



Etudes théoriques de processus photophysiques dans des protéines fluorescentes

Germain VALLVERDU

Université Paris-Sud 11 - Laboratoire de Chimie Physique - UMR8000

16 Juillet 2009

1 Introduction

2 Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean

3 Méthode multi-échelle pour le calcul du déclin de la fluorescence dans la *Green Fluorescent Protein*

1 Introduction

2 Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean

3 Méthode multi-échelle pour le calcul du déclin de la fluorescence dans la *Green Fluorescent Protein*

- Spectroscopie d'émission de fluorescence résolue en temps



Fabienne Mérola



Hélène Pasquier



Marie Erard



Agathe Espagne

- Spectroscopie d'absorption transitoire



Isabelle Lampre



- Simulation – Modélisation

Isabelle Demachy



Jacqueline Ridard



Bernard Lévy



- Analyse bayésienne des données

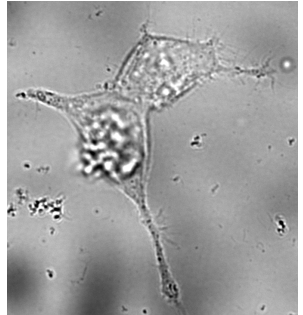
Pascal Pernot



La famille de la Green Fluorescent Protein (GFP)

Utilisation en imagerie cellulaire

- Marqueur ou sonde *in vivo*
- Identification des interactions entre protéines (FRET)



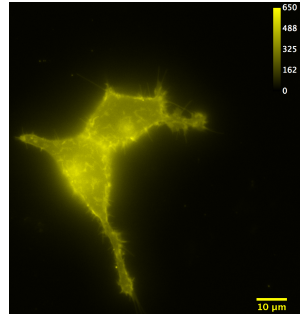
Les propriétés photophysiques des GFP dépendent du pH ou de la température

Comprendre les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes et leurs relations avec les conditions du milieu extérieur (pH, Température).

La famille de la Green Fluorescent Protein (GFP)

Utilisation en imagerie cellulaire

- Marqueur ou sonde *in vivo*
- Identification des interactions entre protéines (FRET)



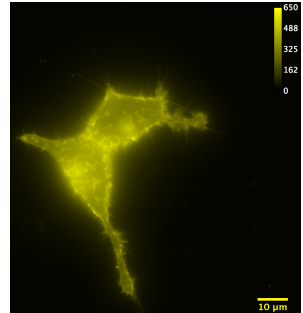
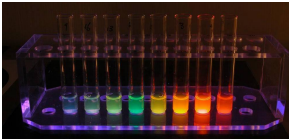
Les propriétés photophysiques des GFP dépendent du pH ou de la température

Comprendre les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes et leurs relations avec les conditions du milieu extérieur (pH, Température).

La famille de la Green Fluorescent Protein (GFP)

Utilisation en imagerie cellulaire

- Marqueur ou sonde *in vivo*
- Identification des interactions entre protéines (FRET)



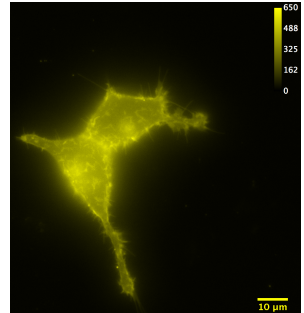
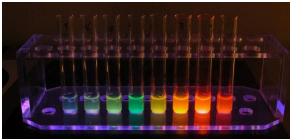
Les propriétés photophysiques des GFP dépendent du pH ou de la température

Comprendre les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes et leurs relations avec les conditions du milieu extérieur (pH, Température).

La famille de la Green Fluorescent Protein (GFP)

Utilisation en imagerie cellulaire

- Marqueur ou sonde *in vivo*
- Identification des interactions entre protéines (FRET)

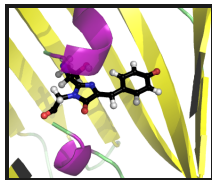
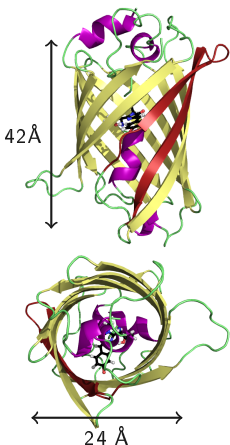


Les propriétés photophysiques des GFP dépendent du pH ou de la température

Comprendre les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes et leurs relations avec les conditions du milieu extérieur (pH, Température).

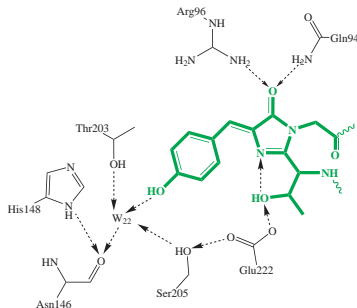
Structure des protéines de la famille de la GFP

Une structure commune à tous les mutants de la famille de la GFP



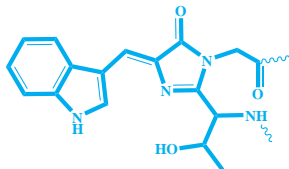
Le chromophore est enfoui à l'intérieur de la protéine en partie isolé de l'environnement.

Le chromophore est tenu par un réseau de liaisons hydrogène

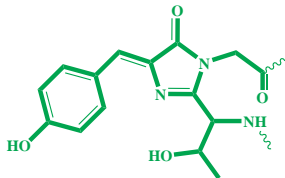


La cavité protéique stabilise la structure et la dynamique de l'état excité fluorescent du chromophore

Mutations impliquant le chromophore



Cyan Fluorescent Protein

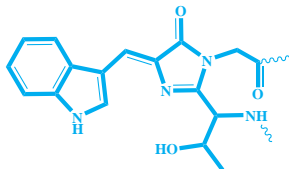


Green Fluorescent Protein

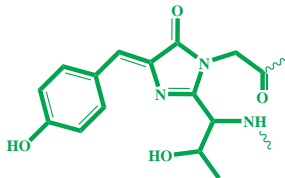
Grandeurs mesurées expérimentalement et calculées par des approches théoriques

- Spectres d'absorption
- Declin temporel de l'intensité de fluorescence
- Rendement quantique de fluorescence ϕ_f

Mutations impliquant le chromophore



Cyan Fluorescent Protein

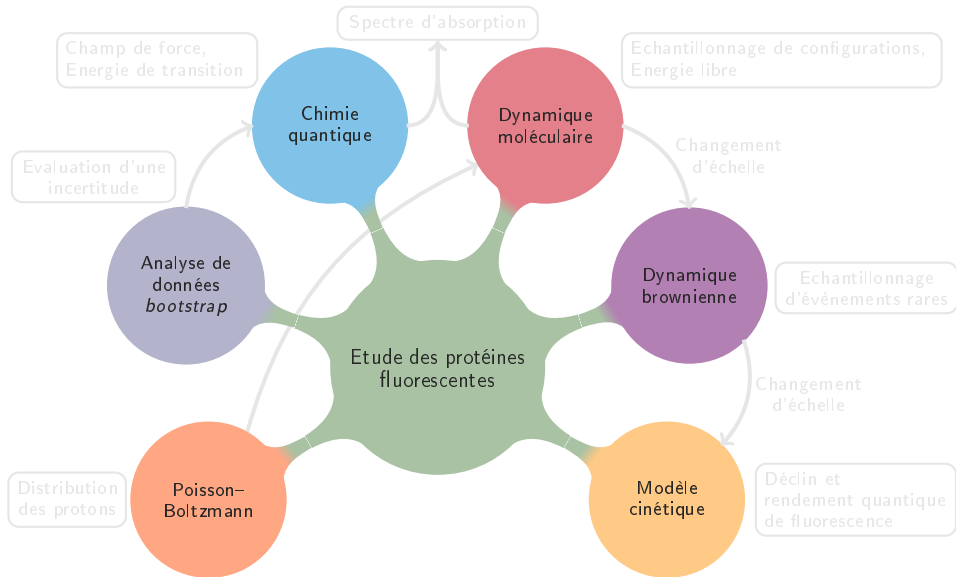


Green Fluorescent Protein

Grandeurs mesurées expérimentalement et calculées par des approches théoriques

- Spectres d'absorption
- Declin temporel de l'intensité de fluorescence
- Rendement quantique de fluorescence ϕ_f

Méthodes utilisées au cours de cette thèse

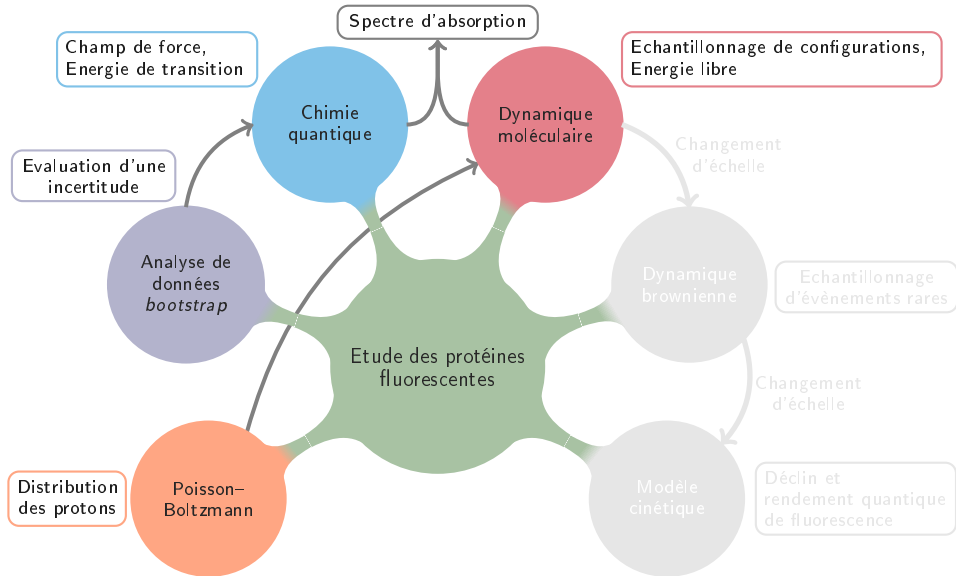


1 Introduction

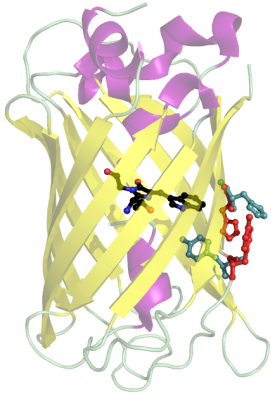
2 Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean

3 Méthode multi-échelle pour le calcul du déclin de la fluorescence dans la *Green Fluorescent Protein*

Première partie : Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean



- La CFP est le donneur le plus utilisé dans les expériences de FRET, mais elle présente une fluorescence complexe.



