



HAL
open science

Étude de propriétés photophysiques de protéines fluorescentes par dynamique moléculaire

Jérémy Verdier

► **To cite this version:**

Jérémy Verdier. Étude de propriétés photophysiques de protéines fluorescentes par dynamique moléculaire. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS450 . tel-01445891

HAL Id: tel-01445891

<https://theses.hal.science/tel-01445891>

Submitted on 25 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS450

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"L'UNIVERSITE PARIS SUD"

ECOLE DOCTORALE N° 571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat: Chimie

Par

Jérémy Verdière

Etude de propriétés photophysiques de protéines fluorescentes par
dynamique moléculaire

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 19 décembre 2016 :

Composition du Jury :

M Gerald MONARD	Professeur, Université de Lorraine	Président
M Florent BARBAULT	Maitre de conférences, Université Paris Diderot	Rapporteur
Mme Isabelle NAVIZET	Professeure, Université-Paris-Est-Marne-La-Vallée	Rapporteur
Mme Helène PASQUIER	Maitre de conférences, Université Paris Sud	Examinatrice
M Gerald MONARD	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
Mme Isabelle DEMACHY	Professeure, Université Paris-Sud	Directrice de thèse

Remerciements

Avant de commencer cette thèse, je souhaite remercier toutes les personnes grâce auxquelles ce travail a pu être réalisé et ce, dans des conditions très agréables.

Tout d'abord, je remercie Mehran Mostafavi et Philippe Maitre, les deux directeurs qui se sont succédé au cours de ma thèse, ainsi que David Lauvergnat, animateur de l'équipe Théosim pour m'avoir permis d'effectuer ce travail au laboratoire de Chimie Physique d'Orsay, et m'avoir bien accueilli.

Deuxièmement, je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle Navizet et Florent Barbault, pour le travail de rapporteur qu'ils ont effectué sur ma thèse, ainsi qu'aux autres membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail de thèse: Hélène Pasquier et Gérald Monard.

Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle Demachy, Bernard Lévy et Jacqueline Ridard qui m'ont encadré au jour le jour sur ce travail et sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Ces trois années ont été riches en apprentissage et je le dois beaucoup, d'une part aux discussions que nous avons eues mais surtout aux encouragements que vous m'avez toujours prodigués. Vous avez fait de ces trois années un moment agréable.

Je remercie également Fabien Caillez, Aurélien de la Lande, Pascal Pernot pour les nombreuses discussions et explications que nous avons pu partager.

Je tiens également à dire un grand merci aux autres doctorants et post-doctorants avec lesquels j'ai pu discuter au cours de cette thèse que ce soit autour d'un repas ou d'un morceau de chocolat je pense notamment à Natacha, Cecilia et Thiago et à ceux avec qui nous partagions le petit déjeuner du vendredi comme Germain et Xiaojing.

Merci également à Joël et Merciano De Azevedo du service logistique pour leur aide, ainsi qu'à Anne Morel, Delphine Lelievre, Elodie, Eve Ranvier, Marie-Françoise Lecanu et Séverine Bourguignon du service administratif qui ont toujours été souriantes et prêtes à m'aider à compléter les documents officiels.

Pour finir, je remercie ma famille et mes proches de m'avoir toujours soutenu dans ce travail. Je tiens surtout à remercier Mélanie pour sa patience et sa compréhension durant tout le temps qu'a duré ce travail de thèse.

Merci à tous.

Etude de propriétés photophysiques de protéines fluorescentes
par dynamique moléculaire

Table des matières

I	Introduction	3
I.1	La famille des protéines fluorescentes	3
I.2	Généralités sur la fluorescence	7
I.3	Utilisation des protéines fluorescentes	9
I.4	Les protéines étudiées	10
I.5	Approche des propriétés photophysiques par simulation	12
II	Transfert de proton dans Padron	14
II.1	Introduction	14
II.2	Energie du chromophore neutre ou anionique dans différentes géométries dans le vide	17
II.2.1	Définition de l'affinité protonique	17
II.2.2	Affinité protonique du chromophore dans différentes géométries. Choix de la méthode de calcul.	17
II.2.3	Correction des affinités protoniques calculées	21
II.2.4	Affinité protonique du chromophore dans ses différentes géométries.	24
II.2.5	Conclusion	28
II.3	Transfert de proton entre le chromophore et la tyrosine dans le vide	29
II.4	Effet de l'environnement	32
II.4.1	Modèle H ₂ O - HO ⁻	32
II.4.2	Modèle avec une molécule d'eau spectatrice	34
II.4.3	Représentation de la molécule d'eau spectatrice	36
II.4.4	Conclusion	37
II.5	Transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore en conformation <i>trans</i> et <i>cis</i> au sein de la protéine Padron	37

II.5.1	Dynamique de Padron avec le chromophore en conformation <i>trans</i> .	38
II.5.2	Dynamique de Padron avec le chromophore isomérisé en conformation <i>cis</i> .	45
II.6	Voisinage du chromophore en conformation <i>cis</i> et <i>trans</i> .	51
II.7	Conclusion	57
III	Etude de la protéine EosFP	59
III.1	Introduction	59
III.2	Dynamique de l'état fondamental	61
III.2.1	Préparation des simulations moléculaires	61
III.2.2	Analyse des réseaux de liaison hydrogène dans l'état fondamental	64
III.3	Calcul des spectres d'absorption de EosFP	66
III.3.1	Méthode :	66
III.3.2	Spectres de EosFP	71
III.4	Dynamiques de l'état excité de EosFP	73
III.4.1	Rôle de la molécule d'eau sur la dynamique interne du chromophore à l'état excité	73
III.4.2	Analyse des dynamiques de l'état excité	75
III.5	Intégration directe	77
III.6	Schéma cinétique	85
III.7	Conclusion du chapitre	93
IV	Conclusion Générale	95
A	Dynamiques moléculaires	104
A.1	Protocole de minimisation et de mise à l'équilibre	104
A.2	Protonation des histidines	105
A.2.1	Dans Padron	105
A.2.2	Protonation des histidines de EosFP	106
A.3	Champ de force	106
A.3.1	Champ de force des résidus non standard	107
B	schéma cinétique	112

Chapitre I

Introduction

Cette thèse porte sur l'étude théorique de protéines fluorescentes. Ces protéines sont très largement étudiées du fait de leur intérêt en biologie. Bien que les protéines fluorescentes soient très utilisées, les mécanismes moléculaires sont encore largement méconnus. Mieux comprendre ces mécanismes peut permettre de les améliorer, notamment en orientant des choix de mutations qui permettront de modifier leurs propriétés photophysiques. Dans cette thèse, nous chercherons à élucider deux cas particuliers.

I.1 La famille des protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes sont une vaste famille de protéines. La première à avoir été découverte est la GFP (*Green Fluorescent Protein*) en 1962 dans la méduse *Aequorea victoria*[1]. Depuis, de nombreuses autres l'ont été dans différents organismes tel que des coraux[2, 3, 4] ou des anémones[5]. L'isolement du gène codant pour la protéine de la GFP en 1992 par Prasher[6] ainsi que la réplique de la protéine dans d'autres organismes vivants[7], ont montré que la maturation de la protéine se fait sans cofacteur, que ce soit son repliement, ou la formation de son chromophore. Cet élément en fait un outil de choix pour les études *in-vivo*.

La première cristallisation de la GFP en 1974 par Morise *et al*[8] puis la résolution simultanée de sa structure en 1996 par les équipes de Yang[9] et Ormö[10] ont permis de mettre en évidence l'existence d'un tonneau composé de 11 brins β et une hélice α au centre de ce tonneau. C'est sur cette hélice que le chromophore est accroché. Dans la GFP, il est formé après le repliement en présence d'oxygène à partir des résidus Ser, Tyr, Gly.

La figure I.1.1 représente la structure de la GFP .

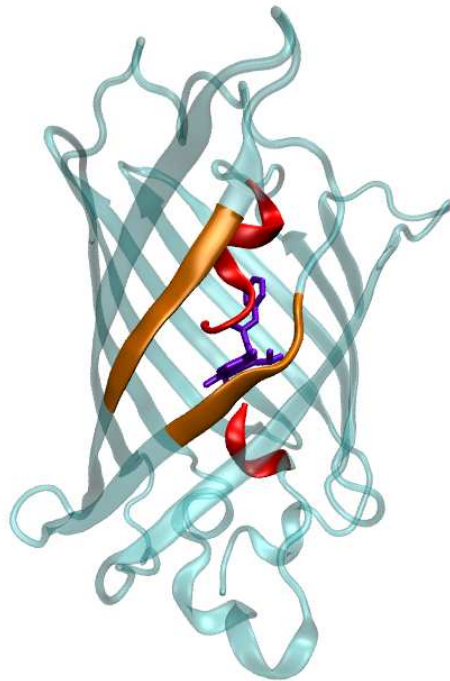


FIG. I.1.1 – Schéma de la structure cristalline de la GFP. En violet : chromophore. En rouge : hélice centrale qui porte le chromophore. En doré : crevasse entre deux brins qui expose le chromophore au solvant.

D'après Cubitt *et al*[11] la formation du chromophore de la GFP se fait selon le mécanisme décrit sur la figure I.1.2.

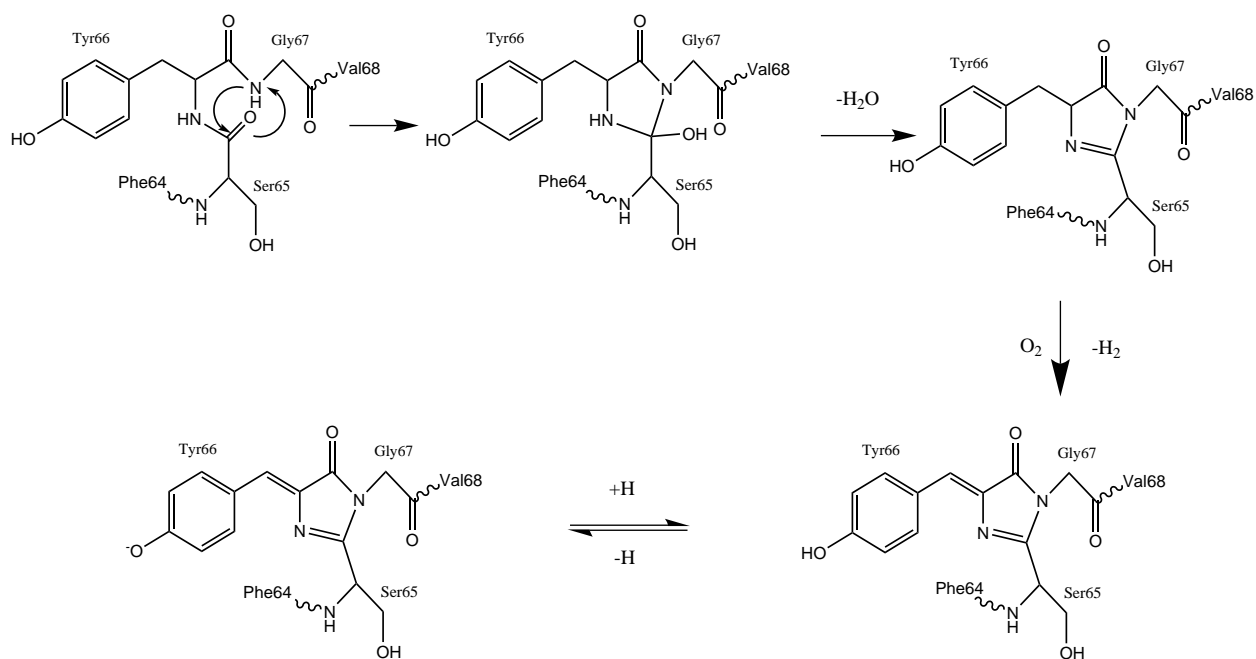


FIG. I.1.2 – Cyclisation du chromophore de la GFP, d'après le mécanisme proposé par Cubit *et al*[11].

Le chromophore est composé de deux cycles aromatiques, l'imidazolinone et le phénol, reliés entre eux par un groupement CH. La partie conjugué du chromophore est présentée sur la figure I.1.3.

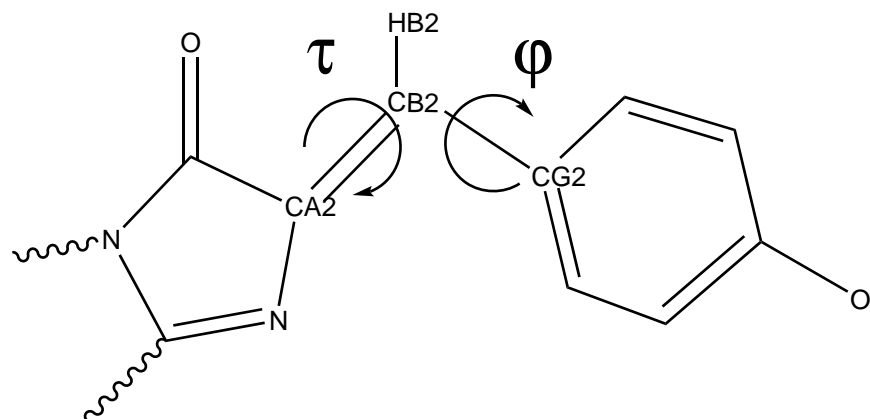


FIG. I.1.3 – Partie conjuguée du chromophore responsable de la fluorescence

Les torsions autour des deux liaisons qui relient les cycles (le "pont" entre les deux cycles) seront nommées torsion τ s'il s'agit de l'angle de torsion entre les atomes CA2 et CB2 (nomenclature sur la figure I.1.3) et φ s'il s'agit de l'angle de torsion entre les atomes CB2 et CG2. Les torsions le long de ce pont jouent un rôle clé dans les propriétés photophysiques du chromophore.

Dans les différentes protéines de la famille, on trouve le chromophore dans deux états de protonation : une forme neutre, avec un proton sur l'oxygène du phénol et une forme déprotonée anionique. Ces deux états de protonation ont des propriétés d'absorption différentes. Sous sa forme neutre, la longueur d'onde d'absorption du chromophore est autour de 400 nm alors que

sous la forme anionique, la longueur d'onde d'absorption est autour de 500 nm.

Le chromophore étant enfoui dans le tonneau β , il n'est pas en contact direct avec le solvant. On peut néanmoins remarquer que face au chromophore, il y a une ouverture du tonneau β (représentée en doré sur la figure I.1.1). Cette ouverture que l'on retrouve dans toutes les protéines fluorescentes est importante car des molécules d'eau du solvant peuvent s'introduire dans le tonneau β à travers elle.

La mutagenèse dirigée appliquée à la GFP ou à d'autres protéines fluorescentes naturelles a permis d'agrandir la famille des protéines fluorescentes, et d'étendre la gamme des longueurs d'onde d'émission sur tout le spectre visible de l'infrarouge à l'ultraviolet. Ces mutations touchent à la fois le chromophore et les résidus proches.

Parmi cette famille, il existe des protéines dans lesquelles on peut faire passer le chromophore d'une forme active (fluorescente) à une forme inactive (non-fluorescente) ou l'inverse, à l'aide d'une excitation à une longueur d'onde donnée. Ces protéines sont dites photo-activables. Dans cette thèse, nous étudierons l'une de ces protéines : Padron.

Une autre variété de protéine fluorescente est celle des protéines photoconvertibles. Dans ces dernières, il est possible de changer la couleur d'émission du chromophore à l'aide d'une excitation de longueur d'onde différente de celle de l'absorption induisant l'émission de fluorescence. Dans le cas de EosFP, le chromophore est composé des résidus His62, Tyr63 et Gly64. Il absorbe et émet initialement dans le vert[4]. Une irradiation dans le proche ultraviolet entraîne une rupture de liaison peptidique entre le chromophore et le résidu Phe61 qui le précède. Les réarrangements induits par cette rupture de liaison conduisent à une extension de la partie aromatique du chromophore au cycle imidazole de l'histidine 62 (premier résidu qui compose le chromophore), ce qui entraîne un décalage des longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le rouge de manière irréversible. Dans cette thèse, nous étudierons la forme verte de EosFP.

Les structures du chromophore dans ses formes verte et rouge sont représentées sur la figure I.1.4.

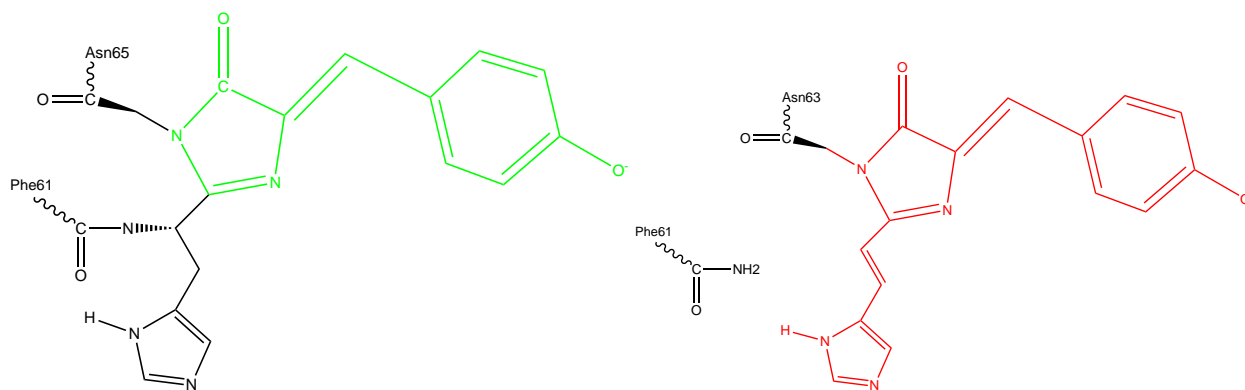


FIG. I.1.4 – Schéma du chromophore dans ses formes verte (à gauche) et rouge (à droite). Les hydrogènes ont été omis pour plus de clarté.

Le rôle physiologique des protéines fluorescentes dans les organismes marins où elles sont présentes n'est pas connu avec certitude à ce jour, les hypothèses les plus courantes concernent

la protection contre le stress oxydant[12, 13], une photoprotection contre les photons de faible longueur d'onde[14, 15, 16], la photoréception[17] ou encore le camouflage[18].

Les protéines développées par mutagenèse dirigée sont optimisées pour des applications en imagerie cellulaire. Les protéines photoactivables sont particulièrement intéressantes pour le développement de méthodes d'imagerie superrésolues.

I.2 Généralités sur la fluorescence

Une molécule peut absorber un photon pour passer de son état fondamental (S_0) à un état excité (S_1). Cette transition est verticale si elle se fait sans réarrangement de géométrie. La géométrie d'arrivée à l'état S_1 est appelée géométrie Franck-Condon (FC). Une fois dans l'état excité, la molécule va effectuer une relaxation vibrationnelle. C'est dans cette géométrie qu'elle va pouvoir subir une désexcitation radiative, et donc retourner à l'état fondamental en émettant un photon. Un autre mécanisme possible est celui de la conversion interne (CI), si la molécule excitée est dans une géométrie qui présente un fort couplage vibronique avec l'état électronique de l'état fondamental, ce couplage permet à la molécule de retourner à l'état fondamental par une transition non radiative. Ces deux phénomènes sont en concurrence. La figure I.2.1 représente les mécanismes qui permettent la désexcitation du chromophore une fois qu'il a absorbé un photon.

La fluorescence peut-être caractérisée par différents paramètres : la longueur d'onde d'émission de fluorescence, le rendement quantique de fluorescence ϕ_{fluo} et la durée de vie de fluorescence τ_{fluo} .

Les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission sont inversement proportionnelles à la différence d'énergie entre les états S_0 et S_1 . De plus, du fait de la relaxation vibrationnelle qui abaisse l'énergie de l'état S_1 , nous avons :

$$\lambda_{absorption} < \lambda_{émission}$$

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_{fluo} est égal au rapport du nombre de photons émis et du nombre de photons absorbés. Le temps de vie de fluorescence, τ_{fluo} , est la durée moyenne d'émission de fluorescence. Les deux grandeurs dépendent de l'efficacité des processus radiatifs et non radiatifs. Dans le cas simple, où à tout instant le chromophore peut se désexciter par l'une des deux voies, avec des constantes de vitesse de désexcitation radiative (k_r) et non radiative (k_{nr}), on trouve dans la littérature[19] que :

$$\frac{dS_1}{dt} = -(k_r + k_{nr})S_1$$

En intégrant cette équation sur le temps, on obtient :

$$S_1(t) = S_1(0)e^{-(k_r+k_{nr})t}$$

L'expression du rendement quantique (ϕ_{fluo}) est alors :

$$\phi_{fluo} = \frac{k_r}{(k_r + k_{nr})}$$

et celle du temps de vie de fluorescence (τ_{fluo}), qui se confond alors avec le temps de vie moyen de l'état excité est :

$$\tau_{fluo} = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Dans le cas des protéines fluorescentes, le chromophore qu'il soit neutre ou anionique adopte une géométrie d'équilibre plane, dans laquelle les deux angles du pont (φ et τ) sont proches de 0 et les géométries présentant des valeurs importantes de ces angles sont défavorables[20, 21, 22]. Mais dans le cas du chromophore anionique dans son état excité, ce n'est plus vrai. La géométrie plane du chromophore est un état métastable et on trouve 4 minima d'énergies, localisés en $\tau = 0^\circ$, $\varphi = \pm 90^\circ$ et $\tau = \pm 90^\circ$, $\varphi = 0^\circ$ (structures "twistées"). Dans ces géométries, la désexcitation radiative est impossible et, au contraire, la conversion interne vers l'état fondamental est possible du fait d'une faible différence d'énergie entre les états S_0 et S_1 des structures twistées.

Donc, suivant sa géométrie, le chromophore pourra soit subir une conversion radiative, soit une conversion non radiative. On peut noter dès à présent que l'on s'écarte alors du modèle simple présenté ci-dessus, où les deux processus sont supposés avoir lieu avec la même vitesse, quelque soit le temps, donc quelque soit la géométrie.

Les barrières entre la géométrie plane et les géométries twistées sont très faibles dans le chromophore anionique isolé, soumis à ses seules forces internes, il va subir très vite une torsion qui va l'amener aux géométries non fluorescentes et il n'est donc pratiquement pas fluorescent[23]. Les protéines sont fluorescentes car elles fournissent au chromophore un environnement suffisamment rigide pour bloquer ou ralentir ses mouvements de torsion et le maintenir dans une géométrie proche de la géométrie plane où il peut fluorescer.

Ainsi, la GFP sauvage possède un rendement quantique de fluorescence expérimental, ϕ_{fluo} , de 0.79[24], et une durée de vie de fluorescence, τ_{fluo} , de 3.2ns[25]. Si on dénature la protéine, le rendement quantique de fluorescence devient quasiment nul [26], et sa durée de vie est alors de l'ordre de la picoseconde[27].

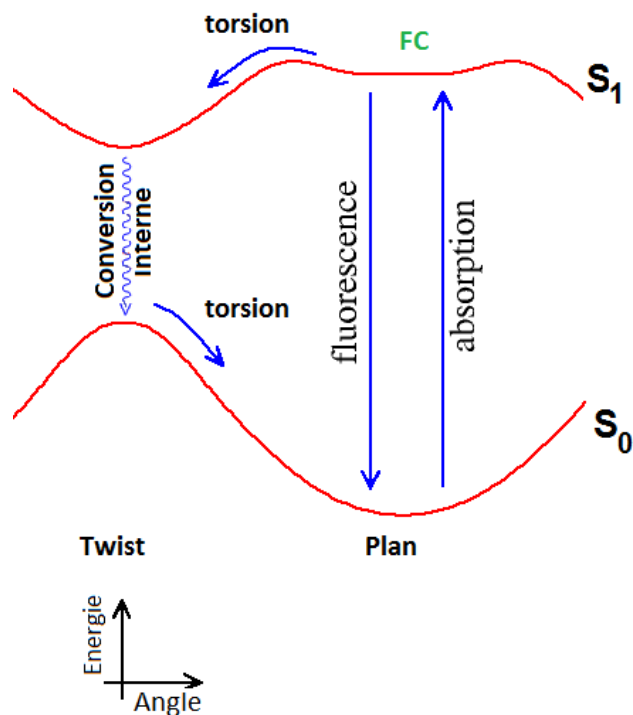


FIG. I.2.1 – Schéma des processus photophysiques.
 S_0 : état fondamental
 S_1 : premier état excité
 FC : géométrie Franck-Condon

I.3 Utilisation des protéines fluorescentes

La principale utilisation des protéines fluorescentes est le marquage cellulaire. En introduisant le gène codant pour la protéine fluorescente à la suite d'une protéine que l'on souhaite étudier, il est possible de faire exprimer à un organisme une protéine chimère, qui sera fluorescente. Dans le meilleur des cas, cette protéine chimère ne perdra pas son rôle premier dans la cellule et la protéine fluorescente rajoutée à sa suite permettra de la localiser dans la cellule au cours du temps.

Une autre utilisation possible des protéines fluorescentes est le Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (Förster Resonance Energy Transfer)[28], qui a été rendu possible par la multiplication des protéines fluorescentes ces dernières années. Pour l'utiliser, il faut avoir deux protéines fluorescentes que nous nommerons A et B. Le spectre d'absorption de la protéine B doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'émission de la protéine A, ce qui limite le choix des deux protéines. Dans ce cas, si les protéines A et B sont proches dans l'environnement cellulaire, c'est-à-dire à une distance inférieure à 10 nm et correctement orientées([28], chapitre 9), une excitation de la protéine A conduit à un transfert d'énergie non radiatif vers la protéine B. La fluorescence observée est alors celle de la protéine B. En marquant deux protéines, une

avec la protéine fluorescente A et l'autre avec la protéine fluorescente B, on peut donc déterminer si elles sont en interaction dans le milieu cellulaire et également avoir un suivi temporel de cette interaction[29].

Les protéines photoactivables sont des outils particulièrement adaptés aux techniques d'imagerie de très haute résolution, notamment à l'aide de la méthode RESOLFT[30] (REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions). Cette technique consiste à marquer une protéine d'intérêt à l'aide d'une protéine photoactivable. Dans un second temps, on scanne l'échantillon, de manière à éteindre la fluorescence de toutes les protéines fluorescentes sauf en un point et on fait une acquisition d'images. On procède ainsi sur l'ensemble de l'échantillon et on peut ainsi obtenir une image dite super résolue.

Les protéines photoconvertibles sont surtout utilisées pour analyser les différents milieux cellulaires, notamment à travers les techniques de FLIM[31] (Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy) et de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Dans ces études, on irradie les protéines pour les faire changer de couleur, et on étudie dans le cas du FLIM l'extinction de fluorescence après excitation, et dans le cas du FRAP[32] la façon dont évolue la fraction de protéine dont on a induit la photoconversion.

I.4 Les protéines étudiées

Dans cette étude, nous étudierons 2 protéines fluorescentes qui appartiennent à deux familles différentes : Padron, qui est une protéine photoactivable, puis EosFP qui est une protéine photoconvertible.

Padron :

La protéine Padron[33] a été obtenue par mutagenèse à partir de la protéine Dronpa[34], une protéine fluorescente issue d'une variété de corail *Pectiniidae*. Il y a en tout 10 acides aminés qui ont été remplacés : Thr59Met, Val60Ala, Asn94His, Ile100Ser, Pro141Arg, Gly155Ser, Val157Gly, Met159Tyr, Phe190Ser, Lys222Asn. Seules les mutations Met159Tyr et Val157Gly sont indispensables pour changer les propriétés de fluorescence de Padron, les autres ont été effectuées pour améliorer les propriétés de repliement et de stabilité de Padron. Le chromophore des deux protéines est le même. Il est formé à partir des résidus Cys62-Tyr63-Gly64.

Dans son état natif, Dronpa est fluorescente (forme *on*), et une irradiation intense dans sa bande d'absorption majoritaire la fait passer à un état non fluorescent (forme *off*). L'irradiation la faisant passer de sa forme *on* à sa forme *off*, on parle de protéine photoactivable négative. A l'inverse, Padron est non fluorescente (état *off*) dans son état natif et quand on l'irradie elle passe dans un état fluorescent (état *on*)[33]. On parle donc de protéine photoactivable positive.

Les structures cristallographiques de Padron[3, 35] montrent que dans l'état *on* le chromophore est en conformation *cis* et que dans l'état *off* il est en conformation *trans*. Les formes *cis* et *trans* du chromophore sont représentées sur la figure I.4.1 .

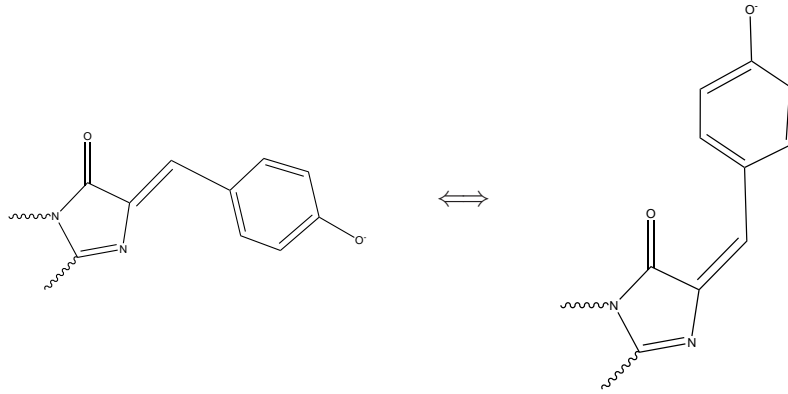


FIG. I.4.1 – Chromophore de Padron, sous sa forme anionique. A gauche en conformation *cis*, à droite en conformation *trans*. Les hydrogènes ont été omis pour plus de clarté. L'oxygène de la moitié phénolate qui change de protonation durant le passage *trans* \rightarrow *cis* porte ici le nom "O⁻"

L'activation de la protéine Padron de l'état natif *off* à l'état *on* correspond donc à l'isomérisation du chromophore *trans* \rightarrow *cis*, accompagnée d'une protonation partielle des chromophores *cis*. La protonation du chromophore peut se produire *a-priori* avant, pendant et après l'isomérisation.

Au sein de l'équipe, une étude complète du processus de photoisomérisation *trans* \rightarrow *cis* du chromophore anionique a été effectuée. Dans ce cadre, le travail mené au cours de cette thèse avait pour objectif d'étudier les probabilités de protonation du chromophore par transfert de proton à partir des partenaires liés par liaison hydrogène au chromophore à différentes étapes du processus d'isomérisation. Nous avons donc étudié la probabilité de ce transfert pour différentes géométries du chromophore le long du processus d'isomérisation dans l'état fondamental. Les résultats de nos analyses sont décrits dans la partie II.

EosFP

EosFP est une protéine issue du corail *Lobophyllia hemprichii*. Elle possède la même structure en tonneau β que les autres protéines fluorescentes. Son chromophore est formé à partir des résidus His62, Tyr63 et Gly64. Dans cette forme, le chromophore absorbe des photons à la longueur d'onde de 506 nm et ré-émet à la longueur d'onde de 516 nm, c'est-à-dire dans le vert, ce qui montre qu'il est sous la forme anionique.

Le chromophore est également capable d'absorber des photons à 390 nm. L'absorption d'un photon à cette longueur d'onde entraîne une série de réarrangement au sein de la protéine et notamment la rupture du squelette peptidique entre le résidu Phe61 et le chromophore. Cette rupture de liaison entraîne une réorganisation du chromophore et l'extension de la conjugaison jusqu'à l'histidine de la chaîne latérale. Dans cette nouvelle structure, le chromophore absorbe à 571 nm, et émet à 581 nm, c'est-à-dire dans le rouge.

Pour cette raison, la protéine EosFP est appelée une protéine photo-convertible. Cette photoconversion est un phénomène irréversible et son mécanisme exact est toujours inconnu à ce jour[4].

Le chromophore de EosFP est rappelé sous ses deux formes sur la figure I.4.2.

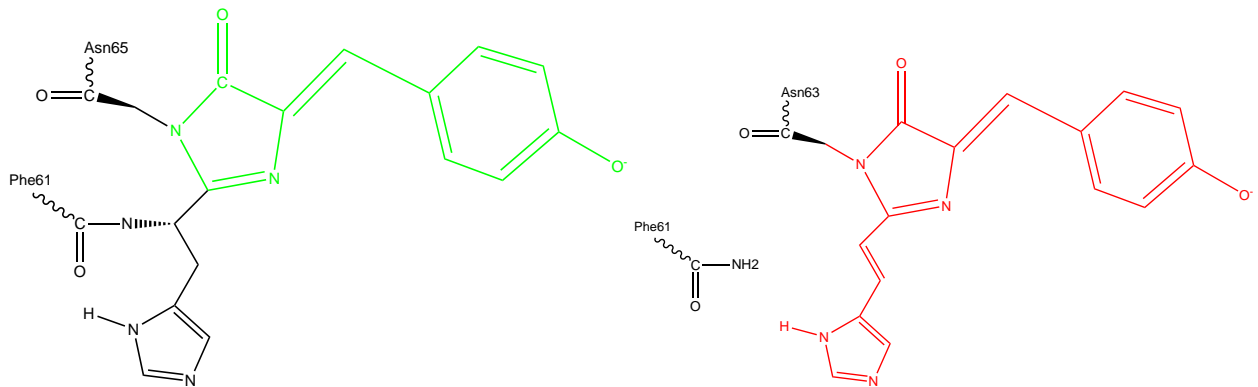


FIG. I.4.2 – Schéma du chromophore dans sa forme verte (à gauche) et rouge (à droite). Les hydrogènes ont été omis pour plus de clarté, sauf celui de l’histidine.

Dans sa forme verte, EosFP possède un rendement quantique de 0.7[4] et un temps de vie de fluorescence de 3.0 ns[36]. Dans cette forme, le chromophore est incapable de s’isomériser et il n’est donc retrouvé que sous sa forme *cis*, native. Dans sa forme rouge, le rendement quantique est de 0.55[4] et son temps de vie de fluorescence de 3.6 ns[36].

La protéine EosFP a été cristallisée sous forme de tétramères. Elle est enregistrée sous sa forme verte, avec le chromophore anionique dans la PDB sous le code 1ZUX. La structure des monomères varie, notamment du fait d’une molécule d’eau présente ou pas à proximité du chromophore et en liaison hydrogène avec l’oxygène de la moitié imidazolinone.

Nous avons étudié deux aspects des propriétés photophysiques de EosFP dans sa forme verte. D’une part, l’effet de la molécule d’eau sur les spectres d’absorption et sur la dynamique du réseau de liaison hydrogène au voisinage du chromophore à l’état fondamental.

D’autre part, nous avons analysé la dynamique du chromophore à l’état excité qui fait apparaître plusieurs zones conformationnelles d’équilibre pour le chromophore. Leur prise en compte est indispensable pour reproduire correctement le temps de vie de fluorescence et le rendement quantique. L’étude de EosFP est décrite dans la partie III.

I.5 Approche des propriétés photophysiques par simulation

Dans cette thèse, nous avons effectué des dynamiques moléculaires classiques de deux protéines fluorescentes : Padron et EosFP. Ces simulations moléculaires sont basées sur les équations de la mécanique classique en utilisant un champ de force qui permet de reproduire la surface d’énergie potentielle d’une molécule. Pour décrire les propriétés du chromophore, il faut utiliser un champ de force adapté à un état électronique donné, un état de protonation donné et à un isomère donné.

A l’aide de ces dynamiques, nous pouvons explorer les différentes géométries que la protéine adopte, sur des temps assez longs (allant jusqu’à la dizaine de nanosecondes).

Cependant, du fait de l'utilisation de champs de force classiques, nous n'incluons pas les processus impliquant des changements d'états électroniques comme la fluorescence et la conversion interne ni des ruptures ou formations de liaison comme les transferts de proton.

Ainsi, à l'aide de dynamiques moléculaires et de calculs quantiques, nous chercherons à prédire si certaines géométries adoptées par le chromophore de la protéine Padron, lié par liaison hydrogène au résidu Tyr159 sont favorables à un transfert de proton.

Dans le cas de EosFP, nous analyserons la dynamique du chromophore dans deux états électroniques. A l'état fondamental, nous étudierons le réseau de liaison hydrogène, ainsi que le rôle d'une molécule d'eau proche du chromophore sur les spectres d'absorption. Dans l'état S_1 , nous étudierons les torsions du chromophore et mettrons en place des modèles de prédiction du temps de vie de fluorescence et du rendement quantique de fluorescence.

Chapitre II

Transfert de proton dans Padron

II.1 Introduction

Dans la protéine Padron, le chromophore est présent dans deux états de protonation : neutre ou anionique et dans deux conformations : *cis* ou *trans*. Ces deux conformations sont rappelées sur la figure II.1.1.

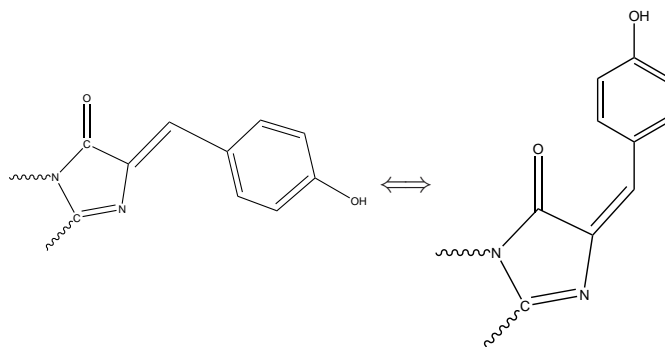


FIG. II.1.1 – conformation *cis* (à gauche) et *trans* (à droite) de la partie conjuguée du chromophore de la protéine Padron.

Selon la conformation du chromophore, l'état de protonation diffère. En conformation *trans*, le spectre d'absorption de la protéine montre que le chromophore est presque uniquement sous sa forme anionique, alors que dans sa conformation *cis*, il est retrouvé dans les deux états de protonation de manière égale[3, 35, 37, 38, 39]. Cette étude nous permettra d'avoir des éléments de réponse sur le caractère simultané ou successif de l'isomérisation *trans* vers *cis* et du changement d'état de protonation.

Cette question a déjà reçu des réponses dans le cas des protéines fluorescentes Dronpa[40, 41, 42] et IrisFP[43]. Il a été montré que dans un premier temps, il y a une isomérisation photoinduite puis un retour à l'état fondamental dans une échelle de temps de l'ordre de la centaine de picosecondes. Puis dans un second temps, il y a un changement d'état de protonation du chromophore, dans

une échelle de temps pouvant atteindre la milliseconde ou plus. Dans le cas de Padron, la thèse de Aline Faro[37], propose un modèle où l'isomérisation survient, puis dans un second temps le chromophore arrache un proton à un résidu non déterminé.

Les structures cristallographiques de la protéine Padron[3, 44] montrent que le chromophore en conformation *trans* est en liaison hydrogène avec une tyrosine (Tyr159), alors que le chromophore en conformation *cis* est en liaison avec une sérine (Ser142). Des dynamiques moléculaires réalisées précédemment dans le groupe ont montrées que durant le processus d'isomérisation *trans* vers *cis*, la liaison entre le chromophore et Tyr159 est conservée. Tyr159 n'est remplacée par Ser142 qu'une fois en conformation *cis*, au bout d'un temps de l'ordre de la nanoseconde. De ces observations, nous avons déduit que Tyr159 était un donneur potentiel de proton tout au long du processus d'isomérisation et nous avons étudié la possibilité d'avoir un transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore au cours des différentes étapes de l'isomérisation. En particulier, lors de la torsion du chromophore autour des liaisons du pont du chromophore, la partie phénolate peut-être déconjuguée du reste du chromophore. La capacité à gagner ou perdre un proton devient alors à priori similaire à celle du groupe phénol d'une tyrosine. La possibilité d'un transfert de proton de la tyrosine vers le chromophore doit donc être considérée dans les géométries planes ainsi que dans les géométries twistées.

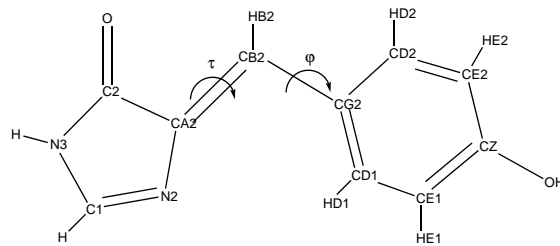


FIG. II.1.2 – Chromophore anionique en conformation *cis* et nomenclature

Ces géométries twistées sont définies par les angles τ et φ représentés sur la figure II.1.2. L'angle τ est l'angle dièdre C2-CA2-CB2-CG2 et l'angle φ est l'angle dièdre CA2-CB2-CG2-CD1. Les noms des atomes utilisés sont indiqués sur la figure II.1.2. Le chromophore est défini comme *trans* lorsque $\tau = 0^\circ$ et $\varphi = 0^\circ$ et *cis* lorsque $\tau = 180^\circ$, $\varphi = 0^\circ$.

La figure II.1.3 schématise le processus d'isomérisation du chromophore. Il se déroule en 4 temps.

