



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE PHYSIQUE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT LMD

Spécialité: *Physique des gaz et plasma*

Par :

Mr MERABTI Karim Elhadj

Sur le thème

Cinétique du déclin de fluorescence d'un système complexe ; approche par dynamique moléculaire. Application à la protéine fluorescente jaune (YFP)

Soutenue publiquement le 28/10/ 2017 à Tlemcen devant le jury composé de :

M ^r LIANI Bachir	Professeur	Université de Tlemcen	Président
M ^r LEVY Bernard	Professeur	Université de Paris-Sud	Examineur
M ^r MERAD Abdelkrim	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
M ^r TCHOUAR Noureddine	Professeur	USTO-MB	Examineur
M ^{elle} DEMACHY Isabelle	Professeure	Université de Paris-Sud	Co-Directrice de thèse
M ^{elle} AZIZI Sihem	Professeure	Université de Tlemcen	Directrice de thèse

*Laboratoire de Physique Théorique (LPT)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

A la mémoire de
mon cher papa « N'hamed »

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le professeur Liani Bachir directeur du laboratoire de Physique Théorique (LPT), ainsi que les professeurs Mehran Mostafavi et Philippe Maître directeurs successifs du laboratoire de chimie physique (LCP) de m'avoir accueilli et permis de mener mes recherches dans leurs laboratoires respectifs.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer. Je remercie Mr Bachir Liani, de présider mon jury de thèse, je suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de recherches. Je remercie également les professeurs Levy Bernard, Merad Abdelkrim et Tchouar Nouredine d'avoir participé au jury en tant qu'examineurs de ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mes directrices de thèse, Mmes Demachy Isabelle et Azizi Sihem pour la confiance qu'elles m'ont accordée durant toutes ces années de thèse, aussi de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche scientifique. Les deux ont fait beaucoup plus que leur devoir et c'est pourquoi je tenais à leur exprimer ma profonde gratitude.

Mes plus profonds remerciements vont à Mr Bernard Lévy et Mme Jacqueline Ridard pour leur qualité d'encadrement tout au long de ce travail. Leurs idées, leurs conseils, leurs critiques, mais aussi leurs encouragements, m'ont été d'une aide précieuse. Sans eux je n'aurais pas pu accomplir ce travail.

Je remercie tous les membres du LCP particulièrement les membres du groupe Theosim pour le climat sympathique dans lequel j'ai pu travailler, pour leur gentillesse, leur compétence et leur humour. Je voudrais remercier mes camarades thésards du LCP, LPT qui m'ont accompagné pendant ces années. Merci à eux pour leur gentillesse et pour les discussions partagées.

Un grand merci à tous mes amis de Saida qui m'ont encouragé de près ou de loin.

Je remercie mon grand frère Tayeb et sa femme Adila, qui ont toujours su trouver les mots justes pour me remonter le moral et aussi pour me motiver. Que Dieu vous bénisse et vous protège ainsi que vos enfants "Imran et Adim".

Je remercie mon frère Ahmed, qui a toujours su être à mes côtés malgré la distance qui nous a séparés.

Je remercie ma mère Faridja, sa présence et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Je rends hommage à mon papa Mhamed qui est parti trop tôt, un homme qui fait ma fierté,

j'espère qu'il sera fier de ce que je suis devenu. Que Dieu bénisse son âme.

Je remercie dieu le tout puissant qui m'a donné le courage de continuer et surtout pour toutes ces personnes qu'il a mises sur mon chemin.

Table des matières

Introduction générale	1
1 Généralités sur les méthodes de calcul utilisées	5
1.1 Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)	5
1.1.1 Théorèmes de Hohenberg-Kohn	5
1.2 Erreur de superposition de base	6
1.3 L'équation de Schrödinger	7
1.4 L'approximation de Born-Oppenheimer	8
1.5 Méthode de Hartree-Fock	9
1.5.1 Déterminant de Slater	9
1.5.2 Les équations de Hartree-Fock	10
1.5.3 Les équations de Roothaan-Hall	10
1.6 Méthodes post Hartree-Fock	11
1.6.1 Interaction de configuration	12
1.6.2 Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF)	13
1.6.3 Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger	14
2 Propriétés de fluorescence de la protéine fluorescente jaune (YFP)	17
2.1 La fluorescence	17
2.2 Les processus non radiatifs	17
2.3 Les protéines fluorescentes	19
2.4 Désactivation non radiative dans les protéines fluorescentes	21
3 Etude de l'état excité de l'anion du chromophore de la YFP	23
3.1 Choix de la méthode de calcul	23
3.2 Analyse des simulations de dynamique moléculaire de la YFP	28
3.2.1 Rotations	29
3.2.2 Translations	30
3.2.3 Dimension de la grille de points	33
3.3 Energie de transition du système chromophore-phénol	34

4	Etude des énergie d'interactions	39
4.1	L'énergie d'interactions CASPT2	39
4.1.1	Avec la base 6-31G*	40
4.1.2	Avec la base étendue 6-31+G*	47
4.2	L'énergie d'interactions décrite par un champ de forces	54
4.2.1	Caractéristique des champs de forces utilisés	54
4.2.2	Énergie d'interactions - Résultats.	55
4.3	Comparaison de CASPT2 avec le potentiel d'un champ de forces	63
4.4	Interpolation	67
5	Etude de la simulation du déclin de fluorescence (YFP) par une méthode directe	73
5.1	Méthode	74
5.2	Probabilité de conversion non radiative	75
5.3	Probabilité de conversion radiative	76
5.3.1	Expression théorique	76
5.3.2	Zone de conversion radiative	79
5.4	Résultats	81
	Conclusion générale	85
	Bibliographie	86
A	Article	95
A.1	Article 1	95
A.2	Proceeding	105
A.3	Article 2	109
B	Résultats des énergies d'interaction	119
B.1	Base sans diffuse 6-31g*	119
B.2	Base diffuse 6-31+g*	136

Table des figures

1	(à gauche) La structure de la GFP, (à droite) le chromophore.	2
2	Le chromophore dans sa forme (a) neutre , (b) anionique	3
3	Chromophore de la YFP en π stacking avec une tyrosine.	4
2.1	Diagramme de Jablonski.	18
2.2	Schéma du mécanisme de formation du chromophore de la famille GFP, proposé par Cubitt et al. [1].	19
2.3	Les acides aminés	20
2.4	Schéma du modèle du chromophore anionique de la GFP - p-hydroxybenzylidene-imidazolinone (HBI) - dans sa forme isomère cis, dans trois géométries différentes ; la géométrie plane (FS : fluorescent state) ($\tau = \varphi = 0^\circ$), la géométrie TwP ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et la géométrie TwI ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$).	21
3.1	A gauche : le chromophore anionique de la GFP avec les noms des trois atomes centraux affichés. A droite : trois structures mésomères d'un ion allylique. L'analogie avec le chromophore peut être faite si les deux carbones terminaux sont remplacés par les deux cycles du chromophore.	25
3.2	Espace CAS	26
3.3	Diagramme des énergies d'excitation. a : Nielsen <i>et al.</i> [2].	27
3.4	Les systèmes d'axes (U_c, V_c, W_c) du chromophore et (U_t, V_t, W_t) de la tyrosine.	28
3.5	Les axes du tangage et du roulis	29
3.6	Histogramme de l'angle de tangage (a) et de l'angle de roulis (b).	30
3.7	Système d'axes XYZ	31
3.8	Histogramme des translations suivant X	31
3.9	Histogramme des translations suivant Y	32
3.10	Histogramme des translations suivant Z	32
3.11	Les points de la grille suivant X et Y (Bleu : base 6-31G*, Rouge : base 6-31+G*).	34
3.12	Energie de transition exprimée en longueur d'onde (nm) pour différentes valeurs de Z avec la base 6-31G*.	35
3.13	Energie de transition exprimée en longueur d'onde pour différentes distances de Z avec la base 6-31+G*.	36

3.14	Le chromophore dans sa forme anionique, (a) : terminaison avec deux hydrogènes, (b) : terminaison avec deux groupes méthyle	37
4.1	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	40
4.2	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	41
4.3	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	41
4.4	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	42
4.5	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	42
4.6	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	43
4.7	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	44
4.8	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	44
4.9	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	45
4.10	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	45
4.11	Géométrie d'équilibre d'énergie minimale	47
4.12	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 2.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	48
4.13	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.0 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	48
4.14	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	49
4.15	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.6 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	49
4.16	Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.9 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	50
4.17	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 2.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	51
4.18	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.0 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	51
4.19	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	52

4.20	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.6 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*	52
4.21	Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.9 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*	53
4.22	Géométrie d'équilibre d'énergie minimale	54
4.23	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$	56
4.24	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$	57
4.25	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$	57
4.26	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$	58
4.27	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$	58
4.28	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$	59
4.29	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$	59
4.30	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$	60
4.31	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$	60
4.32	La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$	61
4.33	Géométrie d'équilibre pour le système chromophore à l'état fondamental + phénol obtenue avec le champ de force.	62
4.34	La variation de l'énergie d'interactions en fonction de (a) Y et (b) X, pour $Z : 3.3 \text{ \AA}$. Les valeurs obtenues par CASPT2 avec la base 6-31G* sont en rouge, avec la base 6-31+G* en bleu et celles du champ de forces en vert	64
4.35	La variation de l'énergie d'interactions en fonction de y pour différentes distances $Z : 2.8 \text{ \AA}, 3.0 \text{ \AA}, 3.3 \text{ \AA}, 3.6 \text{ \AA}$ et 3.9 \AA	65
4.36	La variation de l'énergie d'interactions en fonction de x pour différentes distances $Z : 2.8 \text{ \AA}, 3.0 \text{ \AA}, 3.3 \text{ \AA}, 3.6 \text{ \AA}$ et 3.9 \AA	66
5.1	La définition des angles de torsion τ et φ	73
5.2	Variation des angles φ (en noir) et τ (en rouge) exprimés en degrés au cours d'une des simulations de la YFP avec le chromophore à l'état S_1	74

5.3	<p>Coupes des surfaces d'énergies potentielle adiabatiques et quasi-diabatiques du chromophore : à gauche coupe suivant φ à τ constant ($=0$) et à droite, coupe suivant τ à φ constant ($=0$).</p> <ul style="list-style-type: none"> - lignes pleines rouges et bleu : énergies adiabatiques ; - tirets bleu : énergies quasi-diabatiques et module de la différence de ces énergies ; - ligne pleine verte : élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien effectif entre les deux états quasi-diabatiques. 	76
5.4	<p>Valeurs des probabilités de fluorescence déduite des calculs CASPT2[3] à l'aide de l'eq.(5.8)</p> <p>à gauche : valeurs de P obtenues pour les géométries où un calcul CASPT2 a été fait et ellipses délimitant les zones où P prend différents ordres de grandeurs ;</p> <p>à droite : code couleur des ellipses et des points du cadre de gauche.</p>	80
5.5	Types de graphes attendus pour p_r et p_{nr} et résultant de l'hypothèse 1	81
5.6	Corrélation entre les angles τ et φ au cours des simulations à l'état S_1 de la GFP et de la YFP. L'ellipse rouge entoure la zone de conversion radiative, les cercles verts entourent les zones de conversion non radiative.	82
5.7	Valeurs de t_r et de t_{nr} obtenus par simulation dans la GFP (47 simulations de 6 ns chacune) et dans la YFP (20 simulation de 4 ns chacune)	82

Liste des tableaux

3.1	Energies (en kcal/mol) des géométries représentatives des minima de l'état S1 du chromophore anionique (HBI ou le dérivé diméthylrique HDBI selon la référence), pour chaque calcul, le zéro d'énergie est l'énergie de l'état S1 plan. a : Jonasson et <i>al.</i> [4] b : Martin et <i>al.</i> [5].	26
3.2	Energie d'excitation avec CASPT2 (eV) pour le chromophore anionique obtenue pour différents ensembles de base et CAS(n,m) avec n : nombre d'électrons et m : nombre d'orbitales	27
4.1	Bilan des énergies minimales par rapport à x et y, z étant fixé, du système chromophore (à l'état fondamental ou excité) + phénol. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.	46
4.2	Bilan des énergies minimales par rapport à x et y, z étant fixé, du système chromophore (à l'état fondamental ou excité) + phénol. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.	53
4.3	Bilan des énergies minimales dans le cas du chromophore à l'état fondamental S0 et à l'état excité S1, et des géométries associées	61
4.4	Les coefficients <i>a</i> et <i>b</i> (avec la base minimal 6-31G*)	68
4.5	Les coefficients <i>a</i> et <i>b</i> (avec la base étendue 6-31G*)	68
4.6	Les coefficients <i>a</i> , <i>b</i> et <i>c</i> (avec la base minimal 6-31G*)	69
4.7	Les coefficients <i>a</i> , <i>b</i> et <i>c</i> (avec la base étendue 6-31+G*)	69
4.8	Les coefficients <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> et <i>d</i> (avec la base minimal 6-31G*)	70
4.9	Les coefficients <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> et <i>d</i> (avec la base étendue 6-31+G*)	70

Liste des symboles

(x,y,z)	valeur des coordonnées
6-31+G*	base étendue
6-31G*	base minimale
BSSE	Basis Set Superposition Error
CASPT2	Second order multiconfigurational perturbation theory
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CI	interaction de configuration
CSF	configuration state function
DFT	Density Functional Theory
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
HF	Hartree-Fock
MRCI	interaction de configuration multi référence
X,Y,Z	axes des coordonnées
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Index

6-31+G*, 33

BSSE, 6, 39

CASPT2, 1, 24

CASSCF, 14, 24

CI, 12

DFT, 1, 5

GFP, 1

Hartree-Fock, 9

MCSCF, 12, 14

MOLPRO, 26

MRCI, 1, 12

π -stacking, 37

SA2-CASSCF, 25

SCF, 9

YFP, 23, 37

Introduction générale

Le cadre général de cette thèse est une étude théorique par dynamique moléculaire et chimie quantique visant à interpréter la relation entre la structure et la fluorescence des protéines fluorescentes, en particulier, la façon dont le temps de vie de fluorescence dépend du milieu. Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une codirection pendant six ans entre l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen en Algérie et l'Université Paris-Sud en France. Elle se situe dans le cadre de l'axe transversal Simbiose du Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de l'université Paris-Sud réunissant des théoriciens du groupe Theosim et des expérimentateurs du groupe de Biologie Physico-chimique.

La protéine fluorescente verte (GFP) était découverte vers 1962 dans la méduse *Aequorea Victoria* [6], elle a commencé à recueillir beaucoup d'attention après son clonage en 1992 [7] et la première démonstration de son utilité comme un marqueur fluorescent pour l'étiquetage *in vivo* a été faite en 1994 [8]. Elle est caractérisée par son spectre d'émission dans le visible, de couleur verte (longueur d'onde approximativement de 508 nm)[9]. Un grand nombre de protéines de la famille de la GFP ont été découvertes dans d'autres organismes marins (FPs sauvages) *e.g.* les méduses, les coraux et les anémones de mer. Certaines ont été conçues par mutations dans les laboratoires par des biologistes pour décaler leurs spectres de fluorescence vers les extrémités bleues et rouges du spectre visible (FPs mutants) [10, 11, 12].

La GFP est devenue un outil unique qui permet la visualisation directe des structures et des processus dans les cellules vivantes. Par la suite, un vif intérêt est apparu dans la structure, la biochimie et la biophysique des protéines fluorescentes, ce qui a donné beaucoup de publications scientifiques sur les protéines fluorescentes et leurs applications en biologie moléculaire et cellulaire.

Leur rôle biologique n'est pas encore bien déterminé. Elles peuvent être impliquées dans la photosynthèse [13], la photoréception [14], ou une protection contre la lumière du soleil [13] pour l'organisme porteur. En revanche, elles peuvent être utilisées dans une grande variété d'études et leurs applications sont en expansion continue. Elles sont utilisées au laboratoire comme sondes chimiques capables de mesurer la température, le pH local ou la distance entre protéines. Elles sont également l'un des supports possibles de l'ultramicroscopie [15]. Une des applications les plus populaires de la famille de la GFP est le marquage des protéines [16] pour les visualiser dans les systèmes vivants en temps réel.

La mesure de l'efficacité du transfert d'énergie entre deux protéines de la famille GFP est

actuellement l'une des approches les plus couramment utilisées pour surveiller les interactions protéine-protéine dans les cellules vivantes [17]. Cette approche est basée sur le fait que le chromophore excité d'une protéine, le donneur, peut transférer son énergie d'émission à un chromophore accepteur dont l'énergie d'absorption est égale à l'énergie d'émission du donneur, à travers un mécanisme appelé FRET « Förster Resonance Energy Transfer » [18]. Pour ce type d'expérience, la paire donneur/accepteur la plus utilisée est la CFP (cyan fluorescent protein, le donneur) et la YFP (yellow fluorescent protein, l'accepteur). Cette dernière fait l'objet de notre étude.

Les protéines de la famille GFP ont toutes la même structure globale (figure 1) : un tonneau formé de 11 feuillets β et d'une hélice α dont fait partie le chromophore (le groupement responsable de la fluorescence).

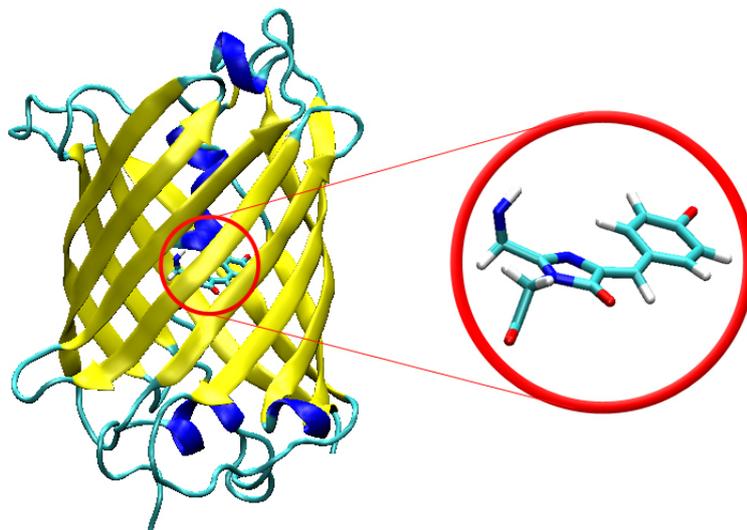


FIGURE 1 – (à gauche) La structure de la GFP, (à droite) le chromophore.

Le chromophore est entouré par un grand nombre d'acides aminés et de molécules d'eau qui sont capables de jouer un rôle dans la maturation du chromophore [19, 20], ou d'influencer l'absorption [21]. Il existe deux états possibles de protonation du chromophore dans les protéines de la famille GFP : une forme neutre (figure 2a) et une forme anionique (figure 2b) ou « déprotonée » obtenue par le départ du proton du groupement hydroxyl du cycle phénol. [22, 23]. Le chromophore est formé de deux cycles, un cycle phénol (ou phénolate) et un cycle imidazolinone, reliés par un pont.

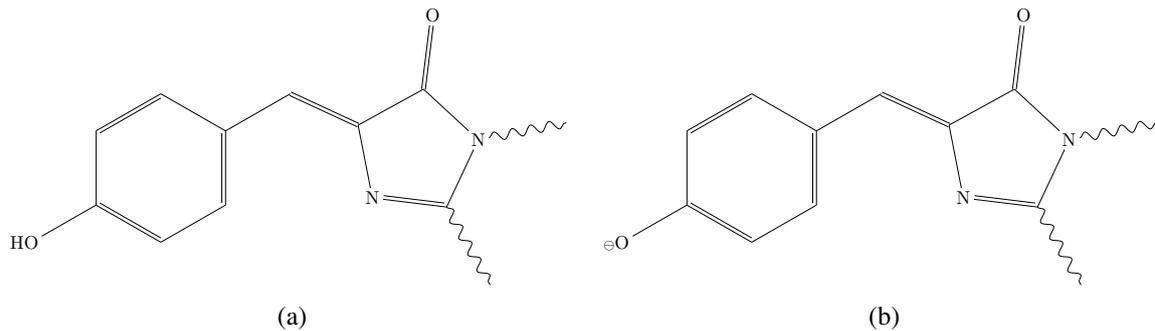


FIGURE 2 – Le chromophore dans sa forme (a) neutre , (b) anionique

Le chromophore à l'état excité S_1 est fluorescent seulement dans des géométries proches de la géométrie plane. La fluorescence est en compétition avec une désactivation non radiative par conversion interne quand le chromophore est dans des géométries perpendiculaires (géométries où les cycles phénol et imidazolinone sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre). Le chromophore isolé ou en solution à température ambiante n'est pratiquement pas fluorescent parce que lorsqu'il est dans l'état S_1 il subit une rotation interne vers une géométrie perpendiculaire, en un temps de l'ordre de la picoseconde[24]. Mais si il est dans une solution à très basse température, le mouvement de rotation est gêné et il peut fluorescer. Lorsqu'il est dans une protéine, les acides aminés autour de lui peuvent aussi l'empêcher de tourner, il reste alors dans sa géométrie plane, et il peut fluorescer.

Les propriétés photophysiques très variées des protéines fluorescentes dépendent fortement de la proportion des deux états de protonation du chromophore, et de la façon dont les acides aminés proches du chromophore l'empêchent de tourner vers les géométries perpendiculaires [24].

L'étude théorique des protéines fluorescentes permet de comprendre la dynamique dans les milieux protéiques et ainsi d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques en combinant des méthodes de dynamique moléculaire et de chimie quantique. De nombreuses études théoriques ont été menées sur les protéines de la famille GFP ces dernières années, citons, celle faite dans notre groupe , qui a permis d'étudier l'extinction de fluorescence dans la GFP et la YFP [3, 4]. Ils ont réalisé cette étude à l'aide de simulations de dynamique moléculaire à l'état excité du chromophore avec un champ de forces classique où ils ont développé un nouveau potentiel pour le chromophore anionique (NADIA). Pour la GFP, ils ont obtenu un temps moyen pour atteindre les géométries perpendiculaires où la désactivation non radiative peut avoir lieu en bon accord avec les résultats expérimentaux[3].

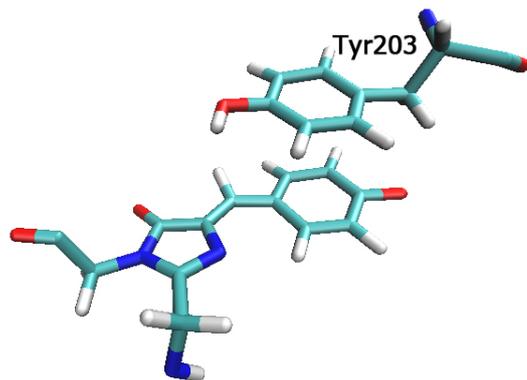


FIGURE 3 – Chromophore de la YFP en π stacking avec une tyrosine.

Dans le cas de la YFP, ce temps moyen est environ trois fois plus petit que la valeur qu'on peut déduire des résultats expérimentaux[4]. Dans la protéine fluorescente jaune (YFP)[25] la thréonine 203 est remplacée par une tyrosine. Avec cette dernière (tyrosine), un phénomène de π stacking avec le phenolate du chromophore (figure 3) est observé. Ce phénomène a pour effet de réduire l'énergie de transition électronique et de décaler de + 20 nm les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission [26]). On peut aussi s'attendre à qu'il gêne les mouvements de torsion du chromophore vers les géométries perpendiculaires. Donc une cause possible du temps calculé trop court pourrait être une mauvaise représentation du π -stacking entre le chromophore et la tyrosine 203. L'étude de cette interaction constitue la première partie de cette thèse. Dans la deuxième partie, nous proposons un modèle original d'analyse du déclin de la population de l'état excité à partir des résultats de dynamique moléculaire. Ce modèle tient compte entre autres du fait que les désexcitations radiative et non radiative ont lieu dans des zones de géométries totalement différentes (modèle de déclin par zones).

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons les fondements théoriques des calculs de chimie quantique qui sont utilisés pour résoudre l'équation de Schrödinger pour les électrons dans les molécules. Dans le deuxième chapitre, les principes généraux des phénomènes photophysiques sont rappelés brièvement, puis nous présentons les caractéristiques de la protéine fluorescente jaune (YFP). Ensuite, dans le troisième chapitre nous précisons les caractéristiques des calculs quantiques CASPT2 permettant la description du premier état excité du chromophore. Puis on définit l'ensemble des positions relatives du chromophore et d'un cycle phénol à étudier au niveau CASPT2 pour représenter la variation de l'interaction π -stacking. Dans le quatrième chapitre, on analyse les énergies d'interaction chromophore-phénol obtenue sur une large grille de positions relatives par un calcul CASPT2 ou en utilisant un champ de force classique. Puis nous présentons les premiers résultats de construction d'un champ de force par interpolation des calculs quantiques pour le système chromophore excité – phénol. Enfin, dans le cinquième chapitre, nous présentons le modèle d'analyse du déclin de la population du chromophore excité et les résultats obtenus pour la GFP et la YFP.

Chapitre 1

Généralités sur les méthodes de calcul utilisées

Un des principaux objectifs de la chimie quantique est de résoudre l'équation de Schrödinger indépendante du temps et de déterminer la structure électronique des atomes et des molécules. Dans ce chapitre, nous présentons les fondements théoriques des calculs de chimie quantique qui sont utilisés pour résoudre l'équation de Schrödinger pour les électrons dans les molécules : nous établissons les équations qui sont utilisées et décrivons certaines des approximations qui rendent les calculs réalisables.

1.1 Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Dans la Théorie de la fonctionnelle de la densité (Density Functional Theory, DFT) proposée par Hohenberg et Kohn [27, 28] on calcule les propriétés de l'état fondamental, dont l'énergie, à partir de la densité électronique $n(\vec{r})$ et non pas de la fonction d'onde multiélectronique. Alors que la fonction d'onde dépend de $3N$ variables, la densité est seulement fonction de trois variables, ce qui réduit considérablement les temps de calculs et permet d'étudier des systèmes de grandes tailles hors de portée des autres méthodes basées sur la fonction d'onde.

1.1.1 Théorèmes de Hohenberg-Kohn

La densité électronique d'un système à n électrons associée à une fonction d'onde $\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$ est donnée par l'expression suivante :

$$\rho(\vec{r}) = \int |\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)|^2 d\vec{r}_1 \dots d\vec{r}_n \quad (1.1)$$

où ρ est normée à n . La DFT repose sur deux théorèmes de Hohenberg et Kohn [27]. Ces théorèmes démontrent que toutes les propriétés d'un système dans son état fondamental sont complètement déterminées par sa densité $\rho(\vec{r})$, elle-même étant obtenue par un principe variationnel appliqué à la fonctionnelle énergie du système $E[\rho]$.

La densité électronique $\rho(\vec{r})$ est la seule fonction nécessaire pour obtenir toutes les propriétés électroniques d'un système quelconque. On peut exprimer l'énergie de l'état fondamental comme une fonctionnelle de la densité :

$$\begin{aligned} E[\rho_0] &= T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \\ &= T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + \int \rho_0(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r} \end{aligned} \quad (1.2)$$

On définit la fonctionnelle de Hohenberg et Kohn $F_{HK}[\rho]$ comme :

$$\begin{aligned} F_{HK}[\rho] &= T[\rho] + E_{ee}[\rho] \\ &= \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle \end{aligned} \quad (1.3)$$

Cette nouvelle fonctionnelle contient l'énergie cinétique électronique $T[\rho]$ et l'énergie potentielle due à l'interaction entre les électrons $E_{ee}[\rho]$. Les expressions explicites de ces deux fonctionnelles ne sont pas connues. Par contre, nous connaissons la partie classique de l'interaction entre électrons

Dans la théorie de Kohn et Sham [28], la fonctionnelle $E[\rho]$ est réécrite sous une forme qui fait intervenir la contribution cinétique T_0 d'un système de particules non-interagissantes et la contribution coulombienne d'un système classique :

$$E[\rho] = T_0[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' + \int \rho(\vec{r}) v(\vec{r}) d\vec{r} + E_{xc}[\rho] \quad (1.4)$$

La fonctionnelle E_{xc} est appelée fonctionnelle d'échange-corrélation. Elle contient les contributions à la corrélation et l'échange de l'énergie cinétique (correction par rapport au système d'électrons non-interagissant) et la partie non classique de l'interaction électron-électron (corrélation et échange). Dans cette approche, on introduit les orbitales Kohn-Sham monoélectroniques solutions d'un hamiltonien monoélectronique comportant le potentiel créé par les noyaux, l'interaction coulombienne entre les électrons et le potentiel d'échange-corrélation. Il prend une forme fonctionnelle de la densité électronique recherchée. Les équations de Kohn-Sham sont alors résolues de manière itérative.

La principale difficulté de la DFT réside dans la détermination de la fonctionnelle échange-corrélation E_{xc} (équation 1.4) dont l'expression analytique exacte n'est pas connue. On cherche donc des approximations qui permettent de décrire convenablement les propriétés étudiées. Ceci conduit à une grande variété de fonctionnelles.

1.2 Erreur de superposition de base

Les bases d'orbitales atomiques utilisées dans les calculs de chimie quantique ne comportent qu'un nombre fini de fonctions. L'évaluation de l'énergie exacte nécessiterait, outre un calcul d'IC complet, une base infinie, comprenant un nombre infini de fonctions. L'erreur de superposition de base (*Basis Set Superposition Error pour*) provient du caractère fini des bases.

Soient deux systèmes : A décrit avec une base d'orbitales atomiques a , et B décrit avec une base b . Lorsque qu'on veut faire des calculs sur le complexe AB formé par les deux systèmes on utilise l'ensemble des deux bases (noté ab), et l'énergie de liaison du complexe est donnée par l'expression :

$$\Delta E_{liaison} = E(AB)_{ab}^* - E(A)_a - E(B)_b \quad (1.5)$$

La géométrie du complexe est dénotée par le symbole étoile (*).

On remarque que la base du système (ab) n'est pas la même que la base des systèmes isolés. Le nuage électronique du système A présent dans le complexe AB va donc être décrit non seulement par les fonctions composant la base a , mais aussi par les fonctions de la base b alors que les systèmes isolés seront dans leur propre base. On a donc un abaissement artificiel de l'énergie du complexe AB qui est nommé erreur de superposition de base.

Pour corriger cette erreur, on applique la méthode du *Counterpoise Correction (CP)* introduit par BOYS ET BERNARDI[29]. Pour estimer cette correction, il faut calculer quatre contributions énergétiques. En utilisant la base a pour le système A , et la base b pour le système B , on calcule l'énergie de ces deux systèmes avec la géométrie qu'ils ont dans le complexe, c'est-à-dire on calcule $E(A)_a^*$ et $E(B)_b^*$. Ensuite, on évalue l'énergie de A avec la base ab , sans la présence de B : $E(A)_{ab}^*$. On réalise la même opération pour le système B . La correction est définie par :

$$\Delta E_{CP} = E(A)_{ab}^* + E(B)_{ab}^* - E(A)_a^* - E(B)_b^* \quad (1.6)$$

L'énergie de liaison corrigée par la méthode *Counterpoise Correction* est donnée par :

$$\Delta E_{CP}^{liaison} = \Delta E_{liaison} - \Delta E_{CP} \quad (1.7)$$

1.3 L'équation de Schrödinger

La chimie quantique est basée sur la résolution de l'équation de Schrödinger [30] afin de déterminer l'énergie et la fonction d'onde d'une molécule. L'équation de Schrödinger indépendante du temps (1.8) est donné par :

$$\hat{H} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle \quad (1.8)$$

Où, E est l'énergie totale du système, elle peut être obtenue par l'opération du hamiltonien \hat{H} sur la fonction d'onde $|\Psi\rangle$. L'hamiltonien est donné par :

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} \quad (1.9)$$

où \hat{T} et \hat{V} sont respectivement les opérateurs des énergies cinétique et potentielle, ils s'écrivent :

$$\begin{cases} \hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_i^N \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 \\ \hat{V} = \sum_i^N \sum_j^N \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \end{cases} \quad (1.10)$$

où m_i est la masse de la particule i , q_i et q_j sont les charges des particules i et j respectivement et r_{ij} est la distance entre i et j .

L'équation de Schrödinger indépendante du temps (1.8), ne peut être résolue exactement pour une molécule à plusieurs électrons. Pour contourner cette difficulté, on introduit des approximations.

1.4 L'approximation de Born-Oppenheimer

Dans l'équation (1.9), les termes nucléaires sont séparés des termes électroniques, en la développant, \hat{H} devient :

$$\begin{aligned} \hat{H} = & \underbrace{-\sum_a \frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2}_{\hat{T}_{el}} - \underbrace{\sum_A \frac{\hbar}{2m_A} \nabla_A^2}_{\hat{T}_{nu}} - \underbrace{\sum_a \sum_A \frac{Z_A e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}}}_{\hat{U}_{en}} \\ & + \underbrace{\sum_a \sum_{b>a} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ab}}}_{\hat{U}_{ee}} + \underbrace{\sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_i Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0 R_{AB}}}_{\hat{U}_{nn}} \end{aligned} \quad (1.11)$$

Où ∇^2 est le laplacien, m_e et m_A sont la masse de l'électron et du noyau respectivement. Ils sont utilisés pour définir les deux termes de l'énergie cinétique \hat{T}_{el} et \hat{T}_{nu} . Le troisième terme \hat{U}_{en} représente l'attraction coulombienne entre l'électron et le noyau. Les deux termes \hat{U}_{ee} et \hat{U}_{nn} représentent la répulsion entre deux électrons et deux noyaux, respectivement.

L'approximation de Born-Oppenheimer [31] prend en compte la différence de masse entre les électrons et le noyau. Pour bien illustrer cette différence, prenons le cas de l'atome d'hydrogène, le rapport de masse du noyau avec l'électron est de 1836. En raison de cette différence de masse, les noyaux sont considérés comme fixes. En conséquence, l'hamiltonien électronique est donné par :

$$\hat{H}_{ele} = -\sum_a \frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2 - \sum_a \sum_A \frac{Z_A e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\sum_a \sum_{b>a} \frac{e^2}{r_{ab}} \right) \quad (1.12)$$

Le terme d'énergie cinétique pour les noyaux ainsi que la répulsion entre les noyaux, sont des constantes. L'équation de Schrödinger électronique devient alors :

$$\hat{H}_{ele} \left| \Psi_{ele}(r_a; R_A) \right\rangle = E_{ele}(R_A) \left| \Psi_{ele}(r_a; R_A) \right\rangle \quad (1.13)$$

où la fonction d'onde électronique, $\Psi_{ele}(r_a; R_A)$, dépend directement des coordonnées d'électrons r_a , et de façon paramétrique des coordonnées nucléaires R_A , tout comme les énergies élec-

troniques, $E_{ele}(R_A)$. L'énergie potentielle pour un état électronique donné est défini comme une somme de l'énergie électronique $E_{ele}(R_A)$ et la répulsion nucléaire $\hat{U}_{nn}(R_A)$, pour une configuration nucléaire spécifique R_A :

$$\hat{V}_{ele} = E_{ele}(R_A) + \hat{U}_{nn}(R_A) \quad (1.14)$$

Résoudre l'équation de Schrödinger électronique (1.13) pour différentes coordonnées nucléaires produit une série d'énergies ponctuelles qui peuvent être connectées pour former des surfaces d'énergie potentielle. Il est possible de résoudre cette équation pour des systèmes mono-électroniques, mais afin de la résoudre pour des systèmes à plusieurs électrons, il faut introduire d'autres approximations. La plus fondamentale de ces approximations est l'approximation de Hartree-Fock.

1.5 Méthode de Hartree-Fock

La méthode Hartree-Fock (HF) [32, 33] est une approximation qui détermine l'énergie de l'état fondamental et la fonction d'onde d'un système de N-électrons. Elle se rapproche de la fonction d'onde exacte comme un déterminant unique appelé déterminant de Slater [34] qui est optimisé par la résolution de l'équation de Hartree-Fock itérative, dans un processus connu sous le nom de la méthode champ auto-cohérent (SCF).

1.5.1 Déterminant de Slater

Le déterminant de Slater est la fonction d'onde qui peut être utilisée pour décrire l'état fondamental d'un système à N-électrons :

$$\Psi_0(X) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(X_1) & \chi_1(X_2) & \cdots & \chi_1(X_N) \\ \chi_2(X_1) & \chi_2(X_2) & \cdots & \chi_2(X_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_N(X_1) & \chi_N(X_2) & \cdots & \chi_N(X_N) \end{vmatrix} \quad (1.15)$$

Le déterminant est décrit par des fonctions $\chi_N(X_N)$ connues comme étant des spinorbitales, la notation X_N désignant les coordonnées d'espace et de spin du N-ième électron. Elle est formée à partir du produit d'une orbitale spatiale $\psi(r)$, qui dépend de la position de l'électron, avec une fonction de spin ($\alpha(\omega)$ ou $\beta(\omega)$).

$$\chi_a(X_a) = \chi_a(r, \omega) = \psi(r) \cdot \begin{cases} \alpha(\omega) \\ \beta(\omega) \end{cases} \quad (1.16)$$

Elle est orthonormée :

$$\langle \chi_a | \chi_b \rangle = \delta_{ab} \quad (1.17)$$

Selon le principe variationnel, la fonction d'onde $\Psi_0(X)$ est celle qui donne l'énergie la plus basse :

$$E_0 = \langle \Psi_0(X) | \hat{H}_{ele} | \Psi_0(X) \rangle \quad (1.18)$$

La minimisation de l'énergie amène à résoudre les équations de Hartree-Fock.

1.5.2 Les équations de Hartree-Fock

Les équations de Hartree-Fock sont définies par :

$$\hat{f}(X_a) | \chi(X_a) \rangle = \varepsilon_0 | \chi(X_a) \rangle \quad (1.19)$$

C'est une équation aux valeurs propres dont la solution donne l'énergie minimale E_0 , où l'opérateur de Fock est défini comme suit :

$$\hat{f}(X_a) = \underbrace{\frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2 - \sum_A \frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}}}_{\hat{h}(X_a)} + \underbrace{\sum_b^N [\hat{J}_b(X_a) - \hat{K}_b(X_a)]}_{\hat{V}^{HF}(X_a)} \quad (1.20)$$

$\hat{h}(X_a)$ est l'opérateur monoélectronique et $\hat{V}^{HF}(X_a)$ est l'opérateur du potentiel de Hartree-Fock.

L'opérateur du potentiel de Hartree-Fock est défini par deux termes :

— \hat{J}_b opérateur coulombien :

$$\hat{J}_b(X_1) \chi_a(X_1) = \chi_a(X_1) \int dX_2 \chi_b^*(X_2) \frac{1}{r_{12}} \chi_b(X_2) \quad (1.21)$$

qui est classiquement décrit comme l'interaction d'un électron a avec les $N-1$ électrons restants, dans ce cas l'électron b .

— \hat{K}_b opérateur d'échange :

$$\hat{K}_b(X_1) \chi_a(X_1) = \chi_b(X_1) \int dX_2 \chi_b^*(X_2) \frac{1}{r_{12}} \chi_a(X_2) \quad (1.22)$$

L'équation (1.19) est nonlinéaire et doit être résolue itérativement. On suppose que les spinorbitales, solutions de cette équation, sont connues et on calcule l'opérateur du potentiel \hat{V}^{HF} qui nous permet d'obtenir de nouvelles spinorbitales.

1.5.3 Les équations de Roothaan-Hall

On peut écrire les équation de Hartree-Fock (1.19) sous la forme :

$$\hat{f}(r_1) | \psi_i(r_1) \rangle = \varepsilon_i | \psi_i(r_1) \rangle \quad (1.23)$$

Où la fonction d'onde $\psi_i(r_1)$ est une orbitale moléculaire et ε_i est l'énergie correspondante. Pour un système moléculaire, l'équation ne peut pas être résolue de manière analytique, mais elle est transformée en un ensemble d'équations algébriques en introduisant d'abord un ensemble de fonctions spatiales, tel que présenté par Roothaan et Hall [35, 36]

Le principe des équations de Roothaan-Hall est que les orbitales moléculaires peuvent être développées comme une combinaison linéaire des M fonctions à un électron, ce développement est appelé *méthode de Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques (LCAO)*[37, 38] :

$$|\psi_i\rangle = \sum_{\mu=1}^M C_{\mu i} |\phi_{\mu}\rangle \quad (1.24)$$

Où les fonctions de base sont notées avec des indices grecs et les orbitales moléculaires avec des indices latins. L'équation (1.24) peut être insérée dans l'équation (1.23) en multipliant par la gauche avec ϕ_v^* et en intégrant on obtient l'équation matricielle suivante :

$$\sum_{\mu}^M C_{\mu i} \underbrace{\int dr_1 \phi_v^*(r_1) \hat{f}(r_1) \phi_{\mu}(r_1)}_{F_{\mu v}} = \varepsilon_i \sum_{\mu}^M C_{\mu i} \underbrace{\int dr_1 \phi_v^*(r_1) \phi_{\mu}(r_1)}_{S_{\mu v}} \quad (1.25)$$

Les éléments de la matrice $S_{\mu v}$ décrivent le recouvrement entre deux fonctions μ et v et forment une matrice de recouvrement S . La matrice de Fock est formée à partir des éléments de la matrice $F_{\mu v}$.

L'équation (1.25) peut être écrite sous la forme compacte :

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\varepsilon \quad (1.26)$$

Où la matrice \mathbf{C} contient les coefficients des orbitales moléculaires ψ_i et les énergies de chaque orbitale moléculaire sont présentes dans la matrice ε (diagonale, par convention).

Pour résoudre un système non linéaire, une approche itérative [32] est utilisée, nommée *champ auto-cohérent (SCF pour self consistent field)*, introduit par Hartree en 1928. Elle a été appliquée aux équations non linéaires de Roothaan-Hall. Cette méthode commence par la résolution des équations non linéaires avec un jeu de coefficients d'orbitales moléculaires, parce que l'opérateur de Fock dépend également de ces coefficients. Un nouvel ensemble de coefficients avec leurs énergies est produit et après chaque itération la matrice de densité obtenue est comparée avec la précédente et si elle ne change pas, la procédure atteint l'auto-cohérence et le processus itératif s'arrête.

1.6 Méthodes post Hartree-Fock

L'approximation Hartree-Fock consiste à remplacer le terme d'interaction inter électronique de l'équation de Schrödinger par une interaction de champ moyen. Cette méthode ignore la corrélation électronique [39]. L'énergie associée à cette corrélation est définie comme la différence

d'énergie entre l'énergie exacte (E_{el} obtenue à partir de l'équation (1.13)), dans les limites de l'approximation de Born-Oppenheimer, et l'énergie Hartree-Fock devient :

$$E_{corr} = E_{exact} - E_{HF} \quad (1.27)$$

Il existe deux types de méthodes pour tenir compte de la corrélation électronique :

- Les méthodes variationnelles telles que l'interaction de configuration (CI), l'interaction de configuration multi référence (MRCI) et la méthode du champ auto cohérent multi-configurationnelle (MCSCF).
- Les méthodes de perturbation telles que la théorie des perturbations multi corps (MBPT) et la méthode de clusters couplés (CC).

1.6.1 Interaction de configuration

La fonction d'onde exacte de l'état fondamental peut être exprimée comme une combinaison linéaire de tous les déterminants de Slater. Par conséquent, nous pouvons écrire la fonction d'onde électronique exacte :

$$\Psi = c_0 \psi_0 + \underbrace{\sum_{a,p} c_a^p \psi_a^p}_{\text{mono excitation (M)}} + \underbrace{\sum_{\substack{a < b \\ p < q}} c_{ab}^{pq} \psi_{ab}^{pq}}_{\text{double excitation (D)}} + \underbrace{\sum_{\substack{a < b < c \\ p < q < r}} c_{abc}^{pqr} \psi_{abc}^{pqr}}_{\text{triple excitation (T)}} + \dots \quad (1.28)$$

Où le premier terme représente le déterminant Hartree-Fock et les autres fonctions d'état de configuration (*CSF pour configuration state function*) peuvent être déterminées par le nombre de spinorbitales échangées avec les orbitales virtuelles du déterminant de Hartree-Fock. Si une seule spinorbitale diffère, on la décrit comme un déterminant d'excitation simple. Si deux spinorbitales diffèrent, elles sont décrites comme un déterminant d'excitation double et ainsi de suite. Les indices a,b,c ... représentent les spinorbitales occupées dans le calcul HF et p,q,r ... pour les spinorbitales virtuelles et les coefficients c représentent le poids des différentes configurations. Une méthode *ab initio* dans laquelle la fonction d'onde est exprimée sous la forme de l'équation (1.28) est appelée *Interaction de Configuration (CI)*. Dans la pratique, il est impossible de gérer un ensemble infini de déterminants de Slater à N électrons, avec chacun des déterminants construit à partir d'un ensemble infini de spin-orbitales. En outre, le calcul devient très coûteux (à la fois pour le temps de calcul que pour l'espace de stockage de l'ordinateur) pour gérer un nombre extrêmement important de déterminants. Ce dernier problème est légèrement réduit par l'observation faite que le nombre de déterminants dans l'équation (1.28) peut souvent être réduit en fonction de la symétrie. Un autre point est la difficulté de réaliser des calculs de structure moléculaire de façon fiable, même si nous pouvons inclure toutes les CSF

dans l'équation (1.28), nous devons aussi rappeler que les CSF sont construites à partir d'un ensemble fini de fonctions de base. Un calcul est défini comme une IC complète (Full CI) si toutes les CSF sont utilisées pour un ensemble de bases finies données.

On peut écrire l'équation (1.28) sous une forme plus simple :

$$\Psi = \sum_{J=1}^L C_J \Psi_J \quad (1.29)$$

Les coefficients C_J sont déterminés par minimisation variationnelle, cette minimisation est équivalente à la résolution d'un ensemble d'équations simultanées pour ces coefficients :

$$\sum_{J=1}^L H_{IJ} C_J = E \sum_{J=1}^L S_{IJ} C_J \quad (1.30)$$

Où :

$$H_{IJ} = \int \Psi_I^* H \Psi_J d\tau \quad S_{IJ} = \int \Psi_I^* \Psi_J d\tau \quad (1.31)$$

La notation $\int \dots d\tau$ implique une intégration sur les coordonnées spatiales et de spin. L'ensemble de ces deux équations peut être écrit en notation matricielle :

$$\mathbf{HC} = \mathbf{ESC} \quad (1.32)$$

où \mathbf{C} est une matrice de coefficients de dimension $L \times L$. Parce que les déterminants de Slater forment un ensemble orthonormé ($S_{IJ} = \delta_{IJ}$), l'équation devient :

$$\mathbf{HC} = \mathbf{EC} \quad (1.33)$$

Cette équation matricielle peut être résolue par la diagonalisation de \mathbf{H} .

1.6.2 Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF)

Dans les méthodes d'IC décrites dans la section précédente, les coefficients C_J des équations (1.29) sont déterminés dans un premier calcul HF-SCF et maintenus fixes dans le calcul d'IC. Dans la méthode dite du Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF), ces coefficients sont optimisés. Le développement de la méthode MCSCF est particulièrement important pour les états excités, une des procédures les plus appropriées est la méthode du champ auto-cohérent de l'espace actif complet (complete active space SCF (CASSCF)), dans laquelle les fonctions d'onde spatiales sont divisées en trois catégories :

- Un ensemble d'**orbitales inactives** composées des fonctions d'onde spatiales qui sont doublement occupées dans tous les déterminants inclus dans l'équation (1.29).
- Un ensemble d'**orbitales virtuelles** composées des fonctions d'onde spatiales qui sont inoccupées dans tous les déterminants.

- Un ensemble d'**orbitales actives** qui sont énergétiquement intermédiaires entre les orbitales inactives et virtuelles.

Dans un calcul MCSCF [40] on optimise simultanément les coefficients C_J et les coefficients des orbitales moléculaires entrant dans la construction des déterminants.

Les étapes élémentaires dans un calcul MCSCF sont premièrement : partir de préférence d'une fonction d'onde initiale appropriée (par exemple les orbitales moléculaires d'un calcul SCF), puis choisir les configurations à inclure dans la fonction d'onde. Ensuite il faut minimiser l'énergie MCSCF.

Le problème le plus important est le choix de l'espace des configurations. Etant donné que le nombre de configurations intervenant dans ce type de calcul doit rester limité, il est impossible d'utiliser cette méthode lorsque le choix nécessite l'inclusion d'un grand nombre de configurations. La méthode Complete Active Space SCF (CASSCF) est une solution à ce problème.

La méthode CASSCF a été introduite par Roos et Siegbahn [41, 42] et Ruedenberg [43, 44] au début des années 80. Dans cette méthode on utilise toutes les configurations construites sur un groupe d'OM en nombre limité. Le calcul favorisera celles de plus gros poids pour un état donné.

La dimension de l'espace configurationnel est fixée par le nombre de possibilités de mettre n électrons dans m orbitales. Cette dimension croît très vite avec le nombre d'orbitales actives.

La fonction d'onde CASSCF possède de nombreux avantages :

- Elle est « size-consistent ¹ ».
- Elle est invariante par transformation unitaire dans l'espace actif.

1.6.3 Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger

Dans la méthode RSPT (Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger) l'équation que nous voulons résoudre est :

$$\hat{H}\Psi_n = E_n\Psi_n \quad (1.34)$$

où \hat{H} représente l'hamiltonien de notre système et Ψ_n est une fonction propre exacte de l'hamiltonien. Afin d'être en mesure d'appliquer RSPT à ce problème, nous séparons l'hamiltonien en deux parties :

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda\hat{V} \quad (1.35)$$

\hat{H}_0 est connu comme l'hamiltonien non perturbé ou l'hamiltonien d'ordre zéro, tandis que \hat{V} est appelé la perturbation, il est supposé faible par rapport à \hat{H}_0 . Ici, nous avons introduit le paramètre λ , qui est supposé être seulement un terme réel avec une valeur comprise entre 0 et 1.

1. Une fonction est dite « size-consistent » si l'énergie de corrélation croît linéairement avec le nombre de particules et si, lorsque les M fragments du système sont à l'infini, la fonction d'onde se réduit bien à un produit de fonctions locales de chacun des fragments.

Si λ est égal à zéro, l'équation (1.34) se réduit à l'équation d'ordre zéro :

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(0)} \quad (1.36)$$

On écrit ensuite :

$$\begin{aligned} E_n &= E_n^{(0)} + \Delta E_n \\ \Psi_n &= \Psi_n^{(0)} + \Delta \Psi_n \end{aligned} \quad (1.37)$$

Ces deux expressions peuvent être écrites comme un développement en puissance de λ :

$$E_n = E_n^{(0)} + \lambda E_n^{(1)} + \lambda^2 E_n^{(2)} + \lambda^3 E_n^{(3)} + \dots \quad (1.38)$$

$$\Psi_n = \Psi_n^{(0)} + \lambda \Psi_n^{(1)} + \lambda^2 \Psi_n^{(2)} + \lambda^3 \Psi_n^{(3)} + \dots \quad (1.39)$$

On pose :

$$\langle \Psi_n^{(0)} | \Psi_n^{(m)} \rangle = \delta_{m0} \quad (1.40)$$

On introduit les expressions de E_n et Ψ_n dans les équations (1.38) et (1.39) dans l'équation (1.34) et on identifie les coefficients du développement en puissance. On obtient un nombre infini d'équations de la forme :

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(0)} \quad (1.41)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(1)} + \hat{V} \Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(0)} \quad (1.42)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(2)} + \hat{V} \Psi_n^{(1)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(2)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(2)} \Psi_n^{(0)} \quad (1.43)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(3)} + \hat{V} \Psi_n^{(2)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(3)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(2)} + E_n^{(2)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(3)} \Psi_n^{(0)} \quad (1.44)$$

En tenant compte de l'orthogonalité (1.40), on obtient une série d'équations :

$$E_n^{(0)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{H}_0 | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (1.45)$$

$$E_n^{(1)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (1.46)$$

$$E_n^{(2)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(1)} \rangle \quad (1.47)$$

$$E_n^{(3)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(2)} \rangle \quad (1.48)$$

⋮

$$E_n^{(m)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(m-1)} \rangle \quad (1.49)$$

H_0 est un opérateur hermitien et dispose d'un ensemble de solutions non dégénérées qui

sont orthogonales et forment un espace complet. $\Psi_n^{(0)}$ est une de ces solutions. Tout vecteur orthogonal peut être exprimé comme une combinaison linéaire de toutes les autres solutions de l'équation aux valeurs propres $\{\Psi_n^{(0)}\}$:

$$\Psi_n^{(m)} = \sum_l C_{n,l}^{(m)} \Psi_l^{(0)} \quad (1.50)$$

Où

$$C_{n,l}^{(m)} = \langle \Psi_l^{(0)} | \Psi_n^{(m)} \rangle \quad (1.51)$$

Pour $m = 1$ les coefficients sont obtenus uniquement avec les solutions de l'ordre de zéro. La multiplication à gauche de l'équation (1.42) par $\langle \Psi_l^{(0)} |$, donne :

$$(E_n^{(0)} - E_l^{(0)}) \langle \Psi_l^{(0)} | \Psi_n^{(1)} \rangle = \langle \Psi_l^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (1.52)$$

Donc

$$C_{n,l}^{(1)} = \frac{\langle \Psi_l^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle}{(E_n^{(0)} - E_l^{(0)})} \quad (1.53)$$

Les corrections d'ordre supérieur peuvent être obtenues d'une manière similaire avec des expressions de plus en plus complexes.

On peut envisager un grand nombre de façons dont l'hamiltonien d'un système de particules peut être partitionné. Il existe plusieurs méthodes de perturbations, elles se distinguent par la fonction d'onde d'ordre zero. La théorie des perturbations Møller-Plesset utilise une fonction d'onde de référence mono-déterminantale issue d'un calcul HF et la méthode CASPT2 utilise une fonction d'onde CASSCF multi-déterminantale, dans ces deux cas on a :

$$E_{MP2} = E_{HF} + E^{(2)} \quad (1.54)$$

$$E_{CASPT2} = E_{CASSCF} + E^{(2)} \quad (1.55)$$

Chapitre 2

Propriétés de fluorescence de la protéine fluorescente jaune (YFP)

Dans ce chapitre, les principes généraux des phénomènes photophysiques sont rappelés, puis les caractéristiques de la protéine utilisée sont présentées. Enfin une analyse des états excités du chromophore de la YFP est fournie afin de connaître les mécanismes entre le chromophore et la tyrosine à l'état excité.

2.1 La fluorescence

Lorsqu'une molécule à l'état électronique fondamental (en général un état singulet S_0) absorbe un photon de longueur d'onde suffisamment énergétique (dans la bande d'adsorption de la molécule), il se produit un apport d'énergie $E = hc/\lambda$ (où h : constante de Planck, c : célérité de la lumière et λ : longueur d'onde absorbée) qui amène la molécule dans un état électronique singulet excité ($S_1, S_2 \dots$) en restant dans la géométrie de l'état fondamental (transition verticale). Il y a ensuite une évolution de la géométrie vers la géométrie d'équilibre la plus proche de l'état excité, puis la molécule peut retourner à l'état S_0 en émettant un photon ayant moins d'énergie que le photon absorbé. L'intervalle de temps moyen qui sépare l'absorption et la restitution d'énergie est appelé «durée de vie» de l'état excité. Il s'agit de temps très court (de l'ordre de quelques femtosecondes à nanosecondes).