La CFP

- Rendement quantique de fluorescence faible :
 $\phi_f \simeq 0.4$
- Le déclin de la fluorescence est complexe et sensible à l'environnement
- Variation de la durée de vie en fonction de la longueur d'onde d'émission

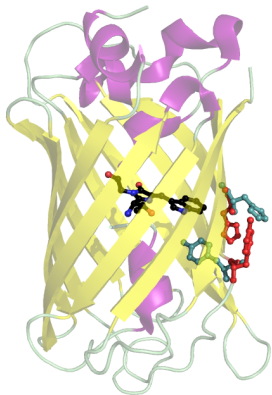
Villoing *et al*, Biochemistry 2008

La Cerulean

- Rendement quantique de fluorescence plus élevé :
 $\phi_f \simeq 0.7$
- Déclin de fluorescence mono-exponentiel

Rizzo *et al*, Nat. Biotechnol. 2004

- La CFP est le donneur le plus utilisé dans les expériences de FRET, mais elle présente une fluorescence complexe.



La CFP

- Rendement quantique de fluorescence faible :
 $\phi_f \simeq 0.4$
- Le déclin de la fluorescence est complexe et sensible à l'environnement
- Variation de la durée de vie en fonction de la longueur d'onde d'émission

Villoing *et al*, Biochemistry 2008

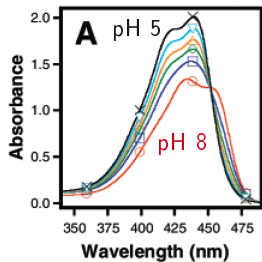
La Cerulean

- Rendement quantique de fluorescence plus élevé :
 $\phi_f \simeq 0.7$
- Déclin de fluorescence mono-exponentiel

Rizzo *et al*, Nat. Biotechnol. 2004

Spectres d'absorption de la Cerulean

Le spectre d'absorption dépend du pH



Malo *et al*, Biochemistry 2007

Origines possibles

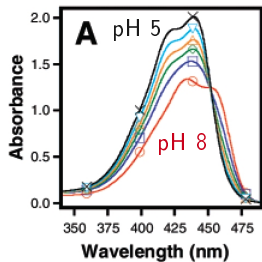
- Un effet électrostatique : changement de la répartition des protons dans la protéine
- Isomérisation du chromophore

Objectif : Evaluer l'effet de ces deux facteurs sur le spectre d'absorption

3 types de simulations : pH 5-cis, pH 8-cis, pH 8-trans

Spectres d'absorption de la Cerulean

Le spectre d'absorption dépend du pH

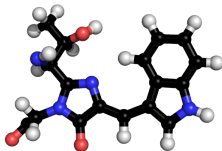


Malo *et al*, Biochemistry 2007

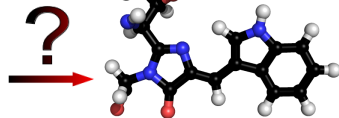
Origines possibles

- Un effet électrostatique : changement de la répartition des protons dans la protéine
- Isomérisation du chromophore

conformation *cis*
pH 5, structure connue



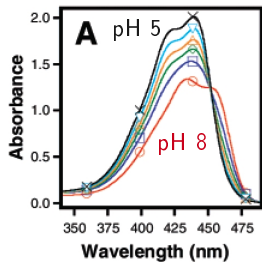
conformation *trans*
pH 8, structure non publiée



Objectif : Evaluer l'effet de ces deux facteurs sur le spectre d'absorption

3 types de simulations : pH 5-*cis* pH 8-*cis* pH 8-*trans*

Le spectre d'absorption dépend du pH

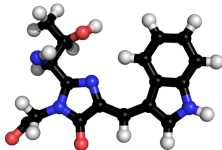


Malo *et al*, Biochemistry 2007

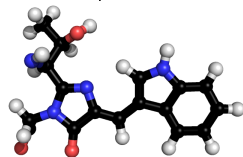
Origines possibles

- Un effet électrostatique : changement de la répartition des protons dans la protéine
- Isomérisation du chromophore

conformation *cis*
pH 5, structure connue



conformation *trans*
pH 8, structure non publiée

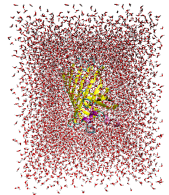


Objectif : Evaluer l'effet de ces deux facteurs sur le spectre d'absorption

3 types de simulations : pH 5-*cis* pH 8-*cis* pH 8-*trans*

Simulation de dynamique moléculaire

- Protéine en solvant explicite avec contre ions ($\sim 30\,000$ atomes)
- Conditions périodiques aux limites et PME pour le calcul des interactions électrostatiques
- 5 ns de simulations (N,P,T)



Champ de force pour le chromophore

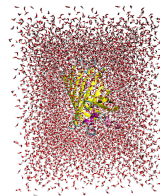
- Charges effectives de type RESP
- Paramétrisation des constantes de forces de torsion entre les deux cycles
- Autres paramètres pris dans le champ de force *ff99*

Distribution des protons et modélisation du pH

- Calcul par la méthode de Poisson-Boltzmann des courbes de titration et des micro-états de protonation
- pH 5 Asp148 protoné / pH 8 Asp148 non protoné

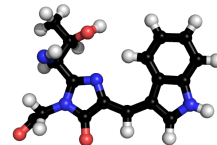
Simulation de dynamique moléculaire

- Protéine en solvant explicite avec contre ions ($\sim 30\,000$ atomes)
- Conditions périodiques aux limites et PME pour le calcul des interactions électrostatiques
- 5 ns de simulations (N,P,T)



Champ de force pour le chromophore

- Charges effectives de type RESP
- Paramétrisation des constantes de forces de torsion entre les deux cycles
- Autres paramètres pris dans le champ de force *ff99*

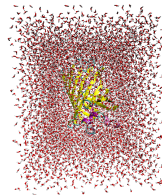


Distribution des protons et modélisation du pH

- Calcul par la méthode de Poisson-Boltzmann des courbes de titration et des micro-états de protonation
- pH 5 Asp148 protoné / pH 8 Asp148 non protoné

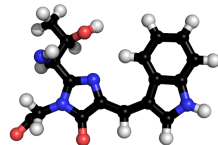
Simulation de dynamique moléculaire

- Protéine en solvant explicite avec contre ions ($\sim 30\,000$ atomes)
- Conditions périodiques aux limites et PME pour le calcul des interactions électrostatiques
- 5 ns de simulations (N,P,T)



Champ de force pour le chromophore

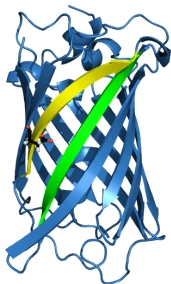
- Charges effectives de type RESP
- Paramétrisation des constantes de forces de torsion entre les deux cycles
- Autres paramètres pris dans le champ de force *ff99*



Distribution des protons et modélisation du pH

- Calcul par la méthode de Poisson-Boltzmann des courbes de titration et des micro-états de protonation
- pH 5 Asp148 protoné / pH 8 Asp148 non protoné

Cleft entre les brins 6 et 7



brin 6

brin 7

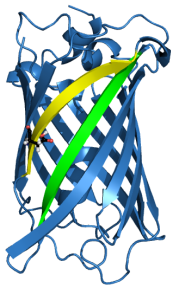
| | | | |
|--------|-----------|--------|---|
| Asp155 | — | Gly160 | |
| Ala154 | — | Ile161 | — |
| Thr153 | — | Lys162 | |
| Ile152 | — | Ala163 | — |
| Tyr151 | - - - - - | Asn164 | |
| Val150 | — | Phe165 | — |
| Asn149 | - - - - - | Lys166 | |
| Asp148 | — | Ile167 | — |
| Ser147 | - - - - - | Arg168 | |

Au départ de la simulation :

- Fermeture partielle du *cleft*
- Formation d'une liaison hydrogène entre Asp148 et Lys166
- Effet d'un empilement cristallin

Dynamique globale de la Cerulean – Fermeture partielle du cleft

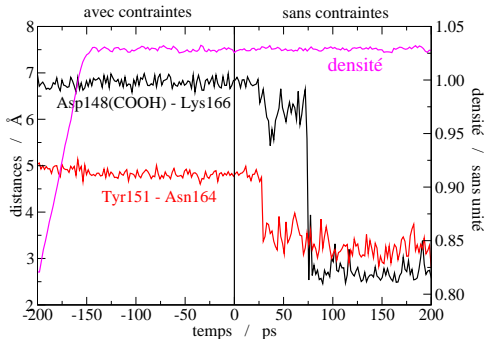
Cleft entre les brins 6 et 7



brin 6

brin 7

| | | | |
|--------|-----------|--------|---|
| Asp155 | — | Gly160 | |
| Ala154 | — | Ile161 | — |
| Thr153 | — | Lys162 | |
| Ile152 | — | Ala163 | — |
| Tyr151 | - - - - - | Asn164 | |
| Val150 | — | Phe165 | — |
| Asn149 | - - - - - | Lys166 | |
| Asp148 | — | Ile167 | — |
| Ser147 | - - - - - | Arg168 | |

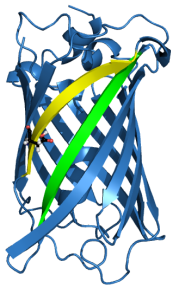


Au départ de la simulation :

- Fermeture partielle du *cleft*
- Formation d'une liaison hydrogène entre Asp148 et Lys166
- Effet d'un empilement cristallin

Dynamique globale de la Cerulean – Fermeture partielle du cleft

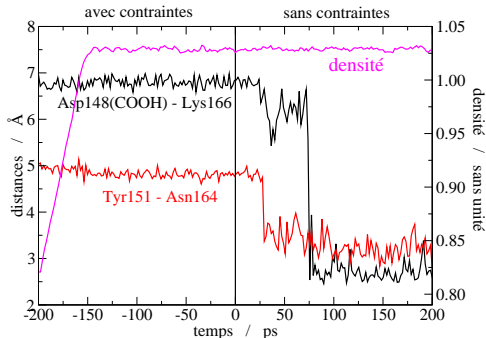
Cleft entre les brins 6 et 7



brin 6

brin 7

| | | | |
|--------|-----------|--------|---|
| Asp155 | — | Gly160 | |
| Ala154 | — | Ile161 | — |
| Thr153 | — | Lys162 | |
| Ile152 | — | Ala163 | — |
| Tyr151 | — | Asn164 | |
| Val150 | — | Phe165 | — |
| Asn149 | - - - - - | Lys166 | |
| Asp148 | - - - - - | Ile167 | — |
| Ser147 | - - - - - | Arg168 | |

