and L.J. Corcuera. 1990. Effect of gramine on the susceptibility of barley leaves to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 29(2): 465–467.
- Shimura, K., A. Okada, K. Okada, Y. Jikumaru, K.-W. Ko, T. Toyomasu, T. Sassa, M. Hasegawa, O. Kodama, N. Shibuya, J. Koga, H. Nojiri, and H. Yamane. 2007. Identification of a Biosynthetic Gene Cluster in Rice for Momilactones. *J. Biol. Chem.* 282(47): 34013–34018. doi: 10.1074/jbc.M703344200.
- Sicker, D., M. Frey, M. Schulz, and A. Gierl. 2000. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int. Rev. Cytol.* 198: 319–346.
- Sicker, D., B. Schneider, L. Hennig, M. Knop, and M. Schulz. 2001. Glycoside carbamates from benzoxazolin-2(3H)-one detoxification in extracts and exudates of corn roots. *Phytochemistry* 58(5): 819–825. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00299-0.
- Singh, H.P., D.R. Batish, and R.K. Kohli. 1999. Autotoxicity: Concept, Organisms, and Ecological Significance. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(6): 757–772. doi: 10.1080/07352689991309478.
- Singh, H.P., D.R. Batish, and R.K. Kohli. 2001. Allelopathy in Agroecosystems: An Overview. *J. Crop Prod.* 4(2): 1–41. doi: 10.1300/J144v04n02_01.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, and K. Saito. 2008a. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(18): 6782–6786. doi: 10.1073/pnas.0801038105.
- Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, and K. Saito. 2008b. Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochem. Rev.* 7(3): 467. doi: 10.1007/s11101-007-9080-2.
- Stephen R. Gliessman, and Cornelius H. Muller. 1972. THE PHYTOTOXIC POTENTIAL OF BRACKEN, *PTERIDIUM AQUILINUM* (L.) KUHN. *Madroño* 21(5,): 299–304.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2017. World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables.
- Weston, L.A., and U. Mathesius. 2013. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 39(2): 283–297. doi: 10.1007/s10886-013-0248-5.
- Willis, R.J. 2007. The History of Allelopathy. Springer Netherlands.

Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1): 3–19. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00300-5.

Wippich, C., and M. Wink. 1985. Biological properties of alkaloids. Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Experientia* 41(11): 1477–1479.

Worthington, M., and C. Reberg-Horton. 2013. Breeding Cereal Crops for Enhanced Weed Suppression: Optimizing Allelopathy and Competitive Ability. *J. Chem. Ecol.* 39(2): 213–231. doi: 10.1007/s10886-013-0247-6.

Wu, Pratley, Lemerle, and Haig. 1999. Crop cultivars with allelopathic capability. *Weed Res.* 39(3): 171–180. doi: 10.1046/j.1365-3180.1999.00136.x.

Xu, M., R. Galhano, P. Wiemann, E. Bueno, M. Tiernan, W. Wu, I.-M. Chung, J. Gershenzon, B. Tudzynski, A. Sesma, and R.J. Peters. 2011. Genetic evidence for natural product-mediated plant–plant allelopathy in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 193(3): 570–575. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04005.x.

1.2. La membrane plasmique

1.2.1. La membrane plasmique : description et fonctions principales

La membrane plasmique d'une cellule est la structure qui délimite cette cellule, c'est-à-dire la frontière entre son intérieur et son extérieur. En plus de son rôle de barrière, elle est le siège des échanges entre le cytoplasme et l'environnement cellulaire, régulant ce qui entre et ce qui sort de la cellule, et percevant les signaux reçus de l'extérieur pour y apporter une réponse adéquate.

Fondamentalement, la structure d'une membrane plasmique est une bicouche lipidique (deux feuillets de lipides accolés l'un à l'autre, voir section suivante pour davantage de détails) avec laquelle interagissent de nombreuses protéines, des glucides pouvant être liés à l'une et à l'autre composante.

Le degré d'interaction entre une protéine et la bicouche permet de distinguer deux grands types de protéines membranaires : les protéines membranaires intégrales (ou intrinsèques) et les protéines membranaires périphériques (ou extrinsèques). Les protéines membranaires intégrales sont intimement liées au cœur hydrophobe de la bicouche lipidique, tandis que les protéines membranaires périphériques sont quant à elles plus faiblement liées aux membranes, via des forces électrostatiques ou des liaisons hydrogènes (Stillwell, 2016a).

A ces deux grandes classes de protéines membranaires peut être ajouté un type supplémentaire, les protéines amphitropiques, pouvant être trouvées soit sous forme soluble dans le cytoplasme soit liées à la membrane, leur état dépendant de certaines conditions physiologiques.

Les protéines de la membrane plasmique, qui représentent environ 50% de son poids (l'autre moitié du poids étant attribuée aux lipides), occupent diverses fonctions cellulaires. Le transport membranaire et la signalisation cellulaire représentent deux grands types de rôles assurés notamment par les protéines membranaires.

Puisque la membrane plasmique a pour premier rôle de séparer la cellule de son environnement, différents mécanismes sont mis en oeuvre pour assurer le transport de diverses molécules au travers de cette membrane. Classiquement, les mécanismes de transport membranaire sont classés en deux groupes : le transport passif et le transport actif. Le premier ne nécessite pas l'utilisation directe d'énergie, et se fait suivant un gradient de concentration ou un gradient électrochimique qui peut exister entre les deux compartiments séparés par la membrane. A l'inverse, le transport actif requiert la consommation d'énergie et permet le transport d'un élément contre son gradient de concentration (rendant possible l'accumulation de cet élément par rapport à sa concentration dans l'environnement extracellulaire).

La diffusion simple est un mécanisme de transport passif au travers des lipides de la membrane dont l'efficacité dépend de l'affinité du soluté considéré pour les lipides. Pour le transport de solutés trop polaires pour diffuser librement dans la bicouche lipidique, la diffusion facilitée peut intervenir. La diffusion facilitée est également un type de transport passif, mais elle repose sur la présence de certaines protéines membranaires capables de transférer un soluté d'un côté de la membrane à l'autre (Yeagle, 2016). Ces protéines peuvent être des transporteurs ou des canaux.

Les transporteurs changent de conformation après avoir lié une molécule spécifique, ce changement de conformation permettant à ladite molécule d'être transférée de l'autre côté de la membrane. Les canaux peuvent être assimilés à des pores présents dans la membrane et permettant le passage de certaines molécules, par exemple des ions (canaux ioniques) ou des molécules d'eau (aquaporines), là aussi avec une spécificité importante. Les canaux ont généralement la faculté de s'ouvrir ou de se fermer selon, notamment, le potentiel membranaire ou la présence d'un ligand.

Des protéines membranaires sont également impliquées dans des mécanismes de transport actif. Il est possible de distinguer deux grands types de transport actif : le transport actif primaire, s'il repose sur de l'énergie chimique, très souvent issue de l'hydrolyse de l'ATP, et le transport actif secondaire, s'il repose sur l'établissement d'un gradient électrochimique.

Le transport actif primaire d'un soluté fait intervenir une protéine qui pompe directement la molécule concernée d'un côté de la membrane à l'autre, grâce à l'énergie fournie par une réaction chimique (généralement, l'hydrolyse de l'ATP, donc) (Stillwell, 2016b). Le transport actif secondaire repose quant à lui sur un mécanisme de cotransport. L'énergie requise pour transporter activement un soluté est fournie par le transport simultané d'un autre composé dont le mouvement suit le gradient de concentration. On parlera de symport si les deux molécules traversent la membrane dans la même direction, et d'antiport dans le cas contraire.

Les protéines membranaires ont également un rôle important dans la signalisation cellulaire. Les molécules transmettant un signal extracellulaire, par exemple les hormones, à une cellule cible doivent se lier à des récepteurs protéiques afin d'assurer la transduction du signal qui débouchera sur une réponse appropriée au signal perçu. Si une molécule signal est suffisamment apolaire, elle pourra traverser la membrane par diffusion et se lier à un récepteur intracellulaire. En revanche, les molécules dont la polarité est trop élevée pour diffuser librement au travers de la bicouche lipidique activeront des récepteurs membranaires. La liaison entre un ligand et son récepteur membranaire est caractérisée par une spécificité et une affinité élevées. Elle engendre généralement un changement de conformation du récepteur, lequel engendre la transmission du signal à l'intérieur de la cellule.

Pendant longtemps, les protéines ont été considérées comme les acteurs principaux des fonctions physiologiques des membranes biologiques. Mais plusieurs études ont souligné la complexité exceptionnelle de l'organisation des membranes plasmiques et le rôle essentiel des lipides dans cette organisation et les propriétés intrinsèques des membranes, qui apparaissent capitales pour assurer leurs fonctions physiologiques (Simons and Ikonen, 1997; Tillman and Cascio, 2003; Lee, 2004; Escibá et al., 2008).

1.2.2. La membrane plasmique : l'environnement lipidique

1.2.2.1. Structure des principaux lipides membranaires

1.2.2.1.1. Considérations générales sur la structure des lipides membranaires

Jusqu'à présent, cet exposé s'est volontairement concentré sur les protéines membranaires. Il n'y aurait pourtant pas de membrane plasmique sans bicouche lipidique. Une bicouche lipidique est une structure résultant de l'association de

lipides en deux feuillets parallèles. La formation d'un tel assemblage découle de la structure chimique des lipides qui le composent. La plupart des lipides membranaires sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent à la fois une partie hydrophobe (apolaire) et une partie hydrophile (polaire). Lorsqu'un composé amphiphile se trouve en milieu aqueux à une concentration suffisante (i.e. supérieure à sa concentration d'agrégation critique), les molécules s'agrègent afin que soit minimisée la surface de contact entre leurs groupements hydrophobes et l'eau, conformément aux lois de la thermodynamique. Du fait de la présence concomitante de groupements hydrophiles pour lesquels le contact avec l'eau est, quant à lui, thermodynamiquement favorable, les agrégats vont adopter une forme essentiellement dictée par l'équilibre entre la partie polaire et la partie apolaire des molécules qui les composent. Le paramètre d'empilement propose une vision simplifiée de la corrélation qui existe entre la géométrie d'une molécule amphiphile et la forme des agrégats qu'elle constitue (Israelachvili et al., 1980). Il apparaît que certains types de molécules amphiphiles forment des bicouches, avec un cœur hydrophobe délimité par deux plans hydrophiles ; la majorité des lipides membranaires rentrent dans cette catégorie.

Les lipides membranaires peuvent être séparés en différentes classes en fonction de leur structure chimique ; les trois principaux groupes de lipides membranaires sont brièvement décrits ci-après.

1.2.2.1.2. Les glycérolipides

Les lipides qui appartiennent à la classe des glycérolipides, abondants dans les membranes biologiques, sont caractérisés par la présence d'un résidu glycérol auquel sont liés différents groupes chimiques, dont au moins un acide gras. Les glycérophospholipides forment le principal sous-groupe des glycérolipides. Leur structure de base est constituée de deux acides gras estérifiés à un résidu glycérol, auquel se rattache encore un groupement phosphate via une liaison phosphoester. La molécule ainsi constituée est un acide phosphatidique ; il s'agit du type le plus simple de glycérophospholipide et précurseur des autres types de glycérophospholipides par ajout de divers alcools pouvant se lier au groupement phosphate. Le nom d'un type de glycérophospholipide est généralement donné d'après le nom de l'alcool rattaché à sa tête polaire. Par exemple, si un groupement choline est lié au phosphate, le lipide est une phosphatidylcholine, la classe de glycérophospholipides la plus abondamment retrouvée dans les membranes biologiques. Des exemples de structures de glycérophospholipides sont représentés sur la figure 3. Il est important de garder à l'esprit que différents acides gras peuvent être estérifiés au glycérol. Les principaux paramètres susceptibles de varier sont la longueur de la chaîne, son degré d'insaturation ainsi que la position de ses éventuelles insaturations. Ces trois paramètres peuvent avoir un impact important sur les propriétés du lipide considéré. Ce point sera développé dans la section suivante.

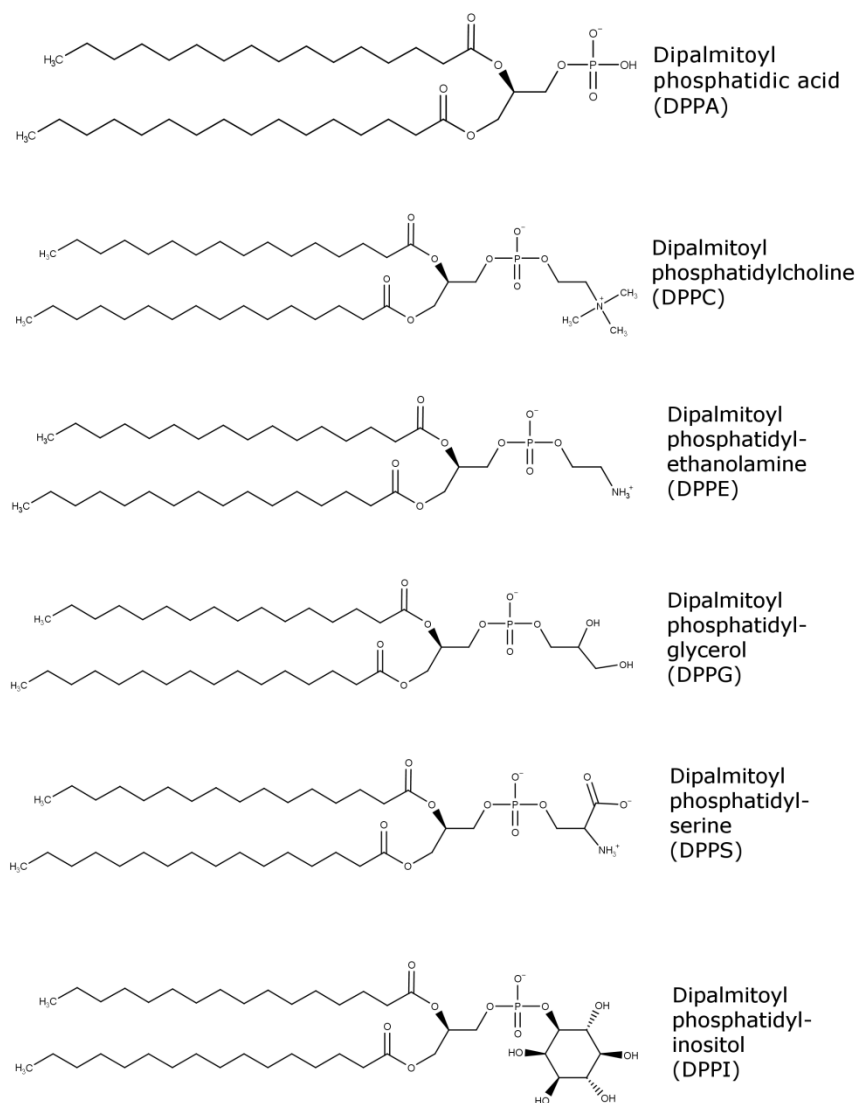


Figure 3. Exemples de structures de glycérophospholipides possédant deux chaînes hydrocarbonées saturées à 16 atomes de carbone.

Les galactolipides, caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs groupement(s) galactose rattaché(s) au résidu glycérol et dépourvus de phosphore, forment également une classe de glycérolipides importante pour les membranes biologiques. En particulier, le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG, un seul résidu galactose) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG, deux résidus galactoses) sont les structures de base les plus courantes de ce type lipidique.

1.2.2.1.3. Les sphingolipides

Les sphingolipides constituent une autre classe majeure de lipides membranaires. Leur structure se construit au départ d'une molécule composée d'une chaîne hydrocarbonée, d'au moins deux fonctions alcool (en C1 et C3) et d'une fonction amine (en C2), appelée base sphingoïde (« long chain base », LCB). Ces bases sphingoïdes possèdent généralement une longueur de 18 atomes de carbone, mais des longueurs allant de 12 à 22 atomes de carbone existent également (Karlsson, 1970; Merrill, 2008). Dans le cas typique d'une longueur de 18 atomes de carbone, la plus simple de ces bases sphingoïdes est la sphinganine (chaîne hydrocarbonée saturée, 2 fonctions alcool et une fonction amine, voir figure 4), au départ de laquelle d'autres bases sphingoïdes peuvent être formées, par désaturation(s) de la chaîne hydrocarbonée et/ou ajout d'un troisième groupement hydroxyle. Les bases sphingoïdes libres forment une première classe de sphingolipides, la plus simple en termes de structure chimique.

L'ajout d'un acide gras par une liaison amide à une base sphingoïde génère une deuxième classe de sphingolipides, les céramides.

Les céramides peuvent servir de précurseurs à d'autres classes de sphingolipides plus complexes, par ajout de diverses molécules pouvant se lier à leur fonction alcool primaire (Lynch and Dunn, 2004), par exemple des sucres ou une phosphocholine.

La diversité des bases sphingoïdes, des acides gras greffés à leur fonction amine et des molécules liées à leur fonction alcool primaire est à l'origine de la diversité des sphingolipides retrouvés dans les membranes cellulaires. Si des sphingolipides sont retrouvés à la fois chez les animaux, les levures et les plantes, il est intéressant de noter que la diversité structurale des sphingolipides végétaux est bien plus importante que celle de leurs homologues issus d'autres organismes eucaryotes (Michaelson et al., 2016). Cette variabilité supérieure est également associée à des types de structures distincts entre les sphingolipides des plantes et les sphingolipides d'animaux ou de levures. Quelques exemples de structures de sphingolipides sont illustrés sur la figure 4.

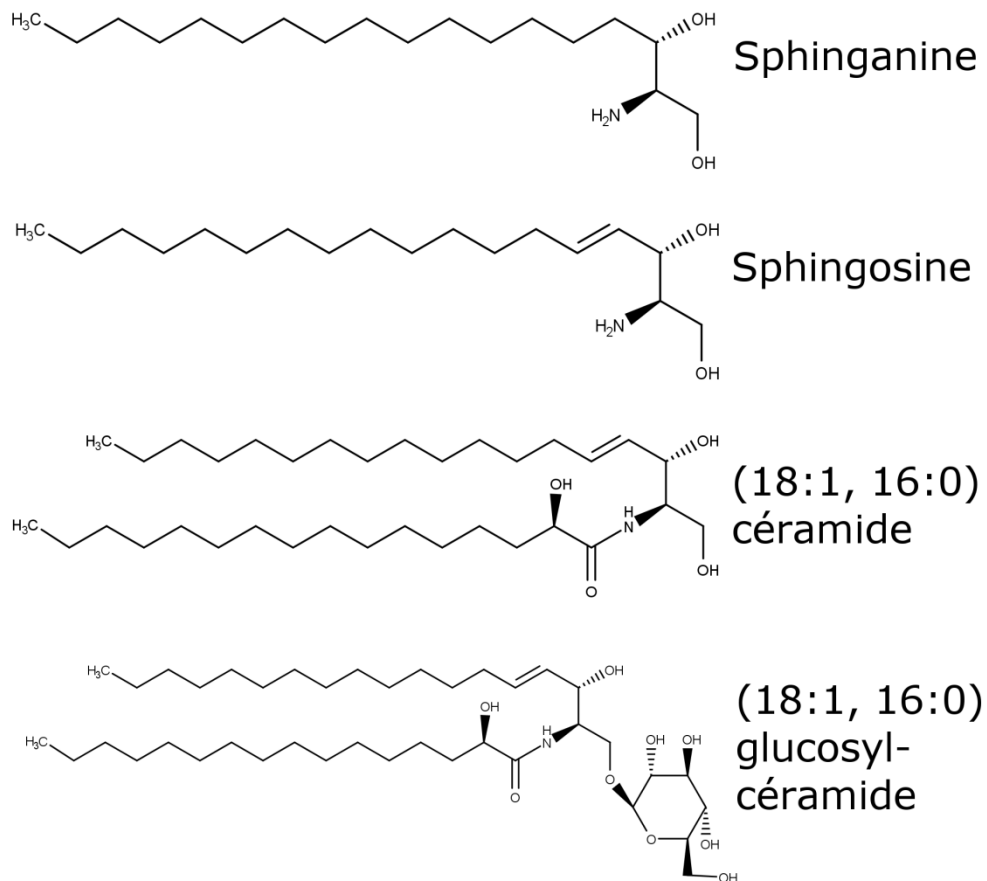
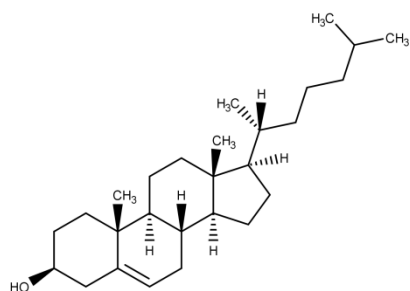


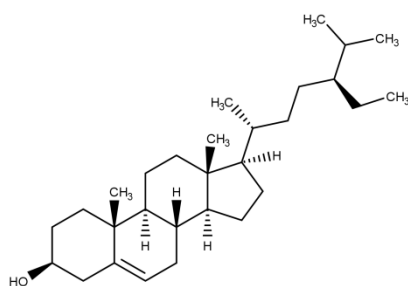
Figure 4. Exemples de structures de sphingolipides.

1.2.2.1.4. Les stérols

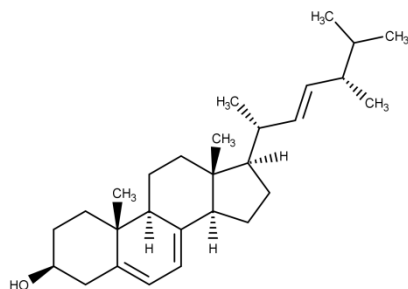
Les stérols représentent la dernière classe de lipides décrite dans cet exposé. Leur structure se distingue nettement des structures génériques des glycérolipides et des sphingolipides. L'ossature des stérols, un stérane (3 cycles à 6 atomes de carbone et un cycle à 5 atomes de carbone), leur confère une rigidité importante. Cette base de stérane porte un groupement hydroxyle qui fait office de tête polaire des stérols. Une courte chaîne hydrocarbonée complète leur structure de base. Les variations structurales observées entre les différents stérols concernent essentiellement la présence et la localisation de doubles liaisons sur l'unité stérane, ainsi que des différences au niveau de la chaîne hydrocarbonée. Ces considérations concernent les stérols libres, dont plusieurs représentants sont illustrés sur la figure 5.



Cholestérol



Ergostérol



Sitostérol

Figure 5. Exemples de structures de stérols libres.

En plus des stérols libres, il existe des stérols conjugués. Leur structure dérive d'un stérol libre au groupement hydroxyle duquel se greffe un acide gras ou un sucre pour former un ester de stérol (« steryl ester », SE) ou un glycoside de stérol (« steryl glycoside », SG), respectivement. Le sucre d'un glycoside de stérol peut lui-même avoir été estérifié au niveau d'un de ses groupements hydroxyles par un acide gras pour former un glycoside acylé de stérol (« acyl steryl glycoside », ASG).

1.2.2.2. Principales caractéristiques des bicouches lipidiques

Les bicouches lipidiques peuvent exister sous différents états physiques appelés « phases ». Nous retiendrons dans un premier temps les deux principales phases : la phase gel (« solide ordonnée ») et la phase fluide (« liquide désordonnée », ou « liquide cristallin »). La phase gel est une phase ordonnée, dans laquelle les lipides de la bicouche ont une faible mobilité, elle peut être assimilée à l'état solide. La phase fluide est en revanche une phase désordonnée, dans laquelle les lipides de la bicouche ont une mobilité élevée, elle peut être assimilée à l'état liquide. Le passage d'une phase à l'autre est appelé transition de phase et, pour un système lipidique donné, est caractérisé par une température de transition de phase (T_m). Si la température du système est inférieure à la température de transition de phase, la bicouche est en phase gel, si la température du système est supérieure à la température de transition de phase, la bicouche est en phase fluide. En plus de la température, l'évolution d'autres paramètres externes, comme la pression, le niveau d'hydratation des lipides, le pH et la force ionique de la phase aqueuse, peut aussi engendrer la transition de phase. Toutefois, ces derniers facteurs sont généralement moins sujets à variations dans le monde du vivant, et standardisés dans les expériences *in vitro*.

A chaque espèce lipidique (formant une bicouche) correspond ainsi une température de transition de phase qui dépend de la structure chimique du lipide considéré. Au plus un lipide forme une bicouche compacte et stable du point de vue thermodynamique, au plus l'énergie thermique nécessaire à sa déstabilisation est importante, i.e. au plus sa température de transition de phase est élevée. Dans le cas des glycérophospholipides, par exemple, la nature de la tête polaire, ainsi que la longueur des queues hydrophobes, leur degré d'insaturation et la position de leur(s) éventuelle(s) insaturation(s) sont les principales caractéristiques structurales influençant la stabilité et la compacité de la bicouche qu'ils forment, et donc leur température de transition de phase.

Tout élément structural d'un lipide contribuant favorablement à la formation d'une bicouche compacte et stable du point de vue thermodynamique impliquera un accroissement de la température de transition de phase du lipide relativement à un autre lipide ne présentant pas cet élément. Par exemple, l'augmentation de la longueur des chaînes hydrocarbonées d'un glycérophospholipide engendre une augmentation de la surface d'interaction entre ces chaînes, d'où découlent des interactions plus fortes dont la déstabilisation nécessite l'apport d'une plus grande énergie thermique, ce qui se traduit par une augmentation de la température de transition de phase. Le tableau 1 reprend la température de transition de phase d'une série de phosphatidylcholines différant uniquement par la longueur de leurs chaînes hydrocarbonées ; il étaye l'assertion précédente puisqu'une augmentation de la

température de transition de phase est bien observée avec l'augmentation de la longueur des chaînes hydrophobes.

Table 1. Température de transition de phase de phosphatidylcholines en fonction de la longueur de leurs chaînes (deux chaînes identiques saturées). Tableau repris de (Lewis and McElhaney, 1992).

Chaînes d'acides gras du PC	Température de transition de phase (°C)
13 :0	13,7
14 :0	23,9
15 :0	34,7
16 :0	41,4
17 :0	49,8
18 :0	55,3
19 :0	61,8
20 :0	66,4
21 :0	71,1

A l'inverse, la présence d'une ou de plusieurs insaturation(s) dans une chaîne hydrocarbonée « brise » l'alignement des queues hydrophobes. Il en résulte une déstabilisation du cœur hydrophobe de la bicouche se traduisant par une diminution de la température de transition de phase, comparativement à un lipide de structure identique mais aux chaînes saturées.

La nature de la tête polaire d'un lipide joue également un rôle important dans la stabilité de la bicouche qu'il forme, et donc dans la température de transition de phase qui lui est associée. Le nombre et la position de la ou des charge(s) portée(s), l'encombrement stérique et la capacité d'établir des ponts hydrogènes sont des exemples de caractéristiques ayant un impact direct sur ces éléments. Le tableau 2 liste la température de transition de phase de glycérophospholipides possédant les deux mêmes chaînes hydrophobes (faites de 14 atomes de carbone et sans insaturation) mais différant par la nature de leur tête polaire ; il étaye l'assertion précédente en mettant en évidence des différences de T_m en fonction du type de tête polaire. Il est intéressant de noter la proximité existant entre la T_m du DMPC et celle du DMPG. Elle indique que les forces attractives qui existent entre les têtes polaires du DMPC sont du même ordre de grandeur que celles qui existent entre les têtes polaires du DMPG. Leur nature diffère toutefois, puisque des forces électrostatiques sont à l'œuvre pour le DMPC, tandis que des ponts H sont à l'origine de l'attraction existant entre les têtes hydrophiles du DMPG (McMullen et al., 2009).

Table 2. Température de transition de phase de glycérophospholipides possédant les mêmes chaînes d'acides gras (2 chaînes palmitoyl (16 :0)) mais des têtes polaires différentes (voir figure 3 pour les structures). Tableau repris de (Lewis and McElhaney, 1992).

Glycérophospholipide	Température de transition de phase (°C)
DPPC	41
DPPG	41
DPPS	55
DPPE	64
DPPA	71

Différentes propriétés permettent de caractériser une bicouche lipidique donnée. La plupart de ces propriétés subissent une évolution radicale lors de la transition de phase, et une évolution nettement plus graduelle lorsqu'un facteur externe (température, force ionique, ...) évolue sans provoquer de changement de phase. La fluidité d'une bicouche est une propriété très importante qui rend compte de sa dynamique. Elle peut être conceptuellement rapprochée de la notion de viscosité (plus exactement, l'inverse de la viscosité), mais sa définition précise dépend généralement de la technique mise en œuvre pour l'étudier. Le concept de fluidité englobe ou est intimement lié à un ensemble d'autres propriétés. L'ordre des chaînes hydrocarbonées fait partie de ces propriétés. Il peut désigner plus spécifiquement l'ordre d'orientation des liaisons entre groupements méthyls des chaînes (l'angle qu'elles forment par rapport à la normale de la bicouche) ou leur ordre de conformation (la proportion d'isomères trans et gauches), même si les deux sont corrélés (Kodati and Lafleur, 1993). Lors du passage d'une bicouche de la phase gel à la phase fluide, la fluidité augmente brusquement, les chaînes hydrocarbonées qui étaient dans une configuration ordonnée, « tout trans » passent à une configuration désordonnée, mélange de conformères « trans » et « gauches » et l'orientation des liaisons entre groupements méthyls fluctue rapidement. Les lipides deviennent plus mobiles, et leur coefficient de diffusion latérale augmente nettement. Ces variations fondamentalement liées à la fluidité de la bicouche influencent d'autres propriétés. Le passage des chaînes hydrophobes d'une configuration ordonnée « entièrement étendue » à une configuration désordonnée engendre ainsi une diminution de l'épaisseur de la bicouche. Il entraîne également une « décompaction » de la bicouche, qui se traduit par une augmentation de l'aire par lipide. Du fait de ces différents changements de propriétés, la phase fluide de la bicouche présente aussi une plus grande perméabilité à l'eau que la phase gel. La figure 6 propose une vision schématique d'une bicouche lipidique en phase gel et en phase fluide. Le tableau 3 propose un récapitulatif de propriétés importantes des bicouches, ainsi que du sens de leur évolution lors de la transition de phase.

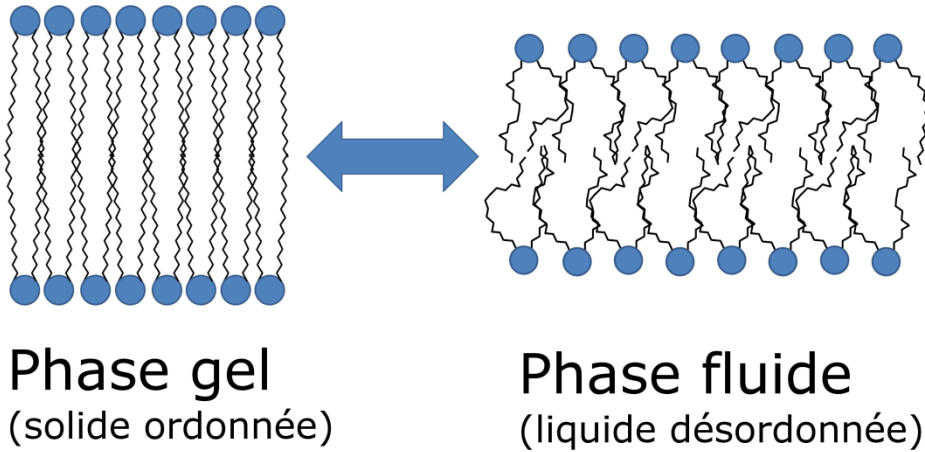


Figure 6. Illustration schématique d'une bicouche en phase gel (solide ordonnée) et en phase fluide (liquide désordonnée).

Table 3. Comparaison de différentes propriétés des bicouches lipidiques en fonction de leur état (phase gel – phase fluide).

Propriété	Phase gel	Phase fluide
Fluidité	-	+
Ordre (orientation)	+	-
Ordre (conformation)	Tout trans	↑ conformères gauches
Coefficient de diffusion	-	+
Aire par lipide	-	+
Epaisseur	+	-
Perméabilité à l'eau	-	+

Comme déjà précisé, ces mêmes propriétés peuvent également évoluer, de façon plus graduelle, en faisant varier un ou plusieurs facteur(s) du système lipidique sans pour autant provoquer de transition de phase. Ainsi, l'élévation de la température d'une bicouche en phase fluide provoquera une augmentation de sa fluidité et impactera l'ensemble des propriétés qui lui sont liées.

Si l'évolution de facteurs externes tels que la température peut impacter la fluidité d'une bicouche, y compris sans provoquer de changement de phase, il en va de même pour des modifications de la composition lipidique. A ce titre, les stérols ont un rôle important au sein des bicouches. Typiquement, l'ajout de stérols à une bicouche de glycérophospholipides en phase fluide, par exemple, induit une diminution de fluidité. De par leur structure majoritairement hydrophobe, les stérols s'intercalent entre les chaînes apolaires des lipides de la bicouche ; cette localisation, couplée à leur grande rigidité, diminue la liberté de mouvement des chaînes apolaires des lipides, et donc la fluidité globale de la bicouche. A l'inverse, si des

stérols sont ajoutés à une bicouche de glycérophospholipides en phase gel, leur intercalation entre les lipides va mener à une légère diminution de l'ordre des chaînes lipidiques (Dufourc, 2008a). Ces éléments ne sont toutefois que des règles générales pouvant être contredites, puisqu'il a été rapporté que le stigmastérol induit une diminution d'ordre dans une bicouche de PC en phase fluide (Grosjean et al., 2015).

1.2.2.3. Rôles des lipides au sein de la membrane plasmique

Si la bicouche lipidique de la membrane plasmique fait office de barrière physique délimitant la cellule, elle est aussi la matrice dans laquelle les protéines membranaires remplissent leurs fonctions diverses. Il existe donc un lien intime entre ces protéines et les lipides qui composent la membrane.

Dans certains cas, des interactions spécifiques sont nécessaires au bon fonctionnement d'un complexe protéique au sein d'une membrane. Ainsi, les complexes de photosystème II des thylakoïdes sont liés à certains lipides précis qui auraient un rôle structural important en rapport avec l'association des monomères protéiques (Mizusawa and Wada, 2012). Des interactions moléculaires entre lipides et protéines membranaires, dépendant par exemple de leur capacité à établir des ponts hydrogènes, peuvent impacter le fonctionnement des protéines (Lee, 2004).

De manière plus générale, puisque la bicouche lipidique constitue l'environnement des protéines, son état peut influencer leur niveau d'activité. Par exemple, l'affinité de la Ca^{2+} -ATPase pour les lipides en phase gel est nettement inférieure à son affinité pour les lipides en phase fluide. Il en résulte une diminution d'activité de cette protéine membranaire en phase gel par comparaison avec la phase fluide (Lee, 2003). Des propriétés telles que l'épaisseur de la bicouche, sa fluidité ou la charge de sa surface peuvent également influencer le niveau d'activité des protéines membranaires (Tillman and Cascio, 2003).

En outre, la membrane plasmique doit être suffisamment fluide pour garantir une diffusion adéquate des différentes molécules qu'elle contient.

Les domaines membranaires (Karnovsky et al., 1982), surnommés radeaux membranaires (« membrane rafts », en anglais) (Simons and Ikonen, 1997), fournissent un exemple de l'importance de l'environnement lipidique et des relations qui l'unissent avec les protéines membranaires. Ces nanodomaines (de 10 à 200 nm) dynamiques et hétérogènes des membranes biologiques, riches en stérols et en sphingolipides, permettent de compartimenter des processus cellulaires (Pike, 2006). Par des interactions protéine-protéine et des interactions protéine-lipide, ces nanodomaines peuvent s'associer pour former des plateformes plus grandes (> 300 nm), des micro-domaines (Sezgin et al., 2017). Leur existence implique donc une répartition latérale hétérogène des espèces lipidiques au sein des membranes cellulaires, en l'occurrence due à une affinité des stérols plus importante vis-à-vis des sphingolipides que des autres types majeurs de lipides membranaires. Du fait de leurs proportions de sphingolipides à chaînes saturées et de stérols plus élevées que la moyenne de la membrane en phase fluide désordonnée dans laquelle ils se trouvent, ces domaines lipidiques ont une fluidité plus faible que la fluidité globale de la membrane. Un type de phase est spécialement associé à un tel environnement lipidique, il s'agit de la phase fluide ordonnée (ou liquide ordonnée), sorte

d'intermédiaire entre la phase fluide désordonnée et la phase gel ordonnée évoquées jusqu'à présent. Cet environnement particulier est associé à des protéines spécifiques, par exemple impliquées dans la transduction de certains signaux (Lingwood and Simons, 2010).

L'importance de l'état des lipides membranaires pour le bon fonctionnement des membranes biologiques est aussi bien reflétée par la théorie de « l'adaptation homéovisqueuse » (Sinensky, 1974). Cette théorie concerne les organismes poïkilothermes, i.e. dont la température varie avec celle de leur environnement. Lorsqu'un tel organisme est confronté à des modifications de température, la composition lipidique de ses membranes cellulaires évolue. Typiquement, si la température diminue, la proportion de chaînes d'acides gras insaturées augmente. La diminution de fluidité normalement observée lorsque la température baisse est ainsi compensée par des changements réalisés au niveau des lipides constitutifs de la membrane, principalement via leur degré d'insaturation (un accroissement du niveau d'insaturation des lipides résultant en une augmentation de fluidité) (Murata and Los, 1997). A l'inverse, si la température augmente, des modifications sont apportées aux lipides membranaires de sorte que leurs chaînes hydrophobes soient plus saturées et plus longues (Sinensky, 1974). Il résulte de la mise en œuvre de ces ajustements que les membranes cellulaires d'un organisme poïkilotherme donné sont caractérisées par une fluidité similaire, quelle que soit la température du milieu. La fluidité des membranes jouerait même un rôle dans la perception de la température par les plantes, à l'origine des événements cellulaires modifiant leur composition lipidique (Ruelland and Zachowski, 2010; Guo et al., 2018).

Certains auteurs estiment que les plantes possèdent des mécanismes d'adaptation différenciés en fonction du type de variation thermique subie. Une distinction pourrait ainsi être faite entre des variations fréquentes de température (typiquement, le cycle jour-nuit) et des variations plus étalées dans le temps (typiquement, le cycle des saisons) (Zheng et al., 2011). Dans le premier cas, l'adaptation de la plante impliquerait principalement un changement d'espèces lipidiques (i.e. de têtes polaires). Dans le cas de variations moins fréquentes de température, la fluidité des membranes serait modulée à la fois par un turnover des espèces lipidiques (par exemple, une augmentation des PC et des PE en cas d'acclimatation au froid (Bohn et al., 2007; Degenkolbe et al., 2012)) et par un changement dans le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées des lipides. Ce dernier processus, jugé moins rapide et plus coûteux en énergie, serait donc une solution moins adaptée aux compensations fréquentes requises par l'alternance du jour et de la nuit.

La présence de stérols pourrait également être impliquée dans la capacité d'un organisme poïkilotherme à adapter la fluidité de sa membrane en fonction des variations thermiques de son environnement. Il a ainsi été montré qu'une phase fluide ordonnée, engendrée notamment par la présence de stérols, présentait une variation de fluidité en fonction de la température beaucoup plus douce que celle observée lors d'une transition de phase d'une phase gel ordonnée vers une phase fluide désordonnée (Bernsdorff and Winter, 2003; Beck et al., 2007; Dufourc, 2008b). Ce pouvoir « tampon » des stérols provient de leur capacité à augmenter la fluidité d'une bicouche qui, sans leur présence, serait en phase gel ordonnée, et à

diminuer la fluidité d'une bicouche qui, sans leur présence, serait en phase fluide désordonnée.

