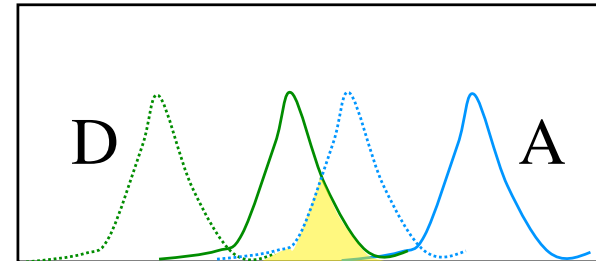


TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION

Cours G. Bourg-Heckly - 2011

TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION

Condition du transfert:



Spectre d'émission de D doit recouvrir partiellement le spectre d'absorption de A

2 types de transfert

radiatif

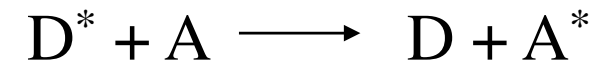


Aucune interaction nécessaire entre D et A

Dépend:

- du recouvrement spectral
- de la concentration

non radiatif



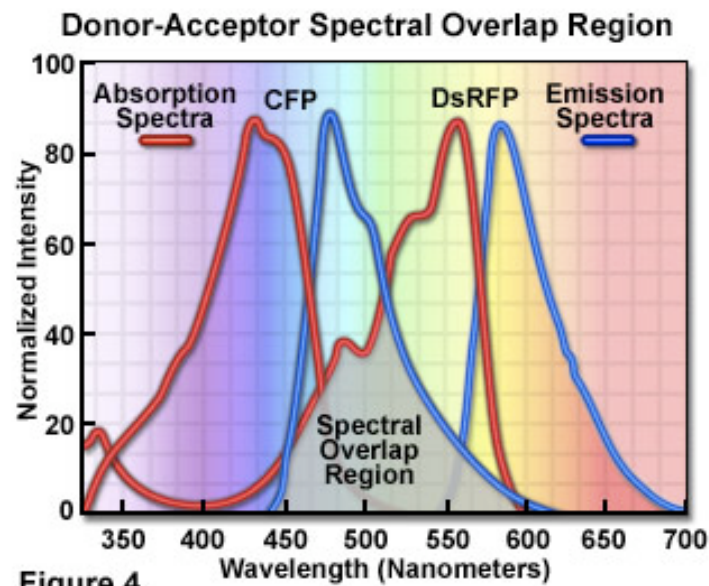
Interaction nécessaire à courte distance
entre D et A

Possible jusqu'à 80 - 100 Angströms

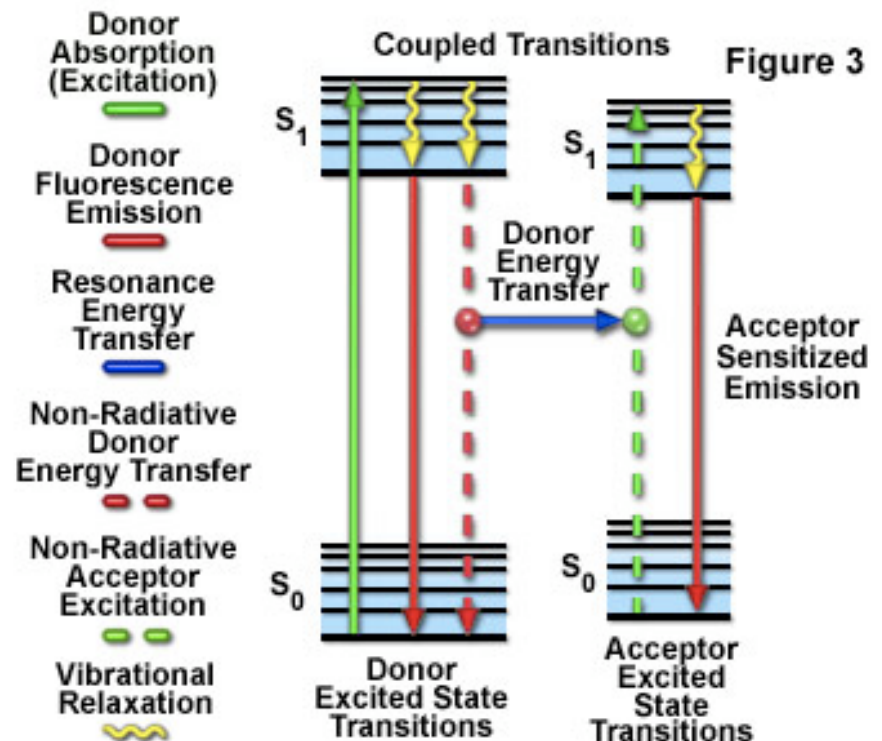
TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION NON RADIATIF

RESONANCE ENERGY TRANSFER(RET)

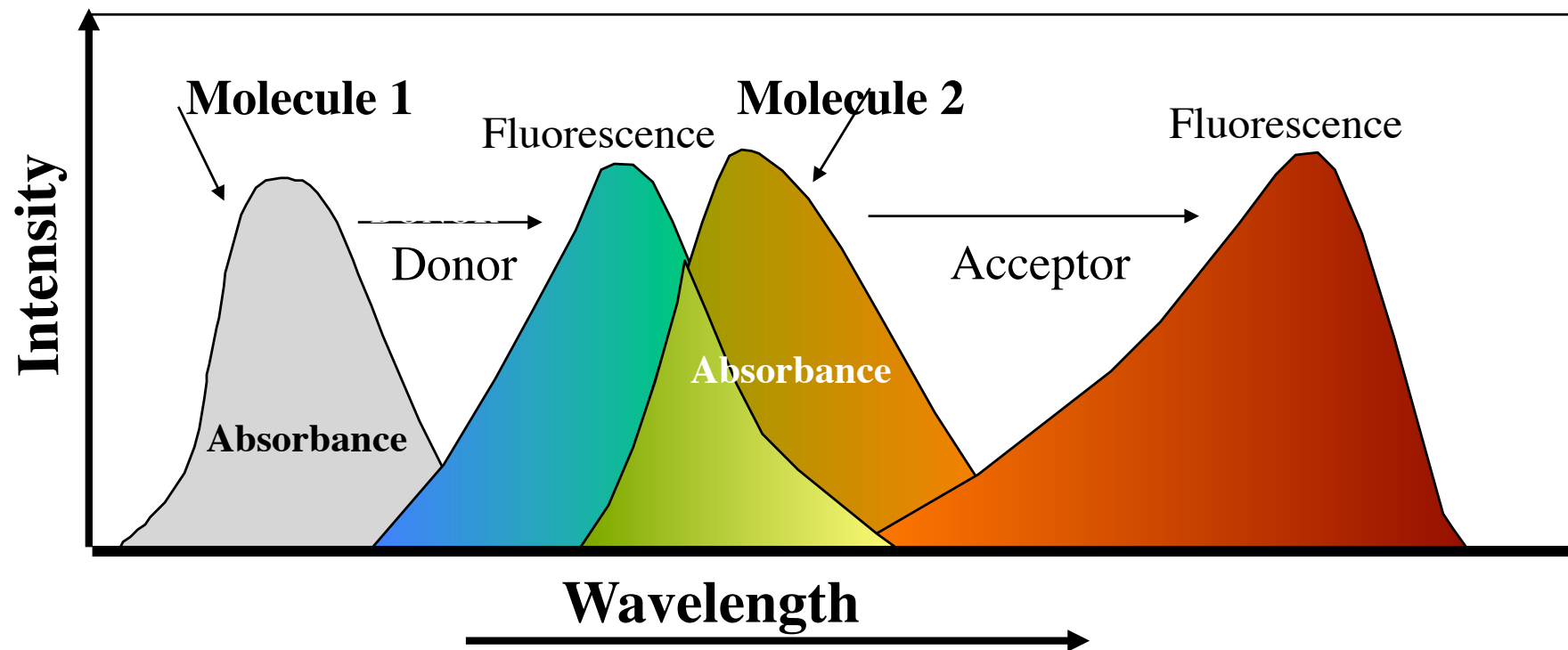
ou FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)



Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram

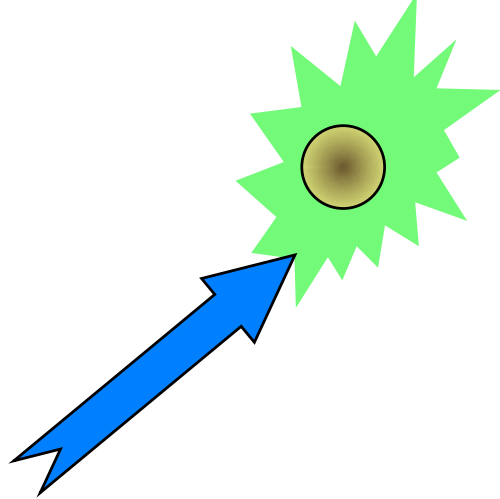


Resonance Energy Transfer

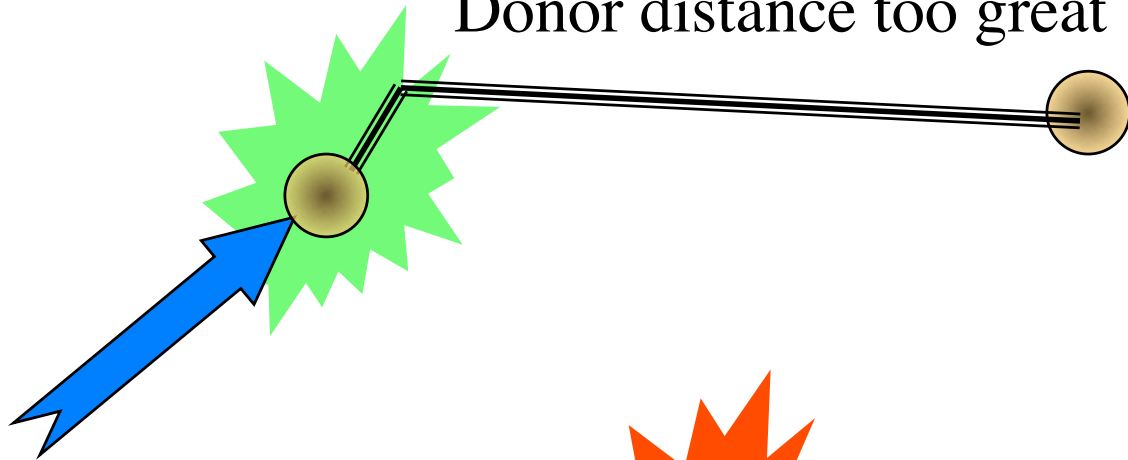


FRET properties

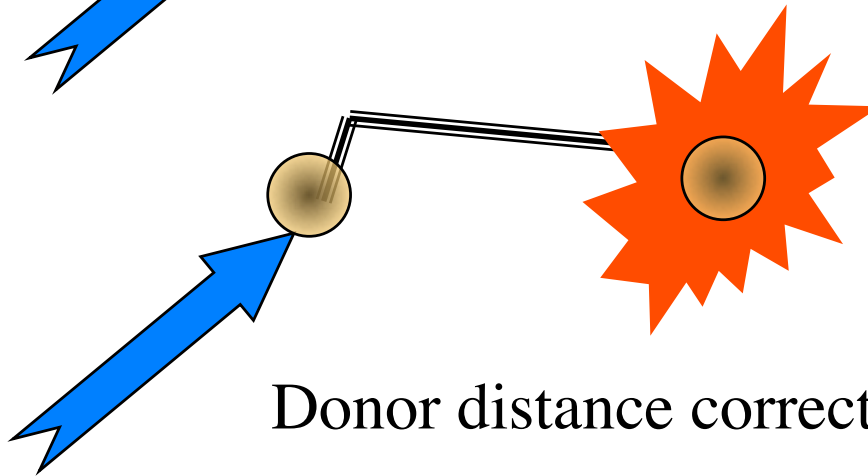
Isolated donor



Donor distance too great

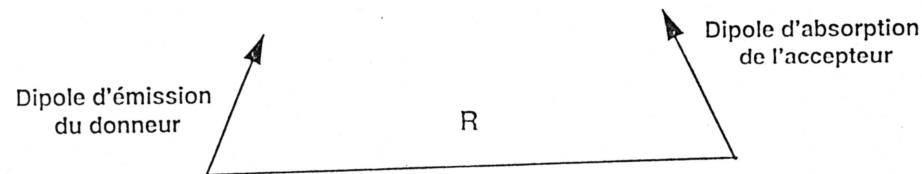


Donor distance correct



Théorie de Förster

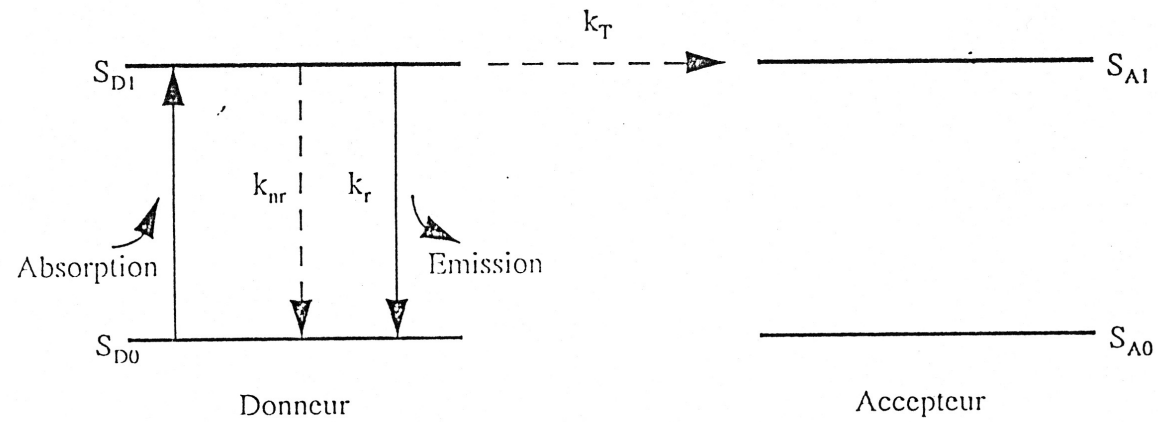
Förster (1948) a proposé un traitement quantique au phénomène d'interaction longue portée entre le dipole de transition électronique d'émission du donneur et le dipole de transition électronique d'absorption de l'accepteur. Le transfert d'énergie a lieu lorsque la resonance des deux dipoles se trouve mutuellement perturbée. L'énergie d'interaction dipole-dipole décroît suivant le cube de la distance entre les dipoles et dépend de leurs orientations relatives. La probabilité de transfert est proportionnelle au carré de l'énergie d'interaction.