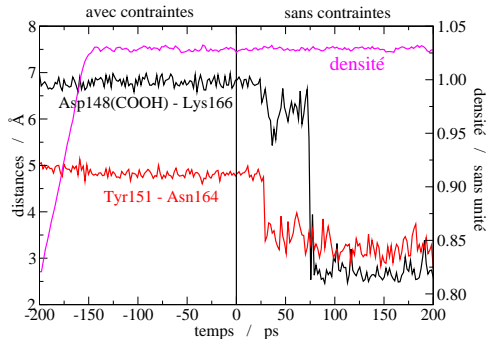
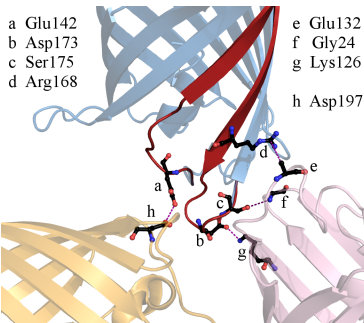


Au départ de la simulation :

- Fermeture partielle du *cleft*
- Formation d'une liaison hydrogène entre Asp148 et Lys166
- Effet d'un empilement cristallin

Dynamique globale de la Cerulean – Fermeture partielle du cleft

Contacts inter-protéiques dans le cristal

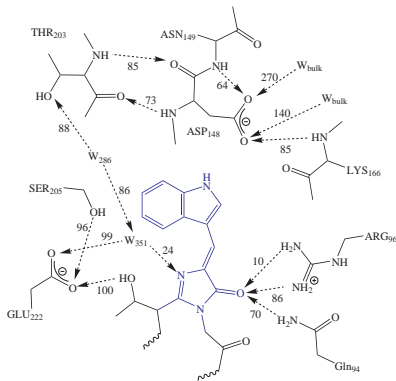


Au départ de la simulation :

- Fermeture partielle du *cleft*
- Formation d'une liaison hydrogène entre Asp148 et Lys166
- Effet d'un empilement cristallin

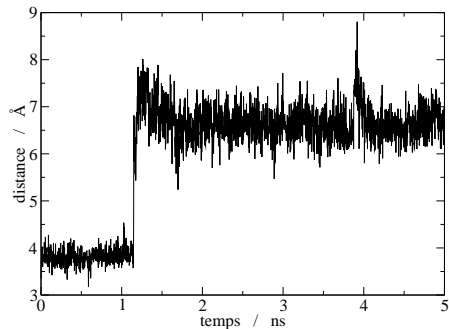
Réseau de liaisons hydrogène à pH 8 et dynamique de la chaîne latérale de Asp148

Conformation *cis*



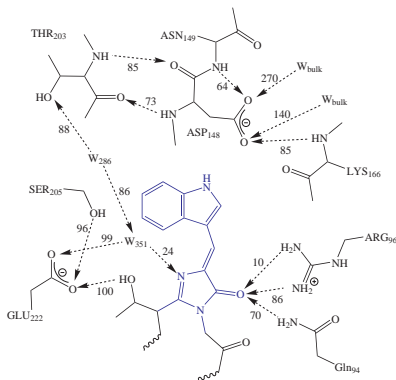
- Le cycle indole ne forme pas de liaison hydrogène
- La chaîne latérale de Asp148 s'expose au solvant

Distance entre le groupe COO⁻ de Asp148 et l'atome d'azote de l'indole du chromophore.



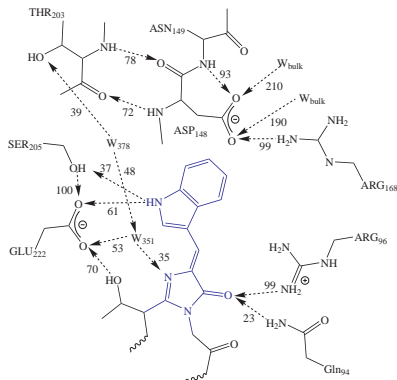
Réseau de liaisons hydrogène à pH 8 et dynamique de la chaîne latérale de Asp148

Conformation *cis*



- Le cycle indole ne forme pas de liaison hydrogène
- La chaîne latérale de Asp148 s'expose au solvant

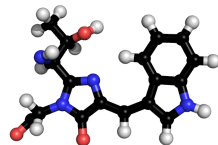
Conformation *trans*



- Le réseau de liaisons hydrogène est proche de celui de la CFP
- A pH 8 la conformation *trans* du chromophore est la plus stable

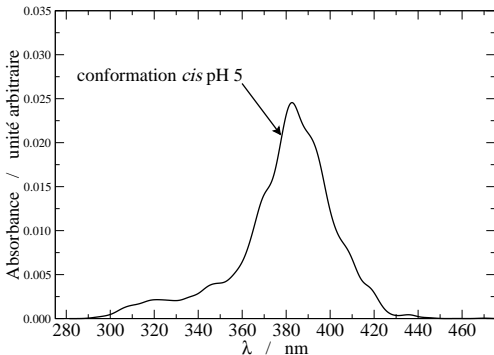
Calculs de chimie quantique et construction du spectre

- Choix d'un système quantique
- Extraction d'un échantillon de $N \simeq 900$ configurations de la simulation de dynamique moléculaire
- Prise en compte du champ électrostatique créé par l'ensemble de la protéine et des molécules d'eau
- Calcul TDDFT des longueurs d'onde d'absorption, λ et des forces d'oscillateur

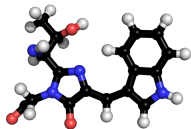


On obtient un échantillon de N couples (λ, f)

- Le spectre d'absorption est obtenu en construisant la densité de probabilité des longueurs d'onde λ pondérée par les forces d'oscillateur f .



conformation *cis*



- Calcul des transitions électroniques au niveau TDDFT/B3LYP/6-31G*

- Observation expérimentale

$$\Delta\lambda_{exp} \simeq +11 \text{ à } 15 \text{ nm}$$

- Effet électrostatique dû au changement de micro-état

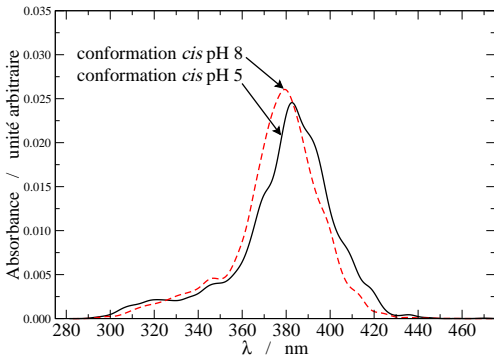
$$\Delta\lambda_{calc} \simeq -4 \text{ nm}$$

- Effet de l'isomérisation du chromophore

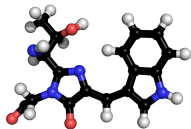
$$\Delta\lambda_{calc} \simeq +16 \text{ nm}$$

L'effet majoritaire est une isomérisation du chromophore

Spectres d'absorption calculés



conformation *cis*



- Calcul des transitions électroniques au niveau TDDFT/B3LYP/6-31G*

- Observation expérimentale

$$\Delta\lambda_{exp} \simeq +11 \text{ à } 15 \text{ nm}$$

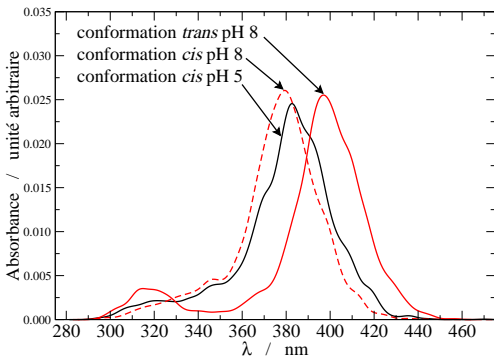
- Effet électrostatique dû au changement de micro-état

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq -4 \text{ nm}$$

- Effet de l'isomérisation du chromophore

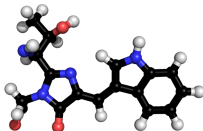
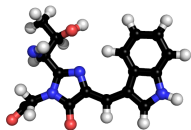
$$\Delta\lambda_{calc} \simeq +16 \text{ nm}$$

L'effet majoritaire est une isomérisation du chromophore



conformation *cis*

conformation *trans*



- Calcul des transitions électroniques au niveau TDDFT/B3LYP/6-31G*

- Observation expérimentale

$$\Delta\lambda_{exp} \simeq +11 \text{ à } 15 \text{ nm}$$

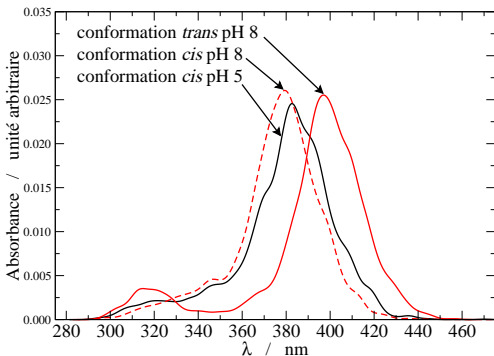
- Effet électrostatique dû au changement de micro-état

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq -4 \text{ nm}$$

- Effet de l'isomérisation du chromophore

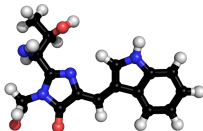
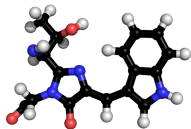
$$\Delta\lambda_{calc} \simeq +16 \text{ nm}$$

L'effet majoritaire est une isomérisation du chromophore



conformation *cis*

conformation *trans*



- Calcul des transitions électroniques au niveau TDDFT/B3LYP/6-31G*

- Observation expérimentale

$$\Delta\lambda_{exp} \simeq +11 \text{ à } 15 \text{ nm}$$

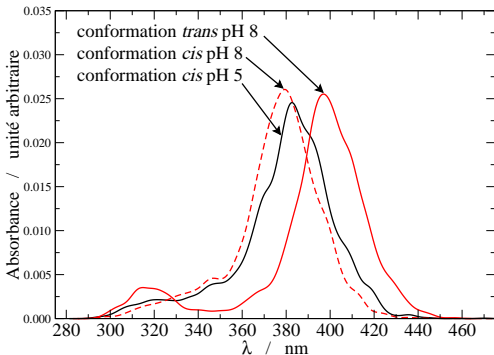
- Effet électrostatique dû au changement de micro-état

