

M1 BI - 30BIA341 - Bases de la modélisation moléculaire

Romain Retureau & Delphine Flatters

TP : dynamique moléculaire d'une protéine dans l'eau

But : Dans ce TP on se propose de mettre en place un protocole de dynamique moléculaire (DM) pour étudier une protéine, la barstar, qui est un inhibiteur de la ribonucléase (la barnase).

La figure ?? A représente le complexe cristallographique barnase/barstar (code PDB 1BRS) avec l'acide aspartique 39 (Asp39) de la barstar dans une conformation favorable pour la construction du complexe.

Dans la structure de la barstar seule (figure ?? B), résolue par RMN (code PDB 1BTA), la construction du complexe n'est pas possible à cause d'une mauvaise conformation de l'Asp39.

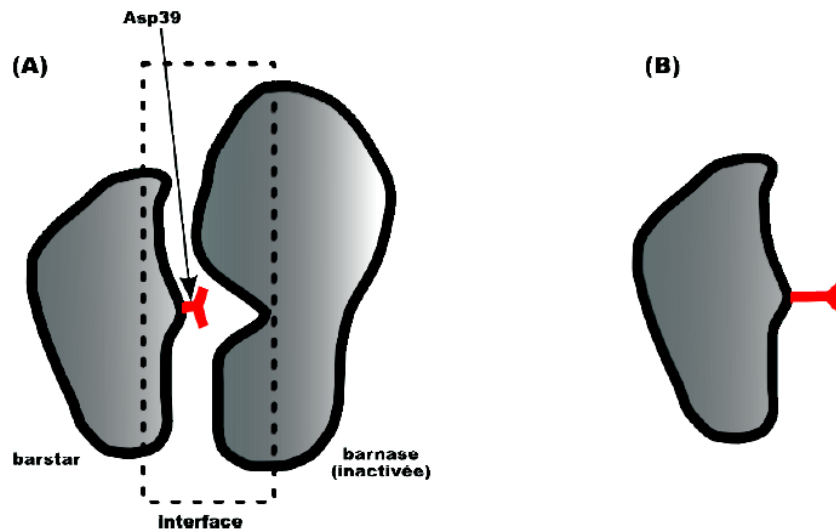


FIGURE 1 – Barstar avec le résidu Asp39 en rouge. (A) Complexe barstar/barnase. (B) Barstar seule.

Question : Partant de la barstar seule, le résidu Asp39 va-t-il adopter la conformation présente dans la barstar complexée ? En d'autres termes, au cours d'une dynamique moléculaire, la chaîne latérale de l'Asp39 va-t-elle prendre la « bonne » conformation ? Suspense ...

Informations à lire absolument

- GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) est une suite gratuite de programmes. Vous trouverez de l'aide pour chacun d'entre eux sur le site web <http://manual.gromacs.org/current/>. Pour un programme donné, utilisez particulièrement le petit tableau qui présente la liste des arguments d'entrée (*input*) et de sortie (*output*). Les arguments suivis de *Opt* sont optionnels.
- Pour chacun des programmes, on peut également retrouver cette aide dans la ligne de commande avec l'option `-h`.
e.g. `pdb2gmx -h` indique quels sont les arguments d'entrée et de sortie du programme `pdb2gmx`.
- Pour bien préparer les étapes du protocole de dynamique moléculaire et éviter les erreurs d'entrée / sortie, donnez impérativement des noms explicites à chacun de vos fichiers. Les extensions des fichiers vous indiquent la nature des informations contenues dans ces fichiers : coordonnées (`.gro` ou `.pdb`), topologie (`.top`), paramètres pour la minimisation ou la dynamique (`.mdp`), trajectoire (`.trr` ou `.xtc`). À vous de choisir des préfixes suffisamment clairs pour ne pas faire d'erreurs (ex : `mini.mdp` pour la minimisation, `md.mdp` pour la dynamique moléculaire).
- Pour faire fonctionner GROMACS, vérifiez quelle version est installée sur vos machines (gromacs-5.0.X) et sa localisation, puis ajoutez dans votre `~/ .bashrc` la ligne suivante (en remplaçant X dans la version et en modifiant éventuellement le chemin) :

```
alias loadgromacs="source /usr/local/gromacs-5.0.X/bin/GMXRC"
```