1.2.2.4. Composition et organisation des membranes plasmiques de plante

1.2.2.4.1. Composition lipidique des membranes plasmiques de plante

Les lipides composant les membranes plasmiques de plante appartiennent majoritairement aux trois principaux groupes précités : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

Les glycérophospholipides sont généralement considérés comme l'espèce lipidique majoritaire des membranes plasmiques de plante, y représentant 30 à 50% des lipides totaux (Furt et al., 2011). Suivent les stérols, comptant pour 25 à 50% du total des lipides des membranes plasmiques de plante et les sphingolipides, avec une représentation comprise entre 5 et 30% (Furt et al., 2011). La difficulté que constitue l'extraction de certains sphingolipides très polaires a cependant pu mener à une sous-estimation de leur abondance dans les membranes plasmiques de plante. Une étude récente menée sur des cellules de tabac montre ainsi que les sphingolipides représentent plus de 40% des lipides de leur membrane plasmique (Cacas et al., 2016).

Les phosphatidylcholines forment la classe de glycérophospholipides la plus représentée au sein des membranes plasmiques de plante, puisque 30 à 45% des glycérophospholipides y sont des PC (Furt et al., 2011)(et références à l'intérieur). Les phosphatidyléthanolamines sont un autre type majeur de glycérophospholipides des membranes plasmiques de plante, y représentant 30 à 40% du total des glycérophospholipides (Furt et al., 2011). La fraction restante des glycérophospholipides est essentiellement constituée de phosphatidylinositols, phosphatidylsérines, acides phosphatidiques et phosphatidylglycérols.

La composition en acides gras renseignée dans la littérature varie en fonction du type de glycérophospholipides et du type de cellule végétale (espèce et organe), mais l'acide palmitique (16 :0 (16 atomes de carbone, 0 insaturation)) et l'acide linoléique (18 :2) sont globalement les deux espèces majoritaires (Furt et al., 2011). Il a été rapporté que l'acide linoléique (18 :3) peut représenter jusqu'à 20% des chaînes des glycérophospholipides dans les membranes plasmiques d'hypocotyles de *Vignata radiata* (L.) Wilczek, ce qui en fait le 3^{ème} plus abondant acide gras dans ces membranes (Yoshida and Uemura, 1986). Dans les membranes plasmiques de racines de maïs en revanche, l'acide linoléique n'a été détecté qu'en faible quantité, et les acides palmitique et linoléique représentent à eux deux environ 90% des chaînes des glycérophospholipides (Bohn et al., 2001).

Il est intéressant de noter qu'en cas de privation de phosphore, des galactolipides, classe lipidique d'ordinaire essentiellement présente dans les chloroplastes (Dörmann and Benning, 2002), peuvent remplacer les glycérophospholipides au sein des membranes plasmiques de plante (Tjellström et al., 2008).

En plus de la sphinganine, les sphingolipides retrouvés dans les membranes de plante possèdent 8 bases sphingoides principales distinctes, toutes dérivées de la

sphinganine (Sperling and Heinz, 2003). Des bases sphingoïdes possédant une longueur différente des 18 atomes de carbone de la sphinganine ont été décrites chez les plantes (Karlsson, 1970) mais n'y seraient que des constituants mineurs (Sperling and Heinz, 2003). Les bases sphingoïdes libres représentent une faible fraction des sphingolipides trouvés dans les membranes végétales (Furt et al., 2011).

Les acides gras intégrés aux céramides possèdent généralement une longueur comprise entre 14 et 28 atomes de carbone dans les membranes de plante (Sperling and Heinz, 2003; Markham et al., 2013). Ces acides gras possèdent généralement un groupement hydroxyle en C2 (Markham et al., 2013; Cacas et al., 2016). Les céramides simples (i.e. sans substituant au niveau de la fonction alcool primaire) ne sont eux aussi présents qu'en faible proportion dans les membranes plasmiques de plante (Furt et al., 2011).

Les sphingolipides complexes, i.e. issus de l'ajout d'une molécule au niveau de la fonction alcool primaire des céramides, retrouvés dans les membranes plasmiques de plante peuvent être séparés en différents groupes sur la base de la nature de la molécule ajoutée. Les principaux substituants sont soit un ou plusieurs sucres (pour former des « glycosylcéramides »), soit un inositol monophosphate (pour former des « inositol phosphorylcéramides »). Dans le dernier cas, la partie inositol monophosphate peut à son tour être glycosylée pour donner une classe de sphingolipides appelée « glycosyl inositol phosphorylcéramides », ou GIPC. Ces sphingolipides complexes constituent la grande majorité des sphingolipides retrouvés chez les plantes. Dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, les GIPC comptent pour plus de 60% du total de sphingolipides, tandis que les glycosylcéramides y représentent plus de 30% des sphingolipides totaux (Markham and Jaworski, 2007). La proportion de GIPC dans le total des sphingolipides retrouvés dans les membranes plasmiques de tabac est même supérieure à cela, dépassant les 80% (Cacas et al., 2016).

Alors que les membranes des cellules animales et de levure sont chacune caractérisées par la présence d'un stérol principal, le cholestérol et l'ergostérol, respectivement, les membranes de plante présentent quant à elles une plus grande diversité de stérols (Hartmann, 1998). Le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol sont les stérols libres majoritaires retrouvés dans les membranes plasmiques de plante (Hartmann, 1998; Schaeffer et al., 2001). Les stérols libres représentent généralement entre 60 et 90% du total des stérols des membranes plasmiques de plante (Furt et al., 2011).

La fraction restante est constituée de stérols conjugués. Les esters de stérol retrouvés dans les cellules végétales sont constitués d'une partie stérol correspondant généralement aux principaux stérols libres de ces cellules et d'un acide gras dont la longueur est souvent comprise entre 12 et 22 atomes de carbone, les acides palmitique (16:0), stéarique (18:0), oléique (18:1), linoléique (18:2) et linolénique (18:3) étant les plus communs (Dyas and Goad, 1993). Très minoritaires dans les membranes (Furt et al., 2011), les esters de stérol seraient une forme de stockage des stérols, accumulés sous forme de gouttelettes lipidique au sein des cellules végétales (Schaller, 2004; Ferrer et al., 2017). Les glycosides de stérol et glycosides acylés de stérol possèdent eux aussi une composante stérol correspondant aux stérols libres majoritaires. La partie sucre de ces stérols conjugués consiste

généralement en un seul sucre simple, souvent le glucose (Ferrer et al., 2017). Enfin, la partie acylée des glycosides acylés de stérol est le plus communément un acide gras à 16 ou 18 atomes de carbone, saturé ou non (Ferrer et al., 2017). Les SG et ASG représentent le plus souvent entre 10 et 40% du total des stérols dans les membranes plasmiques de plante, mais peuvent dans certains cas dépasser les 80%, notamment dans les feuilles d'avoine ou les fruits de tomate (Whitaker, 1988; Furt et al., 2011).

1.2.2.4.2. Organisation des membranes plasmiques de plante : hétérogénéité latérale et asymétrie entre feuilletts

Si le concept des domaines membranaires a d'abord été proposé pour les membranes des cellules animales, les premiers indices de leur existence dans les membranes de plante ont été apportés il y a une dizaine d'années (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005). Ces nano- ou microdomaines de la membrane plasmique y seraient aussi enrichis en sphingolipides et en stérols, et donc caractérisés par une phase « liquide ordonnée » plus compacte que le reste de la membrane.

Le développement et la régulation du compartimentage de la membrane plasmique sont attribués à la fois à des interactions lipides-lipides, en particulier les interactions sphingolipides-stérols, et à des interactions lipides-protéines (Grosjean et al., 2018). Des interactions protéines-protéines pourraient également jouer un rôle dans cette organisation latérale, mais les contours de leur contribution potentielle sont encore flous (Gronnier et al., 2018). Des éléments extrinsèques à la membrane plasmique, tels que le cytosquelette (Oda, 2018) ou la paroi cellulaire (Martinière et al., 2012) sont également susceptibles d'avoir un impact sur la distribution et la diffusion des domaines et protéines membranaires chez les plantes.

L'asymétrie pouvant exister dans la composition lipidique des feuilletts interne et externe de la membrane plasmique des plantes n'a, à notre connaissance, été investiguée que dans une étude (Tjellström et al., 2009). Ses résultats ont indiqué que la répartition de phospholipides, de glucosylcéramides et de stérols entre les feuilletts interne et externe étaient de 65 : 35, 30 : 70 et 30 : 70, respectivement. Cette asymétrie transversale a vraisemblablement des répercussions sur le fonctionnement de la membrane plasmique, mais l'ensemble constitue un domaine très insuffisamment exploré.

1.2.2.5. Etude de l'environnement lipidique et de ses interactions avec des molécules bioactives

1.2.2.5.1. Interactions avec des molécules bioactives

Certaines molécules sont capables d'interagir avec les lipides membranaires et, dans certains cas, d'influencer les propriétés de la bicouche lipidique. Puisque l'environnement lipidique est intimement lié au fonctionnement global de la membrane, de telles interactions sont susceptibles d'avoir un impact important et permettent parfois d'expliquer le mode d'action ou les effets secondaires de certains composés.

La mise en œuvre d'un tel mécanisme concerne potentiellement un grand nombre de classes de molécules, notamment des anesthésiques (Seeman, 1972; Cantor, 1997), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Tomisato et al., 2004; Manrique-Moreno et al., 2010, 2016) et des produits anti-microbiens (Nowotarska et al., 2014).

Des interactions membranaires sont également soupçonnées d'être à l'origine des multiples effets associés à certaines molécules extraites de plantes (Ingólfsson et al., 2014; Neves et al., 2015; Selvaraj et al., 2015; Tsuchiya, 2015).

En sa qualité de barrière cellulaire, la membrane plasmique est en outre le premier point de contact de toute molécule affectant une cellule. La capacité d'un composé à traverser la membrane plasmique par diffusion ou à interagir avec certaines parties de protéines membranaires est aussi corrélée à son affinité pour la bicouche lipidique.

Pour ces raisons, les interactions entre des molécules bioactives et les lipides membranaires représentent un champ d'étude aussi intéressant que vaste. Notamment, l'accroissement des connaissances sur les domaines membranaires, tant au niveau de leurs compositions possibles que des rôles qui leur sont attribués, pourrait s'accompagner d'investigations mettant l'accent sur la spécificité lipidique de ces interactions.

1.2.2.5.2. Utilisation de modèles simplifiés

Même en ne considérant que leur partie lipidique, la complexité des membranes biologiques est telle que l'utilisation de modèles simplifiés s'impose pour étudier leurs propriétés et l'évolution de celles-ci en cas d'interactions avec des molécules bioactives. La grande variété de lipides membranaires, issue des multiples combinaisons possibles entre têtes polaires et parties hydrophobes, ne peut être reproduite, et des simplifications sont nécessaires pour les expériences *in vitro* et *in silico*. En fonction de l'organisme et du type de membrane étudiés, une composition lipidique est identifiée. Le ou les principaux lipides sont ensuite retenus dans des proportions proches de ce qui se trouve dans la membrane d'intérêt afin d'obtenir des caractéristiques similaires.

La composition lipidique simplifiée ainsi déterminée, différentes structures peuvent être construites pour imiter la bicouche lipidique d'une membrane (Deleu et al., 2014). En règle générale, la technique d'étude requiert un type de structure défini. Les principaux types d'assemblages lipidiques utilisés sont la bicouche plane, la monocouche et le liposome. Selon l'instrument utilisé, la bicouche plane peut être supportée par un matériau solide. Dans le cas d'une monocouche, les têtes polaires sont en contact avec une phase aqueuse tandis que les parties hydrophobes se trouvent à l'interface entre cette phase aqueuse et une phase gazeuse (souvent, l'air). Les liposomes sont des vésicules approximativement sphériques constituées d'une ou de plusieurs bicouche(s). Dans le premier cas, les liposomes sont dits « unilamellaires », tandis que dans le deuxième cas ils sont dits « multilamellaires ». Les liposomes unilamellaires peuvent en outre être distingués sur la base de leur diamètre et être qualifiés de petits (SUV, « small unilamellar vesicles »), grands (LUV, « large unilamellar vesicles ») ou géants (GUV, « giant unilamellar vesicles ») si leur diamètre est inférieur à 100 nm, compris entre 100 nm et 1 µm ou supérieur à 1 µm, respectivement (van Swaay and deMello, 2013).

1.2.2.5.3. Techniques pour l'étude des modèles membranaires

De nombreuses techniques expérimentales existent pour étudier les modèles membranaires évoqués ci-avant. Chacune d'entre elles repose sur un principe physique distinct et donne accès à une ou plusieurs informations assez spécifique(s). Combiner différentes méthodes permet donc souvent d'atteindre une caractérisation

sur plusieurs plans d'un système lipidique donné et permet ainsi de suivre son évolution en fonction des changements de conditions ou du fait d'interactions avec des molécules bioactives. Spectroscopie de fluorescence, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et titrage calorimétrique isotherme sont les principales techniques expérimentales utilisées dans le cadre de cette thèse.

L'approche expérimentale a été complétée par de nombreuses simulations de dynamique moléculaire. La dynamique moléculaire est une technique *in silico* qui, appliquée à l'étude des bicouches lipidiques, offre un large éventail d'outils pour l'analyse des propriétés. La suite du texte est dédiée à un bref descriptif de cette technique numérique en pleine expansion.

La dynamique moléculaire est une technique informatique permettant de simuler l'évolution d'un système d'atomes. Il est ainsi possible de suivre le mouvement de molécules à des échelles spatiale (de l'ordre du nm) et temporelle (de l'ordre de la ns) très réduites.

L'utilisateur commence par définir le système qu'il souhaite étudier en créant et en positionnant les molécules de son choix dans une boîte telle que représentée sur la figure 7.

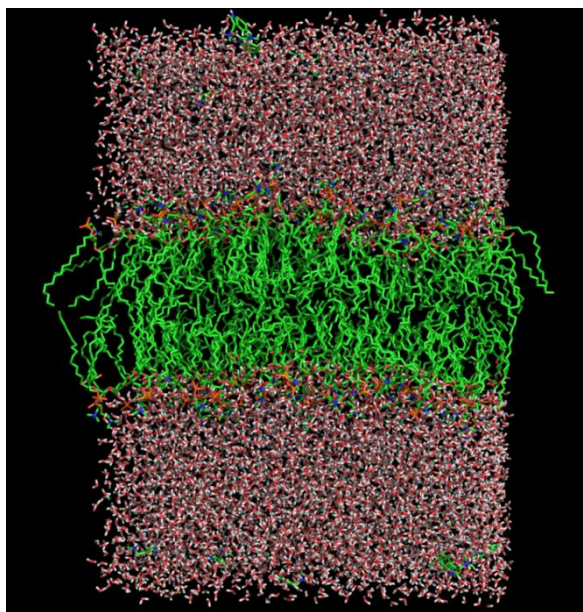


Figure 7. Exemple de système initial de dynamique moléculaire (bicouche lipidique avec molécules d'eau et alcaloïdes en solution). Vert : atome de carbone/groupement méthyl, blanc : atome d'hydrogène, rouge : atome d'oxygène, orange : atome de phosphore, bleu : atome d'azote.

En dynamique moléculaire classique, les atomes sont considérés comme des particules solides (i.e. la mécanique quantique n'est pas prise en compte). Partant, il

est possible de déterminer l'accélération (a_i) de l'atome i du système grâce à la deuxième loi de Newton :

$$F_i = m_i \times a_i \quad (Eq. 1)$$

Où F_i est la force appliquée sur l'atome i et m_i , sa masse. La masse de chaque atome est connue, tandis que la force appliquée est l'opposée de la dérivée de l'énergie potentielle par rapport à la position de l'atome. La fonction d'énergie potentielle, U , doit rendre compte le plus fidèlement possible des interactions interatomiques affectant chacun des atomes du système en fonction de sa position. Elle permet donc par suite de calculer la force appliquée à chacun de ces atomes, qui permet à son tour de déterminer son accélération individuelle et le déplacement qu'il effectue sur un intervalle de temps très faible (généralement 1 ou 2 femtoseconde). Lorsque le mouvement de tous les atomes a été calculé, leurs positions sont mises à jour et la force appliquée à chacun d'entre eux, compte tenu de leur nouvelle position, peut être calculée à nouveau sur la base de la fonction d'énergie potentielle. L'enchaînement des étapes de très courte durée permet d'atteindre des durées totales de simulation supérieures de plusieurs ordres de grandeur (picoseconde, nanoseconde ou microseconde en fonction de la taille de la boîte et de la puissance de calcul disponible).

La fonction de l'énergie potentielle exprimée en fonction de la position des atomes est donc à la base des calculs permettant de simuler l'évolution du système. Elle recouvre deux types majeurs d'interactions interatomiques : les interactions liées et les interactions non liées.

Les interactions liées d'un atome désignent les interactions de cet atome avec les atomes voisins au sein de la même molécule, séparés par un maximum de 3 liaisons covalentes. Ces interactions regroupent ainsi la longueur de liaison (impliquant 2 atomes), l'angle de liaison (impliquant 3 atomes) et l'angle de torsion (ou angle dièdre, impliquant 4 atomes), tous représentés sur la figure 8.

L'énergie potentielle associée à chacun de ces types d'interaction est déterminée en les assimilant à des fonctions simplifiées. Par exemple, la longueur de liaison entre deux atomes i et j peut être considérée comme un oscillateur harmonique, caractérisé par une longueur à l'équilibre r_0 et une constante de raideur k_{ij} définies pour une liaison covalente donnée (par exemple, une liaison C-C au sein d'une chaîne hydrophobe). L'énergie potentielle $U_{liaison\ i-j}$ associée à cet oscillateur harmonique peut alors être déterminée selon :

$$U_{liaison\ i-j} = \frac{k_{ij}}{2} \times (r_{i-j} - r_0)^2 \quad (Eq. 2)$$

Où r_{i-j} est la distance entre les atomes i et j .

Les interactions non liées d'un atome désignent les interactions de cet atome avec des atomes qui ne sont pas concernés par des interactions liées (telles que définies ci-avant) avec lui. Les interactions non liées d'un atome désignent donc les interactions intermoléculaires et les interactions intramoléculaires avec des atomes distants de plus de 3 liaisons covalentes. Ces interactions regroupent les interactions

de van der Waals (attractives à longue distance et répulsives à courte distance (exclusion de Pauli)) et les interactions électrostatiques. L'énergie potentielle associée aux interactions de van der Waals peut être approximée par des fonctions simplifiées telles que le potentiel de Lennard-Jones qui, entre deux atomes i et j ($U_{L-J,ij}$) peut être déterminé selon :

$$U_{L-J,ij} = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \quad (Eq. 3)$$

Où $C_{ij}^{(12)}$ et $C_{ij}^{(6)}$ sont des paramètres définis en fonction de la nature des atomes i et j . L'énergie potentielle associée aux interactions électrostatiques est quant à elle obtenue par la loi de Coulomb.

La fonction d'énergie potentielle est donc la somme de ces différentes contributions, issues des interactions liées et non liées, illustrée par la figure 8 et détaillée par ailleurs (voir par exemple (Cornell et al., 2002)).

$$U_{\text{tot}} = \sum_{\text{liaisons}} \frac{k_{ij}}{2} (r_{i-j} - r_0) + \sum_{\text{angles}} \frac{k_{ijk}^\theta}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \sum_{\text{dièdres}} k_{ijkl}^\Phi (1 + \cos(n\Phi_{ijkl} + \Phi_{ijkl}^0)) + \sum_{ij} \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} + \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Figure 8. Fonction de l'énergie potentielle et ses différentes composantes issues des interactions liées et non liées.

L'appellation « champ de force » désigne à la fois la formule globale utilisée pour le calcul de l'énergie potentielle et l'ensemble des paramètres intervenant dans cette formule (par exemple les constantes utilisées). Il appartient à l'utilisateur de choisir un champ de force existant et de l'adapter à ses besoins afin de simuler le plus adéquatement possible le système qui l'intéresse.

A l'issue de la simulation, l'utilisateur analyse la « trajectoire », i.e. l'évolution des coordonnées des différents atomes du système durant la durée de simulation. La quantité et la précision des données ainsi obtenues rendent possible une analyse très approfondie du système considéré. Dans le cas d'une boîte composée d'une bicouche seule ou avec molécules bioactives, l'utilisateur peut par exemple, à tout instant, « mesurer » la plupart des propriétés principales de la bicouche (épaisseur, paramètre d'ordre, coefficient de diffusion, aire par lipide...) (Neale et al., 2014; Chen et al., 2015), déterminer la localisation préférentielle des molécules bioactives dans la bicouche (Boggara and Krishnamoorti, 2010; Košinová et al., 2012; Kapla et al., 2013; Paloncýová et al., 2014), caractériser un comportement d'agrégation (Sikorska et al., 2014), une organisation en domaines (Hakobyan and Heuer, 2013), suivre l'évolution du nombre de ponts hydrogènes entre différents groupes

moléculaires (Orłowski et al., 2012; Kapla et al., 2015) etc.. Les possibilités sont extrêmement nombreuses et diversifiées.

1.2.3. *Références*

Beck, J.G., D. Mathieu, C. Loudet, S. Buchoux, and E.J. Dufourc. 2007. Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* 21(8): 1714–1723. doi: 10.1096/fj.06-7809com.

Bernsdorff, C., and R. Winter. 2003. Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol, β -Sitosterol, trans -7-Dehydrocholesterol, Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order. *J. Phys. Chem. B* 107(38): 10658–10664. doi: 10.1021/jp034922a.

Boggara, M.B., and R. Krishnamoorti. 2010. Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophysical Journal* 98(4): 586–595. doi: 10.1016/j.bpj.2009.10.046.

Bohn, M., E. Heinz, and S. Luthje. 2001. Lipid Composition and Fluidity of Plasma Membranes Isolated from Corn (*Zea mays* L.) Roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387(1): 35–40. doi: 10.1006/abbi.2000.2224.

Bohn, M., S. Luthje, P. Sperling, E. Heinz, and K. Dörffling. 2007. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *J. Plant Physiol.* 164(2): 146–156. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.008.

Borner, G.H.H., D.J. Sherrier, T. Weimar, L.V. Michaelson, N.D. Hawkins, et al. 2005. Analysis of Detergent-Resistant Membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts. *Plant Physiology* 137(1): 104–116. doi: 10.1104/pp.104.053041.

Cacas, J.-L., C. Buré, K. Grosjean, P. Gerbeau-Pissot, J. Lherminier, et al. 2016. Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant Physiology* 170(1): 367–384. doi: 10.1104/pp.15.00564.

Cantor, R.S. 1997. The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36(9): 2339–2344. doi: 10.1021/bi9627323.

Chen, J., L. Chen, Y. Wang, X. Wang, and S. Zeng. 2015. Exploring the Effects on Lipid Bilayer Induced by Noble Gases via Molecular Dynamics Simulations. *Scientific Reports* 5: srep17235. doi: 10.1038/srep17235.

Cornell, W.D., P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, et al. 2002. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. doi: 10.1021/ja00124a002.

Degenkolbe, T., P. Giavalisco, E. Zuther, B. Seiwert, D.K. Hincha, et al. 2012. Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 72(6): 972–982. doi: 10.1111/tpj.12007.

Deleu, M., J.-M. Crowet, M.N. Nasir, and L. Lins. 2014. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(12): 3171–3190. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.08.023.

Dörmann, P., and C. Benning. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* 7(3): 112–118. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02216-6.

Dufourc, E.J. 2008a. Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.* 1(1): 63–77. doi: 10.1007/s12154-008-0010-6.

Dufourc, E.J. 2008b. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signal. Behav.* 3(2): 133–134. doi: 10.4161/psb.3.2.5051.

Dyas, L., and L.J. Goad. 1993. Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry* 34(1): 17–29. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90777-5.

Escribá, P.V., J.M. González-Ros, F.M. Goñi, P.K.J. Kinnunen, L. Vigh, et al. 2008. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(3): 829–875. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x.

Ferrer, A., T. Altabella, M. Arró, and A. Boronat. 2017. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research* 67: 27–37. doi: 10.1016/j.plipres.2017.06.002.

Furt, F., F. Simon-Plas, and S. Mongrand. 2011. Lipids of the plant plasma membrane. In: Murphy, A.S., Peer, W.A., and Schulz, B., editors, *The Plant Plasma Membrane*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Gronnier, J., P. Gerbeau-Pissot, V. Germain, S. Mongrand, and F. Simon-Plas. 2018. Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization. *Trends in Plant Science* 23(10): 899–917. doi: 10.1016/j.tplants.2018.07.007.

Grosjean, K., S. Mongrand, L. Beney, F. Simon-Plas, and P. Gerbeau-Pissot. 2015. Differential Effect of Plant Lipids on Membrane Organization: Specificities Of Phytosphingolipids And Phytosterols. *J. Biol. Chem.* 290(9): 5810–5825. doi: 10.1074/jbc.M114.598805.

Grosjean, K., C. Der, F. Robert, D. Thomas, S. Mongrand, et al. 2018. Interactions between lipids and proteins are critical for organization of plasma membrane-ordered domains in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot* 69(15): 3545–3557. doi: 10.1093/jxb/ery152.

Guo, X., D. Liu, and K. Chong. 2018. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 60(9): 745–756. doi: 10.1111/jipb.12706.

Hakobyan, D., and A. Heuer. 2013. Phase Separation in a Lipid/Cholesterol System: Comparison of Coarse-Grained and United-Atom Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 117(14): 3841–3851. doi: 10.1021/jp312245y.

Hartmann, M.-A. 1998. Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* 3(5): 170–175. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01233-3.

Ingólfsson, H.I., P. Thakur, K.F. Herold, E.A. Hobart, N.B. Ramsey, et al. 2014. Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. *ACS Chem. Biol.* 9(8): 1788–1798. doi: 10.1021/cb500086e.

Israelachvili, J.N., S. Marčelja, and R.G. Horn. 1980. Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* 13(02): 121. doi: 10.1017/S0033583500001645.

Kapla, J., O. Engström, B. Stevansson, J. Wohler, G. Widmalm, et al. 2015. Molecular dynamics simulations and NMR spectroscopy studies of trehalose–lipid bilayer systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(34): 22438–22447. doi: 10.1039/C5CP02472B.

Kapla, J., J. Wohler, B. Stevansson, O. Engström, G. Widmalm, et al. 2013. Molecular Dynamics Simulations of Membrane–Sugar Interactions. *J. Phys. Chem. B* 117(22): 6667–6673. doi: 10.1021/jp402385d.

Karlsson, K.-A. 1970. Sphingolipid long chain bases. *Lipids* 5(11): 878–891. doi: 10.1007/BF02531119.

Karnovsky, M.J., A.M. Kleinfeld, R.L. Hoover, and R.D. Klausner. 1982. The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol* 94(1): 1–6.

Kodati, V.R., and M. Lafleur. 1993. Comparison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers. *Biophys J* 64(1): 163–170.

Košínová, P., K. Berka, M. Wykes, M. Otyepka, and P. Trouillas. 2012. Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. *J. Phys. Chem. B* 116(4): 1309–1318. doi: 10.1021/jp208731g.

Lee, A.G. 2003. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1612(1): 1–40. doi: 10.1016/S0005-2736(03)00056-7.

Lee, A.G. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666(1): 62–87. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.05.012.

Lewis, R., and R.N. McElhaney. 1992. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* 327(5961): 46–50. doi: 10.1126/science.1174621.

Lynch, D.V., and T.M. Dunn. 2004. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* 161(3): 677–702. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.00992.x.

Manrique-Moreno, M., L. Heinbockel, M. Suwalsky, P. Garidel, and K. Brandenburg. 2016. Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858(9): 2123–2131. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.06.009.

Manrique-Moreno, M., J. Howe, M. Suwalsky, P. Garidel, and K. Brandenburg. 2010. Physicochemical Interaction Study of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Dimyristoylphosphatidylethanolamine Liposomes. *Letters in Drug Design & Discovery* 7(1): 50–56. doi: 10.2174/157018010789869280.

Markham, J.E., and J.G. Jaworski. 2007. Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21(7): 1304–1314. doi: 10.1002/rcm.2962.

Markham, J.E., D.V. Lynch, J.A. Napier, T.M. Dunn, and E.B. Cahoon. 2013. Plant sphingolipids: function follows form. *Current Opinion in Plant Biology* 16(3): 350–357. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.009.

Martinière, A., I. Lavagi, G. Nageswaran, D.J. Rolfe, L. Maneta-Peyret, et al. 2012. Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *PNAS* 109(31): 12805–12810. doi: 10.1073/pnas.1202040109.

McMullen, T.P.W., R.N.A.H. Lewis, and R.N. McElhaney. 2009. Calorimetric and spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788(2): 345–357. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.11.012.

Merrill, A.H. 2008. CHAPTER 13 - Sphingolipids. In: Vance, D.E. and Vance, J.E., editors, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Fifth Edition). Elsevier, San Diego. p. 363–397

Michaelson, L.V., J.A. Napier, D. Molino, and J.-D. Faure. 2016. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochim. Biophys. Acta* 1861(9Part B): 1329–1335. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.04.003.

Mizusawa, N., and H. Wada. 2012. The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(1): 194–208. doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.04.008.

Mongrand, S., J. Morel, J. Laroche, S. Claverol, J.-P. Carde, et al. 2004. Lipid Rafts in Higher Plant Cells Purification And Characterization Of Triton X-100-Insoluble Microdomains From Tobacco Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 279(35): 36277–36286. doi: 10.1074/jbc.M403440200.

Murata, N., and D.A. Los. 1997. Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiol* 115(3): 875–879.

Neale, C., J.C.Y. Hsu, C.M. Yip, and R. Pomès. 2014. Indolicidin Binding Induces Thinning of a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal* 106(8): L29–L31. doi: 10.1016/j.bpj.2014.02.031.

Neves, A.R., C. Nunes, H. Amenitsch, and S. Reis. 2015. Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: a membrane biophysical study. : 11.

Nowotarska, S.W., K.J. Nowotarski, M. Friedman, and C. Situ. 2014. Effect of Structure on the Interactions between Five Natural Antimicrobial Compounds and Phospholipids of Bacterial Cell Membrane on Model Monolayers. *Molecules* 19(6): 7497–7515. doi: 10.3390/molecules19067497.

Oda, Y. 2018. Emerging roles of cortical microtubule–membrane interactions. *J Plant Res* 131(1): 5–14. doi: 10.1007/s10265-017-0995-4.

Orłowski, A., M. Grzybek, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, et al. 2012. Strong preferences of dopamine and l-dopa towards lipid head group: importance of lipid composition and implication for neurotransmitter metabolism. *Journal of Neurochemistry* 122(4): 681–690. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07813.x.

Palonciová, M., R. DeVane, B. Murch, K. Berka, and M. Otyepka. 2014. Amphiphilic Drug-Like Molecules Accumulate in a Membrane below the Head Group Region. *The Journal of Physical Chemistry B* 118(4): 1030–1039. doi: 10.1021/jp4112052.

Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* 47(7): 1597–1598. doi: 10.1194/jlr.E600002-JLR200.

Ruelland, E., and A. Zachowski. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* 69(3): 225–232. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.05.011.

Schaeffer, A., R. Bronner, P. Benveniste, and H. Schaller. 2001. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *The Plant Journal* 25(6): 605–615. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.00994.x.

Schaller, H. 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(6): 465–476. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.012.

Seeman, P. 1972. The Membrane Actions of Anesthetics and Tranquilizers. *Pharmacological Reviews* 24(4): 583–655.

Selvaraj, S., S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, and U.M. Krishnan. 2015. Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in Lipid Research* 58: 1–13. doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.002.

Sezgin, E., I. Levental, S. Mayor, and C. Eggeling. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(6): 361–374. doi: 10.1038/nrm.2017.16.

Sikorska, E., M. Dawgul, K. Greber, E. Howska, A. Pogorzelska, et al. 2014. Self-assembly and interactions of short antimicrobial cationic lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838(10): 2625–2634. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.06.016.

Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387(6633): 569–572. doi: 10.1038/42408.

Sinensky, M. 1974. Homeoviscous Adaptation--A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(2): 522–525. doi: 10.1073/pnas.71.2.522.

Sperling, P., and E. Heinz. 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1632(1): 1–15. doi: 10.1016/S1388-1981(03)00033-7.

Stillwell, W. 2016a. Membrane Proteins. *An Introduction to Biological Membranes*. Elsevier. p. 89–110

Stillwell, W. 2016b. Membrane Transport. *An Introduction to Biological Membranes*. Elsevier. p. 423–451

van Swaay, D., and A. deMello. 2013. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip* 13(5): 752. doi: 10.1039/c2lc41121k.

Tillman, T.S., and M. Cascio. 2003. Effects of Membrane Lipids on Ion Channel Structure and Function. *Cell Biochemistry and Biophysics* 38(2): 161–190. doi: 10.1385/CBB:38:2:161.

Tjellström, H., M.X. Andersson, K.E. Larsson, and A.S. Sandelius. 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ.* 31(10): 1388–1398. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01851.x.

Tjellström, H., L.I. Hellgren, Å. Wieslander, and A.S. Sandelius. 2009. Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *The FASEB Journal* 24(4): 1128–1138. doi: 10.1096/fj.09-139410.

Tomisato, W., K. Tanaka, T. Katsu, H. Kakuta, K. Sasaki, et al. 2004. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323(3): 1032–1039. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.205.

Tsuchiya, H. 2015. Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants. *Molecules* 20(10): 18923–18966. doi: 10.3390/molecules201018923.

Whitaker, B.D. 1988. Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* 27(11): 3411–3416. doi: 10.1016/0031-9422(88)80740-4.

Yeagle, P.L. 2016. Membrane Transport. *The Membranes of Cells*. Elsevier. p. 335–378

Yoshida, S., and M. Uemura. 1986. Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol.* 82(3): 807–812. doi: 10.1104/pp.82.3.807.

Zheng, G., B. Tian, F. Zhang, F. Tao, and W. Li. 2011. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant Cell Environ.* 34(9): 1431–1442. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02341.x.

Objectifs de la thèse

2.1. Contexte et stratégie

Comme décrit dans l'introduction générale, l'allélopathie représente une piste intéressante pour le développement d'alternatives à l'usage d'herbicides synthétiques dans le cadre de la lutte contre les adventices. Que ce phénomène soit exploité au travers de ce que nous avons appelé la « voie biologique » ou via la « voie chimique », une compréhension approfondie est requise pour en faire un usage sécurisé et optimisé.

La première étape fondamentale dans la compréhension des interactions allélopathiques est l'identification des molécules impliquées dans ces interactions. De nombreux composés allélochimiques ont été identifiés à ce jour, et l'étape suivante consiste à comprendre le ou les mécanismes par le(s)quel(s) ils affectent la croissance des plantes receveuses. La tâche est immense.

Souvent, l'action des molécules allélochimiques est analysée en concentrant l'attention sur les cibles classiques des herbicides synthétiques. Une telle méthodologie ne favorise pas la découverte de modes d'action inédits, si précieux pour gérer efficacement la prolifération des adventices.

Dans cette thèse, l'action de certains composés phytotoxiques extraits de plantes est étudiée selon un angle original : leur interaction avec la membrane plasmique des cellules végétales. Cette interaction présente au moins deux motifs d'intérêt majeurs. Premièrement, la membrane plasmique est le site d'interaction initial entre un composé phytotoxique et la cellule cible. Deuxièmement, la membrane plasmique joue de nombreux rôles essentiels au bon fonctionnement cellulaire, étroitement liés à son environnement lipidique subtilement régulé. Des interactions entre cet environnement lipidique et des molécules phytotoxiques amphiphiles, de nature à perturber certaines propriétés de la bicouche lipidique membranaire, pourraient engendrer des dysfonctionnements éventuellement à l'origine de la phytotoxicité de ces molécules. Comme discuté dans l'introduction générale de cette thèse, de tels mécanismes ont déjà été évoqués pour expliquer l'action de diverses molécules, notamment des anti-inflammatoires ou des molécules anesthésiques.

L'accent étant mis sur les interactions avec les lipides de la membrane plasmique des cellules de plante, plusieurs éléments étaient à fixer.

D'abord, le choix des molécules phytotoxiques à étudier. Il s'agit systématiquement de molécules initialement extraites de plantes. Leur effet phytotoxique est documenté dans la littérature, mais ne s'inscrit pas nécessairement dans une relation allélopathique (quel que soit le sens précis donné à l'allélopathie – bien que pour ce travail, nous retenons la définition donnée par Rice) clairement établie, i.e. il n'est pas démontré pour chacune de ces molécules que, en conditions naturelles, leur émission dans l'environnement depuis une plante émettrice a un effet significatif sur les plantes voisines. Plus que la pertinence écologique, nous avons privilégié les données toxicologiques et la structure des composés.

Dans un premier temps, la gramine et l'hordénine ont été sélectionnées. Ce sont de petites molécules aromatiques et amphiphiles, ce qui en fait de bonnes candidates pour des interactions avec les lipides membranaires. Ces caractéristiques présentent

également l'avantage d'être partagées par d'autres molécules documentées comme phytotoxiques, notamment des composés phénoliques. L'étude du comportement de la gramine et de l'hordénine au sein des bicouches lipidiques pourrait donc ouvrir la voie pour d'autres molécules similaires. En outre, ces deux alcaloïdes sont produits par l'orge, une plante d'intérêt économique majeur et cultivée notamment dans nos régions.

Dans un deuxième temps, notre choix s'est porté sur des molécules présentant une chaîne hydrophobe relativement longue, caractéristique a priori favorable aux interactions avec des lipides membranaires et donc intéressante dans le cadre de cette thèse. L'acide nonanoïque et la sarmentine sont deux molécules présentant cette caractéristique et pour lesquelles un mode d'action faisant intervenir une interaction membranaire est soupçonné mais non prouvé. La sorgoléone est une autre molécule possédant une longue chaîne hydrophobe et dont la structure générale laisse présager des interactions avec les lipides membranaires, bien que celles-ci n'aient pas été évoquées comme un mode d'action potentiel de la molécule.

Ensuite, le choix des techniques d'analyse. Différentes méthodes de biophysique ont été employées pour investiguer les interactions des molécules sélectionnées avec des modèles membranaires. Poser un choix au niveau des outils revient à poser un choix quant aux propriétés qu'ils permettent de mesurer. La complémentarité des méthodes expérimentales s'est avérée précieuse, de même que l'apport de la dynamique moléculaire, dont les simulations offrent la possibilité d'avoir une vision plus globale que les techniques de laboratoire, mais dont la pertinence doit être validée par des résultats expérimentaux.

Enfin, le choix des modèles membranaires. Le premier impératif était de choisir une composition lipidique compatible avec ce qui est connu des membranes plasmiques de plante. Compte tenu du caractère exploratoire de cette thèse, il a été décidé de s'en tenir à des compositions lipidiques simples (lipide pur ou mélange binaire) et générales, i.e. non spécifiques à une espèce de plante donnée. La composition lipidique de la membrane plasmique des racines de *M. recutita*, par exemple, n'étant de toute façon pas assez bien documentée pour pouvoir être reproduite fidèlement.

Les phosphatidylcholines sont un type majeur de glycérophospholipides dans les membranes plasmiques de plante, et les glycérophospholipides forment eux-mêmes une classe majeure de lipides membranaires. Les chaînes d'acide gras à 16 atomes de carbone saturées (acide palmitique), et les chaînes d'acide gras à 18 atomes de carbone à 2 insaturations (acide linoléique) étant les plus représentées au sein des glycérophospholipides, le palmitoyl-linoleoyl-phosphatidylcholine (PLPC) a été considéré comme le lipide de base lors de nos expérimentations. Dans le cas des expériences menées avec la gramine et l'hordénine, molécules chargées positivement dans des conditions physiologiques, il a été jugé intéressant de tester des compositions lipidiques intégrant un lipide chargé négativement, en l'occurrence le palmitoyl-linoleoyl-phosphoglycérol (PLPG). Les méthodes expérimentales et les contraintes liées à la mesure de certaines propriétés importantes nous ont parfois obligés à utiliser des compositions lipidiques différentes, mais comparables.