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq -4 \text{ nm}$$

- Effet de l'isomérisation du chromophore

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq +16 \text{ nm}$$

L'effet majoritaire est une isomérisation du chromophore



- Calcul des transitions électroniques au niveau TDDFT/B3LYP/6-31G*

- Observation expérimentale

$$\Delta\lambda_{exp} \simeq +11 \text{ à } 15 \text{ nm}$$

- Effet électrostatique dû au changement de micro-état

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq -4 \text{ nm}$$

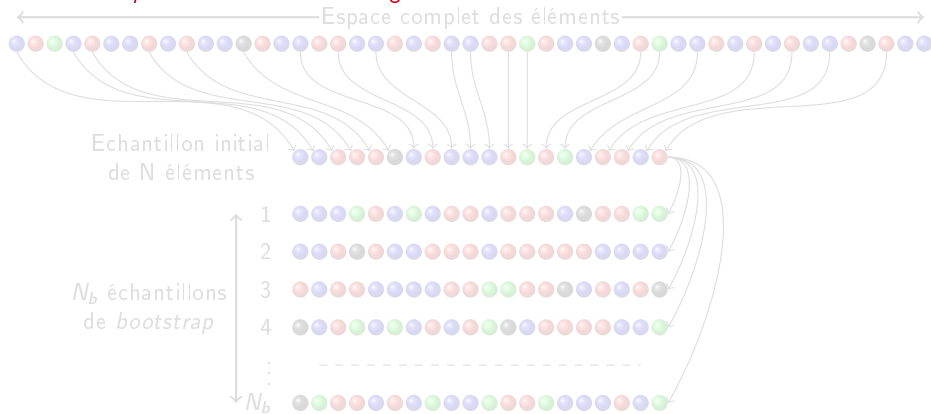
- Effet de l'isomérisation du chromophore

$$\Delta\lambda_{calc} \simeq +16 \text{ nm}$$

La précision des calculs est-elle suffisante pour que le décalage des spectres soit significatif ?

Incertitude statistique – La méthode du bootstrap

Le *bootstrap* est un re-échantillonnage d'un échantillon initial

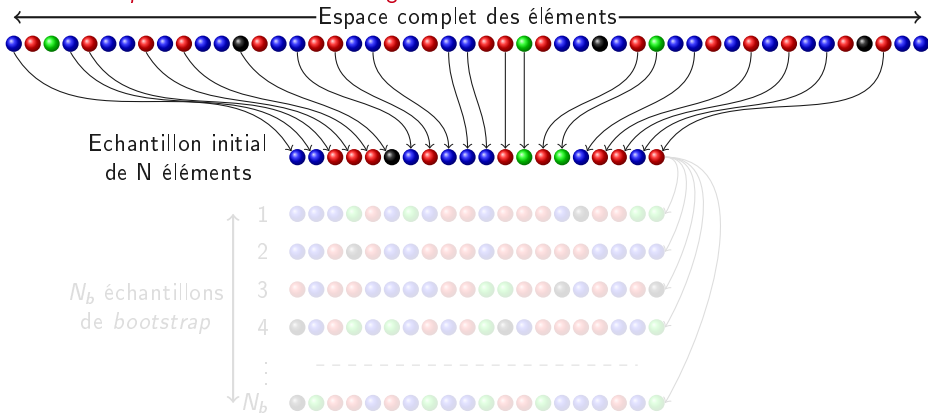


Théorème (B. Efron, Ann. Statist. 1979)

À la limite où N tend vers l'infini, la distribution des valeurs moyennes calculée à partir des échantillons de *bootstrap* est égale à la distribution des valeurs moyennes obtenue à partir de TOUS les échantillons de N éléments que l'on peut construire à partir de l'espace complet.

Incertitude statistique – La méthode du bootstrap

Le *bootstrap* est un re-échantillonnage d'un échantillon initial

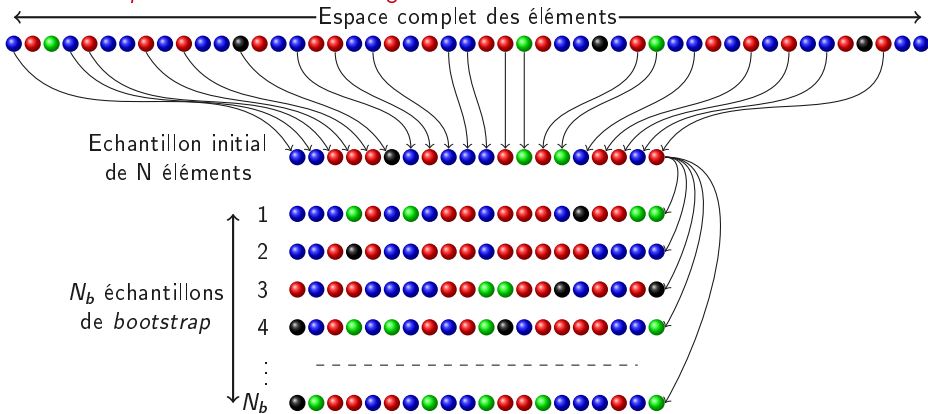


Théorème (B. Efron, Ann. Statist. 1979)

A la limite où N tend vers l'infini, la distribution des valeurs moyennes calculée à partir des échantillons de *bootstrap* est égale à la distribution des valeurs moyennes obtenue à partir de TOUS les échantillons de N éléments que l'on peut construire à partir de l'espace complet.

Incertitude statistique – La méthode du bootstrap

Le *bootstrap* est un re-échantillonnage d'un échantillon initial

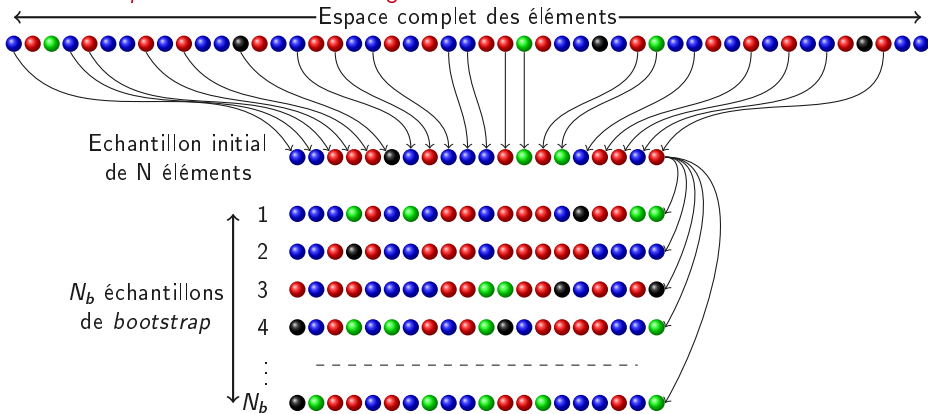


Théorème (B. Efron, Ann. Statist. 1979)

A la limite où N tend vers l'infini, la distribution des valeurs moyennes calculée à partir des échantillons de *bootstrap* est égale à la distribution des valeurs moyennes obtenue à partir de TOUS les échantillons de N éléments que l'on peut construire à partir de l'espace complet.

Incertitude statistique – La méthode du bootstrap

Le *bootstrap* est un re-échantillonnage d'un échantillon initial

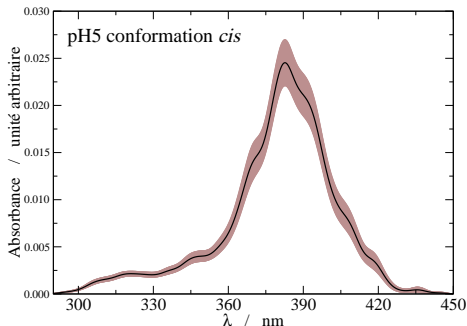


Théorème (B. Efron, Ann. Statist. 1979)

A la limite où N tend vers l'infini, la distribution des valeurs moyennes calculée à partir des échantillons de *bootstrap* est égale à la distribution des valeurs moyennes obtenue à partir de TOUS les échantillons de N éléments que l'on peut construire à partir de l'espace complet.

Calcul de l'incertitude sur le spectre d'absorption

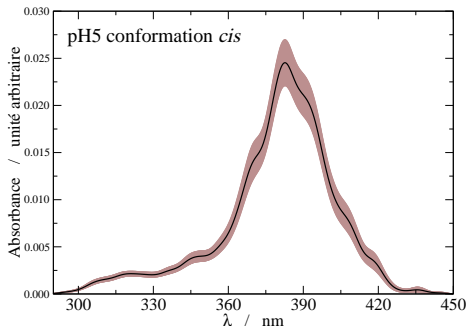
- Echantillon initial : les résultats TDDFT/B3LYP sur 900 configurations à pH 5 en conformation *cis*
- Re-échantillonnage parmi les 900 configurations : calcul de 2000 spectres



Pour $N > 200$ configurations $\Rightarrow u(\lambda_{moy}, N) < 1 \text{ nm} \simeq u_{exp}$

Calcul de l'incertitude sur le spectre d'absorption

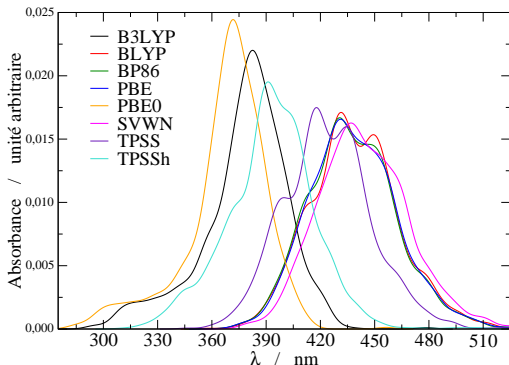
- Echantillon initial : les résultats TDDFT/B3LYP sur 900 configurations à pH 5 en conformation *cis*
- Re-échantillonnage parmi les 900 configurations : calcul de 2000 spectres



Pour $N > 200$ configurations $\Rightarrow u(\lambda_{moy}, N) < 1 \text{ nm} \simeq u_{exp}$

Effet de la fonctionnelle de la densité sur le spectre d'absorption

- Calcul du spectre d'absorption à pH 5 en conformation *cis* à partir de 200 configurations et avec 8 fonctionnelles différentes