Mais il y a en général d'autres chemins de retour à l'état fondamental où la molécule n'émet pas de photon. On les appelle les désexcitations non radiatives.

2.2 Les processus non radiatifs

La molécule excitée dans un état singulet peut être le siège d'une série de réactions dont les manifestations sont diverses, jusqu'à son retour à l'état stable, comme cela est montré sur le diagramme de Jablonski (figure 2.1). La dissipation d'énergie s'effectue selon 2 types de processus différents :

- Processus radiatif : fluorescence .
- Processus non radiatifs : conversion interne (CI) ou relaxation vibrationnelle(RV).

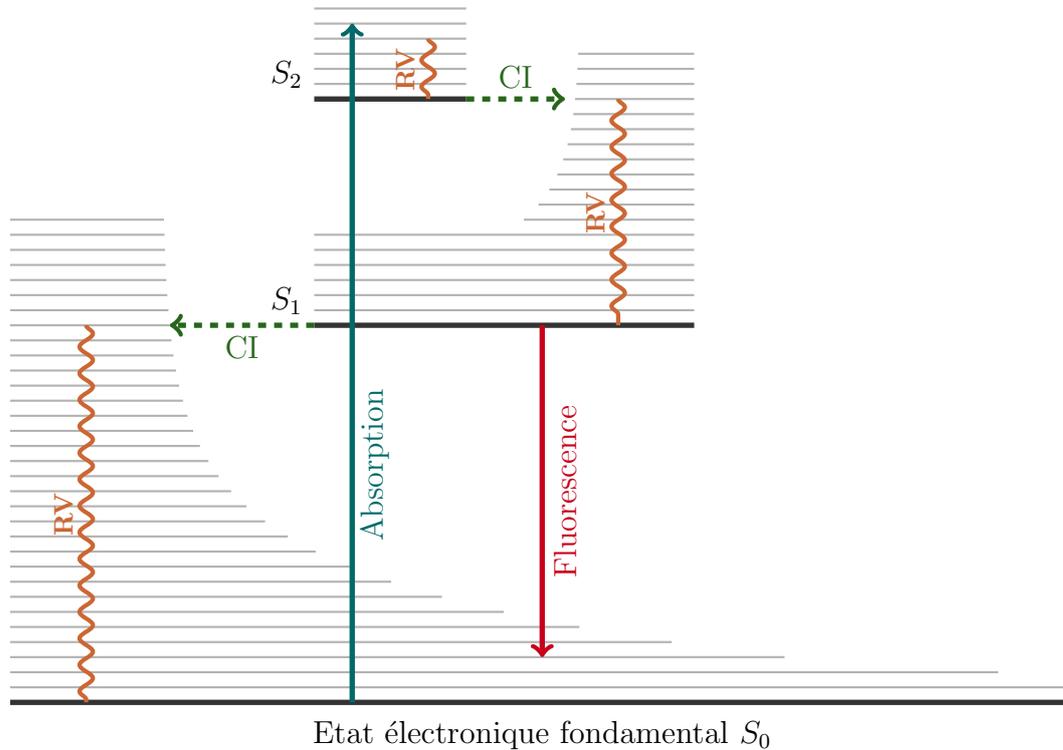


FIGURE 2.1 – Diagramme de Jablonski.

L'intensité de la fluorescence correspond au nombre de photons émis par unité de temps dans des conditions d'excitation données. Ce nombre est proportionnel au nombre d'atomes ou de molécules présents dans le milieu et donc à la concentration. Ceci permet une analyse quantitative. Le rendement quantique ϕ correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de molécules excitées, c'est aussi la probabilité pour que le chromophore excité émette un photon. La durée de vie de fluorescence, τ , ou temps de déclin de fluorescence correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité, temps moyen pendant lequel une molécule fluorescente demeure excitée.

Soient k_r et k_{nr} les constantes de vitesse de la désexcitation radiative et de la désexcitation non radiative. Elles sont reliées au temps de vie de fluorescence τ et au rendement quantique ϕ [45] :

$$\tau = 1/(k_r + k_{nr}) \quad (2.1)$$

$$\phi = k_r/(k_r + k_{nr}) \quad (2.2)$$

2.3 Les protéines fluorescentes

La protéine fluorescente verte de la méduse *Aequorea Victoria* et ses différentes variantes ont été largement utilisées en tant que marqueur en biologie moléculaire. Diverses applications dans les études physiologiques de cellules vivantes ont été décrites [1, 46, 47, 10]. La structure cristallographique de la GFP « sauvage » (celle de la méduse *Aequorea Victoria*) a été déterminée en 1997[22]. La protéine est formée d'un tonneau de 11 feuillets β contenant une hélice centrale qui porte le chromophore. Le chromophore est formé spontanément après le repliement de la protéine par cyclisation de 3 acides aminés : une sérine, une tyrosine et une glycine (Ser65, Tyr66 et Gly67) (voir figure 2.2 et 2.3), conduisant à la formation d'un noyau hétérocyclique de type imidazolinone, suivie par l'oxydation de Tyr66 en présence d'oxygène moléculaire [48]. Le chromophore comporte donc deux cycles, un cycle imidazolinone, et un cycle phénol (ou phénolate), relié par un groupement CH. Le chromophore peut être neutre ou anionique (voir figure 2) dans le cas où le phénol a perdu l'hydrogène de son groupement hydroxyl et est devenu un phénolate. Dans la GFP sauvage il existe à la fois la forme neutre (majoritaire) qui absorbe dans l'ultra violet proche et la forme anionique qui absorbe dans le visible [10]. Quand on excite le chromophore dans la bande d'absorption de l'anion on voit une émission de fluorescence verte à 504 nm. Quand on excite dans la bande d'absorption du neutre on voit majoritairement une fluorescence verte car le chromophore neutre excité perd très rapidement le proton du phénol et devient anionique.

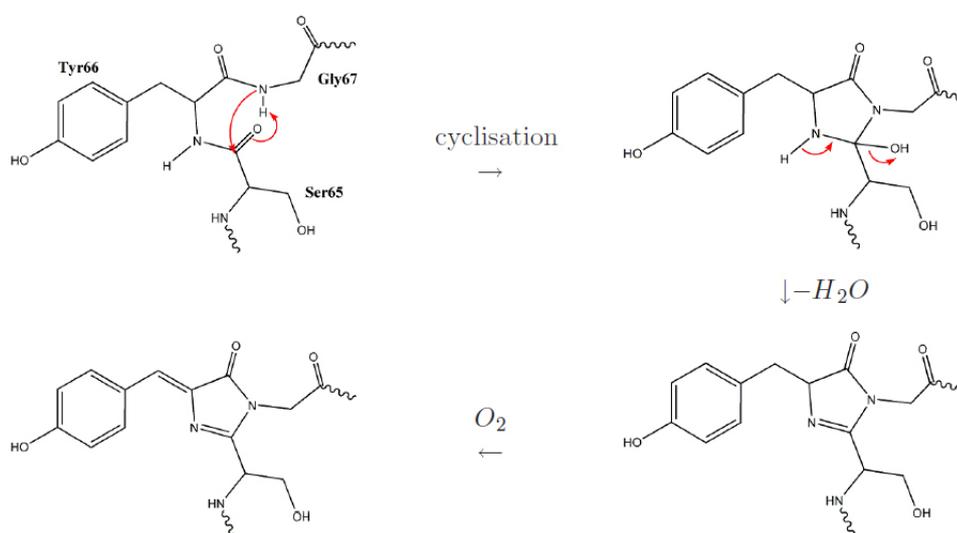


FIGURE 2.2 – Schéma du mécanisme de formation du chromophore de la famille GFP, proposé par Cubitt et al. [1].

Un grand nombre de mutants de la GFP "sauvage" ont été générés en laboratoire et d'autres ont été découverts dans d'autres organismes marins [49, 50, 51]. Ces variants émettent des

rayonnements de fluorescence qui couvrent tout le spectre visible. Le transfert résonant d'énergie de fluorescence (FRET) a été utilisé pour étudier les interactions protéine-protéine *in vivo* [52, 53, 54, 55]. Dans ce type d'expérience, deux protéines fluorescentes de couleurs différentes sont choisies de façon que le spectre d'émission de l'une (le donneur) ait un recouvrement avec le spectre d'absorption de l'autre (l'accepteur). La protéine fluorescente jaune (YFP) est d'un intérêt particulier, car son spectre est déplacé suffisamment pour le rendre facilement reconnaissable à partir du spectre de la protéine fluorescente cyan (CFP) dans les mesures de FRET [10, 54].

La YFP diffère de la GFP sauvage par 4 mutations. L'une concerne le chromophore : la sérine 65 est remplacée par une glycine (mutation S65G). Les autres portent sur des acides aminés proches du chromophore : la thréonine 203 est remplacée par une tyrosine (T203Y), la valine 68 par une leucine (V68L) et la sérine 72 par une alanine (S72A).

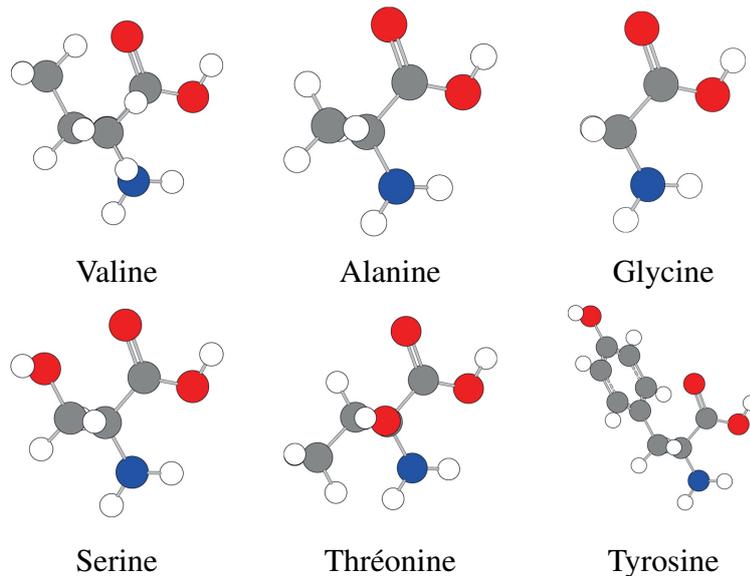


FIGURE 2.3 – Les acides aminés

Comme dans le cas de la GFP sauvage, il y a deux bandes dans le spectre d'absorption de la YFP à pH neutre, l'une à 392 nm correspond au chromophore neutre, l'autre à 514 nm correspond au chromophore anionique [26]. Quand on excite le chromophore dans la bande d'absorption de l'anion, il émet un rayonnement de fluorescence à 528 nm, décalé de 24 nm (0.1 eV) vers le jaune par rapport celui de la GFP sauvage. La structure cristallographique [26] montre que la tyrosine 203 est en situation de π -stacking avec le phénolate du chromophore. C'est cette interaction qui est la cause du déplacement de la fluorescence vers le jaune.

2.4 Désactivation non radiative dans les protéines fluorescentes

Le chromophore anionique excité émet de la lumière verte seulement si il est dans une géométrie à peu près plane. Mais la géométrie la plus stable dans l'état S_1 n'est pas la géométrie plane. De nombreux auteurs [56, 57, 5, 3, 58] ont montré par des calculs de chimie quantique que, dans le cas de la forme anionique, les deux géométries définies par ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$) (figure 2.4) ont une énergie plus basse que la géométrie plane, et que les barrières pour passer de la géométrie plane à ces géométries sont très basses. Dans ces géométries où le cycle Phénolate et Imidazolinone sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, l'écart énergétique entre S_1 et S_0 est petit ($\sim 0.5\text{eV}$) et une conversion interne peut ramener le système de l'état électronique S_1 à l'état S_0 par un couplage des niveaux vibrationnels. La fluorescence est éteinte dans les géométries perpendiculaires. A l'inverse la conversion interne n'est pas probable dans la géométrie plane car la différence d'énergie est grande ($\sim 3\text{ eV}$).

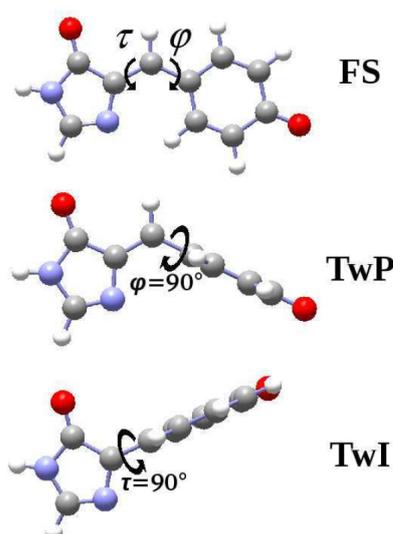


FIGURE 2.4 – Schéma du modèle du chromophore anionique de la GFP - p-hydroxybenzylidène-imidazolinone (HBI) - dans sa forme isomère cis, dans trois géométries différentes ; la géométrie plane (FS : fluorescent state) ($\tau = \varphi = 0^\circ$), la géométrie TwP ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et la géométrie TwI ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$).

Donc la durée de vie du chromophore à l'état excité S_1 dépend de deux processus : la désactivation radiative quand il est dans la géométrie plane et la désactivation non radiative quand il est dans une géométrie perpendiculaire.

Le chromophore isolé ou en solution à température ambiante n'est pratiquement pas fluorescent parce que les rotations vers une géométrie perpendiculaire sont très peu ou pas du tout gênées. Mais si il est en solution à très basse température, le mouvement de rotation est gêné et il peut fluorescer. Lorsqu'il est dans une protéine, les acides aminés autour de lui peuvent aussi l'empêcher de tourner, il reste alors dans sa géométrie plane, et il peut fluorescer.

Des calculs de dynamique moléculaire ont été effectués dans notre groupe, pour simuler la torsion du chromophore à l'état excité dans le cas du mutant S65T de la GFP et dans le cas de la YFP. Les résultats sont exposés dans la thèse de Gabriella Jonasson [4] et dans la référence [3]. Ils ont abouti à une évaluation du temps moyen pour obtenir cette torsion, noté τ_{nr} qu'on peut interpréter comme l'inverse de la constante de vitesse k_{nr} .

En utilisant les relations 2.2 2.1, on voit que :

$$\tau_{nr} = \tau/(1-\phi) \quad (2.3)$$

Si l'on connaît les valeurs expérimentales de ϕ et τ , on peut donc en déduire une valeur de τ_{nr} et la comparer à la valeur obtenue par simulations.

Dans le cas de la protéine GFP/S65T la valeur expérimentale est $\tau_{nr}(\text{exp})=8.3$ ns et la valeur obtenue par simulation est $8.6 \text{ ns} \pm 2.6 \text{ ns}$ donc en très bon accord.

Dans le cas de la YFP, les valeurs expérimentales sont $\tau = 3.68$ ns[59] et $\phi = 0.61$ [10]. La valeur expérimentale de τ_{nr} est donc 9.4 ns, et la valeur simulée est (3.5 ± 0.2) ns. On a donc un temps trop court, c'est à dire que les torsions vers les états perpendiculaires sont trop rapides.

Il peut y avoir plusieurs explications. On peut penser que le champ de force habituel utilisé dans la dynamique moléculaire (AMBER) ne décrit pas bien le π -stacking entre le phénolate du chromophore à l'état excité et le cycle phénol de la tyrosine voisine. De cette hypothèse vient la motivation de notre étude. Dans l'expression analytique du champ de force AMBER, il y a des termes de l'énergie d'interaction entre atomes liés et l'énergie d'interaction entre atomes non liés (interaction électrostatique et interaction de van der Waals). Or, les paramètres de van der Waals dépendent de la polarisabilité des systèmes en interaction. On s'attend donc à ce qu'il soient significativement différents dans un état fondamental et dans un état excité parce que la polarisabilité est d'habitude plus grande dans les états excités. L'idée est de modifier les termes des interactions non liées ou bien d'ajouter un ou plusieurs termes supplémentaires à cette expression en les ajustant sur les énergies d'interaction ab initio calculées par méthode de chimie quantique. Par ailleurs, la façon dont on évalue τ_{nr} à partir des simulations peut être améliorée. Nous avons pour cela utilisé un nouveau modèle de description du déclin de fluorescence élaboré par Bernard Lévy.

Chapitre 3

Etude de l'état excité de l'anion du chromophore de la YFP

Pour améliorer la description de la dynamique du chromophore à l'état excité de la YFP, nous cherchons à développer un nouveau champ de force décrivant les interactions entre le chromophore à l'état excité et le groupement phénol d'une tyrosine en π -stacking. Dans ce chapitre, nous allons décrire la stratégie adoptée pour obtenir au niveau quantique le premier état excité du chromophore et du système chromophore-phénol dans différentes géométries de π -stacking. Nous comparerons l'énergie de transition $S0 \rightarrow S1$ du système chromophore-phénol à la transition électronique observée expérimentalement dans la YFP.

3.1 Choix de la méthode de calcul

L'énergie d'un système s'écrit :

$$E = T + E_{NN} + E_{eN} + E_{ee} \quad (3.1)$$

avec T représentant l'énergie cinétique et E_{NN} , E_{eN} et E_{ee} représentant respectivement les énergies d'interaction entre les noyaux, noyaux-électrons et les électrons.

Dans l'approximation SCF, Le terme E_{ee} peut se décomposer en une partie coulombienne J et une partie définissant l'échange K et l'énergie électronique s'écrit :

$$E_{scf} = \sum_{i=occ} T_i + E_{eN} + \sum_{i \leq j} J_{ij} - K_{ij} \quad (3.2)$$

où :

$$\begin{aligned}
 i & : \text{ indice de spin orbitales } \phi_i(X_1) \\
 J_{ij} & = \int dX_1^3 dX_2^3 \frac{1}{r_{12}} \phi_i(X_1)^2 \phi_j(X_2)^2 \langle \sigma_i | \sigma_i \rangle \langle \sigma_j | \sigma_j \rangle \\
 K_{ij} & = \int dX_1^3 dX_2^3 \frac{1}{r_{12}} \phi_i(X_1) \phi_i(X_2) \phi_j(X_1) \phi_j(X_2) \langle \sigma_i | \sigma_j \rangle^2
 \end{aligned}$$

Dans cette approximation, il y a une compensation entre J_{ii} la « self energy » et K_{ii} l'intégrale d'échange mais on ne décrit pas toute la corrélation électronique.

Tandis que dans la méthode DFT l'énergie électronique est séparée en plusieurs parties : E_{eN} est calculée exactement, et le reste est calculé d'une façon approximative à l'aide de fonctionnelles de la densité.

L'énergie totale DFT s'écrit alors :

$$E_{DFT} = E_{Ne}(\rho) + T_S(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (3.3)$$

L'énergie DFT atteindra l'énergie exacte si et seulement si le terme E_{xc} (énergie d'échange et de corrélation) est calculé exactement. Tout le but des développements récents dans le cadre des méthodes de la Fonctionnelle de la Densité est donc de trouver au mieux cette partie d'échange-corrélation.

Il est difficile de trouver une expression qui soit à la fois opérationnelle et exacte, de plus il n'y a pas de compensation exacte entre la self energy et l'échange.

La méthode DFT permet aujourd'hui à l'aide de fonctionnelles adaptées et de termes de correction de dispersion de décrire concrètement les forces de dispersion et les interactions de π -stacking. Cependant, nous avons besoin de caractériser l'interaction entre les deux molécules conjuguées chromophore et phénol avec le chromophore dans le premier état excité. A terme, il sera sans doute nécessaire de considérer des géométries variées du chromophore c'est-à-dire plane mais aussi twistées autour des deux liaisons reliant le cycle phénolate et le cycle imidazolinone.

Pour ces raisons on a choisi de travailler avec une méthode CASSCF où la corrélation électronique est mieux décrite que dans la méthode SCF. L'inconvénient de cette approche tient au fait qu'elle est coûteuse en temps de calcul.

Calcul de chimie quantique « CASPT2 » du chromophore isolé

Dans notre groupe, la méthode de chimie quantique dite CASPT2 a déjà été utilisée [4], avec succès, pour construire une surface de potentiel du chromophore anionique de la GFP à l'état excité. Cette surface a été ensuite utilisée pour étudier l'extinction de la fluorescence due à une torsion autour des deux liaisons centrales du chromophore.

La matrice d'IC du calcul CASSCF comprend toutes les configurations possibles qui peuvent être générées par l'espace actif défini par m électrons et n orbitales : CAS(m,n). Une simple mi-

minimisation de l'énergie de l'état excité S_1 peut créer des problèmes de convergences dûs à une inversion entre l'énergie de l'état fondamental et l'état excité. Ce phénomène vient du fait que l'énergie de S_0 augmente quand on optimise les orbitales pour l'état excité S_1 . Afin d'éviter ce problème nous avons utilisé un calcul CASSCF moyenné sur deux états (SA2-CASSCF) où la moyenne des énergies est minimisée.

L'espace actif complet du chromophore contient 16 électrons et 14 orbitales π . Cet espace est très grand et son utilisation prendrait beaucoup de temps. Donc nous avons cherché à utiliser un espace réduit « minimal ».

Dans nos calculs, nous avons choisi de travailler avec un espace actif réduit CAS(4,3) et ce choix vient du fait que des études théoriques [60, 61] ont montré que la fonction d'onde électronique du chromophore anionique peut être décrite à l'aide de trois structures analogues à celles de l'anion allylique (figure 3.1).

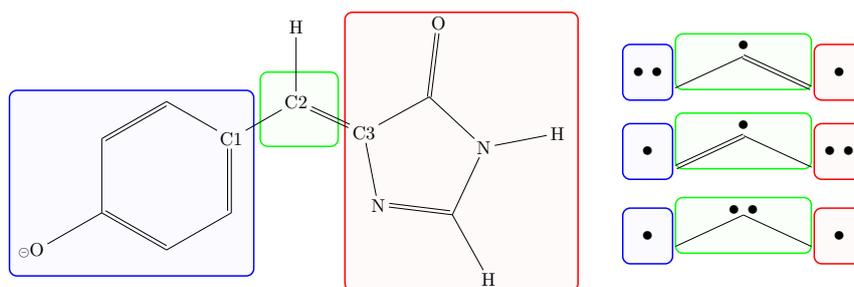


FIGURE 3.1 – A gauche : le chromophore anionique de la GFP avec les noms des trois atomes centraux affichés. A droite : trois structures mésomères d'un ion allylique. L'analogie avec le chromophore peut être faite si les deux carbones terminaux sont remplacés par les deux cycles du chromophore.

Cette description contient deux structures P et I présentant une double liaison soit sur la liaison C3-C2 soit sur la liaison C2-C1 et une troisième structure B avec deux électrons non appariés : un sur l'atome C1 et l'autre sur l'atome C3. Ce genre de structures mésomères peut être trouvé dans des systèmes avec trois orbitales et quatre électrons [62]. Sauf si une des liaisons est allongée, la troisième structure a un poids plus petit dans l'état fondamental et l'état excité que les structures P et I. Notre besoin pour décrire le premier état excité est d'utiliser 3 orbitales (HOMO-1, HOMO et LUMO)¹ et 4 électrons π (figure 3.2).

1. HOMO : l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée, HOMO-1 : l'orbitale moléculaire juste en dessous de la plus haute en énergie occupée, LUMO : l'orbitale la plus basse en énergie non occupée.

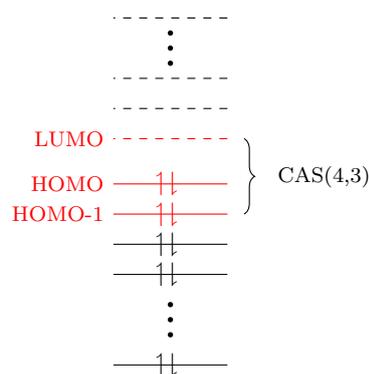


FIGURE 3.2 – Espace CAS

La première étape du calcul CASSCF c'est l'optimisation des orbitales, ce qui veut dire que dans les orbitales frontières on trouve des orbitales de type π du chromophore parce qu'elles sont les plus basses en énergie donc forcément on va avoir des transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ dans le chromophore (excitation locale).

Dans l'étude menée par Jonasson *et al.* [4], il a été montré que les résultats obtenus à l'aide d'un espace actif réduit sont en très bon accord avec les résultats obtenus avec un espace actif plus grand CASSCF(12,11)-PT2. Pour cela, ils ont effectué des calculs dans des géométries représentatives des minima TwP et TwI (figure 2.4) ainsi que les hauteurs du maximum HT et ils ont comparé leur résultats avec d'autres calculs CASPT2 faits dans un espace actif plus grand (tableau 3.1). Les calculs CASSCF/CASPT2 ont été effectués en utilisant les programmes MOLPRO [63].

	TwP	TwI	HT
SA2-CAS(4,3) ^a	-14.7	-18.9	-9.2
SA2-CAS(4,3) – PT2 ^a	-6.0	-9.7	4.8
SA2-CAS(12,11) ^b	-8.6	-11.3	0.1
SA2-CAS(12,11) – PT2 ^b	-7.2	-8.9	4.9

TABLE 3.1 – Energies (en kcal/mol) des géométries représentatives des minima de l'état S1 du chromophore anionique (HBI ou le dérivé diméthylrique HDBI selon la référence), pour chaque calcul, le zéro d'énergie est l'énergie de l'état S1 plan. a : Jonasson *et al.*[4] b : Martin *et al.*[5].

Nous avons calculé l'énergie de transition pour le chromophore isolé en utilisant la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 dans la base 6-31G*, nous avons obtenu une énergie de transition égale à 2.88 eV, qu'on peut comparer avec d'autres résultats théoriques.

CAS (n,m)	6-31G*	cc-pVDZ	cc-pVTZ
2,2	2.84	2.81	2.70
4,4	3.06	3.06	2.94
6,6	3.00	3.01	2.93
8,8	2.99	3.01	2.91
10,10	2.98	3.00	2.92
12,12	2.94	2.96	2.87
14,14	2.95	2.96	2.88

TABLE 3.2 – Energie d'excitation avec CASPT2 (eV) pour le chromophore anionique obtenue pour différents ensembles de base et CAS(n,m) avec n : nombre d'électrons et m : nombre d'orbitales

Dans le tableau 3.2 nous rapportons les principaux résultats des calculs CASPT2 obtenus dans l'étude de Filippi *et al.*[64] pour le chromophore présenté dans la figure 3.14a.

Ils ont effectué ces calculs avec différentes tailles de l'espace actif ainsi que différents ensembles de base, ils ont utilisé les ensembles de base cc-pVDZ et cc-pVTZ ainsi que 6-31G*. On remarque que la dépendance de l'énergie d'excitation CASPT2 sur la taille du CAS n'est pas très forte : si on compare les résultats obtenus avec la même base d'orbitales atomiques on voit une différence de l'ordre de 0.1 eV entre les calculs avec le plus haut niveau de calcul CAS(14,14) et le calcul avec le plus bas niveau. Les ensembles de base 6-31G* et cc-pVDZ donnent des énergies d'excitation comparables, mais en employant la base cc-pVTZ on abaisse de façon systématique l'excitation d'environ 0.1 eV. Ils ont aussi fait des calculs avec un autre modèle du chromophore avec des terminaisons CH_3 . (figure 3.14b) Ils ont trouvé une énergie égale à 2.92 eV avec un CAS(14,14) dans la base cc-pVDZ, ce qui fait un écart de 0.04 eV avec l'autre modèle. Cela ne surprend pas puisque les deux chromophores ne diffèrent que par la terminaison.

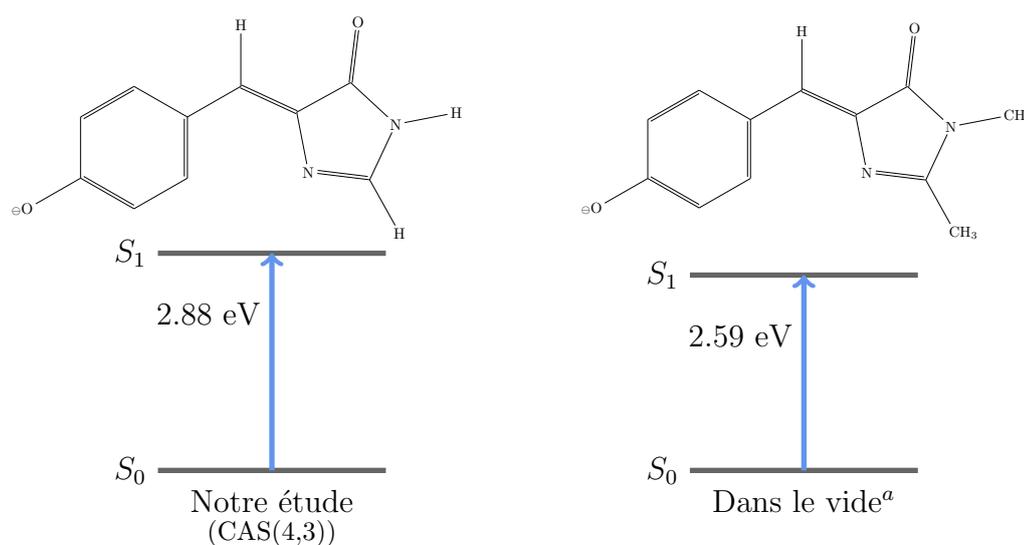


FIGURE 3.3 – Diagramme des énergies d'excitation. a : Nielsen *et al.*[2].

Par ailleurs, on connaît la valeur expérimentale de l'énergie d'excitation du chromophore

anionique avec des terminaisons CH_3 dans le vide [2] : elle vaut 2.59 eV. Notre résultat (pour le chromophore avec des terminaisons hydrogène) est 2.88 eV donc 0.29 eV trop haut. Le résultat de Filippi *et al* [64] avec le chromophore fermé par des CH_3 et le niveau CAS(14,14) est 2.92 eV et n'est pas en meilleur accord. (figure 3.3). Avec des méthodes de plus haut niveau il est possible de se rapprocher de la valeur expérimentale. Par exemple Olsen et Smith[58] ont obtenu la valeur 2.68 eV et Polyakov *et al*[56] ont obtenu 2.51 eV. Mais ces méthodes sont beaucoup trop lourdes pour notre travail car on doit faire des calculs pour le dimère chromophore-tyrosine et pour un très grand nombre de géométries. Donc nous avons choisi d'effectuer tous les calculs CASPT2 au niveau SA2-CAS(4,3)-PT2 avec deux bases : la base minimale 6-31G* et une base plus étendue contenant des fonctions diffuses 6-31+G* pour le système chromophore-phénol. On s'attend à ce que les résultats avec cette dernière base décrivent mieux le caractère anionique du système.

3.2 Analyse des simulations de dynamique moléculaire de la YFP

Dans ce paragraphe, nous allons chercher dans quelles géométries de l'ensemble chromophore-tyrosine nous allons effectuer les calculs de chimie quantique. Pour cela nous avons étudié le mouvement de la tyrosine 203 par rapport au chromophore dans une simulation de dynamique moléculaire de durée 12 ns de la YFP avec le chromophore à l'état fondamental, effectuée précédemment dans notre groupe [4]. Pour cette étude, on place un système d'axes (U_c, V_c, W_c) centré sur le phénolate du chromophore et un autre (U_t, V_t, W_t) centré sur le phénol de la tyrosine comme montré dans la figure 3.4 :

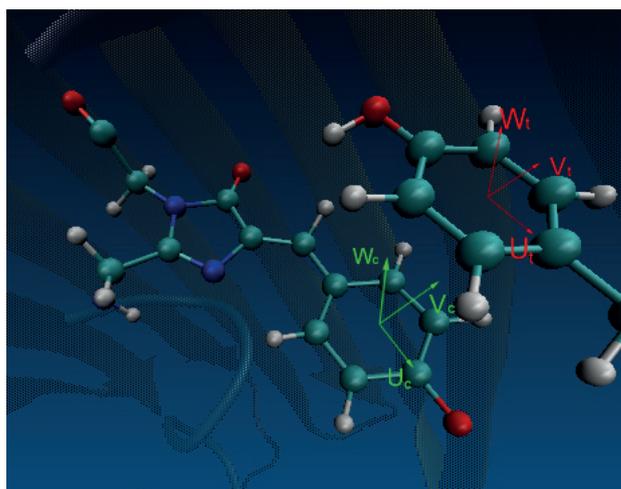


FIGURE 3.4 – Les systèmes d'axes (U_c, V_c, W_c) du chromophore et (U_t, V_t, W_t) de la tyrosine.

On distingue deux types de mouvements : la rotation et la translation.

3.2.1 Rotations

On a étudié deux types de rotation :

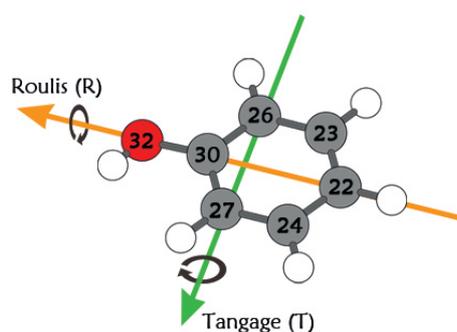


FIGURE 3.5 – Les axes du tangage et du roulis

- Le tangage représente la rotation de la tyrosine par rapport au chromophore autour de l'axe T qui relie les atomes C26 et C27 (voir figure3.5). Il est caractérisé par α qui est l'angle entre les deux axes U_t et U_c .
- Le roulis représente la rotation de la tyrosine par rapport au chromophore autour de l'axe R qui relie les atomes C22 et C30 (voir figure3.5). Il est caractérisé par α qui est l'angle entre les deux axes V_t et V_c .

Le mouvement général de rotation est une combinaison de ces deux mouvements et d'un troisième qui est la rotation de la tyrosine autour de l'axe perpendiculaire à son plan.

Le tangage et le roulis sont présentés dans les histogrammes suivant :

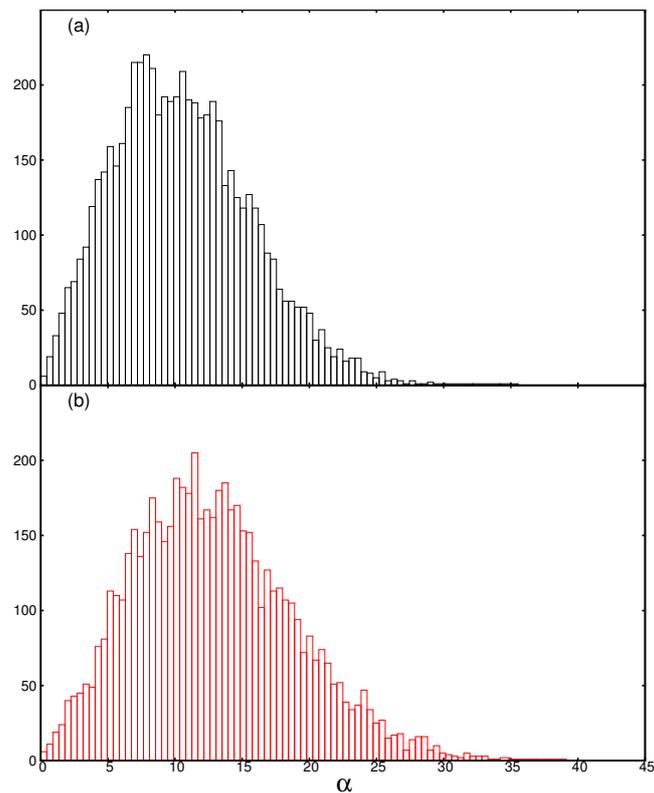


FIGURE 3.6 – Histogramme de l’angle de tangage (a) et de l’angle de roulis (b).

La figure 3.6a représente α l’angle de rotation autour de l’axe de tangage (T) en valeur absolue, on remarque que cette rotation est aux alentours de 12° et qu’elle ne dépasse les 24° .

La figure 3.6b représente α l’angle de rotation autour de l’axe de roulis (R) en valeur absolue, on remarque aussi que pour le roulis elle est aux alentours de 12° et ne dépasse les 30° .

Les deux rotations (tangage et roulis) sont assez faibles par rapport à une rotation de 90° , et nous n’avons pas pris en compte ces mouvements. Nous ne considérerons que les mouvements de translation suivant X, Y et Z.

3.2.2 Translations

Chaque translation suivant un axe est définie par la projection du vecteur qui relie les deux origines des axes dans le système d’axes XYZ (figure 3.7) :

- Projection sur U_c : translation suivant X.
- Projection sur V_c : translation suivant Y.
- Projection sur W_c : translation suivant Z.

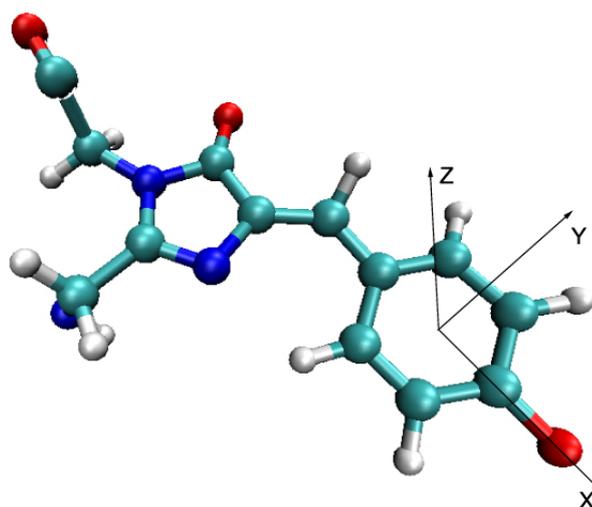


FIGURE 3.7 – Système d'axes XYZ

Dans la simulation de dynamique moléculaire les géométries ont été écrites sur un fichier toutes les 2 ps, nous avons donc 6000 géométries du dimère chromophore-tyrosine. Nous avons calculé les valeurs des translations suivant X, Y et Z pour toutes ces géométries, elles sont présentées dans les histogrammes des figures 3.8, 3.9 et 3.10 respectivement :

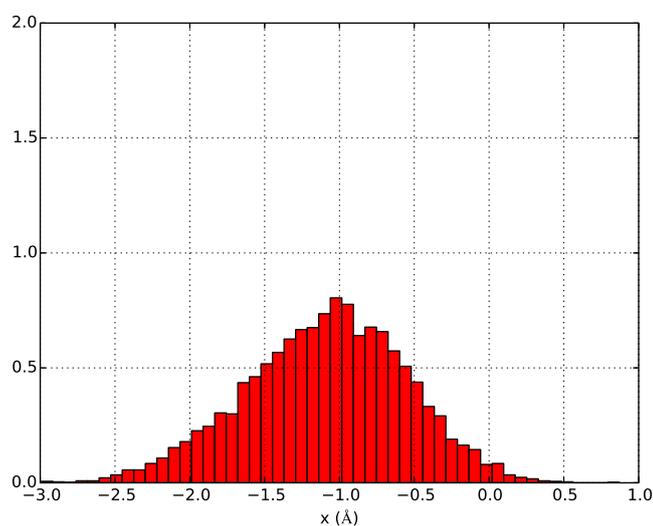


FIGURE 3.8 – Histogramme des translations suivant X

La figure 3.8 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe X. On remarque une bande large entre -2.5 et 0 Å. La valeur moyenne vaut -1.1 Å et l'écart type 0.5 Å

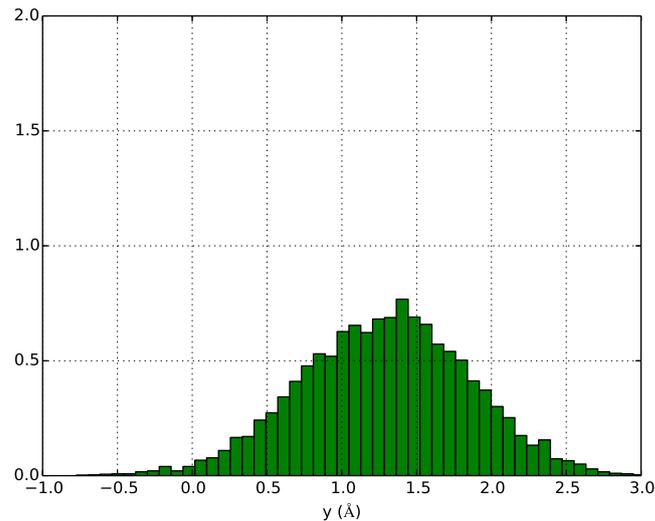


FIGURE 3.9 – Histogramme des translations suivant Y

La figure 3.9 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe Y. On remarque une bande large entre 0.5 et 2.5 Å. La valeur moyenne vaut 1.3 Å et l'écart type est le même que pour la translation suivant X : 0.5 Å ;

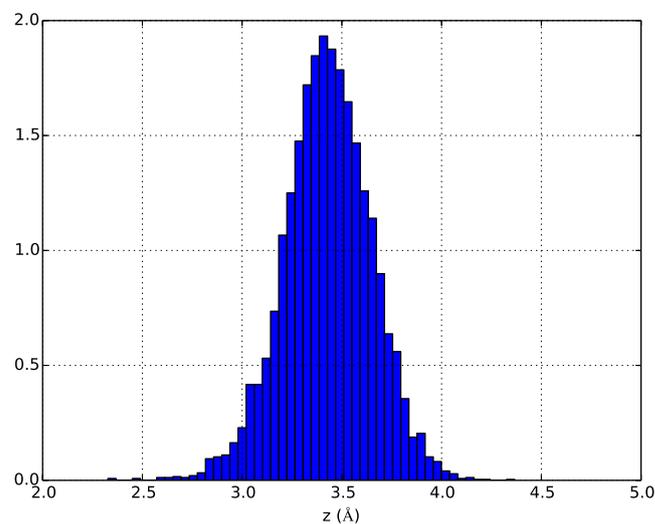


FIGURE 3.10 – Histogramme des translations suivant Z

La figure 3.10 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe Z. Elle présente un pic entre 3 Å et 3.8 Å, beaucoup plus étroit que pour X et Y. La valeur moyenne vaut 3.5 Å et l'écart-type 0.2 Å. Ceci signifie que la distance séparant les plans des deux molécules (phénolate du

chromophore et la tyrosine) ne varie pas beaucoup au cours de la simulation, contrairement aux deux autres translations (X, Y).

On peut conclure que la position la plus favorable suivant Z se situe dans un domaine restreint compris entre 3 et 3.8 Å. On peut localiser la géométrie moyenne de la tyrosine par rapport au chromophore, elle est caractérisé par $x = -1.1$ Å, $y = 1.3$ Å et $z = 3.4$ Å.

Dans la structure cristallographique de la YFP[26], qui est le point de départ de la simulation, ces grandeurs valent $x=-0.8$ Å, $y=0.2$ Å et $Z=3.6$ Å. Ces valeurs de x et z sont donc très proches des valeurs moyennes dans la simulation, mais celle de y ne l'est pas : y moyen vaut 1.3 Å dans la simulation et 0.2 Å dans la structure cristallographique. Quand on regarde plus en détail les résultats de la simulation, on voit que le groupement OH de la tyrosine fait une liaison hydrogène avec le groupement NH₂ d'une glutamine (Gln69) qui se trouve du côté des y positifs. Dans la structure cristallographique cette liaison hydrogène n'existe pas. Quand elle se forme dans la dynamique cela déplace un peu la tyrosine vers la glutamine c'est à dire dans les sens y positif.

On peut aussi déterminer les dimensions de la grille qui sera plus large suivant X et Y.

3.2.3 Dimension de la grille de points

Les résultats que nous avons obtenu, nous amènent à définir les domaines de la grille X comme l'intervalle compris entre la valeur moyenne moins l'écart type, et la valeur moyenne plus l'écart type : cela donne $X \in [-1.6, -0.6]$ Å. De la même façon l'intervalle pour Y serait : $Y \in [0.8, 1.8]$ Å et pour Z : $Z \in [3.3, 3.7]$ Å. Afin de bien décrire la surface de l'énergie d'interactions, on a pris des domaines plus larges que ceux visités en dynamique moléculaire. Lorsque nous considérons la base 6-31G*, X et Y seront compris entre -12 et +12 Å avec un pas de 2.0 Å, et Z ne va prendre que 5 valeurs 3.3, 3.5, 3.8, 4.5 et 5.5 Å. Pour la base 6-31+G*, le domaine de X sera compris entre -3.0 et +1.0 avec un pas de 0.5 Å ; le domaine de Y sera compris entre -2.5 et +2.5 avec un pas de 0.5 Å, Z va prendre les 5 valeurs 2.8, 3.0, 3.3, 3.6 et 3.9 Å. Pour les calculs dans la base 6-31+G* nous avons pris une grille moins étendue, mais avec un pas plus serré, pour X et Y, et des valeurs plus petites pour Z, parce que nous nous sommes rendus compte que l'essentiel de l'interaction (avec la base minimale) se produit essentiellement dans cette région.

Dans la figure 3.11, nous donnons les points calculés ainsi que les dimensions de la grille suivant les axes X et Y pour une valeur donnée de Z :

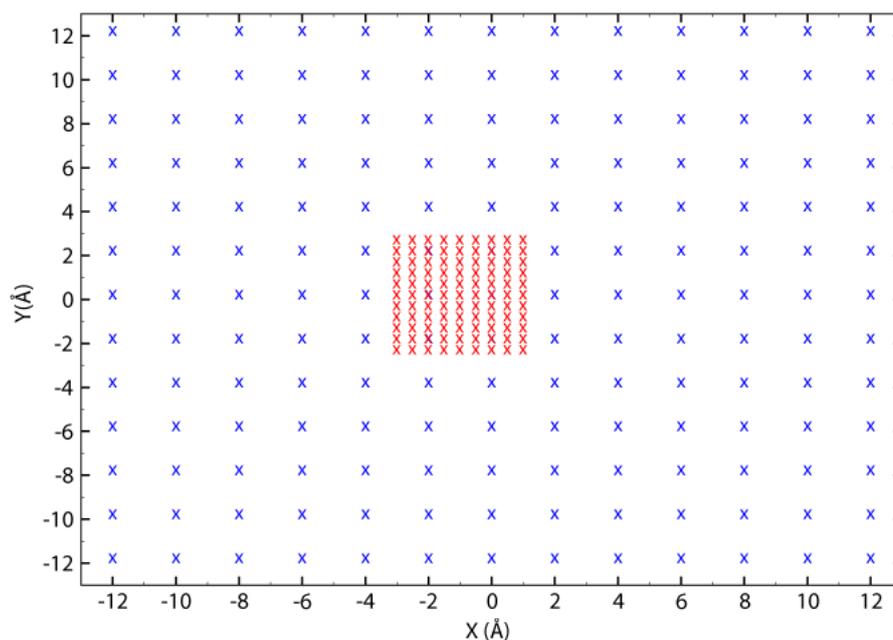


FIGURE 3.11 – Les points de la grille suivant X et Y (Bleu : base 6-31G*, Rouge : base 6-31+G*).

3.3 Energie de transition du système chromophore-phénol

Nous avons calculé l'énergie de transition entre l'état fondamental du chromophore et son état excité dans le système chromophore-tyrosine aux différents points de la grille définie ci-dessus. La tyrosine est en fait représentée seulement par son cycle phénol.

Les calculs ont été effectués en gardant les géométries d'équilibre des deux molécules séparées, en utilisant la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 décrite au début du chapitre, avec les deux bases 6-31G* et 6-31+G*.

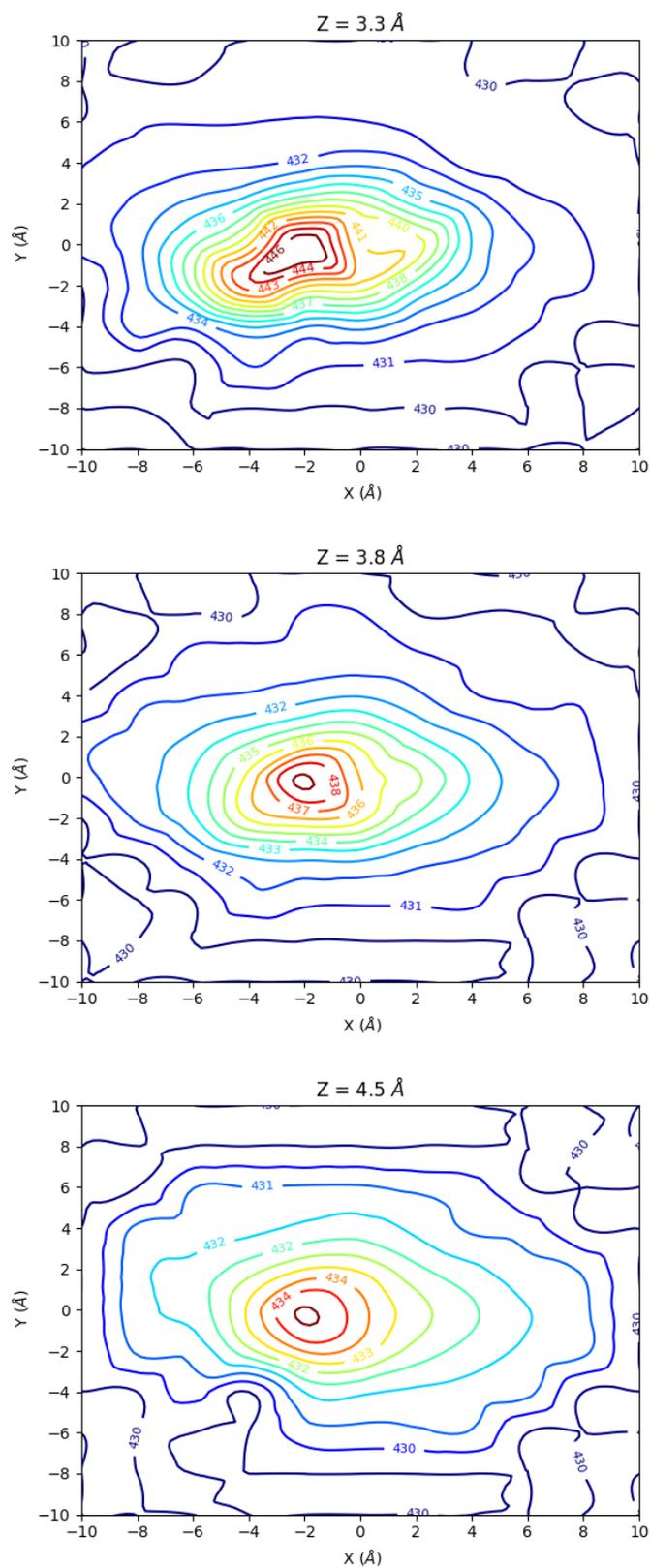


FIGURE 3.12 – Energie de transition exprimée en longueur d'onde (nm) pour différentes valeurs de Z avec la base 6-31G*.

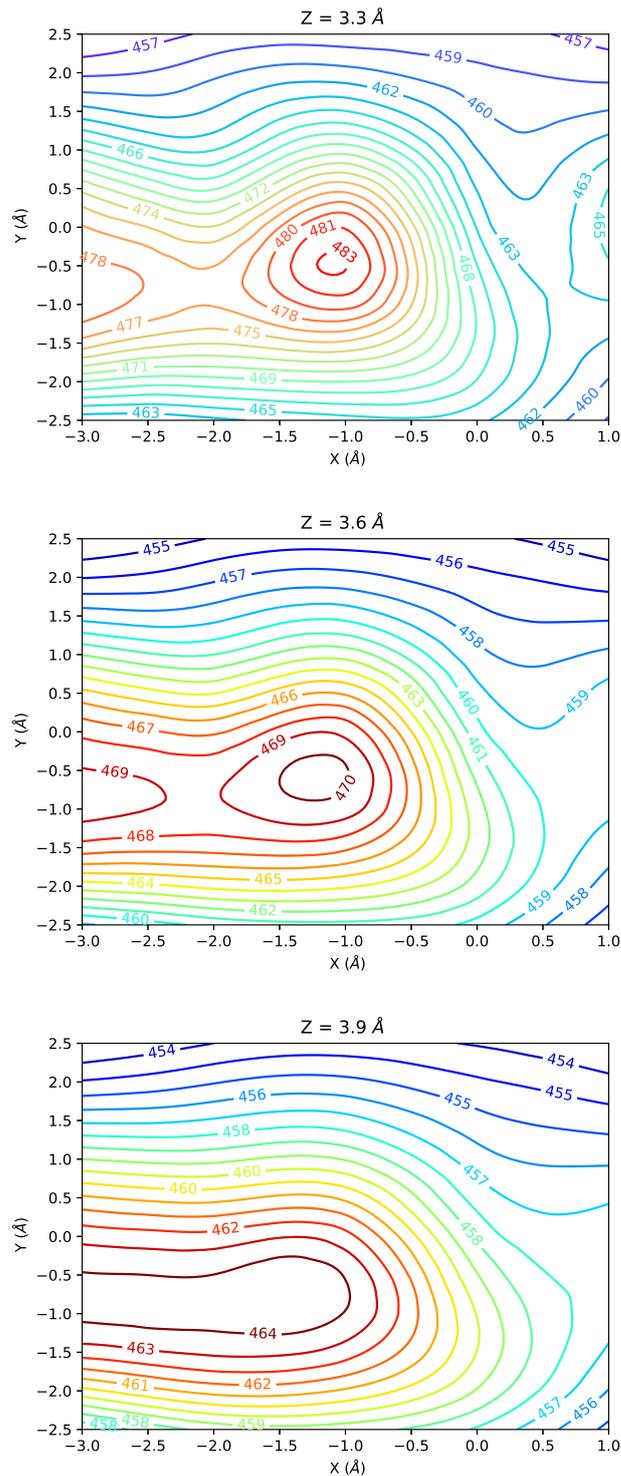


FIGURE 3.13 – Energie de transition exprimée en longueur d'onde pour différentes distances de Z avec la base 6-31+G*.

Les figures 3.12 et 3.13 représentent les surfaces d'énergie de transition (exprimée par la longueur d'onde correspondante) en fonction des déplacements de la tyrosine par rapport au chromophore anionique (X , Y , Z). Lorsque nous considérons la base 6-31G*, les valeurs des longueurs d'onde se situent entre 430 nm et 450 nm. La plus grande longueur d'onde d'excitation 450 nm (équivalente à une énergie de 2.75 eV) correspond à la géométrie ($x = -1 \text{ \AA}$, $y = 0$

Å, $z = 3.3\text{Å}$). Pour le chromophore anionique seul (figure 3.14a) nous avons obtenu la valeur 430 nm (2.88 eV).

Concernant les résultats obtenus avec la base étendue 6-31+G*, les valeurs des longueurs d'onde se situent entre 450 nm et 480 nm, la plus grande longueur d'onde d'excitation dans la géométrie d'équilibre correspond à 468 nm (équivalente à une énergie de 2.65 eV).