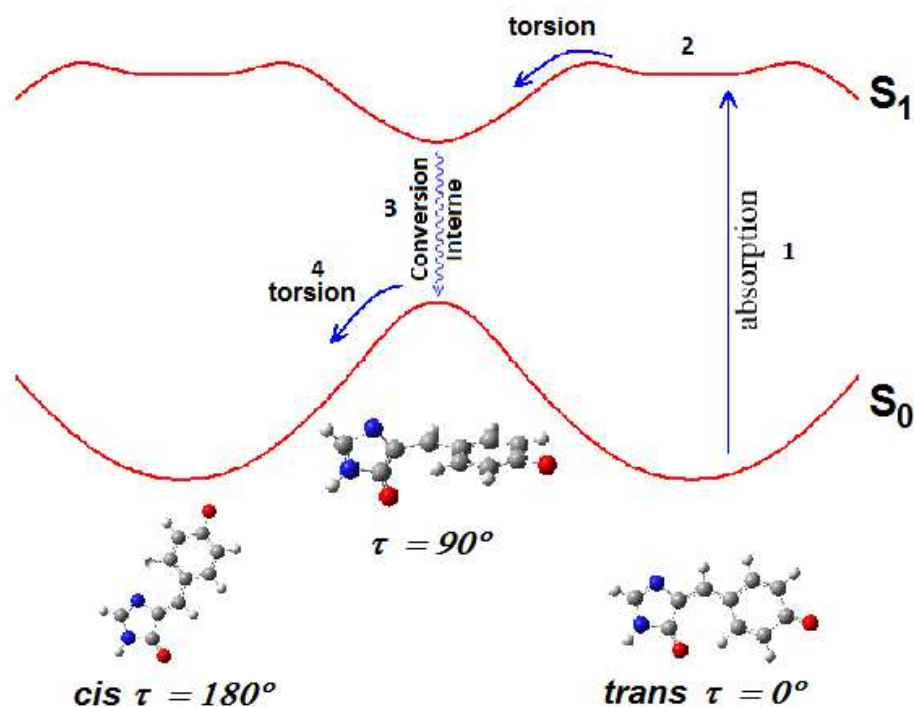


FIG. II.1.3 – Mécanisme d'isomérisation du chromophore.

1. Dans sa géométrie *trans*, le chromophore absorbe un photon et passe à l'état excité.
2. Dans l'état excité, le chromophore se déforme et atteint une géométrie twistée dans laquelle τ vaut 90° .
3. Dans cette géométrie twistée, le chromophore se désexcite par conversion interne et retourne dans l'état fondamental.
4. A l'état fondamental, le chromophore passe de la géométrie twistée ($\tau = 90^\circ$) à la géométrie *cis* ($\tau = 180^\circ$).

Durant la deuxième étape, le chromophore est à l'état excité. Or il a été montré que dans les dérivés de phénols, le caractère acide d'une espèce est renforcé dans les états excités[45]. Nous avons donc écarté un transfert de proton vers le chromophore dans cette étape. Et nous avons cherché à déterminer si le chromophore dans son état fondamental peut arracher le proton du résidu Tyr159 avant qu'il ne soit remplacée par le résidu Ser142, au début, au cours ou après l'étape 4.

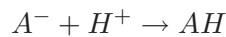
Nous avons dans un premier temps effectué des calculs dans le vide. A l'aide d'un système modèle, nous avons également évalué l'influence d'une molécule d'eau spectatrice sur un transfert de proton entre un donneur et un accepteur. Enfin, à l'aide de simulations de dynamique moléculaire, nous avons évalué la probabilité d'avoir un transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore

déprotoné au sein de la protéine pour les chromophores en géométrie twistée en τ ou en géométrie plane *cis* ou *trans*. Les résultats sont décrits dans la suite de ce chapitre.

II.2 Energie du chromophore neutre ou anionique dans différentes géométries dans le vide

II.2.1 Définition de l'affinité protonique

Pour déterminer si la tyrosine est un donneur potentiel de proton pour le chromophore, nous avons comparé l'affinité protonique du chromophore et de la tyrosine. L'affinité protonique, E_{AP} est définie comme l'énergie produite par la réaction suivante :



Donc E_{AP} est définie comme :

$$E_{AP} = E_{A^-} - E_{AH}$$

Une affinité protonique positive signifie que l'espèce protonée est plus stable que l'espèce anionique. Contrairement au pK_a , l'affinité protonique est une propriété intrinsèque de la molécule. Le signe de la différence d'affinité protonique entre deux molécules permet de déterminer le sens du possible transfert de proton. En comparant l'affinité protonique du chromophore $E_{AP_{cro}}$ à celle de la tyrosine $E_{AP_{tyr}}$, nous pourrions donc déterminer si un transfert de proton est possible. Nous pourrions également obtenir la variation de l'affinité protonique du chromophore en fonction de sa géométrie.

Expérimentalement on ne connaît pas la valeur de l'affinité protonique du chromophore. Pour la déterminer, nous avons eu recours à des calculs quantiques. Nous avons également calibré l'incertitude due à l'utilisation de calculs quantiques pour déterminer des affinités protoniques comparables aux données expérimentales.

Pour la tyrosine, nous avons estimé que l'affinité protonique était identique à celle du phénol. Expérimentalement, cette affinité protonique est déterminée à $347.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ [46].

II.2.2 Affinité protonique du chromophore dans différentes géométries. Choix de la méthode de calcul.

Les calculs quantiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Gaussian09[47] en utilisant la méthode de la DFT (Density Functional Theory), avec la fonctionnelle B3LYP (Becke, three-parameter,

Lee-Yang-Parr)[48, 49], avec la base 6-31G(d) et la base 6-31+G(d) qui inclut des orbitales diffuses. Les calculs que nous avons réalisés impliquent des torsions du chromophore. Or dans une géométrie perpendiculaire, la conjugaison entre les deux cycles disparaît. Pour décrire correctement la structure électronique, il faut normalement recourir à un calcul de type CAS-SCF (Complet Active State, Self Consistent Field)[50] complété par un calcul de perturbation de type MP2. Ces calculs sont longs et coûteux. Nous avons réalisé des calculs R(Restricted)B3LYP et U(Unrestricted)B3LYP et nous avons comparé les résultats de ces deux modes de calcul, afin d'évaluer le problème de description de géométries autour d'une liaison π partielle. Dans le cas du chromophore, les torsions le long du pont entre les deux cycles aromatiques sont des liaisons π partielles, et le caractère multi-déterminant n'est pas nécessairement présent tout le long des torsions.

La différence entre les méthodes RB3LYP et UB3LYP vient de la manière dont est calculée la somme des densités. Dans la méthode RB3LYP, la somme des densités de probabilité de présence des électrons α et β est représentée par un seul terme, alors que dans la méthode UB3LYP, les électrons de spin α et β possèdent chacun leur terme de densité propre.

Au voisinage de 90° , la fonction d'onde n'est pas correctement décrite par un déterminant de Slater couche fermée. Il faut en principe utiliser une méthode multiconfigurationnelle pour décrire correctement la structure électronique twistée. La méthode UB3LYP décrit une configuration singulet couche ouverte qui permet de s'approcher de la bonne description énergétique.

Nous avons optimisé les géométries de la forme neutre et de la forme anionique pour chaque angle. Lors des torsions φ , l'angle τ a été contraint à 0° et lors des torsions τ , l'angle φ a été contraint à 0° . Nous avons également gelé la pyramidalisation du carbone central du pont (HB2-CB2-CG2-CA2), à 180° .

Les résultats des calculs le long des torsions sont présentés dans le tableau II.1.

torsion τ	anion		neutre	
méthode	RB3LYP	UB3LYP	RB3LYP	UB3LYP
$\tau = 0^\circ$	-645.324	-645.324	-645.850	-645.850
$\tau = 30^\circ$	-645.316	-645.316	-645.838	-645.838
$\tau = 60^\circ$	-645.295	-645.295	-645.806	-645.806
$\tau = 80^\circ$	-645.282	-645.282	-645.779	-645.789
$\tau = 85^\circ$	-645.279	-645.279	-645.773	-645.786
$\tau = 90^\circ$	-645.278	-645.278	-645.767	-645.785

torsion φ :	anion		neutre	
méthode	RB3LYP	UB3LYP	RB3LYP	UB3LYP
$\varphi = 0^\circ$	-645.324	-645.324	-645.850	-645.850
$\varphi = 30^\circ$	-645.316	-645.316	-645.846	-645.846
$\varphi = 60^\circ$	-645.297	-645.297	-645.837	-645.837
$\varphi = 80^\circ$	-645.285	-645.285	-645.837	-645.837
$\varphi = 85^\circ$	-645.283	-645.283	-645.837	-645.837
$\varphi = 90^\circ$	-645.282	-645.282	-645.837	-645.837

TAB. II.1 – Comparaison des énergies (en hartree) du chromophore le long des torsions τ (en haut) et φ (en bas) sous ses formes anionique et neutre, à l'aide des fonctionnelles RB3LYP et UB3LYP et de la base 6-31+G(d).

On voit que dans le cas du chromophore anionique, les méthodes UB3LYP et RB3LYP donnent les mêmes résultats. Il en est de même pour le chromophore neutre dans le cas des torsions φ . Par contre, les énergies du chromophore neutre calculées le long de la torsion τ diffèrent à partir de $\tau = 45^\circ$. Nous avons représenté les énergies du chromophore neutre et anionique le long de la torsion τ sur la figure II.2.1.

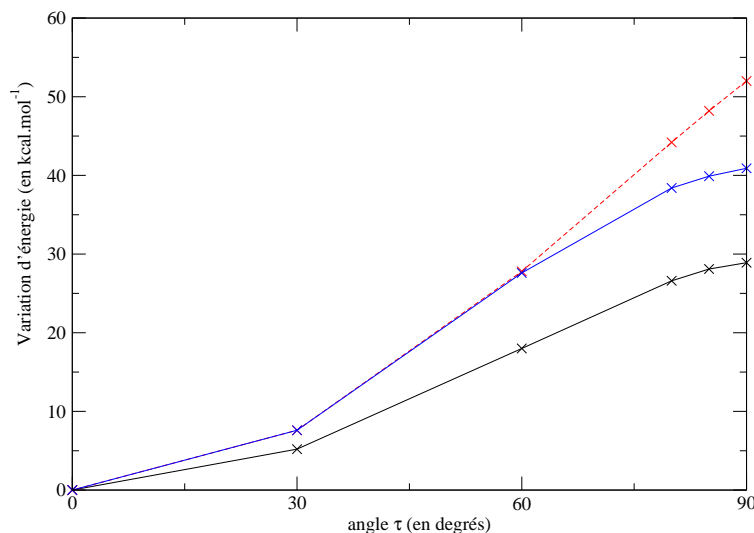


FIG. II.2.1 – Variation de l'énergie en kcal.mol⁻¹ du chromophore en fonction de la torsion τ (en degrés). L'angle φ vaut 0° . En noir : chromophore anionique en UB3LYP et RB3LYP. En bleu : chromophore neutre, en UB3LYP. En rouge : chromophore neutre en RB3LYP. Les énergies de références sont celles des chromophore *trans* optimisés ($\tau = 0^\circ$, $\varphi = 0^\circ$).

Pour le chromophore neutre, la méthode RB3LYP prédit une géométrie twistée en τ défavo-

table de 52 kcal.mol⁻¹. En utilisant la méthode UB3LYP, l'augmentation de l'énergie est de 41 kcal.mol⁻¹. En utilisant la méthode RB3LYP, on trouve donc une structure twistée à $\tau=90^\circ$ plus stable de 11 kcal.mol⁻¹. De plus, la méthode RB3LYP montre une progression linéaire de l'énergie potentielle entre 60° et 90°. Ceci traduit une mauvaise représentation de l'énergie par le calcul RB3LYP, car un calcul avec un angle plus important que 90° ferait apparaître un point anguleux sur la variation de l'énergie. Ce point anguleux à 90° mettrait en évidence l'existence d'un croisement entre états dégénérés, ce qui n'est pas le cas car le croisement est évité.

L'écart entre les méthodes RB3LYP et UB3LYP est une manifestation de l'impossibilité de représenter la structure électronique par un seul déterminant.

Dans le cas du neutre la barrière τ est beaucoup plus grande que la barrière φ . Dans le cas de l'anion, la barrière τ est également plus grande, mais de façon moins prononcée. Par ailleurs la barrière τ pour le neutre est significativement plus grande que celle de l'anion.

Ces barrières ont été calculé par différents auteurs avec des méthodes incluant la corrélation électronique. A la fin des années 1990, Voityuk *et al*[51] ainsi que Weber *et al*[52] ont utilisé des méthodes semi-empiriques. Plus récemment Toniolo *et al*[22], Olsen *et al*[53] ainsi que Polyakov *et al*[21] ont utilisé des méthodes *ab-initio*.

Ces résultats sont présentés dans les tableaux II.2.

Nos résultats	anion	neutre
Barrière τ	30	41
Barrière φ	26	8
Voityuk <i>et al</i> [51]	anion	neutre
barrière τ	26	37
barrière φ	22	2
Weber <i>et al</i> [52]	anion	neutre
barrière τ	27	55
barrière φ	21	4
Polyakov <i>et al</i> [21]	anion	neutre
barrière τ	32	58
barrière φ	32	abs
Olsen <i>et al</i> [53]	anion	neutre
barrière τ	50	62
barrière φ	41	30
Toniolo <i>et al</i> [22]	anion	neutre
barrière τ	33	35
barrière φ	26	abs

TAB. II.2 – Comparaison des barrières (en kcal.mol⁻¹) des torsions τ et φ du chromophore neutre et anionique entre la littérature et nos calculs en UB3LYP/6-31+G(d)

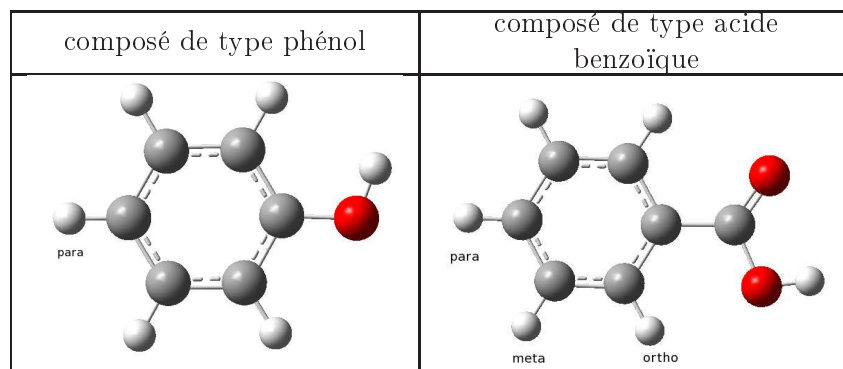
Dans notre étude, ainsi que dans celles de Voityuk *et al*[51] et de Weber *et al*[52] les calculs du chromophore ont été effectués sur des géométries twistées optimisées pour l'état S_0 . Dans le cas des études de Polyakov *et al*[21] et de Olsen *et al*[53], les géométries twistées ont été calculées sur des géométries optimisées pour l'état S_1 . Enfin dans celle de Toniolo *et al*[22], tous les calculs du chromophore ont été effectués sur des géométries optimisées pour l'état S_1 .

La comparaison quantitative entre nos résultats et ceux de la littérature est donc difficile. Par contre, on vérifie que dans toutes les études citées, on retrouve les tendances trouvées dans ce travail : les barrières τ sont plus grandes que les barrières φ . De plus, la barrière en τ du chromophore neutre est plus grande que celle du chromophore anionique.

Au vue de ces résultats, nous avons décidé de retenir la méthode UB3LYP pour calculer les affinités protoniques. Afin de corriger le manque de corrélation électronique, nous avons calibré les erreurs en utilisant un jeu de données pour lequel les valeurs expérimentales de l'affinité protonique sont connues.

II.2.3 Correction des affinités protoniques calculées

Pour calibrer les erreurs induites par l'utilisation de calculs quantiques avec la méthode de la DFT, nous avons utilisé un jeu de données de composés pour lesquels les affinités protoniques expérimentales, $E_{AP_{exp}}$ sont connues. Ce jeu est composé de deux types de molécules : d'une part des phénols substitués et d'autre part des acides benzoïques substitués. Ces deux types de composés sont représentés dans le tableau II.3. La liste des composés et les valeurs expérimentales et calculées d'affinité protonique sont données dans les tableaux II.4 (pour les dérivés du phénol) et II.5 (pour les dérivés de l'acide benzoïque).



TAB. II.3 – Structure des deux types de composés utilisés pour estimer l'erreur sur les valeurs E_{AP} calculées. les sites substitués sont ceux nommés sur les figures.

Les calculs d'affinité protonique du jeu de composés ont été effectués en RB3LYP. De plus, dans cette étude, nous avons choisi de comparer deux bases : la base 6-31G+(d), qui contient des orbitales diffuses, et la base 6-31G(d), qui n'en contient pas, de manière à déterminer l'effet des bases diffuses sur le calcul de l' E_{AP} . Les énergies déterminées avec les deux bases pour les

phénols substitués sont présentées dans le tableau II.4 et celles des acides benzoïques substitués sont reportées dans le tableau II.5.

Composé	Substituant	$E_{AP\ calc}$	$E_{AP\ calc}$	$E_{AP\ exp}$
		Base 6-31G(d)	Base 6-31+G(d)	
1	H	364.6	351.0	347.5[54]
2	CH_3	364.9	352.3	350.3[46]
3	OCH_3	365.2	352.3	350.4[46]
4	OH	367.1	353.0	350.4[46]
5	CHO	344.6	332.6	333.0[46]
6	COOH	347.7	335.3	335.9[46]
7	$C(CH_3)_3$	363.1	351.0	348.5[46]
8	$N(CH_3)_2$	364.0	351.6	351.3[46]

TAB. II.4 – Comparaison des affinités protoniques (kcal.mol^{-1}) calculées et les valeurs expérimentales pour les composés dérivés du phénol.

Composé	Substituant	$E_{AP\ calc}$	$E_{AP\ calc}$	$E_{AP\ exp}$
		Base 6-31G(d)	Base 6-31+G(d)	
1	H	356.5	342.9	340.4[55]
2	Ortho CH_3	356.7	343.9	339.7[55]
3	méta CH_3	357.1	343.6	340.9[55]
4	para CH_3	357.5	344.2	341.1[55]
5	ortho OCH_3	360.9	346.0	339.7[55]
6	méta OCH_3	357.0	343.55	339.7[55]
7	para OCH_3	359.9	346.4	341.4[55]
8	3-5di CH_3	357.4	344.3	341.1[55]
9	méta OH	356.6	342.8	339.0[55]
10	para OH	357.9	344.0	336.1[55]
11	acide nicotinique	351.5	337.9	333.7[55]
12	para nicotinique	349.1	335.5	333.0[55]
13	ortho $OCOCH_3$	349.3	332.9	336.1[55]
14	méta $OCOCH_3$	353.8	338.3	334.7[55]
15	para $OCOCH_3$	350.4	337.4	335.2[55]
16	acide 1-naphtoïque	347.0	341.2	337.1[55]
17	acide 2-naphtoïque	354.1	341.0	338.0[55]

TAB. II.5 – Comparaison des affinités protoniques (kcal.mol^{-1}) calculées et les valeurs expérimentales pour les composés dérivés de l'acide benzoïque.

On voit d'abord que les calculs avec la base ne contenant pas d'orbitales diffuses donnent des

valeurs systématiquement plus hautes que celle avec la base contenant des orbitales diffuses. La différence est de l'ordre de 15 kcal.mol^{-1} . Ceci se vérifie aussi pour le chromophore. On trouve pour le chromophore *trans* une affinité protonique sans orbitale diffuse de $341.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ contre $329.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ avec la base contenant des orbitales diffuses.

Ceci s'explique par le fait que le nuage électronique d'une espèce anionique A^- est plus diffus que celui de l'espèce neutre AH. De ce fait, l'espèce A^- est plus sensible à la présence d'orbitales diffuses dans le choix de la base. Son énergie est donc plus surrestimée que celle de l'espèce neutre lorsque ces orbitales sont absentes. Nous avons donc choisi de ne retenir que les calculs réalisés avec la base 6-31+G(d). De plus, les énergies calculées à l'aide de la base 6-31+G(d) sont plus proches des affinités protoniques expérimentales.

En comparant les valeurs calculées aux valeurs expérimentales, on constate que la différence $E_{AP_{calc}} - E_{AP_{exp}}$ est généralement supérieure à 0 sauf pour le cas du composé numéro 13 des acides benzoïques.

Pour compléter notre étude, nous avons déterminé l'énergie de point zéro (ZPE pour Zero Point Energy) du chromophore et du phénol et d'un composé de chaque type (un pour les phénols substitués et un pour les acides benzoïques substitués) pour évaluer l'importance de la ZPE dans le calcul de l'affinité protonique.

Les ZPE calculées sont regroupées dans le tableau II.6.

	ZPE	$\Delta E_{ZPE} =$ $ZPE_{anion} - ZPE_{neutre}$
chromophore <i>cis</i> , anionique	95.8	-8.5
chromophore <i>cis</i> , neutre	104.3	
chromophore <i>trans</i> , anionique	95.8	-8.6
chromophore <i>trans</i> , neutre	104.4	
phénolate	56.8	-8.8
phénol	65.6	
dérivé phénolate 2	81.1	-8.7
dérivé phenol 2	89.8	
dérivé du benzoate 4	74.3	-8.5
dérivé de l'acide benzoïque 4	82.8	

TAB. II.6 – Valeurs des ZPE et différences de ZPE (kcal.mol^{-1}) dans l'affinité protonique.

Premièrement, on peut voir dans le tableau II.6 que la ZPE des espèces neutres est toujours plus importante, du fait de l'atome supplémentaire, ce qui induit une vibration supplémentaire. De plus, on voit que l'effet de la ZPE sur l'affinité protonique des 5 composés présents dans ce tableau varie entre $-8.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $-8.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Cette variation de $0.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ est très faible par rapport aux variations des affinités protoniques calculées. Nous avons donc considéré que nous pouvions négliger la contribution de l'énergie de point zéro pour le calibrage.

Nous avons déterminé la droite de régression ainsi que l'incertitude associée à cette régression entre $E_{AP_{calc}}$ obtenue avec la base 6-31+G(d) et $E_{AP_{exp}}$ de nos composés substitués. Elle est représentée sur la figure II.2.2.

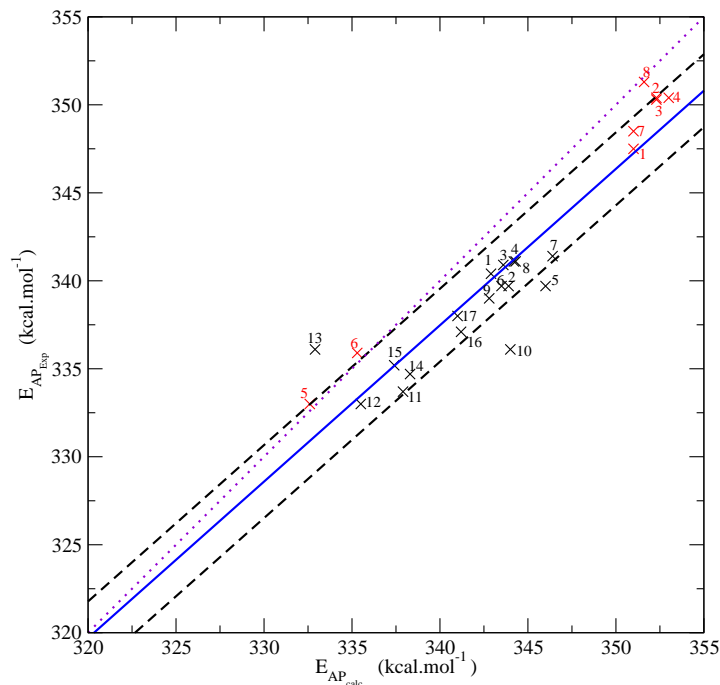


FIG. II.2.2 – Droite de régression calculée entre les valeurs $E_{AP_{calc}}$ et $E_{AP_{exp}}$. En violet pointillé : droite $x=y$. En bleu : droite de régression. En tirets noir : droite de régression \pm écart-type. \times : point correspondant aux phénols, \times : points correspondant aux acides benzoïques. Les numéros indiqués sont ceux utilisés dans le tableau II.4 pour les phénols, et dans le tableau II.5 pour les acides benzoïques.

La droite $x=y$ (en pointillé violet) représente la droite que nous trouverions si nos calculs prédisaient une affinité protonique exacte.

Ainsi, nous pouvons obtenir des valeurs corrigées de l'affinité protonique du chromophore dans ses différentes géométries à partir des valeurs calculées avec la méthode de la DFT/UB3LYP en base 6-31+G(d). La droite de régression fournit une correction systématique, liée aux approximations et au choix du niveau de calcul de la valeur $E_{AP_{calc}}$. Elle nous donne ainsi une meilleure estimation de $E_{AP_{exp}}$.

II.2.4 Affinité protonique du chromophore dans ses différentes géométries.

Pour déterminer l'affinité protonique du chromophore le long des deux torsions, nous avons utilisé des calculs à l'aide de la méthode UB3LYP, avec une base 6-31+G(d) qui contient des orbitales diffuses. Puis nous avons calculé la correction à apporter à nos calculs, ainsi que l'incertitude en utilisant notre droite de régression.

La figure II.2.3 montre comment nous avons procédé dans le cas du chromophore dans sa géométrie *trans*. L'affinité protonique calculée du chromophore est de $329.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$. En utilisant la droite de régression pour le chromophore *trans*, nous obtenons une valeur corrigée égale à $328.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

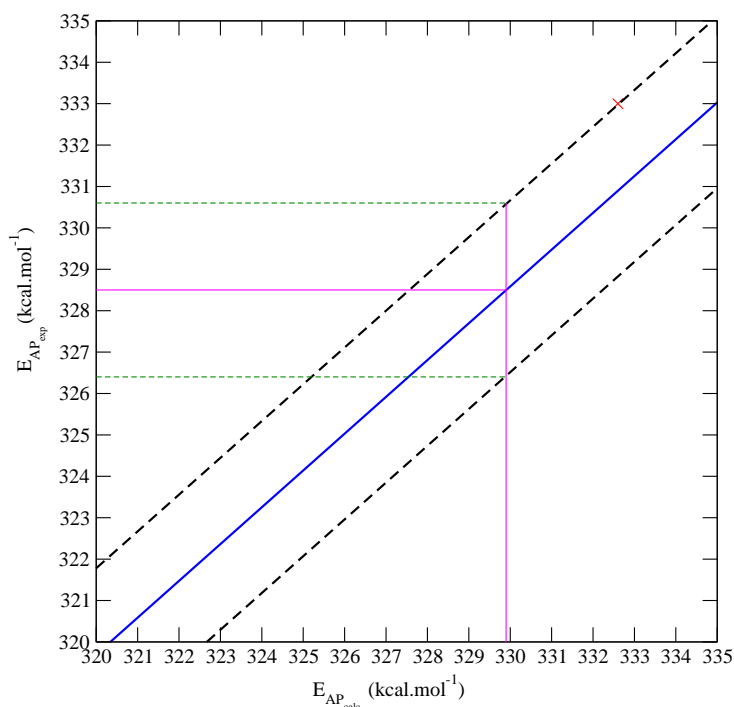


FIG. II.2.3 – Interpolation d'affinité protonique du chromophore dans le cas de la conformation *trans*. En rose : valeur calculée. En vert : incertitude haute et basse. En bleu : droite de régression. Tirets noir : droite de régression \pm écart-type.

En prenant comme incertitude l'écart-type de la droite de régression nous obtenons ainsi une affinité protonique du chromophore *trans* égale à $328.5 \pm 2.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$. L'affinité protonique du chromophore en conformation *cis* déterminée de la même façon est de $329.9 \pm 2.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Le chromophore *cis* possède donc une affinité protonique un peu plus importante que le chromophore *trans*. Néanmoins, la différence est de l'ordre de l'incertitude de détermination que montre notre méthode.

A noter que dans notre jeu de composés utilisé pour calibrer l'erreur, la plus basse affinité protonique calculée est de $332.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le composé 5 des phénols (numérotation selon le tableau II.4) et de $332.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le composé 13 des dérivés de l'acide benzoïque (numérotation selon le tableau II.5). Les valeurs du chromophore plan sont donc légèrement en dehors du jeu de composés.

Les valeurs des affinités protoniques du chromophore le long de la torsion τ déterminées à partir de nos calculs et corrigées par notre droite de régression sont données dans le tableau II.2.4 et celles le long de la torsion φ dans le tableau II.2.5.

	$E_{AP_{calc}}$ Base 6-31+G(d)	E_{AP} corrigée
$\tau = 0^\circ$ (<i>trans</i>)	329.9	328.5 \pm 2.1
$\tau = 30^\circ$	327.5	326.4 \pm 2.1
$\tau = 60^\circ$	320.1	319.8 \pm 2.1
$\tau = 80^\circ$	318.1	318.0 \pm 2.1
$\tau = 85^\circ$	318.1	318.0 \pm 2.1
$\tau = 90^\circ$	317.9	317.8 \pm 2.1
$\tau = 95^\circ$	319.8	319.5 \pm 2.1
$\tau = 100^\circ$	319.6	319.3 \pm 2.1
$\tau = 120^\circ$	319.8	319.5 \pm 2.1
$\tau = 150^\circ$	324.5	323.7 \pm 2.1
$\tau = 180^\circ$ (<i>cis</i>)	331.5	329.9 \pm 2.1

FIG. II.2.4 – Evolution de l’affinité protonique du chromophore (kcal.mol⁻¹) le long de la torsion τ . ($\varphi=0^\circ$)

	$E_{AP_{calc}}$ Base 6-31+G(d)	E_{AP} corrigée
$\varphi = 0^\circ$	329.9	328.5 \pm 2.1
$\varphi = 30^\circ$	332.8	331.1 \pm 2.1
$\varphi = 60^\circ$	340.6	338.0 \pm 2.1
$\varphi = 80^\circ$	346.4	343.2 \pm 2.1
$\varphi = 85^\circ$	347.5	344.1 \pm 2.1
$\varphi = 90^\circ$	347.9	344.5 \pm 2.1
$\varphi = 95^\circ$	347.5	344.1 \pm 2.1
$\varphi = 100^\circ$	346.4	343.2 \pm 2.1
$\varphi = 120^\circ$	340.6	338.0 \pm 2.1
$\varphi = 150^\circ$	332.8	331.1 \pm 2.1
$\varphi = 180^\circ$	329.9	328.5 \pm 2.1

FIG. II.2.5 – Evolution de l’affinité protonique du chromophore en kcal.mol⁻¹ le long de la torsion φ . ($\tau = 0^\circ$)

Les valeurs corrigées de l’affinité protonique, E_{AP} , le long des deux torsions sont présentées sur la figure II.2.6.

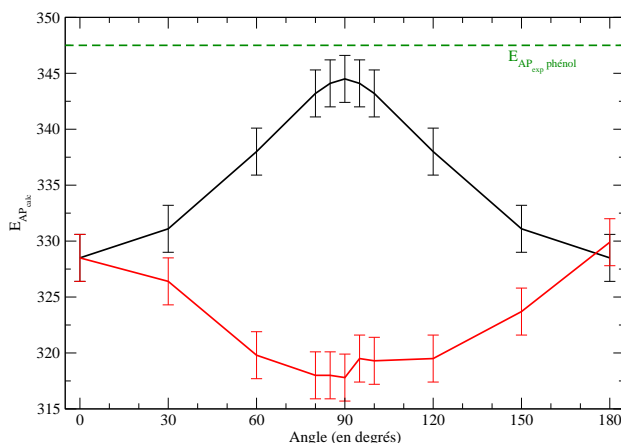


FIG. II.2.6 – Valeurs de l’affinité protonique du chromophore corrigées par notre régression. En noir : valeur de l’affinité protonique le long de la torsion φ . En rouge : valeur de l’affinité protonique le long de la torsion τ . En vert : Affinité protonique expérimentale du phénol.

Pour rappel, l’affinité protonique expérimentale du phénol est de 347.5 kcal.mol⁻¹. Les valeurs d’ E_{AP} déterminées précédemment sont de 329.9 ± 2.1 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore *cis* et de 328.5 ± 2.1 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore *trans*. On évalue donc la différence d’affinité protonique entre le chromophore *trans* et le phénol à 19.0 kcal.mol⁻¹ et 17.6 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore *cis*.

Lors des torsions, l’affinité protonique du chromophore est très différente. Sur la figure II.2.6, on peut voir que la torsion φ augmente l’affinité protonique du chromophore de 16 kcal.mol⁻¹, on a donc une différence d’affinité protonique entre le chromophore dans sa géométrie twistée en φ et le phénol qui vaut 3 kcal.mol⁻¹. Au contraire, la torsion τ abaisse l’affinité protonique du chromophore de près de 11 kcal.mol⁻¹. On trouve alors une différence d’affinité protonique entre le chromophore dans sa géométrie twistée en τ et le phénol égale à 29 kcal.mol⁻¹.

L’augmentation de la différence d’affinité protonique lors de la torsion τ montre que le transfert de proton est alors encore plus défavorable que dans les géométries planes. Au contraire, lors d’une torsion φ , la différence d’affinité protonique du chromophore se rapproche de celle du phénol, rendant un transfert de proton envisageable.

Les variations de l’affinité protonique au cours des torsions s’expliquent par les ruptures de conjugaison qui sont différentes entre les deux torsions.

On peut voir sur la figure II.2.1 que l’effet d’un twist τ jusqu’à 90° est plus déstabilisant pour la forme neutre (40 kcal.mol⁻¹) que pour la forme anionique (30 kcal.mol⁻¹). Ceci s’explique par des réorganisations différentes de la conjugaison. Schématiquement, à l’aide de structures de Lewis, on peut voir que la torsion τ nécessite de casser la double liaison entre l’imidazolinone et le pont, ce qui déstabilise la forme neutre. Dans le cas du chromophore anionique, cette augmentation d’énergie est limitée par l’apparition d’une forme résonante de type semi-quinone, représentée sur la figure II.2.7. Cette résonance stabilise la forme anionique du chromophore lors de la torsion τ , d’où une réduction de l’affinité protonique du chromophore.

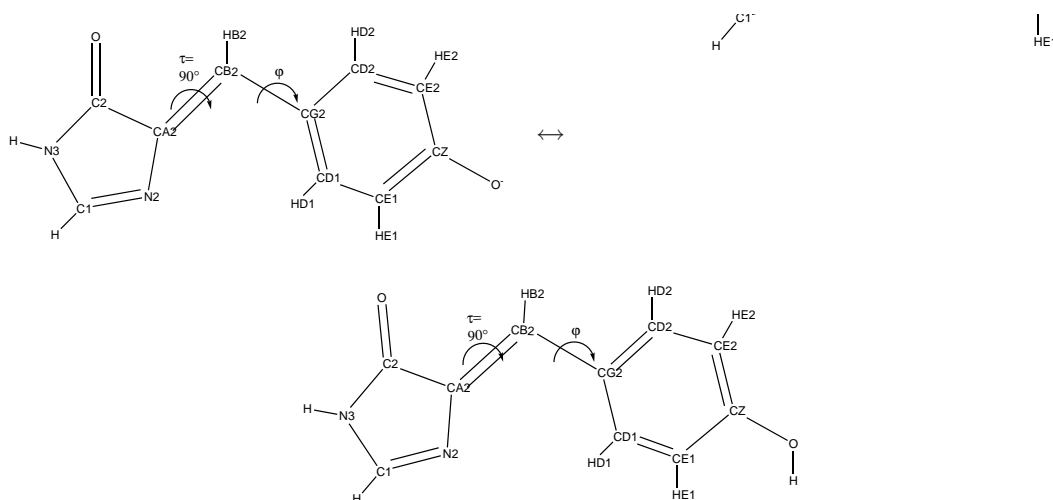


FIG. II.2.7 – En haut : structures résonnantes de la forme anionique du chromophore. En bas : structure de Lewis prépondérante du chromophore neutre.

Au contraire, lors d'un twist φ , la rupture de conjugaison intervient le long de la liaison CB2-CG2. Dans cette géométrie, la charge négative est répartie uniquement sur le phénolate du chromophore, ce qui est déstabilisant. De ce fait, l'affinité protonique du chromophore se rapproche de celle du phénol.

L'isomérisation du chromophore passe par une torsion τ . De ce fait, durant l'isomérisation le transfert de proton depuis le groupement phénol d'un résidu tyrosine vers le phénolate du chromophore est encore plus défavorable que dans les géométries planes.

II.2.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons déterminé que l'affinité protonique du chromophore plan vaut 329.9 ± 2.1 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore *cis* et 328.5 ± 2.1 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore *trans*, alors que celle du phénol vaut 347.5 kcal.mol⁻¹. Dans sa conformation twistée en τ , l'affinité protonique du chromophore diminue à 317.8 kcal.mol⁻¹, alors que dans la conformation twistée en φ , elle augmente à 344.5 kcal.mol⁻¹.

Le transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore plan, *cis* ou *trans*, est défavorable avec une différence d'affinité protonique d'environ 20 kcal.mol⁻¹. Dans le cas d'un twist φ , la différence d'affinité protonique entre le chromophore et la tyrosine est réduite à environ 3 kcal.mol⁻¹, rendant plus probable un transfert de proton.

Par contre, au cours d'une torsion τ , la différence d'affinité protonique entre le phénol et le chromophore est plus importante que dans les conformations planes : elle est de l'ordre de 30 kcal.mol⁻¹ pour une torsion τ de 90°.

Pour rappel, l'isomérisation du chromophore se déroule en 4 temps. Nous avons déjà écarté un transfert de proton vers le chromophore à l'état excité, puisque le caractère acide d'une espèce

se renforce quand elle passe à l'état excité[45]. Au vu des résultats obtenus dans cette partie, nous écartons un transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore qui se déroulerait dans la dernière étape de l'isomérisation, quand le chromophore est à l'état fondamental dans une géométrie twistée en τ .

Tous ces calculs ont été effectués dans le vide, et pour des géométries optimisées du chromophore. Or du fait de l'environnement, la géométrie d'équilibre ne représente pas l'ensemble des géométries adoptées par les deux partenaires. De plus, l'environnement de la protéine peut jouer un rôle de déclencheur, notamment à travers les liaisons hydrogènes.

II.3 Transfert de proton entre le chromophore et la tyrosine dans le vide

Dans cette partie, nous déterminons l'énergie du couple (chromophore, tyrosine), les deux partenaires étant considérés sans interaction entre eux, dans deux états de protonation : chromophore anionique, tyrosine neutre (que nous noterons $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$) et chromophore neutre, tyrosine anionique ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$). Nous considérons différentes valeurs des angles φ et τ du chromophore. Pour chacun des deux états de protonation du couple, nous calculons son énergie non seulement dans sa géométrie d'équilibre propre, mais également dans la géométrie d'équilibre qu'il adopte dans l'autre état de protonation, ceci dans le but de pouvoir calculer des énergies de transfert de proton avec ou sans relaxation de géométrie au cours du transfert.

Pour symboliser la géométrie dans laquelle se trouve le couple, nous noterons en indice $C^- TH$ s'il est dans la géométrie d'équilibre du couple ($\text{Cro}^- - \text{TyrH}$), et CHT^- s'il est dans celle de ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$).

Une partie des calculs nécessaires a déjà été effectuée dans le paragraphe II.2. Les autres ont été réalisés en utilisant la même méthode (DFT, avec la fonctionnelle RB3LYP et la base 6-31+G(d)). Pour les torsions, nous avons choisi des variations de 45° des angles τ et φ par rapport aux géométries planes. Cette valeur de 45° a été choisie pour limiter le problème de détermination des énergies en DFT. Comme nous l'avons vu dans la partie II.2, la méthode de la DFT n'est pas adaptée pour décrire correctement les ruptures de conjugaison dans une molécule. Pour des valeurs d'angles de 45° , nous avons montré que cette méthode permet une représentation correcte de l'énergie avec la fonctionnelle RB3LYP.

Nous obtenons ainsi, pour une valeur fixée de φ et τ , quatre valeurs d'énergie :

- L'énergie de $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$ dans la géométrie optimisée de $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$, notée $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{C^- TH}$
- L'énergie de $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$ dans la géométrie optimisée de $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$, notée $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{CHT^-}$
- L'énergie de $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$ dans la géométrie optimisée de $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$, notée $(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{CHT^-}$
- L'énergie de $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$ dans la géométrie optimisée de $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$, notée $(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{C^- TH}$

Ces calculs nous permettent d'obtenir l'énergie mise en jeu lors d'un transfert de proton de la tyrosine neutre vers le chromophore anionique :

$$\Delta E = (E_{CroH} + E_{Tyr^-}) - (E_{Cro^-} + E_{TyrH})$$

Cette différence d'énergie peut être calculée de deux façons différentes :

- Soit en supposant un transfert "vertical" : le transfert est très rapide et la géométrie des deux partenaires n'a pas le temps de se relaxer (ΔE_{vert}).

on a donc :

$$\Delta E_{vert} = (CroH - Tyr^-)_{C-TH} - (Cro^- - TyrH)_{C-TH}$$

- Soit en supposant un transfert "adiabatique" : le transfert est accompagné de l'adaptation de la géométrie de chaque partenaire à son nouvel état de protonation (ΔE_{adiab}). La différence d'énergie ΔE_{adiab} est égale à la différence d'affinité protonique entre la tyrosine et le chromophore.