Ainsi, étudier l'impact de molécules phytotoxiques sur la température de transition de phase du PLPC en phase aqueuse par spectroscopie infrarouge ou fluorimétrie n'aurait pas été possible, le PLPC passant d'une phase gel à une phase fluide à une température d'environ -18°C . Pour ce type d'expériences, des espèces lipidiques proches, comme le DPPC (2 chaînes hydrocarbonées saturées à 16 atomes de carbone, têtes polaires identiques au PLPC, $T_m = 41^{\circ}\text{C}$), ont donc été utilisées.

2.2. Organisation de la section scientifique de la thèse

La section scientifique de la thèse est organisée en 2 parties, chacune étant associée à une publication.

Dans la première de ces parties (chapitre 3), la gramine et l'hordénine sont considérées sous un double aspect. D'abord, un aspect biologique, l'objectif étant d'établir leur toxicité à l'égard d'une adventice commune de nos régions, la camomille (*Matricaria recutita* L.). Ensuite, un aspect biophysique, l'objectif étant de caractériser leurs interactions avec des modèles membranaires. La combinaison de ces deux points de vue permet d'établir des hypothèses quant aux relations qui pourraient exister entre la structure des composés, leur effet sur les lipides membranaires et leur phytotoxicité. L'ensemble permet de caractériser les effets de petites molécules aromatiques amphiphiles sur les propriétés des bicouches lipidiques.

Dans la deuxième partie (chapitre 4), les effets de l'acide nonanoïque, de la sarmentine et de la sorgoléone sur des modèles membranaires sont étudiés. Titrages calorimétriques isothermes, techniques de fluorimétrie et simulations de dynamique moléculaire sont utilisés afin de mesurer l'impact des chaînes hydrophobes de ces molécules sur les propriétés des bicouches lipidiques.

Interactions entre des composés allélochimiques possédant une structure aromatique amphiphile et des bicouches lipidiques artificielles inspirées de la membrane plasmique de plante

Objectif et stratégie

Dans ce chapitre, deux composés allélochimiques de l'orge, la gramine et l'hordénine, sont considérés. Ces alcaloïdes possèdent une masse moléculaire faible, ainsi qu'une structure aromatique et amphiphile. Ces caractéristiques en font des objets d'étude intéressants, car ils sont susceptibles d'interagir avec les membranes biologiques. En outre, ils pourraient ouvrir la voie à de nouvelles études en biophysique dédiées à d'autres petites molécules aromatiques et amphiphiles phytotoxiques, telles que des composés phénoliques.

Notre investigation par rapport à la gramine et à l'hordénine suit deux axes : un axe biologique et un axe biophysique. Dans le premier axe, la toxicité des alcaloïdes seuls et en mélange est évaluée sur *Matricaria recutita* L., une adventice commune de nos régions. Dans le deuxième axe, une étude biophysique est menée pour caractériser les interactions membranaires de ces deux composés allélochimiques. Les différences de phytotoxicité observées entre la gramine et l'hordénine sont enfin mises en parallèle avec les différences observées au niveau de leurs interactions membranaires et l'ensemble est discuté.

Interaction between the barley allelochemical compounds gramine and hordenine and artificial lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane

Simon Lebecque^{1,2}, Jean-Marc Crowet², Laurence Lins², Benjamin M. Delory³, Patrick du Jardin⁴, Marie-Laure Fauconnier^{5*}, Magali Deleu^{2*}

¹TERRA—AgricultureIsLife, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium

²Laboratory of Molecular Biophysics at Interfaces, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Gembloux, Belgium

³Ecosystem Functioning and Services, Institute of Ecology, Leuphana University, Universitätsallee 1, 21335, Lüneburg, Germany

⁴Laboratory of Plant Biology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium

⁵General and Organic Chemistry Laboratory, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium

Etat de l'article : publié dans Scientific Reports (2018, DOI:10.1038/s41598-018-28040-6).

Abstract

Some plants are able to interfere with the development of neighbouring plants by releasing secondary metabolites into their environment. This phenomenon is known as allelopathy and is a potential tool for weed management within the framework of sustainable agriculture. While many studies have investigated the mode of action of various allelochemicals (molecules emitted by allelopathic plants), little attention has been paid to their initial contact with the plant plasma membrane (PPM). In this paper, this key step is explored for two alkaloids, gramine and hordenine, that are allelochemicals from barley. Using *in vitro* bioassays, we first showed that gramine has a greater toxicity than hordenine towards a weed commonly found in northern countries (*Matricaria recutita* L.). Then, isothermal titration calorimetry was used to show that gramine and hordenine spontaneously interact with lipid bilayers that mimic the PPM. The greater impact of gramine on the thermotropic behaviour of lipids compared to hordenine was established by means of infrared spectroscopy. Finally, the molecular mechanisms of these interactions were explored with molecular dynamics simulations. The good correlation between phytotoxicity and the ability to disturb lipid bilayers is discussed. In this study, biophysical tools were used for the first time to investigate the interactions of allelochemicals with artificial PPM.

3.1. Introduction

For decades, the use of synthetic herbicides in agriculture has been raising concerns about public health and environmental preservation (Alavanja et al., 2004; Annett et al., 2014; Landrigan and Benbrook, 2015). Additionally, herbicides could become increasingly less effective as weeds develop resistance to the commonly used products (Heap, 2014). For these reasons, new ways to support efficient and sustainable crop production are being explored. Allelopathy, defined as “any direct or indirect harmful or stimulatory effect by one plant (including microorganisms) on another through production of chemical compounds (called allelochemicals) that escape into the environment” (Rice, 1984), is one of these alternative ways that might lead to a reduction in the amount of synthetic herbicides used in the field.

Farmers may take advantage of allelopathy in several ways (Bhowmik and Inderjit, 2003; Cheng and Cheng, 2015). The ability to produce and release allelochemicals could become a selection trait in order to obtain allelopathic cultivars able to reduce the spreading of weeds (Wu et al., 1999; Bertholdsson, 2005). The impact of practices such as allelopathic crop residue management on weed development is another topic of interest in current agricultural research (Putnam et al., 1983; Weston, 1996). Another potential application of allelopathy is based on the use of allelochemicals as new herbicides or as leads for new herbicides (Vyvyan, 2002; Duke et al., 2002).

Regardless of the way in which allelopathy is to be exploited, the identification of allelochemicals and a thorough understanding of their modes of action are needed for safe and efficient use of these new approaches. Hence, recent decades have seen an increasing interest in those fields that led to the identification of numerous allelopathic species, from which various potential allelochemicals were extracted and identified. Barley, being both a major cereal grain and a well-known allelopathic plant (Overland, 1966), was no exception to the rule, and more than 40 compounds are now listed as candidate allelochemicals from this species (Kremer and Ben-Hammouda, 2009). A large number of these chemicals are small aromatic compounds; for example, gramine and hordenine (see Figure 9 for structures) are alkaloids that have been extensively studied by Lovett et al. (Hoult and Lovett,

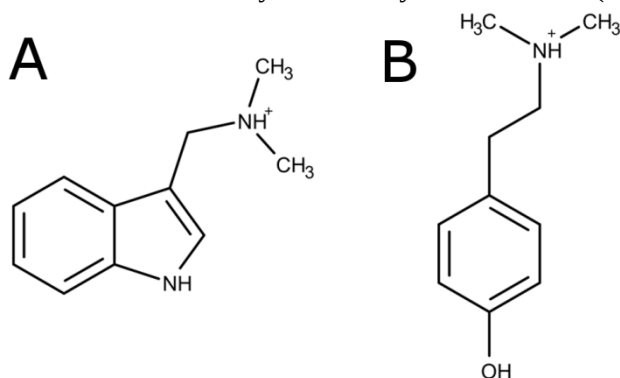


Figure 9. Molecular structures of the alkaloids under investigation. (A) Gramine and (B) hordenine (both in protonated state).

1993; Liu and Lovett, 1993; Lovett et al., 1994). The authors shed light on their phytotoxicity against white mustard and gave new insights into production levels as a function of plant cultivar and plant age.

Recently, more importance has been given to the study of gramine compared to hordenine. In addition to its phytotoxicity, gramine has been reported to be toxic to mammals (Gallagher et al., 1964; Goelz et al., 1980), insects (Corcuera, 1984, 1993), bacteria (Sepulveda and Corcuera, 1990) and fungi (Wippich and Wink, 1985; Matsuo et al., 2001). More recently, publications have emphasized its potential as an algicide (Hong et al., 2009; Laue et al., 2014). This broad-spectrum toxicity suggests that the effects of gramine might be mediated by more than one mode of action and/or through action on ubiquitous targets. Liu and Lovett described the effect of gramine on the root tip ultrastructure of white mustard (Liu and Lovett, 1993). Organellar disorganization, the occurrence of lipid droplets and increases in both size and number of vacuoles were the general symptoms that the authors observed. Several publications focused on the effect of gramine on either isolated subcellular components (Andreo et al., 1984; Niemeyer and Roveri, 1984) or complete unicellular organisms (Foguel and Chaloub, 1993). They showed that effects on energy metabolism could play a role in gramine toxicity. Subsequent studies of gramine-induced toxicity in algae highlighted an enhancement of oxidative stress by the allelochemical that might be responsible for its algicidal effect (Hong et al., 2009; Laue et al., 2014).

However, little attention was given to the initial contact between these small aromatic compounds and the plasma membrane, which is a prerequisite to any toxic mechanism. In this paper, we explore the interactions of gramine and hordenine with artificial plant plasma membranes. We first describe the phytotoxicity induced by these alkaloids on *Matricaria recutita* L. (chamomile), a common weed in northern countries. Then, we highlight the molecular interactions between the allelochemicals and model membranes by using isothermal titration calorimetry (ITC) and infrared spectroscopy. Finally, we propose a structure – function relationship with regard to the ability to interact with membranes based on molecular dynamics (MD).

3.2. Results

3.2.1. Phytotoxicity assays

The phytotoxicity of gramine and hordenine was evaluated by measuring the root length of *M. recutita* seedlings grown in the presence or absence of the alkaloids. Table 4 shows the mean root length of *M. recutita* for each treatment after 7 days. It can be seen that hordenine exhibits a slight but significant phytotoxic effect on *M. recutita*, as revealed by a decrease in mean root length of approximately 20% compared to the control. Treatments, including gramine, are much more effective in reducing the root growth in chamomile, with an inhibition percentage reaching more than 70% for the 1 mM gramine treatment. The concentration-induced differences are not significant according to the statistical analysis. One can also note that the mean root length for both gramine and hordenine together at 0.5 mM is not significantly different from that for 0.5 mM gramine alone. This should exclude the existence of any synergistic effect between hordenine and gramine on *M. recutita* at these concentrations.

Table 4. Phytotoxicity of gramine and hordenine. Effect of various gramine and hordenine treatments on the mean root length of *M. recutita* seedlings (treatments that do not share a common letter are significantly different, Tukey test with $\alpha = 0.05$).

Treatment	Mean root length ($\pm$ SD) (mm)	Inhibition percentage
Control	22.6 ^a ($\pm$ 2.6)	
Hordenine 0.5 mM	17.8 ^b ($\pm$ 1.1)	21.2%
Hordenine 1 mM	16.4 ^b ($\pm$ 2.3)	27.5%
Gramine 0.5 mM	8.4 ^c ($\pm$ 1.7)	62.9%
Gramine 1 mM	6.2 ^c ($\pm$ 1.1)	72.6%
Gramine 0.5 mM + Hordenine 0.5 mM	8 ^c ($\pm$ 1.2)	64.5%

3.2.2. Ability of alkaloids to insert into lipid bilayers

For insight into the possible interactions between the alkaloids and a model plant plasma membrane, biophysical studies were carried out. Isothermal titration calorimetry experiments have been performed to study the ability of gramine and hordenine to insert into large unilamellar vesicles (LUVs) composed of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLPC) and 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (PLPG) (4:1 molar ratio). Figure 10 (upper panels) shows typical raw data from an ITC experiment for gramine (A) and hordenine (B). The negative and decreasing heat flow observed after each injection of liposomes into a 10 μ M alkaloid solution indicate that both gramine and hordenine spontaneously interact with lipids. Figure 10 (lower panels) also displays the corresponding cumulative heat of binding ($\Sigma\delta h_i$) plotted against the lipid concentration in the cell (C_L^0). By curve fitting to this data set, it is possible to determine the partition coefficient K for each alkaloid (Heerklotz and Seelig, 2000; Zakanda et al., 2012). According to these K values, the affinity of gramine for the lipid bilayer is greater than that of hordenine.

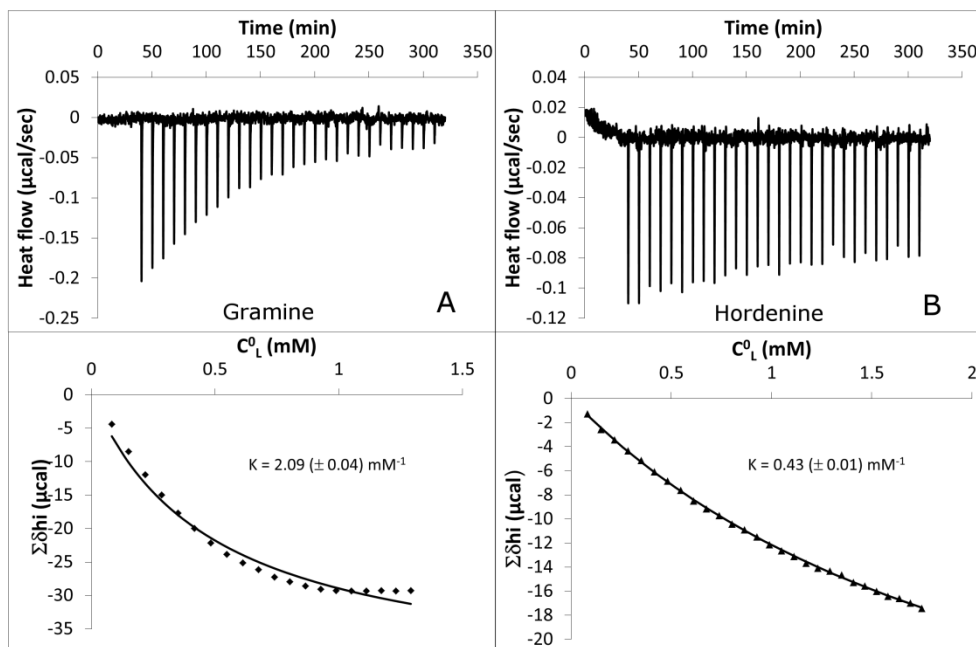


Figure 10. Interactions between alkaloids and liposomes evidenced by ITC experiments. Upper panels: raw data from ITC experiments. Each peak corresponds to a single injection of 10 μL of a 10mM PLPC-PLPG (molar ratio 4:1) LUV suspension into a solution containing (A) 10 μM gramine and (B) 10 μM hordenine at 26 $^{\circ}\text{C}$. LUV suspension and alkaloids solutions were buffered at pH 6.15 with MES – NaOH. Lower panels: cumulative heats of binding ($\Sigma\delta h_i$) as a function of the lipid concentration in the cell (C_L^0). Solid line corresponds to the best fit using the eq. 4. From this fit, the partition coefficient, K , is determined for each alkaloid (fitting uncertainty in brackets).

3.2.3. Effect of gramine and hordenine on lipid phase transition temperature

To study the impact of gramine and hordenine on lipid bilayer properties, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) experiments were performed. When applied to a liposomal suspension, infrared spectroscopy gives an interesting insight into the acyl chain conformation of lipids composing the liposomes. Peaks at approximately 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} on IR spectra for lipid samples correspond to the methylene symmetric (ν_{CH_2}) and antisymmetric (ν_{CH_2}) stretching vibrations, respectively (Lewis and McElhaney, 2013). These IR bands are sensitive to acyl chain conformation, and their maxima will shift to higher values as the relative amount of gauche conformers increases. This feature allows monitoring of the lipid phase transition that occurs in a lipidic system at a given temperature. Indeed, during chain melting, lipidic systems undergo a transition from an ordered gel phase where lipid acyl chains are in an all-trans conformation to a disordered liquid crystalline phase in which the number of gauche conformers is increased. On a graph plotting the wavenumber of the peak maximum corresponding to the methylene symmetric stretching vibration against temperature, the phase transition is thus translated into

an increase in wavenumber. Panels A, B and C from Figure 11 illustrate this for a system composed of pure 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), pure 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DMPG) and mixed DMPC:DMPG (molar ratio 4:1) in the presence or absence of alkaloids. Table 5 summarizes the phase transition temperatures (T_m) calculated for each system from the curves shown in Figure 11.A, B and C as described above. Figure 11.A shows that the phase transition temperature of DMPC vesicles is slightly reduced when gramine is added. The gramine-induced decrease is approximately 1°C (see Table 5). No T_m change is observed when hordenine is added to DMPC multilamellar vesicles (MLVs).

From Figure 11.B, it can be seen that gramine and hordenine have a strong effect on the phase transition temperature of DMPG vesicles, with T_m reductions of approximately 7.1 and 3.1°C, respectively. When working with mixed liposomes (DMPC and DMPG in a molar ratio 4:1), both alkaloids affect the lipid phase transition temperature, as illustrated in Figure 11.C. In such systems, gramine is again responsible for a larger decrease in T_m than hordenine (3.9 vs. 1.2°C).

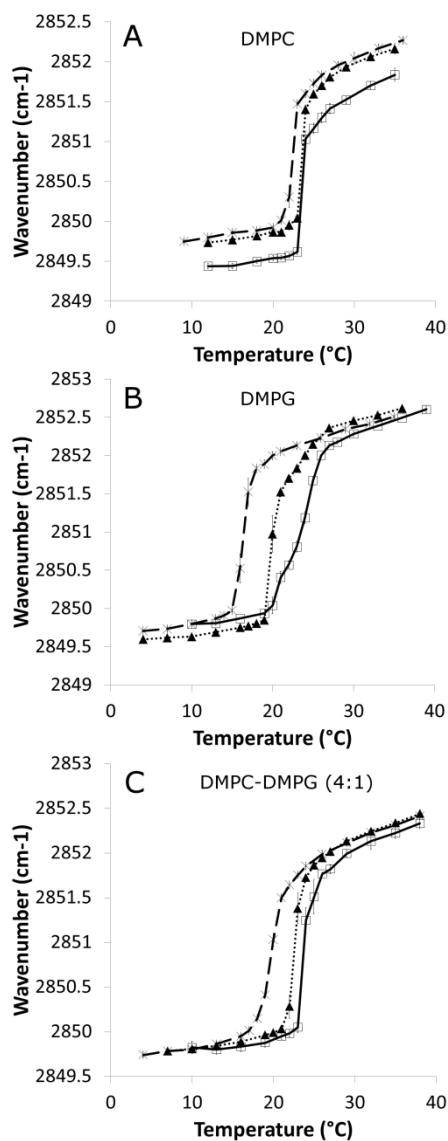


Figure 11. Effect of alkaloids on phase transition temperature of liposomes. Evolution of $s\nu_{CH_2}$ as a function of temperature for (A) DMPC liposomes, (B) DMPG liposomes and (C) DMPC-DMPG (molar ratio 4:1) liposomes in the absence of alkaloids (solid line, $\square$), in the presence of gramine (dashed line, $\times$) or in the presence of hordenine (round dotted line, $\blacktriangle$).

Table 5. Phase transition temperature of the different systems as determined from FTIR measurements (fitting uncertainty in brackets). ΔT_m is computed for each system in the presence of an alkaloid with respect to the same system in the absence of alkaloid.

Lipid composition	Alkaloid	Phase transition temperature (°C)	ΔT_m
DMPC	/	23.69 (± 0.15)	
DMPC	Gramine	22.6 (± 0.18)	-1.09
DMPC	Hordenine	23.65 (± 0.13)	-0.04
DMPG	/	23.67 (± 0.15)	
DMPG	Gramine	16.54 (± 0.17)	-7.13
DMPG	Hordenine	20.52 (± 0.25)	-3.15
DMPC:DMPG (4:1)	/	24.03 (± 0.21)	
DMPC:DMPG (4:1)	Gramine	20.17 (± 0.21)	-3.86
DMPC:DMPG (4:1)	Hordenine	22.81 (± 0.17)	-1.22

3.2.4. Interactions with lipid bilayer: a molecular dynamics insight

Molecular dynamics allows for the analysis of the behaviour of the alkaloids in the presence of lipid bilayers at the molecular level. MD simulations were thus performed to investigate the molecular mechanisms that underlie alkaloid insertion into lipid bilayers and their subsequent interactions. Initially, 32 gramine or hordenine molecules were placed outside a lipid bilayer (composed of 128 PLPC or PLPG molecules, thus reaching a lipid:alkaloid ratio of 4:1 as in the FTIR experiments). After 500 ns of simulation, most of the alkaloids were inserted into the bilayer as illustrated in Figure 12, in agreement with ITC assays.

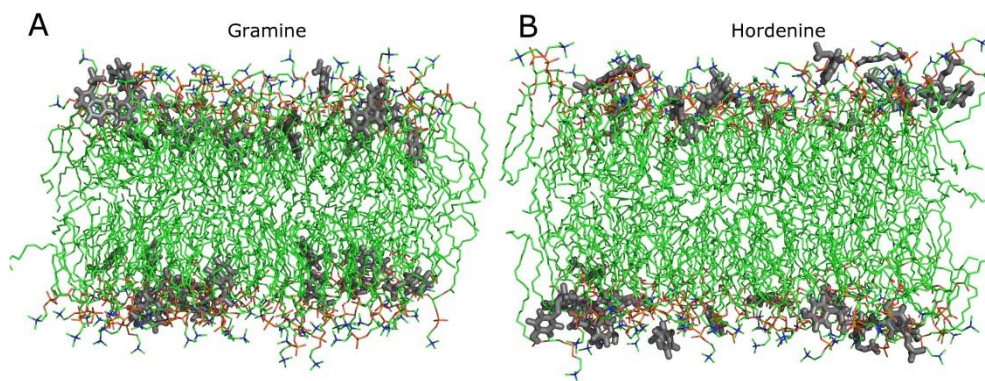


Figure 12. Snapshots after 500 ns long simulations of a PLPC bilayer with alkaloids. (A) 128 PLPC bilayer with 32 gramine molecules and (B) 128 PLPC bilayer with 32 hordenine molecules. For sake of clarity, water molecules and ions are omitted. Gray: alkaloids molecules, green: carbon atoms, red: oxygen atoms, orange: phosphor atoms, blue: nitrogen atoms.

Figure 13.A shows the average distance between the alkaloid centre of mass (COM) and the COM of the PLPC bilayer composed along the Z-axis. For better visualization, the distance between P atoms from PLPC headgroups and the bilayer COM along the Z axis is also displayed, as is the distance between the glycerol backbone COM and the bilayer COM. It can be observed that both alkaloids adsorb to the bilayer surface in approximately 100 ns. Thereafter, gramine molecules penetrate deeper into the bilayer approximately at the glycerol level, while hordenine molecules seem to be preferentially located at the water-lipid interface. Figure 13.B gives the same information for a system containing a 128 PLPG bilayer. The first contact between the alkaloids and the PLPG bilayer seems to occur significantly faster than with the zwitterionic bilayer. This is most likely due to electrostatic attraction from the negatively charged phosphate groups that are not compensated in PLPG, contrary to PLPC molecules that also bear a positively charged choline group. It can also be seen that even though gramine is again more deeply buried than hordenine, as in the PLPC bilayer, it does not penetrate the PLPG bilayer as deeply as it does the PLPC bilayer.

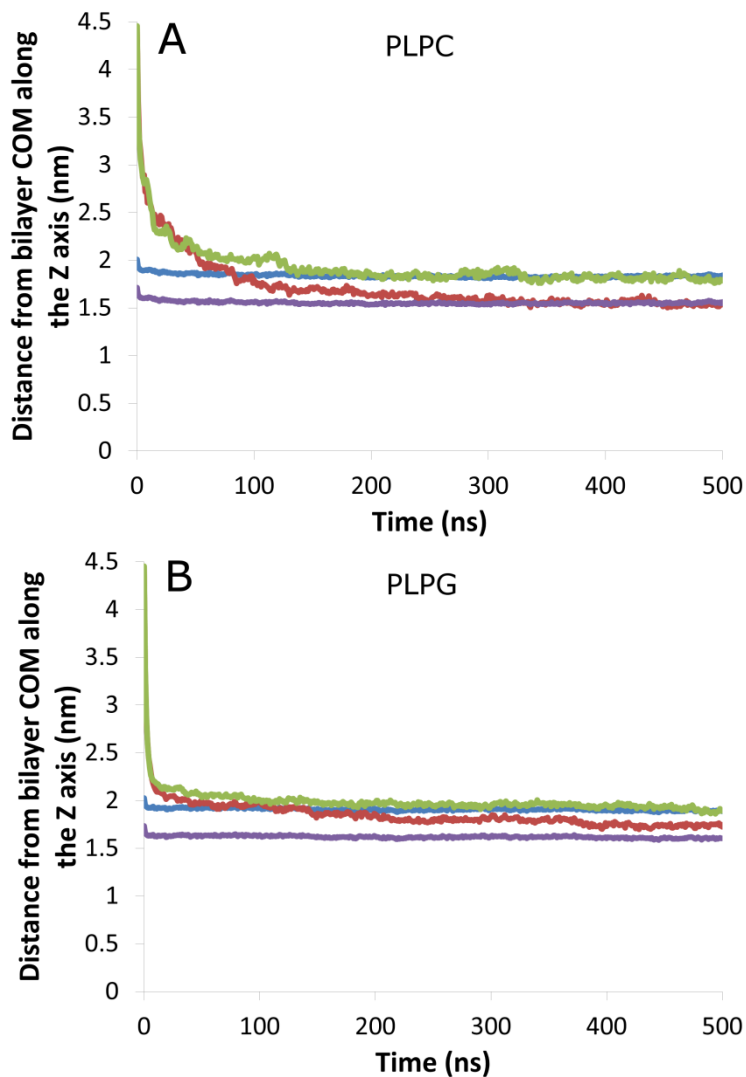


Figure 13. Location of gramine and hordenine within the lipid bilayers. Evolution of the distance from the (A) PLPC bilayer center of mass and (B) PLPG bilayer center of mass along the Z axis (nm). Gramine: red line, hordenine: green line, phosphorus atoms: blue line, glycerol backbone COM: violet line.

Again, this more superficial location is probably due to electrostatic interactions with negatively charged phosphate groups that are more accessible in PLPG. As a result, the number of hydrogen bonds between gramine molecules and phosphate groups is much higher in PLPG systems than in PLPC systems, as shown in Figure 14.A. The same is observed for hordenine (Figure 14.A). The average number of hydrogen bonds per alkaloid during the last 100 ns of simulation is also displayed for each alkaloid-lipid pair. As shown in Figure 16 (see supplementary data), the overall hydrogen bond number between alkaloids and lipids is only marginally affected by the lipid species. In both systems, gramine establishes more hydrogen bonds than hordenine, although the difference is moderate. In addition to phosphate groups, alkaloids can also create H bonds with the ester groups of the lipid molecules. The evolution of such H bonds is plotted against time in Figure 14.B. Given the previous considerations, it is not surprising to find a much higher number of alkaloid – ester H bonds when the bilayer is made of PLPC molecules. It is noteworthy that in a given system, gramine establishes more H bonds with ester groups than hordenine. The small discrepancies between the number of total H bonds (Figure 16, supplementary data) and the sum of the contributions (Figures 14.A and 14.B) from phosphate and ester groups observed for PLPG systems come from a negligible number of H bonds between the alkaloids and the headgroup glycerol.

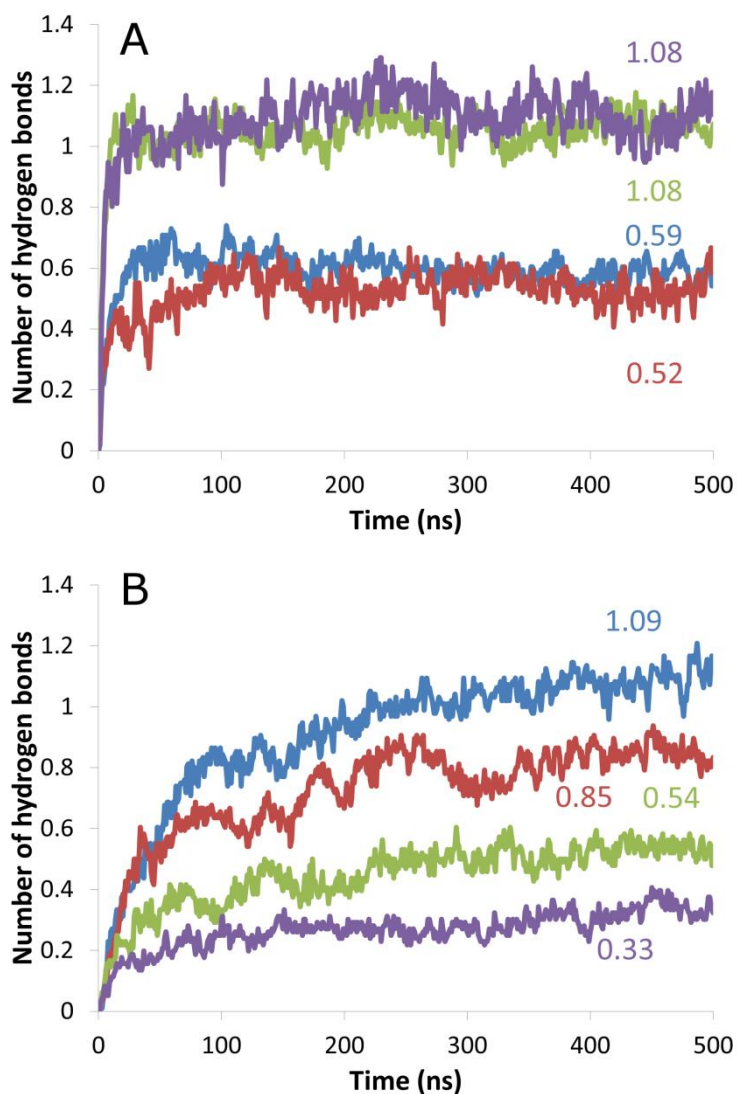


Figure 14. Analysis of hydrogen bonds formation between lipids and alkaloids. Time evolution of the number of hydrogen bonds (A) between alkaloids and lipids phosphate groups and (B) between alkaloids and lipid ester groups (average number per alkaloid in both cases). PLPC – gramine: blue line; PLPC – hordenine: red line; PLPG – gramine: green line; PLPG – hordenine: violet line. For each alkaloid – lipid pair, the average number of hydrogen bonds per alkaloid during the last 100 ns is displayed.

Polar interactions can involve two groups in each alkaloid. For gramine, these groups are the protonated amine function and the nitrogen from the indole cycle, while for hordenine, the protonated amine and the phenol function should be involved. The position of these groups within the molecular structure of each alkaloid could lead to differences between gramine and hordenine with respect to their orientation within the lipid bilayer. Figure 15.A displays the distribution of angles calculated between a vector orthogonal to the PLPC bilayer (referred to as the bilayer normal) and vectors defined on each alkaloid, as shown in the insets. For hordenine, the distribution is unimodal and centred at approximately 90° , which means that the vector is roughly perpendicular to the bilayer normal and thus parallel to the bilayer plane. In contrast, the distribution of angles for gramine is bimodal. Bimodality is explained by the presence of alkaloids within both leaflets of the bilayer, which leads to two populations of supplementary angles from a unique orientation. The gramine vector forms an angle of approximately 35° with the bilayer normal, which means that the insertion of gramine into the bilayer is much more “vertical”. Figure 15.B shows the distribution of angles between the PLPC bilayer normal and a vector orthogonal to the surface defined on each alkaloid from 3 points of the cyclic part. The unimodal distribution centred at approximately 90° observed for gramine confirms that the indolic cycle is buried almost perpendicularly to the bilayer surface. The much broader angle distribution observed for hordenine suggests that the orientation of the aromatic cycle oscillates between two extreme angles of approximately 30 and 150° . The data shown in Figure 15 for PLPC are very similar to the data for PLPG (see Figure 17, supplementary data).

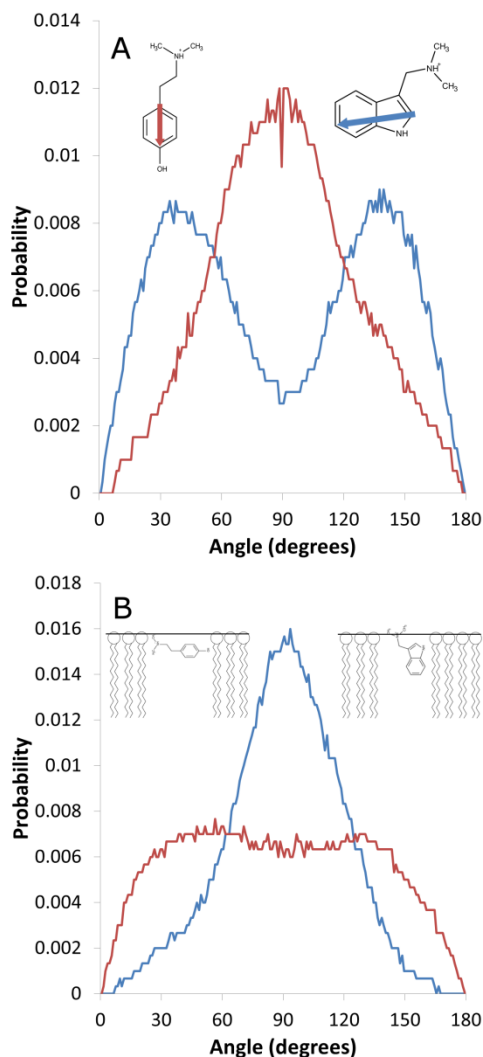


Figure 15. Orientation of gramine and hordenine within the PLPC bilayer. Distribution of angles (A) between the PLPC bilayer normal and vectors defined on each alkaloid as shown in the insets and (B) between the PLPC bilayer normal and vectors orthogonal to the surface defined on each alkaloid by 3 points of the cyclic part (insets of B: schematic representation of hordenine (left) and gramine (right) orientation within lipid bilayer). Blue line: gramine, red line: hordenine.

3.3. Discussion

In this paper, we studied the toxicity of gramine and hordenine towards *M. recutita*, a common weed, and explored the interactions of these molecules with model plant plasma membranes. Both alkaloids were shown to be phytotoxic, with gramine being much more efficient in decreasing the mean root length than hordenine. The toxicity observed for gramine is in agreement with previous studies (Overland, 1966; Liu and Lovett, 1993). From Liu and Lovett's work (Liu and Lovett, 1993), it could be inferred that hordenine is as phytotoxic as gramine, as the compounds reduce the mean root length of white mustard by a similar order of magnitude. However, Overland (Overland, 1966) had previously described the inability of hordenine to inhibit the growth of *Stellaria media* and its slight ability to inhibit flowering. Our results are somewhere in between these opposite trends, with hordenine being able to significantly affect the mean root length of chamomile, but to a lesser extent than gramine.

In addition, while Liu and Lovett concluded that gramine and hordenine have synergistic effects in inhibiting white mustard root length, our data do not support the existence of any such synergy. The contradiction between the studies may have various origins, such as the difference in target species. In addition, Liu and Lovett did not buffer their gramine and hordenine solutions, while in our assays, the solutions were buffered at pH 6.15. Differences in pH may generate differences in the protonation state of the alkaloids, which could have an impact on their toxicity. Finally, the high phytotoxicity of the 0.5 mM gramine treatment alone could eclipse synergistic effects that would occur with less concentrated solutions.

To investigate the initial contact that these alkaloids would have with the target plant cells and how they could interact with the plasma membrane, we used various biophysical techniques. By means of isothermal titration calorimetry experiments, we have shown that gramine and hordenine spontaneously interact with model plant plasma membranes, with gramine having a higher affinity for lipids. Infrared spectroscopy allowed us to study the impact of gramine and hordenine on the thermotropic behaviour of lipids, while MD enabled us to shed light on potential molecular mechanisms that underlie these effects.

For ITC experiments and MD simulations, PLPC and PLPG were used to study the specific interactions of alkaloids with these lipids that are representative of plant plasma membranes (PPMs). Indeed, phospholipids are a major component of PPMs, and among phospholipids, PC is the main lipid species ((Murphy et al., 2011) and references cited therein). Negatively charged PG represents up to 14% of phospholipids and has been further selected since total negatively charged lipids can reach a ratio of 30% of phospholipids ((Murphy et al., 2011) and references cited therein). The acyl chain length and saturation level were chosen because palmitic and linoleic acids are the most common fatty acids in phospholipids from PPMs ((Murphy et al., 2011) and references cited therein). For IR experiments, DMPC and DMPG were used because PLPC and PLPG have phase transition temperatures well below 0°C, making their study highly inconvenient. This is not expected to have any impact on the qualitative effects described in the paper, as the polar headgroups remain unchanged.

The phase transition temperatures found for pure DMPC and pure DMPG are in very good agreement with the literature (Lewis and McElhaney, 1992; Garidel et al., 2000; Pentak, 2014). The fact that the phase transition temperature of mixed DMPC-DMPG MLVs is slightly higher than the T_m of either of the pure lipid components has also been reported previously (Lewis et al., 2005).

Since the impact of both alkaloids on the lipid phase transition temperature is much higher in the DMPG system than in the DMPC system, it is assumed that their effect is mainly mediated through interactions with the lipid polar moiety rather than with the lipid hydrophobic core. Indeed, DMPC and DMPG have the same acyl chains and only differ at the headgroup (phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol, respectively). This is in good agreement with MD simulations, in which alkaloids were localized at a depth between phosphate groups and glycerol groups.

For given acyl chains, polar headgroups determine how tightly packed the lipids are in their gel phase. Their size, their charge and their ability to form H bonds between each other are parameters that affect the stabilization of the gel phase (Lewis and McElhaney, 1992). This is directly linked to the lipid phase transition temperature, as a more stabilized gel phase will need higher temperatures to undergo melting (Lewis and McElhaney, 1992). Hence, what favours tight packing of a lipid species will increase its T_m , as is the case for divalent cations added to PG vesicles, for instance (Garidel et al., 2000). In this case, the repulsive electrostatic interactions between the phosphate groups are screened by the divalent cations that also behave as bridges between headgroups. In the present study, we have shown that the DMPG T_m is decreased when gramine or hordenine is present, which is symptomatic of membrane disturbance. Even though the alkaloids are positively charged and might hence partially screen the negative charges carried by the phosphate groups, they seem to exert a destabilizing effect, possibly arising from H bond interference. McMullen et al. (McMullen et al., 2009) suggested that attractive forces that occur between polar headgroups in the DMPC bilayer and in the DMPG bilayer should be very similar since both lipids have approximately the same T_m . However, the authors assumed that the nature of the headgroup - headgroup interactions should differ. Repulsive electrostatic interactions in DMPG are thought to be overcompensated by intermolecular H bonds. DMPC molecules, however, do not possess a H bond donor, and only weak electrostatic interactions occur between phosphate groups and choline moieties. All in all, the strength of the interactions between polar headgroups is supposed to be similar, resulting in a T_m of approximately 23°C for both lipid species. According to our MD data, gramine and hordenine are able to establish H bonds with phosphate groups much more efficiently in a PG bilayer than in a PC bilayer, which is attributed to the absence of a positively charged group in PG. Our hypothesis is that these alkaloid - lipid headgroup H bonds weaken the lipid headgroup - headgroup H bonds and, together with the electrostatic attraction occurring between alkaloids and lipid phosphate groups, promote effective alkaloid intercalation between the headgroups. This could increase the headgroup - headgroup spacing and thus loosen the packing, destabilizing the bilayer and resulting in a T_m decrease.