Ouvrez ensuite un nouveau terminal (ou tapez directement la ligne de commande `source .bashrc`), puis chargez le chemin GROMACS avec :

```
loadgromacs
```

Testez ensuite si les programmes GROMACS sont accessible en appelant l'un des programmes suivi de l'option `-h` (e.g. `pdb2gmx -h`)

1 Préparation : construction d'une topologie pour la protéine, solvation et minimisation du système avec GROMACS

1.1 Opérations préliminaires

- Créez un nouveau répertoire `TP_MD` dans lequel vous ferez ce TP.
- Allez chercher sur le site de la *Protein Data Bank* (PDB) la structure de la barstar (code 1BTA) et enregistrez-la sous le nom `1BTA.pdb` dans le répertoire `TP_MD`. D'après l'entête du fichier `1BTA.pdb`, retrouvez les informations suivantes : méthode de résolution de la structure, nom et fonction de la protéine (complexe ? mutant ?), nombre de résidus (vérifiez s'il y a des résidus/atomes manquants), topologie (brins, hélices), localisation de l'Asp39.
- Visualisez la barstar avec l'aide de VMD :

```
vmd 1BTA.pdb
```

Affichez la protéine en représentation *cartoon*. Pour ce faire, dans la fenêtre VMD Main, cliquez sur Graphics puis Representations. Dans le champ Drawing Method, sélectionnez NewCartoon. Pour colorer chaque structure secondaire différemment, dans Coloring Method, sélectionnez Structure.
- Affichez l'Asp39. Pour cela, toujours dans la fenêtre Graphical Representations de VMD, cliquez sur Create Rep, dans le champ Selected Atoms, indiquez resid 39 puis dans le champ Drawing Method, choisissez VDW et dans Coloring Method, choisissez Element. L'Asp 39 se trouve-t-elle plutôt au coeur de la protéine ou plutôt en surface ?

1.2 Création de la topologie

Créez une topologie (qui contient l'ensemble des paramètres pour calculer l'énergie) avec la commande suivante :

```
gmx pdb2gmx -f 1BTA.pdb -o 1BTA.gro -p 1BTA.top -i 1BTA.itp
```

Entrez le numéro correspondant au champ de forces (choix 15 : OPLS_AA) lorsque le programme vous le demande, puis entrez le choix du modèle d'eau (choix 2 : TIP3P) (pour une description des modèles d'eau classiques en simulation, voir le lien : http://fr.wikipedia.org/wiki/Modele_d'eau).

Y a-t-il une erreur ? Si oui, suivez les conseils de GROMACS en ajoutant l'option `-ignh` à la fin de la commande précédente. Que fait cette option ? Quelle est la charge totale du système ? (affichage à l'écran au moment de l'exécution du programme) Vérifiez que de nouveaux fichiers ont effectivement été créés. Dans le fichier `1BTA.gro`, la 2^e ligne contient le nombre d'atomes. La dernière ligne contient les dimensions (x, y et z) de la boîte de simulation. À votre avis, la protéine rentre-t-elle dans cette boîte ?

1.3 Élargissement de la boîte

```
gmx editconf -f 1BTA.gro -d 1.4 -o 1BTA_bigbox.gro
```

L'option `-d 1.4` impose une distance protéine / parois de la boîte de 1,4 nm (soit 14 Å). Vérifiez que les dimensions de la boîte ont bien été modifiées dans `1BTA_bigbox.gro`. Quel est le volume de la boîte ?