$$E_{\text{interaction}} \sim 1 / R^3$$

$$p(\text{transfert}) \sim (E_{\text{interaction}})^2$$

durée de vie du donneur



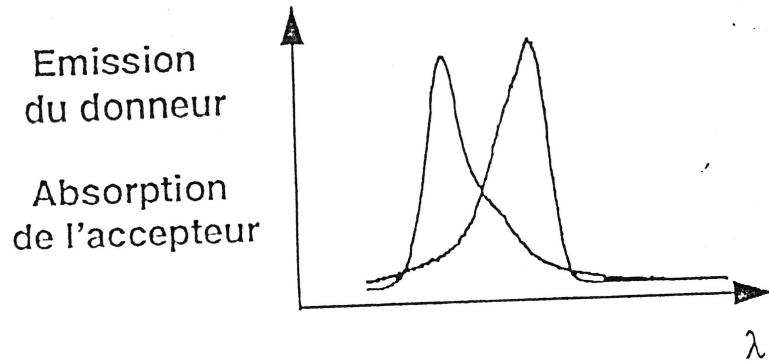
En absence d'accepteur

$$\tau_D = 1 / (k_r + k_{nr})$$

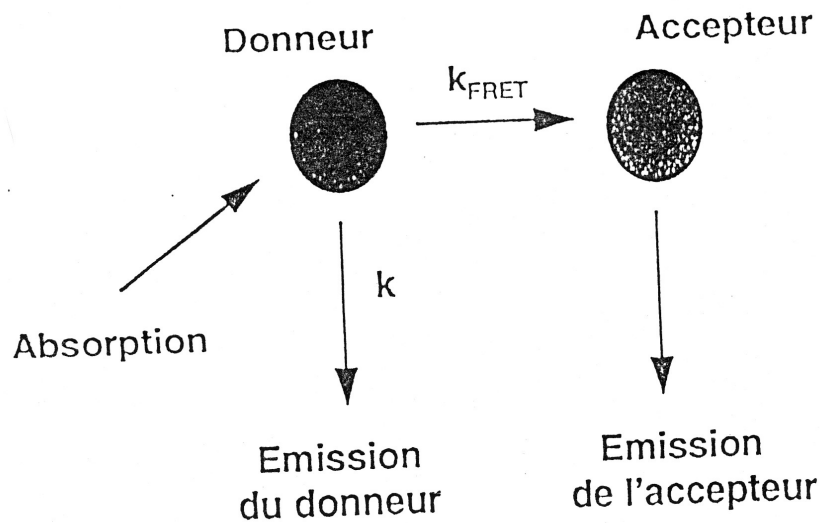
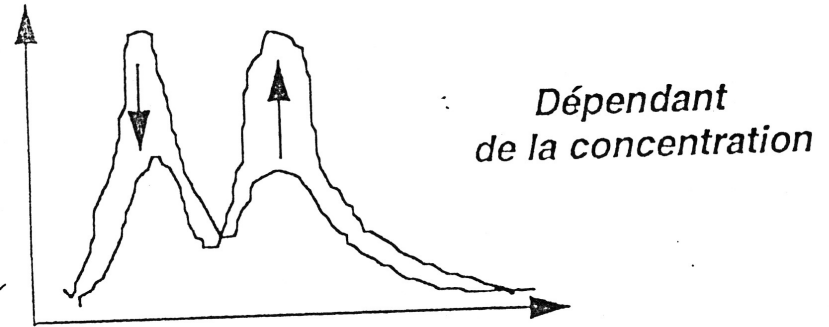
En présence d'accepteur

$$\tau_{DA} = 1 / (k_r + k_{nr} + k_T)$$

FRET



Propriétés spectrales



Propriétés cinétiques

$$\tau_D = 1/(k_r + k_{nr})$$

Indépendant de la concentration

$$\tau_{DA} = 1/(k_r + k_{nr} + k_T)$$

Diminution de la durée de vie du donneur en présence de FRET

avec $\tau_D = 1/(k_r + k_{nr})$ = durée de vie du donneur en l'absence d'accepteur

et $\tau_{DA} = 1/(k_r + k_{nr} + k_T)$ = durée de vie du donneur en présence d'accepteur

vitesse de transfert

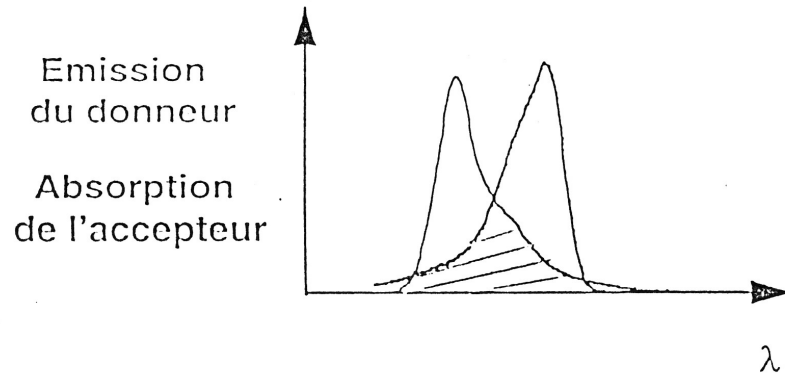
VITESSE DE TRANSFERT

$$k_T = \frac{9 (\ln 10) \kappa^2 Q_D J}{128 \pi^5 N n^4 \tau_D R^6}$$

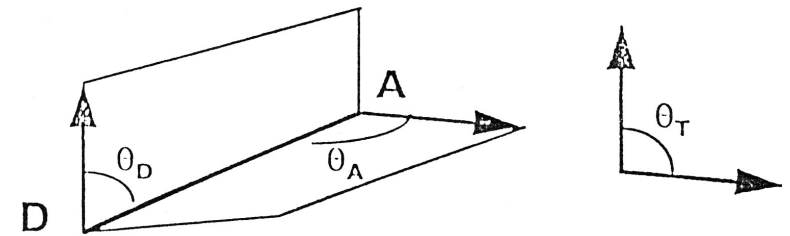
Q_D et τ_D → rendement quantique et durée de vie du donneur

N → nombre d'Avogadro

n → indice de réfraction du milieu



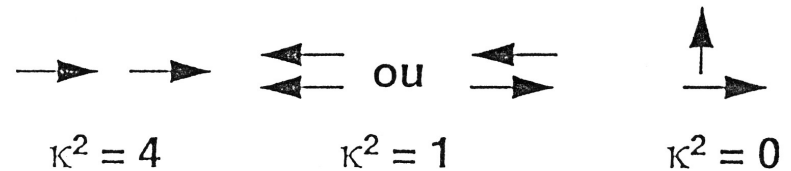
$$J = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$



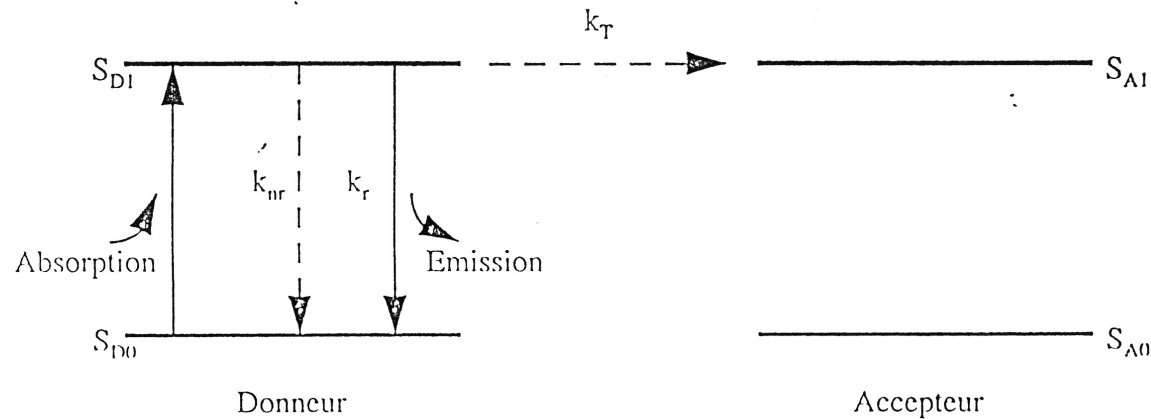
$$\kappa = \cos \theta_T - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D$$