For PC, the presence of the positively charged choline groups prevents the protonated alkaloids from interacting with phosphate groups as much as they do in PG systems. H bond data from MD suggest that both gramine and hordenine are more likely to interact with ester groups rather than phosphate groups in PC systems, while the opposite is observed with PG. Additionally, the native absence of any headgroup – headgroup H bonds in PC means that none of the alkaloids can act on them to lower T_m . However, gramine was shown to be oriented almost perpendicularly to the bilayer surface, while hordenine is roughly parallel to the bilayer surface. Given the orientation and location of gramine, it is reasonable to think that its polar moiety is favourably located at the lipid-water interface, while the most apolar atoms are more deeply buried to avoid contact with water. We assume that this vertical anchoring into the bilayer is responsible for minor steric disturbances around the glycerol region that give rise to the slight reduction in T_m for DMPC. On the other hand, for hordenine, the polar moiety – apolar moiety frontier is less evident, with an OH group and an amine group located on opposite sides of the aromatic ring. Hence, vertical anchoring is not thermodynamically favoured, as it would involve the location of a polar group in a less polar environment. As a result, hordenine is less able to perturb the DMPC bilayer than gramine, and no T_m shift is observed in the DMPC – hordenine system. This is also translated into a higher number of hydrogen bonds between gramine and ester groups for a given lipid species. This difference in orientation might also explain the higher efficiency of gramine in lowering the T_m of DMPG vesicles compared to hordenine.

Interactions with membranes could play a role in gramine and hordenine phytotoxicity. Even though additional evidence is needed, the good correlation between the ability to lower T_m and the observed phytotoxicity might be meaningful in this regard. The molecular effects of the alkaloids on lipid bilayers explored in this study are instructive in several ways. Subtle changes in lipid properties may have a direct impact on the conformation of proteins that are embedded within the lipid bilayer through lateral pressure modifications. This kind of mechanism has been frequently cited to explain the mode of action of small amphipathic compounds, such as anaesthetics, for instance (Cantor, 1997, 2003; Heimburg and Jackson, 2007). This hypothesis surely deserves attention since many putative allelochemicals are small aromatic compounds bearing polar group(s), such as benzoic and cinnamic acid derivatives (Yu and Matsui, 1997; Kaur et al., 2005). In the case of gramine and hordenine, these considerations might be specifically extended to the thylakoids and mitochondria. Thylakoid membranes contain 5 to 15% PG (Sakurai et al., 2006; Boudière et al., 2014) plus 10 to 30% SQDG (sulfoquinovosyl diacylglycerol), another negatively charged lipid. In the dimeric PSII complex, the PG ratio increases to 30% and is proven to play a major role in electron transport mediated by plastoquinone Q_B (Sakurai et al., 2006). Mitochondrial membranes are made of approximately 5% PG and more than 10% cardiolipin (Horvath and Daum, 2013), a lipid species with a molecular structure very similar to a dimer of PG. These considerations may be related to previous studies that reported an impact of gramine on energy metabolism (Andreo et al., 1984; Niemeyer and Roveri, 1984; Foguel and Chaloub, 1993).

Apart from the putative mechanism of action through a direct effect on lipid properties, our data suggest an attractive effect of the lipids on gramine and hordenine together with a preferential location around the polar headgroups. This result could be a clue suggesting that if the alkaloids have specific targets, these targets might be located in membranes as well. In addition, it leads to the question “how do those alkaloids enter the cell?”, as they mostly interact with polar parts of lipids. Over the course of the three MD replicates of each system (1.5 μ s per system in total), none of the 32 alkaloids crossed the PLPC or the PLPG bilayer. Even though the sampling is not sufficient to rule out spontaneous membrane crossing, this observation might indicate that simple diffusion is not sufficient to ensure the transport of the protonated alkaloids through the lipid bilayer. Their uptake might thus depend on active transport (with “pumps” that require metabolic energy) or facilitated diffusion (with carrier or channel proteins that do not require metabolic energy). Since the structure of gramine is similar to that of tryptophan and the structure of hordenine is similar to that of tyrosine, amino acid transporters (Fischer et al., 1998) might be involved in such uptake mechanisms. Moreover, it has been shown that antifungal azole drugs accumulate in fungi cells by facilitated diffusion (Mansfield et al., 2010; Esquivel and White, 2017), and a similar mechanism might occur here.

Finally, the molecular behaviour described in this paper might have consequences on human health. Recently, dopamine has been reported to lower DMPG T_m without having a significant effect on DMPC T_m (Jodko-Piorecka and Litwinienko, 2013). Serotonin has been described as being able to decrease the phase transition temperature of DMPC (Bauer et al., 1990; Seeger et al., 2007; Peters et al., 2013). In addition to their structural similarity, dopamine and serotonin share other similarities with hordenine and gramine, respectively, in their effects on the thermotropic behaviour of lipids. This comparison strengthens our own biophysical results, as similar molecules have similar effects on lipids. However, it also means that the alkaloids investigated here might have noxious effects on mammals through neurotransmitter interference, as already suspected for gramine and other indolealkylamines (Gallagher et al., 1964). This does not imply a straightforward decision as to whether these alkaloids should be used in weed management or not. However, it calls for more research on the toxicity, bioaccumulation and biodegradability of these compounds. Studies on the transport of gramine and hordenine from the roots to other parts of plant would also be of interest, as it would give valuable information about their *in planta* mode of action and their availability for animals. It is worth remembering that such precautions should concern not only gramine and hordenine but also every product potentially used in agricultural fields.

Biophysical techniques such as the ones used in this paper could be useful for highlighting membrane-mediated modes of action of phytotoxic compounds, including already used herbicides. It would be valuable to determine if such interactions with lipid bilayers can also be correlated to deleterious effects on human health. These still unexplored topics surely deserve attention, as they can lead to a better understanding of toxicity mechanisms.

3.4. Methods

3.4.1. Plant material and chemicals

M. recutita seeds were purchased from Emorsgate Seeds, Norfolk, United Kingdom.

DMPC, PLPC and PLPG were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. All other chemicals, including DMPG, gramine and hordenine, were purchased from Sigma Aldrich.

3.4.2. Phytotoxicity assays

One repetition for one treatment was performed as follows. Seventy-five *M. recutita* seeds were placed on Whatman filter paper wetted with 3 mL of solution. Solutions were prepared from 5 mM MES buffer in distilled water adjusted to pH 6.15 by adding NaOH. This buffer alone was used as the control, while gramine and/or hordenine were added at different concentrations to obtain different treatments (namely, hordenine 0.5 mM, hordenine 1 mM, gramine 0.5 mM, gramine 1 mM and gramine 0.5 mM + hordenine 0.5 mM). Each filter paper together with the seeds was placed in a Petri dish sealed with Parafilm®. All Petri dishes were then placed in a growth chamber with a photoperiod of 16:8 h, a light intensity of 250 lux and a temperature of 25°C for 7 days. Thereafter, the Petri dishes were scanned with a resolution of 1200 dpi. The total root length of each seedling was then measured from the scans with the software ImageJ and used as a phytotoxicity marker.

All experiments were carried out using a randomized block experimental design, with a block being composed of 7 Petri dishes (5 treatments + 2 controls performed in a random order). In total, 7 blocks were analysed, resulting in 7 repetitions for each treatment and 14 repetitions for the control. Statistical analyses were undertaken using Minitab 17.3 software.

3.4.3. Lipid preparation and isothermal titration calorimetry

For isothermal titration calorimetry experiments, large unilamellar vesicles were prepared as follows. Small amounts of lipids (PLPC:PLPG, 4:1 molar ratio) were dissolved into chloroform-methanol (2:1) in a round-bottom flask. The solvent was removed under low pressure by a rotary evaporator, and the flask was then kept overnight under vacuum to remove solvent traces. The lipid film was then hydrated with 5 mM MES buffer prepared from Milli-Q water with a pH adjusted to 6.15 by adding NaOH. The flask was maintained at a temperature (~ 37°C) well above the transition phase temperature of the lipids for at least 5 minutes and then vortexed for 1-2 minutes. This cycle was repeated 5 times. Thereafter, the MLV suspension underwent 5 freeze-thaw cycles. To obtain LUVs, the MLV suspension was then extruded 11 times through polycarbonate filters with a pore diameter of 100 nm.

ITC measurements were performed with a VP-ITC from Microcal. The sample cell (volume: 1.4565 mL) contained alkaloid solution from the same buffer as the LUV suspension, and its temperature was maintained at 26°C. Small volumes of the LUV suspension were successively injected into the sample cell: a first injection of 2 µL (not taken into account for data treatment) was followed by 28 injections of 10 µL. A spacing time of 600 s was used between each injection. Origin 7.0 software

was used for data treatment, following a previously described method (Heerklotz and Seelig, 2000; Zakanda et al., 2012) in which the cumulative heats of binding are fitted to the equation:

$$\sum_{k=1}^i \delta h_k = \Delta H_D^{w \rightarrow b} V_{cell} C_A^0 \frac{K C_L^0}{1 + K C_L^0} \quad (Eq. 4)$$

where δh_k is the heat produced after each injection, $\Delta H_D^{w \rightarrow b}$ is the difference in molar enthalpy originating from the transfer of the alkaloid molecules from the aqueous phase to the bilayer membrane, V_{cell} is the volume of the sample cell, C_A^0 and C_L^0 are the total alkaloid and lipid concentrations, respectively, in the cell after i injections and K is the partition constant.

3.4.4. Lipid preparation and Fourier transform infrared spectroscopy

For FTIR experiments, MLVs were prepared as follows. Five milligrams of lipids (pure DMPC, pure DMPG or DMPC:DMPG mix at a 4:1 molar ratio) was dissolved into chloroform-methanol (2:1) in a round-bottom tube. When present, alkaloids were dissolved together with the lipids to reach a lipid:alkaloid molar ratio of 4:1. Solvent was evaporated with a gentle N_2 flux, and the tube was then kept overnight under vacuum to remove solvent traces. The lipid film was then hydrated with 150 μ L of 50 mM MES buffer prepared from Milli-Q water with the pH adjusted to 6.15 by adding NaOH. The tube was maintained at a temperature well above the transition phase temperature of the lipids for at least 5 minutes and then vortexed for 1-2 minutes. This cycle was repeated 5 times. Thereafter, the MLV suspension underwent 5 freeze-thaw cycles.

FTIR measurements were performed with a Bruker Equinox 55 spectrometer. Sixty μ L of the prepared suspension were squeezed between CaF_2 windows separated by a 50 μ m Teflon spacer. The windows were part of an infrared cell assembled and placed in a thermojacket linked to a thermostated bath. The cell was cooled down and kept at the starting temperature for 15 minutes before a first measurement was made. The temperature was then increased (at an approximate rate of 1°C/min) and the sample was allowed to equilibrate for 10 minutes at each desired temperature before spectrum recording. Temperature intervals between two measurements were 3, 2 or 1 °C, depending on how close the phase transition temperature was. Every spectrum was the result of an average of 64 scans between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} with a resolution of 2 cm^{-1} .

The spectra were corrected for CO_2 and H_2O absorption and baseline corrected. Peak picking was made by a standard method from OPUS software. The values of peak maximum corresponding to the symmetric stretching of methylene groups for each temperature were then averaged for 3 replicates and plotted against temperature. A Boltzmann curve was fitted to the resulting sigmoidal curve with Origin 7.0 software to obtain its inflection point, which gives the phase transition temperature of the system.

3.4.5. Molecular dynamics

Simulations have been performed with GROMACS 4.6.7 and the united atom GROMOS 53a6 force field (Oostenbrink et al., 2004) with three replicates. Gramine

and hordenine topologies have been manually refined from Automatic Topology Builder's results (Malde et al., 2011). PLPC and PLPG topologies were derived from POPC and POPG topologies developed by Piggot et al. as Gromos-CKP forcefield (Piggot et al., 2011, 2012). Bilayers containing 128 lipids were generated and hydrated by using Memgen (Knight and Hub, 2015) and then allowed to equilibrate during 200 ns simulations before use. Each system was solvated with SPC water (Hermans et al., 1984). 32 alkaloids were randomly added at least 1 nm away from the bilayer surface and 32 Cl⁻ ions were added to get an overall charge of zero. All systems firstly underwent a 100 ps NVT equilibration followed by a 1 ns NPT equilibration during which alkaloids were under position restraints. 500 ns production runs were then performed. For the production runs, temperature was maintained to an average value of 298K by using the Nose-Hoover thermostat (Nosé, 1984; Hoover, 1985) with a $\tau_T = 0.5$ ps. Semi-isotropic pressure (1 bar) was maintained by using the Parrinello-Rahman barostat (Parrinello and Rahman, 1981) with a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ and $\tau_p = 2$ ps. Electrostatic interactions were treated by using the particle mesh Ewald (PME) method. A twin-range cut-off was used for Van der Waals interactions (short-range = 0.9 nm, long-range = 1.4 nm). Bond lengths were maintained with the LINCS algorithm (Hess et al., 1997). Trajectories were analyzed with GROMACS tools as well as with homemade scripts and were visually analyzed with VMD (Humphrey et al., 1996) and PYMOL (The PyMOL Molecular Graphics System,) software packages.

3.5. References

- Alavanja, M.C.R., J.A. Hoppin, and F. Kamel. 2004. Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25(1): 155–197. doi: 10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020.
- Andreo, C.S., E.G. Orellano, and H.M. Niemeyer. 1984. Uncoupling of Spinach Thylakoids by Gramine. *Z. Für Naturforschung C* 39(7–8): 746–748.
- Annett, R., H.R. Habibi, and A. Hontela. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34(5): 458–479. doi: 10.1002/jat.2997.
- Bauer, M., C. Megret, A. Lamure, C. Lacabanne, and M.-J. Fauran-Clavel. 1990. Differential scanning calorimetry study of the interaction of antidepressant drugs, noradrenaline, and 5-hydroxytryptamine with a membrane model. *J. Pharm. Sci.* 79(10): 897–901.
- Bertholdsson, N.-O. 2005. Early vigour and allelopathy– two useful traits for enhanced barley and wheat competitiveness against weeds. *Weed Res.* 45(2): 94–102. doi: 10.1111/j.1365-3180.2004.00442.x.
- Bhowmik, P.C., and Inderjit. 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Prot.* 22(4): 661–671. doi: 10.1016/S0261-2194(02)00242-9.
- Boudière, L., M. Michaud, D. Petroustos, F. Rébeillé, D. Falconet, O. Bastien, S. Roy, G. Finazzi, N. Rolland, J. Jouhet, M.A. Block, and E. Maréchal. 2014. Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1837(4): 470–480. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.007.

Cantor, R.S. 1997. The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36(9): 2339–2344. doi: 10.1021/bi9627323.

Cantor, R.S. 2003. Receptor Desensitization by Neurotransmitters in Membranes: Are Neurotransmitters the Endogenous Anesthetics? *Biochemistry* 42(41): 11891–11897. doi: 10.1021/bi034534z.

Cheng, F., and Z. Cheng. 2015. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.01020.

Corcuera, L.J. 1984. Effects of indole alkaloids from Gramineae on aphids. *Phytochemistry* 23(3): 539–541.

Corcuera, L.J. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry* 33(4): 741–747.

Duke, S.O., F.E. Dayan, A.M. Rimando, K.K. Schrader, G. Aliotta, A. Oliva, and J.G. Romagni. 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed Sci.* 50(2): 138–151. doi: 10.1614/0043-1745(2002)050[0138:IPCFNF]2.0.CO;2.

Esquivel, B.D., and T.C. White. 2017. Accumulation of Azole Drugs in the Fungal Plant Pathogen *Magnaporthe oryzae* Is the Result of Facilitated Diffusion Influx. *Front. Microbiol.* 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01320.

Fischer, W.-N., B. André, D. Rentsch, S. Krolkiewicz, M. Tegeder, K. Breitzkreuz, and W.B. Frommer. 1998. Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* 3(5): 188–195. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01231-X.

Foguel, D., and R.M. Chaloub. 1993. Effects of the Alkaloid Gramine on the Light-Harvesting, Energy Transfer, and Growth of *Anabaena* sp. (PCC 7119). *Plant Physiol.* 101(2): 633–639. doi: 10.1104/pp.101.2.633.

Gallagher, C.H., J.H. Koch, R.M. Moore, and J.D. Steel. 1964. Toxicity of *Phalaris tuberosa* for sheep. *Nature* 204(4958): 542–545.

Garidel, P., A. Blume, and W. Hübner. 2000. A Fourier transform infrared spectroscopic study of the interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1466(1–2): 245–259. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00166-8.

Goelz, M.F., H. Rothenbacher, J.P. Wiggins, W.A. Kendall, and T.V. Hershberger. 1980. Some hematological and histopathological effects of the alkaloids gramine and hordenine on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Toxicology* 18(2): 125–131.

Heap, I. 2014. Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Manag. Sci.* 70(9): 1306–1315. doi: 10.1002/ps.3696.

Heerklotz, H., and J. Seelig. 2000. Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1508(1–2): 69–85. doi: 10.1016/S0304-4157(00)00009-5.

Heimburg, T., and A.D. Jackson. 2007. The Thermodynamics of General Anesthesia. *Biophys. J.* 92(9): 3159–3165. doi: 10.1529/biophysj.106.099754.

Hermans, J., H.J.C. Berendsen, W.F. Van Gunsteren, and J.P.M. Postma. 1984. A consistent empirical potential for water–protein interactions. *Biopolymers* 23(8): 1513–1518. doi: 10.1002/bip.360230807.

Hess, B., H. Bekker, H.J. Berendsen, J.G. Fraaije, and others. 1997. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18(12): 1463–1472.

Hong, Y., H.-Y. Hu, X. Xie, A. Sakoda, M. Sagehashi, and F.-M. Li. 2009. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Toxicol.* 91(3): 262–269. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.11.014.

Hoover, W.G. 1985. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31(3): 1695–1697. doi: 10.1103/PhysRevA.31.1695.

Horvath, S.E., and G. Daum. 2013. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* 52(4): 590–614. doi: 10.1016/j.plipres.2013.07.002.

Hoult, A.H.C., and J.V. Lovett. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. III. A method for identification and quantification of hordenine and gramine in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Chem. Ecol.* 19(10): 2245–2254.

Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14(1): 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

Jodko-Piorecka, K., and G. Litwinienko. 2013. First Experimental Evidence of Dopamine Interactions with Negatively Charged Model Biomembranes. *ACS Chem. Neurosci.* 4(7): 1114–1122. doi: 10.1021/cn4000633.

Kaur, H., Inderjit, and S. Kaushik. 2005. Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* 43(1): 77–81. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.12.007.

Knight, C.J., and J.S. Hub. 2015. MemGen: a general web server for the setup of lipid membrane simulation systems. *Bioinformatics* 31(17): 2897–2899. doi: 10.1093/bioinformatics/btv292.

Kremer, R.J., and M. Ben-Hammouda. 2009. Allelopathic Plants. 19. Barley (*Hordeum vulgare* L). *Allelopathy J.* 24(2). http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth_type=crawler&jrnl=09714693&AN=44329536&h=7BcTV7sEl2gKhMzfM5H5DOOjax1fsGUTbHRgvv17y2ISDZRvzhU6lKsuE4xbfWRk9M%2ByiHWZ2YjzCEgUmOqJOG%3D%3D&crl=c (accessed 26 May 2014).

Landrigan, P.J., and C. Benbrook. 2015. GMOs, Herbicides, and Public Health. *N. Engl. J. Med.* 373(8): 693–695. doi: 10.1056/NEJMp1505660.

Laue, P., H. Bährs, S. Chakrabarti, and C.E.W. Steinberg. 2014. Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine. *Chemosphere* 104: 212–220. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.11.029.

Lewis, R., and R.N. McElhaney. 1992. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Lewis, R.N.A.H., and R.N. McElhaney. 2013. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim.*

Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1828(10): 2347–2358. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.018.

Lewis, R.N.A.H., Y.-P. Zhang, and R.N. McElhaney. 2005. Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1668(2): 203–214. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.12.007.

Liu, D.L., and J.V. Lovett. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* 19(10): 2231–2244.

Lovett, J.V., A.H.C. Houlst, and O. Christen. 1994. Biologically active secondary metabolites of barley. IV. Hordenine production by different barley lines. *J. Chem. Ecol.* 20(8): 1945–1954. doi: 10.1007/BF02066235.

Malde, A.K., L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P.C. Nair, C. Oostenbrink, and A.E. Mark. 2011. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* 7(12): 4026–4037. doi: 10.1021/ct200196m.

Mansfield, B.E., H.N. Oltean, B.G. Oliver, S.J. Hoot, S.E. Leyde, L. Hedstrom, and T.C. White. 2010. Azole Drugs Are Imported By Facilitated Diffusion in *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi. *PLOS Pathog.* 6(9): e1001126. doi: 10.1371/journal.ppat.1001126.

Matsuo, H., K. Taniguchi, T. Hiramoto, T. Yamada, Y. Ichinose, K. Toyoda, K. Takeda, and T. Shiraishi. 2001. Gramine Increase Associated with Rapid and Transient Systemic Resistance in Barley Seedlings Induced by Mechanical and Biological Stresses. *Plant Cell Physiol.* 42(10): 1103–1111. doi: 10.1093/pcp/pce139.

McMullen, T.P.W., R.N.A.H. Lewis, and R.N. McElhaney. 2009. Calorimetric and spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788(2): 345–357. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.11.012.

Murphy, A.S., B. Schulz, and W. Peer. 2011. *The Plant Plasma Membrane*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Niemeyer, H.M., and O.A. Roveri. 1984. Effects of gramine on energy metabolism of rat and bovine mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 33(19): 2973–2979.

Nosé, S. 1984. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52(2): 255–268. doi: 10.1080/00268978400101201.

Oostenbrink, C., A. Villa, A.E. Mark, and W.F. Van Gunsteren. 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090.

Overland, L. 1966. The Role of Allelopathic Substances in the “Smother Crop” Barley. *Am. J. Bot.* 53(5): 423. doi: 10.2307/2440341.

Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52(12): 7182–7190. doi: 10.1063/1.328693.

Pentak, D. 2014. Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochim. Acta* 584: 36–44. doi: 10.1016/j.tca.2014.03.020.

Peters, G.H., C. Wang, N. Cruys-Bagger, G.F. Velardez, J.J. Madsen, and P. Westh. 2013. Binding of Serotonin to Lipid Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 135(6): 2164–2171. doi: 10.1021/ja306681d.

Piggot, T.J., D.A. Holdbrook, and S. Khalid. 2011. Electroporation of the *E. coli* and *S. Aureus* Membranes: Molecular Dynamics Simulations of Complex Bacterial Membranes. *J. Phys. Chem. B* 115(45): 13381–13388. doi: 10.1021/jp207013v.

Piggot, T.J., Á. Piñeiro, and S. Khalid. 2012. Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study. *J. Chem. Theory Comput.* 8(11): 4593–4609. doi: 10.1021/ct3003157.

Putnam, A.R., J. DeFrank, and J.P. Barnes. 1983. Exploitation of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. *J. Chem. Ecol.* 9(8): 1001–1010.

Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press.

Sakurai, I., J.-R. Shen, J. Leng, S. Ohashi, M. Kobayashi, and H. Wada. 2006. Lipids in Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes of Cyanobacteria and Higher Plants. *J. Biochem. (Tokyo)* 140(2): 201–209. doi: 10.1093/jb/mvj141.

Seeger, H.M., M.L. Gudmundsson, and T. Heimburg. 2007. How Anesthetics, Neurotransmitters, and Antibiotics Influence the Relaxation Processes in Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* 111(49): 13858–13866. doi: 10.1021/jp075346b.

Sepulveda, B.A., and L.J. Corcuera. 1990. Effect of gramine on the susceptibility of barley leaves to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 29(2): 465–467.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, LLC.

Vyvyan, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58(9): 1631–1646. doi: 10.1016/S0040-4020(02)00052-2.

Weston, L.A. 1996. Utilization of Allelopathy for Weed Management in Agroecosystems. *Agron. J.* 88(6): 860–866.

Wippich, C., and M. Wink. 1985. Biological properties of alkaloids. Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Experientia* 41(11): 1477–1479.

Wu, Pratley, Lemerle, and Haig. 1999. Crop cultivars with allelopathic capability. *Weed Res.* 39(3): 171–180. doi: 10.1046/j.1365-3180.1999.00136.x.

Yu, J.Q., and Y. Matsui. 1997. Effects of Root Exudates of Cucumber (*Cucumis sativus*) and Allelochemicals on Ion Uptake by Cucumber Seedlings. *J. Chem. Ecol.* 23(3): 817–827. doi: 10.1023/B:JOEC.0000006413.98507.55.

Zakanda, F.N., L. Lins, K. Nott, M. Paquot, G.M. Lelo, and M. Deleu. 2012. Interaction of Hexadecylbetainate Chloride with Biological Relevant Lipids. *Langmuir* 28(7): 3524–3533. doi: 10.1021/la2040328.

Acknowledgments

We would like to thank the FNRS (PDR grant T.1003.14), the Belgian Program on Interuniversity Attraction Poles initiated by the Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (IAP P7/44 iPros), and the University of Liège (Action de Recherche Concertée-Project FIELD) for financial support.

Partial computational resources have been provided by the Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI), funded by the Fonds de la Recherche Scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS) under Grant No. 2.5020.11.

We thank Pr. Edwin de Pauw for comments on the manuscript. We thank Lucas Vanderavero, Hazar Rouihem, Pierre Delaplace and Imen Bouhaouel for their advice and technical support.

SL is funded by the Cellule d'Appui à la Recherche et à l'Enseignement (CARE) AgricultureIsLife (University of Liège). MD and LL are Senior Research Associates for the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS).

Author contributions

MD and MLF are the project leaders and contributed equally to the work. SL performed the experiments and the overall data analysis and wrote the manuscript. MD performed ITC data treatment and prepared figure 10. BD and PdJ contributed to the phytotoxicity assays, JMC and LL contributed to the molecular dynamics part. All authors revised the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no financial and non-financial competing interests.

3.6. Supplementary data

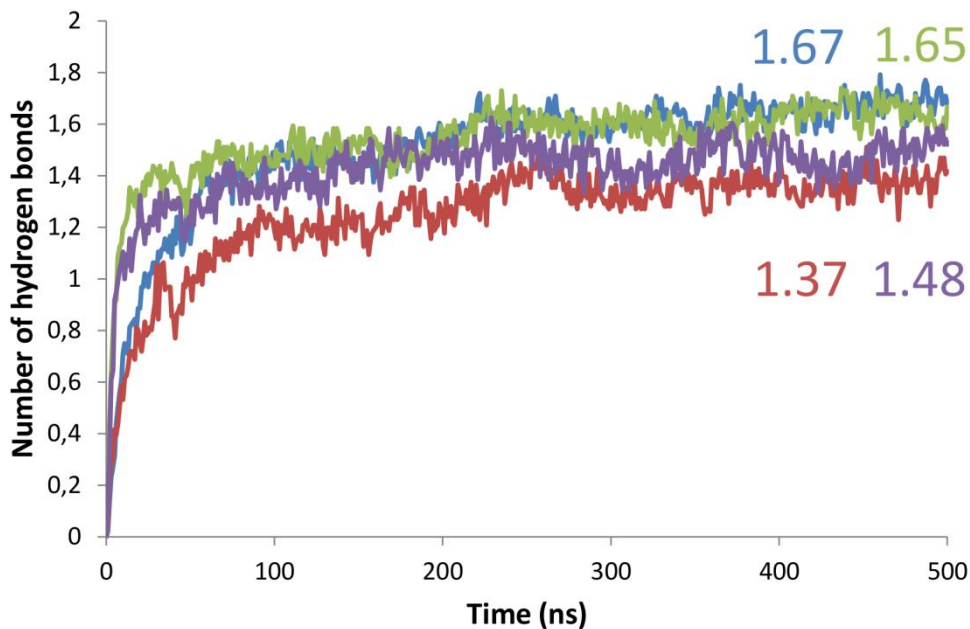


Figure 16. Time evolution of the number of hydrogen bonds between alkaloids and lipids (average number per alkaloid). PLPC – gramine: blue line; PLPC – hordenine: red line; PLPG – gramine: green line; PLPG – hordenine: violet line. For each alkaloid – lipid pair, the average number of hydrogen bonds per alkaloid during the last 100 ns is displayed.

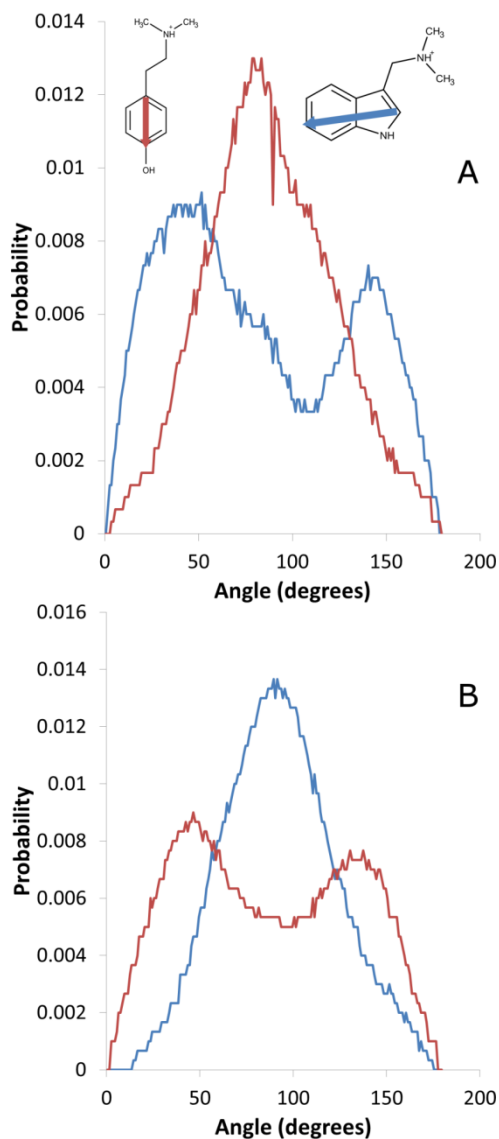


Figure 17. Distribution of angles (A) between the PLPG bilayer normal and vectors defined on each alkaloid as shown in the insets and (B) between the PLPG bilayer normal and vectors orthogonal to the surface defined on each alkaloid by 3 points of the cyclic part. Blue line: gramine, red line: hordenine.

Interactions entre des herbicides naturels possédant une chaîne hydrophobe et des bicouches lipidiques inspirées de la membrane plasmique de plante

Objectif et stratégie

Ce chapitre est consacré à l'étude de trois molécules phytotoxiques d'origine végétale : l'acide nonanoïque, la sarmentine et la sorgoléone. La structure chimique de ces composés est caractérisée par la présence d'une chaîne hydrophobe. Une telle caractéristique est, *a priori*, de nature à favoriser l'existence d'interactions membranaires. De telles interactions sont d'ailleurs suspectées d'être à l'origine de la phytotoxicité de l'acide nonanoïque et de la sarmentine.

Une étude biophysique est ainsi réalisée pour investiguer le comportement de ces 3 molécules en présence d'une bicouche lipidique et leur éventuel effet sur les propriétés de cette bicouche. Dans le cadre de cette thèse, cela permet d'explorer un autre type de structures, après les petites molécules aromatiques amphiphiles, dans le contexte des interactions membranaires.

Interactions between natural herbicides and lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane

S. Lebecque^{1,2}, L. Lins¹, F. E. Dayan³, ML. Fauconnier^{4†}, M. Deleu^{1†*}

¹ Laboratory of Molecular Biophysics at Interfaces – Gembloux Agro-Bio Tech – University of Liege – Passage des Déportés, 2 – 5030 Gembloux – Belgium

² TERRA – AgricultureIsLife - Gembloux Agro-Bio Tech - University of Liege - Passage des Déportés, 2 – 5030 Gembloux – Belgium

³Department of Bioagricultural Sciences and Pest Management - 1179 Campus Delivery - Colorado State University - Fort Collins, CO 80523-1179 – United States

⁴ General and Organic Chemistry Laboratory - Gembloux Agro-Bio Tech - University of Liege - Passage des Déportés, 2 – 5030 Gembloux – Belgium

† Co-last authors

Etat de l'article : soumis à Frontiers in Plant Science (2018).

Abstract

Natural phytotoxic compounds could become an alternative to traditional herbicides in the framework of sustainable agriculture. Nonanoic acid, sarmentine and sorgoleone are such molecules extracted from plants and able to inhibit the growth of various plant species. However, their mode of action is not fully understood and despite clues indicating that they could affect the plant plasma membrane, molecular details of such phenomenon are lacking. In this paper, we investigate the interactions between those natural herbicides and artificial bilayers mimicking the plant plasma membrane. First, their ability to affect lipid order and fluidity is evaluated by means of fluorescence measurements. It appears that sorgoleone has a clear ordering effect on lipid bilayers, while nonanoic acid and sarmentine induce no or little change to these parameters. Then, a thermodynamic characterization of interactions of each compound with lipid vesicles is obtained with isothermal titration calorimetry, and their respective affinity for bilayers is found to be ranked as follows: sorgoleone > sarmentine > nonanoic acid. Finally, molecular dynamics simulations give molecular details about the location of each compound within a lipid bilayer and confirm the rigidifying effect of sorgoleone. Data also suggest that mismatch in alkyl chain length between nonanoic acid or sarmentine and lipid hydrophobic tails could be responsible for bilayer destabilization. Results are discussed regarding their implications for the phytotoxicity of these compounds.

Keywords: plasma membrane, lipid, natural herbicides, phytotoxicity, allelopathy, sorgoleone, sarmentine, nonanoic acid.

4.1. Introduction

Weeds management is a key point for an efficient agriculture and nowadays it mainly relies on the use of herbicides. Unfortunately, traditional herbicides are becoming ineffective because of the evolution of resistance, and there are some public concern related to the potential environmental and health impact of pesticides. In this context, identification of natural phytotoxic compounds with new modes of action is a promising way to reach a more sustainable agriculture. Much effort has been made in this direction, which enabled isolation and identification of numerous molecules with an herbicidal activity.(Dayan and Duke, 2014) However, a comprehensive understanding of the mechanisms underlying the phytotoxicity of such molecules is mandatory prior to their safe use on the field. In this paper, three naturally-occurring compounds, namely nonanoic acid, sarmentine and sorgoleone were considered.

Nonanoic acid (Figure 18.A) (also known as pelargonic acid) is produced by geranium (*Pelargonium* spp.). It has been used for years as a contact herbicide quickly leading to necrotic lesions on aerial parts of the target plants. A comparison of the phytotoxicity of various fatty acids as a function of their carbon chain length demonstrated that fatty acids with C9 to C11 chain lengths were more active than fatty acids with shorter or longer carbon chains.(Fukuda et al., 2004) . According to Lederer et al., their phytotoxicity is due to fatty acids' ability to penetrate and destabilize plasma membranes.(Lederer et al., 2004) However, there is no study accurately investigating the interactions between nonanoic acid and biological membranes.

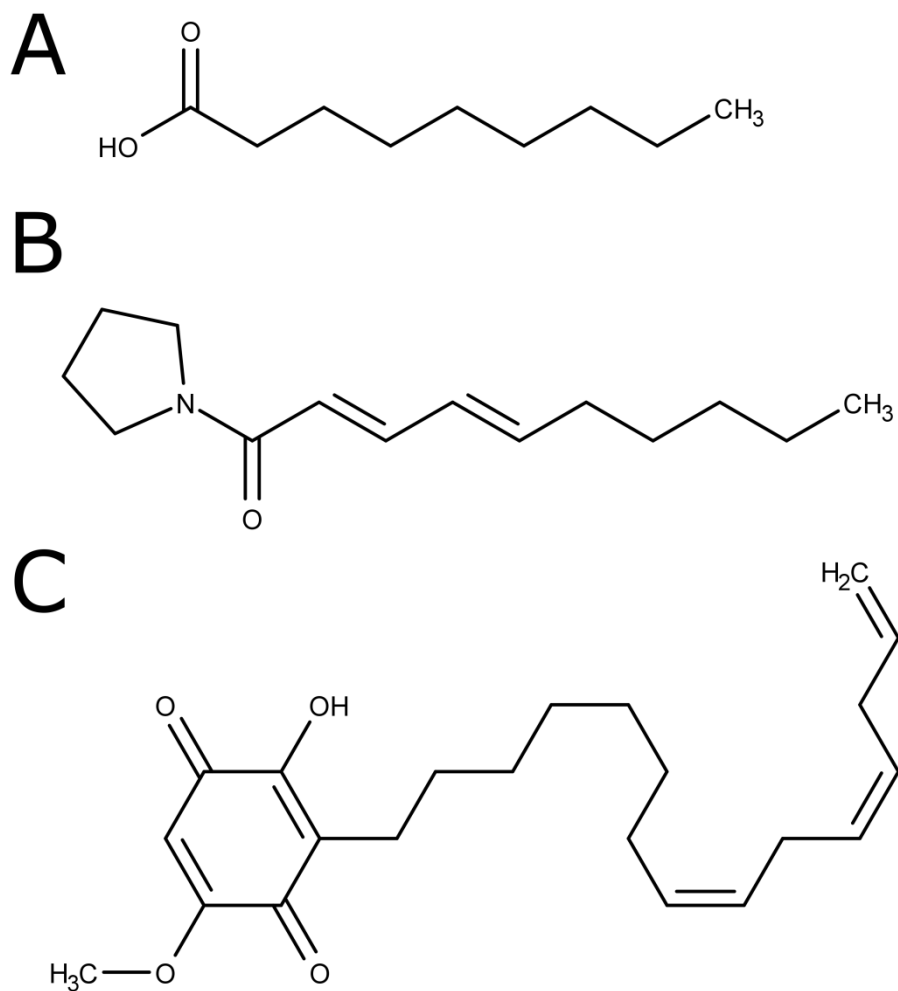


Figure 18. Molecular structures of (A) nonanoic acid, (B) sarmentine and (C) sorgoleone.

Sarmentine (Figure 18.B), a recently isolated amide from long pepper (*Piper longum* L.) fruit, has herbicidal activity on a variety of plant species.(Huang et al., 2010) Plants treated with sarmentine develop very similar symptoms to those observed on plants treated with decanoic acid. The authors suggested that sarmentine phytotoxicity is primarily exerted through membrane destabilization related to its alkyl chain length. More recent work demonstrated that sarmentine is likely to have multiple mechanisms of action, including inhibition of photosystem II and inhibition of enoyl-ACP reductase.(Dayan et al., 2015) At the same time, it was proven that sarmentine induces destabilization of plasma membrane from cotyledon discs assays.(Dayan et al., 2015) This effect was also observed with nonanoic acid, again suggesting that both molecules share at least one mode of action. Sarmentine was however much more potent in inducing destabilization of membrane integrity.(Dayan et al., 2015)

Sorgoleone (Figure 18.C) is an allelochemical compound exuded from *Sorghum bicolor* (L.) Moench roots.(Einhellig and Souza, 1992; Dayan et al., 2010 p. 201) This molecule inhibits photosynthesis by interrupting the photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts.(Nimbal et al., 1996; Gonzalez et al., 1997) However, sorgoleone lipophilicity prevents its translocation from roots to foliage and thus it is not able to reach its putative site of action.(Hejl and Koster, 2004; Dayan et al., 2009) Moreover, even when it is directly applied on the foliage, sorgoleone is ineffective on photosynthesis of mature plants.(Dayan et al., 2009) *In planta* inhibition of photosynthesis seems to only occur in young seedlings. Hence, it is supposed that sorgoleone exhibits its toxicity towards older plants through other modes of action. For instance, Hejl and Koster observed that root H⁺-ATPase is inhibited by sorgoleone.(Hejl and Koster, 2004) They suggested that the resulting solute and water uptake alteration could contribute to the phytotoxicity of the herbicidal molecule.

Nonanoic acid, sarmentine and sorgoleone have a broad spectrum toxicity(Einhellig and Souza, 1992; Dayan et al., 2012, 2015) and share structural similarities: their molecular weight is low (< 400 g/mol) and they all possess highly hydrophobic alkyl tails and somewhat polar heads. Given these common features, we can make the assumption that they could interact with lipid membranes and that their efficacy might be linked to this property. Concerning nonanoic acid and sarmentine, such interactions with cellular membranes are thought to be at least partly responsible for their phytotoxicity, but the molecular understanding and details are lacking. The putative interactions occurring between sorgoleone and lipid bilayers is also evident since its target site in photosystem II is embedded in the thylakoid membrane of chloroplasts. Due to its chemical structure and its low mobility within plant tissues supposedly due to a high lipophilicity, investigating the behavior of sorgoleone in the presence of lipid membranes could bring valuable information about its mechanism of action.