Observez la boîte avec VMD. Pour cela, utilisez la commande

```
vmd 1BTA_bigbox.gro
```

Puis dans la fenêtre `vmd console`, tapez

```
pbx box
```

1.4 Solvation de la protéine

Dans un premier temps, remplissez l'espace vide de la boîte de simulation avec des molécules d'eau :

```
gmx solvate -cp 1BTA_bigbox.gro -cs spc216.gro -p 1BTA.top -o 1BTA_water.gro
```

Le programme `genbox` ajoute des molécules d'eau explicites autour de la protéine. Vérifiez à la fin du nouveau fichier `.top` que le choix du champ de forces (OPLS) et du modèle d'eau (TIP3P) ont bien été pris en compte et que votre système contient maintenant la protéine et un certain nombre de molécules d'eau (notez le nombre de molécules d'eau). Visualisez le nouveau fichier `.gro` avec VMD :

```
vmd 1BTA_water.gro
```

Comme précédemment, faites apparaître les contours de la boîte de simulation.

Visualisez ensuite la protéine dans sa boîte d'eau avec VMD :

```
vmd 1BTA_water.gro
```

Pour mieux distinguer la protéine des molécules d'eau, affichez la dans la représentation *cartoon*.

Pour comprendre la notion de périodicité de la boîte, cliquez sur la ligne

| Lines | Name | all |
|--|------|-----|
| qui va apparaître en jaune. Cliquez sur l'onglet <i>Periodic</i> et cochez les cases correspondant aux boîtes adjacentes que vous voulez voir (+X, +Y ...) | | |

qui va apparaître en jaune. Cliquez sur l'onglet *Periodic* et cochez les cases correspondant aux boîtes adjacentes que vous voulez voir (+X, +Y ...)

1.5 Minimisation « grossière » du système pour enlever les mauvais contacts

Dans GROMACS, toutes les « simulations », qu'elles soient des minimisations ou des dynamiques moléculaires, se font en deux étapes. Une première étape de compilation d'un fichier binaire `.tpr` qui rassemble tous les paramètres de la simulation et une seconde étape de calcul et de simulation à proprement dit.

- Compilez et construisez le fichier `.tpr` (le `\` indique que la ligne de commande se continue avec la suivante).

```
gmx grompp -f minil.mdp -po minil_out.mdp \
-c 1BTA_water.gro -p 1BTA.top -o minil.tpr
```

Le contenu du fichier de paramètres `minil.mdp` (que vous téléchargerez sur Didel) est détaillé dans le listing ???. Comprenez la signification des principaux paramètres de la minimisation. Identifiez les deux critères d'arrêt de la minimisation.

- Lancez la minimisation (à partir du fichier `minil.tpr` généré précédemment) :

```
gmx mdrun -v -deffnm minil
```

Pourquoi la minimisation s'arrête-t-elle ? À combien de pas ? Quelle est l'énergie finale ? Avec l'option `-deffnm` (*default file name*), le programme `mdrun` génère tout un ensemble de fichiers :

- `minil.edr` : énergies au cours de la minimisation
- `minil.trr` : coordonnées au cours de la minimisation
- `minil.log` : journal de la minimisation
- `minil.gro` : structure en fin de minimisation

- Visualisez la trajectoire de la minimisation avec VMD :

```
vmd 1BTA_water.gro minil.trr
```

Dans la fenêtre VMD *Main*, cliquez sur le symbole *play* ▷ en bas à droite. Vous pouvez ralentir le défilement des configurations avec le curseur *speed*.

1.6 Ajout des contre-ions pour neutraliser la charge du système

- Le programme `genion` nécessite un fichier `.tpr` en entrée, utilisez d'abord `grompp`.

```
gmx grompp -f minil.mdp -po dummy_out.mdp -c minil.gro -p 1BTA.top -o dummy.tpr
```

- Appelez ensuite le programme `genion` (le `\` indique que la ligne de commande se continue avec la suivante) :