$$0 < \kappa^2 < 4$$

orientations aléatoires : $\kappa^2 = 2/3$



Relation efficacité de transfert et vitesse de transfert



Efficacité de transfert $\Phi_T = \frac{k_T}{k_r + k_{nr} + k_T}$

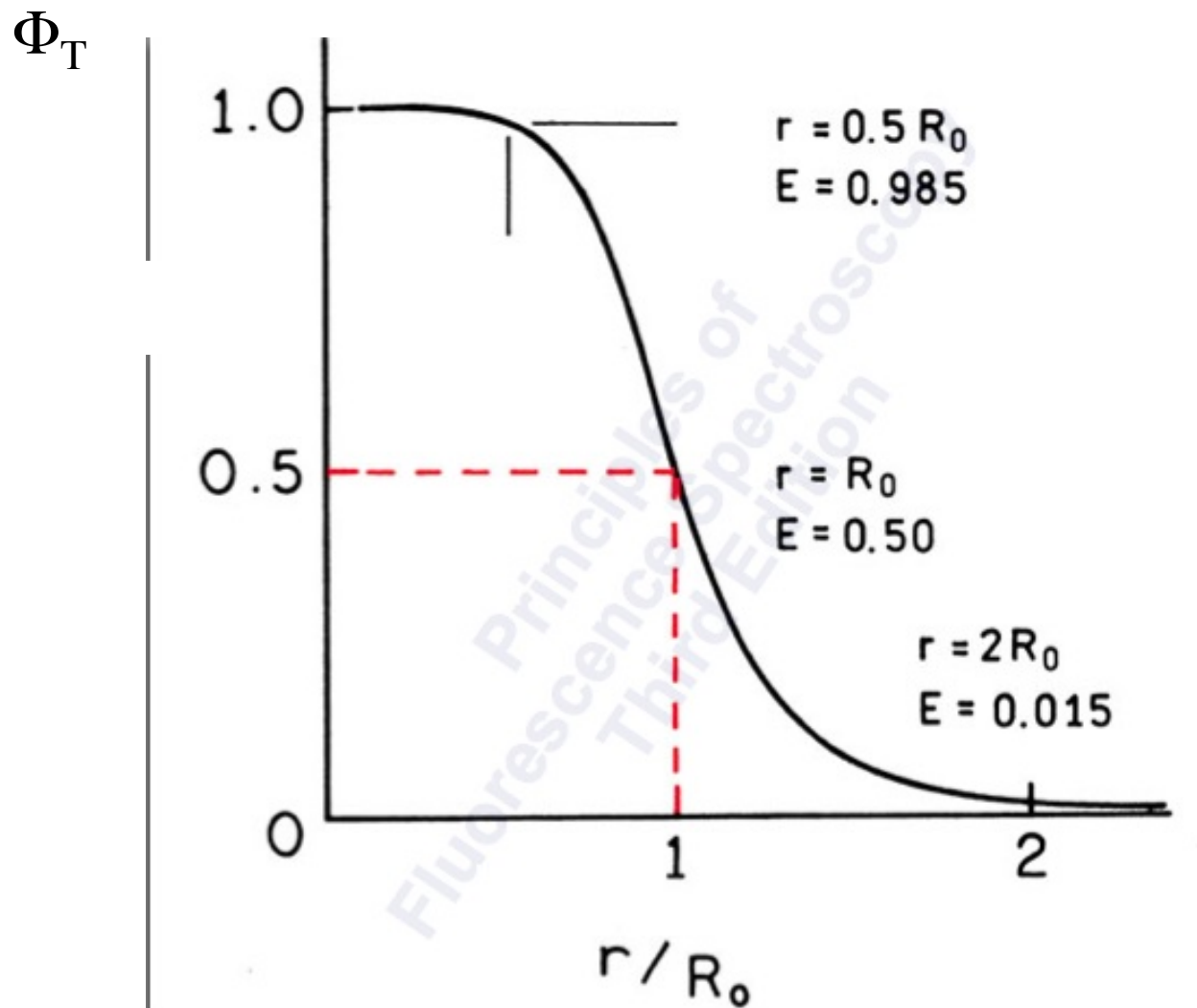
avec R_0 la distance où $E = 1/2$, on a :

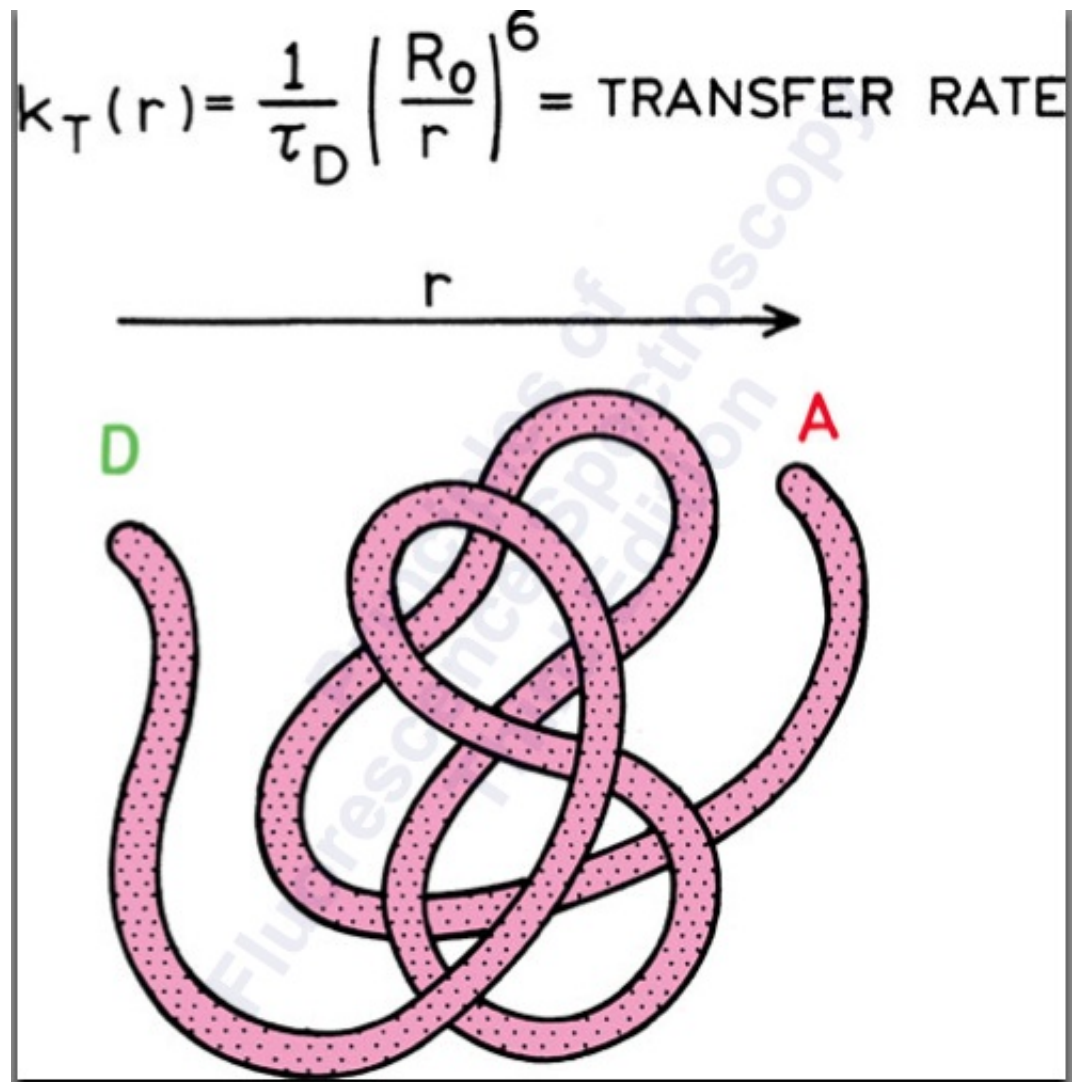
$$R_0^6 = \frac{9 (\ln 10) \kappa^2 Q_D J}{128 \pi^5 N n^4}$$

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \longrightarrow \Phi_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

➡ On peut déterminer R en mesurant Φ_T

Relation efficacité de transfert et distance R
Dependence of the energy transfer efficiency on distance





distances de Förster entre 20 et 90 Å appropriées pour études des macromolécules biologiques