Fonctionnelles pures :

LDA : SVWN

GGA : BLYP, BP86, PBE

meta-GGA : TPSS

Fonctionnelles hybrides

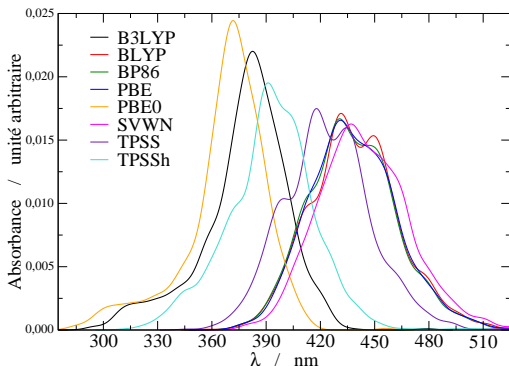
GGA : B3LYP, PBE0

meta-GGA : TPSSh

Grande dispersion des longueurs d'onde

Effet de la fonctionnelle de la densité sur le spectre d'absorption

- Calcul du spectre d'absorption à pH 5 en conformation *cis* à partir de 200 configurations et avec 8 fonctionnelles différentes



Fonctionnelles pures :

LDA : SVWN

GGA : BLYP, BP86, PBE

meta-GGA : TPSS

Fonctionnelles hybrides

GGA : B3LYP, PBE0

meta-GGA : TPSSh

Grande dispersion des longueurs d'onde

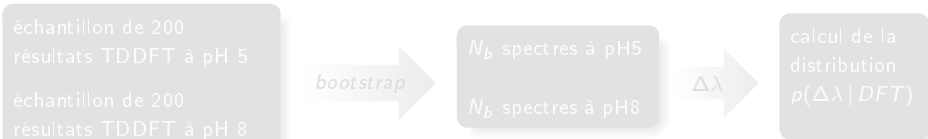
Décalage du spectre d'absorption sous l'effet du changement de pH

$$\Delta\lambda = \lambda^{pH8} - \lambda^{pH5}$$

- Effet électrostatique : changement de la distribution des protons dans la protéine
- Effet de l'isomérisation du chromophore

Pour chaque fonctionnelle de la densité on calcule la distribution des valeurs de $\Delta\lambda$ par la méthode du *bootstrap*.
 $p(\Delta\lambda | DFT)$

principe :



Décalage du spectre d'absorption sous l'effet du changement de pH

$$\Delta\lambda = \lambda^{pH8} - \lambda^{pH5}$$

- Effet électrostatique : changement de la distribution des protons dans la protéine
- Effet de l'isomérisation du chromophore

Pour chaque fonctionnelle de la densité on calcule la distribution des valeurs de $\Delta\lambda$ par la méthode du *bootstrap*.

$$p(\Delta\lambda | DFT)$$

principe :

échantillon de 200
résultats TDDFT à pH 5

échantillon de 200
résultats TDDFT à pH 8

bootstrap

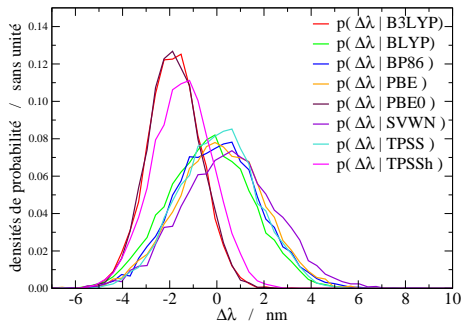
N_b spectres à pH5

N_b spectres à pH8

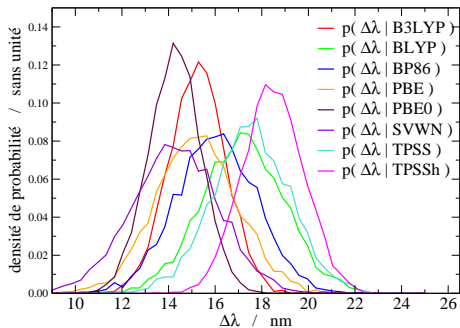
$\Delta\lambda$

calcul de la
distribution
 $p(\Delta\lambda | DFT)$

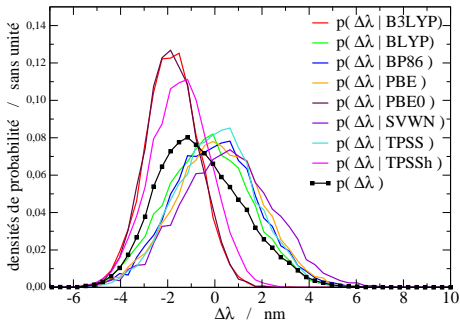
Effet électrostatique



Effet de l'isomérisation

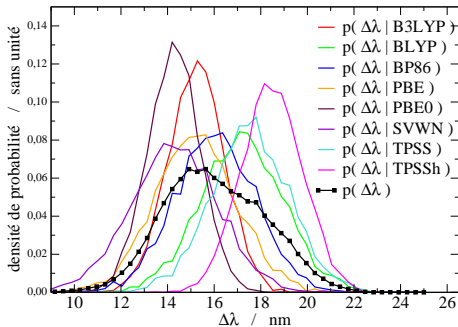


Effet électrostatique



$$p(\Delta\lambda) = \frac{\sum_{i=1}^8 p(\Delta\lambda | DFT_i) p(DFT_i)}{\sum_{i=1}^8 p(DFT_i)}$$

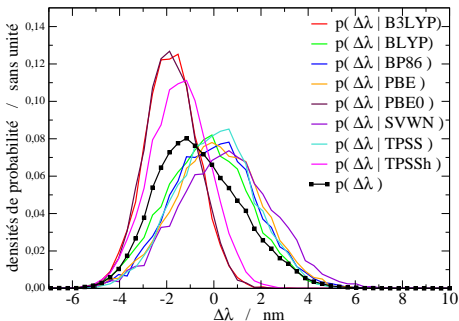
Effet de l'isomérisation



$$p(\Delta\lambda) = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^8 p(\Delta\lambda | DFT_i)$$

On suppose que les fonctionnelles sont également pertinentes

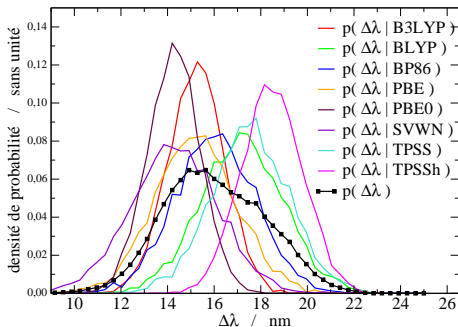
Effet électrostatique



L'effet électrostatique est faible et on ne peut pas prédire le sens du décalage du spectre d'absorption

$$\Delta\lambda = -1 \pm 4 \text{ nm}$$

Effet de l'isomérisation



Les calculs TDDFT sont suffisamment précis pour rendre compte du décalage du spectre d'absorption dû à une isomérisation du chromophore

$$\Delta\lambda = 16 \pm 4 \text{ nm}$$

Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean.

- Evaluation de l'incertitude sur le décalage du spectre d'absorption
- Le décalage du spectre d'absorption de la Cerulean sous l'effet du pH est la signature d'une isomérisation du chromophore.

Nos simulations nous permettent de proposer une structure de la Cerulean à pH 8

- A pH 8 la conformation *trans* est plus favorable pour le chromophore.

Nous avons précisé le rôle crucial de Asp148 dans l'effet du pH sur la structure de la Cerulean

- Asp148 est protoné à pH 5 et non protoné à pH 8.
- Les conformations de Asp148 et du chromophore sont corrélées et contrôlées par l'état de protonation de Asp148.

Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean.

- Evaluation de l'incertitude sur le décalage du spectre d'absorption
- Le décalage du spectre d'absorption de la Cerulean sous l'effet du pH est la signature d'une isomérisation du chromophore.

Nos simulations nous permettent de proposer une structure de la Cerulean à pH 8

- A pH 8 la conformation *trans* est plus favorable pour le chromophore.

Nous avons précisé le rôle crucial de Asp148 dans l'effet du pH sur la structure de la Cerulean

- Asp148 est protoné à pH 5 et non protoné à pH 8.
- Les conformations de Asp148 et du chromophore sont corrélées et contrôlées par l'état de protonation de Asp148.

Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean.

- Evaluation de l'incertitude sur le décalage du spectre d'absorption
- Le décalage du spectre d'absorption de la Cerulean sous l'effet du pH est la signature d'une isomérisation du chromophore.

Nos simulations nous permettent de proposer une structure de la Cerulean à pH 8

- A pH 8 la conformation *trans* est plus favorable pour le chromophore.

Nous avons précisé le rôle crucial de Asp148 dans l'effet du pH sur la structure de la Cerulean

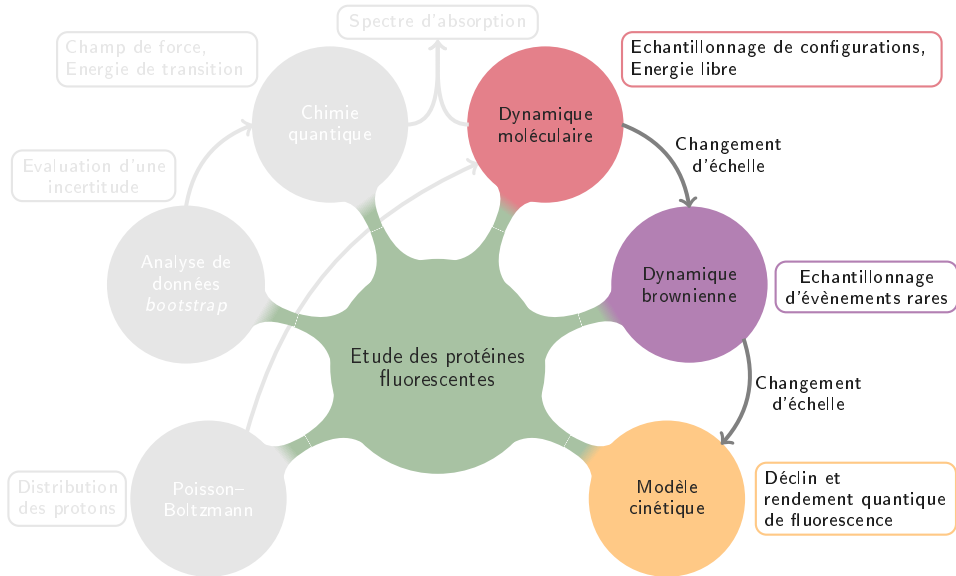
- Asp148 est protoné à pH 5 et non protoné à pH 8.
- Les conformations de Asp148 et du chromophore sont corrélées et contrôlées par l'état de protonation de Asp148.