Listing 1 – Fichier de paramètres mini1.mdp

```

1 title      = barstar
2 cpp        = /lib/cpp ; chemin du preprocesseur C
3 integrator = steep     ; algorithme de minimisation utilise
4             ; ici : steepest descent
5 nsteps     = 1000      ; nombre de pas de minimisation
6 nstxout    = 1         ; ecriture des coordonnees a chaque pas
7 ns_type    = grid      ; utilisation d'une grille pour optimiser
8             ; le calcul
9 ;
10 ; non bonded stuff
11 ;
12 cutoff_scheme = Verlett
13 nstlist       = 10     ; frequence de mise a jour de la liste des voisins
14             ; ici tous les 10 pas
15 coulombtype   = cut-off ; methode de calcul des interactions electrostatiques
16 rlist        = 1.0     ; si d < rlist ; calcul tous les pas des interactions non liees
17 rcoulomb      = 1.0     ; cutoff pour les interactions de Coulomb
18 rvdw         = 1.0     ; cutoff pour les interactions de van der Waals
19 ;
20 ; Energy minimizing stuff
21 ;
22 emtol = 2000.0         ; critere de convergence
23             ; force maximale exercee sur un atome en kJ/mol/nm
24 emstep = 0.01          ; pas pour commencer la minimisation (=1/10 angstrom)

```

```

gmx genion -s dummy.tpr -p 1BTA.top -o 1BTA_water_ions.gro \
-np 6 -pname "NA"

```

- OU Avec les versions plus récentes de GROMACS (v5.0.X), vous pouvez également lancer genion directement avec mini1.tpr :

```

gmx genion -s mini1.tpr -p 1BTA.top -o 1BTA_water_ions.gro \
-np 6 -pname "NA"

```

Cette ligne de commande indique à genion que vous voulez remplacer des molécules d'eau (choix 13, "SOL"). En effet, la charge initiale du système étant de -6, le programme remplace 6 molécules d'eau par 6 ions Na⁺. À la fin du fichier 1BTA.top, vérifiez que genion a bien inclus les 6 ions Na⁺.

- Cherchez dans le fichier 1BTA_water_ions.gro le nombre total de particules contenues dans le système.
- Visualisez le système complet avec VMD :

```
vmd 1BTA_water_ions.gro
```

Pour afficher les ions, dans la fenêtre VMD Main, cliquez sur Graphics puis Representations. Cliquez sur Create Rep. Dans le champ Selected Atoms, indiquez type NA puis dans Drawing Method, sélectionnez VDW.

1.7 Minimisation du système protéine + eau + ions

- Compilez et construisez le fichier .tpr

```

gmx grompp -f mini2.mdp -po mini2_out.mdp -p 1BTA.top \
-c 1BTA_water_ions.gro -o mini2.tpr

```

Le contenu du fichier mini2.mdp que vous téléchargerez depuis Didel est détaillé dans le listing ??.

Les critères d'arrêt de cette minimisation sont-ils les mêmes que précédemment ? Comme le système est maintenant électriquement neutre, on peut utiliser l'algorithme *Particle Mesh Ewald* (PME) pour calculer les interactions électrostatiques. Cet algorithme permet de prendre en compte les interactions électrostatiques à longue portée (au delà du *cutoff*).

- Lancez la minimisation :

```
gmx mdrun -v -deffnm mini2
```

Pourquoi la minimisation s'arrête-t-elle ? À combien de pas ?

Listing 2 – Fichier de paramètres mini2.mdp

```

1 title      = barstar
2 cpp        = /lib/cpp ; chemin du preprocesseur C
3 integrator = steep     ; algorithme de minimisation utilise
4             ; ici : steepest descent
5 nsteps     = 1000      ; nombre de pas de minimisation
6 nstxout    = 1         ; ecriture des coordonnees a chaque pas
7 ns_type    = grid      ; utilisation d'une grille pour optimiser
8             ; le calcul
9 ;
10 ; non bonded stuff
11 ;
12 cutoff_scheme = Verlett
13 nstlist       = 10    ; frequence de mise a jour de la liste des voisins
14             ; ici tous les 10 pas
15 coulombtype   = PME    ; algorithme de calcul des interactions electrostatiques
16             ; Particle Mesh Ewald (PME)
17 rlist         = 1.0    ; si d < rlist ; calcul tous les pas des interactions non liees
18 rcoulomb      = 1.0    ; cutoff pour les interactions de Coulomb
19 rvdw          = 1.0    ; cutoff pour les interactions de van der Waals
20 fourierspacing = 0.12 ; parametre PME
21 pme_order     = 4      ; parametre PME
22 ;
23 ; Energy minimizing stuff
24 ;
25 emtol = 1000.0          ; critere de convergence
26             ; force maximale exercee sur un atome en kJ/mol/nm
27 emstep = 0.01           ; pas pour commencer la minimisation (=1/10 angstrom)

```

- Visualisez ensuite la trajectoire de la minimisation avec VMD :

```
vmd 1BTA_water_ions.gro mini2.trr
```

Affichez les ions comme précédemment. Bougent-ils ?