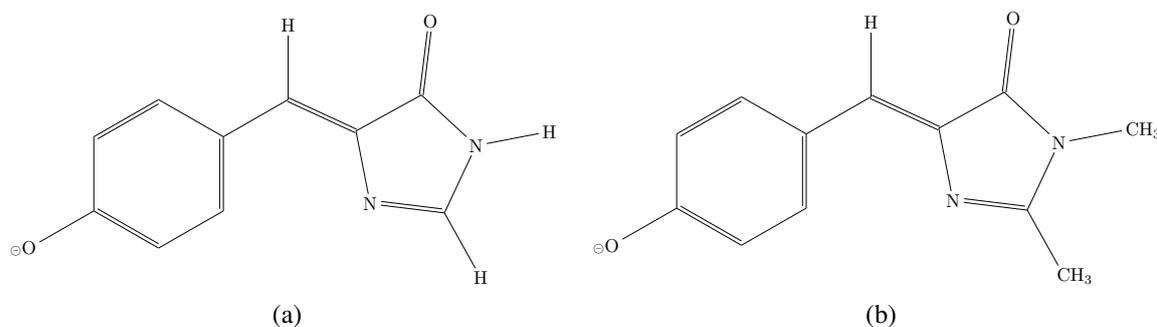


FIGURE 3.14 – Le chromophore dans sa forme anionique, (a) : terminaison avec deux hydrogènes, (b) : terminaison avec deux groupes méthyle

L'expérience montre (Cf 2.3 page 20) [10], que le chromophore anionique dans la GFP sauvage où il n'y a pas de π stacking avec une tyrosine, absorbe à 489 nm, alors que dans la YFP, il absorbe à 514 nm, il y a donc un décalage de 25 nm. Nos calculs avec la base 6-31G* montrent un décalage compris entre 0 nm et 20 nm suivant la position de la tyrosine par rapport au chromophore. Ce décalage, lorsque nous utilisons la base étendue 6-31+G*, augmente et est compris entre 0 et 31 nm. On remarque que dans la géométrie d'équilibre, le décalage est de 21 nm et est très proche de la valeur expérimentale de 25 nm. Il est obtenu pour la géométrie d'équilibre $x = -1\text{ Å}$, $y = 0.5\text{ Å}$, $z = 3.6\text{ Å}$, cette géométrie est très proche de celle qu'on observe dans la structure cristallographique ($x=-0.8\text{ Å}$, $y=0.2\text{ Å}$ et $Z=3.6\text{ Å}$). Notre méthode de calcul donne des résultats en bon accord avec l'expérience.

En conclusion, après avoir identifié les géométries représentatives dans la protéine, la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 nous permet de calculer l'énergie de transition électronique en fonction des positions relatives du chromophore et du phénol et donc de l'importance du π -stacking.

Chapitre 4

Etude des énergie d'interactions

Dans ce chapitre, nous allons présenter les énergies d'interactions entre le chromophore dans son état fondamental ou son premier état excité et un phénol, obtenues soit en utilisant une méthode de chimie quantique (CASPT2) soit en utilisant un champ de forces. Puis nous comparerons les deux résultats.

4.1 L'énergie d'interactions CASPT2

L'énergie d'interactions est calculée comme la différence entre l'énergie du système chromophore + tyrosine et les énergies calculées séparément du chromophore et de la tyrosine. Ainsi, une attraction prend des valeurs négatives alors qu' une interactions répulsive prend des valeurs positives.

Les énergies d'interactions ΔE pour chaque point sont calculées dans les deux bases : 6-31G* et 6-31+G*, corrigées par la "Counterpoise corrections" (erreur de superposition des bases BSSE) à l'aide du package MOLPRO 2010 [63], comme suit :

$$\Delta E = E(Cro + Tyr)_{CT} - E(Cro)_{CT} - E(Tyr)_{CT} \quad (4.1)$$

Où :

- La base du système chromophore + tyrosine est notée CT
- $E(Cro + Tyr)_{CT}$ l'énergie globale du système dans sa base CT.
- $E(Cro)_{CT}$ l'énergie du chromophore anionique dans la base CT.
- $E(Tyr)_{CT}$ l'énergie de la tyrosine dans la base CT.

Nous avons calculé ΔE pour tous les points de la grille telle qu'elle a été définie dans le chapitre 3, en donnant les positions relatives du chromophore et de la tyrosine représentée par son cycle phénol . Nous donnons ci-dessous les résultats sous forme de grille d'énergie d'interactions en fonction des positions x et y des 2 molécules et pour une altitude z donnée.

4.1.1 Avec la base 6-31G*

interactions entre le chromophore à l'état fondamental et un phénol

La figure 4.1 représente la grille des énergies d'interactions calculées avec la méthode CASPT2 pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interactions la plus attractive ($-4 \leq \Delta E (\text{kcal/mol}) \leq -1$) est située dans la région où $2 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$, alors que la région la plus répulsive ($0 \leq \Delta E (\text{kcal/mol}) \leq 5$) est à peu près symétrique à la précédente. Il existe deux minima dans cette grille, obtenus pour $y = 4 \text{ \AA}$, $x = -2 \text{ \AA}$ et $y = 4 \text{ \AA}$, $x = 4 \text{ \AA}$, l'énergie y est de l'ordre de -3.06 et -2.96 kcal/mol respectivement. Ces deux minima se trouvent dans des géométries où la tyrosine est décalée par rapport au cycle phénol du chromophore (figure 4.11) vers des valeurs de y positives.

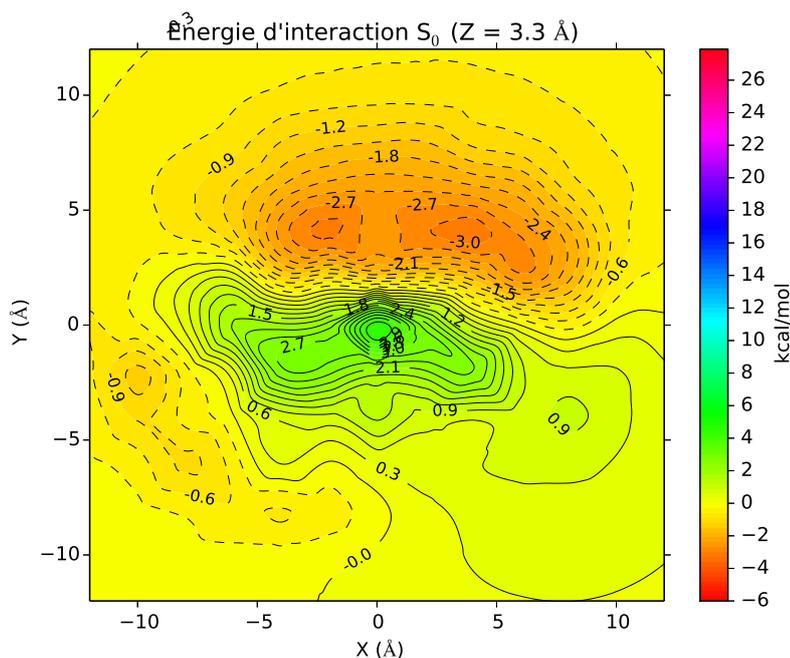


FIGURE 4.1 – Énergie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31G*.

Les grilles des énergies d'interactions pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$, 3.8 \AA , 4.5 \AA et 5.5 \AA sont montrées dans les figures 4.2 à 4.5.

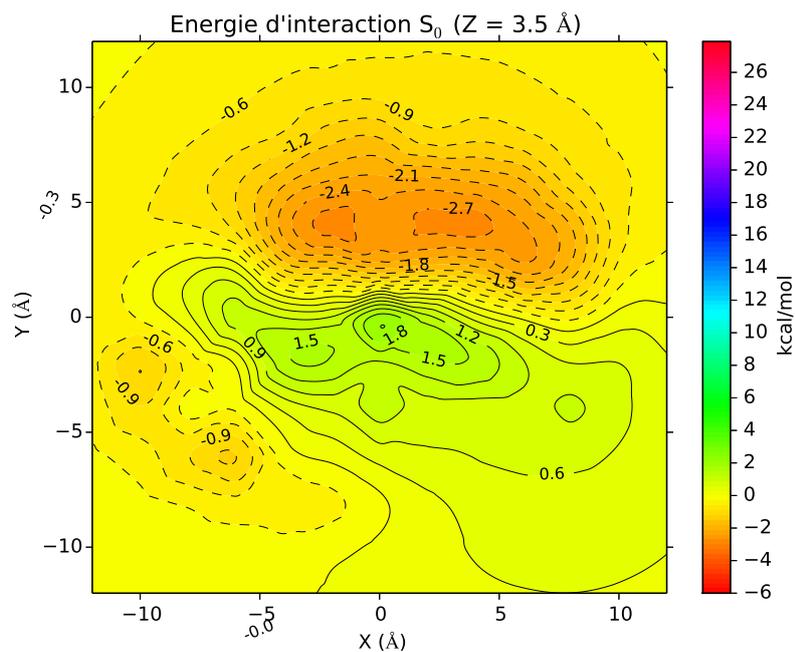


FIGURE 4.2 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

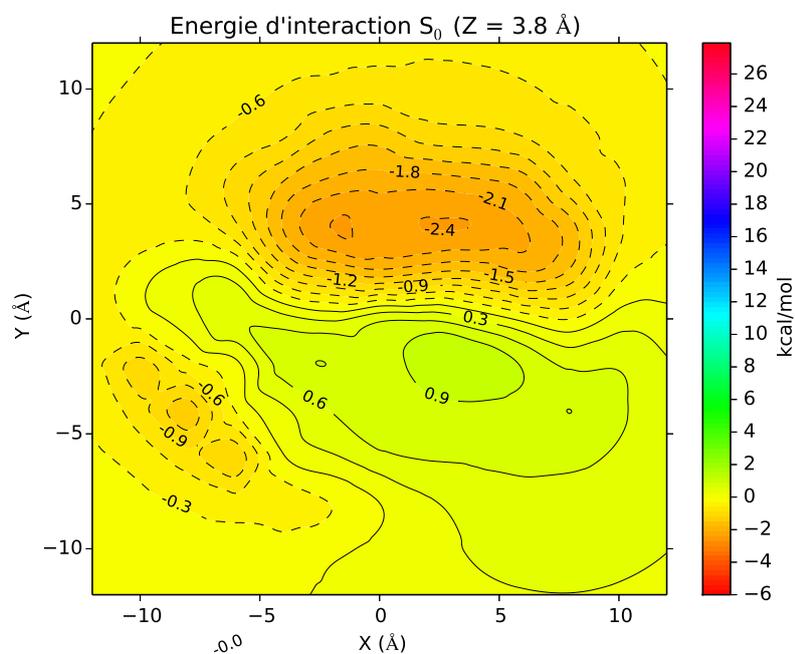


FIGURE 4.3 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

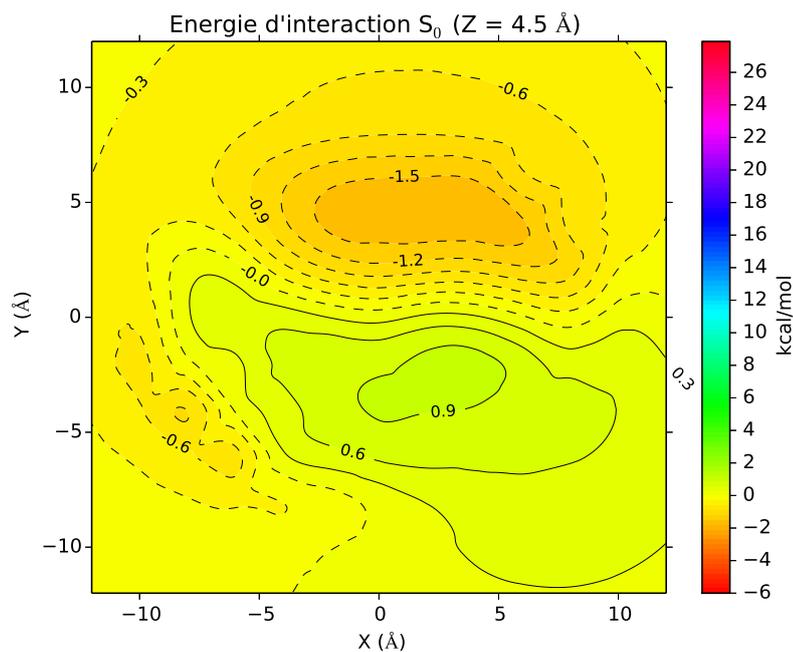


FIGURE 4.4 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31G*.

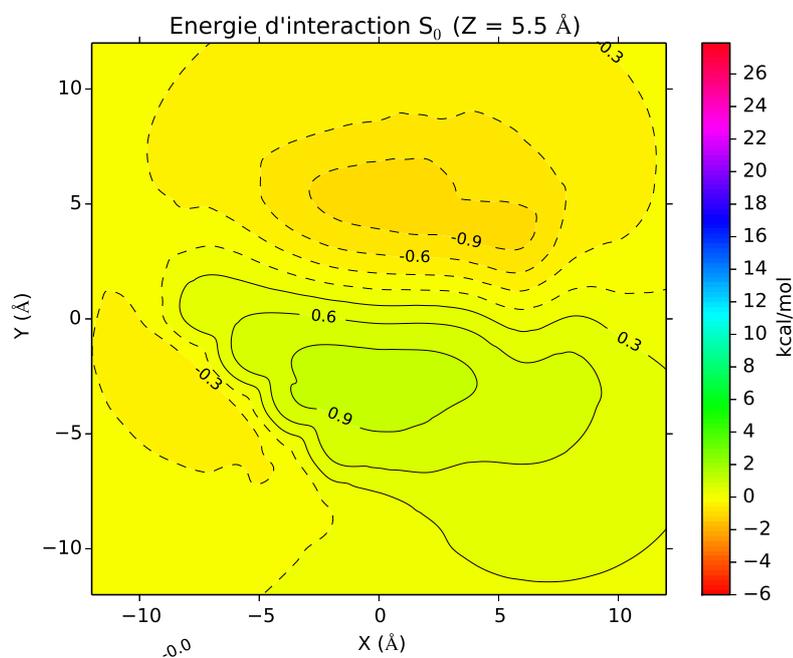


FIGURE 4.5 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31G*.

On voit que pour toutes les valeurs de z étudiées, la géométrie dans laquelle l'interactions entre le chromophore et la tyrosine est la plus favorable correspond à des positions décalées en x et en y positif, les positions précises des minima sont données dans le tableau 4.1.

interactions entre le chromophore dans l'état S1 et un phénol

La figure 4.6 représente la grille des énergies d'interactions calculées avec la méthode CASPT2 pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interactions la plus attractive ($-4 \leq \Delta E (\text{kcal/mol}) \leq -1$) est située dans la région où $2 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$, alors que la région répulsive (en vert dans la même figure) se trouve pour x positif et y négatif. Il existe deux minima dans cette grille, obtenus pour $y = 4 \text{ \AA}$, $x = -2 \text{ \AA}$ et $y = 4 \text{ \AA}$, $x = 4 \text{ \AA}$, et l'énergie y est de l'ordre de -3.31 et -3.20 kcal/mol respectivement.

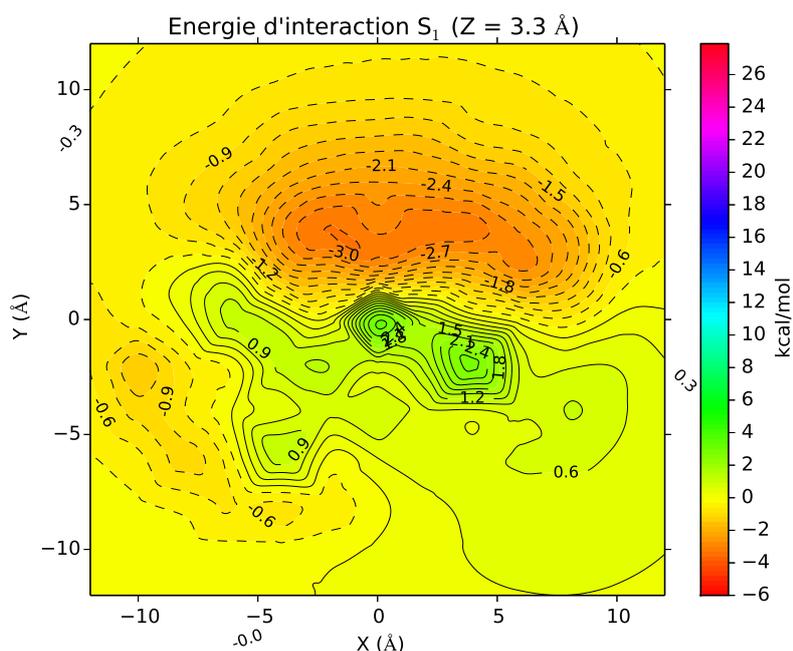


FIGURE 4.6 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31G*.

Les grilles correspondantes aux autres valeurs de z sont données dans les figures 4.7 à 4.10

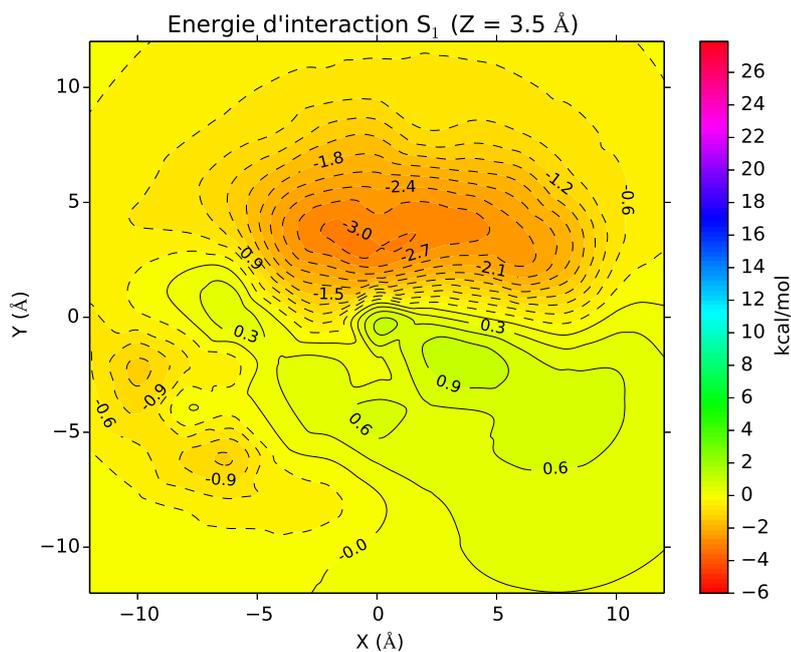


FIGURE 4.7 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

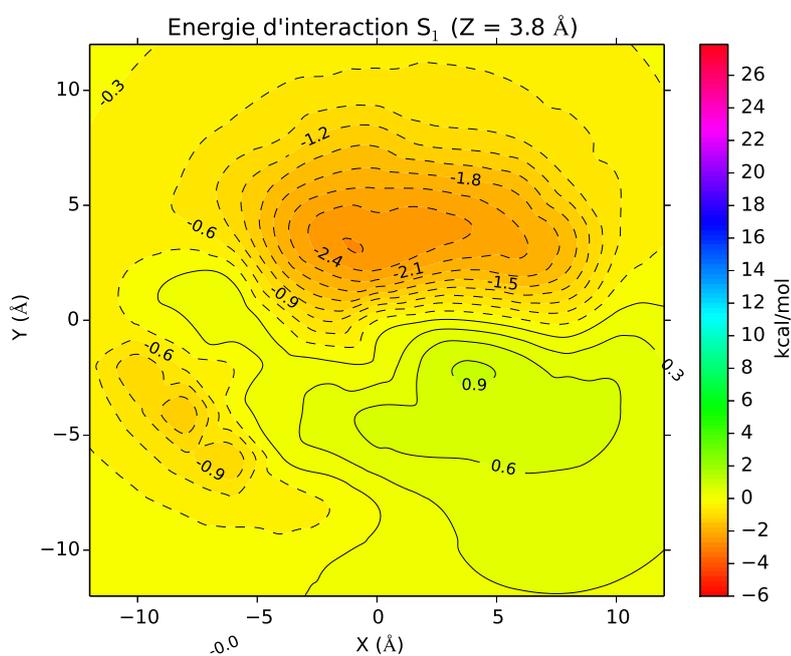


FIGURE 4.8 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

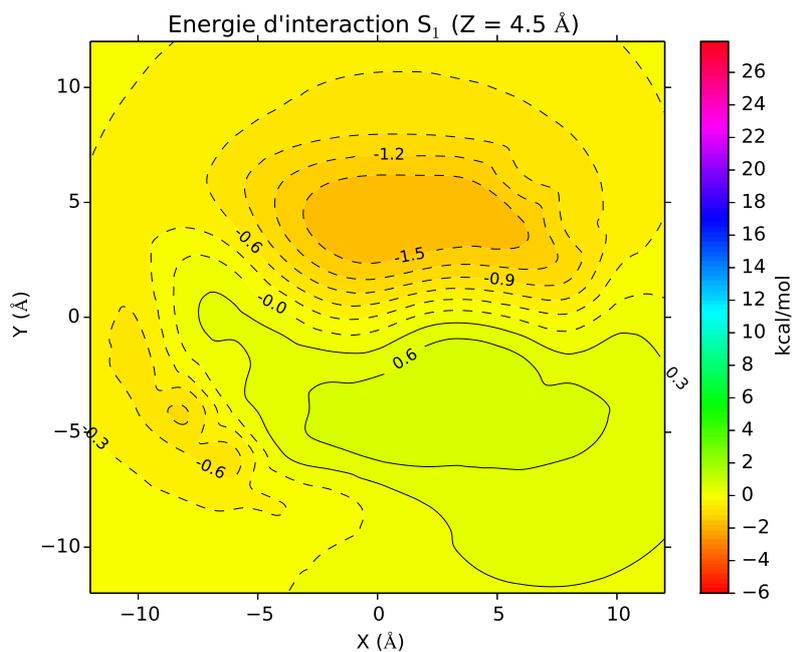


FIGURE 4.9 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

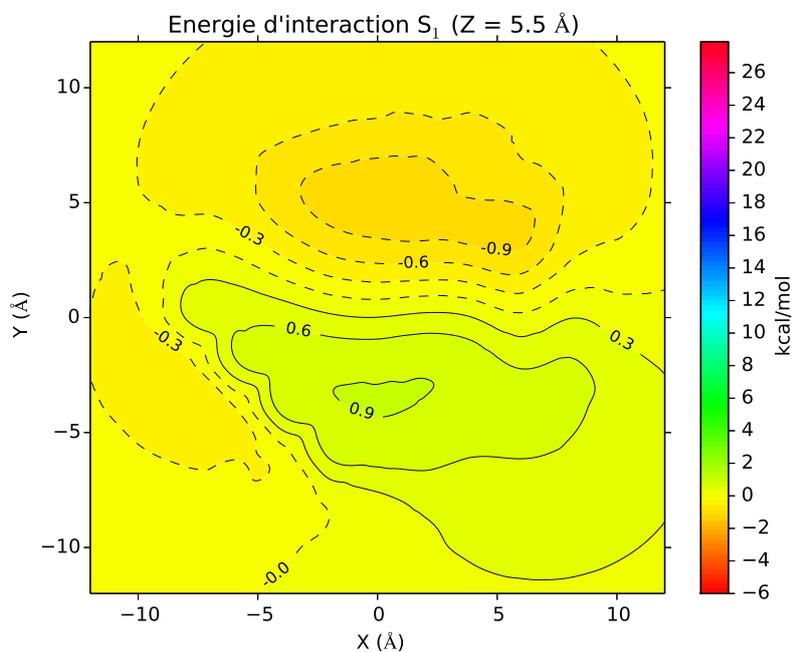


FIGURE 4.10 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

Les géométries les plus stables sont données dans le tableau 4.1.

Les géométries d'équilibre chromophore + phénol

D'après les résultats précédents, on peut établir un bilan des énergies minimales avec leurs géométries, qui est présenté dans le Tableau 4.1.

Z (Å)	Fondamental		Excité	
	(x,y)(Å)	$\Delta E_{min}(kcal/mol)$	(x,y)(Å)	$\Delta E_{min}(kcal/mol)$
3.3	-2.0 , 4.0	-3.06	-2.0 , 4.0	-3.31
	4.0 , 4.0	-2.96	2.0 , 4.0	-3.20
3.5	-2.0 , 4.0	-2.81	-2.0 , 4.0	-3.03
3.8	-2.0 , 4.0	-2.40	-2.0 , 4.0	-2.59
	0.0 , 4.0	-2.30	0.0 , 4.0	-2.55
	2.0 , 4.0	-2.41	2.0 , 4.0	-2.56
4.5	-2.0 , 4.0	-1.57	-2.0 , 4.0	-1.69
	0.0 , 4.0	-1.63	0.0 , 4.0	-1.78
	2.0 , 4.0	-1.66	2.0 , 4.0	-1.76
5.5	0.0 , 6.0	-1.05	-2.0 , 6.0	-0.99
	2.0 , 6.0	-1.08	0.0 , 6.0	-1.08
	4.0 , 4.0	-1.01	2.0 , 6.0	-1.10

TABLE 4.1 – Bilan des énergies minimales par rapport à x et y, z étant fixé, du système chromophore (à l'état fondamental ou excité) + phénol. Calcul CASPT2 , base 6-31G*.

Dans ce tableau on voit que les valeurs de x et y où les interactions sont les plus favorables diffèrent très peu suivant que le chromophore est à l'état fondamental ou à l'état excité. On voit aussi qu'elles varient peu suivant les valeurs de z. On remarque que la géométrie reste approximativement dans la même région c'est-à-dire $x = -2 \text{ \AA}$ et $y = 4 \text{ \AA}$. Elle est représentée dans la figure 4.11. On voit que le cycle phénol de la tyrosine est complètement décalé par rapport au phénolate du chromophore.

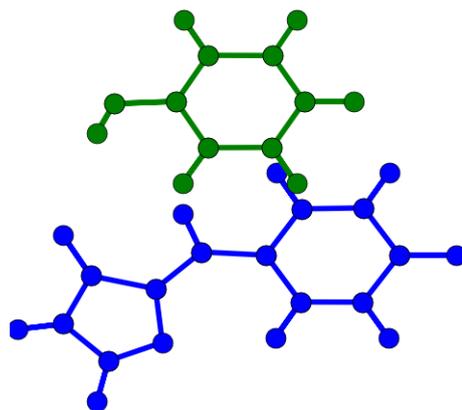


FIGURE 4.11 – Géométrie d'équilibre d'énergie minimale

On note que les énergies d'interactions minimales sont plus négatives donc plus favorables à l'état excité qu'à l'état fondamental. Ceci provient certainement de la plus forte extension et de la polarisation du nuage électronique à l'état excité. Cette caractéristique pourrait avoir une influence sur la dynamique du chromophore à l'état excité en favorisant la géométrie plane fluorescente.

4.1.2 Avec la base étendue 6-31+G*

interactions entre le chromophore à l'état fondamental et un phénol

La figure 4.12 représente la grille des énergies d'interactions calculées avec la méthode CASPT2 pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 2.8 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que les énergies d'interactions attractives se trouvent dans des géométrie très décalées par rapport à X et Y ($x = -3.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.5 \text{ \AA}$) alors que l'interactions répulsive est dominante dans cette grille. Ceci est due à la répulsion entre les deux cycles qui sont trop proches ; et le maximum correspond à un recouvrement total entre la tyrosine et le chromophore, et l'énergie d'interactions est de l'ordre de 24.6 kcal/mol . Alors que pour les géométries correspondantes à $Z = 3.3 \text{ \AA}$ et $Z = 3.6 \text{ \AA}$ (figures 4.19 et 4.20 respectivement), on constate que l'interactions attractive est dominante dans la grille choisie et le minimum se trouve dans la géométrie $x = 0.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.0 \text{ \AA}$ (figure 4.22) cette géométrie correspond a celle obtenue avec le potentiel du champ de forces (Cf 4.2.2 page 55).

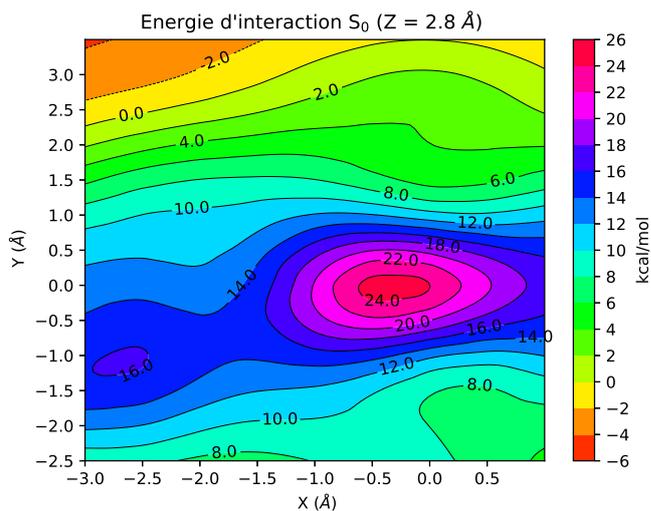


FIGURE 4.12 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 2.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31+G*.

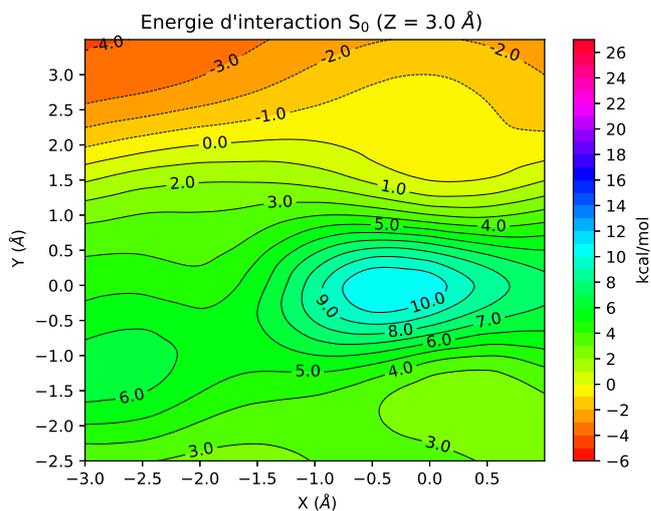


FIGURE 4.13 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.0 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31+G*.

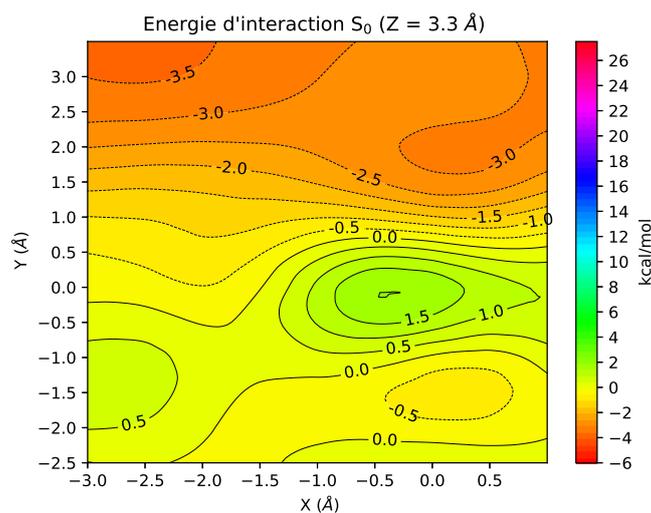


FIGURE 4.14 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

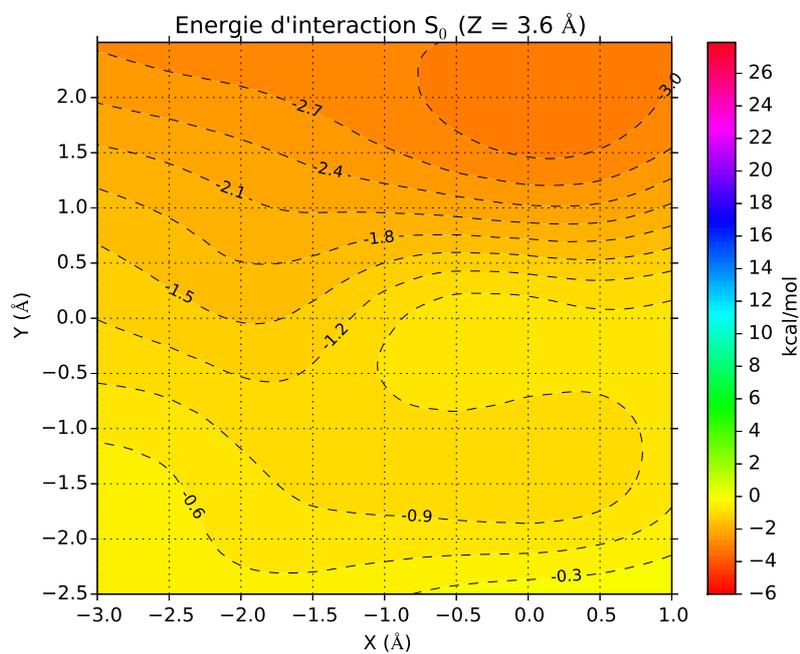


FIGURE 4.15 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.6 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

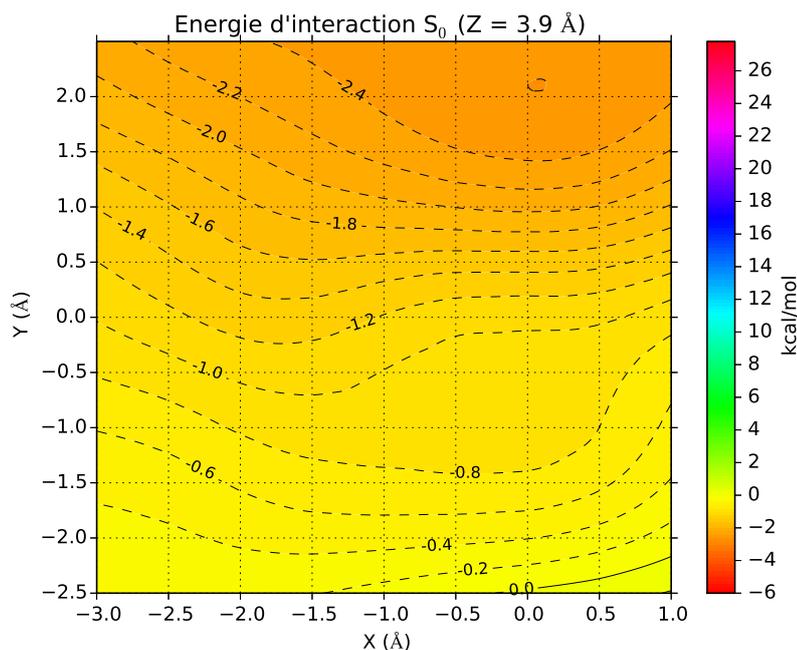


FIGURE 4.16 – Energie d'interactions à l'état fondamental pour $Z = 3.9 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2, base 6-31+G*.

interactions entre le chromophore dans l'état S1 et un phénol

On remarque que lorsque $Z = 2.8 \text{ \AA}$ (figure 4.17), les énergies d'interactions attractives se trouvent dans des géométries très décalées par rapport à X et Y ($x = -3.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.5 \text{ \AA}$) alors que l'interaction répulsive est dominante dans cette grille. Ceci est dû à la répulsion entre les deux cycles qui sont trop proches ; et le maximum correspond à un recouvrement total entre la tyrosine et le chromophore, et l'énergie d'interactions est de l'ordre de 20.6 kcal/mol . Alors que pour les géométries correspondantes à $Z = 3.3 \text{ \AA}$ et $Z = 3.6 \text{ \AA}$ (figures 4.19, 4.20 respectivement), on constate que l'interaction attractive est dominante dans la grille choisie et le minimum se trouve dans la géométrie $x = -0.5 \text{ \AA}$ et $y = 1.5 \text{ \AA}$ (figure 4.22) cette géométrie correspond à celle obtenue avec le potentiel du champ de forces (Cf 4.2.2 page 55).

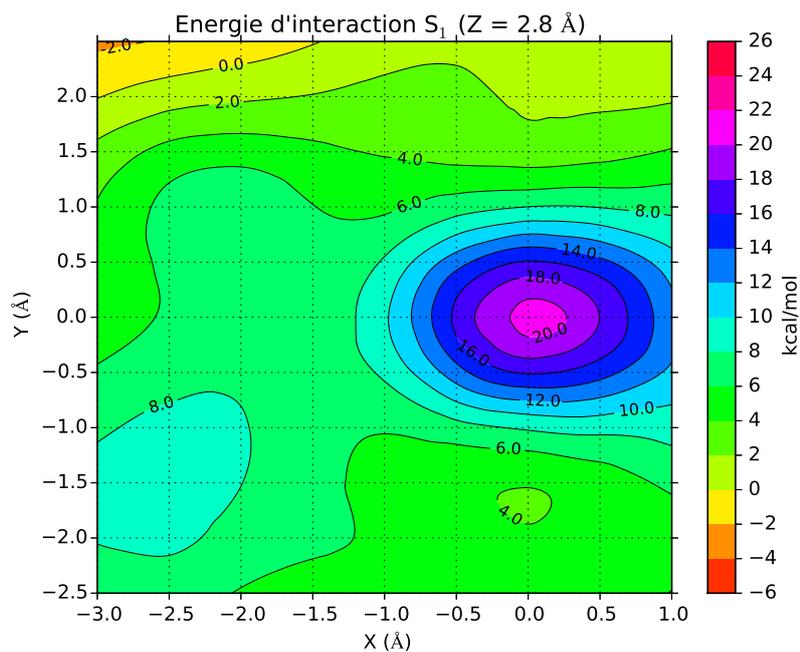


FIGURE 4.17 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 2.8 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

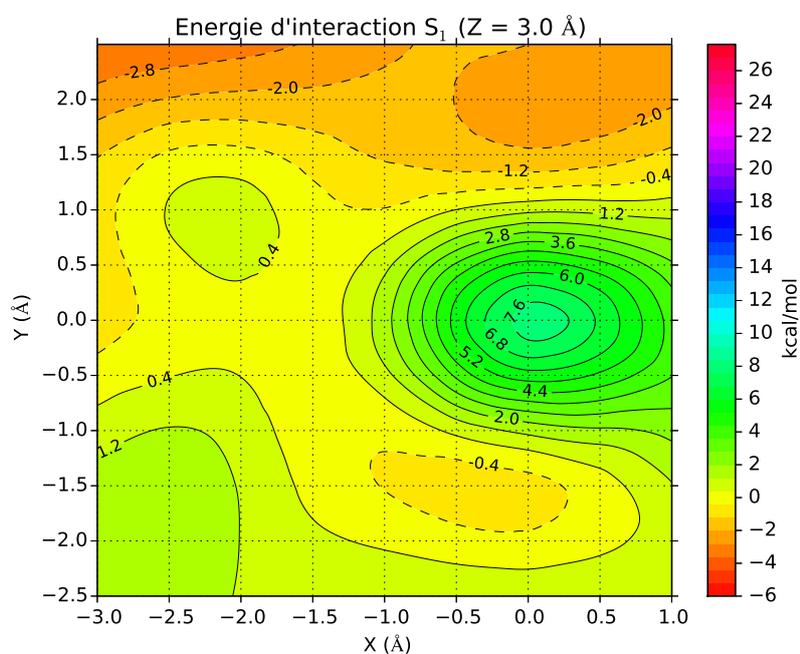


FIGURE 4.18 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.0 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

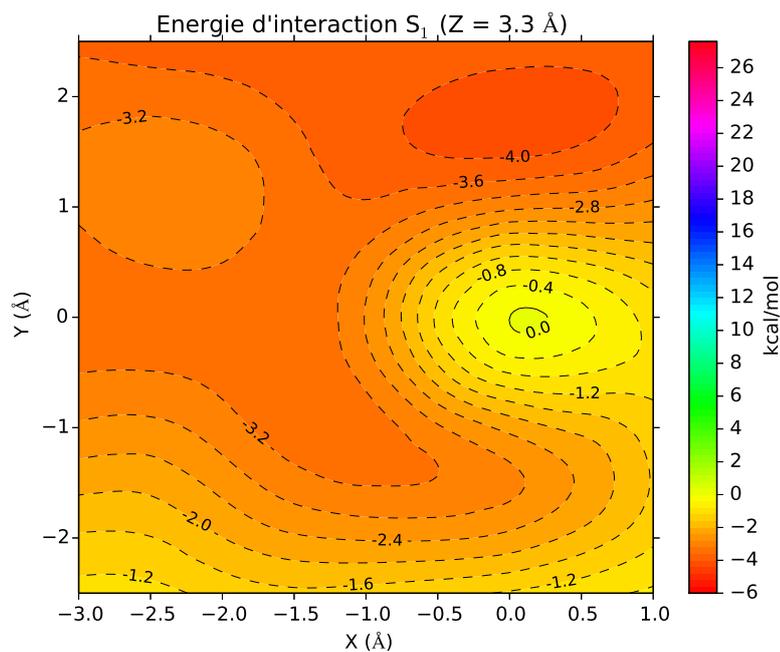


FIGURE 4.19 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

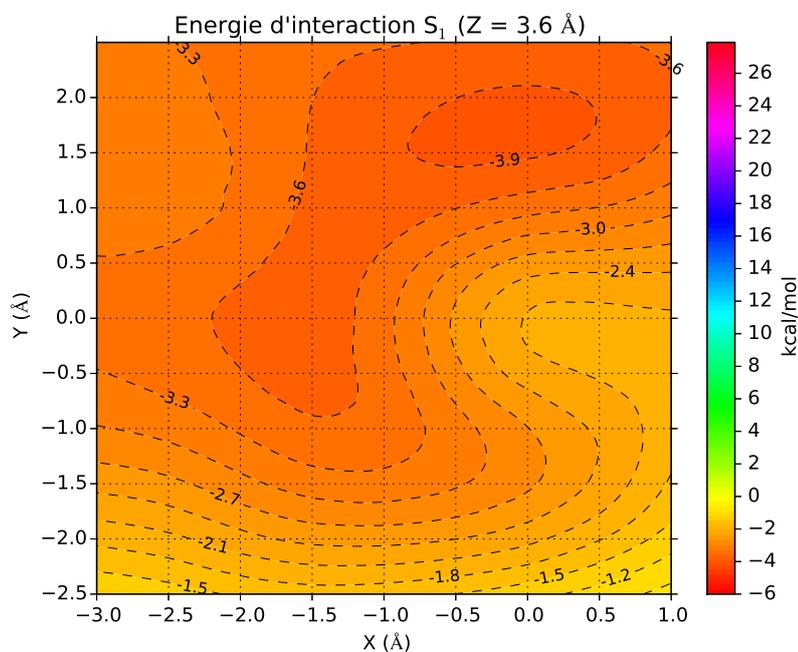


FIGURE 4.20 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.6 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

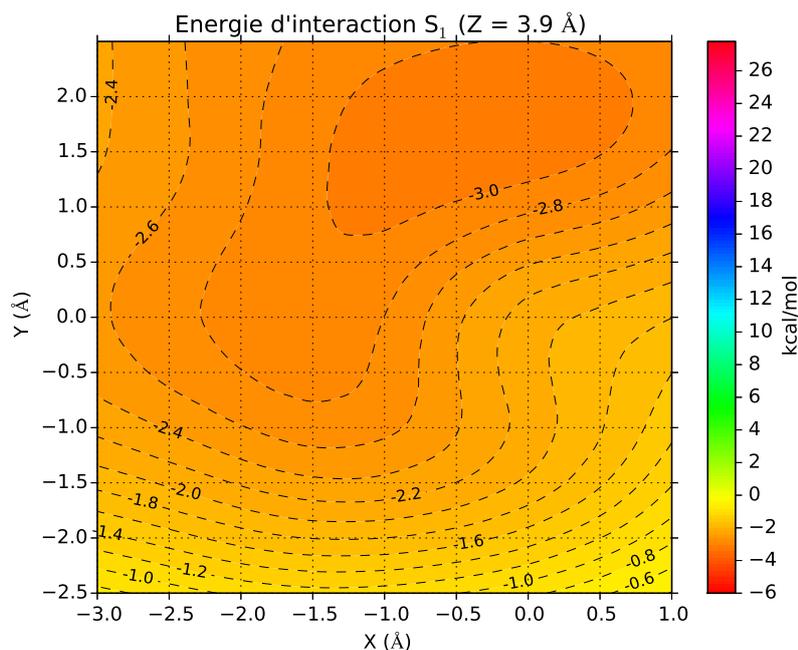


FIGURE 4.21 – Energie d'interactions à l'état excité pour $Z = 3.9 \text{ \AA}$. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

Les géométries d'équilibre chromophore + phénol

D'après les résultats précédents, on peut établir un bilan des énergies minimales avec leurs géométries, qui est présenté dans le Tableau 4.2

Z(Å)	Fondamental		Excité	
	(X,Y) Å	ΔE_{min} (kcal/mol)	(X,Y) Å	ΔE_{min} (kcal/mol)
2.8	-3.0,2.5	-1.33	-3.0,2.5	-2.46
3.0	-3.0,2.5	-2.77	-3.0,2.5	-3.57
3.3	-3.0,2.5	-3.17	0.0,2.0	-4.18
3.6	0.0,2.0	-3.19	-0.5,1.5	-3.94
3.9	0.0,2.0	-2.59	-0.5,1.5	-3.15

TABLE 4.2 – Bilan des énergies minimales par rapport à x et y, z étant fixé, du système chromophore (à l'état fondamental ou excité) + phénol. Calcul CASPT2 , base 6-31+G*.

Dans ce tableau on voit que les valeurs de x et y où les interactions sont les plus favorables diffèrent très peu suivant que le chromophore est à l'état fondamental ou à l'état excité. On voit aussi qu'elles varient peu suivant les valeurs de z. On remarque que le cycle phénol de la tyrosine n'est pas complètement décalé par rapport au phénolate du chromophore.

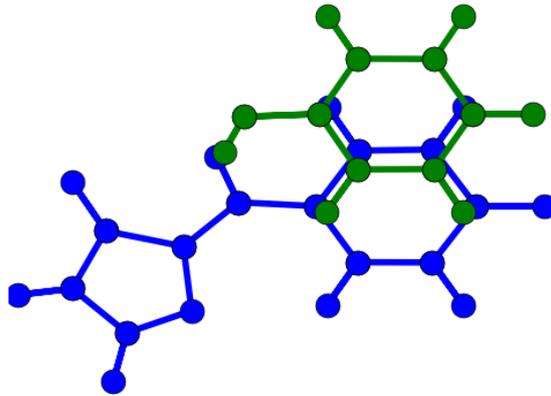


FIGURE 4.22 – Géométrie d'équilibre d'énergie minimale

Lorsqu'on compare les résultats obtenus avec les deux bases, on constate qu'il y a un meilleur recouvrement entre les deux cycles avec la base contenant des fonctions diffusées, alors que les deux cycles sont complètement décalés avec la première base (figures 4.11 et 4.22).

Nous allons maintenant regarder si les champs de forces utilisés dans notre groupe rendent compte des résultats quantiques.

4.2 L'énergie d'interactions décrite par un champ de forces

4.2.1 Caractéristique des champs de forces utilisés

Dans le champ de forces de AMBER l'énergie est de la forme :

$$\begin{aligned}
 U = & \sum_{\text{liaisons}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \\
 & + \sum_{\substack{\text{angles} \\ \text{dièdres}}} K_\beta [1 + \cos(n\beta - \gamma)] + \\
 & + \sum_{\substack{\text{paires} \\ \text{non-liées}}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{\substack{\text{paires} \\ \text{non-liées}}} \epsilon_m \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right]
 \end{aligned}$$

Le premier terme est l'énergie d'élongation des liaisons, le deuxième terme est l'énergie de déformation des angles de valence. Le troisième terme concerne les torsions autour des liaisons.

Ces trois premiers termes sont souvent appelés "termes liés". Dans la dernière ligne, on trouve les termes d'interactions entre les atomes qui ne sont pas liés par une liaison chimique : l'énergie électrostatique et l'énergie de van der Waals. Ces deux termes sont souvent appelés "termes non liés".

Le champ de forces dépend de nombreux paramètres : K_r , R_{eq} , K_θ etc qui sont différents suivant les atomes impliqués.

Dans le champ de forces AMBER il y a les paramètres pour tous les acides aminés standards à l'état fondamental. Le chromophore n'est pas un acide aminé standard et il faut définir des paramètres particuliers.

Pour les constantes de force K_r et K_θ des interactions liées et pour le terme de van der Waals, les auteurs [4] ont utilisé des paramètres de AMBER correspondant à des situations analogues.

Pour les paramètres r_{eq} et θ_{eq} ils les ont pris dans les géométries optimisées par un calcul quantique, et ils sont donc un peu différents pour l'état fondamental et l'état excité. Les charges q_i ont aussi été obtenues à partir de calculs quantiques. On les calcule de façon à représenter le mieux possible les valeurs du potentiel électrostatique créé par le chromophore sur une grille de points entourant le chromophore. Elles sont donc différentes pour l'état fondamental et pour l'état excité.

On ne trouve pas dans le champ de forces AMBER de paramètres satisfaisants pour les deux torsions autour des liaisons qui relient les deux cycles parce qu'on ne retrouve pas de situation analogue. Ils ont été déterminés à partir de calculs quantiques. Pour le chromophore à l'état fondamental, la forme ci-dessus est satisfaisante, mais elle ne convient pas pour le chromophore à l'état excité. En effet les auteurs ont montré qu'il fallait un couplage entre les deux torsions autour des deux liaisons entre le phénolate et l'imidazolinone. Ils ont déterminé ce potentiel à partir de calculs quantiques [3, 4]. Il comporte 30 termes qui sont des produits de sinus et cosinus des deux angles de torsion.

Dans les calculs effectués dans ce chapitre, le chromophore reste dans sa géométrie d'équilibre, seuls les termes d'interactions entre le chromophore et la tyrosine vont varier, c'est à dire les deux termes non liés.

4.2.2 Énergie d'interactions - Résultats.

Les résultats sont donnés dans les figures 4.23 - 4.27 pour l'état fondamental et les figures 4.28- 4.32 pour l'état excité. Les géométries les plus stables sont données dans le tableau 4.3.

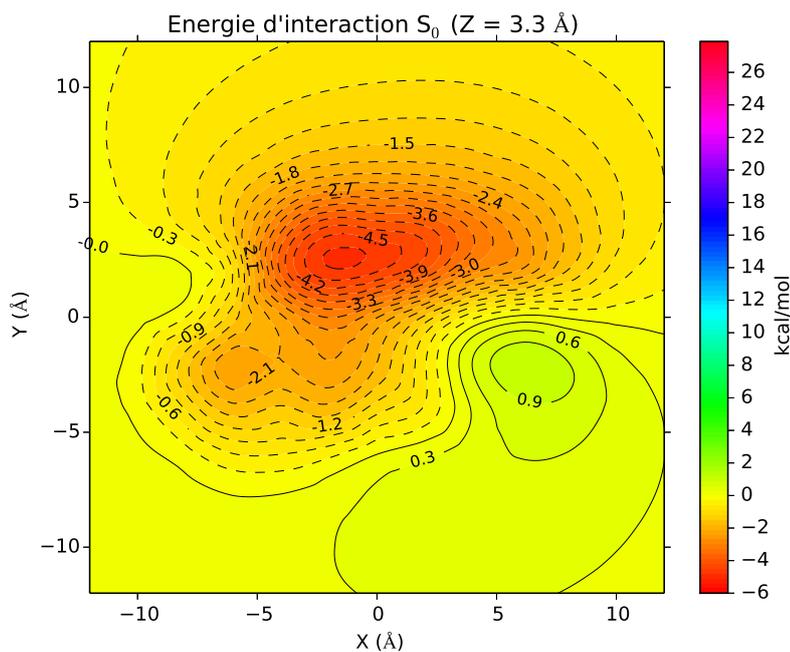


FIGURE 4.23 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$.

On remarque dans cette grille que l'énergie d'interactions la plus attractive ($-5 \leq \Delta E (\text{kcal/mol}) \leq -1$) est située dans la région où $-4 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$. Alors que la région répulsive est décalée vers y négatif. Le minimum se trouve dans la géométrie où $x = -2.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.0 \text{ \AA}$ et où l'énergie est de l'ordre de -4.73 kcal/mol

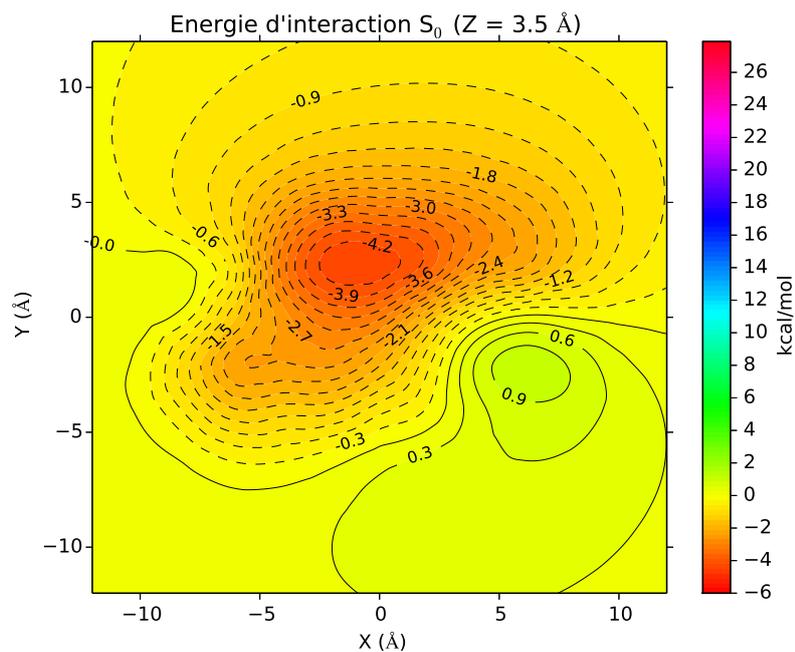


FIGURE 4.24 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$.

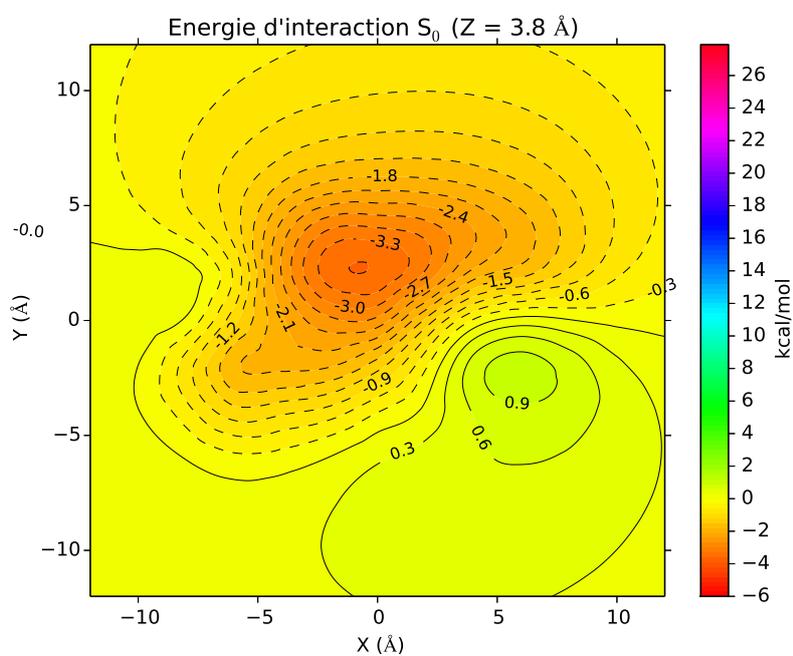


FIGURE 4.25 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$.