Biological membranes are very complex structures composed of numerous lipid species forming a bilayer in which a variety of proteins are embedded. Because of this complexity, model membranes are generally used to mimick biological membranes. Such model membranes are made of one or a few representative lipid species forming structures such as monolayers, bilayers or vesicles that share

common features with biological membranes.(Deleu et al., 2014) In this work, interactions between each of the above herbicidal molecules and plant model membranes are explored. At first, the effect of the herbicidal compounds on the lipid bilayer order and fluidity is studied at various temperatures with fluorescent measurements. Then, a thermodynamic characterization of the interactions occurring between the chemicals under investigation and lipid vesicles is carried out by using isothermal titration calorimetry. Finally, molecular mechanisms of these interactions are explored by performing molecular dynamics simulations.

4.2. Material and methods

4.2.1. Chemicals

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLPC) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc.. Sarmentine was purchased from Toronto Research Chemicals Inc. All other chemicals, including nonanoic acid, laurdan and DPH were purchased from Sigma Aldrich. Sorgoleone was extracted from *Sorghum bicolor* (L.) Moench as described previously.(Dayan et al., 2009)

4.2.2. Liposome preparations

For laurdan generalized polarization experiments, multilamellar vesicles (MLVs) prepared as follows were used. A small volume of DPPC dissolved into chloroform-methanol (2:1) was either put alone or mixed with small amounts of nonanoic acid, sarmentine or sorgoleone (dissolved into 2:1 chloroform-methanol) into a round bottom tube to reach a lipid:herbicide molar ratio of 5:1. Solvent was then evaporated under a gentle stream of nitrogen. The tube was kept overnight under vacuum to remove solvent traces. The resulting film was then hydrated with 10 mM TRIS - HCl buffer at pH 7 prepared from Milli-Q water. The tube was maintained at a temperature ($\sim 51^{\circ}\text{C}$) well above the transition phase temperature of the lipid for at least 1 h and vortexed for 1-2 min every 10 min. Thereafter, the MLV suspension underwent 5 freeze-thaw cycles.

For DPH anisotropy measurements, pure DPPC large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by following the same procedure followed by 11 passages through polycarbonate filters with a pore diameter of 100 nm at a temperature ($\sim 51^{\circ}\text{C}$) well above the transition phase temperature of the lipid.

For isothermal titration calorimetry (ITC), LUVs were used. Small amounts of lipids (PLPC) were dissolved into chloroform-methanol (2:1) in a round-bottom flask. A rotary evaporator was used to remove solvent under low pressure and the flask was then kept overnight under vacuum to remove solvent traces. The lipid film was then hydrated with 10 mM TRIS - HCl buffer at pH 7 prepared from Milli-Q water. The flask was maintained at a temperature ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) well above the transition phase temperature of the lipid for at least 1 h and vortexed for 1-2 min every 10 min. Thereafter, the MLV suspension underwent 5 freeze-thaw cycles. In order to get LUVs, MLV suspension was then extruded 11 times through polycarbonate filters with a pore diameter of 100 nm.

4.2.3. Laurdan generalized polarization

Fluorescence of laurdan in DPPC (either pure or mixed with one of the studied molecules in a lipid:herbicide molar ratio of 5:1) MLVs was monitored at various temperatures with a Perkin Elmer LS50B fluorescence spectrometer. Lipid concentration was 50 μM and 1 μL of a stock solution of laurdan in DMSO was added to 3 ml of MLV suspension to reach a lipid:probe molar ratio of 200:1. A corresponding blank was prepared by adding 1 μL of pure DMSO instead of the laurdan stock solution to 3 ml of MLV suspension from the same batch. Both preparations were kept at a temperature ($\sim 51^\circ\text{C}$) well above the phase transition temperature of DPPC for 1 h in the dark to let the probe partition into the MLVs. Samples were then placed in 10 mm pathlength quartz cuvettes under continuous stirring while the cuvette holder was thermostated with a circulating bath. Samples were equilibrated at the initial temperature of 31°C for 15 min before the first measurements were performed. For the measurements, excitation wavelength was set to 360 nm, and at least 12 measurements of emission intensities at 440 nm and 490 nm were recorded and averaged for each sample at each temperature. An emission spectrum from 400 nm to 600 nm was also recorded for each sample-temperature combination. Excitation slit width was set to 2.5 nm, while emission slit width ranged from 4 to 6.5 nm. When all measurements at a given temperature were recorded, temperature was increased by 4, 3, 2 or 1 degree(s) and samples were equilibrated for 10 min once the new temperature was reached. Generalized polarization (GP) of laurdan was then calculated according to (Parasassi et al., 1991; Jay and Hamilton, 2017):

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Where I_{440} and I_{490} are the blank-subtracted emission intensities at 440 nm and 490 nm, respectively. All experiments were carried out at least three times, each time with liposomes prepared fresh daily.

4.2.4. DPH anisotropy

Fluorescence anisotropy measurements of DPH in DPPC LUVs either in the gel phase (at 35°C) or in the liquid phase (at 50°C) were performed with a Perkin Elmer LS50B fluorescence spectrometer equipped with polarizers. To prepare the samples, stock solutions of nonanoic acid, sarmentine or sorgoleone dissolved into DMSO at various concentrations were prepared. Four μL of each of these solutions were added to aliquots (3 mL) of 50 μM DPPC LUV suspension to reach final concentrations of 10, 25, 50 and 100 μM of natural herbicide. For pure DPPC sample, 4 μL of DMSO were added to an aliquot of 50 μL DPPC LUV suspension. One μL of a stock solution of DPH dissolved into DMSO was then added to each sample to reach a lipid:probe molar ratio of 200:1. Corresponding blanks were prepared by adding 1 μL of pure DMSO instead of the DPH stock solution. Each preparation was kept at a temperature ($\sim 51^\circ\text{C}$) well above the phase transition temperature of DPPC for 1 h in the dark to let the probe and the molecules partition into the LUVs. Samples were then placed in 10 mm pathlength quartz cuvettes under continuous stirring while the cuvette holder was thermostated with a circulating bath. Samples were equilibrated at the desired temperature for 15 min before the

measurements were performed. For the measurements, excitation and emission wavelengths were set to 360 nm and 426 nm, respectively. Excitation slit width was set to 2.5 nm, while emission slit width ranged from 4.5 to 12 nm. Both excitation and emission polarizers can be either in a vertical (V) or a horizontal (H) orientation. For each sample, at least 12 measurements were recorded and averaged for each of the four possible combinations of polarizers orientations. The anisotropy parameter, r , was then calculated according to previous papers: (Harris et al., 2002; Lakowicz, 2006)

$$r = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times G \times I_{VH}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Where I_{VV} and I_{VH} are the blank-subtracted emission intensities with the excitation and the emission polarizers oriented as indicated by the subscripts in this order (for instance, I_{VH} corresponds to the blank-subtracted emission intensity with the excitation polarizer in a vertical orientation and the emission polarizer in a horizontal orientation) and G is a correction factor obtained as follows:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Where I_{HV} and I_{HH} are the blank-subtracted emission intensities with the excitation and the emission polarizers oriented as indicated by the subscripts in this order. All experiments were carried out at least three times. Measurements at 50°C were carried out with liposomes prepared fresh and measurements at 35°C were performed within 3 d following liposomes preparation.

4.2.5. Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were performed with a VP-ITC from Microcal (Microcal Inc., Northampton, MA, USA). The sample cell contained 1.4565 mL of a solution of nonanoic acid (500 μM), sarmentine (75 μM) or sorgoleone (75 μM) dissolved in the same buffer as the LUV suspension. Reference cell was filled with mQ water. Small aliquots of LUV suspension were added to the sample cell with a software-controlled syringe. The first injection was 2 μL and was not taken into account for data treatment. It was followed by 28 successive additions of 10 μL , with an interval of 600 s. For nonanoic acid and sarmentine, a lipid concentration of 5 mM was used. As sorgoleone affinity for lipid vesicles was higher than the other compounds tested, lipid concentration was lowered to 1 mM for ITC experiments involving this molecule. For data treatment, Origin 7.0 software was used as previously described (Heerklotz and Seelig, 2000; Zakanda et al., 2012) in order to fit the cumulative heats of binding to the equation:

$$\sum_{k=1}^i \delta h_k = \Delta H_D^{w \rightarrow b} V_{\text{cell}} C_A^0 \frac{K C_L^0}{1 + K C_L^0} \quad (\text{Eq. 8})$$

Where δh_k is the heat produced after each injection, $\Delta H_D^{w \rightarrow b}$ is the difference in molar enthalpy originating from the transfer of the herbicidal molecules from the aqueous phase to the bilayer membrane, V_{cell} is the volume of the sample cell, C_A^0 and C_L^0 are the total herbicide and lipid concentration, respectively, in the cell after i injections and K is the partition constant. Temperature was maintained at 26°C

during the course of the experiments. Data analysis was done using Origin software (version 7.0) from Microcal.

4.2.6. Molecular dynamics

Simulations have been performed with GROMACS 4.6.7 and the united atom GROMOS 53a6 force field (Oostenbrink et al., 2004) with three replicates. Topologies of the natural herbicides have been manually refined from Automatic Topology Builder's results (Malde et al., 2011). A PLPC topology derived from Berger Lipids forcefield (Berger et al., 1997) and developed by Peter Tieleman's group (Bachar et al., 2004) was used. It is available for download on its website (Tieleman,). Bilayers containing 140 PLPC molecules and 28 herbicide (nonanoic acid, sarmentine or sorgoleone) molecules (lipid:herbicide molar ratio of 5:1) were generated and hydrated by using Memgen (Knight and Hub, 2015). Each system was solvated with SPC water (Hermans et al., 1984). Nonanoic acid being unprotonated in our simulations, 28 K^+ ions (Gurtovenko and Vattulainen, 2008; Cordoní et al., 2009) were added to systems containing nonanoic acid molecules to get an overall charge of zero. All systems firstly underwent a 100 ps NVT equilibration followed by a 1 ns NPT equilibration during which herbicides were under position restraints. 250 ns production runs were then performed from which the first 150 ns were considered as equilibration time and discarded for data analyses. For the production runs, temperature was maintained to an average value of 298K by using the Nose-Hoover thermostat (Nosé, 1984; Hoover, 1985) with a $\tau_T = 0.5$ ps. Semi-isotropic pressure (1 bar) was maintained by using the Parrinello-Rahman barostat (Parrinello and Rahman, 1981) with a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ and $\tau_P = 2$ ps. Electrostatic interactions were treated by using the particle mesh Ewald (PME) method. A cut-off of 1nm was used for Van der Waals interactions. Bond lengths were maintained with the LINCS algorithm (Hess et al., 1997). Trajectories were analyzed with GROMACS tools as well as with homemade scripts and were visually analyzed with VMD (Humphrey et al., 1996) and PYMOL (The PyMOL Molecular Graphics System,) software packages.

4.3. Results

4.3.1. Effect on bilayer order and lipid phase transition temperature

Laurdan is a fluorescent probe that readily partitions at the hydrophilic/hydrophobic interface of bilayers (Bernik et al., 2001; De Vequi-Suplicy et al., 2006). Laurdan fluorescence properties depend on the physical state of the probe environment. When inserted into a lipid bilayer in the gel phase, fluorescence intensity is maximal at an emission wavelength of about 440 nm. As the lipid bilayer undergoes transition to a liquid phase, the maximal fluorescence intensity will occur at higher emission wavelengths. This so-called "red shift" is imputed to an increased presence and mobility of water molecules around the fluorophore (Parasassi et al., 1991; De Vequi-Suplicy et al., 2006) which can be directly linked to the lipid bilayer order (Harris et al., 2002). Laurdan generalized polarization (GP) parameter has been developed in order to conveniently monitor these lipid order changes (Parasassi et al., 1991). Here, laurdan GP is used to study the effect of the natural herbicides on the phase transition temperature (T_m) of DPPC MLVs as well as to investigate their

effect on lipid order at the hydrophilic/hydrophobic interface below, around and above the T_m of DPPC.

The temperature dependence of laurdan GP for MLVs made of either pure DPPC or DPPC mixed with a natural herbicide (lipid:herbicide molar ratio of 5:1) is shown in Figure 19. Nonanoic acid and sarmentine do not affect the phase transition temperature of DPPC MLVs at this concentration. On the other hand, DPPC MLVs mixed with sorgoleone exhibit a slightly increased T_m when compared to pure DPPC. However, the cooperativity of the phase transition does not seem to be affected by sorgoleone as no broadening of the curve in this region is detected. In addition, we observe that nonanoic acid and sarmentine do not induce any change in lipid order at any temperature as their respective curves superimpose the pure DPPC curve. For sorgoleone and DPPC mixed liposomes, laurdan GP values are higher both in the gel phase and in the liquid phase when compared to the other MLV compositions. This likely indicates an ordering effect of sorgoleone on DPPC bilayer.

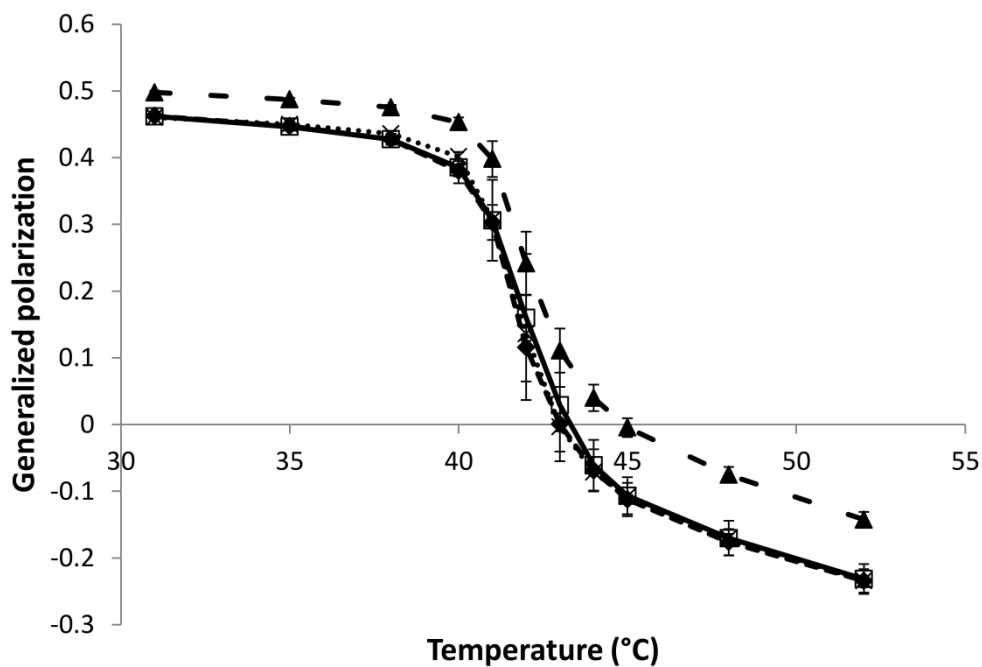


Figure 19. Evolution of laurdan generalized polarization as a function of temperature for DPPC MLVs (50 μ M) in the absence or presence (lipid:herbicide molar ratio 5:1) of natural herbicides ($\square$: pure DPPC, $\blacklozenge$: DPPC + nonanoic acid, $\times$: DPPC + sarmentine, $\blacktriangle$: DPPC + sorgoleone).

4.3.2. Study of the fluidity of the hydrophobic core of bilayer in the presence of the natural herbicides

DPH is a hydrophobic fluorescent probe that spontaneously inserts into the hydrocarbon chains region of lipid bilayers. (Kaiser and London, 1998) As its excited state lifetime is sufficiently long, DPH can change its orientation before fluorescence emission occurs. The ability of the probe to reorient within the hydrophobic core of the lipid bilayer is directly linked to the fluidity of the hydrocarbon chains of the bilayer. (Lentz, 1989; Stott et al., 2008) When the exciting light is polarized, rotational movements of the probe induce a change in polarization for the emission light. (Lentz, 1993) The less fluid is the bilayer, the less rotational movements of DPH occur and the more polarized is the emission light, which is translated into a high value of anisotropy parameter r (see Eq. 6, Methods section). Hence, this anisotropy parameter r has been monitored to investigate the effect of the natural herbicides at different concentrations on the bilayer fluidity.

The evolution of DPH anisotropy for DPPC LUVs (lipid concentration = 50 μM) at 50°C as a function of the concentration of added natural herbicides is shown in Figure 20. At this temperature, DPPC LUVs are in the liquid phase and thus exhibit low r values. Nonanoic acid does not induce any significant change in DPH anisotropy in the range of concentrations tested here (10 μM to 100 μM , i.e. a lipid:herbicide molar ratio ranging from 5:1 to 1:2). Sarmentine seems able to slightly increase r , but only at the highest concentration used in this study. Sorgoleone, on the other hand, induces a sharp rise of DPH anisotropy even at concentration as low as 10 μM . Albeit less marked, similar trends are observed at 35°C, when liposomes are in the gel phase (see Supplementary Data).

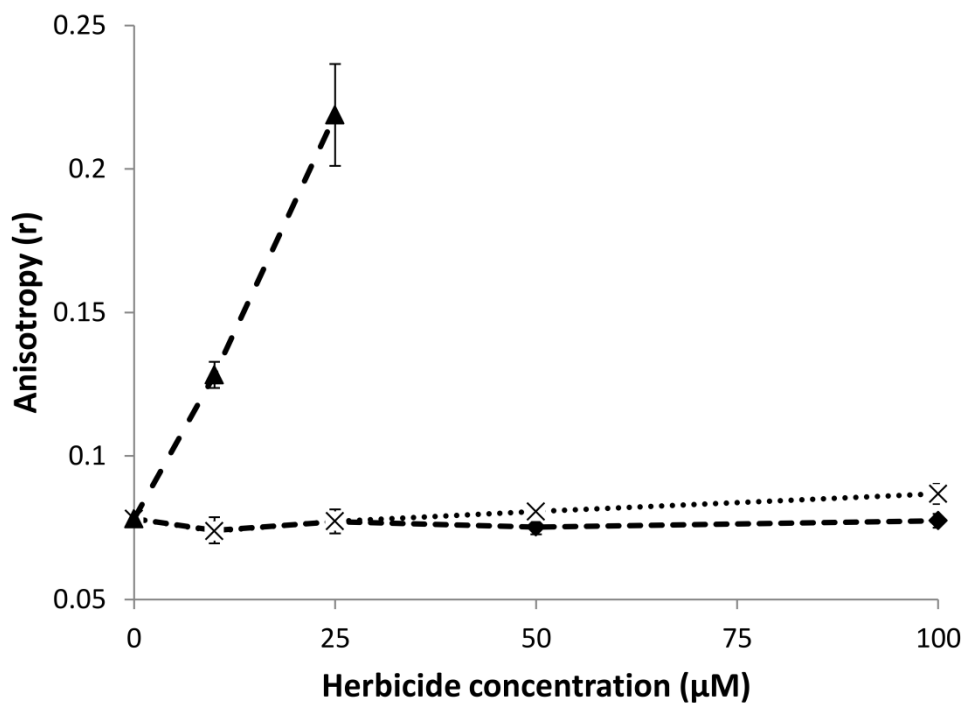


Figure 20. Evolution of DPH anisotropy for DPPC LUVs (50 μM) mixed with increasing concentrations of natural herbicides at 50°C (◆: DPPC + nonanoic acid, ×: DPPC + sarmentine, ▲: DPPC + sorgoleone).

4.3.3. Partitioning into lipid vesicles

ITC experiments were carried out to study the ability of the natural herbicides to partition into lipid bilayers and to thermodynamically characterize interactions that could occur.

Typical raw data of an ITC experiment for nonanoic acid (A), sarmentine (B) and sorgoleone (C) with PLPC LUVs are shown in figure 21 (upper panels). The corresponding cumulative heats of binding ($\Sigma\delta h_i$) are also plotted against the lipid concentration in the cell (C_L^0) (lower panels). Fitting curves are obtained from Eq. 8 and enabled determination of the partition coefficient, K , as well as thermodynamic parameters characterizing the interactions, as summarized in Table 6. ITC raw data display a gradual decrease of the positive heat flow signal over the course of the successive injections which is characteristic of a binding event. The thermodynamic parameters (Table 6) indicate that the binding is spontaneous ($\Delta G < 0$), endothermic ($\Delta H > 0$) and leads to a positive change of entropy ($\Delta S > 0$) for all three molecules. The absolute value of entropy change is much higher than the one of enthalpy change, indicating that the binding is entropy-driven. This is probably due to the transfer of the hydrophobic chain of the herbicidal molecules from the water to the hydrophobic core of the liposomes. This is supported by the good correlation observed between the number of carbon atoms in the alkyl chain of each compound and their respective magnitude of $T\Delta S_D^{w \rightarrow b}$. Nonanoic acid has the lowest binding affinity among the studied compounds. Sarmentine partition coefficient is almost one order of magnitude higher than that of nonanoic acid while sorgoleone one is two orders of magnitude larger.

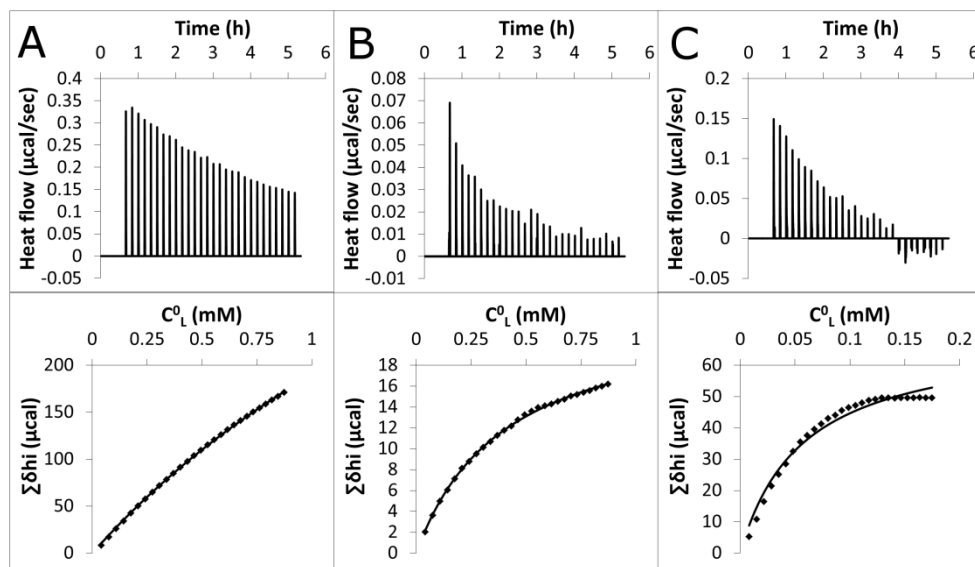


Figure 21. Upper panels: raw data from ITC experiments. Each peak corresponds to a single injection of 10 μL of a PLPC LUV suspension (5 mM for (A) and (B), 1 mM for (C)) into a solution containing (A) 500 μM nonanoic acid, (B) 75 μM sarmentine and (C) 75 μM sorgoleone at 26 $^{\circ}\text{C}$. LUV suspension and herbicides solutions were buffered at pH 7 with TRIS – HCl. Lower panels: cumulative heats of binding ($\Sigma\delta h_i$) as a function of the lipid concentration in the cell (C_L^0). Solid line corresponds to the best fit using the eq. 8.

Table 6. Thermodynamic parameters characterizing the interactions of herbicidal molecules with PLPC LUVs.

Natural compound	K (mM ⁻¹)	$\Delta H_D^{w \rightarrow b}$ (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S_D^{w \rightarrow b}$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{w \rightarrow b}$ (kJ.mol ⁻¹)
Nonanoic acid	0.36 ± 0.06	3.32 ± 0.67	27.85 ± 0.6	-24.53 ± 0.48
Sarmentine	1.69 ± 0.57	1.47 ± 0.61	29.77 ± 0.39	-28.3 ± 0.82
Sorgoleone	28.5 ± 8.33	1.79 ± 0.77	37.13 ± 0.68	-35.34 ± 0.8

4.3.4. Interaction of the natural herbicides with the lipid bilayer and their effect on the lipid order parameter studied by molecular dynamics

Molecular dynamics (MD) simulations have been carried out in order to study the molecular mechanisms underlying the interaction between the herbicidal molecules and a PLPC bilayer. Figure 22 displays snapshots at the end of 250 ns simulations with 28 molecules of (A) nonanoic acid, (B) sarmentine and (C) sorgoleone. From this figure, it can be seen that only sorgoleone, the largest molecule under investigation, is able to interact with every part of the lipid hydrophobic tails, while nonanoic acid and sarmentine are too short to significantly interact with the center of the bilayer.

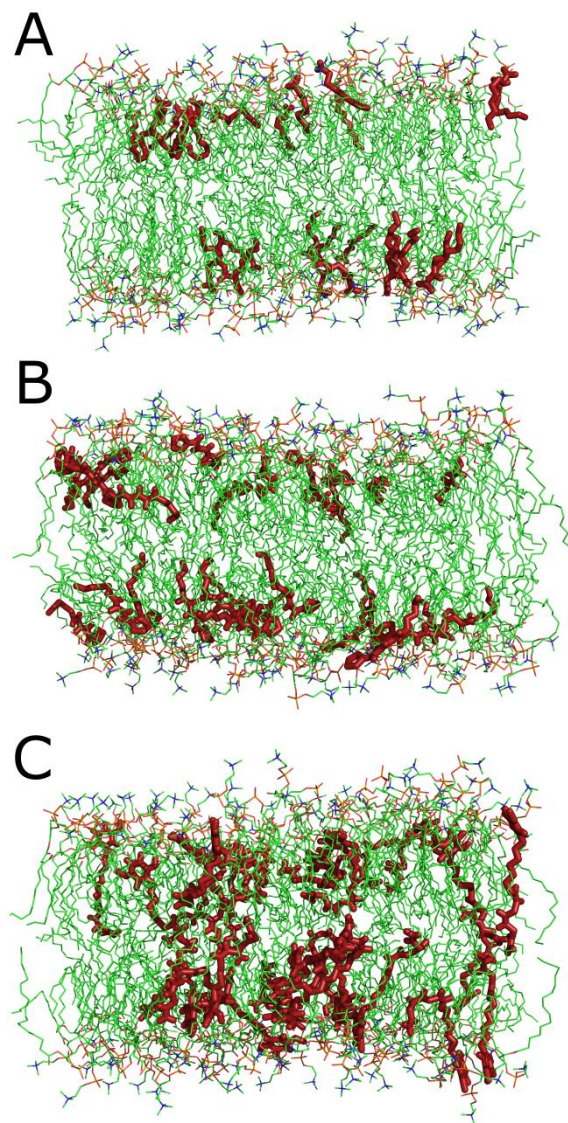


Figure 22. Snapshots after 250 ns simulations of a 140 molecules PLPC bilayer with (A) 28 nonanoic acid molecules, (B) 28 sarmentine molecules or (C) 28 sorgoleone molecules. For sake of clarity, water molecules and ions are omitted. Dark red: herbicidal molecules, green: carbon atoms, red: oxygen atoms, orange: phosphorus atoms, blue: nitrogen atoms.

The average distance between the center of mass (COM) of the bilayer and various groups of the natural herbicides along the Z-axis is plotted on figures 23A, 23B and 23C for nonanoic acid, sarmentine and sorgoleone, respectively. The average distance between the bilayer COM and the phosphorus (P) atoms of the lipid heads is also plotted, as well as the average distance between the bilayer COM and the glycerol backbone COM. From these figures, it appears that each molecule has its own insertion pattern. The last carbon atom of the alkyl chain of sorgoleone is the most deeply buried into the hydrophobic core of the bilayer, while nonanoic acid has the shallowest one. This is not surprising, as sorgoleone has the longest alkyl chain, followed by sarmentine and then nonanoic acid. Concerning the polar moiety of each molecule, it is observed that acid group of nonanoic acid is located at the level of the glycerol backbone. Its inability to penetrate deeper into the hydrophobic core of the bilayer is likely due to its negative net charge. For sorgoleone and sarmentine, on the other hand, the polar part is located slightly deeper into the bilayer. Finally, it can be noted that the P atoms – bilayer COM distance and the glycerol backbone COM – bilayer COM distance are significantly higher for simulations with sorgoleone, which indicates that this molecule induces a thickening of the bilayer.

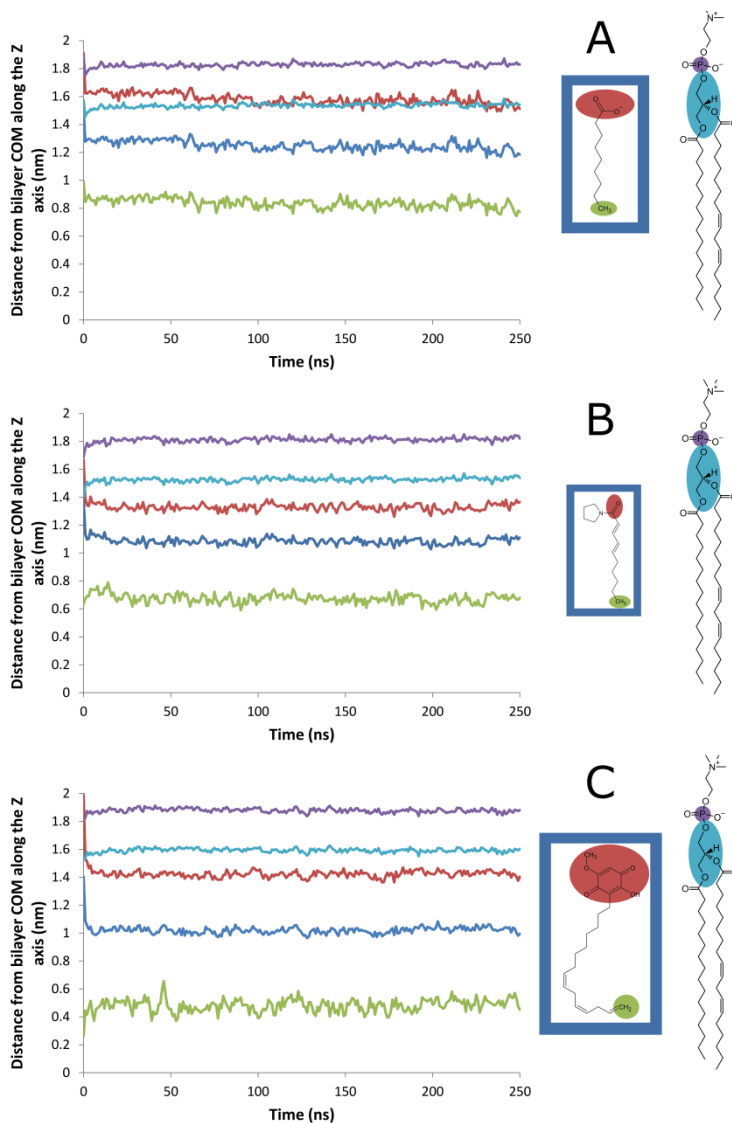


Figure 23. Evolution of the average distance between various atomic groups and the PLPC bilayer center of mass along the Z axis (nm). Blue line: herbicide (A: nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) COM, red line: herbicide (A: nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) polar part (defined as shown on the inset), green line: last methyl group of herbicide (A: nonanoic acid, B: sarmentine and C: sorgoleone) alkyl chain, violet line: PLPC phosphorus atoms, cyan line: PLPC glycerol groups.

This thickening effect of sorgoleone on the lipid bilayer is due to its ordering properties illustrated on figure 24, which shows the order parameter of each carbon atom from the palmitoyl chain during the last 100 ns of simulation for all systems. It is observed that sorgoleone indeed induces a strong ordering effect for all carbon atoms of the alkyl chain. Interestingly, nonanoic acid and sarmentine seem able to increase the order parameter of the first 8 carbon atoms only, which roughly corresponds to their own alkyl chain length. In addition, their presence seems to induce a disordering effect on the following carbon atoms of the palmitoyl chain. Similar trends, but less marked, are also observed for the linoleoyl chain (data not shown).

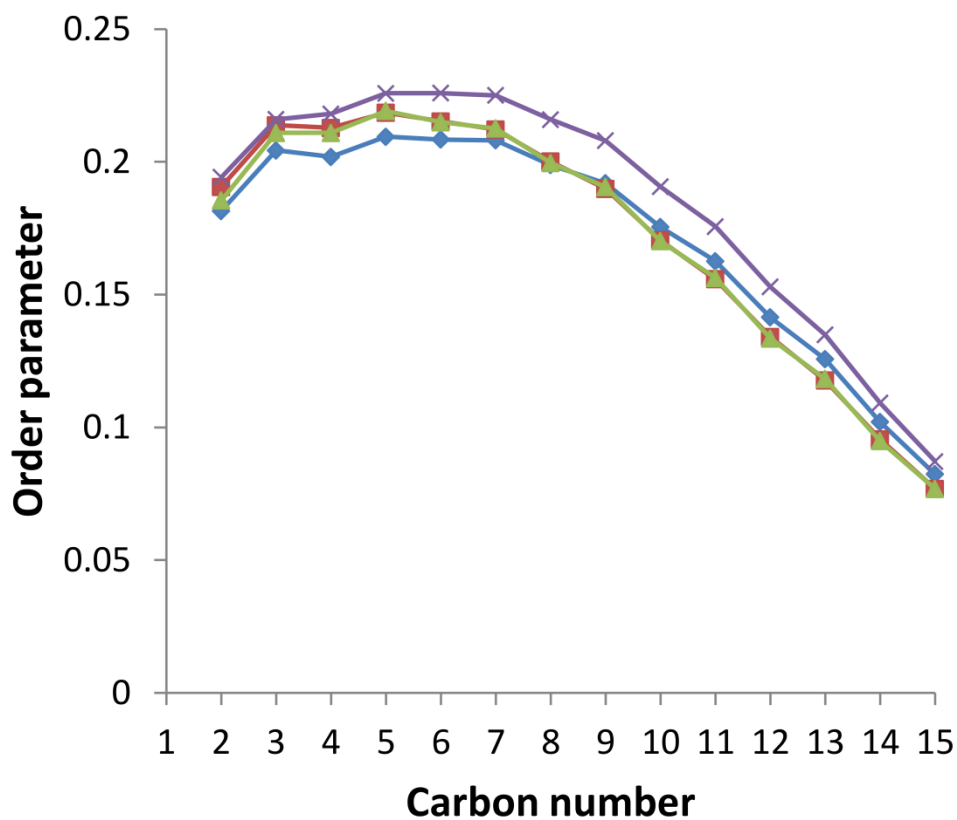


Figure 24. Order parameter for each carbon atom in the palmitoyl chain of PLPC in the presence or absence of herbicidal molecules. Blue line: pure PLPC, red line: PLPC + nonanoic acid (5:1 molar ratio), green line: PLPC + sarmentine (5:1 molar ratio), violet line: PLPC + sorgoleone (5:1 molar ratio).

4.4. Discussion

In this study, the interactions occurring between natural herbicides and model membranes made of PC lipids were investigated. Phospholipids are one of the major components of plant plasma membranes (PPM), and PC is their most common phospholipid ((Murphy et al., 2011) and references cited therein). It is also reported that palmitic and linoleic acids are the main fatty acids found in PPM phospholipids ((Murphy et al., 2011) and references cited therein). Hence, PLPC was used in ITC experiments as well as for molecular dynamics simulations. However, for fluorescence studies, DPPC was used in order to explore the impact of the molecules under investigation on lipid bilayers in both gel and liquid phases as well as their effect on phase transition temperature. It would not have been possible to study PLPC liposomes at their T_m and below with fluorescence measurements, as PLPC has a reported T_m of about -18.5°C .(Morrow et al., 1996) DPPC T_m is around 41.5°C .(Lewis and McElhaney, 1992) which is in good agreement with the laurdan GP curve of pure DPPC liposomes from this work (Fig. 3).

From the fluorescence assays, we demonstrated that nonanoic acid and sarmentine have little influence on the lipid order and phase transition temperature at the concentration tested here. In a recent work, C8 and C10 fatty acids only had a minor effect on DPPC vesicles phase transition temperature at a lipid:fatty acid molar ratio of 1:1 (Arouri et al., 2016). This is well in line with the absence of significant effect observed for nonanoic acid (lipid:fatty acid ratio of 5:1) in this study. Sarmentine was only able to induce a very slight decrease in membrane fluidity, at the highest concentration ($100\text{ }\mu\text{M}$). Only sorgoleone had dramatic effects on model membranes properties. Its ability to increase DPPC T_m and order, as well as the strong decrease of DPPC fluidity indicate that sorgoleone has an overall rigidifying effect on lipids. Alkylresorcinols with a structure similar to sorgoleone were recently found to have such impact on lipid bilayers,(Zawilska and Cieřlik-Boczula, 2017) in agreement with the data presented here.

We clearly demonstrated that the investigated compounds do interact with PLPC LUVs using ITC. Their respective affinity for such bilayers is ranked as follows: sorgoleone > sarmentine > nonanoic acid. This is meaningful when interpreting fluorescence results: the weaker partitioning of nonanoic acid and sarmentine into liposomes partly explains why these molecules had almost no impact on the studied fluorescence parameters.

With our molecular dynamics approach, natural herbicides are embedded in the lipid bilayer from the beginning of the simulations. MD data confirmed that sorgoleone induces an ordering and a thickening effect on the PLPC bilayer. Interestingly, it also showed that nonanoic acid and sarmentine slightly increase the order parameter of the upper part of lipids and slightly decrease the order parameter of the lower part of lipids. If significant, this effect could stem from an alkyl chain length mismatch between the herbicidal molecules and PLPC. In addition, MD gave interesting details about these interactions at the molecular level. The deeper location of sorgoleone within the bilayer could partially explain its higher impact on lipid properties when compared to nonanoic acid, for instance. Moreover, it is possible that its more prominent polar moiety enables more interactions with the lipid heads than sarmentine and nonanoic acid. This could lead to a strong anchorage

of sorgoleone into both polar and apolar lipid regions, which could, in turn, induce this rigidifying effect.

From these considerations, it appears that nonanoic acid and sarmentine have lower potency to affect lipid bilayer properties than sorgoleone. However, it should be reminded that model membranes used in this study were made of PC lipids only. This lipid species is a major component of plant plasma membranes, but specific interactions of nonanoic acid or sarmentine with other lipid species cannot be ruled out. Nonetheless, nonanoic acid and sarmentine spontaneously bind to PLPC liposomes in ITC assays. Hence, it is possible that the potential target on which they exert their toxicity is embedded in membranes. If both molecules have a common target located in membrane, the higher affinity of sarmentine for lipids might at least partly explain its higher toxicity compared to nonanoic acid.(Dayan et al., 2015) However, lipid affinity should not be the only factor for nonanoic acid toxicity. Indeed, the phytotoxicity of fatty acids is maximal when they are made of 9 to 11 carbon atoms(Fukuda et al., 2004) while the affinity of fatty acids for lipid vesicles increases when increasing the number of carbon atoms,(Pernille Høyrup et al., 2001) suggesting that toxicity and lipid affinity are not fully related.