2 Dynamique moléculaire d'équilibrage

À partir de la conformation obtenue à la fin de la dernière minimisation, nous allons maintenant lancer une dynamique moléculaire d'équilibrage après avoir déterminé les paramètres nécessaires. Lors de cette simulation, on initialise les vitesses tout en bloquant la protéine ce qui permet aux molécules d'eau de s'équilibrer.

Les conditions de la simulation sont les suivantes :

- pas d'intégration de 2 fs (avec contraintes des longueurs de liaison)
- temps de simulation de 10 ps d'équilibrage
- sauvegarde des coordonnées et des vitesses toutes les 20 ps dans le .trr
- sauvegarde des coordonnées toutes les ps dans le .xtc (format compressé)
- sauvegarde des énergies toutes les ps
- renouvellement de la liste des voisins tous les 10 pas
- cutoff de 1.0 nm pour les interactions non liées
- couplage de la température et de la pression avec l'algorithme de Berendsen (ensemble thermodynamique NPT)
- température de référence de 300 K et pression de référence de 1 bar
- graine aléatoire : nombre de votre choix pour initialiser les vitesses lors de l'étape d'équilibrage.

Le fichier md_eq.mdp contient les paramètres de la dynamique d'équilibrage. Téléchargez-le depuis Didel. Les différents paramètres sont commentés dans le listing ???. Assurez-vous de bien les comprendre.

- Un groupe « solvant », contenant à la fois l'eau et les ions, est créé pour le thermostat (voir le fichier md_eq.mdp), et ne pas laisser les 6 ions Na^+ tout seul (ce groupe est déjà défini dans le fichier index,

Listing 3 – Fichier de paramètres md_eq.mdp

```

1 define                = -DPOSRES ; position restraints
2 ; voir dans le fichier de topologie la section DPOSRES qui renvoie au fichier itp
3 constraints           = all-bonds ; contraintes sur les longueur de liaison
4                       ; rappel constraints != restraints
5 integrator            = md        ; algorithme utilise : dynamique moleculaire
6 tinit                 = 0.0        ; temps de depart = 0 ps
7 dt                    = 0.002      ; pas d'integration en ps
8                       ; valeur liee a "constraints = all-bonds"
9 nsteps                = 5000       ; total 10 ps
10 nstcomm               = 1          ; retrait du mouvement du centre de masse du systeme
11 nstxout               = 50000      ; freq d'ecriture des positions des atomes dans le .trr
12 nstvout               = 50000      ; freq d'ecriture des vitesses des atomes dans le .trr
13 nstfout               = 0          ; freq d'ecriture des forces (ici jamais)
14 nstxtcout             = 500        ; freq d'ecriture des positions des atomes dans le .xtc
15 xtc_precision         = 1000       ; niveau de precision pour l'ecriture dans les .xtc
16 nstlog                = 500        ; freq d'ecriture dans le .log
17 nstenergy             = 500        ; freq d'ecriture des energies dans le .edr
18 ; non bonded stuff
19 cutoff_scheme         = Verlett
20 nstlist                = 10         ; voir minimisation 2
21 coulombtype           = PME
22 rlist                 = 1.0
23 rcoulomb               = 1.0
24 rvdw                  = 1.0
25 fourierspacing        = 0.12
26 pme_order              = 4
27 ; Temperature coupling is on in 2 groups
28 Tcoupl                = Berendsen   ; algo complage a la temperature
29 tc-grps               = Protein Water_and_ions ; groupes pour les thermostats
30 tau_t                 = 0.1         0.1 ; temps de couplage a la temperature (en ps)
31 ref_t                 = 300         300 ; temperature de reference
32                       ; pour chaque groupe (en K)
33 ; Energy monitoring
34 energygrps            = Protein SOL NA ; groupes pour les calculs d'energies
35 ; Pressure coupling is on
36 Pcoupl                = Berendsen   ; algo complage a la pression
37 tau_p                 = 1.0         ; temps de couplage a la pression (en ps)
38 compressibility        = 4.5e-5      ; compressibilite du milieu (ici l'eau) (en bar-1)
39 ref_p                 = 1.0         ; pression de reference (en bar)
40 ; Generate velocities is on at 300 K.
41 gen_vel               = yes          ; initialisation des vitesses
42                       ; (suivant une distrib de Maxwell Boltzmann)
43 gen_temp               = 300.0       ; temperature de la distribution
44 gen_seed               = 231077     ; graine aleatoire pour initialiser les vitesses