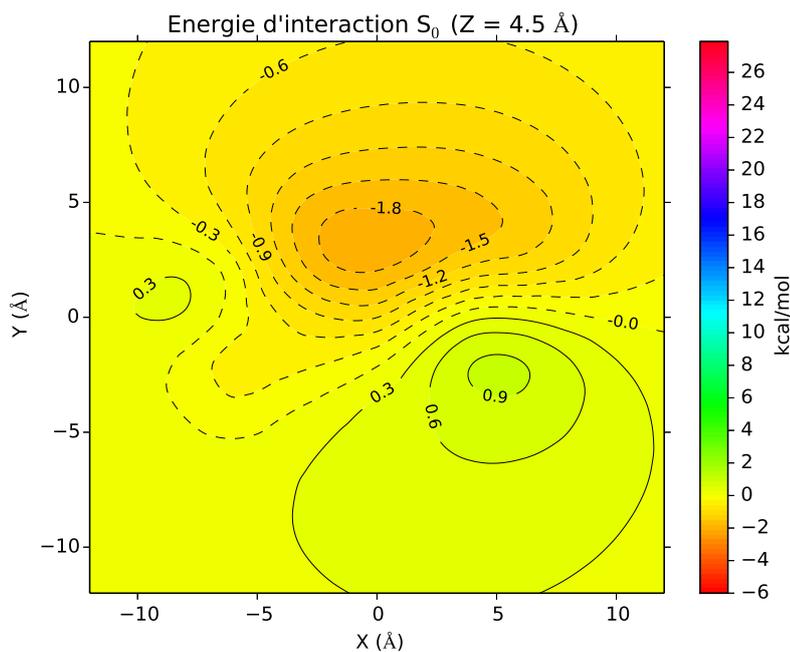


FIGURE 4.26 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$.

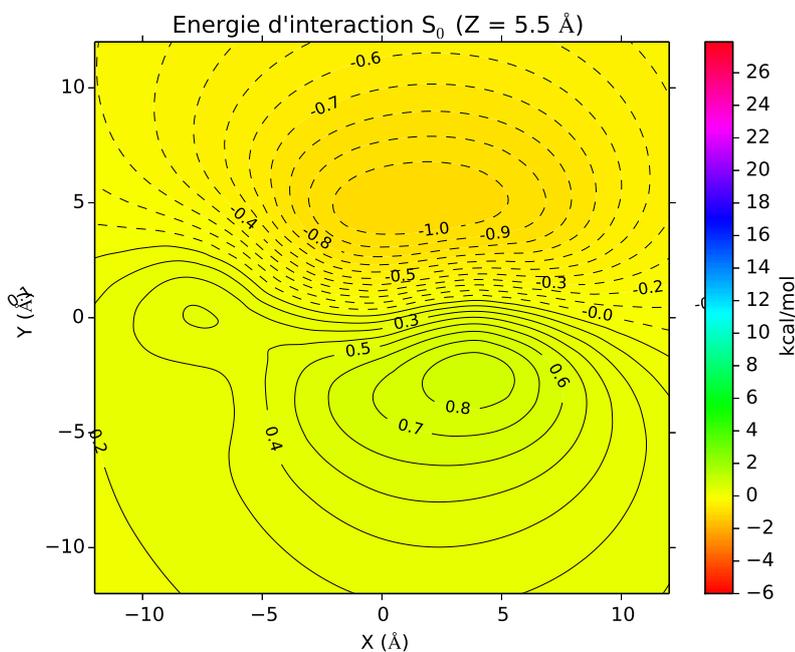


FIGURE 4.27 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$.

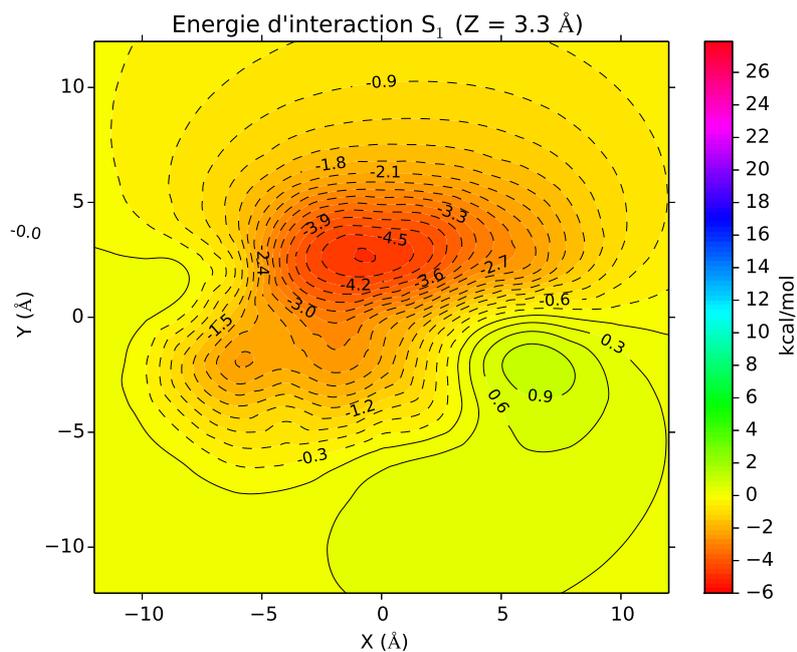


FIGURE 4.28 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$.

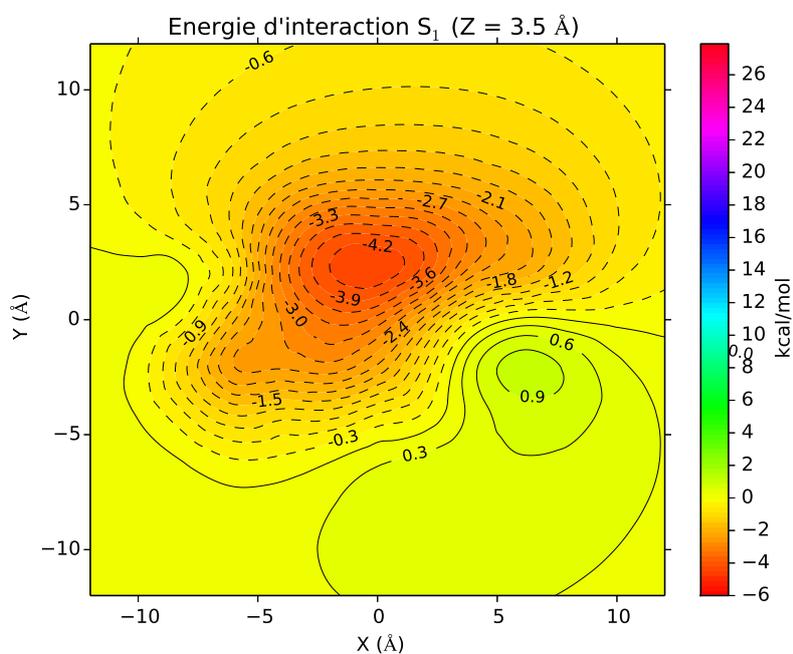


FIGURE 4.29 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$.

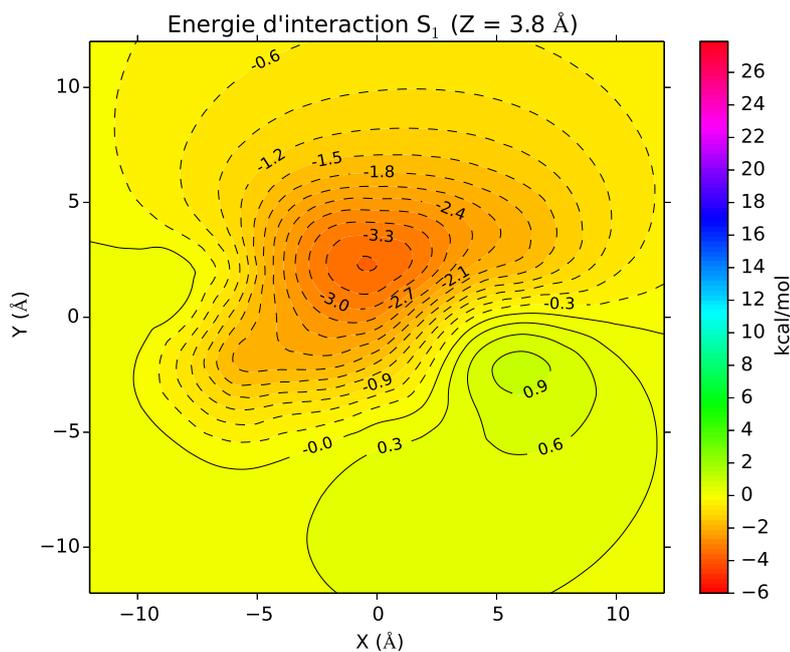


FIGURE 4.30 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$.

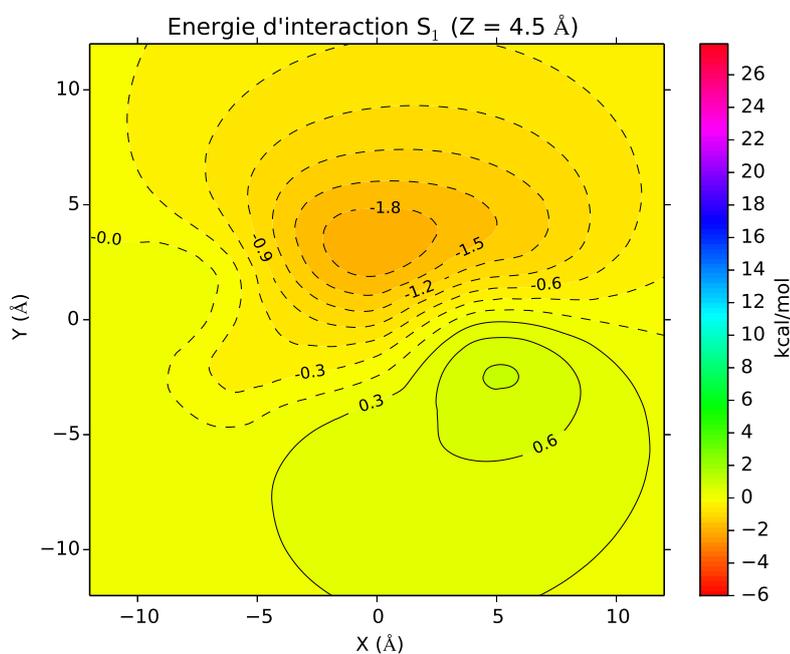


FIGURE 4.31 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$.

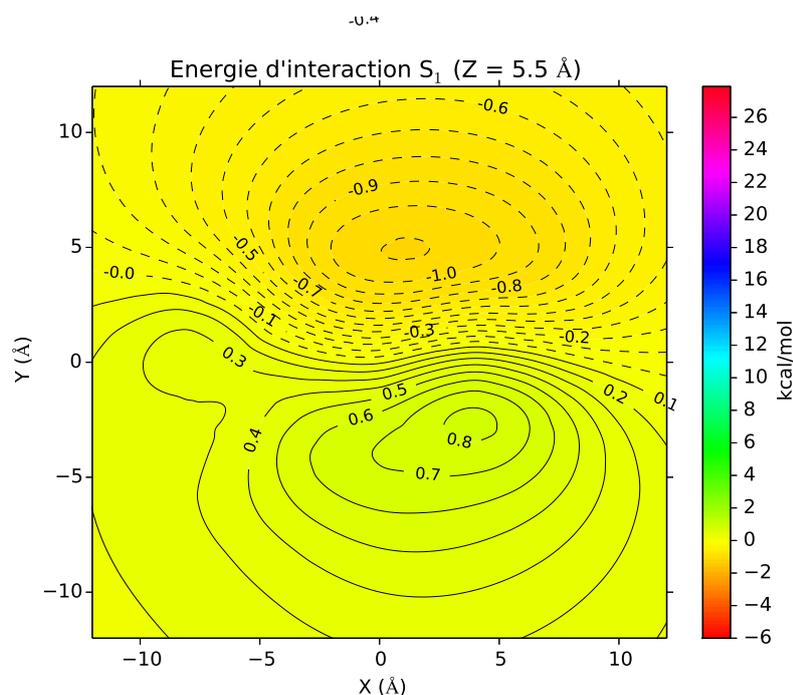


FIGURE 4.32 – La grille des énergies d'interactions avec le potentiel du champ de force standard AMBER pour l'état excité pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$.

D'après les résultats observés précédemment, on peut établir un bilan des énergies minimales avec leurs géométries :

$Z (\text{\AA})$	AMBER (S0)		AMBER (S1)	
	$(x,y)(\text{\AA})$	$\Delta E_{min}(\text{kcal/mol})$	$(x,y)(\text{\AA})$	$\Delta E_{min}(\text{kcal/mol})$
3.3	-2.0 , 2.0	-4.73	0.0 , 2.0	-4.58
3.5	-2.0 , 2.0	-4.35	0.0 , 2.0	-4.40
3.8	-2.0 , 2.0	-3.44	0.0 , 2.0	-3.58
4.5	0.0 , 4.0	-1.92	0.0 , 4.0	-1.95
5.5	0.0 , 4.0	-1.04	0.0 , 4.0	-1.06

TABLE 4.3 – Bilan des énergies minimales dans le cas du chromophore à l'état fondamental S0 et à l'état excité S1, et des géométries associées

On note que les énergies sont de façon générale plus basses qu'avec les calculs quantiques CASPT2 (Tableaux 4.1 et 4.2).

On voit que pour les trois plus petites valeurs de z la géométrie d'équilibre de S1 est différente de celle de S0, avec le cycle phénol qui n'est pas décalé suivant x .

Avec le chromophore à l'état fondamental, si on compare avec les résultats obtenus par CASPT2, on voit que le décalage suivant y est plus faible. La géométrie d'équilibre obtenue avec le champ de forces est présentée dans la figure 4.33

Dans le cas du chromophore à l'état S1, on observe aussi un décalage plus faible : la position d'équilibre par rapport à x et y, pour les faibles valeurs de z, passe de $x = -0.5 \text{ \AA}$, $y = 1.5 \text{ \AA}$ dans le cas de CASPT2 à $x = 0 \text{ \AA}$, $y = 2 \text{ \AA}$ dans le cas du champ de forces.

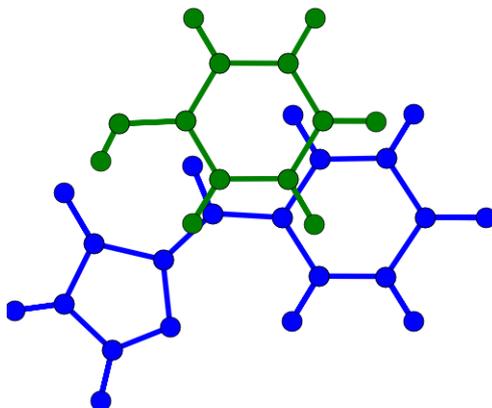


FIGURE 4.33 – Géométrie d'équilibre pour le système chromophore à l'état fondamental + phénol obtenue avec le champ de force.

Un résultat important est à retenir : le recouvrement entre les deux cycles est pratiquement le même qu'avec la base étendue, on remarque un faible décalage de 0.5 \AA pour x et y.

4.3 Comparaison de CASPT2 avec le potentiel d'un champ de forces

Afin de faciliter la comparaison des calculs pour l'état S1, nous reportons dans les figures 4.34 la variation de l'énergie d'interactions calculée de façon quantique avec les bases 6-31G* et 6-31+G*, et avec le champ de forces AMBER en fonction de y pour x et z fixés ou en fonction de x pour y et z fixés.

Sur la figure 4.34a, on remarque l'existence de deux puits autour de la géométrie du π -stacking dans le calcul CASPT2 en base étendue. Les deux puits se situent pour des valeurs négatives et positives de Y . Nous ne nous intéresserons qu'au puits avec des valeurs positives de Y , car la structure cristallographique et la dynamique moléculaire (cf 3.3) montrent que la position la plus favorable se situe lorsque $Y > 0$. La même constatation est faite pour des valeurs négatives de X . Lorsqu'on utilise la base minimale 6-31G*, le puits est plus large et localisé vers les grandes valeurs de Y ($y = 3 \text{ \AA}$) et X ($x = -2.5 \text{ \AA}$). Ce puits est plus étroit et localisé vers des valeurs plus petites (en valeur absolue) de X ($x = -1.5 \text{ \AA}$) et Y ($y = 1.5 \text{ \AA}$), lorsqu'on utilise la base étendue 6-31+G*. Dans la suite de cette étude, nous ne considérerons que les résultats obtenus avec la base étendue 6-31+G*.

Si maintenant, on compare les résultats obtenues avec la base étendue et le champ de forces, on note que l'énergie d'interactions stabilisante obtenue avec le champ de forces est surestimée par rapport à ce que l'on obtient avec le calcul quantique : le caractère répulsif observé dans le calcul quantique disparaît dans les résultats obtenus avec le champ de forces, ceci montre que la tyrosine peut s'éloigner du chromophore et donc donner une mauvaise représentation du π -stacking. Alors que l'existence du puits lors du calcul quantique peut contribuer à maintenir la tyrosine proche du chromophore et par conséquent empêcher les torsions du chromophore dans un laps de temps plus long que le champ de forces. Les figures 4.35 et 4.36 montrent la variation de l'énergie d'interactions calculée de façon quantique et à l'aide d'un champ de forces en fonction de Y pour X et Z fixés et en fonction de X pour Y et Z fixés respectivement.

On note que pour toutes les valeurs de Z , il existe deux puits autour de la géométrie du π -stacking avec le calcul quantique. Ces puits disparaissent pour les résultats avec le champ de forces. Pour les valeurs petites de Z ($Z = 2.8 \text{ \AA}$ et $Z = 3.0 \text{ \AA}$), le champ de forces surestime l'énergie d'interactions répulsive. Pour les valeurs de Z plus grandes ($Z = 3.3 \text{ \AA}$ et $Z = 3.6 \text{ \AA}$) (voir zoom figures 4.35 et 4.36), l'énergie d'interactions attractive est surestimée avec le champ de forces, alors que l'énergie d'interactions répulsive est sous-estimée avec le champ de forces

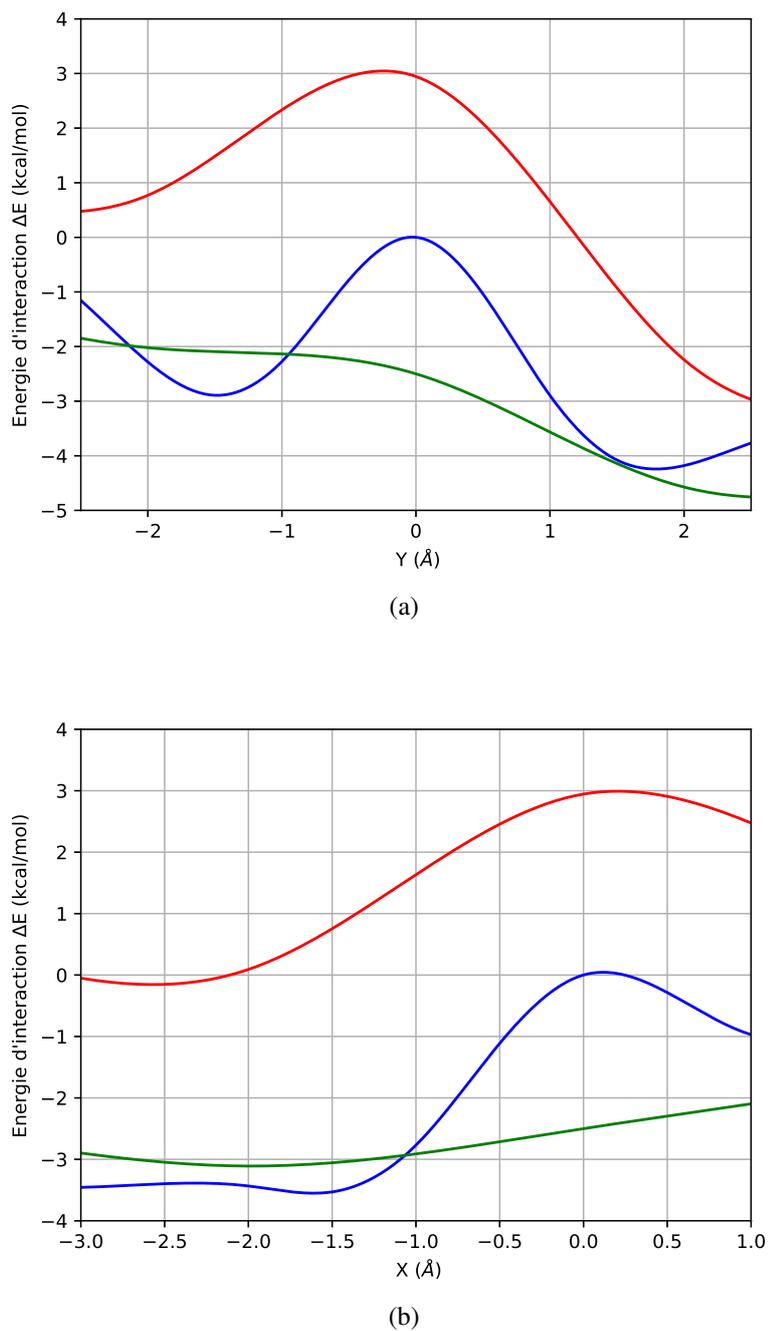


FIGURE 4.34 – La variation de l'énergie d'interactions en fonction de (a) Y et (b) X , pour $Z : 3.3 \text{ \AA}$. Les valeurs obtenues par CASPT2 avec la base 6-31G* sont en rouge, avec la base 6-31+G* en bleu et celles du champ de forces en vert

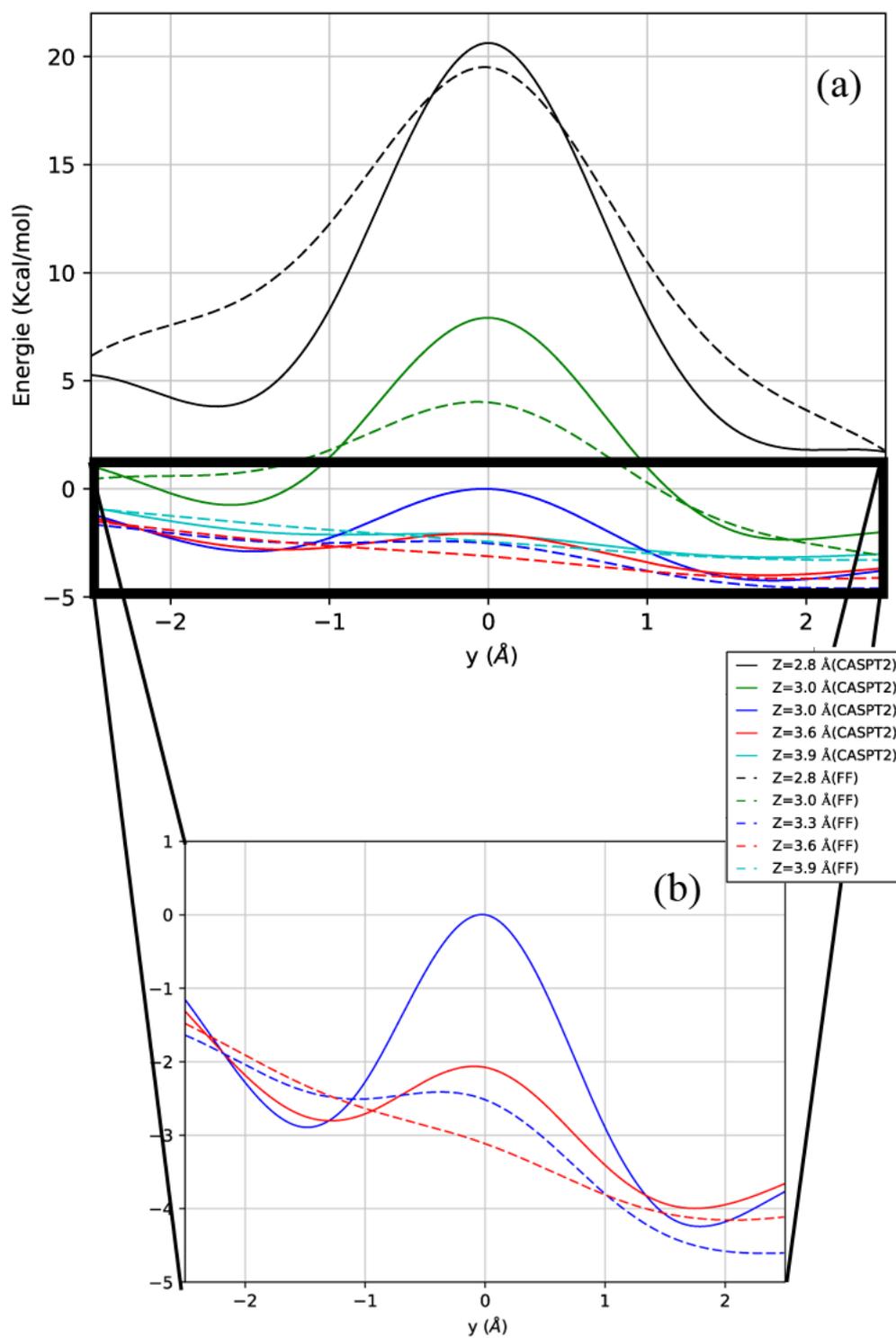


FIGURE 4.35 – La variation de l'énergie d'interactions en fonction de y pour différentes distances Z : 2.8 Å, 3.0 Å, 3.3 Å, 3.6 Å et 3.9 Å.

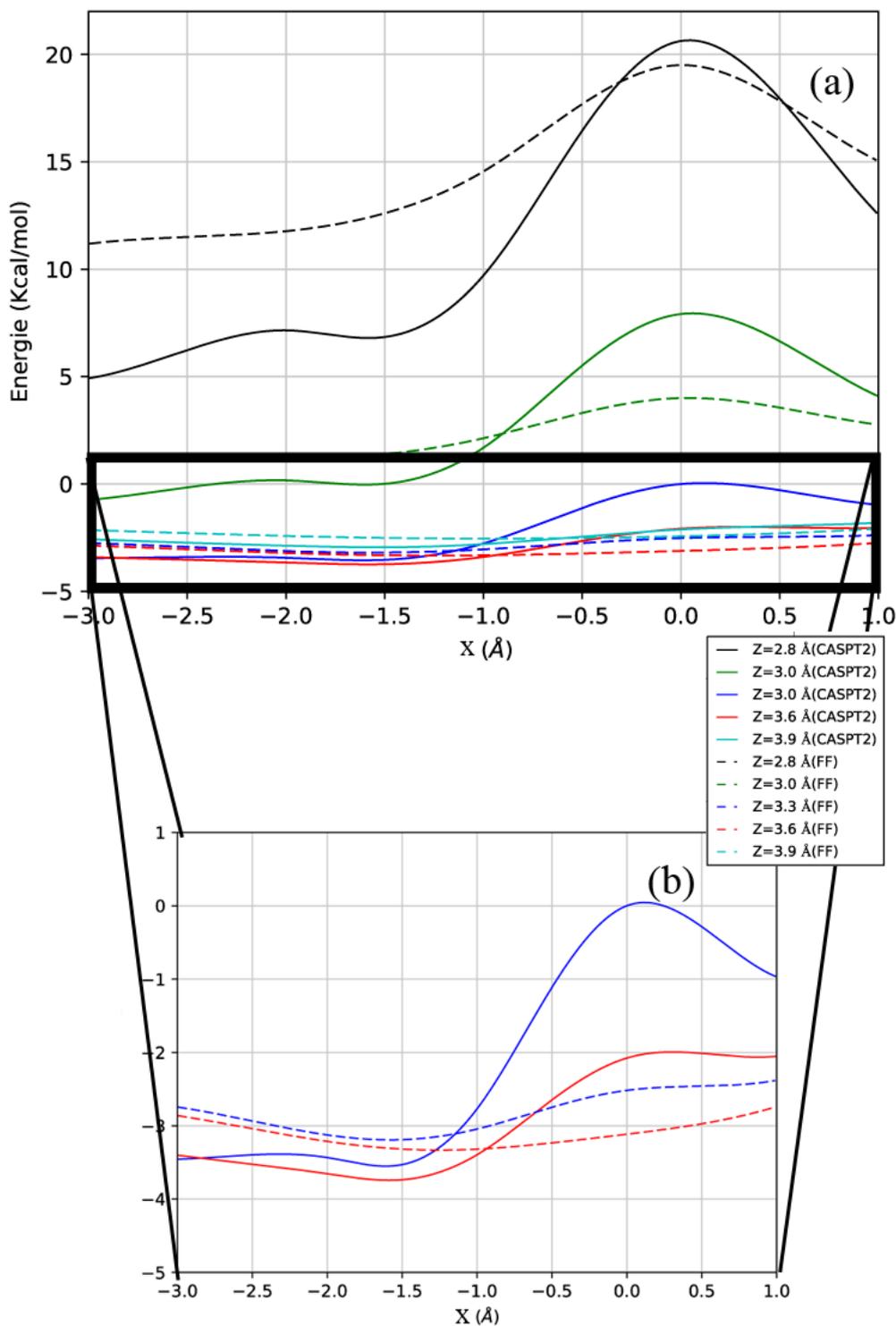


FIGURE 4.36 – La variation de l'énergie d'interactions en fonction de x pour différentes distances Z : 2.8 Å, 3.0 Å, 3.3 Å, 3.6 Å et 3.9 Å.

Les énergies d'interactions et leurs variations en fonction de x , y et z sont donc significativement différentes entre le champ de forces AMBER et les calculs quantiques CASPT2.

Il est donc possible que la mauvaise description de la dynamique du chromophore à l'état excité dans la YFP étudiée par simulation moléculaire au laboratoire, soit due à la mauvaise

représentation des interactions chromophore (S1)- tyrosine par le champ de forces utilisé.

4.4 Interpolation

On cherche à interpoler les énergies d'interactions à l'état excité (CASPT2) avec une expression analytique par type de paire d'atomes non-liés, en concordance avec celle du potentiel d'interactions du champ de force utilisé.

Les type d'atomes qu'on utilise sont : C (carbone), Hydrogène (H), azote (N) et l'oxygène. Chaque type d'atome est considéré comme identique dans les molécules sauf pour l'oxygène où on distingue deux types O et O- .

Dans un premier temps, on a modifié seulement les termes d'énergie d'interactions de van der Waals et on a gardé inchangées les charges des atomes :

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} \right] \quad (4.2)$$

Où :

- k est l'indice du point calculé
- ij est le type de paire d'atomes
- pq : l'atome p appartient au chromophore et l'atome q appartient à la tyrosine.
- a_{ij}, b_{ij} sont les paramètres qu'on cherche à ajuster par la minimisation de l'erreur quadratique moyenne (RMS) :

$$\chi = \frac{1}{N} \sum_k [f(k) - E'(k)]^2 \quad (4.3)$$

Avec N le nombre des points calculés, E' est l'énergie CASPT2 moins l'énergie d'interactions électrostatique entre les charges :

- Avec la base minimale , N égal à 1805 points
- Avec la base étendue , N égal à 495 points

Comme f dépend linéairement des inconnues a_{ij} et b_{ij} le problème peut être résolu simplement.

Avec la base minimale 6-31G* on trouve un RMS de 0.75 kcal/mol et avec la base étendue 6-31+G*, le RMS est de 0.75 kcal :mol, ce qui fait que cette interpolation n'est pas optimale pour construire le nouveau champ de force. Les valeurs obtenues pour les coefficients a_{ij} et b_{ij} sont dans les tableaux (4.4, 4.5) suivant :

Type de paire d'atomes ij	a_{ij}	b_{ij}
O- O	5.1898	-4.2642
O- C	-2.8420	-3.2172
O- H	4.1882	-3.7831
N O	-4.6698	3.9567
N C	-3.4195	3.5876
N H	-4.4821	3.9173
O O	-4.5203	3.7001
O C	-4.0369	3.6928
O H	3.7153	-3.3932
C C	-2.4231	3.0787
C H	1.9148	-2.9226
H H	3.0930	-2.9399

TABLE 4.4 – Les coefficients a et b (avec la base minimal 6-31G*)

Type de paire d'atomes ij	a_{ij}	b_{ij}
O- O	6.3495	-4.3915
O- C	-7.1863	4.9066
O- H	5.3859	-4.0419
N O	-3.2602	3.3514
N C	-3.2993	3.2998
N H	3.4096	-3.0335
O O	-8.8995	7.8118
O C	-3.8072	3.2298
O H	4.3168	-3.2781
C C	-3.4826	3.2766
C H	-3.3621	2.7903
H H	4.2285	-3.3136

TABLE 4.5 – Les coefficients a et b (avec la base étendue 6-31G*)

On remarque que les signes des coefficients n'ont pas une signification physique, normalement on doit avoir un signe négatif pour l'ensemble des coefficients a_{ij} dont le terme associé représente la dispersion et positif pour les coefficients b_{ij} dont le terme associé représente la répulsion. Donc cette première approche n'est pas satisfaisante.

Dans un deuxième temps, nous avons laissé varier les charges et nous avons donc ajouté dans l'équation 4.2 les termes d'interactions électrostatiques. (Dans ce cas on interpole directement les énergies d'interactions CASPT2).

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} + c_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}} \right] \quad (4.4)$$

Avec la base minimale 6-31G* on trouve un RMS de 0.174 kcal/mol et avec la base étendue

6-31+G*, le RMS est de 0.55 kcal :mol,. Les coefficients obtenus pour a_{ij} , b_{ij} et c_{ij} sont dans les tableaux (4.6, 4.7) suivant :

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}
O- O	-3.8020	3.4743	5.1472
O- C	-3.1378	-2.5046	6.4422
O- H	3.1680	-3.3337	-4.1204
N O	-4.3687	3.6365	22.8464
N C	-2.9002	3.0919	1.9696
N H	3.4044	-3.0877	-6.5393
O O	-4.5873	3.8241	16.2346
O C	-3.7520	3.5156	10.8309
O H	3.4906	-3.2383	-15.2892
C C	-3.2128	3.2946	4.2073
C H	3.1146	-3.0554	-6.8305
H H	-3.2692	3.1220	10.5506

TABLE 4.6 – Les coefficients a , b et c (avec la base minimal 6-31G*)

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}
O- O	5.6438	3.9849	-2.5727
O- C	4.6049	-5.7332	2.1856
O- H	3.8003	-3.0679	-2.3996
N O	4.5716	-3.1757	-2.3159
N C	4.3579	-3.0982	-1.9449
N H	-4.0505	-3.1043	2.3264
O O	8.3359	6.2722	-1.8764
O C	-4.2588	3.3604	1.8290
O H	3.6544	-2.8858	-1.9496
C C	2.9002	3.1748	-1.5114
C H	-2.9068	-2.5706	-0.7957
H H	3.4876	-3.1811	1.6636

TABLE 4.7 – Les coefficients a , b et c (avec la base étendue 6-31+G*)

A nouveau les signes des coefficients a_{ij} et b_{ij} ne permettent pas de leur donner un sens physique. Les coefficients c_{ij} semblent avoir des signes corrects.

Pour le troisième essai, dans l'équation 4.4 on ajoute un terme en $\frac{1}{r^2}$ qui représente l'interactions charge-dipole :

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} + c_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}} + d_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^2} \right] \quad (4.5)$$

Avec la base minimale 6-31G* on trouve un RMS vaut 0.17 kcal/mol, et avec la base étendue 6-31+G*, le RMS est de 0.48 kcal :mol. Les coefficients obtenus pour a_{ij} , b_{ij} , c_{ij} et d_{ij} sont dans les tableaux (4.8, 4.9) suivant :

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}	d_{ij}
O- O	5.6534	-4.0243	-29.0643	311.8253
O- C	-3.0718	-2.9881	4.3285	-2.4128
O- H	3.9343	-3.5379	-6.7032	9.6872
N O	4.0707	-3.4573	-12.3270	64.1442
N C	3.1721	-2.4726	-6.8787	19.4057
N H	-3.3539	3.1352	9.0293	-35.9787
O O	-4.3443	3.6526	8.1920	-20.8224
O C	3.2404	3.2024	-9.2388	40.4899
O H	3.0917	-3.2357	6.3236	-29.5124
C C	-2.9955	3.2936	-3.8968	10.3120
C H	-3.3602	2.9688	8.1572	-32.3507
H H	3.3831	-2.9288	-9.9973	51.2505

TABLE 4.8 – Les coefficients a , b , c et d (avec la base minimal 6-31G*)

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}	d_{ij}
O- O	-7.3260	4.5401	-1494.7933	68.3815
O- C	6.8798	-5.4453	-284.1612	-13.0475
O- H	5.8458	-3.7618	1766.7494	-59.2092
N O	6.3297	-3.7326	2208.5323	-68.7148
N C	-5.7808	3.7073	-1343.6367	52.3235
N H	5.3738	-3.5994	1219.5109	-46.7073
O O	-13.3325	6.8254	-13882.2676	220.0639
O C	-4.8634	3.4149	-639.8753	32.9686
O H	5.8928	-3.5830	2270.8533	-65.1050
C C	3.9204	3.0046	96.9457	-13.9370
C H	-3.8192	2.8287	-185.9837	17.1747
H H	2.4969	-3.1944	-114.6068	16.4556

TABLE 4.9 – Les coefficients a , b , c et d (avec la base étendue 6-31+G*)

En considérant les 4 types de termes, l'interpolation peut être considérée numériquement correcte puisque le RMS est environ 30 fois plus petit que l'énergie d'interactions minimale. Cependant, les signes des coefficients ne sont pas tous adaptés à la nature physique du terme correspondant.

Une piste pour améliorer la situation serait d'introduire un terme en $\frac{1}{r^4}$ pour tenir compte de la polarisation, bien que la détermination des paramètres soit alors plus difficile.

Plusieurs aspects quantitatifs des résultats exposés dans les paragraphes 1 , 2 et 3 de ce chapitre nous permettent de discuter le rôle que peut avoir l'amélioration du champ de forces dans la simulation.

La tyrosine 203 a d'autres interactions avec son environnement dans la YFP, qui sont principalement des liaisons hydrogène.

Dans les simulations faites par le groupe, le groupement OH de Tyr203 a deux liaisons hydrogène (LH), avec une glutamine (Gln69) et avec une molécule d'eau (W). Ces deux LH font partie d'une chaîne de LH partant de l'atome O2 du chromophore et arrivant à N2 du chromophore : O2-Gln69-Tyr203-W-Glu222-N2.

Si on arrive à déterminer un champ de forces représentant exactement l'énergie d'interactions de π -stacking CASPT2 pour l'état S1, et qu'on fait une simulation avec ce champ de forces, avec la base étendue 6-31+G* la tyrosine reste relativement dans sa position d'équilibre obtenue avec le champ de forces c'est à dire $x=0 \text{ \AA}$, $y=2 \text{ \AA}$, tandis qu'avec la base minimale 6-31G*, la tyrosine aura tendance à se déplacer de la position d'équilibre du champ de forces actuel ($x=0 \text{ \AA}$, $y=2 \text{ \AA}$) vers la position d'équilibre CASPT2 ($x=-2 \text{ \AA}$ et $y=+4 \text{ \AA}$). C'est un grand déplacement qui impliquerait certainement de casser au moins une des LH.

On peut comparer les énergies mises en jeu. L'ordre de grandeur de la déstabilisation due à la rupture d'une LH est de l'ordre de 2 kcal/mol à 4 kcal/mol. Si on regarde la figure 4.6, qui donne les énergies d'interactions CASPT2 pour l'état S1 et pour $Z=3.3 \text{ \AA}$, on voit que le déplacement qu'on vient de décrire aboutit à une stabilisation due à l'amélioration de l'interactions de π -stacking d'environ 1 à 2 kcal/mol, qui ne compense pas la rupture d'une liaison hydrogène.

On peut donc douter que l'amélioration du champ de force de π -stacking conduise à une modification significative des positions relatives du chromophore et de la tyrosine dans la simulation, et donc cela ne devrait pas modifier les temps caractéristiques de torsion du chromophore conduisant à la désactivation non radiative.

Chapitre 5

Etude de la simulation du déclin de fluorescence (YFP) par une méthode directe

Nous revenons maintenant sur les calculs effectués par notre groupe sur la dynamique du chromophore à l'état excité S_1 dans la GFP et dans la YFP et sur la façon dont ils en ont déduit une constante de vitesse non radiative [3, 4].

Les simulations ont été faites sur le système formé par la protéine solvatée dans une boîte de molécules d'eau, ce qui fait de l'ordre de 25 000 atomes. Le champ de force utilisé a été décrit ici dans le chapitre 4, paragraphe 4.2.1. Cette fois-ci tous les termes du champ de force varient.

Pour chacune des deux protéines, ils ont effectué une simulation avec le chromophore à l'état S_0 et ils ont enregistré des géométries à intervalles de temps réguliers. Ce sont des "snapshots".

Puis ils ont effectué des simulations avec le chromophore à l'état S_1 en prenant comme points de départ des snapshots obtenus à l'état fondamental.

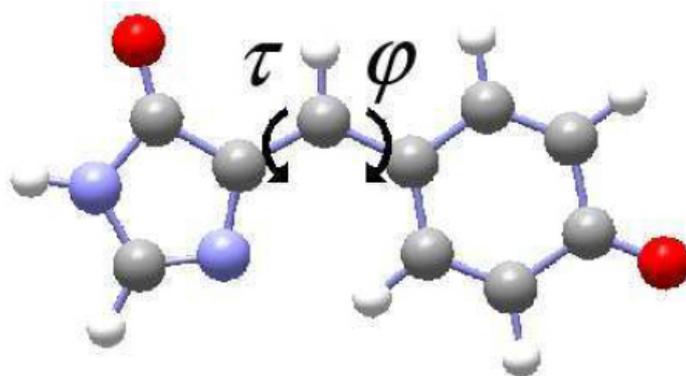


FIGURE 5.1 – La définition des angles de torsion τ et ϕ

On rappelle que les grandeurs qui sont importantes pour le déclin non radiatif sont les angles ϕ et τ (figure 5.1). En effet les forces internes du chromophore à l'état S_1 agissent de façon à le faire tourner suivant l'un ou l'autre de ces angles, et les géométries atteintes quand l'un deux est

proche de 90° en valeur absolue sont telles qu'une conversion interne vers l'état S_0 peut avoir lieu.

Pour chaque simulation ils ont tracé les fonctions $\varphi(t)$ et $\tau(t)$.

Un exemple de comment varient ces fonctions est montré dans la figure 5.2. Dans ce cas ils en déduisaient qu'il y avait une torsion suivant τ qui se produisait à 1.5 ns et que le chromophore subissait une désactivation non radiative à 1.5 ns. En déterminant ce temps pour un ensemble de simulations, ils en ont déduit un temps moyen de désactivation non radiative τ_{nr} qu'ils comparaient avec la valeur déduite des valeurs expérimentales de la durée de vie de fluorescence et du rendement quantique par la formule

$\tau_{nr} = \tau / (1 - \phi)$ (dans cette formule τ est le temps de vie de fluorescence et ϕ le rendement quantique).

Cette façon de faire aboutissait à un bon résultat dans le cas de la GFP, mais pas dans le cas de la YFP où ils obtenaient une valeur de 3.5 ns pour τ_{nr} , presque 3 fois plus petite que la valeur obtenue à partir des résultats expérimentaux (9.4 ns).

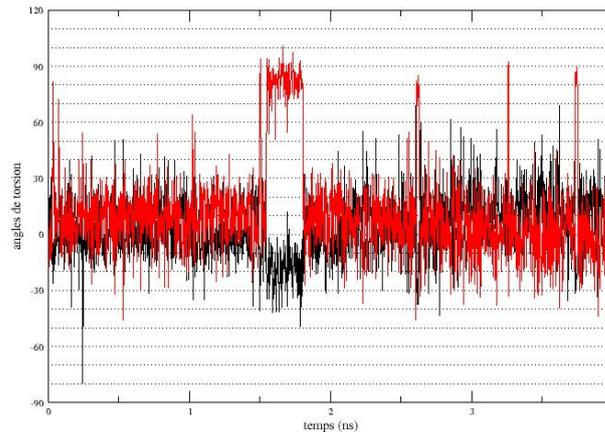


FIGURE 5.2 – Variation des angles φ (en noir) et τ (en rouge) exprimés en degrés au cours d'une des simulations de la YFP avec le chromophore à l'état S_1 .

On présente maintenant une méthode directe permettant d'évaluer par simulation le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence.

5.1 Méthode

On part ici d'une équation différentielle semblable à l'équation habituelle pour le déclin de la population $S_1(t)$ d'un état excité qui peut revenir à l'état fondamental par un processus radiatif ou par un processus non radiatif. Mais on tient compte du fait que les probabilités de ces deux processus peuvent dépendre de la géométrie du système (c'est le cas pour le chromophore des protéines fluorescentes) et donc du temps. On écrit :

$$dS_1(t)/dt = -p_s(t)S_1(t)$$

où $p_s(t)$ est une densité temporelle de probabilité. Elle dépend du temps et c'est pour cela qu'on n'utilise pas le terme habituel « constante de vitesse ». Elle est la somme de la densité temporelle de probabilité du processus radiatif, $p_r(t)$, et de la densité temporelle de probabilité du processus non radiatif $p_{nr}(t)$:

$$p_s(t) = p_r(t) + p_{nr}(t)$$

En intégrant, on obtient :

$$S_1(t) = S_1(0) \exp \int_0^t -p_s(t') dt'$$

Supposons qu'on connaisse les fonctions $p_r(t)$ et $p_{nr}(t)$ en fonction des angles τ et φ du chromophore. Supposons qu'on a fait une dynamique moléculaire de la protéine et qu'on a enregistré les géométries instantanées (« snapshots ») tous les intervalles de temps Δt suffisamment petits. Soit k l'indice d'un snapshot. Pour ce snapshot on connaît les valeurs de τ et φ , donc les valeurs prises par p_r et p_{nr} . On peut écrire :

$$S_1(k+1) = S_1(k) - p_s(k)\Delta t S_1(k)$$

et intégrer numériquement pas à pas la fonction $S_1(k)$.

En fait, dans la suite de ce chapitre, après avoir étudié comment varient les probabilités, on verra qu'on peut étudier le système sans intégrer l'équation.

5.2 Probabilité de conversion non radiative

Il y a conversion non radiative entre deux états adiabatiques (c'est à dire qui diagonalisent l'hamiltonien électronique) ψ_k et ψ_l si l'élément de matrice de l'opérateur de dérivation par rapport aux coordonnées des noyaux $\langle \psi_k, \nabla \psi_l \rangle$ est suffisamment grand par rapport à la différence entre les deux énergies. Cela se produit en général dans des zones limitées. On repère ces zones en combinant ψ_k et ψ_l de façon à obtenir une représentation "quasi-diabatique" (des états "quasi-diabatiques" sont des états dont la structure électronique varie peu dans le domaine considéré, l'élément de matrice de l'opérateur de dérivation par rapport aux coordonnées des noyaux entre ces états est très petit) : il y a conversion non radiative si la différence entre les énergies des deux fonctions d'ondes quasi-diabatiques $\psi_k^{(diab)}$ et $\psi_l^{(diab)}$ est inférieure à l'élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien entre ces deux fonctions d'ondes.

Dans le cas du chromophore anionique les fonctions $\psi_k^{(diab)}$ et $\psi_l^{(diab)}$ ont été déterminées en utilisant une méthode de projection définie à partir d'états *ad hoc* [65, 66] et en utilisant l'hamiltonien effectif de Olsen et Mc Kenzie[60]

Les résultats sont présentés sur la figure 5.3

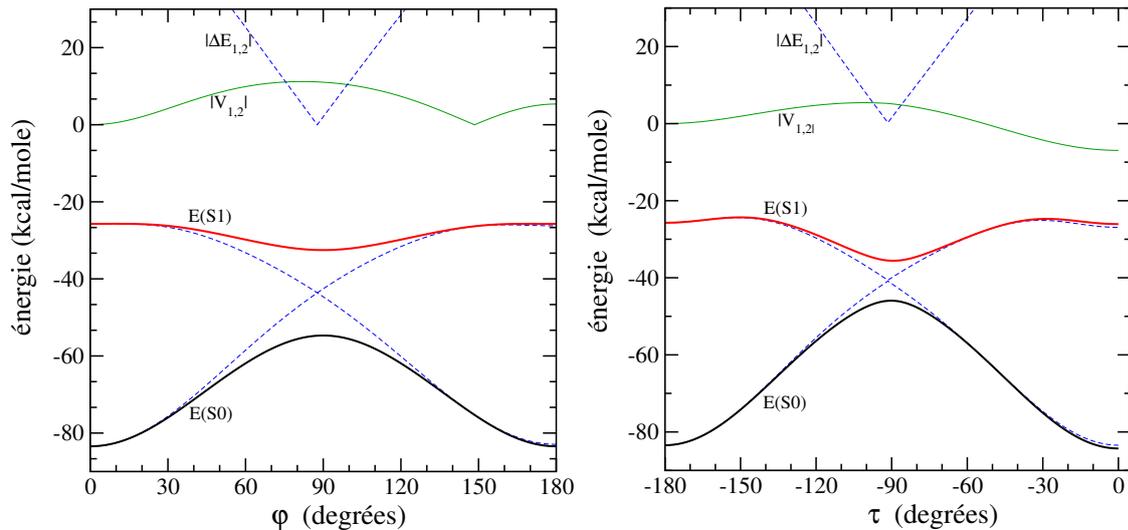


FIGURE 5.3 – Coupes des surfaces d'énergie potentielle adiabatiques et quasi-adiabatiques du chromophore : à gauche coupe suivant φ à τ constant ($=0$) et à droite, coupe suivant τ à φ constant ($=0$).

- lignes pleines rouges et bleu : énergies adiabatiques ;
- tirets bleu : énergies quasi-adiabatiques et module de la différence de ces énergies ;
- ligne pleine verte : élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien effectif entre les deux états quasi-adiabatiques.

On voit que la conversion non radiative peut se produire seulement tout près des points $\varphi = 0, |\tau| = 90^\circ$ ou $|\varphi| = 90^\circ, \tau = 0$. On utilisera ici une probabilité constante (à déterminer empiriquement) dans un cercle de rayon égal à 20° autour de ces points et une probabilité nulle en dehors.

5.3 Probabilité de conversion radiative

5.3.1 Expression théorique

La théorie de base permettant de prédire la probabilité de conversion radiative, c'est-à-dire de fluorescence, dérive de celle du "corps noir" [67, 68, 69, 70]

Le "corps noir" est un solide qui n'absorbe pas la lumière (mais qui peut échanger de l'énergie avec elle) et qui est en équilibre thermique avec elle ; c'est un système idéal qui vise initialement à décrire le fait qu'un objet matériel chauffé à une température suffisante émet de la lumière rouge, puis blanche ... Il se trouve que les résultats obtenus permettent aussi de prédire l'intensité de fluorescence de systèmes tels que le chromophore considéré ici. L'analyse comporte 3 étapes numérotées 0, 1 et 2 : analyse du système de photons, puis de l'équilibre matière-photons, puis de l'effet des photons sur les atomes.

▪ *étape 0.1.* Nombre d'états stationnaires à une fréquence donnée. On considère ici que les photons sont représentés par des ondes à l'intérieur de la boîte constituée par le "corps noir". Si ces ondes sont stationnaires, elles ne peuvent avoir que certaines longueur d'ondes. En une dimension, les longueur d'ondes possibles sont telles que $n\lambda/2 = X$ (X = dimension de la boîte). Le nombre de fréquences possibles inférieures à une fréquence donnée ν est alors égal à $n = 2X/\lambda = 2X\nu/c$; donc, en 3D : $n = 8V\nu^3/c^3$. Le nombre de degrés de liberté au voisinage d'une fréquence donnée ν est donc égal à :

$$dn = \Lambda V \frac{\nu^2}{c^3} d\nu \quad (5.1)$$

où Λ est une constante sans dimension qui comporte le facteur 3 venant de la différentiation de ν^3 et un facteur dépendant de la forme du solide, mais pas de la fréquence.

▪ *étape 0.2.* Distribution d'énergie des photons de fréquence donnée. Les différentes fréquences possibles pour les ondes stationnaire sont considérées ici comme des degrés de liberté. Il peut y avoir plus ou moins d'énergie sur chacun. Pour un système à l'équilibre à la température T , la distribution d'énergie sur chaque degré de liberté est en $N \exp(-\beta E)$ (avec $\beta = 1/kT$, N constante de normalisation qui est l'inverse de la fonction de partition)[67]. L'hypothèse essentielle[69] est que, pour une onde lumineuse de fréquence ν , les seules énergies possibles sont des multiples entiers de $h\nu$ soit $kh\nu$ où h est une constante *ad hoc* (ou "constante de Planck) et k un entier. L'expression de Boltzmann, $N \exp(-\beta E)$, donne donc la distribution des k et on peut trouver la valeur moyenne de l'énergie sur un degré de liberté donné en sommant $NE \exp(-E/kT)$ sur toutes les valeurs possibles de k avec ν constant. On trouve

$$\langle E_\nu \rangle = \frac{\sum_{k=0,\infty} kh\nu \exp(-\beta kh\nu)}{\sum_{k=0,\infty} \exp(-\beta kh\nu)} = \frac{h\nu}{\exp(\beta h\nu) - 1} \quad (5.2)$$

On note que pour $h\nu \ll kT$, donc $\beta h\nu \ll 1$, on a $\langle E_\nu \rangle = kT$ comme en thermodynamique classique. Pour les plus hautes fréquences, la loi est différente.

▪ *étape 0.3.* Energie moyenne des photons de fréquence donnée en équilibre avec le corps noir : elle est égale à $\langle E_\nu \rangle$, eq.(5.2), multipliée par la densité des ondes de fréquence ν dans le corps noir, eq.(5.1). D'où la densité d'énergie par unité de volume et de fréquence (loi de Plank)

$$\rho(\nu) = \frac{d^2 E}{dV d\nu} = \frac{\Lambda}{c^3} \frac{h\nu^3}{\exp(\beta h\nu) - 1} \quad (5.3)$$

▪ *étape 1.0.* On fait intervenir la matière du corps noir. Ici l'hypothèse essentielle (Einstein, 1905) est que chaque atome interagit avec la lumière de trois façons différentes : absorption stimulée, émission stimulée et émission spontanée (ou fluorescence). Dans chaque cas il y a transition de l'atome entre deux états. Soit E_1 et E_2 les énergies de ces deux états et ν la fré-

quence de l'onde lumineuse avec $\nu = (E_2 - E_1)/h$, alors le nombre de transitions par seconde est

$$\text{transitions } 1 \rightarrow 2 : N_1 B_{12} \rho(\nu)$$

$$\text{transitions } 2 \rightarrow 1 : N_2 [A_{21} + B_{21} \rho(\nu)]$$

où A_{21} , B_{21} et B_{12} sont des coefficients caractéristiques des atomes (coefficients d'Einstein), $\rho(\nu)$ est la densité d'énergie de photons, eq.(5.3) et N_1 et N_2 sont les nombres d'atomes initialement (avant transition) dans les états 1 et 2. Les coefficients B_{12} et B_{21} sont relatifs à l'absorption et à l'émission stimulée, le coefficient est relatif à l'émission spontanée (la fluorescence).