On a alors :

$$\Delta E_{adiab} = (CroH - Tyr^-)_{CHT^-} - (Cro^- - TyrH)_{C-TH}$$

Les valeurs d'énergie pour les différentes valeurs de τ et φ sont présentées dans le tableau II.7. La figure II.3.1 reprend ces résultats pour le chromophore *cis* ainsi que pour les géométries du chromophore où $\tau = 135^\circ$, $\varphi = 0^\circ$ et $\tau = 180^\circ$ et $\varphi = 45^\circ$.

		chromophore	chromophore	torsion φ		torsion τ	
		<i>cis</i>	<i>trans</i>	$\tau = 180^\circ$	$\tau = 0^\circ$	$\tau = 135^\circ$	$\tau = 45^\circ$
		$\varphi = 0^\circ$	$\varphi = 0^\circ$	$\varphi = 45^\circ$	$\varphi = 45^\circ$	$\varphi = 0^\circ$	$\varphi = 0^\circ$
1	$(Cro^- - TyrH)_{C-TH}$	0	3	10	11	13	11
2	$(Cro^- - TyrH)_{CHT^-}$	18	21	27	28	30	31
3	$(CroH - Tyr^-)_{CHT^-}$	21	24	25	25	38	38
4	$(CroH - Tyr^-)_{C-TH}$	40	41	44	43	57	58

TAB. II.7 – Energie (kcal.mol⁻¹) des couples $(Cro^- - TyrH)$ et $(CroH - Tyr^-)$ pour différentes valeurs de τ et φ et selon leur géométrie *C-TH* ou *CHT⁻*. L'énergie de l'état le plus bas $(Cro^- - TyrH)_{cis,C-TH}$ est prise comme référence.

Le tableau II.7 fait apparaître plusieurs points importants.

Premièrement, en partant du couple $(Cro^- - TyrH)$ dans sa géométrie *cis* optimisée (ligne 1) pour différentes torsions du chromophore d'amplitude 45° , le transfert sans relaxation (transfert vertical) des deux partenaires conduit à la géométrie $(Cro^- - TyrH)_{CHT^-}$. Ce transfert mène à une augmentation de l'énergie de 40 kcal.mol⁻¹ pour le chromophore plan, 34 kcal.mol⁻¹ lors de la torsion φ et 44 kcal.mol⁻¹ lors d'une torsion τ (différences entre les lignes 1 et 4).

Deuxièmement, toujours en partant de la géométrie $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-TH}}$, le transfert de proton pour atteindre la géométrie optimisée des partenaires $(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{C-HT}^-}$ (transfert adiabatique) s'accompagne d'une variation d'énergie égale à 21 kcal.mol^{-1} pour le chromophore plan, 25 kcal.mol^{-1} pour le chromophore twisté en τ et 15 kcal.mol^{-1} pour le chromophore twisté en φ (différences entre les lignes 1 et 3).

Donc, pour toutes ces conformations (φ, τ) du chromophore le transfert vertical et le transfert adiabatique sont défavorables.

Cependant, au cours de la dynamique de la protéine Padron, le chromophore et la tyrosine ne sont pas rigides, ils visitent des géométries qui fluctuent autour de leur géométrie d'équilibre. Une situation limite qui pourrait rendre le transfert le plus favorable possible serait celle où l'état de départ serait déjà dans la géométrie d'équilibre de l'état d'arrivée : $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-HT}^-}$. Les énergies de transfert dans une telle situation sont indiquées en orange sur la figure II.3.1. Elles sont nettement plus basses que les énergies de transfert vertical ou adiabatique, mais seule la valeur obtenue lors de la torsion φ est négative

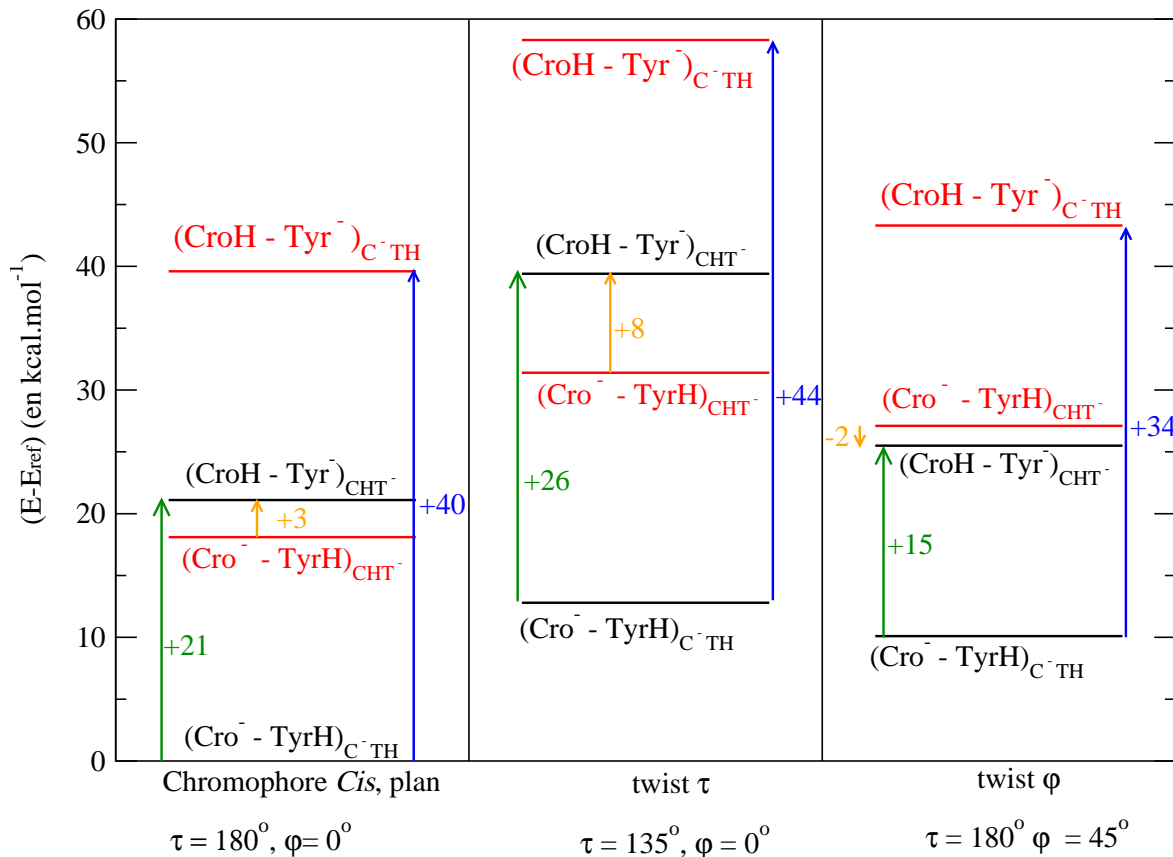


FIG. II.3.1 – Energies des états de protonation $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})$ et $(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)$ (kcal.mol^{-1}) En noir : énergies du couple dans les géométries d'équilibre propre. En rouge : énergie du couple dans la géométrie d'équilibre de l'autre état de protonation. Flèches bleues : énergie du transfert de proton vertical à partir de $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})$ dans sa géométrie propre. Flèches vertes : énergies du transfert de proton adiabatique. Flèches oranges : énergies du transfert de proton dans la géométrie optimisée de $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$.

En conclusion, les géométries les plus favorables à un transfert de proton sont donc les géométries présentant un twist φ , alors que les géométries présentant un twist en τ sont trouvées encore plus défavorables à un transfert de proton que les géométries planes. Ces résultats sont en accord avec les calculs d'affinités protoniques réalisés dans la partie II.2.

Ces considérations sont un point de départ qui montrent que la protonation du chromophore lors d'une torsion τ , donc lors de l'isomérisation, est à écarter. Néanmoins, ces calculs sont réalisés en phase gaz. Il est donc important d'estimer l'effet de l'environnement protéique sur la variation d'énergie associée au transfert de proton.

II.4 Effet de l'environnement

Les résultats des parties III.3.2 et III.3.3 sont obtenus à partir de calculs dans le vide. Nous cherchons maintenant à déterminer si l'environnement protéique et plus spécifiquement l'existence d'une liaison hydrogène supplémentaire avec une molécule d'eau spectatrice peut rendre possible un transfert de proton depuis le résidu Tyr159 vers le chromophore plan. Pour cela, nous avons eu recours à un modèle minimal pouvant donner lieu à un transfert de proton : $\text{H}_2\text{O} - \text{HO}^-$ auquel nous avons ajouté une molécule d'eau spectatrice faisant une liaison hydrogène avec l'un des partenaires.

II.4.1 Modèle $\text{H}_2\text{O} - \text{HO}^-$

On étudie tout d'abord un système composé d'une molécule d'eau, donneur de proton et un ion hydroxyde, qui représente l'accepteur.

Il est présenté sur la figure II.4.1.

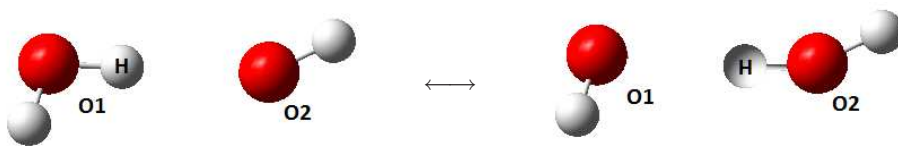


FIG. II.4.1 – Représentation du système $\text{H}_2\text{O} - \text{HO}^-$

Sur ce système, nous avons étudié la variation d'énergie en fonction de la distance D qui est la distance entre les oxygènes O_1 et O_2 , et d , la différence entre les distances O_1H et O_2H ($d = \text{O}_1\text{H} - \text{O}_2\text{H}$) l'atome H étant maintenu sur l'axe $\text{O}_1\text{-O}_2$. Nous avons fait varier la distance entre les atomes d'oxygène entre 2.2 et 3.0 Å. En dessous de 2.2 Å, nous nous attendons à une forte répulsion. Au delà de 3 Å, nous nous attendons à une liaison hydrogène entre les deux partenaires quasi-inexistante. Les valeurs de d ont été considérées entre -1 Å et +1 Å. En dehors de ces valeurs, l'hydrogène est trop proche de l'un des atomes d'oxygène. Lorsque la différence

d est positive, alors l'hydrogène est plus proche de l'oxygène O2. A l'inverse, si la différence d est négative, alors l'hydrogène est plus proche de l'oxygène O₁. Pour $d = 0$, l'hydrogène est à équidistance des deux oxygènes. L'ensemble des atomes est dans le même plan.

Ces calculs ont été réalisés avec le logiciel Gamess[56], en utilisant la méthode de la DFT/B3LYP, et la base minimale 3-21 G. Pour des valeurs de D et d données (donc les positions de O₁, O₂ et H sont fixes) la position de tous les autres atomes a été optimisée par la méthode des gradients.

La figure II.4.2 représente la surface d'énergie potentielle obtenue.

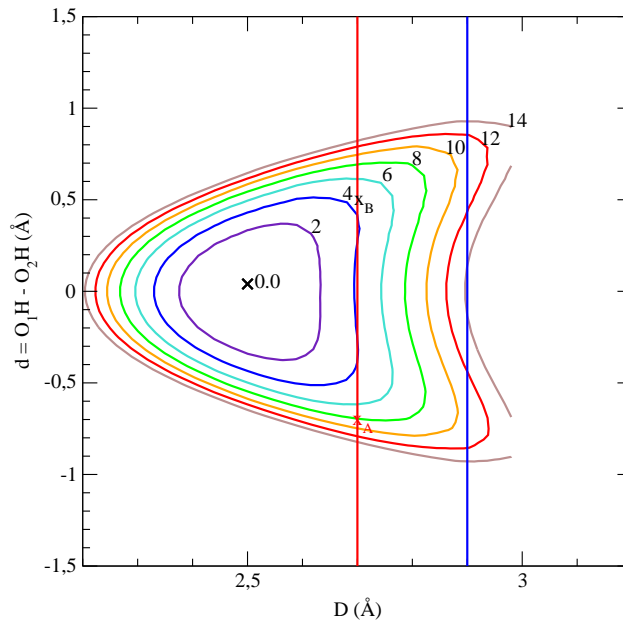


FIG. II.4.2 – Surface d'énergie potentielle (kcal.mol^{-1}) du système $[\text{H}_2\text{O} - \text{HO}^-]$. La surface est décrite à l'aide de courbes de niveau selon la coordonnée $D = \text{O}_1 - \text{O}_2$ en abscisse et $d = \text{O}_1\text{H} - \text{O}_2\text{H}$ en ordonnée. L'énergie la plus basse a servi de référence (\times).

On peut constater sur cette figure que les courbes d'énergie potentielle sont symétriques par rapport à la différence d portée en ordonnée, ce qui est cohérent avec la symétrie du système. L'énergie de référence du système est l'énergie minimale trouvée. La conformation d'énergie minimale, repérée par une croix sur la figure II.4.2, correspond à une conformation symétrique du système ($d=0$, donc le proton est au milieu des deux atomes d'oxygènes) et une distance $D=2.53 \text{ \AA}$ entre les deux atomes d'oxygène. Dans la littérature, la longueur d'une liaison hydrogène entre un hydroxyde et un hydroxyle est estimée à 2.6 \AA [57]. La base, bien que minimale, permet donc une représentation correcte de l'interaction entre les deux partenaires.

Cette conformation symétrique est retrouvée pour toutes les distances O₁-O₂ inférieures à 2.7 \AA (ligne rouge sur la figure). Pour les distances plus grandes, on trouve une conformation asymétriques, où le proton est lié préférentiellement à l'un des oxygènes. Pour une distance D fixée, le transfert du proton d'un oxygène à l'autre se fait en passant par une barrière dont la hauteur augmente avec D . Elle vaut par exemple 3 kcal.mol^{-1} pour $D=2.9 \text{ \AA}$ (ligne bleue sur la figure).

On trouve dans la littérature de nombreux calculs sur le transfert de proton dans le système $[\text{H}_2\text{O} - \text{OH}^-]$. Suivant la méthode et la base utilisée, la conformation d'équilibre trouvée est

symétrique ou asymétrique. Par exemple, Muller et Warshel[58] trouvent au niveau HF/6-31G** une structure d'équilibre symétrique, avec une distance D égale à 2.42 Å, tandis que Xantheas[59] trouve une structure d'équilibre asymétrique ($d = \pm 0.34$ Å et $D = 2.51$ Å) au niveau MP2/aug-cc-pVDZ. Enfin, l'étude de Wei *et al*[60], trouve également une structure d'équilibre asymétrique ($d = \pm 0.14$ Å, et $D = 2.43$ Å) au niveau BLAP3/6311++G(*,*).

Nos calculs utilisent une base minimum, où manquent des orbitales diffuses et des orbitales de polarisations. Ils sont en accord correct avec les résultats cités et permettent de voir que la conformation d'équilibre passe de symétrique à asymétrique lorsque la distance entre les deux oxygènes augmente.

Dans un deuxième temps, nous avons ajouté une molécule d'eau spectatrice, qui donne une liaison hydrogène à l'un des atomes d'oxygène.

II.4.2 Modèle avec une molécule d'eau spectatrice

Pour évaluer l'effet d'une liaison hydrogène extérieure sur le transfert de proton dans le système précédent, nous avons ajouté une molécule d'eau spectatrice *Wat'*, qui établit une liaison hydrogène en tant que donneur de proton avec l'oxygène O_1 . La position de cette molécule d'eau spectatrice est fixée à une distance donnée : la distance O_1-O' a été gelée à la valeur de 3 Å, et l'angle $O'-H_1'-O_1$ à la valeur de 180° . De cette manière, la molécule d'eau spectatrice ne peut pas changer de partenaire lors du déplacement de l'hydrogène H .

Les autres coordonnées ont été optimisées. Le système étudié est représenté sur la figure II.4.3.

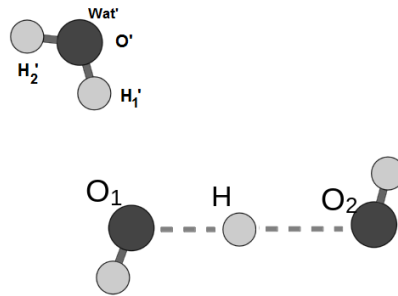


FIG. II.4.3 – Représentation du système $[H_2O, HO^-, Wat']$.

Comme pour le premier modèle, $[H_2O - OH^-]$, nous calculons l'énergie du système pour différentes valeurs de $D = O_1 - O_2$ et $d = O_1H - O_2H$. La surface d'énergie potentielle obtenue avec la méthode de la DFT et la base 3-21G est présentée sur la figure II.4.4.

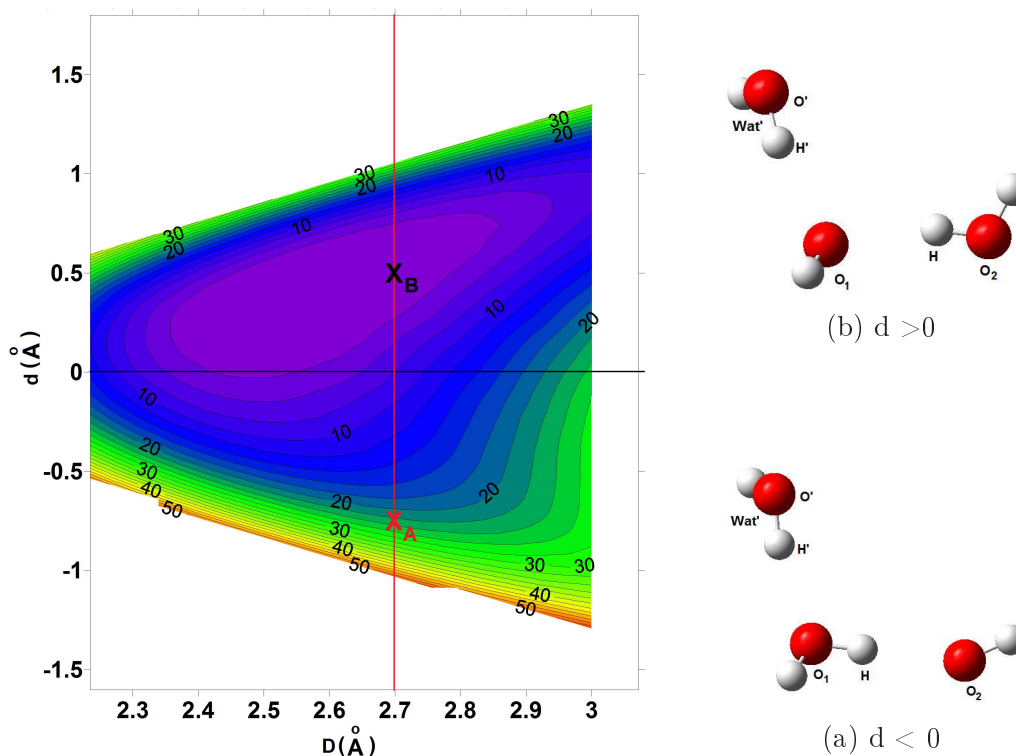


FIG. II.4.4 – A gauche : Surface d'énergie potentielle (kcal.mol^{-1}) du système $[\text{H}_2\text{O}, \text{HO}^-, \text{Wat}]$ en fonction de la distance D , et de la différence de distance d (Å). A droite : représentation de l'état en fonction du signe de d .

Pour rappel, quand la différence d est positive, le proton H est sur l'oxygène O_2 et quand elle est négative, il est sur O_1 . Du fait de la présence de la molécule d'eau spectatrice, la figure n'est plus symétrique par rapport au paramètre géométrique d . Pour une distance donnée $\text{O}_1 - \text{O}_2$, le système est toujours plus stable quand la différence d est supérieure à zéro donc avec l'hydrogène sur l'oxygène O_2 (cas b sur la figure II.4.4). Ceci s'explique car dans cette configuration, l'ion hydroxyde accepte deux liaisons hydrogène : une de la molécule spectatrice et l'autre de H_2O . Pour une différence d inférieure à 0, l'hydroxyde n'accepte qu'une seule liaison hydrogène. Le fait que l'ion accepte deux liaisons hydrogène rend sa charge négative mieux solvatée, d'où une énergie plus basse.

Si on part d'une configuration où $D = 2.7 \text{ \AA}$ et $d = -0.7 \text{ \AA}$ alors on a $\text{O}_1\text{H} = 1 \text{ \AA}$ et $\text{O}_2\text{H} = 1.7 \text{ \AA}$ et le proton H est lié à l'oxygène O_1 (cas a sur la figure II.4.4). Cette configuration est indiquée par le point X_A sur la figure II.4.4. Dans cette configuration, si D reste constant, le système va évoluer sans barrière vers le point X_B pour lequel d vaut $+0.5 \text{ \AA}$. Pour $d = +0.5 \text{ \AA}$, on a $\text{O}_1\text{H} = 1.6 \text{ \AA}$ et $\text{O}_2\text{H} = 1.1 \text{ \AA}$ et H est maintenant lié à O_2 (cas b sur la figure II.4.4). Nous avons donc un transfert de proton depuis O_1 vers O_2 dû à la présence de Wat' . Le système après transfert est plus stable de 20 kcal.mol^{-1} . Alors que dans le cas sans molécule d'eau, la position X_B (figure II.4.2) est plus stable que la position X_A de seulement 4 kcal.mol^{-1} .

On peut espérer un effet semblable dans le cas du transfert entre Tyr159 et le chromophore anionique : la présence d'une molécule d'eau en liaison hydrogène donneur de proton sur le groupement OH de Tyr159 devrait favoriser le transfert de proton vers le phénolate du chromophore,

alors qu'une molécule d'eau en liaison hydrogène avec l'oxygène du phénolate du chromophore devrait le défavoriser.

Dans la partie II.3 nous avons montré que le transfert adiabatique entre Tyr159 et le chromophore anionique en conformation *cis* dans le vide était défavorable de 21 kcal.mol⁻¹. Si l'effet énergétique d'une molécule d'eau lié à Tyr159 est du même ordre de grandeur que dans le cas du système modèle (H₂O - OH⁻ - Wat'), c'est-à-dire qu'il favoriserait de 20 kcal.mol⁻¹, alors le transfert de proton peut devenir possible.

Ces calculs montrent que le transfert de proton entre deux partenaires est fortement influencé par la présence d'une molécule d'eau spectatrice en liaison hydrogène avec l'un des partenaires. L'effet de cette molécule sur le transfert de proton est totalement différent suivant qu'elle soit liée avec l'accepteur de proton (effet défavorable) ou le donneur de proton (effet favorable).

II.4.3 Représentation de la molécule d'eau spectatrice

Nous avons étudié l'effet du remplacement de la molécule d'eau spectatrice Wat' par des charges ponctuelles. Dans cette étude les valeurs des charges que nous avons utilisées sont celles du modèle TIP3P : l'oxygène porte une charge négative de -0.834, et chaque hydrogène porte une charge positive de +0.417.

Les résultats sont présentés sur la figure II.4.5.

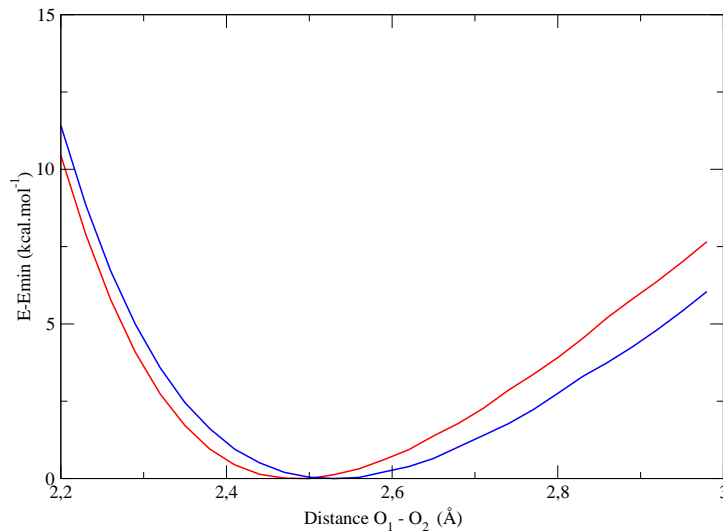


FIG. II.4.5 – Energie (kcal.mol⁻¹) en fonction de la distance $D = O_1 - O_2$ (Å), la distance $d = O_1H - O_2H$ étant optimisée pour chaque valeur de D . En bleu : la molécule spectatrice Wat' est incluse dans le système quantique. En rouge : Wat' est représentée par des charges ponctuelles. L'énergie minimum du système a servi de référence.

Cette figure représente l'énergie du système [H₂O - OH⁻ - Wat'] en fonction de la distance $D = O_1 - O_2$, la valeur de d étant optimisée pour chaque valeur de D . Ces énergies ont été obtenues soit en incluant Wat' dans le système quantique (en bleu sur la figure II.4.5) soit en la représentant

par ses charges ponctuelles (en rouge). On voit que les deux méthodes de représentation donnent des résultats très proches : la différence maximale trouvée est de l'ordre de 2 kcal.mol^{-1} .

Ces calculs montrent qu'en représentant la molécule d'eau par ses charges ponctuelles, nous sommes capable de simuler correctement sa présence. Nous pouvons donc espérer que lorsque nous étudierons le couple chromophore tyrosine, dans la protéine Padron, nous pourrions correctement représenter l'effet des liaisons hydrogène sur le couple et la variation d'énergie associée au transfert de proton en représentant l'environnement protéique par des charges ponctuelles.

II.4.4 Conclusion

Nous avons montré dans la partie II.4.2 que dans le système simple $[\text{H}_2\text{O} - \text{OH}^-]$ susceptible d'échanger un proton, une molécule d'eau placée en liaison hydrogène sur le donneur de proton peut favoriser un transfert de l'ordre de 20 kcal.mol^{-1} sans barrière d'énergie. Dans le cas du chromophore et de Tyr159 dans la protéine Padron, une molécule d'eau en liaison hydrogène avec Tyr159, pourrait donc favoriser un transfert de proton. Dans la partie II.2, nous avons déterminé que l'affinité protonique du phénol est supérieure à celle du chromophore d'environ 20 kcal.mol^{-1} . Cette différence d'affinité protonique, qui correspond à un transfert adiabatique est du même ordre de grandeur que la stabilisation apportée par la molécule d'eau spectatrice. Nous avons donc supposé que l'environnement protéique, et plus particulièrement dans le cas où des molécules d'eau sont proches de Tyr159, pourrait être un déclencheur de transfert de proton. Enfin, nous avons également montré que le remplacement d'une molécule d'eau spectatrice par ses charges ponctuelles semblait suffire à reproduire son effet.

II.5 Transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore en conformation *trans* et *cis* au sein de la protéine Padron

Dans cette partie, nous avons considéré un transfert de proton de Tyr159 vers le chromophore anionique au cours d'une dynamique moléculaire de la protéine Padron. Comme nous l'avons dit précédemment, nous avons écarté une protonation du chromophore à l'état excité, car le caractère acide d'une espèce est renforcé dans son état excité[45]. Au vu de l'évolution de l'affinité protonique dans l'état fondamental du chromophore au cours de la torsion τ , nous avons également écarté un transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore à l'état fondamental au cours de la dernière phase de l'isomérisation, c'est-à-dire quand τ passe de 90° à 180° . Nous avons donc étudié la possibilité d'un transfert de proton depuis Tyr159 vers le chromophore quand il est en géométrie plane *trans* ou *cis*.

II.5.1 Dynamique de Padron avec le chromophore en conformation *trans*.

Pour calculer le coût du transfert de proton, nous avons tout d'abord réalisé des dynamiques moléculaires de la protéine Padron, avec le chromophore anionique en conformation *trans* et la tyrosine neutre.

Pour réaliser des dynamiques moléculaires de la protéine Padron, il faut utiliser un champ de force adapté au chromophore selon sa conformation et son état de protonation. La méthode utilisée pour créer le champ de force du chromophore est donnée dans les annexes A.3. Les autres résidus de la protéine sont des résidus standards. Ils sont donc définis dans le champ de force Amber. Dans cette partie, toutes les dynamiques ont été réalisées à pression et température constante. Le modèle des molécules d'eau choisi est TIP3P. Pour avoir une meilleure exploration de l'espace des phases, nous avons réalisé 4 simulations indépendantes de 8 ns plutôt qu'une seule. Le protocole qui a été utilisé pour passer de la structure cristallographique à la structure initiale est détaillé dans l'annexe A.1.

Nous avons effectué un tirage aléatoire de 1000 snapshots dans ces trajectoires. Puis, pour un snapshot donné nous avons réalisé deux calculs quantiques :

- Le premier avec le proton sur Tyr159, tel qu'il est dans la dynamique moléculaire.

Le système quantique contient le chromophore et la tyrosine restreints à leur partie conjuguée fermée par des hydrogènes. Les calculs ont été effectués avec la méthode de la DFT, la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31+G(d) comme pour les calculs réalisés dans la partie II.2.

Pour simuler l'environnement protéique, nous avons effectué ces calculs dans le nuage des charges ponctuelles des autres atomes de la protéine et des molécules d'eau. Les atomes CA1 et CA3 du chromophore qui ont été remplacés par les atomes d'hydrogène inclus dans le calcul quantique, ont été exclus de ce nuage de charges. De même pour les hydrogènes portés par ces atomes (HA1, HA2 et HA3). De même, les atomes CB2, HB2 et HB3 de Tyr159 ont été exclus du nuage de charges. Les nomenclatures des atomes de la tyrosine et du chromophore sont rappelées sur la figure II.5.1.

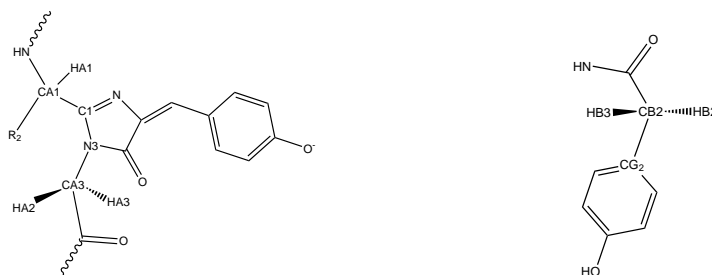


FIG. II.5.1 – Nomenclature des atomes du chromophore et de la tyrosine

La charge totale du système ainsi obtenue (partie quantique + charges ponctuelles) est légèrement différente de zéro. Pour corriger ce défaut, nous avons modifié les charges des atomes du chromophore inclus dans le nuage de charges pour que leur somme soit nulle et de même pour Tyr159.

Ce calcul nous donne l'énergie du couple $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{C-TH}^\pi$ pour ce snapshot donné de la dynamique. L'exposant π indique que le calcul se fait au sein de la protéine. L'indice $C-TH$ indique que la géométrie du couple correspond au champ de force du chromophore anionique et de la tyrosine neutre : les géométries des deux partenaires fluctuent autour de leur géométrie d'équilibre.

– Le deuxième calcul correspond à l'état obtenu après transfert de proton de Tyr159 vers le chromophore.

La position du proton transféré a été choisie pour minimiser les interactions avec des charges trop proches. Pour ce faire, nous avons effectué une minimisation qui consiste en 2000 pas de Steepest Descent à l'aide du logiciel Amber[61]. L'ensemble des autres atomes a été soumis à une contrainte de $1000 \text{ kcal.mol}^{-1}/\text{\AA}^2$. Malgré cette contrainte, les atomes bougent au cours de la minimisation. Ce déplacement, de l'ordre de 0.001\AA par coordonnée, entraîne une forte modification de l'énergie. Pour empêcher cela, nous utilisons les coordonnées initiales du système dans lesquelles nous remplaçons les coordonnées de l'hydrogène par celles issues de la minimisation. De cette façon, seul l'hydrogène est déplacé durant le transfert. Ce calcul nous donne l'énergie du couple $(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{C-TH}^\pi$ pour ce snapshot donné de la dynamique.

Pour ce snapshot, on peut alors calculer la différence d'énergie :

$$\Delta E_0^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{C-TH}^\pi - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{C-TH}^\pi$$

Cette différence d'énergie représente pour un snapshot donné le coût du transfert de proton, au sein de la protéine, depuis la tyrosine vers le chromophore, sans réarrangement de géométrie des deux partenaires. C'est-à-dire un transfert vertical, noté par la suite ΔE_{vert}^π .

$$\Delta E_{vert}^\pi = \Delta E_0^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{C-TH}^\pi - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{C-TH}^\pi$$

On considère maintenant l'hypothèse d'un transfert adiabatique, c'est-à-dire un transfert où la réorganisation interne des deux partenaires a lieu en même temps que le transfert de proton. On notera ce transfert ΔE_{adiab}^π , son expression est :

$$\Delta E_{adiab}^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{CHT^-}^\pi - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{C-TH}^\pi$$

qui est reliée à l'énergie de transfert vertical par la relation :

$$\Delta E_{adiab}^\pi = \Delta E_{vert}^\pi + [(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{CHT^-}^\pi - (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{C-TH}^\pi]$$

La deuxième partie du membre de droite est l'abaissement d'énergie du couple (CroH - Tyr⁻) quand il passe de la géométrie d'équilibre du couple (Cro⁻ - TyrH) à sa géométrie propre. Nous avons fait l'approximation que sa valeur ne dépend pas de la position relative des deux partenaires, ni de l'environnement et utilisé les valeurs calculées dans le paragraphe II.3, tableau II.7 qui correspond à la situation où les deux partenaires sont chacun dans le vide. Nous trouvons ainsi que l'abaissement vaut (24 - 41)kcal.mol⁻¹, soit -17 kcal.mol⁻¹.

On a donc :

$$\Delta E_{adiab}^{\pi} = \Delta E_{vert}^{\pi} - 17 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

La figure II.5.2 représente la correction à appliquer pour obtenir l'énergie d'un transfert adiabatique à partir de celle du transfert vertical.

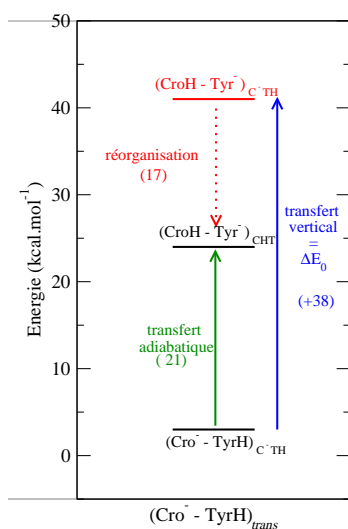


FIG. II.5.2 – Schéma des différentes énergies calculées (avec le chromophore en conformation *trans*) dans le vide. L'énergie de référence est celle du couple Cro⁻ - TyrH, dans sa géométrie optimisée en conformation *cis*.

Les énergies de transfert de proton verticales (ΔE_{vert}^{π}) et adiabatiques (ΔE_{adiab}^{π}) calculées sur les 1000 snapshot extraits de la dynamique sont représentées sous la forme d'histogramme sur la figure II.5.3.

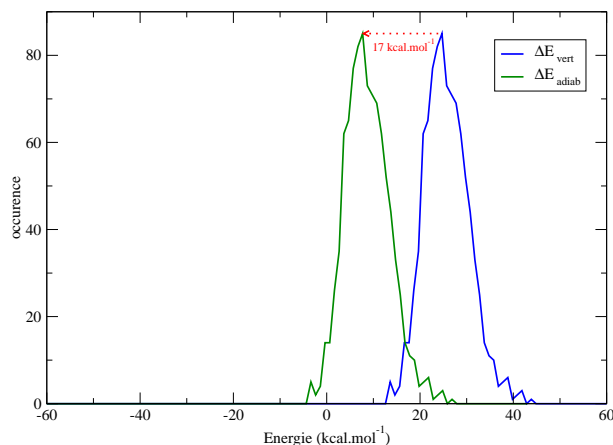


FIG. II.5.3 – Histogrammes des valeurs de ΔE_{vert}^{π} (en bleu) et ΔE_{adiab}^{π} (en vert) calculés dans la dynamique de Padron, effectuée avec le chromophore anionique en conformation *trans* et Tyr159 neutre.

Sur cette figure, l’histogramme bleu correspond au transfert vertical, on trouve une énergie de transfert moyenne de $25.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ avec un écart-type de $4.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Dans le cas du transfert adiabatique, qui correspond à l’histogramme vert, l’énergie de transfert moyenne est à $8.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, avec le même écart-type que dans le cas vertical.

Dans l’hypothèse d’un transfert vertical, on trouve une différence d’énergie toujours positive, donc toujours défavorable, alors que dans l’hypothèse d’un transfert adiabatique, 2.5% des snapshots présentent une différence d’énergie négative, donc favorable au transfert de proton.

Calculs dans l’environnement adapté au couple chromophore neutre, tyrosine anionique

Les calculs précédents ont été effectués à partir d’une dynamique de Padron où le chromophore est anionique et la tyrosine neutre. L’environnement des partenaires est donc adapté à cet état. Dans le but d’estimer des énergies de transfert dans un environnement favorable à l’état après le transfert de proton, $\text{CroH} - \text{Tyr}^{-}$, nous avons réalisé des dynamiques de la protéine avec le chromophore sous sa forme neutre et Tyr159 sous sa forme anionique.

Pour ce faire, nous avons créé deux champs de force : un pour la tyrosine anionique et un pour le chromophore neutre, en conformation *trans*. Pour déterminer ces champs de force, nous avons utilisé la méthodologie décrite dans l’annexe A.3. Comme pour les dynamiques de Padron avec le chromophore *trans* anionique, nous avons réalisé 4 dynamiques de 8 ns.

Dans une partie de ces dynamiques, on observe un réarrangement de la tyrosine anionique : le phénolate de la chaîne latérale se réoriente vers le solvant ce qui entraîne un éloignement de la tyrosine du chromophore et la rupture de la liaison hydrogène entre les deux partenaires. Lorsque ce réarrangement survient, il est définitif et du fait de l’éloignement des deux partenaires, le transfert de proton est alors impossible. Dans ce qui suit, nous n’avons tenu compte que des snapshots où la distance entre l’oxygène du phénolate de la tyrosine et l’oxygène du phénol du chromophore est inférieure à 3.2 \AA .

Comme précédemment, nous avons extrait 1000 snapshots de la dynamique moléculaire. Pour chaque snapshot, nous avons fait deux calculs quantiques, l'un où le système quantique est dans l'état de protonation (CroH - Tyr⁻), et l'autre après le transfert de proton du chromophore vers la tyrosine anionique. Nous obtenons ainsi une différence d'énergie :

$$\Delta E_0^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{CHT}^-}^\pi - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{CHT}^-}^\pi$$

Et cette fois ci, la géométrie des deux partenaires est une géométrie qui fluctue autour de la géométrie d'équilibre du couple (CroH - Tyr⁻). Or, le phénomène qui nous intéresse est le transfert de proton depuis la tyrosine neutre vers le chromophore anionique, l'état de départ est Cro⁻ - TyrH et doit donc être dans sa géométrie propre *C⁻TH*.

Dans le cas du transfert vertical, la variation d'énergie à calculer est donc :

$$\Delta E_{\text{vert}}^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{C-TH}} - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-TH}}$$

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{vert}}^\pi &= \Delta E_0^\pi + [(\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{C-TH}} - (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{CHT}^-}] \\ &\quad - [(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-TH}} - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{CHT}^-}] \end{aligned}$$

Et dans le cas du transfert adiabatique :

$$\Delta E_{\text{adiab}}^\pi = (\text{CroH} - \text{Tyr}^-)_{\text{CHT}^-} - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-TH}}$$

$$\Delta E_{\text{adiab}}^\pi = \Delta E_0^\pi - [(\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{C-TH}} - (\text{Cro}^- - \text{TyrH})_{\text{CHT}^-}]$$

Comme dans le cas précédent, nous avons utilisé les résultats des calculs d'énergie des deux partenaires dans le vide réalisés dans la partie II.3 et nous obtenons ainsi :

$$\Delta E_{\text{adiab}} = \Delta E_0 + 18 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

et

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{vert}} &= \Delta E_0 + 17 \text{ kcal.mol}^{-1} + 18 \text{ kcal.mol}^{-1} \\ \Delta E_{\text{vert}} &= \Delta E_0 + 35 \text{ kcal.mol}^{-1} \end{aligned}$$

La figure II.5.4 schématise les corrections à apporter à l'énergie calculée ΔE_0^π dans la dynamique CroH - Tyr⁻ pour obtenir les énergies de transfert adiabatique et vertical.

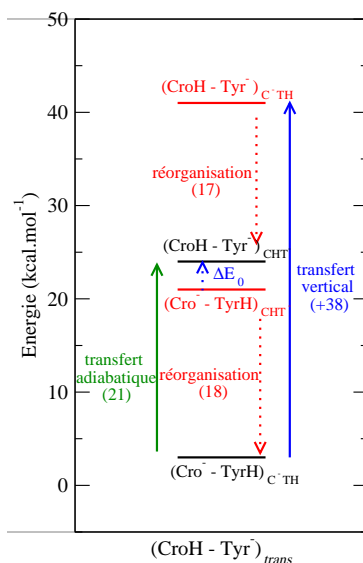


FIG. II.5.4 – Schéma des différentes énergies calculées (avec le chromophore en conformation *trans*) dans le vide. L'énergie de référence est celle du couple Cro⁻ - TyrH, dans sa géométrie optimisée en conformation *cis*.