1 Introduction

2 Effet du pH sur le spectre d'absorption de la Cerulean

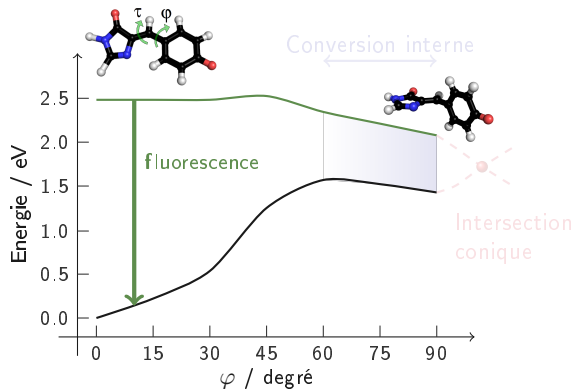
3 Méthode multi-échelle pour le calcul du déclin de la fluorescence dans la *Green Fluorescent Protein*

Deuxième partie : calcul du déclin de la fluorescence dans la GFP



Surface d'énergie potentielle et mécanismes de désactivation de la fluorescence

Courbes d'énergie potentielle dans le vide



Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004

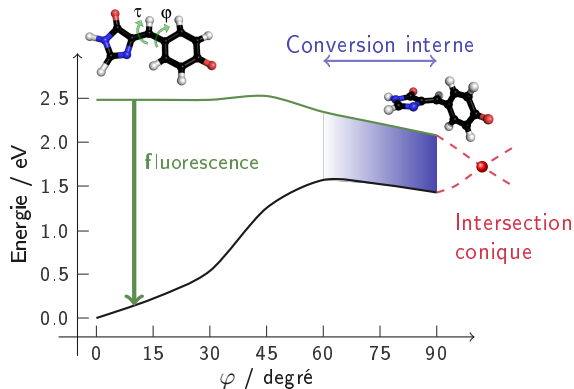
Deux mécanismes de désactivations

- Conversion interne dans l'intervalle où $|\varphi| \in [60^\circ, 90^\circ]$
- Passage par une intersection conique à partir de la géométrie critique où $|\varphi| = 90^\circ$
- Mêmes observations dans le cas de la torsion τ

Martin *et al*, JACS 2004

Surface d'énergie potentielle et mécanismes de désactivation de la fluorescence

Courbes d'énergie potentielle dans le vide



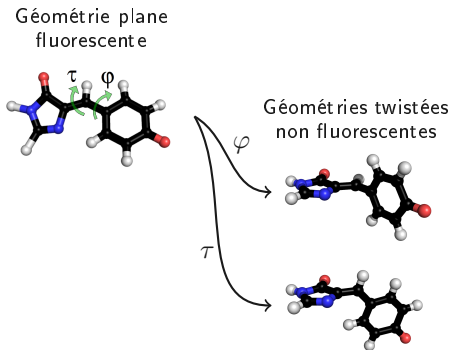
Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004

Deux mécanismes de désactivations

- Conversion interne dans l'intervalle où $|\varphi| \in [60^\circ, 90^\circ]$
- Passage par une intersection conique à partir de la géométrie critique où $|\varphi| = 90^\circ$
- Mêmes observations dans le cas de la torsion τ

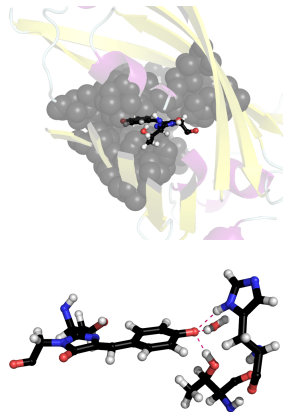
Martin *et al*, JACS 2004

Torsion du chromophore à l'état excité dans le vide



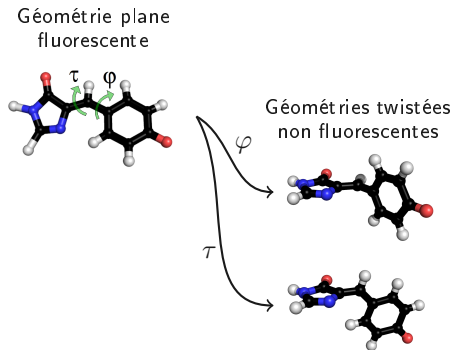
Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004

Dans la protéine, la torsion φ est plus probable



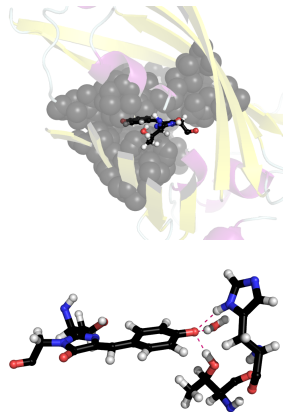
Ce mécanisme permet-il de décrire le déclin de la fluorescence de la GFP ?

Torsion du chromophore à l'état excité dans le vide



Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004

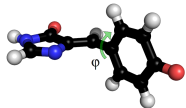
Dans la protéine, la torsion φ est plus probable



Ce mécanisme permet-il de décrire le déclin de la fluorescence de la GFP ?

Objectif général de l'étude

- Obtenir des résultats quantitatifs sur l'effet de la dynamique de la torsion φ sur le rendement quantique de fluorescence et le déclin de fluorescence.



Mécanisme de désactivation non radiatif :

- Transition non adiabatique entre S_1 et S_0 par une intersection conique accessible à partir de $|\varphi|=90^\circ$

Enjeux théoriques

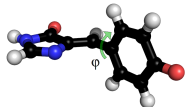
- Description de la dynamique de l'état excité du chromophore dans la protéine.
- Echantillonnage efficace des mécanismes de désactivation non radiatifs, échantillonnage d'évènement rare.

Méthodologie proposée

- Calcul du profil d'énergie libre partielle en fonction de la coordonnée φ : dynamique moléculaire biaisée, *Umbrella Sampling*
- Changement d'échelle de temps de simulation : simulation de dynamique brownienne 1D
- Modèle cinétique de l'état excité : calcul du rendement quantique de fluorescence et du déclin de la fluorescence

Objectif général de l'étude

- Obtenir des résultats quantitatifs sur l'effet de la dynamique de la torsion φ sur le rendement quantique de fluorescence et le déclin de fluorescence.



Mécanisme de désactivation non radiatif :

- Transition non adiabatique entre S_1 et S_0 par une intersection conique accessible à partir de $|\varphi|=90^\circ$

Enjeux théoriques

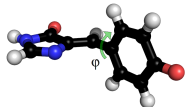
- Description de la dynamique de l'état excité du chromophore dans la protéine.
- Echantillonnage efficace des mécanismes de désactivation non radiatifs, échantillonnage d'évènement rare.

Méthodologie proposée

- Calcul du profil d'énergie libre partielle en fonction de la coordonnée φ : dynamique moléculaire biaisée, *Umbrella Sampling*
- Changement d'échelle de temps de simulation : simulation de dynamique brownienne 1D
- Modèle cinétique de l'état excité : calcul du rendement quantique de fluorescence et du déclin de la fluorescence

Objectif général de l'étude

- Obtenir des résultats quantitatifs sur l'effet de la dynamique de la torsion φ sur le rendement quantique de fluorescence et le déclin de fluorescence.



Mécanisme de désactivation non radiatif :

- Transition non adiabatique entre S_1 et S_0 par une intersection conique accessible à partir de $|\varphi|=90^\circ$

Enjeux théoriques

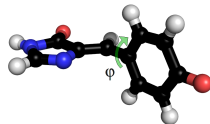
- Description de la dynamique de l'état excité du chromophore dans la protéine.
- Echantillonnage efficace des mécanismes de désactivation non radiatifs, échantillonnage d'évènement rare.

Méthodologie proposée

- Calcul du profil d'énergie libre partielle en fonction de la coordonnée φ : dynamique moléculaire biaisée, *Umbrella Sampling*
- Changement d'échelle de temps de simulation : simulation de dynamique brownienne 1D
- Modèle cinétique de l'état excité : calcul du rendement quantique de fluorescence et du déclin de la fluorescence

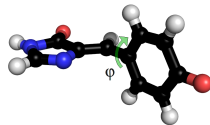
Champ de force pour l'état excité du chromophore de la GFP

- Charges effectives de type RESP, ajustées sur le potentiel électrostatique calculé au niveau CIS
- Constante de force de torsion ajustée sur des calculs CASSCF//CASPT2 (Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004)

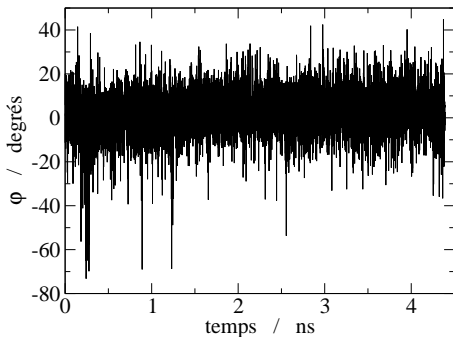


Champ de force pour l'état excité du chromophore de la GFP

- Charges effectives de type RESP, ajustées sur le potentiel électrostatique calculé au niveau CIS
- Constante de force de torsion ajustée sur des calculs CASSCF//CASPT2 (Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004)

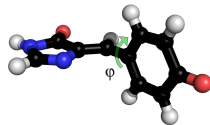


Résultats de la dynamique libre

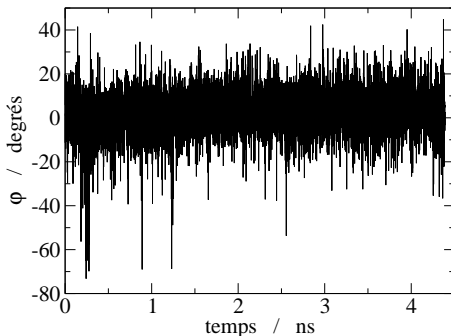


Champ de force pour l'état excité du chromophore de la GFP

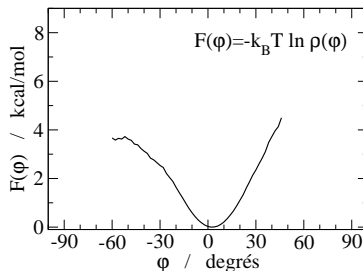
- Charges effectives de type RESP, ajustées sur le potentiel électrostatique calculé au niveau CIS
- Constante de force de torsion ajustée sur des calculs CASSCF//CASPT2 (Toniolo *et al*, Faraday discuss. 2004)



Résultats de la dynamique libre

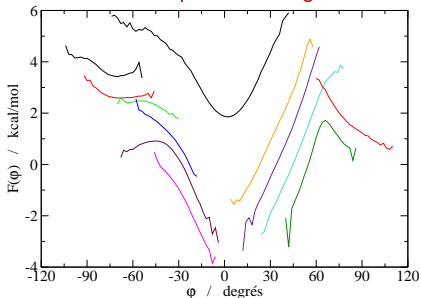


Profil d'énergie libre partielle



Nécessité d'un biais

Construction du profil d'énergie libre



- Contrairement à la phase gaz la torsion φ est inhibée par la protéine.
- Le profil d'énergie libre est fortement asymétrique dans la protéine.