From there, there are two options: (1) fatty acids phytotoxicity is not related to interactions with lipid bilayers or (2) an unknown feature of their mode of action is lowered when alkyl chain length is increased. This putative feature might be an alkyl chain length mismatch between the fatty acids and the membrane lipids. It has been reported that the degree of mismatch between alkyl chain length of lysophospholipids and membrane lipid chain length is proportional to the bilayer perturbation caused by lysophospholipids.(Henriksen et al., 2010) Hence, long chain fatty acids may have a high affinity for lipid bilayers but a low chain length mismatch with them, while short chain fatty acids have a high degree of mismatch with lipid bilayers but a low affinity for them. According to this assumption, middle chain length fatty acids would benefit from intermediate levels of affinity and mismatch, with C9 to C11 presenting optimal combinations of these two factors and thus exhibiting the highest ability for lipid bilayer perturbation and eventually the highest phytotoxicity. Effects of such alkyl chain length mismatches were suggested by our MD simulations but could probably not be efficiently probed with our fluorescent assays. Techniques that enable lipid order measurements with a resolution of a single methyl group such as ^2H NMR could be used to detect such ordering-disordering effect due to alkyl chain length mismatch.

The ordering effect that sorgoleone exerts on lipid bilayers is expected to have some consequences on membrane functions. It has been suggested that small molecules such as phytochemicals(Ingólfsson et al., 2014) or anesthetics(Cantor, 1997, 2003; Heimbürg and Jackson, 2007) could modulate the activity of membrane-embedded proteins through global perturbations of the lipid environment. Interestingly, Hejl and Koster have shown that sorgoleone inhibits the H^+ -ATPase activity.(Hejl and Koster, 2004) This transmembrane enzyme is responsible for the electrochemical gradient that enables metabolites uptake by the plant cells. A decreased activity of this crucial protein, potentially due to changes in lipid environment properties, would thus have a major impact on cell viability. The relationship between H^+ -ATPase activity and plant lipid environment has been

recently reviewed.(Morales-Cedillo et al., 2015) It is reported that modifications in membrane lipid composition are related to alterations in enzymatic activity. For instance, the presence of several sterols, molecules known for their ordering effect,(Schuler et al., 1991; Bernsdorff and Winter, 2003) induces an inhibition of H^+ -ATPase. Albeit no straightforward correlation between membrane fluidity and H^+ -ATPase activity has been established, this tends to indicate that a link could exist between the ability to alter lipid bilayer properties and the modulation of proton-pumping activity could exist. Further research is however needed in order to understand how the lipid environment and its modification by molecules such as sorgoleone could impact this enzyme.

4.5. Conclusion

In the present work, fluorescence assays have shown little effect of nonanoic acid and sarmentine on lipid bilayers fluidity and order. On the contrary, it has been shown that sorgoleone has a clear ordering effect on lipid bilayers, as it (1) increases the phase transition temperature of DPPC LUVs, (2) increases generalized polarization of laurdan of DPPC LUVs in both liquid and gel phases and (3) increases the DPH anisotropy of DPPC MLVs.

We have shown that the natural herbicides under investigation interact with lipid vesicles and that this interaction is entropy-driven. This information is important, as it reinforces the assumption that those molecules could affect plants through interactions with plasma membranes. However, the lower affinity of nonanoic acid and sarmentine when compared to sorgoleone could be responsible for their inability to disturb lipid properties monitored with our fluorescence experiments. Molecular dynamics simulations have confirmed the rigidifying effect of sorgoleone and have shown that nonanoic acid and sarmentine could affect lipid bilayers because of a length mismatch between their alkyl chains and lipid hydrophobic tails. This could explain why middle chain length fatty acids are more phytotoxic than long chain fatty acids despite their lower affinity for lipids. It has, however, to be explored with other means than those used in this study, such as 2H NMR.

The effect that sorgoleone has on lipid bilayers can be meaningful with regard to its mode of action, as modifications of lipid environment can impact processes that occur within the membrane. It is suggested that this ability to change lipid properties could be related to the inhibition of root H^+ -ATPase previously reported for this molecule.

List of abbreviations

DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; ITC: isothermal titration calorimetry ; LUV: large unilamellar vesicle ; MD: molecular dynamics ; MLV: multilamellar vesicle ; PLPC: 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.

Acknowledgments

The authors thank the FNRS (PDR grant T.1003.14), the Belgian Program on Interuniversity Attraction Poles initiated by the Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (IAP P7/44 iPros), and the University of Liège (Action de Recherche Concertée-Project FIELD) for financial support.

Partial computational resources have been provided by the Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI), funded by the Fonds de la Recherche Scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS) under Grant No. 2.5020.11.

SL is funded by the Cellule d'Appui à la Recherche et à l'Enseignement (CARE) AgricultureIsLife (University of Liège). MD and LL are Senior Research Associates for the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS).

Author Contributions

MD and MLF are the project leaders and contributed equally to the work. SL performed the experiments and the overall data analysis and wrote the manuscript. FED and LL provided technical advice. All authors revised the manuscript.

Conflict of interest

There are no conflicts to declare.

4.6. References

- Arouri, A., K.E. Lauritsen, H.L. Nielsen, and O.G. Mouritsen. 2016. Effect of fatty acids on the permeability barrier of model and biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* 200: 139–146. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.10.001.
- Bachar, M., P. Brunelle, D.P. Tieleman, and A. Rauk. 2004. Molecular Dynamics Simulation of a Polyunsaturated Lipid Bilayer Susceptible to Lipid Peroxidation. *J. Phys. Chem. B* 108(22): 7170–7179. doi: 10.1021/jp036981u.
- Berger, O., O. Edholm, and F. Jähnig. 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72(5): 2002–2013. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78845-3.
- Bernik, D.L., D. Zubiri, E. Tymczyszyn, and E.A. Disalvo. 2001. Polarity and Packing at the Carbonyl and Phosphate Regions of Lipid Bilayers. *Langmuir* 17(21): 6438–6442. doi: 10.1021/la010570s.
- Bernsdorff, C., and R. Winter. 2003. Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol, β -Sitosterol, *trans*-7-Dehydrocholesterol, Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order. *J. Phys. Chem. B* 107(38): 10658–10664. doi: 10.1021/jp034922a.
- Cantor, R.S. 1997. The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36(9): 2339–2344. doi: 10.1021/bi9627323.
- Cantor, R.S. 2003. Receptor Desensitization by Neurotransmitters in Membranes: Are Neurotransmitters the Endogenous Anesthetics? *Biochemistry* 42(41): 11891–11897. doi: 10.1021/bi034534z.
- Cordomí, A., O. Edholm, and J.J. Perez. 2009. Effect of Force Field Parameters on Sodium and Potassium Ion Binding to Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayers. *J. Chem. Theory Comput.* 5(8): 2125–2134. doi: 10.1021/ct9000763.
- Dayan, F.E., and S.O. Duke. 2014. Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. *Plant Physiol.* 166(3): 1090–1105. doi: 10.1104/pp.114.239061.
- Dayan, F.E., J. Howell, and J.D. Weidenhamer. 2009. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *J. Exp. Bot.* 60(7): 2107–2117. doi: 10.1093/jxb/erp082.
- Dayan, F.E., D.K. Owens, and S.O. Duke. 2012. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Manag. Sci.* 68(4): 519–528. doi: 10.1002/ps.2332.
- Dayan, F.E., D.K. Owens, S.B. Watson, R.N. Asolkar, and L.G. Boddy. 2015. Sarmentine, a natural herbicide from Piper species with multiple herbicide mechanisms of action. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00222.
- Dayan, F.E., A.M. Rimando, Z. Pan, S.R. Baerson, A.L. Gimsing, and S.O. Duke. 2010. Sorgoleone. *Phytochemistry* 71(10): 1032–1039. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.011.
- De Vequi-Suplicy, C.C., C.R. Benatti, and M.T. Lamy. 2006. Laurdan in Fluid Bilayers: Position and Structural Sensitivity. *J. Fluoresc.* 16(3): 431–439. doi: 10.1007/s10895-005-0059-3.

Deleu, M., J.-M. Crowet, M.N. Nasir, and L. Lins. 2014. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838(12): 3171–3190. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.08.023.

Einhellig, F.A., and I.F. Souza. 1992. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *J. Chem. Ecol.* 18(1): 1–11.

Fukuda, M., Y. Tsujino, T. Fujimori, K. Wakabayashi, and P. Böger. 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80(3): 143–150. doi: 10.1016/j.pestbp.2004.06.011.

Gonzalez, V.M., J. Kazimir, C. Nimbal, L.A. Weston, and G.M. Cheniae. 1997. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *J. Agric. Food Chem.* 45(4): 1415–1421.

Gurtovenko, A.A., and I. Vattulainen. 2008. Effect of NaCl and KCl on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Lipid Membranes: Insight from Atomic-Scale Simulations for Understanding Salt-Induced Effects in the Plasma Membrane. *J. Phys. Chem. B* 112(7): 1953–1962. doi: 10.1021/jp0750708.

Harris, F.M., K.B. Best, and J.D. Bell. 2002. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1565(1): 123–128. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00514-X.

Heerklotz, H., and J. Seelig. 2000. Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1508(1–2): 69–85. doi: 10.1016/S0304-4157(00)00009-5.

Heimburg, T., and A.D. Jackson. 2007. The Thermodynamics of General Anesthesia. *Biophys. J.* 92(9): 3159–3165. doi: 10.1529/biophysj.106.099754.

Hejl, A.M., and K.L. Koster. 2004. The Allelochemical Sorgoleone Inhibits Root H⁺-ATPase and Water Uptake. *J. Chem. Ecol.* 30(11): 2181–2191. doi: 10.1023/B:JOEC.0000048782.87862.7f.

Henriksen, J.R., T.L. Andresen, L.N. Feldborg, L. Duelund, and J.H. Ipsen. 2010. Understanding Detergent Effects on Lipid Membranes: A Model Study of Lysolipids. *Biophys. J.* 98(10): 2199–2205. doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.037.

Hermans, J., H.J.C. Berendsen, W.F. Van Gunsteren, and J.P.M. Postma. 1984. A consistent empirical potential for water–protein interactions. *Biopolymers* 23(8): 1513–1518. doi: 10.1002/bip.360230807.

Hess, B., H. Bekker, H.J. Berendsen, J.G. Fraaije, and others. 1997. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18(12): 1463–1472.

Hoover, W.G. 1985. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31(3): 1695–1697. doi: 10.1103/PhysRevA.31.1695.

Huang, H., C.M. Morgan, R.N. Asolkar, M.E. Koivunen, and P.G. Marrone. 2010. Phytotoxicity of Sarmentine Isolated from Long Pepper (*Piper longum*) Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 58(18): 9994–10000. doi: 10.1021/jf102087c.

Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14(1): 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

Ingólfsson, H.I., P. Thakur, K.F. Herold, E.A. Hobart, N.B. Ramsey, X. Periole, D.H. de Jong, M. Zwama, D. Yilmaz, K. Hall, T. Maretzky, H.C. Hemmings, C. Blobel, S.J. Marrink, A. Koçer, J.T. Sack, and O.S. Andersen. 2014. Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. *ACS Chem. Biol.* 9(8): 1788–1798. doi: 10.1021/cb500086e.

Jay, A.G., and J.A. Hamilton. 2017. Disorder Amidst Membrane Order: Standardizing Laurdan Generalized Polarization and Membrane Fluidity Terms. *J. Fluoresc.* 27(1): 243–249. doi: 10.1007/s10895-016-1951-8.

Kaiser, R.D., and E. London. 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37(22): 8180–8190.

Knight, C.J., and J.S. Hub. 2015. MemGen: a general web server for the setup of lipid membrane simulation systems. *Bioinformatics* 31(17): 2897–2899. doi: 10.1093/bioinformatics/btv292.

Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer, New York.

Lederer, B., T. Fujimori, Y. Tsujino, K. Wakabayashi, and P. Böger. 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80(3): 151–156. doi: 10.1016/j.pestbp.2004.06.010.

Lentz, B.R. 1989. Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes. *Chem. Phys. Lipids* 50(3–4): 171–190.

Lentz, B.R. 1993. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 64(1–3): 99–116.

Lewis, R., and R.N. McElhaney. 1992. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Malde, A.K., L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P.C. Nair, C. Oostenbrink, and A.E. Mark. 2011. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* 7(12): 4026–4037. doi: 10.1021/ct200196m.

Morales-Cedillo, F., A. González-Solís, L. Gutiérrez-Angoa, D.L. Cano-Ramírez, and M. Gavilanes-Ruiz. 2015. Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Rep.* 34(4): 617–629. doi: 10.1007/s00299-014-1735-z.

Morrow, M.R., P.J. Davis, C.S. Jackman, and K.M. Keough. 1996. Thermal history alters cholesterol effect on transition of 1-palmitoyl-2-linoleoyl phosphatidylcholine. *Biophys. J.* 71(6): 3207–3214. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79514-0.

Murphy, A.S., B. Schulz, and W. Peer. 2011. The Plant Plasma Membrane. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Nimbal, C.I., C.N. Yerkes, L.A. Weston, and S.C. Weller. 1996. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54(1): 73–83.

Nosé, S. 1984. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52(2): 255–268. doi: 10.1080/00268978400101201.

Oostenbrink, C., A. Villa, A.E. Mark, and W.F. Van Gunsteren. 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1656–1676. doi: 10.1002/jcc.20090.

Parasassi, T., G. De Stasio, G. Ravagnan, R.M. Rusch, and E. Gratton. 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 60(1): 179–189. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82041-0.

Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52(12): 7182–7190. doi: 10.1063/1.328693.

Pernille Høyrup, †, † Jesper Davidsen, and † Kent Jørgensen*. 2001. Lipid Membrane Partitioning of Lysolipids and Fatty Acids: Effects of Membrane Phase Structure and Detergent Chain Length§. doi: 10.1021/jp003631o.

Schuler, I., A. Milon, Y. Nakatani, G. Ourisson, A.M. Albrecht, P. Benveniste, and M.A. Hartman. 1991. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(16): 6926–6930. doi: 10.1073/pnas.88.16.6926.

Stott, B.M., M.P. Vu, C.O. McLemore, M.S. Lund, E. Gibbons, T.J. Brueseke, H.A. Wilson-Ashworth, and J.D. Bell. 2008. Use of fluorescence to determine the effects of cholesterol on lipid behavior in sphingomyelin liposomes and erythrocyte membranes. *J. Lipid Res.* 49(6): 1202–1215. doi: 10.1194/jlr.M700479-JLR200.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, LLC.

Tieleman, D.P. Biocomputing group - University of Calgary. <http://wcm.ucalgary.ca/tieleman/downloads> (accessed 3 May 2018).

Zakanda, F.N., L. Lins, K. Nott, M. Paquot, G.M. Lelo, and M. Deleu. 2012. Interaction of Hexadecylbetainate Chloride with Biological Relevant Lipids. *Langmuir* 28(7): 3524–3533. doi: 10.1021/la2040328.

Zawilska, P., and K. Cieřlik-Boczula. 2017. Laurdan emission study of the cholesterol-like effect of long-chain alkylresorcinols on the structure of dipalmitoylphosphocholine and sphingomyelin membranes. *Biophys. Chem.* 221: 1–9. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.004.

4.7. Supplementary data

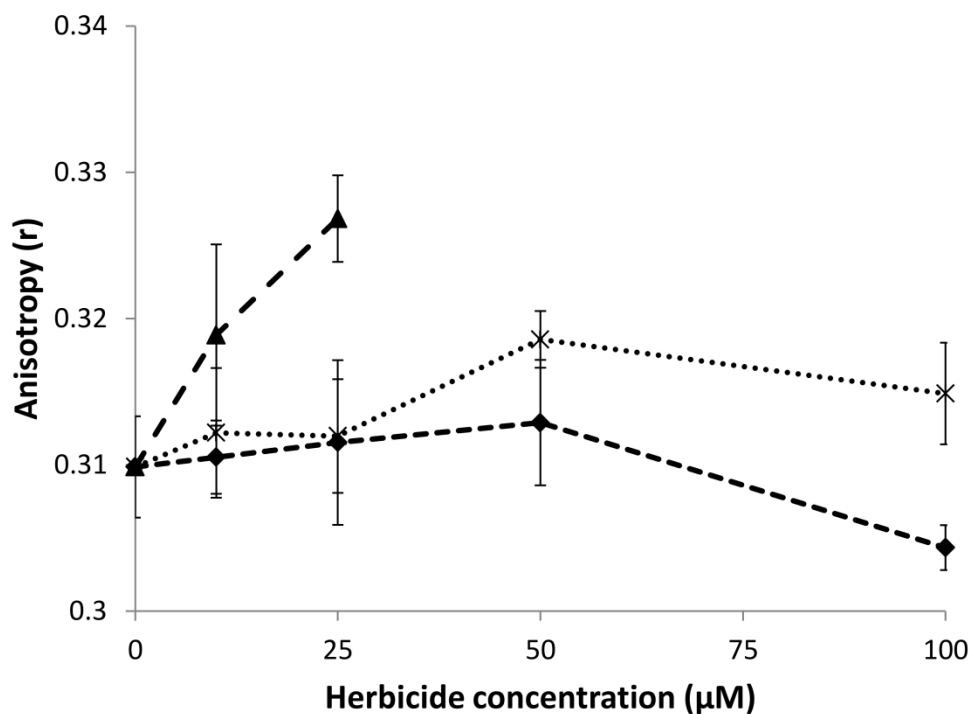


Figure 25. Evolution of DPH anisotropy for DPPC LUV (50 μM) mixed with increasing concentrations of natural herbicides at 35°C (◆: DPPC + nonanoic acid, ×: DPPC + sarmentine, ▲: DPPC + sorgoleone).

Discussion générale, conclusions et perspectives

Investiguer la phytotoxicité de molécules d'origine végétale pourrait permettre l'utilisation sécurisée de ces composés pour lutter contre les adventices. Idéalement, de telles molécules pourraient présenter de nouveaux modes d'action, utiles pour faire face au développement de résistances aux herbicides traditionnels parmi les populations d'adventices, et une biodégradabilité supérieure, intéressante pour minimiser l'impact environnemental de leur utilisation.

Les tests de phytotoxicité menés avec la gramine et l'hordénine lors de cette thèse ont montré que ces composés affectent la croissance d'une adventice commune de nos régions, la camomille. Plusieurs éléments relatifs à cette phytotoxicité restent cependant à explorer. La question de la sélectivité des composés peut notamment se poser. La gramine et l'hordénine sont-elles caractérisées par une toxicité variable en fonction de l'espèce végétale cible ? Typiquement, l'orge, qui produit ces composés, y est-elle moins sensible voire immunisée ? Des tests phytotoxiques plus étendus seraient bien entendu nécessaires pour répondre à ces questions qui pourraient être indirectement liées au mode d'action de ces alcaloïdes. En effet, une espèce végétale peut être immunisée ou moins sensible qu'une autre espèce à un composé toxique si la cible moléculaire de ce composé n'est pas strictement identique entre les espèces considérées. Par exemple, les herbicides de la classe des cyclohexanediones sont beaucoup plus toxiques pour les monocotylédones que pour les dicotylédones, car l'enzyme affectée, l'acétyl-CoA carboxylase, y est nettement plus sensible chez les espèces du premier type que chez celles du second (Rendina and Felts, 1988; Devine and Shukla, 2000).

Il est cependant bon de rappeler que la sélectivité d'un herbicide peut aussi s'expliquer par des mécanismes de séquestration ou de détoxification présents chez les espèces tolérantes et absents chez les espèces sensibles. C'est par exemple le cas d'herbicides de la classe des sulfonylurées, métabolisés beaucoup plus rapidement par les espèces tolérantes que par les autres (Brown, 1990), ou de la mésotrione, que le maïs est capable de métaboliser plus vite que les adventices ciblées (Mitchell et al., 2001).

Si la phytotoxicité de la gramine et de l'hordénine était exercée par le biais d'interactions avec les lipides membranaires, il pourrait donc exister une sélectivité différentielle en fonction des espèces, basée soit sur des différences au niveau de la composition lipidique des membranes, soit sur la présence de mécanismes de séquestration ou de détoxification.

Des phénomènes d'autotoxicité ont été rapportés chez l'orge lors d'expériences *in vitro* dans lesquelles des graines ont été exposées à des extraits aqueux de parties d'orge (Ben-Hammouda et al., 2002; Oueslati et al., 2005). Plus récemment, il a été noté que la toxicité de l'orge est moins marquée sur l'orge elle-même que sur d'autres plantes lorsque des plantules se succèdent en boîte de pétri (Bouhaouel et al., 2015). Ces derniers résultats laissent penser que l'orge possède quelque mécanisme lui permettant de résister un peu plus efficacement à ses propres composés allélochimiques que d'autres espèces partageant son environnement.

Si ces études sur l'autotoxicité de l'orge ont un intérêt agronomique certain, nous ne pouvons pas étendre leur portée jusqu'à la question particulière de la gramine et de l'hordénine. D'autres composés phytotoxiques retrouvés chez l'orge, tels que des dérivés de l'acide phénolique ou des flavonoïdes, pourraient être responsables de

cette autotoxicité observée. Pour faire avancer cette piste spécifique, il faudrait donc évaluer la toxicité de l'hordénine et de la gramine pures sur l'orge, par exemple selon un protocole similaire à celui suivi dans ce travail pour mesurer la toxicité de ces composés vis-à-vis de la camomille.

Dans l'absolu, la phytotoxicité peut être exercée par différents mécanismes, via différentes cibles moléculaires. Ces cibles sont souvent des enzymes et des protéines impliquées dans de grandes voies métaboliques pour les herbicides traditionnels (Dayan et al., 2015). Par exemple, de nombreux herbicides, comme ceux appartenant à la famille des triazines, inhibent la photosynthèse en entrant en compétition avec la plastoquinone au niveau du photosystème II, interrompant ainsi la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse (Duke S O, 1990). Un autre exemple peut être fourni par les représentants de la famille des sulfonilurées qui, comme d'autres classes d'herbicides, inhibent l'acétolactate synthase, une enzyme essentielle pour la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée et donc pour la survie des plantes (Brown, 1990). La spécificité de ces sites d'action et l'usage massif d'herbicides aux modes d'action redondants ont mené au développement de résistances chez les adventices (Powles and Yu, 2010). Une meilleure compréhension des processus liés à la phytotoxicité au sens large (et notamment la phytotoxicité de molécules d'origine naturelle) pourrait mener à la découverte de nouveaux modes d'action ou de facteurs importants influençant cette phytotoxicité.

Cette thèse s'est essentiellement concentrée sur les interactions entre des molécules phytotoxiques d'origine végétale et des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique de plante. L'objectif étant d'entamer l'investigation d'une étape qui paraît cruciale dans l'expression de la toxicité d'une molécule : son contact initial avec la cellule, au niveau de la membrane plasmique, composante cellulaire capitale de par ses nombreux rôles. Deux types de structures ont été considérés pour le choix des molécules étudiées : de petites molécules aromatiques amphiphiles, représentées par la gramine et l'hordénine, d'une part et des composés possédant une chaîne hydrocarbonée, représentés par l'acide nonanoïque, la sarmentine et la sorgoléone, d'autre part.

En ce qui concerne l'impact des molécules testées sur la stabilité des modèles membranaires utilisés, différentes tendances sont observées en fonction des structures des composés investigués. Il ressort de nos expériences que la gramine induit une déstabilisation des bicouches lipidiques constituées de PC, de PG ou d'un mélange des deux, mise en évidence par la diminution de température de transition de phase observée sur des liposomes de telles compositions.

L'hordénine n'a eu aucun impact sur la température de transition de phase des liposomes constitués de PC, mais elle semble cependant capable de déstabiliser les bicouches contenant du PG, seul ou en mélange avec du PC. Il a été suggéré que la présence du groupement choline chargé positivement chez les PC est défavorable à l'intercalation de l'hordénine, chargée positivement elle aussi, entre les têtes polaires de ce lipide.

A l'inverse, la sorgoléone a affiché un effet stabilisateur sur les bicouches lipidiques (PC) utilisées, traduit par une augmentation de leur T_m et de leur ordre.

Il semble intéressant de relier ces observations à certaines caractéristiques liées à la structure et au type d'interactions pouvant exister entre les molécules phytotoxiques considérées et les bicouches lipidiques. Les deux alcaloïdes ont une structure aromatique et amphiphile de petite taille qui semble favoriser une localisation assez superficielle (centre de masse approximativement situé entre les groupements phosphates et les résidus glycérols des lipides) au sein de la bicouche permettant à la fois de protéger leur partie apolaire de contacts avec l'eau et d'assurer l'hydratation de leur(s) partie(s) polaire(s). L'existence de ponts hydrogènes entre les alcaloïdes et les lipides (têtes polaires et groupements carbonyles) est probablement un facteur favorisant l'ancrage de ces molécules à cet endroit. Des constats similaires ont été faits pour l'indole (Wai-Ming Yau et al., 1998; Norman and Nymeyer, 2006) et pour le tryptophane (MacCallum et al., 2008; de Jesus and Allen, 2013), deux molécules structurellement très proches de la gramine, ainsi que pour la dopamine (Orłowski et al., 2012), composé dont la structure est très similaire à celle de l'hordénine, concernant à la fois leur position interfaciale et l'origine de cette localisation.

La séparation plus nette observée entre les parties polaire et apolaire chez la gramine comparativement à l'hordénine engendre par ailleurs une orientation différente de la molécule au sein de la bicouche, et vraisemblablement une localisation plus stable et légèrement plus profonde : elle conforte sa position interfaciale.

Ces considérations mènent à penser que la déstabilisation observée des bicouches lipidiques par ces alcaloïdes tient à leur capacité à s'insérer de façon plus (gramine) ou moins (hordénine) stable entre les lipides, à une profondeur assez faible, entre les têtes polaires et les résidus glycérols. Ce faisant, il est postulé qu'ils font office d'« espaceurs » entre les lipides, leur structure aromatique rigide occupant un volume peu compressible. Ce comportement présumé implique une diminution de la cohésion des lipides composant la bicouche, i.e. une déstabilisation se traduisant par une diminution de la température de transition de phase.

Nous suggérons que la partie aromatique de la sorgoléone interagit avec les résidus glycérols des lipides d'une manière comparable aux alcaloïdes de l'orge, grâce à la présence des 4 atomes d'oxygène sur le cycle, lui conférant une certaine assise près de la région interfaciale et provoquant probablement aussi un certain espacement entre les lipides. Cependant, à la différence de la gramine et de l'hordénine, la sorgoléone possède une longue chaîne hydrocarbonée permettant de compenser l'espacement créé au niveau des queues hydrophobes des lipides. Un ancrage simultané dans les régions interfaciale et hydrophobe des lipides est probablement à l'origine de l'augmentation d'ordre induite par la sorgoléone. Il est proposé que, là où la gramine, par exemple, occupe un certain volume dans la région interfaciale qui génère un espace supplémentaire et non compensé dans la région hydrophobe, la sorgoléone se positionne dans de petits interstices disponibles entre les lipides, allant de la région interfaciale à la région hydrophobe. Une illustration schématique de cette différence qualitative de comportement entre les alcaloïdes de l'orge et la sorgoléone est proposée à la figure 26 (B, C et D).

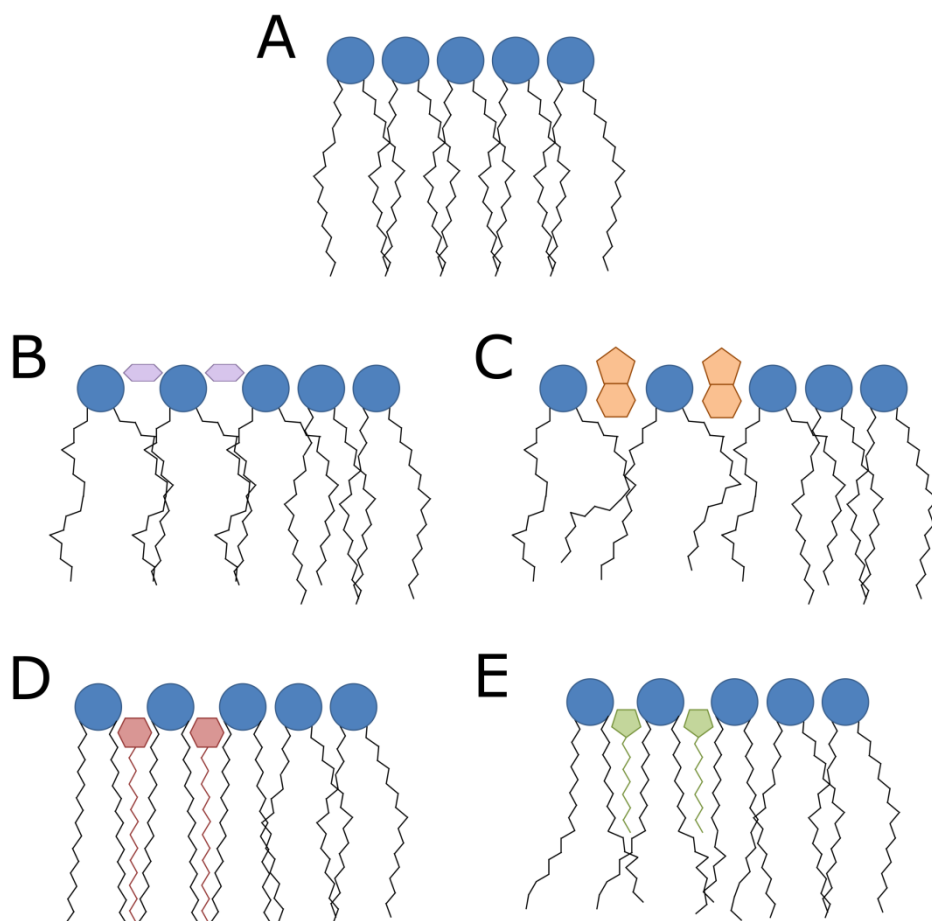


Figure 26. Illustration schématique des mécanismes moléculaires proposés pour expliquer l'effet des différents composés phytotoxiques considérés dans ce travail sur des modèles membranaires. A : monocouche lipidique seule ; B : monocouche lipidique en présence d'hordenine ; C : monocouche lipidique en présence de gramine ; D : monocouche lipidique en présence de sorgolone ; E : monocouche lipidique en présence de sarmentine (mécanisme similaire proposé pour l'acide nonanoïque).

Quid alors de l'acide nonanoïque et de la sarmentine ? Les expériences *in vitro* menées dans le cadre de cette thèse n'ont pas mis en évidence d'effet important de ces molécules sur les bicouches lipidiques. L'effet d'une molécule sur une bicouche lipidique dépend *a priori* de la combinaison de deux facteurs : sa capacité à s'insérer dans la bicouche d'une part et sa capacité à modifier l'organisation des lipides d'autre part ; ces deux éléments étant intimement liés à la structure chimique du composé considéré. Des titrages calorimétriques isothermes ont mis en évidence une

affinité vis-à-vis des bicouches lipidiques de PC nettement plus faible pour l'acide nonanoïque et la sarmentine que pour la sorgoléone. Concrètement, cela signifie que la capacité à s'insérer dans des bicouches de PC de l'acide nonanoïque et de la sarmentine est plus faible que celle de la sorgoléone. Dans les simulations de dynamique moléculaire réalisées avec la sarmentine et l'acide nonanoïque, les molécules phytotoxiques étaient intégrées à la bicouche lipidique dès le départ, permettant en quelque sorte de s'affranchir de leur affinité moindre pour la phase lipidique pour se concentrer sur leur capacité à modifier l'organisation des lipides. Le calcul du paramètre d'ordre des chaînes palmitiques des lipides a mis en évidence un possible effet contrasté de la sarmentine et de l'acide nonanoïque : une augmentation de l'ordre pour les 8-9 premiers atomes de carbone et une diminution de l'ordre pour les suivants. Cet impact, s'il était confirmé par des méthodes expérimentales adaptées (e.g. par des expériences en RMN), pourrait engendrer une déstabilisation de la bicouche due à un mismatch hydrophobe, comme cela a été rapporté pour les lysolipides (Henriksen et al., 2010). Ce mismatch hydrophobe correspond à la différence de longueur existant entre les chaînes hydrocarbonées des lipides (16 et 18 atomes de carbone pour le PLPC) et la chaîne hydrocarbonée de l'acide nonanoïque (9 atomes de carbone) ou de la sarmentine (10 atomes de carbone). En se basant exclusivement sur les simulations de dynamique moléculaire, on peut penser que ces deux molécules comblent des interstices entre les lipides d'une manière similaire à la sorgoléone, avec 2 différences probables. Premièrement, ni la sarmentine ni l'acide nonanoïque ne semblent disposer d'une partie polaire aussi complexe que la sorgoléone. En tenant compte des observations faites pour la gramine et l'hordénine, il semble que des facteurs tels que la capacité à établir des ponts hydrogènes et probablement l'aromaticité favorisent l'ancrage au niveau des têtes polaires / des résidus glycérols des lipides. Les têtes polaires de l'acide nonanoïque et de la sarmentine sont plus simples et probablement plus limitées à cet égard. Deuxièmement, la longueur de la chaîne hydrophobe de la sorgoléone est nettement plus grande, ce qui permet à la molécule d'occuper un volume sur approximativement toute l'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche. A l'inverse, l'acide nonanoïque et la sarmentine n'occupent un volume que sur une épaisseur de bicouche correspondant environ aux 9 premiers atomes de carbone des chaînes hydrophobes des lipides, générant une augmentation du paramètre d'ordre jusque-là, puis une diminution au-delà, due à l'espacement entre lipides non comblé du fait de leur chaîne hydrocarbonée trop courte (voir figure 26.E). Si un tel effet était confirmé, il pourrait être à l'origine d'une déstabilisation membranaire peut-être liée au mode d'action de ces molécules.

Ces considérations concernant l'acide nonanoïque et la sarmentine sont à ce stade hypothétiques, mais ce type de mécanisme pourrait expliquer les différences de phytotoxicité observées entre des acides gras en fonction de la longueur de leur chaîne hydrophobe. Il est en effet rapporté que les acides gras contenant de 9 à 11 atomes de carbone sont ceux présentant la plus forte phytotoxicité (Fukuda et al., 2004). Or, l'affinité des acides gras pour les bicouches lipidiques augmente avec leur longueur de chaîne (Pernille Høyrup et al., 2001). Si le mode d'action des acides gras est lié à leurs interactions avec la phase lipidique des membranes, une augmentation de leur phytotoxicité proportionnelle à leur longueur aurait pu être

attendue. Il peut donc être conclu que soit les interactions des acides gras avec les lipides membranaires n'interviennent pas dans le processus engendrant leur toxicité, soit une composante de leur toxicité impose une restriction au niveau de leur longueur de chaîne. La présence d'un mismatch hydrophobe entre la longueur de chaîne des acides gras et la longueur des queues hydrocarbonées des lipides afin de créer une déstabilisation membranaire pourrait être cette composante.

Des études supplémentaires sur les interactions de l'acide nonanoïque et de la sarmentine avec les bicouches lipidiques seraient nécessaires pour se prononcer davantage quant à leur rôle éventuel dans le mode d'action de ces molécules. En particulier, des expériences en RMN pour déterminer l'impact de ces composés sur le paramètre d'ordre des chaînes lipidiques, et éventuellement des études menées avec de plus fortes concentrations en molécules et en lipides seraient les bienvenues.

Il paraît nécessaire d'insister sur le caractère exploratoire de cette thèse qui représente avant tout un travail introductif à ce qui pourrait devenir une thématique de recherche à part entière. Afin de pouvoir approfondir les premiers éléments obtenus dans le cadre de cette thèse et leur éventuelle portée, il nous semblerait judicieux de compter sur deux grands axes de développement.

Le premier axe se situe au niveau des expériences réalisables pour affiner notre compréhension des interactions pouvant exister entre des molécules phytotoxiques et des modèles membranaires. Dans le contexte de ce travail, des compositions lipidiques simples (espèce unique ou mélange binaire) ont été utilisées pour tester en première approche les interactions de certaines molécules phytotoxiques avec des bicouches lipidiques. Comme aperçu lors de l'introduction bibliographique, les membranes plasmiques, et notamment celles des plantes, sont constituées d'une grande variété de lipides, par ailleurs susceptibles de s'organiser en nano- et microdomaines aux propriétés et rôles spécifiques. Une voie évidente de développement serait donc de complexifier les modèles membranaires utilisés pour les faire s'approcher de la composition des membranes plasmiques de plante (par exemple en ajoutant des stérols et des sphingolipides aux phosphatidylcholines), ou de certaines parties des membranes plasmiques de plante (par exemple en utilisant des mélanges binaires de sphingolipides et stérols pour mimer des domaines membranaires), ou encore de membranes d'organelles comme les thylakoïdes (en intégrant des galactolipides (MGDG et DGDG)).

Toujours selon cet axe, une autre voie évidente de progression consisterait en l'étude de molécules phytotoxiques supplémentaires. Dans ce travail, la présence d'un cycle aromatique substitué s'est révélée intéressante eu égard aux interactions des composés avec les bicouches lipidiques. De nombreux composés phytotoxiques d'origine végétale possèdent une structure incluant un cycle aromatique substitué. Ainsi, la juglone (Rietveld, 1983; Hejl and Koster, 2004a), la khelline et la visnagine (Travaini et al., 2016), ou des dérivés des acides benzoïques et cinnamiques comme l'acide férulique (Baziramakenga et al., 1995; Yu and Matsui, 1997) sont des exemples de composés dont les interactions avec des modèles membranaires vaudraient la peine d'être investiguées. Augmenter le nombre de molécules étudiées permettrait de mieux définir la possible importance de telles interactions, mais aussi

d'établir des relations structure-fonction de plus en plus précises s'il s'avérait justifié de le faire.

Le caractère amphiphile d'une molécule est *a priori* une propriété favorable en ce qui concerne ses interactions potentielles avec des bicouches lipidiques qui présentent elles-mêmes une région hydrophile et une région hydrophobe. Cela peut en outre engendrer un comportement d'agrégation qu'il pourrait être intéressant de caractériser afin de mieux cerner les propriétés générales de la molécule investiguée, et d'apporter éventuellement un élément supplémentaire à la bonne compréhension de son mode d'action si d'aventure il impliquait la formation d'agrégats. C'est la raison pour laquelle nous avons développé un outil de dynamique moléculaire permettant d'étudier les propriétés des micelles formées par des molécules amphiphiles et, dans une certaine mesure, d'estimer leur nombre d'agrégation (Lebecque et al., 2017)(article présent en annexe).

Enfin, l'utilisation de techniques d'étude supplémentaires serait également profitable dans l'optique de développer nos connaissances en ce qui concerne les interactions entre des molécules phytotoxiques et des modèles membranaires. Des méthodes expérimentales telles que la RMN, pour déterminer avec précision l'ordre des chaînes lipidiques, ou l'imagerie de fluorescence, pour visualiser l'organisation latérale de modèles membranaires et l'effet de molécules sur celle-ci, permettraient certainement d'en apprendre davantage sur ces interactions. Des simulations de dynamique moléculaire en gros grain donneraient, quant à elles, accès à des échelles plus larges tant au niveau de leur durée que de la taille des systèmes considérés, comparativement à la dynamique moléculaire « classique ».

Le deuxième axe concerne l'état des connaissances sur le rôle des lipides et de leurs propriétés par rapport au fonctionnement général de la membrane, et notamment les relations qui unissent les lipides aux protéines membranaires. Si ce travail et d'autres mettent en évidence les effets de certaines molécules sur des modèles membranaires, les impacts concrets de telles modifications sont encore trop méconnus pour en tirer des enseignements précis.