Les histogrammes des énergies de transfert de proton vertical ou adiabatique obtenues sur les 1000 snapshots tirés aléatoirement au cours de la dynamique moléculaire de la protéine Padron pour l'état de protonation (CroH - Tyr⁻) en conformation *trans* sont donnés dans la figure II.5.5.

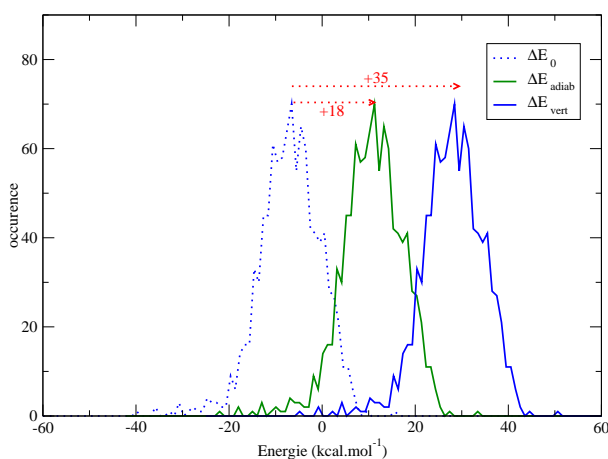


FIG. II.5.5 – Histogrammes des valeurs de ΔE_0^π (en pointillé bleu), ΔE_{vert}^π (en trait plein bleu) et ΔE_{adiab}^π (en trait plein vert) calculés dans les dynamiques de Padron effectuées avec le chromophore neutre *trans* et Tyr159 anionique.

Dans le cas du transfert vertical (en bleu sur la figure), la différence d'énergie moyenne calculée est de $27.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et l'écart type vaut $6.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Dans le cas du transfert adiabatique (en vert sur la figure), l'énergie moyenne vaut $10.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ avec le même écart-type que dans le cas vertical.

Dans l'hypothèse d'un transfert vertical, on trouve une différence d'énergie supérieure à 0 dans 99,9% des cas : le transfert est donc très majoritairement défavorable. Dans le cas d'un transfert adiabatique, on trouve que dans 4% des snapshots, la différence d'énergie est inférieure à 0 et donc favorable au transfert de proton.

Conclusion sur le transfert de proton dans la protéine Padron, avec le chromophore en conformation *trans*.

Si on considère un transfert de proton vertical, on trouve que le transfert est défavorable dans 100% des cas dans l'environnement adapté à l'état de protonation $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$ et dans 99.9% des cas dans l'environnement adapté à $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$. Les énergies moyennes calculées dans ces deux environnements valent respectivement 25.2 et 27.5 kcal.mol⁻¹.

Dans l'hypothèse d'un transfert adiabatique, on trouve que le transfert est défavorable dans 97.5% des cas dans l'environnement adapté à $\text{Cro}^- - \text{TyrH}$ et 96% des cas dans celle avec l'environnement adapté à $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$. Les coûts moyens en énergie sont respectivement de 8.2 kcal.mol⁻¹ et 10.5 kcal.mol⁻¹.

Dans les calculs avec l'environnement adapté à la géométrie ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$), on trouve de façon inattendue que le transfert n'est pas plus favorable que dans l'environnement adapté à la géométrie ($\text{Cro}^- - \text{TyrH}$). Ceci peut s'expliquer par la position relative des cycles du phénol et du phénolate. Pour être favorable, le transfert de proton doit s'effectuer le long de la liaison hydrogène, de façon à préserver cette liaison. Les conditions géométriques idéales pour le transfert de proton sont une distance $\text{OH}_{cro} - \text{OH}_{tyr}$ inférieure à 3.2 Å, un angle $\text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{tyr}$ proche de 109° et un angle dièdre $\text{CE1}_{cro} - \text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{tyr}$ proche de 0°.

Dans le cas de la dynamique avec le chromophore neutre et la tyrosine anionique nous avons suivi l'angle $\text{CZ}_{tyr} - \text{OH}_{tyr} - \text{OH}_{cro}$ et l'angle dièdre $\text{CE1}_{tyr} - \text{CZ}_{tyr} - \text{OH}_{tyr} - \text{OH}_{cro}$.

La nomenclature utilisée est présentée sur la figure II.5.6 et la figure II.5.7 montre les valeurs prises par ces grandeurs dans les deux dynamiques. Dans le cas de la dynamique $\text{CroH} - \text{Tyr}^-$, seuls les snapshots où la longueur $\text{OH}_{cro} - \text{OH}_{tyr}$ est inférieure à 3.2 Å sont pris en compte.

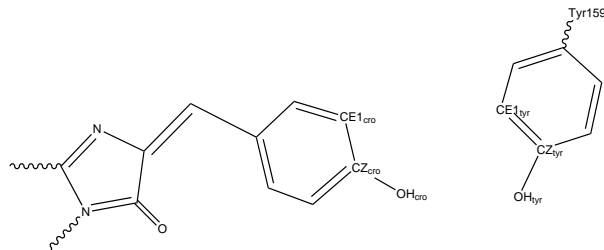


FIG. II.5.6 – Schéma du transfert de proton dans le cas du chromophore *trans*.

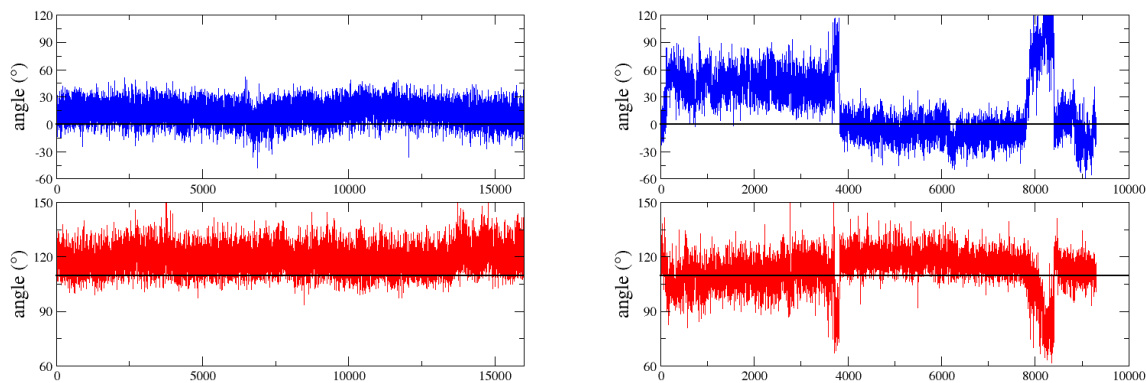


FIG. II.5.7 – Paramètres de la liaison hydrogène entre le chromophore et la tyrosine dans les dynamiques moléculaires de la protéine Padron avec le chromophore *trans*. A gauche : dynamique dans l'état de protonation ($\text{Cro}^- - \text{TyrH}$). A droite : dynamique dans l'état de déprotonation ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$). En rouge : angle $\text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{Tyr}$ (en $^\circ$) . En bleu : angle dièdre $\text{CE1}_{cro} - \text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{tyr}$ (en $^\circ$). Le nom des atomes est précisé sur la figure II.5.6. Les lignes représentent pour chaque graphique la valeur idéale pour avoir un transfert de proton qui maintienne la liaison hydrogène.

Sur cette figure, on peut voir que dans le cas des dynamiques ($\text{Cro}^- - \text{TyrH}$) (à gauche), le transfert se fait en conservant la liaison hydrogène : l'angle est toujours proche de 109° , et l'angle dièdre de 0° , ce qui n'est pas le cas dans les dynamiques dans l'état de déprotonation ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$) (à droite). Dans ces dernières, l'angle dièdre est nettement différent de 0 pendant la moitié du temps. Ce changement d'orientation relative des cycles explique pourquoi malgré un environnement plus favorable, le transfert est défavorisé.

Au final, dans le cas de Padron, avec le chromophore en conformation *trans*, on trouve que l'énergie de transfert n'est pratiquement jamais favorable au transfert quel que soit l'environnement. Par contre, dans l'hypothèse d'un transfert adiabatique, où le système chromophore - tyrosine a le temps de se relaxer, on trouve quelques pourcents de cas favorable. Ce faible pourcentage est cohérent avec les spectres d'absorption expérimentaux, qui montrent une absorption nulle ou très faible dans la bande du chromophore neutre.

II.5.2 Dynamique de Padron avec le chromophore isomérisé en conformation *cis*.

Nous nous intéressons ici à la dynamique de la protéine et du chromophore après l'isomérisation *trans* \rightarrow *cis*, celle-ci ayant été obtenue par des simulations dont le point de départ est la protéine Padron, avec le chromophore dans l'état fondamental, en conformation *trans*. Pour ces dynamiques, nous avons suivi la même démarche pour déterminer si le chromophore est susceptible d'arracher le proton de Tyr159 après l'isomérisation, dans l'état fondamental.

Ces simulations qui ont été réalisées dans les dernières années, comportent 4 étapes :

Etape 1 - On effectue des dynamiques moléculaire de la protéine avec le chromophore en conformation *trans*, anionique à l'état S_0 , dans lesquelles on extrait des snapshots.

Etape 2 - En prenant ces snapshots comme point de départ, on démarre des simulations avec le chromophore à l'état S_1 . Ces dynamiques sont réalisées avec le potentiel NADiA. Dans ces dynamiques, on observe fréquemment des torsions des angles τ et φ . Les snapshots où le chromophore présente une torsion τ de l'ordre de 90° , c'est-à-dire ceux susceptibles de mener le chromophore à une conversion interne vers l'état S_0 puis à une isomérisation sont extraits.

Etape 3 - On suppose que dans les snapshots sélectionnés à l'étape précédente, le chromophore subit effectivement une conversion interne. En prenant ces snapshots comme points de départ, on lance des simulations à l'état S_0 . Dans ces simulations, le chromophore part de géométries très fortement twistées, les deux cycles étant quasiment perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. Pour réaliser ces dynamiques, on utilise un potentiel de torsion couplé mis au point dans le groupe[62]. Ce potentiel de torsion couplé couvre tout l'espace de variation des angles τ et φ . On observe une arrivée en conformation *cis* (τ proche de 180°) dans une petite fraction de ces simulations. Il apparaît qu'au moment de l'arrivée en conformation *cis*, le chromophore a conservé sa liaison hydrogène avec Tyr159. Nous avons extrait des snapshots correspondant à ce type de situation.

Etape 4 - A partir des snapshots issus de la troisième étape, nous avons réalisé 48 dynamiques de 2 ns des simulations de l'état S_0 du chromophore anionique *cis*. Il s'agit de dynamiques moléculaires de relaxation du système, dans lesquels l'environnement va s'adapter à la conformation *cis* du chromophore. Sur ces 48 simulations nous avons observé la rupture de la liaison hydrogène entre le chromophore et Tyr159 dans 26 cas et l'établissement de la liaison hydrogène entre le chromophore et Ser142 dans 14 cas.

Les calculs de l'énergie de transfert de proton ont été réalisés sur les dynamiques de l'étape 4. Nous n'avons retenu que les parties de ces dynamiques où la liaison hydrogène entre le chromophore et la tyrosine reste établie (en prenant comme critère d'existence de la liaison hydrogène que la distance entre les deux oxygènes soit inférieure à 3.2 \AA). On retient ainsi 58% du temps total de simulation de l'étape 4.

Le chromophore de la protéine adoptant ici une conformation *cis*, le champ de force du chromophore a été adapté à cette conformation. Les valeurs d'équilibre des angles du pont ont été modifiées par rapport au chromophore en conformations *trans*.

Comme précédemment, nous avons effectué les dynamiques moléculaires soit avec ($\text{Cro}^- - \text{TyrH}$) soit ($\text{CroH} - \text{Tyr}^-$). Pour chacune de ces dynamiques moléculaires, nous avons tiré aléatoirement 1000 snapshots parmi ceux où la liaison hydrogène chromophore tyrosine existe. Pour chaque snapshot, nous avons calculé une différence d'énergie de transfert de proton selon les hypothèses d'un transfert vertical ou d'un transfert adiabatique suivant la même méthode que dans le cas du chromophore en conformation *trans*.

Dynamique Cro^- - TyrH

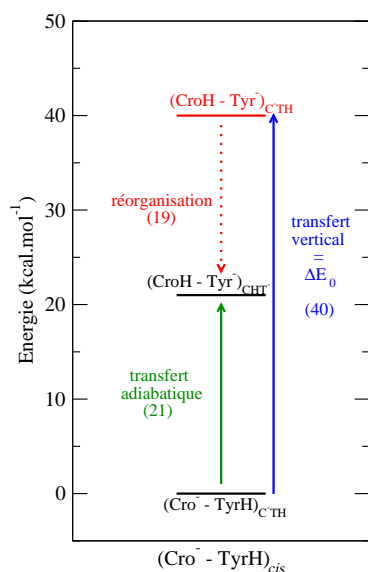


FIG. II.5.8 – Schéma des énergies pour le couple chromophore *cis* anionique, tyrosine neutre dans le vide. L'énergie de référence est celle du couple $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})$ en conformation *cis*.

Les histogrammes des énergies de transfert de proton adiabatique et vertical au cours des dynamiques moléculaires dans l'état de protonation $(\text{Cro}^- - \text{TyrH})$ sont donnés sur la figure II.5.8.

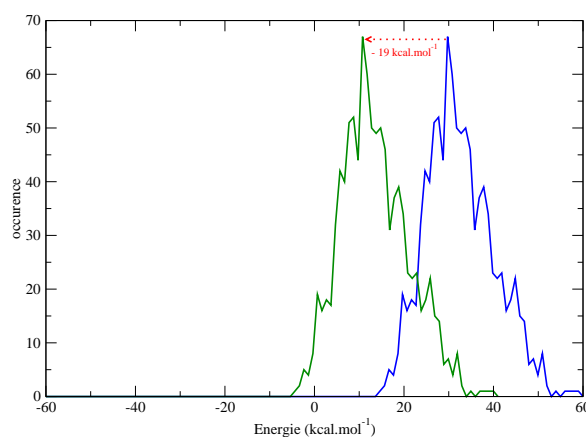


FIG. II.5.9 – Histogrammes des valeurs de ΔE_{vert}^{π} (en bleu) et ΔE_{adiab}^{π} (en vert) calculés dans les dynamiques avec le chromophore *cis* anionique et la tyrosine neutre.

Dans ces dynamiques, on trouve que le coût moyen pour le transfert vertical (ΔE_{vert}^{π}) vaut $32.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ avec un écart-type de $7.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Dans le cas d'un transfert adiabatique, Le ΔE_{adiab}^{π} moyen calculé vaut $13.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Dans l'hypothèse d'un transfert vertical, on trouve une différence d'énergie toujours positive. Il n'y a donc aucun snapshot dans lequel le transfert est trouvé favorable. Dans le cas d'un transfert adiabatique, seuls 2% des snapshots tirés aléatoirement présentent une différence d'énergie négative et sont donc trouvés favorables au transfert de proton.

Dynamique CroH - Tyr⁻

Comme précédemment, nous avons réalisé des dynamiques de la protéine Padron avec le chromophore en conformation *cis*, sous sa forme neutre et la tyrosine anionique, de manière à avoir des calculs dans un environnement favorable à la forme CroH - Tyr⁻. Le champ de force du chromophore *cis*, neutre est déterminé selon la méthodologie décrite dans les annexes A.3. Pour la tyrosine anionique, nous avons procédé de la même façon. Les charges des atomes sont indiquées dans l'annex A.3.

La figure II.5.10 rappelle l'origine et les valeurs des corrections apportées pour obtenir les énergies de transfert vertical et adiabatique dans la conformation *cis* du chromophore de Padron.

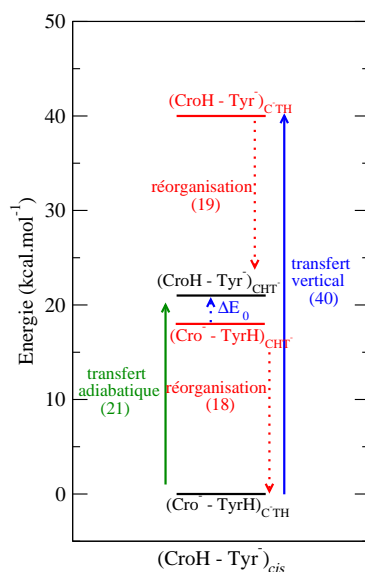


FIG. II.5.10 – Schéma des énergies pour le couple chromophore *cis* neutre, tyrosine anionique. L'énergie de référence est celle du couple (Cro⁻ - TyrH), en conformation *cis*.

Les histogrammes des énergies calculées sur les 1000 snapshots issus de la dynamique moléculaire de la protéine Padron, avec le chromophore en conformation *cis*, neutre et la tyrosine anionique sont représentés sur la figure II.5.11.

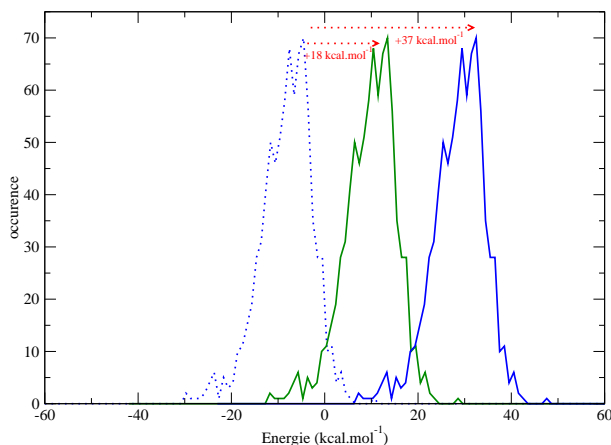


FIG. II.5.11 – Histogrammes des valeurs de ΔE_0^π (en pointillé bleu), ΔE_{vert}^π (en trait plein bleu) et ΔE_{adiab}^π (en trait plein vert) calculés dans les dynamiques (CroH - Tyr⁻), avec le chromophore en conformation *cis*.

Dans cette dynamique, on trouve que le ΔE_{vert}^π moyen vaut 28.3 kcal.mol⁻¹ avec un écart-type de 5.6 kcal.mol⁻¹. Dans le cas du transfert adiabatique, le coût moyen du transfert calculé est de 9.3 kcal.mol⁻¹.

Pour le transfert vertical, on ne trouve aucun cas où la différence d'énergie est inférieure à 0, ce qui signifie que dans cette hypothèse le transfert n'est jamais favorable. Dans le cas du transfert adiabatique, 4.8% des snapshots sont trouvés avec un ΔE_{adiab}^π négatif.

Conclusion sur le transfert de proton dans la protéine Padron, avec le chromophore en conformation *cis*.

Si on considère un transfert de proton vertical, on trouve que le transfert est défavorable quelque soit l'environnement considéré : les énergies moyennes de transfert de proton calculées entre les deux états valent 32.1 kcal.mol⁻¹ dans l'environnement adapté à (Cro⁻ - TyrH) et 28.3 kcal.mol⁻¹ dans l'environnement adapté à (CroH - Tyr⁻). Nous n'avons trouvé aucun snapshot dans lequel le transfert soit favorable.

Dans le cas d'un transfert adiabatique, on trouve que les coûts moyens en énergie calculés sont respectivement de 8.2 ± 4.8 kcal.mol⁻¹ et 13.1 ± 7.7 kcal.mol⁻¹. Le transfert est défavorable dans 98% des cas dans les dynamiques (Cro⁻ - TyrH) et 95% des cas dans celles avec l'environnement (CroH - Tyr⁻).

Conclusion et discussion sur la protonation du chromophore de Padron :

Les coûts moyens de transfert de proton calculés dans les dynamiques et les pourcentages de cas favorables au transfert sont résumés dans le tableau II.8.

		(a)	(b)	(c)	(d)
	état de protonation dans la dynamique	(Cro ⁻ - TyrH)		(CroH - Tyr ⁻)	
		Vertical	Adiabatique	Vertical	Adiabatique
chromophore <i>trans</i>	% cas favorable	0.0	2.5	0.1	4.0
	ΔE^π	25.2±4.8	8.2±4.8	27.6±6.6	10.5±6.6
chromophore <i>cis</i>	% cas favorable	0.0	2.0	0.0	4.8
	ΔE^π	32.1±7.7	13.1±7.7	28.3±5.6	9.3±5.6

TAB. II.8 – Pourcentage de conformations favorables au transfert vertical ou adiabatique au cours de la dynamique moléculaire. Valeur moyenne et écart-type de l'énergie associée au transfert ΔE^π . (a) et (b) : dynamique moléculaire adaptée à l'état de protonation (Cro⁻ - TyrH). (c) et (d) dynamique moléculaire adaptée à l'état de protonation (CroH - Tyr⁻).

Les valeurs moyennes des énergies de transfert vertical et adiabatique sont toujours positives donc défavorables au transfert de proton. Le fait que l'environnement protéique soit adapté à l'état final du transfert ne rend pas systématiquement ces valeurs moyennes plus basses. Nous avons montré que l'orientation relative des cycles phénol et phénolate au cours de la dynamique joue un rôle important.

On remarque tout d'abord qu'on trouve pratiquement le même pourcentage de cas favorable au transfert de proton dans le cas du chromophore *trans* que dans le cas du chromophore *cis*.

Dans l'hypothèse d'un transfert vertical, on ne trouve aucun cas favorable. Par contre dans le cas d'un transfert adiabatique (c'est-à-dire que le transfert est suffisamment lent pour que les deux partenaires aient le temps de se relaxer), on trouve quelques pourcents de cas favorables.

La durée du transfert de proton de H₂O vers OH⁻ a été estimée à 20-30 femtosecondes par Tuñón et al[63]. Cette durée est faible par rapport aux temps caractéristiques des vibrations moléculaires, sauf pour celles des liaisons impliquant un hydrogène. Il y a donc vraisemblablement une relaxation partielle de la géométrie des partenaires au cours du transfert et la réalité est intermédiaire entre les hypothèses verticale et adiabatique.

Nous avons calculé ici les différences d'énergie entre l'état après transfert et l'état avant transfert, mais nous n'avons pas estimé les barrières. Dans le cas des transferts de proton le long d'une liaison hydrogène intermoléculaire, les barrières énergétiques sont comprises entre 1 et 7 kcal.mol⁻¹[64]. On ne peut donc pas écarter qu'il puisse y avoir des situations où la différence d'énergie est favorable, mais pour lesquelles il y a une barrière empêchant le transfert. Les pourcentages que nous trouvons sont donc des bornes supérieures des pourcentages de cas où le transfert a effectivement lieu.

Les spectres d'absorption expérimentaux montrent que la forme neutre est quasi absente dans le cas du chromophore *trans*, et de poids semblable à la forme anionique dans le cas du chromophore *cis*. Par contre, nos calculs montrent que la probabilité de transfert de proton de Tyr159 vers le chromophore anionique est au maximum de quelques pourcents, quel que soit la conformation du chromophore. Nous pouvons donc conclure que l'équilibre entre les formes anionique et neutre du chromophore ne provient pas, ou alors de façon très marginale d'un transfert de proton depuis Tyr159.

II.6 Voisinage du chromophore en conformation *cis* et *trans*

Dans cette partie, nous comparons les environnements du chromophore au cours de la dynamique en fonction qu'il soit en conformation *cis* ou *trans*. Plus précisément, nous nous intéressons aux liaisons hydrogène sur les oxygènes du phénolate du chromophore et du phénol de la tyrosine, autres que celle établie entre eux. En effet, dans la partie II.4, nous avons montré que dans le système $[\text{H}_2\text{O}, \text{OH}^-, \text{Wat}']$ une molécule d'eau en liaison hydrogène avec le donneur de proton (H_2O) pouvait rendre favorable un transfert de proton vers OH^- alors que si elle est en liaison hydrogène avec OH^- elle défavorise le transfert et on espère un effet similaire dans le cas du chromophore et de la tyrosine.

Le tableau II.9 présente le pourcentage des snapshots où l'on trouve des liaisons hydrogène entre des molécules d'eau et l'oxygène du phénolate du chromophore et/ou avec l'oxygène du phénol de Tyr159 dans la dynamique avec le chromophore anionique *trans*.

Les critères d'existence de liaison hydrogène que nous avons choisis sont une distance oxygène-oxygène inférieure à 3.2 Å et un angle Oxygène - Hydrogène - Oxygène supérieur à 120°. Par la suite, nous utiliserons la notation LH pour parler de Liaison Hydrogène.

Chromophore en conformation *trans*.

	0 LH sur le chromophore	1 LH sur le chromophore
0 LH sur Tyr159	2.4%	91.5%
1 LH sur Tyr159	0.1%	6.0%

TAB. II.9 – Pourcentage des cas où nous observons 0 ou 1 liaison hydrogène d'une molécule d'eau sur le chromophore ou sur Tyr159 dans les dynamiques de Padron avec le chromophore anionique en conformation *trans*.

On peut voir dans ce tableau que les situations où une liaison hydrogène avec une molécule d'eau serait susceptible de favoriser le transfert (une liaison hydrogène sur le chromophore et aucune sur le chromophore) ne représentent que 0.1% des snapshots. Ces snapshots étant très rares, il s'avère que parmi les 1000 snapshots pour lesquels nous avons calculé le coût du transfert de proton, aucun ne fait partie de cette catégorie. Dans 97.5% des snapshots, on trouve une liaison hydrogène entre le phénolate du chromophore et une molécule d'eau, ce qui est défavorable au transfert.

En analysant les dynamiques plus en détail, il s'avère que c'est toujours la même molécule d'eau qui est en liaison hydrogène avec le chromophore. Elle est donc très stabilisée dans la protéine. La figure II.6.1 représente une configuration issue des dynamiques de la protéine Padron avec le chromophore en conformation *trans*.

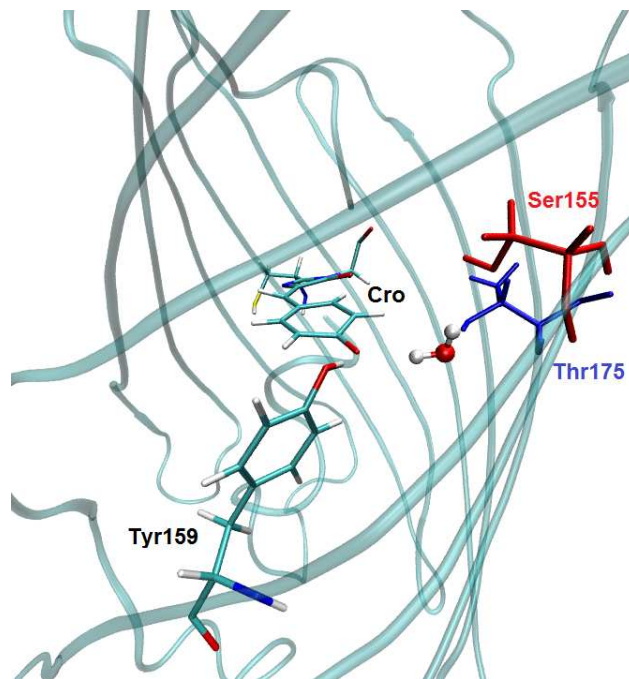


FIG. II.6.1 – Configuration de l’environnement du phénolate du chromophore en conformation *trans* dans les dynamiques de la protéine Padron.

Sur cette figure, on voit que l’oxygène du phénolate est dans un environnement fermé, où la molécule d’eau avec laquelle le chromophore est en liaison hydrogène est à l’intérieur du tonneau β . Cette molécule d’eau n’est pas en contact avec le solvant et en plus du chromophore, elle établit des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales de Ser155 (en rouge sur la figure) et Thr175 (en bleue). Elle est piégée en permanence à l’intérieur de la protéine. Ceci explique le très fort pourcentage de liaison hydrogène avec le chromophore (97.5%).

Chromophore en conformation *cis*

Pour rappel, nous avons réalisé 48 dynamiques de 2 ns avec le chromophore en conformation *cis*. Ici, on ne regarde que les configurations où la relaxation n’a pas eu lieu, c’est-à-dire où le chromophore est toujours en liaison hydrogène avec la tyrosine.

	0 LH sur le chromophore	1 LH sur le chromophore	2 LH sur le chromophore	3 LH sur le chromophore
0 LH sur Tyr159	3.8	48.2	19.3	0.2
1 LH sur Tyr159	2.9	19.3	5.9	0.1
2 LH sur Tyr159	0.1	0.1	0.1	0

TAB. II.10 – Pourcentage de cas où nous observons 0 ou 1 liaison hydrogène d’une molécule d’eau sur le chromophore ou sur Tyr159 dans les dynamiques de Padron avec le chromophore anionique en conformation *cis*.

Dans les dynamiques avec le chromophore anionique *cis*, on trouve 3% des snapshots dans lesquels Tyr159 est en liaison hydrogène avec une ou plusieurs molécules d’eau et dans lesquels le

chromophore n'en établit aucune. Ces configurations sont celles que nous avons identifiées comme pouvant être plus favorables à un transfert de proton depuis la tyrosine vers le chromophore dans la partie II.4.

Parmi les snapshots que nous avons tirés au hasard pour effectuer les calculs d'énergie de transfert, plusieurs correspondent à ce critère. L'un d'eux est représenté sur la figure II.6.2.

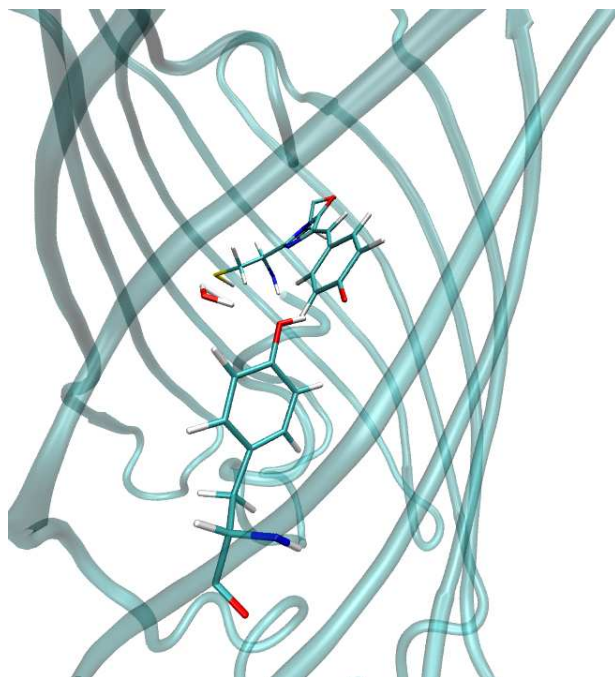


FIG. II.6.2 – Configuration considérée comme pouvant être favorable à un transfert de proton.

Sur cette figure, on peut voir que Tyr159 et l'oxygène du phénolate du chromophore sont en liaison hydrogène. On voit aussi que seule Tyr159 établit une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. Pourtant, on trouve que l'énergie du système après transfert est 33 kcal.mol^{-1} plus haute qu'avant le transfert. Malgré la molécule d'eau qui stabilise Tyr159 sous sa forme anionique après le transfert, la différence d'énergie est trouvée défavorable. Ceci peut s'expliquer par la position relative du chromophore et de Tyr159 : dans cette conformation, les deux cycles sont dans des positions à peu près perpendiculaires. Le proton transféré doit se lier à l'oxygène du phénolate du chromophore et donc se trouver dans le plan de ce cycle ou proche de ce plan. L'angle oxygène - hydrogène - oxygène est alors proche de 90° et donc très défavorable à une liaison hydrogène : la LH entre le chromophore et la tyrosine est alors perdue, ce qui contribue à déstabiliser le transfert de proton.

Comme pour le cas des dynamiques réalisées avec le chromophore en conformation *trans*, neutre et la tyrosine anionique, nous avons quantifié le nombre de cas où une telle situation existe. Pour cela, nous avons calculé au cours des dynamiques moléculaires avec le chromophore en conformation *cis* la distance entre les deux oxygènes, l'angle $\text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{Tyr}$ et l'angle dièdre $\text{CE1}_{cro} - \text{CZ}_{cro} - \text{OH}_{cro} - \text{OH}_{Tyr}$. Les noms d'atomes utilisés sont les mêmes que dans la partie II.5 et sont donnés sur la figure II.5.6.

Les valeurs de ces angles correspondant à une situation favorable au transfert de proton sont voisines de 109° pour l'angle $CZ_{cro} - OH_{cro} - OH_{Tyr}$ et de 0° pour l'angle dièdre $CE1_{cro} - CZ_{cro} - OH_{cro} - OH_{Tyr}$.

Les valeurs de ces paramètres dans la dynamique avec le chromophore en conformation *cis*, quand la distance entre OH_{Tyr} et OH_{cro} est inférieure à 3.2 \AA sont présentées sur la figure II.6.3 (à droite). Les mêmes paramètres pour les dynamiques moléculaires de la protéine Padron avec le chromophore en conformation *trans* sont représentés sur la même figure (à gauche).

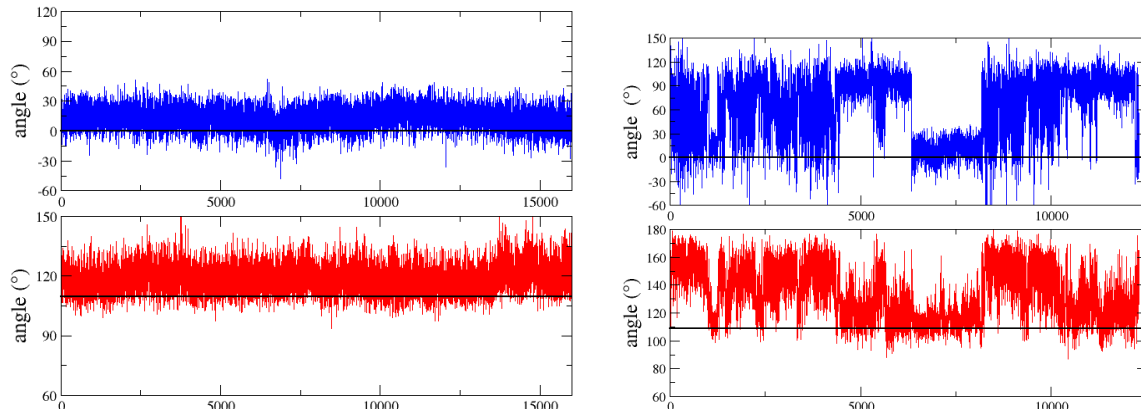


FIG. II.6.3 – Paramètres de la liaison hydrogène entre le chromophore et la tyrosine dans les dynamiques moléculaires de la protéine Padron effectuées avec le chromophore anionique. A gauche : conformation *trans* du chromophore. A droite : conformation *cis* du chromophore. En rouge : angle $CZ_{cro} - OH_{cro} - OH_{Tyr}$ (en $^\circ$). En bleu : angle dièdre $CE1_{cro} - CZ_{cro} - OH_{cro} - OH_{Tyr}$ (en $^\circ$). Le nom des atomes est précisé sur la figure II.5.6. Les lignes noires représentent pour chaque graphique la valeur idéale pour avoir un transfert de proton qui maintienne la liaison hydrogène.

On peut voir sur cette figure (à droite), que dans une grande partie des cas dans la dynamique du chromophore anionique, en conformation *cis*, au moins l'un des critères pour effectuer un transfert de proton tout en conservant la liaison hydrogène entre les deux partenaires n'est pas maintenu. Seuls 18,6% des snapshots permettent un transfert de proton tout en maintenant la liaison hydrogène. Pour rappel, seuls les snapshots où la liaison hydrogène est encore présente ont été utilisés pour calculer une différence d'énergie.

Au contraire, sur la figure II.6.3, à gauche on peut voir que dans le cas des dynamiques avec le chromophore en conformation *trans*, les paramètres pour pouvoir effectuer un transfert de proton et conserver la liaison hydrogène sont toujours proches des valeurs idéales.

La rupture fréquente de liaison hydrogène dans les dynamiques du chromophore *cis* pendant le transfert peut expliquer pourquoi le coût moyen du transfert est trouvé 7 kcal.mol^{-1} plus défavorable que dans le cas du chromophore *trans* d'après les valeurs tirées du tableau II.8). Cette valeur de 7 kcal.mol^{-1} est cohérente avec la stabilisation apportée par une liaison hydrogène, qui est comprise entre 3 et 8 kcal.mol^{-1} [57].

Dans la partie II.4, nous avons évalué l'effet d'une molécule d'eau sur un transfert de proton le long d'une liaison hydrogène sur le système $[H_2O, OH^-, Wat^*]$ et trouvé que cette molécule d'eau

pouvait favoriser le transfert de proton d'environ 20 kcal.mol^{-1} . Dans ce cas, tous les atomes étaient coplanaires, et le déplacement de l'hydrogène ne s'accompagnait jamais d'une rupture de la liaison hydrogène.

Chemin de molécule d'eau reliant le chromophore *cis* au solvant

Par ailleurs, on peut voir dans le tableau II.10 que dans le cas où le chromophore est en conformation *cis*, en liaison hydrogène avec Tyr159, le chromophore peut établir des liaisons hydrogène avec plusieurs molécules d'eau simultanément. Ceci montre que plusieurs molécules d'eau sont présentes dans l'environnement de l'oxygène du phénolate du chromophore *cis* ce qui n'est pas le cas dans la conformation *trans*. En effet, nous avons vu que dans le chromophore *trans*, la seule molécule d'eau en position d'interagir avec l'oxygène du phénolate du chromophore est piégée dans la protéine. Dans la conformation *cis*, la réorientation du chromophore rapproche le phénolate du cleft du tonneau β . On peut également remarquer que lors de la dynamique, le chromophore ne garde pas de liaison hydrogène avec une seule molécule d'eau mais que plusieurs se relaient autour du chromophore, y compris des molécules d'eau définies pour solvater la protéine. Ce phénomène est illustré sur la figure II.6.4.

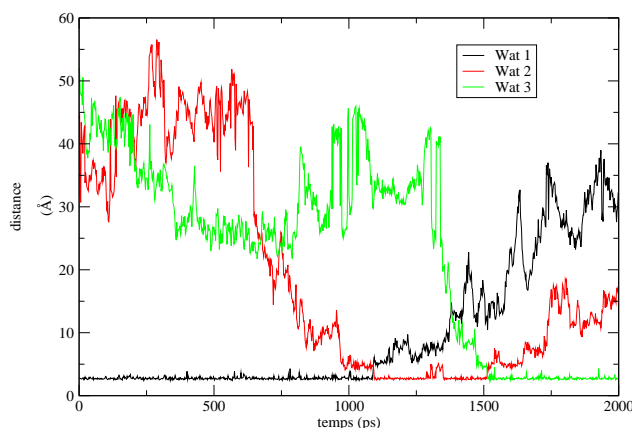


FIG. II.6.4 – Molécules d'eau successivement en liaison hydrogène avec l'oxygène du phénolate du chromophore au cours d'une dynamique de relaxation en conformation *cis* après isomérisation. En ordonnée : distance entre l'oxygène du chromophore et l'oxygène de la molécule d'eau.

Au cours de cette dynamique de 2 ns de Padron avec le chromophore anionique en conformation *cis*, après la relaxation de l'environnement, la liaison hydrogène avec Tyr159 est rompue et celle avec Ser142 établie. On peut voir qu'il y a presque toujours une molécule d'eau à une distance permettant d'établir une liaison hydrogène avec le chromophore. Au début, il s'agit de Wat1, puis après 1 nanoseconde, elle est rejointe par Wat2. Durant 100 picosecondes, les deux molécules d'eau restent proches du chromophore, puis Wat1 passe dans le solvant et est finalement remplacée par Wat2. Au bout de 400 ps, Wat2 est à son tour remplacée par Wat3. Ces deux molécules d'eau proviennent du solvant et s'échangent autour du chromophore au cours de la dynamique.

Nous avons cherché les voisins de la molécule Wat1 pendant les 1000 ps où elle est en liaison hydrogène avec le chromophore et nous avons trouvé qu'elle est presque toujours liée par une

liaison hydrogène à une autre molécule d'eau.

La figure II.6.5 représente les molécules d'eau proches de Wat1 au cours de la dynamique, pendant les 1000 picosecondes où Wat1 est liée au chromophore.

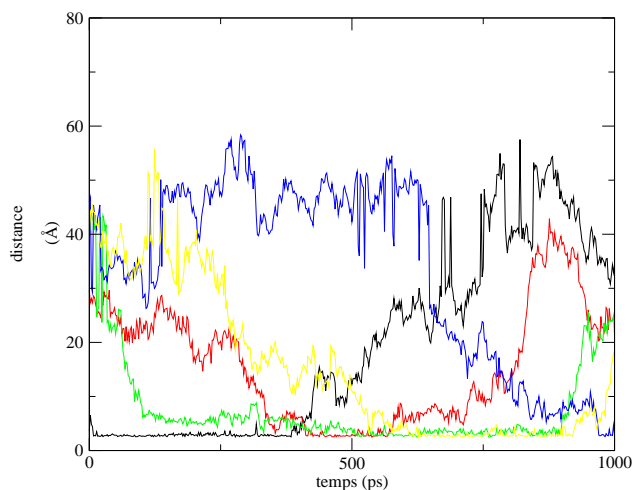


FIG. II.6.5 – Molécules d'eau en liaison hydrogène avec Wat1 pendant les 1000 ps où elle est liée au chromophore. En ordonnée : distance entre les oxygènes des molécules d'eau et l'oxygène de Wat1.