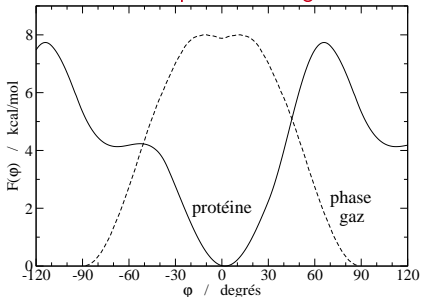
- Potentiel de biais

$$V_i^b(\varphi) = k_i (\varphi - \varphi_{i,0})^2$$

- Plusieurs simulations biaisées (fenêtre) pour différentes valeurs cibles $\varphi_{i,0}$
- Calcul du profil d'énergie libre pour chaque fenêtre par la relation

$$\mathcal{F}_i = \mathcal{F}_i^b - V_i^b(\varphi) + C_i^{ste}$$

Construction du profil d'énergie libre



- Contrairement à la phase gaz la torsion φ est inhibée par la protéine.
- Le profil d'énergie libre est fortement asymétrique dans la protéine.

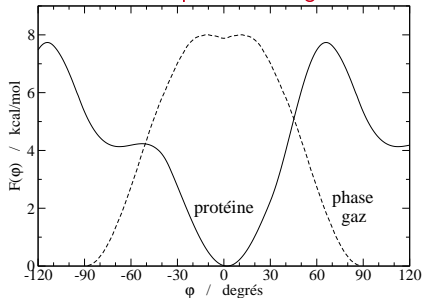
- Potentiel de biais

$$V_i^b(\varphi) = k_i (\varphi - \varphi_{i,0})^2$$

- Plusieurs simulations biaisées (fenêtre) pour différentes valeurs cibles $\varphi_{i,0}$
- Calcul du profil d'énergie libre pour chaque fenêtre par la relation

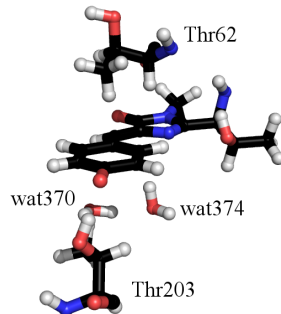
$$\mathcal{F}_i = \mathcal{F}_i^b - V_i^b(\varphi) + C_i^{ste}$$

Construction du profil d'énergie libre



- Contrairement à la phase gaz la torsion φ est inhibée par la protéine.
- Le profil d'énergie libre est fortement asymétrique dans la protéine.

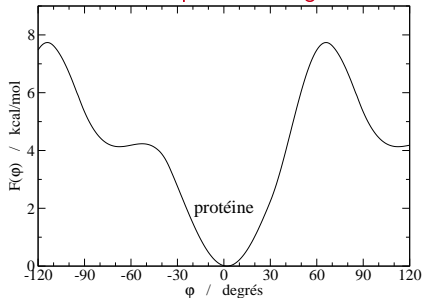
Effet stérique des acides aminés proches



- Présence d'obstacles

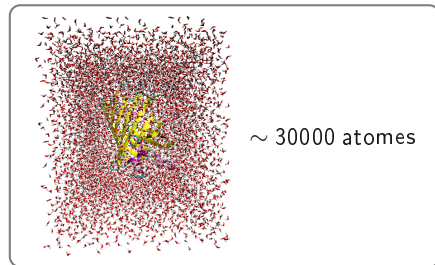
Profil d'énergie libre partielle $\mathcal{F}(\varphi)$

Construction du profil d'énergie libre



- Contrairement à la phase gaz la torsion φ est inhibée par la protéine.
- Le profil d'énergie libre est fortement asymétrique dans la protéine.

Changement d'échelle



Dynamique brownienne 1D dans le potentiel calculé par *Umbrella Sampling*.

Dynamique Brownienne 1D pour une coordonnée de torsion

$$I\ddot{\varphi} = \Gamma(\varphi) - \xi\dot{\varphi} + \tilde{f}$$

Couple de force

Terme de Friction

Terme aléatoire

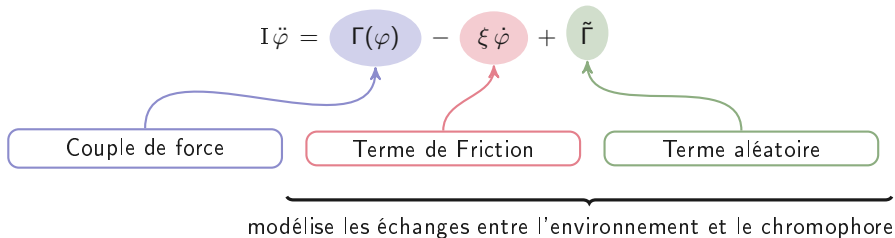
modélise les échanges entre l'environnement et le chromophore

- Le couple de force est calculé à partir du profil d'énergie libre

$$\Gamma(\varphi) = -dF(\varphi)/d\varphi$$

- Le coefficient de friction est calculé à partir de résultats de dynamique moléculaire

Dynamique Brownienne 1D pour une coordonnée de torsion

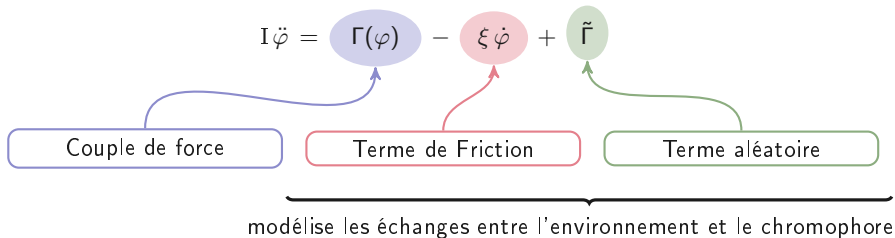


- Le couple de force est calculé à partir du profil d'énergie libre

$$\Gamma(\varphi) = -dF(\varphi)/d\varphi$$

- Le coefficient de friction est calculé à partir de résultats de dynamique moléculaire

Dynamique Brownienne 1D pour une coordonnée de torsion



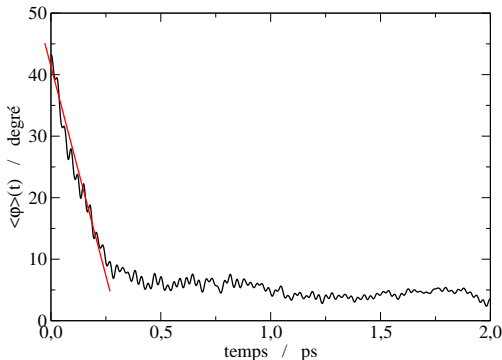
- Le couple de force est calculé à partir du profil d'énergie libre

$$\Gamma(\varphi) = -dF(\varphi)/d\varphi$$

- Le coefficient de friction est calculé à partir de résultats de dynamique moléculaire

Utilisation de la vitesse de retour à l'équilibre

- Configurations initiale du chromophore avec $\varphi \simeq 40^\circ$
- Calcul de la trajectoire moyenne sur un ensemble de conditions initiales



Hypothèse :

- ξ est indépendant de φ

Observations :

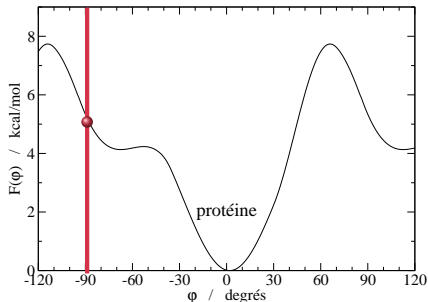
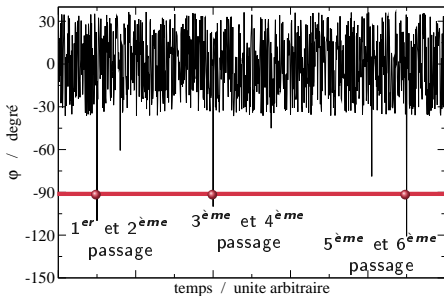
- $d\langle\varphi\rangle/dt$ est constant entre $t=0$ et $t=0.25$ ps
- $\Gamma(\varphi) = \Gamma_0$ est constant sur cet intervalle de φ

$$\frac{d}{dt}\langle\varphi\rangle \simeq -\frac{1}{\xi}\Gamma_0$$

Echantillonnage de l'isomérisation du chromophore

- 10^6 trajectoires de dynamique brownienne de 50 ns \rightarrow simulation d'environ 50 ms

Schéma



- Calcul des distribution des temps de n^{eme} passage à la géométrie critique $|\varphi| = 90^\circ$.

Equation cinétique de la population, $N(t)$, de l'état excité.

$$\frac{dN(t)}{dt} = -k_r N(t) + \sum_n \lambda^n N_0 p_n(t) \exp(-k_r t)$$

Désactivation radiative

Désactivation non radiative

- $p_n(t)$ est la distribution du temps de $n^{\text{ème}}$ passage.
- λ est la probabilité, à partir de la géométrie critique, de retourner dans l'état fondamental en passant par l'intersection conique (inconnue actuellement).

Calcul du rendement quantique et du déclin de la fluorescence

- On utilise une expression analytique lissant les distributions $p_n(t)$
- Intégration analytique de l'équation cinétique

Modèle cinétique - Cas d'une désactivation par une intersection conique

Equation cinétique de la population, $N(t)$, de l'état excité.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \underbrace{-k_r N(t)}_{\text{Désactivation radiative}} + \underbrace{\sum_n \lambda^n N_0 p_n(t) \exp(-k_r t)}_{\text{Désactivation non radiative}}$$

- $p_n(t)$ est la distribution du temps de $n^{\text{ème}}$ passage.
- λ est la probabilité, à partir de la géométrie critique, de retourner dans l'état fondamental en passant par l'intersection conique (inconnue actuellement).