Une finalité attendue de telles études serait de mettre au jour l'action de certaines molécules sur des membranes biologiques, médiée par des interactions avec la composante lipidique de ces membranes. Dans la pratique, cet objectif ambitieux est souvent fractionné : certains s'intéresseront aux effets de composés donnés sur des modèles membranaires inspirés de membranes biologiques, d'autres investigueront le rôle des lipides au sein des membranes biologiques. Cette thèse s'inscrit clairement dans la première catégorie, et il apparaît donc que, pour apporter un éclairage plus complet sur l'action des molécules étudiées, des connaissances supplémentaires quant à l'impact de l'environnement lipidique sur les fonctions membranaires sont nécessaires. L'exemple de la sorgoléone illustre plutôt bien cette idée. La présente thèse a mis en évidence un effet rigidifiant de la sorgoléone sur des bicouches lipidiques constituées de PC. Une précédente étude a rapporté l'impact inhibiteur de cette même molécule sur l'H⁺-ATPase des racines de plante (Hejl and Koster, 2004b), une enzyme membranaire capitale pour le bon fonctionnement cellulaire puisqu'elle génère le gradient électrochimique nécessaire notamment au transport transmembranaire actif. Différentes études ont par ailleurs discuté

l'influence de l'environnement lipidique des membranes sur l'activité de cette protéine (Kasamo, 2003; Morales-Cedillo et al., 2015), sans pouvoir identifier clairement ses tenants et aboutissants. On sait donc d'une part que la sorgoléone inhibe l'H⁺-ATPase, interagit avec les bicouches lipidiques et affecte leurs propriétés, et d'autre part que l'environnement lipidique joue un rôle dans le niveau d'activité de l'H⁺-ATPase. Il est dès lors tentant de penser que la sorgoléone pourrait affecter directement l'H⁺-ATPase au travers de ces interactions membranaires, mais une telle hypothèse ne pourra être vérifiée que lorsque toute la lumière aura été faite sur le lien existant entre les lipides membranaires et cette protéine.

Il a été proposé (Kasamo, 2003) que des variations de l'environnement lipidique de l'H⁺-ATPase pourraient influencer le niveau d'activité de l'enzyme selon deux mécanismes : soit via un changement de la nature des lipides directement en contact avec l'enzyme, soit au travers d'une modification globale des propriétés de la membrane plasmique (par exemple, sa fluidité).

Selon la première hypothèse, la sorgoléone pourrait donc interagir directement avec la protéine en intégrant son environnement lipidique immédiat. Un mécanisme de cette nature a été évoqué pour expliquer l'effet de la beticoline-1, qui inhiberait l'H⁺-ATPase en se fixant à un de ses segments transmembranaires (Gomés et al., 1996). La grande affinité de la sorgoléone pour les bicouches lipidiques rapportée dans ce travail serait dès lors un facteur favorisant une telle action, puisque propice à sa présence à proximité de l'enzyme membranaire et, a priori, à une interaction avec un segment protéique hydrophobe. Il faudrait en revanche pouvoir identifier un site d'interaction spécifique susceptible d'inhiber l'enzyme, avant d'éventuellement caractériser leur affinité réciproque qui permettrait de donner ou non du crédit à cette possibilité.

Selon la deuxième hypothèse, la sorgoléone pourrait impacter l'activité de l'H⁺-ATPase de manière indirecte, en modulant les propriétés générales de la bicouche lipidique dans laquelle elle se trouve. Chez des tonoplastes d'une variété de riz sensible au froid, une corrélation intéressante a été rapportée entre la diminution de fluidité des membranes et la diminution d'activité de l'H⁺-ATPase subséquentes à une exposition au froid (Kasamo et al., 2000). Un lien direct de causalité entre la fluidité du milieu lipidique et le niveau d'activité de l'enzyme membranaire ne peut cependant pas être dressé à l'heure actuelle. En effet, il a par exemple été montré que différents stérols semblent impacter différemment (stimulation ou inhibition) l'activité de l'H⁺-ATPase (Rossard et al., 2010) selon des modalités qui restent à établir mais qui ne semblent pas exclusivement liées à leur effet immédiat sur la fluidité des membranes.

Le fait que plusieurs molécules lipidiques/tensioactives aient un impact sur le degré d'activité de l'H⁺-ATPase invite à penser qu'un élément structural partagé par ces composés, par exemple la présence d'un groupement hydrophobe suffisamment important, ou un caractère amphiphile plus ou moins marqué, est directement responsable de la modulation enzymatique observée. Si ces différentes molécules agissent selon un même mécanisme (ce que rien ne permet d'affirmer en l'état), celui-ci n'est vraisemblablement pas très spécifique, ce qui plaiderait peut-être davantage en faveur d'une influence globale sur les propriétés de la bicouche

lipidique plutôt que sur une action ciblée sur l'H⁺-ATPase. Puisqu'un lien de causalité simple n'a actuellement pas pu être établi avec la fluidité des bicouches lipidiques, il est possible qu'une autre de leurs propriétés soit à l'origine des variations d'activité observées.

Une meilleure compréhension du rôle que peuvent jouer les interactions de molécules avec des lipides membranaires dans le contexte de leur toxicité ne sera donc possible qu'en améliorant notre connaissance des membranes au sens large. Les études relevant purement de la biophysique, comme celle menée ici sur la sorgoléone, ne pourront apporter une réponse à un problème biologique que si le lien entre la biophysique et la biologie est établi par ailleurs. Elles invitent donc à explorer plus avant certains domaines afin de révéler la pertinence (ou l'absence de pertinence) biologique de leurs résultats et peuvent ainsi aiguiller des recherches ultérieures.

De manière générale, ce n'est qu'après avoir bien compris le(s) mode(s) d'action d'un composé phytotoxique d'origine végétale que son utilisation en tant que bioherbicide devrait être envisagée – ou abandonnée. En plus du mode d'action, il est important de caractériser la sélectivité et l'efficacité de la molécule investiguée. Si ces trois paramètres, associés aux coûts de production de la molécule, convergent vers une application potentielle, une homologation en tant que substance active pourra être considérée.

Au sein de l'Union Européenne, un dossier d'homologation de substance active requerra des études démontrant l'efficacité et la sélectivité du composé en conditions proches de celles envisagées pour son utilisation. Des données concernant, entre autres choses, les risques toxicologiques et écotoxicologiques associés à son usage devront également être fournies. Une fois la molécule approuvée en tant que substance active, des herbicides composés de cette molécule et de co-formulants (visant par exemple à obtenir une texture précise, à améliorer l'efficacité...) pourront à leur tour être évalués en vue d'obtenir une autorisation de mise sur le marché national des pays européens visés.

En conclusion, une compréhension approfondie de l'action d'une molécule toxique sur un organisme-cible, basée sur des études fondamentales, apparaît essentielle pour le bon déroulement du processus d'évaluation de la substance en tant que pesticide. L'élucidation des mécanismes moléculaires mis en œuvre doit être un socle permettant à la fois d'expliquer l'efficacité et la sélectivité du composé considéré et d'anticiper d'éventuels risques liés à son usage.

Références

- Baziramakenga, R., G.D. Leroux, and R.R. Simard. 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J. Chem. Ecol.* 21(9): 1271–1285.
- Ben-Hammouda, M., H. Ghorbal, R. Kremer, and O. Oueslatt. 2002. Autotoxicity of Barley. *J. Plant Nutr.* 25(6): 1155.
- Bouhaouel, I., A. Gfeller, M.-L. Fauconnier, S. Rezgui, H. Slim Amara, et al. 2015. Allelopathic and autotoxicity effects of barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) root exudates. *BioControl* 60(3): 425–436. doi: 10.1007/s10526-014-9634-3.
- Brown, H.M. 1990. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29(3): 263–281. doi: 10.1002/ps.2780290304.
- Dayan, F.E., D.K. Owens, N. Corniani, F.M.L. Silva, S.B. Watson, et al. 2015. Biochemical Markers and Enzyme Assays for Herbicide Mode of Action and Resistance Studies. *Weed Sci.* 63(sp1): 23–63. doi: 10.1614/WS-D-13-00063.1.
- Devine, M.D., and A. Shukla. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Prot.* 19(8): 881–889. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00123-X.
- Duke S O. 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environ. Health Perspect.* 87: 263–271. doi: 10.1289/ehp.9087263.
- Fukuda, M., Y. Tsujino, T. Fujimori, K. Wakabayashi, and P. Böger. 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80(3): 143–150. doi: 10.1016/j.pestbp.2004.06.011.
- Gomés, E., V. Kees, S.-P. Francoise, M. Marie-Louise, P.M. Gjedde, et al. 1996. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS Lett.* 398(1): 48–52. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01218-5.
- Hejl, A.M., and K.L. Koster. 2004a. Juglone Disrupts Root Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and Impairs Water Uptake, Root Respiration, and Growth in Soybean (*Glycine max*) and Corn (*Zea mays*). *J. Chem. Ecol.* 30(2): 453–471. doi: 10.1023/B:JOEC.0000017988.20530.d5.
- Hejl, A.M., and K.L. Koster. 2004b. The Allelochemical Sorgoleone Inhibits Root H⁺-ATPase and Water Uptake. *J. Chem. Ecol.* 30(11): 2181–2191. doi: 10.1023/B:JOEC.0000048782.87862.7f.
- Henriksen, J.R., T.L. Andresen, L.N. Feldborg, L. Duelund, and J.H. Ipsen. 2010. Understanding Detergent Effects on Lipid Membranes: A Model Study of Lysolipids. *Biophys. J.* 98(10): 2199–2205. doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.037.
- de Jesus, A.J., and T.W. Allen. 2013. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828(2): 864–876. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.09.009.
- Kasamo, K., M. Yamaguchi, and Y. Nakamura. 2000. Mechanism of the Chilling-Induced Decrease in Proton Pumping across the Tonoplast of Rice Cells. *Plant Cell Physiol.* 41(7): 840–849. doi: 10.1093/pcp/pcd002.

Kasamo, K. 2003. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J. Plant Res.* 116(6): 517–523. doi: 10.1007/s10265-003-0112-8.

Lebecque, S., J.M. Crowet, M.N. Nasir, M. Deleu, and L. Lins. 2017. Molecular dynamics study of micelles properties according to their size. *J. Mol. Graph. Model.* 72: 6–15. doi: 10.1016/j.jmgm.2016.12.007.

MacCallum, J.L., W.F.D. Bennett, and D.P. Tieleman. 2008. Distribution of Amino Acids in a Lipid Bilayer from Computer Simulations. *Biophys. J.* 94(9): 3393–3404. doi: 10.1529/biophysj.107.112805.

Mitchell, G., D.W. Bartlett, T.E. Fraser, T.R. Hawkes, D.C. Holt, et al. 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57(2): 120–128. doi: 10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E.

Morales-Cedillo, F., A. González-Solís, L. Gutiérrez-Angoa, D.L. Cano-Ramírez, and M. Gavilanes-Ruiz. 2015. Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Rep.* 34(4): 617–629. doi: 10.1007/s00299-014-1735-z.

Norman, K.E., and H. Nymeyer. 2006. Indole Localization in Lipid Membranes Revealed by Molecular Simulation. *Biophys. J.* 91(6): 2046–2054. doi: 10.1529/biophysj.105.080275.

Orłowski, A., M. Grzybek, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, et al. 2012. Strong preferences of dopamine and l-dopa towards lipid head group: importance of lipid composition and implication for neurotransmitter metabolism. *J. Neurochem.* 122(4): 681–690. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07813.x.

Oueslati, O., M. Ben-Hammouda, M.H. Ghorbal, M. Guezazah, and R.J. Kremer. 2005. Barley Autotoxicity as Influenced by Varietal and Seasonal Variation. *J. Agron. Crop Sci.* 191(4): 249–254. doi: 10.1111/j.1439-037X.2005.00156.x.

Pernille Høyrup, †, † Jesper Davidsen, and † Kent Jørgensen*. 2001. Lipid Membrane Partitioning of Lysolipids and Fatty Acids: Effects of Membrane Phase Structure and Detergent Chain Length§. doi: 10.1021/jp003631o.

Powles, S.B., and Q. Yu. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61(1): 317–347. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

Rendina, A.R., and J.M. Felts. 1988. Cyclohexanedione Herbicides Are Selective and Potent Inhibitors of Acetyl-CoA Carboxylase from Grasses. *PLANT Physiol.* 86(4): 983–986. doi: 10.1104/pp.86.4.983.

Rietveld, W.J. 1983. Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *J. Chem. Ecol.* 9(2): 295–308. doi: 10.1007/BF00988047.

Rossard, S., G. Roblin, and R. Atanassova. 2010. Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *J. Exp. Bot.* 61(6): 1807–1816. doi: 10.1093/jxb/erq047.

Travaini, M.L., G.M. Sosa, E.A. Ceccarelli, H. Walter, C.L. Cantrell, et al. 2016. Khellin and Visnagin, Furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as Potential Bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.* 64(50): 9475–9487. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02462.

Wai-Ming Yau, ‡, § William C. Wimley, ‡ and Klaus Gawrisch, and § Stephen H. White*. 1998. The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces†. doi: 10.1021/bi980809c.

Yu, J.Q., and Y. Matsui. 1997. Effects of Root Exudates of Cucumber (*Cucumis sativus*) and Allelochemicals on Ion Uptake by Cucumber Seedlings. *J. Chem. Ecol.* 23(3): 817–827. doi: 10.1023/B:JOEC.0000006413.98507.55.

Productions scientifiques

Articles scientifiques

En tant que premier auteur

- Lebecque, S., Crowet, J. M., Nasir, M. N., Deleu, M., & Lins, L. (2017). Molecular dynamics study of micelles properties according to their size. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 72, 6-15. (Publié)
- Lebecque, S., Crowet, J. M., Lins, L., Delory, B. M., du Jardin, P., Fauconnier, M. L., & Deleu, M. (2018). Interaction between the barley allelochemical compounds gramine and hordenine and artificial lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane. *Scientific reports*, 8(1), 9784. (Publié)
- Lebecque, S., Fauconnier, M. L. & Deleu, M. Allélopathie et composés allélochimiques : concepts généraux et rôles potentiels dans les systèmes agricoles. (En préparation pour soumission aux Cahiers de l'agriculture ou BASE (2019))
- Lebecque, S., Lins, L., Dayan, F. E., Fauconnier, M. L., Deleu, M. Interactions between natural herbicides and lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane. (Soumis à *Frontiers in Plant Science* (2018))

En tant que participant

- Hamaidia, M., Barez, P. Y., Carpentier, A., Lebecque, S., Miazek, K., Paul, A., ... & Frederich, M. (2016). From *Valeriana officinalis* to cancer therapy: the success of a bio-sourced compound. *BASE*.
- Paul, A., Frederich, M., Uyttenbroeck, R., Hatt, S., Malik, P., Lebecque, S., ... & Deleu, M. (2016). Grasshoppers as a food source? A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 20(AgricultureIsLife), 337-352.
- Miazek, K., Lebecque, S., Hamaidia, M., Paul, A., Danthine, S., Willems, L., ... & Goffin, D. (2016). Sphingolipids: promising lipid-class molecules with potential applications for industry. A review/Sphingolipides: des molécules lipidiques à haut potentiel de valorisation présentant de nombreuses applications industrielles (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 20(S1), 321.

Communications orales

- Allélopathie – Alcaloïdes de l'orge (2014). Séminaire LBMI à Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.
- Study of the interactions between allelochemicals from barley and plant plasma membrane (2014). Journée annuelle de l'école doctorale thématique CHIM.
- Study of the interactions between allelochemicals and plant plasma membrane (2015). Séminaire TERRA – AgricultureIsLife à Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.
- Allélopathie chez l'orge (2015). Séminaire LBMI à Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.

- Allélopathie chez l'orge : gramine et hordénine (2017). Séminaire LBMI à Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.

Posters

- Simon Lebecque, Jean-Marc Crowet, Magali Deleu & Laurence Lins (2014). Development of a method allowing the prediction of the aggregation number of micelle-forming surfactants using molecular dynamics. Biophysics Conference – Modern Biophysical Techniques for the Life Sciences in Bruxelles (20-21 october 2014).
- Simon Lebecque, Jean-Marc Crowet, Patrick du Jardin, Marie-Laure Fauconnier, Benjamin Delory, Magali Deleu & Laurence Lins (2018). Use of molecular dynamics simulations to study the interactions between barley allelochemicals and plant plasma membrane. Applied bioinformatics in life sciences (2nd edition) in Leuven (8-9 march 2018).
- Simon Lebecque, Jean-Marc Crowet, Patrick du Jardin, Benjamin Delory, Laurence Lins, Magali Deleu & Marie-Laure Fauconnier (2018). Interactions of allelochemicals with plant plasma membrane: a case study with alkaloids from barley. 41st New Phytologist Symposium in Nancy, France (11-13 april 2018).

Annexe

Molecular Dynamics Study of Micelles Properties According to their Size.

S Lebecque^{1§}, JM Crowet^{2§}, MN Nasir², M Deleu², L Lins²

¹AgricultureisLife Platform, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

²Laboratory of Molecular Biophysics at Interfaces, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

[§] Those authors contribute equally to the work

Etat de l'article : publié dans Journal of Molecular Graphics and Modelling (2016, DOI :10.1016/j.jmgm.2016.12.007).

Abstract

Surfactants are molecules able to spontaneously self-assemble to form aggregates with well-defined properties, such as spherical micelles, planar bilayers, cylindrical micelles or vesicles. Micelles have notably several applications in many domains, such as drug delivery or membrane protein solubilization. In this context, the study of micelle formation in relation with the structural and physico-chemical properties of surfactants is of great interest to better control their use in the different application fields.

In this work, we use the MD approach developed by Yoshii *et al.* and extend it to surfactants with different structures. We aim to systematically investigate different micellar properties as a function of the aggregates size by a molecular dynamics approach, to get an insight into the micellar organization and to collect some relevant descriptors about micelle formation. For this, we perform short MD simulations of preformed micelles of various sizes and analyze three parameters for each micelle size, namely the eccentricity of the micelles, the hydrophobic/hydrophilic surface ratio and the hydrophobic tails hydration. If these parameters are known descriptors of micelles, they were not yet studied in this way by MD.

We show that eccentricity, used as “validator” parameter, exhibits minimal values when the aggregate size is close to the experimental aggregation number for surfactants that are known to form spherical micelles. This hence indicates that our methodology gives consistent results. The evolution of the two descriptors follows another scheme, with a sharp increase and decrease, respectively, followed by a leveling-off. The aggregate sizes at which this stabilization starts to occur are close to the respective aggregation number of each surfactant. In our approach, we validate the use of these descriptors to follow micelle formation by MD, from “simple” surfactants to more complex structures, like lipopeptides. Our calculations also suggest that some peculiar behavior, like that of TPC, can be highlighted by our approach.

In the context of peptidic surfactants, our methodology could further help to improve computer simulations combined to molecular thermodynamic models to predict micellar properties of those more complex amphiphilic molecules.

Keywords

Surfactants; aggregation number; micelle stability; micellization; SDS; surfactin; SOS; TPC.

Introduction

Surfactants are able to lower surface or interfacial tension by adsorbing at the air-liquid or liquid-liquid interface due to their dual hydrophobic/hydrophilic structure. Their amphipathic nature is also responsible for their aggregation behavior in bulk aqueous phase. Above a critical concentration, surfactants spontaneously self-assemble to form aggregates with well-defined properties, such as spherical micelles, planar bilayers, cylindrical micelles, vesicles... In spherical micelles, polar heads are hydrated at the micellar surface while hydrophobic tails form an oily core to avoid contacts with water. These micelles have several applications in many domains, among which detergency is the best known. Their oily core is hence able to solubilize hydrophobic compounds within the micelle, making them readily washed by water. Similar processes are also used in fields like drug delivery (Lukyanov and Torchilin, 2004) or solubilization of membrane proteins (Parker and Song, 1992).

Characterization of micelles structure and formation is of great interest to better control their use in the different fields of applications. Properties such as Critical Micelle Concentration (CMC) (Zdziennicka et al., 2012), aggregation number (Tummino and Gafni, 1993), diameter (Hayter and Penfold, 1983) and shape (Lipfert et al., 2007) of surfactant micelles have been widely investigated. Conventional experimental methods for micelle study include dynamic light scattering (Schillh et al., 1994), small-angle (X-ray or neutron) scattering (Hayter and Penfold, 1983), fluorescence quenching methods (Tummino and Gafni, 1993) and cryo-TEM (Zheng and Davis, 2000).

Other works focused on energetic issues of micelle formation, giving a more theoretical insight into the topic (Tanford, 1980). Starting from these theoretical considerations based on thermodynamics, some authors have built models for the prediction of micelles properties (Nagarajan and Ruckenstein, 1977; Puvvada and Blankschtein, 1990; Nagarajan, 1991). The common approach relies on the estimation of the free-energy change associated with the micellization. This free-energy change is calculated as the sum of free-energy contributions originating from different phenomena. Once the free-energy change associated with micellization is estimated (Goldsipe and Blankschtein, 2005), it becomes possible to predict various properties of the aggregate, such as the CMC, the micellar shape and the aggregation number.

Initially, the input data were limited to parameters derived from molecular structures and experimental results (Nagarajan, 1991). More recently, molecular dynamics (MD) was used to improve molecular-thermodynamic (MT) models for surfactants for which hydrophilic and hydrophobic regions are not easy to distinguish (Stephenson et al., 2006, 2007). Because of its ability to simulate phenomena at the atomic scale on very short time periods, MD has become a popular way to study micelles.

Apart from its combination with MT models to predict micellar properties, most of MD studies on micelles are descriptive. Part of those studies focuses on the structure of preformed micelles to compute a series of physical properties (diameter, eccentricity, solvent accessible surface area...) of a surfactant for which the aggregation number is already known (Bruce et al., 2002a; b; Rakitin and Pack,

2004; Chong *et al.*, 2006; Konidala *et al.*, 2006; Shang *et al.*, 2008, 2009; Jalili and Akhavan, 2009; Wang *et al.*, 2010; Lorenz *et al.*, 2011; Abel *et al.*, 2012b; She *et al.*, 2012). The micelles are simulated with a starting structure as close as possible from their natural form. By using MD, their atomic structure becomes accessible, and their organization under different conditions can be studied. Bruce *et al.* (Bruce *et al.*, 2002a), for example, built a micelle made of 60 SDS molecules (i.e. the aggregation number for SDS) and used it as a starting structure for their MD simulation. From the 5ns trajectory, they computed properties such as eccentricity and micelle radius and they discussed about the micelle structure and counterions distribution. MD was thus used as a new tool to study a precise system without taking into account its formation. Another kind of works aims to study the phenomenon of micelle formation. Usually, the simulation starts from a disperse solution of tensioactive molecules to analyze their aggregation behavior (Marrink *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2005; Sammalkorpi *et al.*, 2007, 2011; Levine *et al.*, 2011; Sanders *et al.*, 2012). It is then complicated and computationally expensive to set proper initial conditions with respect to the box dimensions and the simulation time that have to be large and long enough, respectively. In addition, it might be tricky to determine when the system reached an “equilibrium”. As an example, Sammalkorpi *et al.* (Sammalkorpi *et al.*, 2007) performed 200 ns simulations starting from boxes containing 200 SDS molecules randomly dispersed and filled with water molecules and 200 Na⁺ ions. They studied the auto-assembly of SDS monomers and its kinetics, as well as the structure of the aggregates that were formed. It gave them interesting insight into the micellization process, but they were restricted by the computational cost that auto-assembly simulations require: the time window was too small to predict definite micelle size and they could not perform relevant simulations of dilute systems.

By performing short MD simulations of preformed SDS micelles of various sizes, Yoshii *et al.* (Yoshii and Okazaki, 2006) were able to study structural stability of SDS micelles as a function of their size at relatively low computational cost. Each simulation box contained a different number of SDS molecules forming a spherical micelle surrounded by water as a starting structure. They studied 15 micelle sizes, ranging from 1 to 121 molecules, and analyzed parameters such as radial density profile for each one. By combining the data obtained for every simulation box, it becomes possible to study the impact of micelle size on structural stability. It also allows to extrapolate about the phenomenon of micelle formation since each simulation box can be seen as a transient state of surfactants aggregation. For example, the low-density region described by Yoshii *et al.* in the center of micelles containing more than 61 SDS molecules brought them to conclude that this instability factor makes the existence of large aggregates unfavorable.

In the present work, we studied the micelle formation for several surfactants with different structures and properties, namely Sodium DodecylSulfate (SDS), Sodium OctylSulfate (SOS), TetraDecyl Phosphocholine (TPC) and surfactin (a lipopeptide molecule) in a systematic manner, similar to Yoshii *et al.*'s methodology. By doing so, we wanted to explore the behavior of various surfactants micelles as a function of their size, and determine if extrapolations about micellization process are accessible for different surfactants, including more complex ones such as surfactin,

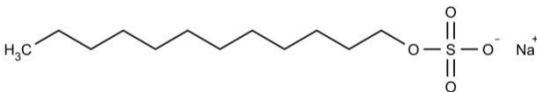
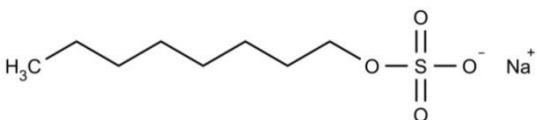
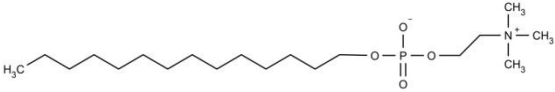
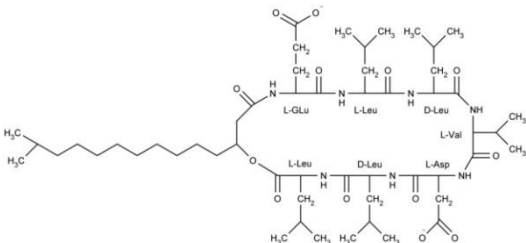
with this type of approach. We used parameters commonly found in MD studies on micelles, but not yet used for such a purpose.

The evolution of the calculated parameters is analyzed as a function of the micellar size. Eccentricity is used to validate our approach while the hydrophobic/hydrophilic surface ratio and the hydrophobic tails hydration are considered as descriptors for micelle formation process. The description of the results focuses on their significance for the micelle formation, with specific attention given to the aggregation number of each surfactant. This structural information is complementary to MT models that are used to predict micellar properties since our approach brings descriptive details that are not given by MT approaches. In the case of surfactin, for which the current MT models could be less accurate due to its peptidic moiety, this study could open the way to the use of some MD parameters to improve the prediction of micellar properties.

Material and methods

Tensioactive molecules studied in this work are presented in Table 1. Two ionic homologues (i.e. two surfactants with the same hydrophilic head but with different hydrophobic chain length), Sodium DodecylSulfate (SDS) and Sodium OctylSulfate (SOS) have been considered; their aggregation numbers are known to be around 60 (Bruce et al., 2002a; Rakitin and Pack, 2004) and 25 (Huisman, 1964; Aniansson et al., 1976; Ranganathan et al., 2000) molecules per micelle, respectively, and SDS micelles have been widely studied (Almgren et al., 1998; Bales et al., 1998; Bruce et al., 2002b; Yoshii and Okazaki, 2006). TetraDecyl Phosphocholine (TPC) is a zwitterionic surfactant that is not as well characterized as SDS; its aggregation number has been reported as 90 (Oliver et al., 2013) or 108 (Göbl et al., 2010). We have also considered iso-C15 surfactin, a lipopeptide from *Bacillus subtilis*, for which an aggregation number of 20 ± 5 molecules per micelle is described (Shen et al., 2009).

Table 1. Presentation of the surfactants considered in this work.

Molecule	Structure	Aggregation number
SDS (Sodium dodecyl sulfate)		55 – 75 (Yoshii et al., 2006), 60 generally admitted (Bruce et al., 2002a; Rakitin and Pack, 2004)
SOS (Sodium octyl sulfate)		24 (Huisman, 1964; Ranganathan et al., 2000) – 27 (Aniansson et al., 1976)
TPC (Tetradecyl phosphocholine)		90 (Oliver et al., 2013) – 108 (Göbl et al., 2010)
Surfactin		20 ± 5 (Shen et al., 2009)

Simulations have been performed with the united atom GROMOS 53a6 force field (Oostenbrink et al., 2004) on Intel Core i7-3930K 3.20GHz. The structure of each molecule has been built with Pymol software (“The PyMOL Molecular Graphics

System,”), and the surfactin peptidic cycle has been formed by using HYPERCHEM (Hypercube, 2003). Topologies of SDS and SOS have been manually refined from Automatic Topology Builder’s (ATB) results (Malde et al., 2011). Topology of surfactin has been obtained by using Gromacs’ program pdb2gmx with manual entries of D-amino acids. Topology of TPC has been derived from the topology of DPC created in Chen et al. (2011) (Chen and Mark, 2011) (charges from ref (Tieleman et al., 2000)) and available on ATB website. Preformed spherical micelles of various sizes have been created by using packmol software (Martinez et al., 2009). Polar head atoms were randomly placed outside a sphere with a radius similar to the length of the hydrocarbon tail of the surfactant whereas the ends of the apolar moieties were placed inside a smaller sphere with the same center. The distance tolerance between 2 atoms of different molecules was set to 2 Å, as advised on packmol website (Martinez,). Each simulation box was built around the resulting structure, with distances ranging from 1 to 2 nm between each side of the preassembled micelle and the box boundaries.

All the systems studied were first run for a 500 ps simulation with the surfactants under position restraints in periodic boundary conditions (PBC) using a 2 fs time step. Production runs were performed for 10 ns. All the systems were solvated with SPC water (Hermans and Van, 1984) and the dynamics were carried out in the NPT conditions (300 K and 1 bar). Na⁺ ions were added to the simulations of SDS, SOS and surfactin molecules (respectively 1:1, 1:1 and 2:1 Na⁺:surfactant ratio) to reach a net charge of 0 for the box. Temperature was maintained by using the v-rescale thermostat with $\tau_T = 0.1$ ps and an isotropic pressure was maintained by using the Parrinello-Rahman (Parrinello and Rahman, 1981) barostat with a compressibility of 4.5×10^{-5} (1/bar) and $\tau_p = 1$ ps. Electrostatic interactions were treated by using the particle mesh Ewald (PME) method. Van der Waals and electrostatics were treated with a 1.2 nm cut-off. Bond lengths were maintained with the LINCS algorithm. (Hess et al., 1997) Positions and velocities of atoms in the system have been saved every 20 ps. The trajectories were performed and analyzed with the GROMACS 4.6.1 tools as well as with homemade scripts, and 3D structures were analyzed with both PYMOL (“The PyMOL Molecular Graphics System,”) and VMD (Humphrey et al., 1996) softwares. A set of properties have been computed for each preformed micelle in order to further estimate the aggregation number of the surfactants. Since the micelles have been preformed as spherical aggregates, the first nanosecond of the simulations was not taken into account to compute properties, allowing molecules to move according to a more natural scheme. Discarding the first nanosecond was already applied by Bruce et al. (Bruce et al., 2002a) and it was proven to be sufficient to get equilibrated systems in our simulations as well (data not shown).

Eccentricity

Eccentricity has been computed as expressed by: (Marchi and Abel, 2015)

$$e = 1 - \frac{I_{min}}{I_{avg}}$$

where $I_{\min}$ is the smallest of the moments of inertia along the principal axes of the micelle (computed with the gromacs tool `g_principal`) and I_{avg} is the average of these moments of inertia.

Hydrophilic / Hydrophobic surface ratio

For each micelle type and size, the solvent accessible surface area (SASA) has been computed with a solvent probe size of 0.14 nm to mimic water (Eisenhaber et al., 1995), with the gromacs tool `g_sas`. By defining a hydrophobic atom as an atom with a net charge between - 0.2 and + 0.2, it is possible to divide SASA into hydrophobic (pho) and hydrophilic (phi) components.

Hydrophobic tails hydration

The hydrophobic tails hydration has been computed as the average number of water molecules at a distance ≤ 0.35 nm from any atom belonging to the apolar moiety of each molecule by using the gromacs tool `g_dist`. The distance of 0.35 nm is a common cut-off of interatomic contact (Gao et al., 2005; Shang et al., 2008).

Micelle radius

The micelle radius has been computed according to: (Bruce et al., 2002a)

$$r_{\text{mic}} = \sqrt{5/3} \times r_{\text{gyr}}$$

where r_{gyr} is the average radius of gyration of the micelle, computed with gromacs tool `g_gyrate`.

Results

A preliminary simulation starting from a disperse solution of 125 SDS molecules has been carried out to assess that a “natural” micellar behavior occurs under the conditions we have set (data not shown). Aggregation is immediately observed; after 100 ns, four micelles containing around 30 molecules were spontaneously formed. From those data, we cannot anticipate if these micelles could merge to form 2 micelles of about 60 tensioactive molecules (i.e. the experimental aggregation number for SDS) or even a single micelle including all the 125 molecules with an expanded simulation time; one could also argue that a micelle could split into two smaller aggregates within a long enough time span. An adequate simulation time is therefore difficult to set. Furthermore, despite the generous dimensions of the simulation box (around 7.5 x 7.5 x 7.5 nm), the SDS concentration is about 0.5 M, more than 60-fold the CMC (0.008 M) (Ruiz and Politecnica, 1995). These conditions could promote micelles collisions and merging, leading to the formation of larger micelles that are unlikely to occur in a dilute solution, which is the most relevant system. Increasing both simulation time and box size in order to investigate the micellization process of a surfactant would imply huge computational resources that are not easily accessible.

To circumvent these problems, we followed an approach in which simulations of preformed micelles of various sizes are carried out. Properties of each micelle type are computed and each parameter is expressed as a function of the molecule number forming the micelle.

Table 2 compares properties of preformed micelles of 60 SDS from the current study and from literature (ref (Bruce et al., 2002a), (Shang et al., 2008), (Jalili and

Akhavan, 2009), (Rakitin and Pack, 2004)). Given the similarities between our results and the previous works on size and shape of the 60 SDS micelles, the methodology used here appears adequate.

Table 2. Comparison of different properties of 60 SDS micelles from several molecular dynamics simulations and this study. (Abbreviations: SASA: Solvent Accessible Surface Area, Phi/pho: hydrophilic SASA/hydrophobic SASA ratio, I_{max}: highest of the principal moments of inertia, I_{min}: smallest of the principal moments of inertia.)

References	Radius (Å)	SASA (Å ²)	Phi / pho	I _{max} / I _{min}	Eccentricity	Simulation parameters
(Bruce et al., 2002a)	20.9	10548		1.05		AMBER parm98, 5 ns
(Shang et al., 2008)	20.4	10470	1.09	1.21		GROMOS45 a3, 10 ns
(Jalili and Akhavan, 2009)	20.3			1.39	0.173	MARTINI (coarse grain), 2 μs
(Rakitin and Pack, 2004)	21.2			1.09		AMBER parm94, 2 ns
Current study	20.83	10530	1.06	1.29	0.134	GROMOS53 a6, 10 ns

Knowing the aggregation number of each surfactant allows to simulate the corresponding micelles and then to compute properties of these ‘representative micelles’. Table 3 gives the average properties calculated in the current study, from ‘representative micelles’ of each surfactant; Figure 1 shows all the micelles after 10 ns simulation.

Table 3. Average properties of ‘representative micelles’ for each studied surfactant, +/- standard deviation.

Micelle type	Radius (Å)	SASA (nm ²)	Phi/pho	Eccentricity
60 SDS	20.8 +/- 0.1	105.3 +/- 0.2	1.06 +/- 0.005	0.134 +/- 0.008
25 SOS	15.8 +/- 0.5	45.7 +/- 0.8	1.08 +/- 0.028	0.248 +/- 0.014
100 TPC	26.3 +/- 0.03	175.9 +/- 1.5	2.03 +/- 0.03	0.084 +/- 0.009
20 surfactins	21.4 +/- 0.15	116.7 +/- 0.7	0.6 +/- 0.016	0.159 +/- 0.051

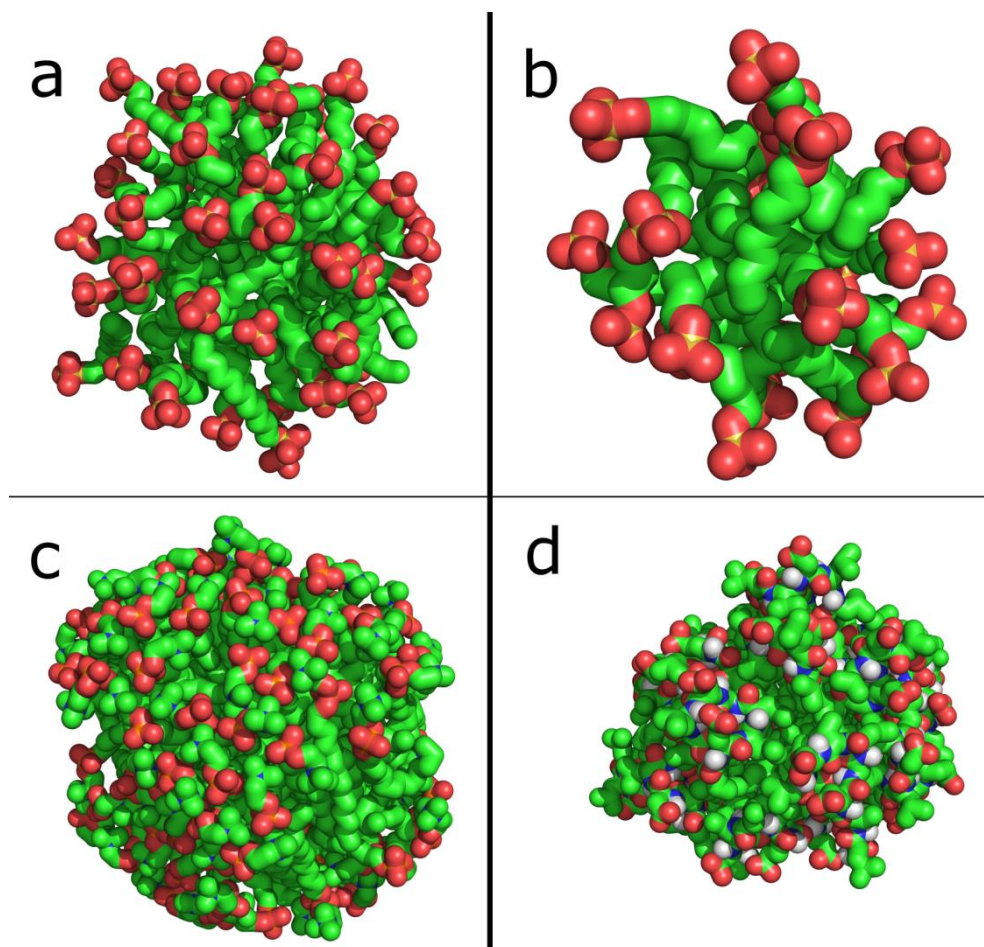


Figure 27. Illustration of the ‘representative micelles’ of each studied surfactant after 10 ns simulation. For clarity, ions and water molecules have been omitted. a: 60 SDS, b: 25 SOS, c: 100 TPC and d: 20 surfactins. Green: carbon, red: oxygen, orange: sulfur (SDS and SOS) or phosphorus (TPC), blue: nitrogen, white: hydrogen.

In the following sections, we describe the different parameters that have been analyzed on the modeled micelles, as well as their evolution as a function of the aggregate size.

Eccentricity

Eccentricity is representative of micelle sphericity: the lower it is, the more spherical is the aggregate.

Looking at the eccentricity values of SDS micelles, three different parts can be defined in the graph presented on Figure 2. The first section, [1–10] molecules per micelle, exhibits high eccentricity values, decreasing dramatically with the increase of molecule number per micelle. The surfactant shape and the low number of molecules within the micelle should not allow them to form a steady spherical structure. The second part, [20–80] molecules per micelle, shows the smallest eccentricity values, i.e. the most spherical aggregates. It has to be noted that this part includes the aggregation number of SDS (60 molecules per micelle), a size for which micellar shape is known to be spherical (Missel et al., 1983). Then the third section, [90–200] molecules per micelle, exhibits a rapid increase of the eccentricity values. These micelle sizes are probably excessive to support a spherical shape, given the SDS molecular morphology. Hence, these micelles take irregular and constantly varying forms (data not shown), which could eventually lead to micelle splitting or other forms of aggregate in longer simulations. Yoshii *et al.* computed a similar parameter, asphericity, for different sizes of SDS aggregates (Yoshii and Okazaki, 2006). They also observed a sharp drop of this property for sizes ranging from a single molecule to a 20 SDS aggregate. Afterwards the parameter exhibits low values and, contrary to our results, still decreases when increasing the number of molecules constituting the micelle. However, they reported the formation of a cavity at the center of the largest aggregates simulated in their work. This cavity is actually an artifact, due to the finite length of SDS molecules that does not allow to keep a spherical shape with too large aggregates (Yoshii and Okazaki, 2006). In our work, we did not observe such cavities for larger aggregates. It explains why the eccentricity value increases from sizes of 90 molecules, as one would expect. Therefore, we assume that the observed values for eccentricity of SDS micelles, as well as their evolution as a function of their size indicate that our simulations give consistent and reliable results.