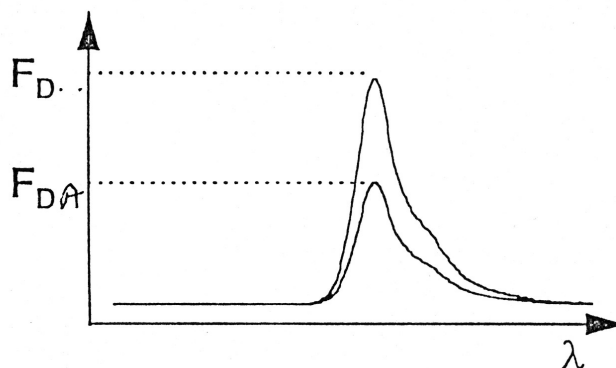
Efficacité du FRET

$$\Phi_T = \frac{\text{Nombre de photons absorbés par le donneur transféré à l'accepteur}}{\text{Nombre de photons absorbés par le donneur}}$$

mesuré par

— Intensité de fluorescence du donneur

$$\Phi_T = 1 - (F_{DA} / F_D)$$



— Durée de vie de fluorescence du donneur

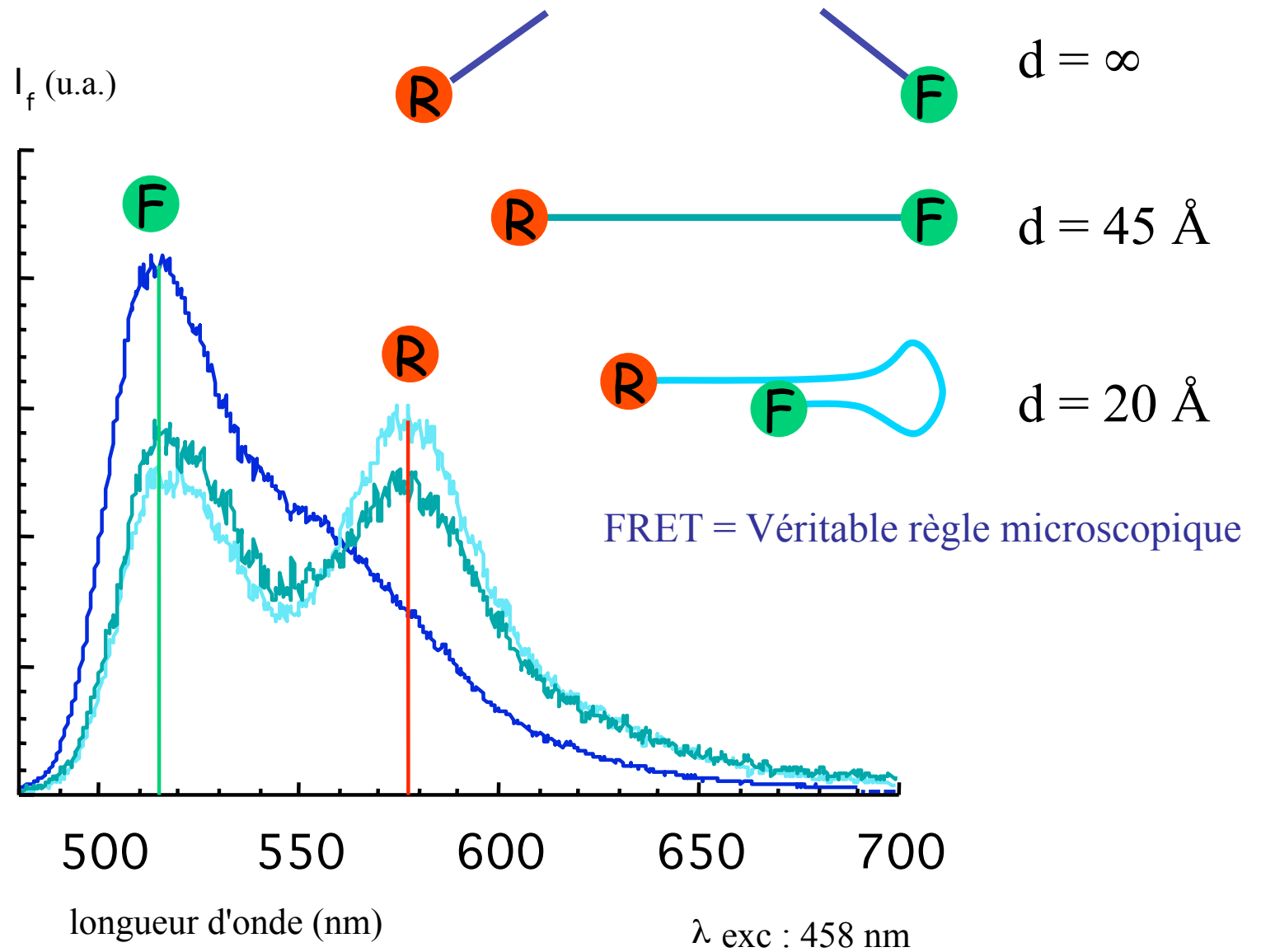
$$\Phi_T = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D)$$

conditions d'application :

- distance R Donneur – Accepteur fixe (souvent vérifié pour protéines)
- déclin durée de vie Donneur mono-exponentiel

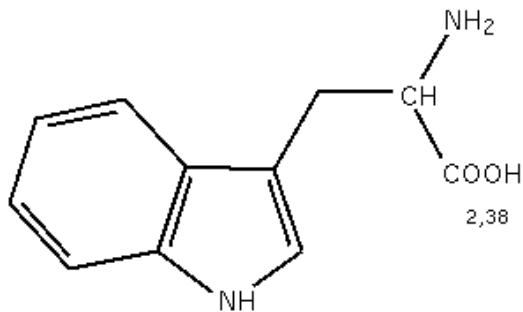
Le FRET comme règle intermoléculaire

$R_0 \sim 60 \text{ \AA}$



RÔLE DU FRET DANS LES SPECTRES D'EMISSION DES PROTÉINES NORMALES

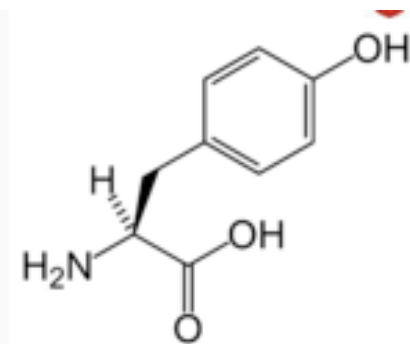
- Recouvrement entre le spectre d'émission de la tyrosine et le spectre d'absorption du tryptophane.
- $R_0 = 9 \text{ \AA}$, distance assez courte, vu la taille moyenne des protéines globulaires, pour qu'il y ait transfert d'énergie Singulet-Singulet de la tyrosine vers le tryptophane dans la plupart des tyrosines des protéines
- Conséquence : l'émission de fluorescence des protéines provient majoritairement du tryptophane