```

il rassemble les molécules d'eau et les ions (voir la commande `make_ndx` pour lire la liste des groupes pré-définis par GROMACS) :

```
gmx make_ndx -f mini2.gro -n 1BTA.ndx
```

Vérifiez que les noms de groupes (pour les ions, pour le solvant et les ions) du fichier `1BTA.ndx` sont cohérents avec ceux indiqués dans le fichier `md_eq.mdp` (paramètres `tc-grps` et `energygrps`)

- Compilez et construisez le fichier `.tpr` :

```
gmx grompp -f md_eq.mdp -po md_eq_out.mdp -p 1BTA.top \
  -c mini2.gro -n 1BTA.ndx -o md_eq.tpr
```

- Lancez la dynamique d'équilibration :

```
gmx mdrun -v -deffnm md_eq
```

En plus des fichiers `.edr`, `.trr`, `.log` et `.gro`, un fichier `.xtc` est créé. Il contient les coordonnées du système en basse précision (mais pas les vitesses). Dans le fichier `md_eq.gro`, notez l'apparition de 3 colonnes supplémentaires correspondant aux vitesses pour chaque atome.

Remarque : La dynamique d'équilibration de 10 ps a été adaptée pour que la simulation puisse se faire pendant le TP. On réalise habituellement des dynamiques d'équilibration de 100 ps. Combien de temps aurait pris une telle simulation ? Pour vous aider, cherchez le mot clef `Performance` à la fin du fichier `md_eq.log`.

- Visualisez la dynamique moléculaire d'équilibration dans VMD :

```
vmd md_eq.gro md_eq.xtc
```

3 Dynamique moléculaire de production

Lorsque le système est équilibré, les contraintes sur les atomes de la protéine sont relâchées et on démarre la phase de production en réutilisant les coordonnées et les vitesses de la dernière conformation de la phase précédente. La phase de production nécessite généralement de bonnes ressources de calcul car elle dure beaucoup plus longtemps que la phase d'équilibration.

Les conditions de simulation sont les mêmes que pour la dynamique moléculaire d'équilibration, sauf pour les 3 points suivants :

- retirer les *position restraints* sur la protéine ;
- temps de simulation de 20 ns ;
- ne pas générer de nouvelles vitesses.

Quelles modifications faut-il apporter au fichier `md_eq.mdp` pour pouvoir réaliser la dynamique moléculaire de production (3 lignes à modifier) ?

- Copiez le fichier `md_eq.mdp` en `md.mdp` et modifiez ce dernier pour réaliser la dynamique moléculaire de production.
- Compilez et construisez un fichier `.tpr` à partir du fichier `md.mdp`.
- Lancez la dynamique moléculaire.
- Quand la simulation devrait-elle se terminer ? Est-ce réalisable pendant le TP ?
- Arrêtez alors votre simulation avec `Ctrl-C`.

À titre de comparaison, sur notre cluster du laboratoire, la dynamique de production de 20 ns a duré 20 h 30 min avec 8 coeurs Intel Xeon 2,53 Ghz Nehalem.