Sur les 1000 picosecondes où Wat1 est liée au chromophore, on voit que 5 molécules d'eau se succèdent dans son voisinage et l'examen visuel par VMD montre qu'elles sont dans la zone du cleft, en contact avec le solvant. Au total, il y a une circulation de molécules d'eau entre l'extrémité phénolate du chromophore et le solvant et presque à tout instant, il y a une chaîne de molécule d'eau reliant le phénolate au solvant. Une de ces chaînes est représentée sur la figure II.6.6.

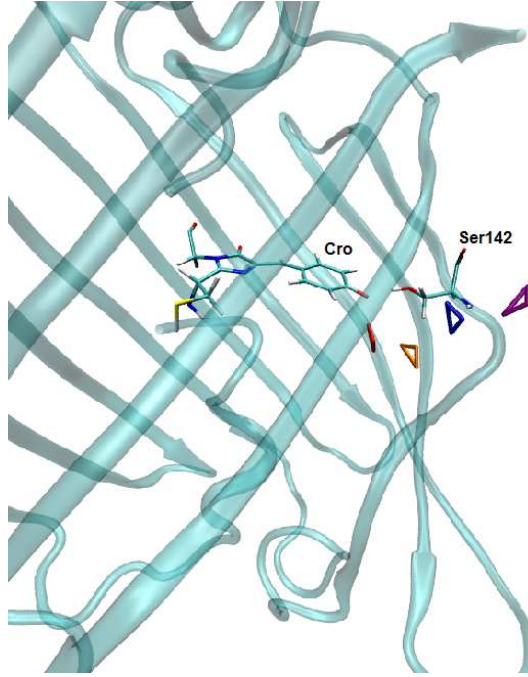


FIG. II.6.6 – Exemple d’un chemin de molécules d’eau entre le phénolate du chromophore et le solvant dans les dynamiques de Padron, avec le chromophore *cis*, anionique

Sur cette figure, on peut voir que l’oxygène anionique du phénolate du chromophore est en liaison hydrogène avec une molécule d’eau (en rouge sur la figure). Cette molécule d’eau est elle même acceptrice de liaison hydrogène avec une autre molécule d’eau (en orange). Ce chemin de liaison hydrogène se propage ainsi à travers les molécules d’eau bleue, puis violette et conduit jusqu’au solvant. Si on suppose un transfert de proton depuis la molécule d’eau violette vers la bleue, puis de la bleue vers la orange, de la orange vers la rouge et finalement de la molécule d’eau rouge vers le chromophore, nous avons donc un chemin de transfert de proton, du solvant vers le chromophore. Ce chemin de transfert de proton conduit *in-fine* à faire apparaître une charge négative sur une des molécules d’eau, mais cette dernière étant dans le solvant, sa charge négative est stabilisée par de nombreuses interactions avec d’autres molécules d’eau.

Nous en concluons qu’un mécanisme probable expliquant l’équilibre de protonation anion-neutre du chromophore en conformation *cis*, dans la protéine Padron est un échange de proton via un chemin de molécule d’eau avec le solvant. Un tel mécanisme a déjà été mis en évidence par Shinobu et Agmon[65] dans l’étude du transfert de proton à partir du chromophore à l’état excité de la GFP.

II.7 Conclusion

Dans cette étude, nous avons calculé l’affinité protonique du chromophore isolé dans différentes géométries. Nous trouvons une affinité protonique du chromophore *trans* de $328.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et de $329.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le chromophore *cis*. Une plus forte affinité protonique du chromophore *cis* signifie une plus grande stabilisation en cas de transfert de proton sur le chromophore en

conformation *cis* que *trans*. Cependant, du fait de la stabilisation par conjugaison du chromophore anionique, l'affinité protonique du chromophore plan est bien inférieure à celle du phénol. Pour une torsion $\tau = 90^\circ$, l'affinité protonique du chromophore est trouvée diminuée de 11 kcal.mol^{-1} . Au contraire, dans le cas d'une torsion $\varphi = 90^\circ$ on trouve une augmentation de l'affinité protonique de presque 18 kcal.mol^{-1} par rapport au chromophore plan.

Cela montre qu'au cours de l'isomérisation, qui implique une torsion τ , la capacité du chromophore twisté à capter un proton est réduite, ce qui tend à montrer que l'isomérisation et la protonation du chromophore sont deux mécanismes successifs et séparés dans le temps : dans un premier temps, il va y avoir isomérisation du chromophore de la géométrie *trans* vers la géométrie *cis*. Puis dans un second temps un transfert de proton, qui va mener à un équilibre entre la forme anionique et la forme neutre du chromophore.

Nous avons également montré sur un modèle simple (H_2O , OH^- , Wat) que dans le cas où une molécule est donneuse de liaison hydrogène sur le donneur potentiel de proton, cela pouvait aboutir à rendre le transfert de proton plus stable d'environ 20 kcal.mol^{-1} et ainsi compenser la différence d'affinité protonique calculée entre le phénol de Tyr159 et le chromophore.

En réalisant des dynamiques moléculaires de la protéine Padron, avec le chromophore dans ses conformation *cis* et *trans* et sous ses formes neutre et anionique, nous avons calculé le coût du transfert de proton en fonction de la conformation du chromophore et de l'environnement. Ces calculs ont montrés que en terme d'énergie, le transfert est plus défavorable dans la conformation *cis* du chromophore que dans la conformation *trans*. En comparant les environnements des deux conformations du chromophore, nous avons pu mettre en évidence que ceci vient du changement d'orientation relative des deux cycles. Dans les dynamiques avec le chromophore anionique, *trans*, le transfert se fait le long de la liaison hydrogène et cette dernière est conservée. Alors que dans la conformation *cis*, le transfert de proton mène généralement à une géométrie dans laquelle la liaison hydrogène est rompue. En revanche, en terme de pourcentage, on trouve que le transfert est aussi peu probable dans les dynamiques avec le chromophore en conformation *cis* que dans celles où il est en conformation *trans*.

En comparant les environnements des chromophores *cis* et *trans*, il est également apparu que dans la conformation *cis*, le chromophore est relié en permanence au solvant à travers des chemins de molécules d'eau. Ceci n'est pas le cas du chromophore *trans*. Nous supposons donc que le transfert de proton se fait le long d'un de ces chemins de proton et que *in-fine*, le proton capté par le chromophore est issu du solvant.

Nos résultats sont en bon accord avec les résultats obtenus dans l'étude de Padron par Aline Faro[37], ainsi qu'avec de récentes études des protéines Dronpa[40, 41, 42] et IrisFP[43], qui ont montré que la protonation du chromophore survenait après l'isomérisation, à une échelle de temps différente de celle de l'isomérisation.

Chapitre III

Etude de la protéine EosFP

III.1 Introduction

Dans cette partie, nous avons étudié la protéine fluorescente EosFP, dont le chromophore dans sa forme verte avec les noms des atomes utilisés est rappelé sur la figure III.1.1.

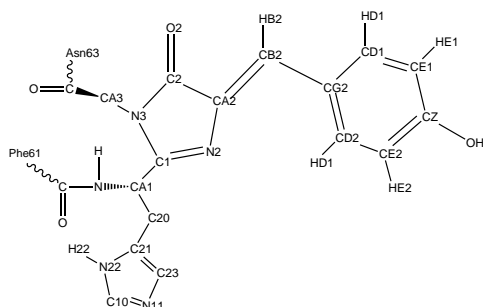


FIG. III.1.1 – Représentation du chromophore de EosFP en conformation *cis* sous sa forme anionique. Les hydrogènes liés à CA1 et CA3, ainsi que ceux des carbones la chaîne latérale de l’histidine n’ont pas été représentés par souci de clarté du schéma. L’atome ‘OH’ est le nom qu’il porte dans la PDB. Ici, il est sous sa forme anionique

La protéine a été cristallisée sous forme de tétramères. Elle est enregistrée dans la Protein Data Bank[66] sous le code 1ZUX. Or, l’environnement du chromophore n’est pas exactement le même dans tous les monomères. Dans trois des quatre monomères on trouve une molécule d’eau proche de l’oxygène O2 à une distance suffisamment courte pour établir une liaison hydrogène avec cet atome et on ne la trouve pas dans le quatrième monomère. Nous nommerons cette molécule d’eau Wat309. (d’après son numéro dans les dynamiques moléculaires où elle est présente).

L’environnement proche du chromophore avec et sans la molécule d’eau est présenté sur la figure III.1.2.

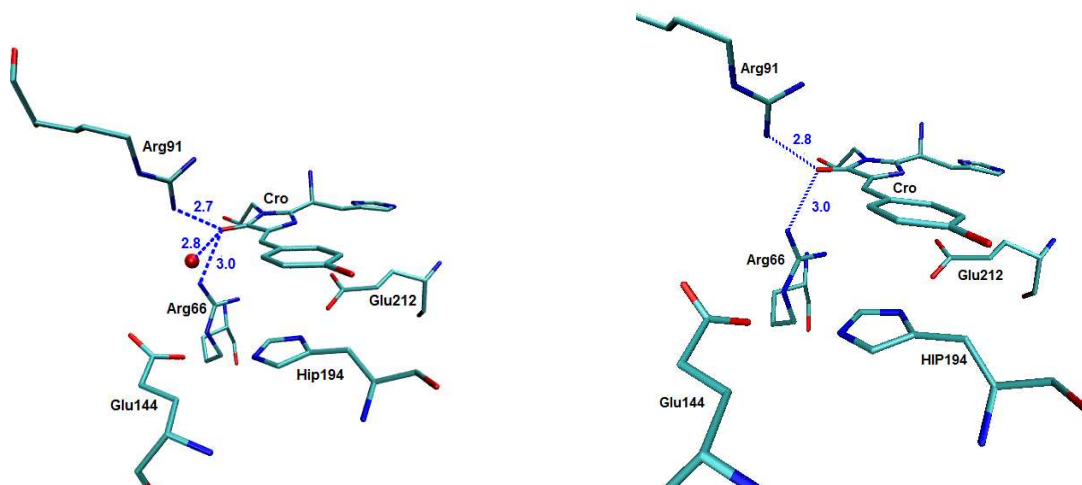


FIG. III.1.2 – Structure du chromophore et des résidus proches dans la structure cristallographique de EosFP. A gauche : monomère avec molécule d'eau. A droite : monomère sans molécule d'eau. En bleu : distance (en Å) entre l'oxygène O2 du chromophore et les atomes potentiels donateurs d'hydrogène.

Sur cette figure, on peut voir que la position du chromophore et des acides aminés proches est très similaire entre les deux monomères. La déviation standard moyenne (RMSD) calculée avec le logiciel VMD après avoir aligné les structures sur les atomes lourds du squelette de la protéine entre ces mêmes atomes vaut 0.23 \AA . La différence entre les deux monomères provient d'une molécule d'eau présente ou non, placée entre les résidus Arg66 et Arg91 et en liaison hydrogène avec l'oxygène O2 du chromophore. Il y a donc 2 ou 3 donateurs de liaison hydrogène possible sur l'oxygène de l'imidazolinone du chromophore selon que la molécule d'eau soit présente ou non.

Expérimentalement, le spectre d'absorption[4] de la protéine présente un maximum d'absorption à 506 nm, ce qui montre que le chromophore est anionique, un épaulement à 476 nm et une largeur à mi hauteur de 25 nm. Le rendement quantique de fluorescence de EosFP vaut 0.7[4], et sa durée de vie de fluorescence est de 3.0 ns[36]. Enfin, dans cette protéine, le chromophore ne s'isomérisé pas et est uniquement trouvé sous sa forme *cis*.

Les spectres d'absorption, d'émission et d'excitation de la protéine sont reproduits sur la figure III.1.3.

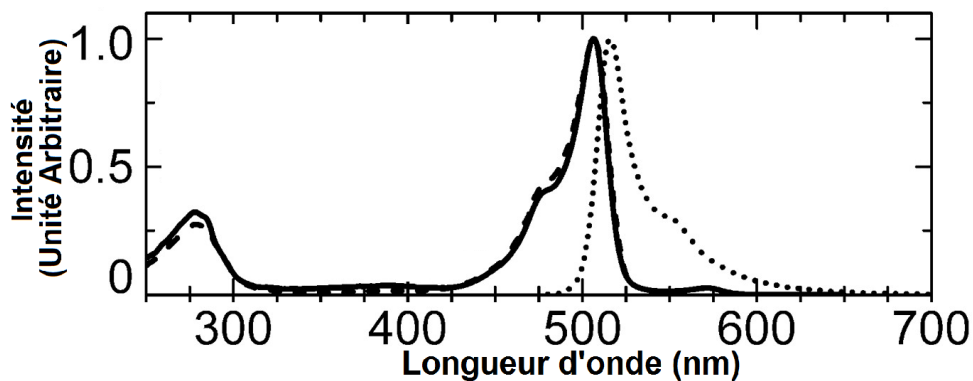


FIG. III.1.3 – Spectres de la protéine EosFP[4]. Trait plein : spectre d’absorption. Pointillés : spectre d’émission. Tirets : spectre d’excitation.

Pour étudier la protéine en solution, à l’aide de dynamiques moléculaires, nous devons choisir un des monomères. Nous avons cherché à caractériser l’effet de la molécule d’eau Wat309 sur les propriétés structurales et spectroscopiques en effectuant des dynamiques moléculaires en partant des deux types de monomères.

Dans un premier temps, nous analyserons les réseaux de liaisons hydrogène obtenus à l’état fondamental et les spectres d’absorption.

Dans un second temps, nous réaliserons des dynamiques moléculaires des deux types de monomères avec le chromophore à l’état excité. A l’aide de ces dynamiques, nous caractériserons les différentes géométries que peut adopter le chromophore ainsi que l’impact de la molécule d’eau sur la dynamique du chromophore à l’état excité. Enfin, nous utiliserons les informations extraites de ces dynamiques dans deux modèles, pour prédire un temps de vie de fluorescence et un rendement quantique de fluorescence.

III.2 Dynamique de l’état fondamental

Pour réaliser une simulation moléculaire, en partant de la structure PDB, nous devons compléter la géométrie cristalline et notamment ajouter les atomes d’hydrogène.

III.2.1 Préparation des simulations moléculaires

a - Choix de la protonation des résidus

Dans les dynamiques de EosFP, tous les résidus titrables ont été protonés selon leur état standard à pH 7 : les acides glutamique et aspartique, qui possèdent un pKa mesuré de 4.2[57] et de 3.9[57] respectivement, sont donc sous leur forme anionique et les lysines et arginines, qui possèdent un pka respectif de 10[57] et 12.5[57] sont sous leur forme cationique.

Le seul résidu pour lequel la protonation à pH 7 n’est pas tranchée est l’histidine : son pKa est de l’ordre de 6.0[57]. A pH7, l’histidine est donc possiblement sous deux formes : neutre avec le

proton sur ND1 ou NE2 (nomenclature sur la figure III.2.1) et cationique, avec un proton sur chaque azote.

Une histidine avec le nom des atomes utilisés dans Amber est représentée sur la figure III.2.1.

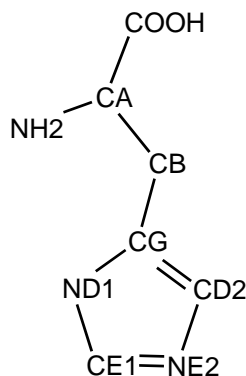


FIG. III.2.1 – Structure d’une histidine, avec le nom des atomes dans Amber. La position des hydrogènes a été omise pour plus de clarté.

La méthode habituelle pour déterminer l’état de protonation de l’histidine neutre, consiste à visualiser la structure de la protéine et à choisir l’azote à protoner de façon à créer une liaison hydrogène stable. La liste des histidines de EosFP avec leur état de protonation est donnée dans l’annexe A.2.

Dans EosFP, il y a deux histidines particulières :

La première est l’histidine 192. Cette histidine est placée en π -stacking avec le phénolate du chromophore. Pour cette histidine, nous avons choisi de la protoner sur les deux azotes. Avec cet état de protonation, elle est capable de former deux liaisons hydrogène simultanées : une avec Glu144 par l’azote NE2, et l’autre avec Glu212 avec l’azote ND1. Ces trois résidus (Glu144, His192 et Glu212) forment une triade que l’on retrouve dans un grand nombre de protéines photoactivables telles que Padron et Dronpa. Des études précédentes effectuées dans le groupe ont montrées que dans cet état de protonation, la triade était très stable et que les liaisons hydrogène étaient maintenues.

L’autre histidine particulière est celle de la chaîne latérale du chromophore. Comme nous l’avons dit précédemment, le mécanisme de photoconversion du chromophore suppose un transfert de proton depuis l’azote N22 (nommé d’après la figure III.1.1) de l’histidine vers l’oxygène du squelette peptidique du résidu Phe61. Nous avons donc placé le proton sur cet azote.

b - Champs de force du chromophore

Pour réaliser des dynamiques moléculaires, nous avons défini deux champs de force pour le chromophore de EosFP : un adapté à l’état fondamental et l’autre à son premier état excité. Pour rappel, le chromophore est constitué des résidus His-Tyr-Gly. Il est rappelé sur la figure III.1.1.

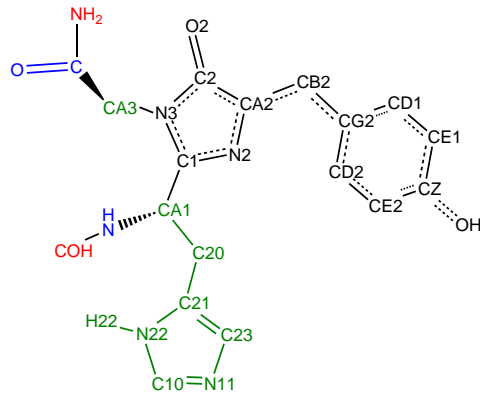


FIG. III.2.2 – Chromophore de la protéine EosFP

Le chromophore dans la protéine est lié par des liaisons covalentes au squelette peptidique de la protéine. Pour définir les charges ainsi que les valeurs d'équilibre des longueurs de liaison, des angles et des angles dièdres, nous devons effectuer un calcul quantique sur une molécule saturée. Ainsi les liaisons coupées entre le chromophore et la protéine sont saturées par les groupement NH_2 et COH (en rouge sur la figure III.2.2). Le protocole suivi pour l'obtention des charges atomiques est décrit dans l'annexe A.3.

Les charges calculées pour les atomes du chromophore, dans ses deux états (fondamental et excité) sont indiquées sur la figure III.2.3.

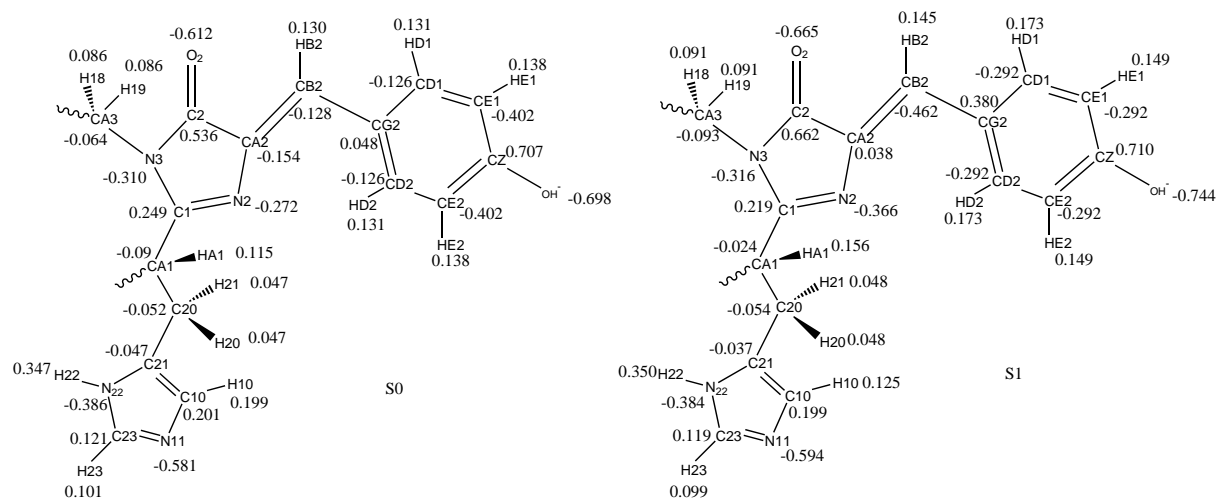


FIG. III.2.3 – Schéma du chromophore de EosFP avec ses charges. A gauche : état fondamental. A droite : état excité.

Sur cette figure, on peut voir que la différence majeure vient de la charge globale du pont. Dans l'état fondamental, la charge globale des atomes du pont ($\text{CB}_2 + \text{HB}_2$) est presque nulle, alors que dans l'état excité, il porte une charge globale de -0.3. Il y a donc un déplacement de la charge depuis les parties phénolate et imidazolinone vers le pont à l'état excité.

Le protocole de minimisation et de mise à l'équilibre utilisé est décrit dans l'annexe A.1.

c - Choix du monomère

Comme nous l'avons dit précédemment, dans la structure cristallographique de EosFP sous sa forme verte, on trouve dans 3 monomères sur 4 une molécule d'eau proche de l'oxygène O2 de l'imidazolinone du chromophore.

A partir des distances entre atomes lourds issues de la structure cristallographique, on peut déduire un réseau de liaison hydrogène probable dans l'environnement du chromophore. Ce réseau est représenté sur la figure III.2.4.

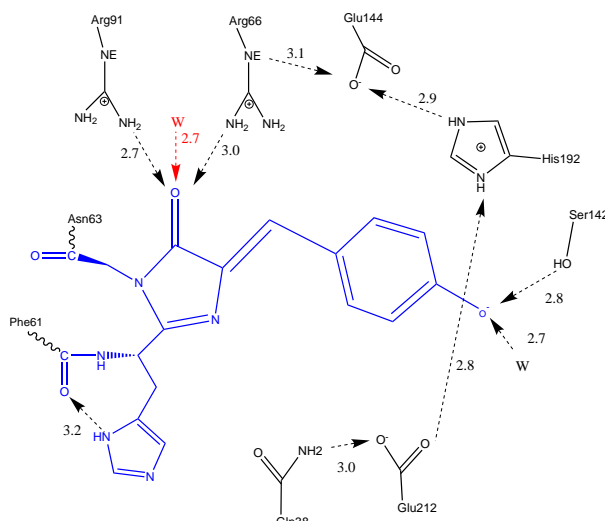


FIG. III.2.4 – Chromophore de EosFP (en bleu). En noir : réseau de liaisons hydrogène entourant le chromophore dans les protéines EosFP (à gauche). En rouge : molécule d'eau Wat309 présente dans 3 des 4 monomères.

La stabilité du réseau de liaison hydrogène est déterminante pour la perturbation qu'il apporte à la structure électronique du chromophore et aux transitions électroniques donc au spectre d'absorption. Le réseau joue également un rôle essentiel dans la dynamique et les déformations du chromophore à l'état excité.

Dans la structure cristalline, Wat309 ne semble établir qu'une liaison hydrogène avec le chromophore.

III.2.2 Analyse des réseaux de liaison hydrogène dans l'état fondamental

A partir des coordonnées issues des dynamiques de mise à l'équilibre, nous avons lancé 4 dynamiques de 8 ns chacune, avec le champ de force du chromophore dans son état fondamental. Ces dynamiques ont été effectuées à pression et température constante. Les vitesses de départ des quatre dynamiques sont choisies aléatoirement, ce qui permet une meilleure exploration de l'espace des phases.

Nous n'exploitons que 6 ns sur les 8 ns des simulations, de façon à s'affranchir d'*artefacts* liés à la suppression progressive des contraintes en fin de mise à l'équilibre. Nous disposons donc de 24 ns de dynamiques des monomères avec et sans la molécule Wat309.

Nous considérons dans un premier temps la dynamique du chromophore et plus particulièrement les angles dièdres φ et τ . L'angle dièdre τ est l'angle formé par les atomes N2-CA2-CB2-CG2, et l'angle dièdre φ est celui formé par les atomes CA2-CB2-CG2-CD1.

Les valeurs moyennes, ainsi que l'écart-type sont résumés dans le tableau III.1.

	structure cristallographique	avec Wat309		sans Wat309	
		moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
τ	-0.7°	-5.0°	8.2	-6.5°	8.9
φ	-8.7°	-4.6°	8.3	-4.6°	8.6

TAB. III.1 – Valeurs moyennes et écart-type des angles τ et φ (en degrés) dans les dynamiques de EosFP avec et sans Wat309.

Les résultats sont identiques ou quasi-identiques dans les deux situations. Dans la structure cristallographique, on trouve que l'angle τ vaut autour de 0° et φ vaut autour de -8° . Les valeurs des angles de torsion du chromophore de EosFP dans les dynamiques sont donc en accord avec les valeurs cristallographiques.

La figure III.2.5 présente le pourcentage d'existence des liaisons hydrogène dans l'environnement du chromophore au cours des simulations moléculaires dans les deux situations.

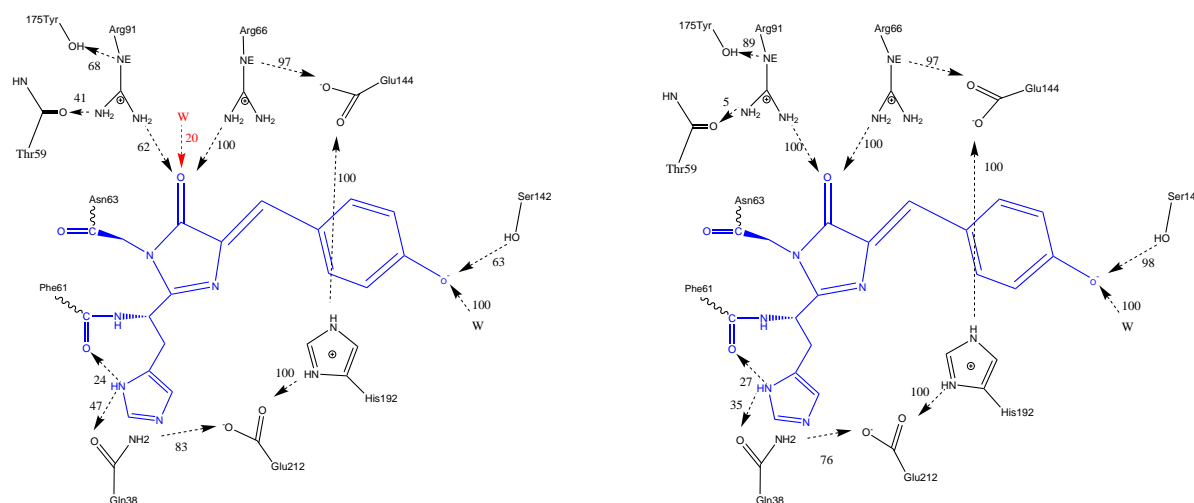


FIG. III.2.5 – Réseau de liaison hydrogène autour du chromophore de EosFP. A gauche : dans les dynamiques avec Wat309. A droite : dans les dynamiques sans Wat309

Sur cette figure, la première différence que l'on peut noter est directement liée à la molécule d'eau. Quand elle est présente, elle entre en concurrence avec les résidus Arg66 et Arg91 pour établir une liaison hydrogène avec l'oxygène O2 du chromophore. On peut également observer que la dynamique du résidu Arg91 est différente entre les deux dynamiques. Dans la dynamique avec molécule d'eau, le résidu Arg91 établit 2 liaisons hydrogène, une avec son azote NE avec le résidu Tyr175 durant 68% du temps, et une deuxième avec son azote NH2, avec le résidu Thr59 dans 42% du temps, alors que sans la molécule d'eau, elle n'établit qu'une seule liaison avec son azote NE et la Tyrosine 175 à 89% du temps. La seule autre différence notable entre ces deux dynamiques vient de Ser142, qui paraît plus mobile dans le cas de la dynamique avec la molécule

d'eau que sans. Le reste du réseau de liaison hydrogène ne présente pas de différence significative entre les deux dynamiques.

Enfin, on peut voir que dans les deux monomères, avec l'état de protonation choisi, l'histidine de la chaîne latérale du chromophore est capable de créer une liaison hydrogène soit avec l'oxygène du squelette peptidique du résidu Phe61, soit avec l'oxygène du carbonyle de la chaîne latérale du résidu Gln38, ce qui est en accord avec l'étude de Imhof[67].

Dans les cas où Wat309 n'établit pas de liaison hydrogène avec le chromophore, elle reste dans l'environnement proche (moins de 5Å de l'oxygène O2), et effectue alors des liaisons hydrogène avec le résidu Glu144 de la triade et les deux résidus Arg66 et Arg91 qui sont eux-même en liaison hydrogène avec l'oxygène O2 du chromophore.

Cette molécule d'eau est donc incapable de s'échanger avec une autre molécule d'eau ou de sortir du tonneau β de la protéine. Dans les dynamiques de la protéine sans la molécule d'eau Wat309, on ne voit aucune molécule d'eau cristallographique ou du solvant qui entre dans le tonneau pour se positionner en liaison hydrogène avec l'oxygène O2 du chromophore

Les différences minimales qui apparaissent au cours des dynamiques de la protéine à l'état fondamental ne nous permettent pas de déterminer si la molécule d'eau Wat309 joue un rôle dans la dynamique de l'état fondamental. D'une part, les angles dièdres τ et φ du chromophore sont proches des valeurs cristallographiques et d'autre part, le réseau de liaison hydrogène qui entoure le chromophore ne présente pas de différence significative dans les dynamiques des deux monomères.

III.3 Calcul des spectres d'absorption de EosFP

Nous allons examiner l'effet de la molécule d'eau Wat309 sur le spectre d'absorption théorique de la protéine solvatée. Pour rappel, le spectre d'absorption expérimental de EosFP présente un maximum à 506 nm et un épaulement à 476nm. La largeur à mi-hauteur est de 25 nm.

III.3.1 Méthode :

Pour calculer les spectres d'absorption de la protéine EosFP, nous avons choisi d'utiliser une méthode déjà utilisée dans d'autres études [68]. Cette méthode consiste à calculer l'énergie des premières transitions électroniques du chromophore, pris dans des géométries extraites de la dynamique moléculaire à l'état fondamental. Les calculs quantiques prennent en compte l'effet électrostatique de la protéine au travers des charges ponctuelles des atomes de l'environnement protéique.

Pour le calcul quantique, nous avons choisi la méthode TD-DFT[69] et utilisé le logiciel Gaussian[47]. La méthode TD-DFT a des limitations bien connues pour le calcul des spectres d'absorption. Par exemple, elle ne permet pas de décrire correctement les états à transfert de charge et les états avec un large caractère de double excitation. Des travaux ont comparé la méthode TD-DFT

par rapport à des méthodes plus précises comme DFT/MRCI[70] ou AM1/MRCI[67] ou des DFT/MM[71] incluant la polarisation de l'environnement. Les approches TD-DFT surestiment les transitions verticales de 0.3 à 0.5 eV par rapport à l'expérience, ce qui conduit à des spectres théoriques déplacés vers le bleu par rapport à l'expérience. Notre approche cherche avant tout à comparer différents environnements, sans chercher un accord quantitatif avec l'expérience, ce qui nous conduit à sélectionner la méthode rapide TD-DFT.

Nous avons effectué quelques calculs tests pour valider ces choix.

Choix du système quantique et de la fonctionnelle

Nous avons réalisé des calculs de spectre sur deux systèmes quantiques.

Le premier est le chromophore restreint à sa partie conjuguée, avec les liaisons fermées par des groupement méthyle : HydroxyBenzilidene-Diméthyl-Imidazolinone, que nous nommerons HBDI par la suite. Il est représenté sur la figure III.3.1.

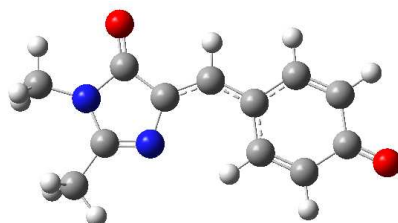


FIG. III.3.1 – Chromophore HBDI

Sur ce système quantique, nous avons calculé les dix premiers états excités avec les fonctionnelles B3LYP[48], PBE0[72], M062X[73] et CAM-B3LYP[74]. Nous avons utilisé la base 6-31+G(d), que nous avons utilisée pour les calculs d'affinité protonique. La longueur d'onde d'absorption expérimentale du chromophore isolé anionique est de 479 nm[75]. Nous allons donc pouvoir comparer nos calculs avec l'expérience pour déterminer la fonctionnelle qui reproduit le mieux l'absorption du chromophore.

Dans un second temps, nous avons calculé les longueurs d'onde d'absorption sur un modèle plus étendu du chromophore, qui est celui utilisé pour calculer les charges dans la partie III.2 et qui est représenté sur la figure III.2.2.

Calcul sur le modèle HBDI

Les résultats des calculs de transitions verticales pour les 4 premiers états excités du modèle HBDI dans sa géométrie optimisée sont présentés dans le tableau III.2.

	Fonctionnelle	B3LYP	PBE0	CAM-B3LYP	M062X
transition	Temps de calcul	10min	11min	12min	17 min
1	Energie (eV)	2.95	3.11	3.13	3.10
	λ (nm)	420	398	396	399
	force d'oscillateur	0.00	1.02	1.08	1.07
2	Energie (eV)	3.06	3.24	3.73	3.50
	λ (nm)	405	382	332	354
	force d'oscillateur	0.99	0.00	0.00	0.00
3	Energie (eV)	3.17	3.30	3.89	3.77
	λ (nm)	391	376	319	329
	force d'oscillateur	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Energie (eV)	3.60	3.89	4.25	4.03
	λ (nm)	344	319	292	308
	force d'oscillateur	0.00	0.00	0.00	0.00

TAB. III.2 – Transitions verticales calculées pour les quatre premiers états excités du chromophore HBDI selon la fonctionnelle utilisée. En gras : force d'oscillateur différente de 0.

Pour les 10 premières transitions, nous ne trouvons pour chaque fonctionnelle qu'un seul état pour lequel la force d'oscillateur est différente de zéro. Il s'agit du premier état pour les fonctionnelles PBE0, CAM-B3LYP et M062X et du deuxième état pour la fonctionnelle B3LYP. Les autres transitions calculées sur le chromophore HBDI présentent toutes une force d'oscillateur égale à 0 et sont donc des transitions interdites.

La transition associée à une force d'oscillateur non nulle correspond à une transition HOMO-LUMO de type π - π^* .

La longueur d'onde d'absorption calculée avec la méthode de la TD-DFT pour la seule transition dont la force d'oscillateur n'est pas nulle est comprise entre 396 nm (CAM-B3LYP) et 405 nm (B3LYP). Pour rappel, la valeur de la longueur d'onde d'absorption expérimentale du chromophore est de 479 nm[75]. C'est donc la fonctionnelle B3LYP qui donne le résultat le plus proche de la valeur expérimentale. Elle est également la fonctionnelle avec laquelle le calcul est le plus rapide.

Calcul sur le modèle étendu du chromophore

Nous avons refait les mêmes calculs que précédemment, sur le modèle utilisé pour calculer les charges du chromophore dans la partie III.2.

Pour les extrémités du chromophore, nous avons utilisé les positions des atomes C et O du squelette du résidu Phe61 (qui précède le chromophore) et N et H du résidu Asn63 (qui suit le chromophore). Pour saturer les extrémités du chromophore, nous avons ajouté des hydrogènes. La position de l'hydrogène C-terminal du chromophore a été choisie le long de l'axe C-CA de Phe61 à une distance de 1 Å. Nous avons procédé de la même façon pour fermer la liaison NH du résidu Asn63, en ajoutant un hydrogène le long de la liaison N-CA de Asn63.

Les quatre premières transitions du chromophore calculées avec les quatre fonctionnelles sont présentées dans le tableau III.3.

	Fonctionnelle	B3LYP	PBE0	CAM-B3LYP	M062X
transition	Temps de calcul	40min	1h15	1h20	1h30
1	Energie (eV)	2.90	2.99	3.05	3.03
	λ (nm)	427	415	406	409
	force d'oscillateur	0.8	1.0	1.1	1.1
2	Energie (eV)	3.06	3.18	3.74	3.61
	λ (nm)	405	390	331	343
	force d'oscillateur	0.0	0.0	0.0	0.0
3	Energie (eV)	3.19	3.45	3.92	3.70
	λ (nm)	389	359	316	336
	force d'oscillateur	0.0	0.1	0.0	0.0
4	Energie (eV)	3.21	3.48	4.20	3.95
	λ (nm)	386	356	295	314
	force d'oscillateur	0.2	0.0	0.0	0.0

TAB. III.3 – Transitions verticales calculées selon la fonctionnelle utilisée. En gras : forces d'oscillateurs différentes de zéro.

Avec les quatre fonctionnelles, la première transition calculée est toujours celle qui présente la plus grande force d'oscillateur. La transition majoritaire est une transition π - π^* entre la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) vers la première orbitale moléculaire non-occupée (LUMO) .

Néanmoins, dans le cas de B3LYP, on trouve que la quatrième transition présente une force d'oscillateur non négligeable. Cette transition est majoritairement entre les orbitales HOMO et LUMO+1

Pour ce modèle étendu du chromophore (chromophore entier), les transitions calculées varient entre 406 nm (pour CAM-B3LYP) et 427 nm (pour B3LYP), alors qu'elles étaient comprises entre 396 et 405 nm dans le cas du chromophore HBDI. La valeur expérimentale d'absorption du chromophore mesurée dans la protéine EosFP est de 506 nm[4]. Les longueurs d'onde calculées en utilisant le modèle de chromophore "entier" sont donc plus proches de la longueur d'onde expérimentale. Enfin, comme pour le chromophore HBDI, c'est la fonctionnelle B3LYP qui est à la fois la moins couteuse en temps de calcul et la plus proche de la valeur expérimentale.

On voit que la transition HOMO \rightarrow LUMO implique une délocalisation des électrons depuis les deux cycles du chromophores vers le pont.

Les orbitales HOMO et LUMO sont représentées sur la figure III.3.2.

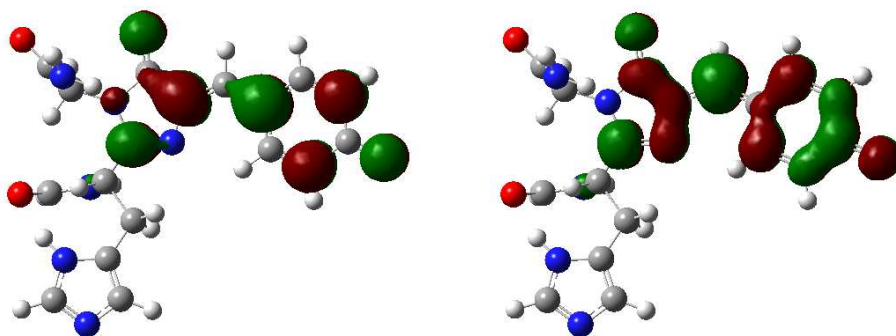


FIG. III.3.2 – Orbitales moléculaires HOMO (à gauche) et LUMO (à droite) du chromophore de EosFP et IrisFP calculées en B3LYP/6-31+G(d). En rouge : isosurface pour $\sigma = 0.03$. En vert : isosurface pour $\sigma = -0.03$.

L'introduction dans la partie quantique de la chaîne latérale du résidu His62, inclus dans le chromophore (His, Tyr, Gly) permet de mieux prédire la polarisation des orbitales HOMO et LUMO même si elles ne sont pas développées sur les atomes de His62. Ceci se traduit par un déplacement vers le rouge, et un meilleur accord avec l'expérience. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'étude de Imhof [67]. Au vue des résultats obtenus, nous avons retenu la fonctionnelle B3LYP, avec la base 6-31+G(d). Pour le modèle du chromophore, bien que plus long à calculer, le chromophore entier permet d'obtenir des résultats plus proches des valeurs expérimentales. C'est donc celui que nous avons retenu. Enfin, nous avons restreint le calcul aux 4 premiers états excités.

Construction du spectre d'absorption

Nous avons extrait 1000 configurations des dynamiques moléculaires de l'état S_0 . Sur cette série de géométries, nous avons calculé les transitions vers les quatre premiers états excités, ainsi que les forces d'oscillateurs associées à ces transitions.

A partir des résultats, nous avons construit le spectre comme une somme de fonctions gaussiennes :

$$S(\lambda) = \sum_{c=1}^{1000} \sum_{i=1}^4 f_{c,i} \exp\left(\frac{-(\lambda-\lambda_{c,i})^2}{2\sigma^2}\right)$$

où σ est la largeur de la gaussienne, $f_{c,i}$ la force d'oscillateur associée à la transition i de la géométrie de la configuration c , $\lambda_{c,i}$ la longueur d'onde associée à la transition i de la configuration c . Nous avons choisi $\sigma = 3$ nm car cette largeur représente la largeur naturelle d'une raie d'absorption.

Pour déterminer l'effet de l'environnement électrostatique de la protéine sur le spectre d'absorption, nous avons effectué deux types de calcul.

Dans le premier, nous avons réalisé le calcul quantique TD-DFT sur le modèle étendu du chromophore (chromophore "entier") isolé sur 300 géométries extraites des dynamiques moléculaires.