Tryptophane (Trp) W

pH_i = 5,88

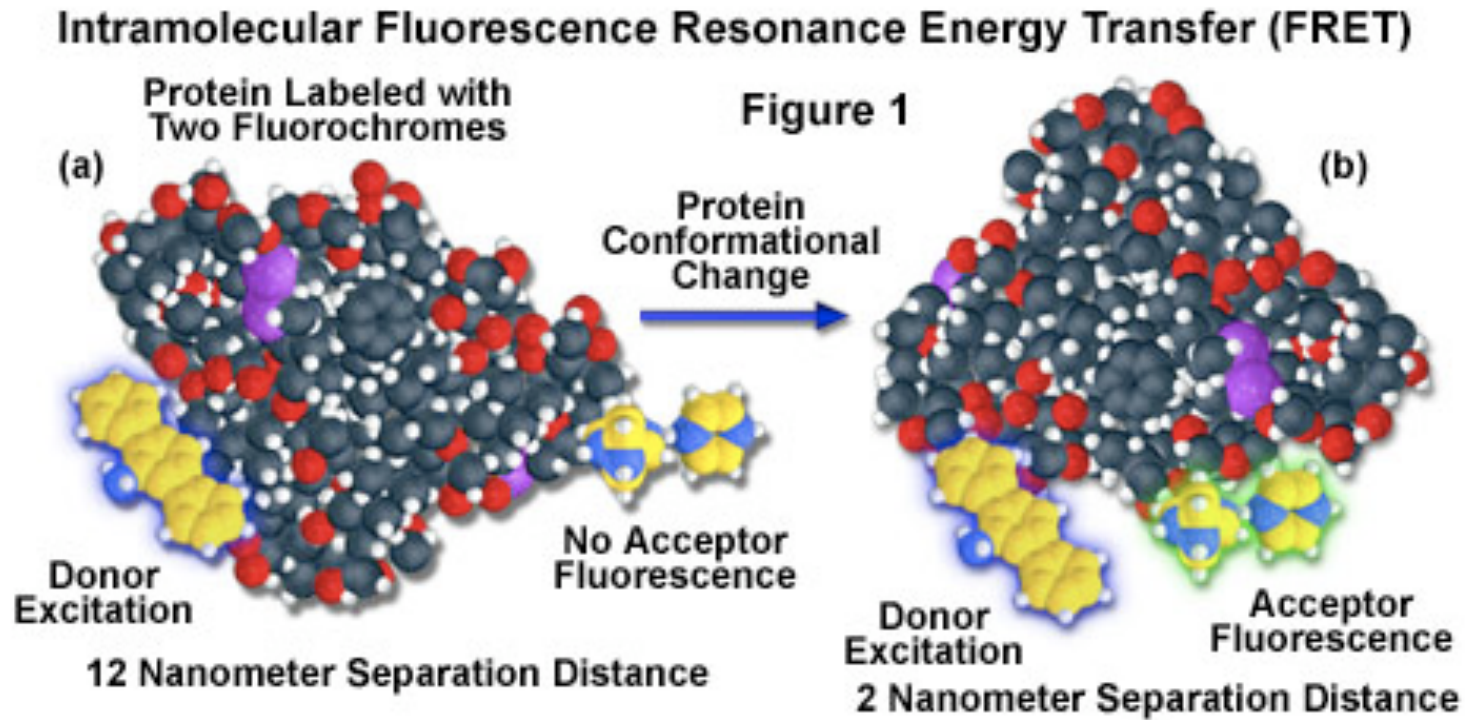
M = 204 g/mol



Structure de la tyrosine

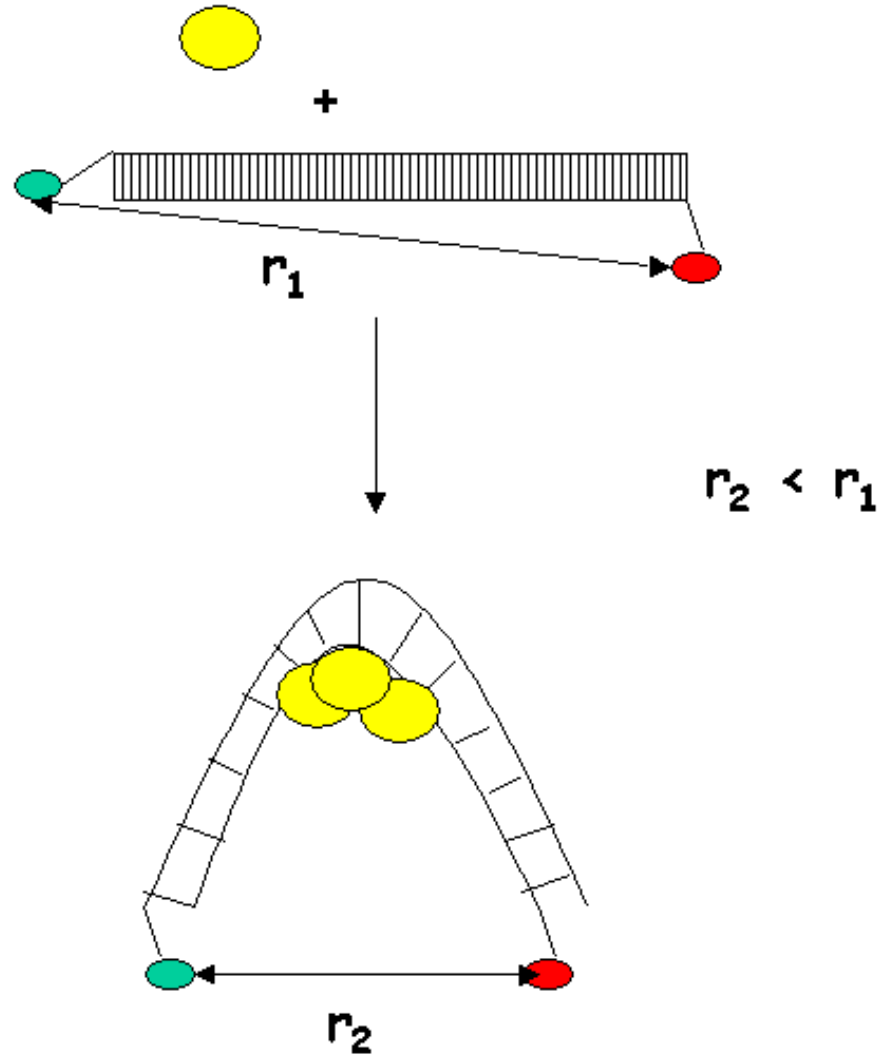
TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION

FRET

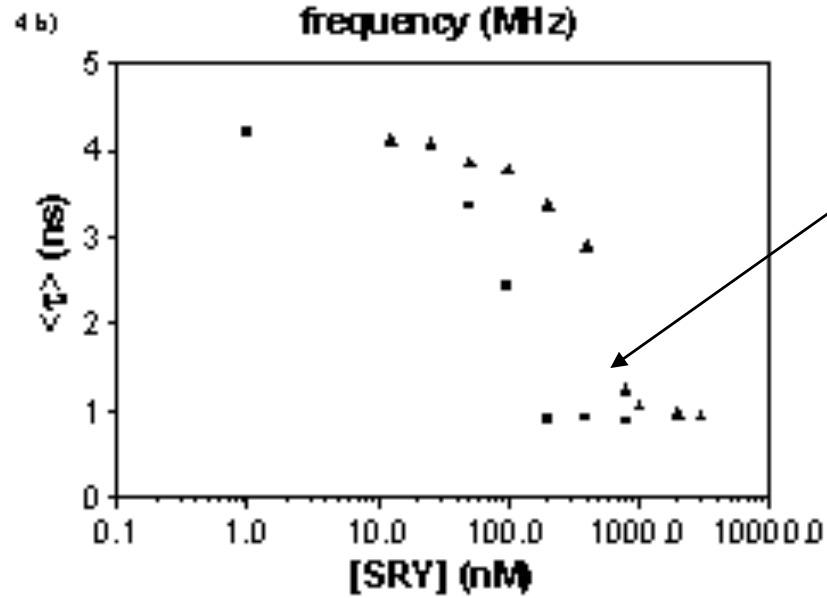
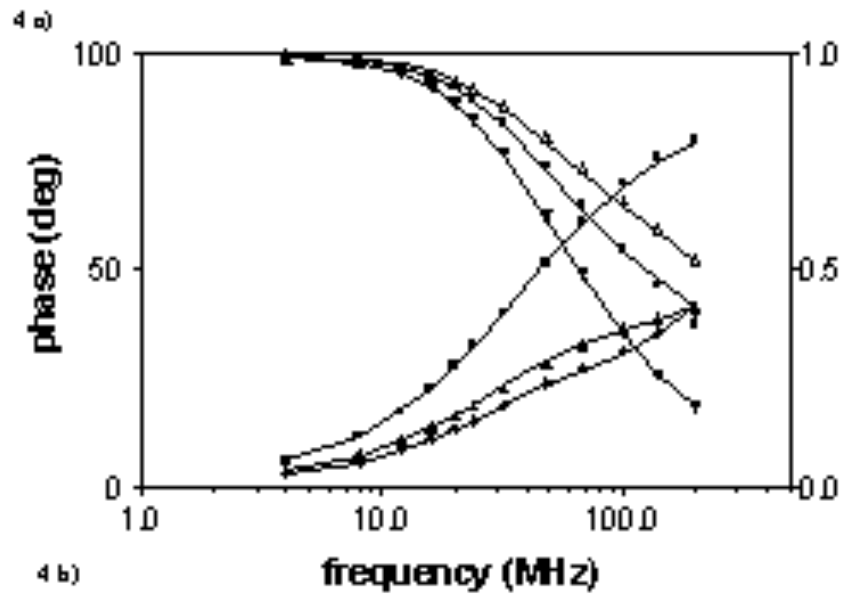