The experimental aggregation number of SOS (around 25, see Table 1) is also included within the smallest eccentricity values, as well as for surfactin (Figure 2). The micelles formed by those two surfactants are known to be spherical when composed of a number of molecules close to their aggregation number (Missel et al., 1983; Shen et al., 2011). In the case of TPC, micelles do not exhibit such minimal eccentricity values (Figure 2), which may indicate a peculiar micelle organization.

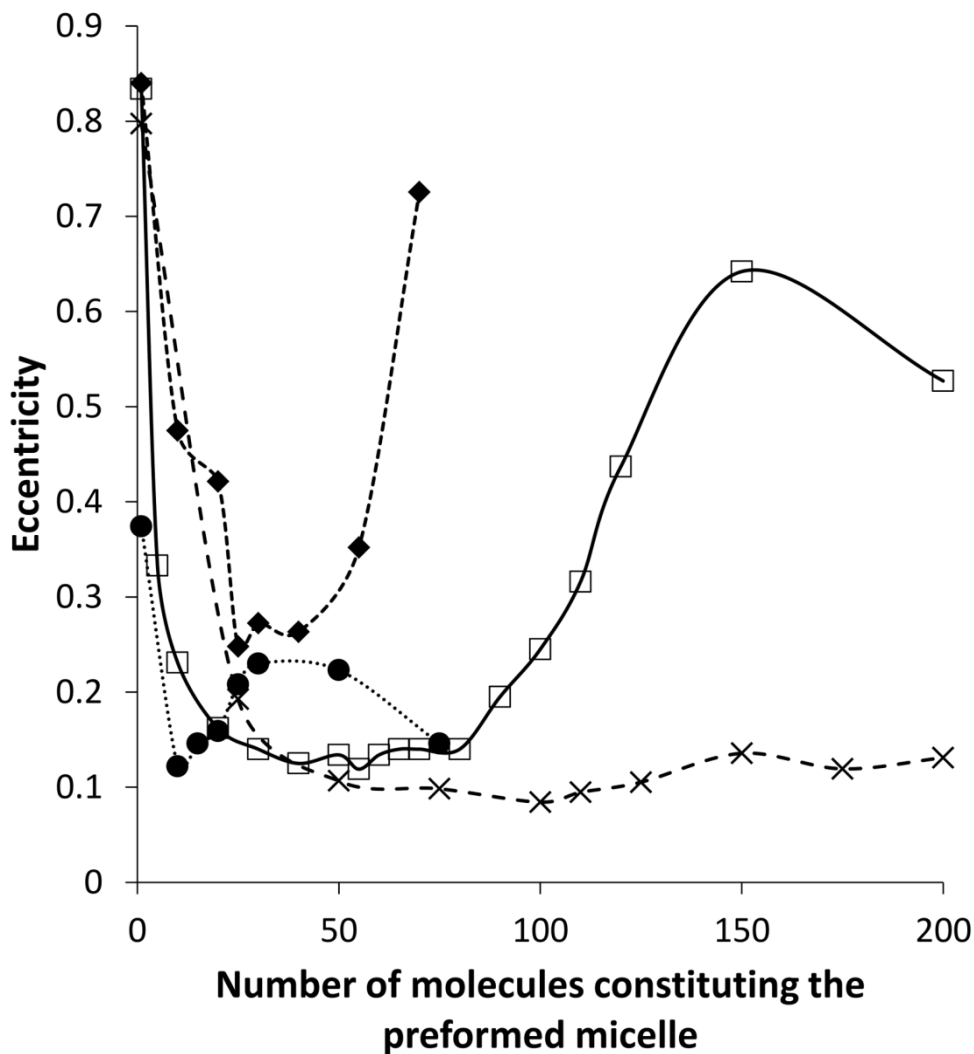


Figure 28. Eccentricity of the micelles as a function of the number of molecules they contain. Standard deviations are between 1 and 14% for SDS, between 1 and 18% for SOS, between 4 and 32% for surfactin, between 1 and 29% for TPC. SDS: solid line (□), SOS: square dotted line (◆), Surfactin: round dotted line (●), TPC: dashed line (×).

Phi/pho surface ratio

Individual tensioactive molecules exhibit phi/pho surface ratio lower than 1, indicating that their hydrophobic part is larger than the polar moiety (Figure 3). Their assembly allows them to shield hydrophobic parts from contact with water, inducing an increase of phi/pho surface ratio. For the very small aggregates (i.e. the micelles containing much less molecules than the aggregation number), the ratio sharply increases with the number of molecules. Approaching the aggregation number, ratio value reaches a plateau. This observation is verified for SDS, SOS and surfactin. For TPC, the plateau is not as evident as for the other molecules tested, while the slope of the curve is slowing down around 100 molecules, which again corresponds to the experimental aggregation number.

The insert in Figure 3 shows the data expressed as a percentage of the highest value of each set (i.e. each surfactant). A threshold has been empirically set at 90%, corresponding to the aggregation number of SDS (60). SDS has been chosen as reference because it is a well described surfactant, and SDS data are more accurate since more points are available (Figure 3). At this threshold (blue line), micelles contain 24, 13 and 99 molecules for SOS, surfactin and TPC respectively. When comparing with Table 1, those values are in very good agreement with experimental aggregation numbers.

One can notice that while the ratio reaches a plateau at a value of 1 for SDS and SOS beyond the aggregation number, this is not the case for TPC (value around 2) and for surfactin (value lower than 1).

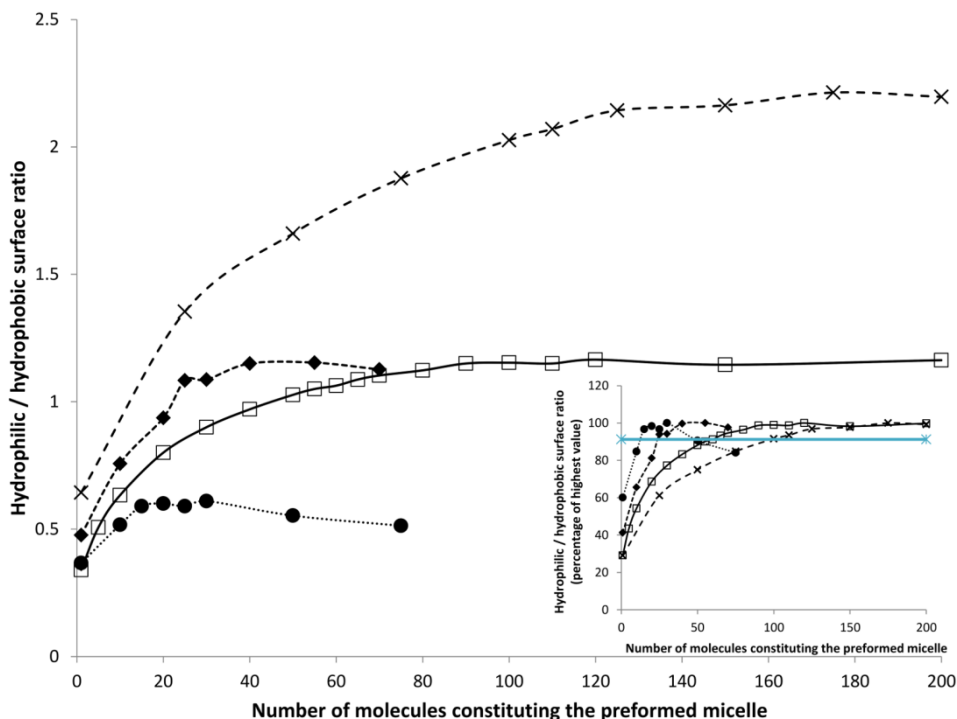


Figure 29. Hydrophilic SASA / hydrophobic SASA ratio of the micelles as a function of the number of molecules they contain. Standard deviations are less than 5% for all the surfactants. SDS: solid line (□), SOS: square dotted line (◆), Surfactin: round dotted line (●), TPC: dashed line (×). Insert: same data expressed as a percentage of the highest value reached for each surfactant. The blue line is a threshold empirically set at 90%, corresponding to the aggregation number of SDS (60).

Hydrophobic tails hydration

The hydrophobic tails hydration (Figure 4) is a parameter that offers insight into the micelle hydrophobic core. At first, a drastic decrease of the apolar tails hydration is observed when increasing the number of molecules in preformed micelles. Again, this is due to the increasing number of polar heads available to protect the hydrophobic tails from contacts with water and to the decreasing SASA per molecule induced by the close packing of the tails. Then the decrease slows down and eventually stops for surfactin, SDS and SOS with further increasing micelles sizes.

It can be seen that stabilization of hydrophobic tails hydration for surfactin occurs for micelle size of about 20 molecules. This is in good agreement with the experimental aggregation number. The same is observed for both SOS (25-30 molecules/micelle) and SDS (55-70 molecules/micelle). TPC micelles exhibit a slightly different behavior, since hydrophobic tails hydration actually never stops to decrease when increasing aggregate size. However, the decrease appears less marked for sizes higher than 100 molecules, i.e. around the aggregation number of TPC.

The insert of Figure 4 shows the data expressed as a percentage of the lowest value of each set. As for the phi/pho surface ratio, the threshold (namely 110) is fixed regarding SDS. At this threshold, SOS, TPC and surfactin micelles sizes correspond to 24, 169 and 29 molecules, respectively. The agreement with experimental values of aggregation numbers is, here again, remarkably good for SOS and pretty close for surfactin. However, the value for TPC (169) is quite far from the aggregation numbers found in literature.

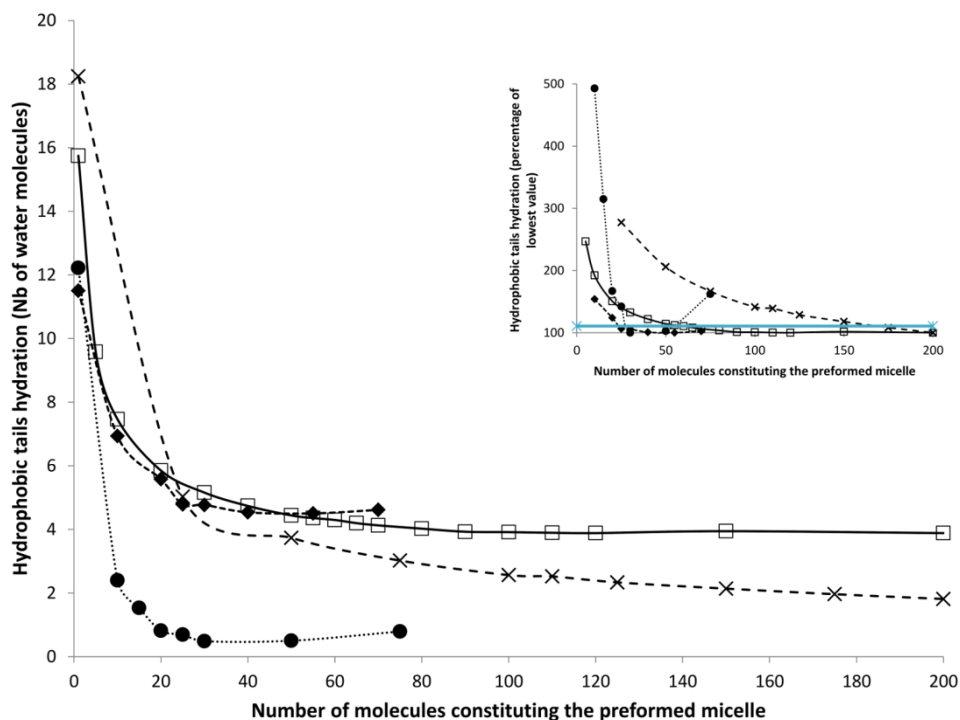


Figure 30. Hydrophobic tails hydration as a function of the number of molecules that micelle contains, expressed as the average number of water molecules present within a cut-off of 0.35 nm from each tail. Standard deviations are less than 5% for SDS, SOS and TPC, and between 3 and 14% for surfactin. SDS: solid line (□), SOS: square dotted line (◆), Surfactin: round dotted line (●), TPC: dashed line (×). Insert: same data expressed as a percentage of the lowest value reached for each surfactant. The blue line is a threshold empirically set at 110%, corresponding to the aggregation number of SDS (60).

Discussion

The calculation of eccentricity allows a validation of our approach when compared to experimental results while the two other parameters – namely phi/pho surface ratio and hydrophobic tail hydration – are interesting descriptors to follow the evolution of the micellar stability as a function of the aggregate size.

Validation of the methodology

Sodium alkyl sulfate surfactants are reported to form spherical micelles when no added salt is present (Missel *et al.*, 1983). Our simulations show that surfactin forms spherical micelles when the two acidic residues are negatively charged, in agreement with previous work (Shen *et al.*, 2011). It suggests that our simulations well reflect their aggregation behavior and that this “multiple micelle sizes” methodology gives consistent results. TPC aggregates composed of roughly 100 molecules exhibit very low eccentricity values, indicative of a spherical shape. This is in good agreement with Göbl *et al.* (Göbl *et al.*, 2010) but not with Oliver *et al.* (Oliver *et al.*, 2013) who assumed that TPC micelles are prolate ellipsoids. They suggest that significant steric and electrostatic repulsions between head groups as well as high surface area per head group are responsible for this peculiar shape. They assumed that this effect might be increased due to the counterion interactions at the surface, since they worked in presence of added salt ions (NaCl). They also predict that ellipticity of the phosphocholine prolate micelle would be dependent on ionic strength. In our TPC simulations, no ion was present and our data further suggest that electrostatic attraction may occur between anionic phosphate groups and cationic choline groups (see below), in contrast to the results of Oliver *et al.* (Oliver *et al.*, 2013). This interaction could explain the peculiar behavior observed for TPC aggregates’ eccentricity curve that does not exhibit a depression as for the other surfactants.

Phi/pho surface ratio

Since a higher phi/pho surface ratio means a more thermodynamically favorable organization of the hydrophilic and hydrophobic domains, one could expect the phi/pho ratio to rise endlessly by increasing the number of surfactants within a micelle. However, steric and/or electrical repulsions between polar heads have to be considered as a limiting factor. The fact that SDS and SOS (they both have the same polar head) micelles reach a same value for the plateau phase illustrates this pretty well. From these considerations, it can be postulated that the plateau corresponds to a balance reached at the micelle surface. Moreover, the insertion of additional molecule in a micelle whose surface is fully covered by charged heads should be less spontaneous.

Surprisingly, the phi/pho surface ratio eventually undergoes a decrease for the largest micelles of surfactin. To get insight on this decrease, the simulation time of a box containing a 75 surfactin-micelle has been extended to 400 ns. An increase of the ratio can be observed during roughly 200 ns, followed by a stabilization around values very close to the values computed for smaller micelles (about 0.6, data not shown). When the simulation time of a 20 surfactins’ micelle is increased to 200 ns, the phi/pho surface ratio only fluctuates around the value computed after the first 10 ns (data not shown).

These data suggest that aggregates containing a very high number of surfactin molecules (i.e. 50 and 75, at least twice and thrice the aggregation number of

surfactin, respectively) have to rearrange themselves to reach a more favorable organization. This process is quite slow because, as a peptidic surfactant, surfactin is larger and probably needs more time to reach an equilibrium when such a high number of molecules is present in the system. However, even after 400 ns, the phi/pho surface ratio of the 75 surfactins-micelle does not become higher than the phi/pho surface ratio of the aggregate containing 20 molecules. This suggests that this phi/pho surface ratio value is like an optimal one for surfactin aggregates. This assumption is reinforced by the fact that even when extending the simulation of 20 surfactins by 190 ns, the phi/pho surface ratio mainly undergoes fluctuations.

While SDS and SOS phi/pho surface ratios reach a same value around their respective aggregation number, TPC ratio becomes much higher as it reaches its own aggregation number. This is due to its hydrophilic moiety (phosphocholine group), which is larger than SDS and SOS head (sulfate group). For surfactin, one could be surprised to see such low values, since it has by far the biggest “polar” head among the surfactants studied here. However, it should be reminded that a hydrophilic atom is defined here as an atom with a charge lower than -0.2 or higher than +0.2. Unlike the three other surfactants, not all the atoms forming the head of surfactin are hydrophilic ones. Thus, it is probably a more complex equilibrium that is reached, still promoting the exposure of hydrophilic atoms to water, but also involving exposure of neighboring hydrophobic atoms. The low values observed of surfactin phi/pho surface ratio could then be explained.

Hydrophobic tails hydration

Since micellization is driven by hydrophobic interactions, it is interesting to study the contacts that occur between water molecules and apolar tails. The less hydrated they are, the more stable micelles should be.

This assumption is in good agreement with the fact that sizes corresponding to the aggregation number for each surfactant are included in the lowest values of hydrophobic tails hydration. Actually, for SDS, SOS and surfactin, the values for sizes around the aggregation number indicate the transition between the sharp decrease and the plateau that can be observed on the curves. One could say that those sizes are “key sizes” because when less molecules are present in the micelle, the protection of the tails from contacts with water is not optimal, while increasing the number of molecules does not significantly further reduce the hydrophobic tails hydration. It seems pretty compatible with the definition of the aggregation number.

The stabilization occurs at a value that is function of the polar head size/electric charge and of the hydrocarbon chain length. For example, the low value of apolar moieties hydration observed for surfactin micelles is probably due to the very large peptidic heads that efficiently preserve hydrophobic tails from contact with water.

Global comment

The results seem in very good agreement with literature for SDS and SOS. Yoshii *et al.* (Yoshii and Okazaki, 2006) had already successfully used this “multiple micelle sizes” methodology for SDS. We here confirm that it also gives good results with the parameters used in our work. Those parameters seem evident for the study of surfactant properties, but were never used in such a way. In addition, we show that it can also be applied with another simple surfactant, SOS, which was expected but had to be proven. The use of a threshold based on SDS curves for phi/pho

surface ratio and hydrophobic tails hydration (inserts in Figure 3 and Figure 4, respectively) is very accurate for estimating the aggregation number of SOS. This may indicate that for such a simple surfactant, it could even be possible to precisely estimate the aggregation number of all its homologues by following the same methodology.

The results for surfactin also support an interesting analysis concerning the evolution of micelle size and the aggregation number. It proves that for a surfactant with such a peculiar structure, the methodology allows to collect interesting and useful data, even though the results are slightly less accurate. As mentioned, the distribution of the hydrophobic and hydrophilic atoms is more subtle for surfactin, since not all the atoms of the “polar head” are actually hydrophilic. This feature probably makes surfactin a molecule for which the prediction of properties such as aggregation number is complicated with classical predictive tools. This work could help to improve existing MD-MT models for peculiar surfactants such as peptides.

For TPC, the methodology used with phi/pho surface ratio parameter still offers interesting data with regard to the aggregation number, but the results are globally less clear than for the other surfactants. A probable explanation for this relies on the organization of the polar heads at the micellar surface. When looking at pictures of TPC aggregates, some hydrophobic patches can be observed at the surface (Figure 5.a). While at the surface of SDS micelle there is an almost uniform distribution of the sulfate groups finely tuned as a function of the electrical repulsions between them (Figure 1), TPC heads seem closer to each other (Figure 5.b) and thus unable to recover the whole micellar surface. This behavior may be due to the zwitterionic nature of TPC: interactions between negatively charged phosphate groups and positively charged choline groups could occur and could contribute to pack together the heads. This heterogeneous organization could be at the origin of the different pattern observed for the evolution of the properties considered here, when compared with other surfactants. However, since all the simulations were performed with gromos53a6, we cannot rule out the possibility that these observations may depend on the forcefield. Tang *et al.* analyzed the effect of the force field on the structure of SDS micelles (Tang *et al.*, 2014). They concluded that some force fields, among which gromos53a6, were more adequate to simulate large SDS aggregates than others. On the other hand, Poger *et al.* found that default non-bonded parameters between choline methyls and non-ester phosphate oxygens in gromos53a6 did not allow to reproduce the behavior of DPPC bilayers experimentally observed (Poger *et al.*, 2010). Indeed, when using these default values, some properties of the simulated bilayers were not in good agreement with experimental data, including area per lipid that was too low. Authors thus tested new Lennard-Jones parameters with a higher repulsive term which gave better results (Poger *et al.*, 2010). In our work, we only used default parameters from gromos53a6 and showed that it allows to study micelles as a function of their size and to give globally consistent results. Since the discrepancies observed for our TPC simulations could arise from the tight packing of the heads, one could suggest that modifying Lennard-Jones parameters as done by Poger *et al.* would give more accurate results. According to a set of explorative simulations that we have performed (data not shown), the hydrophobic patches seem to be no more present at the micelle surface with Poger’s parameters. However, even

though the values of some properties are slightly different, their evolution as a function of the micelle size seems to follow the same trends as we observed with gromos53a6 default parameters. A similar trial was done with a completely different force field, namely charmm36, for which we started from all-atom simulation files used by Abel *et al.* (Abel et al., 2012a). In this case, only eccentricity and phi/pho surface ratio were computed (data not shown). The trends followed by these curves are also very similar to those reported in this study, even though the values reached for the phi/pho surface ratio are much higher. As for Poger's parameters, no large hydrophobic patches are observed with charmm36.

These preliminary results seem to indicate that, for a given surfactant, changing the force field may influence the absolute values of the calculated properties but not the trends described here. The evolution of the parameters as a function of the aggregate size seems to follow the same pattern, whatever the force field.

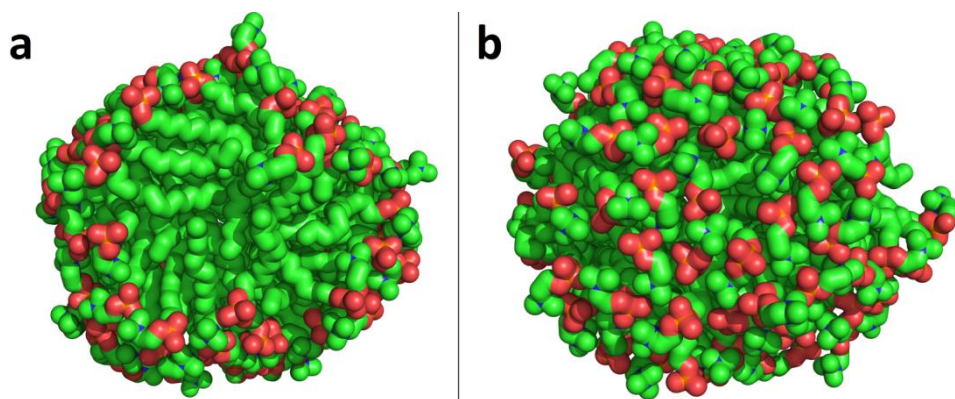


Figure 31. Pictures of 110 TPC micelles showing the heterogeneous distribution of the polar heads at the micellar surface. (a) Side of the micelle on which the distribution of the polar heads is not even, exposing a large hydrophobic area. (b) Polar heads are uniformly distributed on this side of the micelle. Green: carbon, red: oxygen, orange: phosphor, blue: nitrogen.

Conclusions

MD used in the systematic way that we developed in this paper is an interesting tool for the analysis of the micellar structure and stability. It also allows to study micelle formation phenomenon because each micelle size can be seen as a snapshot of a micellization process. Moreover, unlike auto-assembly MD simulations, it only requires low computational resources since systems dimensions and time windows are much smaller. We showed that it is applicable to different surfactants, even a very complex one such as surfactin and that the parameters used here are suitable for such a method. It gives the opportunity to monitor the behavior of surfactant aggregates as a function of their size, and to compare the data between several surfactants. Eccentricity parameter exhibits minimal values when the aggregate size is close to the aggregation number for the surfactants that are known to form spherical micelles. This is hence in good agreement with literature and indicates that the simulations give reliable results, validating our “multiple micelle sizes” approach. The evolution of the other parameters, ϕ/ρ surface ratio and hydrophobic tails hydration, follows another scheme, with a sharp increase and decrease, respectively, followed by a leveling-off. Interestingly, the aggregate sizes at which this stabilization starts to occur are close to the respective aggregation number of each surfactant. It can be assumed that those two parameters are good descriptors of micelle stability and formation.

These observations might be general trends for micelle-forming surfactants, since different molecules tested here gave coherent patterns. Among the compounds that we considered, only zwitterionic TPC exhibited a slightly different behavior from the “common pattern” described above. This singularity may come from a peculiar organization at the micelle surface, some hydrophobic patches being more exposed to water. This specific pattern might be due to putative attractive interactions between negatively-charged phosphate groups and positively-charged choline groups. These interactions would pack TPC heads too tightly, making them unable to cover the whole micelle surface. Explorative simulations performed with different parameters of the force field or with a different force field seem to indicate that this tight packing would come from the gromos53a6 default parameters. However, changing the force field does not seem to have an impact on the trends that the evolution of the properties as a function of the aggregate size follows.

To confirm these preliminary observations and to further explore this topic, future investigation could extend our approach with other force fields as well as with other surfactants. New parameters to analyze could also be investigated to get a more precise picture of micelle organization. Eventually, our methodology could help to improve current computer simulations combined to molecular thermodynamics models to predict properties of peptidic surfactants, since simulations with surfactin appear to give promising results.

Acknowledgments

We gratefully thank Stéphane Abel for sending charmm36 simulations files from his work and for his kind support.

We thank the FNRS (PDR grant T.1003.14), the Belgian Program on Interuniversity Attraction Poles initiated by the Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (IAP P7/44 iPros), The University of Liège (Fonds

Spéciaux de la Recherche, Action de Recherche Concertée-Project FIELD) for financial support.

MD and LL are Senior Research Associates for the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS), SL is supported by the AgricultureIsLife platform (GX ABT, Ulg), JMC is supported by the IAP iPros project and MNN by the ARC FIELD project.

Partial computational resources of the lab are provided by the “Consortium des Équipements de Calcul Intensif” (CECI), funded by the F.R.S.-FNRS under Grant No. 2.5020.11.

References

Abel, S., F.Y. Dupradeau, and M. Marchi. 2012a. Molecular dynamics simulations of a characteristic DPC micelle in water. *J. Chem. Theory Comput.* 8(11): 4610–4623. doi: 10.1021/ct3003207.

Abel, S., F.-Y. Dupradeau, E.P. Raman, A.D.J. MacKerell, and M. Marchi. 2012b. Molecular Simulations of Dodecyl-B-maltoside micelles in water: Influence of the headgroup conformation and force field parameters. *J. Phys. Chem. B* 115(3): 487–499. doi: 10.1021/jp109545v.Molecular.

Almgren, M., J.C. Gimel, K. Wang, G. Karlsson, K. Edwards, et al. 1998. SDS Micelles at High Ionic Strength. A Light Scattering, Neutron Scattering, Fluorescence Quenching, and CryoTEM Investigation. *J. Colloid Interface Sci.* 202(2): 222–231. doi: 10.1006/jcis.1998.5503.

Aniansson, E.A.G., S.N. Wall, M. Almgren, and H. Hoffmann. 1976. Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *J Phys Chem* 80(9): 905–922.

Bales, B.L., L. Messina, A. Vidal, M. Peric, and O.R. Nascimento. 1998. Precision Relative Aggregation Number Determinations of SDS Micelles Using a Spin Probe. A Model of Micelle Surface Hydration. *J. Phys. Chem. B* 102(50): 10347–10358. doi: 10.1021/jp983364a.

Bruce, C.D., M.L. Berkowitz, L. Perera, and M.D.E. Forbes. 2002a. Molecular Dynamics Simulation of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: Micellar Structural Characteristics and Counterion Distribution. *J. Phys. Chem. B* 106(15): 3788–3793. doi: 10.1021/jp013616z.

Bruce, C.D., S. Senapati, M.L. Berkowitz, L. Perera, and M.D.E. Forbes. 2002b. Molecular Dynamics Simulations of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: The Behavior of Water. *J. Phys. Chem. B* 106(42): 10902–10907. doi: 10.1021/jp025872x.

Chen, R., and A.E. Mark. 2011. The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: implications for binding and the mechanism of action. *Eur. Biophys. J. EBJ* 40(4): 545–53. doi: 10.1007/s00249-011-0677-4.

Chong, T.T., R. Hashim, and R. a Bryce. 2006. Molecular dynamics simulation of monoalkyl glycoside micelles in aqueous solution: influence of carbohydrate headgroup stereochemistry. *J. Phys. Chem. B* 110(10): 4978–84. doi: 10.1021/jp056851g.

Eisenhaber, F., P. Lijnzaad, P. Argos, C. Sander, and M. Scharf. 1995. The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *J. Comput. Chem.* 16(3): 273–284.

Gao, J., W. Ge, G. Hu, and J. Li. 2005. From homogeneous dispersion to micelles—a molecular dynamics simulation on the compromise of the hydrophilic and hydrophobic effects of sodium dodecyl sulfate in aqueous solution. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 21(11): 5223–9. doi: 10.1021/la047121n.

Göbl, C., M. Dulle, W. Hohlweg, J. Grossauer, S.F. Falsone, et al. 2010. Influence of phosphocholine alkyl chain length on peptide-micelle interactions and micellar size and shape. *J. Phys. Chem. B* 114(13): 4717–24. doi: 10.1021/jp9114089.

Goldsipe, A., and D. Blankschtein. 2005. Modeling Counterion Binding in Ionic-Nonionic and Ionic-Zwitterionic Binary Surfactant Mixtures. *Langmuir* 21(22): 9850–9865. doi: 10.1021/la050699s.

Hayter, J.B., and J. Penfold. 1983. Determination of micelle structure and charge by neutron small-angle scattering. *Colloid Polym. Sci.* 261(12): 1022–1030. doi: 10.1007/BF01421709.

Hermans, J.A.N., and W.F. Van. 1984. A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers* 23(8): 1513–1518.

Hess, B., H. Bekker, H.J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije. 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18(12): 1463–1472. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.

Huisman, H.F. 1964. Light Scattering of solutions of ionic detergents. *Proc K Ned Akad Wet Ser B Phys Sci* 67.

Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 7855(October 1995): 33–38.

Hypercube. 2003. Hyperchem (TM).

Jalili, S., and M. Akhavan. 2009. A coarse-grained molecular dynamics simulation of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 352(1–3): 99–102. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.10.007.

Konidala, P., L. He, and B. Niemeyer. 2006. Molecular dynamics characterization of n-octyl-beta-D-glucopyranoside micelle structure in aqueous solution. *J. Mol. Graph. Model.* 25(1): 77–86. doi: 10.1016/j.jmgm.2005.11.008.

Levine, B.G., D.N. LeBard, R. DeVane, W. Shinoda, A. Kohlmeyer, et al. 2011. Micellization Studied by GPU-Accelerated Coarse-Grained Molecular Dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* 7(12): 4135–4145. doi: 10.1021/ct2005193.

Lipfert, J., L. Columbus, V.B. Chu, S. a Lesley, and S. Doniach. 2007. Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering. *J. Phys. Chem. B* 111(43): 12427–38. doi: 10.1021/jp073016l.

Lorenz, C.D., C.-M. Hsieh, C. a Dreiss, and M.J. Lawrence. 2011. Molecular dynamics simulations of the interfacial and structural properties of dimethyldodecylamine-N-oxide micelles. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 27(2): 546–53. doi: 10.1021/la1031416.

- Lukyanov, A.N., and V.P. Torchilin. 2004. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(9): 1273–89. doi: 10.1016/j.addr.2003.12.004.
- Malde, A.K., L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, et al. 2011. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* 7(12): 4026–4037. doi: 10.1021/ct200196m.
- Marchi, M., and S. Abel. 2015. Modeling the self-aggregation of small AOT reverse micelles from first-principles. *J. Phys. Chem. Lett.* 6(1): 170–174. doi: 10.1021/jz5023619.
- Marrink, S.J., D.P. Tieleman, and a. E. Mark. 2000. Molecular Dynamics Simulation of the Kinetics of Spontaneous Micelle Formation. *J. Phys. Chem. B* 104(51): 12165–12173. doi: 10.1021/jp001898h.
- Martinez, J.M. Packmol. <http://www.ime.unicamp.br/~martinez/packmol/>.
- Martinez, L., R. Andrade, E.G. Birgin, and J.M. Martinez. 2009. Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *Wiley Intersci.* doi: 10.1002/jcc.
- Missel, P.J., N.A. Mazer, G.B. Benedek, and M.C. Carey. 1983. Influence of Chain Length on the Sphere-to-Rod Transition in Alkyl Sulfate Micelles. *J Phys Chem* 87: 1264–1277.
- Nagarajan, R. 1991. Theory of Surfactant Self -Assembly : A Predictive Molecular Thermodynamic Approach. *Langmuir* 7(3): 2934–2969. doi: 10.1021/la00060a012.
- Nagarajan, R., and E. Ruckenstein. 1977. Critical micelle concentration: A transition point for micellar size distribution. *J. Colloid Interface Sci.* 60(2): 221–231. doi: 10.1016/0021-9797(77)90282-X.
- Oliver, R.C., J. Lipfert, D. a Fox, R.H. Lo, S. Doniach, et al. 2013. Dependence of micelle size and shape on detergent alkyl chain length and head group. *PloS One* 8(5): e62488. doi: 10.1371/journal.pone.0062488.
- Oostenbrink, C., A. Villa, A.E. Mark, and W.F. van Gunsteren. 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1656–76. doi: 10.1002/jcc.20090.
- Parker, W., and P.S. Song. 1992. Protein structures in SDS micelle-protein complexes. *Biophys. J.* 61(5): 1435–9. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81949-5.
- Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52(12): 7182. doi: 10.1063/1.328693.
- Poger, D., W.F. Van Gunsteren, and A.E. Mark. 2010. A New Force Field for Simulating Phosphatidylcholine Bilayers. *J. Comput. Chem.* 31(6): 1117–1125. doi: 10.1002/jcc.21396.
- Puvvada, S., and D. Blankshtein. 1990. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. *J. Chem. Phys.* 92(6): 3710–3724. doi: 10.1063/1.457829.

Rakitin, A.R., and G.R. Pack. 2004. Molecular Dynamics Simulations of Ionic Interactions with Dodecyl Sulfate Micelles. *J. Phys. Chem. B* 108(8): 2712–2716. doi: 10.1021/jp030914i.

Ranganathan, R., L. Tran, and B.L. Bales. 2000. Surfactant- and Salt-Induced Growth of Normal Sodium Alkyl Sulfate Micelles Well above Their Critical Micelle Concentrations. *J. Phys. Chem. B* 104(10): 2260–2264. doi: 10.1021/jp993917x.

Ruiz, C.C., and E.U. Politecnica. 1995. A photophysical study of the urea effect on micellar properties of sodium dodecylsulfate aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.* 1040: 1033–1040.

Sammalkorpi, M., M. Karttunen, and M. Haataja. 2007. Structural properties of ionic detergent aggregates: a large-scale molecular dynamics study of sodium dodecyl sulfate. *J. Phys. Chem. B* 111(40): 11722–33. doi: 10.1021/jp072587a.

Sammalkorpi, M., S. Sanders, a Z. Panagiotopoulos, M. Karttunen, and M. Haataja. 2011. Simulations of micellization of sodium hexyl sulfate. *J. Phys. Chem. B* 115(6): 1403–10. doi: 10.1021/jp109882r.

Sanders, S. a, M. Sammalkorpi, and A.Z. Panagiotopoulos. 2012. Atomistic simulations of micellization of sodium hexyl, heptyl, octyl, and nonyl sulfates. *J. Phys. Chem. B* 116(8): 2430–7. doi: 10.1021/jp209207p.

Schillh, K., W. Brown, and R.M. Johnsen. 1994. Micellar Sphere-to-Rod Transition in an Aqueous Triblock Copolymer System. *Macromolecules* 27: 4825–4832.

Shang, B.Z., Z. Wang, and R.G. Larson. 2008. Molecular dynamics simulation of interactions between a sodium dodecyl sulfate micelle and a poly(ethylene oxide) polymer. *J. Phys. Chem. B* 112(10): 2888–900. doi: 10.1021/jp0773841.

Shang, B.Z., Z. Wang, and R.G. Larson. 2009. Effect of headgroup size, charge, and solvent structure on polymer-micelle interactions, studied by molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 113(46): 15170–80. doi: 10.1021/jp9057737.

She, A.-Q., H.-Z. Gang, and B.-Z. Mu. 2012. Temperature influence on the structure and interfacial properties of surfactin micelle: a molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem. B* 116(42): 12735–43. doi: 10.1021/jp302413c.

Shen, H.-H., T.-W. Lin, R.K. Thomas, D.J.F. Taylor, and J. Penfold. 2011. Surfactin structures at interfaces and in solution: the effect of pH and cations. *J. Phys. Chem. B* 115(15): 4427–35. doi: 10.1021/jp109360h.

Shen, H.-H., R.K. Thomas, C.-Y. Chen, R.C. Darton, S.C. Baker, et al. 2009. Aggregation of the naturally occurring lipopeptide, surfactin, at interfaces and in solution: an unusual type of surfactant? *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 25(7): 4211–8.

Stephenson, B.C., K. Beers, and D. Blankschtein. 2006. Complementary use of simulations and molecular-thermodynamic theory to model micellization. *Langmuir* 22(8): 1500–1513. doi: 10.1021/la052042c.

Stephenson, B.C., A. Goldsipe, K.J. Beers, and D. Blankschtein. 2007. Quantifying the hydrophobic effect. 2. A computer simulation-molecular-thermodynamic model for the micellization of nonionic surfactants in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* 111(1): 1045–1062. doi: 10.1021/jp065697a.

Tanford, C. 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Wiley.

Tang, X., P.H. Koenig, and R.G. Larson. 2014. Molecular Dynamics Simulations of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles in Water—The Effect of the Force Field. *J. Phys. Chem. B* 118(14): 3864–3880.

The PyMOL Molecular Graphics System.

Tieleman, D.P., D. Van Der Spoel, and H.J.C. Berendsen. 2000. Molecular Dynamics Simulations of Dodecylphosphocholine Micelles at Three Different Aggregate Sizes: Micellar Structure and Chain Relaxation. *J. Phys. Chem.* 23: 6380–6388.

Tummino, P.J., and a Gafni. 1993. Determination of the aggregation number of detergent micelles using steady-state fluorescence quenching. *Biophys. J.* 64(5): 1580–7. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81528-5.

Wang, Q., G. Hong, G.R. Johnson, R. Pachter, and M.S. Cheung. 2010. Biophysical properties of membrane-active peptides based on micelle modeling: a case study of cell-penetrating and antimicrobial peptides. *J. Phys. Chem. B* 114(43): 13726–35. doi: 10.1021/jp1069362.

Yoshii, N., K. Iwahashi, and S. Okazaki. 2006. A molecular dynamics study of free energy of micelle formation for sodium dodecyl sulfate in water and its size distribution. *J. Chem. Phys.* 124(18): 184901. doi: 10.1063/1.2179074.

Yoshii, N., and S. Okazaki. 2006. A molecular dynamics study of structural stability of spherical SDS micelle as a function of its size. *Chem. Phys. Lett.* 425(1–3): 58–61. doi: 10.1016/j.cplett.2006.05.004.

Zdziennicka, A., K. Szymczyk, J. Krawczyk, and B. Jańczuk. 2012. Critical micelle concentration of some surfactants and thermodynamic parameters of their micellization. *Fluid Phase Equilibria* 322–323: 126–134. doi: 10.1016/j.fluid.2012.03.018.

Zheng, Y., and H.T. Davis. 2000. Mixed Micelles of Nonionic Surfactants and Uncharged Block Copolymers in Aqueous Solutions: Microstructure Seen by Cryo-TEM. *Langmuir* 16(16): 6453–6459. doi: 10.1021/la000230r.