• *étape 1.1.* A l'équilibre, le bilan des échanges d'énergie entre les atomes (constituant le "corps noir") et les ondes lumineuses doit être nul (pas d'échange d'énergie) ce qui implique

$$N_1 B_{12} \rho(\nu) = N_2 (A_{21} + B_{21} \rho(\nu))$$

Or, les N_1 et N_2 sont reliés par la distribution de Boltzmann :

$$\frac{N_2}{N_1} = \exp[-\beta(E_2 - E_1)] = \exp(-\beta h\nu)$$

et $\rho(\nu)$ par la loi de Planck, eq.(5.3). On en déduit

$$A_{21} [\exp(\beta h\nu) - 1] + B_{21} \Lambda \nu^3 = B_{12} \frac{\Lambda}{c^3} \nu^3 \exp(\beta h\nu)$$

étape 1.2. Les coefficients A_{21} , B_{21} et B_{12} sont des propriétés atomiques indépendantes de la présence ou non d'un équilibre avec le corps noir. Le fait qu'on puisse avoir équilibre avec un corps noir à toute température impose une relation entre ces coefficients. On trouve deux relations exprimant l'égalité des termes en $\exp(\beta h\nu)$ d'une part et des termes sans $\exp(\beta h\nu)$ d'autre part ; d'où (lois de Einstein) :

$$A_{21} = B_{21} \Lambda \nu^3 \quad B_{21} = B_{12} \tag{5.4}$$

• *étape 2.0.* Probabilité d'absorption stimulée. On étudie ici le coefficient B_{12} . On suppose que l'on connaît les niveaux d'énergies E_1 et E_2 et les fonctions d'ondes correspondantes ψ_1 et ψ_2 des atomes/molécules constituant le corps noir. Pour déterminer la probabilité de transition, on représente les ondes lumineuses par un champ électrostatique oscillant à la fréquence ν avec une amplitude \mathcal{E} et uniforme dans le domaine spatial des atomes/molécules considérées et on évalue leur effet par la théorie des perturbation dépendant du temps[71]. Elle montre que l'effet de l'onde lumineuse est de faire passer le système de l'état initial d'énergie E_1 à l'état final

d'énergie E_2 avec une probabilité dépendant du temps

$$P_{12}(t) = \frac{1}{\hbar^2} \left| \int_{0,t} \exp(2i\pi\nu t') W_{12}(t') dt' \right|^2 \quad (5.5)$$

où W_{12} est l'élément de matrice de la perturbation entre les fonctions d'ondes ψ_1 et ψ_2 ; on a $W_{12} = a d_{12}$ où a est une force fonction du temps représentant une force oscillante avec une amplitude proportionnelle à \mathcal{E} et où d_{12} est le moment dipolaire de transition : $d_{12} = \langle \psi_1, r \psi_2 \rangle$ où r est l'opérateur position. On voit sur l'eq.(5.5) que la probabilité de transition à la limite $t \rightarrow \infty$ est le module au carré de la transformée de Fourier de W_{12} (en prolongeant convenablement W_{12} pour les $t < 0$); elle est donc égale à l'intégrale sur t de $|W_{12}(t)|^2$ et donc au produit de deux facteurs :

$$P_{12}(\infty) = d_{12}^2 \bar{W} \quad (5.6)$$

où le premier facteur, carré du moment dipolaire de transition, dépend de l'atome/molécule considérée et pas des photons et le second \bar{W} est indépendant de l'atome/molécule mais dépend des photons et en particulier de la forme du pulse (ce qui est le cas ici puisqu'on étudie une évolution dans le temps).

Conclusion de la section 3.1 : la probabilité de conversion radiative A_{21} est proportionnelle à B_{21} (absorption spontanée) qui est égale à B_{12} (absorption induite), eq.(5.4). Par ailleurs B_{12} est proportionnel au carré du moment dipolaire de transition. Finalement, en comparant les eqs.(5.4) et (5.6) on trouve

$$A_{21} = \Gamma \Delta E^3 \times d^2$$

où Γ est une constante (dont la dimension est telle que celle de A_{21} soit l'inverse d'un temps) indépendante de l'atome/molécule considérée et que l'on peut déterminer empiriquement.

5.3.2 Zone de conversion radiative

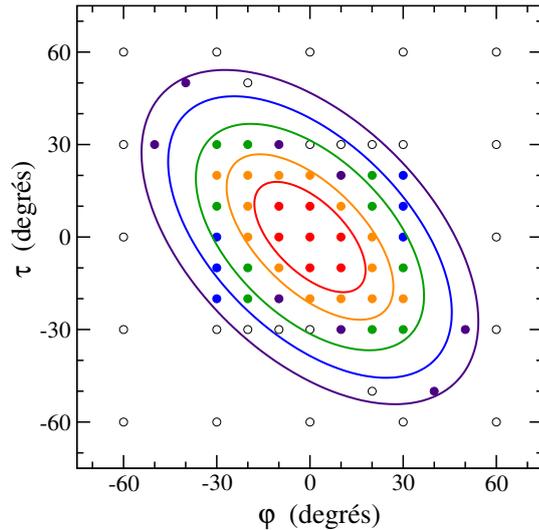
On utilise

$$P \propto \Delta E^3 d^2 \quad (5.7)$$

où ΔE est l'énergie de transition et d le vecteur dipole de transition et on évalue P à l'aide des valeurs de ΔE et de d issues des calculs CASPT2 du chromophore dans le vide[4]. On en déduit une probabilité relative (ramenée à la valeur 1 pour la géométrie plane) en fonction des angles φ et τ :

$$P(\varphi, \tau) = [\Delta E^3 dip^2]_{\varphi, \tau} / [\Delta E^3 dip^2]_{0,0} \quad (5.8)$$

Les valeurs obtenues sont représentées sur la fig. 5.4.



zone	moyennes et écarts types des probabilités relatives	
intérieur de l'ellipse rouge	.95	0.026
orangée	.78	0.072
verte	.39	0.20
bleue	.28	0.16
indigo	.15	0.11
extérieur des 5 ellipses	.023	0.026

FIGURE 5.4 – Valeurs des probabilités de fluorescence déduite des calculs CASPT2[3] à l'aide de l'éq.(5.8)

à gauche : valeurs de P obtenues pour les géométries où un calcul CASPT2 a été fait et ellipses délimitant les zones où P prend différents ordres de grandeurs ;

à droite : code couleur des ellipses et des points du cadre de gauche.

Résultats :

- en dehors du carré $-60^\circ \leq \varphi, \tau \leq 60^\circ$ la probabilité relative est pratiquement nulle ($\ll 0.1$) ;
- on peut trouver des ellipses limitant 6 zones où la probabilité relative est à peu près constante ;

- dans un premier temps on se contente de l'approximation que la probabilité relative vaut 1 à l'intérieur de la sphère la plus externe de la figure 5.4 (sphère de couleur indigo) et zéro à l'extérieur.

Remarque : la comparaison des résultats des sections 2 et 3.2 fait apparaître deux points importants :

- les probabilité de transition radiative et non radiative ne sont jamais non nulles en même temps : la probabilité de transition radiative est non nulle autour de la géométrie plane, et la probabilité de transition non radiative est non nulle autour des géométries perpendiculaires (les points $\varphi = 0, |\tau| = 90^\circ$ ou $|\varphi| = 90^\circ, \tau = 0$) ;

- dans chacune de ces deux zones, on va considérer, en première approximation, que la probabilité correspondante est constante.

5.4 Résultats

Soit $S_1(t)$ le nombre de chromophores encore à l'état excité au temps t , $R(t)$ le nombre de photons émis et $N(t)$ le nombre de conversions internes qui ont eu lieu. On pose

$$\begin{aligned}\dot{S}_1 &= -p_S(t) S_1(t) \\ \dot{R} &= p_r(t) S_1(t) \\ \dot{N} &= p_{nr}(t) S_1(t)\end{aligned}$$

où les fonctions du temps p_S , p_r et p_{nr} sont des densités de probabilité *ad hoc*. La conservation du nombre de molécules implique

$$p_S = p_r + p_{nr}$$

On suppose, *hypothèse 1*, (cf. les § précédents) que les fonctions p_r et p_{nr} ne prennent chacune que 2 valeurs, respectivement 0 ou k_r et 0 ou k_{nr} comme schématisé sur la figure 5.5

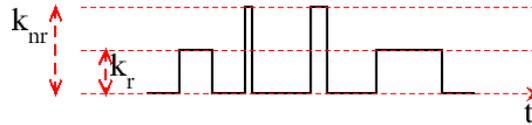


FIGURE 5.5 – Types de graphes attendus pour p_r et p_{nr} et résultant de l'hypothèse 1

On suppose de plus, *hypothèse 2*, (cf. également les § précédents) que p_r et p_{nr} ne sont jamais non nuls en même temps. Il en résulte

$$\begin{aligned}-\text{Ln}(S_1) &= \int_{t:p_r \neq 0} k_r dt + \int_{t:p_{nr} \neq 0} k_{nr} dt \\ &= k_r t_r + k_{nr} t_{nr}\end{aligned}$$

où t_r et t_{nr} représentent la durée totale des intervalles de temps où, respectivement, k_r et k_{nr} ne sont pas nuls (ces deux intervalles dépendent de la durée totale de la simulation).

On obtient :

$$S_1(t) = S_1(0) \exp(-k_r t_r - k_{nr} t_{nr})$$

La figure 5.6 montrent les valeurs prises par l'angle de torsion τ en fonction de φ obtenues au cours des simulations de la GFP et de la YFP à l'état S_1 . On voit que les zones de conversion non radiative sont nettement moins peuplées que les zones de conversion radiative.

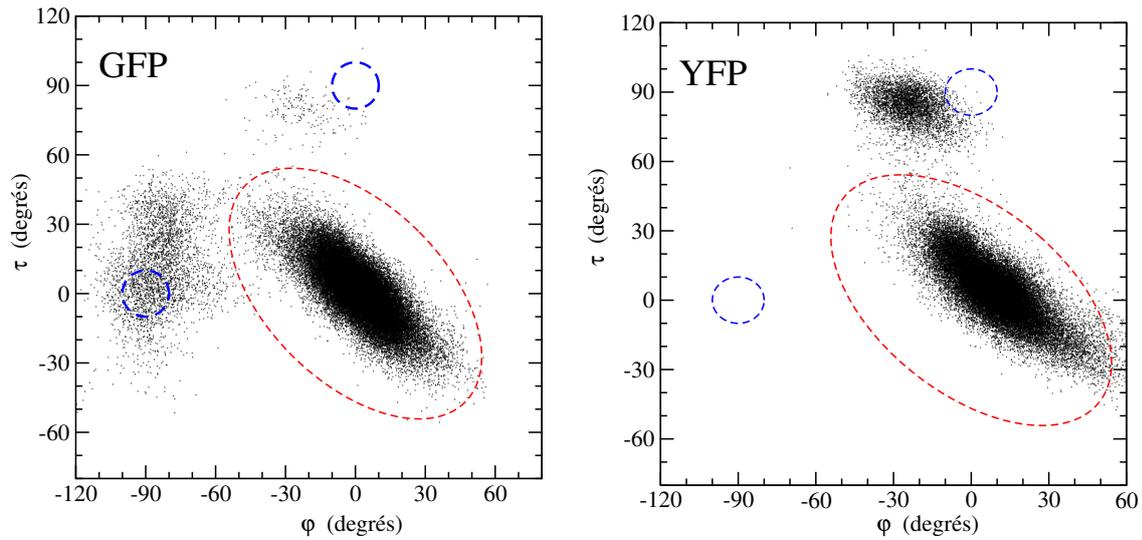


FIGURE 5.6 – Corrélation entre les angles τ et φ au cours des simulations à l'état S_1 de la GFP et de la YFP. L'ellipse rouge entoure la zone de conversion radiative, les cercles bleus entourent les zones de conversion non radiative.

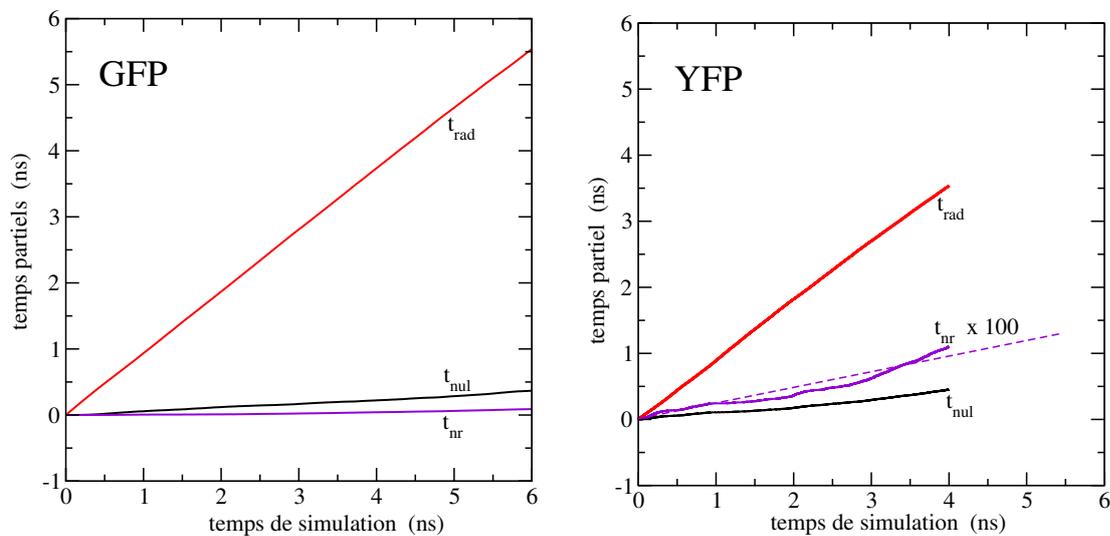


FIGURE 5.7 – Valeurs de t_r et de t_{nr} obtenus par simulation dans la GFP (47 simulations de 6 ns chacune) et dans la YFP (20 simulation de 4 ns chacune)

Les valeurs de t_r et t_{nr} obtenues au cours des mêmes simulations sont montrées sur la figure 5.7. On voit que t_r et t_{nr} varient de façon quasi linéaire avec le temps (et aussi que t_{nr} est très petit, particulièrement pour la YFP) ce qui conduit à une troisième hypothèse :

On suppose maintenant, *hypothèse 3*, que t_r/t et t_{nr}/t sont indépendant du temps, ceci nous

permet de définir deux nouvelles constantes \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} par les relations :

$$\begin{aligned}\bar{k}_r &= k_r t_r / t \\ \bar{k}_{nr} &= k_{nr} t_{nr} / t\end{aligned}$$

On a alors

$$S_1(t) = S_1(0) \exp [-(\bar{k}_r + \bar{k}_{nr})t]$$

Ce qui est l'expression habituelle du déclin d'une population par désexcitation radiative et non radiative. La particularité ici est que les constantes \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} sont des produits de deux facteurs : k_r et k_{nr} qui ne dépendent, *a priori*, que du chromophore et t_r/t , t_{nr}/t (supposés indépendants du temps) qui dépendent de la protéine dans laquelle se trouve le chromophore.

On en déduit les relations habituelles entre le temps moyen de fluorescence τ_{fluo} et le rendement quantique de fluorescence ϕ :

$$\begin{aligned}\tau_{fluo} &= \frac{1}{\bar{k}_r + \bar{k}_{nr}} \\ \phi &= \frac{\bar{k}_r}{\bar{k}_r + \bar{k}_{nr}}\end{aligned}$$

Les valeurs obtenues par simulation pour les rapports des temps sont : (cf. lafigure 5.7)

$$\begin{aligned}\text{GFP : } \quad \frac{t_r}{t} &= 0.92 & \frac{t_{nr}}{t} &= 0.015 \\ \text{YFP : } \quad \frac{t_r}{t} &= 0.89 & \frac{t_{nr}}{t} &= 0.023\end{aligned}$$

Nous allons utiliser le cas de la GFP comme référence et en déduire des valeurs pour \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} , puis pour k_r et k_{nr} qui sont supposées indépendantes du chromophore. Puis nous utiliserons ces valeurs de k_r et k_{nr} dans le cas de la YFP.

Expérimentalement, comme on a vu dans le chapitre 1, pour la GFP on a $\tau_{fluo} = 3.0$ ns et $\phi = 0.64$

On en déduit $\bar{k}_r = 0.21$ ns⁻¹ et $\bar{k}_{nr} = 0.12$ ns⁻¹, puis $k_r = 0.22$ ns⁻¹ et $k_{nr} = 8.0$ ns⁻¹.

Partant de ces valeurs de k_r et k_{nr} , on calcule \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} pour la YFP. On obtient ainsi :

$$\begin{aligned}\bar{k}_r &= k_r t_r / t = 0.19 \text{ ns}^{-1} \\ \bar{k}_{nr} &= k_{nr} t_{nr} / t = 0.18 \text{ ns}^{-1}\end{aligned}$$

puis, utilisant ces valeurs on calcule $\tau_{fluo} = 2.7$ ns et $\phi = 0.51$. La comparaison avec les valeurs expérimentales pour la YFP ($\tau_{fluo} = 3.7$ ns et $\phi = 0.61$) est satisfaisante pour le rendement quantique, moins pour la durée de vie de fluorescence.

On peut également comparer les résultats de ce modèle pour la YFP à ce qui avait été obtenu dans les travaux précédents du groupe [4] et que nous avons rappelé au début de ce chapitre. La

valeur simulée pour τ_{nr} (l'inverse de k_{nr}) était 3.5 ns, nettement plus petit que la valeur tirée des résultats expérimentaux (9.4 ns). Avec ce nouveau modèle nous avons une amélioration significative puisque que nous obtenons une valeur égale à $\frac{1}{0.18}$ ns soit 5.5 ns.

Ce modèle pourra être perfectionné en affinant la représentation de la probabilité radiative : nous avons les valeurs de la probabilité pour de nombreux points de l'espace φ , τ et nous pouvons donc les interpoler par une fonction analytique. Il faudra également améliorer la représentation de la probabilité non radiative.

Conclusion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à approfondir l'étude du déclin de fluorescence de la protéine YFP selon deux axes : l'amélioration du champ de force décrivant les interactions de type empilement π entre le chromophore et une tyrosine d'une part, et d'autre part, la mise au point d'un modèle décrivant le processus de déclin de fluorescence. Ainsi, nous avons calculé au niveau SA2-CAS(4,3) PT2 l'interaction entre le chromophore anionique et un phénol dans des géométries de type empilement π avec deux bases différentes (6-31G* et 6-31+G*). Les positions relatives des deux molécules conjuguées les plus favorables énergétiquement ne correspondent pas à une superposition des deux cycles tout en donnant une stabilisation de l'ordre de 3 kcal/mole. Cela implique dans la protéine une compétition entre l'interaction chromophore-tyrosine et le réseau de liaisons hydrogène qui relie le chromophore et la tyrosine à d'autres résidus proches. La mise au point d'un nouveau champ de force interpolé sur les calculs quantiques permettra de mieux décrire cette compétition mais sans changer nécessairement la dynamique de torsion du chromophore dans les dynamiques moléculaires classiques de la YFP.

Par ailleurs, nous avons utilisé l'analyse des processus de changement d'état (radiatif ou non radiatif) développée dans le groupe ThéoSim. Elle permet de prendre en compte les variations des probabilités de conversion radiative ou non radiative en fonction des angles de torsion interne du chromophore. Appliqué au cas de la YFP sur la base de simulations moléculaires faites avec un champ de force de type AMBER, ce modèle de déclin de fluorescence par zone donne un rendement quantique et un temps de déclin de fluorescence en accord raisonnable avec les valeurs expérimentales.

Cette première approche pourra être améliorée en affinant la description des zones où se produit l'un ou l'autre des processus de désexcitation. Ce modèle ouvre la voie à une détermination rapide du temps de vie de fluorescence et du rendement quantique pour de nouvelles protéines fluorescentes sur la base de simulations moléculaires classiques.

Bibliographie

- [1] Andrew B CUBITT, Roger HEIM, Stephen R ADAMS, Aileen E BOYD, Larry A GROSS et Roger Y TSIEN : Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences*, 20(11):448–455, 1995.
- [2] S Brøndsted NIELSEN, A LAPIERRE, Jens Ulrik ANDERSEN, UV PEDERSEN, S TOMITA et LH ANDERSEN : Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore anion in vacuo. *Physical review letters*, 87(22):228102, 2001.
- [3] Gabriella JONASSON, Jean-Marie TEULER, Germain VALLVERDU, Fabienne MÉROLA, Jacqueline RIDARD, Bernard LÉVY et 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.
- [4] Gabriella JONASSON : *Etude théorique de l'extinction de fluorescence des protéines fluorescentes : champ de forces, mécanisme moléculaire et modèle cinétique*. Thèse de doctorat, Paris 11, 2012.
- [5] María Elena MARTIN, Fabrizia NEGRI et 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.
- [6] Osamu SHIMOMURA, Frank H JOHNSON et 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.
- [7] Douglas C PRASHER, Virginia K ECKENRODE, William W WARD, Frank G PRENDERGAST et Milton J CORMIER : Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, 1992.
- [8] Martin CHALFIE, Yuan TU, Ghia EUSKIRCHEN, William W WARD et Douglas C PRASHER : Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148): 802–805, 1994.
- [9] Frank H JOHNSON, Osamu SHIMOMURA, Yo SAIGA, Lewis C GERSHMAN, George T REYNOLDS et John R WATERS : Quantum efficiency of cypridina luminescence, with a

- note on that of aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 60(1):85–103, 1962.
- [10] Roger Y TSIEN : The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1): 509–544, 1998.
- [11] Lei WANG, W Coyt JACKSON, Paul A STEINBACH et Roger Y TSIEN : Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48):16745–16749, 2004.
- [12] Nathan C SHANER, Robert E CAMPBELL, Paul A STEINBACH, Ben NG GIEPMANS, Amy E PALMER et Roger Y TSIEN : Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12):1567–1572, 2004.
- [13] Anya SALIH, Anthony LARKUM, Guy COX, Michael KÜHL et Ove HOEGH-GULDBERG : Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408(6814):850–853, 2000.
- [14] Dimitri D DEHEYN, Kaoru KUBOKAWA, James K MCCARTHY, Akio MURAKAMI, Magali PORRACHIA, Greg W ROUSE et Nicholas D HOLLAND : Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus. *The Biological Bulletin*, 213(2):95–100, 2007.
- [15] Nina JÄHRLING et Saiedeh SAGHAFI : Ultramicroscopy—a novel light sheet based imaging technique created by various research disciplines. *e & i Elektrotechnik und Informations-technik*, 128(10):352–358, 2011.
- [16] Alexander N GUBIN, Bindu REDDY, Joyce M NJOROGE et Jeffery L MILLER : Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 236(2):347–350, 1997.
- [17] David W PISTON et Gert-Jan KREMERS : Fluorescent protein FRET : the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences*, 32(9):407–414, 2007.
- [18] Th FÖRSTER : Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [19] Jennifer A SNIEGOWSKI, Jason W LAPPE, Hetal N PATEL, Holly A HUFFMAN et Rebekka M WACHTER : Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28):26248–26255, 2005.
- [20] Timothy I WOOD, David P BARONDEAU, Chiharu HITOMI, Carey J KASSMANN, John A TAINER et Elizabeth D GETZOFF : Defining the role of arginine 96 in green fluorescent protein fluorophore biosynthesis. *Biochemistry*, 44(49):16211–16220, 2005.

- [21] William W WARD, Hugh J PRENTICE, Amy F ROTH, Chris W CODY et Sue C REEVES : Spectral perturbations of the aequorea green-fluorescent protein. *Photochemistry and photobiology*, 35(6):803–808, 1982.
- [22] Katjuša BREJC, Titia K SIXMA, Paul A KITTS, Steven R KAIN, Roger Y TSIEN, Mats ORMÖ et S James REMINGTON : Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6):2306–2311, 1997.
- [23] Mita CHATTORAJ, Brett A KING, Gerold U BUBLITZ et Steven G BOXER : Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein : multiple states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16):8362–8367, 1996.
- [24] Fabienne MEROLA, Bernard LEVY, Isabelle DEMACHY et Helene PASQUIER : Photophysics and spectroscopy of fluorophores in the green fluorescent protein family. In *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I*, pages 347–383. Springer, 2010.
- [25] Mats ORMÖ, Andrew B CUBITT, Karen KALLIO, Larry A GROSS, Roger Y TSIEN et S James REMINGTON : Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273(5280):1392–1395, 1996.
- [26] Rebekka M WACHTER, Marc-André ELSLIGER, Karen KALLIO, George T HANSON et S James REMINGTON : Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, 6(10):1267–1277, 1998.
- [27] Pierre HOHENBERG et Walter KOHN : Inhomogeneous electron gas. *Physical review*, 136(3B):B864, 1964.
- [28] Walter KOHN et Lu Jeu SHAM : Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140(4A):A1133, 1965.
- [29] S.F. BOYS et F. BERNARDI : The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. some procedures with reduced errors. *Molecular Physics*, 19(4):553–566, 1970.
- [30] Erwin SCHRÖDINGER : Über das verhältnis der heisenberg-born-jordanschen quantenmechanik zu der meinem. *Annalen der Physik*, 384(8):734–756, 1926.
- [31] Max BORN et Robert OPPENHEIMER : Zur quantentheorie der molekeln. *Annalen der Physik*, 389(20):457–484, 1927.
- [32] Douglas R HARTREE : The wave mechanics of an atom with a non-coulomb central field. part i. theory and methods. In *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, volume 24, pages 89–110. Cambridge Univ Press, 1928.

- [33] V FOCK : Näherungsmethode zur lösung des quantenmechanischen mehrkörperproblems. *Zeitschrift für Physik*, 61(1-2):126–148, 1930.
- [34] JC SLATER : The theory of complex spectra. *Physical Review*, 34(10):1293, 1929.
- [35] Clemens Carel Johannes Roothaan : New developments in molecular orbital theory. *Reviews of modern physics*, 23(2):69, 1951.
- [36] George G HALL : The molecular orbital theory of chemical valency. viii. a method of calculating ionization potentials. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 205(1083):541–552, 1951.
- [37] Werner KUTZELNIGG : Friedrich hund and chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(6):572–586, 1996.
- [38] Robert Sanderson MULLIKEN : *Spectroscopy, molecular orbitals, and chemical bonding*. Laboratory of Molecular Structure and Spectra, University of Chicago, 1967.
- [39] Per-Olov LÖWDIN : Quantum theory of many-particle systems. i. physical interpretations by means of density matrices, natural spin-orbitals, and convergence problems in the method of configurational interaction. *Physical Review*, 97(6):1474, 1955.
- [40] J. FRENKEL : *Wave Mechanics, Advanced General Theory*. Clarendon Press Oxford, 1934.
- [41] Per EM SIEGBAHN, Jan ALMLÖF, Anders HEIBERG et Björn O ROOS : The complete active space SCF (CASSCF) method in a newton–raphson formulation with application to the HNO molecule. *The Journal of Chemical Physics*, 74(4):2384–2396, 1981.
- [42] 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.
- [43] Klaus RUEDENBERG, Michael W SCHMIDT et Mary M GILBERT : Are atoms sic to molecular electronic wavefunctions ? ii. analysis of fors orbitals. *Chemical Physics*, 71(1): 51–64, 1982.
- [44] Klaus RUEDENBERG, Michael W SCHMIDT, Mary M GILBERT et ST ELBERT : Are atoms intrinsic to molecular electronic wavefunctions ? i. the FORS model. *Chemical Physics*, 71(1):41–49, 1982.
- [45] J.R. LAKOWICZ : *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum, 1999.
- [46] Douglas C PRASHER : Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, 11(8):320–323, 1995.

- [47] Hans-Hermann GERDES et Christoph KAETHER : Green fluorescent protein : applications in cell biology. *FEBS letters*, 389(1):44–47, 1996.
- [48] Roger HEIM, Douglas C PRASHER et Roger Y TSIEN : Wavelength mutations and post-translational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26):12501–12504, 1994.
- [49] Dmitriy M CHUDAKOV, Sergey LUKYANOV et Konstantin A LUKYANOV : Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in biotechnology*, 23(12):605–613, 2005.
- [50] Rebekka M WACHTER : The family of GFP-Like proteins : Structure, function, photophysics and biosensor applications. introduction and perspective. *Photochemistry and photobiology*, 82(2):339–344, 2006.
- [51] G Ulrich NIENHAUS et Jörg WIEDENMANN : Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins : perspectives for marker development. *ChemPhysChem*, 10(9-10):1369–1379, 2009.
- [52] Roger HEIM et Roger Y TSIEN : Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6(2):178–182, 1996.
- [53] Robi D MITRAA, Christopher M SILVAB et Douglas C YOUVANB : Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*, 173(13):17, 1996.
- [54] Atsushi MIYAWAKI, Juan LLOPIS, Roger HEIM, J Michael MCCAFFERY, Joseph A ADAMS, Mitsuhiko IKURA et Roger Y TSIEN : Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645):882–887, 1997.
- [55] Valerie A ROMOSER, Patricia M HINKLE et Anthony PERSECHINI : Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence a new class of fluorescent indicators. *Journal of biological chemistry*, 272(20):13270–13274, 1997.
- [56] IV POLYAKOV, BL GRIGORENKO, EM EPIFANOVSKY, AI KRYLOV et 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.
- [57] A TONIOLO, S OLSEN, L MANOHAR et TJ MARTINEZ : Conical intersection dynamics in solution : the chromophore of green fluorescent protein. *Faraday discussions*, 127:149–163, 2004.

- [58] Seth OLSEN et Sean C SMITH : Bond selection in the photoisomerization reaction of anionic green fluorescent protein and kindling fluorescent protein chromophore models. *Journal of the American Chemical Society*, 130(27):8677–8689, 2008.
- [59] Petra SCHWILLE, Susanne KUMMER, Ahmed A HEIKAL, WE MOERNER et Watt W WEBB : Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1):151–156, 2000.
- [60] Seth OLSEN et Ross H MCKENZIE : A diabatic three-state representation of photoisomerization in the green fluorescent protein chromophore. *The Journal of chemical physics*, 130(18):184302, 2009.
- [61] Seth OLSEN : A modified resonance-theoretic framework for structure- property relationships in a halochromic oxonol dye. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(4):1089–1103, 2010.
- [62] Benoit BRAIDA, Christof WALTER, Bernd ENGELS et Philippe C HIBERTY : A clear correlation between the diradical character of 1, 3-dipoles and their reactivity toward ethylene or acetylene. *Journal of the American Chemical Society*, 132(22):7631–7637, 2010.
- [63] H.-J. WERNER, P. J. KNOWLES, G. KNIZIA, F. R. MANBY, M. SCHÜTZ, P. CELANI, T. KORONA, R. LINDH, A. MITRUSHENKOV, G. RAUHUT, K. R. SHAMASUNDAR, T. B. ADLER, R. D. AMOS, A. BERNHARDSSON, A. BERNING, D. L. COOPER, M. J. O. DEEGAN, A. J. DOBBYN, F. ECKERT, E. GOLL, C. HAMPEL, A. HESSELMANN, G. HETZER, T. HRENAR, G. JANSEN, C. KÖPPL, Y. LIU, A. W. LLOYD, R. A. MATA, A. J. MAY, S. J. MCNICHOLAS, W. MEYER, M. E. MURA, A. NICKLASS, D. P. O'NEILL, P. PALMIERI, D. PENG, K. PFLÜGER, R. PITZER, M. REIHER, T. SHIOZAKI, H. STOLL, A. J. STONE, R. TARRONI, T. THORSTEINSSON et M. WANG : MOLPRO, version 2006.1, a package of ab initio programs, 2006. see.
- [64] Claudia FILIPPI, Maurizio ZACCHEDDU et Francesco BUDA : Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore : a difficult case for ab initio methods ? *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(8):2074–2087, 2009.
- [65] B.LEVY : *Spectral Line Shapes*. 1981.
- [66] Michael BAER : Adiabatic and diabatic representations for atom-molecule collisions : Treatment of the collinear arrangement. *Chemical Physics Letters*, 35(1):112–118, 1975.
- [67] Ludwig BOLTZMANN : *Über die mechanische Bedeutung des zweiten Hauptsatzes der Wärmetheorie :(vorgelegt in der Sitzung am 8. Februar 1866)*. Staatsdruckerei, 1866.
- [68] Max PLANCK : On an improvement of wiens equation for the spectrum. *Verh. Deut. Phys. Ges.*, 2:202–204, 1900.

-
- [69] MKEL PLANCK : Distribution of energy in the normal spectrum. *Verhandlungen der Deutschen Physikalischen Gesellschaft*, 2:237–245, 1900.
- [70] Albert EINSTEIN : Über einem die erzeugung und verwandlung des liches betreffenden heuristischen gesichtspunkt. *Annalen der Physik*, 4, 1905.
- [71] F.Laloë C.COHEN-TANNOUDJI, B.Diu : *Mécanique Quantique*. Hermann, 1973.

Appendix A

Article

A.1 Article 1



π -Stacking interactions in YFP, quantum mechanics and force field evaluations in the S_0 and S_1 states



Karim Elhadj Merabti^{a,b}, Sihem Azizi^a, Jacqueline Ridard^b, Bernard Lévy^b, Isabelle Demachy^{b,*}

^aLaboratoire de physique théorique, Université Abou Bekr Belkaid, 22 rue Abi Ayad Abdelkrim, B.P. 119 Tlemcen 13000, Algeria

^bLaboratoire de Chimie Physique, UMR 8000 CNRS/University Paris-Sud, University Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2017

In final form 10 July 2017

Available online 15 July 2017

Keywords:

GFP

YFP

π -Stacking

Quantum mechanics calculations

Classical force field

Molecular dynamics

ABSTRACT

We study the π -stacking interaction between the chromophore and Tyr203 in the Yellow Fluorescent Protein (YFP) in order to (i) evaluate the contribution of the internal interaction energy of the isolated Chromophore-Tyrosine complex (E_{int}) to the 26 nm red shift observed from GFP to YFP, (ii) compare the effects of E_{int} and of the proteic environment. To that end, we perform quantum mechanical and force field (*ff*) calculations of the isolated complex in S_0 and S_1 states on a large sample of geometries, together with molecular dynamics simulations and potential of mean force analysis. The calculated absorption wavelengths are found red shifted with respect to the isolated chromophore by 12–19 nm, that represents a large part of the GFP-YFP shift. We find that the effect of the protein is determinant on the dynamics of the complex while the error that results from using a classical *ff* is of limited effect.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

π -Stacking interactions are found frequently in biological systems like proteins. The resulting structure of the stacked complex is a compromise between the attraction of the two partners and the constraints coming from the protein (covalent bonds, hydrogen bonds, electrostatic effects, steric effects). We try here to evaluate the respective contributions of the two factors by comparing the results of quantum mechanics calculations of the interaction energy of the isolated complex with the results of molecular dynamics simulations of the whole protein, using the Yellow Fluorescent Protein (YFP) [1] as a test case.

In fact, among the Green Fluorescent Protein (GFP) family, the yellow variant YFP has a key role as one of the most widely used acceptors in Förster resonance energy transfer (FRET) applications in molecular biology [1,2], due to the red shift of the absorption and emission wavelengths with respect to GFP. In GFP-S65T the absorption wavelengths of the anionic chromophore is 488 nm [3] while it is 514 nm in YFP [4]. This 26 nm shift is usually ascribed to a π -stacking interaction between the chromophore (that part of the protein responsible for absorption and emission of visible light) and the phenol ring of a neighbour tyrosine (Tyr203, see Fig. 1) in YFP [4,5].

Recently, it has been clearly demonstrated that the shift in YFP comes from the combination of two effects, the π -stacking and the electrostatic interaction with the protein [6].

In addition, a large number of both experimental and theoretical studies on small dimers of aromatic rings in gas phase have characterised the intrinsic properties of π -stacking effects as subtle interactions [7–12] that require high level of calculations to be quantitatively described, especially when one partner is electronically excited [13–15].

Of course, if the stacked dimer is buried inside the protein the π -stacking conformations are dependent on geometrical constraints and on the global dynamics of the protein. These effects may be of the same order of magnitude or even greater than the π -stacking stabilisation. Thus, π -stacking analysis inside proteins requires an accurate calculation of the interaction energy of the stacked partners on a large sample of conformations and long molecular dynamics simulations based on a force field description of this interaction.

In this work we address also the question of the relevance of such an approach and particularly of the relevance of a force field description of stacked complexes. The reliability of classical force fields has been yet evaluated for complexes of aromatic aminoacid residues [7,9,10,16] but never for complexes involving aromatic molecules like fluorescent protein chromophores.

We performed accurate *ab initio* quantum mechanics calculations and classical force field calculations of the intermolecular interaction energy of the complex chromophore-tyrosine in the

* Corresponding author.

E-mail address: isabelle.demachy@u-psud.fr (I. Demachy).

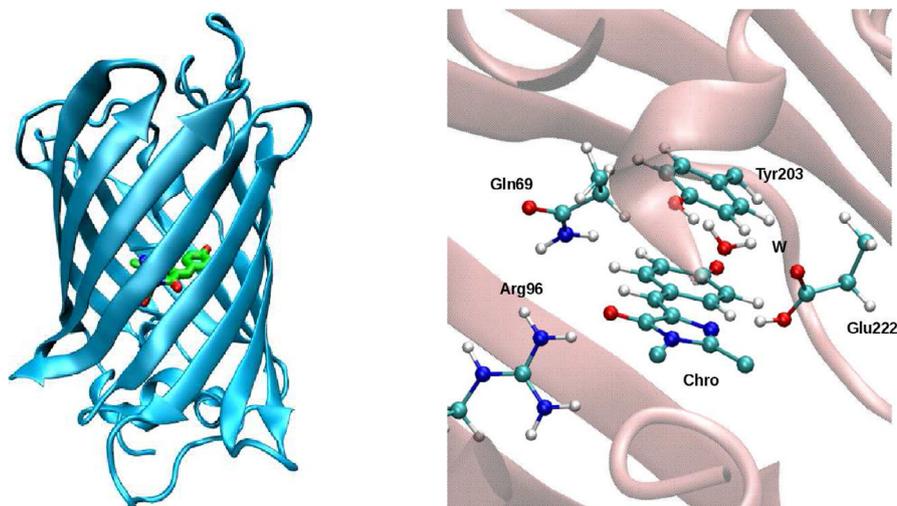


Fig. 1. Left: the overall structure of YFP. Right: the chromophore (Chro, aromatic part only), Tyr203 and the side chains of neighbouring amino-acids.

ground state S_0 and in the excited state S_1 , in a large sample of geometries that covers the ones explored in a standard force field molecular dynamics. All along this work the chromophore is taken in its anionic form (deprotonated at the phenolic oxygen). The π -stacking contribution to the absorption red shift observed between GFP and YFP is quantified. We compare the π -stacking energy landscapes in the S_0 and S_1 states, and examine the validity of a standard force field description. We analyse the effects of the internal forces of the complex and those of the proteic environment.

2. Methods

2.1. Molecular dynamics

Molecular dynamics (MD) calculations of the YFP protein with the chromophore in the electronic ground state were carried out using the AMBER 10 suite [17]. The starting coordinates were taken from the X-ray structure of Wachter et al. [4] in the Protein Data Bank. The protein was solvated in a water box. All titrable amino-acids were taken in their standard protonation state at neutral pH except Glu222 which was taken neutral in order to allow hydrogen bonding with the imidazolinone moiety of the chromophore.

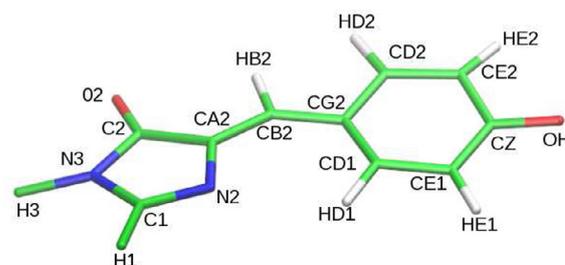
The AMBER 1999 force field was used for all standard amino acids. The chromophore force field as well as the initial equilibration protocol of the system (protein + solvent) are the same as those used in a preceding work in the case of GFP [18]. Point charges for the aromatic part of the chromophore are shown in Table 1.

A special attention was paid here to the orientation of the hydroxyl group OH of Tyr203. In the X-ray structure, the phenol oxygen of Tyr203 is H-bonded to a water molecule W, which is also H-bonded to Glu222 (see Fig. 1, right). Two short simulations were run with the OH group pointing in either direction. Finally the geometry with OH pointing towards W was retained because it leads to a strong Tyr203–W–Glu222 cluster (% of existence of the H-bond equal to 93% for Tyr203–W and 92% for W–Glu222), in agreement with the X-ray structure, while these percentages are much smaller with the opposite direction of the OH group.

Then a 12 ns-long simulation with constant temperature (300 K) and pressure (1 atm) was run.

Table 1

Charges (ua) of the chromophore (HBI) in the ground and excited states.



	S_0	S_1
<i>Imidazolinone</i>		
C1	+0.1318	+0.1226
N2	-0.4101	-0.4976
CA2	-0.0307	+0.1595
C2	+0.3785	+0.4051
O2	-0.5789	-0.5711
N3	+0.0683	+0.0392
H1	-0.0408	-0.0514
H3	-0.0289	-0.0197
Sum	-0.5108	-0.4139
Difference $q(S_1)-q(S_0)$		+0.0974
<i>Bridge</i>		
CB2	-0.1238	-0.3601
HB2	+0.1293	+0.1346
Sum	+0.0055	-0.2255
Sifference		-0.2200
<i>Phenolate</i>		
CG2	+0.0034	+0.2211
CD1,CD2	-0.1225	-0.2391
HD1,HD2	+0.1457	+0.1665
CE1,CE2	-0.4186	-0.3364
HE1,HE2	+0.1416	+0.1372
CZ	+0.7125	+0.6509
OH	-0.7032	-0.6894
sum	-0.4949	-0.3610
difference		+0.1339

2.2. Force field intermolecular energy.

Evaluation of the interaction energy between the chromophore and Tyr203 was performed in the force field (ff) approximation.

The anionic chromophore (Chro) is limited to its conjugated part capped by hydrogen atoms (*p*-hydroxybenzylideneimidazolinone, HBI) and Tyr203 is represented by a phenol molecule. The interaction energy between the two moieties comprises a van der Waals (vdW) contribution and an electrostatic contribution. The vdW energy was obtained using the AMBER parameters for S_0 as well as for S_1 , so that it takes the same value for the two electronic states. Charges for HBI in the S_0 state were the same as those used in the MD simulations, the capping hydrogen atoms were attributed the total charges of the chains that link the aromatic part of the chromophore to the α -helix. The excited state charges were calculated using the same method as in [18]. The S_0 and S_1 charges values are given in Table 1. The global negative charge of the anionic chromophore is delocalised on both cycles and on the methylene bridge. A charge transfer of about 0.1 electron from both phenolate and imidazolinone cycles towards the bridge is observed upon excitation. Charges for the phenol molecule were obtained from the AMBER values for the tyrosine residue using the preceding method for the capping hydrogen charge.

2.3. Quantum mechanics

Quantum mechanics (QM) calculations of the Chro-Tyr complex, using the same model for each partner as for ff calculations, were carried out using the SA2-CAS(4,3)-PT2 level of theory (two states average multiconfiguration self-consistent field [19] calculation with a 4 electrons - 3 orbitals active space, followed by a second order perturbation correction). Such a highly correlated method is necessary to accurately calculate excited states of aromatic systems like the chromophore [18,20–23].

The 6–31 + G* basis set was used and the interaction energy was corrected for the basis set superposition error using the counterpoise method [24]. The Molpro package was used [25].

The internal geometries of the two partners were fixed at their optimised geometries: due to the very large number of calculations performed to explore the intermolecular energy surface, relaxation of the complex at each point would have been too computer time consuming.

3. Results

The relative position of the two partners is characterised as shown in Fig. 2. A cartesian frame Cxyz is attached to the chromophore phenolate ring: C is the center of the ring, the axis Cz is orthogonal to the ring. The position of the Tyr203 phenol center T is characterised by its coordinates X,Y,Z in the Cxyz frame. Introducing local axes Tx', Ty' and Tz' axis defined in a similar way as Cx, Cy,Cz allows to characterise the relative orientation of Tyr203 with

respect to the chromophore. Two different relative positions are shown in Fig. 2 (center and right parts).

3.1. Molecular dynamics

In the X-ray structure, the chromophore is unambiguously hydrogen-bonded to four partners: the phenolate oxygen to His148 and to a water molecule, the imidazolinone oxygen O2 to Arg96 and the imidazolinone nitrogen N2 to Glu222 (see Table 1 for the atom labels). These four H-bonds are well conserved all along the dynamics. In addition the side chain nitrogen atoms NE2 of two glutamine residues, Gln69 and Gln94, are located near the oxygen O2 of the chromophore in the X-ray structure and the NE2 atom of Gln69 is also near the hydroxyl oxygen atom (coined OH in the PDB structure) of Tyr203 (see Table 2). However no H-bonds between these partners can be unambiguously deduced from the X-ray structure. Concerning Gln69(NE2)-O2 the distance is favourable for an H-bond but the angle NE2-H-O2 is not (note that hydrogen atoms are not present in X-ray structures with moderate resolution, but concerning those of the NH2 group of glutamine their positions are determined by the planarity of the terminal group CONH2). Concerning Gln69(NE2)-Tyr203(OH) and Gln94(NE2)-O2 the angle is favourable but the distance is not.

It appears in the MD simulation that two of these three possible H-bonds are established most of the time, while Gln94(NE2)-O2 is very weak (See Table 2).

Thus the Chro-Tyr203 complex is implied in a H-bonds cluster Chro(O2)-Gln69-Tyr203-W-Glu222-Chro(N2) (see Fig. 1, right). It lies in a bulky proteic environment and the C α atoms of both partners are anchored to structured parts of the protein (α -helix for Chro, β -strand for Tyr203). Thus the protein environment is expected to strongly hinder large amplitude movements of one partner with respect to the other.

Concerning the position of the Tyr203 phenol ring with respect to the chromophore, average values and standard deviations of X,Y, Z and of the angles between the two local frames (the three angles like (Cx,Tx) referred as xx') are given in Table 3 together with their values in the X-ray structure.

Table 2

Hydrogen bonds. Columns a and b: distance (Å) between the two heavy atoms A,B and angle AHB (°) in the X-ray structure. Column c: percentage of existence in the S_0 MD simulation (criteria: distance ≤ 3.2 Å, angle $\geq 120^\circ$).

	a Distance	b Angle	c % existence
O2-Arg96	2.6	153	99
O2-Gln69(NE2)	3.0	100	75
O2-Gln94(NE2)	3.5	148	17
Gln69(NE2)-Tyr203(OH)	3.7	137	83

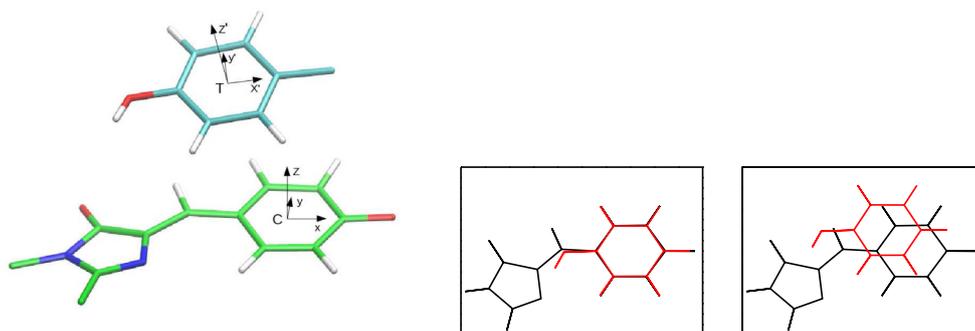


Fig. 2. The local frames used to characterise the relative position of Tyr203 and the chromophore (left). Two different conformations (projection in the Cxy plane): X = Y = 0.0 Å (center) and X = -1.0 Å, Y = +1.0 Å (right).

Table 3
Geometries of the complex Chro-Tyr203 in the X-ray structure of YFP and in the MD simulation. X,Y,Z: coordinates (Å) of the Tyr203 phenol center in the local frame of the chromophore (Fig. 2). xx' , yy' , zz' : angles (degrees) between the local axes of the two partners. MD results: average value \pm standard deviation.

	X	Y	Z	xx'	yy'	zz'
X-ray	-0.9	0.1	3.6	2	12	12
MD	-1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.5	3.4 ± 0.2	10 ± 5	13 ± 6	0 ± 11

Concerning the X and Z coordinates the average values in the MD simulation are close to the X-ray values, while the average value of Y and the X-ray value differ by about 1 Å. The values taken by the three angles show that the relative orientation of the two partners often differ from parallel orientation, however in order to deal with a reasonable number of geometries of the Chro-Tyr complex when exploring the energy surfaces we have chosen to consider only parallel conformations (the three angles equal to zero).

3.2. Force field intermolecular interaction energy surfaces

From the preceding results it was chosen to carry out the intermolecular energy calculations of the isolated Chro-Tyr complex in geometries characterised as follows:

- the two partners are parallel
- the coordinate X of the tyrosine phenol center in the local frame of the chromophore is varied from -3.0 Å to 1.0 Å, Y from -2.5 Å to 2.5 Å, with a 0.5 Å step. The Z coordinate whose fluctuations are significantly smaller in the MD values is restrained in a smaller interval and is given five values: 2.8, 3.0, 3.3, 3.6 and 3.9 Å.

This X, Y, Z grid covers the 95 % probability interval of the distribution (the interval that contains 95 % of the distribution) of each coordinate during the MD simulation, and includes the X-ray geometry.

The intermolecular potential energy of the complex in the S_0 and S_1 states as calculated in the force field approximation are repulsive for $Z=2.8$ Å and 3.0 Å except for $Y>1.0$ Å (See [Supplementary Information, SI](#), at the end of the manuscript). The intermolecular potential energy surface (PES) in the X,Y plane, with larger values of Z (3.0 Å and 3.3 Å) are shown in Fig. 3

for S_0 and in Fig. 4 for S_1 . The PES's with $Z=3.9$ Å are shown in the SI.

Looking at the ground state PES's (Fig. 3) it appears that the interaction energy is negative at all points of these surfaces, that have no minimum or maximum in the explored region. It is also the case for $Z=3.9$ Å but with a weaker attraction. The two PES's for $Z=3.3$ and 3.6 Å have very similar appearance and for given values of X,Y the energies with these two values of Z are very close to each other. The dependence on the X coordinate is very weak. The dependence on Y is stronger and corresponds to a force in the direction $Y>0$ at all points of the surfaces.

The molecular dynamics results (Table 3) can be discussed in light of these PES's. The geometries of the Chro-Tyr203 complex in the MD simulation stem from the competition between its internal force field and the protein constraints (covalent bonds, hydrogen bonds, electrostatic interactions, steric effects). The maximum Z value in the MD simulation is very similar to the most favourable value of the force field landscape. Since the PES's are very flat along the X coordinate, the peaked distribution around $X=-1.1$ Å observed in the simulation comes mainly from the protein constraints. In the Y direction, the maximum value of 1.3 Å in MD calculations results from two opposite forces: the internal force of the Chro-Tyr203 complex that favours distant positions of the two partners and the force exerted by the protein which is necessarily in the opposite direction.

The PES of the excited state are very similar to those of the ground state. The van der Waals contributions are strictly equal because the parameters were taken the same values as for S_0 . This is a weakness of this approach which should be corrected to properly describe the dispersion effects in the excited state. The electrostatic contributions of the two states are very similar although a non negligible charge transfer occurs upon excitation as seen above (Table 1). Nevertheless it is worth noting that this transfer may have a significant effect on the interaction with the proteic environment as was shown in the case of GFP [26].

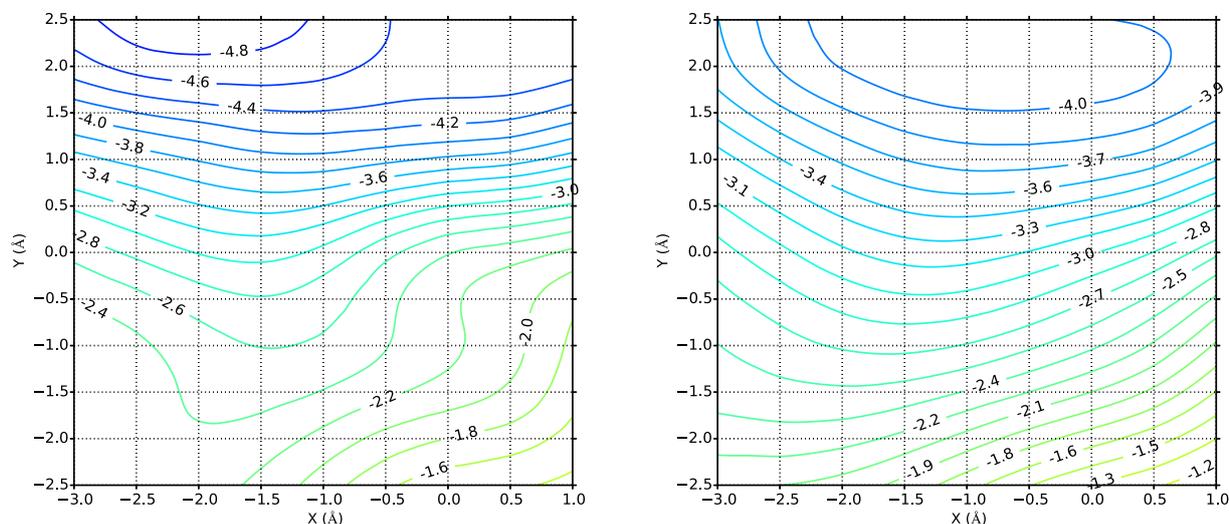


Fig. 3. Classical force field interaction energy surfaces (kcal/mol) of the complex Chro-Tyr in the S_0 state in the plane X,Y. The value of Z is equal to 3.3 Å (left) and 3.6 Å (right).

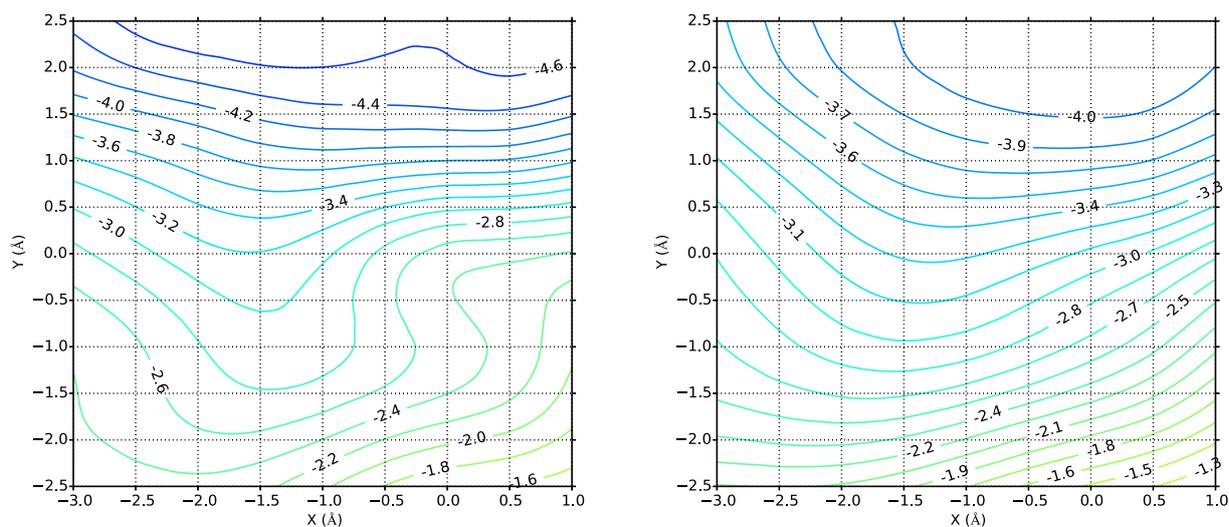


Fig. 4. Classical force field interaction energy surfaces (kcal/mol) of the complex Chro-Tyr in the S_1 state in the plane X,Y. The value of Z is equal to 3.3 Å (left) and 3.6 Å (right).