FRET

Le transfert de l'énergie (FRET) augmente lors de la fixation de la protéine **SRY** sur son site SRBE marqué avec donneur et accepteur



Mesures de durée de vie du donneur confirmant l'effet FRET



transfert

Figure 4

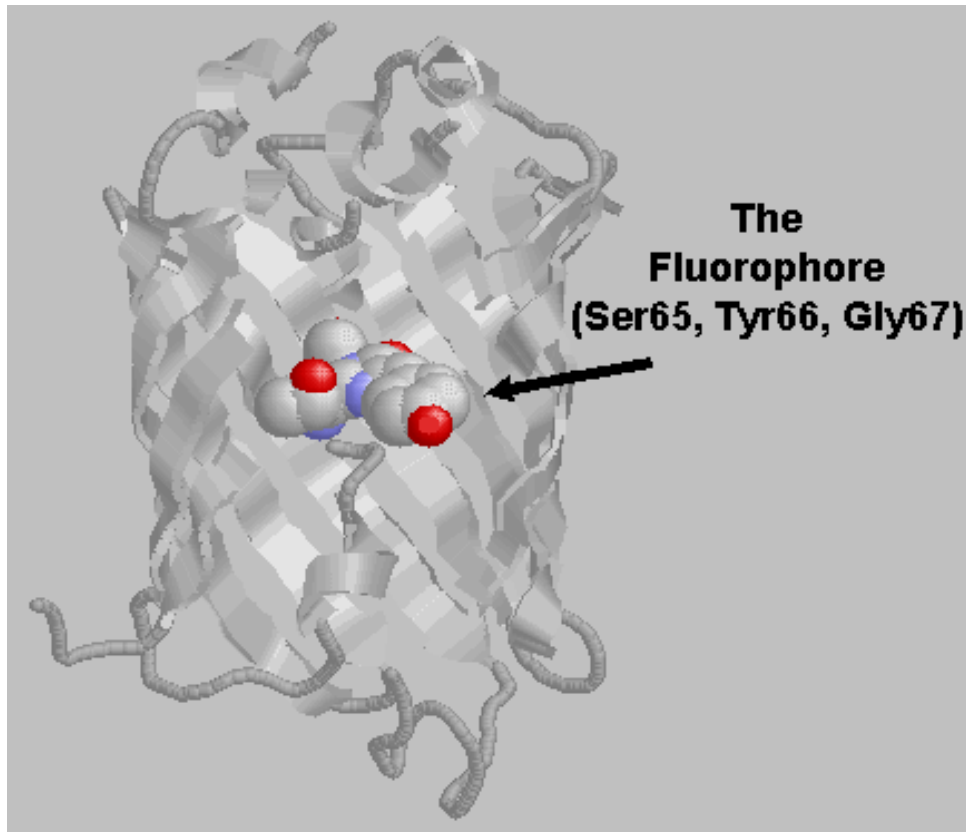
UTILISATION DES PROTEINES FLUORESCENTES EN FRET GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) ET SES VARIANTS



- GFP issue d'une méduse
- Intrinsèquement fluorescente
- Gène codant la GFP cloné en 1992
- Son gène peut être fusionné in vitro au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier

Exploitation de la GFP et de ses variants comme sondes moléculaires a favorisé le développement de la méthode FRET bien adaptée à l'étude de la dynamique des interactions moléculaires dans la cellule vivante

GREEN FLUORESCENT PROTEIN



B.



Cyclisation des chaînes latérales

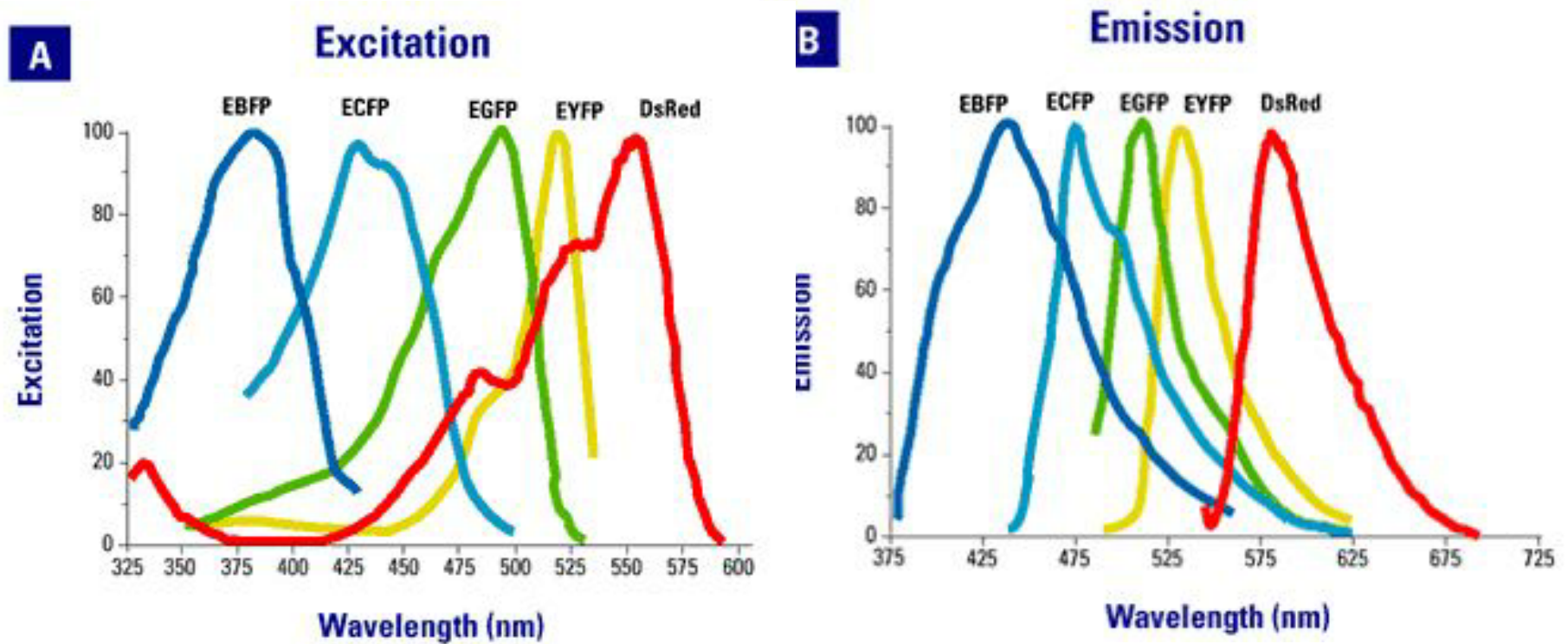
Sérine, Tyrosine, Glycine

Abs max 395 nm, Em max 508 nm

- M = 27 Kda
- cylindre de 30Å de diamètre et 40Å de hauteur
- 11 feuillets β entourant une hélice α contenant le chromophore