Calcul du rendement quantique et du déclin de la fluorescence

- On utilise une expression analytique lissant les distributions $p_n(t)$
- Intégration analytique de l'équation cinétique

Equation cinétique de la population, $N(t)$, de l'état excité.

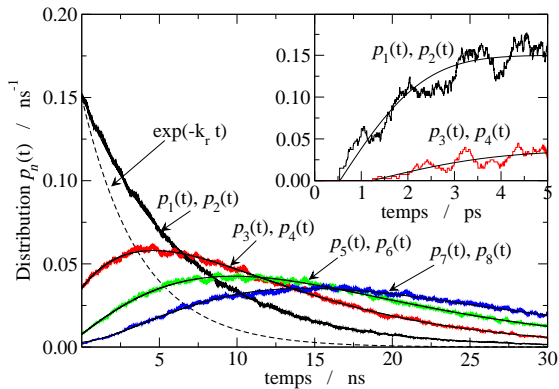
$$\frac{dN(t)}{dt} = \underbrace{-k_r N(t)}_{\text{Désactivation radiative}} + \underbrace{\sum_n \lambda^n N_0 p_n(t) \exp(-k_r t)}_{\text{Désactivation non radiative}}$$

- $p_n(t)$ est la distribution du temps de $n^{\text{ème}}$ passage.
- λ est la probabilité, à partir de la géométrie critique, de retourner dans l'état fondamental en passant par l'intersection conique (inconnue actuellement).

Calcul du rendement quantique et du déclin de la fluorescence

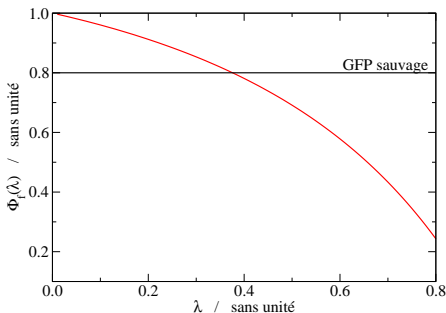
- On utilise une expression analytique lissant les distributions $p_n(t)$
- Intégration analytique de l'équation cinétique

Distribution des temps de $n^{\text{ème}}$ passage, $p_n(t)$ obtenue à partir des 10^6 trajectoires



Résultats sur le rendement quantique de fluorescence ϕ_f et le déclin de fluorescence

Rendement quantique de fluorescence, ϕ_f ,
en fonction de la probabilité λ

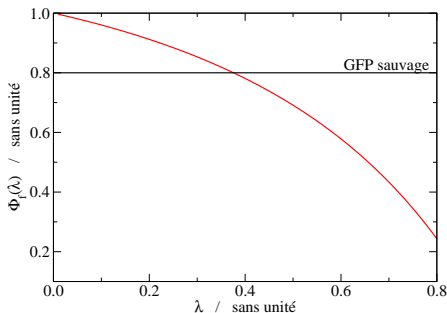


Déclin de la fluorescence pour plusieurs
valeurs de la probabilité λ

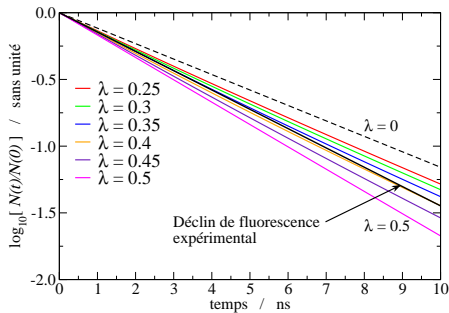
Les résultats obtenus sont cohérents avec les résultats expérimentaux
Ce processus pourrait contribuer au déclin de la fluorescence

Résultats sur le rendement quantique de fluorescence ϕ_f et le déclin de fluorescence

Rendement quantique de fluorescence, ϕ_f ,
en fonction de la probabilité λ



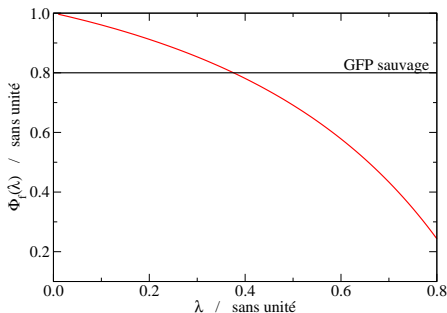
Déclin de la fluorescence pour plusieurs
valeurs de la probabilité λ



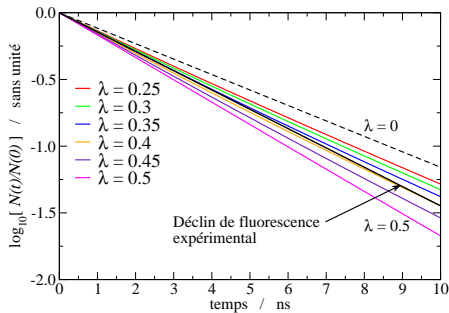
Les résultats obtenus sont cohérents avec les résultats expérimentaux
Ce processus pourrait contribuer au déclin de la fluorescence

Résultats sur le rendement quantique de fluorescence ϕ_f et le déclin de fluorescence

Rendement quantique de fluorescence, ϕ_f ,
en fonction de la probabilité λ



Déclin de la fluorescence pour plusieurs
valeurs de la probabilité λ



Les résultats obtenus sont cohérents avec les résultats expérimentaux
Ce processus pourrait contribuer au déclin de la fluorescence

Nous avons développé une méthode multi-échelle permettant un échantillonnage efficace d'évènements rares à l'échelle d'une simulation tout atome

La méthode permet d'obtenir des grandeurs macroscopiques, mesurées expérimentalement.

- Calcul du déclin et du rendement quantique de fluorescence

Identification des acides aminés qui bloquent la torsion φ .

- Un petit nombre d'acides aminés font obstacle, c'est un effet local
- Induit une forte asymétrie sur la dynamique de la torsion φ

Nous avons développé une méthode multi-échelle permettant un échantillonnage efficace d'évènements rares à l'échelle d'une simulation tout atome

La méthode permet d'obtenir des grandeurs macroscopiques, mesurées expérimentalement.

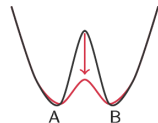
- Calcul du déclin et du rendement quantique de fluorescence

Identification des acides aminés qui bloquent la torsion φ .

- Un petit nombre d'acides aminés font obstacle, c'est un effet local
- Induit une forte asymétrie sur la dynamique de la torsion φ

Description de la dynamique de torsion

- Dynamique des portes indépendantes de la torsion
- Effet de l'environnement au travers de portes



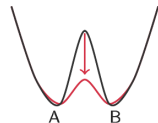
Utilisation de charges variables

- Description des mélanges entre états électroniques
- Champ de force matriciel

$$\mathcal{H}^{\text{eff}} = \begin{pmatrix} E_1 & C \\ C & E_2 \end{pmatrix}$$

Description de la dynamique de torsion

- Dynamique des portes indépendantes de la torsion
- Effet de l'environnement au travers de portes

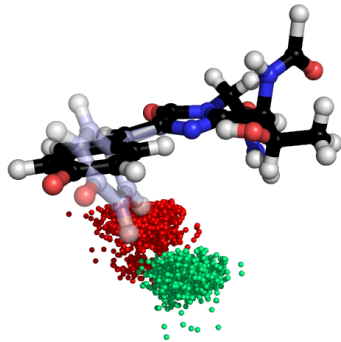
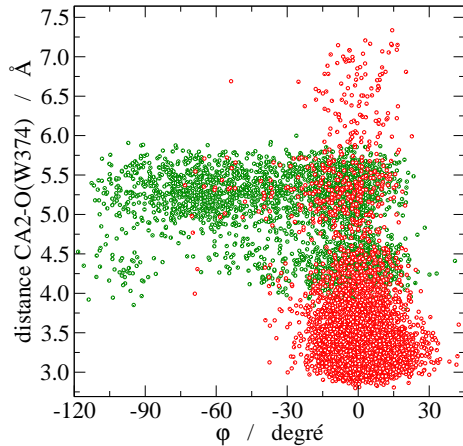


Utilisation de charges variables

- Description des mélanges entre états électroniques
- Champ de force matriciel

$$\mathcal{H}^{\text{eff}} = \begin{pmatrix} E_1 & C \\ C & E_2 \end{pmatrix}$$

Biais sur une molécule d'eau

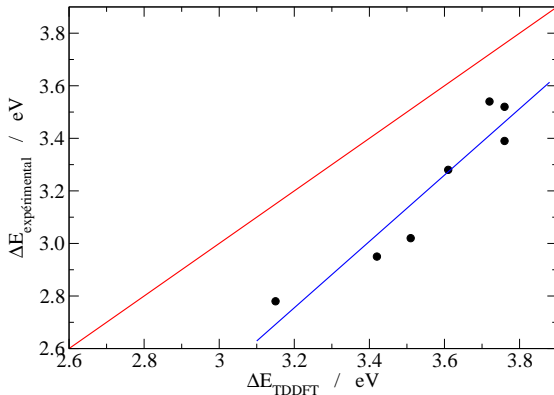


Théorème de Bayes

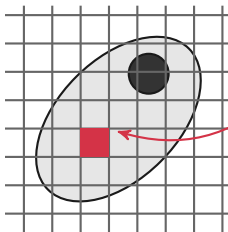
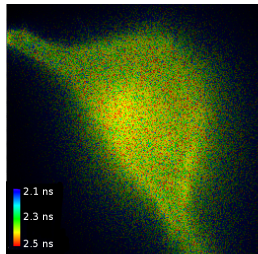
$$P(A|B, C) P(B|C) = P(B|A, C) P(A|C)$$

$$P(\Delta E_{exp} | \Delta E_{TDDFT}, I) P(\Delta E_{TDDFT} | I) = P(\Delta E_{TDDFT} | \Delta E_{exp}, I) P(\Delta E_{exp} | I)$$

Résultats expérimentaux et théoriques Timerghazin et al, J Phys Chem B, 2008



FLIM : Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy



- Cartographie du temps de vie de fluorescence dans une cellule

FRET : Förster Resonant Energy Transfer