4 Analyses de la trajectoire de la dynamique moléculaire de production

Nous avons fait tourner la simulation pour vous sur le cluster de calcul de notre laboratoire. Vous allez analyser la simulation à partir de trois fichiers dont l'emplacement sera indiqué par vos enseignants :

- `md.edr`, contient les variables thermodynamiques (énergies, température, pression) toutes les 1 ps.
- `md_skip100.xtc`, contient les positions de tous les atomes (protéine, eau et ions) toutes les 100 ps.
- `md_prot_only_skip10.xtc`, contient les positions des atomes de la protéine uniquement, toutes les 10 ps.

Remarque : en réalité, la dynamique de production a généré le fichier `md.xtc` contenant la position de tous les atomes (protéine + eau + ions) enregistrées toutes les 1 ps. Ce fichier fait 1,3 Go et est trop lourd à

manipuler pour ce TP. Nous avons donc extrait du fichier `md.xtc` certaines informations pour construire les fichiers `md_skip100.xtc` (13 Mo) et `md_prot_only_skip10.xtc` (10 Mo).

4.1 Visualisation de la trajectoire

- Copiez dans votre répertoire de travail le fichier `md_skip100.xtc` et le fichier `md_start.pdb` qui contient la conformation du système complet en début de dynamique.
 - Visualisez la trajectoire du système complet (protéine + eau + ions) :
`vmd md_start.pdb md_skip100.xtc`
 - La protéine diffuse-t-elle ? Sort-elle de la boîte ? Comment bougent les ions ?
 - Copiez dans votre répertoire de travail le fichier `md_prot_only_skip10.xtc` et le fichier `md_start_prot_only.pdb` qui contient la protéine seule en début de dynamique.
 - Visualisez ensuite la trajectoire de la protéine :
`vmd md_start_prot_only.pdb md_prot_only_skip10.xtc`
 Affichez la protéine dans la représentation *cartoon*. Les structures secondaires vous semblent-elles stables ? Affichez également l'Asp39 et observez son mouvement.
- Remarque : pour cette trajectoire, la protéine a été, à chaque fois, recentrée dans la boîte.

4.2 Énergies

- Copiez dans votre répertoire de travail le fichier `md.edr`.
- Utilisez le programme `g_energy` pour extraire les énergies :
`gmx g_energy -f md.edr -o energy.xvg`
 Sélectionnez les énergies potentielles (Potential, choix 9), cinétiques (Kinetic-En., choix 10) et totales (Total-Energy, choix 11). Appuyez une fois supplémentaire sur Entrée pour lancer le calcul.
- Visualisez l'évolution des énergies en fonction du temps de simulation avec le programme `xmgrace` :
`xmgrace -nxy energy.xvg`
 L'option `-nxy` est utilisée pour charger un fichier de données avec plusieurs colonnes. Dans `xmgrace`, le bouton `AutoO` permet de zoomer sur une courbe sélectionnée. Le bouton `As` permet de zoomer sur toutes les courbes.
- Comment évoluent les différentes énergies ?
- En utilisant une des propriétés de l'énergie cinétique, vous devez être capables d'identifier chacune des 3 courbes (sans avoir besoin de la légende).

4.3 Température

- Utilisez une commande similaire à la précédente :
`gmx g_energy -f md.edr -o temperature.xvg`
 Sélectionnez cette fois la température (Temperature, choix 12).
- Utilisez `xmgrace` pour tracer l'évolution de la température en fonction du temps de simulation
`xmgrace temperature.xvg`
- Commentez l'évolution de la température. Est-ce en accord avec l'ensemble thermodynamique utilisé ? Dans le menu `Edit`, puis `Data sets`, sélectionnez le jeu de données `G0.S0[2][20001]` et notez les valeurs min, max, la moyenne (*Mean*) et l'écart-type (*Stdev*) de la température.

4.4 Pression

- De manière similaire, analysez l'évolution de la pression en fonction du temps de simulation.
`gmx g_energy -f md.edr -o pression.xvg`
 Sélectionnez cette fois la pression (Pressure).
- Commentez l'évolution de la pression au cours de la simulation.
- Quelle est la valeur moyenne ? L'écart-type ? Est-ce en accord avec l'ensemble thermodynamique utilisé ? Les fluctuations vous paraissent-elles réalistes ?