3.3. Quantum mechanics intermolecular interaction energy surfaces

The quantum mechanics calculations were performed on the same set of geometries as the force field calculations. The PES's with $Z = 3.9$ Å are shown in the SI. For both S_0 and S_1 states the PES's for $Z = 2.8$ Å and 3.0 Å are repulsive.

Ground state.

The energy surfaces of the Chro-Tyr complex in the S_0 state with Z equal to 3.3 Å and 3.6 Å are shown in Fig. 5. The zero of energy corresponds to the non interacting partners. The interaction energies are negative on the whole PES's. As in the force field calculations it is also the case for $Z = 3.9$ Å but with weaker values. The energy landscapes are more rugged than in the case of the force field. For $Z = 3.3$ Å a large attractive basin appears for positive Y values with a minimum (*i.e.* largest attraction) of ~ -3.0 kcal/mol for $Y = 2.0$ Å and $X = 0.25$ Å. The most attractive basin is for $Z = 3.6$ Å with an absolute minimum of -3.1 kcal/mol for $Z = 3.6$ Å, $X = 0.0$ Å and $Y = 2.0$ Å, but in fact the two basins are very similar. In addition, it is worth noticing that in the region of positive Y values the curves are nearly parallel to the X axis showing that the energy is weakly dependent on X, as in the ff approximation.

Excited state.

Concerning the S_1 state, it was first checked that it corresponds to an excitation of the chromophore. Calculating the energy differences between S_0 and S_1 in the whole set of geometries shows that they take values in the interval 2.3–2.7 eV, thus corresponding to visible absorption (450–540 nm). This is an evidence that the calculated S_1 state of the complex corresponds to an excitation of the chromophore, not of the phenol whose absorption is in the UV domain.

The S_1 state PES for Z equal to 3.3 Å and 3.6 Å are shown in Fig. 6. Whatever the geometry of the complex the interaction energy is more attractive by a few kcal/mol in the S_1 state than in the S_0 state, in agreement with the more polarisable nature of excited states compared to ground states. As for S_0 the energy landscape presents a rugged aspect. The absolute minimum is for $Z = 3.3$ Å, $X = 0.0$ Å, $Y = 1.8$ Å but the more attractive basin is obtained for $Z = 3.6$ Å, as in the case of the S_0 state. The energy profiles along Y, with $X = -1.0$ Å and $Z = 3.3$ Å or $Z = 3.6$ Å are presented in Fig. 7 showing an energy dependence of the S_1 state on Y weaker than the case of S_0 .

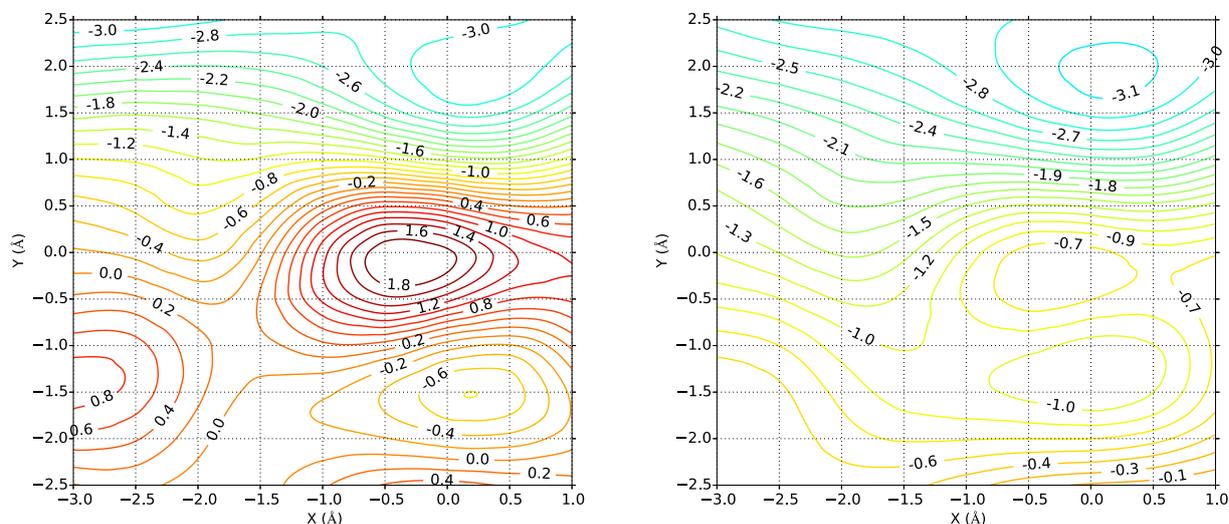


Fig. 5. Quantum mechanical interaction energy surfaces (kcal/mol) of the complex Chro-Tyr in the S_0 state in the plane X,Y. Left: $Z = 3.3$ Å. Right: $Z = 3.6$ Å.

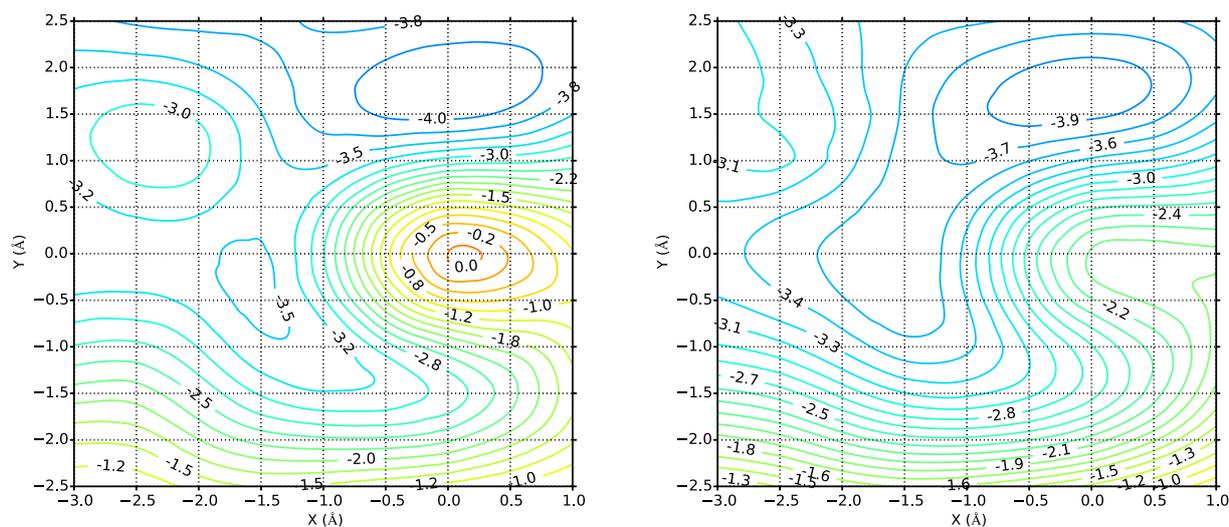


Fig. 6. Quantum mechanics interaction energy surfaces (kcal/mol) of the complex Chro-Tyr in the S_1 state in the plane X,Y. Left: $Z = 3.3 \text{ \AA}$. Right: $Z = 3.6 \text{ \AA}$

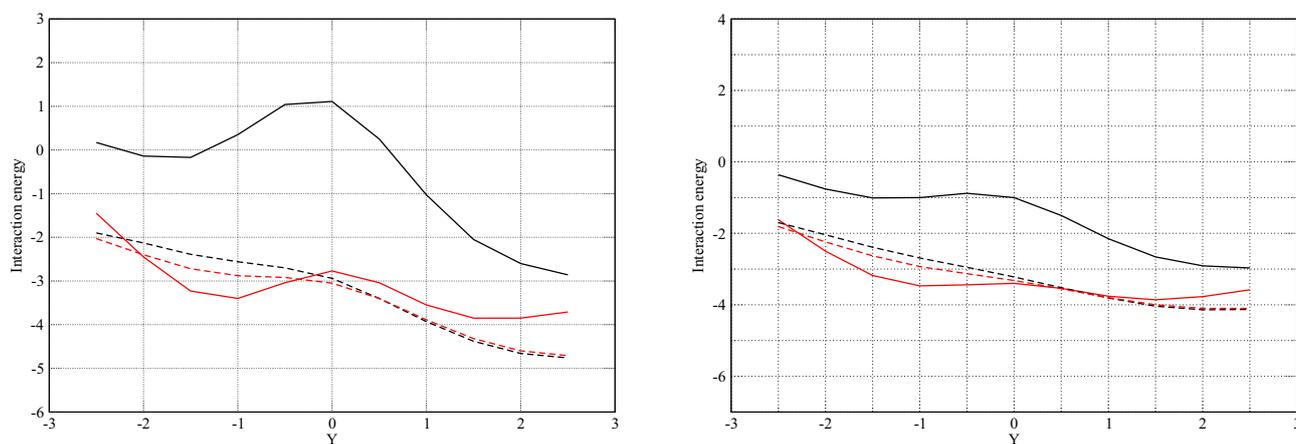


Fig. 7. Interaction energy (kcal/mol) as a function of Y (\AA) with $X = -1.0 \text{ \AA}$ and $Z = 3.3 \text{ \AA}$ (left) and $Z = 3.6 \text{ \AA}$ (right). Black: S_0 state, solid line: QM values, dashed: ff values. Red: S_1 state, same legend as S_0 .

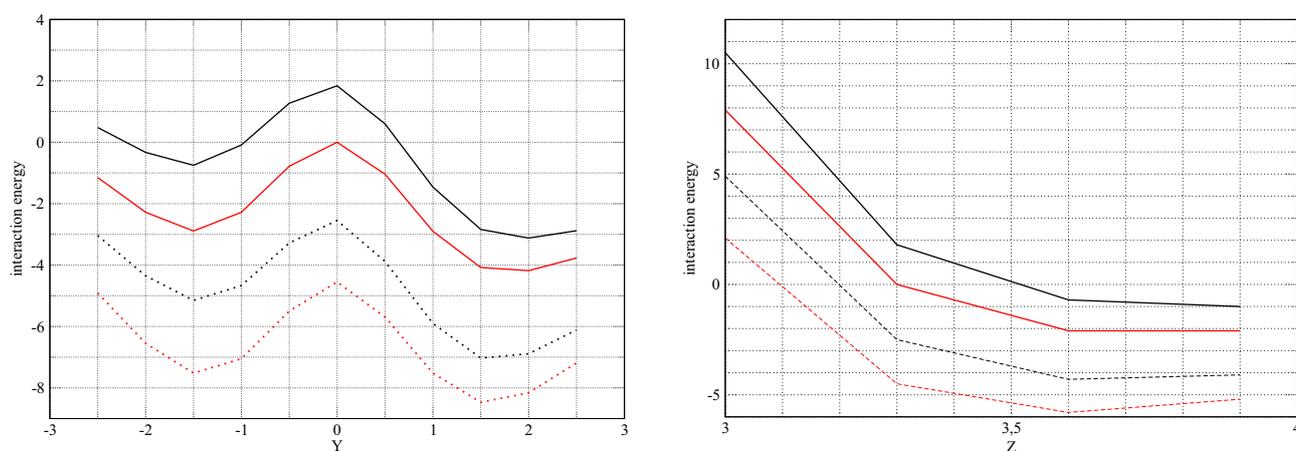


Fig. 8. Quantum mechanical interaction energy (kcal/mol). Black: S_0 state (solid line: with BSSE correction, dots: without BSSE correction). Red: S_1 state (solid line: with BSSE correction, dots: without BSSE correction). Left: as a function of Y (\AA) for $Z = 3.3 \text{ \AA}$ and $X = 0.0 \text{ \AA}$. Right: as a function of Z (\AA) for $X = 0.0 \text{ \AA}$ and $Y = 0.0 \text{ \AA}$.

BSSE correction. The BSSE correction contributes to the interaction energy by a few kcal/mol, and is very similar for the two electronic states. For a given value of Z it is weakly dependent of X and

Y . Fig. 8 (left) shows the interaction energy of S_0 and S_1 states with and without the BSSE correction as a function of Y , with Z and X fixed at the values 3.3 \AA and 0.0 \AA respectively. The curves are

almost parallel, so that the correction has no significant effect on the force along the Y coordinate. On the other hand it significantly affects the force along the Z coordinate. The BSSE effect for $X = Y = 0$ as a function of Z is shown in Fig. 8 (right). Calculating the force along Z for the S_0 state leads to the value 19 kcal/mol/Å with the correction and 15 kcal/mol/Å without the correction.

3.4. Absorption wavelength landscape

The absorption wavelengths λ deduced from the quantum mechanical S_0 and S_1 energy values are given in Fig. 9 which represents the contour lines of λ in the X,Y plane for $Z = 3.3$ Å and 3.6 Å. We can compare the values of Fig. 9 with the absorption wavelength calculated for the isolated chromophore at the same level of theory, namely $\lambda_0 = 449$ nm. It is seen that λ_0 is smaller than all the values calculated for the complex, which means that the interaction between the two partners results in a red shift whatever the geometry (in the considered geometry domain).

In addition, the absorption spectrum could be evaluated (in a classical mechanics approach) as an histogram of the absorption wavelengths found at different geometries G weighted by the square of the transition dipole moment at G and by the density probability of finding that geometry G. We have not evaluated the spectrum. However assuming that the considered geometries constitute a significant sample, our results imply that the maximum absorption wavelength of the complex is actually red shifted with respect to that of the isolated chromophore. We note that the assumption of a reasonable sampling is supported by the values in Table 3 which show that the two partners are nearly always in parallel planes and that the explored grid of X,Y,Z values includes 95% of the visited geometries.

Values of the red shift can be evaluated by interpolation for two geometries of particular interest, where the two molecules are still in parallel planes but with X,Y,Z values not in the grid of values presented in Fig. 9:

- the geometry characterised by the X,Y,Z values found in the X-ray structure ($X = -0.9$, $Y = 0.1$, $Z = 3.6$) where we find $\lambda \simeq 468$ nm i.e. with a 19 nm red shift with respect to the isolated chromophore;
- and the geometry characterised by the X,Y,Z values corresponding to the average geometry obtained in the MD simulation ($X = -1.1$, $Y = 1.3$, $Z = 3.4$) where λ is evaluated by

interpolation between the $Z = 3.3$ and $Z = 3.6$ surfaces, yielding the value $\lambda \simeq 465$ nm i.e. with a 15 nm red shift.

One may also express these results in terms of absorption energies. The experimental values are 2.54 eV (GFP) and 2.14 eV (YFP) resulting in a 0.13 eV shift. Our calculations give 2.76 eV (isolated chromophore), 2.65 eV (Chro-Tyr complex, X-ray structure), 2.67 eV (Chro-Tyr complex, average MD structure), resulting in an energy shift of respectively 0.11 eV and 0.09 eV (84 % and 69 % of the experimental value).

Thus we find that the interaction between the chromophore and Tyr203, in the crystallographic structure as well as in the average geometry of the MD simulation, contributes for a large part of the red shift observed from GFP to YFP. Remaining contributions are due to the different effects of the environment: deviations from the parallel conformations of the complex, interaction with the neighbouring amino acids. For instance Glu222 is H-bonded to the imidazolinone ring of the chromophore in YFP, not in GFP.

4. Discussion and conclusion

As mentioned at the beginning, we try to analyse the relative effects of the internal Chro-Tyr203 interaction and of the constraints exerted by the protein on the complex in the S_0 state, particularly the effects of changing the Chro-Tyr interaction from the ff approximation to the QM value.

To that end we use the Potential of Mean Force (PMF) [27] along the Y coordinate, deduced from the distribution of this coordinate.

The distribution of Y arising from the MD simulation turns out to be very close to a Gaussian distribution and is well represented by:

$$g(Y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp(-(Y - Y_0)^2 / 2\sigma^2)$$

$$Y_0 = 1.29 \text{ \AA}$$

$$\sigma = 0.56 \text{ \AA}$$

There is a general relationship between $g(Y)$ and the potential of mean force $F_0(Y)$. It writes, to within a constant [28]:

$$F_0(Y) = -k_B T \ln(g(Y))$$

where k_B is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature.

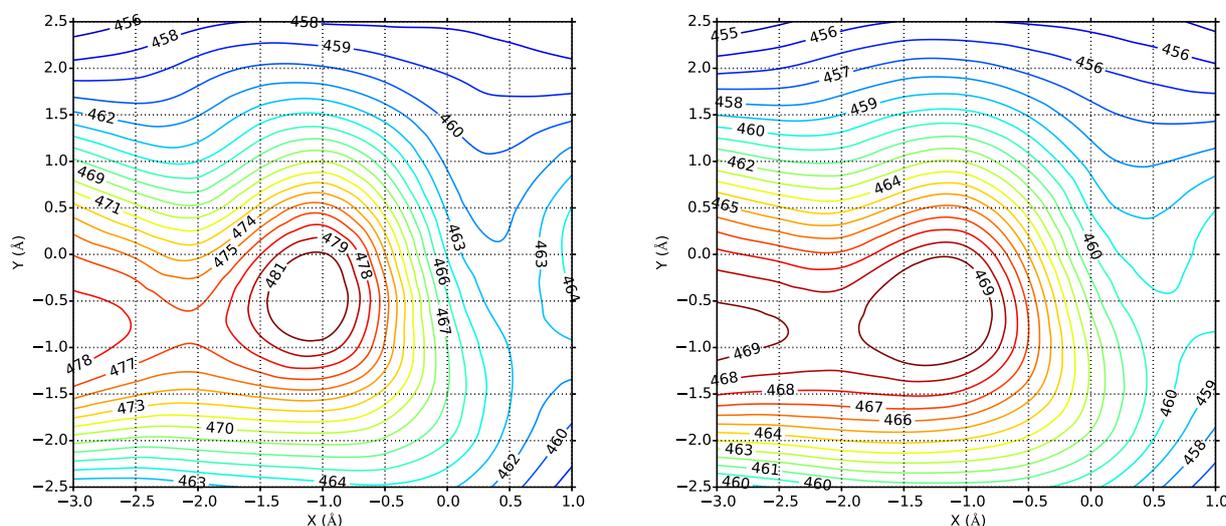


Fig. 9. Contour lines of the absorption wavelength (nm) in the X,Y plane. Left: $Z = 3.3$ Å. Right: $Z = 3.6$ Å.

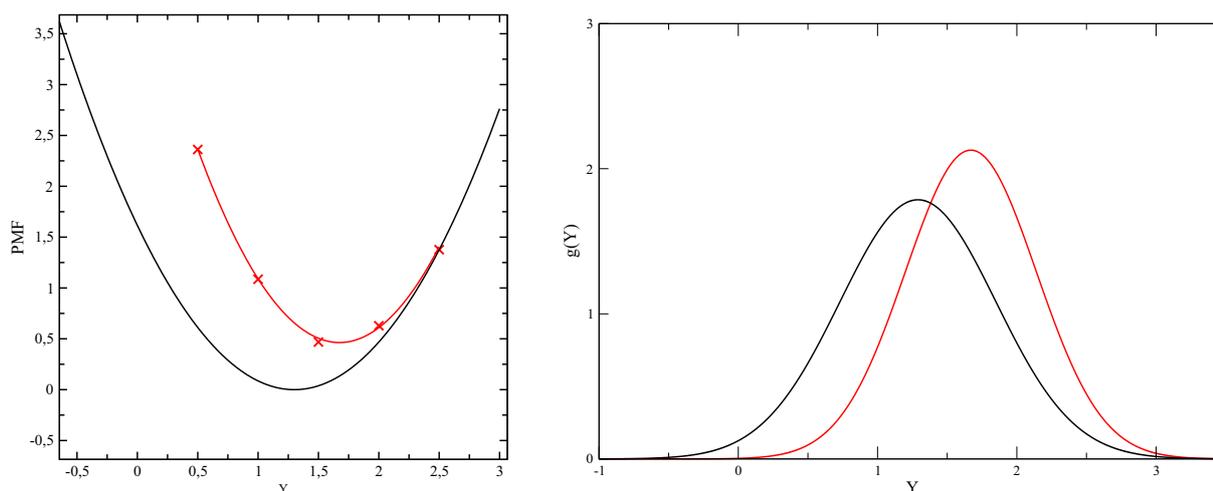


Fig. 10. Left: Potential of mean force (kcal/mol) of the coordinate $Y(\text{Å})$, black curve: from the MD simulation, red crosses: corrected values, red curve: fit of the red crosses. Right: the corresponding distributions (arbitrary unit) of Y .

Thus one obtains:

$$F_0(Y) = k_B T (Y - Y_0)^2 / 2\sigma^2$$

The functions $g(Y)$ and $F_0(Y)$ arising from the MD simulations are shown in Fig. 10 (black curves).

We assume now that changing the internal interaction energies along Y from the ff values to the QM values does not affect the constraints due to the protein. It follows that the actual PMF is just equal to the sum of the PMF deduced from MD simulations, $F_0(Y)$, and of the difference between the QM and ff direct interactions.

Fig. 7 (black lines) shows the energy profiles E_{QM} and E_{ff} along the Y coordinate with X equal to -1.0 Å and Z equal to 3.3 Å or 3.6 Å . We restrain our analysis to the 95% interval of Y in the MD simulation ($0.2 \text{ Å} < Y < 2.4 \text{ Å}$). If Z is equal to 3.6 Å , the two interaction energy curves obtained with the force field or the quantum calculations are nearly parallel in the interval of the Y coordinate. If Z is equal to 3.3 Å , the QM curve variations are much larger than the ones of the ff curve in the same interval of Y values. We use these curves to estimate the correction $E_{QM} - E_{ff}$ to be applied to F_0 . Five values have been corrected (red crosses, Fig. 10). These points are then fitted by a parabola, giving the corrected PMF that would be the result of molecular dynamics simulations realised with an adapted force field describing accurately the QM interaction potential energy of the Cro-Tyr complex in the S_0 state.

This PMF is more narrow than the initial one and its minimum is located at a larger value ($Y = 1.7 \text{ Å}$, instead of 1.3 Å). The initial MD distribution of Y , $g(Y)$, and the distribution associated with the corrected PMF are shown in Fig. 10 (right). They present a very large overlap and the corrected distribution remains included in the 95% interval of Y considered in this analysis.

The authors of [6] analyse the π -stacking effects of the complex Cro-Tyr203 by considering the total electrostatic interaction of the chromophore with the whole protein (including Tyr203) on one hand, and QM calculation of the $\pi - \pi$ interaction of the complex without the intra-complex electrostatic interactions, on the other hand. The present analysis is different and implies the total QM internal energy of the complex on one hand, and the electrostatic interaction of the complex with the rest of the protein on the other hand.

It appears here that changing the ff internal potential of the complex to the QM potential has a moderate effect on the geometric structure of the complex (the average value of the Y coordinate

increases by 0.4 Å). However a QM/MM approach would be required if a high accuracy is needed.

In addition, looking at Fig. 9 it appears that this structural change has a limited impact on the absorption wavelength of the chromophore: λ decreases from 465 nm in the mean MD structure ($X = -1.0 \text{ Å}$, $Y = 1.7 \text{ Å}$, $Z = 3.3 \text{ Å}$) to 462 nm when Y increases from 1.3 Å to 1.7 Å . The variation of λ upon geometry changes in the region allowed by the protein is very slow, which means that using a standard force field might be sufficient or not, depending of the observable of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2017.07.002>.

References

- [1] R.Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 509–544.
- [2] D.M. Chudakov, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *TRENDS Biotechnol.* 23 (2005) 605.
- [3] R. Heim, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, Improved green fluorescence, *Nature* 373 (1995) 663–664.
- [4] R.M. Wachter, M.A. Elsliger, K. Kallio, G.T. Hanson, S.J. Remington, Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein, *Structure* 6 (1998) 1267–1277.
- [5] G.U. Nienhaus, J. Wiedenmann, Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins: perspectives for marker development, *ChemPhysChem* 10 (2009) 1369–1379.
- [6] J.W. Park, Y.M. Rhee, Emission shaping in fluorescent proteins: role of electrostatics and π -stacking *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 3944–3955.
- [7] C. Chipot, R. Jaffe, B. Maigret, D.A. Pearlman, P.A. Kollman, Benzene dimer: a good model for π - π interactions in proteins? A comparison between the benzene and the toluene dimers in the gas phase and in an aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11217–11224.
- [8] C.A. Hunter, K.R. Lawson, J. Perkins, C.J. Urch, Aromatic interactions, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 651–669.
- [9] F.L. Gervasio, R. Chelli, P. Procacci, V. Schettino, The nature of intermolecular interactions between aromatic amino acid residues, *PROTEINS: Struct. Funct. Genet.* 48 (2002) 117–125.
- [10] R.S. Paton, M. Goodman J.M., Hydrogen bonding and π -stacking: how reliable are force fields? A critical evaluation of force field descriptions of nonbonded interactions, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 944–955.
- [11] J. Rezac, K.E. Riley, P. Hobza, S66: A well-balanced database of benchmark interaction energies relevant to biomolecular structures, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 2427–2438.
- [12] J.A. Frey, C. Holzer, W. Klopper, S. Leutwyler, Experimental and theoretical determination of dissociation energies of dispersion-dominated aromatic molecular complexes, *Chem. Rev.* 116 (2016) 5614–5641.

- [13] G. Olaso-González, D. Roca-Sanjuán, L. Serrano-Andrés, M. Merchána, Toward the understanding of DNA fluorescence: the singlet excimer of cytosine, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 231102.
- [14] T. Rocha-Rinza, L. De Vico, V. Veryazov, B.O. Roos, A theoretical study of singlet low-energy excited states of the benzene dimer, *Chem. Phys. Lett.* 426 (2006) 268–272.
- [15] R. Huenerbein, G. Grimme, Time-dependent density functional study of excimers and exciplexes of organic molecules, *Chem. Phys.* 343 (2008) 362–371.
- [16] A.V. Morozov, K.M.S. Misura, K. Tsemekhman, D. Baker, Comparison of quantum mechanics and molecular mechanics dimerization energy landscapes for pairs of ring-containing amino acids in proteins, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 8489–8496.
- [17] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvary, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, P.A. Kollman, AMBER 10, University of California, San Francisco, CA, 2008.
- [18] G. Jonasson, J.-M. Teuler, G. Vallverdu, F. Mrola, J. Ridard, B. Lévy, I. Demachy, Excited state dynamics of the green fluorescent protein on the nanosecond time scale, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 1990–1997.
- [19] B.O. Roos, P.R. Taylor, P.E.M. Siegbahn, A complete active space scf method (cassf) using a density matrix formulated super-ci approach, *Chem. Phys.* 48 (1980) 157–173.
- [20] M.E. Martin, F. Negri, M. Olivucci, Origin, nature, and fate of the fluorescent state of the green fluorescent protein chromophore at the CASPT2//CASSCF resolution, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5452–5464.
- [21] A. Toniolo, S. Olsen, L. Manohar, T.J. Martinez, Conical intersection dynamics in solution: the chromophore of Green Fluorescent Protein, *Faraday Discuss.* 127 (2004) 149–163.
- [22] S. Olsen, S.C. Smith, Bond selection in the photoisomerization reaction of anionic green fluorescent protein and kindling fluorescent protein chromophore models, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 8677–8689.
- [23] C. Filippi, M. Zacccheddu, F. Buda, *J. Chem. Theory Comput.* 5 (2009) 2074–2087.
- [24] S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Mol. Phys.* 19 (1970) 553–566.
- [25] Werner H.-J., Knowles P.J., Manby F.R., Schutz M., Celani P., Knizia G., Korona T., Lindh R., Mitrushenkov A., Rauhut G., Adler T.B., Amos R.D., Bernhardsson A., Berning A., Cooper D.L., Deegan M.J.O., Dobbyn A.J., Eckert F., Goll E., Hampel C., Hesselmann A., Hetzer G., Hrenar T., Jansen G., Koppl C., Liu Y., Lloyd A.W., Mata R.A., May A.J., McNicholas S.J., Meyer W., Mura M.E., Nicklass A., Palmieri P., Pflüger K., Pitzer R., Reiher M., Shiozaki T., Stoll H., Stone A.J., Tarroni R., Thorsteinsson T., Wang M., Wolf, A., MOLPRO, version 2006.1, University College Cardiff Consultants Limited: Cardiff, Wales, 2010.
- [26] J.W. Park, Y.M. Rhee, Electric field keeps chromophore planar and produces high yield fluorescence in green fluorescent protein, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 13619–13629.
- [27] D. Chandler, *Introduction to Modern Statistical Mechanics*, Oxford University Press, Inc., 1987.
- [28] J.A. Mc Cammon, S.C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, 1987.

A.2 Proceeding

π STACKING INTERACTION INVOLVING AN EXCITED STATE: TOWARDS A FORCE FIELD REPRESENTATION

Karim Merabti^{1,2,*}, Sihem Azizi¹, Isabelle Demachy², Bernard Lévy²
and Jacqueline Ridard²

¹Laboratoire de Physique Théorique, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie

²Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

*Corresponding author email: hadj.merabti@gmail.com

Abstract: The π stacking interaction is significantly different in the ground state and the excited state. Hence we need to modify the corresponding van der Waals parameter in the force field to be used in molecular dynamics. We evaluated the interaction energy between the chromophore and the tyrosine in the excited state with ab initio method quantum chemistry CASPT2. We intend to use the resulting force fields in the study of Yellow fluorescent Protein (YFP).

INTRODUCTION

Fluorescent proteins are naturally occurring substances in the jellyfish, corals, sea anemones and a few others [1,2]. They are used in the laboratory as probes capable of measuring the local pH, the temperature and the distance between proteins. They are also one of the possible carriers of ultra-microscopy [3]. The theoretical approaches combine methods of molecular dynamics and quantum chemistry to find new fluorescent proteins and understand the dynamics of the protein environment. This work presents a theoretical study of π -stacking interaction between the chromophore and a tyrosine in YFP (yellow fluorescent protein) [4], where the electronic transition energy is reduced compared to that of Green fluorescent Protein (GFP) due to the influence of the π stacking between the Chromophore and that Tyrosine. This type of interaction is poorly described in excited states by usual force fields. Our objective is to determine a specific force field to describe the effect of π stacking interactions on the dynamics of the excited chromophore in YFP and on the fluorescence properties.

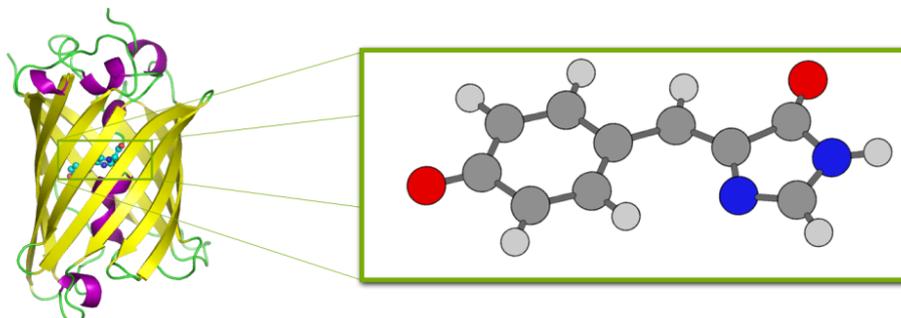


Figure 1. Left a fluorescent protein and right the chromophore (anionic form)

RESULTS AND DISCUSSION

- The xy axes of the system (Figure 2) are defined in the atoms of the chromophore and the z axis is perpendicular to the xy plane.

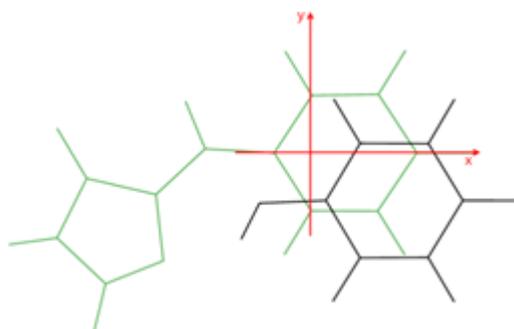


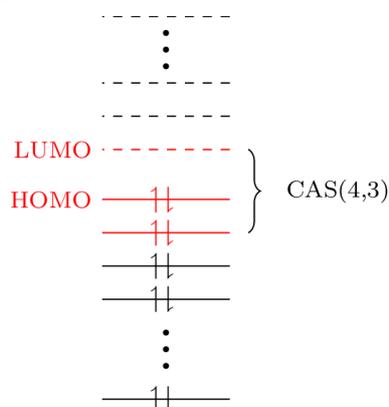
Figure 2. Geometry of the complex (Cro-Tyr) for $x = 1 \text{ \AA}$, $y = -1 \text{ \AA}$

Tyrosine is moved in the xy plane with a pitch of 0.5 \AA and for different distances z between the two rounds of 2.5 to 4 \AA , for all the movements of the Tyrosine we calculate the interaction energy.

Then, we interpolate the energy values to adjust the parameters of the force field to make a new molecular dynamics with force fields. Tyrosine is moved in the xy plane with a pitch of 0.5 \AA and for different distances z between the two rounds of 2.5 to 4 \AA , for all the movements of the Tyrosine we calculate the interaction energy. The interaction energy is calculated between two molecules (Chromophore and Tyrosine) with BSSE (Basis Set Superposition Error) 5 corrections by the approach of Counterpoise CP:

$$\Delta E = E(\text{cro+tyr}) - E^{\text{cp}}(\text{cro}) - E^{\text{cp}}(\text{tyr})$$

We calculated the energy with the 6-31G* basis set, by the CASPT2 [6,7] method (complete active space second-order perturbation theory). CASSCF calculations in a minimal active space (4 electrons and 3 orbitals) with geometry optimization in the state averaged approach SA2-CAS [4,3] were performed. This level of theory is compatible with a large number of calculations of energy [8]:



In the CASPT2 calculations, we have to consider carefully the number of active orbitals in the complex formed by the chromophore and the tyrosine. The active space has to be balanced regarding the ones of the separate systems.

Looking for intruder states: TDDFT calculations using localised orbitals provide evidence that both local excitations and electron transfer are present in the same energy range.

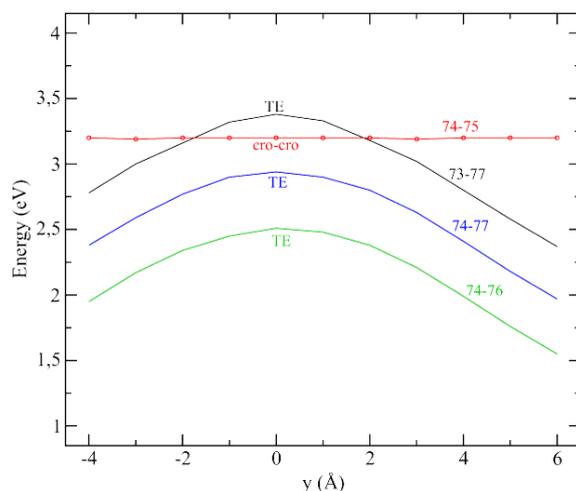


Figure 3. Energy transitions as a function of y with $x = 1 \text{ \AA}$ and $z = 3.5 \text{ \AA}$

However, we remark a crossing (74-75, 73-77) and the energy difference between the charge transfer and intermolecular excitation is large.

CONCLUSION

The pi-stacking may result in degeneracy between the local excited state and charge transfer; we need to define a minimal active space representing the degeneracy and as perspective, we will interpolated the energy values to adjust the parameters of the force field to make a new molecular dynamics with force fields.

REFERENCES

- [1] Tsien, R. Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67 (1), 509-544.
- [2] Wachter, R. M. The Family of GFP-Like Proteins: Structure, Function, Photophysics and Biosensor Applications. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, 82 (2), 339-344.
- [3] Nienhaus, K.; Ulrich Nienhaus, G. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem. Soc. Rev.*, The Royal Society of Chemistry **2014**, 43, 1088-1106.
- [4] Wachter, R. M. E. M.-A. . K. K. H. G. T. & R. S. J. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **1998**, 6, 1267-1277.
- [5] Boys, S. & B. F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Molecular Physics* **1970**, 19 (4), 553-566.
- [6] Werner, H.-J. *Mol. Phys* **1996**, 89, 645-661.
- [7] P. Celani and H.-J. Werner, *J. Chem. Phys* **2000**, 112, 5546.
- [8] Jonasson, G.; Teuler, J.-m.; Vallverdu, G.; Merola, F.; Ridard, J.; Levy, B.; Demachy, I. Excited State Dynamics of the Green Fluorescent Protein on the Nanosecond Time Scale. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2011**, 7, 1990-1997.

A.3 Article 2

Depuis juillet 2016, nous avons initié une collaboration avec l'équipe de chimie théorique du MSME de l'université de Marne la Vallée, Paris-Est. Cette collaboration porte sur les calculs des états électroniques du dication AlS^{2+} . Les principaux résultats sont exposés dans l'article présenté ci-après. Cette collaboration se continue avec l'étude des système CsS et CsS^-

Prediction of metastable AIS^{2+} dications in the gas phaseKarim Elhadj Merabti,¹ Bilel Mehnen,^{2,3} Sihem Azizi,¹ Saida Ben Yaghlane,³ Nejm Eddine Jaidane,³ Muneerah Mogren Al Mogren,⁴ and Majdi Hochlaf^{2,*}¹Laboratoire de Physique Théorique, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algeria²Université Paris-Est, Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Echelle, MSME UMR 8208 CNRS, 5 bd Descartes, 77454 Marne-la-Vallée, France³Laboratoire de Spectroscopie Atomique, Moléculaire et Applications LSAMA, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia⁴Chemistry Department, Faculty of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Kingdom of Saudi Arabia

(Received 5 January 2017; published 21 February 2017)

Using *ab initio* methodologies, we investigate the lowest electronic states of AIS^{2+} dications. These computations are performed using standard and explicitly correlated methods. Here we predict the metastability of this particular dication, where several potential wells are located. For the bound states, we report equilibrium distances and vibrational and rotational spectroscopic parameters. These computations show that the ground state of AIS^{2+} is of $^2\Sigma^-$ space symmetry. We also derive vertical and adiabatic charge-stripping energies of AIS^+ and vertical and adiabatic double-ionization energies of AIS. A comparison with the isovalent molecular species is carried out. Also, we show that the electronic properties of sulfur-containing dications cannot be predicted from those of the corresponding oxygenated dications.

DOI: [10.1103/PhysRevA.95.022508](https://doi.org/10.1103/PhysRevA.95.022508)**I. INTRODUCTION**

Molecular systems containing aluminum and their ions play important roles in fields of plasmas, surface sputtering, and solution, solid-state, interstellar, atmospheric, and environmental chemistry [1–5]. For instance, the AlCl , AlF , and AlO diatomics have already been detected in interstellar and/or in circumstellar media [6–11]. Several others are viewed as potentially detectable there. This is the case, for instance, of AIS since AlO (oxygen analog of AIS) is already detected together with several sulfur-containing species. In the literature, the AIS^q ($q = -1, 0, 1$) diatomics were widely studied both theoretically and experimentally (see, for instance, Refs. [12–18]). However, no data are found dealing with the AIS^{2+} dication, the subject of the present contribution.

The reviews dealing with gas-phase diatomic dications by Mathur [19], by Schröder and Schwarz [20], and more recently by Sabzyan *et al.* [21] highlighted the identification of several metastable AlX^{2+} doubly charged diatomics in the gas phase. These include AlH^{2+} [22–24], AlHe^{2+} [24], AlF^{2+} [25–27], AlCl^{2+} [27,28], AlO^{2+} [29–32], and AlN^{2+} [33]. These ions are formed, for instance, after energetic high-current ion beam sputtering of aluminum metal samples. Their metastability was confirmed after theoretical computations on their ground and electronic excited states. Therefore, the AIS^{2+} dication should be thermodynamically stable as demonstrated for its isovalent AlO^{2+} molecule and for other AlX^{2+} species. Such information is needed by experimentalists using mass spectrometry, who should be aware of the existence of stable AIS^{2+} as a possible mass interference. This includes the identification of cobalt impurities with atom probe (time-of-flight) mass spectrometry, and the analysis of trace amounts of the radioisotope nickel-59 with accelerator mass spectrometry, if more cost-efficient small accelerator systems with detection

of charge state $2+$ were to be used in the future. In addition, the existence of AIS^{2+} dications may help in understanding the atmospheric chemistry of meteoric Al^+ , still not well known, especially with sulfur [34]. In this context, Larsson *et al.* [35] showed recently that dication formation should not be ignored in planetary ionospheres, since these dications serve as intermediates to form the singly charged atoms. For instance, some of us showed that the existence of MgO^{2+} is necessary to explain the predominance of Mg^+ over the atmosphere [36].

At present, we treat the lowest electronic states of AIS^{2+} dications using post-Hartree-Fock configuration-interaction methods. These include standard and explicitly correlated coupled clusters and multireference configuration interaction approaches in conjunction with different basis sets. We deduce hence their potential energy curves which present relatively deep potential wells, where the long-lived AIS^{2+} doubly charged ion may be found. After nuclear motion treatment, we derive its vibrational and rotational spectroscopic parameters. We also give the double-ionization energy of AIS and the charge-stripping energy of AIS^+ . These spectroscopic and thermodynamical data are helpful for future experimental characterization of this dication.

II. COMPUTATIONAL APPROACHES

The electronic computations are performed using post-Hartree-Fock methodologies at the coupled cluster (with perturbative treatment of triple excitations) and multireference configuration-interaction (CI) levels as implemented in the MOLPRO (version 2015) [37] package. In both cases, we used the standard ((R)CCSD(T) [38–40] and MRCI [41–43]) and the explicitly correlated ((R)CCSD(T)-F12 [44–46] and MRCI-F12 [47,48]) versions. The multireference CI calculations are preceded by complete active space self-consistent field (CASSCF) [49,50] computations. In CASSCF, all valence electrons and orbitals were correlated and we averaged all electronic states having the same spin multiplicity with equal weights. In MRCI, all configurations of the CI expansion of

*hochlaf@univ-mlv.fr

TABLE I. Systematic studies of the $X^2\Sigma^-$, $1^2\Pi$, $1^2\Delta$, and $1^2\Sigma^+$ electronic states of $^{27}\text{Al}^{32}\text{S}^{2+}$. These data are obtained via the MRCI and MRCI-F12 approaches in conjunction with the aug-cc-pVXZ or the aug-cc-pV(X+d)Z basis sets and then extrapolated to the CBS limits. The full set of data is given in Table S1 of the Supplemental Material [76]. We give the equilibrium distances (r_e , in Å) and rotational (B_e , α_e , in cm^{-1}), vibrational (ω_e , $\omega_e X_e$, in cm^{-1}), and zero point vibrational energy (ZPE, cm^{-1}). We give also the adiabatic excitation energy (T_0 , in eV) with respect to the $\text{AlS}^{2+}(X^2\Sigma^-, \nu = 0)$ level.

Method	Basis set	r_e	ω_e	$\omega_e X_e$	B_e	α_e	ZPE	T_0
$\text{AlS}^{2+}(X^2\Sigma^-)$								
MRCI	aug-cc-pVXZ/CBS	2.449	337.9	1.91	0.191	0.00151	169.46	
	aug-cc-pV(X+d)Z/CBS	2.450	337.6	1.79	0.191	0.00151	169.28	
MRCI-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	2.449	338.4	1.96	0.191	0.00151	169.67	
$\text{AlS}^{2+}(1^2\Pi)$								
MRCI	aug-cc-pVXZ/CBS	2.174	438.7	2.07	0.243	0.00274	219.86	0.054
	aug-cc-pV(X+d)Z/CBS	2.176	437.0	1.61	0.242	0.00272	218.87	0.058
MRCI-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	2.175	443.6	4.23	0.242	0.00225	222.87	0.087
RCCSD(T)	aug-cc-pVXZ/CBS	2.167	452.9	4.34	0.245	0.00238	227.56	
RCCSD(T)-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	2.168	452.8	3.98	0.245	0.00237	227.41	
$\text{AlS}^{2+}(1^2\Delta)$								
MRCI	aug-cc-pVXZ/CBS	2.504	266.4	2.69	0.183	0.00259	133.74	0.893
	aug-cc-pV(X+d)Z/CBS	2.506	268.7	5.06	0.183	0.00258	135.56	0.892
MRCI-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	2.504	267.9	2.94	0.183	0.00258	134.58	0.889
$\text{AlS}^{2+}(1^2\Sigma^+)$								
MRCI	aug-cc-pVXZ/CBS	2.455	310.9	3.23	0.190	0.00205	156.23	1.820
	aug-cc-pV(X+d)Z/CBS	2.456	310.5	3.25	0.190	0.00206	156.05	1.828
MRCI-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	2.455	311.5	3.36	0.190	0.00206	156.58	1.824

the CASSCF wave functions are used as reference. For the doublet electronic states, this results in more than 17.0×10^5 (16.5×10^6) contracted (uncontracted) configuration state functions (CSFs) per C_{2v} symmetry to be treated. We used the C_{2v} point group since MOLPRO does not consider infinite groups ($C_{\infty v}$). Here, the B_1 and B_2 irreducible representations are equivalently described.

For the benchmarks on the three lowest AlS^{2+} electronic states, we described the Al and S atoms by two sets of basis sets: (i) Within the standard electronic structure methods, we used the aug-cc-pVXZ ($X = \text{T, Q, 5}$) and aug-cc-pV(X+d)Z ($X = \text{T, Q, 5}$) [51–55] basis sets. (ii) For explicitly correlated treatments, we used the aug-cc-pVXZ ($X = \text{T, Q, 5}$) together with the corresponding resolutions of the identity and density fitting functions as generated by MOLPRO [56–58].

For better accuracy, the energies were extrapolated to the complete basis set (CBS) limit using this formula [59]:

$$E_X = E_{\text{CBS}} + A \exp[-(X-1)] + B \exp[-(X-1)^2],$$

where $X = 3, 4, \text{ and } 5$ and E , A , and B are adjustable fitting parameters.

For the computations of the full set of the electronic states of AlS^{2+} lying in the 0–7 eV energy range, we used the aug-cc-pV(5+d)Z basis set. *A priori*, the incorporation of tight- d functions improves the description of S-containing molecular species (see, for instance, Refs. [60–62]). However, the consideration of static relativistic and core valence effects is less critical.

For the bound states, we derived their spectroscopic parameters after incorporation of their potential energy curves into variational and perturbative treatments of the nuclear motions. The spectroscopic parameters (vibrational and rotational) are

deduced using the derivatives of the potentials at equilibrium and second-order perturbation theory. To obtain the vibrational energies, we also resolved the one-dimensional Schrödinger equation for the nuclear motions variationally [63,64].

III. PATTERN OF THE ELECTRONIC STATES OF AlS^{2+}

A. Identification of the ground state

For seven-electron isovalent diatomic molecules, the determination of the nature of the electronic ground state is not straightforward. Several possibilities are known. For instance, the ground states of BO^{2+} [65], BeO^+ [66], MgO^+ [67], AlO^{2+} [32], LiS [68], NaO [69], and NaS [70] are of $^2\Pi$ space symmetry, while those of BN^+ [71] and KO [72] are of $^2\Sigma^-$ nature, and LiP^- [68], GaO^{2+} [73], BC [74], C_2^+ [75], and AlC [74] diatomics have a $^4\Sigma^-$ as their ground state. This is due to the interplay between dipole and quadrupole interactions and Pauli repulsion. As discussed in the literature, the latter favors the stabilization of the $^2\Sigma^+$ and $^4\Sigma^-$ states, whereas the multipolar interactions stabilize the $^2\Pi$ state.

We started our investigations by doing benchmarks on the lowest $^2\Pi$, $^2\Sigma^-$, and $^4\Sigma^-$ states. Our calculations show that the $^2\Sigma^-$ and $^4\Sigma^-$ states are multiconfigurational in nature, whereas the $^2\Pi$ state can be described by a unique dominant configuration. Therefore, these electronic computations are carried out at the MRCI/aug-cc-pVXZ and MRCI-F12/aug-cc-pVXZ ($X = \text{T, Q, 5, CBS}$) levels of theory. Additional computations using the (R)CCSD(T)/aug-cc-pVXZ, (R)CCSD(T)/aug-cc-pV(X+d)Z, (R)CCSD(T)-F12/aug-cc-pVXZ approaches are performed for the $^2\Pi$ state.

Table I lists the spectroscopic parameters and adiabatic excitation energies of AlS^{2+} ($^2\Pi$, $^2\Sigma^-$, $^4\Sigma^-$). For illustration,

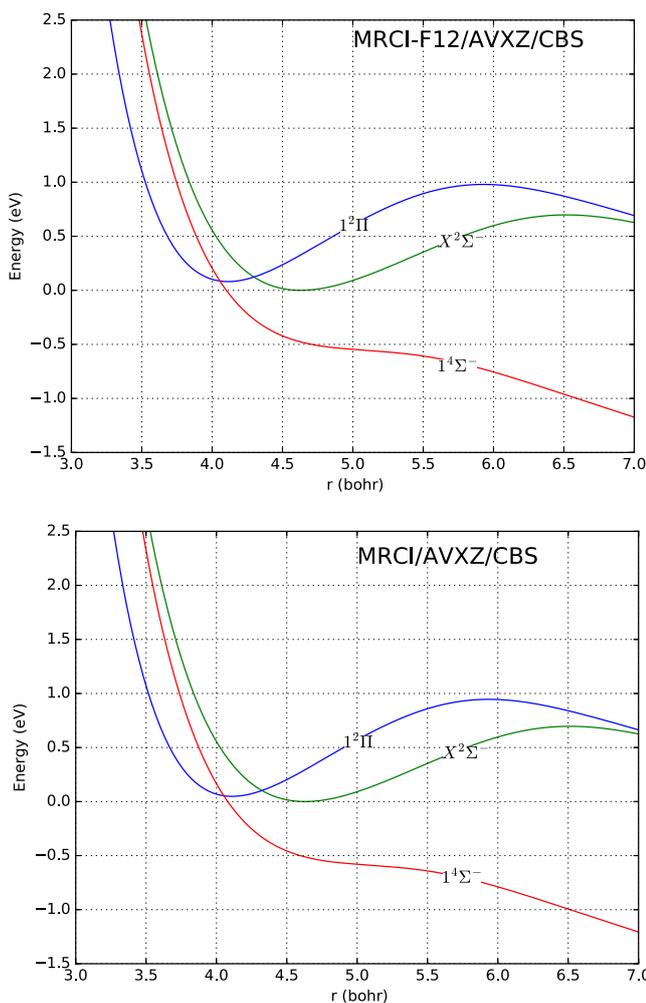


FIG. 1. Potential energy curves (PECs) of the lowest electronic states of AIS²⁺ computed using MRCI and MRCI-F12 and extrapolated to the CBS limit. The reference energy is chosen to be the energy of AIS²⁺(X²Σ⁻) at equilibrium.

Figs. 1 and S1 [76] display the corresponding MRCI/aug-cc-pVXZ and MRCI-F12/aug-cc-pVXZ (X = T, Q, 5, CBS) potentials. Interestingly, our computations show that AIS²⁺ presents similar electronic state patterns as the isovalent BO²⁺ [65]. Indeed, the lowest electronic state is the 1⁴Σ⁻ state, which is, however, repulsive and not bound. We found also that the ²Π and ²Σ⁻ states present potential wells that are close in energy. The energy difference between them depends on the method and basis set used for computations. This difference is ~0.1 eV (Table I). Anyway, all levels of theory are in favor of a ground state of ²Σ⁻ nature as for BN⁺ [71] and KO [72]. AIS²⁺ joins hence the very few seven-electron isovalent diatomic systems, which have such a ground state.

The electron configuration of neutral AIS is 9σ¹3π⁴. Figure 2 depicts these molecular orbitals (MOs) and its energy evolution vs the internuclear distance (r). The ground state of AIS²⁺ is obtained after removal of two electrons from the outermost 3π and 9σ MOs [77] of AIS (cf. Fig. 2). The ²Π state is formed after ejection of two electrons from the 3π MOs. Figure 2 shows that these outermost MOs are nonbonding

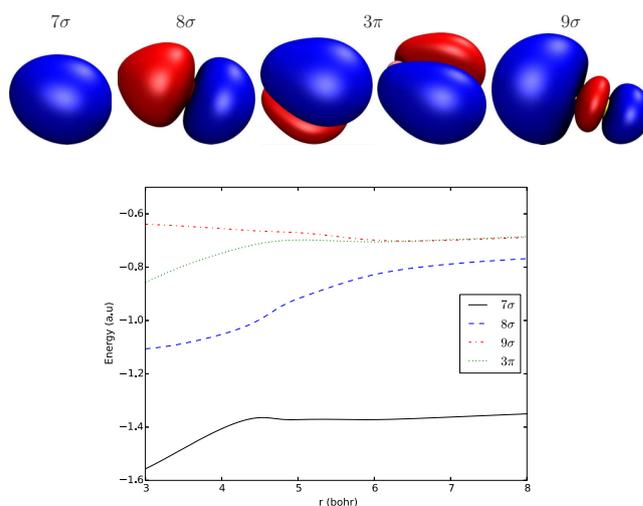


FIG. 2. Outermost MOs of AIS derived using the CASSCF/aug-cc-pVDZ method. We give the evolution of their energies along the internuclear separation.

where the 9σ is mainly located on Al and the 3π MO is mainly a lone pair of S. This results in the longer AIS distance in these electronic states compared to the neutral AIS (X²Σ⁺) (=2.029 Å [13]).

Figures 1 and 3 show that the X²Σ⁻ state, close to equilibrium, is free from any interaction with the close-lying electronic states. The rovibrational levels of AIS²⁺(X²Σ⁻), especially those located in the bottom of the potential well, can decay only by tunneling through the potential barrier. Various studies on dications revealed that such tunneling lifetimes are relatively long (longer than a millisecond). This confers hence a long-lived character to these levels. We refer to the review by Sabzyan *et al.* [21] for a wide presentation on this subject.

B. Electronic excited states of AIS²⁺

Figure 3 displays the MRCI/aug-cc-pV(5+d)Z potential energy curves of the electronic states of AIS²⁺ along the internuclear distance. These curves are given in energy with respect to the energy of X²Σ⁻ at equilibrium. These electronic states correlate adiabatically to the Al⁺(¹S) + S⁺(⁴S⁰), Al⁺(¹S) + S⁺(²D⁰), Al⁺(¹S) + S⁺(²P⁰), and Al⁺(³P⁰) + S⁺(⁴S⁰) charge separation channels (Table III). In addition to the ground state, Fig. 3 shows that the 1²Π, 1²Δ, 1²Σ⁺, 1⁴Π, 3²Π, 2⁴Σ⁻, and 2²Σ⁻ states present potential wells. Table II lists their characteristics including their equilibrium distances, excitation energies, and dominant electron configurations as quoted at the equilibrium distance (r_e) of the neutral ground state. Note that some of the potential wells are located at relatively large Al-S distances (~5–6 bohrs), i.e., distinctly larger than r_e's of AIS (X²Σ⁺) (=3.83 bohrs [78]) and of AIS⁺ (X³Π) (=4.08 bohrs [13]). This results in unfavorable Franck-Condon factors for their population by direct double photoionization from AIS (X²Σ⁺) and by charge stripping from the AIS⁺ (X³Π) cation.