Dans le second, nous avons effectué le calcul quantique TD-DFT sur le même modèle de chromophore inclus dans le nuage des charges ponctuelles des autres atomes de la protéine et des molécules d'eau. Les spectres ont été déterminés à partir de 1000 configurations. Les charges utilisées sont les charges du champ de force Amber "ff99". Les atomes CA des résidus Phe61 et Asn63, qui ont été remplacés par des hydrogènes dans la partie quantique, ont été retirés. De même les hydrogènes portés par ces atomes (HA1) ont également été retirés du nuage. La charge totale du système (partie quantique + charges ponctuelles) est légèrement différente de 0. Pour corriger cela, nous avons modifié les charges ponctuelles des atomes de Phe61 et Asn63 incluses dans le champ des charges pour que leurs sommes soient nulles.

En comparant les spectres obtenus dans le champ des charges de la protéine avec celui sans les charges, nous pouvons estimer l'effet électrostatique de la protéine sur les longueurs d'onde d'absorption. De plus, pour déterminer si la molécule d'eau proche du chromophore joue un rôle sur le spectre, nous avons réalisé les calculs sur les deux types de monomères.

III.3.2 Spectres de EosFP

Monomère avec Wat309

Les spectres d'absorption que nous obtenons pour le monomère avec la molécule d'eau Wat309 sont présentés sur la figure. III.3.3.

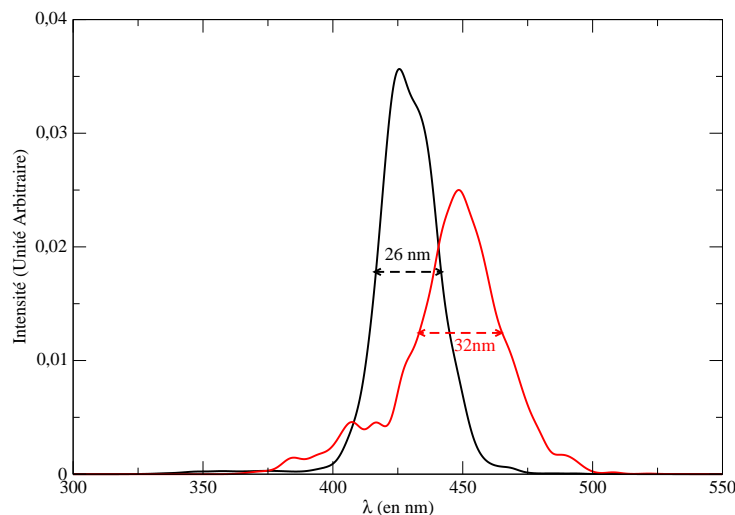


FIG. III.3.3 – Spectres d'absorption théorique du monomère de EosFP avec Wat309. En noir : dans le nuage des charges. En rouge : sans le nuage des charges.

Sans le nuage des charges (spectre en rouge), on trouve un maximum d'émission à 448 nm, ainsi qu'un pic secondaire autour de 410 nm. La largeur à mi-hauteur est de 32 nm. Cette largeur

provient de la variété des conformations adoptées par le chromophore dans la simulation de EosFP à l'état fondamental.

Dans le champ des charges (spectre en noir), on trouve le maximum d'émission à 425 nm et la largeur à mi-hauteur est de 26 nm. Le deuxième pic d'absorption à 410 nm n'est pas retrouvé.

Que ce soit avec ou sans charge, l'épaule à 476 nm n'est jamais retrouvé.

L'effet électrostatique de la protéine se traduit d'une part par une réduction de la largeur à mi hauteur et d'autre part par un décalage vers le bleu, ce qui a également été obtenu dans les spectres calculés dans d'autres protéines fluorescentes[67, 70].

Expérimentalement le spectre d'absorption dans la protéine est déplacé vers le rouge par rapport au spectre du chromophore isolé. Le désaccord sur le sens du déplacement de la bande d'absorption du chromophore entre le spectre calculé et le spectre expérimental peut être lié à l'absence des effets de polarisation, comme l'ont montré Daday *et al*[76] et/ou à la nécessité de prendre en compte dans la partie quantique des résidus en liaison hydrogène avec le chromophore. Dans l'étude de Imhof[67], l'auteur montre que l'augmentation de la taille de la partie quantique entraîne un déplacement vers le rouge du spectre d'absorption calculé. L'épaule observé à 476 nm a été interprété par l'auteur comme lié à la présence d'une forme zwitterionique du chromophore ou à la structure vibronique.

Monomère sans Wat309.

Les spectres d'absorption du monomère de EosFP sans Wat309 sont représentés sur la figure III.3.4.

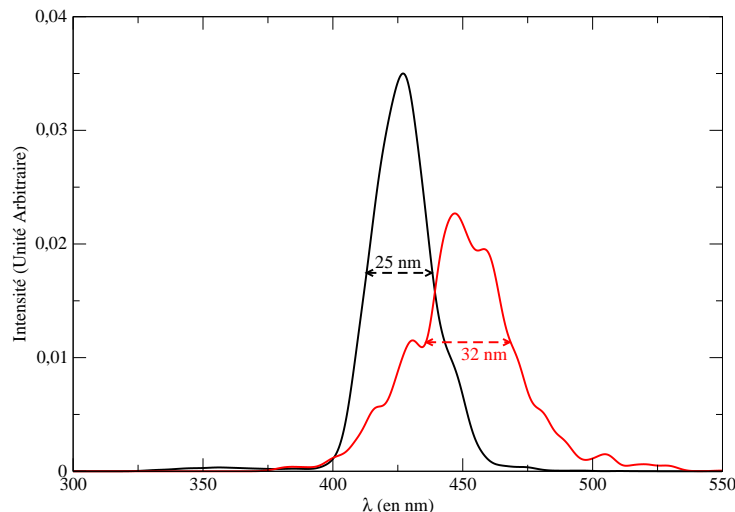


FIG. III.3.4 – Spectres d'absorption théorique de la protéine EosFP dans le monomère sans Wat309. En noir : dans le nuage des charges de la protéine. En rouge : dans le champ des charges.

Pour le spectre du chromophore sans le champ des charges (en rouge), sans molécule d'eau proche du chromophore on trouve un maximum d'émission à 447 nm, et une largeur à mi-hauteur de 32 nm.

Les calculs dans le nuage des charges de la protéine (en noir) donnent un maximum d'émission à 426 nm et une largeur à mi hauteur de 25 nm.

Comme dans le cas du monomère avec la molécule d'eau Wat309, la prise en compte de l'environnement électrostatique de la protéine entraîne un décalage du spectre vers le bleu.

Les résultats sans la molécule d'eau Wat309 sont très similaires aux calculs avec la molécule d'eau Wat309.

Conclusion sur les spectres de EosFP.

On peut considérer que la prise en compte de la molécule d'eau Wat309 uniquement par ses charges dans l'effet électrostatique de la protéine est insuffisante et qu'une meilleure description serait possible en l'incluant dans la partie quantique avec le chromophore.

Cela étant, compte tenu des très faibles modifications du réseau de liaison hydrogène et de la similarité des spectres avec et sans la molécule d'eau Wat309, il semble que celle-ci n'ait pas une influence majeure sur la dynamique de l'environnement du chromophore au sein de EosFP. Ceci peut correspondre au fait que dans la protéine *in-vivo* comme dans la structure cristallographique, certaines protéines incluent la molécule d'eau Wat309 et d'autres pas.

III.4 Dynamiques de l'état excité de EosFP

III.4.1 Rôle de la molécule d'eau sur la dynamique interne du chromophore à l'état excité

Nous avons réalisé des dynamiques de la protéine EosFP à l'état excité, avec et sans la molécule d'eau Wat309.

Pour lancer ces dynamiques, nous avons utilisé comme points de départ des snapshots extraits de la simulation à l'état fondamental réalisée dans la partie IV.2.

Pour réaliser des dynamiques de EosFP avec le chromophore à l'état excité, nous utilisons le potentiel NADiA, développé précédemment dans l'équipe[20]. Ce potentiel a pour but de décrire la surface d'énergie potentielle du chromophore dans son premier état excité singulet de spin. Il a été calibré sur des calculs quantiques et est décrit par une somme de produit de sinus et de cosinus de multiples des deux angles φ et τ . La surface de potentiel décrite par le potentiel est représentée sur la figure III.4.1.

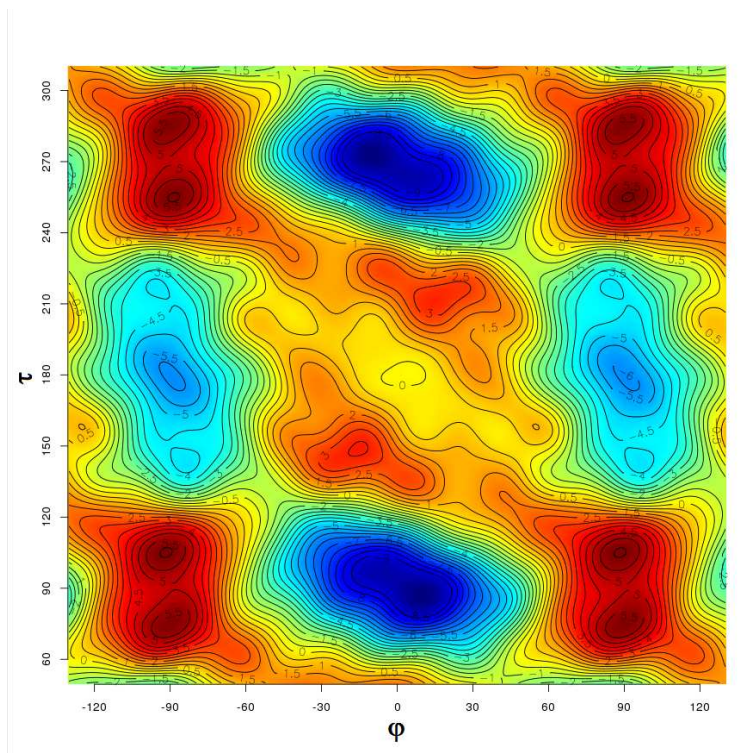


FIG. III.4.1 – Surface de Potentiel de NADiA en fonction des angles φ et τ (en degrés). En bleu : puits de potentiel. En rouge barrière de potentiel.

Nous avons réalisé 120 dynamiques de 2 ns issues de 120 points de départ différents pour chaque monomère (avec ou sans Wat309).

Dans ces dynamiques, nous avons sauvegardé les géométries toutes les 2 picosecondes. Pour avoir une description plus précise de l'état de torsion du chromophore, les valeurs prises par les angles de torsions φ et τ sont sauvegardées toutes les 20 fs.

Pour rappel, il y a à l'état excité deux phénomènes en concurrence pour que le chromophore retourne à l'état fondamental :

- La conversion radiative, c'est-à-dire l'émission de fluorescence. Pour ce faire, le chromophore doit être dans une géométrie quasi-plane.

- La conversion non radiative. Pour cela le chromophore doit atteindre une géométrie twistée dans laquelle soit τ soit φ prend une valeur proche de $\pm 90^\circ$ pendant que l'autre angle reste proche de 0° . Nous pouvons décrire quatre zones de conversion interne : $(\tau = 90^\circ, \varphi = 0^\circ)$; $(\tau = -90^\circ, \varphi = 0^\circ)$; $(\tau = 0^\circ, \varphi = 90^\circ)$ et $(\tau = 0^\circ, \varphi = -90^\circ)$. Par la suite, les torsions seront nommées en fonction de l'angle twisté et de son signe. Ainsi, une torsion $(\tau = -90, \varphi = 0^\circ)$ sera nommée $\tau < 0$.

En comparant la dynamique du chromophore à l'état excité dans les deux monomères, nous allons déterminer si la molécule d'eau Wat309 joue un rôle dans les propriétés d'émission de la protéine.

Nous avons étudié le temps moyen d'occurrence de la première torsion et la nature de cette torsion.

Le tableau III.4 présente les statistiques de torsion du chromophore à l'état excité dans les dynamiques avec ou sans molécule d'eau.

torsion	Avec Wat309					Sans Wat309				
	$\tau > 0$	$\tau < 0$	$\varphi > 0$	$\varphi < 0$	aucune	$\tau > 0$	$\tau < 0$	$\varphi > 0$	$\varphi < 0$	aucune
nombre de dynamiques	25	14	21	50	11	4	29	4	83	0
temps moyen (ps)	435	430	400	261	/	93	49	10	38	/

TAB. III.4 – Torsions du chromophore observées dans les 120 dynamiques de 2 ns à l'état excité. Temps moyen où les différentes torsions sont observées.

En comparant les dynamiques effectuées avec ou sans Wat309, on remarque que :

- Dans le cas du monomère sans la molécule d'eau Wat309, il n'y a aucune dynamique où le chromophore reste plan pendant toute la durée de la simulation. Dans le cas du monomère avec la molécule d'eau Wat309, on trouve 11 dynamiques où le chromophore reste plan pendant toute la durée de la simulation.
- Le temps moyen de première torsion est trouvé quatre fois plus rapide dans les dynamiques sans la molécule d'eau Wat309 que dans celles avec.

On voit que la présence de la molécule d'eau Wat309, en liaison hydrogène avec l'oxygène de l'imidazolinone du chromophore, a un effet très net sur la dynamique du chromophore à l'état excité. Lorsqu'elle est présente, les torsions du chromophore sont beaucoup plus fortement inhibées que lorsqu'elle ne l'est pas. Lorsqu'elle n'est pas présente, ces torsions se produisent toutes avant 100 ps, aboutissant à une fluorescence très faible puisque le chromophore twisté n'est pas fluorescent. Ceci est en fort désaccord avec les propriétés expérimentales de EosFP caractérisé par un rendement quantique de fluorescence de 0.7 [4] et un temps de vie de fluorescence de 3.0 ns [36].

La suite de l'étude a donc été effectuée uniquement sur le monomère où Wat309 est présente. Nous avons prolongé ces dynamiques, pour porter le temps total de chaque simulation à 6 ns. Nous disposons donc de 120 dynamiques de 6 ns de la protéine EosFP avec le chromophore à l'état excité.

III.4.2 Analyse des dynamiques de l'état excité

Nous avons extrait des dynamiques les valeurs prises par les angles τ et φ toutes les 20 fs et nous avons ainsi 36 millions de "*snapshots*" des valeurs de τ et φ espacés de 20 fs.

Le long de nos dynamiques, on trouve que le chromophore est suffisamment libre pour effectuer des rotations complètes le long de l'angle φ . Ces résultats peuvent venir du fait que, dans nos dynamiques, le chromophore est incapable de retourner à l'état fondamental. Une rotation complète le long d'un angle implique de passer dans des géométries où le chromophore peut effectuer des conversions internes. Par la suite, nous ne nous intéresserons qu'aux géométries du chromophore où ce dernier n'a pas effectué de rotation complète.

Nous n'observons par contre pas de rotation complète suivant l'angle τ .

Nous avons extrait une géométrie sur 1000 parmi les 36 millions de géométries et nous avons superposé les points représentant ces snapshots à la surface d'énergie potentielle NADiA sur la figure III.4.2.

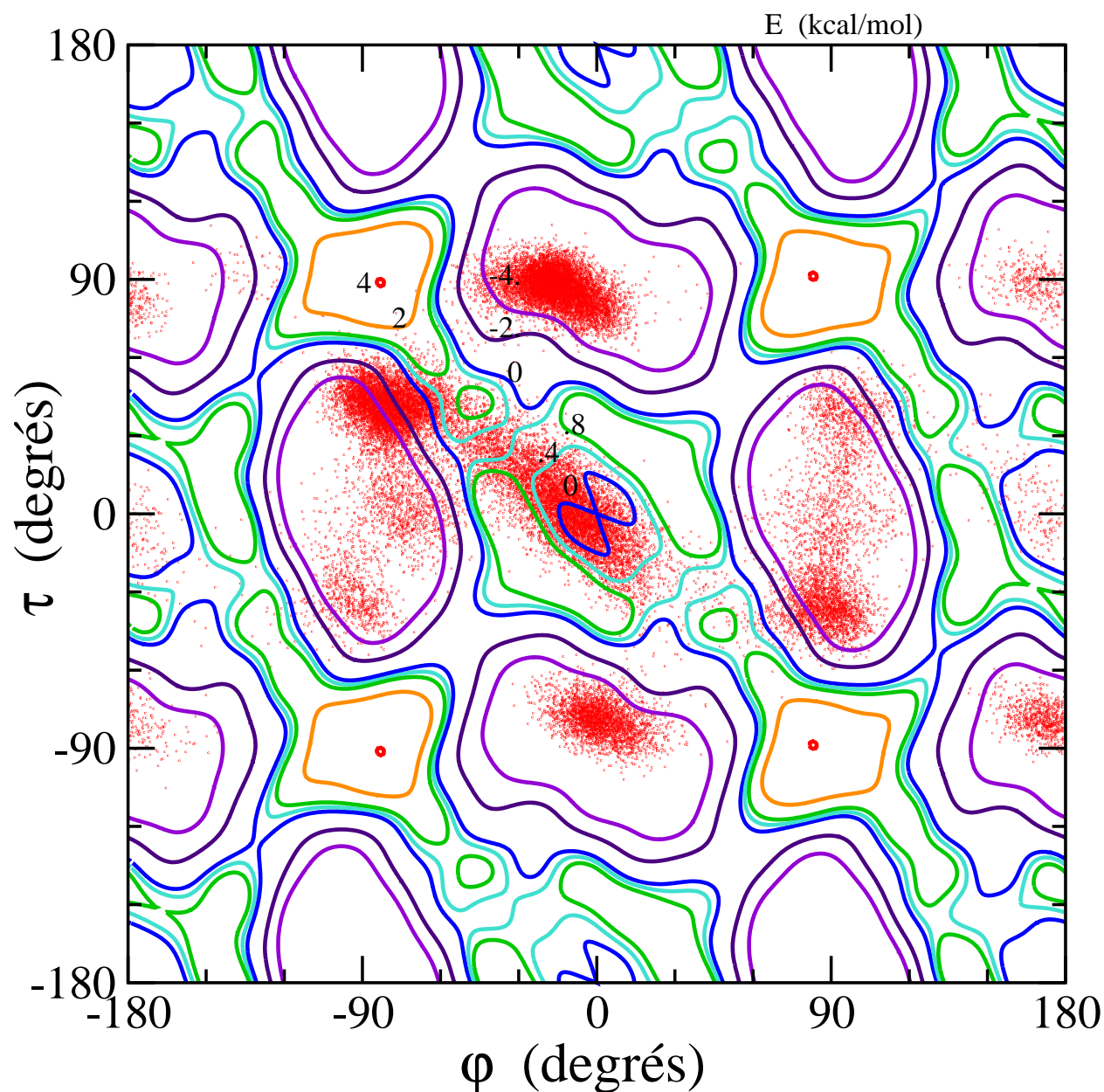


FIG. III.4.2 – Paysage énergétique du chromophore (en kcal.mol⁻¹) dans le plan φ, τ (en degrés), calculé avec le potentiel NADiA utilisé pour décrire l'état excité du chromophore. Points rouge : snapshots extraits des dynamiques.

On peut voir sur cette figure l'impact de la protéine sur la dynamique du chromophore. Le chromophore isolé n'est soumis qu'à son propre potentiel de torsion et visiterait *a priori* les cinq bassins d'énergie du potentiel NADiA : une zone elliptique centrée sur la géométrie plane, et les

quatre bassins des géométries twistées centrés sur $\tau = \pm 90^\circ$, $\varphi = 0^\circ$ et $\tau = 0^\circ$, et $\varphi = \pm 90^\circ$. La protéine empêche fortement les twists suivant φ , elle autorise les twists suivant τ , mais très rarement jusqu'au fond des puits. Par ailleurs, elle contraint fréquemment le chromophore dans les zones où les deux angles du chromophore présentent une torsion marquée. Dans la première, l'angle φ est proche de -90° et l'angle τ est proche de 45° et dans la deuxième, φ est proche de 90° , et τ est proche de 45° . Ces deux zones ne sont pas des bassins d'énergie du chromophore isolé. Lorsque le chromophore est dans ces zones, ses forces internes qui tendent à le faire tourner et les forces exercées par la protéine qui l'en empêchent, s'équilibrent.

Les zones de Hula-Twist (valeurs absolues de τ et φ proches de 90°) ne sont pas peuplées.

Nous avons évalué le rendement quantique ϕ_{fluor} et le temps de vie τ_{fluor} de fluorescence par deux méthodes : l'une utilise directement les valeurs de τ et φ enregistrées le long des 120 dynamiques (méthode de "l'intégration directe"). Dans l'autre, nous avons déterminé des constantes de vitesse de passage entre les différentes zones visitées par le chromophore et résolu l'équation cinétique de l'évolution des populations de ces zones (méthode du "schéma cinétique").

III.5 Intégration directe

Pour chacune des 120 dynamiques de 6 ns à l'état excité S_1 , à partir des snapshots φ et τ enregistrés tous les $\delta t = 20$ fs, on évalue pour chaque snapshot la probabilité pour que le chromophore subisse une conversion vers l'état fondamental S_0 , radiative ou non radiative, pendant l'intervalle de temps entre les deux snapshots (δt).

Pour calculer ces probabilités, on utilise le modèle mis au point récemment dans l'équipe pour la GFP[77]. Dans ce modèle, la conversion radiative a lieu dans une zone délimitée par une ellipse centrée sur $\varphi = 0^\circ$ et $\tau = 0^\circ$, avec un grand axe de 40° , un petit axe de 22° , un angle de -45° entre le grand axe et l'axe φ et avec une vitesse $k_r = 0.22 \text{ ns}^{-1}$ [77] (en vert sur la figure III.5.1). La conversion non radiative a lieu dans quatre zones délimitées par des cercles de rayon de 10° centrés sur les points $(\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ)$ et $(\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ)$, avec une constante de vitesse de 8.0 ns^{-1} (en noir sur la figure III.5.1). En dehors de ces zones il n'y a pas de conversion vers l'état fondamental. Ce choix est fait d'après les études de dynamiques non Born-Oppenheimer faites sur le chromophore isolé par Olsen *et al*[53] Ces zones sont présentées sur la figure III.5.1.

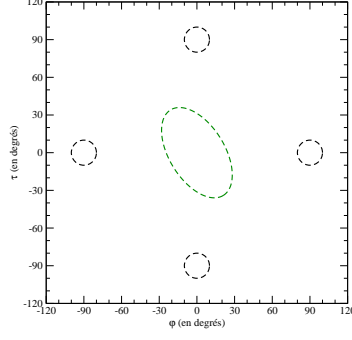


FIG. III.5.1 – Zones dans lesquelles la probabilité de désexcitation est différente de 0. En tiret vert : zone de fluorescence. En tiret noir : zones de conversion interne.

Pour une trajectoire, on note S_1 la population de l'état excité. Sa valeur initiale vaut 1 : $S_1(0) = 1$.

En fonction de la zone où se trouve le chromophore, on calcule la proportion de population qui retourne à l'état fondamental.

Au snapshot, $isnap$, nous avons donc 3 cas de figures :

1- S'il est dans la zone de fluorescence (ellipse verte), on a alors :

$$S_1(isnap + 1) = S_1(isnap) - S_1(isnap).k_r.\delta t$$

et le nombre de photon émis est :

$$\delta nph(isnap) = S_1(isnap).k_r.\delta t$$

Remarque : ici, δnph est inférieur à 1, et doit donc être interprété comme une proportion de photon émis, le nombre initial de photon absorbé étant 1.

2- S'il est dans une zone de conversion non radiative (cercles noirs)

$$S_1(isnap + 1) = S_1(isnap) - S_1(isnap).k_{nr}.\delta t$$

3- S'il n'est dans aucune zone.

$$S_1(isnap + 1) = S_1(isnap)$$

ou δt est l'intervalle de temps entre les deux snapshots, k_r la constante de vitesse de conversion radiative et k_{nr} la constante de vitesse de conversion non radiative.

Calcul de ϕ_{fluo} et τ_{fluo} :

On a donc :

$$\phi_{fluo} = \sum_{isnap=1}^{\infty} (\delta nph(isnap))$$

Et :

$$\tau_{fluo} = \frac{\sum_{isnap=1}^{\infty} (\delta nph(isnap) * isnap * \delta t)}{\sum_{isnap=1}^{\infty} \delta nph(isnap)}$$

Ici, nous avons des trajectoires de 6 ns. Ces 6 ns représente 2 fois le temps de vie de fluorescence expérimental de la protéine EosFP. Nous avons donc estimé que nous obtenons une approximation correcte de ϕ_{fluo} et τ_{fluo} en utilisant les sommes tronquées à 6 ns (donc 300000 snapshots).

Nous avons donc calculé le rendement quantique de fluorescence et le temps de vie de fluorescence sur toutes nos trajectoires. Les résultats classés par rendements quantiques croissants sont donnés sur la figure III.5.2 (en haut) et par temps de vie de fluorescence croissants (figure III.5.2 en bas).

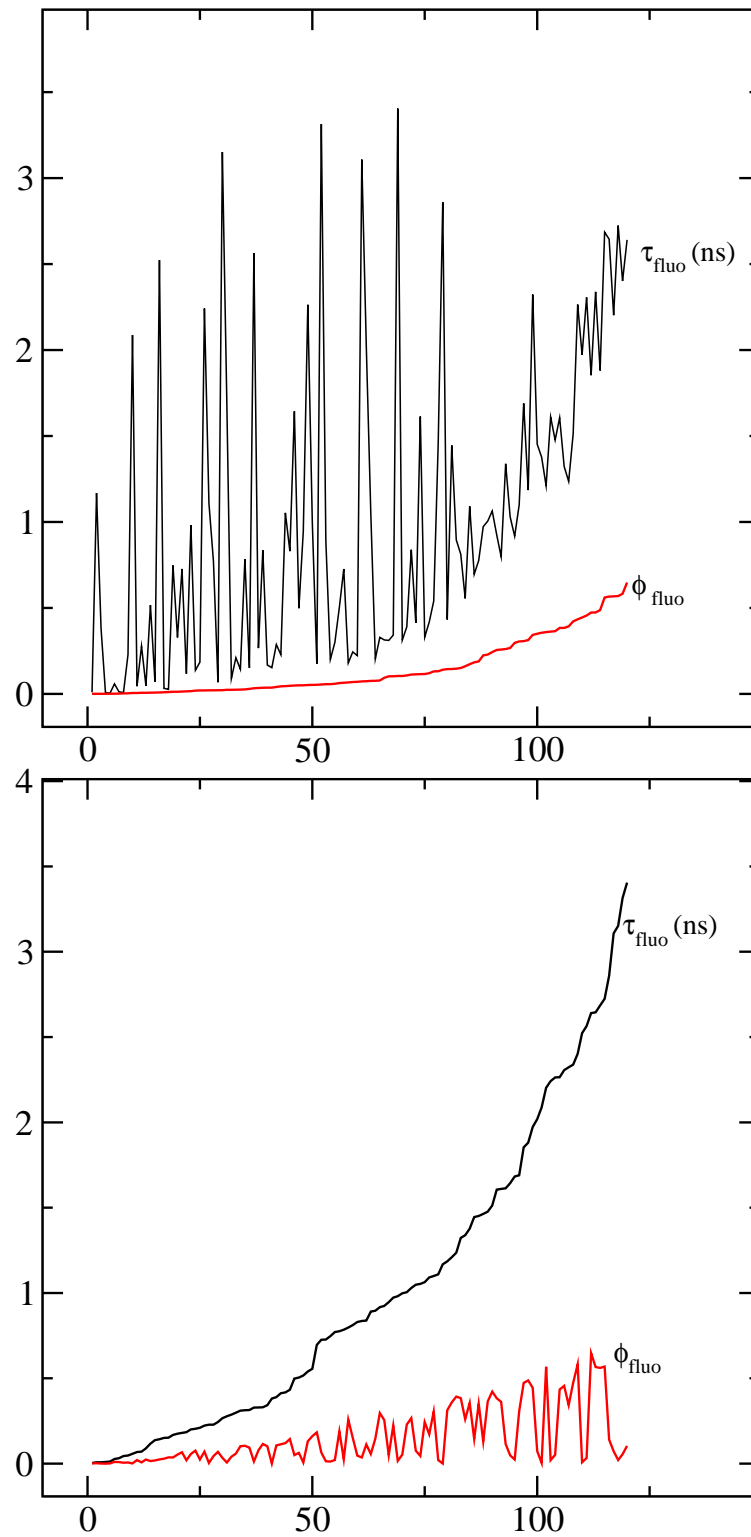


FIG. III.5.2 – Rendement quantique de fluorescence et temps de vie de fluorescence calculés dans nos 120 dynamiques. En haut : Les dynamiques sont classées par rendement quantique croissants. En bas : Les dynamiques sont classées par temps de vie de fluorescence croissants.

On peut voir tout d'abord sur ces deux figures que, selon les dynamiques, le temps de vie de fluorescence et le rendement quantique peuvent être très différents. Le rendement quantique mesuré varie entre 0 et 0.7 et le temps moyen de fluorescence entre 0 et 3.4 ns.

On peut également observer que, quand une dynamique présente un temps de vie de fluorescence important, le rendement quantique de fluorescence a tendance à être important aussi, aux oscillations près. De même, si on prend un temps de vie de fluorescence important, le rendement quantique de fluorescence est généralement grand également.

A l'aide de ces graphiques, on voit que nous avons 3 cas de figure possibles :

1 - Les situations dans lesquels le rendement quantique de fluorescence est faible et le temps de vie de fluorescence aussi.

2 - Celles où le rendement quantique de la simulation est élevé et le temps de vie de fluorescence aussi.

3 - Des simulations où le rendement quantique est faible, mais le temps de vie de fluorescence est important.

Nous avons choisi 3 dynamiques parmi les 120 correspondant chacune à l'un des cas. Pour chacune, nous avons représenté les zones visitées par le chromophore et calculé le déclin de fluorescence, c'est-à-dire le nombre de photon émis par unité de temps en fonction de temps. Ces résultats sont présentés sur la figure III.5.3.

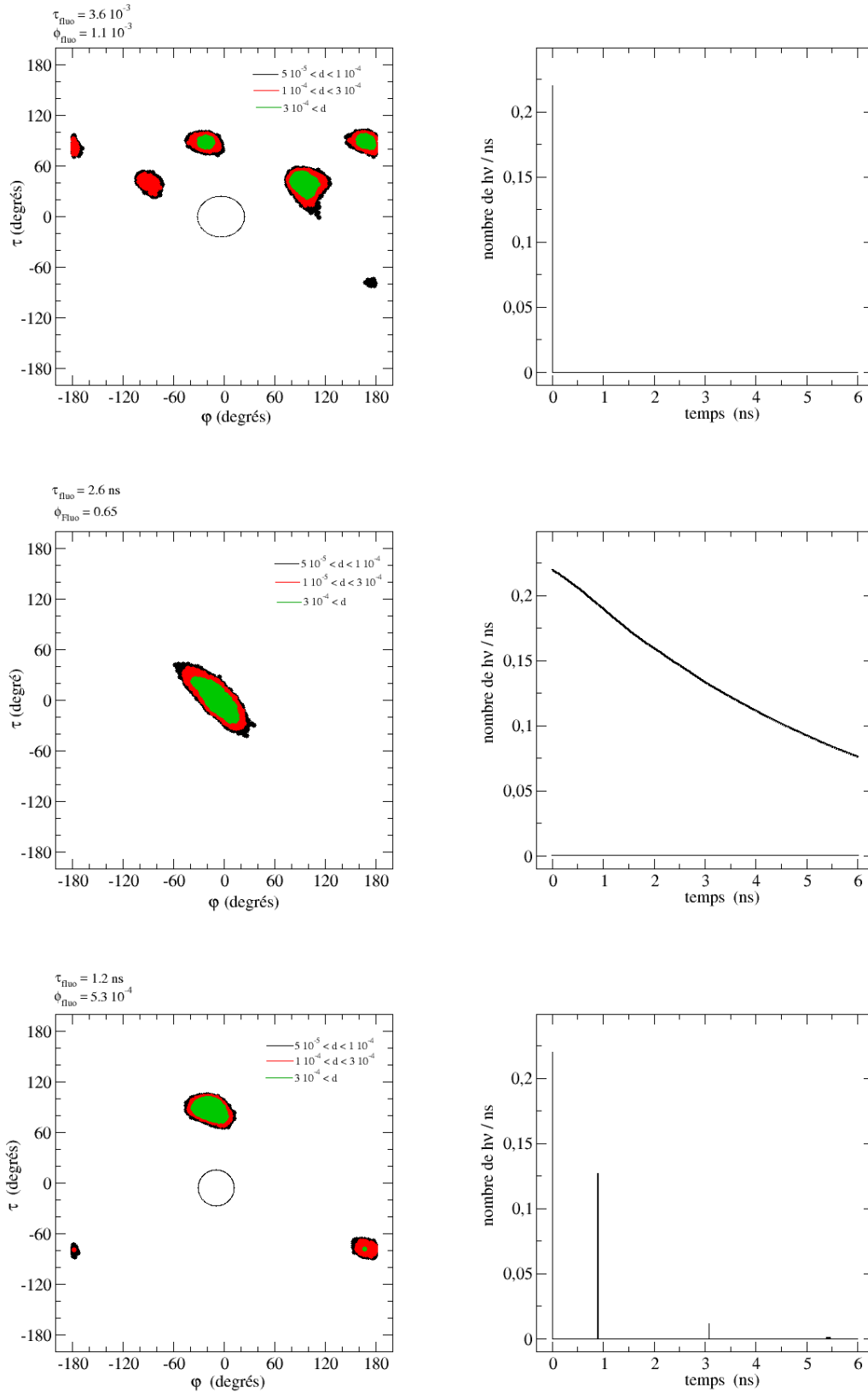


FIG. III.5.3 – Représentation des trois cas de figure. En haut : cas de figure 1. Au milieu : cas de figure 2. En bas : cas de figure 3. A gauche : zones visitées pendant la dynamique. A droite : déclin de fluorescence associé.

Sur cette figure, on peut voir que dans le cas 1 (τ_{fluo} et ϕ_{fluo} faibles), le chromophore n'est presque jamais dans la zone de fluorescence. En analysant le déclin de fluorescence, on peut voir que le chromophore émet des photons seulement dans les temps très courts. Dans cette dynamique, le chromophore a donc quitté la zone de fluorescence dès le début de la simulation, et n'y est jamais retourné. Le chromophore visite des zones de twists couplés de φ et τ ($\varphi = \pm 90^\circ$ et $\tau = 45^\circ$). Pour ces géométries, dans notre modèle, la conversion interne ne se produit pas mais la fluorescence non plus. Le chromophore visite également la zone de conversion interne $\tau > 0$. De ce fait, on trouve un rendement quantique de fluorescence très faible (0.001), et le temps de vie de fluorescence est très petit (0.004 ns).

Dans le cas de figure 2 (τ_{fluo} et ϕ_{fluo} importants), on peut voir que le chromophore ne visite pas d'autres zones que celle de fluorescence. On peut donc voir que l'émission de photon se fait tout au long de la simulation. Nous avons donc un rendement quantique de fluorescence important (0.65) et un temps de vie de fluorescence long (2.6 ns).

Enfin, dans le troisième cas de figure (τ_{fluo} important et ϕ_{fluo} faible), le chromophore ne se trouve pas dans la zone de fluorescence, mais seulement dans les zones de conversion interne $\tau > 0$ et $\tau < 0$. Néanmoins, en observant le déclin de fluorescence, on peut voir qu'il y a des pics occasionnels. De temps en temps, le chromophore adopte donc une géométrie plane, qui permet un peu de fluorescence. On trouve donc un rendement quantique très faible (0.0005), mais un temps de vie de fluorescence long (1.2 ns).

Les notions de ϕ_{fluo} et τ_{fluo} nécessitent une statistique sur un nombre important de dynamiques, mais cette analyse trajectoire par trajectoire permet de voir des profils très différents.

La figure III.5.4 représente le nombre cumulé de photons émis en fonction du temps moyenné sur les 120 dynamiques et le déclin de la population de l'état excité de EosFP moyenné sur les 120 dynamiques.

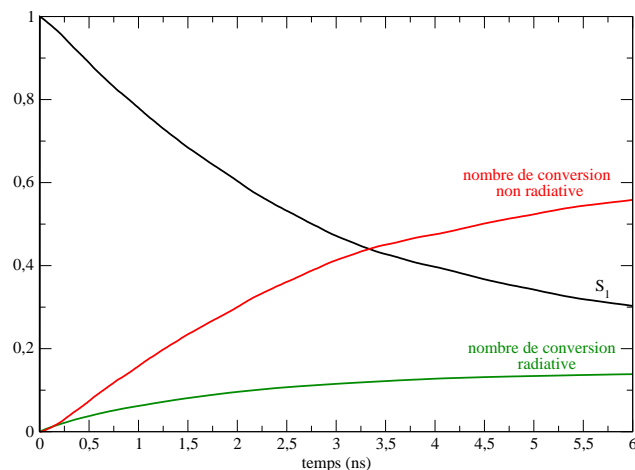


FIG. III.5.4 – Evolution moyennée sur les 120 dynamiques. En noir : population de l'état S₁. En rouge : nombre de conversions non radiatives. En vert : nombre de conversions radiatives.

A partir de ces moyennes, on trouve un rendement quantique de fluorescence de 0.14 et un temps de vie de fluorescence de 1.0 ns. On peut également voir qu'après les 6 nanosecondes de

simulation, on trouve environ 30% de la population qui est toujours à l'état excité. On peut remarquer que le nombre de conversion radiative semble avoir atteint sa limite.

Pour rappel, le rendement quantique déterminé expérimentalement vaut 0.7, et le temps de vie de fluorescence vaut 3.0 ns.

Le rendement quantique de fluorescence ainsi que le temps de vie de fluorescence calculée sont donc dans le même ordre de grandeur que les valeurs mesurées expérimentalement, mais cependant nettement trop petits.

Dans l'étude qui a permis de déterminer les valeurs de k_r et k_{nr} [77], l'incertitude sur la valeur de k_{nr} est grande. Pour évaluer l'impact de la valeur de k_{nr} sur le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence, nous avons fait varier la valeur de k_{nr} entre 8.0 ns^{-1} et 0.2 ns^{-1}

La figure III.5.5 présente l'évolution de ces deux grandeurs, en fonction de la valeur de k_{nr} .

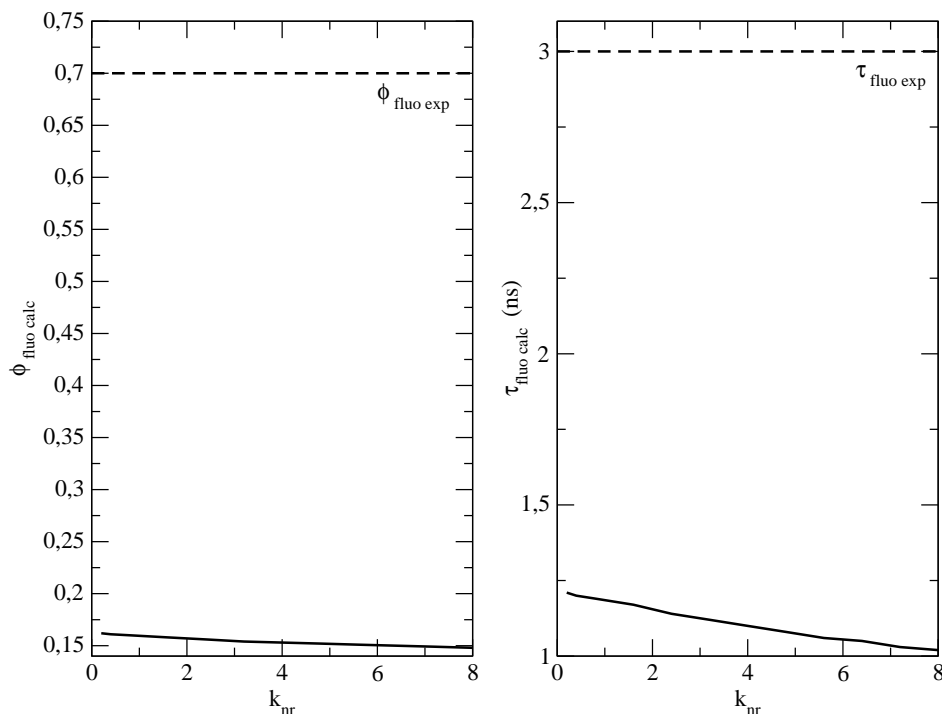


FIG. III.5.5 – Impact de la valeur de k_{nr} sur le rendement quantique (à gauche) et le temps de vie de fluorescence (à droite)

Sur cette figure, il apparaît que la valeur de k_{nr} n'impacte que très légèrement les valeurs calculées de rendement quantique et de temps de vie de fluorescence.

Nos valeurs trop petites de τ_{fluo} et ϕ_{fluo} peuvent venir de plusieurs éléments. D'une part, le champ de force du chromophore n'est pas parfait. Notre approche prend en compte des champs de force sans polarisation. D'autre part, nous avons observé que des dynamiques donnent des τ_{fluo} et des ϕ_{fluo} proches des valeurs expérimentales. On suppose donc que nous avons un problème de statistique. Nous avons réalisé 120 dynamiques, à partir de point de départ issus de dynamiques à l'état fondamental. L'exploration de l'état S_0 n'est peut-être pas assez étendue. De plus, un plus grand nombre de dynamique de l'état S_1 améliorerait sûrement la statistique.