4.5 Écart quadratique moyen (RMSD)

Le RMSD mesure l'écart entre chaque structure de la trajectoire et une structure de référence, qui est souvent la structure initiale.

Le calcul du RMSD nécessite deux étapes :

1. alignement des deux structures pour s'affranchir de la rotation et de la translation ;
2. calcul du RMSD à proprement dit.

Le programme à employer est `g_rms` auquel il faut préciser le groupe d'atomes utilisé pour l'alignement et le groupe d'atomes utilisé pour le calcul du RMSD. Ici, il s'agira des carbones alpha (choix 3) dans les deux cas.

```
gmx g_rms -f md_prot_only_skip10.xtc -s md.tpr -o rmsd.xvg
```

Commentez l'évolution du RMSD en fonction du temps de simulation ? La simulation semble-t-elle avoir convergée ? Vers quelle valeur de RMSD ?

4.6 Rayon de giration

Le rayon de giration mesure la compacité de la protéine.

```
gmx g_gyr -f md_prot_only_skip10.xtc -s md.tpr -o rgyr.xvg
```

Commentez l'évolution du rayon de giration en fonction du temps de simulation ? Vers quelle valeur le rayon de giration converge-t-il ? Est-il stable ?

4.7 Fluctuations atomiques (RMSF)

Les fluctuations atomiques donnent une information sur la mobilité des atomes. Elles quantifient les mouvements des atomes autour de leur position d'équilibre.

```
gmx g_rmsf -f md_prot_only_skip10.xtc -s md.tpr -o rmsf.xvg
```

Sélectionnez ici uniquement les carbones alphas (choix 3). Quels sont les carbones alpha les plus mobiles ? Sur quelles parties de la protéine se trouvent-ils ? Pourquoi le RMSF des atomes des extrémités Nter et Cter est-il important ?

4.8 Carte des structures secondaires

- Téléchargez la carte des structures secondaires `ss.pdf` depuis Didel.
- Comment évoluent les différentes structures secondaires au cours du temps ?
- Remarquez la zone qui correspond aux résidus 60 à 68. Mettez-la en relation avec l'évolution des fluctuations atomiques.
- Remarquez ce qui se passe vers 13 ns pour les résidus 60 à 64. Reliez votre observation à l'évolution de l'écart quadratique moyen au cours du temps.
- Visualisez la trajectoire de la protéine seule avec VMD en vous concentrant sur les résidus 60 à 64. Vous pouvez isoler ces résidus en entrant `resid 60 to 64` dans le champ `Selected Atoms` puis en sélectionnant une représentation (`Drawing Method`) et une coloration (`Coloring Method`) adaptée.

4.9 Angles χ_1 et χ_2 des résidus de la barstar

Vous allez maintenant étudier l'évolution des angles χ_1 et χ_2 des résidues de la barstar au cours de la dynamique moléculaire.

- Créez d'abord un répertoire `chi` dans lequel vous ferez cette analyse. Allez dans ce répertoire.
- Lancez la commande suivante :

```
gmx g_chi -f ../md_prot_only_skip10.xtc -s ../md.tpr -rama -maxchi 2
```

- Vérifiez que de nombreux fichiers ont ainsi été générés.
- Affichez avec xmgrace, le fichier qui concerne les angles χ_1 et χ_2 de l'Asp39.
- En début de simulation, les valeurs des angles $\{\chi_1 ; \chi_2\}$ de l'Asp39 sont $\{-83 ; 147\}$. Dans le complexe barstar / barnase, les angles $\{\chi_1 ; \chi_2\}$ de l'Asp39 valent $\{177 ; 59\}$. Au cours de la dynamique, l'Asp39 adopte-t-il une conformation favorable à la création du complexe barstar/barnase ? Pour répondre à cette question, vous pouvez déplacer votre curseur dans xmgrace de façon à ce que ses coordonnées (indiquées en haut à gauche) correspondent aux valeurs recherchées et ainsi voir si le curseur est sur un point, donc une conformation rencontrée pendant la simulation.