The shapes of the potentials of the bound states of AIS²⁺ are conventional for molecular dications. They are known as “volcanic”-type potentials: They correspond to a potential

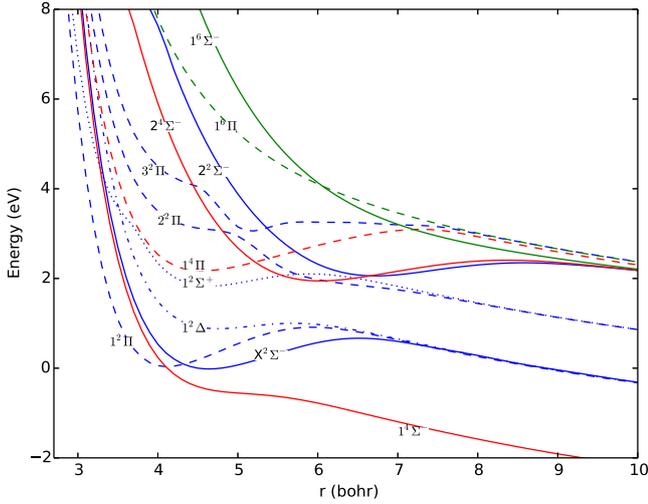


FIG. 3. MRCI/aug-cc-pV(5+d)Z potential energy curves of AIS^{2+} along the internuclear separation (r). The reference energy is chosen to be the energy of $\text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-)$ at equilibrium.

well, which is separated from the corresponding dissociation limits by a potential barrier. Then these potentials exhibit a $1/R$ evolution, due to Coulombic repulsion between the two positive charges, until reaching the charge separation $\text{Al}^+ + \text{S}^+$ asymptotes. Table II lists their dissociation energies (D_e) and their kinetic energy release (KER). D_e 's are computed as the energy difference between the energy at equilibrium and the top of the potential barrier. KER is the energy difference between the top of the potential and the dissociation limit to which it correlates (Table III).

For the $1^2\Pi$ rovibrational states, we expect short lifetimes, since they should be predissociated by spin-orbit interaction. Indeed, the $1^2\Pi$ state is crossed by the repulsive $1^4\Sigma^-$ state close to its equilibrium distance, where spin-orbit (SO) conversion may occur: At the $1^2\Pi-1^4\Sigma^-$ crossing (i.e., $r = 4.028$ bohrs), the $\langle 1^2\Pi | \text{H}^{\text{SO}} | 1^4\Sigma^- \rangle$ integral is evaluated at 110 cm^{-1} , which is large enough to allow such conversion. Afterwards, the Al^+ and S^+ ions are formed. The lifetimes of the upper electronic states should be also reduced due to spin-orbit and/or vibronic couplings and tunneling (for those located not far from the corresponding potential barrier).

TABLE II. MRCI/aug-cc-pV(5+d)Z equilibrium distances (r_e , in Å), rotational (B_e , α_e , in cm^{-1}) and vibrational (ω_e , $\omega_e X_e$, in cm^{-1}) constants, dissociation energy (D_e , in eV), kinetic energy release (KER, in eV), and vertical excitation energy (T_v , in eV) of the lowest electronic states of $^{27}\text{Al}^{32}\text{S}^{2+}$. We give also the AIS^{2+} dominant electron configuration of AIS electronic states quoted at the ground-state equilibrium distance. T_v is evaluated with respect to the energy of the neutral ground state at equilibrium.

Electronic state	r_e	ω_e	$\omega_e X_e$	B_e	α_e	D_e	KER	T_v	Electronic configuration
$1^2\Sigma^-$	2.452	336.7	1.91	0.191	0.00151	0.68	3.79	25.97	$7\sigma^2 8\sigma^2 9\sigma^1 3\pi^2(0.76)$
$1^2\Pi$	2.178	434.1	1.21	0.242	0.00269	0.87	4.05	25.19	$7\sigma^2 8\sigma^2 3\pi^3(0.87)$
$1^2\Delta$	2.510	265.5	4.99	0.182	0.00262	0.12	4.13	26.93	$7\sigma^2 8\sigma^2 9\sigma^1 3\pi^2(0.67)$
$1^2\Sigma^+$	2.458	308.8	3.36	0.190	0.00208	0.27	4.04	27.73	$7\sigma^2 8\sigma^2 9\sigma^1 3\pi^2(0.66)$
$1^4\Pi$	2.409	290.8	3.59	0.198	0.00237	1.04	3.73	27.88	$7\sigma^2 8\sigma^1 9\sigma^1 3\pi^3(0.93)$
$3^2\Pi$	2.714	331.7	3.75	0.156	0.00211	0.11	3.73	29.83	$7\sigma^2 8\sigma^1 9\sigma^1 3\pi^3(0.61)$
$2^4\Sigma^-$	3.186	235.8	1.51	0.113	0.00078	0.44	3.14	31.76	$7\sigma^2 8\sigma^1 9\sigma^2 3\pi^2(0.64)$
$2^2\Sigma^-$	3.547	226.9	4.67	0.091	0.00080	0.26	4.34	33.53	$7\sigma^2 8\sigma^2 9\sigma^1 3\pi^2(0.66)$

IV. THERMOCHEMICAL AND SPECTROSCOPIC DATA

A. Double-ionization energy and charge-stripping energy

The adiabatic double-ionization energy (ADIE) corresponds to the energy of the $\text{AIS}(X^2\Sigma^+, \nu=0) \rightarrow \text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-, \nu=0) + 2e^-$ reaction. The charge-stripping energy (CSE) is the energy of the $\text{AIS}^+(X^3\Pi, \nu=0) \rightarrow \text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-, \nu=0) + e^-$ reaction. For that purpose, we generated the potential energy curves of the AIS ($X^2\Sigma^+$), $\text{AIS}^+(X^3\Pi)$, and $\text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-)$ at the MRCI/aug-cc-pVXZ, MRCI/aug-cc-pV(X+d)Z, and MRCI-F12/aug-cc-pVXZ ($X = \text{T, Q, 5, CBS}$). The results are listed in Table IV. At the MRCI/CBS level, ADIE of AIS and CSE of AIS^+ are estimated as 24.99 and 16.02 eV, respectively.

Table IV gives the vertical double-ionization energy (VDIE) and the vertical charge-stripping energy (VCSE) of AIS^+ . We compute VDIE as the difference between the energy of $\text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-)$ and the energy of AIS ($X^2\Sigma^+$), where both species are taken at the equilibrium distance of the neutral. The VCSE is evaluated as the energy difference between the energies of $\text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-)$ and the energy of $\text{AIS}^+(X^3\Pi, \nu=0)$, where both internuclear distances are fixed at $r_e(\text{AIS}^+(X^3\Pi))$. At the CBS limits, VDIE and VCSE are ~ 26.0 and ~ 16.4 eV, respectively. Both energies are distinctly larger (by 1 and 0.4 eV, respectively) than the corresponding adiabatic quantities. This is due to the larger equilibrium distances in the doubly charged species compared to the neutral and the cation. Interestingly, the corresponding explicitly correlated values (e.g., ADIE of 25.01 eV and CSE of 16.03 eV) are very close to those derived using standard MRCI. As established in the literature, the use of explicitly correlated methods is accompanied by a strong reduction of the computational cost (both CPU and disk occupancy). Note also that the effect of tight- d functions is not noticeable (less than 0.01 eV).

B. Spectroscopy

For $\text{AIS}^{2+}(X^2\Sigma^-, 1^2\Pi, 1^2\Delta, \text{ and } 1^2\Sigma^+)$ states, Table I presents a systematic study of their rotational and vibrational constants using MRCI, MRCI-F12, and coupled clusters approaches. These data are extrapolated to the CBS limit. We consider these extrapolated quantities as the best estimation of these parameters. Table I shows that the data derived using the standard methodologies and those obtained using explicitly

TABLE III. Dissociation channels for AIS²⁺ and molecular states that correlate to these asymptotes. We give also the experimental and RCCSD(T)/aug-cc-p-V5Z+BSSE (basis set superposition error) energy positions (in eV) of the asymptotes.

Dissociation fragments	Relative computed energies	Relative experimental energies ^a	Molecular states
Al ⁺ (¹ S) + S ⁺ (⁴ S ⁰)	0.00 ^b	0.00 ^b	⁴ Σ ⁻
Al ⁺ (¹ S) + S ⁺ (² D ⁰)	1.87	1.84	X ² Σ ⁻ , 1 ² Π, 1 ² Δ
Al ⁺ (¹ S) + S ⁺ (² P ⁰)	3.04	3.05	1 ² Σ ⁺ , 2 ² Π
Al ⁺ (³ P ⁰) + S ⁺ (⁴ S ⁰)	4.40	4.66	2 ² Σ ⁻ , 3 ² Π, 2 ⁴ Σ ⁻ , 1 ⁴ Π, 1 ⁶ Σ ⁻ , 1 ⁶ Π

^aReference [78].

^bUsed as reference.

correlated versions are almost coinciding: The equilibrium distances differ by less than 0.001 Å. The harmonic frequencies exhibit less than 1 cm⁻¹ deviations. Again, this highlights the performance of explicitly correlated methods for the deduction of spectroscopic properties of sulfur metallic dications. In particular, benchmarks showed that these methods lead to a gain of computational cost [47,48,79].

Table I shows that the inclusion of tight-*d* functions only slightly affects the spectroscopic parameters of AIS²⁺. For the 1²Π state, the coupled clusters (CC) *r_e*'s are shorter (by ~0.01 Å) than the MRCI ones. The harmonic CC frequencies are larger (by ~10 cm⁻¹) than the MRCI corresponding quantities. As established in the literature, CC techniques account better for electron correlation than MRCI. Therefore, we recommend the CC values for 1²Π, whereas one should use the MRCI values for the X²Σ⁻, 1²Δ, and 1²Σ⁺ states.

Table II gives the equilibrium distances (*r_e*) and rotational (*B_e*, *α_e*) and vibrational (*ω_e*, *ω_ex_e*) constants for the upper bound states. According to our systematic study on the lowest states, we expect that the distances are accurate to within 0.01 Å and that the harmonic frequencies are accurate to within 10 cm⁻¹. All values represent predictions that may help in identifying the AIS²⁺ dication in the laboratory.

V. COMPARISON OF OXYGEN- AND SULFUR-CONTAINING DIATOMIC DICATIONS

For AIS²⁺, we have the following ordering of states: the 1⁴Σ⁻, X²Σ⁻, and then 1²Π states. For the AIO²⁺ isovalent dication, we have different electronic state patterns, where the ground state X²Π is followed by the 1⁴Σ⁻ and then by the 1²Σ⁻ states. Whereas the 1⁴Σ⁻ and the X²Σ⁻ states derive from the same electron configuration (Table II), the quartet

TABLE IV. AIS ADIEs and VDIEs, CSE, and VCSE of AIS⁺ as computed using MRCI and MRCI-F12 in conjunction with the aug-cc-pVXZ or the aug-cc-pV(X+d)Z basis sets extrapolated to the CBS limits. The full set of data is given in Table S2 of the Supplemental Material [76]. The ZPE correction was evaluated variationally. All values are in eV.

Methods	Basis set	ADIE	CSE	VDIE	VCSE
MRCI	aug-cc-pVXZ/CBS	24.99	16.02	25.97	16.41
	aug-cc-pV(X+d)Z/CBS	24.99	16.01	25.97	16.44
MRCI-F12	aug-cc-pVXZ/CBS	25.01	16.02	26.02	16.41

is repulsive and the doublet is bound. This demonstrates that there is a correlation related to the overall symmetry or total spin of the considered molecular dicationic system.

Different shapes for dicationic potentials upon substitution of the oxygen atom by sulfur are known for other dications. For instance, the lowest ³Σ⁻ state of CS²⁺ is a weak quasibound state with a very broad and low barrier (~0.26 eV), unlike the corresponding state for CO²⁺ which is purely repulsive. Another example concerns the low-lying ³Σ⁺ state of O₂²⁺ and of the isovalent SO²⁺. Indeed, the potential of O₂²⁺(A³Σ_u⁺) corresponds mainly to a 1/*R* evolution [80], whereas the (1³Σ⁺) state of SO²⁺ [81] possesses a potential well along the SO distance. We can cite also the SH²⁺/OH²⁺ isovalent dications: SH²⁺ is metastable [82], whereas no local minima are found on the ground potential of OH²⁺ [83].

More generally, isovalent dications do not have necessarily the same potential shapes or the same electronic states pattern. Such a situation is well documented in the literature for the CO²⁺ and N₂²⁺ doubly charged ions. Indeed, the lowest electronic state of CO²⁺ (i.e., ³Σ⁻) has repulsive potential and the electronic excited states (i.e., X³Π and 1¹Σ⁺) are bound. [84] In contrast, the corresponding states for N₂²⁺ (i.e., X¹Σ_g⁺, 1³Π_u, and 1¹Σ_g⁻) are bound. As explained by Senekowitsch *et al.* [83], this is due to the interplay between chemical bond and the repulsive Coulomb potential.

VI. CONCLUSIONS

We used both standard and explicitly correlated methods to compute the potential energy curves of the low-lying AIS²⁺ electronic states. Our calculations show that the AIS²⁺ dication is a metastable species in the gas phase. It possesses a X²Σ⁻ ground state characterized by an effective well depth of 0.68 eV. After nuclear motion treatments, we derived a set of accurate spectroscopic parameters for this dication. We also predict the double-ionization energy of AIS and the charge-stripping energy of AIS⁺. Our predicted values may help for the identification of this dication in the laboratory and in natural media and to propose mechanisms for the reactive processes involving AIS²⁺ dications such as the reactive collisions between Al⁺ and S⁺.

Through the comparison of several sulfur-containing dications with their respective oxygenated species, we show that both species may not present a similar electronic pattern or similar potential evolution, unlike the neutral and the singly charged species. Therefore, we cannot *a priori* predict the electronic properties of sulfur-containing doubly charged ions

using those of the O-containing analogs. They need to be investigated independently. This work can be extended to other sulfur-metal dications already detected such as MgS^{2+} , FeS^{2+} , AsS^{2+} , PbS^{2+} , and WS^{2+} [21,85,86]. Note that relativistic effects should be taken into account for such large- Z metal dications as demonstrated recently for WC^{2+} [87] and for IO^{2+} [88].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors extend their appreciation to the International Scientific Partnership Program (ISPP) at King Saud University for funding this research work through ISPP Grant No. 0045. We would like to thank K. Franzreb (Arizona State University, USA) and R. Linguerrri (Université Paris-Est Marne-La-Valle) for fruitful discussions.

- [1] D. C. Tyte, Red ($B^2\pi-A^2\sigma$) band system of aluminium monoxide, *Nature (London)* **202**, 383 (1964).
- [2] E. R. Johnson and C. H. Low, Further spectral observations of grenade glow clouds in the lower thermosphere, *Aust. J. Phys.* **20**, 577 (1967).
- [3] P. W. Merrill, A. J. Deutsch, and P. C. Keenan, Absorption spectra of M-type Mira variables, *Astrophys. J.* **136**, 21 (1962).
- [4] D. P. K. Banerjee, W. P. Varricatt, N. M. Ashok, and O. Launila, Remarkable changes in the near-infrared spectrum of the nova-like variable V4332 Sagittarii, *Astrophys. J. Lett.* **598**, L31 (2003).
- [5] S. Stojadinović, M. Perić, M. Petković, R. Vasilčić, B. Kasalica, I. Belča, and J. Radić-Perić, Luminescence of the $B^2\Sigma^+-X^2\Sigma^+$ band system of AlO during plasma electrolytic oxidation of aluminum, *Electrochim. Acta* **56**, 10122 (2011).
- [6] L. M. Ziurys, The chemistry in circumstellar envelopes of evolved stars: Following the origin of the elements to the origin of life, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12274 (2006).
- [7] J. Cernicharo and M. Guélin, Metals in IRC+10216—detection of NaCl, AlCl, and KCl, and tentative detection of AlF, *Astron. Astrophys.* **183**, L10 (1987).
- [8] L. M. Ziurys, A. J. Apponi, and T. G. Phillips, Exotic fluoride molecules in IRC+10216: Confirmation of AlF and searches for MgF and CaF, *Astrophys. J.* **433**, 729 (1994).
- [9] E. D. Tenenbaum and L. M. Ziurys, Millimeter detection of AlO ($X^2\Sigma^+$): Metal oxide chemistry in the envelope of VY Canis Majoris, *Astrophys. J. Lett.* **694**, L59 (2009).
- [10] T. Kamiński, K. T. Wong, M. R. Schmidt, H. S. P. Müller, C. A. Gottlieb, I. Cherchneff, K. M. Menten, D. Keller, S. Brünken, J. M. Winters, and N. A. Patel, An observational study of dust nucleation in Mira (o Ceti). II. Titanium oxides are negligible for nucleation at high temperatures, *Astron. Astrophys.* **592**, A42 (2016).
- [11] O. Sghaier, R. Linguerrri, M. M. A. Mogren, J. S. Francisco, and M. Hochlaf, Spectroscopic constants of the $X^1\Sigma^+$ and $1^3\Pi$ states of AlO^+ , *Astrophys. J.* **826**, 163 (2016).
- [12] P. J. Bruna and F. Grein, Electron-spin magnetic moment (g factor) of $X^2\Sigma^+$ diatomic radicals $\text{MX}^{(\pm)}$ with nine valence electrons ($M = \text{Be, B, Mg, Al}$; $X = \text{N, O, F, P, S, Cl}$). An ab initio study, *J. Phys. Chem. A* **105**, 3328 (2001).
- [13] M. Guichemerre and G. Chambaud, Theoretical study of the electronic states of AlS, AlS^+ and AlS, *J. Phys. Chem. A* **104**, 2105 (2000).
- [14] O. Launila and J. Jonsson, Spectroscopy of AlS: Rotational analysis of the $A'^2\Pi_i-X^2\Sigma^+$ band system in the $2\text{-}\mu\text{m}$ region, *J. Mol. Spectrosc.* **168**, 483 (1994).
- [15] M. He, H. Wang, and B. R. Weiner, Production and laser-induced fluorescence spectrum of aluminum sulfide, *Chem. Phys. Lett.* **204**, 563 (1993).
- [16] S. Takano, S. Yamamoto, and S. Saito, Millimeter-wave spectrum of the aluminum monosulfide radical AlS ($X^2\Sigma^+$), *J. Chem. Phys.* **94**, 3355 (1991).
- [17] H. Lavendy, The $B^2\Pi-X^2\Sigma^+$ electronic transition of AlS, *J. Phys. B* **13**, 1151 (1980).
- [18] H. Lavendy, J. M. Mahieu, and M. Becart, Study on transitions of radical Al-S, *Can. J. Spectrosc.* **18**, 13 (1973).
- [19] D. Mathur, Structure and dynamics of molecules in high charge states, *Phys. Rep.* **391**, 1 (2004).
- [20] D. Schröder and H. Schwarz, Generation, stability, and reactivity of small, multiply charged ions in the gas phase, *J. Phys. Chem. A* **103**, 7385 (1999).
- [21] H. Sabzyan, E. Keshavarz, and Z. Noorisafa, Diatomic dications and dianions, *J. Iran. Chem. Soc.* **11**, 871 (2014).
- [22] P. M. W. Gill and L. Radom, The ACDCP model for estimating the kinetic energy release and transition structure bond length in the fragmentation of a diatomic dication, *Chem. Phys. Lett.* **147**, 213 (1988).
- [23] K. Franzreb, R. C. Sobers, Jr., J. Lörincik, and P. Williams, Detection of the diatomic dications SiH^{2+} and AlH^{2+} , *Appl. Surf. Sci.* **231**, 82 (2004).
- [24] R. E. Grisenti, W. Schöllkopf, J. P. Toennies, G. C. Hegerfeldt, T. Köhler, and M. Stoll, Determination of the Bond Length and Binding Energy of the Helium Dimer by Diffraction from a Transmission Grating, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 2284 (2000).
- [25] M. Kolbuszewski and J. S. Wright, Thermodynamically stable dications: AlF^{2+} and SiF^{2+} , *J. Phys. Chem.* **99**, 3455 (1995).
- [26] C. Heinemann, D. Schroeder, and H. Schwarz, Generation of the thermodynamically stable dications AlF^{2+} and SiF^{2+} via charge-stripping mass spectrometry, *J. Phys. Chem.* **99**, 16195 (1995).
- [27] S. Petrie, Is the Gaussian-2 technique reliable for determining the energetics of small molecular dications? *J. Chem. Phys.* **107**, 3042 (1997).
- [28] V. Brites, D. Hammoutène, and M. Hochlaf, Spectroscopy, metastability, and single and double ionization of AlCl, *J. Phys. Chem. A* **112**, 13419 (2008).
- [29] T. F. Kelly and M. K. Miller, Atom probe tomography, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 031101 (2007).
- [30] R. Rachbauer, S. Massl, E. Stergar, P. Felfer, and P. H. Mayrhofer, Atom probe specimen preparation and 3D interfacial study of Ti-Al-N thin films, *Surf. Coat. Technol.* **204**, 1811 (2010).

- [31] Y. M. Chen, T. Ohkubo, M. Kodzuka, K. Morita, and K. Hono, Laser-assisted atom probe analysis of zirconia/spinel nanocomposite ceramics, *Scr. Mater.* **61**, 693 (2009).
- [32] O. Sghaier, H. H. Abdallah, H. Y. Abdullah, N. E. Jaidane, M. Mogren Al Mogren, and M. Hochlaf, Theoretical investigation of the long-lived metastable AlO²⁺ dication in gas phase, *Chem. Phys.* **477**, 32 (2016).
- [33] T. J. Prosa, P. H. Clifton, H. Zhong, R. Shivaraman, J. S. Speck, A. Tyagi, S. P. DenBaars, and S. Nakamura, Atom probe analysis of interfacial abruptness and clustering within a single In_xGa_{1-x}N quantum well device on semipolar (1011) GaN substrate, *Appl. Phys. Lett.* **98**, (2011).
- [34] S. Petrie and R. C. Dunbar, Main group metal ion chemistry in planetary atmospheres, *AIP Conf. Proc.* **855**, 272 (2006).
- [35] M. Larsson, W. D. Geppert, and G. Nyman, Ion chemistry in space, *Rep. Prog. Phys.* **75**, 066901 (2012).
- [36] R. Linguerri, M. Hochlaf, M. C. Bacchus-Montabonel, and M. Desouter-Lecomte, Characterization of the MgO²⁺ dication in the gas phase: Electronic states, spectroscopy and atmospheric implications, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 824 (2013).
- [37] H.-J. Werner, P. J. Knowles, G. Knizia, F. R. Manby, M. Schütz, P. Celani, W. Györffy, D. Kats, T. Korona, R. Lindh, A. Mitrushenkov, G. Rauhut, K. R. Shamasundar, T. B. Adler, R. D. Amos, A. Bernhardsson, A. Berning, D. L. Cooper, M. J. O. Deegan, A. J. Dobbyn, F. Eckert, E. Goll, C. Hampel, A. Hesselmann, G. Hetzer, T. Hrenar, G. Jansen, C. Köppl, Y. Liu, A. W. Lloyd, R. A. Mata, A. J. May, S. J. McNicholas, W. Meyer, M. E. Mura, A. Nicklass, D. P. O'Neill, P. Palmieri, D. Peng, K. Pflüger, R. Pitzer, M. Reiher, T. Shiozaki, H. Stoll, A. J. Stone, R. Tarroni, T. Thorsteinsson, and M. Wang, MOLPRO, version 2015.1, a package of *ab initio* programs (2015), see <https://www.molpro.net>.
- [38] Peter J. Knowles, Claudia Hampel, and Hans-Joachim Werner, Coupled cluster theory for high spin, open shell reference wave functions, *J. Chem. Phys.* **99**, 5219 (1993).
- [39] P. J. Knowles, C. Hampel, and H.-J. Werner, Erratum: "Coupled cluster theory for high spin, open shell reference wave functions" [*J. Chem. Phys.* **99**, 5219 (1993)], *J. Chem. Phys.* **112**, 3106 (2000).
- [40] K. ishnan Raghavachari, G. W. Trucks, J. A. Pople, and M. Head-Gordon, A fifth-order perturbation comparison of electron correlation theories, *Chem. Phys. Lett.* **157**, 479 (1989).
- [41] H.-J. Werner and P. J. Knowles, An efficient internally contracted multiconfiguration-reference configuration interaction method, *J. Chem. Phys.* **89**, 5803 (1988).
- [42] P. J. Knowles and H.-J. Werner, An efficient method for the evaluation of coupling coefficients in configuration interaction calculations, *Chem. Phys. Lett.* **145**, 514 (1988).
- [43] K. R. Shamasundar, G. Knizia, and H.-J. Werner, A new internally contracted multi-reference configuration interaction method, *J. Chem. Phys.* **135**, 054101 (2011).
- [44] H.-J. Werner, T. B. Adler, and F. R. Manby, General orbital invariant MP2-F12 theory, *J. Chem. Phys.* **126**, 164102 (2007).
- [45] T. B. Adler, G. Knizia, and H.-J. Werner, A simple and efficient CCSD(T)-F12 approximation, *J. Chem. Phys.* **127**, 221106 (2007).
- [46] G. Knizia, T. B. Adler, and H.-J. Werner, Simplified CCSD(T)-F12 methods: Theory and benchmarks, *J. Chem. Phys.* **130**, 054104 (2009).
- [47] T. Shiozaki and H.-J. Werner, Explicitly correlated multireference configuration interaction with multiple reference functions: Avoided crossings and conical intersections, *J. Chem. Phys.* **134**, 184104 (2011).
- [48] T. Shiozaki and H.-J. Werner, Multireference explicitly correlated F12 theories, *Mol. Phys.* **111**, 607 (2013).
- [49] P. J. Knowles and H.-J. Werner, An efficient second-order MC SCF method for long configuration expansions, *Chem. Phys. Lett.* **115**, 259 (1985).
- [50] H.-J. Werner and P. J. Knowles, A second order multiconfiguration SCF procedure with optimum convergence, *J. Chem. Phys.* **82**, 5053 (1985).
- [51] T. H. Dunning, Jr., Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen, *J. Chem. Phys.* **90**, 1007 (1989).
- [52] D. E. Woon and T. H. Dunning, Jr., Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. III. The atoms aluminum through argon, *J. Chem. Phys.* **98**, 1358 (1993).
- [53] R. A. Kendall, T. H. Dunning, Jr., and R. J. Harrison, Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions, *J. Chem. Phys.* **96**, 6796 (1992).
- [54] D. E. Woon and T. H. Dunning, Jr., Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. V. Core-valence basis sets for boron through neon, *J. Chem. Phys.* **103**, 4572 (1995).
- [55] K. A. Peterson and T. H. Dunning, Jr., Accurate correlation consistent basis sets for molecular core-valence correlation effects: The second row atoms Al–Ar, and the first row atoms B–Ne revisited, *J. Chem. Phys.* **117**, 10548 (2002).
- [56] F. Weigend, A fully direct RI-HF algorithm: Implementation, optimised auxiliary basis sets, demonstration of accuracy and efficiency, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4**, 4285 (2002).
- [57] C. Hättig, Optimization of auxiliary basis sets for RI-MP2 and RI-CC2 calculations: Core-valence and quintuple- ζ basis sets for H to Ar and QZVPP basis sets for Li to Kr, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 59 (2005).
- [58] W. I. M. Klopper, Highly accurate coupled-cluster singlet and triplet pair energies from explicitly correlated calculations in comparison with extrapolation techniques, *Mol. Phys.* **99**, 481 (2001).
- [59] K. A. Peterson, D. E. Woon, and T. H. Dunning, Jr., Benchmark calculations with correlated molecular wave functions. IV. The classical barrier height of the H + H₂ → H₂ + H reaction, *J. Chem. Phys.* **100**, 7410 (1994).
- [60] T. Ayari, N.-E. Jaidane, M. M. A. Mogren, J. S. Francisco, and M. Hochlaf, Toward the laboratory identification of [O, N, S, S] isomers: Implications for biological NO chemistry, *J. Chem. Phys.* **144**, 234316 (2016).
- [61] S. B. Yaghlane, C. E. Cotton, J. S. Francisco, R. Linguerri, and M. Hochlaf, *Ab initio* structural and spectroscopic study of HPS^x and HSP^x ($x = 0, +1, -1$) in the gas phase, *J. Chem. Phys.* **139**, 174313 (2013).
- [62] S. Ben Yaghlane, N.-E. Jaidane, C. E. Cotton, J. S. Francisco, M. M. Al Mogren, Roberto Linguerri, and M. Hochlaf, Theoretical spectroscopic investigations of HNS^q and HSN^q ($q = 0, +1, -1$) in the gas phase, *J. Chem. Phys.* **140**, 244309 (2014).

- [63] J. W. Cooley, An improved eigenvalue corrector formula for solving the Schrödinger equation for central fields, *Math. Comput.* **15**, 363 (1961).
- [64] B. Numerov, *Publ. Observatoire Central Astrophys. Russ.* **2**, 188 (1933).
- [65] J. Fišer and R. Polák, A theoretical study of the BO^{2+} dication, *Chem. Phys. Lett.* **471**, 198 (2009).
- [66] H. Ghalila, S. Lahmar, Z. Ben Lakhdar, and M. Hochlaf, Spectroscopy and metastability of BeO^+ , *J. Phys. B* **41**, 205101 (2008).
- [67] A. Maatouk, A. Ben Houria, O. Yazidi, N. E. Jaidane, and M. Hochlaf, Theoretical investigations of the MgO^+ cation: Spectroscopy, spin-orbit coupling and single ionization spectrum, *J. Phys. B* **44**, 225101 (2011).
- [68] A. I. Boldyrev, J. Simons, and P. von R. Schleyer, *Ab initio* study of the electronic structures of lithium containing diatomic molecules and ions, *J. Chem. Phys.* **99**, 8793 (1993).
- [69] P. Soldán, E. P. F. Lee, S. D. Gamblin, and T. G. Wright, Photoionization of NaO ($X^2\Pi$; $A^2\Sigma^+$) and the absorption/emission spectra of the lowest cationic states, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 4947 (1999).
- [70] F. Khadri and M. Hochlaf, Theoretical calculations on the NaS and NaS^+ radicals: Electronic structure, spectroscopy and spin-orbit couplings, *Eur. Phys. J. D* **66**, 145 (2012).
- [71] R. C. Mawhinney, P. J. Bruna, and F. Grein, An *ab initio* investigation of the infrared and visible-UV spectra of BN^+ , and photoionization spectrum of BN , *Chem. Phys.* **199**, 163 (1995).
- [72] C. W. Bauschlicher, Jr., Harry Partridge, and Lars G. M. Pettersson, Franck-Condon factors for photodetachment from LiO^- , NaO^- , and KO^- , *J. Chem. Phys.* **99**, 3654 (1993).
- [73] I. Corral, A. Palacios, and M. Yáñez, On the stability and lifetime of GaO^{2+} in the gas phase, *Theor. Chem. Acc.* **129**, 401 (2011).
- [74] D. Tzeli and A. Mavridis, Accurate theoretical study of the excited states of boron and aluminum carbides, BC , AlC . 2, *J. Phys. Chem. A* **105**, 7672 (2001).
- [75] J. D. Watts and R. J. Bartlett, Coupled-cluster calculations on the C_2 molecule and the C_2^+ and C_2^- molecular ions, *J. Chem. Phys.* **96**, 6073 (1992).
- [76] See Supplemental Material at <http://link.aps.org/supplemental/10.1103/PhysRevA.95.022508> for the full presentation of the potentials and the spectroscopic benchmark studies on AlS^{2+} dications.
- [77] G. Hermann, V. Pohl, J. C. Tremblay, B. Paulus, H.-C. Hege, and A. Schild, ORBKIT: A modular python toolbox for cross-platform postprocessing of quantum chemical wavefunction data, *J. Comput. Chem.* **37**, 1511 (2016).
- [78] <http://webbook.nist.gov>.
- [79] T. Shiozaki, G. Knizia, and H.-J. Werner, Explicitly correlated multireference configuration interaction: MRCI-F12, *J. Chem. Phys.* **134**, 034113 (2011).
- [80] M. Larsson, P. Baltzer, S. Svensson, B. Wannberg, N. Martensson, A. Naves de Brito, N. Correia, M. P. Keane, M. Carlsson-Gothe, and L. Karlsson, X-ray photoelectron, auger electron and ion fragment spectra of O_2 and potential curves of O_2^{2+} , *J. Phys. B* **23**, 1175 (1990).
- [81] A. Ben Houria, Z. Ben Lakhdar, M. Hochlaf, F. Kemp, and I. R. McNab, Theoretical investigation of the SO^{2+} dication and the photo-double ionization spectrum of SO , *J. Chem. Phys.* **122**, 054303 (2005).
- [82] G. Parlant, J. Senekowitsch, S. V. O'Neil, and D. R. Yarkony, Spin-forbidden decay of the dication HS^{2+} , *J. Chem. Phys.* **94**, 7208 (1991).
- [83] J. Senekowitsch, S. O'Neil, and W. Meyer, On the bonding in doubly charged diatomics, *Theor. Chim. Acta* **84**, 85 (1992).
- [84] J. H. D. Eland, M. Hochlaf, G. C. King, P. S. Kreymin, R. J. LeRoy, I. R. McNab, and J.-M. Robbe, Photo double ionization spectra of CO : Comparison of theory with experiment, *J. Phys. B* **37**, 3197 (2004).
- [85] V. Brites, K. Franzreb, J. N. Harvey, S. G. Sayres, M. W. Ross, D. E. Blumling, A. W. Castleman, and M. Hochlaf, Oxygen-containing gas-phase diatomic trications and tetracations: ReO^{z+} , NbO^{z+} and HfO^{z+} ($z = 3, 4$), *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 15233 (2011).
- [86] B. Pasquini, A field-ion microscope and 3-D atom-probe microscopy study of tungsten disulfide and carbon nanotubes, *Nanoscape* **1**, 101 (2004).
- [87] S. Sabor, A. Touimi Benjelloun, M. Mogren, A. Mogren, and M. Hochlaf, Characterization of gas phase WC^{2+} : A thermodynamically stable carbide dication, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 21356 (2014).
- [88] H. Hammami, O. Yazidi, M. Ben El, Hadj Rhouma, M. M. Al Mogren, and M. Hochlaf, Theoretical investigations of the IO^{q+} ($q = 2, 3, 4$) multi-charged ions: Metastability, characterization and spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **141**, 014302 (2014).

Appendix B

Résultats des énergies d'interaction

B.1 Base sans diffuse 6-31g*

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-16.0	-16.0	-0.0133	-0.0138	-0.0130	-0.0135	-0.0126	-0.0130
-16.0	-14.0	-0.0267	-0.0279	-0.0263	-0.0274	-0.0256	-0.0267
-16.0	-12.0	-0.0440	-0.0463	-0.0434	-0.0457	-0.0425	-0.0447
-16.0	-10.0	-0.0660	-0.0699	-0.0652	-0.0690	-0.0640	-0.0676
-16.0	-8.0	-0.0933	-0.0993	-0.0923	-0.0981	-0.0907	-0.0961
-16.0	-6.0	-0.1265	-0.1347	-0.1250	-0.1329	-0.1226	-0.1300
-16.0	-4.0	-0.1639	-0.1741	-0.1617	-0.1715	-0.1579	-0.1671
-16.0	-2.0	-0.2006	-0.2119	-0.1970	-0.2079	-0.1914	-0.2016
-16.0	0.0	-0.2269	-0.2382	-0.2221	-0.2329	-0.2146	-0.2248
-16.0	2.0	-0.2347	-0.2446	-0.2295	-0.2391	-0.2215	-0.2307
-16.0	4.0	-0.2260	-0.2340	-0.2214	-0.2292	-0.2145	-0.2219
-16.0	6.0	-0.2096	-0.2156	-0.2061	-0.2120	-0.2007	-0.2064
-16.0	8.0	-0.1913	-0.1957	-0.1888	-0.1931	-0.1848	-0.1890
-16.0	10.0	-0.1734	-0.1765	-0.1716	-0.1746	-0.1687	-0.1717
-16.0	12.0	-0.1565	-0.1587	-0.1551	-0.1573	-0.1530	-0.1552
-16.0	14.0	-0.1407	-0.1423	-0.1398	-0.1413	-0.1382	-0.1397
-16.0	16.0	-0.1264	-0.1275	-0.1256	-0.1267	-0.1245	-0.1256
-14.0	-16.0	-0.0112	-0.0117	-0.0109	-0.0113	-0.0103	-0.0107
-14.0	-14.0	-0.0273	-0.0289	-0.0268	-0.0283	-0.0260	-0.0274
-14.0	-12.0	-0.0493	-0.0526	-0.0486	-0.0518	-0.0475	-0.0504
-14.0	-10.0	-0.0787	-0.0848	-0.0778	-0.0836	-0.0763	-0.0816
-14.0	-8.0	-0.1182	-0.1281	-0.1170	-0.1264	-0.1149	-0.1236
-14.0	-6.0	-0.1712	-0.1857	-0.1693	-0.1831	-0.1659	-0.1786

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-14.0	-4.0	-0.2376	-0.2567	-0.2339	-0.2519	-0.2275	-0.2440
-14.0	-2.0	-0.3053	-0.3273	-0.2979	-0.3187	-0.2859	-0.3049
-14.0	0.0	-0.3502	-0.3718	-0.3383	-0.3589	-0.3203	-0.3393
-14.0	2.0	-0.3493	-0.3675	-0.3366	-0.3541	-0.3179	-0.3342
-14.0	4.0	-0.3173	-0.3308	-0.3074	-0.3205	-0.2926	-0.3050
-14.0	6.0	-0.2805	-0.2897	-0.2737	-0.2826	-0.2634	-0.2720
-14.0	8.0	-0.2467	-0.2527	-0.2422	-0.2481	-0.2354	-0.2411
-14.0	10.0	-0.2167	-0.2206	-0.2138	-0.2176	-0.2092	-0.2130
-14.0	12.0	-0.1903	-0.1929	-0.1884	-0.1909	-0.1853	-0.1878
-14.0	14.0	-0.1672	-0.1689	-0.1659	-0.1676	-0.1637	-0.1654
-14.0	16.0	-0.1471	-0.1482	-0.1462	-0.1473	-0.1446	-0.1457
-12.0	-16.0	-0.0075	-0.0079	-0.0070	-0.0074	-0.0064	-0.0066
-12.0	-14.0	-0.0270	-0.0288	-0.0263	-0.0280	-0.0252	-0.0267
-12.0	-12.0	-0.0552	-0.0598	-0.0543	-0.0586	-0.0527	-0.0566
-12.0	-10.0	-0.0962	-0.1056	-0.0951	-0.1038	-0.0930	-0.1008
-12.0	-8.0	-0.1581	-0.1749	-0.1566	-0.1723	-0.1537	-0.1676
-12.0	-6.0	-0.2579	-0.2850	-0.2550	-0.2799	-0.2487	-0.2706
-12.0	-4.0	-0.4108	-0.4493	-0.4004	-0.4357	-0.3820	-0.4129
-12.0	-2.0	-0.5604	-0.6075	-0.5355	-0.5788	-0.4967	-0.5347
-12.0	0.0	-0.6116	-0.6588	-0.5730	-0.6167	-0.5183	-0.5572
-12.0	2.0	-0.5454	-0.5830	-0.5099	-0.5453	-0.4607	-0.4928
-12.0	4.0	-0.4526	-0.4774	-0.4294	-0.4531	-0.3965	-0.4184
-12.0	6.0	-0.3819	-0.3965	-0.3681	-0.3822	-0.3479	-0.3612
-12.0	8.0	-0.3230	-0.3314	-0.3150	-0.3232	-0.3031	-0.3109
-12.0	10.0	-0.2736	-0.2785	-0.2689	-0.2738	-0.2618	-0.2664
-12.0	12.0	-0.2328	-0.2357	-0.2299	-0.2328	-0.2254	-0.2282
-12.0	14.0	-0.1990	-0.2008	-0.1972	-0.1989	-0.1942	-0.1959
-12.0	16.0	-0.1711	-0.1721	-0.1698	-0.1709	-0.1678	-0.1688
-10.0	-16.0	-0.0013	-0.0014	-0.0008	-0.0007	0.0000	0.0002
-10.0	-14.0	-0.0246	-0.0265	-0.0237	-0.0254	-0.0223	-0.0236
-10.0	-12.0	-0.0618	-0.0675	-0.0604	-0.0657	-0.0581	-0.0627
-10.0	-10.0	-0.1229	-0.1366	-0.1209	-0.1335	-0.1174	-0.1283
-10.0	-8.0	-0.2350	-0.2632	-0.2314	-0.2569	-0.2243	-0.2459
-10.0	-6.0	-0.4731	-0.5230	-0.4584	-0.5026	-0.4327	-0.4691
-10.0	-4.0	-0.9369	-1.0146	-0.8714	-0.9396	-0.7763	-0.8311
-10.0	-2.0	-1.2690	-1.3728	-1.1657	-1.2584	-0.9966	-1.0718
-10.0	0.0	-0.3411	-0.4641	-0.2604	-0.3686	-0.1553	-0.2444

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-10.0	2.0	-0.2720	-0.3661	-0.2089	-0.2940	-0.1315	-0.2044
-10.0	4.0	-0.4486	-0.5042	-0.5593	-0.6051	-0.4906	-0.5316
-10.0	6.0	-0.5247	-0.5484	-0.4965	-0.5190	-0.4567	-0.4776
-10.0	8.0	-0.4282	-0.4398	-0.4143	-0.4255	-0.3937	-0.4043
-10.0	10.0	-0.3478	-0.3538	-0.3405	-0.3463	-0.3294	-0.3350
-10.0	12.0	-0.2851	-0.2883	-0.2810	-0.2841	-0.2745	-0.2775
-10.0	14.0	-0.2363	-0.2380	-0.2338	-0.2354	-0.2298	-0.2314
-10.0	16.0	-0.1980	-0.1989	-0.1963	-0.1972	-0.1937	-0.1946
-8.0	-16.0	0.0085	0.0091	0.0092	0.0098	0.0103	0.0111
-8.0	-14.0	-0.0185	-0.0198	-0.0173	-0.0183	-0.0152	-0.0159
-8.0	-12.0	-0.0674	-0.0733	-0.0651	-0.0704	-0.0613	-0.0657
-8.0	-10.0	-0.1617	-0.1791	-0.1572	-0.1727	-0.1496	-0.1624
-8.0	-8.0	-0.3826	-0.4255	-0.3676	-0.4047	-0.3432	-0.3724
-8.0	-6.0	-0.9535	-1.0078	-0.8823	-0.9337	-0.7782	-0.8212
-8.0	-4.0	-0.5052	-0.5962	-0.2025	-0.0303	-1.3326	-1.3669
-8.0	-2.0	-0.4073	-0.6262	-0.4805	-0.6517	-0.4117	-0.5290
-8.0	0.0	0.4013	0.0876	0.2300	-0.0190	0.1620	-0.0149
-8.0	2.0	0.2639	0.0358	0.1943	0.0007	0.1610	0.0099
-8.0	4.0	-0.6962	-0.7981	-0.5921	-0.6840	-0.4645	-0.5428
-8.0	6.0	-0.8071	-0.8486	-0.7456	-0.7842	-0.5998	-0.6308
-8.0	8.0	-0.5702	-0.5854	-0.5478	-0.5623	-0.5149	-0.5284
-8.0	10.0	-0.4416	-0.4483	-0.4308	-0.4373	-0.4144	-0.4206
-8.0	12.0	-0.3470	-0.3501	-0.3413	-0.3443	-0.3324	-0.3353
-8.0	14.0	-0.2781	-0.2795	-0.2747	-0.2761	-0.2695	-0.2708
-8.0	16.0	-0.2268	-0.2274	-0.2248	-0.2253	-0.2215	-0.2220
-6.0	-16.0	0.0238	0.0254	0.0246	0.0263	0.0259	0.0277
-6.0	-14.0	-0.0050	-0.0048	-0.0033	-0.0028	-0.0006	0.0001
-6.0	-12.0	-0.0647	-0.0687	-0.0610	-0.0643	-0.0551	-0.0574
-6.0	-10.0	-0.1988	-0.2149	-0.1892	-0.2030	-0.1739	-0.1845
-6.0	-8.0	-0.5645	-0.6090	-0.5244	-0.5621	-0.4655	-0.4930
-6.0	-6.0	-0.4506	-0.2694	-1.2006	-1.1765	-1.0650	-1.0681
-6.0	-4.0	-0.0253	0.0363	-0.2639	-0.2003	-0.2866	-0.2379
-6.0	-2.0	0.5452	-0.1531	0.0528	-0.3852	-0.0736	-0.2927
-6.0	0.0	1.8271	1.0270	1.0309	0.4582	0.5750	0.2172
-6.0	2.0	0.5743	0.2118	0.2766	-0.0340	0.1091	-0.1331
-6.0	4.0	-1.1594	-1.2995	-1.0270	-1.1558	-0.8461	-0.9561
-6.0	6.0	-1.2269	-1.2826	-1.1362	-1.1872	-1.0114	-1.0562

x	y	Z=3.3		Z=3.5		Z=3.8	
		S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-6.0	8.0	-0.7561	-0.7741	-0.7235	-0.7405	-0.6756	-0.6913
-6.0	10.0	-0.5519	-0.5588	-0.5371	-0.5437	-0.5146	-0.5208
-6.0	12.0	-0.4148	-0.4173	-0.4073	-0.4098	-0.3956	-0.3980
-6.0	14.0	-0.3215	-0.3222	-0.3173	-0.3180	-0.3107	-0.3114
-6.0	16.0	-0.2556	-0.2556	-0.2531	-0.2531	-0.2492	-0.2491
-4.0	-16.0	0.0460	0.0487	0.0469	0.0497	0.0482	0.0511
-4.0	-14.0	0.0205	0.0229	0.0226	0.0251	0.0257	0.0286
-4.0	-12.0	-0.0404	-0.0403	-0.0353	-0.0346	-0.0274	-0.0260
-4.0	-10.0	-0.1915	-0.2001	-0.1766	-0.1831	-0.1538	-0.1577
-4.0	-8.0	-0.6072	-0.6391	-0.5473	-0.5730	-0.4625	-0.4796
-4.0	-6.0	0.3124	1.0681	-0.1605	-0.1553	-0.0198	-0.0223
-4.0	-4.0	0.7091	0.4872	0.3533	0.2118	0.2452	0.1665
-4.0	-2.0	2.6051	1.0077	1.3821	0.3176	0.7334	0.1134
-4.0	0.0	1.8825	0.5926	0.8836	-0.1369	0.4091	-0.3206
-4.0	2.0	-1.0352	-1.7058	-1.1340	-1.6821	-0.9966	-1.4100
-4.0	4.0	-2.5189	-2.6743	-2.2243	-2.3700	-1.8289	-1.9576
-4.0	6.0	-1.8175	-1.8810	-1.6851	-1.7431	-1.5009	-1.5517
-4.0	8.0	-1.1963	-1.2177	-0.9242	-0.9422	-0.8598	-0.8763
-4.0	10.0	-0.6633	-0.6692	-0.6445	-0.6502	-0.6160	-0.6214
-4.0	12.0	-0.4796	-0.4808	-0.4704	-0.4716	-0.4562	-0.4574
-4.0	14.0	-0.3616	-0.3612	-0.3566	-0.3562	-0.3488	-0.3485
-4.0	16.0	-0.2815	-0.2806	-0.2786	-0.2777	-0.2740	-0.2732
-2.0	-16.0	0.0753	0.0790	0.0760	0.0797	0.0772	0.0809
-2.0	-14.0	0.0607	0.0651	0.0627	0.0672	0.0658	0.0704
-2.0	-12.0	0.0159	0.0204	0.0213	0.0261	0.0295	0.0347
-2.0	-10.0	-0.1065	-0.1051	-0.0899	-0.0874	-0.0653	-0.0614
-2.0	-8.0	-0.4321	-0.4454	-0.3716	-0.3807	-0.2875	-0.2912
-2.0	-6.0	-0.0218	-0.0793	0.1013	0.0577	0.2585	0.2312
-2.0	-4.0	0.8148	0.6691	0.6456	0.4869	0.6103	0.4545
-2.0	-2.0	2.5022	1.1946	1.4461	0.3811	0.8897	0.0913
-2.0	0.0	2.2540	0.0906	0.9233	-0.7534	0.2419	-0.9342
-2.0	2.0	-0.8046	-1.9955	-1.3418	-2.2532	-1.4396	-2.0872
-2.0	4.0	-3.0621	-3.3105	-2.8144	-3.0339	-2.4062	-2.5906
-2.0	6.0	-2.2438	-2.3147	-2.0840	-2.1492	-1.8601	-1.9180
-2.0	8.0	-1.3988	-1.4174	-1.3432	-1.3609	-1.2604	-1.2767
-2.0	10.0	-0.7479	-0.7511	-0.7265	-0.7296	-0.6939	-0.6969
-2.0	12.0	-0.5297	-0.5287	-0.5193	-0.5184	-0.5033	-0.5024

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-2.0	14.0	-0.3926	-0.3906	-0.3870	-0.3851	-0.3783	-0.3765
-2.0	16.0	-0.3013	-0.2993	-0.2981	-0.2961	-0.2930	-0.2911
0.0	-16.0	0.1089	0.1130	0.1094	0.1134	0.1101	0.1142
0.0	-14.0	0.1118	0.1171	0.1132	0.1185	0.1154	0.1207
0.0	-12.0	0.0990	0.1058	0.1033	0.1100	0.1096	0.1164
0.0	-10.0	0.0462	0.0534	0.0590	0.0664	0.0775	0.0853
0.0	-8.0	-0.0962	-0.0959	-0.0553	-0.0536	0.0012	0.0047
0.0	-6.0	0.3489	0.3064	0.4266	0.3915	0.5237	0.4974
0.0	-4.0	1.2400	0.8789	1.0048	0.7103	0.8801	0.6595
0.0	-2.0	1.9899	0.7695	1.1581	0.2125	0.7611	0.0803
0.0	0.0	4.3642	2.9453	1.9409	0.8182	0.5175	-0.3011
0.0	2.0	-1.1194	-2.2409	-1.6298	-2.4978	-1.6689	-2.2867
0.0	4.0	-2.5352	-2.9204	-2.5095	-2.8280	-2.3014	-2.5470
0.0	6.0	-2.3209	-2.3902	-2.1675	-2.2313	-1.9500	-2.0069
0.0	8.0	-1.4820	-1.4914	-1.4266	-1.4357	-1.3436	-1.3524
0.0	10.0	-0.7898	-0.7878	-0.7676	-0.7657	-0.7337	-0.7320
0.0	12.0	-0.5570	-0.5528	-0.5461	-0.5421	-0.5293	-0.5254
0.0	14.0	-0.4099	-0.4060	-0.4041	-0.4002	-0.3949	-0.3912
0.0	16.0	-0.3123	-0.3090	-0.3089	-0.3057	-0.3036	-0.3005
2.0	-16.0	0.1419	0.1456	0.1420	0.1457	0.1422	0.1458
2.0	-14.0	0.1636	0.1684	0.1642	0.1690	0.1652	0.1699
2.0	-12.0	0.1862	0.1922	0.1884	0.1943	0.1916	0.1974
2.0	-10.0	0.2059	0.2119	0.2125	0.2185	0.2220	0.2280
2.0	-8.0	0.2132	0.2120	0.2333	0.2327	0.2612	0.2612
2.0	-6.0	0.5150	0.4747	0.5639	0.5274	0.6247	0.5932
2.0	-4.0	0.7719	0.5473	0.7517	0.5628	0.7891	0.6379
2.0	-2.0	2.0760	1.3668	1.4289	0.8845	1.0592	0.6694
2.0	0.0	2.5387	1.2550	1.2925	0.3903	0.5440	-0.0303
2.0	2.0	-1.0813	-1.7753	-1.4783	-2.0033	-1.4960	-1.8637
2.0	4.0	-2.9624	-3.2007	-2.7608	-2.9573	-2.4108	-2.5630
2.0	6.0	-2.3027	-2.3243	-2.1557	-2.1769	-1.9487	-1.9696
2.0	8.0	-1.4883	-1.4787	-0.9872	-0.9592	-1.0547	-1.0498
2.0	10.0	-0.7917	-0.7820	-0.7699	-0.7607	-0.7367	-0.7282
2.0	12.0	-0.5592	-0.5512	-0.5484	-0.5407	-0.5318	-0.5244
2.0	14.0	-0.4113	-0.4053	-0.4055	-0.3996	-0.3964	-0.3907
2.0	16.0	-0.3129	-0.3084	-0.3095	-0.3051	-0.3042	-0.2999
4.0	-16.0	0.1689	0.1717	0.1687	0.1714	0.1682	0.1709

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
4.0	-14.0	0.2053	0.2086	0.2052	0.2084	0.2049	0.2081
4.0	-12.0	0.2538	0.2572	0.2542	0.2575	0.2546	0.2579
4.0	-10.0	0.3187	0.3203	0.3208	0.3224	0.3236	0.3252
4.0	-8.0	0.3992	0.3919	0.4080	0.4011	0.4194	0.4131
4.0	-6.0	0.5801	0.5375	0.6085	0.5687	0.6424	0.6065
4.0	-4.0	0.6748	0.5288	0.7378	0.6066	0.8102	0.6976
4.0	-2.0	2.3990	2.7721	1.4343	1.1293	1.1724	0.9341
4.0	0.0	0.8372	0.3443	0.4644	0.0644	0.2853	-0.0220
4.0	2.0	-1.5470	-1.9122	-1.5992	-1.8849	-1.4590	-1.6690
4.0	4.0	-3.1372	-3.1351	-2.8102	-2.8166	-2.3848	-2.4003
4.0	6.0	-2.1506	-2.1147	-2.0275	-1.9965	-1.8519	-1.8274
4.0	8.0	-1.1140	-1.0899	-1.0690	-1.0467	-1.0019	-0.9820
4.0	10.0	-0.7539	-0.7375	-0.7339	-0.7183	-0.7034	-0.6888
4.0	12.0	-0.5358	-0.5247	-0.5258	-0.5151	-0.5102	-0.5000
4.0	14.0	-0.3962	-0.3886	-0.3907	-0.3833	-0.3821	-0.3749
4.0	16.0	-0.3026	-0.2973	-0.2994	-0.2942	-0.2944	-0.2892
6.0	-16.0	0.1862	0.1878	0.1857	0.1873	0.1848	0.1864
6.0	-14.0	0.2307	0.2322	0.2300	0.2314	0.2288	0.2302
6.0	-12.0	0.2919	0.2924	0.2910	0.2916	0.2895	0.2901
6.0	-10.0	0.3769	0.3744	0.3762	0.3737	0.3747	0.3724
6.0	-8.0	0.4932	0.4820	0.4943	0.4834	0.4948	0.4844
6.0	-6.0	0.6529	0.6194	0.6617	0.6298	0.6701	0.6404
6.0	-4.0	0.7496	0.6610	0.7672	0.6844	0.7793	0.7046
6.0	-2.0	0.9800	0.8128	0.9247	0.7725	0.8669	0.7345
6.0	0.0	-0.0053	-0.2433	-0.0909	-0.2994	-0.0898	-0.2618
6.0	2.0	-2.5332	-2.6293	-2.1940	-2.2847	-1.7701	-1.8516
6.0	4.0	-2.6576	-2.6223	-2.4230	-2.3951	-2.1112	-2.0926
6.0	6.0	-1.8666	-1.8206	-1.7734	-1.7319	-1.6384	-1.6030
6.0	8.0	-0.9743	-0.9461	-0.9380	-0.9114	-0.8835	-0.8593
6.0	10.0	-0.6749	-0.6566	-0.6580	-0.6404	-0.6321	-0.6155
6.0	12.0	-0.4878	-0.4757	-0.4791	-0.4673	-0.4655	-0.4543
6.0	14.0	-0.3656	-0.3574	-0.3607	-0.3527	-0.3531	-0.3453
6.0	16.0	-0.2824	-0.2766	-0.2795	-0.2738	-0.2749	-0.2694
8.0	-16.0	0.1927	0.1932	0.1920	0.1925	0.1908	0.1914
8.0	-14.0	0.2385	0.2384	0.2375	0.2374	0.2358	0.2358
8.0	-12.0	0.3009	0.2994	0.2994	0.2979	0.2970	0.2955
8.0	-10.0	0.3871	0.3822	0.3848	0.3800	0.3810	0.3764