III.6 Schéma cinétique

Dans la partie III.4.2, nous avons montré que le chromophore visite les géométries (φ et τ) de manière très inégale certaines zones étant très peuplées et d'autres pas du tout. Pour mieux représenter cela, nous avons quadrillé l'espace τ , φ en carrés de 1° et dénombré le nombre de snapshots situés dans chaque carré. Ceci nous permet d'obtenir une densité de population par $(\text{degré})^2$ en fonction de τ et φ . Cette densité, normalisée pour que la somme des densités soit égale à 1, est présentée sur la figure III.6.1.

On voit sur cette figure que le chromophore visite principalement 5 zones : une zone proche de la géométrie plane (que nous noterons Z_{Fluo}), deux zones dans lesquels il est fortement twisté suivant l'angle τ dans le sens positif (notée Z_{τ_p}) ou négatif (notée Z_{τ_n}) et deux zones où il est fortement twisté suivant φ , mais avec des valeurs de τ importantes (Z_{dark1} et Z_{dark2}).

On retrouve 68% des géométries dans ces 5 zones. Dans les 32% de géométries restantes, le chromophore est en dehors des zones. Cela montre que les zones sont assez floues. Cela est probablement dû aux effets de la dynamique sur le chromophore. La dynamique de l'environnement du chromophore modifie les énergies d'interaction entre le chromophore et les résidus voisins, ce qui peut compenser ou renforcer des écarts d'énergie de la surface d'énergie potentielle du chromophore excité.

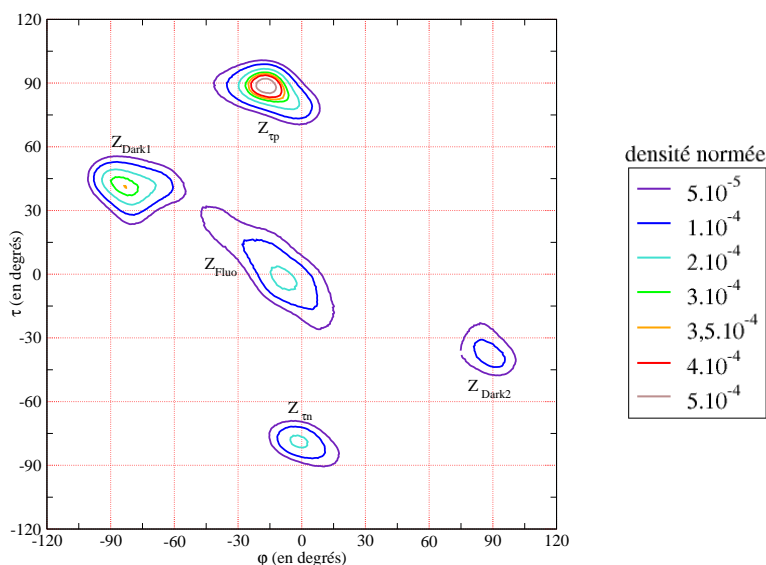


FIG. III.6.1 – Les zones visitées majoritairement par le chromophore selon le plan φ, τ (en degrés).

La répartition des angles φ et τ avec des zones faisant apparaître des maxima de densité suggère que chaque zone représente une espèce distincte. On assimile alors le passage d'une zone à une autre à une réaction chimique. On peut alors déterminer un schéma de réaction du chromophore qui décrit à la fois les passages d'une zone à l'autre et les retours vers l'état fondamental par conversion radiative ou non radiative.

En pratique, nous définirons les différentes espèces considérées comme les zones où la densité est supérieure à 5.10^{-5} .

La figure III.6.2 présente les zones visitées par le chromophore ainsi que les zones de conversion.

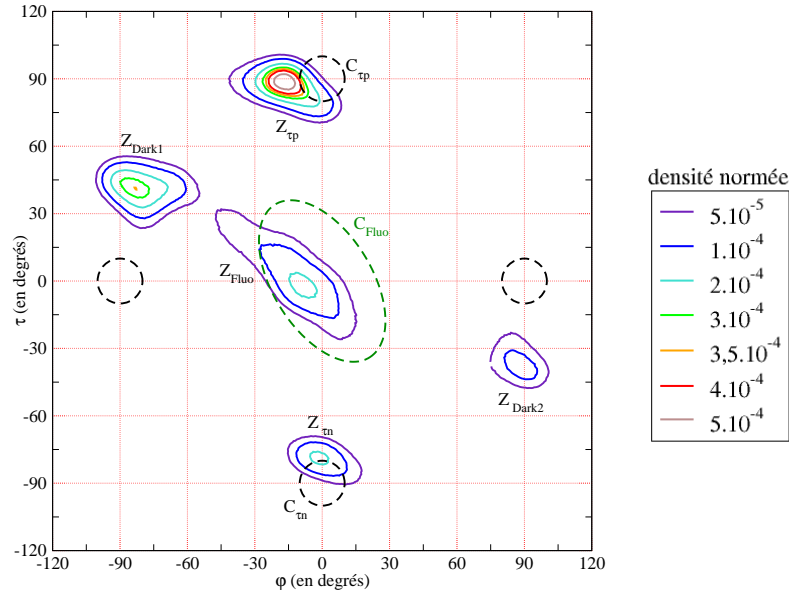


FIG. III.6.2 – Les zones majoritairement visitées par le chromophore (traits plein) et les zones de conversion (traits pointillés) selon le plan φ et τ .

La figure III.6.2 rappelle les 5 zones visitées par le chromophore de EosFP en fonction des angles φ et τ décrites précédemment ainsi que les zones dans lesquelles nous avons considéré dans la partie précédente que le chromophore est capable de retourner à l'état fondamental soit par conversion radiative (en pointillés verts) soit par conversion non radiative (en pointillés noirs) ces zones sont les mêmes que dans la partie III.5. Nous appellerons dorénavant C_{Fluo} , la zone où le chromophore est capable d'effectuer une conversion radiative. La zone C_{τ_n} sera la zone où le chromophore est capable d'effectuer une conversion non radiative, où le chromophore présente une torsion négative de τ et C_{τ_p} celle où le chromophore présente une torsion positive de τ .

Le recouvrement entre les zones Dark et les conversions non radiatives en φ étant nulle, il n'y aura pas de conversion interne à considérer depuis ces zones.

La zone Z_{fluo} est la seule zone où la conversion radiative est susceptible d'avoir lieu, mais on peut voir sur cette figure qu'elle ne coïncide pas exactement avec la zone C_{Fluo} où la fluorescence se produit. Seule une partie de Z_{Fluo} est active pour la fluorescence. Cependant, on peut considérer que durant le laps de temps qui sépare deux snapshots (20 femtosecondes) la position du chromophore se déplace rapidement dans la zone par rapport à la vitesse d'échange entre les zones. Nous avons calculé une constante de vitesse effective k_r^* en multipliant la valeur de k_r utilisée dans la partie III.5 ($k_r = 0.22 \text{ ns}^{-1}$) par la proportion de la population Z_{fluo} qui appartient à la zone C_{fluo} . Dans le schéma cinétique, le déclin de la population de Z_{fluo} par la voie radiative sera donc affecté de la constante de vitesse effective k_r^* . On trouve que k_r^* vaut 0.19 ns^{-1} .

De la même façon, la zone Z_{τ_p} ne coïncide pas avec la zone de conversion non radiative C_{τ_p} . Seule une petite partie de Z_{τ_p} appartient à C_{τ_p} . Nous avons déterminé une constante de vitesse effective de la même façon que pour la fluorescence. A partir de la valeur de k_{nr} utilisée précédemment

(8.0 ns^{-1} [77]), nous obtenons $k_{nr-\tau p}^* = 1.22 \text{ ns}^{-1}$. Procédant de même pour la zone $Z_{\tau n}$, nous obtenons $k_{nr-\tau n}^* = 1.85 \text{ ns}^{-1}$.

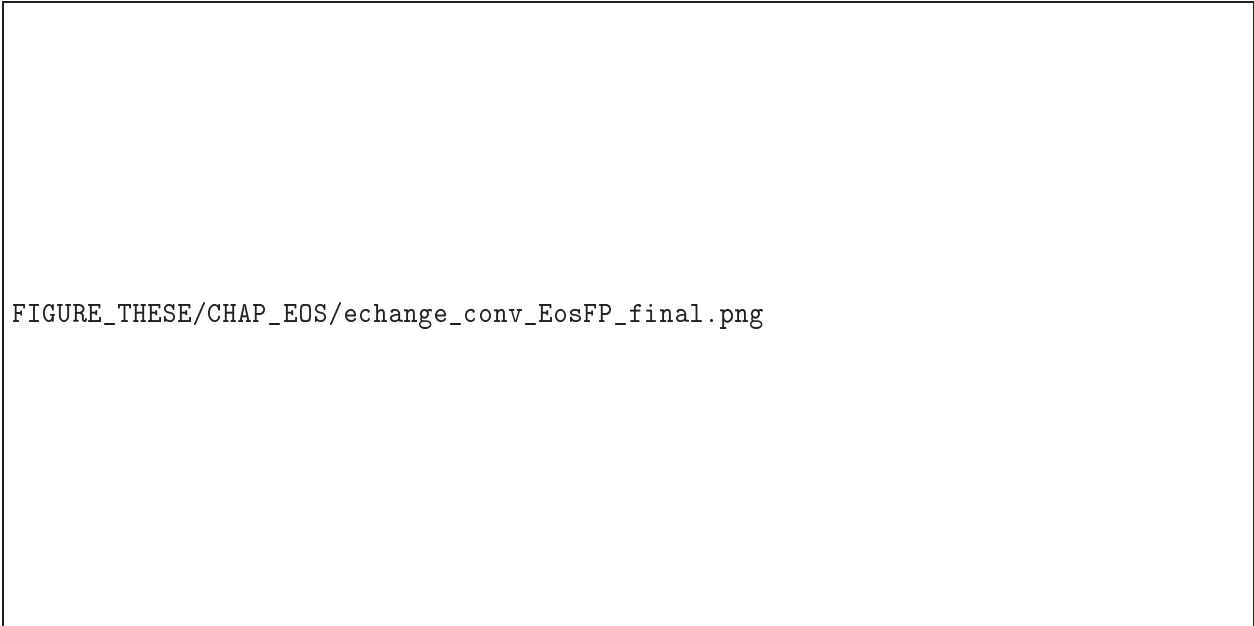
Constantes de vitesse de passage entre les zones.

Nous calculons la vitesse de passage k_{a-b} de la zone a vers la zone b de la façon suivante :

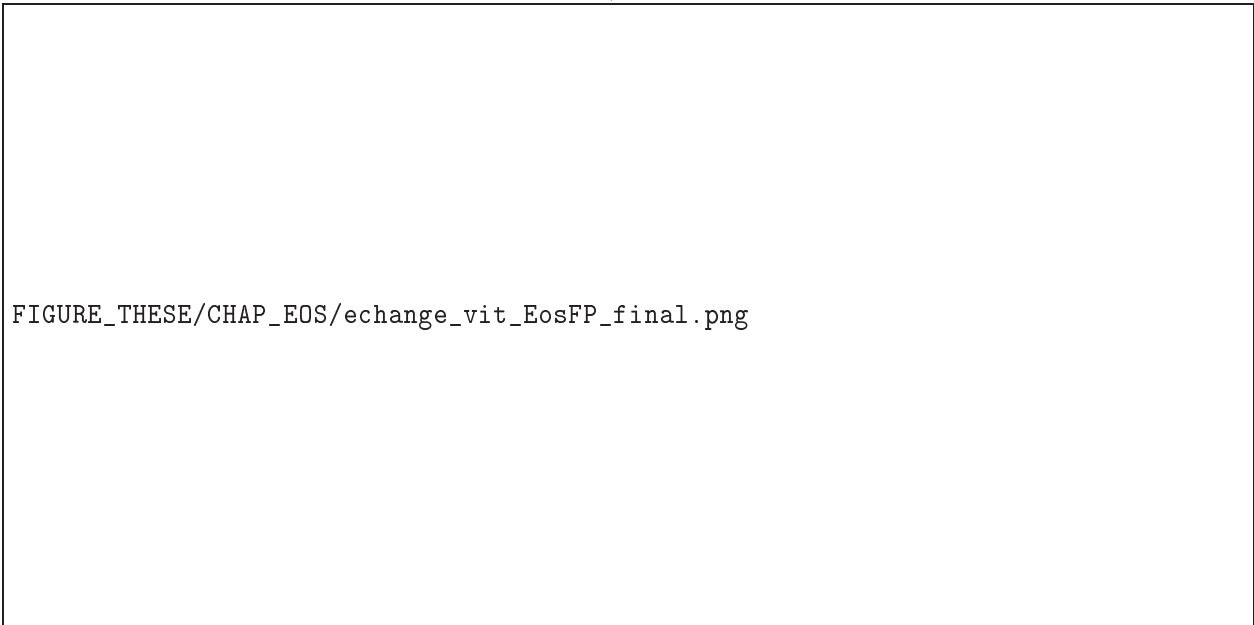
$$k_{a-b} = \frac{n_{a-b}}{F_a \cdot T} \quad (\text{III.6.1})$$

Les grandeurs n_{a-b} et F_a sont tirées de l'ensemble de nos dynamiques, de durée totale $T=720 \text{ ns}$. La grandeur n_{a-b} est le nombre de passages de a vers b observés pendant ces dynamiques et F_a est le pourcentage de temps passé dans la zone a (nombre en rouge sur la figure III.6.3). Cette formule s'explique ainsi : le chromophore réside dans la zone a pendant le temps $F_a \cdot T$, pendant ce temps, il effectue n_{a-b} passage vers la zone b. La vitesse de passage de a vers b est donc le rapport $\frac{n_{a-b}}{F_a \cdot T}$.

Les valeurs de F_a , n_{a-b} ainsi que celles de k_{a-b} ainsi obtenues sont données dans la figure III.6.3.



FIGURE_THESE/CHAP_EOS/echange_conv_EosFP_final.png



FIGURE_THESE/CHAP_EOS/echange_vit_EosFP_final.png

FIG. III.6.3 – Représentation des échanges entre les zones pendant les dynamiques de durée totale 720 ns. En haut : nombre de conversions. En bas : vitesse de réaction (en ns^{-1}). En rouge : pourcentage de géométrie trouvé dans la zone.

Sur cette figure, on peut voir que :

Premièrement, le nombre de passages d'une zone à une autre est toujours très proche de celui de retour.

Deuxièmement, les conversions les plus nombreuses sont entre les zones Z_{Fluo} et Z_{Dark1} . Ceci montre que le chromophore est capable d'adopter des géométries partiellement twistées assez rapidement et donc que l'environnement n'est pas assez rigide pour maintenir le chromophore dans une géométrie plane. Dans un deuxième temps, les nombreux retours vers la zone Z_{Fluo} montrent que le chromophore n'est pas non plus stabilisé dans la zone Z_{Dark1} . Les vitesses de

passage vers les zones de conversion non radiative sont elles beaucoup plus lentes.

Troisièmement, on peut voir que les échanges entre les zones Z_{Dark1} et $Z_{\tau p}$ sont plus nombreux que les échanges entre les zones Z_{Fluo} et $Z_{\tau p}$. De plus, les échanges entre les zones Z_{Dark1} et $Z_{\tau n}$ ainsi que ceux entre la zone Z_{Dark2} vers la zone $Z_{\tau n}$ ne sont pas négligeables. Les zones Z_{Dark1} et Z_{Dark2} peuvent donc servir d'intermédiaire pour atteindre des zones de conversion non radiative.

Enfin, le nombre de passages entre les zones Z_{Dark1} et Z_{Dark2} , $Z_{\tau n}$ et $Z_{\tau p}$ et les zones Z_{Dark2} et $Z_{\tau p}$ sont proches de 0, et les vitesses de réaction calculées à partir de ces conversions sont inférieures à 0.1 ns^{-1} . Nous avons donc négligé ces réactions.

Matrice de l'évolution des populations du chromophore

A partir des vitesses de réactions déterminées précédemment, on peut écrire l'évolution temporelle des populations des différentes zones sous forme matricielle :

$$[A][S] = [\dot{S}]$$

avec A ou 'matrice cinétique' est une matrice dépendant des vitesses de réaction, déterminée par l'équation III.6.1. S le vecteur colonne des populations, et \dot{S} le vecteur colonne des dérivées de ces populations par rapport au temps.

La matrice A est donnée sur le tableau III.5.

	$S_{1 Fluo}$	$S_{1 Dark1}$	$S_{1 \tau p}$	$S_{1 \tau n}$	$S_{1 Dark2}$	$S_{0 fluo}$	$S_{0 \tau p}$	$S_{0 \tau n}$
$S_{1 Fluo}$	$-\sum_{dep Fluo}$	$k_{Dark1-Fluo}$	$k_{\tau p-Fluo}$	$k_{\tau n-Fluo}$	$k_{Dark2-Fluo}$	0	0	0
$S_{1 Dark1}$	$k_{Fluo-Dark1}$	$-\sum_{dep Dark1}$	$k_{\tau p-Dark1}$	$k_{\tau n-Dark1}$	0	0	0	0
$S_{1 \tau p}$	$k_{Fluo-\tau n}$	$k_{Dark1-\tau p}$	$-\sum_{dep \tau p}$	0	0	0	0	0
$S_{1 \tau n}$	$k_{Fluo-\tau n}$	$k_{Dark1-\tau n}$	0	$-\sum_{dep \tau n}$	$k_{Dark2-\tau n}$	0	0	0
$S_{1 Dark2}$	$k_{Fluo-Dark2}$	0	0	$k_{\tau n-Dark2}$	$-\sum_{dep Dark2}$	0	0	0
$S_{0 Fluo}$	k_r^*	0	0	0	0	0	0	0
$S_{0 \tau p}$	0	0	$k_{nr-\tau p}^*$	0	0	0	0	0
$S_{0 \tau n}$	0	0	0	$k_{nr-\tau n}^*$	0	0	0	0

TAB. III.5 – Matrice cinétique régissant l'évolution des populations.

avec :

$$\sum_{dep fluo} = k_{Fluo-Dark1} + k_{Fluo-\tau p} + k_{Fluo-\tau n} + k_{Fluo-Dark2} + k_r^*$$

$$\sum_{dep dark1} = k_{Dark1-Fluo} + k_{Dark1-\tau p} + k_{Dark1-\tau n}$$

$$\sum_{dep \tau p} = k_{\tau p-Fluo} + k_{\tau p-Dark1} + k_{\tau p-Dark2} + k_{nr-\tau p}^*$$

$$\sum_{dep \tau n} = k_{\tau n-Fluo} + k_{\tau n-Dark1} + k_{\tau n-Dark2} + k_{nr-\tau n}^*$$

$$\sum_{dep dark2} = k_{Dark2-Fluo} + k_{Dark2-\tau n}$$

Nous notons S_{0Fluo} la population de chromophore à l'état fondamental par conversion radiative, $S_{0\tau p}$ la population de chromophore par conversion non radiative depuis la zone $Z_{\tau p}$ et $S_{0\tau n}$ celle obtenue par conversion interne depuis la zone $Z_{\tau n}$.

La forme explicite d'évolution de la population de la zone Z_{Fluo} est par exemple :

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1fluo}}{dt} = & -(k_{Fluo-Dark1} + k_{Fluo-\tau p} + k_{Fluo-\tau n} + k_{Fluo-Dark2} + k_r^*) \cdot S_{1Fluo} \\ & + k_{\tau p-Fluo} \cdot S_{1\tau p} + k_{\tau n-Fluo} \cdot S_{1\tau n} + k_{Dark2-Fluo} \cdot S_{1dark2} \end{aligned}$$

Les formes explicites pour chaque zone sont données dans l'annexe B1.

Ce système d'équation permet d'exprimer les populations en fonction du temps sous forme de combinaisons linéaires des fonctions propres de la matrice A et d'une exponentielle : $\exp(\lambda_p t)$ où les λ_p sont les valeurs propres de la matrice A :

$$\begin{aligned} \dot{S}_i &= \sum_j A_{i,j} \cdot S_j \\ S_i(t) &= \sum_p d_p \cdot \sum_j C_{j,p} \cdot \exp(\lambda_p t) \\ &= \sum_p \left(d_p \cdot \sum_j C_{j,p} \right) \cdot \exp(\lambda_p t) \end{aligned}$$

d_p sont des coefficients déterminés à l'aide des conditions initiales. Les valeurs propres et les vecteurs propres ont été ici déterminés numériquement.

Résultats :

La figure III.6.4 présente l'évolution des populations des différentes zones ainsi obtenues en fonction du temps.

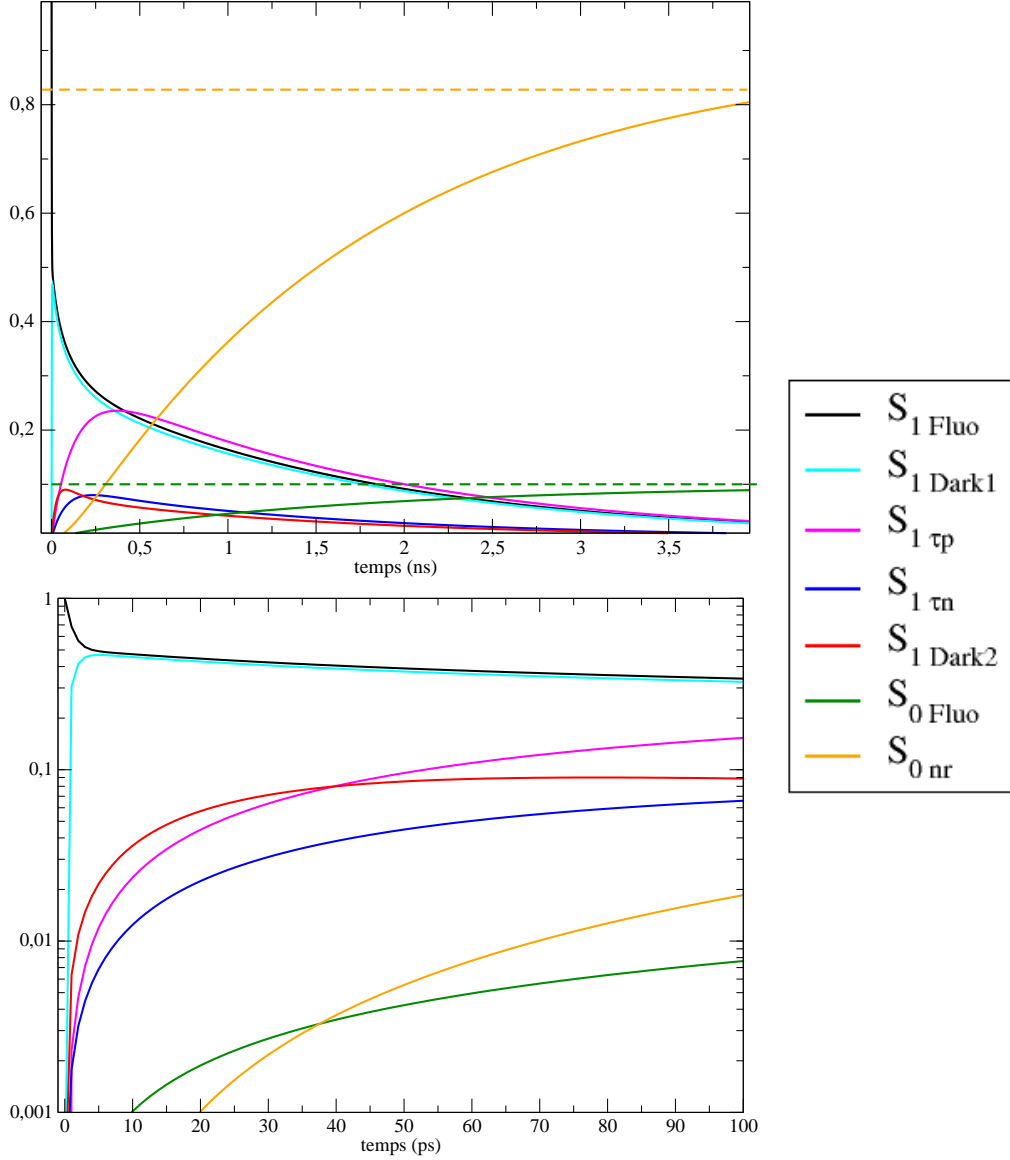


FIG. III.6.4 – Evolution des populations du chromophore en fonction du temps (ns). En haut : durant 4 ns. En bas : zoom sur les temps courts en échelle logarithmique. En pointillé : asymptote de $S_{0\text{Fluo}}$ (en vert) et de S_{0nr} (en jaune). S_{0nr} est la somme des conversions ($S_{0\tau p}$ et $S_{0\tau n}$) non radiative possible (conversion non radiative par les zones $Z_{\tau p}$ et $Z_{\tau n}$).

Sur la figure du haut, on peut voir que dans un premier temps, un équilibre très rapide s’installe entre les zones Z_{Dark1} et Z_{Fluo} . Dans un deuxième temps, les géométries évoluent vers les zones $Z_{\tau p}$, $Z_{\tau n}$ et Z_{Dark2} .

L’extrapolation de la valeur de $S_{0\text{Fluo}}$ à l’infini, nous donne la valeur du rendement quantique de fluorescence de EosFP. On trouve que ϕ_{fluo} vaut 0.1.

Le temps de vie de fluorescence est calculé comme :

$$\tau_{\text{fluo}} = k_r^* \cdot \sum_k C_k \exp(\lambda_k t)$$

Avec k_r la constante de vitesse de conversion radiative, C_k un coefficient numérique déterminé à partir des fonctions propres de la matrice A et des conditions initiales de la cinétique. Et les λ_k sont les valeurs propres de la matrice A, supposées réelles et négatives.

On trouve que τ_{fluo} vaut 1.6 ns.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus avec la méthode de l'intégration directe ($\phi=0.14$ et $\tau_{fluo}=1.9$ ns).

Sur la figure III.6.4, en bas, nous présentons l'évolution des populations en échelle logarithmique durant les 100 premières picosecondes. Sur cette figure, on peut voir que durant les 5 premières picosecondes, le déclin de la zone Z_{Fluo} n'est pas monoexponentielle. Ceci traduit le fait qu'un équilibre très rapide s'établit entre les zones Z_{Fluo} et Z_{Dark1} , qui domine dans les 5 premières picosecondes.

Comme pour le modèle de l'intégration directe, nous avons fait varier les valeurs de k_{nr} entre 0.2 ns^{-1} et 8.0 ns^{-1} .

Les valeurs obtenues pour ϕ et τ_{fluo} en fonction de la valeur de k_{nr} sont présentées sur la figure III.6.5.

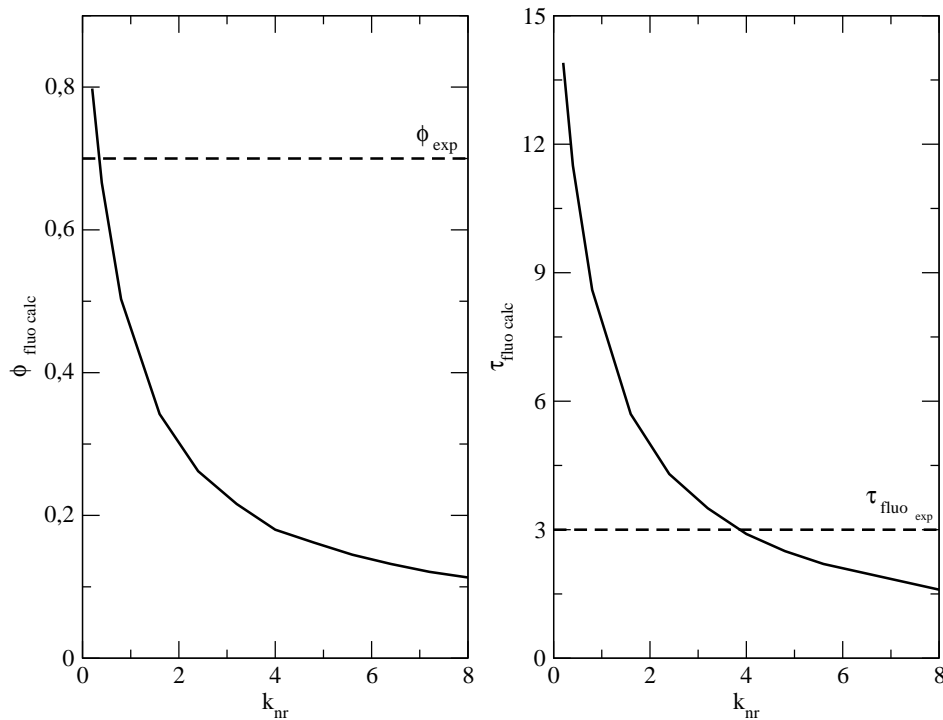


FIG. III.6.5 – Effet de la valeur de k_{nr} sur les propriétés photophysiques de EosFP. A gauche : effet sur le rendement quantique. A droite : effet sur le temps de vie de fluorescence.

On peut voir sur cette figure qu'aucune valeur de k_{nr} ne permet de reproduire de façon précise à la fois le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence de EosFP. Pour simuler correctement le rendement quantique, il faudrait une valeur de k_{nr} égale à 0.4 ns^{-1} mais avec cette valeur, on estime un temps de vie de fluorescence autour de 10 ns qui est environ 3 fois trop grand.

De même, pour prédire un temps de vie de fluorescence proche de la valeur expérimentale, il faut une valeur de k_{nr} de 4.0 ns^{-1} . Avec cette valeur on obtient un rendement quantique de fluorescence de 0.18, au lieu de la valeur de 0.7 mesurée expérimentalement.

Pour obtenir de meilleurs résultats avec ce modèle, il faudrait prendre en compte les conversions non radiatives qui peuvent avoir lieu depuis les zones où l'angle φ est proche de 90° et τ proche de 0° , que nous avons négligées ici. De plus, il faudrait une meilleure définition des zones où la conversion interne est possible. Il est possible également que la prise en compte des configurations en dehors des zones ici utilisées modifient les constantes d'équilibre.

III.7 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons analysé la dynamique du chromophore, son réseau de liaison hydrogène à l'état fondamental ainsi que les spectres d'absorption pour les deux types de structure de la protéine EosFP caractérisées par cristallographie. Ces résultats ne montrent pas de rôle spécifique de la molécule d'eau Wat309 qui différencie les deux structures dans l'environnement du chromophore.

La dynamique du chromophore à l'état excité dans EosFP apparaît beaucoup plus sensible à la présence de la molécule d'eau.

L'étude détaillée de la dynamique à l'état excité nous a permis d'identifier une surface d'énergie complexe comportant des configurations partiellement twistées, qualifiées d'états noirs.

Nous obtenons une estimation du rendement quantique et du temps de vie de fluorescence par deux méthodes différentes.

D'une part nous avons effectué une intégration directe le long des trajectoires. Grâce à l'analyse de 3 trajectoires particulières par cette méthode, nous avons montré des comportements dynamiques très différents du chromophore, caractérisés par des contributions très différentes au temps de vie moyen et au rendement quantique moyen.

D'autre part, nous avons estimé le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence en établissant un schéma cinétique. Les résultats obtenus ont un ordre de grandeur correct, sans reproduire précisément les données expérimentales. Tous les résultats sont rappelés dans le tableau III.6.

	ϕ_{fluo}	$\tau_{fluo}(\text{ns})$
intégration directe	0.14	1.7
schéma cinétique	0.1	1.9
Valeurs expérimentales	0.70[78]	3.0[36]

TAB. III.6 – Comparaison des résultats obtenus avec les différentes méthodes.

Ces écarts sont probablement dus à une statistique insuffisante, aux approximations dans la description des processus de changements d'états électroniques ainsi qu'à l'absence des effets de polarisation. Cependant, la mise au point de méthodes d'analyse de la dynamique complexe du chromophore au sein d'une protéine par intégration directe ou par un schéma cinétique constitue une avancée par rapport aux approches précédemment utilisées dans l'équipe.

Chapitre IV

Conclusion Générale

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des outils théoriques différents (dynamiques moléculaires et calculs quantiques) dans le but de mieux décrire les propriétés photophysiques de deux protéines fluorescentes, Padron et EosFP.

Sur la protéine Padron, nous avons étudié la capacité du chromophore à se protoner au cours du processus d'isomérisation *cis* \rightarrow *trans*. Nous avons montré à travers son affinité protonique, que la protonation était moins probable dans les géométries twistées en τ que dans les géométries planes *cis* ou *trans* du chromophore. De plus, nous avons montré que malgré la liaison hydrogène qui est fréquemment établie entre le résidu Tyr159 et le chromophore, y compris lors de l'isomérisation, la protonation du chromophore ne se faisait pas par ce résidu ou alors de façon très minoritaire. Enfin, nous avons mis en évidence que sous sa forme *cis*, le chromophore est relié au solvant via un réseau de molécules d'eau qui passe par le cleft.

Pour approfondir cette étude, il faudrait donc chercher à déterminer si le long de ces chemins de molécules d'eau, un transfert de proton partant du solvant et aboutissant au chromophore est possible.

Sur la protéine EosFP, nous avons analysé l'impact d'une molécule d'eau proche de l'oxygène de l'imidazolinone du chromophore sur la dynamique du chromophore d'une part à l'état fondamental et d'autre part à l'état excité. A l'état fondamental, nous n'avons pas pu mettre en évidence le rôle de cette molécule d'eau, que ce soit sur le réseau de liaison hydrogène, ou sur le spectre d'absorption de EosFP. A l'état excité par contre, les dynamiques réalisées sans la molécule d'eau présentent une torsion beaucoup plus rapide du chromophore.

A partir des dynamiques de l'état excité du chromophore de EosFP, nous avons utilisé deux approches pour calculer le rendement quantique de fluorescence et le temps de vie de fluorescence de la protéine. Soit par intégration directe le long des trajectoires, soit en définissant un ensemble "d'espèces" à l'état excité et à l'état fondamental. Nos deux modèles donnent des résultats en accord qualitatif avec l'expérience.

Deux axes sont envisagés pour améliorer cette étude. D'une part travailler avec un ensemble de trajectoires plus important pour améliorer la description statistique et d'autre part préciser la

description des zones de conversion radiative et non radiative, à la fois au niveau de la définition géométrique de la zone et des valeurs des constantes k_r et k_{nr} en leur sein.

Plus généralement, les travaux menés dans cette thèse renforcent l'idée que la dynamique du chromophore à l'état fondamental comme à l'état excité au sein des protéines fluorescentes est complexe, fortement dépendante de l'environnement et de la dynamique globale de la protéine. Les descriptions du processus d'isomérisation *trans*→*cis* du chromophore ou de la dynamique du chromophore à l'état excité posent le problème des coordonnées de réaction à l'action bien plus complexe que les seules torsions τ et φ . L'étude des protéines fluorescentes implique l'analyse de nombreuses trajectoires de dynamique moléculaire mais aussi des descriptions fines de la structure et des processus électroniques pour conduire à des résultats quantitatifs.

Bibliographie

- [1] Osamu Shimomura, Frank H Johnson, and Yo Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3) :223–239, 1962.
- [2] Geoffrey S Baird, David A Zacharias, and Roger Y Tsien. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of dsred, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22) :11984–11989, 2000.
- [3] Tanja Brakemann, Gert Weber, Martin Andresen, Gerrit Groenhof, Andre C Stiel, Simon Trowitzsch, Christian Eggeling, Helmut Grubmüller, Stefan W Hell, Markus C Wahl, et al. Molecular basis of the light-driven switching of the photochromic fluorescent protein Padron. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19) :14603–14609, 2010.
- [4] Jörg Wiedenmann, Sergey Ivanchenko, Franz Oswald, Florian Schmitt, Carlheinz Röcker, Anya Salih, Klaus-Dieter Spindler, and G Ulrich Nienhaus. EosFP, a fluorescent marker protein with uv-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45) :15905–15910, 2004.
- [5] Lars V Schäfer, Gerrit Groenhof, Astrid R Klingen, G Matthias Ullmann, Martial Boggio-Pasqua, Michael A Robb, and Helmut Grubmüller. Photoswitching of the fluorescent protein asFP595 : mechanism, proton pathways, and absorption spectra. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(4) :530–536, 2007.
- [6] Douglas C Prasher, Virginia K Eckenrode, William W Ward, Frank G Prendergast, and Milton J Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2) :229–233, 1992.
- [7] M Chalfie, Y Tu, and G Ward Euskirchen. W. and prasher, d.(1994) green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 :802.
- [8] Hiroshi Morise, Osamu Shimomura, Frank H Johnson, and John Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13(12) :2656–2662, 1974.
- [9] Fan Yang. *The molecular structure of green fluorescent protein*. PhD thesis, Rice University, 1997.
- [10] Mats Ormo, Andrew B Cubitt, Karen Kallio, Larry A Gross, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280) :1392, 1996.

- [11] Andrew B Cubitt, Roger Heim, Stephen R Adams, Aileen E Boyd, Larry A Gross, and Roger Y Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences*, 20(11) :448–455, 1995.
- [12] Fadi Bou-Abdallah, N Dennis Chasteen, and Michael P Lesser. Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(11) :1690–1695, 2006.
- [13] Michael P Lesser, Charles H Mazel, Maxim Y Gorbunov, and Paul G Falkowski. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science*, 305(5686) :997–1000, 2004.
- [14] SG Dove, O Hoegh-Guldberg, and S Ranganathan. Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral reefs*, 19(3) :197–204, 2001.
- [15] Caroline V Palmer, Chintan K Modi, and Laura D Mydlarz. Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS One*, 4(10) :e7298, 2009.
- [16] Anya Salih, Anthony Larkum, Guy Cox, Michael Kühl, and Ove Hoegh-Guldberg. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408(6814) :850–853, 2000.
- [17] Alexey M Bogdanov, Alexander S Mishin, Ilia V Yampolsky, Vsevolod V Belousov, Dmitriy M Chudakov, Fedor V Subach, Vladislav V Verkhusha, Sergey Lukyanov, and Konstantin A Lukyanov. Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. *Nature chemical biology*, 5(7) :459, 2009.
- [18] Mikhail V Matz, N Justin Marshall, and Misha Vorobyev. Are corals colorful? *Photochemistry and Photobiology*, 82(2) :345–350, 2006.
- [19] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [20] Gabriella Jonasson, Jean-Marie Teuler, Germain Vallverdu, Fabienne Mérola, Jacqueline Ridard, Bernard Lévy, and Isabelle Demachy. Excited state dynamics of the green fluorescent protein on the nanosecond time scale. *Journal of chemical theory and computation*, 7(6) :1990–1997, 2011.
- [21] IV Polyakov, BL Grigorenko, EM Epifanovsky, AI Krylov, and AV Nemukhin. Potential energy landscape of the electronic states of the GFP chromophore in different protonation forms : electronic transition energies and conical intersections. *Journal of chemical theory and computation*, 6(8) :2377–2387, 2010.
- [22] A Toniolo, S Olsen, L Manohar, and TJ Martinez. Conical intersection dynamics in solution : the chromophore of green fluorescent protein. *Faraday discussions*, 127 :149–163, 2004.
- [23] Gabriella Jonasson. *Etude théorique de l’extinction de fluorescence des protéines fluorescentes : champ de forces, mécanisme moléculaire et modèle cinétique*. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI, 2012.
- [24] George H Patterson, Susan M Knobel, Wallace D Sharif, Steven R Kain, and David W Piston. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 73(5) :2782, 1997.

- [25] Andreas Volkmer, Vinod Subramaniam, David JS Birch, and Thomas M Jovin. One-and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins. *Biophysical journal*, 78(3) :1589–1598, 2000.
- [26] Haruki Niwa, Satoshi Inouye, Takashi Hirano, Tatsuki Matsuno, Satoshi Kojima, Masayuki Kubota, Mamoru Ohashi, and Frederick I Tsuji. Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24) :13617–13622, 1996.
- [27] Debabrata Mandal, Tahei Tahara, and Stephen R Meech. Excited-state dynamics in the green fluorescent protein chromophore. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3) :1102–1108, 2004.
- [28] Bernard Valeur and Mário Nuno Berberan-Santos. *Molecular fluorescence : principles and applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- [29] Fabienne Mérola, Asma Fredj, Dahdjim-Benoît Betolngar, Cornelia Ziegler, Marie Erard, and Hélène Pasquier. Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnology journal*, 9(2) :180–191, 2014.
- [30] Tim Grotjohann, Ilaria Testa, Marcel Leutenegger, Hannes Bock, Nicolai T Urban, Flavie Lavoie-Cardinal, Katrin I Willig, Christian Eggeling, Stefan Jakobs, and Stefan W Hell. Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature*, 478(7368) :204–208, 2011.
- [31] Annette Müller-Taubenberger and Kurt I Anderson. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1) :1–12, 2007.
- [32] Manos Mavrikakis, Richa Rikhy, and Jennifer Lippincott-Schwartz. Plasma membrane polarity and compartmentalization are established before cellularization in the fly embryo. *Developmental cell*, 16(1) :93–104, 2009.
- [33] Martin Andresen, Andre C Stiel, Jonas Fölling, Dirk Wenzel, Andreas Schönle, Alexander Egner, Christian Eggeling, Stefan W Hell, and Stefan Jakobs. Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology*, 26(9) :1035–1040, 2008.
- [34] Ryoko Ando, Hideaki Mizuno, and Atsushi Miyawaki. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, 306(5700) :1370–1373, 2004.
- [35] Aline Regis Faro, Philippe Carpentier, Gabriella Jonasson, Guillaume Pompidor, Delphine Arcizet, Isabelle Demachy, and Dominique Bourgeois. Low-temperature chromophore isomerization reveals the photoswitching mechanism of the fluorescent protein Padron. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41) :16362–16365, 2011.
- [36] Sergey Ivanchenko, Carlheinz Röcker, Franz Oswald, Jörg Wiedenmann, and G Ulrich Nienhaus. Targeted green-red photoconversion of EosFP, a fluorescent marker protein. *Journal of biological physics*, 31(3-4) :249–259, 2005.
- [37] Aline Regis Faro. *Mécanismes de photo-commutation réversible des protéines fluorescentes*. PhD thesis, Grenoble, 2012.