DIFFERENTS VARIANTS DE GFP

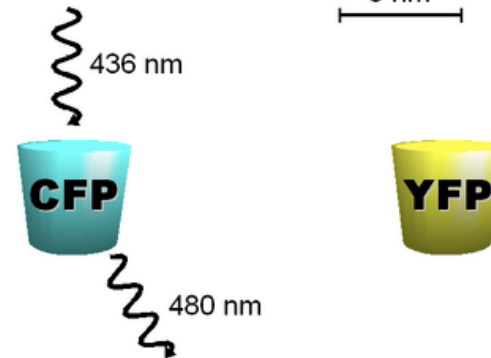


Couples très utilisés en FRET : CFP/YFP et BFP/GFP

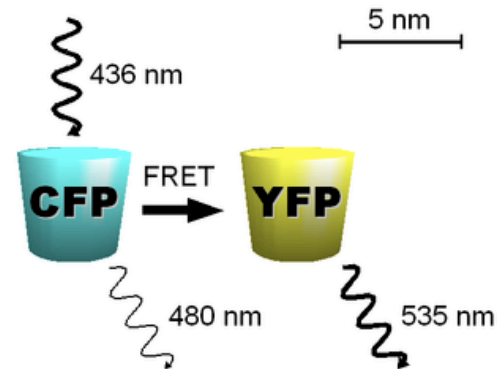
TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION

FRET CFP-YFP

Nessun segnale FRET



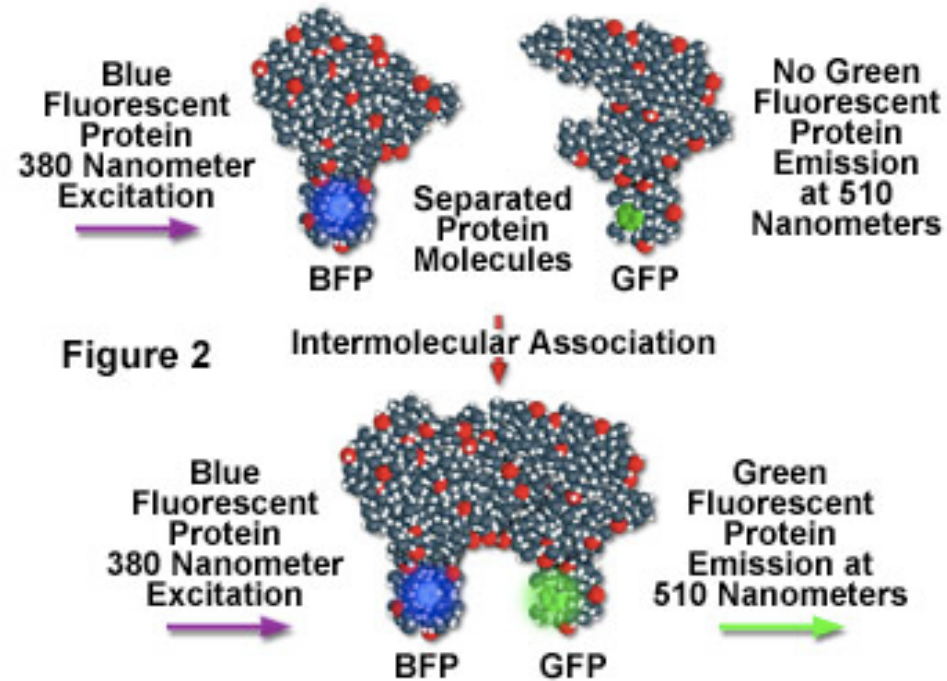
Segnale FRET



TRANSFERT DE L'ENERGIE D'EXCITATION

FRET BFP/GFP

FRET Detection of *in vivo* Protein-Protein Interactions

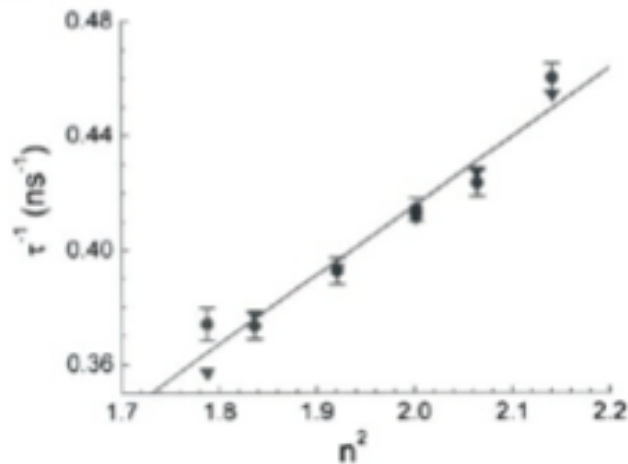


SENSIBILITÉ ENVIRONNEMENTALE DES PROTÉINES FLUORESCENTES

L'intensité de fluorescence dépend:

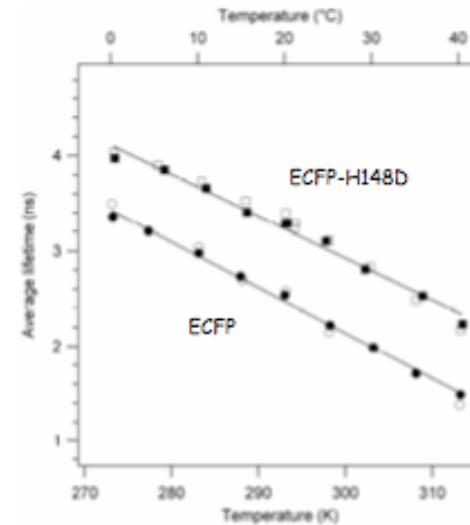
- de l'indice de réfraction

- de la température



$1/\tau$ e-GFP vs n^2

$$1/\tau = k_r (n^2) + k_{nr}$$



τ GFP vs T

$\approx 0,05$ ns (2%) par degré C

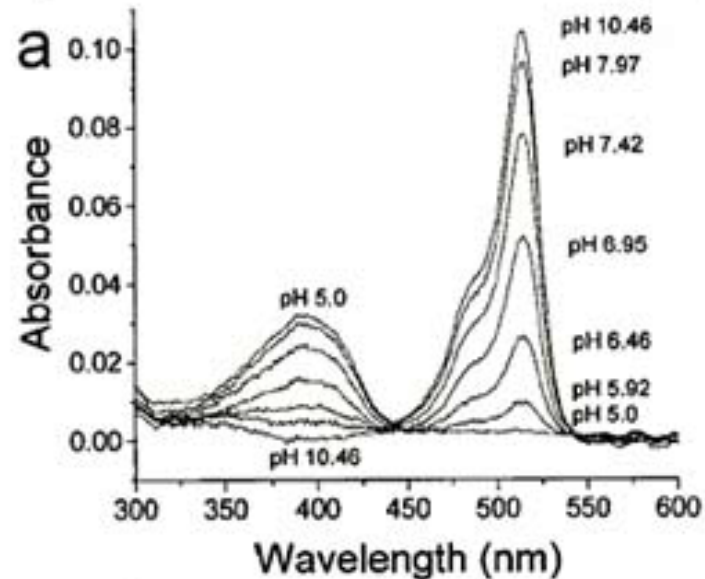
	n
PBS	1,34
cytoplasme	1,35
membrane	1,46 - 1,60

SENSIBILITÉ ENVIRONNEMENTALE DES PROTÉINES FLUORESCENTES

L'absorption et l'émission de fluorescence dépendent du pH:

Variations de l'absorption de EYFP en f(pH)

Llopis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998)



Variations de l'émission de fluorescence de différents variants en f(pH)