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
8.0	-8.0	0.5082	0.4963	0.5045	0.4929	0.4984	0.4872
8.0	-6.0	0.6875	0.6619	0.6798	0.6550	0.6670	0.6435
8.0	-4.0	0.9657	0.9167	0.9396	0.8928	0.9003	0.8568
8.0	-2.0	0.6419	0.5590	0.6012	0.5360	0.5481	0.4776
8.0	0.0	-0.4377	-0.5198	-0.3783	-0.4552	-0.3021	-0.3715
8.0	2.0	-1.8530	-1.8778	-1.6571	-1.6822	-1.4067	-1.4320
8.0	4.0	-1.9174	-1.8961	-1.7861	-1.7677	-1.6040	-1.5896
8.0	6.0	-1.0835	-1.0562	-1.0278	-1.0024	-0.9463	-0.9238
8.0	8.0	-0.7755	-0.7532	-0.7496	-0.7283	-0.7105	-0.6908
8.0	10.0	-0.5630	-0.5470	-0.5500	-0.5346	-0.5301	-0.5154
8.0	12.0	-0.4205	-0.4094	-0.4135	-0.4026	-0.4025	-0.3921
8.0	14.0	-0.3229	-0.3151	-0.3189	-0.3112	-0.3125	-0.3050
8.0	16.0	-0.2542	-0.2485	-0.2517	-0.2461	-0.2477	-0.2423
10.0	-16.0	0.1894	0.1891	0.1886	0.1883	0.1874	0.1871
10.0	-14.0	0.2314	0.2303	0.2303	0.2292	0.2285	0.2274
10.0	-12.0	0.2866	0.2840	0.2849	0.2823	0.2823	0.2797
10.0	-10.0	0.3595	0.3540	0.3568	0.3514	0.3525	0.3472
10.0	-8.0	0.4551	0.4447	0.4505	0.4402	0.4432	0.4332
10.0	-6.0	0.5758	0.5575	0.5670	0.5491	0.5533	0.5362
10.0	-4.0	0.6892	0.6607	0.6724	0.6448	0.6473	0.6210
10.0	-2.0	0.6184	0.5821	0.6000	0.5651	0.5731	0.5403
10.0	0.0	0.1002	0.0697	0.1152	0.0857	0.1347	0.1068
10.0	2.0	-0.5457	-0.5559	-0.4927	-0.5031	-0.4195	-0.4300
10.0	4.0	-0.7754	-0.7675	-0.7271	-0.7201	-0.6577	-0.6519
10.0	6.0	-0.7016	-0.6865	-0.6723	-0.6581	-0.6288	-0.6158
10.0	8.0	-0.5614	-0.5466	-0.5453	-0.5311	-0.5207	-0.5074
10.0	10.0	-0.4381	-0.4262	-0.4291	-0.4175	-0.4152	-0.4041
10.0	12.0	-0.3438	-0.3347	-0.3385	-0.3296	-0.3303	-0.3217
10.0	14.0	-0.2735	-0.2667	-0.2703	-0.2636	-0.2652	-0.2587
10.0	16.0	-0.2210	-0.2159	-0.2189	-0.2139	-0.2157	-0.2108
12.0	-16.0	0.1787	0.1778	0.1779	0.1771	0.1768	0.1760
12.0	-14.0	0.2139	0.2122	0.2128	0.2112	0.2112	0.2096
12.0	-12.0	0.2576	0.2546	0.2561	0.2531	0.2537	0.2507
12.0	-10.0	0.3107	0.3055	0.3084	0.3033	0.3047	0.2997
12.0	-8.0	0.3714	0.3631	0.3678	0.3596	0.3621	0.3541
12.0	-6.0	0.4288	0.4163	0.4232	0.4109	0.4145	0.4026
12.0	-4.0	0.4458	0.4292	0.4384	0.4222	0.4271	0.4115

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
12.0	-2.0	0.3460	0.3280	0.3410	0.3234	0.3332	0.3163
12.0	0.0	0.0847	0.0707	0.0900	0.0762	0.0973	0.0840
12.0	2.0	-0.2167	-0.2221	-0.2006	-0.2060	-0.1772	-0.1827
12.0	4.0	-0.3884	-0.3853	-0.3705	-0.3677	-0.3438	-0.3415
12.0	6.0	-0.4183	-0.4104	-0.4046	-0.3971	-0.3837	-0.3767
12.0	8.0	-0.3791	-0.3701	-0.3701	-0.3613	-0.3561	-0.3478
12.0	10.0	-0.3224	-0.3142	-0.3167	-0.3086	-0.3077	-0.3000
12.0	12.0	-0.2687	-0.2618	-0.2208	-0.2154	-0.2592	-0.2527
12.0	14.0	-0.2232	-0.2177	-0.2650	-0.2582	-0.2171	-0.2118
12.0	16.0	-0.1863	-0.1820	-0.1847	-0.1805	-0.1822	-0.1780
14.0	-16.0	0.1634	0.1623	0.1628	0.1617	0.1618	0.1607
14.0	-14.0	0.1908	0.1890	0.1900	0.1881	0.1886	0.1868
14.0	-12.0	0.2226	0.2196	0.2213	0.2184	0.2194	0.2165
14.0	-10.0	0.2571	0.2527	0.2554	0.2510	0.2527	0.2484
14.0	-8.0	0.2899	0.2836	0.2876	0.2813	0.2838	0.2777
14.0	-6.0	0.3097	0.3013	0.3066	0.2983	0.3018	0.2937
14.0	-4.0	0.2945	0.2845	0.2913	0.2815	0.2863	0.2767
14.0	-2.0	0.2178	0.2078	0.2161	0.2063	0.2134	0.2039
14.0	0.0	0.0773	0.0698	0.0791	0.0717	0.0818	0.0745
14.0	2.0	-0.0796	-0.0829	-0.0741	-0.0774	-0.0659	-0.0692
14.0	4.0	-0.1926	-0.1915	-0.1856	-0.1846	-0.1750	-0.1742
14.0	6.0	-0.2424	-0.2384	-0.2361	-0.2322	-0.2263	-0.2226
14.0	8.0	-0.2468	-0.2414	-0.2419	-0.2367	-0.2343	-0.2293
14.0	10.0	-0.2287	-0.2232	-0.2252	-0.2198	-0.2197	-0.2145
14.0	12.0	-0.2030	-0.1981	-0.2006	-0.1957	-0.1967	-0.1920
14.0	14.0	-0.1769	-0.1727	-0.1752	-0.1710	-0.1725	-0.1684
14.0	16.0	-0.1531	-0.1496	-0.1519	-0.1484	-0.1500	-0.1466
16.0	-16.0	0.1461	0.1449	0.1456	0.1444	0.1448	0.1436
16.0	-14.0	0.1664	0.1646	0.1657	0.1639	0.1646	0.1628
16.0	-12.0	0.1879	0.1853	0.1870	0.1844	0.1855	0.1829
16.0	-10.0	0.2085	0.2049	0.2073	0.2037	0.2054	0.2019
16.0	-8.0	0.2238	0.2191	0.2223	0.2177	0.2200	0.2154
16.0	-6.0	0.2261	0.2203	0.2244	0.2187	0.2217	0.2161
16.0	-4.0	0.2046	0.1983	0.2031	0.1968	0.2006	0.1945
16.0	-2.0	0.1509	0.1450	0.1502	0.1443	0.1490	0.1433
16.0	0.0	0.0688	0.0644	0.0695	0.0651	0.0705	0.0661
16.0	2.0	-0.0214	-0.0235	-0.0193	-0.0214	-0.0160	-0.0182

		Z =3.3		Z =3.5		Z =3.8	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
16.0	4.0	-0.0951	-0.0949	-0.0922	-0.0920	-0.0876	-0.0875
16.0	6.0	-0.1400	-0.1379	-0.1370	-0.1349	-0.1322	-0.1303
16.0	8.0	-0.1583	-0.1551	-0.1557	-0.1526	-0.1516	-0.1486
16.0	10.0	-0.1590	-0.1554	-0.1569	-0.1534	-0.1536	-0.1502
16.0	12.0	-0.1501	-0.1466	-0.1485	-0.1451	-0.1460	-0.1426
16.0	14.0	-0.1372	-0.1340	-0.1360	-0.1329	-0.1341	-0.1311
16.0	16.0	-0.1233	-0.1206	-0.1224	-0.1197	-0.1210	-0.1183

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-16.0	-16.0	-0.0114	-0.0117	-0.0096	-0.0097
-16.0	-14.0	-0.0240	-0.0249	-0.0213	-0.0219
-16.0	-12.0	-0.0402	-0.0420	-0.0364	-0.0377
-16.0	-10.0	-0.0608	-0.0639	-0.0553	-0.0576
-16.0	-8.0	-0.0862	-0.0908	-0.0783	-0.0818
-16.0	-6.0	-0.1160	-0.1223	-0.1047	-0.1094
-16.0	-4.0	-0.1481	-0.1558	-0.1317	-0.1377
-16.0	-2.0	-0.1770	-0.1858	-0.1550	-0.1618
-16.0	0.0	-0.1964	-0.2053	-0.1701	-0.1771
-16.0	2.0	-0.2025	-0.2106	-0.1756	-0.1822
-16.0	4.0	-0.1978	-0.2045	-0.1740	-0.1797
-16.0	6.0	-0.1875	-0.1928	-0.1683	-0.1729
-16.0	8.0	-0.1749	-0.1788	-0.1601	-0.1636
-16.0	10.0	-0.1614	-0.1643	-0.1502	-0.1528
-16.0	12.0	-0.1477	-0.1497	-0.1393	-0.1412
-16.0	14.0	-0.1343	-0.1357	-0.1279	-0.1293
-16.0	16.0	-0.1215	-0.1226	-0.1167	-0.1177
-14.0	-16.0	-0.0089	-0.0091	-0.0065	-0.0065
-14.0	-14.0	-0.0239	-0.0249	-0.0204	-0.0209
-14.0	-12.0	-0.0444	-0.0467	-0.0391	-0.0407
-14.0	-10.0	-0.0719	-0.0763	-0.0642	-0.0671
-14.0	-8.0	-0.1086	-0.1155	-0.0967	-0.1014
-14.0	-6.0	-0.1556	-0.1656	-0.1364	-0.1432
-14.0	-4.0	-0.2091	-0.2222	-0.1781	-0.1869
-14.0	-2.0	-0.2555	-0.2707	-0.2103	-0.2209
-14.0	0.0	-0.2789	-0.2944	-0.2245	-0.2357
-14.0	2.0	-0.2760	-0.2898	-0.2232	-0.2336

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-14.0	4.0	-0.2592	-0.2699	-0.2157	-0.2243
-14.0	6.0	-0.2394	-0.2471	-0.2067	-0.2131
-14.0	8.0	-0.2189	-0.2242	-0.1952	-0.1998
-14.0	10.0	-0.1980	-0.2015	-0.1811	-0.1843
-14.0	12.0	-0.1775	-0.1799	-0.1655	-0.1677
-14.0	14.0	-0.1583	-0.1599	-0.1496	-0.1511
-14.0	16.0	-0.1407	-0.1418	-0.1344	-0.1354
-12.0	-16.0	-0.0045	-0.0046	-0.0016	-0.0013
-12.0	-14.0	-0.0224	-0.0234	-0.0177	-0.0181
-12.0	-12.0	-0.0485	-0.0514	-0.0412	-0.0428
-12.0	-10.0	-0.0867	-0.0926	-0.0750	-0.0784
-12.0	-8.0	-0.1435	-0.1538	-0.1232	-0.1291
-12.0	-6.0	-0.2273	-0.2429	-0.1876	-0.1963
-12.0	-4.0	-0.3317	-0.3534	-0.2562	-0.2682
-12.0	-2.0	-0.4071	-0.4341	-0.2953	-0.3110
-12.0	0.0	-0.4074	-0.4363	-0.2870	-0.3050
-12.0	2.0	-0.3640	-0.3890	-0.2623	-0.2793
-12.0	4.0	-0.3284	-0.3464	-0.2517	-0.2650
-12.0	6.0	-0.3033	-0.3148	-0.2480	-0.2572
-12.0	8.0	-0.2752	-0.2823	-0.2374	-0.2434
-12.0	10.0	-0.2443	-0.2487	-0.2190	-0.2228
-12.0	12.0	-0.2142	-0.2169	-0.1971	-0.1996
-12.0	14.0	-0.1867	-0.1884	-0.1750	-0.1766
-12.0	16.0	-0.1627	-0.1637	-0.1544	-0.1554
-10.0	-16.0	0.0023	0.0027	0.0059	0.0067
-10.0	-14.0	-0.0184	-0.0192	-0.0122	-0.0121
-10.0	-12.0	-0.0518	-0.0549	-0.0410	-0.0423
-10.0	-10.0	-0.1066	-0.1140	-0.0869	-0.0902
-10.0	-8.0	-0.2011	-0.2150	-0.1596	-0.1655
-10.0	-6.0	-0.3640	-0.3856	-0.2650	-0.2731
-10.0	-4.0	-0.5807	-0.6117	-0.3721	-0.3835
-10.0	-2.0	-0.6772	-0.7212	-0.3916	-0.4105
-10.0	0.0	-0.5298	-0.5835	-0.3006	-0.3279
-10.0	2.0	-0.3773	-0.4253	-0.2320	-0.2599
-10.0	4.0	-0.3671	-0.3982	-0.2531	-0.2738
-10.0	6.0	-0.3762	-0.3934	-0.2876	-0.3004
-10.0	8.0	-0.3475	-0.3568	-0.2884	-0.2959

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-10.0	10.0	-0.3029	-0.3080	-0.2655	-0.2699
-10.0	12.0	-0.2586	-0.2614	-0.2348	-0.2373
-10.0	14.0	-0.2197	-0.2213	-0.2041	-0.2056
-10.0	16.0	-0.1871	-0.1880	-0.1766	-0.1774
-8.0	-16.0	0.0131	0.0141	0.0175	0.0189
-8.0	-14.0	-0.0100	-0.0099	-0.0017	-0.0007
-8.0	-12.0	-0.0514	-0.0538	-0.0354	-0.0354
-8.0	-10.0	-0.1285	-0.1359	-0.0943	-0.0960
-8.0	-8.0	-0.2816	-0.2966	-0.1954	-0.1980
-8.0	-6.0	-0.5649	-0.5843	-0.3410	-0.3407
-8.0	-4.0	-0.8885	-0.9070	-0.4545	-0.4511
-8.0	-2.0	-0.0690	-0.1141	-0.3863	-0.3970
-8.0	0.0	0.2541	0.1694	0.3481	0.3156
-8.0	2.0	0.1889	0.1026	0.2122	0.1707
-8.0	4.0	-0.2661	-0.3192	-0.2175	-0.2476
-8.0	6.0	-0.4682	-0.4923	-0.3354	-0.3523
-8.0	8.0	-0.4429	-0.4544	-0.3544	-0.3633
-8.0	10.0	-0.3758	-0.3814	-0.3225	-0.3273
-8.0	12.0	-0.3106	-0.3133	-0.2783	-0.2808
-8.0	14.0	-0.2564	-0.2577	-0.2362	-0.2374
-8.0	16.0	-0.2132	-0.2137	-0.2001	-0.2006
-6.0	-16.0	0.0291	0.0311	0.0340	0.0363
-6.0	-14.0	0.0061	0.0076	0.0163	0.0187
-6.0	-12.0	-0.0403	-0.0405	-0.0180	-0.0159
-6.0	-10.0	-0.1362	-0.1404	-0.0828	-0.0810
-6.0	-8.0	-0.3392	-0.3489	-0.1947	-0.1908
-6.0	-6.0	-0.6852	-0.6866	-0.3303	-0.3163
-6.0	-4.0	0.0361	0.0633	-0.3638	-0.3419
-6.0	-2.0	0.2385	0.1911	0.5370	0.5330
-6.0	0.0	0.4952	0.3521	0.5784	0.5228
-6.0	2.0	0.1373	0.0039	0.2366	0.1729
-6.0	4.0	-0.5240	-0.5965	-0.2593	-0.3009
-6.0	6.0	-0.7694	-0.8026	-0.4303	-0.4507
-6.0	8.0	-0.5711	-0.5841	-0.4435	-0.4535
-6.0	10.0	-0.4618	-0.4673	-0.3894	-0.3941
-6.0	12.0	-0.3672	-0.3694	-0.3256	-0.3276
-6.0	14.0	-0.2943	-0.2950	-0.2693	-0.2699

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-6.0	16.0	-0.2391	-0.2391	-0.2234	-0.2234
-4.0	-16.0	0.0516	0.0546	0.0564	0.0596
-4.0	-14.0	0.0335	0.0368	0.0446	0.0485
-4.0	-12.0	-0.0085	-0.0055	0.0177	0.0223
-4.0	-10.0	-0.1017	-0.1004	-0.0353	-0.0294
-4.0	-8.0	-0.2931	-0.2946	-0.1179	-0.1086
-4.0	-6.0	0.2574	0.2636	-0.1683	-0.1530
-4.0	-4.0	0.4679	0.4451	0.6852	0.6888
-4.0	-2.0	0.6907	0.4623	0.8583	0.7760
-4.0	0.0	0.4679	0.1105	0.6631	0.5102
-4.0	2.0	-0.4492	-0.6803	0.0216	-0.0953
-4.0	4.0	-1.1335	-1.2252	-0.5676	-0.6253
-4.0	6.0	-1.1376	-1.1756	-0.7617	-0.7882
-4.0	8.0	-0.7187	-0.7322	-0.5464	-0.5568
-4.0	10.0	-0.5491	-0.5539	-0.4577	-0.4617
-4.0	12.0	-0.4216	-0.4227	-0.3709	-0.3720
-4.0	14.0	-0.3294	-0.3291	-0.2998	-0.2996
-4.0	16.0	-0.2624	-0.2616	-0.2442	-0.2435
-2.0	-16.0	0.0800	0.0838	0.0839	0.0876
-2.0	-14.0	0.0730	0.0778	0.0829	0.0878
-2.0	-12.0	0.0485	0.0544	0.0734	0.0798
-2.0	-10.0	-0.0117	-0.0051	0.0516	0.0601
-2.0	-8.0	-0.1254	-0.1203	0.0317	0.0422
-2.0	-6.0	0.5018	0.4978	0.6324	0.6407
-2.0	-4.0	0.7915	0.6888	0.9078	0.8626
-2.0	-2.0	0.8692	0.4491	1.0059	0.8249
-2.0	0.0	0.2853	-0.2910	0.6111	0.3586
-2.0	2.0	-0.8690	-1.2156	-0.1958	-0.3715
-2.0	4.0	-1.5655	-1.6935	-0.8195	-0.9004
-2.0	6.0	-1.4164	-1.4610	-0.9558	-0.9878
-2.0	8.0	-0.8315	-0.8445	-0.6279	-0.6383
-2.0	10.0	-0.6173	-0.6200	-0.5121	-0.5147
-2.0	12.0	-0.4642	-0.4635	-0.4069	-0.4065
-2.0	14.0	-0.3567	-0.3550	-0.3236	-0.3223
-2.0	16.0	-0.2802	-0.2785	-0.2601	-0.2586
0.0	-16.0	0.1118	0.1157	0.1138	0.1176
0.0	-14.0	0.1205	0.1257	0.1268	0.1319

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
0.0	-12.0	0.1236	0.1305	0.1408	0.1475
0.0	-10.0	0.1168	0.1251	0.1604	0.1687
0.0	-8.0	0.1093	0.1155	0.2096	0.2171
0.0	-6.0	0.6673	0.6542	0.7271	0.7226
0.0	-4.0	0.9253	0.8022	0.9716	0.9080
0.0	-2.0	0.8355	0.4716	0.9954	0.8205
0.0	0.0	0.1801	-0.2657	0.5289	0.3062
0.0	2.0	-1.0254	-1.3528	-0.3050	-0.4745
0.0	4.0	-1.6334	-1.7831	-0.9180	-1.0059
0.0	6.0	-1.5123	-1.5565	-1.0485	-1.0802
0.0	8.0	-0.8819	-0.8904	-0.6694	-0.6767
0.0	10.0	-0.6535	-0.6523	-0.5428	-0.5424
0.0	12.0	-0.4881	-0.4848	-0.4277	-0.4251
0.0	14.0	-0.3722	-0.3688	-0.3373	-0.3345
0.0	16.0	-0.2901	-0.2873	-0.2691	-0.2665
2.0	-16.0	0.1424	0.1458	0.1420	0.1453
2.0	-14.0	0.1671	0.1716	0.1687	0.1729
2.0	-12.0	0.1983	0.2039	0.2051	0.2102
2.0	-10.0	0.2414	0.2472	0.2602	0.2655
2.0	-8.0	0.3136	0.3147	0.3568	0.3585
2.0	-6.0	0.7110	0.6886	0.7319	0.7175
2.0	-4.0	0.9132	0.8148	0.9368	0.8780
2.0	-2.0	0.9789	0.7558	0.9789	0.8555
2.0	0.0	0.3719	0.0881	0.5320	0.3800
2.0	2.0	-0.9348	-1.1398	-0.3364	-0.4542
2.0	4.0	-1.6638	-1.7600	-0.9708	-1.0313
2.0	6.0	-1.5331	-1.5524	-1.0877	-1.1045
2.0	8.0	-0.8880	-0.8853	-0.6795	-0.6792
2.0	10.0	-0.6580	-0.6511	-0.5486	-0.5438
2.0	12.0	-0.4910	-0.4846	-0.4308	-0.4257
2.0	14.0	-0.3737	-0.3685	-0.3389	-0.3345
2.0	16.0	-0.2907	-0.2868	-0.2696	-0.2661
4.0	-16.0	0.1669	0.1695	0.1644	0.1668
4.0	-14.0	0.2039	0.2069	0.2012	0.2039
4.0	-12.0	0.2547	0.2578	0.2525	0.2552
4.0	-10.0	0.3280	0.3295	0.3278	0.3291
4.0	-8.0	0.4378	0.4326	0.4435	0.4394

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
4.0	-6.0	0.6839	0.6556	0.6259	0.6073
4.0	-4.0	0.8839	0.8036	0.8411	0.7890
4.0	-2.0	1.0042	0.8516	0.8667	0.7757
4.0	0.0	0.3429	0.1527	0.4068	0.2987
4.0	2.0	-0.9255	-1.0524	-0.4313	-0.5075
4.0	4.0	-1.6490	-1.6735	-1.0132	-1.0383
4.0	6.0	-1.4892	-1.4765	-0.7453	-0.7438
4.0	8.0	-0.8508	-0.8361	-0.6585	-0.6497
4.0	10.0	-0.6307	-0.6186	-0.5288	-0.5200
4.0	12.0	-0.4721	-0.4631	-0.4156	-0.4084
4.0	14.0	-0.3606	-0.3541	-0.3277	-0.3221
4.0	16.0	-0.2816	-0.2768	-0.2614	-0.2572
6.0	-16.0	0.1824	0.1839	0.1783	0.1796
6.0	-14.0	0.2256	0.2269	0.2198	0.2210
6.0	-12.0	0.2853	0.2857	0.2770	0.2774
6.0	-10.0	0.3695	0.3673	0.3574	0.3554
6.0	-8.0	0.4904	0.4812	0.4719	0.4642
6.0	-6.0	0.6696	0.6446	0.6334	0.6140
6.0	-4.0	0.7608	0.7020	0.8311	0.7925
6.0	-2.0	0.7613	0.6645	0.6205	0.5563
6.0	0.0	0.0428	-0.0714	0.1394	0.0690
6.0	2.0	-1.0960	-1.1579	-0.5868	-0.6296
6.0	4.0	-1.5413	-1.5371	-1.0041	-1.0094
6.0	6.0	-0.9821	-0.9615	-0.6849	-0.6747
6.0	8.0	-0.7592	-0.7403	-0.5975	-0.5849
6.0	10.0	-0.5700	-0.5560	-0.4822	-0.4715
6.0	12.0	-0.4322	-0.4222	-0.3824	-0.3742
6.0	14.0	-0.3339	-0.3268	-0.3044	-0.2982
6.0	16.0	-0.2633	-0.2581	-0.2450	-0.2403
8.0	-16.0	0.1879	0.1883	0.1828	0.1832
8.0	-14.0	0.2315	0.2314	0.2241	0.2240
8.0	-12.0	0.2904	0.2890	0.2792	0.2778
8.0	-10.0	0.3708	0.3665	0.3531	0.3491
8.0	-8.0	0.4813	0.4711	0.4510	0.4422
8.0	-6.0	0.6321	0.6114	0.5739	0.5569
8.0	-4.0	0.8105	0.7739	0.6914	0.6631
8.0	-2.0	0.4526	0.3964	0.6705	0.6321

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
8.0	0.0	-0.1726	-0.2273	0.3266	0.2892
8.0	2.0	-0.9754	-0.9993	-0.1915	-0.2116
8.0	4.0	-0.8210	-0.8154	-0.5054	-0.5055
8.0	6.0	-0.7705	-0.7539	-0.5608	-0.5509
8.0	8.0	-0.6199	-0.6038	-0.4988	-0.4872
8.0	10.0	-0.4819	-0.4692	-0.4127	-0.4026
8.0	12.0	-0.3754	-0.3660	-0.3347	-0.3268
8.0	14.0	-0.2964	-0.2895	-0.2714	-0.2654
8.0	16.0	-0.2377	-0.2326	-0.2218	-0.2172
10.0	-16.0	0.1843	0.1840	0.1790	0.1787
10.0	-14.0	0.2239	0.2229	0.2162	0.2152
10.0	-12.0	0.2753	0.2728	0.2637	0.2614
10.0	-10.0	0.3415	0.3364	0.3234	0.3188
10.0	-8.0	0.4246	0.4154	0.3952	0.3870
10.0	-6.0	0.5199	0.5043	0.4705	0.4571
10.0	-4.0	0.5899	0.5668	0.5139	0.4948
10.0	-2.0	0.5149	0.4866	0.4429	0.4202
10.0	0.0	0.1676	0.1433	0.1911	0.1714
10.0	2.0	-0.2774	-0.2879	-0.1349	-0.1448
10.0	4.0	-0.5120	-0.5087	-0.3464	-0.3457
10.0	6.0	-0.5309	-0.5207	-0.4064	-0.3995
10.0	8.0	-0.4628	-0.4514	-0.3826	-0.3739
10.0	10.0	-0.3813	-0.3714	-0.3316	-0.3235
10.0	12.0	-0.3099	-0.3020	-0.2788	-0.2721
10.0	14.0	-0.2525	-0.2465	-0.2326	-0.2273
10.0	16.0	-0.2075	-0.2029	-0.1944	-0.1902
12.0	-16.0	0.1738	0.1730	0.1689	0.1681
12.0	-14.0	0.2069	0.2053	0.1999	0.1984
12.0	-12.0	0.2474	0.2446	0.2372	0.2345
12.0	-10.0	0.2953	0.2906	0.2803	0.2759
12.0	-8.0	0.3478	0.3403	0.3255	0.3186
12.0	-6.0	0.3932	0.3822	0.3614	0.3516
12.0	-4.0	0.4002	0.3859	0.3617	0.3493
12.0	-2.0	0.3146	0.2992	0.2877	0.2745
12.0	0.0	0.1118	0.0995	0.1258	0.1151
12.0	2.0	-0.1267	-0.1322	-0.0670	-0.0724
12.0	4.0	-0.2839	-0.2825	-0.2078	-0.2075

		Z =4.5		Z =5.5	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
12.0	6.0	-0.3351	-0.3293	-0.2691	-0.2649
12.0	8.0	-0.3224	-0.3151	-0.2741	-0.2683
12.0	10.0	-0.2856	-0.2786	-0.2526	-0.2467
12.0	12.0	-0.2448	-0.2387	-0.2225	-0.2173
12.0	14.0	-0.2075	-0.2025	-0.1924	-0.1880
12.0	16.0	-0.1757	-0.1718	-0.1654	-0.1618
14.0	-16.0	0.1591	0.1581	0.1548	0.1538
14.0	-14.0	0.1850	0.1832	0.1790	0.1773
14.0	-12.0	0.2144	0.2116	0.2062	0.2036
14.0	-10.0	0.2457	0.2415	0.2344	0.2306
14.0	-8.0	0.2743	0.2684	0.2592	0.2538
14.0	-6.0	0.2897	0.2821	0.2711	0.2641
14.0	-4.0	0.2738	0.2649	0.2550	0.2469
14.0	-2.0	0.2065	0.1976	0.1956	0.1876
14.0	0.0	0.0875	0.0806	0.0939	0.0876
14.0	2.0	-0.0469	-0.0502	-0.0221	-0.0254
14.0	4.0	-0.1500	-0.1495	-0.1156	-0.1157
14.0	6.0	-0.2028	-0.1997	-0.1692	-0.1668
14.0	8.0	-0.2156	-0.2111	-0.1880	-0.1842
14.0	10.0	-0.2060	-0.2013	-0.1851	-0.1810
14.0	12.0	-0.1870	-0.1826	-0.1718	-0.1678
14.0	14.0	-0.1656	-0.1617	-0.1547	-0.1511
14.0	16.0	-0.1451	-0.1419	-0.1372	-0.1342
16.0	-16.0	0.1426	0.1414	0.1390	0.1378
16.0	-14.0	0.1617	0.1599	0.1569	0.1553
16.0	-12.0	0.1817	0.1792	0.1755	0.1731
16.0	-10.0	0.2005	0.1971	0.1926	0.1893
16.0	-8.0	0.2139	0.2095	0.2042	0.2001
16.0	-6.0	0.2149	0.2096	0.2042	0.1992
16.0	-4.0	0.1945	0.1887	0.1848	0.1794
16.0	-2.0	0.1459	0.1404	0.1408	0.1357
16.0	0.0	0.0727	0.0685	0.0754	0.0714
16.0	2.0	-0.0083	-0.0105	0.0024	0.0002
16.0	4.0	-0.0766	-0.0766	-0.0605	-0.0608
16.0	6.0	-0.1207	-0.1190	-0.1035	-0.1021
16.0	8.0	-0.1413	-0.1386	-0.1257	-0.1233
16.0	10.0	-0.1453	-0.1421	-0.1324	-0.1296

		$Z = 4.5$		$Z = 5.5$	
x	y	S_0	S_1	S_0	S_1
16.0	12.0	-0.1396	-0.1364	-0.1295	-0.1267
16.0	14.0	-0.1293	-0.1264	-0.1216	-0.1189
16.0	16.0	-0.1174	-0.1148	-0.1116	-0.1092

B.2 Base diffuse 6-31+g*

		Z = 2.8		Z = 3.0		Z = 3.3	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-3.0	-2.5	8.582530	6.484214	3.065441	1.497445	-0.016685	-1.051599
-3.0	-2.0	12.421741	8.145621	4.934208	1.784185	0.524617	-1.546723
-3.0	-1.5	15.409188	8.605541	6.347573	1.556462	0.880710	-2.135076
-3.0	-1.0	15.697711	7.661152	6.348803	0.800878	0.712500	-2.731894
-3.0	-0.5	14.296765	6.227179	5.481077	-0.076958	0.244440	-3.206329
-3.0	0.0	12.832841	4.917611	4.641500	-0.743549	-0.168047	-3.456404
-3.0	0.5	11.291929	4.401936	3.843082	-0.839890	-0.512111	-3.371383
-3.0	1.0	8.967915	4.106893	2.657007	-0.723343	-0.989959	-3.127658
-3.0	1.5	5.579364	2.568171	0.889269	-1.258646	-1.701417	-3.110816
-3.0	2.0	1.796711	-0.084193	-1.122564	-2.462781	-2.516985	-3.392329
-3.0	2.5	-1.339576	-2.460202	-2.776855	-3.574514	-3.172714	-3.681009
-2.5	-2.5	8.513868	6.838995	3.096339	1.674597	0.050885	-1.066973
-2.5	-2.0	11.936249	8.442364	4.674714	1.942111	0.419559	-1.584317
-2.5	-1.5	15.027600	9.129047	6.089002	1.859110	0.723493	-2.123718
-2.5	-1.0	16.090871	8.554117	6.465746	1.250256	0.659393	-2.692562
-2.5	-0.5	15.038933	7.233987	5.766983	0.368423	0.234958	-3.190209
-2.5	0.0	13.243691	6.235889	4.741143	-0.155604	-0.267677	-3.396427
-2.5	0.5	11.666389	6.428641	3.905908	0.119679	-0.652208	-3.178669
-2.5	1.0	10.030904	6.577436	3.049132	0.459732	-1.033345	-2.859015
-2.5	1.5	7.227267	4.618132	1.584694	-0.294936	-1.631732	-2.923944
-2.5	2.0	3.289462	1.119590	-0.472032	-1.952891	-2.436526	-3.374213
-2.5	2.5	-0.310310	-1.824936	-2.344865	-3.384153	-3.149634	-3.785088
-2.0	-2.5	7.653672	5.867403	2.682748	1.134638	-0.076864	-1.348217
-2.0	-2.0	10.461746	7.154143	3.856247	1.179793	0.068650	-1.992456
-2.0	-1.5	13.242988	8.032895	5.063739	1.130747	0.252340	-2.552715
-2.0	-1.0	14.691575	8.164302	5.653278	0.846799	0.265110	-3.013019
-2.0	-0.5	14.202180	7.600829	5.280336	0.385956	-0.028012	-3.343672
-2.0	0.0	12.730877	7.156232	4.413997	0.169999	-0.483998	-3.433438
-2.0	0.5	11.473185	7.545966	3.704145	0.534588	-0.858471	-3.196233
-2.0	1.0	10.335980	7.391235	3.078079	0.728068	-1.183728	-2.940090
-2.0	1.5	8.062413	5.156046	1.885855	-0.162525	-1.683131	-3.058494
-2.0	2.0	4.371295	1.694853	-0.003389	-1.785704	-2.392769	-3.480877
-2.0	2.5	0.736138	-1.157881	-1.847250	-3.132076	-3.052985	-3.827162
-1.5	-2.5	7.414716	5.393263	2.605501	0.836621	-0.068612	-1.520205
-1.5	-2.0	9.678288	6.256333	3.397870	0.560140	-0.140236	-2.337705

		Z = 2.8		Z = 3.0		Z = 3.3	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-1.5	-1.5	12.051247	6.582908	4.378467	0.182574	-0.065801	-3.031417
-1.5	-1.0	14.214693	6.669643	5.414874	-0.054324	0.140468	-3.434260
-1.5	-0.5	15.361146	6.822410	5.967516	-0.057769	0.223362	-3.556731
-1.5	0.0	14.865979	6.842942	5.632564	0.008346	-0.027974	-3.530294
-1.5	0.5	13.176202	6.703867	4.642561	0.068468	-0.550414	-3.441388
-1.5	1.0	10.979077	6.055392	3.376692	-0.099818	-1.172922	-3.393170
-1.5	1.5	8.293499	4.451114	1.892858	-0.767306	-1.817475	-3.491570
-1.5	2.0	4.976465	2.100181	0.198770	-1.786507	-2.442631	-3.679371
-1.5	2.5	1.761507	-0.132580	-1.357805	-2.699007	-2.944708	-3.795806
-1.0	-2.5	8.079732	5.612979	3.045618	0.964112	0.168926	-1.454900
-1.0	-2.0	9.661251	5.756202	3.390598	0.267451	-0.137908	-2.445468
-1.0	-1.5	11.670047	5.394800	4.159253	-0.430064	-0.165543	-3.227734
-1.0	-1.0	15.210393	6.139554	5.967328	-0.221756	0.350690	-3.401108
-1.0	-0.5	19.154291	8.411597	8.060662	0.959224	1.041948	-3.036444
-1.0	0.0	20.179234	9.709513	8.561528	1.689275	1.111859	-2.769269
-1.0	0.5	17.071894	8.257185	6.768275	0.977497	0.245319	-3.041037
-1.0	1.0	12.150707	5.698427	3.945837	-0.363146	-1.033289	-3.552401
-1.0	1.5	8.046894	3.848855	1.620293	-1.297709	-2.050268	-3.853034
-1.0	2.0	5.150862	2.534034	0.134777	-1.774509	-2.601266	-3.852319
-1.0	2.5	2.787316	1.114802	-0.901769	-2.161840	-2.856574	-3.713495
-0.5	-2.5	8.718775	5.608078	3.478487	1.064376	0.415556	-1.313974
-0.5	-2.0	9.108063	4.856811	3.145473	-0.080855	-0.190261	-2.445926
-0.5	-1.5	10.264909	4.449244	3.439888	-0.755453	-0.414458	-3.172996
-0.5	-1.0	14.772373	7.290576	5.768194	0.626713	0.301914	-2.855652
-0.5	-0.5	21.517612	13.152313	9.335554	3.753857	1.541346	-1.737856
-0.5	0.0	24.479438	16.451093	10.817789	5.517240	1.954209	-1.111307
-0.5	0.5	19.912116	13.139367	8.231288	3.726409	0.768191	-1.858094
-0.5	1.0	12.106969	7.128296	3.841752	0.415393	-1.136062	-3.215121
-0.5	1.5	6.749242	3.390491	0.792940	-1.626863	-2.471779	-4.030682
-0.5	2.0	4.644406	2.322400	-0.290424	-2.013088	-2.883990	-4.041821
-0.5	2.5	3.539719	1.795073	-0.614865	-1.905558	-2.834197	-3.702959
0.0	-2.5	8.469905	5.264718	3.428003	1.049937	0.477629	-1.154316
0.0	-2.0	7.981721	4.220956	2.611312	-0.207806	-0.327284	-2.283200
0.0	-1.5	8.265538	4.144280	2.421014	-0.668072	-0.746630	-2.892725
0.0	-1.0	12.512328	8.300007	4.600700	1.453011	-0.092702	-2.275036
0.0	-0.5	20.029209	16.181339	8.546831	5.623954	1.273305	-0.778827
0.0	0.0	24.021262	20.627458	10.513992	7.916241	1.839720	0.001029

		Z = 2.8		Z = 3.0		Z = 3.3	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
0.0	0.5	19.281757	16.136303	7.829958	5.480725	0.600991	-1.035567
0.0	1.0	10.808376	8.019209	3.073373	0.992896	-1.461068	-2.897783
0.0	1.5	5.423132	2.998774	-0.016987	-1.826216	-2.838358	-4.078517
0.0	2.0	4.019375	1.807278	-0.727177	-2.329661	-3.116526	-4.180187
0.0	2.5	3.697061	1.709982	-0.607743	-1.998499	-2.879290	-3.766507
0.5	-2.5	7.197604	4.729490	2.867575	0.995626	0.373418	-0.950225
0.5	-2.0	7.197259	4.460012	2.310453	0.193116	-0.322120	-1.856268
0.5	-1.5	7.809263	5.052657	2.266816	0.069754	-0.694264	-2.334392
0.5	-1.0	11.328105	8.697120	4.019833	1.857943	-0.215242	-1.870983
0.5	-0.5	17.158641	14.751627	7.081251	5.035325	0.822853	-0.774441
0.5	0.0	20.249478	17.953382	8.608421	6.649136	1.229574	-0.284795
0.5	0.5	16.892828	14.504351	6.598107	4.663363	0.210040	-1.216158
0.5	1.0	10.323117	7.926005	2.800130	0.955691	-1.527760	-2.829842
0.5	1.5	5.629439	3.365961	0.089364	-1.596830	-2.769984	-3.923811
0.5	2.0	3.867335	1.717902	-0.788773	-2.326611	-3.107484	-4.115716
0.5	2.5	3.016232	1.104486	-0.934939	-2.268811	-2.969852	-3.814825
1.0	-2.5	5.626741	3.954189	2.192073	0.855873	0.270990	-0.729976
1.0	-2.0	6.876903	4.879006	2.370286	0.769967	-0.083013	-1.286815
1.0	-1.5	8.872666	6.418501	3.074163	1.147690	-0.151700	-1.562693
1.0	-1.0	12.059950	8.873475	4.625455	2.252119	0.245802	-1.387913
1.0	-0.5	15.587031	11.561243	6.480543	3.635245	0.835404	-0.993404
1.0	0.0	17.148281	12.540058	7.228396	4.080726	0.951198	-0.969634
1.0	0.5	15.387169	10.820951	6.005066	2.933821	0.196122	-1.636771
1.0	1.0	11.212335	7.452486	3.436588	0.862537	-1.107718	-2.674666
1.0	1.5	6.942314	4.167404	0.966748	-0.997037	-2.263145	-3.508833
1.0	2.0	3.887780	1.779347	-0.601945	-2.110346	-2.879905	-3.855532
1.0	2.5	1.825105	0.199423	-1.445086	-2.610929	-3.054303	-3.808814

		Z = 3.6		Z = 3.9	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-3.0	-2.5	-0.551060	-1.232247	-0.294315	-0.726681
-3.0	-2.0	-0.470394	-1.881763	-0.348764	-1.328821
-3.0	-1.5	-0.469710	-2.494690	-0.443555	-1.862800
-3.0	-1.0	-0.661370	-2.978142	-0.611847	-2.252615
-3.0	-0.5	-0.951926	-3.283814	-0.817996	-2.481411
-3.0	0.0	-1.205747	-3.401736	-1.013484	-2.569395
-3.0	0.5	-1.418831	-3.322601	-1.197207	-2.540052

		Z = 3.6		Z = 3.9	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-3.0	1.0	-1.682535	-3.141018	-1.407667	-2.448932
-3.0	1.5	-2.041239	-3.030583	-1.659418	-2.377728
-3.0	2.0	-2.435183	-3.047256	-1.917701	-2.359066
-3.0	2.5	-2.744225	-3.085898	-2.122030	-2.355935
-2.5	-2.5	-0.490738	-1.354812	-0.244239	-0.892959
-2.5	-2.0	-0.514897	-2.026216	-0.365982	-1.508947
-2.5	-1.5	-0.570337	-2.626297	-0.507229	-2.036545
-2.5	-1.0	-0.750859	-3.102131	-0.693285	-2.418196
-2.5	-0.5	-1.045538	-3.416846	-0.919841	-2.646735
-2.5	0.0	-1.353689	-3.523435	-1.153438	-2.733614
-2.5	0.5	-1.603595	-3.402834	-1.367701	-2.695235
-2.5	1.0	-2.167945	-3.201623	-1.584637	-2.604610
-2.5	1.5	-1.849352	-3.122745	-1.825312	-2.548348
-2.5	2.0	-2.544533	-3.198887	-2.072106	-2.551429
-2.5	2.5	-2.860245	-3.279466	-2.271108	-2.560829
-2.0	-2.5	-0.519660	-1.547671	-0.238196	-1.045469
-2.0	-2.0	-0.670701	-2.285967	-0.435178	-1.692224
-2.0	-1.5	-0.801449	-2.901278	-0.627554	-2.224829
-2.0	-1.0	-0.966980	-3.335540	-0.823977	-2.587473
-2.0	-0.5	-1.218341	-3.585125	-1.046052	-2.792418
-2.0	0.0	-1.523054	-3.654628	-1.291597	-2.872626
-2.0	0.5	-1.793837	-3.542348	-1.530176	-2.850305
-2.0	1.0	-2.038157	-3.377815	-1.758389	-2.784637
-2.0	1.5	-2.320110	-3.324276	-1.985384	-2.743227
-2.0	2.0	-2.643070	-3.382779	-2.202314	-2.737191
-2.0	2.5	-2.914500	-3.420956	-2.371026	-2.721722
-1.5	-2.5	-0.491422	-1.661740	-0.209080	-1.129028
-1.5	-2.0	-0.767181	-2.479930	-0.479442	-1.806650
-1.5	-1.5	-0.962524	-3.143560	-0.715970	-2.352948
-1.5	-1.0	-1.058791	-3.542492	-0.898462	-2.699747
-1.5	-0.5	-1.168605	-3.706994	-1.075708	-2.874778
-1.5	0.0	-1.402158	-3.737027	-1.303080	-2.947318
-1.5	0.5	-1.753011	-3.705896	-1.586551	-2.973448
-1.5	1.0	-2.134330	-3.656975	-1.877973	-2.973266
-1.5	1.5	-2.480464	-3.625148	-2.130571	-2.955275
-1.5	2.0	-2.760327	-3.596032	-2.322331	-2.918146
-1.5	2.5	-2.945285	-3.520636	-2.443002	-2.848429

		Z = 3.6		Z = 3.9	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
-1.0	-2.5	-0.358572	-1.622777	-0.131965	-1.107329
-1.0	-2.0	-0.760699	-2.503211	-0.472358	-1.799246
-1.0	-1.5	-1.014168	-3.182754	-0.747176	-2.341910
-1.0	-1.0	-0.997583	-3.474219	-0.897276	-2.641765
-1.0	-0.5	-0.877754	-3.444369	-0.994295	-2.742637
-1.0	0.0	-0.996918	-3.395762	-1.186771	-2.797563
-1.0	0.5	-1.497790	-3.540114	-1.538572	-2.915347
-1.0	1.0	-2.153054	-3.760841	-1.944665	-3.048875
-1.0	1.5	-2.658833	-3.856912	-2.263057	-3.106116
-1.0	2.0	-2.907685	-3.771389	-2.438232	-3.057660
-1.0	2.5	-2.973517	-3.577595	-2.499063	-2.934712
-0.5	-2.5	-0.212280	-1.494427	-0.042275	-1.007065
-0.5	-2.0	-0.750439	-2.402665	-0.447577	-1.689262
-0.5	-1.5	-1.090053	-3.034153	-0.763146	-2.196296
-0.5	-1.0	-1.001581	-3.120806	-0.893084	-2.411952
-0.5	-0.5	-0.683904	-2.807365	-0.922621	-2.409913
-0.5	0.0	-0.689351	-2.646829	-1.081262	-2.439870
-0.5	0.5	-1.325281	-3.011971	-1.493335	-2.668089
-0.5	1.0	-2.233401	-3.605024	-2.004761	-2.974596
-0.5	1.5	-2.878562	-3.948428	-2.384656	-3.156298
-0.5	2.0	-3.081204	-3.897675	-2.543014	-3.138132
-0.5	2.5	-3.013966	-3.626039	-2.544526	-2.987272
0.0	-2.5	-0.129386	-1.312769	0.032059	-0.850784
0.0	-2.0	-0.749541	-2.183940	-0.406752	-1.491427
0.0	-1.5	-1.165398	-2.745173	-0.753771	-1.955577
0.0	-1.0	-1.102641	-2.709643	-0.894107	-2.119489
0.0	-0.5	-0.744722	-2.265956	-0.912223	-2.077232
0.0	0.0	-0.705678	-2.076241	-1.061370	-2.115329
0.0	0.5	-1.373324	-2.584411	-1.494684	-2.423084
0.0	1.0	-2.356380	-3.409166	-2.045556	-2.845907
0.0	1.5	-3.035226	-3.933651	-2.448724	-3.123486
0.0	2.0	-3.194884	-3.946860	-2.596446	-3.149333
0.0	2.5	-3.050299	-3.657785	-2.566866	-3.000544
0.5	-2.5	-0.087914	-1.070575	0.107191	-0.639621
0.5	-2.0	-0.655716	-1.817657	-0.302924	-1.201775
0.5	-1.5	-1.051581	-2.315994	-0.637694	-1.627390
0.5	-1.0	-1.054473	-2.345430	-0.799516	-1.815862

		Z = 3.6		Z = 3.9	
x	y	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
0.5	-0.5	-0.815618	-2.066979	-0.860824	-1.846572
0.5	0.0	-0.838936	-2.012781	-1.036847	-1.955019
0.5	0.5	-1.444370	-2.520618	-1.459318	-2.288942
0.5	1.0	-2.329981	-3.288815	-1.988628	-2.716859
0.5	1.5	-2.971534	-3.804038	-2.389701	-3.012228
0.5	2.0	-3.159950	-3.866344	-2.556405	-3.072337
0.5	2.5	-3.058036	-3.632157	-2.549346	-2.956762
1.0	-2.5	-0.014590	-0.787418	0.214608	-0.389282
1.0	-2.0	-0.416252	-1.349478	-0.109576	-0.843065
1.0	-1.5	-0.681369	-1.755276	-0.382022	-1.217118
1.0	-1.0	-0.711031	-1.903582	-0.548538	-1.452314
1.0	-0.5	-0.636671	-1.907378	-0.669597	-1.602227
1.0	0.0	-0.772163	-2.052258	-0.890580	-1.803538
1.0	0.5	-1.295475	-2.492951	-1.291503	-2.132980
1.0	1.0	-2.038057	-3.072406	-1.780759	-2.510289
1.0	1.5	-2.660063	-3.504572	-2.187549	-2.790874
1.0	2.0	-2.970637	-3.641212	-2.416150	-2.897224
1.0	2.5	-3.016489	-3.532434	-2.484423	-2.850067



Cinétique du déclin de fluorescence d'un système complexe ; approche par dynamique moléculaire. Application à la protéine fluorescente jaune (YFP)

Mots clés : Champ de forces, Amber, chromophore, YFP, CASPT2

Le cadre général de cette thèse est une étude théorique par chimie quantique et dynamique moléculaire de la relation entre la structure et la fluorescence des protéines fluorescentes, en particulier de la protéine fluorescente jaune (YFP). Dans cette protéine l'énergie de transition électronique est réduite par rapport à celle de la protéine fluorescente verte (GFP) en raison de l'empilement π entre le chromophore (la partie qui peut absorber et émettre de la lumière visible au cœur de la protéine) et une tyrosine. Cet effet constitue la base de son utilité au laboratoire (transfert d'énergie par résonance «FRET» avec d'autres protéines). Ce travail comporte deux parties. D'une part, nous avons cherché à déterminer si un champ de forces classique (ff99 de la suite AMBER) permet de représenter l'effet de π -stacking sur la dynamique à l'état excité. Pour cela nous avons effectué une série de calculs CASPT2 sur une grille de points. La conclusion est que la différence entre les surfaces d'énergie d'interaction résultant du champ de forces et des calculs de chimie quantique CASPT2 ne semble pas déterminante pour les propriétés de fluorescences.

D'autre part, nous avons utilisé un modèle développé dans le groupe ThéoSim pour décrire le déclin à partir d'une série de dynamique (300ns) utilisant un champ de force classique. Cette méthode conduit à déterminer des paramètres en principe transférables d'une protéine fluorescente à une autre. Nous avons comparé la GFP et l'YFP. Cette approche ouvre la voie à une méthode rapide pour des propriétés de fluorescence pour de nouvelles protéines fluorescentes. Une prochaine étape serait d'améliorer la description du déclin radiatif utilisée dans ce modèle.

Kinetics of the fluorescence decline of a complex system; molecular dynamics approach. Application to yellow fluorescent protein (YFP)

Keywords : Force Fields, amber, chromophore, YFP, CASPT2

The general framework of this PhD is a theoretical study by quantum chemistry and molecular dynamics of the relationship between the structure and the fluorescence properties of fluorescent proteins, particularly, of the yellow fluorescent protein (YFP). In this protein, the electron transition energy is reduced with respect to that of the green fluorescent protein (GFP) as a result of a π stacking between the chromophore (the part that absorbs and emits visible light in the protein) and a tyrosine. This effect is the basis of the usefulness of YFP in the laboratory (resonance energy transfer "FRET" with other proteins). This study has two parts. First, we have tried to determine if a classical force field (ff99 of the AMBER suite) can represent the effect of π stacking on the dynamics in the excited state. For this goal, we performed a series of CASPT2 calculations on a grid of points. The conclusion is that the difference between the interaction energy surfaces resulting from the force field and the CASPT2 calculations does not seem decisive for the fluorescence properties. Second, we used a model developed in the ThéoSim group to extract the fluorescence decay time from a series of dynamics (300ns) using a classical force field. This method leads to the determination of parameters in principle transferable across fluorescent protein. We compared GFP and YFP. This approach opens the way to a fast method for determining fluorescence properties for new fluorescent proteins. A next step would be to improve the description of radiative decay used in this model.

حركية تراجع مضان من نظام معقد. بواسطة نهج الديناميات الجزيئية. تطبيق لبروتين فلوري أصفر (YFP)

الكلمات المفتاحية: حقول القوة، AMBER، كروموفور، YFP، CASPT2
الإطار العام لهذه الأطروحة هو دراسة نظرية للعلاقة بين هيكل ومضان من البروتينات الفلورية، وخاصة البروتين الفلوري الأصفر (YFP)، من قبل الكيمياء الكم والديناميكا الجزيئية في هذا البروتين، يتم تقليل الطاقة الانتقالية الإلكترونية مقارنة مع البروتين الأخضر الفلورسنت (GFP) بسبب التراص π بين الكروموفور (الجزء الذي يمكن أن تمتص وتتبعث الضوء المرئي في قلب البروتين) و التيروزين. هذا التأثير هو أساس فائدته في المختبر (نقل طاقة الرنين "FRET" مع بروتينات أخرى). هذا العمل ينقسم إلى جزأين. في الجزء الأول، سعينا لتحديد ما إذا كان يمكن استخدام حقل القوة الكلاسيكية (AMBER) لتمثيل تأثير التراص π على ديناميات في حالة المثارة. لهذا أجرينا سلسلة من العمليات الحسابية CASPT2 على شبكة من النقاط. تم التوصل إلى أن الفرق بين أسطح طاقة التفاعل الناتجة عن حقل القوة و حسابات الكيمياء الكمية CASPT2 لا يبدو أنه حاسم لخصائص مضان. و في الجزء الثاني، استخدمنا نموذجا تم تطويره في مجموعة ThéoSim لوصف الانخفاض من سلسلة ديناميات (300ns) باستخدام حقل القوة الكلاسيكية. هذا الأسلوب يؤدي إلى تحديد المعلمات التي يمكن مبدئيا تحويلها من بروتين فلوري واحد إلى آخر. هذا النموذج يفتح المجال إلى طريقة سريعة لخصائص مضان للبروتينات الفلورسنت الجديدة. وتتمثل الخطوة التالية في تحسين وصف الانخفاض الإشعاعي المستخدم في هذا النموذج.