- [38] Eduard Fron, Mark Van der Auweraer, Johan Hofkens, and Peter Dedecker. Excited state dynamics of photoswitchable fluorescent protein Padron. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(51) :16422–16427, 2013.
- [39] Arne Walter, Martin Andresen, Stefan Jakobs, Joëlrg Schroeder, and Dirk Schwarzer. Primary light-induced reaction steps of reversibly photoswitchable fluorescent protein Padron0.9 investigated by femtosecond spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(16) :5136–5144, 2015.
- [40] Dheerendra Yadav, Fabien Lacombar, Nadia Dozova, Fabrice Rappaport, Pascal Plaza, and Agathe Espagne. Real-Time Monitoring of Chromophore Isomerization and Deprotonation during the Photoactivation of the Fluorescent Protein Dronpa. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(6) :2404–2414, 2014.
- [41] Mark M Warren, Marius Kaucikas, Ann Fitzpatrick, Paul Champion, J Timothy Sage, and Jasper J van Thor. Ground-state proton transfer in the photoswitching reactions of the fluorescent protein Dronpa. *Nature communications*, 4 :1461, 2013.
- [42] Marius Kaucikas, Martijn Tros, and Jasper J van Thor. Photoisomerization and proton transfer in the forward and reverse photoswitching of the fast-switching M159T mutant of the Dronpa fluorescent protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(6) :2350–2362, 2014.
- [43] Jacques-Philippe Colletier, Michel Sliwa, François-Xavier Gallat, Michihiro Sugahara, Virginia Guillon, Giorgio Schirò, Nicolas Coquelle, Joyce Woodhouse, Laure Roux, Guillaume Gotthard, et al. Serial femtosecond crystallography and ultrafast absorption spectroscopy of the photoswitchable fluorescent protein IrisFP. *The journal of physical chemistry letters*, 7(5) :882–887, 2016.
- [44] Aline Regis Faro, Virgile Adam, Philippe Carpentier, Claudine Darnault, Dominique Bourgeois, and Eve de Rosny. Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(2) :254–262, 2010.
- [45] EL Wehry and LB Rogers. Application of linear free energy relations to electronically excited states of monosubstituted phenols. *Journal of the American Chemical Society*, 87(19) :4234–4238, 1965.
- [46] SG Lias. Ionization energy evaluation. *NIST chemistry webbook, NIST standard reference database*, 69, 2005.
- [47] MJea Frisch, GW Trucks, Hs B Schlegel, GE Scuseria, MA Robb, JR Cheeseman, G Scalmani, V Barone, B Mennucci, GA Petersson, et al. Gaussian 09, revision A. 02 ; Gaussian, Inc. *Wallingford, CT*, 19 :227–238, 2009.
- [48] Axel D Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical review A*, 38(6) :3098, 1988.
- [49] Chengteh Lee, Weitao Yang, and Robert G Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*, 37(2) :785, 1988.

- [50] Björn O Roos, Peter R Taylor, Per EM Si, et al. A complete active space SCF method (CASSCF) using a density matrix formulated super-CI approach. *Chemical Physics*, 48(2) :157–173, 1980.
- [51] Alexander A Voityuk, Maria-Elisabeth Michel-Beyerle, and Notker Rösch. Structure and rotation barriers for ground and excited states of the isolated chromophore of the green fluorescent protein. *Chemical physics letters*, 296(3) :269–276, 1998.
- [52] Wolfgang Weber, Volkhard Helms, J Andrew McCammon, and Peter W Langhoff. Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11) :6177–6182, 1999.
- [53] Seth Olsen, Kristina Lamothe, and Todd J Martinez. Protonic gating of excited-state twisting and charge localization in GFP chromophores : a mechanistic hypothesis for reversible photoswitching. *Journal of the American Chemical Society*, 132(4) :1192–1193, 2010.
- [54] Laurence A Angel and Kent M Ervin. Competitive threshold collision-induced dissociation : gas-phase acidity and OH bond dissociation enthalpy of phenol. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(40) :8346–8352, 2004.
- [55] Tomasz Bienkowski, Paweł Świder, Kacper Błaziak, and Witold Danikiewicz. Proton affinities of the anions of aromatic carboxylic acids measured by kinetic method. *International Journal of Mass Spectrometry*, 357 :29–33, 2014.
- [56] Michael W Schmidt, Kim K Baldridge, Jerry A Boatz, Steven T Elbert, Mark S Gordon, Jan H Jensen, Shiro Koseki, Nikita Matsunaga, Kiet A Nguyen, Shujun Su, et al. General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of computational chemistry*, 14(11) :1347–1363, 1993.
- [57] RH Garrett and CM Grisham. Biochimie. 2 édition. édité par De Boeck et Larcier. Technical report, ISBN 2-7445-0020-8. ième, 2000.
- [58] Richard P Muller and Arieh Warshel. Ab initio calculations of free energy barriers for chemical reactions in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(49) :17516–17524, 1995.
- [59] Sotiris S Xantheas. Theoretical study of hydroxide ion-water clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 117(41) :10373–10380, 1995.
- [60] Dongqing Wei, EI Proynov, A Milet, and DR Salahub. Solvation of the hydroxide anion : A combined dft and molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(11) :2384–2395, 2000.
- [61] R.M. Betz D.S. Cerutti T.E. Cheatham III T.A. Darden R.E. Duke T.J. Giese H. Gohlke A.W. Goetz N. Homeyer S. Izadi P. Janowski J. Kaus A. Kovalenko T.S. Lee S. LeGrand P. Li T. Luchko R. Luo B. Madej K.M. Merz G. Monard P. Needham H. Nguyen H.T. Nguyen I. Omelyan A. Onufriev D.R. Roe A. Roitberg R. Salomon-Ferrer C.L. Simmerling W. Smith J. Swails R.C. Walker J. Wang R.M. Wolf X. Wu D.M. York D.A. Case, J.T. Berryman and AMBER 2015 P.A. Kollman (2015). Amber 14, 2015.
- [62] Aliexsandr Jakutovich. Etude théorique de la fluorescence et de la photoconversion de la protéine Padron. Master’s thesis, 2012.

- [63] I Tuñón, MTC Martins-Costa, C Millot, and MF Ruiz-López. Molecular dynamics simulations of elementary chemical processes in liquid water using combined density functional and molecular mechanics potentials. i. proton transfer in strongly H-bonded complexes. *The Journal of chemical physics*, 106(9) :3633–3642, 1997.
- [64] Giuseppe Felice Mangiatordi, Eric Brémond, and Carlo Adamo. Dft and proton transfer reactions : a benchmark study on structure and kinetics. *Journal of chemical theory and computation*, 8(9) :3082–3088, 2012.
- [65] Ai Shinobu and Noam Agmon. The hole in the barrel : Water exchange at the GFP chromophore. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(8) :3464–3478, 2015.
- [66] Frances C Bernstein, Thomas F Koetzle, Grahame JB Williams, Edgar F Meyer, Michael D Brice, John R Rodgers, Olga Kennard, Takehiko Shimanouchi, and Mitsuo Tasumi. The protein data bank. *European Journal of Biochemistry*, 80(2) :319–324, 1977.
- [67] Petra Imhof. Computational study of absorption spectra of the photoconvertible fluorescent protein EosFP in different protonation states. *Journal of chemical theory and computation*, 8(11) :4828–4836, 2012.
- [68] Isabelle Demachy, Jacqueline Ridard, Hélène Laguitton-Pasquier, Elodie Durnerin, Germain Vallverdu, Pierre Archirel, and Bernard Lévy. Cyan fluorescent protein : molecular dynamics, simulations, and electronic absorption spectrum. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(50) :24121–24133, 2005.
- [69] Erich Runge and Eberhard KU Gross. Density-functional theory for time-dependent systems. *Physical Review Letters*, 52(12) :997, 1984.
- [70] Elsa Sanchez-Garcia, Markus Doerr, and Walter Thiel. QM/MM study of the absorption spectra of DsRed. M1 chromophores. *Journal of computational chemistry*, 31(8) :1603–1612, 2010.
- [71] Arnfinn Hykkerud Steindal, Jógvan Magnus Haugaard Olsen, Kenneth Ruud, Luca Frediani, and Jacob Kongsted. A combined quantum mechanics/molecular mechanics study of the one-and two-photon absorption in the green fluorescent protein. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(16) :5440–5451, 2012.
- [72] John P Perdew, Kieron Burke, and Matthias Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical review letters*, 77(18) :3865, 1996.
- [73] Yan Zhao and Donald G Truhlar. The m06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements : two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, 120(1-3) :215–241, 2008.
- [74] Takeshi Yanai, David P Tew, and Nicholas C Handy. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical Physics Letters*, 393(1) :51–57, 2004.
- [75] S Brøndsted Nielsen, A Lapierre, Jens Ulrik Andersen, UV Pedersen, S Tomita, and LH Andersen. Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore anion in vacuo. *Physical review letters*, 87(22) :228102, 2001.

- [76] Csaba Daday, Carles Curutchet, Adalgisa Sinicropi, Benedetta Mennucci, and Claudia Filippi. Chromophore–protein coupling beyond nonpolarizable models : Understanding absorption in green fluorescent protein. *Journal of chemical theory and computation*, 11(10) :4825–4839, 2015.
- [77] Karim Merabti. *Yellow Fluorescent Protein : étude du π stacking : élaboration d'un modèle du déclin de fluorescence*. PhD thesis, Paris Saclay, 2015.
- [78] Karin Nienhaus, G Ulrich Nienhaus, Jörg Wiedenmann, and Herbert Nar. Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26) :9156–9159, 2005.
- [79] María Elena Martin, Fabrizia Negri, and Massimo Olivucci. Origin, nature, and fate of the fluorescent state of the green fluorescent protein chromophore at the CASPT2//CASSCF resolution. *Journal of the American Chemical Society*, 126(17) :5452–5464, 2004.
- [80] Christopher I Bayly, Piotr Cieplak, Wendy Cornell, and Peter A Kollman. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges : the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(40) :10269–10280, 1993.
- [81] B Lévy and M Enescu. Theoretical study of methylene blue : a new method to determine partial atomic charges ; investigation of the interaction with guanine. *Journal of Molecular Structure : THEOCHEM*, 432(3) :235–245, 1998.
- [82] Jacqueline Ridard and Bernard Lévy. Effective atomic charges in alanine dipeptide. *Journal of computational chemistry*, 20(5) :473–482, 1999.

Annexe A

Dynamiques moléculaires

A.1 Protocole de minimisation et de mise à l'équilibre

Une fois déterminé les champs de force des résidus non standard, et la protonation des histidines, nous avons lancé des minimisations et une mise à l'équilibre du système. La minimisation de l'énergie est nécessaire pour éviter les problèmes d'encombrement stérique causé par l'ajout automatique des hydrogènes et des molécules d'eau. En effet, comme précisé pour les histidines, les positions des atomes d'hydrogène sont inconnues dans la structure issue de la cristallographie. Il faut donc les ajouter. Pour cela, nous avons utilisé le programme LEAP, de la suite AMBER, afin d'ajouter les atomes d'hydrogène de la protéine, ainsi que les molécules d'eau de la boîte.

Les minimisations ont été réalisées sur 5000 pas en combinant deux méthodes. Les 4000 premiers pas sont effectués en steepest-descent, et les 1000 derniers en gradient conjugué. Nous avons réalisé trois minimisations successives.

- Dans la première, on minimise l'énergie par rapport aux positions des hydrogènes de la protéine. Le reste des atomes restant fixe.
- Dans la deuxième, on minimise l'énergie par rapport aux positions des molécules d'eau.
- Enfin, dans la troisième on minimise l'énergie par rapport à tous les atomes du système.

Après ces trois minimisations, nous obtenons une structure de la protéine qui contient tous les atomes et qui présente une structure stable. Nous avons ensuite relaxé cette structure avec le protocole suivant :

- On commence par une montée en température du système. Cette étape s'effectue à volume, nombre d'atome constant et température (NVT), et l'intégralité des atomes de la protéine sont contraints dans la conformation issue de la minimisation globale de la protéine. Cette étape dure 0.2ns.
- Une fois la montée en température effectuée, on effectue cette fois une dynamique à nombre d'atome, pression et température constantes (NPT). Dans ces dynamiques on relâche progres-

sivement les contraintes appliquées aux atomes de la protéine. Nous effectuons 5 dynamiques dans lesquelles les contraintes sont progressivement relâchées. Chaque étape dure 0.2 ns. Le poids des contraintes est successivement de 5 kcal.mol^{-1} , 2 kcal.mol^{-1} , 1 kcal.mol^{-1} , $0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et enfin $0.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

La dernière étape, également effectuée en NPT, dure 2 ns. Dans cette étape, toutes les contraintes sont retirées afin de relâcher la protéine.

A.2 Protonation des histidines

Pour rappel, une histidine peut être trouvée dans deux états de protonation : neutre, avec un proton sur l'azote ND1 ou NE2, ou cationique, avec les deux azotes protonés. Pour déterminer l'état de protonation des histidines, nous avons visualisé la structure cristallographique de la protéine et positionné le proton de manière à créer une liaison hydrogène stable. On nommera HIP les histidines doublement protonées, HID celles protonées sur l'azote ND et HIE celles protonées sur l'azote NE.

A.2.1 Dans Padron

Dans la protéine Padron on trouve 8 histidines. Leur état de protonation est référencé dans le tableau A.1.

Numéro du residu	Protonation de l'histidine
21	HID
168	HIP
189	HID
193	HIP
194	HID
200	HIP
210	HIP
212	HIP
216	HIP

TAB. A.1 – Protonation des histidines utilisées dans les dynamiques de Padron.

La protonation de la majorité des histidines ne paraît pas être déterminante car elles sont situées à l'extérieur du tonneau β . Néanmoins ce n'est pas le cas de l'histidine 193 qui est située au dessus du chromophore. Sur cette histidine, nous avons déterminé que sous sa forme protonée elle est capable de former un pont entre les glutamates 211 et 144.

Que ce soit pour les dynamiques de Padron avec le chromophore en conformation *cis* ou *trans*, neutre ou anionique, nous avons utilisé le même état de protonation des histidines.

A.2.2 Protonation des histidines de EosFP

Nous avons procédé de la même façon pour les 10 histidines de la protéine EosFP. Le tableau A.2 présente la protonation des histidines.

numéro du résidu	protonation de l'histidine
21	HID
22	HID
72	HID
119	HID
166	HIP
188	HIP
192	HIP
199	HID
211	HID
215	HIE

TAB. A.2 – protonation des histidines de EosFP

Comme pour Padron, la majorité des histidines de EosFP est situé à l'extérieur du tonneau β de la protéine. La triade Glu-HIP-Glu est retrouvée dans EosFP, avec l'histidine à la position 192, et les acides glutamiques en positions 142 et 210.

A.3 Champ de force

Un champ de force standard se présente sous la forme d'une somme de termes que l'on peut classer en deux groupes.

Dans le premier, on regroupe les forces entre les atomes liés par une liaison covalente :

$$E_{lié} = \sum_{liaison} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dièdres} k_\omega [1 + \cos(n\omega - \gamma)]$$

Les deux premiers termes sont des fonctions harmoniques et concernent respectivement les élongations de liaison et les déformations des angles de valence.

r_0 , θ_0 représentent les valeurs d'équilibre, pour lesquelles l'énergie est minimale.

k_r , k_θ sont les constantes de forces associées aux déformations.

Le dernier terme représente la déformation d'un angle dièdre. Elle est décrite par une fonction cosinus où k_ω est la demi-hauteur de la barrière de torsion autour de la liaison centrale de l'angle dièdre ω , n la multiplicité de la fonction et γ est la phase. La déformation des angles impropres peut également être prise en compte dans le terme des angles dièdres.

Et dans le deuxième groupe, on regroupe les énergies d'interaction entre les atomes non liés, c'est-à-dire placés l'un part rapport à l'autre en 1-4 ou plus loin le long d'une chaîne de liaisons

covalentes (les interactions entre les atomes placés en 1-2 ou 1-3 sont déjà prises en compte dans les sommes sur les liaisons et les angles ; et on considère que les interactions en position 1-4 sont seulement partiellement prises en compte par la somme sur les dièdres, quand les atomes sont liés) :

$$E_{non-lié} = \sum_{i<,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{i,j}} + \sum_{i<,j} \epsilon(i,j) \left[\left(\frac{\rho(i,j)}{r_{i,j}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\rho(i,j)}{r_{i,j}} \right)^6 \right]$$

Le premier terme de cette expression $E_{non-lié}$ représente les interactions électrostatiques, décrites par le potentiel de Coulomb avec q_i, q_j les charges atomiques, $r_{i,j}$ la distance entre les deux atomes et ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide.

Le second terme représente les interactions van der Waals entre des atomes non liés. Elles sont décrites par un potentiel de Lennard-Jones. Dans cette expression, $\epsilon(i,j)$ et $\rho(i,j)$ sont des paramètres qui dépendent du type des deux atomes i et j : on distingue par exemple les interactions entre deux carbones sp^3 , ou entre un carbone sp^3 et un carbone sp^2 *etc.* Le paramètre ϵ représente une énergie de liaison et ρ la distance d'équilibre correspondante entre les deux atomes.

Dans nos simulations, nous avons utilisé le champ de force "ff99" de Amber qui contient les paramètres pour tous les résidus standards.

A.3.1 Champ de force des résidus non standard

Comme nous l'avons dit précédemment, le chromophore des protéines fluorescentes est le résultat d'une fusion autocatalytique de 3 résidus. Ces résidus varient selon les protéines fluorescentes. Dans cette étude, nous étudierons deux chromophores : l'un qui est formé à partir des résidus Cys-Tyr-Gly (pour la protéine Padron) et l'autre qui est formé à partir des résidus His-Tyr-Gly (EosFP). Le champ de force ff99 de AMBER ne contient pas les paramètres pour de telles molécules. Nous avons donc élaboré un champ de force pour chaque chromophore, il faut également adapter le champ de force à l'état de protonation du chromophore, à son état électronique (fondamental ou excité) et à sa conformation (*cis* ou *trans*).

a - Champ de force à l'état fondamental

Pour obtenir les paramètres d'équilibre r_0 et θ_0 du chromophore à l'état fondamental, nous avons réalisé une optimisation de géométrie à l'aide de la méthode de la DFT, avec la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31+G(d). Nous avons saturé la liaison du résidu du côté NH par un groupement carbonyle (CHO). Du côté CO du résidu, nous avons saturé la liaison par un groupement amide (NH2). De cette manière, le chromophore est le plus proche de sa forme dans la protéine. Cette optimisation ayant été réalisée dans le vide, nous avons appliqué des contraintes sur les parties liant le chromophore au squelette peptidique de la protéine. De plus, les angles dièdres de la chaîne latérale du premier résidu (la cystéine dans le cas du chromophore de Padron et l'histidine dans la protéine EosFP) sont également contraints aux valeurs observées dans les structures

cristallographiques. A partir de la structure optimisée, nous avons déterminé les longueurs, angles et angles dièdres d'équilibre intervenant dans le champ de force des résidus.

La figure A.3.1 représente les contraintes appliquées au chromophore lors de l'optimisation de géométrie.

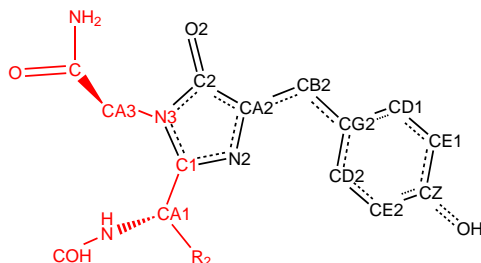


FIG. A.3.1 – Modèle de chromophore utilisé pour déterminer les paramètres d'équilibre du champ de force. En rouge : atomes avec angles dièdres gelés lors de l'optimisation de géométries. En noir : atomes laissés libres lors de l'optimisation. Le substituant R2 dépend du chromophore. Les hydrogènes de la partie conjuguée ont été omis pour plus de clarté.

En ce qui concerne les constantes de forces, nous avons repris les constantes de force des résidus d'origine du chromophore pour les chaînes latérales ainsi que pour le groupement phénolate. Dans le cas de l'imidazolinone, nous avons repris celles qui avait été déterminées dans une précédente étude[23].

b - Champ de force du chromophore anionique à l'état excité

Pour le chromophore anionique à l'état excité, nous avons déterminé les paramètres d'équilibre des longueurs de liaison et des angles de valence à l'aide de la méthode CIS/6-31G. Les charges ont été calculées par la même méthode que pour le chromophore à l'état fondamental. Lors de cette optimisation nous avons contraint les angles φ et τ pour maintenir un chromophore plan.

La difficulté supplémentaire dans l'état excité vient de la torsion. En effet, comme nous l'avons dit précédemment, à l'état excité la géométrie plane du chromophore n'est pas la géométrie d'équilibre. Les géométries twistées soit en τ soit en φ sont plus stables d'environ 10 kcal.mol^{-1} . Dans un champ de force standard, formé d'une somme de termes indépendants, on obtiendrait alors que les géométries de type Hula-Twist, twistées suivant les deux angles à la fois, auraient une énergie plus basse que la géométrie plane. Or les calculs quantiques montrent que ces géométries sont au contraire plus hautes en énergie[23, 79, 20]. Nous avons donc utilisé le potentiel NADiA, développé précédemment dans l'équipe[20]. Ce potentiel a été calibré sur des calculs quantiques et est décrit par une somme de produit de sinus et de cosinus de multiples des deux angles φ et τ . A l'aide de ce potentiel propre à l'état excité du chromophore anionique et des paramètres classiques d'un champ de force, nous sommes en mesure de réaliser des dynamiques moléculaires de la protéine avec le chromophore à l'état excité.

c - détermination des charges des chromophores

Représentation du chromophore de EosFP (à gauche) et Padron (à droite) avec les contraintes appliquées lors du calcul des charges.

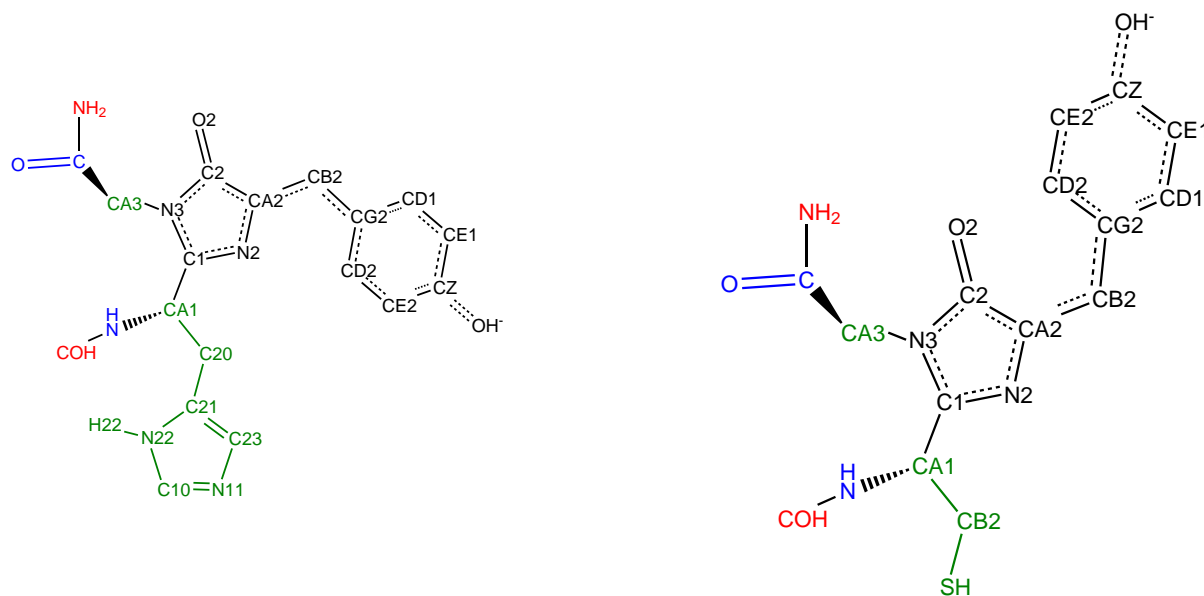


FIG. A.3.2 – Structures des chromophores étudiés et noms des atomes que nous utilisons. A gauche : chromophore de EosFP dans sa forme cis, anionique. A droite : celui de Padron, dans sa forme trans, anionique. En noir, faible contrainte harmonique avec 0 comme valeur cible. En rouge, groupe d'atome dont la somme des charges doit être nulle. En bleu, charge imposée à une valeur donnée. En vert, contraintes harmoniques avec les valeurs du champ de force "ff99" d'AMBER comme cible.

Les atomes des liaisons peptidiques ont été contraints exactement aux valeurs des atomes du champ de force "ff99" (atomes en bleus sur la figure A.3.2). Les charges des atomes ajoutés pour saturer le chromophore ont été contraintes pour que leur somme soit égale à 0 (en rouge sur la figure). De cette manière, la somme totale des charges du chromophore vaut 0 s'il est neutre, ou -1 s'il est anionique. Les atomes équivalents ont été contraints pour qu'ils portent la même charge. Par exemple, les atomes CD1 et CD2 n'ont pas de raison d'avoir une charge identique. Néanmoins, dans la dynamique nous leur imposons une charge identique pour deux raisons. La première pour se rapprocher des méthodes de calculs de charges du champ de force "ff99" d'AMBER. La deuxième pour que dans les dynamiques de l'état excité où l'on observe une isomérisation, les deux conformères soient équivalents. Des contraintes harmoniques ont été appliquées sur les atomes lourds qui ne sont pas impliqués dans la partie conjugué du chromophore, c'est-à-dire des chaînes latérales de l'histidine pour EosFP et de la cystéine pour Padron, ainsi que de la glycine (en vert), avec la valeur de ces atomes dans le potentiel "ff99" comme cible. Enfin, les atomes lourds de la partie du chromophore (en noir) ont été légèrement contraints pour les maintenir dans des valeurs réalistes (valeur absolue inférieure à 1). L'ensemble des charges obtenues est ainsi proche de celles utilisées dans les résidus standards de AMBER.

Nous avons réalisé des calculs quantiques au niveau RHF/6-31G* pour les résidus à l'état fon-

damental, et un calcul CIS/6-31G*+ pour le chromophore de EosFP à l'état S_1 . Pour calculer les charges atomiques, nous avons utilisé une méthode proche de la méthode RESP : Restricted ElectroStatic Potential[80], qui est utilisée dans le champ de force amber. La méthode que nous avons utilisé à été développée par des membres de l'équipe [81, 82]. Comme pour la méthode RESP, on détermine les charges des atomes de façon à ce qu'elle représente au mieux le potentiel électrostatique créé par la molécule. L'avantage de notre méthode vient des différents types de contraintes que l'on peut appliquer lors de la détermination des charges.

Nous avons utilisé les mêmes charges pour les chromophores en conformation *cis* et *trans*.

Les charges du chromophore de Padron dans sa géométrie *trans*, dans son état de protonation neutre et anionique sont indiquées sur la figure A.3.3.

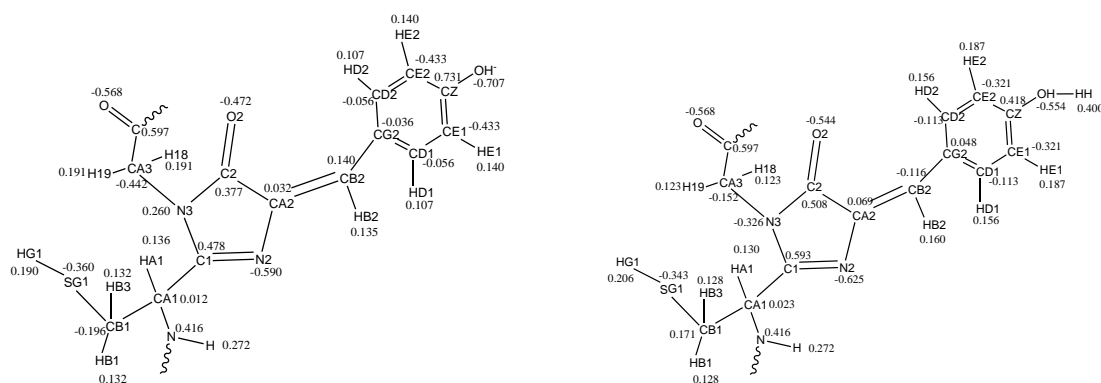


FIG. A.3.3 – Comparaison des charges portées par les atomes du chromophore *trans*. A gauche chromophore anionique. A droite chromophore neutre

Si l'on compare l'état neutre et l'état anionique du chromophore de Padron, il apparaît sans surprise que la valeur absolue de la charge globale de la moitié phénolate est diminuée (elle passe de -0.492 dans le cas de l'état anionique à +0.131 dans le cas de l'état neutre). Les charges de l'imidazolinone et du pont ne sont presque pas changées.

Charge de la tyrosine anionique.

Pour obtenir les paramètres d'équilibre r_0 et θ_0 de la tyrosine anionique, nous avons réalisé une optimisation de géométrie à l'aide de la méthode de la DFT, avec la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31+G(d). Nous avons saturé la liaison du résidu du côté NH par un groupement carbonyle (CHO). Du côté CO du résidu, nous avons saturé la liaison par un groupement amide (NH2). Cette optimisation ayant été réalisée dans le vide, nous avons appliqué des contraintes sur les parties reliant la tyrosine à la protéine. Sur la géométrie issue de l'optimisation, nous avons calculé les charges partielles des atomes.

Le modèle sur lequel nous avons calculé les charges de la tyrosine anionique, avec les types de contrainte est représenté sur la figure A.3.4.

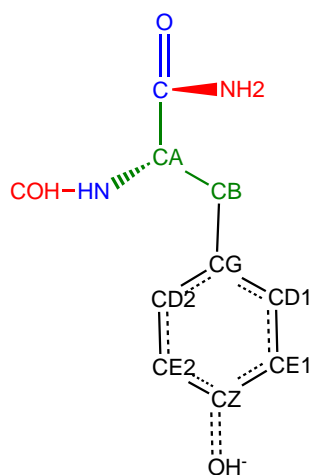


FIG. A.3.4 – Modèle de la tyrosine anionique, avec les contraintes appliquées pour déterminer les charges. En noir, faible contrainte harmonique avec 0 comme valeur cible. En rouge, somme des charges des ces atomes doit être nulle. En bleu, charges imposées à une valeur donnée. En vert, les charges avec une valeur cible.

Comme pour le chromophore, nous avons contraint les charges partielles des atomes de la liaison peptidique aux mêmes valeurs que celle de la tyrosine neutre. Nous avons également appliqué des contraintes harmoniques sur les atomes CA et CB pour les rapprocher des charges de la tyrosine neutre. Enfin les atomes équivalents portent la même charge.

La figure A.3.5 schématise les charges partielles de la tyrosine anionique, ainsi que celles de la tyrosine neutre pour comparaison.

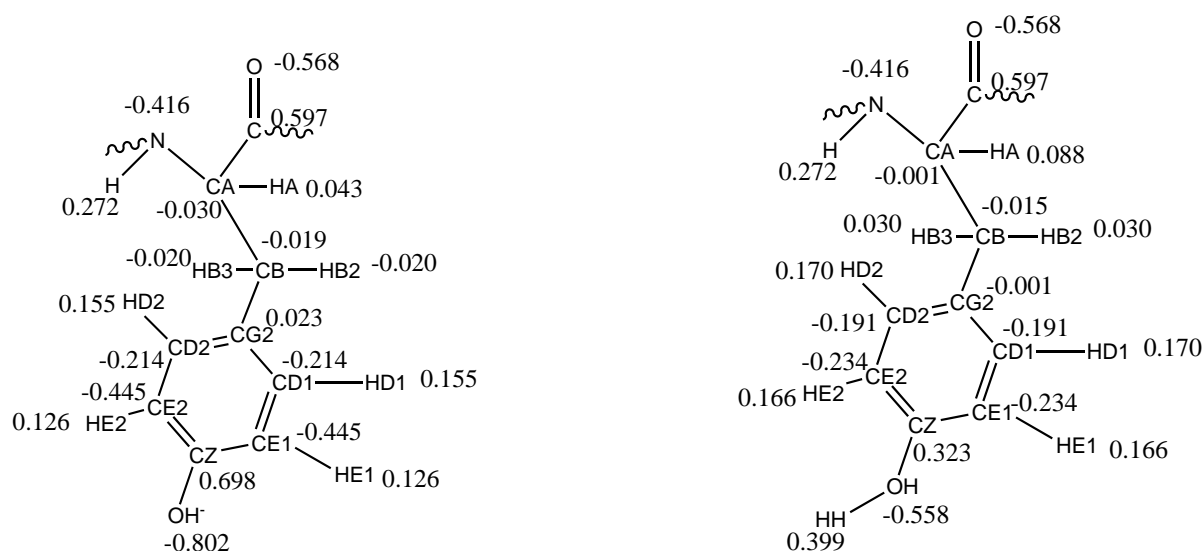


FIG. A.3.5 – Comparaison des charges portées par les atomes de la tyrosine. A gauche : tyrosine anionique. A droite : tyrosine neutre

Sur cette figure, on peut voir que les seules charges qui sont beaucoup modifiées sont celles des atomes CZ et OH, ainsi que celles des atomes CE1 et CE2. Les autres charges ne diffèrent que très peu entre les deux formes de la tyrosine.

Annexe B

schéma cinétique

L'équation régissant l'évolution de la population de la zone Z_{Fluo} est la suivante :

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1fluo}}{dt} = & (-k_{Fluo-Dark1} - k_{Fluo-\tau p} - k_{Fluo-\tau n} - k_{Fluo-Dark2} - k_r^*) \cdot S_{1Fluo} \\ & + k_{Dark1-Fluo} \cdot S_{1Dark1} + k_{\tau p Fluo} \cdot S_{1\tau p} + k_{\tau n Fluo} \cdot S_{1\tau n} + k_{Dark2 Fluo} \cdot S_{1Dark2} \end{aligned}$$

pour la zone $Z_{\tau p}$:

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1\tau p}}{dt} = & -(k_{\tau p-Dark1} + k_{\tau p-Fluo} + k_{nr-\tau p}^*) \cdot S_{1\tau p} \\ & + k_{Dark1\tau p} \cdot S_{1Dark1} + k_{Fluo-\tau p} \cdot S_{1Fluo} \end{aligned}$$

Pour la zone $Z_{\tau n}$:

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1\tau n}}{dt} = & (-k_{\tau n-Fluo} - k_{\tau n-Dark2} - k_{nr-\tau n}^*) \cdot S_{1\tau n} \\ & + k_{Fluo-\tau n} \cdot S_{1Fluo} + k_{Dark2-\tau n} \cdot S_{1Dark2} \end{aligned}$$

Pour la zone Z_{Dark1} :

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1\text{Dark1}}}{dt} = & (-k_{\text{Dark1-Fluo}} - k_{\text{Dark1-}\tau p}) \cdot S_{1\text{Dark1}} \\ & + k_{\text{Fluo-Dark1}} \cdot S_{1\text{Fluo}} + k_{\tau p\text{-Dark1}} \cdot S_{1\tau p} \end{aligned}$$

Et enfin pour la zone Z_{Dark2} :

$$\begin{aligned} \frac{dS_{1\text{Dark2}}}{dt} = & -k_{\text{Dark2-Fluo}} \cdot S_{1\text{Dark2}} - k_{\text{Dark2}\tau n} \cdot S_{1\text{Dark2}} \\ & + k_{\text{Fluo-Dark2}} \cdot S_{1\text{Fluo}} + k_{\tau n\text{-Dark2}} \cdot S_{1\tau n} \end{aligned}$$

Et pour les populations de chromophore à l'état fondamental, on a les deux équations suivantes.

Pour la population obtenue par conversion radiative depuis la zone $S_{1\text{Fluo}}$:

$$\frac{dS_{0\text{Fluo}}}{dt} = k_r^* \cdot S_{1\text{Fluo}}$$

et pour le retour à l'état fondamental par conversion non radiative depuis les zones $Z_{\tau p}$ et $Z_{\tau n}$:

$$\frac{dS_{0nr}}{dt} = k_{nr\tau p}^* \cdot S_{1\tau p} + k_{nr\tau n}^* \cdot S_{1\tau n}$$

Titre : Étude de propriétés photophysiques de protéines fluorescentes par dynamique moléculaire.

Mots clés : protéines fluorescentes, liaison hydrogène, transfert de proton, spectre d'absorption, déclin de fluorescence, dynamique moléculaire.

Résumé : Les protéines fluorescentes sont très largement utilisées dans les études de biologie moléculaire depuis maintenant une vingtaine d'année. Pour autant, l'origine de leurs propriétés photophysiques n'est pas totalement élucidée. Dans cette thèse, nous avons essayé d'améliorer la compréhension de la photophysique de deux protéines fluorescentes particulières : Padron et EosFP.

Dans la protéine Padron, nous avons étudié l'isomérisation du chromophore et cherché à déterminer si la protonation et l'isomérisation sont simultanées ou successives. Pendant l'isomérisation, le donneur de proton potentiel est le résidu Tyr159. Nous avons d'abord montré que dans le vide, le transfert de proton est peu probable quelle que soit la géométrie du chromophore. Dans la protéine (où l'effet de l'environnement n'est pas négligeable) nous avons mis en évidence par dynamique moléculaire que, durant l'isomérisation, le transfert de proton n'est presque jamais favorable et reste donc marginal.

Par ailleurs, ces mêmes dynamiques ont montré que, à la fin de l'isomérisation, il apparaît de nombreux chemins de molécules d'eau reliant le chromophore au solvant, pouvant permettre un transfert de proton. On conclut donc

que l'isomérisation et la protonation ne sont pas simultanées mais successives.

Dans le cas de la protéine EosFP, nous avons analysé l'effet d'une molécule d'eau présente dans une partie des structures cristallines. Les dynamiques avec le chromophore à l'état fondamental ont montré que cette molécule ne joue pas de rôle, que ce soit sur le réseau de liaison hydrogène ou sur le spectre d'absorption. Par contre, à l'état excité, les dynamiques ont montré que l'extinction de fluorescence est beaucoup plus rapide sans la molécule d'eau qu'en sa présence.

Par ailleurs, ces dynamiques ont mis en évidence que la protéine bloque souvent le chromophore dans des géométries où il ne peut pas retourner à l'état fondamental ni par fluorescence, ni par conversion interne. Ces géométries « noires » jouent un rôle important dans la photophysique.

Pour tenir compte de ces géométries, nous avons calculé le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence par intégration directe le long des trajectoires et par cinétique chimique. Dans les deux cas, nous avons obtenu un accord qualitatif avec l'expérience.

Title : Study of photophysical properties of fluorescent proteins by molecular dynamics.

Keywords: Fluorescent proteins, hydrogen-bond, absorption spectra, fluorescence decay, molecular dynamics.

Abstract : Fluorescent proteins are widely used in biology studies since 20 years. Yet, the origin of their photophysical properties aren't totally explained. Here, we try to improve the understanding of two particular fluorescent proteins: Padron and EosFP.

In the protein Padron, we work on the isomerization of chromophore and try to determine whether isomerization and protonation are simultaneous or successive processes. During the isomerization, the potential donor is Tyr159.

First, we show that, in vacuum, the proton transfer is quite unlikely whatever the chromophore geometry.

In the protein (where the environment effect isn't negligible) we evidence with molecular dynamics that, during isomerization, proton transfer stays marginal.

In addition, these dynamics shown the appearance, at the end of isomerization, of a lot of water molecules channel between the chromophore and the solvent allowing a proton transfer. We conclude that isomerization and protonation are successive processes.

In the case of the protein EosFP, we first analyze the effect of a water molecule which is found only in some of the crystallographic structures.

Molecular dynamics of the protein with the chromophore in the ground state show that the water molecule doesn't play any role neither in the hydrogen bond network nor in the absorption spectra.

On the contrary, in the excited state, dynamics without this water show a significant faster decay of fluorescence that those with the molecule.

In addition, those dynamics have demonstrate that during long period, the protein retains the chromophore in geometries in which it is unable to convert to the ground state, neither by fluorescence nor by internal conversion. Those "dark" geometries play a crucial role in the photophysics.

To take them into account, we calculate the quantum yield and the fluorescence lifetime by direct integration along trajectories and by a kinetic scheme. We obtain a good qualitative agreement with the two methods.